

**Das Adapterprotein SLy1 -
Ein Zelltyp-spezifischer Regulator des Immunsystems**

Dissertation

Der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat)

vorgelegt von
Daniel Schäll
aus Kursk (Russland)

Tübingen

2015

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen

Tag der mündlichen Qualifikation

26.10.2015

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter

PD Dr. Sandra Beer-Hammer

2. Berichterstatter

Prof. Dr. Peter Ruth

Zusammenfassung

Das SH3-Lymphozytenprotein 1 (SLy1) ist Teil der SLy-Familie von drei hoch homologen Adapterproteinen. SLy1 weist die zwei Protein-Protein-Interaktionsdomänen SAM (*sterile alpha motive*) und SH3 (*Scr homology 3*) auf und wird ausschließlich in Lymphozyten exprimiert. Die T-Zell-Rezeptor- (TZR) Stimulation führt zur Phosphorylierung von SLy1 an Ser27, die auf eine Einordnung von SLy1 in den TZR-Signalweg vermuten lässt. Die Bedeutung von SLy1 in der Regulation des Immunsystems wurde in SLy1 Knockout (KO) Mäusen demonstriert, die eine massive Beeinträchtigung in der Thymozytenentwicklung zeigen. Eine erhöhte Apoptose in SLy1 KO Thymozyten konnte in der vorliegenden Arbeit durch die Verwendung von Bcl-2- (*B-cell lymphoma 2*) überexprimierenden Tieren als Ursache ausgeschlossen werden. Die Thymozytenanalyse von RAG1 (*recombination-activating gene 1*) KO Mäusen brachte zudem den Hinweis, dass SLy1 nicht in den Notch-Signalweg einzuordnen ist. Stattdessen konnte die Zellzahlreduktion in SLy1 KO Thymozyten teilweise durch eine Bcl-2 induzierte Hochregulation der Zellzyklusinhibierenden Gene *p27* und *p130* erklärt werden. Da Bcl-2 ein wichtiger Bestandteil des IL-7/IL-7R-Signalweges ist, wurde hier der erste Hinweis geliefert, dass SLy1 die Thymozytenentwicklung über die Beteiligung an der IL-7/IL-7R-Signalkaskade steuert.

Für SLy1 wurde bereits eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von T- und B-Zell-Immunantwort gezeigt. Die Infektion mit *Listeria monocytogenes* ergab in der vorliegenden Arbeit eine erhöhte Anfälligkeit von SLy1 KO Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Kontrollen, welche auf einer gehemmten adaptiven T-Zell-Antwort beruhte. Als Ursache konnte ein neuer potenzieller Mechanismus der SLy1-abhängigen Regulation der T-Zell-Proliferation gefunden werden. Die SLy1-Deletion führt zu einer veränderten Foxo1- (*forkhead-box O1*) Regulation, die eine Inhibierung des Zellzyklus verursacht und somit die T-Zell-Proliferation sowohl *ex vivo* als auch *in vivo* hemmt.

Die vorliegende Arbeit zeigt mechanistische Details zur Rolle von SLy1 in der Steuerung des Immunsystems, die in verschiedenen Geweben und Zellen über unterschiedliche Signalwege reguliert wird.

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	VIII
Abbildungsverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.1.1 Die Entwicklung der Thymozyten	1
1.1.2 Notch-Signalweg.....	3
1.1.3 IL-7/IL-7R-Signalweg.....	4
1.2 Die <i>Listeria monocytogenes</i> (LM) Infektion.....	4
1.2.1 Die Pathogenese	5
1.2.2 Die angeborene Immunantwort.....	6
1.2.3 Die adaptive Immunantwort.....	8
1.3 Fox- (<i>forkhead-box</i>) Familie	9
1.3.1 Foxo- (<i>forkhead-box O</i>) Familie	9
1.3.1.1 Regulation der subzellulären Lokalisation von Foxo	10
1.3.1.2 Regulation der Foxo-Proteinlevel	11
1.4 Zellzyklus	12
1.4.1 Zellzyklusinhibierung.....	13
1.4.2 Die Ink4-Familie	13
1.4.3 Cip/Kip-Familie	13
1.4.4 Pocket-Proteine	14
1.5 Die SLy-Protein-Familie	15
1.5.1 SLy1-Protein	15
1.6 Zielsetzung der Arbeit	18

2	Materialien	19
2.1	Geräte.....	19
2.2	Verbrauchsmaterial.....	19
2.3	Puffer, Lösungen und Medien	20
2.4	Chemikalien und Kits	23
2.5	Primer	25
2.6	Antikörper.....	27
2.6.1	Primäre Antikörper.....	27
2.6.2	Sekundäre Antikörper	27
2.6.3	Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper	28
2.7	Plasmide.....	28
3	Methoden	29
3.1	Statistische Analysen	29
3.2	Tierexperimente.....	29
3.2.1	Zucht von genveränderten Mäusen	29
3.2.2	Auswahlkriterien	29
3.2.3	Infektion mit LM.....	30
3.2.4	Präparation der Lymphorgane und Serumentnahme	30
3.2.5	Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (CFU).....	30
3.3	Molekularbiologische Methoden.....	31
3.3.1	Maus-Genotypisierung	31
3.3.2	Quantitative Real-Time PCR	34
3.3.2.1	RNA-Isolation.....	34
3.3.2.2	cDNS-Synthese	34
3.3.2.3	qPCR.....	34
3.3.3	Amplifizierung und Herstellung von Plasmid-DNS	35
3.3.3.1	Transformation von kompetenten Bakterien	36

3.3.3.2	Plasmid Präparation	36
3.4	Zellbiologische Methoden	36
3.4.1	OP9 und HEK293T Zellkultur	36
3.4.2	<i>In vitro</i> Differenzierung von Thymozyten	37
3.4.3	Transfektion mit Kalzium-Phosphat	37
3.4.4	ELISA (<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>).....	37
3.4.5	MACS (<i>magnetic activated cell sorting</i>)	37
3.4.5.1	Aufreinigung von SLy1 KO und SLy1 KO x Bcl-2 TG Thymozyten.....	37
3.4.5.2	Aufreinigung von SLy1 KO x RAG1 KO Thymozyten	38
3.4.6	<i>Ex vivo</i> Stimulation	38
3.4.7	CFSE-Färbung.....	39
3.4.8	Durchflusszytometrie (FACS).....	39
3.4.8.1	Kompensationskontrollen	39
3.4.8.2	Oberflächenfärbung	40
3.4.8.3	Intrazelluläre Färbung	40
3.5	Proteinbiochemische Methoden	40
3.5.1	Proteinlyse	40
3.5.2	Proteinkonzentrationsbestimmung und SDS-Probenvorbereitung.....	41
3.5.3	Western Blot.....	41
3.5.4	Immunpräzipitation	41
4	Ergebnisse	43
4.1	Thymozytenentwicklung in SLy1 KO Mäusen	43
4.1.1	Thymozytenentwicklung in RAG1-defizienten Mäusen.....	44
4.1.2	Thymozytenentwicklung in Bcl-2-überexprimierenden Mäusen.....	46
4.2	Infektionsanalysen in SLy1 KO Mäusen.....	48
4.2.1	LM-Infektion in SLy1 KO Mäusen.....	48
4.2.2	Analyse des angeboren Immunsystems.....	50

4.2.3	Differenzierung der T-Zellen des adaptiven Immunsystems	52
4.2.4	Reduzierte Proliferation von SLy1 KO T-Zellen.....	54
4.3	<i>Ex vivo</i> Untersuchungen mit SLy1 KO T-Zellen	58
4.3.1	IL-2/IL-2R-Signaltransduktion in SLy1 KO T-Zellen.....	60
4.3.2	Expression von Zellzyklusinhibierenden Genen in SLy1 KO T-Zellen	61
4.3.3	Unveränderte <i>Foxo1</i> - und <i>Foxo3</i> -Expression in SLy1 KO T-Zellen.....	64
4.3.4	Eine beschleunigte <i>Foxo1</i> -Dephosphorylierung in SLy1 KO T-Zellen.....	65
4.3.5	Interaktionsanalyse zwischen SLy1 und <i>Foxo1</i>	68
4.4	Untersuchung des Proliferationsdefekts in SLy1 KO Thymozyten	70
4.4.1	Expressionsanalyse der Zellzyklus-Gene im Thymus	70
4.4.2	Unbeeinträchtigte <i>Foxo</i> -Regulation in SLy1 KO Thymozyten	71
4.4.3	Veränderte <i>Bcl-2</i> -Expression in SLy1 KO Thymozyten	72
5	Diskussion	75
5.1	Die SLy1-abhängige Regulation der T-Zell-Proliferation.....	75
5.1.1	Die Rolle von SLy1 während einer LM-Infektion	75
5.1.2	SLy1 in der Regulation der T-Zell-Proliferation.....	76
5.1.3	Wie reguliert SLy1 die <i>Foxo1</i> -Lokalisation?.....	78
5.2	Die Rolle von SLy1 in der Thymozytenentwicklung.....	81
5.2.1	SLy1 reguliert den Zellzyklus von Thymozyten.....	81
5.2.2	Die Einbindung von SLy1 in den IL-7/IL-7R-Signalweg.....	83
5.2.3	Die Thymozytenentwicklung mit Hilfe des OP9 Systems.....	85
5.3	Perspektive und klinische Relevanz von SLy1.....	86
	Literaturverzeichnis	89
	Danke	99
	Eidesstattliche Erklärung	100
	Lebenslauf	101

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte	19
Tabelle 2: Verbrauchsmaterial	20
Tabelle 3: Chemikalien	23
Tabelle 4: Kits	24
Tabelle 5: PCR-Primer	25
Tabelle 6: Primäre Antikörper.....	27
Tabelle 7: Sekundäre Antikörper	27
Tabelle 8: Fluoreszenz-gekoppelte anti-Maus Antikörper.....	28
Tabelle 9: SLy1 KO PCR-Programm.....	31
Tabelle 10: SLy1 KO PCR-Mastermix	32
Tabelle 11: Bcl-2 TG PCR-Programm.....	32
Tabelle 12: Bcl-2 TG PCR-Mastermix	33
Tabelle 13: RAG1 KO PCR-Programm.....	33
Tabelle 14: RAG1 KO PCR-Mastermix	34
Tabelle 15: qPCR-Programm	35
Tabelle 16: qPCR-Mastermix.....	35

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stadien der $\alpha\beta$ -Thymozytenentwicklung.	3
Abbildung 2: Immunantwort auf die LM-Infektion.	7
Abbildung 3: Zellzyklus und regulatorische Familien der CKIs.	12
Abbildung 4: Schematische Darstellung des SLy1-Proteins.	16
Abbildung 5: Differenzierung der DN-Thymozyten auf OP9-DL1-Zellen.	44
Abbildung 6: Thymozyten-Zellzahlen in SLy1 KO und SLy1 KO x RAG1 KO Mäusen.	45
Abbildung 7: Apoptose-Analyse in SLy1 KO x RAG1 KO Thymozyten.	46
Abbildung 8: Thymozyten-Zellzahlen in SLy1 KO und SLy1 KO x Bcl-2 TG Mäusen.	47
Abbildung 9: Differenzierung und Expansion der SLy1 KO x Bcl-2 TG Thymozyten.	48
Abbildung 10: LM-Infektion in SLy1 KO Mäusen.	49
Abbildung 11: Analyse der Makrophagen-Aktivierung.	50
Abbildung 12: Analyse der NK-Zellen-Aktivierung.	51
Abbildung 13: Differenzierung der CD8 ⁺ T-Zellen des adaptiven Immunsystems.	53
Abbildung 14: Differenzierung der CD4 ⁺ T-Zellen des adaptiven Immunsystems.	54
Abbildung 15: T-Zell-Zahlanalyse nach der LM-Infektion.	55
Abbildung 16: Apoptoseanalyse der T-Zellen.	56
Abbildung 17: Expansionsanalyse der CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen.	57
Abbildung 18: Bakterientiterbestimmung nach LM-Infektion.	58
Abbildung 19: <i>Ex vivo</i> Ki-67-Proliferationsanalyse.	59
Abbildung 20: <i>Ex vivo</i> CFSE-Proliferationsanalyse.	59
Abbildung 21: Analyse der IL-2/IL-2R-Signaltransduktion.	60
Abbildung 22: Zellzyklusanalyse in T-Zellen.	62
Abbildung 23: Expressionsanalyse von <i>p130</i> und <i>p27</i>	63
Abbildung 24: Expressionsanalyse von <i>p16</i> und <i>p18</i>	64
Abbildung 25: Genexpression von Foxo-Proteinen.	65
Abbildung 26: Foxo3-Phosphorylierungsanalyse.	66
Abbildung 27: Foxo1-Phosphorylierungsanalyse.	67
Abbildung 28: Lokalisationsanalyse von Foxo1.	68
Abbildung 29: Interaktionsanalyse von SLy1 mit Foxo1.	69
Abbildung 30: Expressionsanalyse von <i>p130</i> und <i>p27</i>	71

Abbildung 31: Foxo1- und Foxo3-Regulationsanalyse im Thymus.	72
Abbildung 32: Einfluss der Bcl-2-Überexpression auf die Thymozytenentwicklung.	73
Abbildung 33: Bcl-2- und IL-7R α -Expressionsanalyse im Thymus.....	74
Abbildung 34: CD8-Differenzierung und T _{reg} -Analyse nach LM-Infektion.	78
Abbildung 35: Schematische Darstellung der SLy1-abhängigen Foxo1-Regulation.	80
Abbildung 36: <i>SLy1</i> -Expression in humanen PBMC-Proben.	88

Abkürzungsverzeichnis

ABB	<i>antibody dilution buffer</i>
ALL	Akute lymphatische Leukämie
APC	Antigenpräsentierende Zellen
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BHI	<i>brain-heart infusion</i>
BSA	Rinderserumalbumin
cDNS	komplementäre DNS
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
CFSE	5(6)-Carboxyfluoresceindiacetat Succinimidylester
CFU	koloniebildende Einheit
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
Cip/Kip	<i>CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein</i>
CKI	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor protein</i>
CXCL12	<i>C-X-C motif chemokine 12</i>
CXCR4	<i>C-X-C chemokine receptor type 4</i>
DC	Dendritische Zellen
DL1	<i>Delta-Like-1</i>
DN	doppelt negativ
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DP	doppelt positiv
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
FACS	Durchflusszytometrie
FCS	fötales Kälberserum
Fox	<i>forkhead-box</i>
HA	Hämagglutinin
HRP	Meerrettichperoxidase
IFN γ	Interferon- γ
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin

Ink4	<i>inhibitor of CDK4</i>
i.p.	intraperitoneal
IP	Immunpräzipitation
kDa	Kilo Dalton
KO	Knockout
Ko-IP	Ko-Immunpräzipitation
LM	<i>Listeria monocytogenes</i>
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NLS	Kernlokalisierungssignal
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
p	phospho
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pi	nach Infektion
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PP2A	Protein-Phosphatase 2A
qPCR	quantitative Real-Time PCR
R	Rezeptor
RAG	<i>recombination-activating gene</i>
Rb	Retinoblastom
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SAM	<i>sterile alpha motive</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
Ser	Serin
SH3	<i>Src homology 3</i>
SLy	SH3-Lymphozytenprotein

SP	einfach positiv
TG	Transgen
T _H 1	Typ1-T-Helferzellen
TNF α	Tumornekrosefaktor- α
T _{reg}	regulatorische T-Zellen
Thr	Threonin
TZR	T-Zell-Rezeptor
ÜN	über Nacht
WB	Western Blot
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein komplexes Netzwerk aus lymphatischen Organen, Zellen, humoralen Faktoren und Zytokinen mit der Aufgabe den Körper vor Eindringlingen zu schützen. Dabei lässt sich das Immunsystem abhängig von der Geschwindigkeit und Spezifität in zwei Bestandteile aufteilen. Das angeborene Immunsystem bietet einen sofortigen Schutz gegen Pathogene und ermöglicht dadurch die Generierung einer spezifischen adaptiven T- und B-Zell-Antwort. Die Reifung der T-Zellen zu den Immunzellen des adaptiven Immunsystems sowie der Verlauf beider Immunantworten während einer *Listeria monocytogenes* (LM) Infektion sollen im nachfolgenden näher ausgeführt werden.

1.1.1 Die Entwicklung der Thymozyten

CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sind wichtige Bestandteile des adaptiven Immunsystems und können als Killer, Regulatoren oder Produzenten von spezifischen Zytokinen agieren [1]. Dabei dienen die CD4- und CD8-Moleküle als Corezeptoren während der Interaktion vom T-Zell-Rezeptor (TZR) mit Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekülen (MHC) von Antigenpräsentierenden Zellen (APC), die fremde Peptide auf der Oberfläche präsentieren. Gleichzeitig wird die Expression von CD4 und CD8 zur Definition der verschiedenen T-Zell-Entwicklungsstadien, die im Thymus während der T-Zell-Reifung durchlaufen werden, genutzt.

Unreife Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, die in den Thymus über den Blutstrom einwandern, tragen kein CD4 und CD8 auf der Oberfläche und werden daher doppelt negativ (DN) genannt (Abb. 1). Die DN-Population macht ca. 1-5 % der gesamten Thymozytenpopulation aus und lässt sich weiter anhand der CD25/CD44 Expression in vier Stadien (DN1-DN4) unterteilen [2]. Im DN2-Stadium beginnt die Umlagerung des *TZRβ*-Gens, welches im DN3-Stadium endet. Eine erfolgreiche Genumlagerung und die Expression der TZRβ-Untereinheit führt zu einer Komplexbildung mit prä-TZRα zum prä-TZR, dessen Signal in einer massiven Proliferation und Expansion dieser Thymozyten resultiert. Wie in Mäusen mit einem genetischen Defekt in *RAG1/2*, *TZRβ*, *prä-TZRα* oder *Syk/Zap70* [3] beobachtet wurde, erfahren Zellen, die unfähig sind einen funktionalen prä-TZR auszubilden,

einen Entwicklungsarrest und Proliferationsstopp in diesem Stadium. Dieser Prozess, bei dem zwischen funktionalen und nicht funktionalen Thymozyten unterschieden wird, wird auch β -Selektion genannt.

Das Signal durch den prä-TZR führt nicht nur zur Proliferation und Expansion der DN-Thymozyten, sondern auch zur Umlagerung des *TZR α* -Gens und zur CD4- und CD8-Expression und somit zum Fortschreiten in das nächste Entwicklungsstadium. Dieses Stadium ist gekennzeichnet durch die gleichzeitige Expression von CD4 und CD8 und wird somit doppelt positiv (DP) genannt. DP-Thymozyten machen ca. 80-90% der gesamten Thymozytenpopulation aus. Die erfolgreiche Umlagerung des *TZR α* -Gens führt zur Expression des reifen TZR $\alpha\beta$ -Komplexes auf der Oberfläche der DP-Thymozyten. Die Weiterentwicklung zu einfach positiven (SP) CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen ist von einem funktionalen TZR $\alpha\beta$ abhängig. Die positive [4] und negative [5] Selektion stellen dabei sicher, dass nur die wenigen DP-Zellen, die mit angemessener Stärke an eigene intrathymische MHC/Peptide binden, sich zu SP-T-Zellen entwickeln dürfen. [6]. DP-Thymozyten, die kein TZR $\alpha\beta$ -Signal aufgrund eines nicht funktionalen Rezeptorkomplexes erhalten, sterben innerhalb weniger Tage. Im Gegensatz dazu führt eine zu starke Bindung vom TZR $\alpha\beta$ an eigene MHC/Peptide zum TZR-induzierten Zelltod. Dadurch verhindert der Prozess der negativen Selektion die Entstehung von autoreaktiven T-Zellen. Somit werden nur die wenigen DP-Thymozyten zur Weiterentwicklung zu SP-T-Zellen selektioniert, die mit richtiger Stärke an eigene MHC/Peptide binden. Nach der erfolgreichen positiven Selektion verlassen ausgereifte CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen den Thymus in die peripheren Lymphorgane.

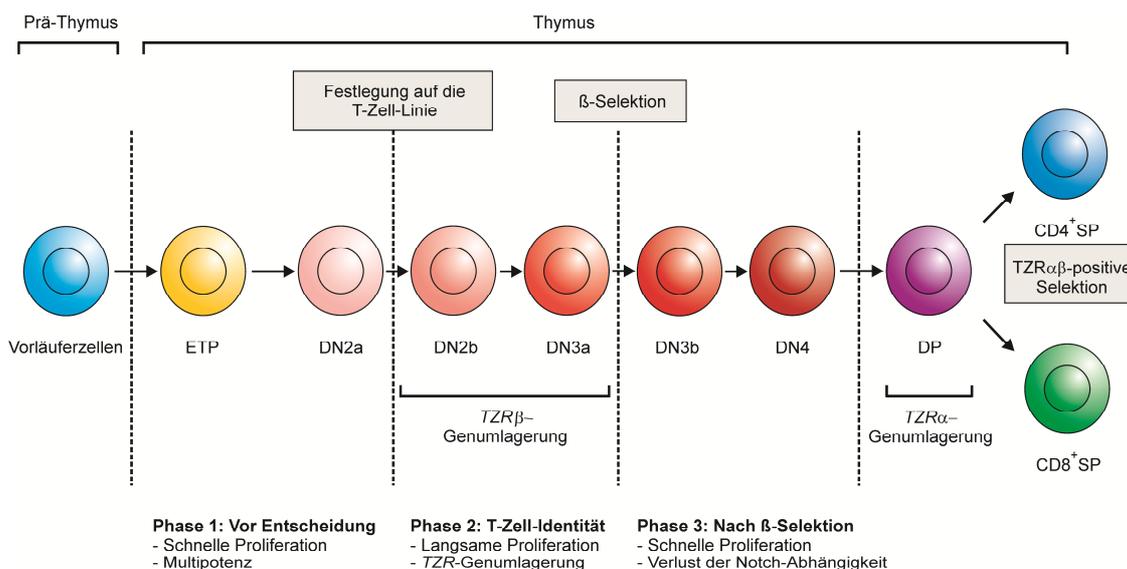


Abbildung 1: Stadien der $\alpha\beta$ -Thymozytenentwicklung.

Die T-Zell-Entwicklung beginnt mit dem Einwandern von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in den Thymus. Dabei durchlaufen die Thymozyten verschiedene Reifestadien von ETP (*early thymic progenitors*) über DN und DP schließlich zu CD4⁺ und CD8⁺ SP. Die Entwicklung von funktionalen T-Zellen stellen dabei β -Selektion und positive und negative Selektion sicher (modifiziert nach [7]).

1.1.2 Notch-Signalweg

Notch-Signale spielen im Verlauf der gesamten Thymozytenentwicklung eine wichtige Rolle. In Säugetieren gibt es vier Notch-Rezeptoren (Notch1-4), die mit fünf Liganden (DL1, DL3, DL4 und Jagged1-2) interagieren. In der frühen Phase der Thymozytenreifung begünstigt die Expression des Notch-Rezeptors die Differenzierung der Vorläuferzellen in Richtung T-Zelle. Die ersten Hinweise dafür wurden durch Gain- und Loss-of-function-Studien erbracht. Eine Inaktivierung der Notch1-Rezeptor-Expression in hämatopoetischen Vorläuferzellen führte zur vollständigen Blockade der Thymozytenentwicklung, mit gleichzeitiger Anhäufung von B-Zellen im Thymus [8, 9]. Im Vergleich dazu führte die konstitutive Expression von Notch-Rezeptoren zu T-Zell-Reifung im Knochenmark, während die B-Zell-Entwicklung unterdrückt wurde [10].

Eine weitere essentielle Rolle spielen Notch-Rezeptoren zusammen mit dem prä-TZR während der β -Selektion [11]. Dabei ist die gemeinsame Signalgebung für den Übergang von entscheidender Bedeutung. Unreife Thymozyten, denen das Notch-Rezeptor-Protein fehlt, können trotz Überexpression von TZR β oder TZR $\alpha\beta$ die β -Selektion nicht überwinden [12].

Gleichzeitig können RAG2- (*recombination-activating gene 2*) defiziente Thymozyten, welchen der prä-TZR fehlt, nicht über das DP-Stadium hinaus differenzieren, obwohl Notch vollständig funktional ist [13]. Sobald die Thymozyten die β -Selektion überwunden haben, sorgt Notch für das Überleben der Zellen in dem es den Glucose-Metabolismus reguliert [14]. Im späteren Verlauf der T-Zell-Entwicklung wird die Dichte der Notch-Rezeptoren langsam reduziert.

1.1.3 IL-7/IL-7R-Signalweg

Ein weiterer wichtiger Signalweg während der Thymozytenentwicklung ist der IL-7/IL-7R-Signalweg. Interessanterweise wird IL-7R α stark in DN- und SP-Zellen exprimiert, aber während dem DP-Stadium herunter reguliert [15]. Die Wichtigkeit des IL-7/IL-7R-Signalweges wurde in IL-7 und IL-7R α Knockout (KO) Mäusen gezeigt, die beide stark reduzierte Thymozytenzahlen und eine Differenzierungsblockade im DN-Stadium aufweisen [16, 17]. Die IL-7/IL-7R-Signalgebung sorgt für das Überleben der Thymozyten durch die Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) und entsprechend kann eine Überexpression von Bcl-2 in IL-7R α KO Mäusen die Zellzahlen wiederherstellen [18]. Im Gegensatz dazu ist die für die Differenzierung der DN-Zellen wichtige TZR-Genumlagerung vollständig auf das IL-7R-Signal angewiesen und kann durch den Schutz vor Apoptose nicht kompensiert werden [18]. Im SP-Stadium regelt die IL-7/IL-7R-Signalgebung das Überleben und die Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, die in sekundäre Lymphorgane auswandern und als Teil der adaptiven Immunantwort eine wichtige Barriere gegen intrazelluläre Infektionen darstellen.

1.2 Die *Listeria monocytogenes* (LM) Infektion

Die ersten Berichte über LM stammen aus dem Jahr 1926, die ein gram-positives Bakterium als die Ursache für das Sterben einiger Kaninchen-Kolonien beschrieben [19]. Dadurch dass die Tiere eine deutliche Monozytose entwickelten, wurde das Bakterium *Bakterium monocytogenes* getauft. Ungefähr zur gleichen Zeit wurde in Südafrika ein Bericht über ein gram-positives Bakterium verfasst, das eine tödlich verlaufende Krankheit in wilden Gerbils auslöste [20]. All diese Tiere starben an einer Nekrotisierung der Leber und zu Ehren des britischen Chirurgen Joseph Lister wurde der Organismus *Listerella hepatolytica* genannt.

Erst später entdeckte man, dass es sich in beiden Fällen um ein und denselben Organismus handelte und gab diesem als Kompromiss den Namen *Listeria monocytogenes*.

Kontaminationen mit LM sind bevorzugt in unverarbeiteten Lebensmitteln zu finden, wie etwa nicht pasteurisierte Milch und deren Produkte oder rohem Fleisch. Über diesen Weg kann eine Übertragung auf den Menschen und folglich eine Infektion zustande kommen. Besonders anfällig sind immundefiziente Menschen, die eine Sepsis und Meningitis entwickeln können [21], sowie schwangere Frauen, die eine Chorioamnionitis (eine Infektion des Plazenta-Gewebes und des Fruchtwassers) und eine schwere Infektion des Föten entwickeln können.

In der medizinischen Grundlagenforschung ist dieser Organismus wegen seiner guten Charakterisierung und der Eignung für Maus-Infektionsmodelle sehr beliebt. Die Infektion von Mäusen hat gezeigt, dass sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem notwendig sind um das Bakterium zu bekämpfen. Somit eignet sich das Bakterium ideal um das Immunsystem in allen Einzelheiten zu studieren.

1.2.1 Die Pathogenese

Der natürliche Infektionsweg des LM ist über den Gastrointestinaltrakt. Dabei infiziert LM intestinale Epithelzellen durch die Interaktion von Internalin A, welches auf der Zelloberfläche des Bakteriums exprimiert wird, mit E-Cadherin, welches auf der Zelloberfläche der Epithelzellen exprimiert wird [22]. LM überquert die Epithelzellschicht, tritt in den Blutkreislauf ein und befällt andere Organe wie Leber und Milz, wo es von den dort ansässigen Makrophagen phagozytiert wird. Nach der Zellinvasion kann LM das Phagosom verlassen, indem es Listeriolysin freisetzt, einen virulenten Faktor der die phagosomale Membran zerstört [23]. Die Mobilität des LM im Zytosol der Wirtszelle wird durch die Expression des Aktinreorganisatorproteins ermöglicht. Das bakterielle Aktinreorganisatorprotein initiiert dabei eine *de novo* Bildung von Aktinfilamenten, die das Bakterium durch das Zytosol bewegen und den Befall von Nachbarszellen ermöglichen [24, 25]. Die intrazelluläre Mobilität ist für die Virulenz des LM verantwortlich. Obwohl der natürliche Infektionsweg von LM über die Aufnahme von Epithelzellen erfolgt, wird in der wissenschaftlichen Anwendung meist die intravenöse oder intraperitoneale (i.p.) Infektionsroute bevorzugt, um eine systemische Infektion auszulösen.

1.2.2 Die angeborene Immunantwort

Mehrere Zelltypen des angeborenen Immunsystems sind an der frühen LM-Bekämpfung beteiligt. Neutrophile Zellen, Makrophagen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Dendritische Zellen (DC) stellen dabei die erste Abwehrbarriere dar.

Innerhalb der ersten Stunden nach der Infektion sind Neutrophile die ersten Zellen, die den Infektionsort erreichen (Abb. 2). Angelockt werden sie durch Chemokine, die von infizierten Zellen sezerniert werden [26, 27]. Neutrophile phagozytieren LM und produzieren im Gegenzug Stickstoffmonoxid (NO) und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) um intrazelluläre Bakterien zu töten. Die Wichtigkeit der Neutrophilen wurde in Neutrophilen-defizienten Mäusen gezeigt, die eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber LM zeigten und sowohl in der Leber als auch in der Milz erhöhte LM-Lasten aufwiesen [28, 29]. Interessanterweise spielen die Neutrophilen eine viel wichtigere Rolle in der Leber als in der Milz [26].

Ansässige Makrophagen spielen ebenfalls eine wichtige Rolle während der LM-Infektion. LM-befallene Makrophagen sezernieren IL-12 und Tumornekrosefaktor- α (TNF α) um die NK-Zellen zu aktivieren [30]. NK-Zellen sind in den ersten Tagen der LM-Infektion die Hauptquelle der Interferon- γ - (IFN γ) Produktion. Das produzierte IFN γ aktiviert im Gegenzug die Makrophagen und Neutrophile bakterizides NO und ROS auszustoßen.

Unreife DCs, die sich im peripheren Gewebe befinden, haben eine enorme phagozytotische Aktivität, sind aber nicht in der Lage reife T-Zellen zu aktivieren. Sobald die DCs ein Antigen aufnehmen, durchlaufen sie einen Reifungsprozess bei dem sie MHC und kostimulatorische Moleküle hochregulieren. Aktivierte DCs migrieren in Richtung lymphatische Organe, wo sie die phagozytierten Antigene den T-Zellen präsentieren. Im Gegensatz zu den Makrophagen sind die DCs in der Lage naive CD8⁺ T-Zellen zu aktivieren [31]. Zusätzlich zu ihrer Rolle in der Verbindung des angeborenen und des adaptiven Immunsystems, wurde den DCs eine entscheidende Rolle bei der Unterbindung der Verteilung und Proliferation der LM in der Milz zugeschrieben [32].

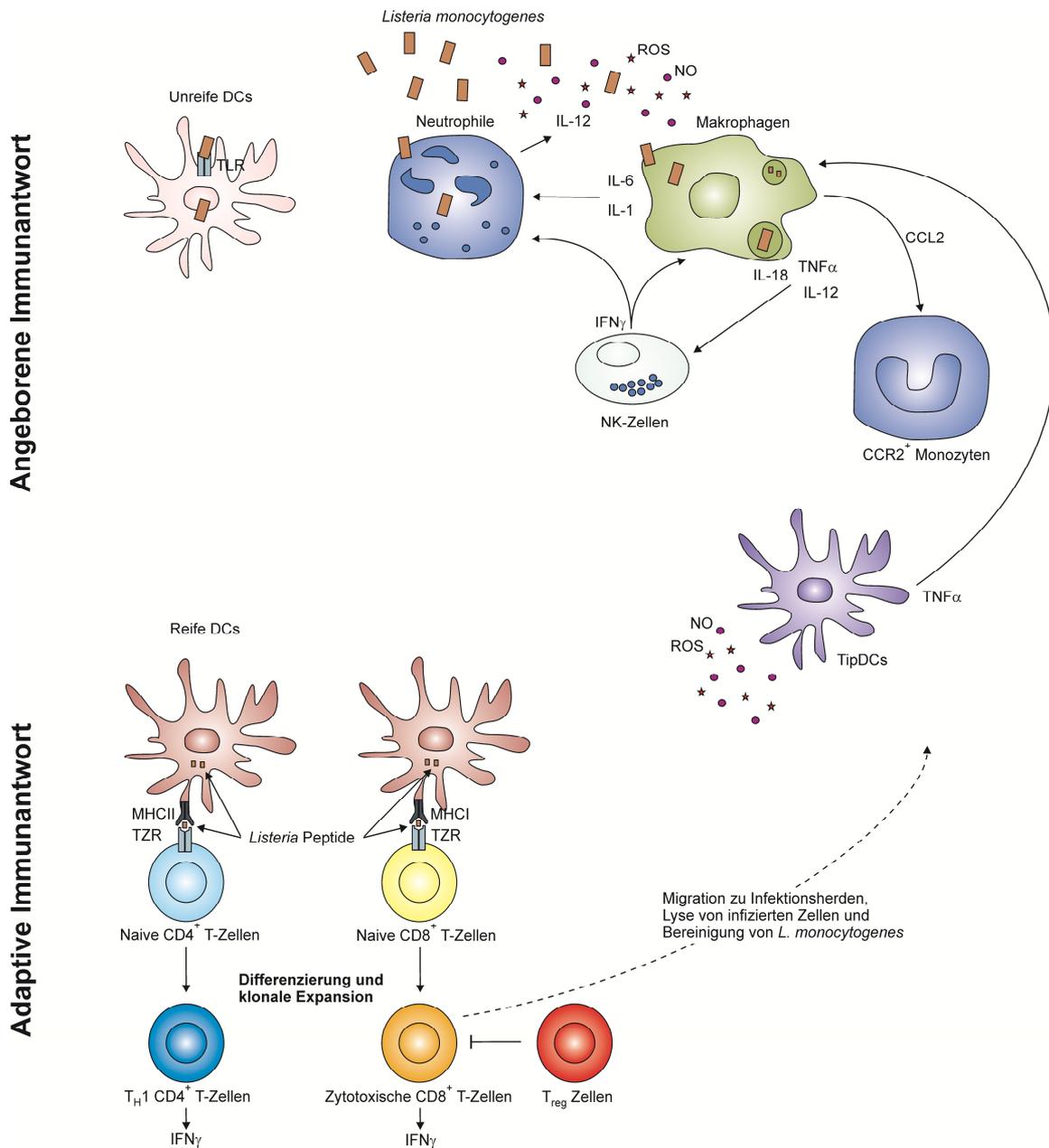


Abbildung 2: Immunantwort auf die LM-Infektion.

Neutrophile und Makrophagen können LM phagozytieren und als Antwort bakterizides NO und ROS produzieren. Die von Makrophagen produzierten Zytokine IL-12 und TNF α aktivieren NK-Zellen zur Produktion von IFN γ , das im Gegenzug wiederum das bakterizide Potential der Makrophagen stimuliert. Ausgereifte DCs sorgen für die Aktivierung der T-Zellen über die Präsentation von LM-Peptiden über die MHC-Rezeptoren. CD8⁺ T-Zellen entwickeln sich dabei zu zytotoxischen T-Zellen und die CD4⁺ T-Zellen differenzieren mit Hilfe von IFN γ und IL-12 zu T_H1 T-Zellen. Beide T-Zell-Populationen sezernieren IFN γ um Makrophagen zu aktivieren. Regulatorische T-Zellen (T_{reg}) kontrollieren die Effektor-Funktion der zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen (modifiziert von [33]).

