

Aus der
Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin II

(Schwerpunkt: Hämatologie, Onkologie, klinische
Immunologie, Rheumatologie)

**Die Rolle des Transkriptionsfaktors NFAT2 in der
chronisch lymphatischen Leukämie**

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

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

vorgelegt von

Heitmann, Jonas Sebastian

2020

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. Dr. M. R. Müller

2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. M. Döring

Tag der Disputation: 04.12.2019

ἡμεῖς δὲ κλέος οἶον ἀκούομεν οὐδέ τι ἴδμεν

Doch wir horchen allein dem Gerüchte und wissen durchaus nichts

Homer, Ilias, Gesang 2, Vers 486

Für meine Lieben

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung.....	6
1.1. Maligne Erkrankungen des lymphatischen Systems.....	6
1.2. Chronisch lymphatische Leukämie (CLL).....	7
1.2.1. Prognostische Faktoren und klinisches Management der chronisch lymphatischen Leukämie.....	12
1.2.2. Richter-Transformation.....	14
1.3. Ca²⁺/NFAT Signalweg	15
1.3.1. NFAT Transkriptionsfaktoren.....	15
1.3.2. NFAT2-Isoformen.....	17
1.3.3. Ca ²⁺ /NFAT Regulation.....	20
1.3.4. Inhibitoren des Ca ²⁺ /NFAT Signalweges	22
1.3.4.1. Cyclosporin A.....	24
1.3.4.2. VIVIT	24
1.3.4.3. INCA-6	25
1.4. NFAT2 und Tumorerkrankungen.....	26
1.5. NFAT2 in der chronisch lymphatischen Leukämie	26
1.6. Die Rolle der Zellkultur als Modell	27
1.6.1. shRNA - Beispiel einer RNA-Interferenz.....	28
1.7. Zielsetzung.....	29
2. Material & Methoden	30
2.1. Material.....	30
2.1.1. Verbrauchsmaterialien	30
2.1.2. Reagenzien & Chemikalien	30
2.1.3. Geräte und Zubehör	32
2.1.4. Puffer und Medien	33
2.1.5. Antikörper.....	33
2.1.6. Zelllinien.....	34
2.1.7. Primer	34
2.1.8. Vektoren.....	35
2.2. Methoden	36
2.2.1. Software und Statistik.....	36
2.2.2. Zellkultur	36
2.2.2.1. Einfrieren und Auftauen	36
2.2.2.2. Zellzählung.....	36
2.2.2.3. Zellkultivierung und -expansion	37
2.2.2.4. Zellstimulation mit PMA/Ionomycin und Cyclosporin A	37
2.2.2.5. Viability Assay mit MEC-1 und JVM-3 Zellen	37
2.2.3. NFAT2 shRNA-Knock-down in MEC-1-Zellen	38

2.2.4. Humane CLL Zellen	41
2.2.4.1. Ethik	41
2.2.4.2. Fallzahlkalkulation.....	41
2.2.4.3. Proben- und Patientenrekrutierung.....	41
2.2.5. Isolation mononukleärer Zellen des peripheren Bluts (PBMC) aus Patientenproben und Buffy Coats.....	42
2.2.6. MACS-Technologie	42
2.2.7. Durchflusszytometrie/Immunphänotypisierung (FACS)	45
2.2.8. Zytospin und Immunfluoreszenz.....	46
2.2.9. RNA-Isolation und cDNA-Synthese	47
2.2.9.1. Zellkultur und PBMC	47
2.2.9.2. Paraffinfixiertes Material	47
2.2.10. Quantitative RT-PCR.....	49
2.2.11. Proteinisolation und Proteinbestimmung nach Bradford	49
2.2.12. SDS-Page und Western Blot.....	52
3. Ergebnisse.....	55
3.1. Teil I: NFAT2 in den CLL-Zelllinien MEC-1 und JVM-3.....	55
3.1.1. NFAT2-Expression in JVM-3 und MEC-1	55
3.1.2. Induktion und Inhibition der nukleären Translokation von NFAT2.....	56
3.1.3. Einfluss der Calcineurin-Inhibitoren (CsA, VIVIT und INCA-6) auf das Wachstum von MEC-1 Zellen.....	58
3.1.4. NFAT2 shRNA-Knock-down in der MEC-1-Zelllinie.....	62
3.2. NFAT2 in primären humanen CLL-Zellen	64
3.2.1. Klinische Daten der Patientenkohorte und Einteilung	64
3.2.2. Expression von NFAT2 in der CLL	69
3.2.3. Translokation und Aktivierung von NFAT2 in der CLL	75
3.2.4. Die Expression von NFAT2-Zielgenen bei der CLL	82
3.2.5. NFAT2 in der Richter-Transformation.....	83
4. Diskussion	84
4.1. Diskussion der Ergebnisse.....	84
4.2. Fazit und Ausblick.....	96
5. Zusammenfassung	98
6. Anhang.....	99
6.1. Abbildungsverzeichnis	99
6.2. Tabellenverzeichnis	100
7. Literaturverzeichnis	101
8. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertation	111
9. Publikationsverzeichnis	112
9.1. Kongressbeiträge.....	112
9.1.1. Vorträge	112

9.1.2. Posterpräsentationen	112
10. Danksagung.....	113

Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäuren
ADP	Adenosindiphosphat
Ago2	Protein argonaute-2
AICD	Activation induced cell death
AKT	Serine/Threonine Kinase
ALCL	Anaplastisch-großzelliges Lymphom
AP-1	Activator protein 1
APS	Ammonium persulfat
ATCC	American Type Culture Collection
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	Adenosintri-phosphat
B-PLL	B-Prolymphozytenleukämie
Bcl-2/3	B-cell lymphoma 2/3
BCR	B-Zell-Rezeptor
BSA	Bovines Serumalbumin
BTK	Bruton´s Tyrosinkinase
CER	Cytoplasmic Extraction Reagent
CI	Combinational Index
CK1	Caseinkinase 1
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CML	Chronisch myeloische Leukämie
COX2	Cyclooxygenase-2
CRAC	Calcium release-activated channels
CsA	Cyclosporin A
DAG	1,2-Diacylglycerin
DC	Dendritische Zelle
DLBCL	Diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DYRK	Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated Kinase
EBV	Epstein-Barr-Virus
ED	Erstdiagnose
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
Fa-CI	Fraction affected-Combinational Index Plot
FCS	Fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Green fluorescent protein
GSK3	Glykogensynthase-Kinase 3
Hb	Hämoglobin
IgHV	Schwere Kette der Immunglobuline
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
iwCLL	International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia
LCK	Lymphocyte-specific proteine tyrosine kinase
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
miRNA	Micro RNA
mRNA	Messenger RNA
NER	Nuclear Extraction Reagent
NF-kB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NHR	NFAT homology region
NK	Natürliche Killerzellen

ORAI	Calcium Release-Activated Calcium Modulator
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDCD1	Programmed cell death protein 1
PET-CT	Positronen-Emissions-Tomographie-Computertomographie
PFS	Progressions-freies Überleben
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLC γ 2	Phospholipase γ 2
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
qRT-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
SCID	Severe combined immunodeficiency
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler
shMEC-1	shRNA modifizierte MEC-1 Zellen
shRNA	Short hairpin Ribonukleinsäure
siRNA	Small interfering RNA
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
SP	Serin-Prolin Motiv
SPP1	Osteopontin
SRR	Serin-reiches Motiv
STIM	stromal interaction molecule
T-ALL	Akute lymphatische T-Zell Leukämie
TAD	Transaktivierungsdomäne
TCL1	T cell lymphoma breakpoint 1 onkogen
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TKI	Tyrosinkinase Inhibitor
TNFSF4	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 4
TP53	Tumor protein p53
V-Myc	Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog
WAS	Wiskott-Aldrich-Syndrom
WHO	World Health Organisation
XLA	Bruton-Syndrom

1. Einleitung

1.1. Maligne Erkrankungen des lymphatischen Systems

Unter malignen Erkrankungen des lymphatischen Systems versteht man die Entstehung einer bösartigen Erkrankung aus den lymphoiden Progenitorzellen des Blutes. Diese Erkrankungen können in verschiedenen Stadien der B- und T-Zellentwicklung entstehen. Eine grobe Einteilung erfolgt zunächst in Leukämien und Lymphome. Ein typischer Vertreter der leukämisch verlaufenden Erkrankungen des lymphatischen Systems ist die akute lymphatische Leukämie (ALL) oder die chronische lymphatische Leukämie (CLL). Das Wort Leukämie geht in seiner Etymologie zurück auf die altgriechischen Worte λευκός (leukós), z. Dt. „weiß“, und αἷμα (haima), „Blut“, weshalb es sich mit „weißes Blut“ übersetzen lässt. Das beschreibt den Phänotyp des Blutes bei einem hohen Anteil an weißen Blutkörpern.

Allen Lymphomerkrankungen ist gemein, dass sie in der Regel die Lymphknotenlokalisationen in verschiedenen Bereichen des Körpers befallen. In seltenen Fällen kann auch nur ein extranodaler Befall erfolgen. Zur Einteilung der Lymphome dient die WHO-Klassifikation. In dieser werden zwei große Gruppen, die Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) und das Hodgkin-Lymphom (Morbus Hodgkin), voneinander unterschieden.¹

Die Hodgkin-Erkrankung wurde erstmals 1832 vom englischen Arzt Thomas Hodgkin beschrieben.² Beim Hodgkin-Lymphom handelt es sich um eine aus B-Zellen entstandene Neoplasie. Die deutlich größere Gruppe bilden die Non-Hodgkin-Lymphome, deren Einteilung in einzelne Subtypen aufgrund der Progenitorzellen erfolgt. Die T-Zell-Lymphome wie das anaplastische großzellige T-Zell-Lymphom (ALCL) oder das hochaggressive adulte T-Zell-Lymphom bilden 15-20% der NHLs. Ungefähr 80-85% der NHLs sind B-Zell-Lymphome, wobei hier das indolente folliculäre Lymphom und das diffus-großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL) besonders häufig auftretende Vertreter sind.^{3,4}

Eine Sonderrolle nimmt die chronisch lymphatische Leukämie ein, die zu den indolenten NHL gezählt wird. Da sich die vorliegende Arbeit mit der Rolle des

Transkriptionsfaktors NFAT in der chronisch lymphatischen Leukämie befasst, wird im folgenden Abschnitt die CLL näher erläutert.

1.2. Chronisch lymphatische Leukämie (CLL)

Die CLL ist die häufigste leukämische Erkrankung der Bevölkerung in den Industrienationen mit jährlich ca. 5.000 Neuerkrankungen allein in Deutschland. Männer sind sowohl häufiger betroffen (4,9 vs. 2,5 /100.000 Einwohner) als auch jünger bei Erkrankungsbeginn (72 vs. 75 Jahre). Das mediane Alter bei der Diagnose liegt bei etwas über 70 Jahren (*Abbildung 1*).

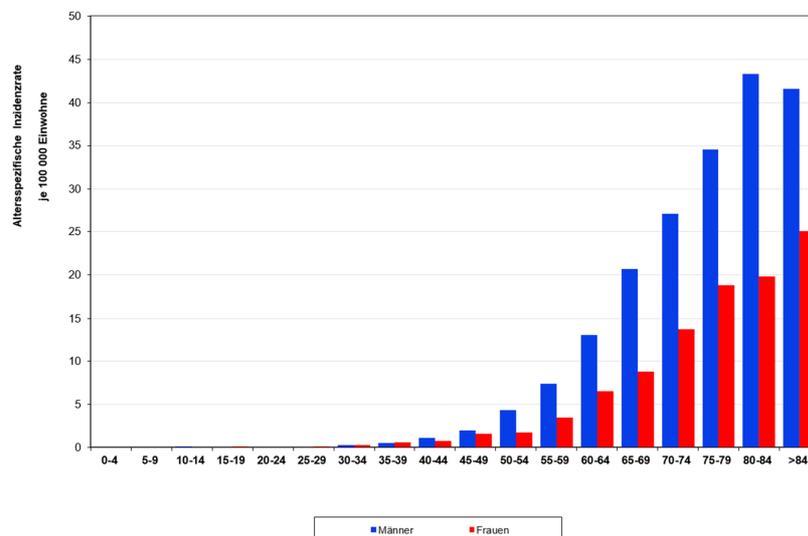


Abbildung 1: Altersspezifische Inzidenzrate der chronisch lymphatischen Leukämie im Jahr 2011

Datenquelle: Zentrum für Krebsregisterdaten, GEKID, 2011.⁵

Die Erstbeschreibung der CLL erfolgte 1845 durch den deutschen Arzt Rudolf Virchow.³ Die genaue Pathogenese der chronisch lymphatischen Leukämie ist bis heute weitgehend ungeklärt. Von besonderer Bedeutung scheint der Signalweg des B-Zell-Rezeptors zu sein, da neuere Behandlungen mit Signalweginhibitoren eine signifikant bessere Behandlung der CLL ermöglichen. Zudem wird die CLL-Erkrankung durch einen Apoptosedefekt mit Involvierung von u.a. B-cell lymphoma (Bcl-2) charakterisiert.^{6,7} In den letzten Jahren konnte in weiteren Untersuchungen dem

Microenvironment eine tragende Rolle für das Wachstum und die Proliferation der CLL-Zellen zugeordnet werden.⁸

Die Behandlung der CLL wird aus einer Kombination konventioneller Chemotherapeutika und Antikörpern gestaltet. Neue Behandlungsmöglichkeiten, die auch erstmals die molekularpathologischen Veränderungen miteinbeziehen, bieten die Small Molecules, welche beispielsweise spezifisch die Bruton's Tyrosinkinase (BTK) oder Bcl-2 inhibieren. Trotz der enormen therapeutischen Fortschritte der letzten Jahre ist bis heute eine kurative Therapie nur mit einer allogenen Stammzelltransplantation möglich.

Häufig wird die Diagnose einer CLL als Zufallsbefund gestellt, da erst in fortgeschrittenen Stadien Symptome wie Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust (sog. B-Symptome) auftreten können. Des Weiteren können Lymphknotenschwellungen sowie eine Hepatosplenomegalie auftreten. Eine Behandlungsindikation ergibt sich in der Regel erst im Verlauf aufgrund von auftretenden Autoimmunphänomenen (Hämolyse, Immunthrombopenie), Antikörpermangel und einer progredienten Knochenmarkinsuffizienz mit Zytopenien.

Eine monoklonale B-Zellpopulation mit Expression von CD5 und CD20 ist ein Kerncharakteristikum der malignen Zellen. Im Ausstrich des peripheren Blutes finden sich zudem sogenannte Gumprecht-Kernschatten, die durch den Ausstrich von Kernmaterial der fragilen Lymphozyten entstehen. Die Diagnosekriterien der chronisch lymphatischen Leukämie wurden von dem *International Workshop on CLL (IWCLL)* aufgestellt und sind in *Tabelle 1* zusammengefasst.^{9,10}

Diagnosekriterien des internationalen Workshop der CLL
1. Nachweis einer klonalen B-Zelllymphozytose mit 5.000/µl
2. Vorherrschen kleiner, morphologisch reif wirkender Lymphozyten im Blutaussstrich
3. Immunphänotypische Koexpression der Oberflächenantigene CD19, CD20, CD23 und CD5. Durch Markierung der Leichtkettenrestriktion Igκ oder Igλ kann die Monoklonalität nachgewiesen werden.

Tabelle 1: Auflistung der Diagnosekriterien

Zur Diagnosestellung müssen alle drei Kriterien erfüllt sein. Tabelle ist modifiziert nach Hallek et al., 2008&2018.^{9,10}

Bei der CLL handelt es sich in den meisten Fällen um eine indolent verlaufende Erkrankung.¹¹ Die klassische Einteilung der CLL erfolgt in verschiedene Stadien nach den Rai- oder Binet-Klassifikation (siehe *Tabelle 2*).

Stadium	Definition	Medianes Überleben
A	Hb > 10 g/dl Thrombozyten > 100.000/ µl <3 betroffenen Regionen (LN, Milz, Leber)	> 10 Jahre
B	Hb > 10 g/dl Thrombozyten > 100.000/ µl >3 betroffenen Regionen (LN, Milz, Leber)	5 Jahre
C	Hb < 10 g/dl Thrombozyten < 100.000/ µl	2-3 Jahre

Tabelle 2: Binet-Klassifikation

Die Binet-Klassifikation umfasst drei Stadien, die nach dem Blutbild und den betroffenen Lymphknotenregionen eingeteilt werden. Tabelle ist modifiziert nach Binet et al., 1981.¹²

Ein Teil der Patienten mit CLL weist hingegen einen aggressiven Phänotyp der Erkrankung mit raschem Progress und frühem Therapieversagen auf. Neuere Untersuchungen versuchen dieses Patientenkollektiv möglichst frühzeitig zu identifizieren. Eine nähere Beschreibung der Risikofaktoren erfolgt in Kapitel 1.2.1.

Menschen mit der Diagnose einer CLL benötigen in der Regel zunächst keine spezifische Therapie, da das mediane Überleben in frühen Stadien über zehn Jahren liegt. Die regelmäßigen klinischen und laborchemischen Kontrollen werden als „watch and wait“-Strategie bezeichnet.¹³ Eine Therapieeinleitung ist erst im Stadium Binet C oder Auftreten der in *Tabelle 3* aufgeführten Veränderungen in Stadium Binet A oder B indiziert.

Aktuell Empfehlung zur Therapieeinleitung
Symptomatischer Progress einer Anämie oder fortschreitende Thrombopenie
Massive, progredient oder symptomatische Splenomegalie
Symptomatische oder massive (>10 cm) Lymphadenopathie
Lymphozytenverdopplungszeit von weniger als 6 Monaten bei einem Basiswert von mind. 30.000 Lymphozyten/ μ l
Refraktäre Autoimmunzytopenie
Schwerwiegende Fatigue oder ausgeprägte B-Symptomatik

Tabelle 3: Empfehlung zur Therapieeinleitung

Therapieindikation modifiziert nach Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Interdisziplinäre S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge für Patienten mit einer chronischen lymphatischen Leukämie.¹⁴

Wenn die Erkrankung therapiebedürftig wird, steht als Erstlinientherapie eine klassische Chemoimmuntherapie oder eine Therapie mit dem BTK-Inhibitor Ibrutinib zur Verfügung. In neueren Therapieempfehlungen fließt auch der klinische Performancestatus in die Therapieentscheidung mit ein, womit abhängig vom Performancestatus der Patienten angepasste Therapieschemata eingesetzt werden. Eine Übersichtsdarstellung ist in *Abbildung 2* dargestellt.

Als Antikörper in der Erstlinientherapie werden die CD20-Antikörper Rituximab und Obinutuzumab eingesetzt. Als Chemotherapeutika stehen die Alkylantien Cyclophosphamid, Chlorambucil und Bendamustin oder das Purinanalogon Fludarabin zur Verfügung. In den letzten Jahren haben zusätzlich die Small Molecules als Inhibitoren des B-Zellrezeptor-Signalweges bzw. als Apoptoseaktivatoren deutlich an

Bedeutung gewonnen.¹⁵ Hier sind an erster Stelle die BTK-Inhibitoren zu nennen (z.B. Ibrutinib)^{16,17}, die bereits in der Erstlinientherapie der Hochrisiko-CLL (TP53 Mutation, del17p) und der Standard-CLL bei älteren Patienten zugelassen sind. Des Weiteren wurden in den letzten Jahren der B-cell lymphoma (BCL2)-Inhibitor Venetoclax und der Phosphoinositid-3-Kinase δ (PI3K δ)-Inhibitor Idelalisib¹⁸ in der Rezidivtherapie als Monotherapie oder Kombinationstherapie mit Rituximab/(Idelalisib) zugelassen.¹⁹

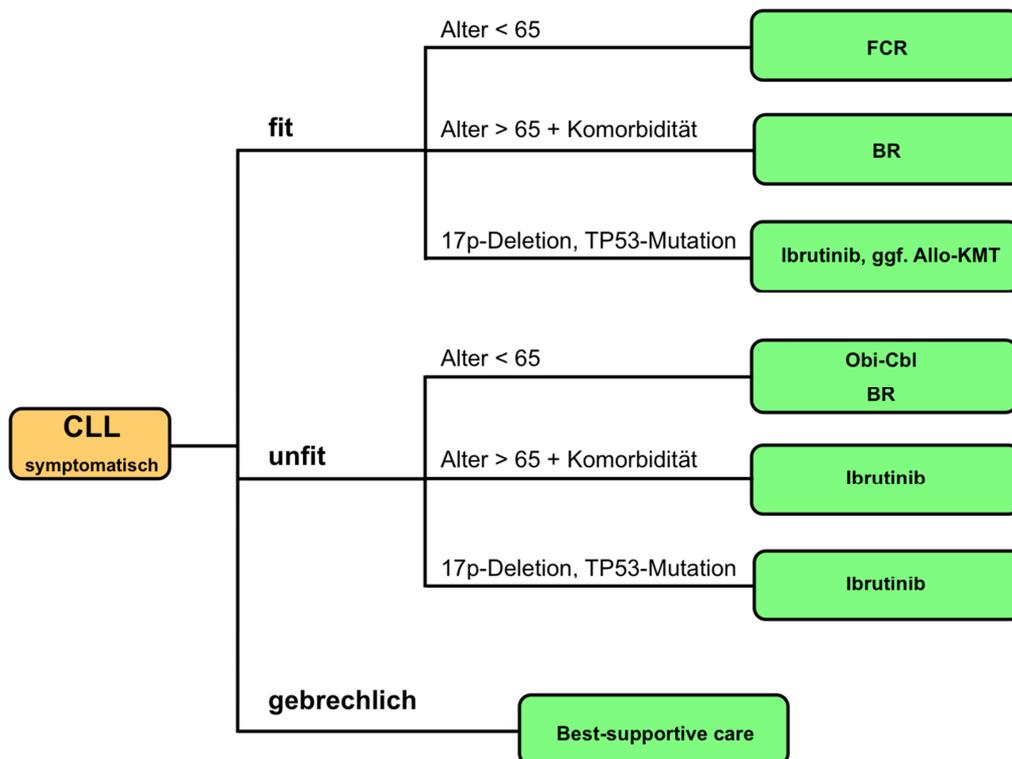


Abbildung 2: First-line-Therapieschema der chronisch lymphatischen Leukämie nach den aktuellen Leitlinien

Graphische Darstellung des Entscheidungsbaumes bei therapiebedürftiger CLL. Als fit werden Patienten in gutem Allgemeinzustand ohne Einschränkung der Nierenfunktion bezeichnet. Demgegenüber stehen unfite Patienten mit Einschränkung der Nierenfunktion und weiteren relevanten klinische Komorbiditäten. Als „gebrechlich“ werden Patient mit vielen Komorbiditäten und schlechtem klinischen Zustand bezeichnet. FCR = Fludarabin, Cyclophosphamid, Rituximab; BR = Bendamustin, Rituximab; Obi-Cbl = Obinutuzumab-Chlorambucil. Erstellung nach den aktuellen CLL Leitlinien.¹⁴

1.2.1. Prognostische Faktoren und klinisches Management der chronisch lymphatischen Leukämie

Bis heute ist die CLL eine weiterhin nicht heilbare hämatologische Erkrankung. Aus diesem Grund ist in den letzten Jahrzehnten viel Kraft in die Erforschung der molekularen Mechanismen der Erkrankung und molekularen Eigenschaften der entarteten klonalen B-Zellen geflossen. Hieraus konnten einige prognostische Faktoren abgeleitet werden, die bei der Identifikation des Patientenkollektives mit rasch progredienter Erkrankung helfen.

Die populärste Einteilung erfolgt nach dem Status der somatischen Mutation in den variablen Regionen der schweren Kette der Immunglobuline (IgHV) auf der Zelloberfläche.²⁰ Der Mutationsstatus ist nicht nur für die Therapieentscheidung, sondern auch für die Prognose der Patienten essentiell, wobei mutierte *IgHV* eine deutlich besseres Gesamtüberleben als unmutierte *IgHV* aufweisen (Medianes Gesamtüberleben 293 Monate vs. 117 Monate). Eine CLL gilt als unmutiert bei einer 98%igen Identität von *IgVH* zur entsprechenden Keimbahnsequenz. Der Mutationsstatus bleibt während des Verlaufs der Erkrankung unverändert.²¹

Weitere Veränderungen, die klinisch und laborchemisch einfach zu bestimmen sind, sind ZAP70 und CD38. Die Tyrosinkinase ζ -Ketten-assoziierte Proteinkinase 70 (ZAP70) und das Transmembran-Glykoprotein CD38, auch als zyklische Adenosindiphosphat (ADP)-Ribose Hydrolase bekannt, sind beide bei hoher Expression mit einer schlechteren Prognose verbunden.^{22,23} Diese beiden Veränderung sind häufig zusammen mit einem unmutierten IgHV Status zu finden.^{24,25}

Einen weiteren wichtigen Faktor stellen die chromosomalen Aberrationen dar, die bei ca. 80% der CLL-Patienten auftreten.²⁶ Sie sind nur in den malignen CLL-Zellen und nicht in gesunden Zellen vorhanden und ihre Genese ist bislang nicht abschließend geklärt. Die wichtigsten Aberrationen sind die Deletion 13q14, die Trisomie 12q13 und die beiden Deletionen 11q23 und 17p13. Die Deletion 13q14 ist mit ca. 40% die häufigste Aberration und mit einer besseren Prognose vergesellschaftet. Analysen der 13q-Region konnten einen komplexen epigenetisch-regulierten Tumorsuppressor-

Mechanismus beschreiben, der unter anderem aus den microRNA-Genen Mir-15a und Mir-16-1 besteht.²⁷ Die Deletion des 11q- Arms tritt eher selten auf (ca. 10%) und betrifft vor allem die Region des Ataxia teleangiectatica-mutierten (*ATM*) Gens. Die Serin-Proteinkinase ATM hat eine zentrale Rolle bei der Reparatur von DNA Schäden.²⁸ Die Deletion in 17p ist bei der Initialdiagnose mit nur 3-4% die seltenste Aberration, allerdings tritt sie bei refraktären CLL-Patienten mit ca. 30% am häufigsten auf.²⁶ Durch die Deletion kommt es zu einem Verlust des Tumorsuppressors p53 (*TP53*), was mit einem sehr schnellen Progress der Erkrankung und einer schlechten Prognose einhergeht.^{29,30}

Vor kurzem veröffentlichte „The international CLL-IPI working group“ einen Prognosescore auf Grundlage der aktuell verfügbaren klinischen und laborchemischen Tests (*Tabelle 4*). In diesen Score fließen der *TP53*-Mutationsstatus, der *IgHV*-Status, der Serumspiegel von beta-2-Mikroglobulin, das Alter und das Binet Stadium ein. Jedem Faktor wurde eine individuelle Punktzahl zugewiesen. Somit errechnet sich ein Score, der zur Einteilung in vier Gruppen mit unterschiedlichem medianen Überleben führt.³¹

Variable		Punkte
<i>TP53</i> (17p)	Mutiert/deleted	4
<i>IgHV</i> Status	Unmutiert	2
β2-Mikroglobulin	> 3,5 mg/l	2
Stadium	Binet B/C	1
Alter	> 65 Jahre	1
Score		1 - 10

Risikogruppe	Score	Medianes Überleben (Monate)
Niedrig	0 – 1	Nicht erreicht
Intermediär	2 – 3	104
Hoch	4 – 6	63
Sehr hoch	7 - 10	31

Tabelle 4: CLL-IPI-Score

Berechnung des individuellen Risikos bei Erstdiagnose einer chronisch lymphatischen Leukämie, Modifiziert nach „The international CLL-IPI working group“, Mai 2016.³¹

1.2.2. Richter-Transformation

Eine Sonderform der chronisch lymphatischen Leukämie ist die sogenannte Richter-Transformation. Diese wurde erstmals 1928 von Maurice Richter als Progress einer CLL in ein aggressives B-Zelllymphom beschrieben. Am häufigsten treten hier DLBCL auf, seltener auch Hodgkin-Lymphome. In der Regel gehen die Lymphome aus den CLL-Zellen als genetische Evolution hervor.^{32,33}

Ca. 5-10% der CLL-Erkrankungen gehen in eine Richter-Transformation über. Hilfreich kann hier ein PET-CT sein, da die Richter-transformierten Lymphknoten PET-CT positiv sind (im Gegensatz zu CLL-infiltrierten Lymphknoten).³⁴

Patienten mit einem hohen Risikoprofil (vgl. Kapitel 1.2.1) haben ebenso ein erhöhtes Risiko für die Transformation der CLL in ein aggressives Lymphom. Die höchste Korrelation scheint zwischen *IgHV*-Mutationsstatus und Transformationsrisiko vorzuliegen.³⁵ Ob ein Zusammenhang zwischen der Erstlinientherapie und der Entwicklung einer Richter-Transformation besteht, ist nicht abschließend geklärt. Die wahrscheinlichste Erklärung einer Richter-Transformation unter Behandlung mit Ibrutinib ist, dass das Risiko bereits bei Initiierung der Therapie deutlich erhöht war.³⁶

Eine Richter-Transformation ist äußerst schwierig zu behandeln. Das mediane Überleben liegt bei ca. zehn Monaten.^{33,37} In der Regel erfolgt die Behandlung analog zu anderen aggressiven Lymphomen mit R-CHOP. Die Ansprechrate ist gering und das Rezidivrisiko ist hoch.

1.3. Ca²⁺/NFAT Signalweg

1.3.1. NFAT Transkriptionsfaktoren

Die Erstbeschreibung der NFAT (nuclear factor of activated T-cells)-Transkriptionsfaktoren gelang 1988 und die Familie umfasst heute fünf Mitglieder (NFAT1-5). Der Transkriptionsfaktor wurde zuerst in T-Zellen entdeckt und wurde als DNA-bindendes Protein, welches am Interleukin-2 (IL-2)-Promoter bindet, charakterisiert.³⁸

Der Nachweis des Proteins gelang im späteren Verlauf auch in B-Zellen, natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), Dendritischen Zellen (DC) und Megakaryozyten.³⁹⁻⁴¹ Des Weiteren wurde dem Transkriptionsfaktor auch eine essentielle Rolle bei der Entwicklung der Muskulatur, des Herzens und anderer Organe zuerkannt.⁴² Zwischen verschiedenen Spezies ist die Struktur der NFAT-Proteine homolog und in der Evolution blieb der Aufbau hochkonserviert.

Der schematische Aufbau der NFAT-Proteine besteht aus einem N-terminalen regulatorischen Element, bekannt als *NFAT homology region* (NHR). In der NHR liegt eine Transaktivierungsdomäne (TAD). Ihr angeschlossen findet sich die DNA-Bindedomäne, auch *Rel-homology domain* (RHD) genannt. Den Abschluss bildet die C-terminalen Domäne. Die regulatorische Domäne besteht aus mehreren serinreichen und Serin-Prolin-Motiven (serine-rich regions SRR, serine-prolin regions SR), die durch verschiedene Kinasen u.a. die Caseinkinase 1 (CK1), die Glykogensynthasekinase 3 (GSK3) und die *dual-specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase* (DYRK) phosphoryliert werden können. Durch die Phosphorylierung wird NFAT an der nukleären Translokation gehindert. Zudem enthält die regulatorische Domäne auch die Calcineurin-Bindestelle (PxIxIT), wodurch die NFAT-Aktivität maßgeblich reguliert wird. Ein wichtiger Abschnitt in dieser Domäne ist auch die nukleäre Lokationssequenz (NLS). Diese sorgt für die Translokation von NFAT in den Zellkern. Die DNA-Bindungsdomäne verfügt außerdem über mehrere Ansatzpunkte für die Bindung von Kofaktoren (*FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog* (FOS) und das *jun proto-oncogene* (JUN)). Die NFAT Faktoren 1-4 werden durch den intrazellulären Calcium-Signalweg reguliert. NFAT5 hingegen wird vor allem durch osmotischen Stress aktiviert. (Siehe *Abbildung 3*, Übersicht in Müller et al., 2010⁴³).

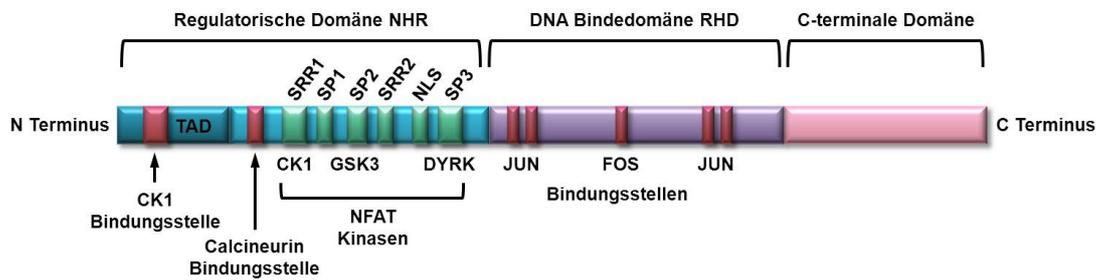


Abbildung 3: Schematischer Aufbau der NFAT Transkriptionsfaktoren

Das Grundgerüst der NFAT-Transkriptionsfaktoren enthält eine N-terminale regulatorische Domäne (NHR), die neben der TAD-Domäne Bindungsstellen für CK1 und Calcineurin besitzt. Hier finden sich ebenso mehrere serinreiche (SRR) und Serin-Prolin (SP)-Motive, die über die Kinasen CK1 GSK3 und DYRK phosphoryliert werden können. In der NHR-Domäne befindet sich auch die NLS-Sequenz, die für die nukleäre Translokation essentiell ist. Die DNA-Bindedomäne enthält Erkennungsmotive für die Kofaktoren FOS und JUN. Der letzte Abschnitt bildet die C-terminale Domäne in welchem sich ebenfalls zwei TAD Regionen befinden (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Dr. Melanie Märklin).

1.3.2. NFAT2-Isoformen

Die Gruppe NFAT-Transkriptionsfaktoren besteht, wie bereits erwähnt, aus fünf Familienmitgliedern. Interessanterweise ist NFAT2 zudem in unterschiedlichen Isoformen exprimiert.