1.2.3 Die adaptive Immunantwort

Die Zellen des adaptiven Immunsystems, bestehend aus T- und B-Lymphozyten, sind für die T-Zell-vermittelte und humorale Immunantwort zuständig. Die LM-induzierte adaptive Immunantwort verläuft strikt T-Zell-abhängig. Beide, $CD4^+$ T-Zellen und $CD8^+$ T-Zellen, sind an der LM-Abwehr beteiligt, aber eine größere Rolle wird den $CD8^+$ T-Zellen zugesprochen.

Während der LM-Infektion werden die $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen Antigen-abhängig aktiviert. Dazu nutzt der Wirt verschiedene Strategien. MHC-Klasse-I-Moleküle können auf jeder kernhaltigen Zelle gefunden werden und jede LM-infizierte Zelle ist in der Lage LM-Peptide über MHC-Klasse-I-Moleküle den $CD8^+$ T-Zellen zu präsentieren [34]. Listeriolysin ist eines dieser Proteine, welches eine starke Immunantwort in $CD8^+$ T-Zellen auslöst [35]. Nach der Differenzierung und klonalen Expansion können die $CD8^+$ Effektor-T-Zellen infizierte Zellen durch Perforin und Granzyme lysieren und somit LM freisetzen. Das freigesetzte Bakterium kann dann wiederum von Neutrophilen und Makrophagen phagozytiert werden. Zusätzlich zur lysierenden Funktion sind die $CD8^+$ Effektor-T-Zellen in der Lage $IFN\gamma$ zu produzieren und somit die bakterizide Funktion von den Neutrophilen und Makrophagen anzuregen. Nach der Erstinfektion verbleiben ein paar wenige $CD8^+$ Gedächtnis-T-Zellen, die für eine lebenslange Immunität gegen LM sorgen.

Im Gegensatz zu MHC-Klasse-I-Molekülen werden MHC-Klasse-II-Moleküle nur von einzelnen professionellen APCs exprimiert und $CD4^+$ T-Zellen präsentiert [34]. Nach der TZR-Aktivierung und in Anwesenheit von IL-12 und $IFN\gamma$ differenzieren die $CD4^+$ T-Zellen in Typ1-T-Helferzellen (T_H1), die große Mengen an $IFN\gamma$ produzieren [36]. Dieses aktiviert die Makrophagen zur letztendlichen Befreiung des Körpers von LM.

Die Prozesse der Differenzierung und klonalen Expansion von $CD8^+$ und $CD4^+$ T-Zellen werden durch Transkriptionsfaktoren gesteuert. Die Familie der Fox- (*forkhead-box*) Proteine gehört zu eben solchen wichtigen immunologischen Regulatoren und soll im nächsten Abschnitt näher beschrieben werden.

1.3 Fox- (*forkhead-box*) Familie

Fox-Proteine gehören zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren, die eine große Vielfalt an unterschiedlichen zellulären Prozessen regulieren [37]. Der Name Forkhead stammt vom *Drosophila melanogaster forkhead* Genprodukt [38]. Kurz nach der Entdeckung dieses Genprodukts wurde eine neue Gruppe von Leber-spezifischen Transkriptionsfaktoren (*hepatic nuclear factor 3 family*) bestimmt, die eine *forkhead* DNA-Bindestelle aufwies [39]. Die Entdeckung dieses Forkhead-Motivs erschuf eine neue Familie von Transkriptionsfaktoren, die nachfolgend in verschiedenen Organismen, von der Hefe bis zum Menschen, identifiziert wurden. Die Zahl der Fox-Familienmitglieder wächst stetig aufgrund der immer größeren Bedeutung die diesen Proteinen zugeschrieben wird. Denn, *Fox*-Genmutationen führen teilweise zu schweren Störungen, wie z.B. die Entwicklung von Kraniopharyngeom (gutartige Tumorbildung im Bereich der Hirnanhangdrüse) (*Foxe1*), Sprach- und Spracherwerbstörungen (*Foxp2*) und Hörstörungen (*Foxi1*) [40]. Für die Regulation des Immunsystems sind besonders *Foxp3*-, *Foxn1*-, *Foxj1*- und *Foxo*-Proteine von Bedeutung. Im Folgenden soll näher auf die *Foxo*-Familie eingegangen werden.

1.3.1 *Foxo*- (*forkhead-box O*) Familie

Das stetig steigende Interesse an den Proteinen der *Foxo*-Familie beruht einerseits auf der Tatsache, dass das *Caenorhabditis elegans* *Foxo*-Homolog DAF-16 für die Langlebigkeit in diesem Organismus verantwortlich ist und andererseits weil in Säugetieren *Foxo1*, *Foxo3*, *Foxo4* und *Foxo6* über den PI3K-Akt-Signalweg reguliert werden.

Foxo-Proteine agieren hauptsächlich als transkriptionelle Aktivatoren durch die Bindung an die DNS-Konsensussequenz TTGTTTAC [41]. *Foxo*-Transkriptionsfaktoren regulieren den Zellzyklus, die Reparatur der beschädigten DNA, Apoptose und Autophagie durch die Hochregulation von spezifischen Zielgenen [42-45]. Zusätzlich regulieren *Foxo*-Proteine die Zelldifferenzierung im Blut, Muskel und Fettgewebe [46-48], sowie den Energie-Metabolismus durch die Förderung der Gluconeogenese und Nahrungsaufnahme [49]. Dadurch dass die zellulären *Foxo*-Funktionen sich teilweise stark unterscheiden, kann angenommen werden, dass die *Foxo*-Aktivität gewebespezifisch unterschiedlich reguliert wird.

1.3.1.1 Regulation der subzellulären Lokalisation von Foxo

Die Aktivierung des PI3K-Akt-Signalweges als Antwort auf Insulin, Insulinähnliche Wachstumsfaktoren und andere Wachstumsfaktoren führt zu einer negativen Regulation der Foxo-Proteine [50]. Dabei erfolgt eine Phosphorylierung von Foxo-Proteinen an drei Phosphorylierungsstellen (Foxo1 an Thr24, Ser256, Ser319; Foxo3 an Thr32, Ser253, Ser315; Foxo4 an Thr28, Ser319, Ser258), die zum Export aus dem Nukleus führt [50]. Damit wird die transkriptionelle Funktion von Foxo unterbrochen. Die Foxo-Phosphorylierung durch Akt kreiert eine Bindestelle für 14-3-3-Proteine. 14-3-3-Proteine binden an phosphoryliertes Foxo im Nukleus und induzieren damit den Export ins Zytoplasma [51]. Zusätzlich maskieren 14-3-3-Proteine das Kernlokalisierungssignal (NLS) von Foxo und verhindern damit den Rückeintritt in den Nukleus [52]. Ausgenommen von diesem Mechanismus ist Foxo6, denn Foxo6 wird nicht durch den nukleären Export reguliert [53]. Die Tatsache, dass Foxo6 nur an zwei der drei Phosphorylierungsstellen (Thr26 und Ser184) phosphoryliert wird, beweist die Wichtigkeit der Phosphorylierung an allen drei Stellen für die funktionale Regulation der subzellulären Lokalisation.

Während die Phosphorylierung die Bindung an 14-3-3-Proteine initiiert, führt die Dephosphorylierung von Foxo zur Dissoziation des Proteinkomplexes [54]. Die Protein-Phosphatase 2A (PP2A) wird für diese Dissoziation verantwortlich gemacht [55]. PP2A-Inhibitoren oder dessen Knockdown stabilisieren die Foxo-Phosphorylierung und gleichzeitig den Proteinkomplex mit 14-3-3-Proteinen [56]. Zusätzlich führt die PP2A-Inhibierung zu einem verzögerten Foxo-Rückeintritt in den Nukleus und zu einer Schwächung seiner transkriptionellen Aktivität.

Interessanterweise führt eine Stress-induzierte Stimulation, trotz Anwesenheit eines Wachstumsfaktorsignals, zu einem Foxo-Rückeintritt in den Nukleus [57]. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass der Nukleus-Rückeintritt des Foxo-Proteins ohne Dephosphorylierung an Akt-Phosphorylierungsstellen möglich ist. Als Antwort auf oxidativen Stress phosphoryliert die Kinase MST1 (*mammalian Ste20-like kinase*) Foxo3 an Ser207, zerstört damit den Proteinkomplex mit 14-3-3-Proteinen und induziert dadurch die Relokalisation des Foxo3-Proteins [58]. Eine andere Stress-induzierte Proteinkinase JNK (*c-Jun kinase*) phosphoryliert Foxo4 an Thr447 und Thr451 und stimuliert damit den nukleären Rückeintritt [59, 60]. Gleichzeitig phosphoryliert JNK 14-3-3-Proteine, wodurch die Foxo-14-3-3-Komplex-Dissoziation begünstigt wird [61]. Somit begünstigt die MST1- und JNK-Signalweg-

Aktivierung den nukleären Foxo-Rückeintritt in Säugetieren und steigert die Lebenserwartung in Würmern, während die AKT-PI3K-Signalweg-Aktivierung die nukleäre Foxo-Relokalisation inhibiert und die Lebenserwartung in Würmern reduziert [58, 60].

1.3.1.2 Regulation der Foxo-Proteinlevel

Obwohl der Hauptmechanismus der Foxo-Regulation in der Änderung der subzellulären Lokalisation besteht, kann eine Veränderung der Foxo-Expression einen dramatischen Effekt im Organismus verursachen. In der Tat führt eine Überexpression von Foxo in Würmern und Fliegen zu einer erhöhten Lebenserwartung [62]. Im Gegensatz dazu ist ein Fehlen des Foxo-Proteins in Säugetieren mit einem erhöhten Krebsrisiko assoziiert [63]. Die Änderungen der Foxo-Proteinlevel können durch Foxo-Degradierung, *Foxo*-Transkription oder durch Mutationen im *Foxo*-Gen ausgelöst werden.

Obwohl Foxo-Transkriptionsfaktoren relativ stabile Proteine bilden, können sie durch eine TNF α -Stimulation degradiert werden. Die im Anschluss an TNF α -Stimulation stattfindende Phosphorylierung von Foxo-Proteinen durch die I κ B-Kinase (*inhibitor of kappa B*) führt zur Ubiquitinierung und sofortigem Abbau [64]. Gleichzeitig resultiert eine I κ B-Überexpression in einer verlagerten Foxo-Expression und in einer Unterdrückung der zellulären Transformation und des Tumorwachstums [64]. Dies beweist die Signifikanz der Regulation der Foxo-Proteinexpression für die Tumorgenese.

Wie bereits oben angedeutet können Foxo-Proteinlevel auch durch eine veränderte Transkription der *Foxo*-Gene beeinflusst werden. E2F1, ein Transkriptionsfaktor der Zellzyklus-Progress und Apoptose reguliert, bindet spezifisch an die Foxo1- und Foxo3-Promotoren [65] und kann eine *Foxo*-Expression induzieren. Die E2F-Proteine werden durch Pocket-Proteine der Retinoblastom- (Rb) Familie von Zellzyklusregulierenden Vertretern reguliert, die wiederum direkte Zielgene von Foxo-Proteinen darstellen. Da ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit in der Foxo-abhängigen Steuerung des Zellzyklus liegt, soll im nachfolgendem der Zellzyklus kurz erläutert werden.

1.4 Zellzyklus

Der Zellzyklus beschreibt die Serie von Ereignissen, die eine Zelle auf dem Weg der Genom-Duplizierung und Herstellung zweier identischer Tochterzellen durchläuft. Der Zellzyklus ist unterteilt in vier Phasen. Während der ersten beiden Phasen wird in der Zelle eine Kopie des gesamten genetischen Materials generiert (S-Phase) und die zellulären Komponenten zwischen zwei identischen Tochterzellen verteilt (M-Phase). Die anderen beiden Phasen G1 und G2, dienen der Vorbereitung der Zelle auf den jeweiligen erfolgreichen Abschluss der S- und M-Phasen. Sobald die Zelle die Proliferation einstellt, verlässt sie den Zellzyklus und tritt in die Ruhephase (G0) ein (Abb. 3).

Der Progress durch jedes Stadium des Zellzyklus wird durch Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) gesteuert. CDKs sind eine Familie von Serin/Threonin-Proteinkinasen, die durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung aktiviert werden und dabei einen Heterodimerkomplex mit der regulatorischen Untereinheit (Cyclin) bilden.

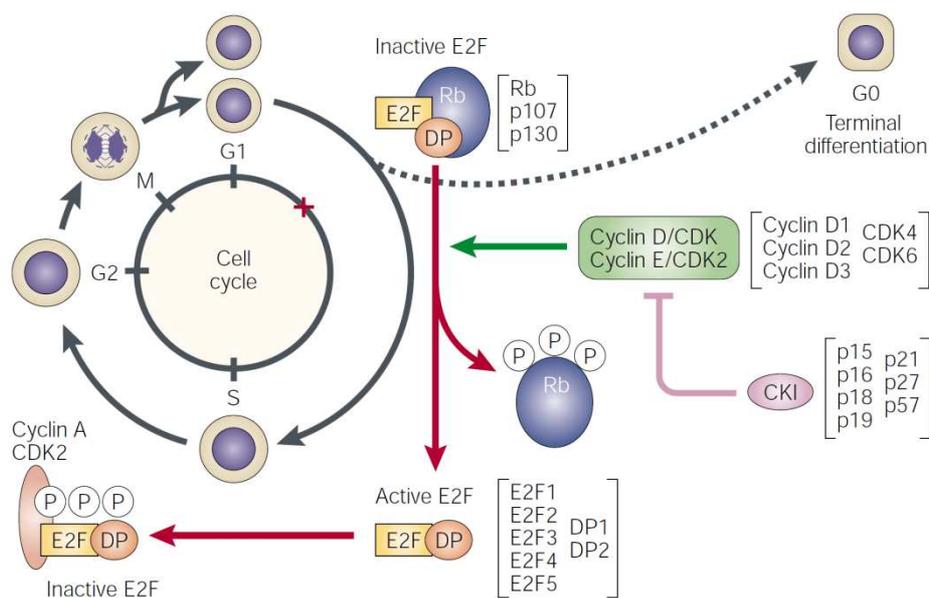


Abbildung 3: Zellzyklus und regulatorische Familien der CKIs.

Der Zellzyklusfortschritt durch die G1/S-Phase wird durch die Bindung von Rb-Proteinen an Mitglieder der E2F-Familie reguliert. Die Phosphorylierung der Rb-Proteine durch Cyclin/CDK führt dabei zur Freisetzung des E2F-Proteins und zum Zellzyklusfortschritt. Die Ink4- und Cip/Kip-Familien der CKIs können diese Phosphorylierung durch Inhibierung der Cyclin/CDK-Komplexe hemmen ([66]).

1.4.1 Zellzyklusinhibierung

Die Aktivität von CDKs ist wichtig für den Progress der Zelle durch die G1-Phase und den Eintritt in die S-Phase. Die Kontrolle der Aktivität dieser Kinasen ist von entscheidendem Wert und geschieht daher auf mehreren Ebenen. Zunächst wird die Akkumulation des Cyclins und der Zusammenbau des Cyclin-CDK-Komplexes kontrolliert. Als nächstes wird die Aktivität des Komplexes durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung gesteuert [67]. Als letztes werden die CDKs durch Interaktion mit inhibitorischen Proteinen (CKIs) reguliert. Die bekannten CKIs werden abhängig von ihrer strukturellen Ähnlichkeit in zwei Familien, die Ink4 (*inhibitor of CDK4*) und Cip/Kip (*CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein*) unterteilt.

Die Bedeutung der CKIs wurde durch Studien mit KO Mäusen gezeigt [68]. Mäuse mit fehlendem p27^{Kip1} zeigen eine erhöhte Körpergröße, als Ergebnis von Hyperzellularität in verschiedenen lebenswichtigen Organen, weibliche Unfruchtbarkeit und Taubheit. Einen ähnlichen Phänotyp von Gigantismus und Organomegalie zeigen auch p18^{Ink4c} KO Mäuse.

1.4.2 Die Ink4-Familie

Die Familie der Ink4-Proteine besteht aus vier Mitgliedern, p16^{Ink4a} (p16), p15^{Ink4b} (p15), p18^{Ink4c} (p18) und p19^{Ink4} (p19) und haben allesamt als Gemeinsamkeit das Vorhandensein von Ankyrin-Repeat-Motiven. Diese Ink4-Proteine hemmen die CDK-Aktivität indem sie mit D-Cyclinen um die Bindung konkurrieren [69]. Die größte Aufmerksamkeit wurde bislang p16 aufgrund der Korrelation zwischen einer Mutation im *p16*-Gen und Melanom-Entwicklung geschenkt [70]. In der Tat kann aus der Familie der Ink4-Proteine nur p16 als Tumorsuppressor nach LOH (*loss of heterozygosity*) [71] klassifiziert werden. Über die anderen Mitglieder der Familie ist bis jetzt nur wenig bekannt, außer dass die *p15*-Expression durch TGFβ (*transforming growth faktor*) induziert wird und dass p18 und p19 an CDK6 binden und während der Entwicklung unterschiedlich reguliert werden [72].

1.4.3 Cip/Kip-Familie

Drei Proteine gehören zur Gruppe der Cip/Kip Familie, p21^{Cip1} (p21), p27^{Kip1} (p27) und p57^{Kip2} (p57). Alle drei sind homolog in der inhibitorischen Domäne, die sowohl für das Binden als auch für das Hemmen von CDK4- und CDK2-Komplexen notwendig ist. P21 war das erste entdeckte Mitglied der Familie und ist in den p53-abhängigen G1-Zellzyklusarrest

involviert, welcher durch DNA-Schäden induziert wird [73]. Zusätzlich kann p21 mit PCNA (Untereinheit der DNA-Polymerase) interagieren und so die DNA-Synthese inhibieren [74]. Beide Beobachtungen zeigen dass p21 eine wichtige Rolle in der Regulation der Replikation spielt, weshalb die p21-Expression während des Eintritts in den Zellzyklus in verschiedenen zellulären Systemen ansteigt.

P27 ist ein sehr wichtiges und viel untersuchtes Mitglied der Familie. Die Regulation dieses Proteins ist äußerst komplex und erfolgt auf transkriptioneller, translationeller, proteolytischer und lokalisatorischer Ebene [68]. Zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Analysen zeigten eine entscheidende Rolle für p27 während der Entscheidung des Zellzykluseintritts [75]. Zusätzlich zu den oben beschriebenen Maus-Phänotypen zeigt ein p27-Expressionsverlust im Menschen eine Korrelation mit dem Auftreten verschiedener Tumorarten (Lunge, Brust, Harnblase) sowie einer schlechten Prognose und erhöhter Tumoraggressivität [76].

Im Gegensatz zu p27 ist p57 wenig untersucht. Man vermutet eine Rolle bei Wilm's-Tumoren und dem Beckwith-Wiedermann-Syndrom [77, 78].

1.4.4 Pocket-Proteine

Die Pocket-Protein-Familie, vertreten durch die Rb-Protein-Familie, besteht aus drei Mitgliedern, Rb/p105, p107/Rb11 und p130/Rb12. Rb-Proteine spielen eine wichtige Rolle in der Zellzyklus-Kontrolle durch die Regulation von Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie. E2F-Proteine sind für die Expression von wichtigen Zellzyklus-Komponenten, wie Cyclin E, Cyclin A, Cdc25A und E2F selbst zuständig. Die E2F-Familie kann dabei in starke Aktivatoren (E2F1-E2F3) und Repressoren (E2F4 und E2F5) unterteilt werden. Beide Gruppen werden durch Rb-Proteine reguliert. Rb-Proteine interagieren mit E2F durch eine Komplexbindung die zu einer Aktivierung aber auch zur Repression von zahlreichen Zielgenen führt. Während p105 als Aktivator agiert, führt die Bindung von p107 und p130 an E2F zur Repression.

Die Funktion der Pocket-Proteine ist die Zelle durch die Inaktivierung von E2F in der G0-Phase zu halten. Während der G0-Ruhephase bindet das nicht phosphorylierte p105 an E2F und unterdrückt dessen transkriptionelle Aktivität. Sobald CyclinD/CDK4/6 die Phosphorylierung von p105 initiiert, verlässt p105 den Komplex mit E2F1-E2F3 und ermöglicht die Expression von Zellzyklusaktivierenden Genen. Im Falle der inhibitorischen

p107 und p130 führt die Phosphorylierung zur Freisetzung von Zellzykluskontrollierenden Mitgliedern der E2F Familie, E2F4 und E2F5.

Die Wichtigkeit der Pocket-Proteine wurde durch Studien mit KO Mäusen belegt. Dabei führt der Verlust von p105 zum Sterben während der Embryogenese, bedingt durch Veränderungen in der Proliferation, sowie einem verstärkten Zelltod in der Leber und im Zentralnervensystem und einer beeinträchtigten Erythropoese [79, 80]. P107- und p130-defiziente Mäuse zeigen normale Phänotypen. Allerdings führt ein Doppel-Knockout von p107 und p130 zum neonatalen Tod [81]. Dieser Befund deutet auf eine überlappende Rolle von p107 und p130 hin.

1.5 Die SLy-Protein-Familie

Die Familie der SH3-Lymphozytenproteine (SLy) besteht aus drei Mitgliedern: SLy1 (SASH3), SLy2 (HACS1, NASH1 und SAMSN1) und SASH1 (SLy3). SLy1 [82] und SLy2 [83, 84] wurden 2001 das erste Mal beschrieben, SASH1 zwei Jahre später [85]. Alle drei Proteine zeigen große Ähnlichkeit im strukturellen Aufbau und das Aufweisen der Protein-Protein-Interaktionsdomänen SAM (*sterile alpha motive*) und SH3 (*Src homology 3*) führte zur Einordnung als Adapterproteine. Für SLy2 konnten verschiedene Protein-Interaktionen bereits bestätigt werden. SLy2 bindet direkt an die Histon-Deacetylase 1 (HDAC1) und an SAP30 (*Sin3-associated polypeptide 30*) und reguliert damit die HDAC-Enzymaktivität [86]. Zusätzlich wurde SLy2 eine immunregulatorische Rolle zugesprochen, da es die Immunglobulin-M- (IgM) Produktion in B1-Zellen reguliert [87] und an der Aktin-Zytoskelett-Reorganisation beteiligt ist [88]. Für SASH1 konnte eine Rolle als Tumorsuppressor identifiziert werden [85].

1.5.1 SLy1-Protein

SLy1 war das erste beschriebene Mitglied der SLy-Familie und bekam aufgrund der ausschließlichen Expression in Lymphozyten den Namen „SH3 domain protein expressed in Lymphocytes 1“, kurz SLy1. Sowohl das murine als auch das humane *SLy1*-Gen befinden sich auf dem X-Chromosom und weisen eine über 90-prozentige Aminosäuren-Homologie auf. Interessanterweise ist das humane *SLy1*-Gen auf X-Chromosom Xq25-Xq26.3 (GenBank accession No. NM_018990) lokalisiert, einer Stelle die mit verschiedenen X-chromosomalen

Erkrankungen verbunden ist. Als Beispiel wären Mutationen im *SH2D1A*- und *CD40L*-Gen, die beide auf Chromosom Xq25-26 lokalisiert sind, zu nennen. Während die Mutation von *SH2D1A* zu einer X-chromosomalen lymphoproliferativen Erkrankung (XLS) führt, resultiert die Genveränderung von *CD40L* in einem Hyper-IgM-Syndrom [89, 90].

Das SLy1-Protein ist 380 Aminosäuren lang und 55 kDa schwer. Charakteristische Strukturmerkmale für das SLy1-Protein ist eine zweigeteilte nukleäre Lokalisationssignal-Sequenz NLS1 und NLS2, sowie jeweils eine SAM- und eine SH3-Domäne. Zwischen den beiden NLS-Domänen befindet sich am Ser27 eine Phosphorylierungsstelle. Diese wird im Zuge einer TZR-Stimulation durch eine bisher unbekannte Kinase phosphoryliert [91]. Der schematische Strukturaufbau von SLy1 ist in (Abb. 4) dargestellt.



Abbildung 4: Schematische Darstellung des SLy1-Proteins.

Farbliche Blöcke markieren die funktionalen Einheiten NLS, SH3, und SAM. Zahlen bezeichnen die entsprechende Aminosäuren-Lokalisation. Die spezifische Phosphorylierungsstelle Ser27 ist in rot hervorgehoben. Ein vorhergesagtes nukleäres Exportsignal (NES) ist in der C-terminalen SAM-Domäne lokalisiert.

Während die beiden Protein-Protein-Interaktionsdomänen SAM und SH3 für die Adapterfunktion von SLy1 verantwortlich sind, regulieren die Phosphorylierungsstelle Ser27 und die beiden NLS-Domänen die Aktivierung und die zelluläre Lokalisation von SLy1. Beide Prozesse sind von entscheidender Bedeutung für die Funktion von SLy1, wie anhand der SLy1-del Maus gezeigt werden konnte. Diese Maus exprimiert ein unvollständiges SLy1-Protein, dem die Ser27-Stelle und die zweite NLS-Domäne fehlen. Während das Wildtyp (WT) SLy1-Protein in unstimulierten T-Zellen vorwiegend im Nukleus vorzufinden ist, befindet sich das SLy1-del Protein ausschließlich im Zytoplasma [92]. Der Verlust der Phosphorylierungsstelle und der Möglichkeit in den Nukleus einzuwandern resultiert in einer reduzierten Proliferation der SLy1-del T-Zellen im Vergleich zu WT Kontrollen [92]. In der Milz der SLy1-del Maus konnte eine Zellzahlreduktion der Marginalzonen B-Zellen

festgestellt werden, die nach einer Immunisierung zur eingeschränkten IgM-Produktion führte [92]. Eine Entwicklungsstörung der Thymozyten wurde sowohl in der SLy1-del als auch in der SLy1 KO Maus beobachtet [93]. Zusätzlich zeigen die NK Zellen der SLy1 KO Maus einen Defekt in der Funktion und Expression von aktivierenden NK-Rezeptoren, die letztendlich in einer reduzierten Tumorbekämpfung endet (Kooperation mit A. Krupnick, St. Louis, USA).

All diese Beobachtungen deuten auf eine wichtige Rolle für SLy1 in der Regulation des Immunsystems hin.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die bisher erbrachten Vorarbeiten deuten klar auf eine positive Rolle des SLy1-Proteins in der Regulation des Immunsystems hin. Die Vielfalt der Phänotypen in SLy1 KO Mäusen lässt zusätzlich auf eine Gewebe-, Zell- und möglicherweise Signalweg-abhängige Funktion von SLy1 schließen. Der Einfluss einer SLy1-Deletion auf den Verlauf einer Infektion wurde allerdings bisher noch nicht untersucht und sollte daher in dieser Arbeit beleuchtet werden. In Bezug auf eine mögliche zellspezifische Funktion von SLy1 sollte daher die Infektion mit LM untersucht werden, die eine starke T-Zell-abhängige Immunantwort induziert. Somit erlaubt dieses Infektionsmodell spezifisch die Rolle von SLy1 in der Generierung der adaptiven T-Zell-Antwort zu analysieren. Dazu sollten SLy1 KO und WT Mäuse mit LM infiziert werden und Überlebensraten, sowie die spezifische T-Zell-Antwort untersucht werden.

Darüber hinaus sollte die Ursache der reduzierten Thymozytenzahlen, die von Bernhard Reis in SLy1 KO Mäusen beschrieben wurden, weiter analysiert werden. Dazu sollte die Thymozytenentwicklung in SLy1 KO x Bcl-2 TG Mäusen näher untersucht werden. Diese Mäuse erlauben aufgrund der Bcl-2-Überexpression die Analyse des Einflusses von SLy1 auf die Reifung der Thymozyten unabhängig von der Apoptose. Weiterhin sollte die Einordnung von SLy1 in den prä-TZR- und/oder Notch-Signalweg mit Hilfe von SLy1 KO x RAG1 KO Mäusen überprüft werden.

In der Rolle als Adapterprotein hat SLy1 keine eigene katalytische Aktivität und erfüllt somit seine Funktion durch die Interaktion mit anderen Proteinen. Allerdings sind bis auf die Bindung von SLy1 an 14-3-3-Proteine bisher keine weiteren immunregulatorischen Interaktionspartner von SLy1 bekannt. Ein wichtiger Anhaltspunkt in der Identifizierung neuer Interaktionspartner ist die TZR-abhängige Phosphorylierung von SLy1 an Ser27 und der anschließende Export aus dem Nukleus. Angesichts dieser Regulationsmerkmale von SLy1 sollten immunregulatorische Proteine mit einem ähnlichen Regulationsmechanismus als mögliche Interaktionspartner für SLy1 untersucht werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten im Zusammenhang mit den zuvor erbrachten Vorarbeiten die Rolle und Funktionsweise des Adapterproteins SLy1 weiter entschlüsseln.

2 Materialien

2.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Name	Hersteller	Standort
BD FACSCanto™II	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
Geldokumentationssystem	Bio-Rad Laboratories	München, Deutschland
HERAcell Inkubator	Thermo Scientific	Schwerte, Deutschland
Heraeus Pico 17	Thermo Scientific	Schwerte, Deutschland
HERAsafe Sterilbank	Thermo Scientific	Schwerte, Deutschland
LightCycler® 480 II	Roche	Mannheim, Deutschland
MACS Multiständer	Miltenyi Biotec	Bergisch-Gladbach, Deutschland
Microskop PrimoVert	Zeiss	Oberkochen, Deutschland
MidiMACS™ Separator	Miltenyi Biotec	Bergisch-Gladbach, Deutschland
NanoDrop Lite	Peqlab	Erlangen, Deutschland
peqSTAR 2x Gradient	Peqlab	Erlangen, Deutschland
Thermocycler		
QIAxcel	Qiagen	Hilden, Deutschland
Sunrise	Tecan	Crailsheim, Deutschland
Wasserbad DB15103	Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5430	Eppendorf	Hamburg, Deutschland

2.2 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial, das nicht in der Tab. 2 gelistet ist, wurden von Sarstedt, Greiner, BD Biosciences oder Eppendorf bezogen.

Tabelle 2: Verbrauchsmaterial

Name	Hersteller	Standort
70 µm Filter	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
96 well PCR-Platte, weiß	Greiner	Frickenhausen, Deutschland
AMPLIseal™	Greiner	Frickenhausen, Deutschland
Costar 96 well EIA/RIA Platte	Corning	Amsterdam, Niederlande
Columbia Blood Agar plates	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
MACS® Separation Columns	Miltenyi Biotec	Bergisch-Gladbach, Deutschland
Mikropipetten 10 µl	Brand	Wertheim, Deutschland
Microstrainer® SST™ Tubes	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
PCR 12er-SoftStrips	Biozym Biotech Trading	Wien, Österreich
Zellsieb 70 µm	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland

2.3 Puffer, Lösungen und Medien

Alle Lösungen wurden in Wasser (Millipore Qualität) hergestellt und der pH mit NaOH oder HCL eingestellt.

Antikörperpuffer	10 mM HEPES 0,5 M NaCl 1 % BSA (w/v) 0,2 % Tween20 (v/v) 0,02 % NaN ₃ (w/v)
BBS (2x)	50 mM BES 280 mM NaCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O pH 6,95

Erythrozyten-Lysepuffer	0,155 M NH ₄ Cl 0,01 M KHCO ₃ 0,1 mM EDTA
Gewebelysepuffer	500 mM KCl 100 mM Tris mit pH 8,3 0,1 mg/ml Gelatine 1 % NP-40 (v/v) 1 % Tween20 (v/v) 500 µg/ml Proteinase K
HEK293T Kulturmedium	500 ml DMEM High Glucose 10 % FCS (v/v) 5 ml Penicillin/Streptomycin (100x) 2 mM L-Glutamin
LB-Agar (500 ml)	10 g LB-Medium 7,5 g Agar-Agar autoklaviert
LB-Medium (500 ml)	10 g LB-Medium autoklaviert
MACS-Puffer	500 ml PBS 0,5 % BSA (w/v) 2,5 mM EDTA
OP9-Medium	500 ml MEM α 20 % FCS (v/v) 5 ml Penicillin/Streptomycin (100x) 2 mM L-Glutamin 0,05 mM β -Mercaptoethanol (v/v)

Sammelgel-Puffer	0,25 M Tris 0,2 % SDS (w/v) pH 6,8
Sammelgel (6%)	4,5 ml Sammelgel-Puffer 3 ml H ₂ O 1,5 ml Acrylamid 8 µl TEMED 90 µl 10 % APS
SDS-Laufpuffer (10x)	30,3 g Tris 144,2 g Glycin 10 g SDS 1000 ml H ₂ O pH 8,3-8,8
SDS-Probenpuffer (5x)	10 % SDS (w/v) 30 mM Tris mit pH 6,8 0,1 % Bromphenolblau (w/v) 45 % Glycerin (v/v) 25 % β-Mercaptoethanol (v/v)
Stimulationsmedium	500 ml RPMI 10 % FCS (v/v) 5 ml Penicillin/Streptomycin (100x) 2 mM L-Glutamin 0,05 mM β-Mercaptoethanol (v/v)
TBS/T	50 mM Tris 150 mM NaCl 0,1 % Tween20 (v/v)

Transfer-Puffer	SDS-Laufpuffer 20 % Methanol
Trenngel-Puffer	0,75 M Tris 0,2 % SDS (w/v) pH 8,8
Trenngel (12%)	9 ml Trenngel-Puffer 1,8 ml H ₂ O 7,2 ml Acrylamid 45 µl TEMED 135 µl 10 % APS
Zell-Lysepuffer	50 mM Tris 150 mM NaCl 2 mM EDTA 5 % NP-40 (v/v) Complete Mini (Protease inhibitor tablet) PhosSTOP (Phosphatase inhibitor tablet)

2.4 Chemikalien und Kits

Chemikalien, die nicht in der Tab. 3 gelistet sind, wurden von Merck, Roth, Serva oder Sigma-Aldrich bezogen.

Tabelle 3: Chemikalien

Name	Hersteller	Standort
7-AAD	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
ABB	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
Amersham Hybond TM Membran	GE Healthcare	München, Deutschland
Annexin V	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
β-Mercaptoethanol 50 mM	Gibco [®] Life Technologies	Darmstadt, Deutschland

BHI	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
CFSE	Biolegend	Eching, Deutschland
Chlorophorm	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Complete Mini	Roche	Mannheim, Deutschland
DMEM High Glucose	GE Healthcare	München, Deutschland
FCS	GE Healthcare	München, Deutschland
Ionomycin	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Isopropanol	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
L-Glutamin 200 mM	GE Healthcare	München, Deutschland
MEM α	Invitrogen [®] Life Technologies	Darmstadt, Deutschland
BSA	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Nukleasefreies Wasser	Qiagen	Hilden, Deutschland
PBS	Gibco [®] Life Technologies	Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (100x)	GE Healthcare	München, Deutschland
PhosSTOP	Roche	Mannheim, Deutschland
PMA	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Protein A Sepharose [™]	GE Healthcare	München, Deutschland
RPMI	GE Healthcare	München, Deutschland
TRI [®] Reagent	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Trypsin/EDTA	GE Healthcare	München, Deutschland

Tabelle 4: Kits

Kit	Beschreibung	Hersteller
Amersham ECL Detection Reagents	Western Blot Detektion	GE Healthcare
Bio-Rad DC [™] Protein Assay	Proteinbestimmung	Bio-Rad
BIOTAQ [™] DNA Polymerase	DNA-Amplifizierung (PCR)	Bioline
BD [™] CompBeads	Kompensationspartikel	BD Biosciences
BD Pharmingen [™] BrdU Flow Kit	Zellzyklusbestimmung	BD Biosciences
CD4 MicroBeads	T-Zell-Aufreinigung	Miltenyi Biotec
CD8a MicroBeads	T-Zell-Aufreinigung	Miltenyi Biotec

ELISA MAX TM IFN γ	ELISA	BioLegend
ELISA MAX TM IL-12p70	ELISA	BioLegend
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	cDNS-Synthese	Applied Biosystems
NE-PER TM Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents	Nukleus/Zytoplasma Fraktionierung	Thermo Scientific
Pan T cell Isolation Kit II	T-Zell-Aufreinigung	Miltenyi Biotec
SuperSignal West Femto Chemiluminescence Substrate	Western Blot Detektion	Thermo Scientific
SYBR Green I Master	qPCR Reaktion Master Mix	Roche
TCR $\gamma\delta$ T cell Isolation Kit	T-Zell-Aufreinigung	Miltenyi Biotec
Ter-119 MicroBeads	Erythrozyten-Depletion	Miltenyi Biotec
Transcription Factor Buffer Set	Intrazelluläre FACS-Analyse	BD Biosciences

2.5 Primer

Alle in Tab. 5 gelisteten Primer wurden von biomers.net, Ulm, Deutschland bezogen.