Die meisten Untersuchungen liegen für das murine NFAT2 vor. Hier werden insgesamt vier Transkripte exprimiert.⁴⁴ Daraus resultieren Isoformen mit unterschiedlichen Eigenschaften. So wird eine konstitutiv aktive Form (Isoform NFAT2/β), welche über den P2-Promoter reguliert wird, von einer induzierbaren Isoform NFAT2/α (Regulation über den P1 Promotor) unterschieden. Diese beiden unterscheiden sich stark im N-Terminus. Die Isoform NFAT2/α grenzt sich damit stark von anderen NFAT-Familienmitgliedern ab.⁴⁵ Neben den zwei unterschiedlichen Promotoren führen weitere transkriptionelle und posttranskriptionelle Modifikationen zu Veränderungen am C-Terminus. Für den Promoter P1 entstehen drei Isoformen (αA, αB, αC) und für P2 lediglich eine lange Isoform (βC). Die Isoform A ist ca. 700 Aminosäuren lang, wohingegen die Isoform C mit ca. 930 Aminosäuren deutlich länger ist.⁴⁶ Von Serfling et al. konnten zwei murine Isoformen (αA und αC) mit unterschiedlicher Transkriptionsaktivität beschrieben werden. Der Isoform NFAT2/αA wird eine anti-apoptotische und proliferative Funktion zugeschrieben, wohingegen die Isoform NFAT2/αC den gegenteiligen Effekt in der Zelle besitzt.⁴⁷

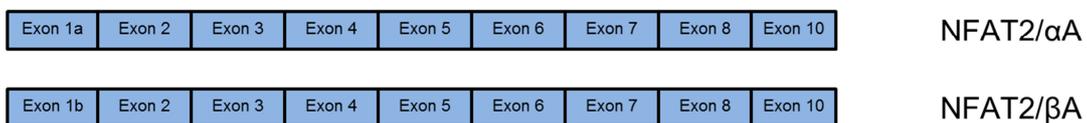
Im humanen Transkriptom finden sich hingegen mindestens sechs Gruppen von NFAT2-Isoformen.⁴⁶ Die Veränderungen beruhen auf transkriptioneller Modifikation mit alternativem Splicing und Polyadenylierung und den beiden unterschiedlichen Promotoren. Die Veränderungen betreffen hauptsächlich den C-Terminus und dadurch die Länge der Isoformen. Die Isoform NFAT2/B weist im Vergleich zur Isoform NFAT2/A ca. 128 Aminosäuren zusätzlich auf. Die Isoform NFAT2/C hat noch eine weitere Verlängerung um 118 Aminosäuren (*Abbildung 4*).⁴⁸ Im Bereich des C-Terminus der Isoform NFAT2/C findet sich eine zusätzliche TAD-Region mit zwei zusätzlichen Sumolyierungsmotiven (regulatorisches Element).^{45,49,50} Die Isoform NFAT2/B scheint durch die zusätzliche Peptidkette in ihrer transkriptionellen Aktivität eingeschränkt zu sein.⁵¹ Der N-Terminus wird hier ebenso in α und β unterschieden. Für die einzelnen Isoformen von NFAT2 werden auch im humanen System unterschiedliche transkriptionelle Eigenschaften angenommen. Die DNA-Bindedomäne

ist jedoch in allen Isoformen hochkonserviert. Interessanterweise scheinen insbesondere humane Effektor T-Zellen mehr kurze *NFAT2*-Isoformen zu exprimieren.^{45,48} In CLL-Patienten werden alle *NFAT2*-Isoformen mit unterschiedlicher Länge exprimiert (*Abbildung 5*).

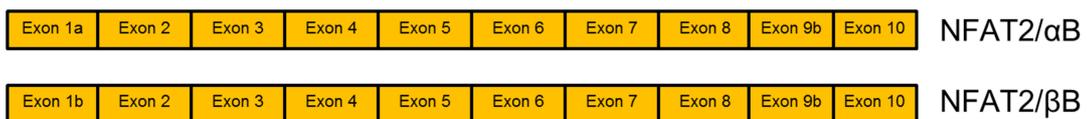
Komplettes NFAT2 Transkriptom



Kurze Isoform, aa ~710



Mittlere Isoform , aa ~820



Lange Isoform , aa ~930

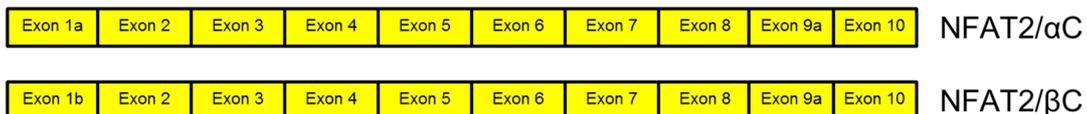


Abbildung 4: Schematische Darstellung des humanen NFAT2-Transkriptoms.

Die einzelnen Exone sind durchnummeriert. Die einzelne Länge der Isoformen ist an jeder Subform von NFAT2 genannt. Die farbliche Markierung ordnet sie der entsprechenden Isoform zu (blau= Isoform A, orange = B, gelb = C). α und β stehen für den unterschiedlichen N-Terminus durch die zwei Promotor (P1 und P2). Soweit möglich wurde mit PrimerBLAST exonüberspannende Primer synthetisiert. (Quelle: Ensemble genom browser, NFAT2 Transkriptom^{46,52})

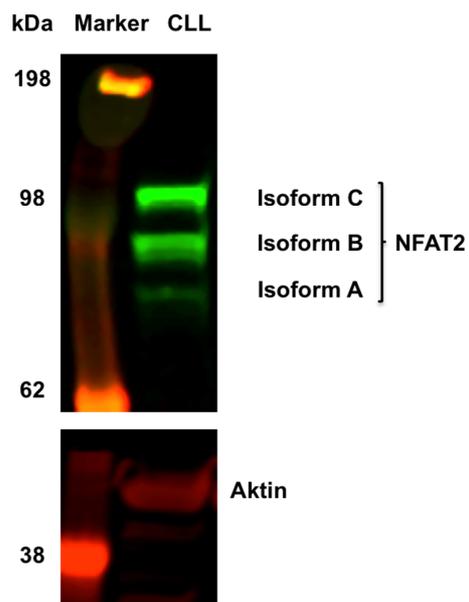


Abbildung 5: Western Blot von NFAT2-Isoformen

Western Blot mit Nachweis der NFAT2-Expression in einem CLL-Patienten. Als Ladekontrolle dient Actin. Die drei Isoformen von NFAT2 sind entsprechend ihrer Größe zu unterscheiden.

1.3.3. Ca²⁺/NFAT Regulation

Der Ca²⁺/NFAT-Signalweg kann durch Rezeptoraktivierung der Zelle initiiert werden. In B-Zellen geschieht dies über den B-Zell-Rezeptor (BCR), der durch Bindung des Fc-Rezeptors und durch Chemokinrezeptoren induziert wird.

Ein essentieller Schritt für die NFAT-Aktivierung ist die Rekrutierung des „Signalosoms“ und die damit verbundene Aktivierung von PLC γ 2. Hieraus resultiert die Spaltung von PIP2 in IP3 und DAG. Während DAG im weiteren Verlauf den MEK/ERK-Signalweg aktiviert, bindet IP3 an den IP3-Rezeptor am endoplasmatischen Retikulum (ER). Dies induziert die Öffnung der Calcium-Kanäle, führt zum Ca²⁺-Einstrom ins Zytoplasma und zu einer Änderung der Ca²⁺-Konzentration und löst damit eine Kommunikation zwischen den Ca²⁺-Sensoren STIM im ER und ORAI in der Zellmembran aus. ORAI reguliert über die Öffnung des Ca²⁺-Kanals CRAC einen weiteren Ca²⁺-Einstrom. Der erhöhte Calciumspiegel führt zu einer vermehrten Bindung an Calmodulin. Calmodulin aktiviert die Phosphatase Calcineurin. Calcineurin dephosphoryliert das inaktive phosphorylierte NFAT im Zytoplasma und dephosphoryliertes NFAT kann in den Nucleus translozieren. Im Zellkern erfüllt NFAT seine Funktion als Transkriptionsfaktor. In der Regel bildet es dimerische Komplexe mit unterschiedlichen Kofaktoren. NFAT kann selbst als Kofaktor dienen oder als Partner mit dem *activator protein 1* (AP-1). Mit dem Partner bindet NFAT an die Promotorregion verschiedener Zielgene. Dadurch werden unter anderem die Proliferation, Aktivierung und Differenzierung der B-Zelle gesteuert. Die Transkription wird über die Rephosphorylierung von NFAT gesteuert (*siehe Abbildung 6*).⁴³

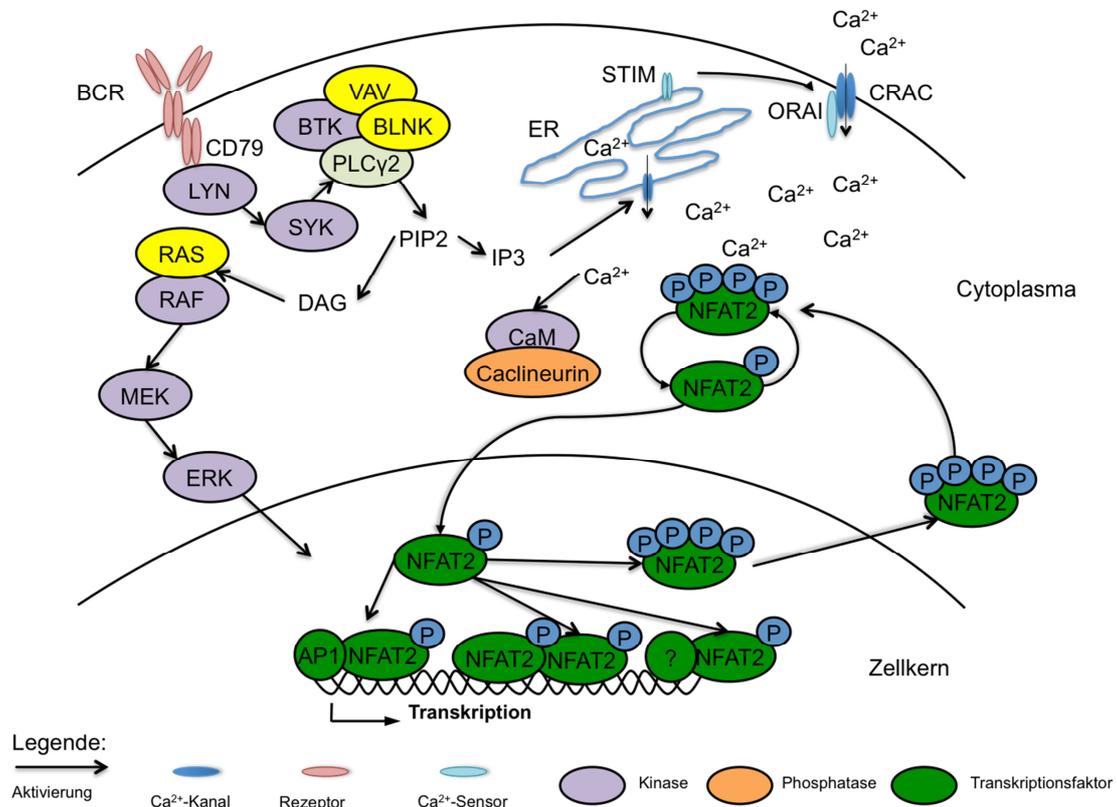


Abbildung 6: Ca²⁺/NFAT Signalweg in der B-Zelle

NFAT befindet sich in stark phosphoryliertem Zustand im Zytoplasma ruhender Zellen. Die Aktivierung des Rezeptors, in diesem Fall des BCRs, induziert den Ca²⁺/NFAT-Signalweg. Dies führt über die Aktivierung der Kinasen LYN und SYK zur Rekrutierung des Signalosoms aus BTK, VAV und PLCγ2 durch das Adapterprotein BLNK. PLCγ2 spaltet PIP2 in DAG und IP3. Während DAG unter anderem den MEK/ERK-Signalweg aktiviert, bindet IP3 an den IP3-Rezeptor im ER. Dies führt zu einem Ca²⁺-Einstrom ins Zytoplasma und wird über den Ca²⁺-Sensor STIM an ORAI weitergeleitet. ORAI induziert die Öffnung der CRAC Kanäle in der Zellmembran. Durch den stark erhöhten intrazellulären Ca²⁺-Spiegel wird über Calmodulin die Phosphatase Calcineurin aktiviert. Calcineurin dephosphoryliert NFAT. Daraufhin transloziert NFAT in den Zellkern. Dort bindet es als Dimer mit Kofaktoren wie AP1 an die DNA und induziert die Transkription verschiedener Zielgene. Die nukleären Kinasen CK1, GSK3 und DYRK rephosphorylieren NFAT und lösen den nukleären Export ins Zytoplasma aus.

1.3.4. Inhibitoren des Ca²⁺/NFAT Signalweges

Da die Aktivierung von Calcineurin streng calciumabhängig ist, kann eine Aktivierung von NFAT über eine Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels erfolgen. Eine gleichmäßige und starke Aktivierung kann durch die Stimulation von B-Zellen mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) und dem Ca²⁺-Ionophor Ionomycin (Iono) erreicht werden. Mit Hilfe dieser membrangängigen, intrazellulär wirkenden Substanzen wird die rezeptorabhängige Stimulation umgangen.⁵³ PMA wirkt analog zu DAG aktivierend auf PKC und aktiviert dadurch den MEK-EKR-Signalweg, dessen Ziel unter anderem der Kofaktor von NFAT AP-1 ist.⁵⁴ Ionomycin hingegen lagert sich in die Lipiddoppelschicht von Zell- und Organellmembranen ein und verursacht dadurch einen massiven Ca²⁺-Einstrom.⁵⁵ Dies führt zur Aktivierung der Phosphatase Calcineurin. Unterschiedliche Konzentrationen von PMA/Ionomycin-Stimulation können einen unterschiedlich starken Calciumflux auslösen und eine dementsprechende Aktivierung der nachgeschalteten Kinasen und Transkriptionsfaktoren induzieren (*siehe Abbildung 7*).⁵³

Im Weiteren werden drei mögliche Inhibitoren des Calcineurin/NFAT-Signaltransduktionsweges, nämlich Cyclosporin A, VIVIT und INCA-6, erläutert.

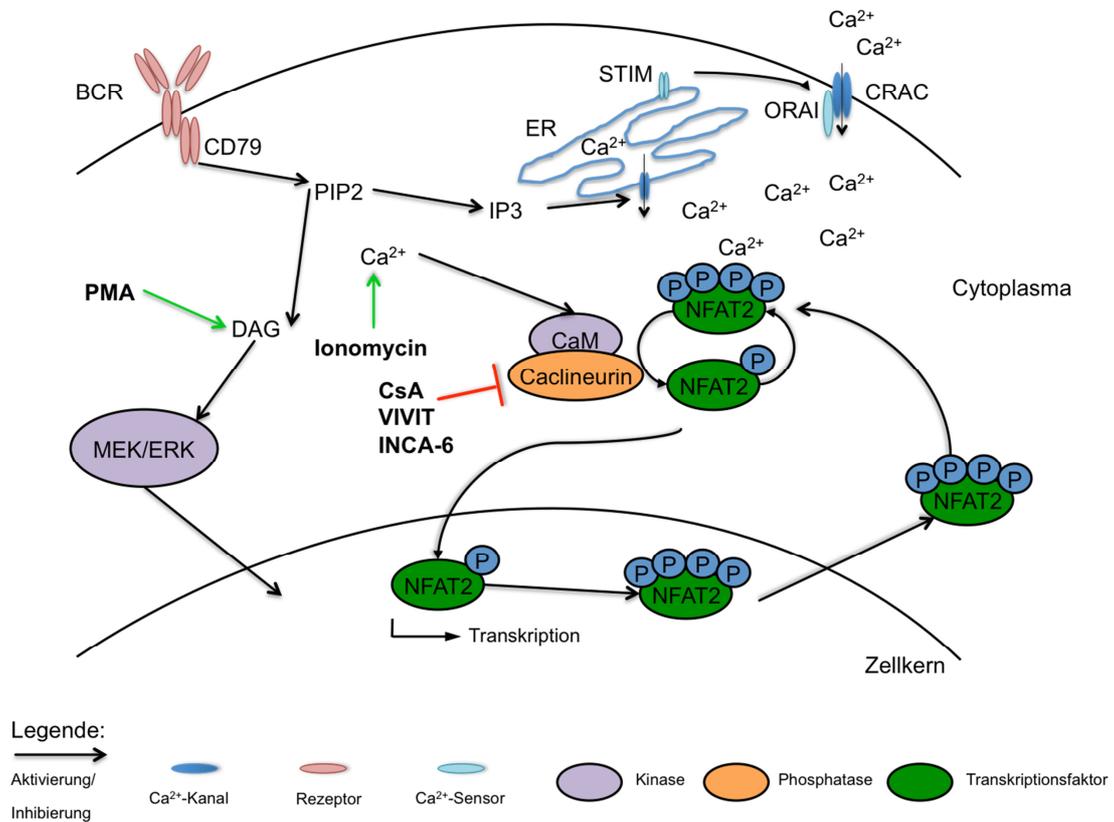


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Angriffspunkte im Ca²⁺/NFAT-Signalweg

Es gibt Induktoren und Inhibitoren des NFAT-Signalwegs. PMA und Ionomycin stimulieren direkt über eine Erhöhung des intrazellulären Calciums die Translokation von NFAT in den Nukleus (grüne Pfeile). Die Inhibition der NFAT2-Translokation erfolgt über Bindung von Cyclosporin A an Calcineurin; VIVIT oder INCA-6 binden die Calcineurinbindungsstelle von NFAT. Dies verhindert eine Dephosphorylierung von NFAT.

1.3.4.1. Cyclosporin A

Cyclosporin A (CsA) ist ein zyklisches Peptid (siehe *Abbildung 8*). Es besteht aus elf Aminosäuren und wurde aus Pilzen isoliert.⁵⁶ Es bildet intrazellulär einen Komplex mit Cyclophilin A und bindet an Calcineurin. Diese Bindung verdrängt die autoinhibitorische Domäne vom aktiven Zentrum.⁵⁷ Damit ist die Aktivierung von NFAT blockiert. Des Weiteren wirkt es inhibitorisch auf AP-1 und NF- κ B.^{58,59} Klinische Anwendung findet Cyclosporin A als Immunsuppressivum im Bereich der Organtransplantation und bei Autoimmunerkrankungen.^{56,57,60-62} Bei Langzeitanwendung kann es nephrotoxisch sein.⁶¹

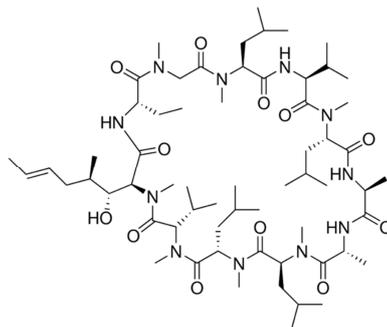


Abbildung 8: Chemische Struktur von Cyclosporin A

Modifiziert nach Sigma Alderich⁶³

1.3.4.2. VIVIT

Die Bindungsstelle von NFAT an Calcineurin ist evolutionär hoch konserviert. Das Bindungsmotiv PxlIT wird von den PxlIT-Peptiden imitiert und es konkurriert um die Calcineurin-Bindungsstelle (siehe *Abbildung 9*).⁶⁴ Die Dephosphorylierung anderer Calcineurin-Substrate ist deshalb nicht beeinflusst. Dies konnte durch ein GFP-VIVIT-Fusionprotein in Jurkat-Zellen gezeigt werden.⁶⁵ Damit ist VIVIT deutlich spezifischer als CsA. Einige Zelltypen weisen keine Membrandurchlässigkeit für das VIVIT-Peptid auf.⁶⁶

Met-Ala-Gly-Pro-His-Pro-Val-Ile-Val-Ile-Thr-Gly-Pro-His-Glu-Glu

Abbildung 9: Schematische Darstellung der VIVIT Aminosäuren Sequenz

1.3.4.3. INCA-6

Die Gruppe der INCA-Substanzen (Inhibitors of NFAT-CaN Association) bilden eine weitere Gruppe von Calcineurin-Inhibitoren. Sie unterscheiden sich durch unterschiedliche R-Reste; die beste inhibitorische Wirkung wurde für INCA-6 gezeigt (*Abbildung 10*). Die inhibitorische Wirkung der Substanz beruht auf einer kovalenten Bindung an einen Cysteinrest im Bereich des Calcineurin-Bindemotivs für NFAT (PxIxIT).⁶⁷ In-vitro-Analysen an murinen T-Zelllinien fanden eine fehlende Translokation von NFAT in den Zellkern nach Behandlung mit INCA-6. Hieraus resultierte eine Minderproduktion von IFN γ - und TNF α .^{68,69} Die Anwendung von INCA-6 als Inhibitor ist problematisch, da er eine hohe Zytotoxizität aufweist.^{67,68}

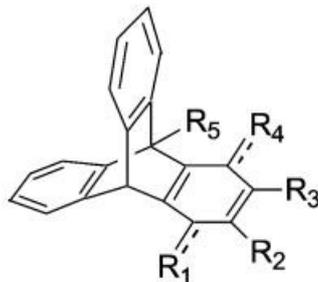


Abbildung 10: Chemische Struktur von INCA-6.

Die verschiedenen Modifikationen an den R-Resten führen zu unterschiedlichen chemischen Eigenschaften. Für INCA-6 ist die Verteilung wie folgt: R1=O, R2=H R3=H R4=O R5=H
Modifiziert nach Roerhl et al, 2004⁶⁸

1.4. NFAT2 und Tumorerkrankungen

Die Rolle des NFAT-Signalweges in lymphatischen Zellen war bereits die Grundlage einiger Forschungen. So wurde dem Ca^{2+} /NFAT-Signalweg eine Rolle bei verschiedenen immunologischen Erkrankungen zugeschrieben. Beispielhaft kann hier der schwere kombinierte Immundefekt (*severe combined immunodeficiency* SCID), das Bruton-Syndrom (*X-linked agammaglobulinemia* XLA), das Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS) und der Lupus erythematodes (SLE) genannt werden.

Dass eine NFAT-Dysregulation zu einem malignem Wachstum und anschließender Transformation führt, scheint damit durchaus möglich. Es liegen bereits Daten zu verschiedenen soliden Tumorerkrankungen vor. So konnte beim Mammakarzinom eine entscheidende Rolle für NFAT1 und NFAT5 charakterisiert werden, vor allem in der Metastasierung durch die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT).⁷⁰ Beim malignen Melanom hingegen sind NFAT2 und NFAT4 durch die Induktion der Cyclooxygenase-2 (COX2) relevant.⁷¹ Eine weitere Rolle konnte im Pankreaskarzinom differenziert werden. Hier induziert NFAT2 das *avian myelocytomatosis viral oncogene homolog* (V-MYC).⁷² (Übersicht in Müller et al., 2010⁴³).

1.5. NFAT2 in der chronisch lymphatischen Leukämie

Die Rolle der NFAT-Transkriptionsfaktoren scheint auch bei den hämatologischen Erkrankungen eine große Rolle zu spielen. So ergeben sich Hinweise dafür, dass der Signalweg über NFAT2 bei der chronisch myeloischen Leukämie (CML) für die Resistenzentwicklung gegenüber Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) ein Mechanismus ist.⁷³ Dagegen wurde bei der akuten lymphatischen T-Zell-Leukämie (T-ALL) eine konstitutive Aktivierung von Calcineurin, das auch NFAT2 dephosphoryliert, beschrieben.⁷⁴ Auch in Lymphomen der B-Zellreihe ist eine Vielzahl an NFAT2-Aspekten charakterisiert worden. Jedoch ergaben Analysen zum Mutationsstatus von NFAT2 bei Tumorerkrankungen keine Aufschlüsse.⁷⁵ Interessanterweise fand sich dort

jedoch häufig eine aberrante Aktivierung und es lag zudem häufig eine Überexpression und Hyperaktivierung von NFAT2 in einer Vielzahl an Tumoren vor.

Marafioti et al. führten histopathologische Untersuchung an über 300 Biopsien verschiedener Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) durch. Hier fand sich eine deutliche Überexpression von NFAT2 in der überwiegenden Mehrheit der Präparate. In einzelnen Non-Hodgkin-Lymphomen konnte eine starke aberrante nukleäre Translokation von NFAT2 nachgewiesen werden. Dies fand sich u.a. für die indolent verlaufende CLL, aber auch für aggressive Lymphome wie DLBCL und Burkitt Lymphome.⁷⁶

Die Produktion von IL-10, die u.a. CD5 abhängig ist, bedeutet für CLL-Zellen einen Überlebensstimulus. Zudem besteht ein regulatorischer Zusammenhang zwischen NFAT2 und CD5. In neueren Studien gelang es, eine Korrelation der BCR-Reaktivität mit dem NFAT2-Aktivierungsstatus zu charakterisieren.⁷⁵ So wurde in der Studie von Le Roy et al. das CLL-Patientenkollektiv in sogenannte *Responder* und *Non-Responder* eingeteilt. Dies beschreibt die Fähigkeit der primären CLL-Zellen auf α lgM-Stimulation in vitro mit erhöhter metabolischer Aktivität und Apoptoseresistenz zu reagieren. Während alle CLL-Proben eine erhöhte NFAT2-Expression aufwiesen, zeigten nur die *Responder* auf α lgM-Stimulation eine verstärkte NFAT2-DNA-Bindungskapazität. Interessanterweise korrelierte eine erhöhte BCR-NFAT-Aktivität direkt mit einer deutlich schlechteren Prognose für die Patienten.⁷⁷

1.6. Die Rolle der Zellkultur als Modell

Um die Pathogenese einer Tumorerkrankung zu untersuchen, sind Modellsysteme notwendig. Neben der Möglichkeit eines Mausmodells ist eine Expansion von humanen CLL-Zellen in vitro zur genaueren Untersuchung des Effekts in verschiedenen Substanzen oder der Analyse des NFAT2-Signalweges möglich. Leider sind primäre CLL-Zellen außerhalb eines Kokultursystems in vitro nicht längerfristig kultivierbar.^{78,79} In der Literatur sind mehrere CLL-Zelllinien beschrieben, die dauerhaft in vitro kultiviert werden können. Zwei Beispiele dafür sind die beiden Zelllinien JVM-3

und MEC-1^{80,81}. An diesen Zelllinien können Methoden für primäre CLL-Zellen etabliert und neue Substanzen in vitro getestet werden, ohne dass aufwendige Tiermodelle notwendig sind. Des Weiteren sind verschiedene genomische und metabolische Modifikationen bei diesen Zelllinien möglich. Ein Beispiel hierfür stellt die shRNA-Interferenz dar.

1.6.1. shRNA - Beispiel einer RNA-Interferenz

Die Expression von Proteinen in der eukaryotischen Zelle ist abhängig von der Transkription und Translation der RNA. Die Transkription der DNA unterliegt Mechanismen der Histonmethylierung und Demethylierung. Hierdurch wird ein transkriptionales Gene-Silencing erreicht.⁸²

Ein Weg, der die Translation der mRNA beeinflusst, kann als RNA-Interferenzmechanismus beschrieben werden. Unterschieden werden kann hier exogene siRNA und endogene microRNA (miRNA). In Insekten und Pflanzen dient siRNA der Virusabwehr. So wird virale Doppelstrang-RNA durch sogenannter DICER (ein RNase III Enzym) in kleine siRNA Stücke geschnitten. Diese werden im Anschluss in den RNA-induced silencing complex (RISC) geladen und sind für die Erkennung viraler mRNA zuständig.⁸³

Der miRNA wird in eukaryotischen Zellen eine bedeutende Rolle bei der Genregulation zugeschrieben. Diese entsteht durch Prozessierung von sogenannten Pri-miRNA und wird ebenfalls in den RISC-Komplex geladen.^{84,85} Abhängig von der Sequenzhomologie zwischen der siRNA/miRNA und der mRNA erfolgt über die Argonautenproteine (Ago2) entweder eine direkte Spaltung der mRNA oder eine Inhibierung der Translation.^{82,86}

Eine artifiziell hergestellte RNA-Interferenz kann über kurzwirksame siRNA oder durch die Hilfe eines shRNA-Expressionsvektors erreicht werden. Die siRNA hat in der Regel eine Wirkdauer von wenigen Tagen (4-5 Tage). Durch das Integrieren eines shRNA-Vektors kann eine längerfristige Regulation des Zielgens erreicht werden. Ein Vorteil der siRNA ist die deutlich stärkere Regulationseigenschaft, da mehr siRNA in die jeweilige Zelle eingebracht werden kann, ohne dass ein zytotoxischer Effekt auftritt. Die shRNA-Vektoren können nur bis zu einem gewissen Grad in die Zelle integriert

werden, bevor zytotoxische Effekt auftreten. Dazu kommt noch als ein weiterer Einflussfaktor die Aktivität der ablesenden RNA-Polymerase.⁸²

1.7. Zielsetzung

Die chronisch lymphatische Leukämie bleibt bis heute eine unheilbare Erkrankung. Der indolente Verlauf der Erkrankung macht es notwendig, dass engmaschige ärztliche Konsultationen erfolgen. Sollte die Erkrankung therapiebedürftig werden, stehen neben neuen Substanzen wie den Small Molecules auch Kombinationstherapien aus Antikörpern und konventioneller Chemotherapie zur Verfügung. Im Verlauf der Erkrankung sind in der Regel mehrere Therapien notwendig.

Nicht nur für den Patienten, sondern auch für den behandelnden Arzt ist es wichtig, frühzeitig den möglichen Progress der Erkrankung vorherzusehen. Hierfür wurden in den letzten Jahren immer wieder neue Scores auf Grundlage molekularer, klinischer und zytogenetischer Faktoren erstellt. Trotz allem sind hier noch weitere Verbesserungen notwendig. Darüber hinaus ist die Pathogenese der Erkrankung weiterhin nicht geklärt.

Ziel dieser Arbeit ist, die aberrante Aktivierung von NFAT2 in CLL-Patienten und deren Einfluss auf den klinischen Verlauf zu charakterisieren. Dabei soll geprüft werden, ob NFAT2 als möglicher prognostischer Marker bei der CLL etabliert werden kann. Ein weiteres Ziel ist es, den Effekt der NFAT-Inhibierung auf das Wachstum der CLL-Zellen zu untersuchen. Hierzu werden die klassischen Inhibitoren des NFAT-Signalwegs an CLL-Zelllinien untersucht. Ferner sollte in der Folge ein Knock-down von NFAT2 in CLL-Zelllinien etabliert werden.

Die Analyse der Rolle des Ca^{2+} /NFAT2-Signalwegs in der CLL soll zum einen die klinische Relevanz des Expressionsprofil von NFAT2 darlegen, zum anderen einen möglichen therapeutischen Ansatz in vitro charakterisieren und möglicherweise neue Zielstrukturen identifizieren.

2. Material & Methoden

2.1. Material

2.1.1. Verbrauchsmaterialien

96-well plate F-Bottom	Greiner bio-one, Frickenhausen
96-well plate, weiß	Roche, Penzberg
Bolt® 4-12% Bis-Tris Plus Gel	Novex® Life technologie, Carlsbad, CA
Combitips Biopur 5 ml	Eppendorf, Hamburg
Countess Slides	Invitrogen™, Life technologie, Carlsbad, CA
Deckgläser	Menzel, Braunschweig
FACS Röhrchen 5 ml	Costar® Corning, Tewksbury, MA
Falconröhrchen 15; 50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Gentle MACS C-tubes	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Gewebe-Kulturflaschen 75 cm ²	Greiner bio-one, Frickenhausen
Gewebe-Kulturschale Polystyrol PS 16/60 mm	Greiner bio-one, Frickenhausen
Gewebe-Kulturflaschen 25 cm ²	Greiner bio-one, Frickenhausen
LS MACS Columns	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Nitrilhandschuhe	Kimberley Clark, Weinheim
Objektträger Superfrost	Langenbrinck, Emmendingen
PCR-Reaktionsgefäße 8er Strips	Biozym, Hessisch Oldendorf
Pipette serologisch Advant. 2; 5; 10; 25; 50 ml	Costar® Corning, Tewksbury, MA
Pipettenspitzen 10; 200; 1000; 1250 µl	Eppendorf, Hamburg
QIA Shredder	Qiagen, Hilden
Reaktionsgefäße 0,5; 1,5; 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Sealing Folie	Roche, Penzberg
Sterilfilterspitzen 10; 100; 1000 µl	Biozym, Hessisch Oldendorf
Zellsieb 40 µm, steril	Partec, Münster
Zellsieb 40 µm, steril	Costar® Corning, Tewksbury, MA

2.1.2. Reagenzien & Chemikalien

100 bp DNA Ladder	Invitrogen™, Life technologie, Carlsbad, CA
Agarose NEEO Ultra	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
CD19 Microbeads (human)	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DNase- & Rnase-freies Wasser	Promega, Madison, WI
Dnase I	Invitrogen™ Life technologies, Darmstadt
dNTPs	Lonza, Basel, CH

Ethanol p.a. (99,9%)	Merck, Darmstadt
Ex-Taq HS + Puffer	Lonza, Basel, CH
FACS-Clean	BD Biosciences, Heidelberg
FACS-Flow	BD Biosciences, Heidelberg
FACS-Rinse	BD Biosciences, Heidelberg
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Merck, Darmstadt
HALT Protease & Phosphatase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Gibco® Life technologie, Carlsbad, CA
Licor Blocking Buffer	Li-COR Bioscience, Lincoln, US
Lymphozytenseparationsmedium LSM 1077	PAA, GE Healthcare, Freiburg
Methanol	Merck, Darmstadt
Midori Green	Biozym, Hessisch Oldendorf
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	Gibco® Life technologie, Carlsbad, CA
Neomount Eindeckmedium	Merck Millipore, Darmstadt
NE-PER Nuclear & Cytoplasmic Extraction	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Oligo(dT) ₂₃ Primer	Sigma-Aldrich, Steinheim
One-Color Protein Molecular Weight Marker	Li-COR Bioscience, Lincoln, US
Orange G	Sigma-Aldrich, Steinheim
PBS w/o Ca ²⁺ Mg ²⁺	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin/Streptomycin-Mix	PAA, GE Healthcare, Freiburg
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Reducing Agent	Li-COR Bioscience, Lincoln, US
RIPA-Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
RNase-, DNase-freies Wasser	Promega, Wisconsin, USA,
RNase Out	Invitrogen, Darmstadt
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen, Hilden
Roti®-Nanoquant	Carl Roth, Karlsruhe
RPMI 1640 GlutaMAX-I HEPES	Gibco® Life technologies, Darmstadt
SDS (10%)	Carl Roth, Karlsruhe
Superscript II Reverse Transkriptase	Invitrogen™ Life technologies, Darmstadt
SYBR® Select Master Mix	Applied Biosystems®, Life technologie, Carlsbad, CA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypanblau	Invitrogen™ Life technologies, Darmstadt
Tween-20	Sigma-Aldrich, Steinheim
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Biotin-Antibody Cocktail (Anti-CD2, CD4, CD11b, CD16, CD36, CD235a, Anti-IgE)	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Anti-Biotin Microbeads	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Cyclosporin A	Sigma-Aldrich, Steinheim
VIVIT	Bereitgestellt durch Prof. Jung, Tübingen
INCA-6	Sigma-Aldrich, Steinheim
Gibco™ Opti-MEM™	Gibco® Life technologies, Darmstadt
MIRUS Transit-LT1	Mirus Bio LLC, Madison, WI

Polybrene
Trypsin-EDTA (0,05%)
CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay
IMDM, HEPES
DMEM
PerfeCTa[®] PreAmp SuperMix
qScript[™] XLT cDNA SuperMix

Sigma-Aldrich, Steinheim
Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Promega, Madison, WI

Gibco[®] Life technologies, Darmstadt
Gibco[®] Life technologies, Darmstadt
Quanta BioSciences Inc., Beverly, MA
Quanta BioSciences Inc., Beverly, MA

2.1.3. Geräte und Zubehör

Apotome
BD FACS Canto II
Biofuge fresco
Bolt[®] Mini Gel Tank

Bolt[™] LDS Sample Buffer

Bolt[™] MES SDS Running Buffer

Countess[™]

ELISA Reader
Eppendorf 8 Kanal elektr.
Eppendorf Research Plus 2,5; 10; 100; 1000
µl

Geldoku E-Box-VX2/20M

Gelkammer

iBlot[®] Gel Transfer Device

Inkubator HERA Cell
Licor Odyssey Imaging System

Light Cycler LC480

MACS Puffer

Mastercycler Gradient

Megafuge 1.0R

Mikroskop HBO 50

Mikrowelle

Nanodrop

Pipetboy acu

Schüttler Polymax 1040

Spannungsgerät Power Pac 300

Sterilbank HERA safe

Thermomixer comfort

Vacusaft

Waage Kern

Wasserbad

Zentrifuge 5415R

Zeiss, Jena
BD Biosciences, Heidelberg
Heraeus, Hanau
Invitrogen[™] Life technologies,
Darmstadt

Invitrogen[™] Life technologies,
Darmstadt

Invitrogen[™] Life technologies,
Darmstadt

Invitrogen[™] Life technologies,
Darmstadt

TECAN, Crailsheim
Eppendorf, Hamburg
Eppendorf, Hamburg

Peqlab, Erlangen

Peqlab, Erlangen

Invitrogen[™] Life technologies,
Darmstadt

Heraeus, Hanau

Li-COR Bioscience, Lincoln, US

Roche, Penzberg

Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

Eppendorf, Hamburg

Heraeus, Hanau

Zeiss, Jena

LG, Willich

Peqlab, Erlangen

Integra Biosciences, Chur CH

Heidolph, Schwabach

Bio-Rad, München

Heraeus, Hanau

Eppendorf, Hamburg

Integra Biosciences, Chur CH

Roth, Karlsruhe

Memmert, Schwabach

Eppendorf, Hamburg

Zentrifuge 5804R
GloMax 96 Microplate Luminometer

Eppendorf, Hamburg
Promega, Madison, WI

2.1.4. Puffer und Medien

10x TBE Puffer (1 l)	107,8 g TRIS, 55 g Borsäure, 7,44 g EDTA
Jurkat/JVM-3 Zellmedium	RPMI, 10% FCS, 1% Pen/Strep
Einfriermedium	FCS + 10% DMSO
PBS-T	PBS + 0,1 % Tween-20
MEC-1 Zellmedium	IMDM, 10% FCS, 1% Pen/Strep, 1% L-Glutamin, 1% Na-Bikarbonat
HEK293T Zellmedium	DMEM, 10% FCS, 1% Pen/Strep

2.1.5. Antikörper

CD19-PerCPCy5	Rat IgG _{2a}	eBioscience, Frankfurt
CD38-PE	Rat IgG _{2a}	eBioscience, Frankfurt
CD3-FITC	arm. Hamster IgG	eBioscience, Frankfurt
CD5-APC	Rat IgG _{2a}	eBioscience, Frankfurt
GAPDH	Mouse, IgG ₁	R&D Systems, Minneapolis, MN
IRDye® 680 Anti-Rabbit	Donkey	Li-COR Bioscience, Lincoln, US
IRDye® 680LT Anti-Mouse	Donkey	Li-COR Bioscience, Lincoln, US
IRDye® 800CW Anti-Mouse	Donkey	Li-COR Bioscience, Lincoln, US
NFAT2 (7A6)	Mouse IgG ₁	BD Biosciences, Heidelberg
β-Aktin (13E5)	Rabbit IgG	Cell Signaling, Danvers, MA
TATA-Box (ab818)	Mouse IgG ₁	Abcam, Cambridge, MA
NFAT2 (7A6)	Mouse IgG ₁	Alexis, Enzo Life Science, US
NFAT2 (7A6)	Mouse IgG ₁	Santa Cruz Biotechnology, US
anti-mouse-Cy3	Goat IgG	Abcam, Cambridge, MA
Anti-rabbit-Alexis488	Goat IgG	Abcam, Cambridge, MA
DAPI		Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
CD19 (D4V4B)	Rabbit IgG	Cell Signaling, Danvers, MA

2.1.6. Zelllinien

Jurkat (ACC 282), ATCC

Jurkat ist eine Suspensionszelle, welche aus dem Blut eines 14-jährigen Jungen mit Rezidiv einer T-ALL gewonnen wurde. Sie wird häufig in experimentellen Arbeiten in der Zellkultur eingesetzt.