(T_m = Schmelztemperatur; T_a = Annealingtemperatur)

Tabelle 5: PCR-Primer

Gen	Länge [nu]	Sequenz 5'-3'	T _m [°C]	T _a [°C]
Screening Primer 3 (for)	21	tgacgccagtagggatggttag	54	64
Screening Primer 4 (neo-rev)	19	cgccttcttgacgagttcttct	52	64
Screening Primer 6 (rev-wt)	19	agtggcctgggggagatgt	55	64
IMR0336	17	ataggtcggcggttcat	47	60
IMR0337	20	cccgagtatctggaagacag	49	60
mVav1.2	21	gtcacaaaagaggaagtgggtg	49	60
hBcl2.1	26	agcttataatggatgtacttcatcac	50	60
IMR0189	21	tggatgtggaatgtgtgcgag	57	58
IMR1746	20	gaggttccgctacgactctg	51	58

IMR3104	20	ccggacaagttttcatcgt	52	58
p16 fwd	21	gggttttcttggtgaagttcg	53	60
p16 rev	19	ttgccatcatcacct	51	60
p18 fwd	21	aatggattgggagaactgc	52	60
p18 rev	22	aaattggattagcacctctga	52	60
p27 fwd	19	gtagcggagcagtgcca	51	60
p27 rev	20	tctgttctgtggcccttt	51	60
p130 fwd	22	gggagacatggatttatctggt	51	60
p130 rev	19	gccaagagtgacctgtgga	50	60
IL-2 fwd	21	gctgttgatggacctacagga	52	60
IL-2 rev	20	ttcaattctgtggcctgctt	52	60
Foxo1 fwd	20	cttcaaggataaggcgaca	52	60
Foxo1 rev	20	gacagattgtggcgaattga	51	60
Foxo3 fwd	20	gctaagcaggcctcatctca	52	60
Foxo3 rev	20	ttccgtcagttgagggtct	51	60
TNF α fwd	19	ctgtagcccacgtcgtagc	51	60
TNF α rev	18	ttgagatccatgccgttg	51	60
IFN γ fwd	20	atctggaggaactggcaaaa	51	60
IFN γ rev	26	ttcaagacttcaaagagtctgaggta	53	60
m β -Aktin fwd	20	aaggccaaccgtgaaaagat	53	60
m β -Aktin rev	21	gtggtacgaccagaggcatac	51	60
Bcl-2 fwd	20	agtacctgaaccggcatctg	52	60
Bcl-2 rev	21	ggggccatatagtccacaaa	53	60
IL-7R α fwd	20	cgaaactccagaaccaaga	52	60
IL-7R α rev	21	aatggtgacacttggaagac	51	60
hSLy1 fwd	20	tgaaggccctgtcagaagag	52	60
hSLy1 rev	21	ggctgtagtctggagatgtcg	51	60
h β -Aktin fwd	18	aaggccaaccgtgaaaagat	51	60
h β -Aktin rev	20	gtggtacgaccagaggcatac	51	60

2.6 Antikörper

2.6.1 Primäre Antikörper

Tabelle 6: Primäre Antikörper

Antigen	Hersteller	Spezies	Klon
Akt	Cell Signaling	Kaninchen	C67E7
CD3	BD Biosciences	Hamster	145-2C11
CD28	BD Biosciences	Hamster	37.51
CD16/CD32	BioLegend	Ratte	93
Foxo1	Cell Signaling	Kaninchen	C29H4
Foxo3	Cell Signaling	Kaninchen	75D8
GAPDH	Cell Signaling	Kaninchen	14C10
HA-Tag	Cell Signaling	Kaninchen	C29F4
HA-Tag	Sigma-Aldrich	Maus	Monoklonal
Lamin A/C	Cell Signaling	Kaninchen	Polyklonal
myc-Tag	Cell Signaling	Kaninchen	71D10
myc-Tag	AbD Serotec	Maus	9E10
p27	Cell Signaling	Kaninchen	D37H1
p130	Cell Signaling	Kaninchen	D9T7M
p-Akt	Cell Signaling	Kaninchen	D9E
p-Foxo1 (Ser256)	Cell Signaling	Kaninchen	Polyklonal
p-Foxo3 (Ser253)	Cell Signaling	Kaninchen	Polyklonal
β-Aktin	Cell Signaling	Maus	AC-74

2.6.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 7: Sekundäre Antikörper

Antigen	Hersteller	Spezies	Verwendung
IgG-HRP	Dianova	Maus	WB
IgG-HRP	Cell Signaling	Kaninchen	WB

2.6.3 Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper

Tabelle 8: Fluoreszenz-gekoppelte anti-Maus Antikörper

Antigen	Fluorochrome	Spezies	Klon	Hersteller
CD44	APC	Ratte	IM7	BD Biosciences
CD90.2	APC	Ratte	53-2.1	BD Biosciences
CD4	APC-Cy7	Ratte	GK1.5	BD Biosciences
T-bet	FITC	Maus	4B10	BioLegend
Ki-67	FITC	Maus	B56	BD Biosciences
IFN γ	FITC	Ratte	XMG1.2	eBioscience
CD25	FITC	Ratte	7D4	BD Biosciences
CD45R/B220	FITC	Ratte	RA3-6B2	BD Biosciences
TCR $\gamma\delta$	FITC	Hamster	GL3	BD Biosciences
IL-2	PE	Ratte	JES6-5H4	BD Biosciences
FoxP3	PE	Ratte	MF-14	BioLegend
Bcl-2	PE	Hamster	3F11	BD Biosciences
CD8a	PE	Ratte	53-6.7	BD Biosciences
CD62L	PE	Ratte	MEL-14	BD Biosciences
CD3e	PerCP-Cy TM 5.5	Hamster	145-2C11	BD Biosciences
NK1.1.	PerCP-Cy TM 5.5	Maus	PK136	BioLegend
CD8a	PerCP-Cy TM 5.5	Ratte	53-6.7	BD Biosciences
CD8a	V500	Ratte	53-6.7	BD Biosciences
CD4	Pacific Blue	Ratte	RM4-5	BD Biosciences
CD3e	Pacific Blue	Hamster	500A2	BD Biosciences

2.7 Plasmide

Foxo1-HA-Plasmid wurde von Addgene erworben. SLy1-myc-Plasmid wurde bereits beschrieben (Doktorarbeit Brandt).

3 Methoden

3.1 Statistische Analysen

Die statistische Auswertung wurde entsprechend den Angaben zu den jeweiligen Abbildungen durchgeführt. Statistische Analysen wurden mit Hilfe von GraphPad Prism erstellt. Die Abbildungen wurden mit Image Lab, FlowJo und GraphPad Prism angefertigt und mit CorelDraw zusammengestellt.

3.2 Tierexperimente

3.2.1 Zucht von genveränderten Mäusen

SLy1 KO Mäuse wurden bereits beschrieben [93]. Bcl-2 TG Mäuse wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Tarik Möröy (Universitätsklinikum Essen) zur Verfügung gestellt und mit SLy1 KO Mäusen gekreuzt. RAG1 KO Mäuse wurden von Jackson Laboratories erworben und mit SLy1 KO Mäusen gekreuzt.

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden im spezifisch pathogenfreien Bereich in der Tierversuchsanlage der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen unter Einhaltung eines zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus gezüchtet. Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Die Inzucht erfolgte mit 8-10 Wochen alten Tieren. Die Jungtiere wurden mit 3-4 Wochen von den Eltern getrennt und mittels Ohrlochkodierung markiert. Alle Linien wurden mindestens sechsfach auf den C57BL/6 Hintergrund rückgekreuzt. Die für die Rückkreuzung verwendeten C57BL/6 Mäuse wurden von CharlesRiver Laboratories erworben.

3.2.2 Auswahlkriterien

Die Auswahl der Mäuse erfolgte anhand des Genotyps, der mittels PCR bestimmt wurde. Alle Experimente wurden mit 9-14 Wochen alten männlichen und weiblichen Tieren durchgeführt. Als Kontrollen dienten gleichaltrige WT Mäuse. Für Infektionen wurden ausschließlich

weibliche Tiere eingesetzt. Sämtliche Tierexperimente erfolgten laut den Tierversuchsangaben und wurden durch das Regierungspräsidium genehmigt.

3.2.3 Infektion mit LM

Am Vortag der Infektion wurde der LM-Bakterienstamm (ATCC 43251) in 5 ml BHI-Medium ÜN bei 37 °C inokuliert. Am darauffolgenden Tag wurde die LM-Konzentration mittels Vermessung der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) bestimmt. Die Bakterien wurden auf eine OD_{600} von 0,7-0,75 eingestellt und seriell 1:10 mit BHI-Medium verdünnt. Dabei entsprach die dritte Dilution einer LD_{50} -Dosis. 350 µl der entsprechenden Dosis wurden den Mäusen i.p. appliziert. Zur Kontrolle der Dilutionsreihe wurden 10 µl der jeweiligen Verdünnung auf Columbia Blood Agar Platten ausgestrichen und ÜN im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die koloniebildenden Einheiten (CFU) ausgezählt. Das Befinden der Tiere wurde täglich anhand der äußeren Erscheinung und der Messung des Gewichts kontrolliert.

3.2.4 Präparation der Lymphorgane und Serumentnahme

Die Tötung der Mäuse erfolgte durch zervikale Dislokation nach vorheriger CO_2 - oder Isofluran-Anästhesiologie. Milz und Thymus wurden vorsichtig entfernt und mit Hilfe eines 70 µm Zellsiebes homogenisiert. Danach wurden die Milzzellen abzentrifugiert und zur Entfernung der Erythrozyten in 2-5 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert. Die Lyse erfolgte 3 min bei RT und wurde mit 5 ml kaltem PBS gestoppt. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4 °C, 500 g und 5 min.

Für die Serumentnahme wurden die Mäuse mit Isofluran anästhesiert und das Blut mit einer 10 µl Kapillare retroorbital entnommen. Das Blut wurde in Microtainer® SST™ Gefäßen gesammelt. Die Koagulation wurde 30 min bei RT abgewartet und die Gefäße danach bei 11000 g für 2 min abzentrifugiert. Das Serum wurde vorsichtig in ein frisches Gefäß überführt und bei -20 °C gelagert.

3.2.5 Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (CFU)

Am Tag zwei und vier nach einer mittleren LM-Infektion ($1 \times LD_{50}$) wurden die infizierten Mäuse geopfert, die Milz und ein Leberlappen entnommen und in PBS homogenisiert. Als nächstes wurden serielle 1:10 Verdünnungen angefertigt, von denen 10 µl auf Columbia

Blood Agar Platten ausplattiert und bei 37 °C im Brutschrank ÜN inkubiert wurden. Am nächsten Tag wurden die Kolonien ausgezählt.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Maus-Genotypisierung

Gewebeprobe von 3-4 Wochen alten Mäusen wurden aus dem Ohr entnommen und mit Gewebelysepuffer lysiert. Die Lyse erfolgte mindestens 1 h bei 55 °C. Danach wurden die Lysate bei 2500 g für 3 min abzentrifugiert und bei 4 °C gelagert. Die Genotyp-Analyse erfolgte mit spezifischen Primern für das entsprechende Genprodukt und PCR-Programm (Tab. 9-14). Die PCR-Produkte wurden anschließend mittels QIAxcel DNA Analyzer aufgetrennt.

Tabelle 9: SLy1 KO PCR-Programm

Temperatur	Zeit
95 °C	3 min
95 °C	15 sec
64 °C	30 sec
72 °C	90 sec
	} 30 Zyklen
72 °C	10 min

Tabelle 10: SLy1 KO PCR-Mastermix

Bestandteil	Volumen
H ₂ O	17,55 µl
10xNH ₄ Reaktionspuffer	2,5 µl
MgCl ₂ 50 mM	1,25 µl
dNTPs 10 mM	0,5 µl
Primermix	2 µl
Taq (5 Einheiten/µl)	0,2 µl
cDNS	1 µl
<u>Primermix SLy1 KO</u>	
H ₂ O	10 µl
Screening Primer 3 (for) 100 µM	20 µl
Screening Primer 4 (neo-rev) 100 µM	10 µl
Screening Primer 6 (rev-wt) 100 µM	10 µl

Tabelle 11: Bcl-2 TG PCR-Programm

Temperatur	Zeit
95 °C	15 min
94 °C	30 sec
60 °C	90 sec
72 °C	90 sec
	} 34 Zyklen
72 °C	10 min

Tabelle 12: Bcl-2 TG PCR-Mastermix

Bestandteil	Volumen
H ₂ O	12,55 µl
10xNH ₄ Reaktionspuffer	2,5 µl
MgCl ₂ 50 mM	1,25 µl
dNTPs 10 mM	0,5 µl
IMR0336 10 µM	1 µl
IMR0337 10 µM	1 µl
mVav1.2 10 µM	2,5 µl
hBcl2.1 10 µM	2,5 µl
Taq (5 Einheiten/µl)	10 µl
cDNS	1 µl

Tabelle 13: RAG1 KO PCR-Programm

Temperatur	Zeit
95 °C	3 min
94 °C	30 sec
58 °C	45 sec
72 °C	45 sec
	} 35 Zyklen
72 °C	10 min

Tabelle 14: RAG1 KO PCR-Mastermix

Bestandteil	Volumen
H ₂ O	17,55 µl
10xNH ₄ Reaktionspuffer	2,5 µl
MgCl ₂ 50 mM	1,25 µl
dNTPs 10 mM	0,5 µl
Primermix RAG1 KO	2 µl
Taq (5 Einheiten/µl)	0,2 µl
cDNS	1 µl
<u>Primermix RAG1 KO</u>	
H ₂ O	10 µl
IMR0189	20 µl
IMR1746	10 µl
IMR3104	10 µl

3.3.2 Quantitative Real-Time PCR

3.3.2.1 RNA-Isolation

Die Gesamt-RNA wurde mit TRI[®] Reagent und Chlorophorm/Isopropanol nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Bestimmung der optischen Dichte bei 260 nm diente zur Messung der RNA-Konzentration, die mit Hilfe der Lambert-Beer Gleichung berechnet wurde.

3.3.2.2 cDNS-Synthese

Die Umschreibung von 1-2 µg RNA in cDNS erfolgte mit dem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit und wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.3.2.3 qPCR

Die qPCR wurde mit SYBR Green durchgeführt. Spezifische Primer wurden für die jeweiligen Genprodukte eingesetzt (Tab. 15, 16). Als Referenzgen diente *β-Aktin*. Ein interner Standard wurde als Kalibrator benutzt um Abweichungen zwischen verschiedenen Ansätzen

auszugleichen. Die qPCR wurde mit dem LightCycler® 480 II durchgeführt. Die Primersequenzen wurden mit dem Universal ProbeLibrary Assay Design Center von Roche ausgewählt und die qPCR-Daten mit Hilfe der LightCycler® 480 Software ausgewertet.

Tabelle 15: qPCR-Programm

Temperatur	Zeit
98 °C	5 min
98 °C	10 sec
60 °C	10 sec
72 °C	10 sec
	} 45 Zyklen
72 °C	5 min

Tabelle 16: qPCR-Mastermix

Bestandteil	Volumen
H ₂ O	1,5 µl
2xSYBR Green	5 µl
Primer fwd 10 µM	0,4 µl
Primer rev 10 µM	0,4 µl
cDNS	2,5 µl

3.3.3 Amplifizierung und Herstellung von Plasmid-DNS

Um die benötigte Menge an Plasmid-DNS für die Transfektion von HEK293T Zellen zu bekommen, wurde diese mit Hilfe von kompetenten Bakterien amplifiziert.

3.3.3.1 Transformation von kompetenten Bakterien

Die OneShot[®]Top10 kompetenten *E.coli* wurden auf Eis aufgetaut. Danach wurden 5 µl der Plasmid-DNS mit 25 µl Bakterien für 30 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde durch Hitze-Schock-Inkubation bei 42 °C für 30 sek aktiviert und anschließend auf Eis für 2 min inkubiert. Die transformierten Bakterien wurden danach bei 37 °C in 200 µl SOC-Medium in einem Bakterieneschüttler vorinkubiert bevor sie auf vorgewärmte LB-Agar Platten, die 100 µg/ml Ampicillin enthielten, ausplattiert wurden.

3.3.3.2 Plasmid Präparation

Am nächsten Tag wurden Ampicillin-resistente Einzelkolonien gepickt und ÜN-Kulturen inokuliert. Dazu wurde eine Einzelkolonie in 400 ml LB-Medium gegeben, welches 100 µg/ml Ampicillin enthielt. Bakterien wurden bei 37 °C und 225 rpm ÜN im Bakterieneschüttler inkubiert. Plasmid-DNS wurde am nächsten Tag mit NucleoBond[®]Xtra Maxi Kit nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 OP9 und HEK293T Zellkultur

Das Einfriermedium für OP9- und HEK293T Zellen setzte sich aus Kulturmedium mit 10% DMSO zusammen. Jeweils 5×10^6 bis 1×10^7 Zellen wurden in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und für 24 h bei -80 °C gelagert. Anschließend wurden die Zellen zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt. Zum Auftauen wurden die Zellen mit vorgewärmtem Zellkulturmedium aufgefüllt und auf Zellkulturplatten ausplattiert. Die OP9 und HEK293T Zellen wurden zweimal pro Woche umgesetzt. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend erfolgte das Ablösen der adhären Zellen mit 2 ml Trypsin/EDTA mit einer Inkubation für 2 min im Brutschrank. Danach wurde das Trypsin/EDTA mit 8 ml Medium inaktiviert und die Zellen in 50 ml Gefäße überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 500 g, 4 °C für 5 min wurden ungefähr 1×10^6 Zellen zur Weiterführung der Kultur in 10 cm Platten ausplattiert.

3.4.2 *In vitro* Differenzierung von Thymozyten

Am Vortag der Isolierung von DN-Thymozyten wurden die OP9-DL1- und OP9-GFP-Zellen, die als Kontrolle verwendet wurden, wie bereits oben beschrieben trypsiniert, auf 2×10^4 Zellen/ml eingestellt und zu 1 ml pro Vertiefung in eine 24-Lochplatte bzw. 3 ml pro Vertiefung in eine 12-Lochplatte gegeben. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt und in der 24-Lochplatte durch 500 μ l und in der 12-Lochplatte durch 1 ml für Tag 3 und 1,9 ml für Tag 6 frisches Medium ersetzt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit aufgereinigten DN-Thymozyten für die entsprechende Dauer im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂.

3.4.3 Transfektion mit Kalzium-Phosphat

Am Vortag der Transfektion wurden ca. 1×10^6 HEK293T Zellen in 10 cm Platten ausgesät. 1 M CaCl₂ wurde 1:5 in H₂O verdünnt und 500 μ l von der Verdünnung für jede Transfektion vorgelegt. Als nächstes wurden 7-10 μ g Plasmid-DNS hinzugefügt und gemischt. Sofort im Anschluss wurden 500 μ l 2xBBS tropfenweise dazugegeben und gemischt. Die Proben wurden 10 min bei RT inkubiert. Danach wurde das Medium von den HEK293T Zellen abgenommen, mit frischem Medium ersetzt und der Transfektionsansatz tropfenweise hinzugefügt. Die Zellen wurden 48 h bei 37 °C inkubiert, bevor die Proteinlysate erstellt wurden.

3.4.4 ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*)

Die Zytokine IL-12 und IFN γ wurden mittels kommerziell erworbenen ELISA-Kits nach Angaben des Herstellers bestimmt. Die Detektion erfolgte am ELISA plate reader.

3.4.5 MACS (*magnetic activated cell sorting*)

Isolierte Milzzellen wurden homogenisiert und die Erythrozyten depletiert. Die T-Zellen wurden in MACS-Puffer mit entsprechenden MicroBeads aus dem Pan T cell Isolation Kit II markiert und über LS-Säulen nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

3.4.5.1 Aufreinigung von SLy1 KO und SLy1 KO x Bcl-2 TG Thymozyten

Die Thymi wurden homogenisiert und die Zellsuspension gezählt. Ungefähr 1×10^8 Thymozyten wurden in 400 μ l MACS-Puffer aufgenommen und mit 50 μ l Non T cell

Depletion Cocktail (aus dem TCR $\gamma\delta$ Isolation Kit) und 50 μl anti-Ter-119 Microbeads versetzt. Nach Inkubation für 15 min bei 4 °C wurden die Zellen mit MACS-Puffer gewaschen und abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit 500 μl MACS-Puffer resuspendiert und über LD-Säulen aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte laut der Gebrauchsanweisung des Herstellers. Der aufgefangene Durchlauf wurde abzentrifugiert, während die positive Fraktion verworfen wurde. Pro 1×10^8 zu Anfang eingesetzten Zellen wurden 350 μl MACS-Puffer dazugegeben, mit 50 μl anti-Biotin (aus dem TCR $\gamma\delta$ Isolation Kit), 50 μl CD4 und 50 μl CD8a Microbeads versetzt und 15 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit MACS-Puffer gewaschen, abzentrifugiert, in 500 μl MACS-Puffer resuspendiert und über LS-Säulen aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte laut der Gebrauchsanweisung des Herstellers. Der aufgefangene Durchlauf wurde abzentrifugiert, während die positive Fraktion wieder verworfen wurde. Die Zellen wurden gezählt und auf 4×10^4 Zellen/ml eingestellt. Für Tag 3 wurde 1 ml pro Vertiefung in eine 12 Lochplatte mit OP9-Zellen gegeben bzw. 0,1 ml für Tag 6.

3.4.5.2 Aufreinigung von SLy1 KO x RAG1 KO Thymozyten

Die Thymi wurden homogenisiert und die Zellsuspension gezählt. Pro 1×10^8 Thymozyten wurden 400 μl MACS-Puffer zugegeben und mit 50 μl anti-Ter-119 Microbeads versetzt. Nach Inkubation für 15 min bei 4 °C wurden die Zellen mit MACS-Puffer gewaschen und abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 500 μl MACS-Puffer resuspendiert und über LS-Säulen aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte laut der Gebrauchsanweisung des Herstellers. Der aufgefangene Durchlauf wurde abzentrifugiert, während die positive Fraktion verworfen wurde. Die Zellen wurden gezählt und auf 2×10^5 Zellen/ml eingestellt. 500 μl wurden pro Vertiefung in die 24-Lochplatte mit OP9-Zellen gegeben und für die entsprechende Zeit im Brutschrank inkubiert.

3.4.6 *Ex vivo* Stimulation

Für Stimulationsanalysen wurden T-Zellen mittels MACS aufgereinigt und in RPMI-Stimulationsmedium unter Zugabe von anti-CD28 (2,5 $\mu\text{g/ml}$) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Lochplatten verteilt, die zuvor 3 h im Brutschrank mit anti-CD3 (5 $\mu\text{l/ml}$) beschichtet wurden. Für die Analyse des TZR-Signalweges mittels Western Blot wurden die Zellen für 20 und 60 min im Brutschrank inkubiert. Für die Analyse der Proliferation wurden die T-Zellen 24 h, 48 h und 72 h im Brutschrank inkubiert. Die

Stimulation der Thymozyten für Western Blot Analysen erfolgte im RPMI-Stimulationsmedium unter Zugabe von PMA (50 ng/ml) und Ionomycin (1 µg/ml) für 10 und 30 min im Brutschrank.

Die Stimulation der Splenozyten und Thymozyten für FACS-Analysen erfolgte in RPMI-Stimulationsmedium entweder mit gelöstem anti-CD28 (2,5 µg/ml) und beschichteten anti-CD3 (5 µl/ml) für 24 h oder mit PMA (50 ng/ml) und Ionomycin (1 µg/ml) für 3 h im Brutschrank. Für FACS-Analysen von intrazellulären Proteinen wurde nach 1 h PMA/Ionomycin-Stimulation dem Medium Brefeldin A (5 µg/ml) zugesetzt und weitere 2 h im Brutschrank inkubiert. Für FACS-Färbung von intrazellulären Proteinen nach LM-Infektion wurden die Milzzellen 3 h lang mit Brefeldin A (5 µg/ml) im Brutschrank inkubiert und anschließend am FACS analysiert.

3.4.7 CFSE-Färbung

T-Zellen aus der Milz wurden wie zuvor beschrieben mit MACS aufgereinigt und pro 1×10^6 Zellen in 500 µl RPMI (ohne Zusätze) resuspendiert. Als nächstes wurde eine CFSE-Vorverdünnung in RPMI (ohne Zusätze) hergestellt und 500 µl der CFSE-Vorverdünnung zu den Zellen gegeben um eine 1:10000 Endverdünnung von CFSE zu erhalten. Der Ansatz wurde 10 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend mit 250 µl RPMI (ohne Zusätze) und 250 µl kaltem FCS (pur) abgestoppt. Die Zellen wurden abzentrifugiert und für Stimulationsversuche weiter verwendet. Sämtliche Abläufe erfolgten unter Ausschluss von Licht.

3.4.8 Durchflusszytometrie (FACS)

FACS wurde zur Analyse der relativen Verteilung der hämatopoetischen Zellen, der Expression von Oberflächen und intrazellulären Proteinen verwendet. Die Messung erfolgte am BD FACSCanto™ II. Die Auswertung wurde mit der FlowJo Software durchgeführt.

3.4.8.1 Kompensationskontrollen

Die Messung am BD FACSCanto™ II ermöglicht die gleichzeitige Detektion von Fluoreszenzen in acht verschiedenen Farben, auch Kanäle genannt. Jede Farbe absorbiert Licht innerhalb eines bestimmten Wellenbereichs und emittiert dieses in der gleichen Art und Weise. Die gleichzeitige Aufnahme von vielen verschiedenen Farben führt unumgänglich zu Überschneidungen und zum Einstrahlen einer Farbe in den Kanal einer anderen Farbe, was zu

falsch positiven Ergebnissen führen kann. Nach Kalibrierung mit einzelgefärbten Proben, auch Kompensationskontrollen genannt, berechnet die BD FACSDiva Software automatisch die Kompensation für diese Überschneidungen und schließt somit die Gefahr der falsch positiven Ergebnisse aus. Zu diesem Zweck wurden BDTM CompBeads verwendet und laut der Gebrauchsanweisung eingesetzt. Diese Art der Kompensation wurde für jede einzelne Analyse angefertigt.

3.4.8.2 Oberflächenfärbung

Nach der Organpräparation wurden die Zellen in PBS aufbewahrt. Pro 1×10^6 Zellen wurden 50 μ l 2x-konzentrierten Oberflächen-Farbansatzes angefertigt. Vor der Oberflächen-Färbung wurden die Zellen in 50 μ l CD16/CD32 Antikörperansatz resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert um unspezifische Bindungen an FcR zu blockieren. Direkt im Anschluss wurden 50 μ l des 2x-konzentrierten Oberflächen-Farbansatzes dazugegeben und weitere 15 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen, bei 500 g und 4 °C für 5 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 200 μ l PBS aufgenommen und am FACS gemessen. Für die Analyse der Apoptose wurden die Zellen in 100 μ l ABB-Puffer aufgenommen und Annexin V und 7-AAD hinzugefügt und 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen mit weiteren 100 μ l ABB-Puffer aufgefüllt und unmittelbar am FACS gemessen. Die FACS-Analyse des Zellzyklus erfolgte mit BD PharmingenTM BrdU Flow Kit nach Angaben des Herstellers.

3.4.8.3 Intrazelluläre Färbung

Die Zelloberfläche wurde wie oben beschrieben gefärbt. Danach wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert unter Verwendung des Transcription Factor Buffer Sets. Die Färbung erfolgte 45 min auf Eis im Dunkeln. Danach wurden die Zellen gewaschen und am FACS gemessen.

3.5 Proteinbiochemische Methoden

3.5.1 Proteinlyse

Der Zellysepuffer wurde frisch mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren ergänzt. Primäre Maus-Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und in 10 μ l Zellysepuffer pro 1×10^6 Zellen lysiert. Zellen aus der Zellkultur wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und in

500 µl pro 10 cm Platte lysiert. Die Lyse erfolgte 30 min auf Eis. Danach wurden die Lysate bei 13.000 g und 4 °C 15 min abzentrifugiert, die Überstände in frische Gefäße überführt und bei -20 °C aufbewahrt. Die Nukleus-Zytoplasma-Fraktionierung erfolgte mit dem NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents laut der Gebrauchsanweisung des Herstellers.

3.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung und SDS-Probenvorbereitung

Die Proteinbestimmung wurde mit Bio-Rad DC™ Protein Assay Kit laut der Gebrauchsanweisung des Herstellers durchgeführt. Die optische Dichte wurde mit dem Sunrise ELISA plate reader bei 700 nm gemessen. BSA-Proben mit einer Konzentration von 0-2 mg/ml wurden bei jeder Proteinbestimmung als Standard mit vermessen. Die Proteinkonzentration der Lysate wurden anschließend auf 10-50 µg pro 20 µl eingestellt, mit 5xSDS-Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95 °C gekocht.

3.5.3 Western Blot

Die SDS-Gele, bestehend aus 6 %-igem Sammelgel und 12 %-igem Trenngel, wurden frisch hergestellt und entweder sofort eingesetzt oder bei 4 °C aufbewahrt. Die Elektrophorese verlief 2-3 h bei 100 V in SDS-Laufpuffer. Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine Hybond™ Nitrocellulose-Membran mit dem Nass-Blot-Verfahren transferiert. Der Transfer verlief 60-90 min bei 100 mA pro Membran bei 4 °C im Transferpuffer. Danach wurde die Membran kurz in Wasser gewaschen um die Methanolreste zu entfernen und 1 h lang in 5 %-igem Milchpulver in TBS/T auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Membran 3x in TBS/T für insgesamt 30 min gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Membran mit den primären Antikörpern, verdünnt im Antikörperpuffer, ÜN bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde die Membran 3x in TBS/T für insgesamt 30 min gewaschen und anschließend 1 h lang mit dem entsprechenden HRP-gekoppelten sekundären Antikörper, verdünnt in 5 %-iger Milch, inkubiert. Danach wurde die Membran 3x in TBS/T für insgesamt 30 min gewaschen. Die HRP-Reaktion wurde entweder mit ECL-Reagenz oder mit SuperSignal West Femto Kit induziert und die Chemilumineszenz wurde mit dem Gel Doc Device detektiert. Die Auswertung erfolgte mit Image Lab Software.

3.5.4 Immunpräzipitation

50 µl Protein A Sepharose™ Beads wurden insgesamt 2x mit PBS und 2x mit Lysepuffer gewaschen. Zwischen den Waschvorgängen wurde jeweils bei 300 rpm und 4 °C 2 min lang

abzentrifugiert und die Überstände vorsichtig abgenommen und verworfen. 500 µg Protein wurden für die Präzipitation eingesetzt und auf ein Gesamtvolumen von 750 µl mit Lysepuffer aufgefüllt. Die entsprechenden Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt. Die Inkubation erfolgte mit ständiger Überkopf-Drehung ÜN bei 4 °C. Am nächsten Tag wurden die Beads insgesamt 2x mit Lysepuffer und 2x mit PBS, wie oben beschrieben, gewaschen und die Überstände vorsichtig abgenommen und verworfen. Die Elution der Proteine von den Beads erfolgte mit 50 µl 2,5x SDS-Probenpuffer bei 95 °C für 10 min. Anschließend wurden die Beads bei 8000 rpm für 5 min bei RT abzentrifugiert und die Überstände mit den abgelösten Proteinen in frische Gefäße überführt. Die Eluate wurden entweder direkt auf das Gel geladen oder bei -20 °C aufbewahrt.

4 Ergebnisse

4.1 Thymozytenentwicklung in SLy1 KO Mäusen

Die SLy1 KO Maus zeigt eine reduzierte Zellzahl im Thymus, die auf einer reduzierten Thymozytenentwicklung beruht [93]. Um die Ursache für diesen Defekt weiter zu entschlüsseln, wurde die OP9-Methode verwendet. Dieses *in vitro* Differenzierungssystem, bestehend aus der Knochenmarks-Stromazelllinie OP9, die den Notch-Liganden Delta-Like-1 (DL1) auf der Oberfläche exprimiert [94], ermöglicht es über die Interaktion mit dem Notch-Rezeptor auf den Thymozyten die Entwicklung von DN-Thymozyten zu analysieren. Um eine Vergleichbarkeit zu den bereits beschriebenen Ergebnissen [93] zu gewährleisten, wurde zunächst die Differenzierung der DN-Thymozyten untersucht. Dazu wurden DN-Thymozyten aus SLy1 KO und WT Mäusen aufgereinigt und auf die OP9-DL1-Zellen ausgesät. Nach drei und sechs Tagen wurden die Thymozyten von den OP9-DL1-Zellen ab gespült und mittels FACS analysiert (Abb. 5). Wie man deutlich anhand des Verhältnisses von DP- zu DN-Thymozyten sehen kann, differenzieren die SLy1 KO Thymozyten signifikant langsamer als die WT Thymozyten am Tag drei und auch am Tag sechs nach dem Aussäen auf die OP9-DL1-Zellen. Diese Ergebnisse spiegeln die bereits gezeigte reduzierte Thymozytenentwicklung wider [93] und stellen sicher, dass diese Methode erfolgreich im Labor etabliert wurde.

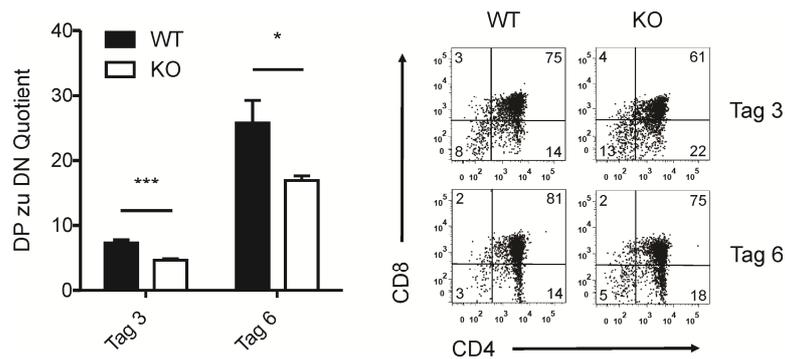


Abbildung 5: Differenzierung der DN-Thymozyten auf OP9-DL1-Zellen.

FACS-Analyse der aufgereinigten SLy1 KO und WT DN-Thymozyten nach Aussäen auf OP9-DL1-Zellen, dargestellt als Quotient aus DP- zu DN-Thymozyten. Graph zeigt Mittelwert + SEM von $n = 6$ Mäusen aus zwei unabhängigen Experimenten. Sternchen verdeutlichen statistische Signifikanz; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; Studentischer t-Test. FACS-Abbildung auf der rechten Seite veranschaulicht die Differenzierung anhand eines repräsentativen Individuums pro Genotyp. Zahlen in Quadranten geben die Verteilung von DN (CD4^{low} CD8^{low}), DP (CD4^{high} CD8^{high}), SP CD4 (CD4^{high} CD8^{low}) und SP CD8 (CD4^{low} CD8^{high}) Thymozyten wieder.

4.1.1 Thymozytenentwicklung in RAG1-defizienten Mäusen

Um die Ursache für die Störung der Thymozytenentwicklung in den SLy1 KO Mäusen weiter zu untersuchen, wurden RAG1- (*recombination-activating gene 1*) defiziente Mäuse zur Hilfe genommen. Diese wurden mit SLy1 KO Mäusen verpaart und somit eine doppel-KO Maus generiert. Das RAG1-Protein ist für die Genumlagerung des *TZR* verantwortlich [95] und somit führt eine RAG1-Defizienz zu einem Entwicklungsstopp der Thymozyten im DN3-Stadium, da ein funktionaler TZR nicht ausgebildet werden kann.

Eine Analyse der Thymozytenzahl in SLy1 KO und WT Mäusen (Abb. 6A) lieferte die bereits beschriebene verminderte Zellzahl in SLy1 KO Mäusen [93]. Interessanterweise ergab die Zellzahlanalyse in SLy1 KO x RAG1 KO und WT x RAG1 KO Mäusen auch eine Reduktion der Thymozyten wenn SLy1 fehlte (Abb. 6B). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Reduktion der Zellzahl in SLy1 KO Mäusen sich sehr früh in der Thymozytenentwicklung manifestiert. Das wird zusätzlich durch die Tatsache bestärkt, dass SLy1 in Thymozyten bereits ab dem DN1-Stadium exprimiert wird [93].