JVM-3 (ACC 18), ATCC

JVM-3 ist eine Suspensionszelllinie, welche von einem 73-jährigen Mann mit B-PLL über EBV-Transformation immortalisiert wurde. EBV-Proteine werden nicht exprimiert. Die Zellen exprimieren mRNA von BCL2/3.

MEC-1 (ACC 497), ATCC

MEC-1 ist eine Suspensionszelllinie. Sie wurde 1993 aus dem Blut eines 61-jährigen Kaukasiers mit B-CLL gewonnen. MEC-1 ist positiv für EBV in der PCR, jedoch werden die spezifischen EBV-Proteine nicht exprimiert.

HEK293T, zur Verfügung gestellt von Prof. A. Rao, San Diego

Tochterzellen der HEK293 Zellen, welche von humanen embryonalen Nierenzellen abstammen. Die Zellen wurden mittels des Adenovirus 5 transformiert und enthalten das SV40 large T-Antigen. Dies erlaubt eine erhöhte intrazelluläre Produktion von (sh)Vektoren über einen auf dem Vektor vorhandenem SV40-Replikationsursprung (origin of replication). Das ist insbesondere für eine hohe Vektorkonzentration in Transduktionsviren von besonderer Relevanz. Die Zellen wachsen in Zellkultur adhärent.⁸⁷

2.1.7. Primer

GAPDH	qRT-PCR	FW: 5'-CTC TTC CTG AAG CGA GAG AAT-3' RV: 5'-GCC ACG TCA ATC TGC TTC TT-3'
NFAT2	qRT-PCR	FW: 5'-AGT CTC TTT CCC CGA CAT CA-3' RV: 5'-CAC CTC GAT CCG AAG CTC-3'
Pdcd1	RT ² -qPCR Primer Assay	Qiagen, Hilden
Spp1	RT ² -qPCR Primer Assay	Qiagen, Hilden

TP53	RT ² -qPCR Primer Assay	Qiagen, Hilden
TNSFS40	RT ² -qPCR Primer Assay	Qiagen, Hilden
NFAT2 Exon 2-3	qRT-PCR	FW: 5'-CCT GTC CCC TAC GTC CTA CA-3' RV: 5'-CTG CCC TCC GTC TCG TAG T-3'
NFAT2 Exon 4-5	qRT-PCR	FW: 5'-CCT GGA GAT CCC ACT CCT G-3' RV: 5'-CGT ACC CGT GTG TTC TTC CT-3'
NFAT2 Exon 5-6	qRT-PCR	FW: 5'-AGG AAG AAC ACA CGG GTA CG-3' RV: 5'-CTC TGC TTC TCC ACC AGA GG-3'
NFAT2 Exon 6-8	qRT-PCR	FW: 5'-CTG CAG GAC TCC AAG GTC AT-3' RV: 5'-GGG ATC TCA ACC ACC AGA GA-3'
NFAT2 Exon 8-9	qRT-PCR	FW: 5'-AGA AAG CGA AGC CAG TAC CA-3' RV: 5'-GAC TTA ACC CCT GGC TCA CC-3'
GAPDH	qRT-PCR (Lymphknoten)	FW: 5'-ATT GCC GAC AGG ATG CAG AA-3' RV: 5'-GTA CTT GCG CTC AGG AGG AG-3'
NFAT2	qRT-PCR (Lymphknoten)	FW: 5'-ACCGAGCCCACTACGAGAC-3' RV: 5'-CGGCTCATTCTCCAAGTAGC-3'

2.1.8. Vektoren

shRNA	Zielstruktur
Scramble	Keine mRNA Zielstruktur im humanen Transkriptom
E5	NFAT2 (genaue Sequenz nicht publiziert)
B5	NFAT2 (genaue Sequenz nicht publiziert)
C5	NFAT2 (genaue Sequenz nicht publiziert)
F10	NFAT2 (genaue Sequenz nicht publiziert)
VSV-g	Hüllplasmid (Lentivirus)
Δ R8.9 (gag-pol-rev)	Verpackungsplasmid (Lentivirus)

zur Verfügung gestellt von Prof. A. Rao, San Diego

2.2. Methoden

2.2.1. Software und Statistik

Diese Arbeit wurde mit Microsoft Office 2010 angefertigt (Version 14.3.9). Die statistische Auswertung erfolgte mit JMP 13.0. Alle Daten wurden auf ihre Verteilung getestet und es wurden entsprechende statistische Test angewandt (Students/Welch's t-test, Mann-Whitney/Kruskal-Wallis Test, Fisher's t-test). Die Überlebenskurven (Kaplan-Meier) wurden mit GraphPad PRISM Version 7.0 erstellt.

Für die Auswertung der qRT-PCR wurde die LightCycler 480 SW V. 1.5 benutzt. Zur Quantifizierung der Western Blots diente ImageStudioLite (Version 5.0.21). Primer und shRNA-Sequenzen wurden erstellt und überprüft über das Online Tool Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). Die Software CompuSyn diente zur Berechnung der CI Values und Darstellung der Plots.

2.2.2. Zellkultur

2.2.2.1. Einfrieren und Auftauen

Zum Einfrieren wurden 5×10^7 Zellen pelletiert und in 1 ml Einfriermedium aufgenommen (FCS + 10% DMSO). Die Zellsuspension wurde in ein 2 ml Cyro-Röhrchen überführt, danach erfolgte das Einfrieren bei -80°C über einen Naygene Cryo 1° Freezing Container. Im Auftauprozess wurde der Inhalt eines Cryo-Röhrchen in 10 ml RPMI-Medium resuspendiert und anschließend mit PBS gewaschen (300 g, 5 min, 20°C).

2.2.2.2. Zellzählung

Das Countess System wurde zur Bestimmung der Zellzahl verwendet. Es wurden verdünnte (1:100 in PBS) oder unverdünnte Proben 1:2 mit Trypanblau gemischt und

10 µl in eine Kammer pipettiert. Nach Feinjustierung des Countess Geräts entsprechend der Zellgröße erfolgte die automatische Auszählung der lebenden Zellen. Der Anteil der lebenden Zellen wurde als Viability angegeben.

2.2.2.3. Zellkultivierung und -expansion

Zur Zellkultur dienten Zellkulturflaschen mit 25 cm² und 75 cm². In diesen erfolgte die Kultivierung nach dem Auftauen im Brutschrank bei 37° C und 5% CO₂. Die Zellen wurden in ihrem optimalen Nährmedium aufgenommen (siehe Kapitel 2.1.4). Die Zelllinien wurden in der Regel in einer Konzentration von 1 x 10⁶ Zellen/ml expandiert. Ein Splitting der Zellen erfolgte alle 2-3 Tage. Vor Experimenten lag die Viabilität der Zellen über 95%.

2.2.2.4. Zellstimulation mit PMA/Ionomycin und Cyclosporin A

Jurkat-Zellen wurden in einer Konzentration von 1,5 x 10⁶ Zellen/ml in Zellkulturflaschen aufgenommen. Die Stimulation mit PMA/Ionomycin erfolgte für 6h. Die Zugabe von Cyclosporin A (CsA) erfolgte 45 min vorher. Nach Abschluss der Stimulierung wurden die Zellen geerntet und zweimal in PBS gewaschen (300 g, 5 min, RT). Erst danach erfolgte die Weiterverarbeitung.

<u>Stoffgruppe</u>	<u>Konzentration</u>
PMA	10 ng/ml
Ionomycin	1000 ng/ml
CsA	400 ng/ml

2.2.2.5. Viability Assay mit MEC-1 und JVM-3 Zellen

Um den Einfluss von Ifosamid und Calcinerin/NFAT-Inhibitoren auf die MEC-1 und JVM-3 Zellen zu untersuchen, wurde der CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay

eingesetzt. Dazu wurden in einer lichtundurchlässigen 96-well Platte 5000 Zellen pro well ausgesät. Die Zellen wurden in vierfachen Bestimmungen mit einer Verdünnungsreihe der jeweiligen Substanz (Ifosfamid und Calcineurin/NFAT-Inhibitoren) im jeweiligen Zellmedium behandelt und für 48 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen mit dem CellTiter-Glo Assay lysiert und das austretende ATP führte durch eine chemische Reaktion zum Auftreten eines Lumineszenz-Signals. Dementsprechend ist das Signal proportional zur Menge an ATP und damit dem Anteil an lebenden Zellen (siehe *Abbildung 11*). Nach Auswertung der Viability erfolgte die Berechnung des Synergismus bzw. Antagonismus der Substanzkombination auf Grundlage des Massenwirkungsgesetzes.⁸⁸

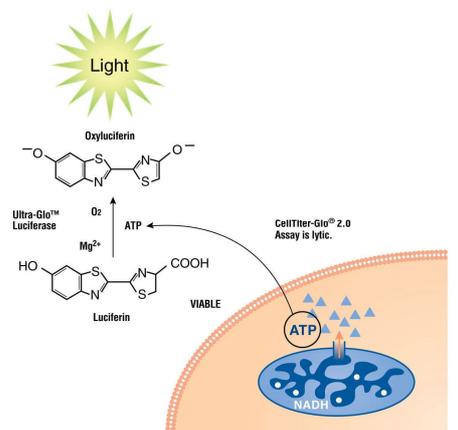


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Funktionsweise des Cell Titer Glo Assays von Promega.

Nach Kultivierung der Zellen in der Substanzkombination erfolgt zunächst die Zellyse. Das freie ATP katalysiert die Umwandlung von Luciferin in Oxyluciferin. Hierdurch kommt es zur Lichtemission, die vom Luminometer gemessen werden kann. Die Lumineszenz ist proportional zum ATP-Gehalt und damit zum Anteil an lebenden Zellen. *Abbildung modifiziert nach Promega.*⁸⁹

2.2.3. NFAT2 shRNA-Knock-down in MEC-1-Zellen

In diesem Versuchsaufbau wurde in der Zelllinie MEC-1 mittels shRNA ein NFAT2-Knock-down etabliert. Hierzu wurden NFAT2-mRNA-spezifische Vektoren von der RNAi facility des „La Jolla Instituts für Allergie und Immunologie“ in San Diego über das Lentivirus in die Zelllinie eingeschleust. Eine Selektion der transduzierten Zellen

erfolgte mit Hilfe des Nukleosid-Antibiotikums Puromycin. Ein schematischer Aufbau des pLKO.1-Vektors ist in *Abbildung 12* zu sehen.

Der Virusüberstand für die Transduktion wurde in 6-well-Platten produziert. 24 h vor Transfektion erfolgte die Aussaat von $1,3 \times 10^6$ HEK293T Zellen, so dass am Folgetag eine 60%ige Konfluenz erreicht wurde. Das Zellmedium wurde abgenommen und 5 ml DMEM wurden hinzugegeben. Danach erfolgte für 1 h eine Inkubation der Zellen im Brutschrank. Der Transfektionsansatz wurde vorbereitet (siehe unten) und kreisförmig auf die HEK293T Zellen getropft. Der Ansatz wurde für 16 h im Inkubator inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand abgesaugt und verworfen. Eine erneute Inkubation für 24 h erfolgte nach Hinzugabe von 2 ml frischem Medium. Der Überstand wurde abgenommen, filtriert ($45 \mu\text{M}$) und zur Transduktion weiterverwendet. Nach Wiederholung des Vorgangs (erneute 24 h Inkubation) entstanden pro Ansatz zwei Virusproduktionen. Ein schematischer Aufbau des pLKO.1-Transfervektors ist in *Abbildung 12* zu sehen.

3,5 μg	Transfektor (shNFAT)
2,3 μg	$\Delta\text{R8.9}$ (gag-pol-rev)
1,2 μg	VSV-g
Auffüllen auf 540 μl Gesamtvolumen mit Opti-MEM	
16 μl	TransIT

Inkubation für 30 min bei RT

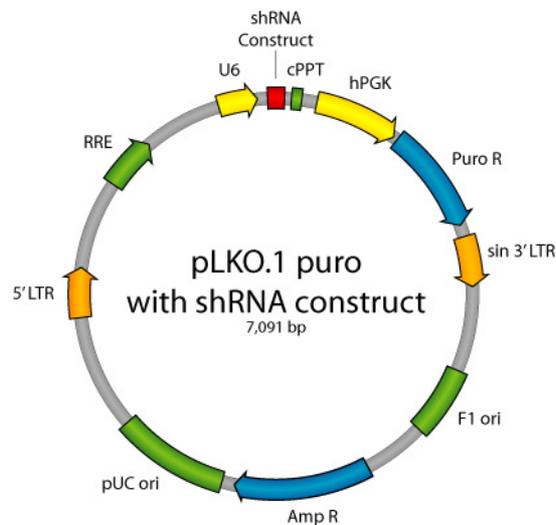


Abbildung 12: Schematische Darstellung des verwendeten pLKO.1 Vektors

Der pLKO.1-Vektor enthält eine Resistenz gegenüber Ampicillin zur kulturellen Anzucht des Vektors in Bakterien. Zudem enthält er eine Puromycin-Resistenz zur kulturellen Selektion der transduzierten Zelle. Durch den SV40 Replikationsursprung (origin of replication) wird eine hohe Vektorproduktion in HEK293T Zellen erreicht. In der Zielzelle wird die Expression über den humanen Phosphoglyceratkinase-Promotor reguliert. U6 markiert einen humanen Promotor für RNA Polymerase III. Abbildung modifiziert nach Addgene.^{90,91}

Für die Transduktion wurden 1×10^6 MEC-1 Zellen in 1 ml IMDM aufgenommen und in eine 6-well-Platte gegeben. Das Virusfiltrat wurde mit Polybrene $8 \mu\text{g/ml}$ versetzt und auf die Zellsuspension gegeben. Im Anschluss wurden die Zellen zentrifugiert (700 g , 60 min , 37°C) und für 6 h im Inkubator stengelassen. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (300 g , 5 min , RT) wurde der Überstand vorsichtig entfernt und frisches Zellmedium hinzugegeben. Die Transduktion wurde am Folgetag einmal wiederholt. Nach 36 h erfolgte die Hinzugabe von Puromycin in einer Konzentration von 2 mg/ml . Die Zellen wurden im weiteren Verlauf nur noch in puromycinhaltigem Medium kultiviert.

2.2.4. Humane CLL Zellen

2.2.4.1. Ethik

Der Ethikantrag zu dieser wissenschaftlichen Arbeit ist unter der Referenznummer 574/2011 B02 zu finden. Dem Ethikantrag wurde die Genehmigung der Ethikkommission Tübingen erteilt.

2.2.4.2. Fallzahlkalkulation

Es wird von einem hohen Unterschied in der NFAT2-Expression ausgegangen (hohe Effektstärke). Demnach gelten folgende Annahmen:

- Das Risiko, bei tatsächlich fehlendem Unterschied in der NFAT2-Expression diesen fälschlicherweise zu behaupten (α -Fehler), beträgt 5%.
- Die Erfolgsrate, einen tatsächlich vorliegenden Unterschied zu zeigen, beträgt 80% (Power, $1-\beta$ -Fehler).
- Der Unterschied zwischen den CLL-Kohorten soll mindestens 1 Standardabweichung betragen (Effektstärke $d=1$)

Die benötigte Fallzahl wurde somit auf 14 Patienten pro Gruppe berechnet. Es erfolgte eine statistische Beratung durch das Institut für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie der Universität Tübingen.

2.2.4.3. Proben- und Patientenrekrutierung

Die Patienten wurden aus den ambulanten und stationären Fällen der Medizinischen Klinik II in Tübingen rekrutiert. Nach ausführlicher Aufklärung und schriftlichem Einverständnis erfolgte die Blutentnahme von drei bis vier NH_4 -Heparin-Röhrchen. Gesunde Kontrollen wurden aus Buffy Coats der Transfusionsmedizin Tübingen gewonnen.

2.2.5. Isolation mononukleärer Zellen des peripheren Bluts (PBMC) aus Patientenproben und Buffy Coats

Aus den Buffy Coats wurde in einer 75 cm² Zellkulturflasche mit PBS eine Zellsuspension mit einem Gesamtvolumen von 125 ml hergestellt. Die Patientenproben wurden unverdünnt der Dichtegradientenzentrifugation hinzugeführt. Auf 15 ml Ficoll wurden bis zu 30 ml Blut unter Benutzung der Slow Flow-Funktion der Pipette geschichtet. Danach erfolgte die Auftrennung bei 2000 rpm in der Zentrifuge ohne Bremse für 20 min bei RT. Zwischen Ficoll und Blutplasma bildete sich nach erfolgreicher Zentrifugation eine weiße, PBMC-haltige Interphase. Diese wurde vorsichtig, aber zügig mit Pipettierhilfe abgenommen. Im Anschluss erfolgten drei Waschzyklen mit jeweils 50 ml PBS:

1. 1600 rpm, 5 min, RT
2. 1400 rpm, 5 min, RT
3. 1200 rpm, 5 min, RT

Der Überstand wurde jeweils verworfen. Die Zellzählung erfolgte nach dem zweiten Waschzyklus (s. Kapitel 2.2.2.2).

2.2.6. MACS-Technologie

Die MACS-Technologie behilft sich mit magnetischen MicroBeads, die an Antikörper gekoppelt sind, um bestimmte Zellpopulationen aus einem heterogenen Zellgemisch zu isolieren. Grundsätzlich können zwei unterschiedliche Verfahren der Zellselektion unterschieden werden. Bei der positiven Selektion werden die Zielzellen mit MicroBeads- Antikörpern markiert und in der Säule zurückgehalten, während die restlichen, ungewollten Zellen ausgewaschen werden. Bei der negativen Selektion hingegen werden die ungewollten Zellen magnetisch markiert und der Durchfluss mit den unmarkierten Zielzellen weiterverwendet. Vorteil der negativen Selektion ist die fehlende Zellstimulation durch Bindung der Antikörper an der Zelloberfläche. Die Isolation der CLL-Zellen erfolgte aus den aufgearbeiteten PBMCs (siehe Kapitel 2.2.3.3). Zur Gewinnung angereicherter B-CLL-Zellen wurde MACS Miltenyi Biotec B-

CLL Cell Isolation Kit human - leicht abgewandelt nach Herstellangaben - verwendet. Zunächst wird die Zellzahl berechnet; in der Regel wurden 1×10^8 Zellen benutzt. Der Anteil an CLL Zellen wurde zuvor mittels FACS/Differentialblutbild bestimmt. Der Anteil an Lymphozyten in den einzelnen Patientenproben lag immer bei >50 %. Die Menge an Antikörpern wurde nach der Gesamtzellzahl und dem Anteil an CLL-Zellen bestimmt. Aus Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass bei Anwendung des Protokolls nach Herstellerangaben eine deutlich zu geringere Ausbeute nach der Isolation erreicht wurde (*Abbildung 13*). Das Protokoll wurde entsprechend angepasst (*Tabelle 5*).

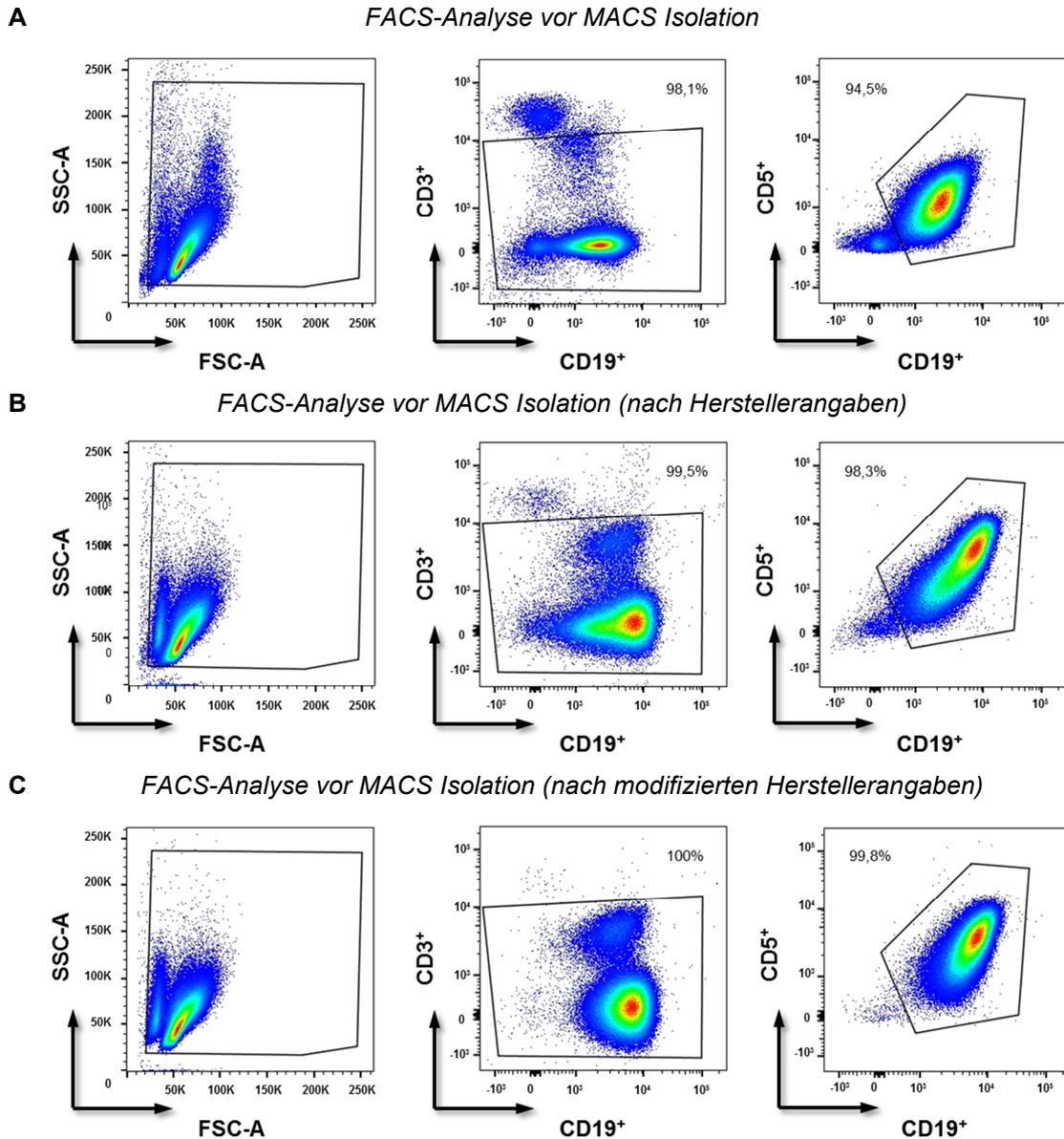


Abbildung 13: Optimierung der MACS Beads-Technologie

FACS-Analyse eines CLL-Patienten (Nr. 44). Es erfolgte zunächst das Gating auf die Lymphozyten (SSC-A/FSC-A) und darauf auf die Einzelzellen (nicht gezeigt). T-Zellen wurden mittels Anti-CD3- und Anti-CD19-Antikörpern von B-Zellen abgegrenzt. Die Identifikation der CLL-Zellen konnte über Anti-CD5 und Anti-CD19 erreicht werden. **A** FACS-Analyse vor CLL-Zell-Isolation. Ca. 92% der PBMC sind CLL-Zellen. **B** FACS-Analyse nach Isolation mit der MACS Beads-Technologie (Herstellerangaben, Negativisolation). Beim Einsatz von 1×10^8 Zellen lag die Ausbeute bei lediglich 2×10^7 CLL-Zellen, die Reinheit lag bei 97%. **C** FACS-Analyse nach Isolation mit der MACS Beads-Technologie (modifizierte Herstellerangaben, Negativisolation). Beim Einsatz von 1×10^8 konnte eine Ausbeute von 6×10^7 CLL Zellen erreicht werden, die Reinheit lag verbessert bei 99%.

Anteil der CD19 ⁺ /CD5 ⁺ -Zellen in der Immunphänotypisierung (%)	B-CLL Biotin-Antikörper-Cocktail (μ l)	Anti-Biotin-MicroBeads (μ l)
>90	25	50
75-90	33	66
50-90	50	100
<50	100	200

Tabelle 5: Modifikation des MACS beads Isolationskits

Angaben der Antikörper Menge für 1×10^8 PBMCs

Die Isolation gesunder B-Zellen erfolgte aus PBMC, welche aus Buffy Coats hergestellt wurden. Die Negativisolation gesunder B-Zellen erfolgte mit dem MACS Miltenyi Biotec B Cell Isolation Kit II human nach Herstellerangaben.

2.2.7. Durchflusszytometrie/Immunphänotypisierung (FACS)

Die verwendeten Zellen wurden, wie in Kapitel 2.2.3.5.1 beschrieben, präpariert und mit dem FACS Canto II analysiert. Die Daten wurden anschließend mit der FlowJo 8.5.3 Software analysiert.

Zur Färbung wurden ca. $0,5 - 1 \times 10^6$ Zellen in 50 μ l MACS-Puffer verwendet. Der Antikörpermix wurde nach Pipettierschema zugegeben und die Zellen 30-60 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen mit MACS-Puffer gewaschen (300 g, 5 min, 4°C) und in MACS-Puffer zur FACS-Analyse aufgenommen.

CLL Panel

1. AK	[μ l]
CD19	0,5
CD38	0,5
CD5	1
CD3	0,5

2.2.8. Zytospin und Immunfluoreszenz

Von den PBMCs/Zelllinien wurden mittels der *Shandon Cytospin 3 Cyto centrifuge* Zytospins angefertigt. Dazu wurden 2×10^6 Zellen in 500 μ l PBS aufgenommen und 100 μ l auf die Zytospinapparatur gegeben. Danach wurden die Zellen bei 800 rpm für 2 min auf die Slides zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen in Aceton für 3 min und ein Einfrieren bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung.

Im ersten Schritt wurden die Zytospins aufgetaut und getrocknet. Danach wurden die Zellen mit einem Fettstift umrandet und kurz in PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 0,2% Triton X über 8 min permeabilisiert und darauf einmal mit PBS gewaschen. Des Weiteren wurden 100 μ l 5% BSA/PBS pro Zytospin auf die Zellen pipettiert und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Blockierlösung wurde abgekippt und der Primärantikörper in 1% BSA/PBS verdünnt und je 100 μ l pro Zytospin zugeben. Als Negativkontrolle dienten 100 μ l 1% BSA/PBS ohne Antikörper. Es erfolgte die Inkubation bei 4°C über Nacht in der feuchten Kammer. Am Folgetag wurde das Slide 2 x 10 min und 1 x 5 min in PBS gewaschen. Der Kern wurde mit DAPI in 1% BSA/PBS gegengefärbt und mit dem jeweiligen Sekundärantikörper für 1 h lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgten zwei Waschschriffe über 10 min mit PBS und ein Waschschriff mit Aqua bidest lichtgeschützt. Danach trockneten die Slides unter dem Abzug, bevor sie mit auf 55°C erwärmter Kaisergelatine eingebettet wurden. Die mikroskopische Auswertung erfolgte am Apoptome[®].

Von den Patientenproben wurden repräsentative Aufnahmen gemacht und der Anteil an nukleärem und zytoplasmatischem NFAT2 wurde visuell und semi-quantitativ ausgewertet.

Primärantikörper

NFAT2 (m, mouse) 1:100
CD19 (m, rabbit) 1:100

Sekundärantikörper

goat-anti-mouse-Cy3 (rot) 1:200
Anti-rabbit-Alexis488 (grün) 1:500
DAPI 1:5000

2.2.9. RNA-Isolation und cDNA-Synthese

2.2.9.1. Zellkultur und PBMC

Die RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Kits (Qiagen) isoliert. Dafür wurden pelletierte Zellen verwendet, die in 600 µl RLT-Puffer mit β-Mercaptoethanol lysiert wurden. Die RNA-Isolation erfolgte nach Herstellerprotokoll. Am Ende wurde die RNA in 30 µl RNase- & DNase-freiem Wasser eluiert. Der RNA-Gehalt und die Reinheit wurden mit dem NanoDrop bestimmt. Um mögliche Reste der genomischen DNA zu eliminieren, wurde im Anschluss ein DNase-Verdau durchgeführt. Dafür wurde die RNA (max. 8 µl) nach Pipettierschema 15 min bei Raumtemperatur verdaut. Die DNase wurde schließlich durch Zugabe von 25 mM EDTA bei 65°C für 10 min inaktiviert.

Im Anschluss wurde die cDNA-Synthese durchgeführt. Hierfür wurden 10 µl der DNase-verdauten RNA eingesetzt und der Mastermix nach Pipettierschema zugegeben. Die cDNA wurde bei 42°C für 50 min synthetisiert. Am Ende wurde die Reaktion bei 70°C für 15 min inhibiert und die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

<u>DNase-Verdau</u>		<u>cDNA Synthese</u>	
RNA	1 µg	RNA	10 µl
RNase-freies H ₂ O	< 8 µl	5x Puffer	4 µl
10x Puffer	1 µl	DTT	2 µl
DNase	1 µl	Oligo(dt) ₂₃	1 µl
EDTA (25 mM)	1 µl	dNTPs (10mM)	1 µl
		RNase Out	1 µl
		Superscript II	1 µl

2.2.9.2. Paraffinfixiertes Material

In Zusammenarbeit mit der Pathologie Tübingen wurden die Proben (Knochenmark und Lymphknoten) ausgewählt. Die Gewinnung der RNA erfolgte mit Hilfe des Pure

Link FFPE total RNA Isolation Kit. Die Isolation der RNA erfolgte durch die Kollegen der Pathologie Tübingen (Frau. Prof. Quintanilla de Fend) und wurde zur weiteren Verarbeitung bereitgestellt. Es erfolgte eine Quantitäts- und Qualitätsüberprüfung mittels NanoDrop.

Die Synthese der cDNA erfolgte mit dem qScript™ XLT cDNA SuperMix analog zur Herstellerempfehlung. Hierfür wurden 1 µg RNA und der Mastermix nach unten stehendem Pipettierschema vermischt. Die cDNA wurde bei 42°C über 60 min synthetisiert und danach wurden bei 85°C für 5 min die Enzyme denaturiert. Bei geringem Ausgangsmaterial erfolgte zunächst ein Amplifikationsschritt der cDNA mit dem PerfeCTa® PreAmp SuperMix Kit. Hierzu wurden 2 µl cDNA mit den qRT-PCR Primern in dem unten genannten Mastermix vermischt und es wurde im Thermocycler mit dem unten stehenden PCR-Programm die cDNA amplifiziert.

Danach erfolgte die qRT-PCR (Kapitel 2.2.10). Da mRNA aus Paraffinblöcken meistens hyperfragmentiert ist, wurden Primer mit einer Produktlänge von unter 100 bp für die qRT-PCR genutzt. Zudem sind diese Primer exonüberspannend hergestellt worden, so dass ein DNase-Verdau nicht notwendig war.

<u>cDNA Synthese</u>		<u>PreAmplifikation</u>	
RNA	1 µg	Perfecta PreAmp SuperMix (5X)	10 µl
qScript XLT Supermix (5X)	4 µl	Assay Primer Pool (0,5 µM)	5 µl
RNase-freies Wasser	< 16 µl	cDNA	2 µl
<hr/>		RNase-freies Wasser	33 µl
Gesamtvolumen	20 µl	Gesamtvolumen	50 µl

<u>PCR Programm</u>			
Denaturierung	95°C	2 min	
Amplifikation	95°C	15 sec	10 Zyklen
	60°C	3 min	
Kühlen	40°C	30 sec	

2.2.10. Quantitative RT-PCR

Zur Bestimmung der Genexpression wurde eine qRT-PCR durchgeführt. Hierfür wurde der Roche Light Cycler 480 mit 96-well Platten verwendet. Die cDNA wurde mit RNase-freiem Wasser nach Pipettierschema verdünnt und in die 96-well-Platte vorgelegt. Der SYBR® Select Master Mix wurde ebenfalls nach Schema mit den verwendeten Primern versetzt und zu der vorgelegten cDNA pipettiert. Die Platte wurde mit einer selbstklebenden Folie verschlossen und die Proben wurden bei 300 g für 1 min zentrifugiert. Die Messung der Proben erfolgte nach dem angegebenen PCR-Programm und wurde anschließend mit der Lightcycler Software (Roche) analysiert. Zur genauen Evaluation des NFAT2-KO in den MEC-Zellen wurden exonüberspannende Primer entworfen. Die einzelnen Sequenzen sind dem Kapitel 2.1.7 Primer zu entnehmen.