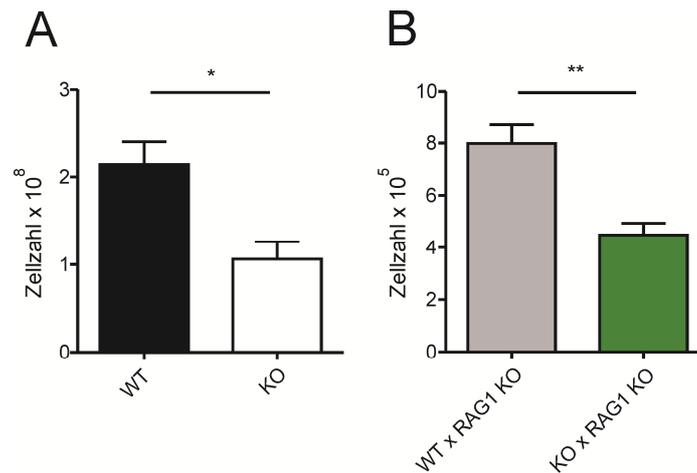


Abbildung 6: Thymozyten-Zellzahlen in SLy1 KO und SLy1 KO x RAG1 KO Mäusen.

Thymozyten von (A) SLy1 KO und WT bzw. (B) SLy1 KO x RAG1 KO und WT x RAG1 KO Mäusen wurden gezählt und als Mittelwert + SEM aus $n = 5-8$ aus drei bis vier unabhängigen Experimenten dargestellt. Sternchen verdeutlichen statistische Signifikanz; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; Studentischer t-Test.

Die Proliferation und Differenzierung der DN-Thymozyten ist von einem prä-TZR- und einem Notch-Signal abhängig. Nur wenn beide Signale vorliegen, können sich die Thymozyten normal entwickeln. Um herauszufinden in welchen Signalweg SLy1 eingreift, wurden SLy1 KO x RAG1 KO Mäuse zur Hilfe gezogen. Aufgrund des fehlenden TZR kann in diesen Mäusen das prä-TZR-Signal ausgeschlossen werden und der Notch-Signalweg im Einzelnen analysiert werden. Ein Notch-Signal ohne prä-TZR-Signal kann allerdings nur das Überleben der Zellen sichern. Wenn SLy1 im Notch-Signalweg involviert wäre, würde das Fehlen des SLy1 zu einer Unterbrechung führen, die wiederum in einer erhöhten Sterblichkeit sichtbar wäre. Um diese Hypothese zu überprüfen wurden die DN-Thymozyten von SLy1 KO x RAG1 KO und WT x RAG1 KO auf die OP9-DL1-Zellen ausgesät und die Apoptose an den nachfolgenden drei Tagen mittels FACS analysiert (Abb. 7). Die Analyse zeigte eine erhöhte Apoptose einen Tag nach dem Aussäen auf die OP9-DL1-Zellen, die in den beiden darauffolgenden Tagen jedoch kontinuierlich abnahm. Interessanterweise konnte kein Unterschied in der Apoptose zwischen SLy1 KO x RAG1 KO und WT x RAG1 KO festgestellt werden. Damit konnte gezeigt werden, dass SLy1 nicht an der Signalübertragung von Notch beteiligt ist.

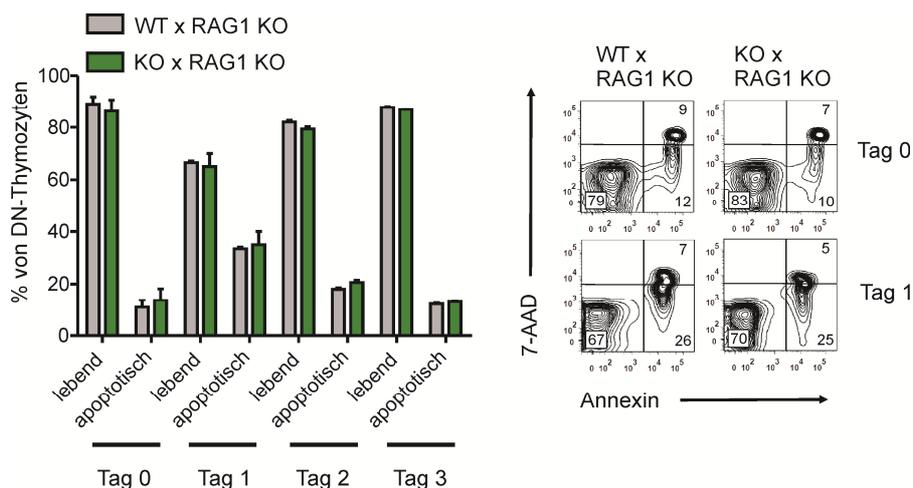


Abbildung 7: Apoptose-Analyse in SLy1 KO x RAG1 KO Thymozyten.

FACS-Analyse der aufgereinigten SLy1 KO x RAG1 KO und WT x RAG1 KO DN-Thymozyten, dargestellt als lebende und apoptotische Thymozyten am Tag null bis drei nach Aussäen auf OP9-DL1-Zellen. Graph zeigt Mittelwert + SEM von $n = 2-5$ Mäusen aus zwei unabhängigen Experimenten. FACS-Abbildung auf der rechten Seite veranschaulicht die Apoptose anhand eines repräsentativen Individuums pro Genotyp. Zahlen in Quadranten geben die Verteilung von lebenden ($\text{Annexin}^{\text{low}} 7\text{-AAD}^{\text{low}}$), früh apoptotischen ($\text{Annexin}^{\text{high}} 7\text{-AAD}^{\text{low}}$) und spät apoptotischen ($\text{Annexin}^{\text{high}} 7\text{-AAD}^{\text{high}}$) Thymozyten wieder.

4.1.2 Thymozytenentwicklung in Bcl-2-überexprimierenden Mäusen

Als eine mögliche Ursache für die reduzierte Thymozytenentwicklung in SLy1 KO Mäusen wurde eine erhöhte Apoptose während dem Übergang von DN- zum DP-Stadium postuliert [93]. Dementsprechend könnte eine Blockade der Apoptose in SLy1 KO Thymozyten die Thymozytenentwicklung wiederherstellen. Um diese Hypothese zu überprüfen wurden Bcl-2-überexprimierende (TG) Mäuse mit den SLy1 KO Mäusen gekreuzt. Die spezifische Überexpression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 unter der Kontrolle des vav-Promoters erlaubt eine gezielte Analyse des anti-apoptotischen Effekts auf die T-Zellen [96].

Zunächst wurden wieder die Zellzahlen im Thymus von SLy1 KO x Bcl-2 TG und WT x Bcl-2 TG Mäusen verglichen. Bemerkenswerterweise konnte eine Reduktion der Zellzahl in SLy1 KO x Bcl-2 TG gegenüber WT x Bcl-2 TG festgestellt werden, die wieder im Zusammenhang mit der SLy1-Defizienz stand (Abb. 8).

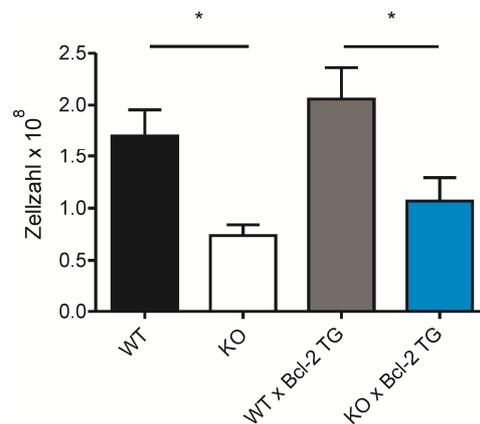


Abbildung 8: Thymozyten-Zellzahlen in SLy1 KO und SLy1 KO x Bcl-2 TG Mäusen.

Thymozyten von SLy1 KO und WT bzw. SLy1 KO x Bcl-2 TG und WT x Bcl-2 TG Mäusen wurden gezählt und als Mittelwert + SEM aus $n = 4-6$ aus drei unabhängigen Experimenten aufgetragen. Sternchen verdeutlichen statistische Signifikanz; * $p < 0,05$; Studentischer t-Test.

Um zu überprüfen, ob eine Hemmung der Apoptose den Phänotyp der WT Maus in SLy1 KO wiederherstellen kann, wurden DN-Thymozyten von SLy1 KO x Bcl-2 TG und WT x Bcl-2 TG aufgereinigt und auf die OP9-DL1-Zellen ausgesät. Nach drei und sechs Tagen wurden die Zellen abgenommen, gezählt und mit FACS analysiert. Interessanterweise konnte eine reduzierte Differenzierung von SLy1 KO x Bcl-2 TG Thymozyten im Vergleich zu WT x Bcl-2 TG festgestellt werden (Abb. 9A). Diese wurde an einer reduzierten DP- zu DN-Ratio an Tag drei und sechs nach OP9-DL1-Inkubation festgemacht. Zusätzlich zu einer reduzierten Differenzierung wurde eine erniedrigte Proliferation von SLy1 KO x Bcl-2 TG Thymozyten im Vergleich zu WT x Bcl-2 TG bestimmt (Abb. 9B). Somit konnte gezeigt werden, dass die Blockade der Apoptose durch eine Überexpression von Bcl-2 die Thymozytenentwicklung in SLy1 KO unerwarteter Weise nicht wiederherstellen kann.

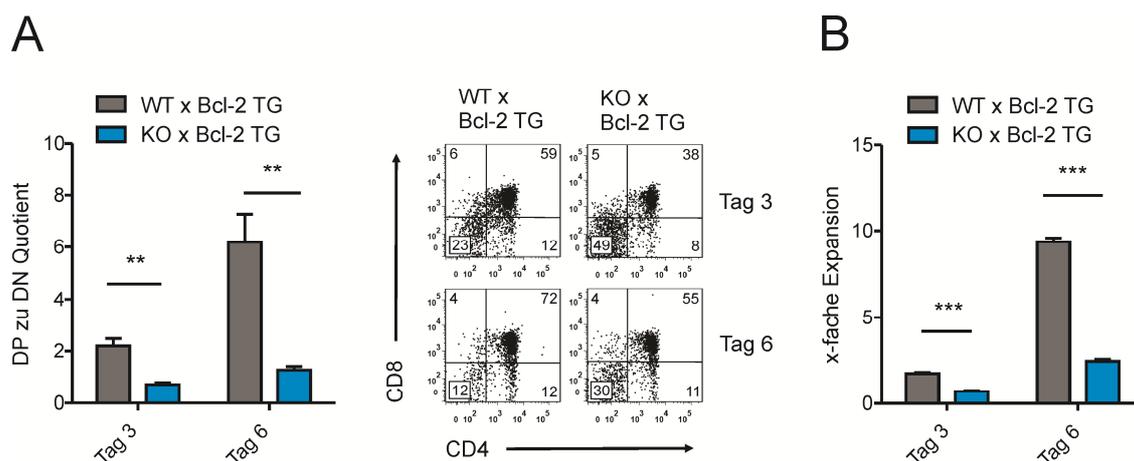


Abbildung 9: Differenzierung und Expansion der SLy1 KO x Bcl-2 TG Thymozyten.

FACS-Analyse der aufgereinigten SLy1 KO x Bcl-2 TG und WT x Bcl-2 TG DN-Thymozyten nach Aussäen auf OP9-DL1-Zellen. Graphen zeigen Mittelwert + SEM von $n = 4-5$ Mäusen aus vier unabhängigen Experimenten. Sternchen verdeutlichen statistische Signifikanz; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Studentischer t-Test. **(A)** Differenzierung dargestellt als Quotient aus DP- zu DN-Thymozyten. FACS-Abbildung auf der rechten Seite veranschaulicht die Differenzierung anhand eines repräsentativen Individuums pro Genotyp. Zahlen in Quadranten geben die Verteilung von DN ($CD4^{low} CD8^{low}$), DP ($CD4^{high} CD8^{high}$), SP CD4 ($CD4^{high} CD8^{low}$) und SP CD8 ($CD4^{low} CD8^{high}$) Thymozyten wieder. **(B)** Expansion dargestellt als das Vielfache von der ausgesäten Zellzahl.

4.2 Infektionsanalysen in SLy1 KO Mäusen

T-Zellen spielen bekannterweise eine wichtige Rolle während der Immunantwort. Ein gutes Infektionsmodell um die angeborene und adaptive Immunantwort zu analysieren ist die Infektion mit LM. Untersuchungen mit T-Zell-defizienten SCID (*severe combined immunodeficiency*) Mäusen ergaben eine begünstigte Entwicklung von chronischer Listeriose bis hin zu einer erhöhten Sterblichkeit dieser Tiere während der LM-Infektion [30, 97]. In SLy1 KO Mäusen wurde eine reduzierte T-Zell-Entwicklung und T-Zell-Proliferation festgestellt [92, 93]. Somit ergibt sich die Frage welche Auswirkung eine SLy1-Defizienz in T-Zellen auf den Verlauf einer Infektion haben würde.

4.2.1 LM-Infektion in SLy1 KO Mäusen

Um die Frage zu beantworten, welche Funktion SLy1 während einer Infektion hat, wurden SLy1 KO und WT Mäuse mit dem intrazellulären Bakterium LM i.p. infiziert. Den Mäusen wurden drei verschiedene Dosen von LM gespritzt und die Überlebensraten während der

nächsten zehn Tage bestimmt. Während der Infektion mit der hohen Dosis ($10 \times \text{LD}_{50}$ entspricht 5×10^6 CFU) starben alle infizierten Mäuse spätestens an Tag fünf (Abb. 10A). Im Gegensatz dazu überlebten alle infizierten Mäuse eine Infektion mit der niedrigen LM-Dosis von 5×10^4 CFU ($0,1 \times \text{LD}_{50}$) (Abb. 10B). Interessanterweise starben mit der mittleren LM-Dosis ($1 \times \text{LD}_{50}$ entspricht 5×10^5 CFU) signifikant mehr SLy1 KO Mäuse als WT Kontrolltiere (Abb. 10C). Während über 60 Prozent der WT Mäuse die Infektion überlebten, starben alle SLy1 KO Mäuse zwischen Tag vier und fünf nach der Infektion.

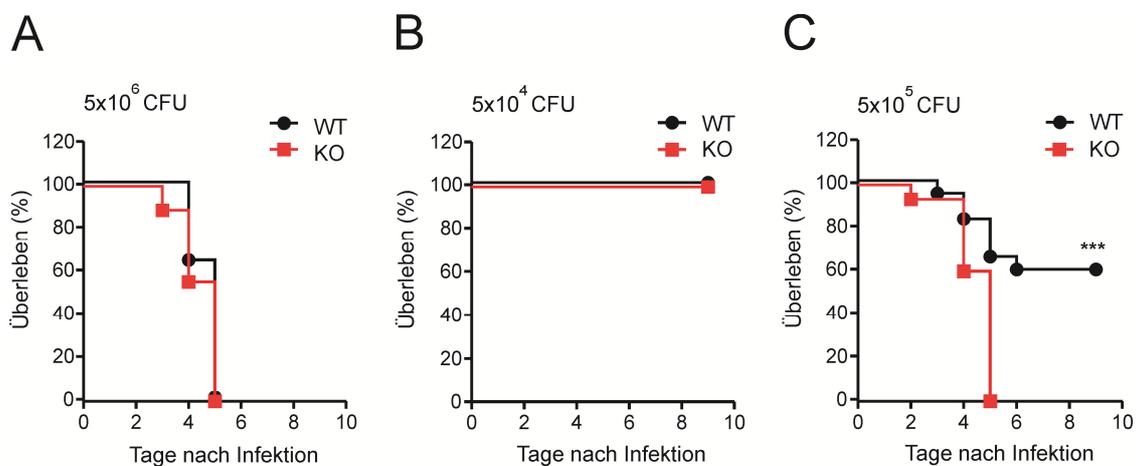


Abbildung 10: LM-Infektion in SLy1 KO Mäusen.

Kaplan-Meier-Analyse der Überlebensrate der SLy1 KO (rot) und WT (schwarz) Mäuse nach i.p. Infektion mit (A) 5×10^6 CFU (hohe Dosis entspricht $10 \times \text{LD}_{50}$), (B) 5×10^4 CFU (niedrige Dosis entspricht $0,1 \times \text{LD}_{50}$) und (C) 5×10^5 CFU (mittlere Dosis entspricht $1 \times \text{LD}_{50}$). Darstellung aus zwei bis drei unabhängigen Experimenten mit $n = 11-22$ Mäusen. Sternchen verdeutlichen statistische Signifikanz; *** $p < 0,001$; log-rank Mantel-Cox Test.

Dieses Experiment weist auf eine durch die SLy1-Defizienz hervorgerufene Beeinträchtigung während dem Übergang von der angeborenen zur adaptiven Immunantwort hin. Um die Ursache für die erhöhte Sterblichkeit von den SLy1 KO Mäusen näher zu untersuchen, wurde in den nachfolgenden Experimenten eine niedrige LM-Dosis ($0,1 \times \text{LD}_{50}$ entspricht 5×10^4 CFU) verwendet.

4.2.2 Analyse des angeborenen Immunsystems

Um auszuschließen, dass ein Defekt in der angeborenen Immunantwort für die erhöhte Sterblichkeit in den SLy1 KO Mäusen verantwortlich ist, wurden zunächst die wichtigsten Parameter des angeborenen Immunsystems angeschaut. LM induziert die eigene Phagozytose durch nicht aktivierte Makrophagen, die daraufhin Zytokine, wie IL-12 und TNF α produzieren [33]. Um die Aktivierung von Makrophagen zu analysieren, wurden SLy1 KO und WT Mäuse mit LM infiziert und die Serum-Zytokinlevel mittels ELISA am Tag eins und zwei nach Infektion bestimmt. Es konnte ein deutlicher Anstieg des IL-12 im Serum festgestellt werden, welcher das Maximum bereits einen Tag nach der LM-Infektion erreichte (Abb. 11A). Gleichzeitig wurde ein Anstieg der TNF α mRNA-Expression in Splenozyten detektiert, der ebenfalls 24 Stunden nach der Infektion maximal war (Abb. 11B). Der Anstieg beider Parameter deutet auf eine schnelle und vollständige Aktivierung der Makrophagen während der LM-Infektion hin. Allerdings konnte zwischen SLy1 KO und WT Mäusen kein Unterschied in der Makrophagen-Aktivierung ausgemacht werden, da beide Parameter zwischen den Genotypen vergleichbar waren.

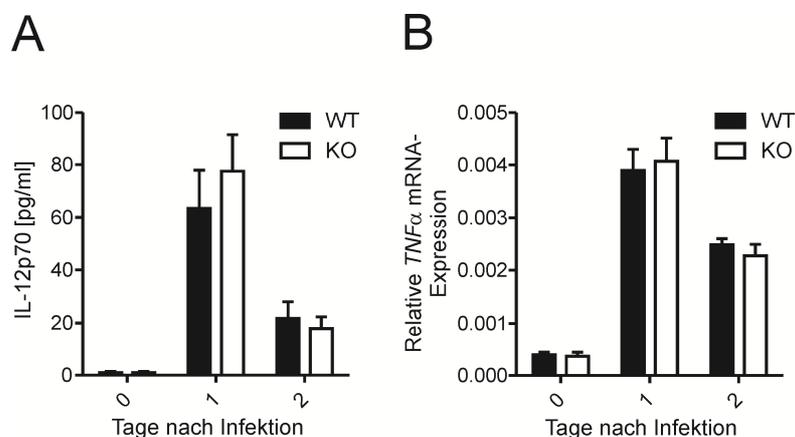


Abbildung 11: Analyse der Makrophagen-Aktivierung.

Die angeborene Immunantwort in nicht infizierten (Tag 0) und LM-infizierten (Tag eins und zwei nach Infektion) SLy1 KO und WT Mäusen. Dargestellt ist der Mittelwert + SEM von $n = 6-8$ aus zwei unabhängigen Experimenten. **(A)** ELISA-Analyse der IL-12p70 Serum-Konzentration. **(B)** TNF α mRNA-Expressionsanalyse in Splenozyten mittels qPCR.

Während der LM-Infektion führt der IL-12- und TNF α -Ausstoß zur Aktivierung von NK-Zellen, die im Gegenzug große Mengen an IFN γ produzieren [30]. IFN γ regt dann wiederum die Makrophagen zur Produktion von bakterizidem NO und ROS an [98]. Deswegen wurden zusätzlich die Aktivität der NK-Zellen und die IFN γ -Produktion überprüft. In der Tat konnte bereits einen Tag nach der LM-Infektion ein deutlicher Anstieg von IFN γ -positiven Zellen festgestellt werden (Abb. 12A). Jedoch waren am Tag eins nach der Infektion in SLy1 KO Mäusen genau so viele NK-Zellen IFN γ -positiv wie in WT Mäusen (Abb. 12B). Um zu überprüfen, ob die gleichwertig aktivierten NK-Zellen auch gleiche Mengen an IFN γ produzieren, wurden IFN γ -Zytokinlevel im Serum gemessen (Abb. 12C). Wie bereits für die Makrophagen beschrieben, stieg die IFN γ -Produktion deutlich nach der Infektion an und erreichte das Maximum nach einem Tag. Wieder konnte kein signifikanter Unterschied in der IFN γ -Produktion zwischen SLy1 KO und WT Mäusen bestimmt werden.

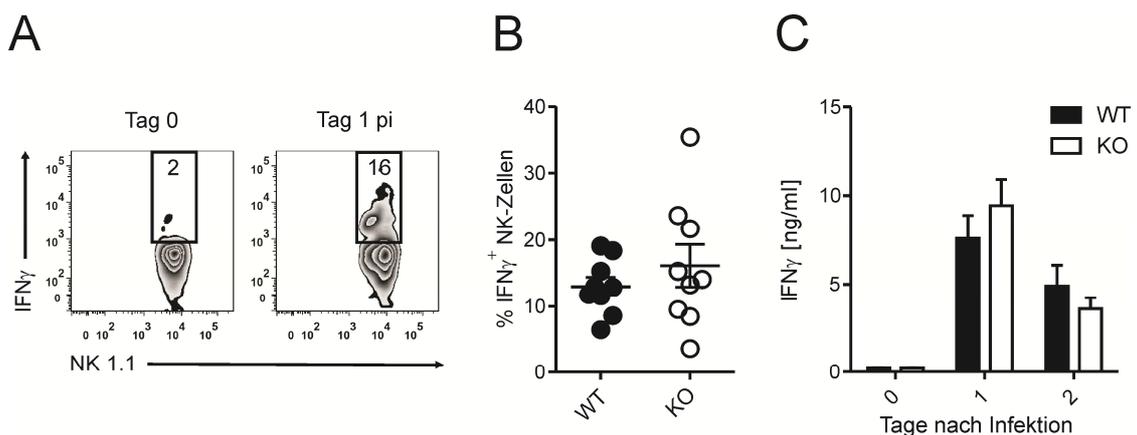


Abbildung 12: Analyse der NK-Zellen-Aktivierung.

Die angeborene Immunantwort in nicht infizierten (Tag 0) und LM-infizierten (Tag eins und zwei nach Infektion (pi = nach Infektion)) SLy1 KO und WT Mäusen. Dargestellt ist der Mittelwert + SEM von $n = 6-8$ aus zwei unabhängigen Experimenten. **(A)** IFN γ -Expression von NK-Zellen (definiert als CD3⁺ NK1.1⁺ Lymphozyten) am Beispiel eines infizierten Individuums einen Tag nach der Infektion verglichen mit einer repräsentativen nicht infizierten Kontrolle. **(B)** Quantifizierung von IFN γ -positiven SLy1 KO und WT NK-Zellen einen Tag nach der Infektion, gemessen mit FACS. **(C)** IFN γ -Serumkonzentration gemessen mit ELISA.

Zusammengenommen zeigen diese Experimente, dass das angeborene Immunsystem die maximale Aktivität bereits 24 Stunden nach der Infektion erreicht, was auf eine schnelle und vollständige Aktivierung hindeutet. Allerdings wurde keine Beeinträchtigung in SLy1 KO Mäusen beobachtet.

4.2.3 Differenzierung der T-Zellen des adaptiven Immunsystems

Da in der Immunantwort des angeborenen Immunsystems kein Defekt in SLy1 KO Tieren festgestellt werden konnte, wurde nachfolgend die adaptive Immunantwort analysiert. Sobald das angeborene Immunsystem die LM-Ausbreitung unter Kontrolle hat, greift das adaptive Immunsystem ein, befreit den Organismus von dem Bakterium und sorgt für eine lebenslange Immunität. Dafür verantwortlich sind $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen, wobei den $CD8^+$ T-Zellen eine größere Rolle zugeschrieben wird [99]. Um die Aktivierung der $CD8^+$ T-Zellen zu analysieren, wurde die Expression der Oberflächenmarker CD44 und CD62L mittels FACS angeschaut. Diese Marker eignen sich besonders gut um zwischen naiven ($CD44^{low}$ $CD62L^{high}$), Gedächtnis ($CD44^{high}$ $CD62L^{high}$) und zytotoxischen ($CD44^{high}$ $CD62L^{low}$) $CD8^+$ -Subpopulationen zu unterscheiden. Bereits am Tag vier nach der Infektion zeigten die $CD8^+$ T-Zellen eine starke Ausdifferenzierung zu zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen, die am Tag sechs nach der Infektion 60 Prozent der gesamten $CD8^+$ -Population ausmachten (Abb. 13A). Allerdings konnte kein Unterschied zwischen den einzelnen $CD8^+$ -Subpopulationen in SLy1 KO und WT Mäusen sowohl an Tag vier als auch an Tag sechs nach der Infektion festgestellt werden (Abb. 13B).

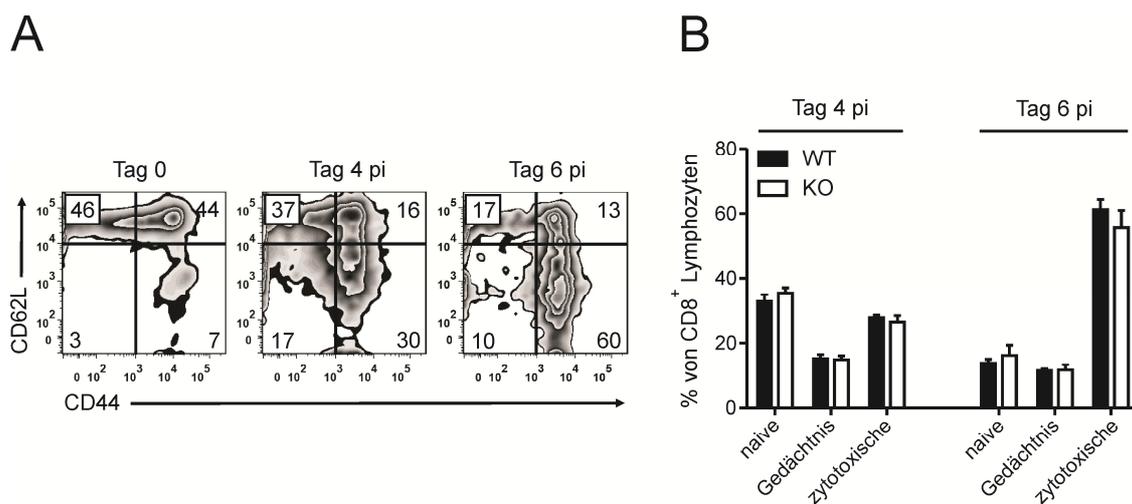


Abbildung 13: Differenzierung der CD8⁺ T-Zellen des adaptiven Immunsystems.

(A) Differenzierung der CD8⁺ T-Zellen (definiert als CD3⁺ CD8⁺ Lymphozyten) am Beispiel eines infizierten Individuums vier und sechs Tage nach der Infektion verglichen mit einer repräsentativen nicht infizierten Kontrolle. Zahlen in Quadranten geben die Verteilung von naiven (CD44^{low} CD62L^{high}), Gedächtnis (CD44^{high} CD62L^{high}) und zytotoxischen (CD44^{high} CD62L^{low}) CD8-Subpopulationen wieder. (B) Quantitative Auswertung der differenzierten CD8⁺ T-Zellen in SLy1 KO und WT Mäusen vier und sechs Tage nach der Infektion, gemessen mit FACS. Der Graph zeigt Mittelwerte + SEM von $n = 6$ Mäusen aus zwei unabhängigen Experimenten.

Zusätzlich dazu wurde die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen angeschaut. Dazu wurde die Expression des T_H1-typischen Transkriptionsfaktors T-bet [100] mittels FACS analysiert. Sieben Tage nach der Infektion zeigen die CD4⁺ T Zellen einen deutlichen Anstieg der T-bet-Expression verglichen mit nicht infizierten CD4⁺ T-Zellen (Abb. 14A). Jedoch wurde wiederum kein Unterschied zwischen SLy1 KO und WT bestimmt (Abb. 14B). Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die T-Zell-Differenzierung in SLy1 KO wie in WT Mäusen gleichwertig verläuft.

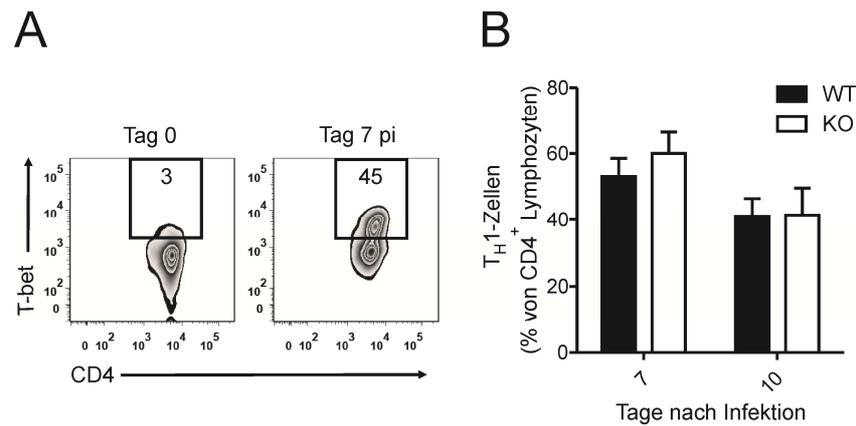


Abbildung 14: Differenzierung der $CD4^+$ T-Zellen des adaptiven Immunsystems.

(A) Differenzierung der $CD4^+$ T-Zellen (definiert als $CD3^+ CD4^+$ Lymphozyten) am Beispiel eines infizierten Individuums sieben Tage nach der Infektion verglichen mit einer repräsentativen nicht infizierten Kontrolle. (B) Quantitative Auswertung der differenzierten $CD4^+$ T-Zellen in SLy1 KO und WT Mäusen sieben und zehn Tage nach der Infektion, gemessen mit FACS. Der Graph zeigt Mittelwerte + SEM von $n = 6$ Mäusen aus zwei unabhängigen Experimenten.

4.2.4 Reduzierte Proliferation von SLy1 KO T-Zellen

Differenzierte T-Zellen erfahren während der LM-Infektion eine starke klonale Expansion, die für einen massiven Pool an LM-spezifischen T-Zellen sorgt [101, 102]. In der Tat konnte sechs Tage nach der Infektion eine deutliche Erhöhung der absoluten T-Zellen im Vergleich zum Tag vier nach der Infektion festgestellt werden (Abb. 15A). Interessanterweise waren die T-Zell-Zahlen in SLy1 KO Mäusen sowohl an Tag vier als auch an Tag sechs nach der Infektion im Vergleich zu WT Kontrollen signifikant reduziert (Abb. 15A), während die relative Verteilung von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen unverändert zwischen den beiden Genotypen blieb (Abb. 15B).

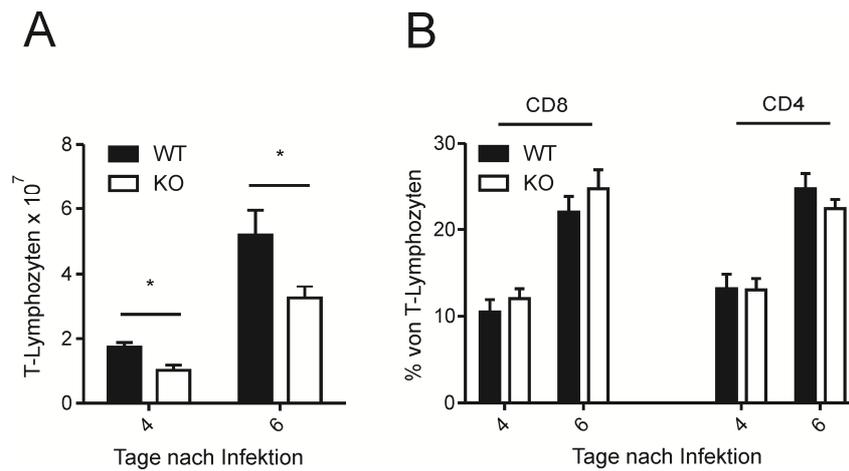


Abbildung 15: T-Zell-Zahlanalyse nach der LM-Infektion.

(A) Zellzahlanalyse der T-Zellen aus der Milz von SLy1 KO und WT Mäusen vier und sechs Tage nach der LM-Infektion. Graph zeigt Mittelwert + SEM von $n = 5$ Mäusen aus drei unabhängigen Experimenten. Sternchen verdeutlichen statistische Signifikanz; $p < 0,05$; Studentischer t-Test. (B) Relative Verteilung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen an Tag vier und sechs nach der Infektion gemessen mit FACS. Graph zeigt Mittelwert + SEM von $n = 5-6$ Mäusen aus zwei unabhängigen Experimenten.

Die Apoptose in T-Lymphozyten während einer LM-Infektion ist ein gut beschriebenes Phänomen [103]. Obwohl die genaue Ursache noch nicht bekannt ist, wird vermutet dass die Apoptose durch IFN $\alpha\beta$ gesteuert wird und für eine Selektion zwischen LM-spezifischen und nicht spezifischen T-Zellen sorgt. Dabei wird in nicht spezifischen T-Zellen die Apoptose induziert, um die Expansion der LM-spezifischen T-Zellen zu ermöglichen [104, 105]. Um zu untersuchen, ob die Reduktion der T-Zellen-Zahlen in SLy1 KO durch eine erhöhte Apoptoserate bedingt war, wurden SLy1 KO und WT Mäuse infiziert und die Apoptose sechs Tage nach der Infektion gemessen. In der Tat konnte eine erhöhte Apoptose (Annexin^{high}) sechs Tage nach der Infektion detektiert werden (Abb. 16A). Allerdings bestand zwischen SLy1 KO und WT Mäusen kein Unterschied in den lebenden (Annexin^{low} 7-ADD^{low}) und apoptotischen (Annexin^{high}) T-Zellen sechs Tage nach der Infektion (Abb. 16B).

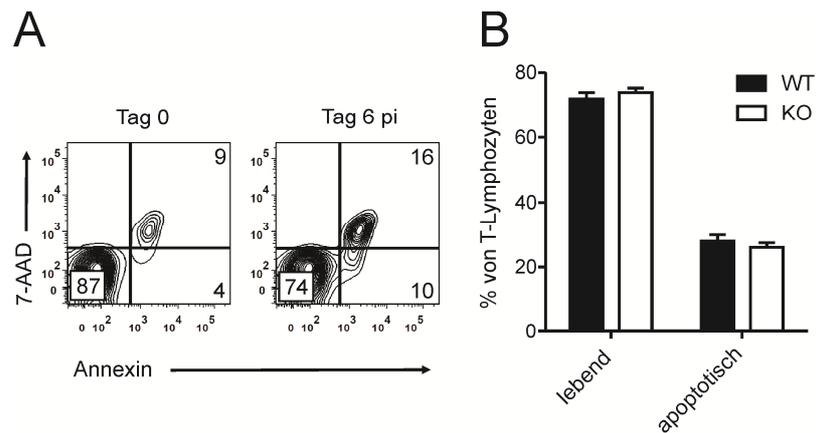


Abbildung 16: Apoptoseanalyse der T-Zellen.

(A) Apoptoseanalyse von T-Zellen am Beispiel eines infizierten Individuums sechs Tage nach der Infektion verglichen mit einer repräsentativen nicht infizierten Kontrolle. (B) Quantitative Auswertung von lebenden ($\text{Annexin}^{\text{low}} 7\text{-AAD}^{\text{low}}$) und apoptotischen ($\text{Annexin}^{\text{high}} 7\text{-AAD}^{\text{low}}$ für frühe Apoptose und $\text{Annexin}^{\text{high}} 7\text{-AAD}^{\text{high}}$ für späte Apoptose) SLy1 KO und WT T-Zellen sechs Tage nach der Infektion, gemessen mit FACS. Graph zeigt Mittelwert + SEM von $n = 5-7$ Mäusen aus zwei unabhängigen Experimenten.

Als weitere mögliche Ursache für die T-Zell-Zahlreduktion in SLy1 KO Tieren wurde die Expansion der T-Zellen näher analysiert. Es ist bekannt, dass die CD8^+ T-Zellen schneller als die CD4^+ T-Zellen expandieren und für die frühe Abwehr während der adaptiven Immunantwort verantwortlich sind [99]. Tatsächlich konnte ein Anstieg in der Proliferation, gemessen als Expression des Proliferationsmarkers Ki-67, von den CD8^+ T-Zellen bereits vier Tage nach der Infektion detektiert werden. Interessanterweise wurde eine reduzierte Proliferation in den CD8^+ T Zellen der SLy1 KO Mäuse verglichen mit den WT Mäusen beobachtet. Diese Reduktion war bereits ab Tag vier signifikant sichtbar und deutlich ausgeprägt am Tag sechs nach der Infektion (Abb. 17A).

CD4^+ T-Zellen expandieren später während der adaptiven Immunantwort und sind für die späte Abwehr und die vollständige Elimination des Bakteriums verantwortlich [99]. Entsprechend dazu wurde die Proliferation von den CD4^+ T-Zellen erst am Tag sechs nach der Infektion detektiert. Auch diese war in SLy1 KO T-Zellen verglichen mit WT T-Zellen signifikant reduziert (Abb. 17B).

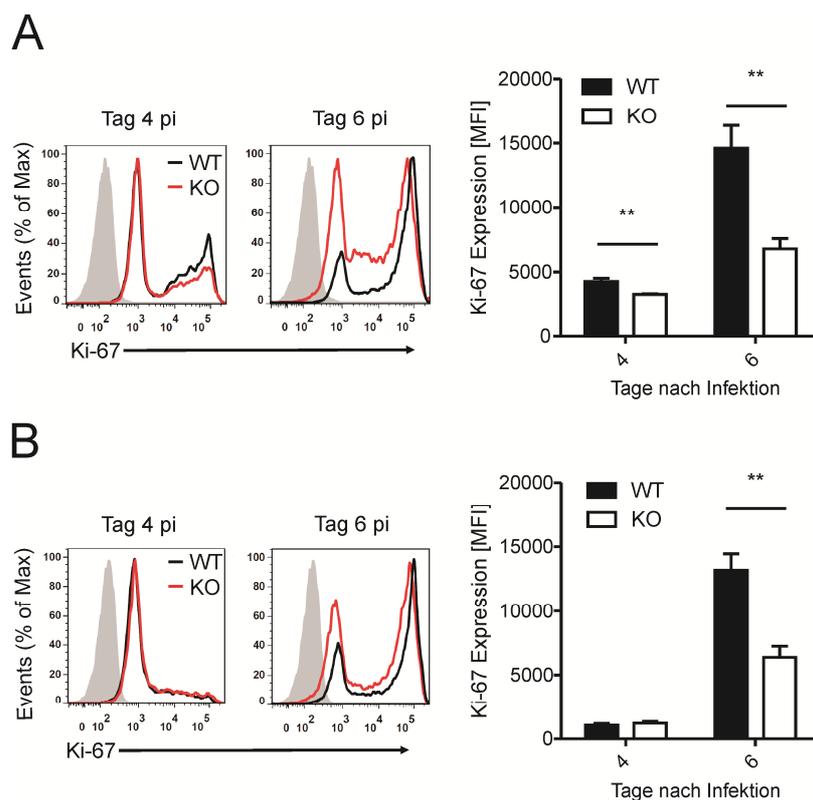


Abbildung 17: Expansionsanalyse der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen.

FACS-Analyse der Ki-67 Expression in CD8⁺ T-Zellen (**A**) und CD4⁺ T-Zellen (**B**) an Tag vier und sechs nach Infektion. Histogramme zeigen jeweils ein repräsentatives Individuum pro Genotyp (SLy1 KO = rote Linie, WT = schwarze Linie und Isotyp = grau gefülltes Histogramm). Die Graphen in (**A**) und (**B**) zeigen den Mittelwert + SEM von $n = 6$ Mäusen aus zwei unabhängigen Experimenten. Sternchen verdeutlichen statistische Signifikanz; ** $p < 0,01$; Studentischer t-Test.

Um festzustellen ob die reduzierten T-Zell-Zahlen in SLy1 KO Mäusen für die erhöhte Sterblichkeit in diesen Mäusen verantwortlich sind, wurden die Bakterientiter bestimmt. Dazu wurden SLy1 KO und WT Mäuse mit einer mittleren Dosis LM (1xLD₅₀) infiziert und die koloniebildenden Einheiten (CFU) an Tag zwei und vier gezählt. Interessanterweise zeigten die SLy1 KO Mäuse im Vergleich zu den WT Kontrollen sowohl in der Milz als auch in der Leber signifikant erhöhte CFU am Tag vier nach der Infektion (Abb. 18A und B).

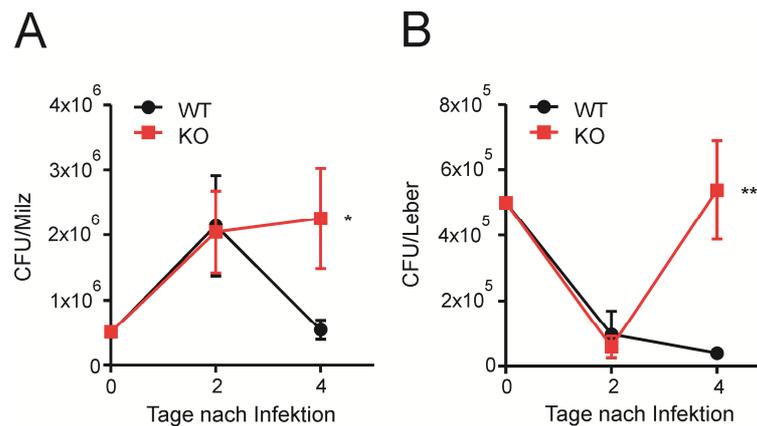


Abbildung 18: Bakterientiterbestimmung nach LM-Infektion.

CFU-Bestimmung in der Milz (**A**) und Leber (**B**) von SLy1 KO und WT Mäusen an Tag zwei und vier nach einer 1xLD₅₀ LM-Infektion. Die i.p.-gespritzte LM-Menge ist auf der y-Achse dargestellt. Graphen zeigen Mittelwert ± SEM von $n = 8-15$ Mäusen aus drei unabhängigen Experimenten. Sternchen verdeutlichen statistische Signifikanz; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; Studentischer t-Test.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die LM-induzierte Expansion von T-Zellen in den SLy1 KO Mäusen deutlich langsamer verläuft. Dadurch entsteht ein kleinerer Pool an LM-spezifischen T-Zellen der nur unzureichend Schutz gegen das Wachstum der Bakterien bietet. Eine verminderte Proliferation der T-Zellen wurde als eine mögliche Ursache für die reduzierte Expansion in den SLy1 KO T-Zellen identifiziert, während eine erhöhte Apoptose ausgeschlossen werden konnte.

4.3 *Ex vivo* Untersuchungen mit SLy1 KO T-Zellen

Um die Ursache für die reduzierte Proliferation der SLy1 KO T-Zellen näher zu untersuchen, wurden *ex vivo* Analysen durchgeführt. Als erstes wurde die reduzierte Proliferation, die während der LM-Infektion beobachtet wurde, in den *ex vivo* Untersuchungen bestätigt. Dazu wurden T-Zellen von SLy1 KO und WT Mäusen aufgereinigt, mit anti-CD3/CD28 stimuliert und mittels FACS ausgewertet. Eine reduzierte Expansion in den SLy1 KO T-Zellen konnte nach 48 Stunden Stimulation durch eine signifikant verminderte Ki-67-Expression bestätigt werden (Abb. 19).

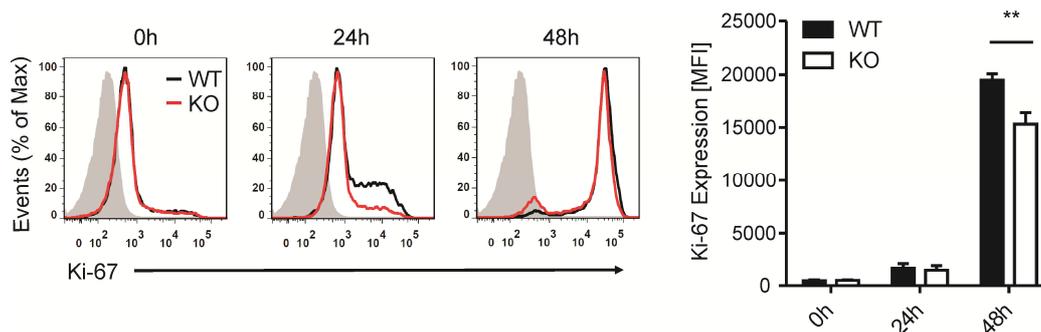


Abbildung 19: Ex vivo Ki-67-Proliferationsanalyse.

FACS-Analyse der Ki-67-Expression in aufgereinigten SLy1 KO und WT T-Zellen nach anti-CD3/CD28 Stimulation. Histogramme zeigen jeweils ein repräsentatives Individuum pro Genotyp (SLy1 KO = rote Linie, WT = schwarze Linie und Isotyp = grau gefülltes Histogramm). Graph zeigt Mittelwert + SEM von $n = 6$ Mäusen aus drei unabhängigen Experimenten. Sternchen verdeutlichen statistische Signifikanz; ** $p < 0,01$; Studentischer t-Test.

Zusätzlich zur Messung der Ki-67-Expression wurde die Proliferationshemmung in SLy1 KO T-Zellen mittels CFSE-Verdünnungsmethode bestimmt. Dazu wurden T-Zellen von SLy1 KO und WT Mäusen aufgereinigt, mit CFSE angefärbt und mit anti-CD3/CD28 stimuliert. Die Messung der CFSE-Verdünnung am FACS ergab signifikant weniger proliferierende SLy1 KO T-Zellen verglichen mit WT Kontrollen sowohl 48 als auch 72 Stunden Stimulation (Abb. 20).

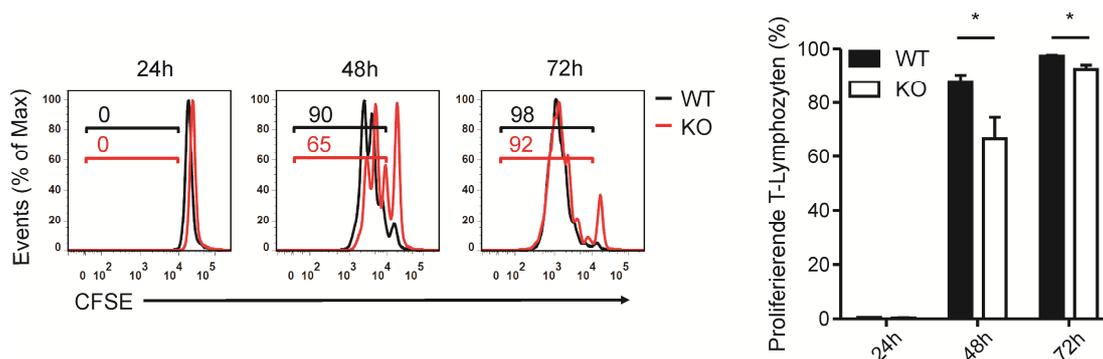


Abbildung 20: Ex vivo CFSE-Proliferationsanalyse.

FACS-Analyse der CFSE-Verdünnung in aufgereinigten SLy1 KO und WT T-Zellen nach anti-CD3/CD28 Stimulation. Histogramme zeigen jeweils ein repräsentatives Individuum pro Genotyp (SLy1 KO = rote Linie, WT = schwarze Linie). Zahlen geben den prozentualen Anteil an sich teilenden T-Zellen an. Graph zeigt Mittelwert + SEM von $n = 4-6$ Mäusen aus drei unabhängigen Experimenten. Sternchen verdeutlichen statistische Signifikanz; * $p < 0,05$; Studentischer t-Test.

4.3.1 IL-2/IL-2R-Signaltransduktion in SLy1 KO T-Zellen

Der IL-2/IL-2R-Signalweg spielt eine wichtige Rolle während der T-Zell-Proliferation. Die Aktivierung der T-Zellen durch den TZR und kostimulatorische Rezeptoren wie CD28 führen zur Produktion von IL-2 und zur Expression des IL-2R. Das freigesetzte IL-2 bindet an den IL-2R und startet so eine Signalkaskade die für die T-Zell-Proliferation und die Effektorfunktionen von aktivierten T-Zellen sorgt [106]. Um herauszufinden, ob der IL-2/IL-2R-Signalweg in SLy1 KO T-Zellen gestört ist und somit zu einer reduzierten Proliferation führt, wurden T-Zellen von SLy1 KO und WT Mäusen aufgereinigt, mit anti-CD3/CD28 stimuliert und die *IL-2*-mRNA sowie die IL-2R α (CD25) Hochregulation analysiert. Die *IL-2* mRNA war 24 Stunden nach der Stimulation tatsächlich stark erhöht (Abb. 21A). Zum gleichen Zeitpunkt zeigten fast 100 Prozent der T-Zellen eine IL-2R α (CD25) Hochregulation (Abb. 21B). Beide Parameter zeigen deutlich, dass die IL-2/IL-2R-Signalkaskade vollständig aktiviert ist, allerdings konnte kein Unterschied zwischen SLy1 KO und WT Zellen festgestellt werden. Somit kann man eine gestörte IL-2/IL-2R-Signalkaskade als Ursache für die reduzierte Proliferation in SLy1 KO T-Zellen ausschließen.

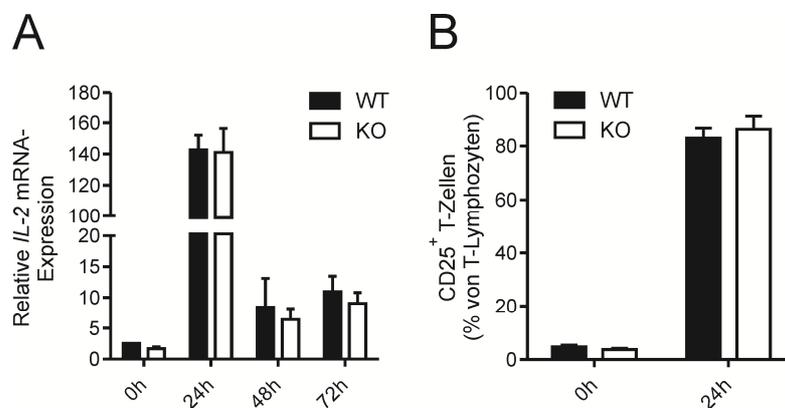


Abbildung 21: Analyse der IL-2/IL-2R-Signaltransduktion.

(A) *IL-2* mRNA-Expression in aufgereinigten SLy1 KO und WT T-Zellen nach anti-CD3/CD28 Stimulation. Graph zeigt Mittelwert + SEM von $n = 6$ aus drei unabhängigen Experimenten. (B) FACS-Analyse der IL-2R α (CD25) Hochregulation 24 Stunden nach anti-CD3/CD28 Stimulation. Graph zeigt Mittelwert + SEM von $n = 4$ aus zwei unabhängigen Experimenten.

4.3.2 Expression von Zellzyklusinhibierenden Genen in SLy1 KO T-Zellen

Als nächstes wurde der Zellzyklus der T-Zellen nach TZR-Stimulation detaillierter untersucht. Dazu wurden die T-Zellen von den SLy1 KO und WT Mäusen aufgereinigt, mit anti-CD3/CD28 stimuliert und die Zellzyklusverteilung mittels FACS analysiert. Die Messung der Zellverteilung in G0-G1- (BrdU^{low} 7-AAD^{low}), S- ($\text{BrdU}^{\text{high}}$ 7-AAD^{high}) und G2-M-Phase (BrdU^{low} 7-AAD^{high}) vor der Stimulation (0h) ergab gleiche Ausgangspunkte in SLy1 KO und WT T-Zellen (Abb. 22). Aber bereits 24 Stunden nach TZR-Stimulation waren signifikant weniger SLy1 KO T-Zellen in der S-Phase im Vergleich zu WT Kontrollen. Die Analyse nach 48 Stunden Stimulation zeigte den gleichen Verlauf. Nach 72 Stunden Stimulation befanden sich signifikant mehr WT T-Zellen bereits in der G0-G1- und G2-M-Ruhephase, während der Großteil der SLy1 KO T-Zellen sich noch immer in der S-Phase aufhielt.

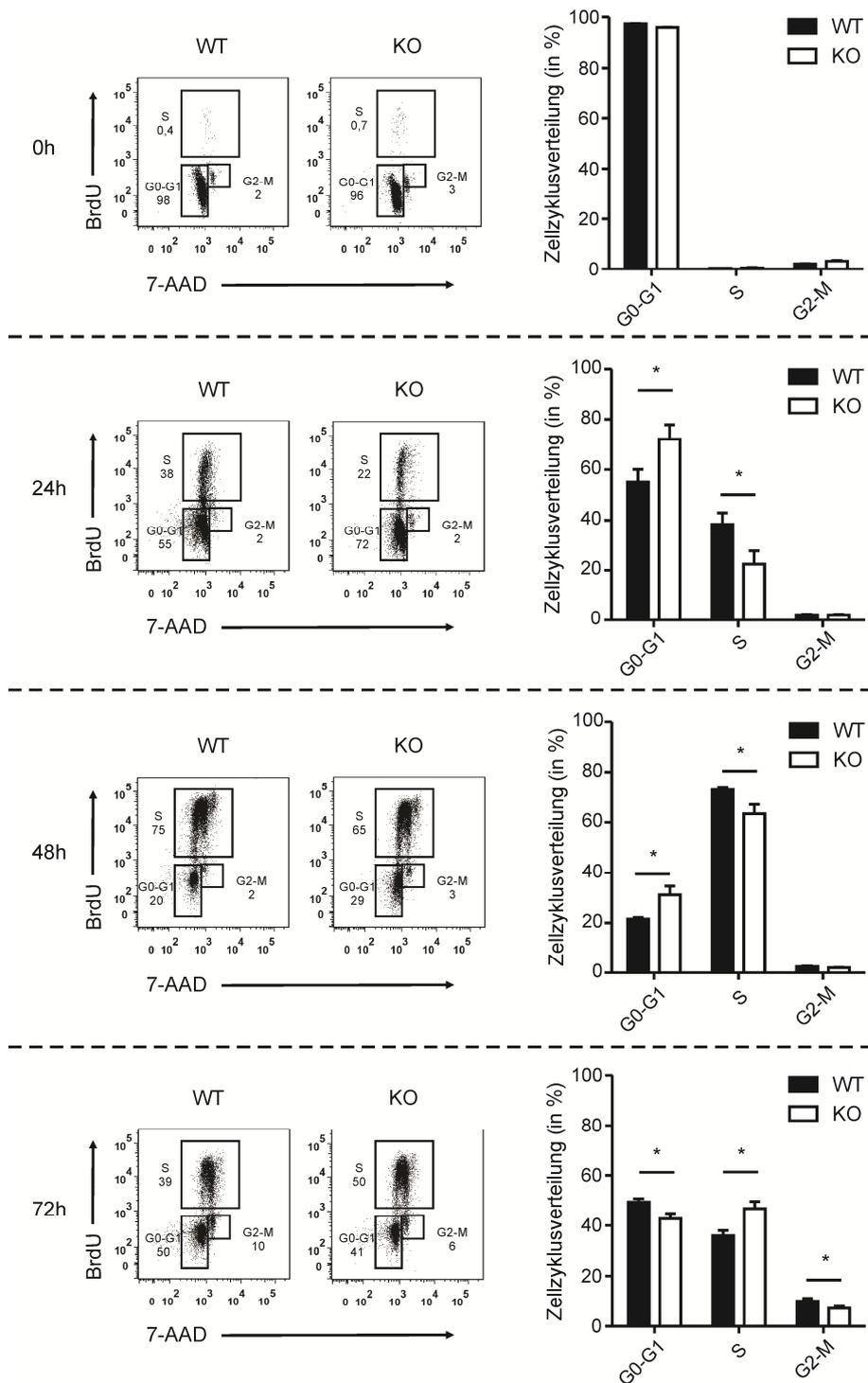


Abbildung 22: Zellzyklusanalyse in T-Zellen.

Aufgereinigte T-Zellen von SLy1 KO und WT Mäusen wurden mit anti-CD3/CD28 stimuliert und die Zellverteilung in G0-G1- (BrdU^{low} 7-AAD^{low}), S- (BrdU^{high} 7-AAD^{high}) und G2-M-Phase (BrdU^{low} 7-AAD^{high}) mit FACS gemessen. Die FACS-Abbildungen zeigen jeweils ein repräsentatives Individuum pro Genotyp. Die Graphen zeigen Mittelwert + SEM von $n = 6$ Mäusen aus drei unabhängigen Experimenten. Sternchen verdeutlichen statistische Signifikanz; * $p < 0,05$; Studentischer t-Test.

Um die Ursache für die gehemmte Zellzyklusprogression in SLy1 KO T-Zellen zu identifizieren, wurde die Expression von Zellzyklusinhibierenden Genen analysiert. Dazu wurden die T-Zellen von den SLy1 KO und WT Mäusen aufgereinigt, mit anti-CD3/CD28 stimuliert und die Expression von *p130* und *p27*, zwei wichtigen Zellzyklusinhibierenden Genen der Rb- und Cip/Kip-Familie [68], analysiert. Interessanterweise konnte eine erhöhte Expression von *p130* und *p27* sowohl auf mRNA- (Abb. 23A und B) als auch auf Protein-Ebene (Abb. 23C) in den SLy1 KO T-Zellen im Vergleich zu WT Kontrollen beobachtet werden.

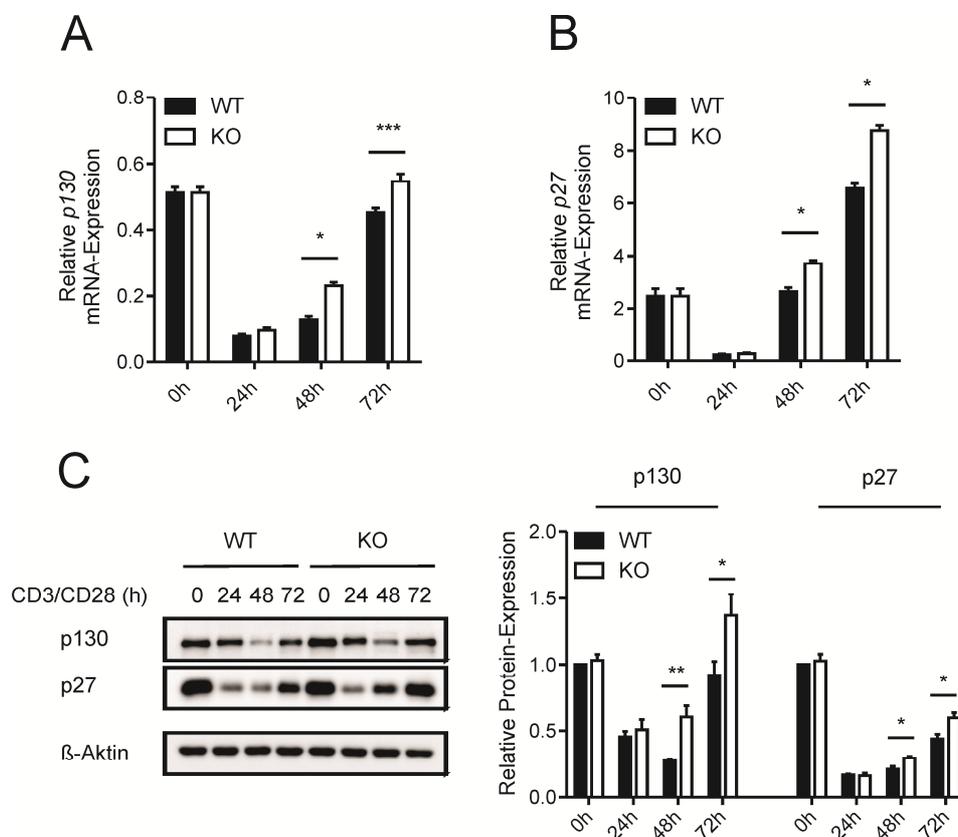


Abbildung 23: Expressionsanalyse von *p130* und *p27*.

(A) *p130* und (B) *p27* mRNA-Expression in aufgereinigten SLy1 KO und WT T-Zellen nach anti-CD3/CD28 Stimulation. Graphen zeigen Mittelwert + SEM von $n = 6$ aus drei unabhängigen Experimenten. (C) Repräsentativer Western Blot der *p130* und *p27* Expression in aufgereinigten SLy1 KO und WT T-Zellen nach anti-CD3/CD28 Stimulation. β -Aktin dient als Ladekontrolle. Quantitative Auswertung der *p130* und *p27* Expression zeigt Mittelwert + SEM von $n = 4$ aus vier unabhängigen Experimenten. Sternchen verdeutlichen statistische Signifikanz; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Studentischer t-Test.

Ein weiterer interessanter Befund wurde für zwei andere Zellzyklusinhibierende Gene der Ink4-Familie, *p16* und *p18* [107], nach anti-CD3/CD28-Stimulation festgestellt. Beide zeigten eine vergleichbare Expression in SLy1 KO und WT T-Zellen im Verlauf der gesamten Proliferation (Abb. 24).

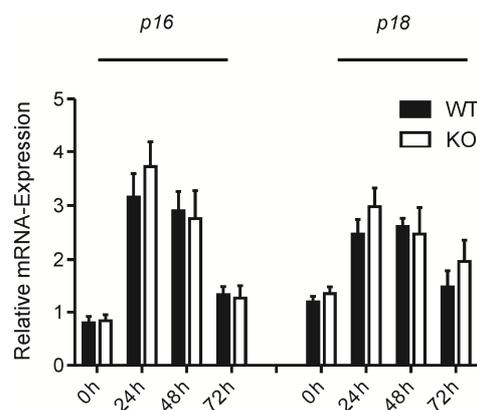


Abbildung 24: Expressionsanalyse von *p16* und *p18*.

p16 und *p18* mRNA-Expression in aufgereinigten SLy1 KO und WT T-Zellen nach anti-CD3/CD28-Stimulation. Graphen zeigen Mittelwert + SEM von $n = 6$ aus drei unabhängigen Experimenten.

Somit scheint eine Inhibierung des Zellzyklus durch eine erhöhte Expression von Zellzyklusinhibierenden Genen der Grund für die reduzierte Proliferation in SLy1 KO T-Zellen zu sein. Interessanterweise ist diese Inhibierung spezifisch durch eine erhöhte Expression von *p130* und *p27* in SLy1 KO Zellen reguliert, während andere inhibierende Zellzyklusgene, wie *p16* und *p18*, in ihrer Expression in SLy1 KO T-Zellen unverändert sind.

4.3.3 Unveränderte *Foxo1*- und *Foxo3*-Expression in SLy1 KO T-Zellen

Um den Grund für die unterschiedliche Expression von Zellzyklusinhibierenden Genen zu entschlüsseln, wurde die Regulation dieser Gene genauer angeschaut. *P130* und *p27* zählen interessanterweise zu den Zielgenen der Transkriptionsfaktorfamilie der Foxo-Proteine [44, 45], während *p16* und *p18* über andere Faktoren reguliert werden [107]. Beide Mitglieder der Familie, Foxo1 und Foxo3, regulieren die Expression von *p130* und *p27*. Um festzustellen ob die veränderte *p130*- und *p27*-Expression in SLy1 KO Mäusen auf einer veränderten *Foxo1*- oder *Foxo3*-Expression während der TZR-Stimulation beruht, wurden T-Zellen von SLy1 KO und WT Mäusen aufgereinigt, mit anti-CD3/CD28 stimuliert und die mRNA-Level gemessen.

Es konnte jedoch kein Unterschied in der mRNA-Expression sowohl für *Foxo1* (Abb. 25A) als auch für *Foxo3* (Abb. 25B) zwischen SLy1 KO und WT T-Zellen ausgemacht werden.

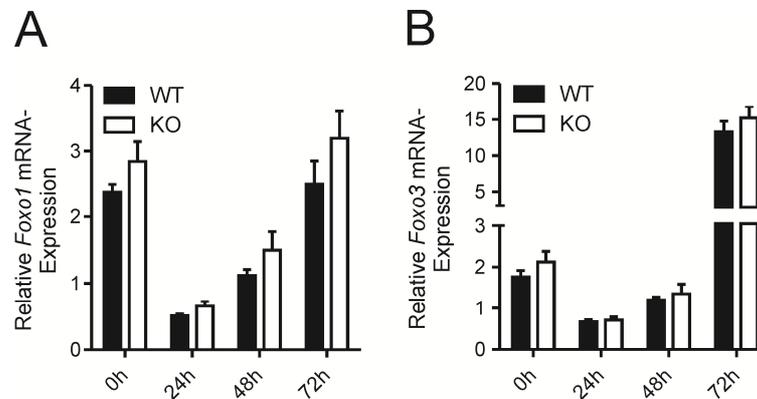


Abbildung 25: Genexpression von Foxo-Proteinen.

(A) *Foxo1* und (B) *Foxo3* mRNA-Expression in aufgereinigten SLy1 KO und WT T-Zellen nach anti-CD3/CD28 Stimulation. Graphen zeigen Mittelwert + SEM von $n = 6$ aus drei unabhängigen Experimenten.

4.3.4 Eine beschleunigte Foxo1-Dephosphorylierung in SLy1 KO T-Zellen

Nach der TZR-Stimulation werden Foxo-Proteine von der Kinase Akt an drei verschiedenen Stellen phosphoryliert. An das phosphorylierte Foxo binden 14-3-3-Proteine und induzieren einen Export aus dem Nukleus in Richtung Zytoplasma [42, 108]. Dieser Export führt zu einer verminderten transkriptionellen Aktivität des Foxo-Proteins die wiederum zu einem Zellzyklusprogress der Zelle führt. Als nächstes erfolgt eine Degradierung [109, 110] oder Dephosphorylierung des zytoplasmatischen Foxo-Proteins und eine Rückkehr in den Nukleus [56]. Um festzustellen, ob eine veränderte posttranslationale Regulation der Foxo-Proteine für die reduzierte Proliferation von SLy1 KO T-Zellen verantwortlich ist, wurden T-Zellen von SLy1 KO und WT Mäusen aufgereinigt, mit anti-CD3/CD28 stimuliert und die Phosphorylierung mittels Western Blot gemessen. Dadurch dass Foxo1- und Foxo3-Proteine auf die gleiche Art und Weise reguliert werden, wurde die Phosphorylierung beider Proteine analysiert. Für Foxo3 konnte keine unterschiedliche Phosphorylierung in SLy1 KO und WT Mäusen sowohl nach 20 Minuten als auch nach 60 Minuten Stimulation beobachtet werden (Abb. 26A und B).

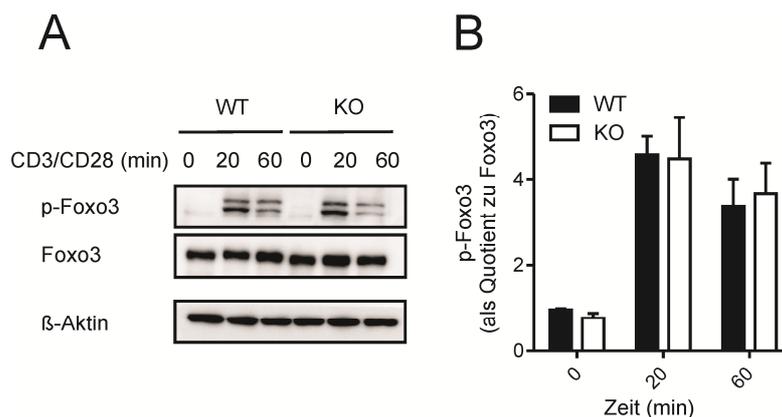


Abbildung 26: Foxo3-Phosphorylierungsanalyse.

(A) Repräsentativer Western Blot von Foxo3-Phosphorylierung (p = phospho) in aufgereinigten SLy1 KO und WT T-Zellen nach anti-CD3/CD28 Stimulation für 20 und 60 Minuten. β -Aktin dient als Ladekontrolle. (B) Quantitative Auswertung zeigt Mittelwert + SEM von $n = 9$ aus drei unabhängigen Experimenten, dargestellt als Verhältnis von phosphoryliertem Foxo3 zum Foxo3-Gesamtprotein.

Interessanterweise wurde eine reduzierte Foxo1-Phosphorylierung in SLy1 KO T-Zellen nach 60 Minuten TZR-Stimulation festgestellt (Abb. 27A). Aufgrund der identischen Foxo1-Phosphorylierung nach 20 Minuten TZR-Stimulation in SLy1 KO und WT T-Zellen, deutet eine Abnahme der Foxo1-Phosphorylierung nach 60 Minuten auf eine beschleunigte Dephosphorylierung des Foxo1-Proteins in SLy1 KO T-Zellen hin. Die Möglichkeit, dass die Abnahme der Foxo1-Phosphorylierung durch eine gestörte Akt-Phosphorylierung verursacht wurde, konnte ausgeschlossen werden, da diese während der gesamten Stimulationszeit in SLy1 KO und WT T-Zellen vergleichbar blieb (Abb. 27A). Zusätzlich konnte eine Degradierung des Foxo1-Proteins nach 60 Minuten Stimulation als Ursache für die reduzierte Phosphorylierung in SLy1 KO T-Zellen ausgeschlossen werden, da die Foxo1-Proteinlevel sowohl in SLy1 KO als auch in WT T-Zellen vergleichbar waren (Abb. 27A). Eine quantitative Auswertung der Foxo1- und Akt-Phosphorylierung ist in Abb. 27B und C dargestellt.

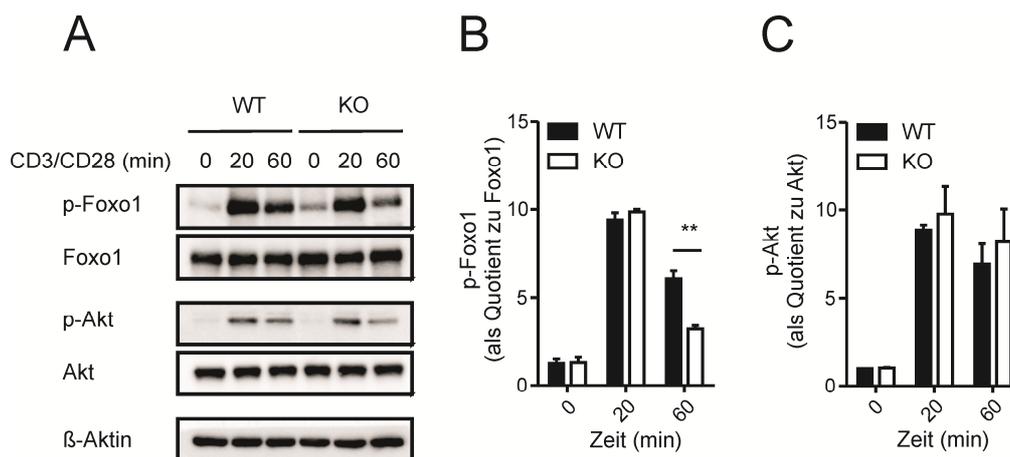


Abbildung 27: Foxo1-Phosphorylierungsanalyse.

(A) Repräsentativer Western Blot von Foxo1- und Akt-Phosphorylierung in aufgereinigten SLy1 KO und WT T-Zellen nach anti-CD3/CD28 Stimulation für 20 und 60 Minuten. β -Aktin dient als Ladekontrolle. (B) Quantitative Auswertung zeigt Mittelwert + SEM von $n = 9$ aus drei unabhängigen Experimenten, dargestellt als Verhältnis von phosphoryliertem Foxo1 zum Foxo1-Gesamtprotein. Sternchen verdeutlichen statistische Signifikanz; ** $p < 0,01$; Studentischer t-Test. (C) Quantitative Auswertung zeigt Mittelwert + SEM von $n = 9$ aus drei unabhängigen Experimenten, dargestellt als Verhältnis von phosphoryliertem Akt zum Akt-Gesamtprotein.