<u>cDNA Ansatz</u>		<u>SYBR® Green Ansatz</u>	
cDNA	1 µl	Mastermix	10 µl
RNase-freies H ₂ O	8 µl	Primer fw/rv	1 µl
Ges. pro Well	9 µl	Ges. pro Well	11 µl

PCR Programm

UDG Aktivierung	50°C	2 min	
TaqAktivierung	95°C	2 min	
Amplifikation	95°C	15 sec	40 Zyklen
	60°C	1 min	
Schmelzkurve	60-95°C	15 sec	
Kühlen	40°C	30 sec	

2.2.11. Proteinisolation und Proteinbestimmung nach Bradford

Als Ausgangsmaterial für die Proteinisolation wurden pelletierte Zellen verwendet. Es wurde entweder das komplette Protein aus den Zellen isoliert, oder eine Fraktionierung in nukleäre und zytoplasmatische Proteine durchgeführt.

Zur Gewinnung des kompletten Proteinlysats wurden 1×10^7 Zellen in 100 μl Ripa-Puffer aufgenommen. Vor Gebrauch des RIPA-Puffers wurde dieser mit je 1 μl Protease/Phosphatase-Inhibitor-Cocktail auf 100 μl Puffer versetzt. Die Zellen wurden für 20 min auf Eis und anschließend weitere 30 min bei 4°C unter Schütteln lysiert. Abschließend wurden die restlichen zellulären Bestandteile bei 800 g für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand enthielt das Proteinlysate, welches anschließend bei -80°C eingefroren wurde.

Bei der separaten Isolation der Kern-Zytoplasma-Proteine wurde das NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit verwendet. Die Isolation erfolgte nach leicht modifizierten Herstellerangaben (vgl. unten stehende Tabelle). Es erfolgte die Zellyse in CER I-Puffer und die Inkubation auf Eis für 10 min, danach wurde Puffer CER II hinzugegeben und die Zellen für 1 min weiter lysiert. Mittels Zentrifugation (13.000 rpm, 5 min, 4°C) wurde die Kernfraktion vom zytoplasmatischen Teil getrennt. Nach Abnahme der Zytoplasmafraktion erfolgte ein kurzer Waschschriff mit CER I-Puffer und danach die Lyse in CER II-Puffer für 40 min unter intermittierendem Vortexen. Der Debris wurde von der Kernfraktion mittels Zentrifugation separiert (13.000 rpm, 10 min, 4°C). Die Proteinproben wurden ebenfalls bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Zellen	CER I (μL)	CER II (μL)	NER (μL)
2×10^7	100	5,5	50

Extraktionspuffer für Kern-Zytoplasma-Proteinisolation

Die Proteinbestimmung erfolgte jeweils direkt vor der weiteren Verarbeitung (z.B. Western Blot). Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Methode nach Bradford unter Zuhilfenahme der Roti®-Nanoquant-Lösung angewendet. Die Konzentrationsbestimmung wurde in einer 96-well-Flachbodenplatte durchgeführt und pro Well 49 μl ddH₂O vorgelegt. Die Proteinlysate wurden 1:10 mit RIPA/CER I-Puffer vorverdünnt und es wurde je 1 μl der verdünnten Proteinlösung und der Eichgeraden pro Well hinzugegeben. Zur Herstellung der Roti®-Nanoquant Arbeitslösung wurde eine 1:5 Verdünnung in ddH₂O angefertigt. Pro Well wurden 200 μl Roti®-Nanoquant-Arbeitslösung zugegeben und die Reaktion wurde für 5 min bei Raumtemperatur

inkubiert. Anschließend wurde die Farbreaktion mit dem ELISA-Reader bei 590 nm und 450 nm detektiert und der Quotient 590/450 zur Bestimmung der Proteinkonzentration verwendet.

Eichgerade (Konzentration)

0 mg/ml	1 mg/ml
0,0625 mg/ml	2 mg/ml
0,125 mg/ml	3 mg/ml
0,25 mg/ml	4 mg/ml
0,5 mg/ml	

2.2.12. SDS-Page und Western Blot

Das Trenngel wurde nach unten stehenden Angaben gegossen und zum Polymerisieren stehen gelassen. Danach erfolgten das Gießen des Sammelgels und das Einsetzen eines Probenkamms (Taschenkapazität 25 µl).

Reagenzien	Trenngel 8%	Sammelgel 4,5%
H ₂ O	3587,5	1462,5 ul
Trenngelpuffer (1,5M Tris/HCl, pH 8,8)	1875 ul	-
Sammelgelpuffer (0,5M Tris/HCl, pH 6,8)	-	625 ul
10% SDS	75 ul	75 ul
Rotiphorese (30% Acrylamid + 0,8% Bisacrylamid)	2000 ul	375 ul
10% APS	75 ul	25 ul
TEMED	4,5 ul	2,5 ul

Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurde, entsprechend der nachfolgenden Tabelle, das benötigte Volumen berechnet und auf 20 µl mit RIPA-Buffer aufgefüllt.

Isolat	Proteinmenge in µg
Komplett	50
Zytoplasmatisch	50
Nucleär	25

Danach erfolgte das Zusetzen von 4 µl 6x Lamli-Ladepuffer und das Kochen bei 95°C für 10 min. Die Western Blot-Kammer wurde aufgebaut und mit 1x SDS Elektrophoresepuffer gefüllt. Das Proteinkonzentrat wurde in die Geltaschen geladen. Zusätzlich wurden 10 µl des Licor Protein Molecular Weight Marker (10-250 kDa) und eine normierte Jurkatproteinlösung (100 µg) auf jedes Gel geladen.

Laufzeiten Einlauf ins Trenngel: ca. 1 Std., 75 V, 100 mA
 Gellauf: ca. 1 Std., 150 V, 100 mA

- **6x-Lämmli-Ladepuffer:**

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	7 ml
Glycerol	3 ml
SDS	1 g
Bromphenolblau	2 mg
β-Mercaptoethanol	600 µl

- **10x SDS-Elektrophoresen-Laufpuffer:** für 1 Liter

250 mM Tris	28,0 g
1,92 M Glycin	143,0 g
2 % SDS	20,0 g

- **Transferpuffer:** für 1 Liter

12,5 mM Tris	1,51 g
195 mM Glycin	14,64 g
0,01 % SDS	100 mg
10 % Methanol	100 ml

Das Blotting der 8% SDS-Page erfolgte auf eine Nitrozellulosemembran. Diese wurde dazu kurz in Transferpuffer gelegt. Der Aufbau der Blotkammer erfolgte nach diesem Schema:

1. 3 Whatman-Papiere in Transferpuffer getränkt
2. Gel
3. Nitrozellulose Membran
4. 3 Whatman-Papiere
5. Luftblasen wurden mit einer Pasteurpipette vorsichtig durch Rollen über die Whatman-Papiere entfernt
6. Blotten: 1 Std., bei 1 Membran 150 mA; bei 2 Membranen 250 mA, 100 V

Um Restbestände der Blotting-Lösung zu entfernen, wurde nach dem Übertragen der Proteine die Membran für 1 min mit PBS unter Schütteln gewaschen. Danach erfolgte das Blockieren mit 25 ml Odyssey™ Blocking Puffer 1:2 in PBS verdünnt und mit 0,01% NaN₃ versetzt. Nach mindestens 1 h Inkubation wurden der Blocking Puffer entfernt, 25 ml der Primärantikörper-Lösung zugegeben und über Nacht unter leichtem Schütteln im Kühlraum inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Entfernung der Primärantikörper-Lösung und die Membran wurde viermal für 5 min unter Schütteln mit

PBS-T gewaschen. Danach konnte die Sekundärantikörperlösung zugegeben werden und es folgte eine Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur. Abschließend erfolgten ein erneutes Waschen der Membran (viermal für 5 min) mit PBS-T und anschließend das Trocknen bei 50°C im Wärmeschrank. Nach dem Trocknen wurde die Membran mit dem ODYSSEY® Imaging System analysiert.

Primärantikörper-Lösung

Odyssey™ Blocking Puffer	12,5 ml
PBS	12,5 ml
0,2% Tween-20	50 µl
0,01% NaN ₃ (1%)	250 µl

Sekundärantikörper-Lösung

Odyssey™ Blocking Puffer	12,5 ml
PBS	12,5 ml
0,2% Tween-20	50 µl
0,02% SDS (10%)	50 µl
0,01% NaN ₃ (1%)	250 µl

Zusammensetzung der Antikörperlösungen

<u>Primär-Antikörper</u>	<u>Verdünnung</u>
NFAT2 (m-mouse)	1:2000
β-Aktin (m-rabbit)	1:2000
GAPDH (m-mouse)	1:1000
TATA-Box (m-rabbit)	1:1000

Verdünnung der Primärantikörper

<u>Sekundär-Antikörper</u>	<u>Verdünnung</u>
α-mouse 800CW	1:20000
α-rabbit 680	1:50000

Verdünnung der Sekundärantikörper

3. Ergebnisse

3.1. Teil I: NFAT2 in den CLL-Zelllinien MEC-1 und JVM-3

3.1.1. NFAT2-Expression in JVM-3 und MEC-1

Um die Rolle des Transkriptionsfaktors NFAT2 in CLL-Zelllinien zu untersuchen, wurde zunächst evaluiert, ob die verwendeten Zelllinien JVM-3 und MEC-1 eine relevante *NFAT2*-Expression auf RNA- oder Proteinebene zeigten. Die mRNA-Expression in MEC-1 war gegenüber der T-Zelllinie Jurkat um etwa den Faktor 3,5 reduziert. Bei Betrachtung der beiden CLL-Zelllinien konnte eine deutlich geringere *NFAT2*-mRNA-Expression in den JVM-3 Zellen verglichen mit der MEC-1 Zelllinie detektiert werden (Abbildung 14A). Im Gegensatz dazu stellte sich der *NFAT2*-Proteingehalt in den Zelllinien etwas anders dar. Jurkat und MEC-1 hatten etwa den gleichen Anteil an *NFAT2*-Protein, während JVM-3 weiterhin die geringste *NFAT2*-Expression zeigte (Abbildung 14B). Bei einer Größe von 50 kDa konnte zudem eine unspezifische Bande des *NFAT2*-Antikörpers (Klon 7A6) detektiert werden. Diese Analysen verdeutlichen, dass *NFAT2* in den CLL-Zelllinien exprimiert wird und insbesondere in MEC-1 relevante *NFAT2*-Proteinmengen zu finden sind.

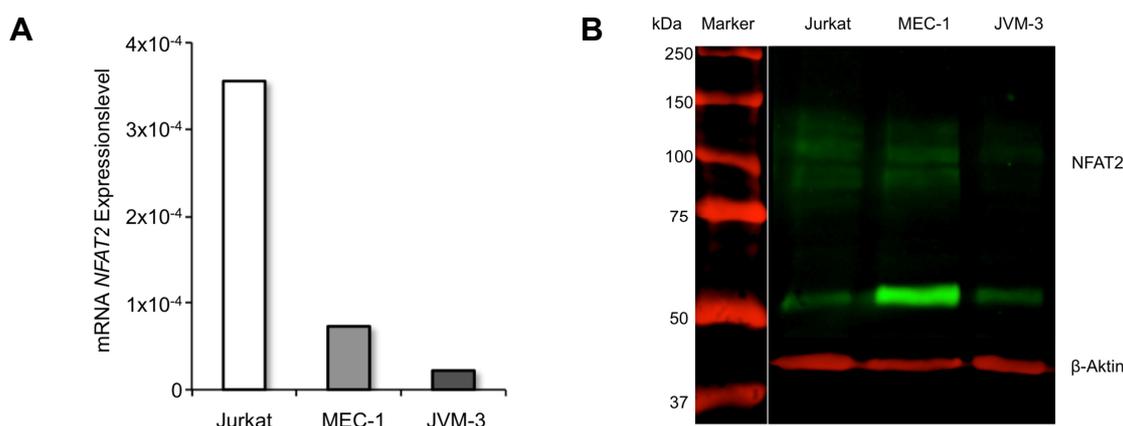


Abbildung 14: NFAT2 Expression in den Zelllinien MEC-1 und JVM-3

Jurkat, *JVM-3* und *MEC-1* Zellen wurden für >72h kultiviert. **A** Nach der Extraktion der mRNA wurde eine qRT-PCR durchgeführt und als Referenzgen β -Aktin verwendet. Die dargestellten Daten sind Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten. **B** Für die SDS-Page wurden 100 μ g Proteinextrakt verwendet. Die Western Blot-Analyse wurde mit *NFAT2* (BD, 7A6) und β -Aktin (Cell Signaling, 13E5) als Ladekontrolle durchgeführt.

3.1.2. Induktion und Inhibition der nukleären Translokation von NFAT2

NFAT2 als Transkriptionsfaktor kann seine transkriptionelle Aktivität nur durch Translokation in den Zellkern ausüben. Eine nukleäre Translokation erfolgt in vivo durch Bindung eines Antigens an den T-Zellrezeptor und nachfolgender Kaskade mit Einstrom von Ca^{2+} . Ebenso ist für die Aktivierung des B-Zellrezeptors u.a. ein nachfolgender Ca^{2+} Einstrom mit nukleärer Translokation von NFAT beschrieben.⁹² Dies kann in vitro durch Behandlung der Zellen mit PMA und Ionomycin erreicht und beispielsweise mit Cyclosporin A blockiert werden.

Zum Nachweis einer erfolgreichen Inhibierung der nukleären Translokation erfolgte nach entsprechender Behandlung die Immunfluoreszenzfärbung zur Bestimmung der NFAT2-Lokalisation. Da, wie bereits im Kapitel 3.1.1 gezeigt wurde, Jurkat-Zellen die höchste NFAT2-Expression aufweisen, erfolgte die Durchführung der Experimente an dieser Zelllinie.

In Jurkat Zellen konnte mittels PMA/Ionomycin-Behandlung über 6 h eine Translokation des Transkriptionsfaktors NFAT2 in den Zellkern beobachtet werden (*Abbildung 15A&C*). Dies konnte mit zwei Antikörpern der Firmen Santa Cruz Biotechnology und Alexis (jeweils der Klon 7A6) bestätigt werden. Wenn Jurkat-Zellen 45 Minuten zuvor mit Cyclosporin A behandelt wurden, konnte trotz Zugabe von PMA/Ionomycin keine Translokation von NFAT2 in den Zellkern beobachtet werden (*Abbildung 15B&D*). Diese Ergebnisse bestätigen den bereits bekannten Mechanismus der calcineurinabhängigen Dephosphorylierung von NFAT2.

3 Ergebnisse

3.1 Teil I: NFAT2 in den CLL-Zelllinien MEC-1 und JVM-3

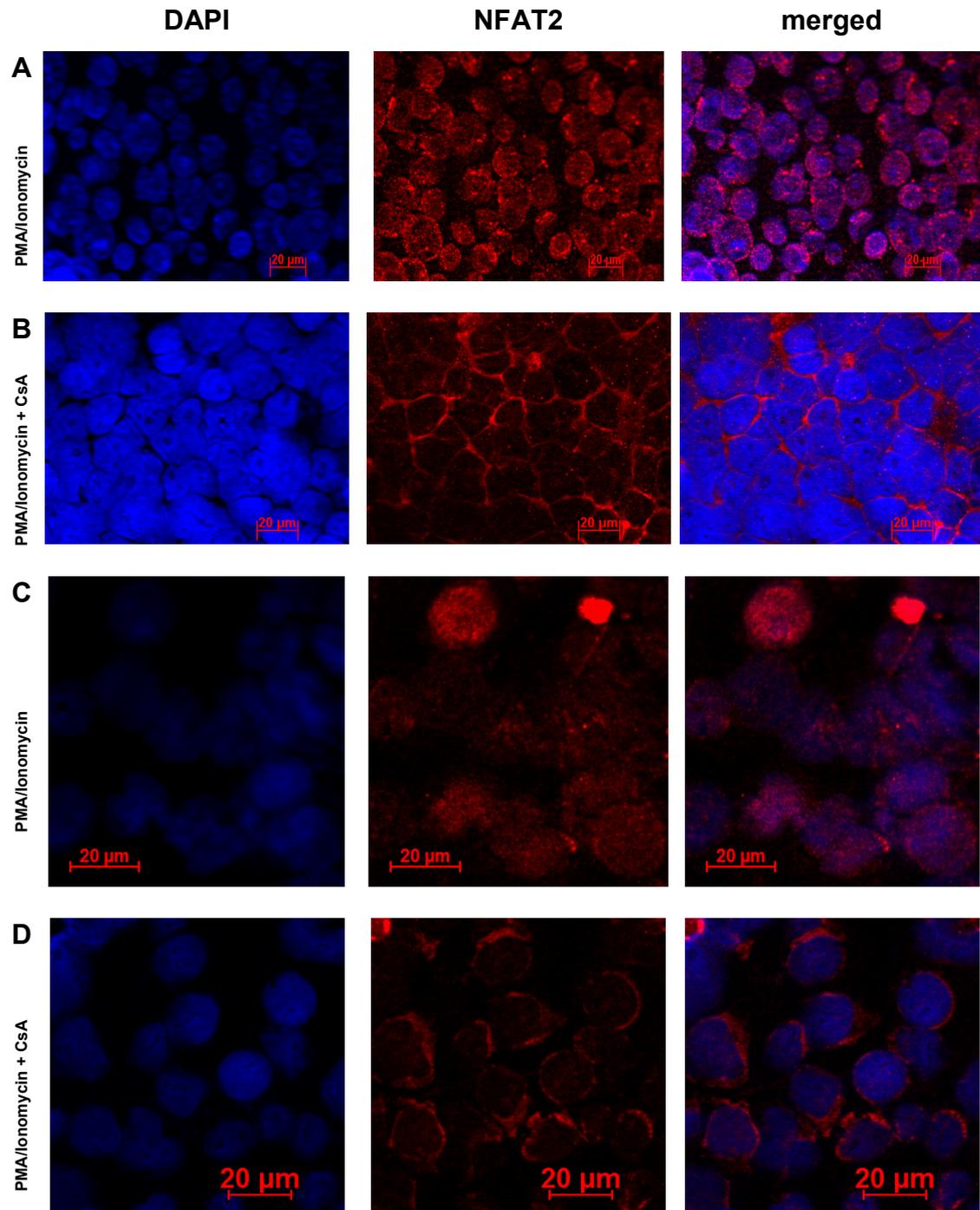


Abbildung 15: Induktion und Inhibition der nukleären Translokation von NFAT2

Immunfluoreszenz von Jurkat-Zellen für NFAT2 (rot) mit Anti-NFAT2 Alexis, 7A6 (A,B) oder Anti-NFAT2 Santa Cruz, 7A6 (C,D) und Kernfärbung mit DAPI (blau), Vergrößerung 400 x. A, C Behandlung mit PMA/Ionomycin (PMA 10 ng/ml; Ionomycin 1000 ng/ml) über 6 h B, D Behandlung 45 min vor Hinzugabe von PMA/Ionomycin mit Cyclosporin A (400 ng/ml).

3.1.3. Einfluss der Calcineurin-Inhibitoren (CsA, VIVIT und INCA-6) auf das Wachstum von MEC-1 Zellen

Um den Einfluss der NFAT-Familie auf das Überleben und die Proliferation zu untersuchen, wurden die CLL-Zelllinien mit verschiedenen Calcineurin-Inhibitoren *in vitro* behandelt und die Viabilität anhand des ATP-Gehalts bestimmt. Hierbei sind die NFAT-spezifischen Inhibitoren (VIVIT und INCA-6) von dem NFAT-unspezifischen Inhibitor Cyclosporin A abzugrenzen. Des Weiteren wurde untersucht, wie sich eine Inhibition der NFAT-Signalkaskade im Beisein von zytotoxischen Substanzen, in diesem Fall die metabolisch aktive Form von Ifosfamid (4-Hydroxyifosfamid), auf die Viabilität der CLL-Zelllinien auswirkt.

Ifosfamid gilt zwar nicht als klassischer Bestandteil einer Chemotherapie zur Behandlung einer CLL-Erkrankung, jedoch wird aus der Gruppe der Stickstoff-Lost-Verbindungen sehr häufig das Zytostatikum Cyclophosphamid verwendet. Als Salvage-Therapie wurde Ifosfamid in Kombinationstherapie bereits bei der CLL-Erkrankung in Phase-II-Studien getestet.⁹³

In *Abbildung 17* sind die Ergebnisse der Kombinationsbehandlung von MEC-1-Zellen mit CsA, VIVIT oder INCA-6 mit Ifosfamid nach 32 h bzw. 24 h dargestellt. Die Konzentrationen der einzelnen Substanzen wurden nach den bekannten Stoffkonzentrationen ausgewählt.⁹⁴ Im Falle von Cyclosporin A wurde jedoch eine deutlich höhere Konzentration gewählt, da in der zuvor durchgeführten Immunfluoreszenz für Stoffkonzentrationen um 5 μM eine bessere Inhibition der nukleären NFAT-Translokation gezeigt werden konnte. Die IC_{50} von Ifosfamid lag nach 32 h bei etwa 15 μM (*Abbildung 16A/B*). Ähnliche Ergebnisse konnten auch mit JVM-3 Zellen erreicht werden (Daten nicht gezeigt).

Im Bereich der Stoffkonzentrationen für die inhibitorische Wirkung für die nukleäre NFAT-Translokation fand sich für CsA kein Einfluss auf die Zytotoxizität (*Abbildung 16A*). Bei höheren Konzentrationen kam es jedoch zu einer deutlichen Zytotoxizität. Bei VIVIT ergab sich ein leichter Einfluss auf das Überleben der Zellen ohne Signifikanz (*Abbildung 16B*). Für INCA-6 fand sich hingegen ein deutlicher zytotoxischer Effekt (*Abbildung 16C*), welches am ehesten auf die zytotoxische

3 Ergebnisse

3.1 Teil I: NFAT2 in den CLL-Zelllinien MEC-1 und JVM-3

Wirkung der Substanz selbst und nicht auf die spezifische Hemmung der NFAT2-Translokation zurückzuführen ist.⁶⁷

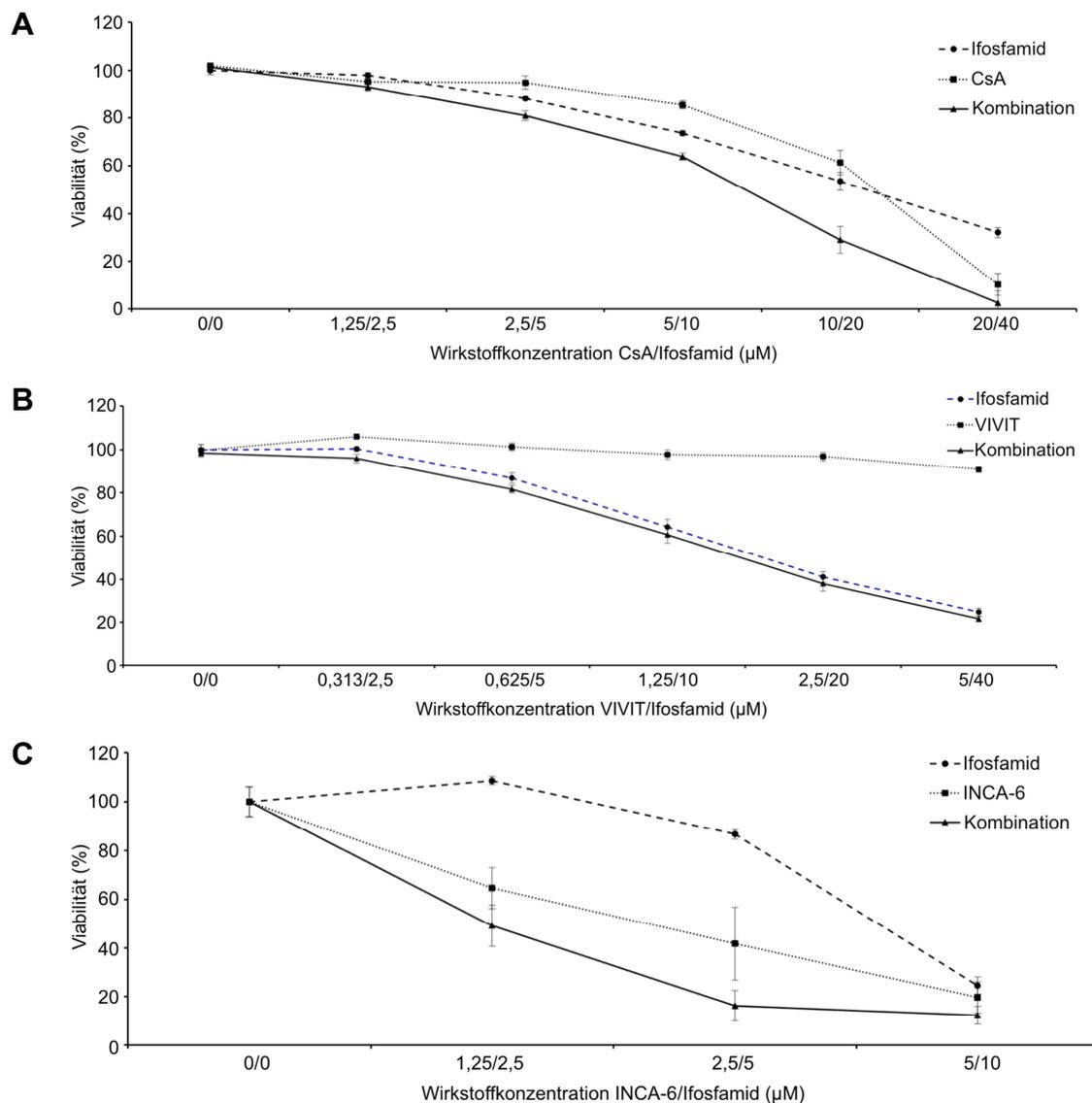


Abbildung 16: Effekt der NFAT2-Inhibition auf das Wachstum von MEC-1-Zellen

MEC-1-Zellen wurden mit verschiedenen Kombinationen der Inhibitoren und Ifosfamid für 32 h oder 24 h *in vitro* behandelt. Die Bestimmung der Zellviabilität erfolgt mit dem CellTiterGlow Assay und wurde auf unbehandelte Zellen (100% Viabilität) normalisiert. **A** Inkubation der MEC-1-Zelllinie mit dem Calcineurin-Inhibitor CsA in aufsteigender Konzentration (1,25 bis 20 μM) und Ifosfamid für 32 h. **B** MEC-1-Zellen mit dem NFAT-spezifischen Inhibitor VIVIT ($K_d = 0,5 \mu\text{M}$)⁹⁴ und Ifosfamid für 32 h. **C** MEC-1-Zellen mit dem NFAT-spezifischen Calcineurininhibitor INCA-6 ($IC_{50} = 0,8 \mu\text{M}$)⁹⁴ und Ifosfamid. Aufgrund der eigenständigen Zytotoxizität von INCA-6 erfolgte die Behandlung lediglich für 24 h.

Wenn man die Kombinationstherapie mit den einzelnen Calcineurin/NFAT-Inhibitoren und Ifosfamid vergleicht, so lassen sich unterschiedliche Ergebnisse ableiten. Cyclosporin A in Kombination mit Ifosfamid führt insbesondere in höheren Konzentrationen zu einer stärker ausgeprägten Zytotoxizität. Ebenso wird im Bereich der NFAT-Inhibition durch CsA (um 5 μ M) ein signifikanter Unterschied zur Monotherapie mit Ifosfamid erreicht (*Abbildung 16A*). Zur genaueren Einschätzung der Kombinationstherapie finden sich in *Abbildung 17* für die Kombinationstherapien die Fa-CI-Plots. Mit dieser grafischen Darstellung ist der Anteil der Zellen mit Effekt (Fa) gegen den Combinational Index (CI) dargestellt. Der Plot wurde auf Grundlage der vorhandenen Daten zur Kombination der Substanzen mit dem CI-Algorithmus von Chou T.C. et al. simuliert. Der Combinational Index (CI) definiert quantitativ einen Synergismus ($CI < 1$), additiven Effekt ($CI = 1$) und Antagonismus ($CI > 1$) zweier Substanzen in Kombination unabhängig vom Wirkmechanismus.⁸⁸

Im höheren zytotoxischen Bereich ($Fa > 0,5$) wirken die Substanzen Ifosfamid und Cyclosporin A synergistisch (*Abbildung 17A*). So liegt bei einer $Fa = 0,95$ der CI bei 0,72. Dies entspricht einem moderaten Synergismus (semi-quantitative Einteilung^{88,95}). Im Gegensatz dazu führt der spezifischere Inhibitor VIVIT zu keiner signifikanten Änderung der Zytotoxizität in der Kombination mit Ifosfamid. Im Fa-CI-Plot wird im niedrig zytotoxischen Bereich ($Fa < 0,5$) ein milder Synergismus erreicht, wohingegen im relevanten zytotoxischen Bereich ($Fa > 0,5$) eine antagonistische Wirkung der Substanzen vorliegt ($Fa = 0,95$ entspricht einer CI von 1,27; moderater Antagonismus) (*Abbildung 17B*). INCA-6 weist eine hohe eigenständige Zytotoxizität auf. In Kombination mit Ifosfamid wird diese Zytotoxizität weiter verstärkt. Jedoch wird auch hier im Bereich der relevanten Zytotoxizität ($Fa > 0,85$) ein antagonistischer Effekt erreicht ($Fa = 0,95$ entspricht einer CI von 2,89; Antagonismus). (*Abbildung 17C*)

3 Ergebnisse

3.1 Teil I: NFAT2 in den CLL-Zelllinien MEC-1 und JVM-3

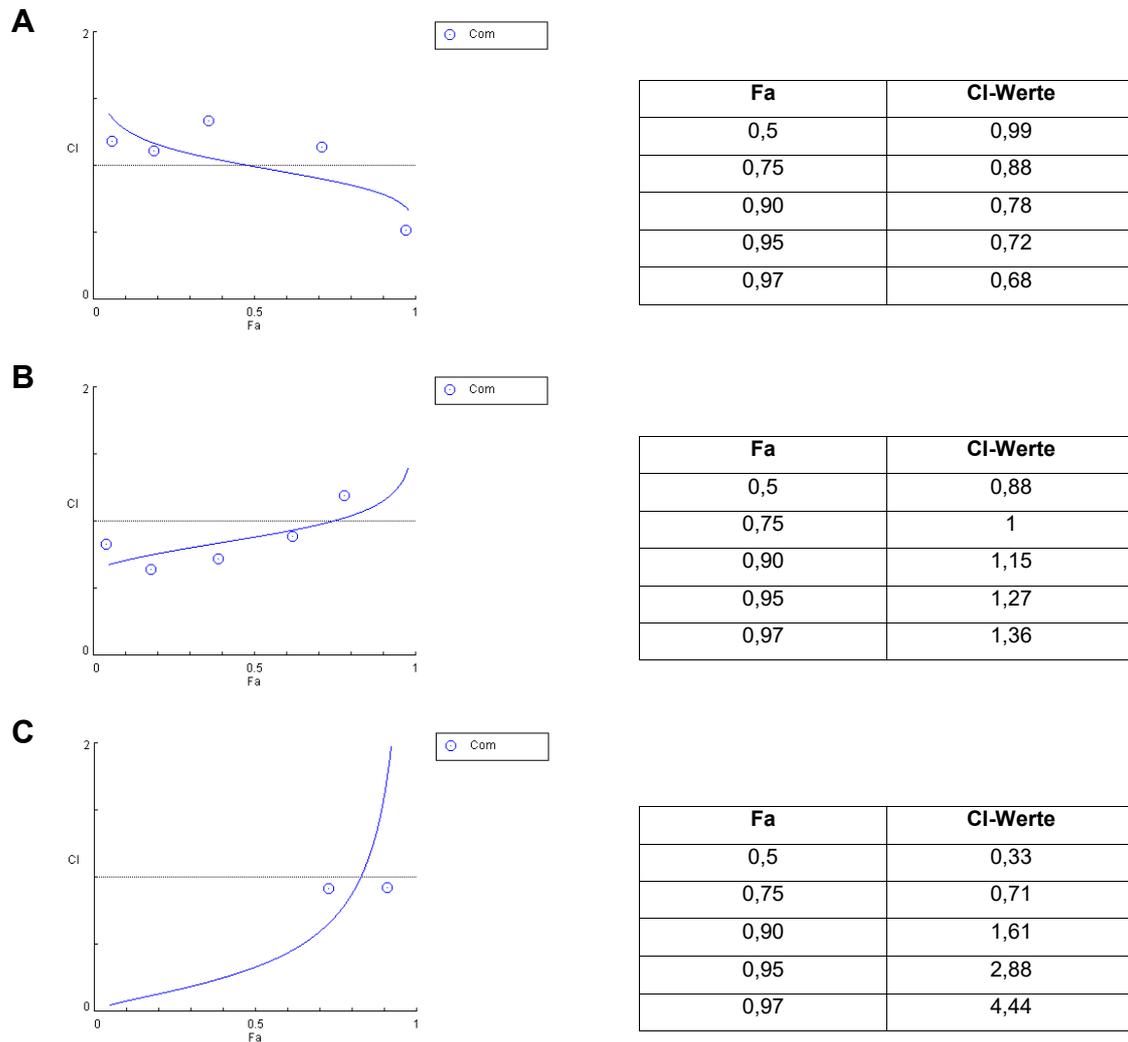


Abbildung 17: Fa-CI Plot

Combinational Index (CI) wurde mit der Software CompuSyn für jedes Experiment berechnet. Abgebildet sind berechneten Fa- (Anteil der Zellen mit Effekt) gegen die CI-Werte für **A** CsA und Ifosfamid, **B** VIVIT und Ifosfamid und **C** INCA-6 und Ifosfamid. (Com = Combo; Messpunkt) sowohl grafisch als auch tabellarisch.

3.1.4. NFAT2 shRNA-Knock-down in der MEC-1-Zelllinie

Da die Behandlung mit CsA durch die Inhibition von Calcineurin zusätzlich zu NFAT2 auch auf die übrigen NFAT-Familienmitglieder NFAT1, NFAT3 und NFAT4 sowie auf andere Calcineurin-Targets wirkt, wurde zur genaueren Charakterisierung von NFAT2 ein stabiler NFAT2-Knock-down in MEC-1-Zellen etabliert. Dies wurde mit Hilfe einer lentiviralen Übertragung von shRNA-Plasmiden durchgeführt. Die shRNAs wurden erfreulicherweise von Frau Prof. A. Rao, La Jolla institute of Allergy and Immunology, San Diego, USA, zur Verfügung gestellt.

Es wurden vier verschiedene NFAT2-spezifische shRNAs für den Knock-down verwendet, F10, B5, E5, C5 und ein Scrambled Kontrollplasmid. Die Effektivität der einzelnen shRNAs wurde nach der Transduktion mittels qRT-PCR und spezifischen exonüberspannenden Primern für NFAT2 überprüft. Der Vektor F10 konnte keine signifikante Änderung der *NFAT2*-Expression erreichen. Mit den beiden Vektoren E5 und C5 gelang sowohl auf mRNA-Expressionsebene (*Abbildung 18A*) als auch auf Proteinebene (*Abbildung 18B*) eine signifikante Reduktion aller drei *NFAT2*-Isoformen. Der Vektor B5 konnte die mRNA der mittleren und langen Isoformen von *NFAT2* inhibieren. Die Expression der kurzen Isoformen blieb in diesem Zusammenhang unbeeinflusst.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Effizienz der Transduktion mit längerer Kultivierung stabil blieb und sogar an Effizienz gewann. So lag nach fünf Tagen die Effizienz bei ca. 80% und nach 17 Tagen bereits bei 90-95% (*Abbildung 18C*).

Mit NFAT2-shRNA konnten nach Transduktion der MEC-1-Zellen zwei MEC-1-Zelllinien mit unterschiedlicher Expression der NFAT2-Isoformen generiert werden. MEC-1-E5 und -C5 besitzen kein NFAT2 mehr, da die mRNA aller Isoformen von der shRNA gebunden werden. Der Klon MEC-1-B5 hingegen besitzt lediglich die kurzen NFAT2-Isoformen. In *Abbildung 19* ist dies schematisch dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Teil I: NFAT2 in den CLL-Zelllinien MEC-1 und JVM-3

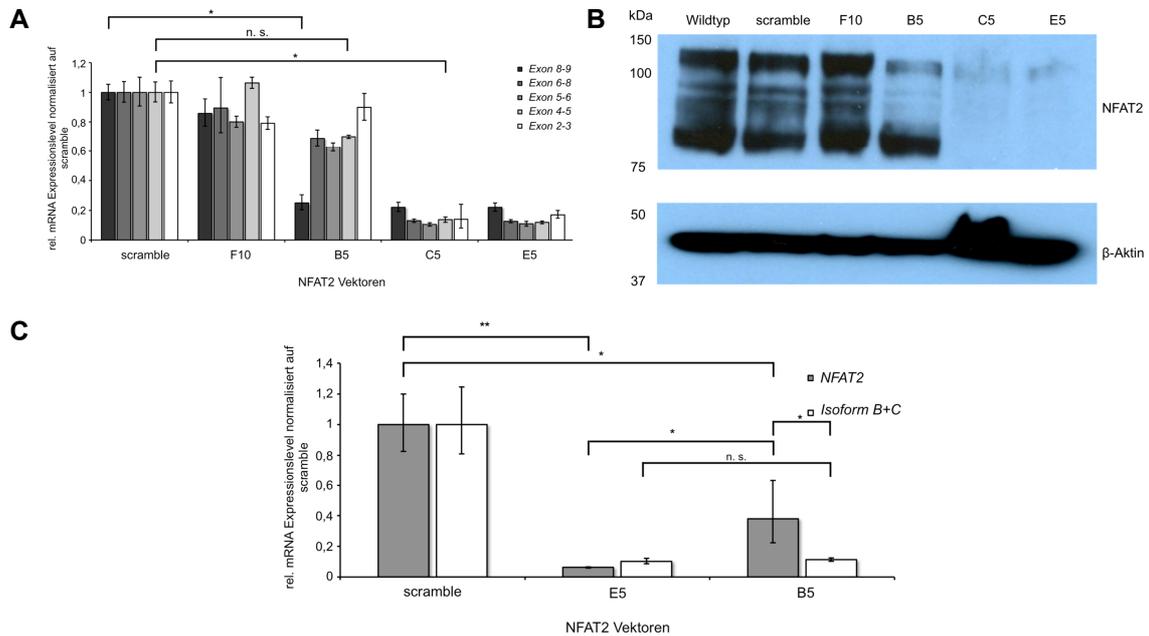


Abbildung 18: NFAT2 shRNA-Knock-down in MEC-1 Zellen

Nach Transduktion der MEC-1-Zellen wurde die NFAT2-mRNA und Proteinexpression analysiert. Bei **A** und **C** wurde mittels exonspezifischer Primer nach 5 Tagen (**A**) und nach 17 Tagen (**C**) eine qRT-PCR durchgeführt. GAPDH wurde als Kontrollgen verwendet und die NFAT2-Expression auf die Expression der Kontrollzellen (scramble) normalisiert. Statistische Auswertung mit Kruskal-Wallis Test, SD (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$). **B** Western Blot-Analyse der NFAT2-Expression (Klon 7A6, BD) nach 5 Tagen. Das β -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet.

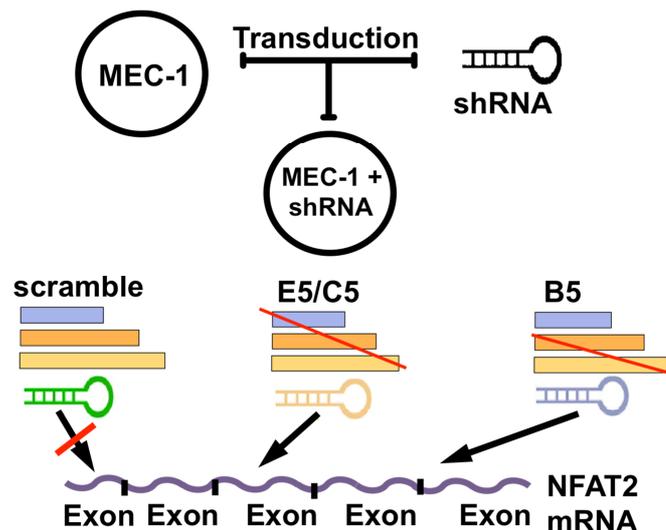


Abbildung 19: Schematische Darstellung des NFAT2-Knock-downs

Zellen mit Transduktion von Scramble shRNA exprimieren alle NFAT2-Isoformen (blau, orange und gelb). MEC-1-B5-Zellen hingegen besitzen lediglich die kurze (blauer Balken) - isoform. Bei Transduktion mit dem E5-Vektor findet sich kein NFAT2 mehr.

3.2. NFAT2 in primären humanen CLL-Zellen

Insgesamt wurden Proben von 37 verschiedenen Patienten im Zeitraum von März 2011 bis März 2015 akquiriert. Als Einschlusskriterien wurde lediglich ein Lymphozytenanteil von über 50% der peripheren mononukleären Zellen (PBMC) und Leukozyten von über 10000/ μ l Blut festgelegt. Die klinischen Daten der Patienten wurden für eine Korrelation bis April 2018 erhoben.

3.2.1. Klinische Daten der Patientenkohorte und Einteilung

Zur Korrelation der *NFAT2*-Expression mit klinischen Daten erfolgte die Erfassung des klinischen Verlaufs und weitere apparative und laborchemische Diagnostik bei den CLL-Patienten. In *Tabelle 6* sind die Charakteristika der Patienten einzeln dargelegt. Anhand dieser Parameter erfolgt unter Berücksichtigung der aktuell vorliegenden Daten (CLL-IPI Score) eine Einteilung der Patienten in zwei Gruppen. Die Kriterien sind in *Abbildung 20* gezeigt. Die Zugehörigkeit zu einer dieser Gruppen ist über das Erfüllen der entsprechenden Parameter definiert. Mit dieser Einteilung konnten eine Gruppe mit aggressiv verlaufender Erkrankung und eine zweite Gruppe mit indolent verlaufender Erkrankung ausgemacht werden. Dies spiegelt sich in den erhobenen Kaplan-Meier-Kurven für das progressionsfreie und das Gesamtüberleben wieder (vgl. *Abbildung 21*). Patienten, die keiner Kohorte zugeordnet werden konnten, bildeten eine dritte Gruppe.

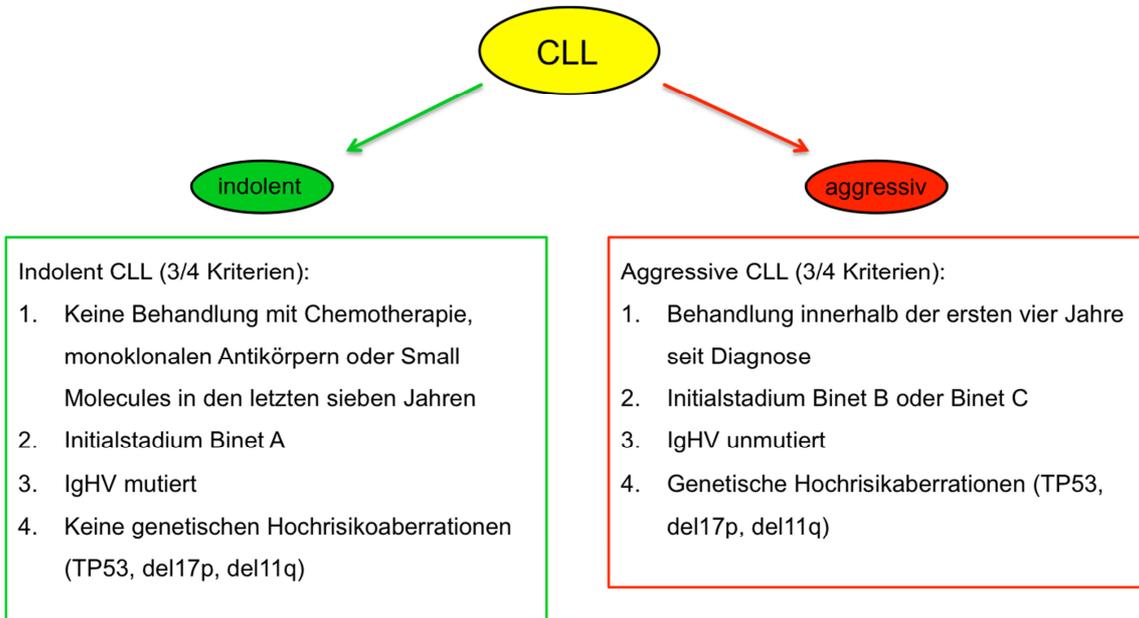


Abbildung 20: Einteilungskriterien

Das Erfüllen von drei der vier Kriterien definiert die Einteilung in eine Gruppe. Die Auswahl der Kriterien erfolgte auf Grundlage der vorliegenden Studien- und Prognosefaktoren der CLL-Erkrankung (vgl. CLL-IPI Score).³¹

3 Ergebnisse
 3.2 NFAT2 in primären humanen CLL-Zellen

CLL #	Alter (Jahre)	Initialstadium	beta-2-mikroglobulin (mg/l)	Immunphänotypisierung	Zyto-genetik	ED	IgHV	PFS (Zeitspanne von Diagnose bis zum first-line Behandlung (Monate))	PFS nach first-line Behandlung (Monate/ +/- forbestehend)	Therapien	Gesamtlieben (Monate/ +/- forbestehend)
1	68	Binet B	N/A	CD38+	del17, 43, XX, -13, -15, komplex aberrant	01/2012	unmutiert	17	17	1	30
2	75	Binet C	5.3	N/A	Keine TP53 Mutation	07/1997	N/A	1	48	2	236+
3	66	Binet A	N/A	N/A	del 11q	07/2005	unmutiert	20	6	7	87
5	76	Binet A	N/A	CD38 +	unauffällig für del 17, del 13q	12/2009	N/A	-	-	-	87+
6	70	Binet A	N/A	N/A	N/A	03/2010	N/A	-	-	-	84+
7	81	Binet A	N/A	N/A	folgt	1988	hypermutiert	6	180	3	288
8	76	Binet A	10.8	CD38+, ZAP70+	21% del11	1988	unmutiert	132	3	6	228+
9	70	Binet C	3.6	CD38-	keine TP53 mutation	1991	N/A	132	45	5	324+
12	70	Binet B	6.3	CD38+	N/A	01/2008	N/A	36	N/A	N/A	110+
16	73	Binet A	N/A	N/A	46, XY	08/2011	unmutiert	16	48+	1	67+
17	86	Binet B	N/A	N/A	N/A	1997	N/A	192	31	3	180
22	72	Binet A	1.8	N/A	Keine del17, keine del11	01/2007	hypermutiert	-	-	-	122+
23	70	Binet A	N/A	N/A	N/A	1999	N/A	84	8+	1	216+
26	51	Binet B	N/A	N/A	Trisomie 12	10/2010	N/A	-	-	-	77+
31	63	Binet A	N/A	CD38-	Karyotyp 46, XY, del 13q	04/2008	N/A	-	-	-	107+
32	69	Binet B	N/A	N/A	del 13	10/2001	unmutiert	132	60+	1	188+
36	72	Binet A	N/A	CD38-	Keine del17, keine del11	01/2007	hypermutiert	-	-	-	122+
39	68	Binet A	N/A	N/A	Deletion 17q	09/1988	hypermutiert	181	144	2	343+
40	72	Binet A	6.3	N/A	Unauffällig für del17, del13	03/2006	unmutiert	72	N/A	1	N/A
44	58	Binet A	N/A	N/A	keine TP53 mut	01/2008	unmutiert	81	24+	1	110+
47	79	Binet A	N/A	N/A	Keine del17, keine del11	07/2000	hypermutiert	-	-	-	195+
50	72	Binet A	N/A	N/A	N/A	12/2005	N/A	30	72	1	N/A
51	59	Binet A	3.6	CD38-	del13	10/2010	N/A	-	-	-	77+
53	66	Binet A	2.2	N/A	46, XY	01/2013	unmutiert	36	39	1	50+
56	50	Binet A	N/A	ZAP70-	keine del 17	12/2013	N/A	-	-	-	39+
58	76	Binet A	N/A	N/A	Keine TP53 Mutation	02/1995	hypermutiert	-	-	-	265+
59	86	Binet A	N/A	N/A	kein del 17, del 13q	05/2007	unmutiert	21	2	4	118+
60	54	Binet A	N/A	N/A	kein del 17, del 13q	01/2013	hypermutiert	-	-	-	50+
62	56	Binet A	N/A	N/A	kein del 13q14	07/2009	unmutiert	17	42	3	93+
63	54	Binet C	N/A	N/A	del13, TP53 unauffällig	11/2012	unmutiert	1	0	6	52+
64	55	Binet A	N/A	N/A	Trisomie 12	02/2011	unmutiert	48	24+	1	74+
68	74	Binet A	N/A	N/A	Kein del17	07/1990	hypermutiert	-	-	-	320+
69	76	Binet A	N/A	N/A	keine del 17	09/2014	hypermutiert	-	-	-	30+
70	74	Binet A	<2	CD38-	46 XY	05/2009	hypermutiert	78	4	1	82+
71	72	Binet A	N/A	CD38-	Keine del17, keine del11	07/2003	hypermutiert	-	-	-	164+
72	76	Binet B	3.2	N/A	12% del 17, Zyt 47 XO +12	02/2011	unmutiert	50	17	1	73+
73	56	Binet B	N/A	ZAP70-, CD38+	Deletion 11, Deletion 13q, Keine 17p-Deletion, TP53 unauffällig	11/2003	unmutiert	48	20	10	135

Tabelle 6: Zusammenfassung der klinische Parameter der CLL-Patienten

Legende: N/A = Daten nicht vorhanden, - = bis zum Ende des Beobachtungszeitraum kein Ereignis aufgetreten.

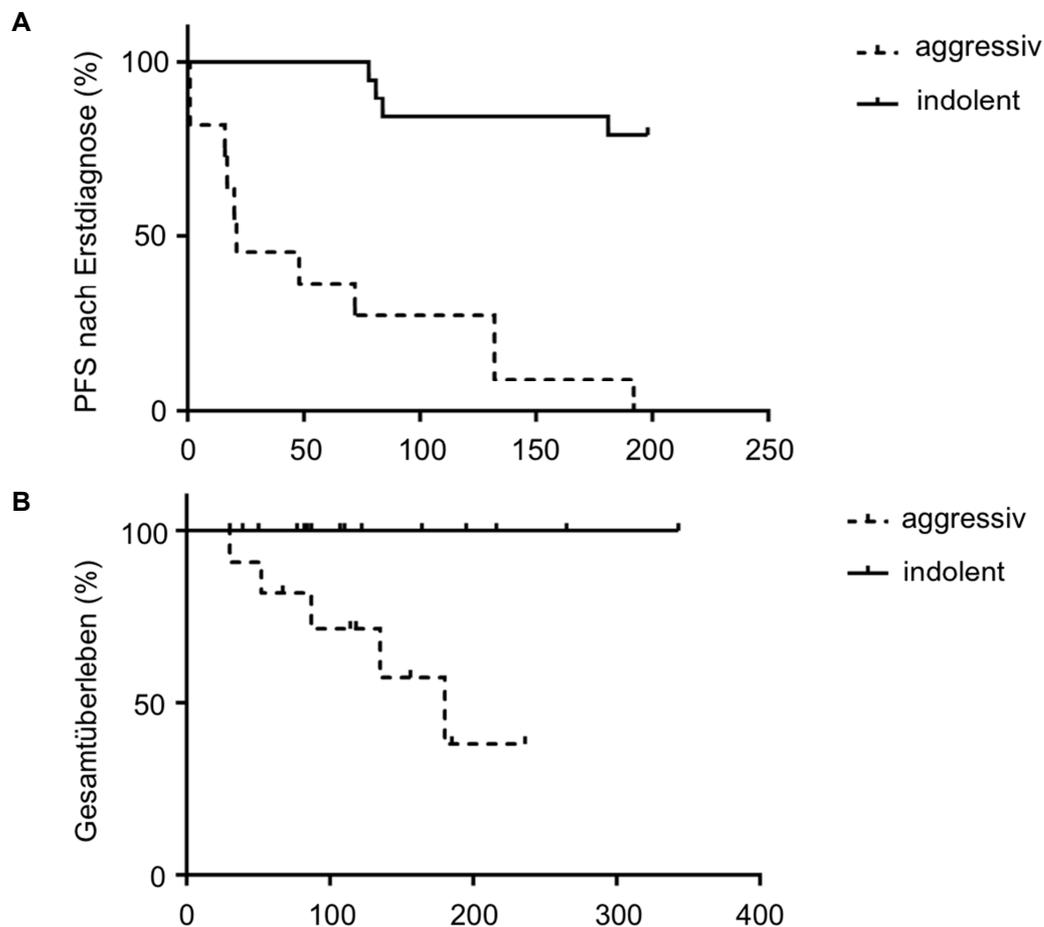


Abbildung 21: Progressionsfreies und Gesamtüberleben der unterschiedlichen Patientenkohorten

Kaplan-Meier-Kurven zum progressionsfreien Überleben (PFS) und Gesamtüberleben der Patienten der jeweiligen Gruppe. **A** Das mittlere PFS liegt in der aggressiven Gruppe bei 24 Monaten, in der indolent verlaufenden Erkrankung wird es nicht erreicht. **B** Aus der indolenten Gruppe ist im Beobachtungszeitraum kein Patient verstorben. Patienten mit aggressiv verlaufender Erkrankung hatten ein mittleres Überleben von 180 Monaten ab Diagnosezeitpunkt.

In der aggressiven CLL-Patientenkohorte lag die Behandlungsrate bei 100%. Unterschiede im Alter und in der Geschlechtsverteilung fanden sich nicht. Ca. 64% der indolent verlaufenden Erkrankungen waren *IgHV*-mutiert. *Tabelle 7* fasst die Eigenschaften der beiden Gruppen zusammen.

Parameter	CLL (n=24)	Indolente CLL (n=14)	Aggressive CLL (n=10)	p-Wert
Medianes Alter (Jahre)	69,1	69,0	69,2	n.s. †
Geschlecht (männlich/weiblich)	15/9	9/5	6/4	n.s. ^π .
Stage Binet B/C	10 (41,6%)	1 (8%)	9 (90%)	<0,0001 ^π
Patienten mit mindestens einer Behandlung	12	2 (14%)	10 (100%)	<0,0001 ^π
Mediane Anzahl an Behandlungen	3,3	1	3,8	0,077 [†]
First-line-Behandlung < 48 Monate	6 (25%)	0 (0%)	6 (60%)	0,0016 [†]
IgHV mutiert	9 (37,5%)	9 (64,2%)	0 (0%)	0,0006 ^π
Genetische Aberrationen (del17, del11, TP53 Mutation)	3 (12,5%)	0 (0%)	3 (30%)	0,059 ^π

Tabelle 7: Klinische und prognostische Parameter beider Patientenkohorten

Statistische Analyse der beiden unterschiedlichen CLL Kohorten (indolent vs. aggressiv) mit ^πFisher's t-test oder [†]Mann-Whitney Test, n.s. =nicht signifikant. Modifiziert nach Maerklin et al.⁹⁶

3.2.2. Expression von NFAT2 in der CLL

Zur Bestimmung der NFAT2-Expression in den CLL-Zellen wurden die mRNA-Level in den einzelnen Patientenproben ermittelt und mit gesunden B-Zellen verglichen. *NFAT2* war auf mRNA-Ebene in fast allen Patienten signifikant überexprimiert (*Abbildung 22A*), in einzelnen Patienten sogar bis zu 20-fach erhöht. Innerhalb des Patientenkollektivs zeigte sich zwar eine hohe Varianz der *NFAT2*-Expression. Wenn die Daten der CLL Patienten allerdings kumuliert und mit der *NFAT2*-Expression gesunder B-Zellen verglichen wurden, zeigte sich eine signifikante Überexpression der *NFAT2* Expression in primären CLL-Zellen (*Abbildung 22B*).

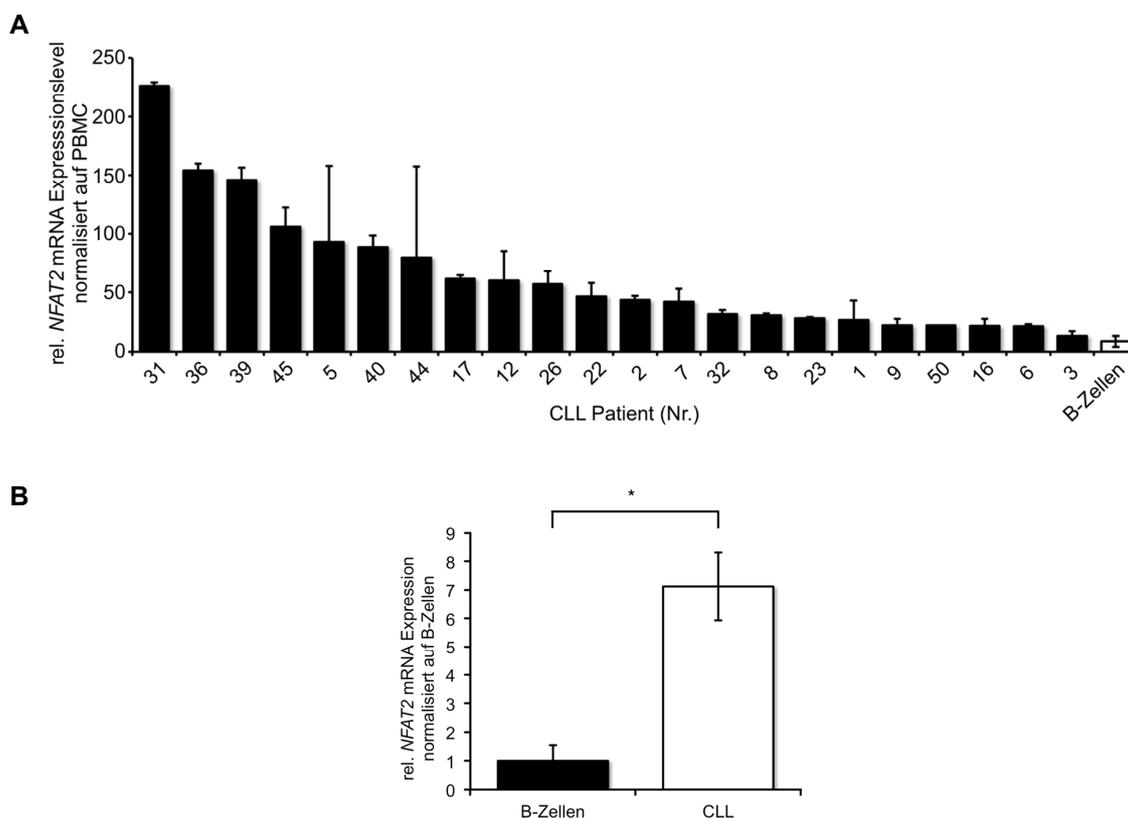


Abbildung 22: NFAT2-mRNA-Expression in CLL-Patienten

Nach Isolation der CLL-Zellen aus dem peripheren Blut erfolgte die Bestimmung der *NFAT2*-Expression in CLL-Patienten ($n = 22$). Die Ziel(*NFAT2*)/Referenz(*GAPDH*)-Expression wurde normalisiert auf die *NFAT2*-Expression von PBMCs. **A** Pro Patient wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt. Die *NFAT2*-Expression von B-Zellen ($n = 5$) wurde kumuliert. **B** qRT-PCR gesunder B-Zellen ($n = 5$) im Vergleich mit der kumulierten *NFAT2*-Expression der CLL-Patienten ($n = 22$). Signifikanzniveau mit Welch's t-Test, SD, * = $p < 0,05$. *Abbildung 22B* modifiziert nach Maerklin et al.⁹⁶

Um die Relevanz der *NFAT2*-mRNA-Expression genauer zu analysieren, wurden die einzelnen *NFAT2*-Isoformen ebenfalls analysiert. Wie eingangs bereits erörtert, werden den verschiedenen Isoformen unterschiedliche regulatorische Funktionen im Bereich der Transkriptions- und Zellzyklusregulation zugeschrieben.⁴⁵ Gesunde B-Zellen exprimierten insbesondere die kurze *NFAT2*-Isoform, welche antiapoptotische und proliferative Transkription induzieren soll.⁴⁷ In CLL-Zellen fand sich ebenso häufiger die kurze Isoform *NFAT2/A* (Abbildung 23A). Die Expression war signifikant erhöht im Vergleich zu den gesunden B-Zellen. Das Expressionsverhältnis in CLL-Zellen wurde jedoch zugunsten der langen Isoformen verschoben. In CLL-Patienten lagen diese bei etwa 20% der *NFAT2*-mRNA-Expression, in B-Zellen bei lediglich 5% (Abbildung 23B).

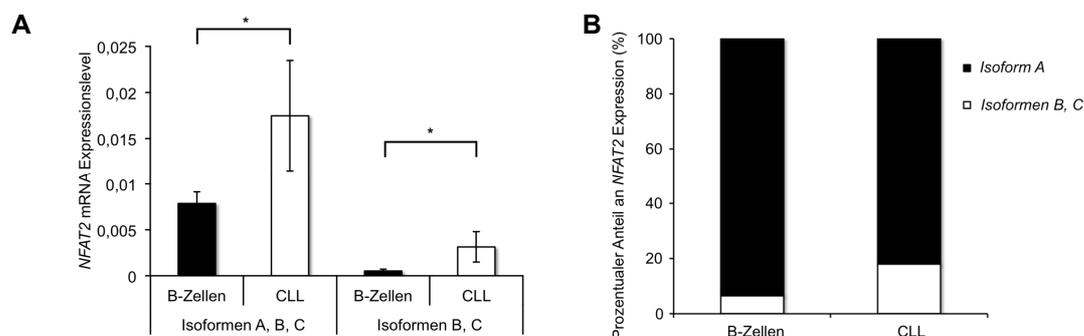


Abbildung 23: mRNA-Expression der NFAT2-Isoformen in der CLL

Die Expression der unterschiedlichen *NFAT2*-Isoformen in B-Zellen ($n = 5$) und CLL-Zellen ($n = 22$) wurde mit den exonspezifischen Primern bestimmt. **A** Vergleich der Expression der langen *NFAT2*- Isoformen (*NFAT2/B* und *NFAT2/C*) und kurzen Isoform (*NFAT2/A*). **B** Prozentualer Anteil der mRNA der *NFAT2*-Isoformen. Signifikanzniveau mit Student's *t*-Test, *SD*, * = $p < 0,05$. Die Daten dieser Abbildung wurden freundlicherweise durch Frau Felicia Truckenmüller bereitgestellt.

Da neben der mRNA-Expression die Translation und die damit verbundene Proteinexpression eine funktionell bedeutsame Rolle einnimmt, wurde im Folgenden die NFAT2-Expression mit Western Blot analysiert. In allen untersuchten Patientenproben konnte eine NFAT2-Expression detektiert werden. Ebenso fand sich hier ein sehr heterogenes Muster der Expressionsstärke (*Abbildung 24A*). Die Proteinexpression der CLL-Patienten wurde quantifiziert, anschließend kumuliert und mit gesunden B-Zellen verglichen. Es fand sich bei gesunden B-Zellen im Vergleich eine signifikant erniedrigte NFAT2-Proteinexpression (*Abbildung 24B*).

Im zeitlichen Verlauf konnte für zwei Patienten die NFAT2-Expression ermittelt werden. Es lag kein signifikanter Progress oder eine Therapie zwischen den Entnahmezeitpunkten. Die Expression zeigte lediglich eine geringfügige Variation im zeitlichen Verlauf (*Abbildung 24C*).

3 Ergebnisse
 3.2 NFAT2 in primären humanen CLL-Zellen

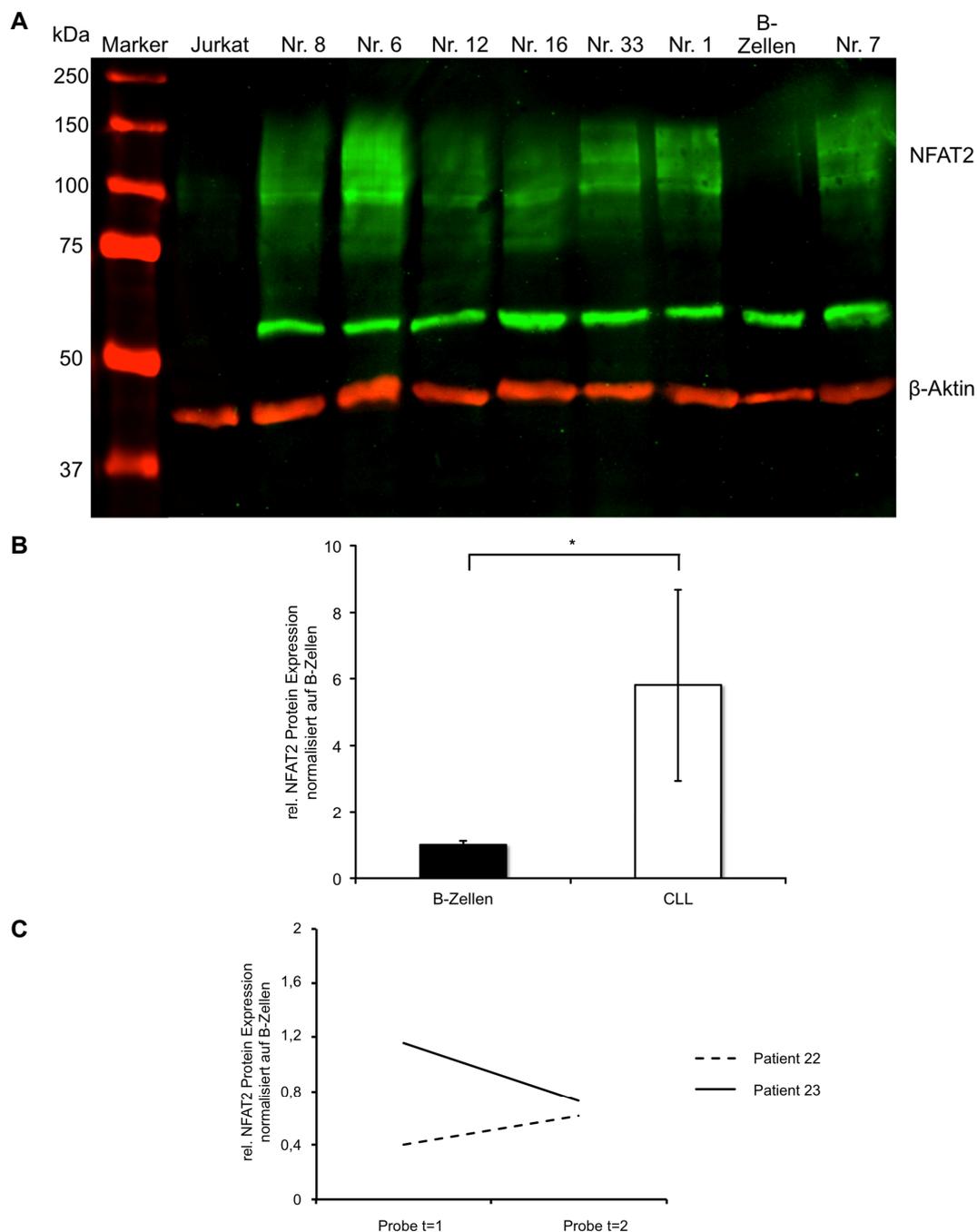


Abbildung 24: NFAT2-Proteinexpression in CLL-Patienten

Nach CLL-Zell-Isolation aus PBMCs der Patienten wurden Proteinlysate aus 1×10^7 Zellen präpariert. **A** Ein repräsentativer Western Blot verschiedener CLL-Patienten und gesunder B-Zellen ($CD19^+$) mit $50 \mu\text{g}$ Proteinlysat. Jurkat-Proteinkonzentrat diente zur Normalisierung der Western Blots und zum Vergleich. Anti-NFAT2-Antikörper (grün, BD, 7A6) und β -Aktin (rot, Cellsignaling, 13E5). **B** Statistische Auswertung der Western Blots aller CLL-Patienten ($n = 18$) im Vergleich zu gesunden B-Zellen ($n = 3$). Die NFAT2-Expression wurde auf das β -Aktin-Signal normalisiert. **C** Zeitlicher Verlauf der NFAT2-Proteinexpression in zwei Patienten. Die Erhebung der Signalstärke erfolgte mit ImageStudioLite Software. Signifikanzniveau mit Student's t-Test, SD, * = $p < 0,05$.

Im Folgenden wurde das Patientenkollektiv hinsichtlich der Aufteilung in den indolenten und den aggressiven Verlauf der Erkrankung untersucht. Dabei wurden die Kriterien, welche in Kapitel 3.2.1 genannt sind, angewandt. In der indolent verlaufenden CLL-Erkrankung wird *NFAT2* im Vergleich zu gesunden B-Zellen hochsignifikant überexprimiert. Ebenso zeigten Patienten mit aggressiv verlaufender Erkrankung eine deutlich erhöhte *NFAT2*-Expression im Vergleich zu gesunden B-Zellen, wobei diese signifikant geringer als bei indolenten Verläufen war (*Abbildung 25*). Diese Ergebnisse konnten auf Proteinebene bestätigt werden. In *Abbildung 26A* findet sich ein exemplarischer Western Blot. Nach statistischer Auswertung der *NFAT2*-Proteinexpression lag in der indolenten CLL-Kohorte die Expression signifikant höher als in der aggressiven Kohorte (*Abbildung 26B*).