Um die Aussage zu überprüfen, dass eine beschleunigte Dephosphorylierung die Ursache für die reduzierte Foxo1-Phosphorylierung in stimulierten SLy1 KO T-Zellen ist, wurden T-Zellen von SLy1 KO und WT Tieren erneut aufgereinigt, stimuliert und anschließend nach Nukleus und Zytoplasma fraktioniert. Wie erwartet, konnte nach 20 Minuten TZR-Stimulation der Export des Foxo1-Proteins vom Nukleus ins Zytoplasma beobachtet werden (Abb. 28A). Der nukleäre Export war vollständig intakt in SLy1 KO T-Zellen, da das Verhältnis zwischen der Proteinmenge in Nukleus und Zytoplasma nach 20 Minuten TZR-Stimulation in SLy1 KO und WT Zellen vergleichbar war. Allerdings konnte nach 60 Minuten Stimulation wesentlich weniger Foxo1-Protein im Zytoplasma und gleichzeitig mehr Foxo1-Protein im Nukleus der SLy1 KO T-Zellen im Vergleich zu WT Zellen detektiert werden. Eine quantitative Auswertung der subzellulären Verteilung der Foxo1-Proteine ist in Abb. 28B dargestellt.

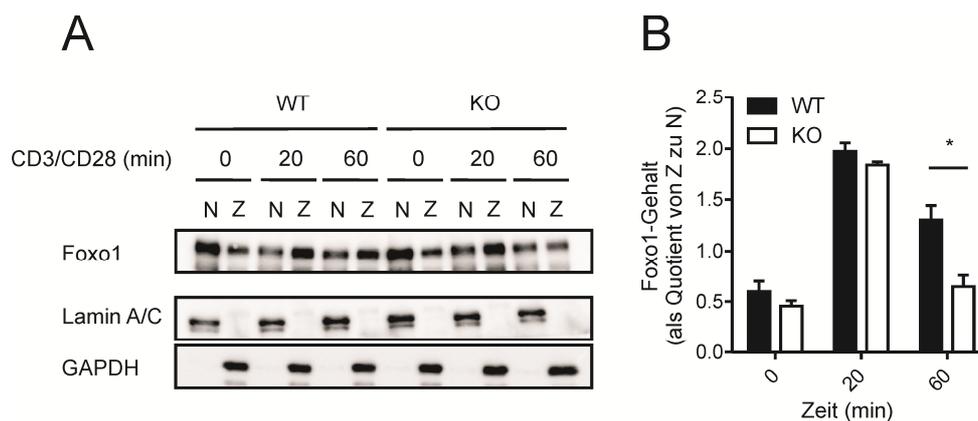


Abbildung 28: Lokalisationsanalyse von Foxo1.

(A) Repräsentativer Western Blot von Foxo1-Lokalisation im Nucleus (N) und Zytoplasma (Z) von aufgereinigten SLy1 KO und WT T-Zellen nach anti-CD3/CD28 Stimulation für 20 und 60 Minuten. Lamin A/C und GAPDH dienten als Kontrollen der Fraktionierung. (B) Quantitative Auswertung zeigt Mittelwert + SEM von $n = 8$ aus vier unabhängigen Experimenten, dargestellt als Verhältnis des zytoplasmatischen Foxo1-Proteingehalts zum nukleären Foxo1-Proteingehalt. Sternchen verdeutlichen statistische Signifikanz; * $p < 0,05$; Studentischer t-Test.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass Foxo1 nach TZR-Stimulation von Akt phosphoryliert wird und anschließend den Nucleus verlässt. Jedoch erfolgt der nukleäre Rücktransport von Foxo1 in SLy1 KO T-Zellen schneller als in den WT Kontrollen. Dieser vorzeitige Rückeintritt in den Nucleus beruht folglich auf einer beschleunigten Dephosphorylierung der Foxo1-Proteine.

4.3.5 Interaktionsanalyse zwischen SLy1 und Foxo1

Wie bereits oben beschrieben, wird Foxo1 nach TZR-Stimulation phosphoryliert und im Proteinkomplex mit 14-3-3-Proteinen aus dem Nucleus exportiert [42]. Aus den Vorarbeiten von Bernhard Reis ist bekannt, dass SLy1 nach TZR-Stimulation ebenfalls aus dem Nucleus ins Zytoplasma wandert und dieser Export auch phosphorylierungsabhängig erfolgt (Doktorarbeit Reis). Interessanterweise entsteht durch die Phosphorylierung von SLy1 am Ser27 eine putative 14-3-3 Bindestelle (Doktorarbeit Reis). Tatsächlich konnte in weiteren Arbeiten für SLy1 eine Interaktion mit 14-3-3-Proteinen beobachtet werden (Doktorarbeit Brandt). Beide Proteine, Foxo1 und SLy1, zeigen einen ähnlichen Regulationsverlauf und gleichzeitig führt eine SLy1-Deletion zur Fehlregulation des Foxo1-Proteins, womit sich die Frage ergibt, ob SLy1 mit Foxo1 interagiert. Um diese Frage zu beantworten wurden Ko-

Immunpräzipitationsanalysen (Ko-IP) durchgeführt. Dazu wurden Foxo1-HA- und SLy1-myc-Plasmide in HEK-Zellen ko-transfiziert. Nach der Zellyse erfolgte die Ko-IP mit anti-HA- bzw. anti-myc-gekoppelter Protein-A-Sepharose mit anschließender Analyse im Western Blot. Leider konnte weder für das HA-gebundene Foxo1 eine Interaktion mit SLy1 (Abb. 29A) noch für das myc-gebundene SLy1 eine Interaktion mit Foxo1 (Abb. 29B) bestimmt werden. Somit kann man schlussfolgern, dass die SLy1-abhängige Regulation des Transkriptionsfaktors Foxo1 nicht über eine direkte Bindung sondern über einen komplexeren Mechanismus erfolgt.

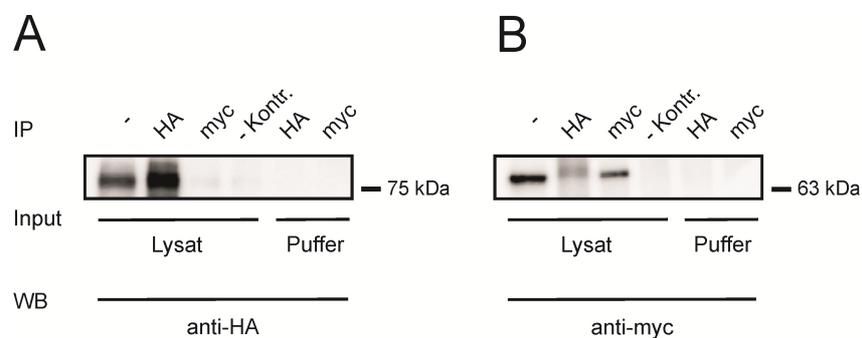


Abbildung 29: Interaktionsanalyse von SLy1 mit Foxo1.

Western Blot Analyse des Proteingehalts an HA-gekoppelten Foxo1 (A) und myc-gekoppelten SLy1 (B). Die Präzipitation erfolgte mit anti-HA und anti-myc Antikörpern. Negativkontrolle (-Kontr.): Präzipitation ohne Antikörper. Ladekontrolle (-): Proteinlysate ohne Präzipitation.

Zusammenfassend kann man nun sagen, dass die erhöhte Anfälligkeit der SLy1 KO Mäuse gegenüber LM auf einer reduzierten Proliferation der T-Zellen des adaptiven Immunsystems beruht. Die gehemmte Expansion hat zur Folge, dass der SLy1 KO Maus ein kleinerer Pool an LM-spezifischen T-Zellen zur Verfügung steht, welcher besonders in der frühen Phase der Infektion von entscheidender Bedeutung ist. Die inhibierte Proliferation erfolgte aufgrund einer erhöhten Expression der Zellzyklusinhibierenden Gene *p130* und *p27* in SLy1 KO T-Zellen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Expressionserhöhung durch eine Fehlregulation des Transkriptionsfaktors Foxo1 verursacht wurde. Während der nukleäre Export von Foxo1 in beiden Genotypen vergleichbar ablief, erfolgte der Wiedereintritt in den Nukleus in SLy1 KO T-Zellen früher als in WT Kontrollen. Dadurch konnte Foxo1 seine

transkriptionelle Aktivität in SLy1 KO T-Zellen früher als in WT T-Zellen wieder aufnehmen und so für eine erhöhte Expression der Zielgene *p130* und *p27* sorgen.

4.4 Untersuchung des Proliferationsdefekts in SLy1 KO Thymozyten

Die reifen T-Zellen der SLy1 KO Maus zeigen eine Foxo1-bedingte Reduktion der Proliferation durch eine erhöhte Expression von Zellzyklusinhibierenden Genen *p130* und *p27*. Da in vorhergehenden Arbeiten gezeigt wurde, dass auch die Thymozyten der SLy1 KO Maus einen Defekt in der Proliferation und einen damit einhergehenden Defekt in der Entwicklung aufweisen [93], stellt sich die Frage ob diese Proliferationsblockade auch über Foxo1 gesteuert ist.

4.4.1 Expressionsanalyse der Zellzyklus-Gene im Thymus

Um herauszufinden ob Foxo-Proteine am Proliferationsdefekt in SLy1 KO Thymozyten beteiligt sind, wurden zunächst die Zellzyklusinhibierenden Gene *p130* und *p27* untersucht. Dazu wurden Thymozyten aus SLy1 KO und WT Mäusen isoliert und mittels qPCR analysiert. Die Expressionsanalyse ergab sowohl für *p130* (Abb. 30A) als auch für *p27* (Abb. 30B) signifikant erhöhte mRNA-Level in SLy1 KO Thymozyten verglichen mit WT Kontrollen.

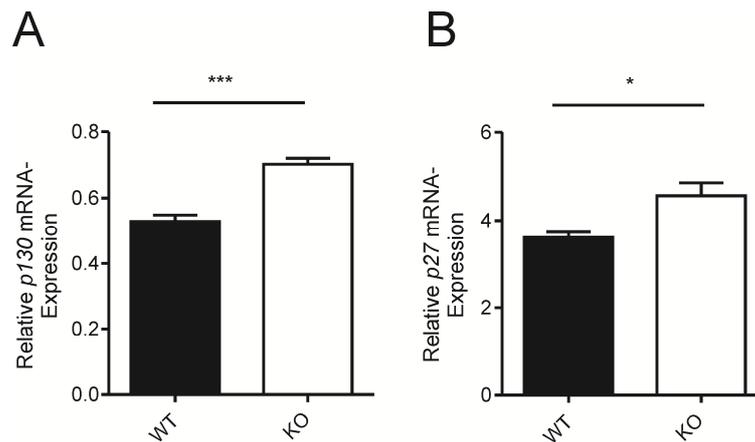


Abbildung 30: Expressionsanalyse von *p130* und *p27*.

(A) *p130* und (B) *p27* mRNA-Expression in SLy1 KO und WT Thymozyten. Graphen zeigen Mittelwert + SEM von $n = 6$ Mäusen. Sternchen verdeutlichen statistische Signifikanz; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; Studentischer t-Test.

Dieses Ergebnis lässt vermuten dass Foxo-Proteine an der Hochregulation der Zellzyklusinhibierenden Gene beteiligt sind und somit ebenfalls für die reduzierte Proliferation der SLy1 KO Thymozyten verantwortlich sind.

4.4.2 Unbeeinträchtigte Foxo-Regulation in SLy1 KO Thymozyten

Um zu überprüfen ob die erhöhte *p130*- und *p27*-Expression durch eine veränderte *Foxo1*- oder *Foxo3*-Expression bedingt war, wurden Thymozyten aus SLy1 KO und WT Mäusen isoliert und mRNA-Level gemessen. Die Expression ergab vergleichbare *Foxo1* und *Foxo3* mRNA-Level in SLy1 KO und WT Thymozyten (Abb. 31A).

Wie bereits für reife T-Zellen gezeigt wurde, kann eine beschleunigte Foxo1- oder Foxo3-Dephosphorylierung die Ursache für eine erhöhte Expression von *p130* und *p27* darstellen. Um dies zu überprüfen, wurden Thymozyten aus SLy1 KO und WT Mäusen isoliert und mit PMA/Ionomycin stimuliert. Allerdings konnte sowohl 10 als auch 30 Minuten nach der Stimulation kein Unterschied zwischen der Phosphorylierung von Foxo1, Foxo3 und Akt in SLy1 KO und WT Mäusen festgestellt werden (Abb. 31B). Darüber hinaus konnte eine veränderte subzelluläre Lokalisation von Foxo1 und Foxo3 in SLy1 KO Thymozyten ebenfalls ausgeschlossen werden (Abb. 31C).

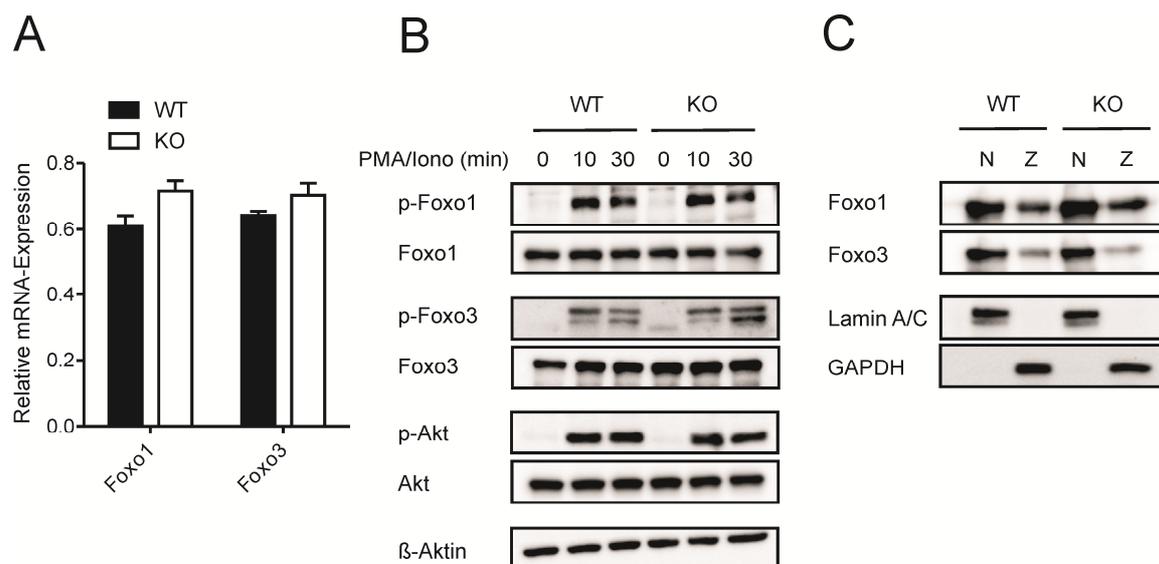


Abbildung 31: Foxo1- und Foxo3-Regulationsanalyse im Thymus.

(A) *Foxo1* und *Foxo3* mRNA-Expressionsanalyse in SLy1 KO und WT Thymozyten. Graph zeigt Mittelwert + SEM von $n = 6$ Mäusen. (B) Repräsentativer Western Blot von Foxo1-, Foxo3- und Akt-Phosphorylierung in SLy1 KO und WT Thymozyten nach PMA/Ionomycin Stimulation für 10 und 30 Minuten. Abbildung repräsentativ für ein Experiment aus insgesamt drei. β -Aktin dient als Ladekontrolle. (C) Repräsentativer Western Blot der Foxo1- und Foxo3-Lokalisation in Nukleus (N) und Zytoplasma (Z) von SLy1 KO und WT Thymozyten. Abbildung repräsentativ für ein Experiment aus insgesamt drei. Lamin A/C und GAPDH dienen als Kontrollen der Fraktionierung.

Somit kann die Überexpression der Zellzyklusinhibierenden Gene *p130* und *p27* in SLy1 KO Thymozyten nicht auf eine veränderte Foxo1- oder Foxo3-Regulation zurückgeführt werden.

4.4.3 Veränderte Bcl-2-Expression in SLy1 KO Thymozyten

Für Bcl-2 wurde, unabhängig zur anti-apoptischen Rolle, eine anti-proliferative Rolle beschrieben [111]. Diese konnte bereits während der Analysen der Thymozytenentwicklung in SLy1 KO x Bcl-2 TG und WT x Bcl-2 TG Mäusen beobachtet werden. Wie zuvor beschrieben, zeigten SLy1 KO x Bcl-2 TG Thymozyten nach Inkubation mit OP9-DL1-Zellen eine reduzierte Differenzierung und Proliferation im Vergleich zu WT x Bcl-2 TG Thymozyten. Ein direkter Vergleich mit den WT Thymozyten zeigte, dass die Überexpression von Bcl-2 die Differenzierung und Proliferation insgesamt stark reduzierte (Abb. 32A und B). Dieses Experiment beweist, dass die Bcl-2-Überexpression in Thymozyten zu einer reduzierten Proliferation führen kann.

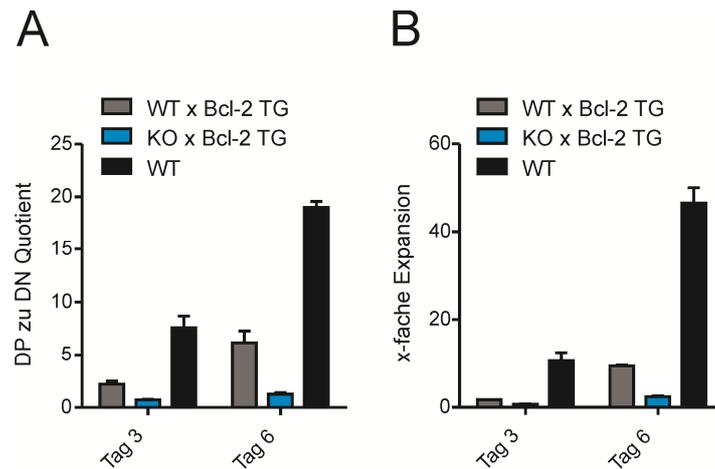


Abbildung 32: Einfluss der Bcl-2-Überexpression auf die Thymozytenentwicklung.

Abbildung zeigt die FACS-Analyse der Differenzierung und Expansion aus Abb. 9 im Verhältnis zum WT. Graphen zeigen Mittelwert + SEM von $n = 4-5$ Mäusen aus vier unabhängigen Experimenten. **(A)** Differenzierung dargestellt als Quotient aus DP- zu DN-Thymozyten. **(B)** Expansion dargestellt als das Vielfache der ausgesäten Zellzahl.

Die anti-proliferative Funktion von Bcl-2 beruht ebenfalls auf einer Hochregulation der Zellzyklusinhibierenden Gene *p130* und *p27* [112]. Somit kann eine Überexpression von Bcl-2 zu einer erhöhten Expression von *p130* und *p27* führen. Um zu überprüfen ob dieser Mechanismus für die SLy1 KO Thymozyten zutrifft, wurden Thymozyten aus SLy1 KO und WT Mäusen isoliert und die Bcl-2-Expression untersucht. Die FACS-Analyse ergab eine signifikant erhöhte Bcl-2-Expression in allen vier Entwicklungsstadien der SLy1 KO Maus verglichen mit WT Kontrollen (Abb. 33A). Zusätzlich konnte eine erhöhte *Bcl-2* mRNA-Expression in SLy1 KO Thymozyten festgestellt werden (Abb. 33B). Somit kann die erhöhte *p130*- und *p27*-Expression in SLy1 KO Thymozyten auf eine erhöhte Bcl-2-Expression zurückgeführt werden.

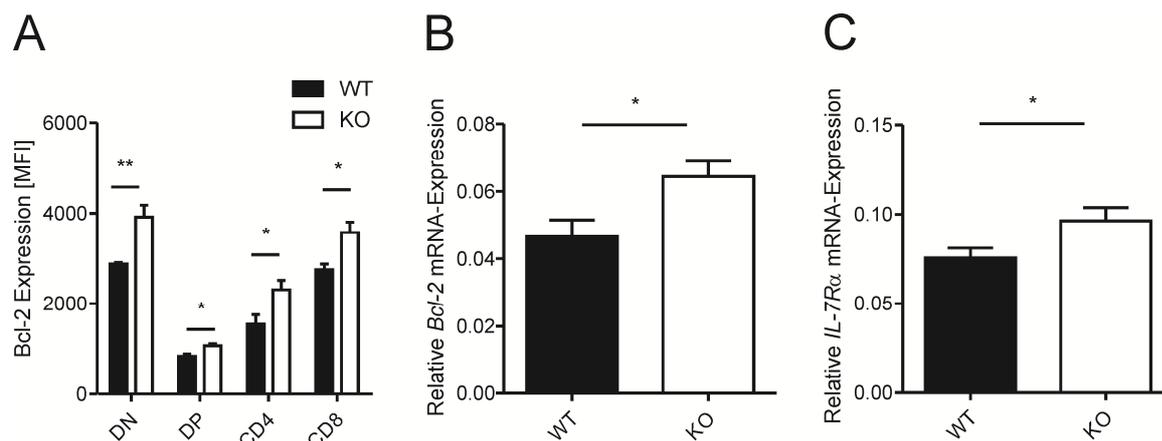


Abbildung 33: Bcl-2- und IL-7Rα-Expressionsanalyse im Thymus.

(A) FACS-Analyse der Bcl-2 Protein-Expression in SLy1 KO und WT Thymozyten. Graph zeigt Mittelwert + SEM von $n = 4$ aus zwei unabhängigen Experimenten. (B) *Bcl-2* und (C) *IL-7Rα* mRNA-Expression in SLy1 KO und WT Thymozyten. Graphen zeigen Mittelwert + SEM von $n = 6$ Mäusen. Sternchen verdeutlichen statistische Signifikanz; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; Studentischer t-Test.

Interessanterweise wird die Expression von Bcl-2 über die IL-7/IL-7R-Signalkaskade reguliert. Dabei wird das Signal über STAT5 in den Nukleus geleitet und die *Bcl-2*-Transkription initiiert. Um zu überprüfen ob eine gestörte IL-7/IL-7R-Signalkaskade für die erhöhte Expression von Bcl-2 verantwortlich ist, wurde zunächst die *IL-7Rα*-Expression in Thymozyten von SLy1 KO und WT Mäusen analysiert. Tatsächlich konnte eine erhöhte Expression des *IL-7Rα* in SLy1 KO Thymozyten festgestellt werden (Abb. 33C). Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass die erhöhte Bcl-2-Expression in SLy1 KO Thymozyten, und die damit einhergehende *p130*- und *p27*-Hochregulation, durch eine Fehlregulation in der IL-7/IL-7R-Signalkaskade zustande kommt. Dieser Mechanismus ist unterschiedlich zu dem in reifen T-Zellen und lässt vermuten, dass SLy1 die Proliferation von T-Zellen in Abhängigkeit des Differenzierungsstatus und des Aufenthaltsortes, sowie der Aktivierung, reguliert.

5 Diskussion

5.1 Die SLy1-abhängige Regulation der T-Zell-Proliferation

5.1.1 Die Rolle von SLy1 während einer LM-Infektion

Die LM-Infektion in Mäusen dient als ein klassisches Model zur Untersuchung des zellulären Immunsystems [113]. Da bereits früher gezeigt wurde, dass SLy1 eine immunregulatorische Funktion aufweist [92, 93], wurde in dieser Arbeit die Rolle des SLy1-Proteins in der Generierung der angeborenen und adaptiven Immunantwort näher untersucht. Tatsächlich konnte eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber dem LM-Bakterium in SLy1 KO Mäusen beobachtet werden, allerdings nur bei einer mittleren LM-Dosis ($1 \times LD_{50}$). Infolge dieser Infektionsdosis starben alle SLy1 KO Mäuse innerhalb der ersten fünf Tage, während über die Hälfte der WT Mäuse überlebten. Eine Fehlfunktion in der angeborenen Immunantwort der SLy1 KO Mäuse konnte als Ursache ausgeschlossen werden, da sämtliche analysierten Parameter zwischen SLy1 KO und WT Mäusen vergleichbar waren. Zusätzlich zeigte die Analyse von IL-12, TNF α und IFN γ , dass die angeborene Immunantwort bereits 24 Stunden nach der Infektion eine maximale Aktivierung erreichte und somit nicht für das Sterben der SLy1 KO Mäuse am Tag vier und fünf verantwortlich sein konnte. Diese Beobachtung, sowie auch der Zeitpunkt des mehrheitlichen Sterbens der SLy1 KO Mäuse, weisen auf einen Defekt im Übergang von der angeborenen zur adaptiven Immunantwort hin. Dass die T-Zellen des adaptiven Immunsystems eine wichtige Rolle während der LM-Infektion spielen, haben Studien mit γ_c (γ -Untereinheit) KO Mäusen eindrucksvoll gezeigt [114]. Diese Mäuse haben aufgrund eines NK-Zell-Entwicklungsdefekts keine NK-Zellen, sind aber trotzdem in der frühen Phase der LM-Infektion geschützt. Als IFN γ -Produzenten während der angeborenen Immunantwort wurden anstelle von NK-Zellen die CD8⁺ T-Zellen identifiziert. Entsprechend resultierte die Deletion der T-Zellen in den γ_c KO Mäusen im Sterben aller infizierten Mäuse innerhalb der ersten vier Tage nach der Infektion [114]. Berg et al. beschrieben die CD8⁺ T-Zellen sogar als Teil des angeborenen Immunsystems, aufgrund der Zytokin-induzierten Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen, die bereits 16 Stunden nach der LM-Infektion auftrat [115]. Zusätzlich wurde die Wichtigkeit einer schnellen und vollständigen T-Zell-Expansion in Experimenten mit CD28 KO Mäusen herausgestellt, die reduzierte T-Zell-Zahlen und zugleich eine reduzierte Überlebensfähigkeit während der LM-Infektion zeigten

[116]. In der Tat konnte in der vorliegenden Arbeit in SLy1 KO Mäusen eine reduzierte T-Zell-Proliferation festgestellt werden. Der daraus resultierende verkleinerte Pool an LM-spezifischen T-Zellen erklärt besonders während dem Übergang von der angeborenen zur adaptiven Immunantwort einen reduzierten Schutz gegenüber LM und führt daher zur erhöhten Sterblichkeit der SLy1 KO Mäuse. Unterstützt wird diese Vermutung zusätzlich durch Überlebensanalysen nach Infektionen mit höheren und niedrigeren LM-Dosen. Während der Infektion mit der hohen LM-Dosis war das angeborene Immunsystem nicht in der Lage das Bakterium entscheidend an der Expansion zu hindern, wodurch alle SLy1 KO und WT Mäuse starben. Die adaptive Immunantwort war zwar am Tag vier nach der Infektion bereits in Form von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen vertreten, konnte aber wegen der bakteriellen Überladung nichts ausrichten. Im Gegensatz dazu führte die LM-Infektion mit der niedrigen LM-Dosis zum Überleben aller infizierten Mäuse. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die angeborene Immunantwort die vorhandenen Bakterien bereits in den ersten Tagen erfolgreich bekämpfen konnte und nicht die Unterstützung des adaptiven Immunsystems benötigte.

5.1.2 SLy1 in der Regulation der T-Zell-Proliferation

Die T-Zell-Apoptose spielt während der LM-Infektion eine wichtige Rolle. Dabei wird in nicht LM-spezifischen T-Zellen eine IFN α -gesteuerte Apoptose ausgelöst um Platz und Ressourcen für die massive Expansion der LM-spezifischen T-Zellen zu ermöglichen [104, 105]. In der Tat konnte während der Infektion eine Erhöhung der Apoptose in T-Zellen beobachtet werden, aber im gleichen Ausmaß in SLy1 KO und WT Mäusen. Somit konnte die Apoptose als ein möglicher Grund für die reduzierten T-Zell-Zahlen in SLy1 KO Mäusen ausgeschlossen werden. Stattdessen wurde eine Foxo1-abhängige Blockade des Zellzyklus infolge einer Hochregulation der Zellzyklusinhibierenden Gene *p130* und *p27* in SLy1 KO T-Zellen festgestellt. Interessanterweise waren andere Zellzyklusinhibierende Gene wie *p16* und *p18*, die nicht über Foxo1 gesteuert werden, zwischen SLy1 KO und WT Mäusen nicht verändert. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Zellzyklusinhibierung in SLy1 KO T-Zellen ausschließlich über Foxo1 induziert wird und somit eine globale Zellzyklusblockade ausgeschlossen werden kann. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die veränderte Expression von *p130* und *p27* nicht durch eine veränderte Foxo1-Expression oder erhöhte Foxo1-Degradierung bedingt war, sondern durch eine Fehlregulation in der Dephosphorylierung zustande kam. Foxo1 wird nach TZR-Stimulation Akt-abhängig

phosphoryliert und im Proteinkomplex mit 14-3-3-Proteinen aus dem Nukleus exportiert. Im Zytoplasma erfolgt die Degradierung [109, 110] oder Dephosphorylierung [56] des Foxo1-Proteins. Durch die detaillierte Analyse der Phosphorylierung von Foxo1 konnte eine beschleunigte Dephosphorylierung des Foxo1-Proteins in SLy1 KO T-Zellen gezeigt werden. Dadurch wurde ein beschleunigter Wiedereintritt in den Zellkern ermöglicht, der wiederum Voraussetzung für die Transkription von Foxo1-Zielgenen *p130* und *p27* ist. Die Folgen einer veränderten Dephosphorylierung konnten eindrucksvoll in der *in vivo* Studie von Liu et al. demonstriert werden [117]. Dabei führte die Hyperaktivität der Phosphatase PP2A zur beschleunigten Dephosphorylierung von Foxo1 und zu einer erhöhten Expression des proapoptotischen Proteins BIM (*Bcl-2 interacting mediator of cell death*). Durch eine erhöhte Apoptose sank die T-Zell-Expansion während der LM-Infektion [117]. Obwohl die Analyse der Foxo1-induzierten Reduktion der T-Zell-Proliferation in SLy1 KO Mäusen *ex vivo* erfolgte, ist eine Übertragung auf die T-Zell-Expansionshemmung während der LM-Infektion durchaus möglich. Rao et al. zeigten nämlich, dass eine gleichzeitige Antigen- und IL-12-Stimulation der T-Zellen *ex vivo* zur Foxo1-Phosphorylierung und zum Export ins Zytoplasma führte [118]. Gleichzeitig wurde eine Herunterregulation des Foxo1-Zielgens *KLF2* (*Krüppel-like Factor 2*) und ein Zellzyklusfortschritt beobachtet [118]. Diese Art der Stimulation ähnelt sehr der Aktivierung der T-Zellen während der LM-Infektion und somit kann eine *in vivo* Foxo1-abhängige T-Zell-Proliferationsreduktion in SLy1 KO Mäusen vermutet werden.

Der Transkriptionsfaktor Foxo1 kontrolliert neben *p130* und *p27* die Expression einiger weiterer Zielgene die an der Regulation des Metabolismus, der Tumorsuppression und der Entwicklung beteiligt sind [119]. Ein beschleunigter nukleärer Wiedereintritt infolge der SLy1-Defizienz würde somit eine erhöhte Transkription sämtlicher Zielgene nach sich ziehen. Von interessanter Bedeutung ist die Beobachtung, dass Foxo1 die Differenzierung der CD8⁺ T-Zellen über die Regulation der T-bet-Expression steuern kann [118]. Die Analyse der CD8⁺ T-Zellen der SLy1 KO und WT Mäuse sechs Tage nach der LM-Infektion bestätigte zwar einen deutlichen Anstieg der T-bet-Expression (Abb. 34A), allerdings ohne erkennbaren Unterschied zwischen SLy1 KO und WT T-Zellen (Abb. 34B). Darüber hinaus spielt Foxo1 auch eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Funktion der regulatorischen T-Zellen (T_{reg}), die die Effektorfunktion der CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen über die Ausschüttung von inhibitorischen Zytokinen wie IL-10 und TGFβ kontrollieren. Die Deletion von Foxo1 in T_{regs} führt dabei zu schweren immunologischen Defekten, wie Autoimmunität und Splenomegalie

[120]. Die Analyse der T_{regs} in SLy1 KO und WT Mäusen vier Tage nach LM-Infektion ergab allerdings ebenfalls keinen Unterschied zwischen den beiden Genotypen (Abb. 34C).

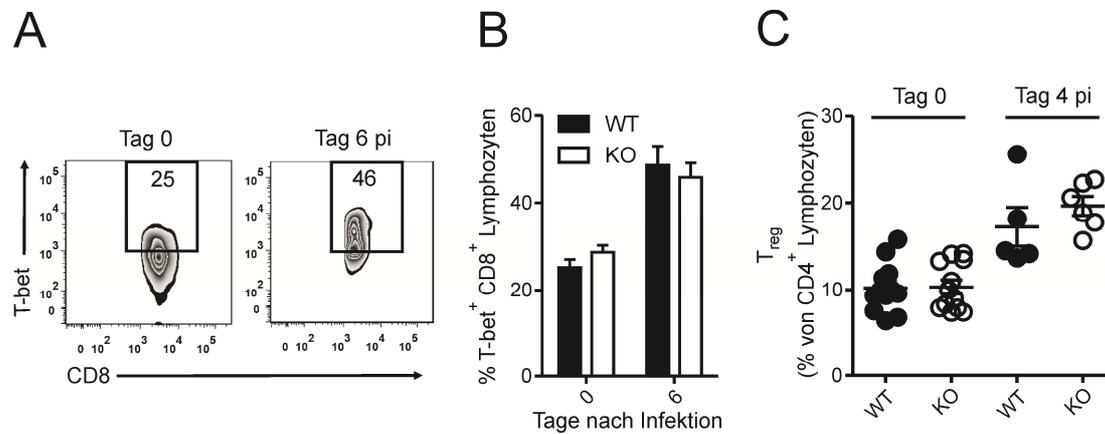


Abbildung 34: CD8-Differenzierung und T_{reg} -Analyse nach LM-Infektion.

(A) Differenzierung der CD8⁺ T-Zellen (definiert als CD3⁺ CD8⁺ Lymphozyten) am Beispiel eines infizierten Individuums sechs Tage nach der Infektion verglichen mit einer repräsentativen nicht infizierten Kontrolle. **(B)** Quantitative Auswertung der differenzierten CD8⁺ T-Zellen in SLy1 KO und WT Mäusen sechs Tage nach der Infektion, gemessen mit FACS. **(C)** Der prozentuale Anteil von T_{regs} in der CD4⁺-Population (definiert als CD3⁺ CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Lymphozyten) der SLy1 KO und WT Mäuse vor (Tag 0) und sechs Tage nach der LM-Infektion. In **(B)** und **(C)** sind jeweils Mittelwerte + SEM von n = 5-12 Mäusen aus zwei bis vier unabhängigen Experimenten dargestellt.

Diese Ergebnisse weisen auf einen sehr spezifischen Regulationsmechanismus von SLy1 hin, der die Foxo1-Funktionen nur selektiv reguliert. In T-Zellen führt das TZR-Signal zur Proliferation und zum Foxo1-Export aus dem Nukleus, an dem entsprechend den hier gezeigten Daten auch SLy1 beteiligt ist. Andere Prozesse, wie die Foxo1-abhängige CD8-Differenzierung und die T_{reg} -Entwicklung sind jedoch in SLy1 KO Mäusen nicht verändert und laufen offensichtlich unabhängig von SLy1 ab. Somit kann für SLy1 eine Signalspezifische Regulation des Foxo1-Proteins postuliert werden.