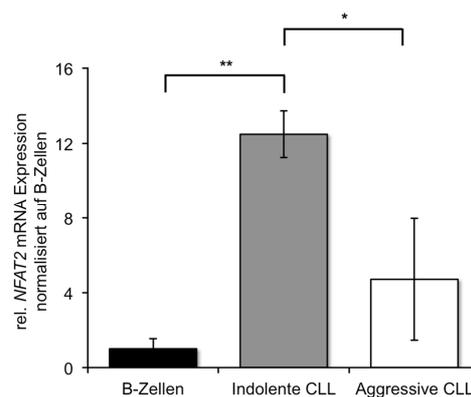


Abbildung 25: *NFAT2*-mRNA-Expression in unterschiedlichen CLL-Patientenkohorten

Das Patientenkollektiv wurde anhand der in Kapitel 3.2.1 genannten Kriterien in zwei Kohorten unterteilt. Mittels qPCR konnte die mRNA-Expression in den beiden Gruppen (n je Gruppe = 6) ermittelt werden. Signifikanzniveau mit Welch's t -Test, SD, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$. *Abbildung modifiziert nach Maerklin et al.*⁹⁶

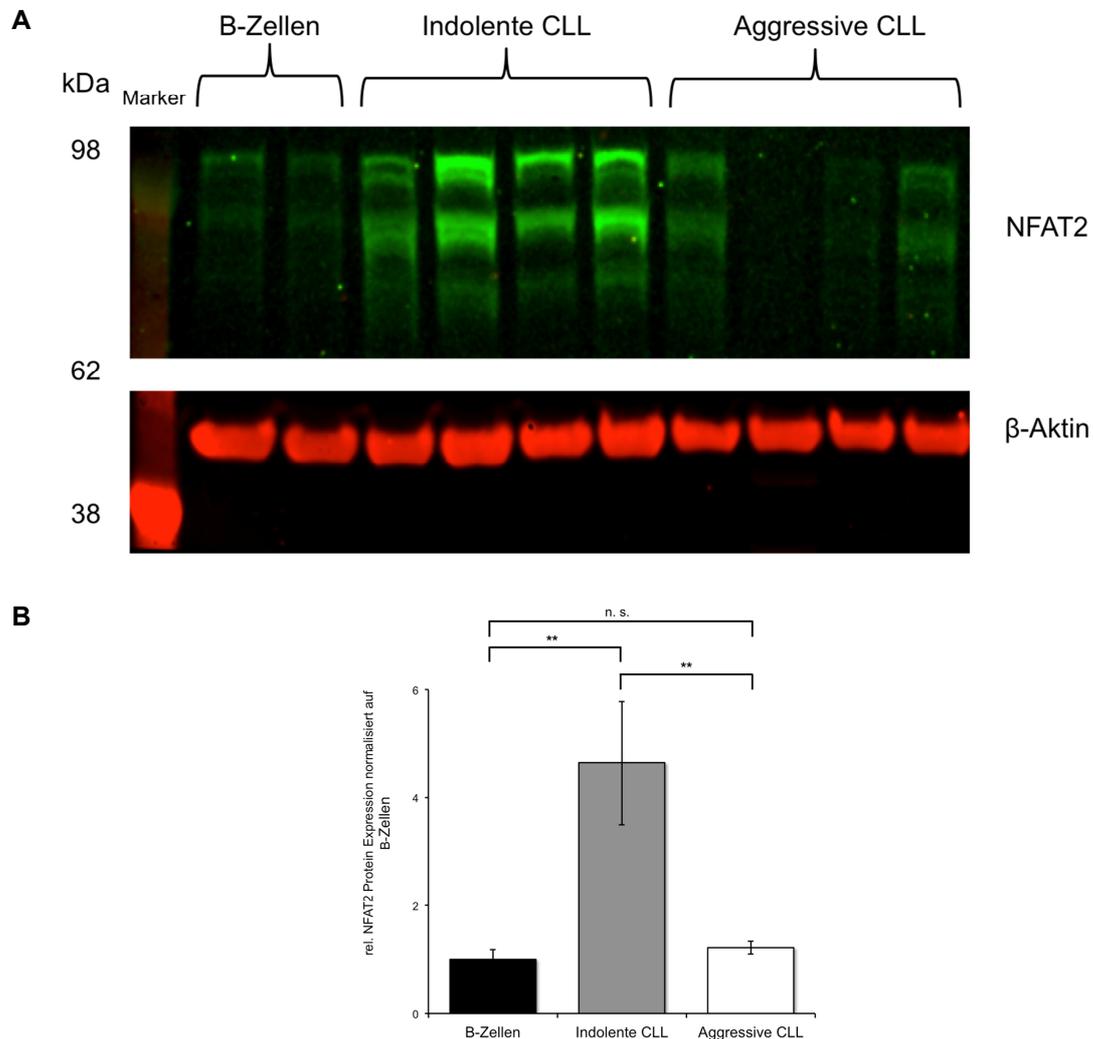


Abbildung 26: NFAT2-Proteinexpression in unterschiedlichen Patientenkohorten

Nach CLL-Zell-Isolation aus PBMCs der Patienten wurden Proteinlysate aus jeweils 1×10^7 Zellen präpariert. **A** Ein repräsentativer Western Blot des Patientenkollektivs mit $50 \mu\text{g}$ Proteinlysate. Antikörper gegen NFAT2 (grün, BD, 7A6) und β -Aktin (rot, Cell Signaling, 13E5). **B** Statistische Auswertung der Western Blots aller CLL-Patienten (indolente Kohorte mit $n = 7$, aggressive Kohorte mit $n=8$) im Vergleich zu gesunden B-Zellen ($n = 10$). Die NFAT2-Expression wurde auf das β -Aktin-Signal normalisiert. Die Erhebung der Signalstärke erfolgte mit ImageStudioLite Software. Signifikanzniveau mit Welch's t-Test, SD, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$. Abbildungen modifiziert nach Maerklin et al.⁹⁶

3.2.3. Translokation und Aktivierung von NFAT2 in der CLL

Da bei einem Transkriptionsfaktor wie NFAT2 nicht nur die reine Expressionsstärke relevant ist, sondern vor allem die Aktivität und damit die Fähigkeit, in den Zellkern zu translozieren, wurde die NFAT2-Lokalisation zunächst mittels Immunfluoreszenz bei primären CLL-Zellen bestimmt. Als Kontrolle dienten hierbei gesunde PBMCs. Zunächst wurden die Zellen auf einem Objektträger als einzelne Zellen fixiert. Hier zeigte sich insbesondere die ausgesprochene Fragilität der CLL-Zellen als Herausforderung, da CLL-Zellen durch mechanische Kräfte leicht zerstört werden (Grumprecht'sche Kernschatten). Dabei war die Etablierung der korrekten Fixationsmethode für das Epitop des Detektionsantikörpers (hier NFAT2) essentiell. In *Abbildung 27* ist das Ergebnis mit gesunden PBMCs dargestellt. Es zeigte sich, dass NFAT2 in gesunden B-Zellen außerhalb des Kernes war und inaktiv im Zytoplasma ruhte. Bei den CLL-Zellen war NFAT2 zu einem gewissen Anteil bereits unter Ruhebedingungen in den Zellkern transloziert und dementsprechend aktiviert (*Abbildung 28*). Zusätzlich wurde eine quantitative Auswertung der Immunfluoreszenz durchgeführt, bei der jeweils 100 Zellen optisch nach ihrer zytoplasmatischen oder nukleären NFAT2-Lokalisation bewertet wurden (*Abbildung 29*). Aggressiv verlaufende Erkrankungen schienen mehr NFAT2 im Zellkern zu besitzen als indolente. Allerdings erfolgte aufgrund der kleinen Einzelgruppen hier keine Signifikanztestung.

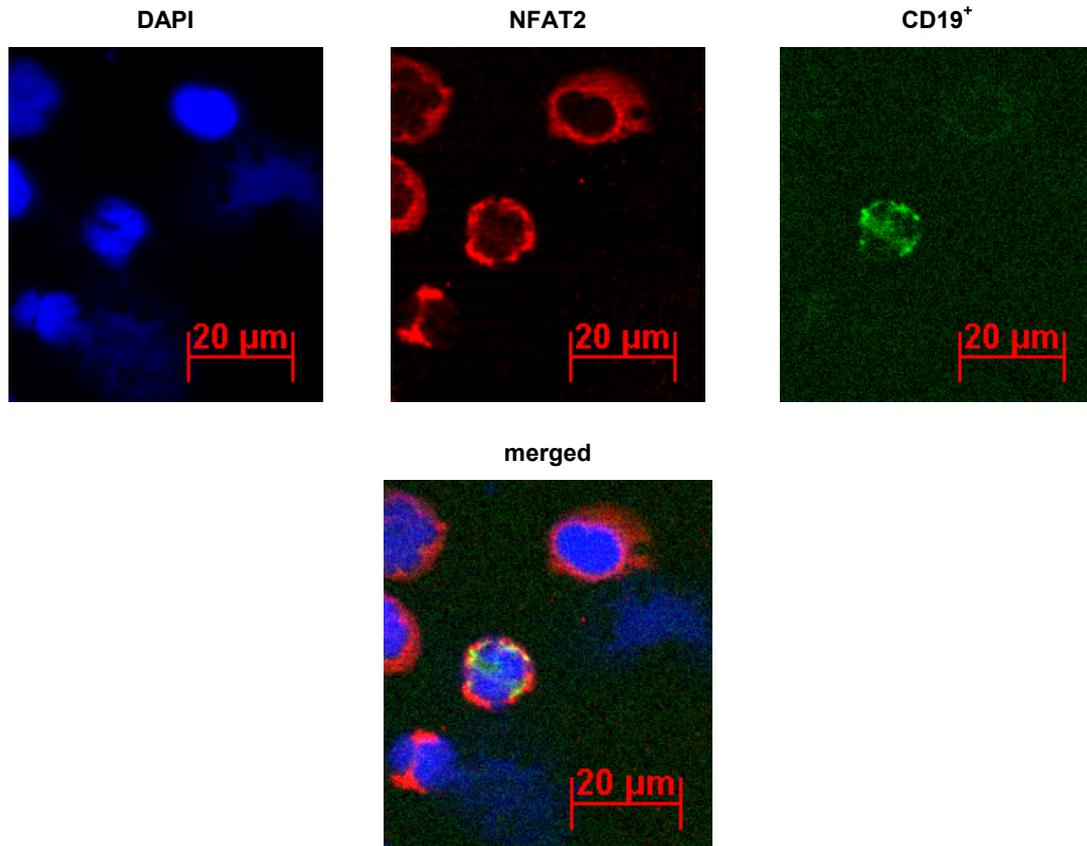


Abbildung 27: NFAT2-Lokalisation in B-Zellen

Von PBMCs eines Spenders wurden Zytospins angefertigt. Immunfluoreszenz für NFAT2 (rot, Alexis, 7A6), CD19 (grün, Cellsignaling, D4V4B) und die Zellkernfärbung (blau, DAPI).

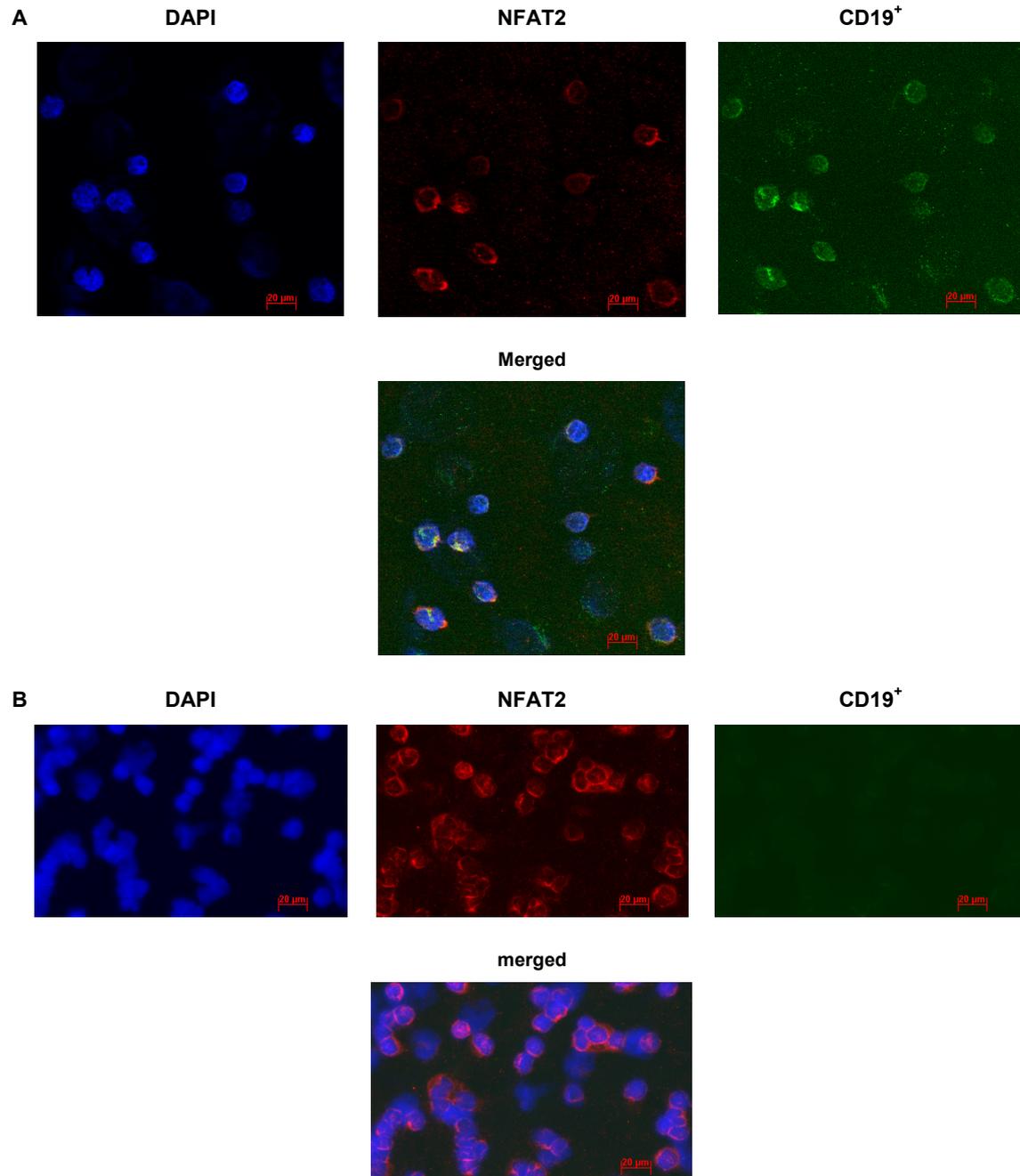


Abbildung 28: NFAT2-Lokalisation in CLL Patienten

Immunfluoreszenzfärbung von isolierten PBMCs exemplarischer CLL-Patienten für NFAT2 (rot, Alexis, 7A6), CD19 (grün, Cellsignaling, D4V4B) und die Zellkernfärbung (blau, DAPI).

A Immunfluoreszenzfärbung eines indolenten CLL-Patienten (Nr. 33).

B Immunfluoreszenzfärbung eines aggressiven CLL-Patienten (Nr. 16).

3 Ergebnisse
3.2 NFAT2 in primären humanen CLL-Zellen

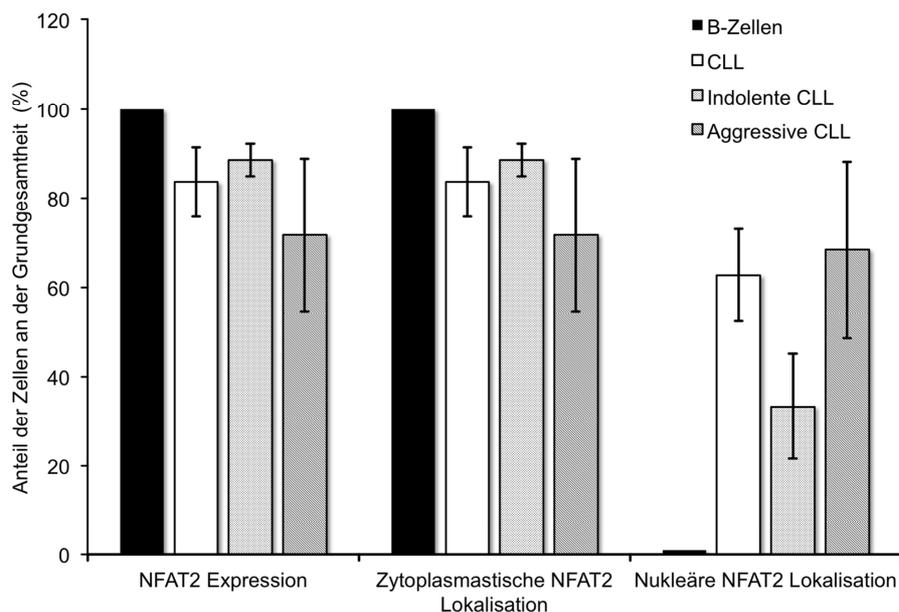


Abbildung 29: Quantitative Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung in CLL-Patienten

Es wurden pro CLL-Patient ($n=8$) visuell 100 Zellen ausgezählt und nach ihrer zytoplasmatischen oder nukleären NFAT2-Lokalisation ausgewertet. Des Weiteren erfolgte die Einteilung in die beiden Kohorten (CLL indolent ($n=2$), CLL aggressiv ($n=3$)), SEM.

Zur weiteren Untersuchung und Bestätigung der Immunfluoreszenz wurden weitere Western-Blot-Analysen mit Kern- und Zytoplasmafraktionen durchgeführt. In gesunden B-Zellen ($CD19^+$) befand sich NFAT2 im Zytoplasma, bei den CLL-Zellen hingegen wurde NFAT2 in den Zellkern transloziert. Dies ist exemplarisch in einem Western Blot in *Abbildung 30* zu sehen.

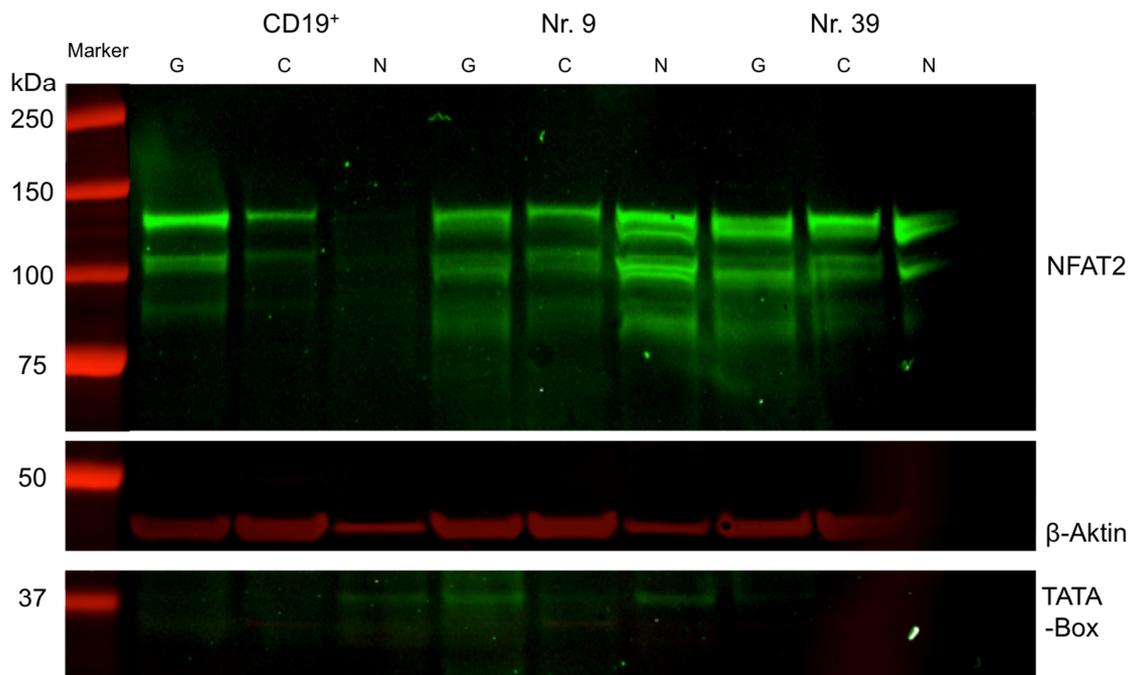


Abbildung 30: Western Blot für die Zytoplasma-Nukleus-Verteilung von NFAT2 in CLL-Patienten

Nukleus- und Zytoplasma-Proteinlysate von PBMCs aus CLL-Patienten wurden mittels Western Blot analysiert. Es wurden 50 µg komplettes Proteinlysate (G), 50 µg zytoplasmatisches Proteinlysate (C) und 25 µg nukleäres Proteinlysate (N) aufgetragen. Anti-NFAT2-AK (grün, BD, 7A6), Anti-TATA-Box-AK (grün, Abcam ab818) und Anti-β-Aktin-AK (rot, Cellsignaling, 13E5) wurden zur Differenzierung der Lysate genutzt.

Nach Auswertung aller Western Blots konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen gesunden B-Zellen und CLL-Patienten in Bezug auf die NFAT2-Lokalisation in der Zelle berechnet werden (Abbildung 31). In gesunden B-Zellen befanden sich unter Ruhebedingungen nur ca. 10% des NFAT2 im Zellkern, wohingegen in CLL-Zellen etwa 60% des NFAT2 im Zellkern lokalisiert war.

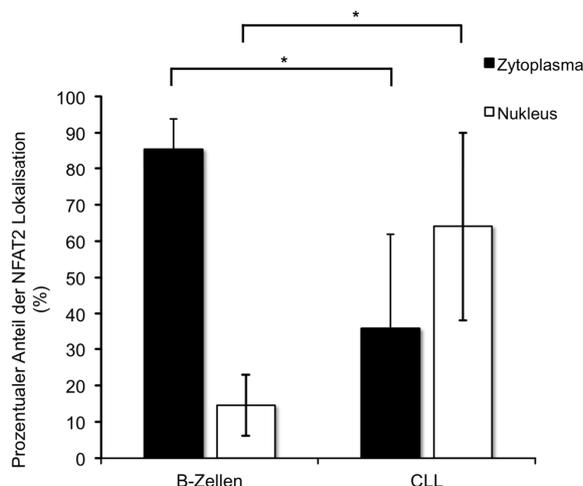


Abbildung 31: Zytoplasma-Nukleus-Verteilung von NFAT2 in CLL-Patienten

Statistische Auswertung der Zytoplasma-Nukleus-Western-Blots. Es wurden gesunde B-Zellen (n=3) mit CLL-Patienten (n=26) verglichen. Es wurde für jeden Patienten die NFAT2-Verteilung prozentual mittels Erhebung der Signalstärke (ImageStudioLite Software) berechnet. Signifikanzniveau mit Student's t-Test, SD, * = $p < 0,01$.

Bei eingängiger Betrachtung der Lokalisation von NFAT im CLL-Patientenkollektiv lässt sich weiterhin eine hohe Varianz in der NFAT2-Lokalisation feststellen (Abbildung 31). Differenziert man nun wieder zwischen den CLL-Kohorten mit aggressivem bzw. indolentem Verlauf, lassen sich deutliche Unterschiede im Vergleich der beiden Kollektive erkennen. NFAT2 zeigte sich in der indolenten CLL-Erkrankung zu etwa gleichen Anteilen im Zytoplasma und im Nukleus lokalisiert. In der aggressiv verlaufenden Erkrankung residierte NFAT2 signifikant mehr im Nukleus. Ca. 80% des NFAT2-Proteins war hier im Nukleus zu finden. Trotz geringerer NFAT2-Expression war die Lokalisation von NFAT2 in der aggressiven CLL-Kohorte tendenziell mehr im Nukleus zu finden als in der indolenten CLL-Erkrankung (Abbildung 32).

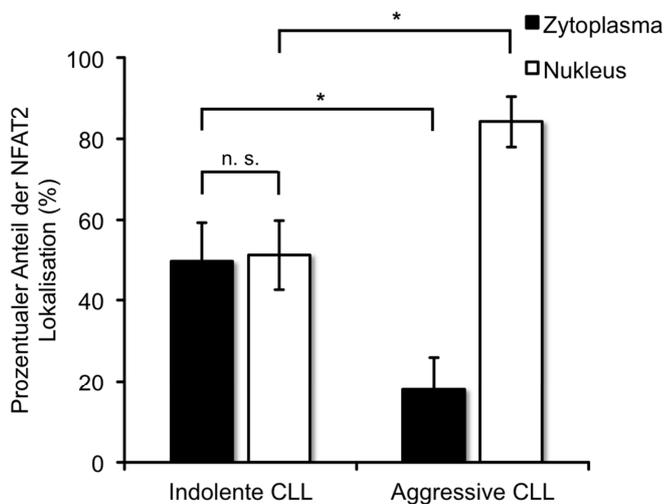


Abbildung 32: Zytoplasma-Nukleus-Verteilung von NFAT2 in unterschiedlichen Patientenkohorten

Statistische Auswertung der Zytoplasma-Nukleus-Western-Blots. Es wurde die indolente CLL-Kohorte (n=6) mit der aggressiven Kohorte (n=5) verglichen. Es wurde für jeden Patienten die NFAT2 Verteilung prozentual mittels Erhebung der Signalstärke (ImageStudioLite Software) bestimmt. Signifikanzniveau mit Student's t-Test, SD, * = $p < 0,05$.

3.2.4. Die Expression von NFAT2-Zielgenen bei der CLL

In der Literatur wurden bereits etliche NFAT2-Zielgene in B-Zellen im Mausmodell definiert. Bhattacharyya et al. definierten mittels RNA Microarray u.a. Gene wie *tnfsf14*, *pdc1* und *spp1*.⁹⁷ In einer parallelen Arbeit von Frau Dr. Melanie Märklin konnte im *Nfat2^{-/-}/Tcl1* Mausmodell zudem *Tnfsf4* ebenso mittels RNA Microarray als Target identifiziert werden. Um zu evaluieren, ob die potentiellen NFAT2-Zielgene auch im hier analysierten Patientenkollektiv eine NFAT2-abhängige Expression zeigten, wurden qRT-PCRs für *TNFSF4*, *PDCD1*, *TP53* und *SPP1* durchgeführt. Hierbei dienten gesunde B-Zellen als Kontrolle. In der Patientenkohorte mit aggressiv verlaufender Erkrankung fand sich die Transkription der bekannten NFAT2-Zielgene signifikant kompromittiert (Abbildung 33A-C). Die Kontrolle mittels der NFAT2-unabhängigen *TP53*-Expression zeigt keinen Unterschied (Abbildung 33D).

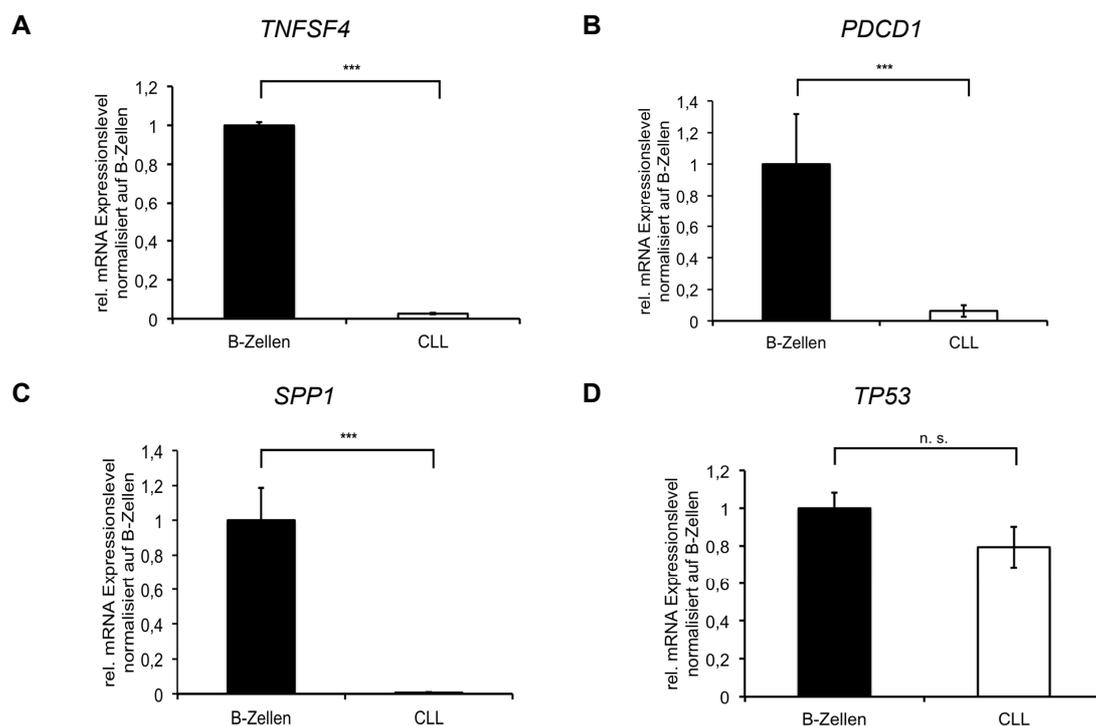


Abbildung 33: Expression verschiedener NFAT2-Zielgene in der aggressiven CLL-Kohorte

Nach Isolation der CLL-Zellen aus dem peripheren Blut erfolgte die Bestimmung der Zielgene **A** *TNFSF4* **B** *PDCD1* **C** *SPP1* **D** *TP53* mittels qRT-PCR in CLL-Patienten (aggressiv, $n = 6$). Die Ziel(Zielgen)/Referenz(*GAPDH*)-Expression wurde normalisiert auf die Expression in gesunden B-Zellen ($n=4$). Signifikanzniveau mit Mann-Whitney Test, SD, *** = $p < 0,001$.

3.2.5. NFAT2 in der Richter-Transformation

Als besondere Form der CLL-Erkrankung ist die Richter-Transformation anzusehen. Hierbei handelt es sich in der Regel um ein hochmalignes B-Zelllymphom mit sehr schlechter Prognose. Zur Klärung der Relevanz von NFAT2 in der Richter-Transformation wurde die *NFAT2*-Expression in verschiedenen Patienten mit Richter-Transformation untersucht. Die *NFAT2*-mRNA-Expression bei Patienten mit Richter-Transformation betrug im Vergleich zu den CLL-Proben lediglich 30% (*Abbildung 34A*). Dies stellt eine signifikante Reduktion der Expression dar. Dies konnte in einem Beispiel auch auf Proteinebene gezeigt werden (*Abbildung 34B*). In diesem Beispiel kam es zur leukämischen Aussaat der Richter-transformierten Zellen in das periphere Blut.

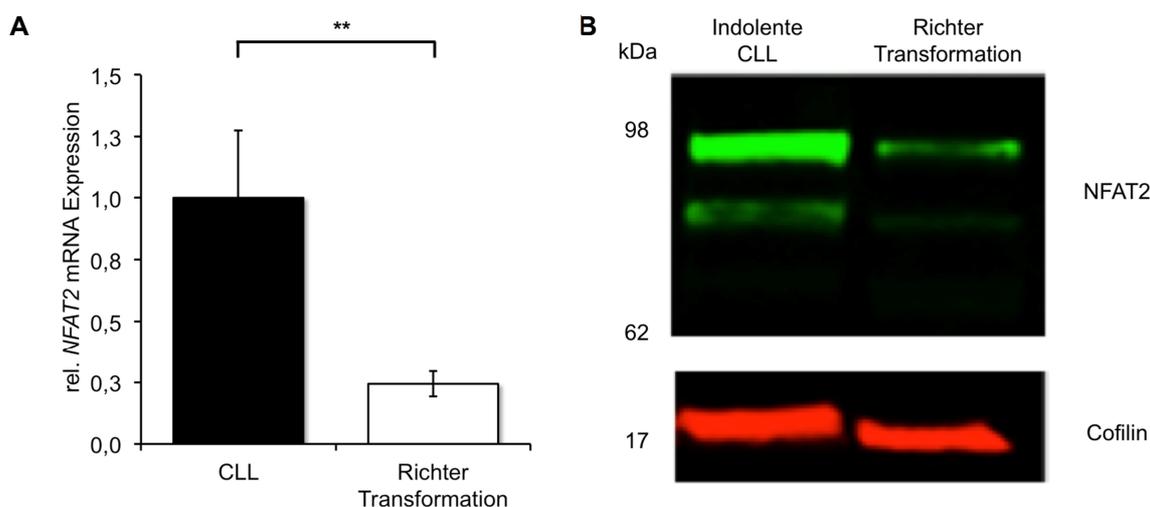


Abbildung 34: NFAT2 Expression in der Richter-Transformation

A mRNA wurde aus paraffinfixiertem Knochenmark oder Lymphknoten von CLL-Patienten ($n=5$) und Patienten mit Richter-Transformation ($n=8$) isoliert und mittels qRT-PCR analysiert. Die Ziel(*NFAT2*)/Referenz(*GAPDH*)-Expression wurde normalisiert auf die Expression in CLL-Patienten. **B** Western Blot eines CLL-Patienten mit Ausschwemmung der Richter-transformierten Zellen ins periphere Blut. 50 μ g Proteinlysate wurden für den Western Blot eingesetzt. Anti-NFAT2-AK (grün, BD, 7A6) und Anti-Cofilin-AK (rot,) dienen zum Nachweis. Signifikanzniveau mit Mann-Whitney Test, SD, ** = $p < 0,01$. Abbildungen modifiziert nach Maerklin et al.⁹⁶

4. Diskussion

4.1. Diskussion der Ergebnisse

Die Familie der NFAT-Transkriptionsfaktoren unterliegt schon seit langem intensiver Untersuchungen bei malignen Erkrankungen; vor allem ihre Rolle bei hämatologischen Neoplasien wird intensiv diskutiert.⁹⁸ Ein Zusammenhang zwischen NFAT2 und der chronisch lymphatischen Leukämie wurde erstmals 1996 als Charakteristikum unstimulierter CLL-Zellen beschrieben.⁹⁹ In weiteren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die CD23-Expression durch NFAT (Familienmitglieder NFAT1 und NFAT2) reguliert werden kann.¹⁰⁰ In histopathologischen Untersuchungen konnte an 300 primären Gewebeproben unterschiedlicher Lymphomentitäten eine signifikante Expression von zytoplasmatischem NFAT2 detektiert werden. Des Weiteren fanden sich in hochmalignen Lymphomen, wie dem DLBCL und dem Burkitt Lymphom, ein signifikanter Anteil von NFAT2 in den Nucleus transloziert.¹⁰¹

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von NFAT2 bei der chronisch lymphatischen Leukämie näher zu beleuchten. Für diese Fragestellung wurden zwei unterschiedliche Herangehensweisen gewählt: Zum einen wurden im Zellkulturmodell *in vitro* die CLL-Zelllinien MEC-1 und JVM-3 untersucht und zum anderen experimentell die NFAT2-Expression in primären CLL-Zellen analysiert.

Es liegen bereits einige Daten zum Expressionsprofil von NFAT2 in primären CLL-Zellen vor.^{75,101} Die vorliegende Arbeit an CLL-Zellen zeigt, dass NFAT2 in der CLL-Erkrankung in einem Großteil der Patienten überexprimiert ist. Jedoch fand sich eine heterogene Expression von NFAT2. Die erhöhte Expression konnte in der Regel sowohl auf Proteinebene als auch auf mRNA-Expressionsebene detektiert werden. Die NFAT2-Expression schien bei den Patienten über die Zeit konstant zu bleiben, wobei hier aufgrund nicht ausreichender Probenanzahl keine statistisch valide Aussage gemacht werden kann.