5.1.3 Wie reguliert SLy1 die Foxo1-Lokalisation?

Die hier gezeigten Daten geben einen klaren Hinweis darauf, dass SLy1 in die Regulation von Foxo1 involviert ist. Obwohl eine direkte Interaktion zwischen SLy1 und Foxo1 in Ko-IP-Analysen nicht gezeigt werden konnte, wird diese Vermutung durch Ähnlichkeiten in der

Regulation beider Proteine unterstützt. SLy1 wird nach TZR-Stimulation an Ser27 phosphoryliert [91]. Dadurch wird ein Sequenzmuster generiert, das einer 14-3-3-Bindestelle entspricht [121]. Tatsächlich konnte eine Interaktion von SLy1 mit 14-3-3-Proteinen in verschiedenen Ko-IP-Analysen nachgewiesen werden (Doktorarbeit Brandt). Dass die SLy1-Phosphorylierung essentiell für die 14-3-3-Bindung ist, zeigen SLy1 Ser27Ala-Mutanten die anstelle von Serin an Stelle 27 ein Alanin exprimieren und daher keine Bindung mit 14-3-3-Proteinen eingehen können (Doktorarbeit Brandt). Die vielfach beschriebene Funktion der 14-3-3-Proteine, nämlich phosphorylierte Proteine über die Maskierung der NLS-Domänen im Zytoplasma zu halten, könnte dabei auch die ausschließliche zytoplasmatische Lokalisation von phosphoryliertem SLy1 erklären [93]. Wie bereits beschrieben, wird Foxo1 nach TZR-Stimulation von Akt phosphoryliert und im Proteinkomplex mit 14-3-3-Proteinen aus dem Nukleus exportiert [42]. Dabei generiert Akt durch die Phosphorylierung von Foxo1 an Ser256 eine 14-3-3-Konsensussequenz, die eine nachfolgende 14-3-3-Bindung ermöglicht. Das gebundene 14-3-3-Protein verdeckt dabei die beiden NLS-Domänen des Proteins und verhindert damit den nukleären Wiedereintritt von Foxo1 [51, 54]. Interessanterweise zeigen beide Proteine, SLy1 und Foxo1, einen verhinderten Reimport in den Nukleus durch die phosphorylierungsabhängige Bindung von 14-3-3-Proteinen und eine dadurch bedingte Maskierung der NLS-Domänen. Somit muss der Proteinkomplex mit 14-3-3-Proteinen erst zerstört werden um die NLS-Domänen frei zu legen und die Dephosphorylierung einzuleiten. Eine gut beschriebene Phosphatase, die in Verbindung mit der Dephosphorylierung aller Foxo-Proteine steht, ist die PP2A. Diese Phosphatase kann den Foxo-14-3-3-Komplex zerstören, Foxo dephosphorylieren und damit den nukleären Reimport initiieren [56]. An dieser Stelle ist es interessant zu erwähnen, dass PP2A eine viel größere Affinität zu Foxo3 als zu Foxo1 oder Foxo4 aufweist [122]. Diese kann durch die große Vielfalt an verschiedenen PP2A-Untereinheiten bedingt sein und der damit verbundenen spezifischen Bindung. Daraus folgt, dass PP2A vermutlich nur eine indirekte oder sogar untergeordnete Rolle in der Foxo1- und Foxo4-Dephosphorylierung spielt und andere Phosphatasen für diese Dephosphorylierung in Frage kommen. Diese Tatsache würde erklären warum die Regulation von Foxo1 durch eine SLy1-Defizienz gestört ist, während Foxo3 unverändert zum WT reguliert wird. Dies würde heißen, dass SLy1 die Dephosphorylierung der Foxo1-spezifischen Phosphatase stört, während die Phosphatase PP2A unabhängig von SLy1 funktioniert. Daher scheint SLy1 eine schützende oder stabilisierende Funktion zu haben, die einer vorzeitigen Dephosphorylierung des 14-3-3-Foxo1-Proteinkomplexes entgegenwirkt. Das Fehlen des

SLy1-Proteins führt hingegen zur Instabilität des Komplexes und einer leichteren Zerstörung durch eine Phosphatase.

Insgesamt kann der potenzielle Mechanismus, wie SLy1 die Foxo1 Funktion reguliert, in der nachfolgenden Abbildung zusammengefasst werden (Abb. 35). Nach TZR-Stimulation wird Foxo1 durch Akt an drei Akt-spezifischen Phosphorylierungsstellen phosphoryliert und damit wird eine Bindung an 14-3-3-Proteine eingeleitet. Gleichzeitig führt das TZR-Signal zur Phosphorylierung von SLy1 an Ser27 und der damit verbundenen Einbeziehung in den Foxo1-14-3-3-Proteinkomplex. Dieser Proteinkomplex kann den Nukleus verlassen und ins Zytoplasma wandern. Im Zytoplasma stabilisiert SLy1 den Foxo1-14-3-3-Proteinkomplex und schützt ihn vor vorzeitiger Dephosphorylierung durch Phosphatasen. Fehlt SLy1, erfolgt eine schnellere Dissoziation des Proteinkomplexes, und infolge dessen gelangt der Transkriptionsfaktor Foxo1 früher in den Nukleus zurück, wo er die Transkription der Zielgene *p130* und *p27* vorantreiben kann.

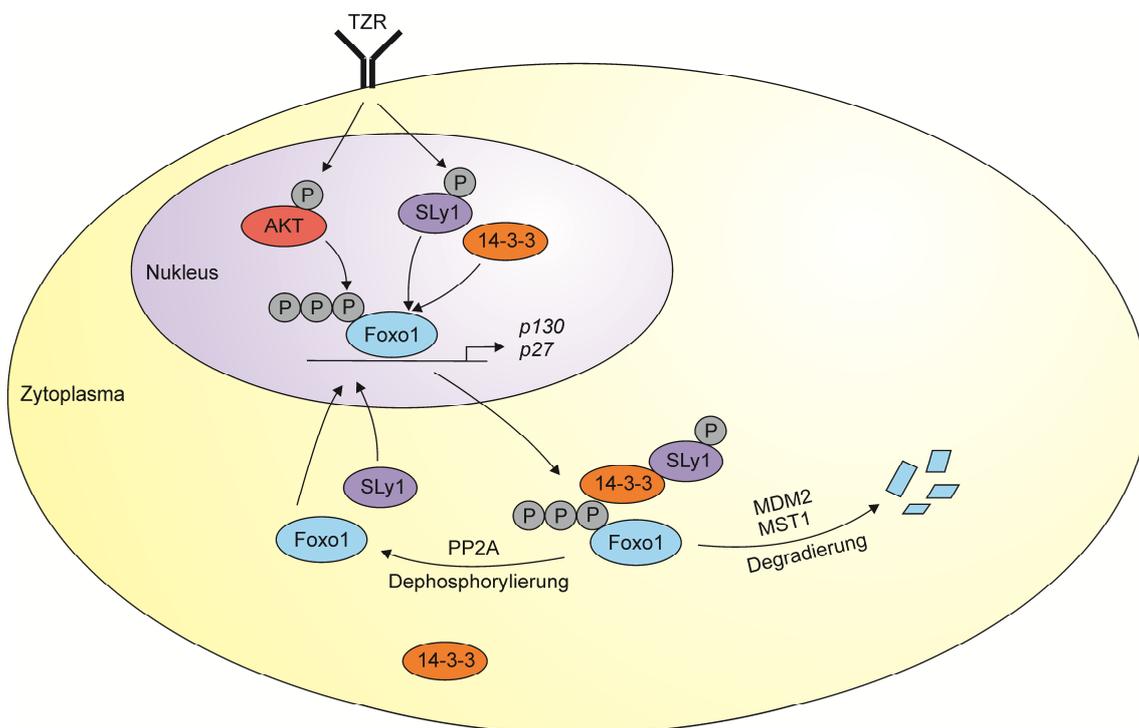


Abbildung 35: Schematische Darstellung der SLy1-abhängigen Foxo1-Regulation.

SLy1 und Foxo1 werden nach TZR-Stimulation phosphoryliert und verlassen im Proteinkomplex mit 14-3-3-Proteinen den Nukleus. Im Zytoplasma kann der Komplex zerstört werden und eine Foxo1-Degradierung oder Foxo1-Dephosphorylierung erfolgen.

5.2 Die Rolle von SLy1 in der Thymozytenentwicklung

5.2.1 SLy1 reguliert den Zellzyklus von Thymozyten

Der Zellzyklus wird streng während der hämatopoetischen Zellentwicklung kontrolliert [123]. Von besonderer Bedeutung sind dabei die negativen Zellzyklusregulatoren, die die hämatopoetischen Zellen und Vorläuferpopulationen vor einem vorzeitigen Verlust der Selbsterneuerung schützen können. Die Zellzyklusinhibierenden Vertreter der CKI-Familie p21 und p27 spielen eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Zellzyklusinitiation als Antwort auf mitogene Stimulationsreize. P21 und p27 regulieren dabei den Ruhezustand der hämatopoetischen Zellen und Vorläuferzellen und bestimmen dadurch die Größe des Zellbestandes [124, 125]. Trotz dieser wichtigen p27-Funktion in der Zellzyklusregulation zeigen p27 KO Mäuse keine Abnormalität in der hämatopoetischen Proliferation, obwohl eine lymphatische Hyperplasie im Thymus und in der Milz vorliegen. Dieser Befund deutet auf eine kompensatorische Rolle von anderen Zellzyklusinhibierenden Proteinen hin, die für die Aufrechterhaltung der hämatopoetischen Zellzahlen sorgen. Für die Kompensation der p27-Deletion kämen als erstes die beiden anderen Mitglieder der CKI-Familie p21 und p57 in Frage. Allerdings ergaben die Untersuchungen, dass p57 nicht in hämatopoetischen Zellen exprimiert wird [126] und dass p21 keine Rolle in der hämatopoetischen Proliferation spielt [124, 125]. Ein interessanter Befund zeigte, dass p130 als CDK2-Inhibitor agieren kann und somit das Fehlen von p27 in p27-Null embryonalen Mausfibroblasten (MEF) kompensieren kann [127, 128]. In MEFs mit gleichzeitiger p27- und p130-Deletion erfolgte keine CDK2-Inhibierung. Somit ist die hämatopoetische Proliferationsstörung durch die p27-Deletion zumindest theoretisch durch eine p130-Kompensation möglich. Um dieser Frage nachzugehen, wurden p27/p130 doppel-KO Mäuse untersucht [129]. Diese Mäuse zeigten ein erhöhtes Vorkommen von Lymphozyten und Thymozyten in der S- und M-Phase im Vergleich zu den WT Kontrollen, was auf eine Kompensationsfähigkeit beider Proteine schließen lässt und eine Einordnung in den gleichen Signalweg nahe legt. Die erhöhte Proliferation in diesen doppel-KO Mäusen war durch eine übermäßige CDK2-Aktivität bedingt.

Vorarbeiten haben gezeigt, dass SLy1 KO Mäuse eine reduzierte Thymozytenproliferation aufweisen, die mit einer Entwicklungsstörung im Thymus einhergeht [93]. Als Ursache dafür wurde eine erhöhte Apoptose der DN-Thymozyten postuliert. Gleichzeitig kann aber diese geringe, wenngleich signifikante, Erhöhung der DN-Apoptose nicht eine 50-prozentige

Reduktion der DP-Zellzahl in SLy1 KO Mäusen erklären, wie bereits von Bernhard Reis geschlussfolgert wurde (Doktorarbeit Reis). Zusätzlich konnte die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Apoptose-Hemmung durch Bcl-2-Überexpression nicht den gewünschten WT-Phänotyp in SLy1 KO x Bcl-2 TG Mäusen wiederherstellen. Somit müssen zusätzliche Defekte in den SLy1 KO Thymozyten vorliegen, die eine normale Entwicklung einschränken. Als einen möglichen weiteren Faktor in der Proliferationsstörung wurde eine erhöhte Expression von Zellzyklusinhibierenden Genen *p130* und *p27* in SLy1 KO Thymozyten identifiziert. Diese erhöhte Expression kann zu einer Zellzyklusblockade in Thymozyten führen. Von interessanter Bedeutung ist dabei die Tatsache, dass sowohl *p130* als auch *p27* verstärkt exprimiert waren und damit keine kompensatorische Funktion ausführen können.

Um der Frage nachzugehen was die erhöhte Expression von *p130* und *p27* in SLy1 KO Thymozyten verursachte, wurde die Regulation dieser Gene genauer angeschaut. *P130* und *p27* sind direkte Zielgene der Foxo-Proteine und wie bereits für SLy1 KO T-Zellen gezeigt wurde, führt eine erhöhte Expression dieser Gene zur Proliferationsstörung. Somit liegt der Schluss nahe, dass Foxo-Proteine auch für den Thymozytendefekt in SLy1 KO Tieren verantwortlich sind. Allerdings ergaben die Analysen der Foxo1- und Foxo3-Expression, deren Phosphorylierung sowie deren zellulären Lokalisation keine veränderte Regulation in SLy1 KO Thymozyten. Zusätzlich zeigen die Beobachtungen mit Foxo KO Mäusen, dass Foxo-Proteine keine entscheidende Rolle bei der Thymozytenentwicklung spielen [130, 131]. Ein weiteres Protein, das die Expression von *p130* und *p27* regulieren kann ist Bcl-2 [112]. Studien haben zusätzlich zu der gut beschriebenen anti-apoptischen Funktion des Bcl-2-Proteins, eine Zellzyklusregulierende Rolle entdeckt. Dabei kann Bcl-2 sowohl den Austritt aus dem Zellzyklus beschleunigen [132] als auch den Wiedereintritt hemmen [133-135]. Diese anti-proliferative Funktion verläuft dabei unabhängig von der anti-apoptischen Funktion und wird daher durch unterschiedliche Stimuli induziert [132]. Diese Hypothese wird auch in Studien mit mutierten Bcl-2-Proteinen unterstützt, die die Zellzyklusaktivität verlieren, aber die anti-apoptische Funktion beibehalten [136, 137]. Wie Bcl-2 den Ruhezustand der Zellen reguliert ist größtenteils unbekannt. Weder die Regulation über p53 noch über p16 können dabei eine Rolle spielen, da Bcl-2 die Ruhephase in Zellen welchen beide Gene fehlen, reguliert [111, 135]. Vairo et al. konnten allerdings zeigen, dass Bcl-2 die Herunterregulation von *p27* und *p130* während des Zellzyklus verhindert und damit eine Retardierung des Zellzyklus verursacht [112]. Die N-terminale Region von Bcl-2 in der Nähe von Tyr28 ist stark mit der Zellzyklusregulierenden Funktion von Bcl-2 verbunden, denn die

Mutation an dieser Stelle führt zum Verlust der anti-proliferativen Rolle des Bcl-2-Proteins, während die anti-apoptotische Funktion bestehen bleibt [137]. Gleichzeitig führt der Verlust von Tyr28 zu reduzierten p27-Level [112]. Welches Protein an diese Stelle von Bcl-2 bindet und für die Regulation von p27 und p130 sorgt, ist jedoch unklar.

In der vorliegenden Arbeit konnte in verschiedenen Entwicklungsstadien von SLy1 KO Thymozyten eine erhöhte Bcl-2-Expression beobachtet werden. Damit könnte SLy1 ein möglicher Regulator der *p130*- und *p27*-Expression über die Kontrolle der Bcl-2-Expression im Anschluss auf eine mitogene Stimulation sein. Folglich führt der Verlust von SLy1 zu einer erhöhten Expression der beiden Zellzyklusinhibitoren, und einer damit einhergehenden verminderten Proliferation, die eine verringerte Zellzahl im Thymus der SLy1 KO Mäuse erklären würde. Interessant an dieser Stelle ist die Beobachtung, dass die gleichzeitige Bcl-2-Überexpression in SLy1 KO x Bcl-2 TG und WT x Bcl-2 TG Mäusen die Proliferation nicht angleichen konnte. Somit scheint die Zellzyklusinhibierung nicht allein für die Zellzahlreduktion von SLy1 KO Thymozyten verantwortlich zu sein und weitere Defekte müssen mit einer SLy1-Defizienz verbunden sein.

5.2.2 Die Einbindung von SLy1 in den IL-7/IL-7R-Signalweg

Bcl-2 erfüllt eine wichtige Funktion während der T-Zellreifung und die am besten beschriebene Regulation des Bcl-2-Proteins erfolgt über die IL-7/IL-7R-Signalkaskade. IL-7 spielt während der Thymozytenentwicklung sowohl eine wichtige positiv- als auch eine negativ-regulatorische Rolle. Eine IL-7/IL-7R-Signalgebung vermittelt das Überleben der DN-Thymozyten durch eine JAK/STAT-vermittelte Aktivierung von anti-apoptotischen Genen, wie Bcl-2. Gleichzeitig aktiviert das IL-7/IL-7R-Signal über zusätzliche Signalkaskaden Gene, die die Signalweiterleitung, Metabolismus und Zellwachstum während der Thymozytenentwicklung regulieren [138]. Daher sind IL-7R α -Mutationen oftmals mit T-Zell-Leukämien verbunden [139]. Interessant ist aber auch die Tatsache, dass IL-7R α nur während der DN- und SP-Phase exprimiert wird und während der DP-Phase herunterreguliert wird [140], was für eine negativ-regulatorische Funktion von IL-7 spricht. Tatsächlich zeigen Inkubation von DN-Thymozyten mit hohen Dosen IL-7 [141] und Studien mit IL-7R α TG Tieren [15] eine starke Reduktion der DP-Entwicklung. Diese beruht zum Teil auf einer inhibitorischen Funktion von IL-7 auf die Differenzierung von DN- zu DP-Zellen. Der mögliche Mechanismus liegt dabei in der IL-7-bedingten Hemmung der *TCF1*, *LEF1* und *ROR γ t* Genexpression [142]. Diese Gene sind wichtig für die Differenzierung der DN- zu DP-

Thymozyten, denn die Deletion dieser Gene führt zur vollständigen Entwicklungsblockade in diesem Stadium. SLy1 KO Mäuse zeigen zusätzlich zur erhöhten Bcl-2-Expression auch eine erhöhte *IL-7R α* -Expression in Thymozyten und damit kann eine übermäßige IL-7/IL-7R-Signalgebung für eine erhöhte Expression von Bcl-2 sorgen. Gleichzeitig kann ein Defekt in der Herunterregulation der *IL-7R α* -Expression auch für die DP-Zellzahlreduktion in SLy1 KO Mäusen verantwortlich sein. Die negativ-regulatorische Funktion von IL-7 konnte Bernhard Reis bereits während seiner Doktorarbeit beobachten. Dabei zeigten die SLy1 KO Thymozyten in Kultur mit OP9-DL1-Zellen eine reduzierte Differenzierung und Expansion am Tag drei und sechs, während die IL-7-Zugabe diese Defekte sowohl am Tag drei als auch am Tag sechs kompensieren konnte (Doktorarbeit Reis). Die IL-7-Zugabe bewirkte eine insgesamt stark erhöhte Expansion der Thymozyten. Allerdings erlaubt das OP9-DL1-System nur eine Differenzierung bis zum DP-Stadium. Danach gehen die Thymozyten in eine Ruhephase über, weil weitere Entwicklungssignale fehlen. Aus der Analyse der Expansion der DN-Thymozyten am Tag sechs ist nicht ersichtlich, wie schnell die WT und die SLy1 KO Thymozyten dieses DP-Stadium erreichen. Somit kann an der Stelle ein bestehender SLy1 KO Proliferationsdefekt nicht geklärt werden. Allerdings zeigt die Expansionsanalyse am Tag drei bereits keine Unterschiede in der Proliferation zwischen SLy1 KO und WT Thymozyten. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die IL-7-Zugabe eine Angleichung der Thymozytenentwicklung in SLy1 KO und WT nach sich zieht. Der zugrunde liegende Mechanismus könnte eine Maskierung der *IL-7R α* -Überexpression in SLy1 KO Zellen sein. In diesem Fall könnte das massive Vorhandensein von IL-7 im Medium die erhöhte *IL-7R α* -Expression und die damit verbundene gesteigerte IL-7/IL-7R-Signalgebung in SLy1 KO Thymozyten überdecken und die Differenzierung in SLy1 KO und WT Zellen insgesamt stark reduzieren, wodurch Unterschiede ausgeglichen werden könnten. Dass eine übermäßige IL-7/IL-7R-Signalgebung für Defekte in SLy1 KO verantwortlich ist, wird auch durch die Tatsache gestärkt, dass IL-7 die Differenzierung der CD8⁺ SP-Zellen begünstigt [143] und entsprechend die SLy1 KO Mäuse tatsächlich signifikant mehr CD8⁺ SP-Zellen im Vergleich zu WT aufweisen [93].

Zusammenfassend kann die *IL-7R α* -Überexpression sowohl die erhöhten Bcl-2-Level in SLy1 KO Thymozyten als auch die DP-Zellzahlreduktion in SLy1 KO und SLy1 KO x Bcl-2 TG Mäusen erklären. Allerdings liefert die Literatur keinen klaren Zusammenhang zwischen der negativ-regulatorischen IL-7-Rolle und der anti-proliferativen Bcl-2-Rolle. Alle bisherigen Beobachtungen reduzierten die IL-7-Funktion auf eine Förderung des Überlebens der DN-

Population durch die Expression des Bcl-2-Proteins. Erst die neuesten Studien zeigen, dass IL-7 die Bcl-2-Expression nicht nur über JAK/STAT-Signalweg sondern auch über NFAT kontrollieren kann [144] und dass IL-7 über das Eingreifen in unterschiedliche Signalkaskaden an der Regulation verschiedener Prozesse beteiligt ist [138]. An welcher Stelle SLy1 in die IL-7/IL-7R-Signalkaskade eingreift, muss in weiteren Analysen identifiziert werden. Einen Hinweis darauf kann die Analyse weiterer IL-7-Zielgene in SLy1 KO und WT Thymozyten geben und damit eine Einordnung von SLy1 in einen spezifischen Signalweg ermöglichen.

5.2.3 Die Thymozytenentwicklung mit Hilfe des OP9 Systems

Die Entwicklung des OP9-Systems für die Analyse der Thymozytenentwicklung durch Schmitt und Zuniga-Pflücker war ein Meilenstein um die Prozesse während der DN-Reifung zu verstehen und gezielt zu manipulieren [94]. Durch die Expression von DL1 oder DL4 auf der Oberfläche der OP9-Zellen wird die Interaktion mit Notch-Rezeptoren auf der Oberfläche der Thymozyten ermöglicht und gemeinsam mit dem prä-TZR-Signal ein Entwicklungssignal induziert, das die Differenzierung ins DP-Stadium fördert. Bei all den Vorteilen die dieses System mit sich bringt, birgt es aber auch einige Nachteile wodurch eine eindeutige Interpretation der Versuchsergebnisse schwierig sein kann. Einer dieser Nachteile ist die Expression von CXCL12 (*C-X-C motif chemokine 12*) und CXCR4 (*C-X-C chemokine receptor type 4*) von den OP9-Zellen [145]. CXCL12 kann autokrin an den CXCR4 binden und das Wachstum der OP9-Zellen induzieren. Der CXCR4 wird aber auch auf den DN-Thymozyten exprimiert und initiiert nach CXCL12-Bindung ein wichtiges Signal für die Reifung. Somit können Versuchsergebnisse, wie die verschlechterte Entwicklung von SLy1 KO Thymozyten, nicht eindeutig nur dem Notch- oder prä-TZR-Signalweg zugeschrieben werden, sondern können auch aufgrund eines Defekts im CXCR4-Signalweg zustande kommen. Zusätzlich können auch weitere, noch unbekannte Faktoren von OP9-Zellen produziert werden, die den Reifeprozess der DN-Zellen beeinflussen. Ein weiterer Parameter der den Reifeprozess der DN-Zellen beeinflusst, ist die Dichte der ausgesäten OP9-Zellen. Durch unterschiedliche Passagen und ungenaue Zellzahlbestimmung kann die Zelldichte zum Teil sehr variieren und kann somit auch zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Daher werden mittlerweile Systeme mit kontrollierten Bedingungen genutzt, wie z.B. DL1- oder DL4-beschichtete Zellkulturschalen in die DN-Thymozyten ausgesät werden [145].

Nichtsdestotrotz konnten mit Hilfe des OP9-Systems wichtige Hinweise zur Funktion von SLy1 während der Thymozytenentwicklung gesammelt werden. Bernhard Reis vermutete in seiner Arbeit, dass SLy1 entweder im Signalweg des prä-TZR und/oder des Notch-Rezeptors einzuordnen ist. Um die beiden Signalwege unabhängig voneinander zu untersuchen, wurden RAG1 KO Mäuse verwendet. Diese Mäuse exprimieren keinen prä-TZR und somit kann das Notch-Signal allein das Überleben der DN-Thymozyten gewährleisten. Allerdings lieferte die Analyse keine Unterschiede in der Apoptose zwischen SLy1 KO x RAG1 KO und WT x RAG1 KO Thymozyten. Somit kann die Beteiligung von SLy1 im Notch-Signalweg ausgeschlossen werden. Interessant an dieser Stelle zu erwähnen ist die Beobachtung, dass die Überexpression von Bcl-2 nicht das Überleben der RAG1 KO Thymozyten sicherstellen kann [18]. Somit hat die erhöhte Bcl-2-Expression, die in SLy1 KO DN-Thymozyten beobachtet wurde, keinen zusätzlichen Vorteil während der Apoptoseanalyse in den SLy1 KO x RAG1 KO Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen. Das Einordnen von SLy1 in den prä-TZR-Signalweg kann zusätzlich durch die Tatsache ausgeschlossen werden, dass die Zellzahlreduktion bereits in SLy1-deletierten RAG1 KO Mäusen manifestiert ist. Außerdem kann SLy1 in RAG1 KO Mäusen phosphoryliert werden und zeigt damit eine TZR-unabhängige Funktion [93]. Diese Hinweise erhärten die Hypothese dass SLy1 in den IL-7/IL-7R-Signalweg einzuordnen ist.

In dieser Arbeit wurden weitere Anhaltspunkte zur Identifizierung der SLy1 Rolle in der Thymozytenentwicklung geschaffen. Die hier erbrachten Ergebnisse geben einen klaren Hinweis darauf, dass die Zellzahlreduktion in SLy1 KO Thymozyten nicht die Ursache eines einzelnen Defekts, sondern eines komplexen Zusammenspiels zwischen mehreren Fehlregulationen ist. In Anlehnung an die Stadiums-abhängige Regulation von IL-7R, Bcl-2 und Notch während der Thymozytenentwicklung ist es gut vorstellbar, dass auch SLy1 eine Entwicklungs-abhängige Funktion hat. Daher müssen die zukünftigen Analysen spezifisch in einzelnen Subpopulationen und in Abhängigkeit der einzelnen Thymozyten-Entwicklungsstadien durchgeführt werden.

5.3 Perspektive und klinische Relevanz von SLy1

Die SLy1-Defizienz führt zu großen Defekten in sämtlichen untersuchten lymphatischen Geweben. Im Thymus äußert sich das Fehlen von SLy1 in einer massiven Störung der

Thymozytenentwicklung und einer damit verbundenen Reduktion der T-Zell-Zahl in peripheren Lymphorganen [93]. In B-Zellen hat der SLy1-Defekt, in Form eines trunkierten SLy1-Proteins, eine Reduktion der Marginalzonen B-Zellen zu Folge, die nach anschließender Immunisierung zu einer reduzierten IgM-Produktion führt [146]. Reife SLy1 KO T-Zellen durchlaufen eine verlangsamte Proliferation, die in einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionen mit dem LM-Bakterium resultiert. Weiterhin weisen die NK-Zellen in der Lunge der SLy1 KO Mäuse eine reduzierte Expression von aktivierenden NK-Rezeptoren auf, die mit einer schlechteren Tumorbekämpfung in Verbindung steht (Kooperation mit A. Krupnick, St. Louis, USA). All diese Defekte zeigen eine positive und wichtige Rolle des Adapterproteins SLy1 in der Regulation des Immunsystems. Daher liegt der Schluss nahe, dass eine zusätzliche Expression von SLy1 einen positiven Effekt auf den Verlauf bestimmter Krankheitsbilder haben könnte. Eine solche Möglichkeit bietet eine neu entwickelte Methode der gezielten Expression von therapeutischen Proteinen nach mRNA-Einbringung in Zellen [147]. Dabei wird die gewünschte mRNA modifiziert, um die Aktivierung des angeborenen Immunsystems in Form von TLR (*toll-like receptor*), RIG1 (*retinoic acid inducible gene 1*) und PBMCs (*peripheral blood mononuclear cell*) zu unterbinden und in den gewünschten Ort appliziert. Das Einführen des Surfactant-Proteins B (SP-B) in SP-B-defiziente Mäuse konnte die Lebenserwartung der Mäuse um das Dreifache gegenüber den Kontrollen erhöhen [147]. Ein ähnlicher Therapieansatz scheint auch bei der Bekämpfung des Lungenkarzinoms vorstellbar zu sein. In Kooperation mit A. Krupnick konnte gezeigt werden, dass 129SvEv und AJ Mäuse eine hohe Anfälligkeit für Lungentumore im Vergleich zu B6 und C3H Mäusen aufweisen. Ein wesentlicher Unterschied in diesen beiden Gruppen war die verminderte Expression von SLy1 in NK-Zellen der 129SvEv und AJ Mäuse. Somit wäre eine gezielte Applikation von SLy1 mRNA in die Lungen-NK-Zellen dieser tumorsuszeptiblen Mäuse ein vielversprechender Therapieansatz, dessen Anwendung am Menschen in Zukunft durchaus vorstellbar wäre. Erwähnenswert an dieser Stelle ist aber auch die Beobachtung, dass ALL-Patienten (Akute lymphatische Leukämie) eine erhöhte *SLy1* mRNA-Expression in isolierten PBMCs aufweisen im Vergleich zu PBMCs von CLL-Patienten (Chronische lymphatische Leukämie) und Kontrollen (Abb. 36A).

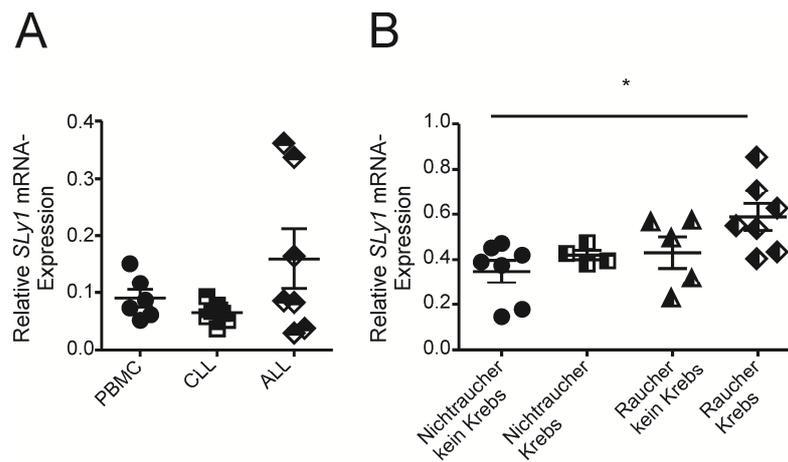


Abbildung 36: *SLY1*-Expression in humanen PBMC-Proben.

(A) *SLY1* mRNA-Expression in PBMC-Proben von ALL, CLL oder gesunden Patienten (PBMC). (B) *SLY1* mRNA-Expression in PBMC-Proben von Rauchern oder Nichtrauchern mit oder ohne Lungenkrebs. Die Graphen zeigen den Mittelwert \pm SEM von $n = 4-8$ Patienten. Sternchen verdeutlichen statistische Signifikanz; * $p < 0,05$; Studentischer t-Test.

ALL nimmt ihren Ursprung oftmals im Thymus und ist zusätzlich zu zahlreichen anderen Mutationen mit Genveränderungen im *p27* assoziiert. P27-defiziente Mäuse zeigen eine beschleunigte T-ALL-Entwicklung aufgrund der Aufhebung der Zellzykluskontrolle [148]. Die T-Zellen wie auch Thymozyten der *SLY1* KO Mäuse weisen erhöhte *p27* mRNA-Level auf. An dieser Stelle kann man jedoch nur spekulieren, ob eine erhöhte *SLY1*-Expression die Entstehung einer ALL über die Hemmung der *p27*-Expression begünstigt oder ob die *SLY1*-Expression in Folge dieser Erkrankung als gegenregulatorische Maßnahme ansteigt. Gleiches Phänomen zeigt sich bei der Analyse der humanen *SLY1* mRNA-Expression in Lungenkrebs-Patienten. Während die PBMCs von Rauchern mit Lungenkrebs verglichen mit PBMCs von gesunden Patienten signifikant mehr *SLY1* aufwiesen, zeigten sowohl die PBMCs von Rauchern ohne Krebs wie von Nichtrauchern mit Krebs keine signifikante Veränderung in der *SLY1* mRNA-Expression (Abb. 36B). Somit könnte eine Erhöhung der *SLY1* Expression auch Nachteile mit sich bringen, weshalb dieser Zusammenhang unbedingt in weiteren Untersuchungen abzuklären bleibt.

Literaturverzeichnis

- 1 **Ellmeier, W., Sawada, S. and Littman, D. R.**, The regulation of CD4 and CD8 coreceptor gene expression during T cell development. *Annu Rev Immunol* 1999. **17**: 523-554.
- 2 **Godfrey, D. I., Kennedy, J., Suda, T. and Zlotnik, A.**, A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8-triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J Immunol* 1993. **150**: 4244-4252.
- 3 **Rodewald, H. R. and Fehling, H. J.**, Molecular and cellular events in early thymocyte development. *Adv Immunol* 1998. **69**: 1-112.
- 4 **Marrack, P. and Kappler, J.**, Positive selection of thymocytes bearing alpha beta T cell receptors. *Curr Opin Immunol* 1997. **9**: 250-255.
- 5 **Page, D. M., Kane, L. P., Onami, T. M. and Hedrick, S. M.**, Cellular and biochemical requirements for thymocyte negative selection. *Semin Immunol* 1996. **8**: 69-82.
- 6 **Bosselut, R.**, CD4/CD8-lineage differentiation in the thymus: from nuclear effectors to membrane signals. *Nat Rev Immunol* 2004. **4**: 529-540.
- 7 **Yui, M. A. and Rothenberg, E. V.**, Developmental gene networks: a triathlon on the course to T cell identity. *Nat Rev Immunol* 2014. **14**: 529-545.
- 8 **Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H. R. and Aguet, M.**, Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* 1999. **10**: 547-558.
- 9 **Han, H., Tanigaki, K., Yamamoto, N., Kuroda, K., Yoshimoto, M., Nakahata, T., Ikuta, K. and Honjo, T.**, Inducible gene knockout of transcription factor recombination signal binding protein-J reveals its essential role in T versus B lineage decision. *Int Immunol* 2002. **14**: 637-645.
- 10 **Pui, J. C., Allman, D., Xu, L., DeRocco, S., Karnell, F. G., Bakkour, S., Lee, J. Y., Kadesch, T., Hardy, R. R., Aster, J. C. and Pear, W. S.**, Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity* 1999. **11**: 299-308.
- 11 **Radtke, F., Fasnacht, N. and Macdonald, H. R.**, Notch signaling in the immune system. *Immunity* 2010. **32**: 14-27.
- 12 **Maillard, I., Schwarz, B. A., Sambandam, A., Fang, T., Shestova, O., Xu, L., Bhandoola, A. and Pear, W. S.**, Notch-dependent T-lineage commitment occurs at extrathymic sites following bone marrow transplantation. *Blood* 2006. **107**: 3511-3519.
- 13 **Allman, D., Karnell, F. G., Punt, J. A., Bakkour, S., Xu, L., Myung, P., Koretzky, G. A., Pui, J. C., Aster, J. C. and Pear, W. S.**, Separation of Notch1 promoted lineage commitment and expansion/transformation in developing T cells. *J Exp Med* 2001. **194**: 99-106.
- 14 **Ciofani, M. and Zuniga-Pflucker, J. C.**, Notch promotes survival of pre-T cells at the beta-selection checkpoint by regulating cellular metabolism. *Nat Immunol* 2005. **6**: 881-888.
- 15 **Munitic, I., Williams, J. A., Yang, Y., Dong, B., Lucas, P. J., El Kassar, N., Gress, R. E. and Ashwell, J. D.**, Dynamic regulation of IL-7 receptor expression is required for normal thymopoiesis. *Blood* 2004. **104**: 4165-4172.