Die Genese der erhöhten NFAT2-Expression wurde in anderen Studien bereits näher beleuchtet. Möglich wären eine aktivierende Mutation oder andere posttranskriptionelle Modifikationen. Le Roy et al. untersuchte den *NFAT2*-Genlocus auf mögliche Mutationen oder Translokationen, wobei keine Auffälligkeiten beschrieben werden

konnten.⁷⁵ Da genetische Modifikationen nicht vorzuliegen scheinen, wurde in neueren Arbeiten das Vorliegen epigenetischer Veränderungen im Bereich der Promotorregion für *NFAT2* untersucht. Hier konnte demonstriert werden, dass eine Hypomethylierung im Bereich des *NFAT2*-Promotors zur vermehrten Transkription des *NFAT2*-Genes führen könnte.¹⁰²

Ein weiterer Grund für die erhöhte *NFAT2*-Expression könnte ein verstärkter Autoloop-Mechanismus sein. In murinen B-Zellen wird nach Translokation von *NFAT2* in den Nukleus die *NFAT2* Expression erhöht.⁴⁷ Dies bedeutet, dass nach entsprechender Stimulation einer gesunden B-Zelle durch den Autoloop-Mechanismus die *NFAT2*-Expression erhöht wird. Im Falle von anergen CLL-Zellen gilt, dass diese konstitutiv-aktiviertes *NFAT2* aufweisen, obwohl eine fehlende Stimulierbarkeit des BCRs durch beispielweise anti-IgM vorliegt.¹⁰³⁻¹⁰⁵ Denkbar ist demnach ein chronisch aktivierter Autoloop-Mechanismus, der gleichermaßen von Le Roy et al. durch seine Einteilung des CLL-Patientenkollektives nach Respondern und Non-Respondern beschrieben wurde. Diese Arbeit zeigt, dass Responder nach Stimulation mit anti-IgM eine höhere *NFAT2*-DNA-Bindungsaktivität als non-Responder aufweisen. Ein weiterer Einfluss auf die *NFAT2*-Expression nach anti-IgM Stimulation wurde von Le Roy et al. nicht untersucht.⁷⁵ Durch eine geringe DNA-Bindung sollte der Autoloop-Mechanismus reduziert werden, wodurch prinzipiell eine erniedrigte Expression von *NFAT2* in anergen CLL-Zellen zu erwarten wäre.

Ähnliche Daten in unserem Patientenkollektiv in Bezug auf genetische und epigenetische Veränderungen fehlen bislang und sind Gegenstand laufender Untersuchungen außerhalb dieser Arbeit. Diese Untersuchungen sollen die Ursache der *NFAT2*-Überexpression abschließend beantworten.

Als funktionelles Protein ist insbesondere für Transkriptionsfaktoren festzuhalten, dass deren Expression in der Zelle nicht mit deren transkriptionellen Aktivität gleichzusetzen ist. Um ein tieferes Verständnis für die Funktion von *NFAT2* in der CLL zu erhalten, musste daher eine Methode zur Bestimmung der *NFAT2*-Lokalisation etabliert werden. Ebenso sollte gezeigt werden, dass die Calcineurininhibitoren eine erfolgreiche *NFAT2*-Translokation verhindern können. Hierfür können unterschiedliche Methoden genutzt werden. Eine methodische Herangehensweise wäre über die Bestimmung unterschiedlicher Phosphorylierungszustände des *NFAT2* Proteins. Nach calcineurinabhängiger Dephosphorylierung translozieren *NFAT*-Transkriptionsfaktoren in den Nucleus. Leider sind bisher keine kommerziellen Antikörper für die

verschiedenen Phosphorylierungszustände von NFAT2 erwerbbar. Deshalb ist eine verlässliche Auswertung eines NFAT2 Western Blots hinsichtlich der Phosphorylierung derzeit technisch nicht möglich. Eine bessere Methode bietet die in dieser Arbeit angewandte histologische Untersuchung. Mit einem eigenständig modifizierten Immunfluoreszenzprotokoll konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine In-vitro-Behandlung von Jurkat-Zellen mit PMA/Ionomycin und damit die Stimulierung des Calcineurin/NFAT-Signalweges zur Translokation von NFAT2 in den Zellkern führt. Dies wird durch vorherige Behandlung mit Cyclosporin A inhibiert. Eine Quantifizierung war jedoch aufgrund der vorliegenden technischen Möglichkeiten (manuelles Auszählen oder Intensitätsmessungen ohne Normalisierung) nur eingeschränkt verwertbar.

Um valide Aussagen zur NFAT2-Translokation in den CLL-Patienten zu erhalten, wurde diese Methode mit einer Weiteren kombiniert. Neben der histologischen Untersuchung erfolgte die Proteinbestimmung an nukleären und zytoplasmatischen Zellextrakten mittels Western Blot. In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass neben der erhöhten NFAT2-Expression auch eine verstärkte nukleäre Translokation vorliegt. Da beide Untersuchungen das gleiche Ergebnis zeigen, kann eine signifikante nukleäre NFAT2-Translokation unter Ruhebedingungen angenommen werden.

Diese Methoden zur NFAT2-Lokalisationsbestimmung spiegeln den In-vivo-Zustand der CLL-Zellen wider, da zuvor keine -Stimulation der Zellen erfolgte, wie dies beispielsweise von anderen Autoren durchgeführt wurde.⁷⁵ Die Ursache warum CLL-Zellen NFAT2 konstitutiv in den Nukleus translozieren, ob hierfür eine dauerhafte Stimulierung des BCRs in vivo ursächlich ist, oder NFAT2 aufgrund seiner vermehrten Präsenz schlicht verstärkt transloziert wird, konnte nicht näher beleuchtet werden.

Zur näheren Untersuchung der transkriptionellen Aktivität von NFAT-Proteinen konnte ein In-vitro-Modell etabliert werden. Zelllinien bieten den Vorteil, dass sie ein stabiles Modell für Proliferationsuntersuchungen und molekulare Analysen sind.¹⁰⁶ Hier konnte gezeigt werden, dass NFAT2 von den CLL-Zelllinien (JVM-3 und MEC-1) exprimiert wird. Die Expression ist jedoch im Vergleich zur leukämisch transformierten T-Zelllinie Jurkat deutlich vermindert. Ursächlich hierfür könnte die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen Erkenntnis über die Rolle des Transkriptionsfaktor NFAT2 für die leukämisch transformierte B-Zelle als Charakteristikum einer aggressiven Erkrankung (Überleben in Zellkultur) sein.

Ob die transkriptionelle Aktivität der NFAT-Proteine essentiell für das Überleben von MEC-1 und JVM-3 ist, sollte anhand der Behandlung mit Calcineurininhibitoren und klassischen Chemotherapeutika untersucht werden. Das Zusammenwirken zweier Substanzen auf eine Zelle ist insbesondere bei der Entwicklung neuer Therapieansätze in der Onkologie wichtig. Dabei gehen In-vitro-Modelle oder Mausmodelle in der Regel klinischen Studien und individuellen Heilversuchen voran.

Eine erhöhte *NFAT2*-Expression scheint in hämatologischen Neoplasien verbreitet zu sein¹⁰¹ und möglicherweise ein wichtiges Target in der Therapie dieser Erkrankungen zu werden. Nicht zuletzt bietet die Möglichkeit der therapeutischen Modulation des NFAT-Signalweges durch die bereits klinisch sehr geläufigen Calcineurininhibitoren Cyclosporin A (CsA) und Tacrolimus (FK506) aber auch durch neue *Small Molecule*-Inhibitoren wie VIVIT und INCA-6, ein optimales Target für zukünftige klinische Applikationen.^{65,68}

Zunächst wurde untersucht, welchen Einfluss die Substanzen einzeln auf das Zellwachstum hatten, und im Anschluss wurden verschiedene Kombinationen der Substanzen verwendet. Mittels entsprechender Assays und anschließender statistischer Auswertung konnte für unterschiedliche Kombinationen ein Synergismus bzw. Antagonismus definiert werden.⁹⁵ Die in vitro eingesetzten Substanzkonzentrationen sollten nach Möglichkeit der Konzentration im Plasma der Patienten entsprechen, um eine Übertragbarkeit für den therapeutischen Einsatz beim Menschen zu ermöglichen.

Die wachstumshemmende Wirkung von Ifosfamid lag bei einem zytotoxischen IC_{50} von ca. 15 μ M, welches einem Zehntel der in vivo erreichbaren Plasmakonzentration entsprach.¹⁰⁷ Obwohl Ifosfamid nicht zur Standardtherapie der CLL gehört, ist aus diesen und in der Literatur beschriebenen In-vivo-Daten von einer Wirksamkeit gegenüber primären B-CLL Zellen auszugehen.^{14,93} Die alleinige Behandlung mit verschiedenen Calcineurin- oder NFAT-Inhibitoren hatte in dieser Untersuchung einen unterschiedlichen Einfluss auf das Zellwachstum. In der Literatur ist für die Behandlung maligner Erkrankungen mit Cyclosporin A vor allem in der Zellkultur ein Effekt beschrieben.¹⁰⁸⁻¹¹⁰

Die Behandlung der MEC-1-Zellen mit CsA wirkte sich in hohen Wirkstoffkonzentrationen inhibitorisch auf das Zellwachstum aus. Für die Calcineurin/NFAT-Inhibition liegt der IC_{50} für CsA bei 0,7 nM.⁹⁴ Die genutzte Substanzkonzentration von CsA konnte in dieser Arbeit nachweislich die NFAT2-

Translokation in den Zellkern blockieren. Anzumerken ist dabei, dass die in dieser Arbeit genutzten Konzentrationen von CsA etwa 100-fach geringer waren als die maximale Plasmakonzentration von CsA in der Anwendung als Immunsuppressivum.¹¹¹

In der Kombinationsbehandlung von Ifosfamid und CsA zeigte sich ein Synergismus. Die vorliegende Untersuchung ist im Einklang mit den bereits publizierten Daten für CsA im Malignom, bei denen eine synergistische Wirkung von CsA in Kombination mit Chemotherapeutika gezeigt werden konnte. Die sensibilisierende Wirkung für Chemotherapie scheint hier u.a. in der Modifikation von Zellmembrantransportern zu liegen. So kann CsA die Regulation der *MDR1*-Expression durch Anthrazykline negativ beeinflussen und damit die Chemotherapieresistenz in gynäkologischen Tumoren aufheben.¹⁰⁸⁻¹¹⁰ Ob ein ähnlicher Mechanismus bei der Substanzklasse der Stickstoff-Lost-Verbindungen gilt, muss noch näher untersucht werden. Ein weiterer möglicher Mechanismus lässt sich aus Daten zum duktalem Adenokarzinom des Pankreas ableiten. Hier konnte gezeigt werden, dass eine Chemotherapieresistenz über das *NFAT1*-Silencing des p15^{INK4b} Tumorsuppressors vermittelt wird.¹¹² Ebenso können *NFAT1/2* über Histonacetylierung die Expression von MYC im Pankreastumor induzieren.^{72,113,114} In dieser Arbeit konnte erstmalig eine synergistische Wirkung von CsA und Chemotherapie in einer leukämischen Entität gezeigt werden. Abschließend kann jedoch nicht sicher gesagt werden, ob die CsA Wirkung über den Calcineurin/NFAT-Signalweg vermittelt wird, oder ob es sich um einen Off-Target-Effekt handelt.

Im Gegensatz zu CsA hat VIVIT in den hier durchgeführten Untersuchungen mit den angewandten Substanzkonzentrationen keinen zytotoxischen Effekt auf das Zellwachstum. INCA-6 hingegen führte zu einer Hemmung des Zellwachstums. Dies konnte bereits auch für andere Zelllinien in vitro beschrieben werden und beruht am ehesten auf einem Off-Target-Effekt.⁶⁷

Bei der Kombinationsbehandlung von Ifosfamid mit diesen NFAT Inhibitoren zeigte sich ein Antagonismus für VIVIT und INCA-6. Die Inhibition des NFAT-Signalweges in MEC-1-Zellen durch Behandlung mit VIVIT und INCA-6 schützt somit vor den zytostatischen Effekten von Ifosfamid.

Im Gegensatz zu CsA sind aufgrund des Inhibitionsmechanismus für VIVIT und INCA-6 calcineurinabhängige Off-Target-Effekte nur in geringem Ausmaß zu erwarten. Cyclosporin A führt zur Hemmung aller Calcineurin nachgeschalteten Signaltransduktionswege, womit eine NFAT-unabhängige Komponente beispielsweise

über NF- κ B nicht sicher ausgeschlossen werden kann.^{94,115} Für INCA-6 ist jedoch eine ausgesprochen zytotoxische Wirkung beschrieben, so dass NFAT-inhibitorische Konzentrationen in vitro meist letal sind.^{67,68} Als idealer Inhibitor kann VIVIT eingestuft werden, da er hochspezifisch die Aktivität von NFAT-Proteinen hemmt, ohne andere zelluläre Prozesse zu beeinflussen. Die Aufnahme des Moleküls in die Zelle unterliegt jedoch aufgrund der Molekülstruktur strengen Kontrollmechanismen.⁶⁷ Die in dieser Arbeit vorliegenden Daten suggerieren einen protektiven Effekt der spezifischen NFAT-Inhibition. Ein Mechanismus für diese Beobachtung kann aus den bisherigen Erkenntnissen zu NFAT-Inhibitoren in Kombination mit Chemotherapie nicht abgeleitet werden. Ein aggressiver Phänotyp einer CLL-Erkrankung ohne *NFAT2*-Expression ist jedoch bereits beschrieben worden.⁹⁶ Dies könnte eine mögliche Ursache dafür sein, dass die spezifische Inhibition von NFAT in MEC-1-Zellen zur Desensibilisierung für Ifoamid führt.

Welche Rollen die weiteren NFAT-Familienmitglieder in diesem Kontext spielen, ist jedoch weiterhin unklar. Eine genaue Differenzierung, welche NFAT-Isoform ursächlich ist, kann aufgrund der unspezifischen pharmakologischen Inhibition nicht getroffen werden.

Zusammenfassend suggerieren diese Daten, dass eine spezifische Inhibition von NFAT mit VIVIT zur vermehrten Chemotherapieresistenz führt. Im Gegensatz dazu wird bei einer Calcineurin/NFAT-Inhibition durch Cyclosporin A eine erhöhte zelluläre Zytotoxizität registriert. Demnach scheint eine Kombinationstherapie aus CsA und Ifoamid ein Ansatzpunkt zur Behandlung der CLL zu sein. Um einen molekularen Off-Target-Effekt (Calcineurin/NFAT) auszuschließen, ist in diesem Fall ein spezifischer genetischer Knock-down des zu untersuchenden Gens notwendig. Hiermit kann das Weiteren zwischen den einzelnen NFAT-Isoformen differenziert werden.

Mit einem Proof-of-principle gelang in MEC-1-Zellen erstmals ein spezifischer NFAT2-Knock-down mittels shRNA. Die reduzierte *NFAT2*-Expression war sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachweisbar. Zudem waren die MEC-1-Zellen trotz der genetischen Modifikation überlebensfähig und proliferierten weiterhin in vitro.

Eine genaue Charakterisierung ist noch ausstehend und aktuell Inhalt eines weiteren Forschungsprojektes. Aufgrund der bisherigen Ergebnisse von Bhattacharyya et al. in gesunden B-Zellen der Maus sind unterschiedliche Proliferation- und Apoptose-Eigenschaften zu erwarten.⁹⁷ Der genetische Knock-down von *NFAT2* ist auch auf die anderen Familienmitglieder mit entsprechenden Vektoren übertragbar.

Die Gruppe der NFAT-Familienmitglieder ist heterogen.^{43,116} Welche genaue Rolle die anderen NFAT-Familienmitgliedern oder NFAT2-Isoformen in der Pathogenese der CLL einnehmen, ist noch nicht ausreichend untersucht. Generell werden den NFAT-Transkriptionsfaktoren in B-Zellen und T-Zellen jedoch unterschiedliche Eigenschaften in Bezug auf die Zellproliferation und -apoptose zugeschrieben. Hierbei können die einzelnen Transkriptionsfaktoren gegensätzlichen Effekt haben. NFAT1 wirkt im Gegensatz zu NFAT2 eher antiproliferativ und proapoptotisch.^{116,117} Auf Grundlage der bereits erschienen Publikationen zu NFAT2 im Malignom¹⁰¹ konzentrierte sich diese Arbeit auf die Rolle von NFAT2 in der CLL. Die anderen NFAT-Mitglieder wurden nicht beleuchtet. Zudem wurden für NFAT2 im murinen und humanen Transkriptom unterschiedliche Isoformen beschrieben.^{45,48} Die meisten Erkenntnisse zur Funktion der einzelnen NFAT2-Isoformen entstanden aus Untersuchungen im Mausmodell. In diesem Zusammenhang ist insbesondere die kurze NFAT2-Isoform (NFAT2/A, ca. 700 aa) mit dem α N-Terminus in murinen T-Zellen und B-Zellen mit ihrer transkriptionellen Aktivität antiapoptotisch und proproliferativ.^{47,97,117,118} Lucena et al konnten mit Überexpression von NFAT2/A mit unterschiedlichem α und β N-Terminus einen gegensätzlichen Effekt in Bezug auf die Zellproliferation und Apoptose zeigen. So ist NFAT2/ β A pro-apoptotisch und anti-proliferativ.¹¹⁸ Zudem wäre anzunehmen, dass in einer Zelle mit anhaltender BCR-Stimulierung¹¹⁹ eine vermehrte Expression des α N-Terminus über den P1 Promotor erfolgt. Dies sollte zu mehr an kurzer Isoform führen.¹²⁰

Neben dem unterschiedlichen N-Terminus findet sich auch ein Unterschied im C-Terminus der NFAT2-Isoformen. Insbesondere die langen NFAT2-Isoformen können aufgrund ihrer zusätzlichen Transaktivierungsdomäne (TAD) mit zwei zusätzlichen Sumoylierungsmotiven mit anderen Transkriptionspartnern die Genregulation steuern.^{49,50} Dies scheint insbesondere bei der CLL-Erkrankung ein interessanter Ansatzpunkt zu sein.

Die experimentelle Abgrenzung zwischen den einzelnen Isoformen gelingt nicht gänzlich. Aktuell kommerziell erwerbbarer NFAT2-Antikörper können den Unterschied zwischen dem N-Terminus der einzelnen NFAT2-Isoformen nicht darlegen. Die N-Termini (α oder β) können theoretisch mittels sequenzspezifischer Primer voneinander abgegrenzt werden. Durch die unterschiedliche Länge können die NFAT2 Isoformen über die Banden auf dem Western Blot voneinander differenziert werden. Zudem konnte in dieser Arbeit mit exonspezifischen Primern eine Differenzierung zwischen

den längeren Isoformen und der kurzen NFAT2/A-Isoform erfolgen. Durch Begrenzungen im Primer-Design kann eine sichere Differenzierung zwischen den beiden längeren Isoformen mittels qRT-PCR nicht erfolgen.

Da die Daten zum α und β N-Terminus bisher nur aus Daten von humanen T-Zellen und murinen B-Zellen stammen (gegensätzliche Gen-Regulationseigenschaften)⁹⁷, wurde versucht die differentielle Expression der NFAT2-Isoformen mit unterschiedlichem C-Terminus darzustellen, da hier Modifikationen durch die TAD-Regulationsdomäne möglich sind und die kurze NFAT2/ α A Isoform als induzierbar gilt. Die vorliegenden Untersuchungen dieser Arbeit konnten zeigen, dass die längeren Isoformen NFAT2/B und NFAT2/C in CLL-Patienten im Vergleich zu den kurzen Isoformen signifikant höher exprimiert sind. Dies ist interessant, da den längeren Isoformen eher antiproliferative und proapoptische Eigenschaften zugeschrieben werden.^{45,47,97} Dies steht somit in Teilen im Gegensatz zu dem Grundbaustein der molekularen Eigenschaften der CLL, welcher sich durch einen Apoptosedefekt kennzeichnet. Dieser wird maßgeblich über Bcl-2 vermittelt und dient als Ansatzpunkt der modernen CLL-Therapie.^{6,121} Muzio et al. beschrieben einen CLL-Phänotyp mit konstitutiv-aktiver Kinase MAP-Kinase und transloziertem NFAT ohne AKT-Aktivierung als anergen CLL-Phänotyp.¹²² Der AKT-Signalweg reguliert unter anderem die Induktion von Apoptose in Tumorzellen.^{123,124} Eine mögliche Erklärung für die hier gezeigten Daten wäre, dass die antiproliferativen Regulationseigenschaften der langen NFAT2-Isoformen stärker ausgeprägt sind als die proapoptischen Eigenschaften. Dies entspricht auch dem langsamen klinischen Verlauf der CLL-Erkrankung. Eine erhöhte NFAT2-Expression scheint einen protektiven Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung zu nehmen, da insbesondere der Anteil an längeren NFAT2-Isoformen signifikant erhöht ist.

Um diesen Effekt erstmals in humanen Zellen zu bestätigen, gelang es mit dem shRNA-Knock-down über unterschiedliche *NFAT2*-spezifische shRNAs eine Deletion der Isoformen NFAT2/B und NFAT2/C zu erreichen. Hiermit gelang es, einen MEC-1-Klon zu generieren, welcher lediglich die kurze NFAT2/A-Isoform exprimierte. Weitere Untersuchungen in vitro und im Mausmodell sollen zeigen, ob der postulierte Effekt der unterschiedlichen NFAT2-Isoformen auch in humanen B-Zellen besteht.

Die heterogene Expression von *NFAT2* innerhalb des CLL-Patientenkollektivs wurde bisher noch nicht mit klinischen Parametern korreliert. Die im Rahmen dieser Untersuchung gewonnenen Patientenproben umschließen ein relativ selektiertes

Patientenkollektiv. Die Altersverteilung ist repräsentativ für das durchschnittliche Erkrankungsalter, jedoch kann der Bias durch das monozentrische, universitäre Patientenkollektiv nicht vernachlässigt werden. Tendenziell finden sich in universitärer Behandlung eher Patienten mit komplexeren Krankheitsbildern. Die Begleiterkrankungen der einzelnen Patienten wurden in dieser Untersuchung nicht beachtet. Des Weiteren fehlen bei einem Teil der Patienten die Daten zu etablierten prognostischen Markern wie ZAP70, CD38 und *IgHV*-Mutationsstatus.⁷⁷ Es muss des Weiteren beachtet werden, dass sich die Patienten im Patientenkollektiv zum Entnahmezeitpunkt in unterschiedlichen Stadien der Erkrankung befanden. Da das Patientenkollektiv zu klein und der Datensatz zu unvollständig für eine Multivarianzanalyse ist, erfolgte die Einteilung in die beiden Patientenkohorten nach den in *Kapitel 3.2.1* genannten Charakteristika. Die Kriterienauswahl erfolgte auf Grundlage der in der Literatur beschriebenen Eigenschaften einer indolent verlaufenden CLL-Erkrankung.^{11,125} Dies findet sich mit der vorgenommenen Einteilung im progressionsfreien Überleben und im Gesamtüberleben wieder. Anhand dieser Einteilung wurde nun Korrelation mit der *NFAT2* Expression in beiden Patientenkollektiven durchgeführt.

In dieser Arbeit unterscheidet sich die indolente CLL-Erkrankung signifikant in ihrer *NFAT2*-Expression von der aggressiven Kohorte. Die erhöhte Expression von *NFAT2* in der indolenten Erkrankung scheint Teil des anergen Phänotyps der CLL-Zellen dieser Patienten zu sein. Frühere Studien beschrieben bereits einen Zusammenhang der *NFAT2*-Expression mit der MAPK/ERK-Aktivierung als anergen Phänotyp.¹²² Hier führt eine Stimulierung des BCR zu keiner nachgeschalteten Signalkaskade. Der BTK-Inhibitor Ibrutinib wirkt genau im Bereich dieser Signalkaskade und verhindert eine Weiterleitung der Rezeptorstimulation.¹²⁶

Wichtig ist es sicherlich zu untersuchen, wie sich die *NFAT2*-Expression unter Inhibition des BCR-Signalweges mit Ibrutinib verhält. Das soll in weiteren Experimenten außerhalb dieser Arbeit untersucht werden.

Von Interesse ist in diesem Zusammenhang auch die Verteilung der *NFAT2*-Isoformen in den beiden Patientenkohorten. Aufgrund der in dieser Untersuchung erhobenen Daten kann keine Aussage getroffen werden, ob ein Unterschied zwischen den beiden CLL-Kohorten besteht. Es ist dennoch möglich, dass die proliferative und antiapoptotische *NFAT2/A*-Isoform in der aggressiven CLL-Kohorte vermehrt exprimiert wird. Diese kann entweder konstitutiv erhöht sein oder nach Stimulation des B-Zell-Rezeptors (BCR) über den Autoloop-Mechanismus hochreguliert werden.^{45,75} Ob

die bereits oben genannten Charakterisierungen der NFAT2-Isoformen auf das humane Modell übertragbar sind, ist demnach aktuell noch unklar. Weitere Untersuchungen am shMEC-1-NFAT2-Knock-down-Modell werden dieser Frage nachgehen.

Neben den unterschiedlichen Expressionsmustern in beiden Patientenkohorten konnte diese Arbeit auch für die NFAT2-Translokation einen signifikanten Unterschied zeigen. In der Patientenkohorte mit einer aggressiv verlaufenden Erkrankung ist der Anteil an nukleärem NFAT2 bereits ohne Behandlung mit anti-IgM signifikant erhöht.

Von weiterem Interesse wären Untersuchungen hinsichtlich einer Verschiebung der NFAT2 Lokalisation nach Stimulation der CLL ex vivo. Eine Stimulation des B-Zell-Rezeptors sollte bei einem stimulierbaren BCR-Signalweg, wie in einer aggressiv verlaufenden CLL Erkrankung, einen Ca^{2+} -Einstrom induzieren und schließlich NFAT in den Nukleus translozieren.⁷⁵ Bei anergen CLL-Zellen sollte sich hingegen der nukleäre NFAT-Anteil nicht signifikant verändern. Die im Rahmen der in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen, dass ein Teil des anergen Phänotyps der CLL-Zelle eine erhöhte NFAT2-Expression zu sein scheint bei zeitgleich vermindert nukleärer NFAT2-Translokation. Dies ist im Gegensatz zu CLL-Zellen mit aggressiv verlaufendem Phänotyp zu sehen.

Eine erhöhte NFAT2-Translokation sollte mit einer erhöhten Transkription bekannter Zielgene von NFAT2 assoziiert sein. In anderen Arbeiten konnte die NFAT2-DNA-Bindungsaktivität bei der CLL beschrieben werden. So ist NFAT2 in der Lage, sich nach nukleärer Translokation in CLL-Zellen an die DNA zu binden und damit Genregulation einzuleiten.⁷⁵ Aufgrund seines strukturellen Aufbaus kann der Transkriptionsfaktor NFAT2 mit unterschiedlichen anderen Transkriptionsfaktoren kooperieren und die Transkription verschiedener Zielgene regulieren. Bekannte Kofaktoren sind NFAT selbst, AP-1- und GATA-Proteine.¹²⁷ Auf Grundlage der Daten einer Microarray-Analyse von Bhattacharyya et al. wurden verschiedene NFAT2-Zielgene in B Zellen ausgewählt.⁹⁷ In dieser Arbeit konnte auf mRNA-Ebene ein hochsignifikanter Unterschied in der Expression der bekannten NFAT2-Zielgene (*PDCD1*, *SPP1* und *TNFSF4*) in der aggressiven Patientenkohorte gezeigt werden. Dies ist ein erster Anhaltspunkt für ein NFAT2-Mistargeting in der CLL (*Abbildung 36*). Hierfür spricht auch, dass der Autoloop-Mechanismus gestört erscheint, da die aggressive Patientenkohorte in unserem Patientenkollektiv weniger NFAT2 exprimiert. Die Ursache dieses Mistargeting ist unklar und konnte hier nicht abschließend geklärt

werden. Möglicherweise werden andere Bindungspartner genutzt, oder NFAT2 bindet nur noch als Homodimer an die DNA. Eine weitere Erklärung könnten epigenetische Veränderungen auf DNA-Ebene sein. Es konnten bereits für die CLL in mehreren Arbeiten veränderte Methylierungsmuster gezeigt werden.¹⁰² Die örtliche Nähe zur DNA ist zwar essentiell für eine Transkription der Zielgene, aber der Methylierungszustand des Bindungsmotivs der DNA limitiert die transkriptionelle Aktivität von NFAT2. Methylierte Promotoren können selbst durch einen translozierten Transkriptionsfaktor nicht gebunden werden. In malignen Zellen sind Promotoren der Onkogene eher hypomethyliert und Tumorsuppressorgene eher hypermethyliert.^{128,129} Bessere Untersuchungen, um diese Fragestellung zu beantworten, wären ein EMSA oder ein ChIP-Sequenzierung. Leider gelang es in eigenen Versuchen nicht, ein Protokoll für eine ChIP-Sequenzierung zu etablieren. Dies soll Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

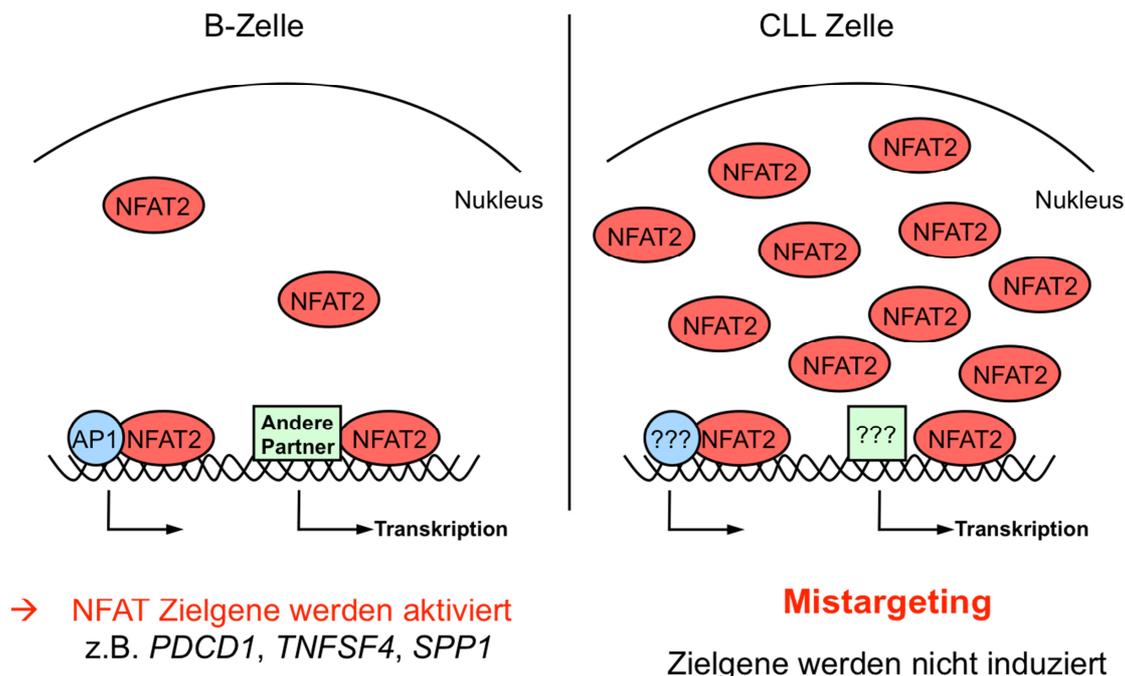


Abbildung 35: Hypothese zur NFAT2-Transkriptionsaktivität in der CLL

NFAT2 bindet in gesunden B-Zellen nach Translokation in den Nucleus mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren (bspw. AP-1) an die DNA und reguliert die Transkription. In CLL Zellen ist dies gestört, so dass die Genregulation verändert wird.

Weitere mögliche neue Targets konnten in der Arbeit von Maerklin et al. beschrieben werden. Hier konnte mittels RNA Microarray-Analyse *LCK* als neues NFAT2-Target beschrieben werden.⁹⁶ Die Tyrosinkinase *LCK* übernimmt insbesondere in T-Zellen eine wichtige Funktion.¹³⁰ Maerklin et al. konnten zeigen, dass CLL-Patienten über eine unterschiedliche Expression von *LCK* je nach NFAT2-Expression verfügen.⁹⁶ Dieses Gen scheint ein möglicher Vermittler der Anergie in B-Zellen zu sein.

In der gleichen Arbeit führte im TCL1-Mausmodell der B-Zell-spezifische Knockout von NFAT2 zur Akzeleration der CLL-Erkrankung und imponierte klinisch und histologisch wie eine Richter-Transformation. Passend zum TCL1-*Nfat2*^{-/-}-Mausmodell von Maerklin et al. wird auch in Gewebeproben von Patienten mit Richter-Transformation weniger *NFAT2* exprimiert.

Die Rolle des Transkriptionsfaktor NFAT2 begünstigt somit insbesondere den anergen Phänotyp der CLL-Erkrankung. Ein Verlust, die Reduktion des Expressionsmusters oder ein *NFAT2-Mistargeting* führt zur Akzeleration der CLL Erkrankung. Der genaue

Mechanismus ist vielschichtig. Vor allem die fehlende Regulation anergievermittelnder Gene trägt vermutlich einen entscheidenden Anteil zum Phänotyp bei. Hier sind noch weitere Analysen notwendig, um mögliche Zielstrukturen neuer Therapieansätze zu definieren. Eine Inhibition von NFAT2 mittels entsprechender Inhibitoren scheint auf Grundlage dieser Daten als klinische Anwendung nicht sinnvoll zu sein.

4.2. Fazit und Ausblick

Mit dieser Arbeit konnte ein neuer Blickwinkel auf die Rolle von NFAT2 in der chronisch lymphatischen Leukämie eröffnet werden. Die Relevanz von NFAT2 konnte in dieser Arbeit erneut bestätigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor NFAT2 in der chronisch lymphatischen Leukämie im größten Teil der Patienten deutlich überexprimiert ist. Erstmals wurde hier die genaue Funktion des Transkriptionsfaktor NFAT2 auf die Proliferation von leukämischen Zellen (MEC-1) untersucht. So konnte durch eine Inhibition des Calcineurin/NFAT-Signalweges mit CsA eine erhöhte Sensibilisierung für eine zytostatische Behandlung erreicht werden. Interessanterweise konnte bei einer Inhibition des Calcineurin/NFAT-Signalweges mit dem spezifischeren VIVIT-Peptid dieses Ergebnis nicht bestätigt werden. Die Divergenz dieser Ergebnisse führte dazu, dass, um insbesondere die Relevanz des Familienmitglieds NFAT2 für die CLL zu eruieren, ein shRNA-*NFAT2*-Knock-down in MEC-1-Zellen etabliert wurde. Hier konnte zudem erstmals ein spezifischer Knock-down der in humanen T-Zellen beschriebenen NFAT2-Isoformen mit unterschiedlichen regulatorischen Eigenschaften erfolgen.⁴⁵ Die Relevanz der unterschiedlichen NFAT2-Isoformen spiegelt sich auch in primären CLL-Zellen wider. So findet sich bei der Mehrheit der CLL-Zellen eine erhöhte Expression der antiproliferativen Isoformen. Die tatsächliche Bedeutung von NFAT2 in der CLL wird durch die erhöhte nukleäre NFAT2-Translokation unterstrichen.

Von besonderer Relevanz ist diese Arbeit im Hinblick auf die Einstufung des klinischen Phänotyps der Erkrankung im Vergleich zur *NFAT2*-Expression. Erstmals konnte hier gezeigt werden, dass eine Assoziation mit dem Verlauf der Erkrankung und der NFAT2-Expression besteht. So ist eine indolente CLL-Erkrankung durch eine erhöhte

NFAT2-Expression charakterisiert. Dies deutet erstmals auf eine pathogenetische und prognostische Relevanz von NFAT2 hin. Im Gegensatz dazu findet sich in der aggressiven Erkrankung NFAT2 vor allem nuklear transloziert bei gleichzeitig reduzierter Expression. Diese Ergebnisse werden durch eine verminderte NFAT2-Expression in der Richter-Transformation unterstützt. In weiteren Untersuchungen konnte an durch NFAT2 regulatorisch beeinflussten Genen ein Mistargeting in der aggressiven CLL Patientenkohorte dargelegt werden.

Zusammenfassend kann auf Grundlage der bisher gewonnenen Daten aktuell keine Empfehlung zur therapeutischen Inhibition von NFAT2 in der CLL gegeben werden. Die hier erzielten Ergebnisse scheinen im Gegenteil einen protektiven Effekt einer erhöhten NFAT2-Expression auf die Erkrankung zu bestätigen. Wenn es jedoch zu einem NFAT2-Mistargeting kommt, ist die Erkrankung nicht mehr indolent, sondern wird aggressiv. Dies dient auch als mögliche Erklärung der divergenten Ergebnisse einer Calcineurin/NFAT-Inhibition bei den analysierten MEC-1 Zellen. Hier werden weitere Untersuchungen notwendig sein, um abschließend die Relevanz des NFAT2-Transkriptionsfaktors als therapeutisches Target zu bewerten.

Mögliche Ansatzpunkte sollen in Zukunft insbesondere im shMEC-1-Knock-down-Modell untersucht und im Verlauf auch auf primäre CLL-Zellen übertragen werden. Ein weiterer Schwerpunkt wird auf der Untersuchung der NFAT-Zielgene liegen, da das Mistargeting noch nicht genau verstanden ist und näher untersucht werden sollte. Welche Rolle die NFAT2-Isoformen und ihre differentielle Expression in der CLL bei der Genregulation spielen, soll sowohl im shMEC-1-Modell als auch an primären CLL-Zellen mit beispielweise ChIP-Assay näher beleuchtet werden. Möglicherweise können durch die Untersuchung verschiedener CLL-Kohorten so neue Therapieansätze gefunden und die Therapie der CLL damit verbessert werden. So kann insbesondere in der aggressiven CLL-Erkrankung mit putativem NFAT2-Mistargeting eine NFAT/Calcineurin-Inhibition als therapeutische Intervention potentiell sinnvoll sein.

5. Zusammenfassung

Die chronisch lymphatische Leukämie (CLL) ist die häufigste Leukämieform in der westlichen Hemisphäre und eine kurative Behandlung ist bis heute nur mittels allogener Stammzelltransplantation möglich. Klassischerweise bestand die Therapie der CLL aus einer Chemoimmuntherapie. In den letzten Jahren hat allerdings die Bedeutung sogenannter Small Molecules in der Behandlung stark zugenommen. Als wichtiger Signalweg in der CLL konnte in den letzten Jahren der Calcineurin/NFAT-Signalweg charakterisiert werden. Die Familie der NFAT-Proteine umfasst fünf Familienmitglieder, NFAT1-5, wobei in dieser Arbeit die Rolle von NFAT2 in der CLL näher beleuchtet wird.

Hierfür wurden In vitro-Modelle mit den CLL-Zelllinien MEC-1 und JVM-3 unter therapeutischer Modulation des NFAT-Signalweges durch Kombinationsbehandlungen von klassischen Chemotherapeutika mit Calcineurin-Inhibitoren (CsA) oder NFAT-Inhibitoren (VIVIT Peptid, INCA-6) verwendet. Durch eine synergistische Wirkung von Chemotherapie und Calcineurin-Inhibitor konnte NFAT als therapeutisches Target in der CLL definiert werden. Zudem gelang erstmals die Etablierung eines NFAT2 shRNA-Knock-down-Systems in einer CLL-Zelllinie zur spezifischen Analyse der Rolle von NFAT2.

Die NFAT2-Überexpression auf mRNA- und Proteinebene in primären CLL-Zellen korreliert zudem klar mit indolent verlaufenden Erkrankungen, wohingegen aggressive Verläufe, wie beispielsweise das Richter-Syndrom, eine deutlich verminderte NFAT2-Expression aufwiesen. Die funktionelle Aktivität konnte durch eine konstitutive Aktivierung von NFAT2 mit der verstärkten Translokation in den Nukleus, vor allem bei aggressiven Erkrankungsverläufen, gezeigt werden. Jedoch führt die verstärkte Translokation von NFAT2 bei vielen CLL-Patienten entgegen der Erwartung nicht zur Induktion bekannter NFAT-Zielgene, wodurch hier die Hypothese eines transkriptionellen *Mistargeting* von NFAT2 bei der CLL formuliert werden konnte.

Der Stellenwert dieser Arbeit markiert neue Einblicke in die Rolle des Transkriptionsfaktors NFAT2. Der Ca²⁺/NFAT2-Signalweg ist konstitutiv aktiviert in der indolenten CLL. Die Hypothese des NFAT2-Mistargeting in der CLL, die durch fehlende NFAT-Zielgen-Induktion trotz Translokation gestützt wird, macht NFAT2 als therapeutisches Target interessant

6. Anhang

6.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Altersspezifische Inzidenzrate der chronisch lymphatischen Leukämie im Jahr 2011.....	7
Abbildung 2: First-line-Therapieschema der chronisch lymphatischen Leukämie nach den aktuellen Leitlinien	11
Abbildung 3: Schematischer Aufbau der NFAT Transkriptionsfaktoren	16
Abbildung 4: Schematische Darstellung des humanen NFAT2-Transkriptoms.....	18
Abbildung 5: Western Blot von NFAT2-Isoformen.....	19
Abbildung 6: Ca ²⁺ /NFAT Signalweg in der B-Zelle	21
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Angriffspunkte im Ca ²⁺ /NFAT-Signalweg	23
Abbildung 8: Chemische Struktur von Cyclosporin A	24
Abbildung 9: Schematische Darstellung der VIVIT Aminosäuren Sequenz	25
Abbildung 10: Chemische Struktur von INCA-6.....	25
Abbildung 11: Schematische Darstellung der Funktionsweise des Cell Titer Glo Assays von Promega.	38
Abbildung 12: Schematische Darstellung des verwendeten pLKO.1 Vektors.....	40
Abbildung 13: Optimierung der MACS Beads-Technologie.....	44
Abbildung 14: NFAT2 Expression in den Zelllinien MEC-1 und JVM-3.....	55
Abbildung 15: Induktion und Inhibition der nukleären Translokation von NFAT2.....	57
Abbildung 16: Effekt der NFAT2-Inhibition auf das Wachstum von MEC-1-Zellen.....	59
Abbildung 17: Fa-CI Plot.....	61
Abbildung 18: NFAT2 shRNA-Knock-down in MEC-1 Zellen.....	63
Abbildung 19: Schematische Darstellung des NFAT2-Knock-downs.....	63
Abbildung 20: Einteilungskriterien.....	65
Abbildung 21: Progressionsfreies und Gesamtüberleben der unterschiedlichen Patientenkohorten.....	67
Abbildung 22: NFAT2-mRNA-Expression in CLL-Patienten	69
Abbildung 23: mRNA-Expression der NFAT2-Isoformen in der CLL	70
Abbildung 24: NFAT2-Proteinexpression in CLL-Patienten.....	72
Abbildung 25: NFAT2-mRNA-Expression in unterschiedlichen CLL-Patientenkohorten	73
Abbildung 26: NFAT2-Proteinexpression in unterschiedlichen Patientenkohorten	74
Abbildung 27: NFAT2-Lokalisation in B-Zellen.....	76
Abbildung 28: NFAT2-Lokalisation in CLL Patienten.....	77
Abbildung 29: Quantitative Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung in CLL-Patienten	78
Abbildung 30: Western Blot für die Zytoplasma-Nukleus-Verteilung von NFAT2 in CLL-Patienten	79
Abbildung 31: Zytoplasma-Nukleus-Verteilung von NFAT2 in CLL-Patienten	80
Abbildung 32: Zytoplasma-Nukleus-Verteilung von NFAT2 in unterschiedlichen Patientenkohorten.....	81
Abbildung 33: Expression verschiedener NFAT2-Zielgene in der aggressiven CLL-Kohorte.....	82
Abbildung 34: NFAT2 Expression in der Richter-Transformation	83
Abbildung 35: Hypothese zur NFAT2-Transkriptionsaktivität in der CLL	95

6.2. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Auflistung der Diagnosekriterien</i>	9
<i>Tabelle 2: Binet-Klassifikation</i>	9
<i>Tabelle 3: Empfehlung zur Therapieeinleitung</i>	10
<i>Tabelle 4: CLL-IPI-Score</i>	13
<i>Tabelle 5: Modifikation des MACS beads Isolationskits</i>	45
<i>Tabelle 6: Zusammenfassung der klinische Parameter der CLL-Patienten</i>	66
<i>Tabelle 7: Klinische und prognostische Parameter beider Patientenkohorten</i>	68

7. Literaturverzeichnis

1. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood* 1997;89:3909-18.
2. Hodgkin T. On some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen. *Med Chir Trans* 1832;17:68-114.
3. Virchow R. Weisses Blut. *Natur- und Heilkunde* 1845;36:151-6.
4. Swerdlow SH CE, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues 2018.
5. Altersspezifische Inzidenzrate der chronisch lymphatischen Leukämie. 2011. at <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/chronische-lymphatische-leukaemie-cll/@@view/html/index.html>.)
6. Packham G, Stevenson FK. Bodyguards and assassins: Bcl-2 family proteins and apoptosis control in chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology* 2005;114:441-9.
7. Loeder S, Zenz T, Schnaiter A, et al. A novel paradigm to trigger apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* 2009;69:8977-86.
8. Burger JA, Gribben JG. The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: insight into disease biology and new targeted therapies. *Semin Cancer Biol* 2014;24:71-81.
9. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 2008;111:5446-56.
10. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood* 2018;131:2745-60.
11. Guarini AC, G.; Mauro, F.R. Chronic lymphocytic leukemia patients with highly stable and indolent disease show distinctive phenotypic and genotypic features. *Blood* 2003;102:1035-41.
12. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981;48:198-206.
13. Kalil NC, B.D. Chronic lymphocytic leukemia. *The Oncologist* 1999;4:352-69.

14. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF). Interdisziplinäre S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge für Patienten mit einer chronischen lymphatischen Leukämie, Langversion 0.1, (Konsultationsfassung) 2017, AWMF Registernummer: 018-032OL 21.02.2018.
15. Stilgenbauer S, Zenz T. Understanding and managing ultra high-risk chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2010;2010:481-8.
16. de Rooij MF, Kuil A, Geest CR, et al. The clinically active BTK inhibitor PCI-32765 targets B-cell receptor- and chemokine-controlled adhesion and migration in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012;119:2590-4.
17. Herman SE, Gordon AL, Hertlein E, et al. Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood* 2011;117:6287-96.
18. Song Z, Lu P, Furman RR, et al. Activities of SYK and PLCgamma2 predict apoptotic response of CLL cells to SRC tyrosine kinase inhibitor dasatinib. *Clin Cancer Res* 2010;16:587-99.
19. Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, et al. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2014;370:997-1007.
20. Damle RNW, T.; Fais, F.; Ghiotto, F.; Valetto, A.; Allen, S.L.; Buchbinder, A.; Budman, D.; Dittmar, K.; Kolitz, J.; Lichtman, S.M.; Schulman, P.; Vinciguerra, V.P.; Rai, K.R.; Ferrarini, M.; Chiorazzi, N. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999.
21. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:1848-54.
22. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2001;194:1639-47.
23. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* 2003;101:4944-51.
24. Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, et al. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2004;351:893-901.
25. Crespo M, Bosch F, Villamor N, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2003;348:1764-75.
26. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000;343:1910-6.

27. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:15524-9.
28. Lavin MF. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:759-69.
29. Zenz T, Krober A, Scherer K, et al. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood* 2008;112:3322-9.
30. Lozanski G, Heerema NA, Flinn IW, et al. Alemtuzumab is an effective therapy for chronic lymphocytic leukemia with p53 mutations and deletions. *Blood* 2004;103:3278-81.
31. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *The Lancet Oncology* 2016;17:779-90.
32. Jamroziak K, Tadmor T, Robak T, Polliack A. Richter syndrome in chronic lymphocytic leukemia: updates on biology, clinical features and therapy. *Leuk Lymphoma* 2015;56:1949-58.
33. Parikh SA, Kay NE, Shanafelt TD. How we treat Richter syndrome. *Blood* 2014;123:1647-57.
34. Falchi L, Keating MJ, Marom EM, et al. Correlation between FDG/PET, histology, characteristics, and survival in 332 patients with chronic lymphoid leukemia. *Blood* 2014;123:2783-90.
35. Strati P, Keating MJ, O'Brien SM, et al. Outcomes of first-line treatment for chronic lymphocytic leukemia with 17p deletion. *Haematologica* 2014;99:1350-5.
36. Maddocks KJ, Ruppert AS, Lozanski G, et al. Etiology of Ibrutinib Therapy Discontinuation and Outcomes in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia. *JAMA Oncol* 2015;1:80-7.
37. Jain P, O'Brien S. Richter's transformation in chronic lymphocytic leukemia. *Oncology (Williston Park)* 2012;26:1146-52.
38. Shaw JP, Utz PJ, Durand DB, Toole JJ, Emmel EA, Crabtree GR. Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science* 1988;241:202-5.
39. Goodridge HS, Simmons RM, Underhill DM. Dectin-1 stimulation by *Candida albicans* yeast or zymosan triggers NFAT activation in macrophages and dendritic cells. *J Immunol* 2007;178:3107-15.
40. Crist SA, Sprague DL, Ratliff TL. Nuclear factor of activated T cells (NFAT) mediates CD154 expression in megakaryocytes. *Blood* 2008;111:3553-61.
41. Shukla U, Hatani T, Nakashima K, Ogi K, Sada K. Tyrosine phosphorylation of 3BP2 regulates B cell receptor-mediated activation of NFAT. *J Biol Chem* 2009;284:33719-28.

42. Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev* 2003;17:2205-32.
43. Muller MR, Rao A. NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age. *Nat Rev Immunol* 2010;10:645-56.
44. Vihma H, Pruunsild P, Timmusk T. Alternative splicing and expression of human and mouse NFAT genes. *Genomics* 2008;92:279-91.
45. Chuvpilo S, Avots A, Berberich-Siebelt F, et al. Multiple NF-ATc isoforms with individual transcriptional properties are synthesized in T lymphocytes. *J Immunol* 1999;162:7294-301.
46. Zerbino DR, Achuthan P, Akanni W, et al. Ensembl 2018. *Nucleic Acids Res* 2018;46:D754-D61.
47. Serfling E, Avots A, Klein-Hessling S, Rudolf R, Vaeth M, Berberich-Siebelt F. NFATc1/alphaA: The other Face of NFAT Factors in Lymphocytes. *Cell Commun Signal* 2012;10:16.
48. Chuvpilo S, Zimmer M, Kerstan A, et al. Alternative polyadenylation events contribute to the induction of NF-ATc in effector T cells. *Immunity* 1999;10:261-9.
49. Nayak A, Glockner-Pagel J, Vaeth M, et al. Sumoylation of the transcription factor NFATc1 leads to its subnuclear relocalization and interleukin-2 repression by histone deacetylase. *J Biol Chem* 2009;284:10935-46.
50. Avots A, Buttmann M, Chuvpilo S, et al. CBP/p300 integrates Raf/Rac-signaling pathways in the transcriptional induction of NF-ATc during T cell activation. *Immunity* 1999;10:515-24.
51. Serfling E, Chuvpilo S, Liu J, Hofer T, Palmetshofer A. NFATc1 autoregulation: a crucial step for cell-fate determination. *Trends Immunol* 2006;27:461-9.
52. NFATc1 transcript table. Ensemble genome browser, 2018. (Accessed 04.02.2018, 2018, at https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000131196;r=18:79395856-79529325.)
53. Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC, Healy JI. Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature* 1997;386:855-8.
54. Blumberg PM. Protein kinase C as the receptor for the phorbol ester tumor promoters: sixth Rhoads memorial award lecture. *Cancer Res* 1988;48:1-8.
55. Liu CH, T. E. Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. *J Biol Chem* 1978;253:5892-4.
56. Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stahelin H. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions* 1976;6:468-75.

57. Chaudhuri BH, M.; Furst, P. The interaction between the catalytic A subunit of calcineurin and its autoinhibitory domain, in the yeast two-hybrid system, is disrupted by cyclosporin A and FK506. *FEBS Lett* 1995;357:221-6.
58. McCaffrey PG, Kim PK, Valge-Archer VE, Sen R, Rao A. Cyclosporin A sensitivity of the NF-kappa B site of the IL2R alpha promoter in untransformed murine T cells. *Nucleic Acids Res* 1994;22:2134-42.
59. Meyer SK, N. G.; Joly, A. Cyclosporine A is an uncompetitive inhibitor of proteasome activity and prevents NF-kappaB activation. *FEBS Lett* 1997;413:354-8.
60. Taylor AL, Watson CJ, Bradley JA. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005;56:23-46.
61. Naesens MK, D. R.; Sarwal, M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;4:481-508.
62. Brandt C, Pavlovic V, Radbruch A, Worm M, Baumgrass R. Low-dose cyclosporine A therapy increases the regulatory T cell population in patients with atopic dermatitis. *Allergy* 2009;64:1588-96.
63. Cyclosporin A. Sigma Alderich, 2018. (Accessed 04.02.2018, 2018, at <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/cefillian/c104?lang=de®ion=DE.>)
64. Feske S, Okamura H, Hogan PG, Rao A. Ca²⁺/calcineurin signalling in cells of the immune system. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;311:1117-32.
65. Aramburu JY, M. B.; Lopez-Rodriguez, C.; Cantley, L. C.; Hogan, P. G.; Rao, A. Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin A. *Science* 1999;285:2129-33.
66. Noguchi H, Matsushita M, Okitsu T, et al. A new cell-permeable peptide allows successful allogeneic islet transplantation in mice. *Nat Med* 2004;10:305-9.
67. Kang S, Li H, Rao A, Hogan PG. Inhibition of the calcineurin-NFAT interaction by small organic molecules reflects binding at an allosteric site. *J Biol Chem* 2005;280:37698-706.
68. Roehrl MH, Kang S, Aramburu J, Wagner G, Rao A, Hogan PG. Selective inhibition of calcineurin-NFAT signaling by blocking protein-protein interaction with small organic molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:7554-9.
69. Kang TY, Lee HS, Kim TH, Jun JB, Yoo DH. Clinical and genetic risk factors of herpes zoster in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 2005;25:97-102.
70. Jauliac S, Lopez-Rodriguez C, Shaw LM, Brown LF, Rao A, Toker A. The role of NFAT transcription factors in integrin-mediated carcinoma invasion. *Nat Cell Biol* 2002;4:540-4.

71. Flockhart RJ, Armstrong JL, Reynolds NJ, Lovat PE. NFAT signalling is a novel target of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *Br J Cancer* 2009;101:1448-55.
72. Buchholz M, Schatz A, Wagner M, et al. Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca²⁺/calcineurin signaling pathway. *EMBO J* 2006;25:3714-24.
73. Gregory MA, Phang TL, Neviani P, et al. Wnt/Ca²⁺/NFAT signaling maintains survival of Ph⁺ leukemia cells upon inhibition of Bcr-Abl. *Cancer Cell* 2010;18:74-87.
74. Medyouf H, Alcalde H, Berthier C, et al. Targeting calcineurin activation as a therapeutic strategy for T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med* 2007;13:736-41.
75. Le Roy C, Deglesne PA, Chevallier N, et al. The degree of BCR and NFAT activation predicts clinical outcomes in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012;120:356-65.
76. Marafioti T, Jones M, Facchetti F, et al. Phenotype and genotype of interfollicular large B cells, a subpopulation of lymphocytes often with dendritic morphology. *Blood* 2003;102:2868-76.
77. Deglesne PA, Chevallier N, Letestu R, et al. Survival response to B-cell receptor ligation is restricted to progressive chronic lymphocytic leukemia cells irrespective of Zap70 expression. *Cancer Res* 2006;66:7158-66.
78. Kurtova AV, Balakrishnan K, Chen R, et al. Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance. *Blood* 2009;114:4441-50.
79. Purroy N, Abrisqueta P, Carabia J, et al. Co-culture of primary CLL cells with bone marrow mesenchymal cells, CD40 ligand and CpG ODN promotes proliferation of chemoresistant CLL cells phenotypically comparable to those proliferating in vivo. *Oncotarget* 2015;6:7632-43.
80. Melo JV, Foroni L, Brito-Babapulle V, Luzzatto L, Catovsky D. The establishment of cell lines from chronic B cell leukaemias: evidence of leukaemic origin by karyotypic abnormalities and Ig gene rearrangement. *Clin Exp Immunol* 1988;73:23-8.
81. Stacchini A, Aragno M, Vallario A, et al. MEC1 and MEC2: two new cell lines derived from B-chronic lymphocytic leukaemia in polymphocytoid transformation. *Leuk Res* 1999;23:127-36.
82. Kim DH, Rossi JJ. Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat Rev Genet* 2007;8:173-84.
83. Stram Y, Kuzntzova L. Inhibition of viruses by RNA interference. *Virus Genes* 2006;32:299-306.
84. Carrington JC, Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* 2003;301:336-8.

85. Saumet A, Lecellier CH. Anti-viral RNA silencing: do we look like plants? *Retrovirology* 2006;3:3.
86. Pratt AJ, MacRae IJ. The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine. *J Biol Chem* 2009;284:17897-901.
87. Graham FLS, J.; Russell, W. C.; Nairn, N. Characteristics Of a human cell line transformed by dna from humanadenovirustyp. *JGenVirol* 1977;36:5974.
88. Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 1984;22:27-55.
89. CellTiter-Glo® Luminescent Assay Chemistry. Promega, 2018. (Accessed 05.02.2018, 2018, at https://www.promega.de/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter_glo-luminescent-cell-viability-assay/?catNum=G7570.)
90. Map of pLKO.1. Addgene, 2018. (Accessed 05.02.2018, 2018, at <http://www.addgene.org/tools/protocols/plko/>.)
91. Moffat J, Grueneberg DA, Yang X, et al. A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high-content screen. *Cell* 2006;124:1283-98.
92. Kurosaki T, Shinohara H, Baba Y. B cell signaling and fate decision. *Annu Rev Immunol* 2010;28:21-55.
93. Biagi JJ, Herbert KE, Smith C, et al. A phase II study of dexamethasone, ifosfamide, cisplatin and etoposide (DICE) as salvage chemotherapy for patients with relapsed and refractory lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2005;46:197-206.
94. Sieber M, Baumgrass R. Novel inhibitors of the calcineurin/NFATc hub - alternatives to CsA and FK506? *Cell Commun Signal* 2009;7:25.
95. Chou TC. Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. *Pharmacol Rev* 2006;58:621-81.
96. Maerklin M, Heitmann JS, Fuchs AR, et al. NFAT2 is a critical regulator of the anergic phenotype in chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Commun* 2017;8:755.
97. Bhattacharyya SD, J.; Patra, A. K. ; Thuy Pham, D. A. , Chen, W.; Vaeth, M; Berberich-Siebelt ,F; Klein-Hessling, S; Lamperti, ED; Reifenberg K; Jellusova J; Schweizer A; Nitschke L; Leich E.; Rosenwald A.; Brunner C.; Engelmann S.; Bommhardt U.; Avots A.; Müller MR.; Kondo E.; Serfling E. NFATc1 affects mouse splenic B cell function by controlling the calcineurin--NFAT signaling network. *Journal of Experimental Medicine* 2011;208:823-39.
98. Tripathi MK, Deane NG, Zhu J, et al. Nuclear factor of activated T-cell activity is associated with metastatic capacity in colon cancer. *Cancer Res* 2014;74:6947-57.

99. Schuh K, Avots A, Tony HP, Serfling E, Kneitz C. Nuclear NF-ATp is a hallmark of unstimulated B cells from B-CLL patients. *Leuk Lymphoma* 1996;23:583-92.
100. Kneitz C, Goller M, Tony H, et al. The CD23b promoter is a target for NF-AT transcription factors in B-CLL cells. *Biochim Biophys Acta* 2002;1:41-7.
101. Marafioti T, Pozzobon M, Hansmann ML, et al. The NFATc1 transcription factor is widely expressed in white cells and translocates from the cytoplasm to the nucleus in a subset of human lymphomas. *Br J Haematol* 2005;128:333-42.
102. Pei L, Choi JH, Liu J, et al. Genome-wide DNA methylation analysis reveals novel epigenetic changes in chronic lymphocytic leukemia. *Epigenetics* 2012;7:567-78.
103. Nedellec S, Renaudineau Y, Bordron A, et al. B cell response to surface IgM cross-linking identifies different prognostic groups of B-chronic lymphocytic leukemia patients. *J Immunol* 2005;174:3749-56.
104. Renaudineau Y, Nedellec S, Berthou C, Lydyard PM, Youinou P, Pers JO. Role of B-cell antigen receptor-associated molecules and lipid rafts in CD5-induced apoptosis of B CLL cells. *Leukemia* 2005;19:223-9.
105. Debant M, Hemon P, Brigaudeau C, Renaudineau Y, Mignen O. Calcium signaling and cell fate: how can Ca²⁺ signals contribute to wrong decisions for Chronic Lymphocytic Leukemic B lymphocyte outcome? *Int J Dev Biol* 2015;59:379-89.
106. Schmitz S. *Zellkultur*: Springer Spektrum; 2011.
107. Boddy AV, Yule SM, Wyllie R, Price L, Pearson AD, Idle JR. Pharmacokinetics and Metabolism of Ifosfamide administered as a continuous infusion in children. *Cancer Res* 1993;16:3758-64.
108. Hu XF, Slater A, Wall DM, Parkin JD, Kantharidis P, Zalcborg JR. Cyclosporin A and PSC 833 prevent up-regulation of MDR1 expression by anthracyclines in a human multidrug-resistant cell line. *Clin Cancer Res* 1996;2:713-20.
109. Lehne G, Sorensen DR, Tjonnfjord GE, et al. The cyclosporin PSC 833 increases survival and delays engraftment of human multidrug-resistant leukemia cells in xenotransplanted NOD-SCID mice. *Leukemia* 2002;16:2388-94.
110. Sood AK, Sorosky JI, Squatrito RC, Skilling JS, Anderson B, Buller RE. Cyclosporin A reverses chemoresistance in patients with gynecologic malignancies. *Neoplasia* 1999;1:118-22.
111. Schiff J, Cole E, Cantarovich M. Therapeutic monitoring of calcineurin inhibitors for the nephrologist. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007;2:374-84.
112. Baumgart S, Glesel E, Singh G, et al. Restricted heterochromatin formation links NFATc2 repressor activity with growth promotion in pancreatic cancer. *Gastroenterology* 2012;142:388-98 e1-7.

113. Arlt A, Schäfer H, Kalthoff H. The 'N-factors' in pancreatic cancer: functional relevance of NF- κ B, NFAT and Nrf2 in pancreatic cancer. *Oncogenesis* 2012.
114. Koenig A, Linhart T, Schlegemann K, et al. NFAT-induced histone acetylation relay switch promotes c-Myc-dependent growth in pancreatic cancer cells. *Gastroenterology* 2010;138:1189-99 e1-2.
115. Li H, Rao A, Hogan PG. Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins. *Trends Cell Biol* 2011;21:91-103.
116. Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 1997;15:707-47.
117. Mognol GP, Carneiro FR, Robbs BK, Faget DV, Viola JP. Cell cycle and apoptosis regulation by NFAT transcription factors: new roles for an old player. *Cell Death Dis* 2016;7:e2199.
118. Lucena PI, Faget DV, Pachulec E, et al. NFAT2 Isoforms Differentially Regulate Gene Expression, Cell Death, and Transformation through Alternative N-Terminal Domains. *Mol Cell Biol* 2016;36:119-31.
119. Slupsky JR. Does B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukaemia cells differ from that in other B cell types? *Scientifica (Cairo)* 2014;2014:208928.
120. Sherman MA, Powell DR, Weiss DL, Brown MA. NF-ATc isoforms are differentially expressed and regulated in murine T and mast cells. *J Immunol* 1999;162:2820-8.
121. Davids MS, Hallek M, Wierda W, et al. Comprehensive Safety Analysis of Venetoclax Monotherapy for Patients with Relapsed/Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Cancer Res* 2018.
122. Muzio M, Apollonio B, Scielzo C, et al. Constitutive activation of distinct BCR-signaling pathways in a subset of CLL patients: a molecular signature of anergy. *Blood* 2008;112:188-95.
123. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2:489-501.
124. Reed JC. Apoptosis-targeted therapies for cancer. *Cancer Cell* 2003;3:17-22.
125. Kalil N, Cheson BD. Chronic lymphocytic leukemia. *Oncologist* 1999;4:352-69.
126. Pan Z, Scheerens H, Li SJ, et al. Discovery of selective irreversible inhibitors for Bruton's tyrosine kinase. *ChemMedChem* 2007;2:58-61.
127. Macian F, Lopez-Rodriguez C, Rao A. Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* 2001;20:2476-89.
128. Momparler RL, Bovenzi V. DNA methylation and cancer. *J Cell Physiol* 2000.

129. Shames DS, Minna JD, Gazdar AF. DNA methylation in health, disease, and cancer. *Curr Mol Med* 2007;7:85-102.
130. Rudd, Trevillyan, Dasgupta, Wong, Schlossman. The CD4 receptor is complexed in detergent lysates to a protein-tyrosine kinase (pp58) from human T lymphocytes. *PNAS* 1988;85:5190-4.

8. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertation

Die Arbeit wurde in der Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Tübingen in der Abteilung für Hämatologie, Onkologie, Immunologie, Rheumatologie und Pneumologie (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. L. Kanz) unter Betreuung von PD Dr. Dr. Martin R. Müller erstellt. Die Versuche wurden von mir nach Einarbeitung durch Frau Dr. M. Märklin durchgeführt. Die klinischen Parameter im Patientenkollektiv wurden von mir nach entsprechender Anleitung von Herrn PD Dr. Dr. M.R. Müller erfasst. Die statistische Auswertung erfolgte durch Frau Dr. M. Märklin und mich. Bei dieser Arbeit wurde die Beratung des Instituts für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie der Universität Tübingen in Anspruch genommen. Die Vektoren für den shRNA-Knock-down in MEC-1 Zellen wurden von Frau Prof. Anjana Rao, San Diego, synthetisiert und kostenlos überlassen. Die mRNA für *Abbildung 34A* wurde von Frau Prof. Quintanilla de Fend, Pathologie Tübingen, isoliert und zur Verfügung gestellt. Freundlicherweise wurden die experimentellen Daten für *Abbildung 23* durch Frau Felicia Truckenmüller bereitgestellt. Teile dieser Arbeit (*Abbildungen 22B, 25, 26, 34 und Tabelle 7*) wurden bereits in der Publikation von Maerklin et al. gezeigt. Die Synthese dieser Daten ist durch mich erfolgt und mein Anteil an der Publikation. Die *Abbildung 3* wurde von Frau Dr. Melanie Märklin für ihre Dissertation erstellt und freundlicherweise bereitgestellt.

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation nach Anleitung durch Herrn PD Dr. Dr. M. R. Müller und Frau Dr. M. Märklin selbstständig verfasst habe und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet habe.

Tübingen, den 20.05.2019

Jonas Sebastian Heitmann

9. Publikationsverzeichnis

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Maerklin M., Heitmann J.S., Fuchs A.R., Truckenmueller F.M., Gutknecht M., Bugl S., Saur S. J., Lazarus J., Kohlhofer U., Quintanilla-Martinez L., Rammensee H.G., Salih H.R., Kopp H.G., Haap M., Kirschniak A., Kanz L., Rao A., Wirths S., Mueller M.R.; *NFAT2 is a critical regulator of the anergic phenotype in chronic lymphocytic leukaemia.* Nature Communication, 2017 Oct 2;8(1):755

9.1. Kongressbeiträge

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorab im Rahmen von nationalen und internationalen Kongressen in Form von Vorträgen oder Posterpräsentationen präsentiert.

9.1.1. Vorträge

10/2013 & 10/2016 Jährliches Meeting der deutschen Gesellschaft für Hämatologie und medizinische Onkologie (DGHO)

9.1.2. Posterpräsentationen

12/2012 & 12/2016 Jährliches Meeting der American Society of Hematology (ASH)
Gewinn des ASH Abstract Achievement Award

10/2017 Jährliches Meeting der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und
medizinische Onkologie (DGHO)
Gewinner des Posterpreises 2017

10. Danksagung

Mein sicherlich größter Dank zur Vollendung dieser Dissertation gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Dr. Martin Müller. Seine Ideen und Ermutigungen haben mich stets bei meiner wissenschaftlichen Arbeit begleitet. Seine Tür stand für mich und meine Probleme jederzeit offen und er hat mir zudem Tore aufgestoßen, die ich für verschlossen hielt. Er war mir eine große Hilfe bei der Erhebung der klinischen Daten und hat mit seinen Hinweisen zur Verbesserung dieser Dissertation beigetragen. Zudem möchte ihm einen besonderen Dank dafür aussprechen, dass er in mir die nachhaltige Begeisterung für die klinische Arbeit geweckt hat.

Nicht weniger möchte ich Dr. Melanie Märklin danken. Dank ihrer hervorragenden Einarbeitung, ihrem stetigen Rat und ihrer Freundschaft hatte ich immer viel Freude an der Auseinandersetzung mit den Herausforderungen des wissenschaftlichen und experimentellen Arbeitens im Labor. Besonders möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mich auch stets bei meinen Kongressbeiträgen exzellent unterstützt hat. Ohne sie wäre das Erstellen dieser Arbeit sicherlich um einiges schwieriger gewesen.

Ich möchte zudem allen danken, die durch ihr unermüdliches Korrekturlesen, diese Arbeit verbessert haben.

Zudem möchte ich der Boehringer Ingelheim Fonds danken für die finanzielle Unterstützung während meines Auslandsaufenthaltes bei Prof. Anjana Rao. Für die kurze, aber lehrreiche Zeit gilt ihr ebenso meine Dankbarkeit. Frau Prof. Quintanilla de Fend bin ich für die Bereitstellung der Proben sowie allen Patienten für die Studienteilnahme zu Dank verpflichtet.

Außerhalb meiner Dissertation konnte ich mich immer auf den Rückhalt meiner Familie stützen. Ich danke meinen Eltern dafür, mich finanziell und moralisch unterstützt zu haben. Dank dieser Hilfe konnte ich alle mir offenstehenden Möglichkeiten nutzen. Meinen Geschwistern danke ich für unsere gemeinsame Kindheit, die mich sicherlich zu dem Menschen gemacht hat, der ich heute bin.

Als Letztes möchte ich Rebecca danken. Die Verbindung zu Dir stützt mich täglich, sie verleiht mir Kraft und Mut. Dafür bin ich Dir unendlich dankbar.

Fata viam invenient
Das Schicksal findet einen Weg
Vergil, Aeneis, X, Vers 113