- 16 **Peschon, J. J., Morrissey, P. J., Grabstein, K. H., Ramsdell, F. J., Maraskovsky, E., Gliniak, B. C., Park, L. S., Ziegler, S. F., Williams, D. E., Ware, C. B., Meyer, J. D. and Davison, B. L.**, Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med* 1994. **180**: 1955-1960.
- 17 **von Freeden-Jeffry, U., Vieira, P., Lucian, L. A., McNeil, T., Burdach, S. E. and Murray, R.**, Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med* 1995. **181**: 1519-1526.
- 18 **Maraskovsky, E., O'Reilly, L. A., Teepe, M., Corcoran, L. M., Peschon, J. J. and Strasser, A.**, Bcl-2 can rescue T lymphocyte development in interleukin-7 receptor-deficient mice but not in mutant rag-1^{-/-} mice. *Cell* 1997. **89**: 1011-1019.
- 19 **Murray, E. G. D., Webb, R. A. and Swann, M. B. R.**, A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). *The Journal of Pathology and Bacteriology* 1926. **29**: 407-439.
- 20 **Pirie, J. H. H.**, A new disease of veld rodents 'Tiger River Disease'. *Publication of the South African Institute of Medical Research* 1927. **3**: 163-186.
- 21 **Gellin, B. G. and Broome, C. V.**, Listeriosis. *Jama* 1989. **261**: 1313-1320.
- 22 **Gaillard, J. L., Berche, P., Frehel, C., Gouin, E. and Cossart, P.**, Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell* 1991. **65**: 1127-1141.
- 23 **Bielecki, J., Youngman, P., Connelly, P. and Portnoy, D. A.**, *Bacillus subtilis* expressing a haemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grow in mammalian cells. *Nature* 1990. **345**: 175-176.
- 24 **Domann, E., Wehland, J., Rohde, M., Pistor, S., Hartl, M., Goebel, W., Leimeister-Wachter, M., Wuenscher, M. and Chakraborty, T.**, A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. *Embo j* 1992. **11**: 1981-1990.
- 25 **Kocks, C., Gouin, E., Tabouret, M., Berche, P., Ohayon, H. and Cossart, P.**, *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. *Cell* 1992. **68**: 521-531.
- 26 **Conlan, J. W. and North, R. J.**, Neutrophils are essential for early anti-*Listeria* defense in the liver, but not in the spleen or peritoneal cavity, as revealed by a granulocyte-depleting monoclonal antibody. *J Exp Med* 1994. **179**: 259-268.
- 27 **Conlan, J. W.**, Early host-pathogen interactions in the liver and spleen during systemic murine listeriosis: an overview. *Immunobiology* 1999. **201**: 178-187.
- 28 **Rogers, H. W. and Unanue, E. R.**, Neutrophils are involved in acute, nonspecific resistance to *Listeria monocytogenes* in mice. *Infect Immun* 1993. **61**: 5090-5096.
- 29 **Czuprynski, C. J., Brown, J. F., Maroushek, N., Wagner, R. D. and Steinberg, H.**, Administration of anti-granulocyte mAb RB6-8C5 impairs the resistance of mice to *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* 1994. **152**: 1836-1846.
- 30 **Tripp, C. S., Wolf, S. F. and Unanue, E. R.**, Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993. **90**: 3725-3729.
- 31 **Jung, S., Unutmaz, D., Wong, P., Sano, G., De los Santos, K., Sparwasser, T., Wu, S., Vuthoori, S., Ko, K., Zavala, F., Pamer, E. G., Littman, D. R. and Lang, R. A.**, In vivo depletion of CD11c⁺ dendritic cells abrogates priming of CD8⁺ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* 2002. **17**: 211-220.

- 32 **Neuenhahn, M., Kerksiek, K. M., Nauerth, M., Suhre, M. H., Schiemann, M., Gebhardt, F. E., Stemberger, C., Panthel, K., Schroder, S., Chakraborty, T., Jung, S., Hochrein, H., Russmann, H., Brocker, T. and Busch, D. H.,** CD8alpha+ dendritic cells are required for efficient entry of *Listeria monocytogenes* into the spleen. *Immunity* 2006. **25**: 619-630.
- 33 **Stavru, F., Archambaud, C. and Cossart, P.,** Cell biology and immunology of *Listeria monocytogenes* infections: novel insights. *Immunol Rev* 2011. **240**: 160-184.
- 34 **Lara-Tejero, M. and Pamer, E. G.,** T cell responses to *Listeria monocytogenes*. *Curr Opin Microbiol* 2004. **7**: 45-50.
- 35 **Lenz, L. L., Dere, B. and Bevan, M. J.,** Identification of an H2-M3-restricted *Listeria* epitope: implications for antigen presentation by M3. *Immunity* 1996. **5**: 63-72.
- 36 **Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., Tripp, C. S., Wolf, S. F., O'Garra, A. and Murphy, K. M.,** Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science* 1993. **260**: 547-549.
- 37 **Kaufmann, E. and Knochel, W.,** Five years on the wings of fork head. *Mech Dev* 1996. **57**: 3-20.
- 38 **Weigel, D., Jurgens, G., Kuttner, F., Seifert, E. and Jackle, H.,** The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the *Drosophila* embryo. *Cell* 1989. **57**: 645-658.
- 39 **Lai, E., Prezioso, V. R., Smith, E., Litvin, O., Costa, R. H. and Darnell, J. E., Jr.,** HNF-3A, a hepatocyte-enriched transcription factor of novel structure is regulated transcriptionally. *Genes Dev* 1990. **4**: 1427-1436.
- 40 **Lehmann, O. J., Sowden, J. C., Carlsson, P., Jordan, T. and Bhattacharya, S. S.,** Fox's in development and disease. *Trends Genet* 2003. **19**: 339-344.
- 41 **Furuyama, T., Kitayama, K., Shimoda, Y., Ogawa, M., Sone, K., Yoshida-Araki, K., Hisatsune, H., Nishikawa, S., Nakayama, K., Nakayama, K., Ikeda, K., Motoyama, N. and Mori, N.,** Abnormal angiogenesis in Foxo1 (Fkhr)-deficient mice. *J Biol Chem* 2004. **279**: 34741-34749.
- 42 **Brunet, A., Bonni, A., Zigmund, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J. and Greenberg, M. E.,** Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 1999. **96**: 857-868.
- 43 **Dijkers, P. F., Medema, R. H., Pals, C., Banerji, L., Thomas, N. S., Lam, E. W., Burgering, B. M., Raaijmakers, J. A., Lammers, J. W., Koenderman, L. and Coffey, P. J.,** Forkhead transcription factor FKHR-L1 modulates cytokine-dependent transcriptional regulation of p27(KIP1). *Mol Cell Biol* 2000. **20**: 9138-9148.
- 44 **Medema, R. H., Kops, G. J., Bos, J. L. and Burgering, B. M.,** AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* 2000. **404**: 782-787.
- 45 **Kops, G. J., Medema, R. H., Glassford, J., Essers, M. A., Dijkers, P. F., Coffey, P. J., Lam, E. W. and Burgering, B. M.,** Control of cell cycle exit and entry by protein kinase B-regulated forkhead transcription factors. *Mol Cell Biol* 2002. **22**: 2025-2036.
- 46 **Hribal, M. L., Nakae, J., Kitamura, T., Shutter, J. R. and Accili, D.,** Regulation of insulin-like growth factor-dependent myoblast differentiation by Foxo forkhead transcription factors. *J Cell Biol* 2003. **162**: 535-541.
- 47 **Nakae, J., Kitamura, T., Kitamura, Y., Biggs, W. H., 3rd, Arden, K. C. and Accili, D.,** The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. *Dev Cell* 2003. **4**: 119-129.

- 48 **Bakker, W. J., Blazquez-Domingo, M., Kolbus, A., Besooyen, J., Steinlein, P., Beug, H., Coffey, P. J., Lowenberg, B., von Lindern, M. and van Dijk, T. B.,** FoxO3a regulates erythroid differentiation and induces BTG1, an activator of protein arginine methyl transferase 1. *J Cell Biol* 2004. **164**: 175-184.
- 49 **Kim, M. S., Pak, Y. K., Jang, P. G., Namkoong, C., Choi, Y. S., Won, J. C., Kim, K. S., Kim, S. W., Kim, H. S., Park, J. Y., Kim, Y. B. and Lee, K. U.,** Role of hypothalamic Foxo1 in the regulation of food intake and energy homeostasis. *Nat Neurosci* 2006. **9**: 901-906.
- 50 **Calnan, D. R. and Brunet, A.,** The FoxO code. *Oncogene* 2008. **27**: 2276-2288.
- 51 **Brunet, A., Kanai, F., Stehn, J., Xu, J., Sarbassova, D., Frangioni, J. V., Dalal, S. N., DeCaprio, J. A., Greenberg, M. E. and Yaffe, M. B.,** 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *J Cell Biol* 2002. **156**: 817-828.
- 52 **Obsilova, V., Vecer, J., Herman, P., Pabianova, A., Sulc, M., Teisinger, J., Boura, E. and Obsil, T.,** 14-3-3 Protein interacts with nuclear localization sequence of forkhead transcription factor FoxO4. *Biochemistry* 2005. **44**: 11608-11617.
- 53 **Jacobs, F. M., van der Heide, L. P., Wijchers, P. J., Burbach, J. P., Hoekman, M. F. and Smidt, M. P.,** FoxO6, a novel member of the FoxO class of transcription factors with distinct shuttling dynamics. *J Biol Chem* 2003. **278**: 35959-35967.
- 54 **Tzivion, G., Dobson, M. and Ramakrishnan, G.,** FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins. *Biochim Biophys Acta* 2011. **1813**: 1938-1945.
- 55 **Rinner, O., Mueller, L. N., Hubalek, M., Muller, M., Gstaiger, M. and Aebersold, R.,** An integrated mass spectrometric and computational framework for the analysis of protein interaction networks. *Nat Biotechnol* 2007. **25**: 345-352.
- 56 **Yan, L., Lavin, V. A., Moser, L. R., Cui, Q., Kanies, C. and Yang, E.,** PP2A regulates the pro-apoptotic activity of FOXO1. *J Biol Chem* 2008. **283**: 7411-7420.
- 57 **Brunet, A., Sweeney, L. B., Sturgill, J. F., Chua, K. F., Greer, P. L., Lin, Y., Tran, H., Ross, S. E., Mostoslavsky, R., Cohen, H. Y., Hu, L. S., Cheng, H. L., Jedrychowski, M. P., Gygi, S. P., Sinclair, D. A., Alt, F. W. and Greenberg, M. E.,** Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 2004. **303**: 2011-2015.
- 58 **Lehtinen, M. K., Yuan, Z., Boag, P. R., Yang, Y., Villen, J., Becker, E. B., DiBacco, S., de la Iglesia, N., Gygi, S., Blackwell, T. K. and Bonni, A.,** A conserved MST-FOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extends life span. *Cell* 2006. **125**: 987-1001.
- 59 **Essers, M. A., Weijzen, S., de Vries-Smits, A. M., Saarloos, I., de Ruiter, N. D., Bos, J. L. and Burgering, B. M.,** FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. *Embo j* 2004. **23**: 4802-4812.
- 60 **Oh, S. W., Mukhopadhyay, A., Svrzikapa, N., Jiang, F., Davis, R. J. and Tissenbaum, H. A.,** JNK regulates lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/DAF-16. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005. **102**: 4494-4499.
- 61 **Sunayama, J., Tsuruta, F., Masuyama, N. and Gotoh, Y.,** JNK antagonizes Akt-mediated survival signals by phosphorylating 14-3-3. *J Cell Biol* 2005. **170**: 295-304.
- 62 **Henderson, S. T. and Johnson, T. E.,** daf-16 integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* 2001. **11**: 1975-1980.
- 63 **Borkhardt, A., Repp, R., Haas, O. A., Leis, T., Harbott, J., Kreuder, J., Hammermann, J., Henn, T. and Lampert, F.,** Cloning and characterization of AFX,

- the gene that fuses to MLL in acute leukemias with a t(X;11)(q13;q23). *Oncogene* 1997. **14**: 195-202.
- 64 **Hu, M. C., Lee, D. F., Xia, W., Golfman, L. S., Ou-Yang, F., Yang, J. Y., Zou, Y., Bao, S., Hanada, N., Saso, H., Kobayashi, R. and Hung, M. C.**, IkkappaB kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. *Cell* 2004. **117**: 225-237.
- 65 **Nowak, K., Killmer, K., Gessner, C. and Lutz, W.**, E2F-1 regulates expression of FOXO1 and FOXO3a. *Biochim Biophys Acta* 2007. **1769**: 244-252.
- 66 **Dyer, M. A. and Cepko, C. L.**, Regulating proliferation during retinal development. *Nat Rev Neurosci* 2001. **2**: 333-342.
- 67 **Morgan, D. O.**, Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997. **13**: 261-291.
- 68 **Vidal, A. and Koff, A.**, Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene* 2000. **247**: 1-15.
- 69 **Parry, D., Bates, S., Mann, D. J. and Peters, G.**, Lack of cyclin D-Cdk complexes in Rb-negative cells correlates with high levels of p16INK4/MTS1 tumour suppressor gene product. *Embo j* 1995. **14**: 503-511.
- 70 **Kamb, A., Shattuck-Eidens, D., Eeles, R., Liu, Q., Gruis, N. A., Ding, W., Hussey, C., Tran, T., Miki, Y., Weaver-Feldhaus, J. and et al.**, Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. *Nat Genet* 1994. **8**: 23-26.
- 71 **Ruas, M. and Peters, G.**, The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta* 1998. **1378**: F115-177.
- 72 **Roussel, M. F.**, The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene* 1999. **18**: 5311-5317.
- 73 **el-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B.**, WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993. **75**: 817-825.
- 74 **Zhang, H., Xiong, Y. and Beach, D.**, Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes. *Mol Biol Cell* 1993. **4**: 897-906.
- 75 **Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R. and Berneman, Z. N.**, The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 2003. **36**: 131-149.
- 76 **Clurman, B. E. and Porter, P.**, New insights into the tumor suppression function of P27(kip1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998. **95**: 15158-15160.
- 77 **Hatada, I., Inazawa, J., Abe, T., Nakayama, M., Kaneko, Y., Jinno, Y., Niikawa, N., Ohashi, H., Fukushima, Y., Iida, K., Yutani, C., Takahashi, S., Chiba, Y., Ohishi, S. and Mukai, T.**, Genomic imprinting of human p57KIP2 and its reduced expression in Wilms' tumors. *Hum Mol Genet* 1996. **5**: 783-788.
- 78 **Thompson, J. S., Reese, K. J., DeBaun, M. R., Perlman, E. J. and Feinberg, A. P.**, Reduced expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor gene p57KIP2 in Wilms' tumor. *Cancer Res* 1996. **56**: 5723-5727.
- 79 **Clarke, A. R., Maandag, E. R., van Roon, M., van der Lugt, N. M., van der Valk, M., Hooper, M. L., Berns, A. and te Riele, H.**, Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development. *Nature* 1992. **359**: 328-330.
- 80 **Jacks, T., Fazeli, A., Schmitt, E. M., Bronson, R. T., Goodell, M. A. and Weinberg, R. A.**, Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature* 1992. **359**: 295-300.
- 81 **Cobrinik, D., Lee, M. H., Hannon, G., Mulligan, G., Bronson, R. T., Dyson, N., Harlow, E., Beach, D., Weinberg, R. A. and Jacks, T.**, Shared role of the pRB-related p130 and p107 proteins in limb development. *Genes Dev* 1996. **10**: 1633-1644.

- 82 **Beer, S., Simins, A. B., Schuster, A. and Holzmann, B.**, Molecular cloning and characterization of a novel SH3 protein (SLY) preferentially expressed in lymphoid cells. *Biochim Biophys Acta* 2001. **1520**: 89-93.
- 83 **Uchida, T., Nakao, A., Nakano, N., Kuramasu, A., Saito, H., Okumura, K., Ra, C. and Ogawa, H.**, Identification of Nash1, a novel protein containing a nuclear localization signal, a sterile alpha motif, and an SH3 domain preferentially expressed in mast cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001. **288**: 137-141.
- 84 **Claudio, J. O., Zhu, Y. X., Benn, S. J., Shukla, A. H., McGlade, C. J., Falcioni, N. and Stewart, A. K.**, HACS1 encodes a novel SH3-SAM adaptor protein differentially expressed in normal and malignant hematopoietic cells. *Oncogene* 2001. **20**: 5373-5377.
- 85 **Zeller, C., Hinzmann, B., Seitz, S., Prokoph, H., Burkhard-Goettges, E., Fischer, J., Jandrig, B., Schwarz, L. E., Rosenthal, A. and Scherneck, S.**, SASH1: a candidate tumor suppressor gene on chromosome 6q24.3 is downregulated in breast cancer. *Oncogene* 2003. **22**: 2972-2983.
- 86 **Brandt, S., Ellwanger, K., Beuter-Gunia, C., Schuster, M., Hausser, A., Schmitz, I. and Beer-Hammer, S.**, SLY2 targets the nuclear SAP30/HDAC1 complex. *Int J Biochem Cell Biol* 2010. **42**: 1472-1481.
- 87 **Schmitt, F., Schall, D., Bucher, K., Schindler, T. I., Hector, A., Biedermann, T., Zemlin, M., Hartl, D. and Beer-Hammer, S.**, SLY2 controls the antibody response to pneumococcal vaccine through an IL-5R α -dependent mechanism in B-1 cells. *Eur J Immunol* 2015. **45**: 60-70.
- 88 **von Holleben, M., Gohla, A., Janssen, K. P., Iritani, B. M. and Beer-Hammer, S.**, Immunoinhibitory adapter protein Src homology domain 3 lymphocyte protein 2 (SLy2) regulates actin dynamics and B cell spreading. *J Biol Chem* 2011. **286**: 13489-13501.
- 89 **Ramesh, N., Morio, T., Fuleihan, R., Worm, M., Horner, A., Tsitsikov, E., Castigli, E. and Geha, R. S.**, CD40-CD40 ligand (CD40L) interactions and X-linked hyperIgM syndrome (HIGM1). *Clin Immunol Immunopathol* 1995. **76**: S208-213.
- 90 **Coffey, A. J., Brooksbank, R. A., Brandau, O., Oohashi, T., Howell, G. R., Bye, J. M., Cahn, A. P., Durham, J., Heath, P., Wray, P., Pavitt, R., Wilkinson, J., Leversha, M., Huckle, E., Shaw-Smith, C. J., Dunham, A., Rhodes, S., Schuster, V., Porta, G., Yin, L., Serafini, P., Sylla, B., Zollo, M., Franco, B., Bolino, A., Seri, M., Lanyi, A., Davis, J. R., Webster, D., Harris, A., Lenoir, G., de St Basile, G., Jones, A., Behlorsky, B. H., Achatz, H., Murken, J., Fassler, R., Sumegi, J., Romeo, G., Vaudin, M., Ross, M. T., Meindl, A. and Bentley, D. R.**, Host response to EBV infection in X-linked lymphoproliferative disease results from mutations in an SH2-domain encoding gene. *Nat Genet* 1998. **20**: 129-135.
- 91 **Astoul, E., Laurence, A. D., Totty, N., Beer, S., Alexander, D. R. and Cantrell, D. A.**, Approaches to define antigen receptor-induced serine kinase signal transduction pathways. *J Biol Chem* 2003. **278**: 9267-9275.
- 92 **Beer, S., Scheikl, T., Reis, B., Huser, N., Pfeffer, K. and Holzmann, B.**, Impaired immune responses and prolonged allograft survival in Sly1 mutant mice. *Mol Cell Biol* 2005. **25**: 9646-9660.
- 93 **Reis, B., Pfeffer, K. and Beer-Hammer, S.**, The orphan adapter protein SLY1 as a novel anti-apoptotic protein required for thymocyte development. *BMC Immunol* 2009. **10**: 38.
- 94 **Schmitt, T. M. and Zuniga-Pflucker, J. C.**, Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro. *Immunity* 2002. **17**: 749-756.

- 95 **von Boehmer, H., Aifantis, I., Gounari, F., Azogui, O., Haughn, L., Apostolou, I., Jaeckel, E., Grassi, F. and Klein, L.,** Thymic selection revisited: how essential is it? *Immunol Rev* 2003. **191**: 62-78.
- 96 **Ogilvy, S., Metcalf, D., Gibson, L., Bath, M. L., Harris, A. W. and Adams, J. M.,** Promoter elements of vav drive transgene expression in vivo throughout the hematopoietic compartment. *Blood* 1999. **94**: 1855-1863.
- 97 **Bancroft, G. J., Bosma, M. J., Bosma, G. C. and Unanue, E. R.,** Regulation of macrophage Ia expression in mice with severe combined immunodeficiency: induction of Ia expression by a T cell-independent mechanism. *J Immunol* 1986. **137**: 4-9.
- 98 **Beckerman, K. P., Rogers, H. W., Corbett, J. A., Schreiber, R. D., McDaniel, M. L. and Unanue, E. R.,** Release of nitric oxide during the T cell-independent pathway of macrophage activation. Its role in resistance to *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* 1993. **150**: 888-895.
- 99 **Ladel, C. H., Flesch, I. E., Arnoldi, J. and Kaufmann, S. H.,** Studies with MHC-deficient knock-out mice reveal impact of both MHC I- and MHC II-dependent T cell responses on *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* 1994. **153**: 3116-3122.
- 100 **Szabo, S. J., Kim, S. T., Costa, G. L., Zhang, X., Fathman, C. G. and Glimcher, L. H.,** A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 2000. **100**: 655-669.
- 101 **Gessner, A., Moskophidis, D. and Lehmann-Grube, F.,** Enumeration of single IFN-gamma-producing cells in mice during viral and bacterial infection. *J Immunol* 1989. **142**: 1293-1298.
- 102 **Busch, D. H., Pilip, I. M., Vijh, S. and Pamer, E. G.,** Coordinate regulation of complex T cell populations responding to bacterial infection. *Immunity* 1998. **8**: 353-362.
- 103 **Merrick, J. C., Edelson, B. T., Bhardwaj, V., Swanson, P. E. and Unanue, E. R.,** Lymphocyte apoptosis during early phase of *Listeria* infection in mice. *Am J Pathol* 1997. **151**: 785-792.
- 104 **Jiang, J., Lau, L. L. and Shen, H.,** Selective depletion of nonspecific T cells during the early stage of immune responses to infection. *J Immunol* 2003. **171**: 4352-4358.
- 105 **Carrero, J. A., Calderon, B. and Unanue, E. R.,** Type I interferon sensitizes lymphocytes to apoptosis and reduces resistance to *Listeria* infection. *J Exp Med* 2004. **200**: 535-540.
- 106 **Malek, T. R.,** The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol* 2008. **26**: 453-479.
- 107 **Ortega, S., Malumbres, M. and Barbacid, M.,** Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2002. **1602**: 73-87.
- 108 **Fabre, S., Lang, V., Harriague, J., Jobart, A., Unterman, T. G., Trautmann, A. and Bismuth, G.,** Stable activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the T cell immunological synapse stimulates Akt signaling to FoxO1 nuclear exclusion and cell growth control. *J Immunol* 2005. **174**: 4161-4171.
- 109 **Du, X., Shi, H., Li, J., Dong, Y., Liang, J., Ye, J., Kong, S., Zhang, S., Zhong, T., Yuan, Z., Xu, T., Zhuang, Y., Zheng, B., Geng, J. G. and Tao, W.,** Mst1/Mst2 regulate development and function of regulatory T cells through modulation of Foxo1/Foxo3 stability in autoimmune disease. *J Immunol* 2014. **192**: 1525-1535.
- 110 **Xiao, N., Eto, D., Elly, C., Peng, G., Crotty, S. and Liu, Y. C.,** The E3 ubiquitin ligase Itch is required for the differentiation of follicular helper T cells. *Nat Immunol* 2014. **15**: 657-666.
- 111 **Vairo, G., Innes, K. M. and Adams, J. M.,** Bcl-2 has a cell cycle inhibitory function separable from its enhancement of cell survival. *Oncogene* 1996. **13**: 1511-1519.

- 112 **Vairo, G., Soos, T. J., Upton, T. M., Zalvide, J., DeCaprio, J. A., Ewen, M. E., Koff, A. and Adams, J. M.,** Bcl-2 retards cell cycle entry through p27(Kip1), pRB relative p130, and altered E2F regulation. *Mol Cell Biol* 2000. **20**: 4745-4753.
- 113 **Pamer, E. G.,** Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nat Rev Immunol* 2004. **4**: 812-823.
- 114 **Andersson, A., Dai, W. J., Di Santo, J. P. and Brombacher, F.,** Early IFN-gamma production and innate immunity during *Listeria monocytogenes* infection in the absence of NK cells. *J Immunol* 1998. **161**: 5600-5606.
- 115 **Berg, R. E., Cordes, C. J. and Forman, J.,** Contribution of CD8+ T cells to innate immunity: IFN-gamma secretion induced by IL-12 and IL-18. *Eur J Immunol* 2002. **32**: 2807-2816.
- 116 **Mittrucker, H. W., Kursar, M., Kohler, A., Hurwitz, R. and Kaufmann, S. H.,** Role of CD28 for the generation and expansion of antigen-specific CD8(+) T lymphocytes during infection with *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* 2001. **167**: 5620-5627.
- 117 **Liu, Q., Yi, L., Sadiq-Ali, S., Koontz, S. M., Wood, A., Zhu, N. and Jackson, S. H.,** PP2A-dependent control of transcriptionally active FOXO3a in CD8(+) central memory lymphocyte survival requires p47(phox). *Cell Death Dis* 2012. **3**: e375.
- 118 **Rao, R. R., Li, Q., Gubbels Bupp, M. R. and Shrikant, P. A.,** Transcription factor Foxo1 represses T-bet-mediated effector functions and promotes memory CD8(+) T cell differentiation. *Immunity* 2012. **36**: 374-387.
- 119 **Coffer, P. J. and Burgering, B. M.,** Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2004. **4**: 889-899.
- 120 **Ouyang, W., Liao, W., Luo, C. T., Yin, N., Huse, M., Kim, M. V., Peng, M., Chan, P., Ma, Q., Mo, Y., Meijer, D., Zhao, K., Rudensky, A. Y., Atwal, G., Zhang, M. Q. and Li, M. O.,** Novel Foxo1-dependent transcriptional programs control T(reg) cell function. *Nature* 2012. **491**: 554-559.
- 121 **Dougherty, M. K. and Morrison, D. K.,** Unlocking the code of 14-3-3. *J Cell Sci* 2004. **117**: 1875-1884.
- 122 **Singh, A., Ye, M., Bucur, O., Zhu, S., Tanya Santos, M., Rabinovitz, I., Wei, W., Gao, D., Hahn, W. C. and Khosravi-Far, R.,** Protein phosphatase 2A reactivates FOXO3a through a dynamic interplay with 14-3-3 and AKT. *Mol Biol Cell* 2010. **21**: 1140-1152.
- 123 **Ezoe, S., Matsumura, I., Satoh, Y., Tanaka, H. and Kanakura, Y.,** Cell cycle regulation in hematopoietic stem/progenitor cells. *Cell Cycle* 2004. **3**: 314-318.
- 124 **Cheng, T., Rodrigues, N., Dombkowski, D., Stier, S. and Scadden, D. T.,** Stem cell repopulation efficiency but not pool size is governed by p27(kip1). *Nat Med* 2000. **6**: 1235-1240.
- 125 **Cheng, T., Rodrigues, N., Shen, H., Yang, Y., Dombkowski, D., Sykes, M. and Scadden, D. T.,** Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. *Science* 2000. **287**: 1804-1808.
- 126 **Matsuoka, S., Edwards, M. C., Bai, C., Parker, S., Zhang, P., Baldini, A., Harper, J. W. and Elledge, S. J.,** p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev* 1995. **9**: 650-662.
- 127 **Coats, S., Whyte, P., Fero, M. L., Lacy, S., Chung, G., Randel, E., Firpo, E. and Roberts, J. M.,** A new pathway for mitogen-dependent cdk2 regulation uncovered in p27(Kip1)-deficient cells. *Curr Biol* 1999. **9**: 163-173.
- 128 **Collado, M., Medema, R. H., Garcia-Cao, I., Dubuisson, M. L., Barradas, M., Glassford, J., Rivas, C., Burgering, B. M., Serrano, M. and Lam, E. W.,** Inhibition

- of the phosphoinositide 3-kinase pathway induces a senescence-like arrest mediated by p27Kip1. *J Biol Chem* 2000. **275**: 21960-21968.
- 129 **Soeiro, I., Mohamedali, A., Romanska, H. M., Lea, N. C., Child, E. S., Glassford, J., Orr, S. J., Roberts, C., Naresh, K. N., Lalani el, N., Mann, D. J., Watson, R. J., Thomas, N. S. and Lam, E. W.,** p27Kip1 and p130 cooperate to regulate hematopoietic cell proliferation in vivo. *Mol Cell Biol* 2006. **26**: 6170-6184.
- 130 **Kerdiles, Y. M., Beisner, D. R., Tinoco, R., Dejean, A. S., Castrillon, D. H., DePinho, R. A. and Hedrick, S. M.,** Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor. *Nat Immunol* 2009. **10**: 176-184.
- 131 **Ouyang, W., Beckett, O., Flavell, R. A. and Li, M. O.,** An essential role of the Forkhead-box transcription factor Foxo1 in control of T cell homeostasis and tolerance. *Immunity* 2009. **30**: 358-371.
- 132 **Thornberry, N. A., Rano, T. A., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V. M., Nordstrom, P. A., Roy, S., Vaillancourt, J. P., Chapman, K. T. and Nicholson, D. W.,** A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* 1997. **272**: 17907-17911.
- 133 **Linette, G. P., Li, Y., Roth, K. and Korsmeyer, S. J.,** Cross talk between cell death and cell cycle progression: BCL-2 regulates NFAT-mediated activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996. **93**: 9545-9552.
- 134 **Mazel, S., Burtrum, D. and Petrie, H. T.,** Regulation of cell division cycle progression by bcl-2 expression: a potential mechanism for inhibition of programmed cell death. *J Exp Med* 1996. **183**: 2219-2226.
- 135 **O'Reilly, L. A., Huang, D. C. and Strasser, A.,** The cell death inhibitor Bcl-2 and its homologues influence control of cell cycle entry. *Embo j* 1996. **15**: 6979-6990.
- 136 **Uhlmann, E. J., D'Sa-Eipper, C., Subramanian, T., Wagner, A. J., Hay, N. and Chinnadurai, G.,** Deletion of a nonconserved region of Bcl-2 confers a novel gain of function: suppression of apoptosis with concomitant cell proliferation. *Cancer Res* 1996. **56**: 2506-2509.
- 137 **Huang, D. C., O'Reilly, L. A., Strasser, A. and Cory, S.,** The anti-apoptosis function of Bcl-2 can be genetically separated from its inhibitory effect on cell cycle entry. *Embo j* 1997. **16**: 4628-4638.
- 138 **Boudil, A., Matei, I. R., Shih, H. Y., Bogdanoski, G., Yuan, J. S., Chang, S. G., Montpellier, B., Kowalski, P. E., Voisin, V., Bashir, S., Bader, G. D., Krangel, M. S. and Guidos, C. J.,** IL-7 coordinates proliferation, differentiation and Tcra recombination during thymocyte beta-selection. *Nat Immunol* 2015. **16**: 397-405.
- 139 **Inaba, H., Greaves, M. and Mullighan, C. G.,** Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2013. **381**: 1943-1955.
- 140 **Sudo, T., Nishikawa, S., Ohno, N., Akiyama, N., Tamakoshi, M., Yoshida, H. and Nishikawa, S.,** Expression and function of the interleukin 7 receptor in murine lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993. **90**: 9125-9129.
- 141 **Plum, J., De Smedt, M. and Leclercq, G.,** Exogenous IL-7 promotes the growth of CD3-CD4-CD8-CD44+CD25+/- precursor cells and blocks the differentiation pathway of TCR-alpha beta cells in fetal thymus organ culture. *J Immunol* 1993. **150**: 2706-2716.
- 142 **Yu, Q., Erman, B., Park, J. H., Feigenbaum, L. and Singer, A.,** IL-7 receptor signals inhibit expression of transcription factors TCF-1, LEF-1, and RORgammat: impact on thymocyte development. *J Exp Med* 2004. **200**: 797-803.

- 143 **Brugnera, E., Bhandoola, A., Cibotti, R., Yu, Q., Guinter, T. I., Yamashita, Y., Sharrow, S. O. and Singer, A.,** Coreceptor reversal in the thymus: signaled CD4+8+ thymocytes initially terminate CD8 transcription even when differentiating into CD8+ T cells. *Immunity* 2000. **13**: 59-71.
- 144 **Patra, A. K., Avots, A., Zahedi, R. P., Schuler, T., Sickmann, A., Bommhardt, U. and Serfling, E.,** An alternative NFAT-activation pathway mediated by IL-7 is critical for early thymocyte development. *Nat Immunol* 2013. **14**: 127-135.
- 145 **Tussiwand, R., Engdahl, C., Gehre, N., Bosco, N., Ceredig, R. and Rolink, A. G.,** The preTCR-dependent DN3 to DP transition requires Notch signaling, is improved by CXCL12 signaling and is inhibited by IL-7 signaling. *Eur J Immunol* 2011. **41**: 3371-3380.
- 146 **Scheikl, T., Reis, B., Pfeffer, K., Holzmann, B. and Beer, S.,** Reduced notch activity is associated with an impaired marginal zone B cell development and function in Sly1 mutant mice. *Mol Immunol* 2009. **46**: 969-977.
- 147 **Kormann, M. S., Hasenpusch, G., Aneja, M. K., Nica, G., Flemmer, A. W., Herber-Jonat, S., Huppmann, M., Mays, L. E., Illenyi, M., Schams, A., Griese, M., Bittmann, I., Handgretinger, R., Hartl, D., Rosenecker, J. and Rudolph, C.,** Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice. *Nat Biotechnol* 2011. **29**: 154-157.
- 148 **Kang-Decker, N., Tong, C., Boussouar, F., Baker, D. J., Xu, W., Leontovich, A. A., Taylor, W. R., Brindle, P. K. and van Deursen, J. M.,** Loss of CBP causes T cell lymphomagenesis in synergy with p27Kip1 insufficiency. *Cancer Cell* 2004. **5**: 177-189.

Danke

Hiermit möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit einen Beitrag geleistet haben.

An erster Stelle möchte ich meinen besonderen Dank an PD Dr. Sandra Beer-Hammer für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe aussprechen. Die kontinuierliche Betreuung und die Möglichkeit der freien wissenschaftlichen Entfaltung waren die Grundlage für die Erstellung dieser Arbeit.

Ebenfalls möchte ich mich bei Prof. Dr. Dr. Bernd Nürnberg bedanken für die Möglichkeit diese Arbeit am Institut anfertigen zu dürfen.

Bei Prof. Dr. Peter Ruth bedanke ich mich für seine Beratung und bereitwillige Unterstützung als zweiter Berichterstatter.

Dr. Alexander Krupnick und dem gesamten Team möchte ich für die Zusammenarbeit und die Bereitstellung der NK-Daten danken.

Ich danke Herrn Zent und dem ganzen Tierpfleger-Team für die gute Versorgung der Tiere.

Ein ganz herzliches Dankeschön geht an alle Mitarbeiter des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie für die Hilfsbereitschaft und freundliche Zusammenarbeit.

Besonders dankbar bin ich meinen Kollegen Dr. Kirsten Bucher, Dr. Fee Schmitt und Claudia Müller für das angenehme Arbeitsklima, die hervorragende Zusammenarbeit und den regen Ideenaustausch.

Vielen Dank den wissenschaftlichen Hilfskräften des Instituts für die Unterstützung bei der Genotypisierung.

Zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die mich im Verlauf der gesamten Zeit stets unterstützt hat.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel „Das Adapterprotein SLy1 – Ein Zelltyp-spezifischer Regulator des Immunsystems“ selbständig verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet habe. Ich erkläre, dass die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis der Universität Tübingen (Beschluss des Senats vom 25.5.2000) beachtet wurden. Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Abgabe einer Versicherung an Eides statt mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft wird.

Tübingen, 26.06.2015

Daniel Schäll

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Daniel Schäll
Anschrift Veilchenstr. 8, 72411 Bodelshausen
Telefon 07471/5074216
E-Mail daniel-schaell@freenet.de

Familienstand verheiratet
Staatsangehörigkeit deutsch
Geburtsdatum 01.05.1985
Geburtsort Kursk (Russland)

Ausbildung

09/1998-07/2004 Arnoldi-Gymnasium, Gotha (Abitur)
10/2005-07/2011 Pharmaziestudium, Johann-Wolfgang-Goethe Universität,
Frankfurt am Main (Staatsexamen)
05/2010-10/2010 Praktikum im Rahmen des PJs, Schiller-Apotheke,
Frankfurt am Main
11/2010-04-2011 Praktikum im Rahmen des PJs, Schwabe Arzneimittel
GmbH, Karlsruhe
09/2011-ld. Promotion am Institut für Pharmakologie und Toxikologie,
Universitätsklinikum Tübingen