

# **Analyse des Transkriptionsfaktors NFAT2 in der Pathogenese der CLL**

## **Dissertation**

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

vorgelegt von

**Melanie Märklin**

aus Göppingen

Tübingen

2015

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

Tag der mündlichen Qualifikation:

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee

PD Dr. Dr. Martin R. Müller

GOD, GRANT ME THE SERENITY TO ACCEPT THE THINGS I CANNOT CHANGE,  
COURAGE TO CHANGE THE THINGS I CAN,  
AND WISDOM TO KNOW THE DIFFERENCE  
*(Reinhold Niebuhr 1941)*

## ZUSAMMENFASSUNG

Die Chronische Lymphatische Leukämie (CLL) ist mit über 4000 Neuerkrankungen pro Jahr die häufigste hämatologische Erkrankung in Deutschland. In den allermeisten Fällen ist die CLL nicht vollständig heilbar. Durch konventionelle Chemotherapeutika und Antikörperbasierte Immuntherapien gelingt es zwar oft die Patienten möglichst lange in Remission zu halten, trotzdem steigt das Bedürfnis nach neuen Therapieansätzen stetig.

In dieser Arbeit wurde zum einen der Einfluss des Transkriptionsfaktors NFAT2 auf die Entwicklung physiologischer B-Zellen untersucht und zum anderen seine Rolle in der Pathogenese der CLL detailliert charakterisiert. Diese Analysen wurden in einem konditionellen NFAT2-Knockout Mausmodell in Kombination mit dem transgenen  $\epsilon\mu$ -TCL1-Modell der CLL durchgeführt. Während im physiologischen B-Zell-Modell der Verlust von NFAT2 zu einer Hemmung der B-Zell-Entwicklung und einer Reduktion der B1 B-Zell-Subpopulation führt, ergaben die Analysen im CLL-Modell ein differentes Ergebnis. Hier führte der Verlust von NFAT2 zu einer Akzeleration der CLL-Erkrankung. Dies führte zu einem drastisch reduzierten Überleben dieser Tiere und einer verstärkten Akkumulation der CLL-Zellen in der Peripherie. Als Ursache konnte eine gesteigerte Proliferation in der Leukämie-Kohorte mit NFAT2-Knockout beobachtet werden. Da die Proliferation der B-Zellen stark B-Zell-Rezeptor-abhängig reguliert wird, wurde die Funktionalität des BCRs untersucht. In der normalen TCL1-Kohorte zeigte sich ein aneurger Phänotyp, wodurch die CLL-Zellen unfähig waren, auf  $\alpha$ IgM-Stimulation durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisation zu reagieren. Ferner konnte eine konstitutive Aktivierung des AKT- und ERK-Signalwegs und eine starke Expression der in dieser Arbeit vorgeschlagenen Anergie-Gene *Cbl*, *Gra1l*, *Pacsin1* und *Lck* beobachtet werden. Diese Beobachtungen entsprechen den bekannten Daten aus einer Subpopulation der CLL-Patienten, die einen sehr milden Verlauf der Erkrankung mit guter Langzeitprognose zeigen. Der Verlust von NFAT2 in den CLL-Zellen führte hingegen zu einer Aufhebung der Anergie und damit zu einem hochresponsiven Phänotyp. Die molekulare Analyse der proximalen BCR-Signalkaskaden zeigten im Vergleich zu der meist konstitutiven Aktivierung in der TCL1-Kohorte eine induzierte Aktivierung der Kinasen SYK, LYN, ERK und AKT. Interessanterweise zeigte die Tyrosinkinase LCK als einzige eine Aktivierung nach BCR-Stimulation in der anergen TCL1-Kohorte. Aufgrund dieser Tatsache werden NFAT2 und die LCK-Kinase, welche vermutlich auch durch NFAT2 aktiviert wird, als maßgebliche Regulatoren der Anergie bei der CLL postuliert.

## SUMMARY

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common hematological malignancy in Germany with about 4000 new cases per year. CLL remains an essentially incurable disease, but conventional chemotherapy and antibody-based immunotherapy help to keep patients in long term remissions. Nevertheless, there is a strong need for new therapeutic strategies.

In this project we analyzed the function of the transcription factor NFAT2 in the development of physiological B cells as well as its role in the pathogenesis of CLL. Therefore, we used a conditional NFAT2 knock-out mouse model in combination with the transgenic E $\mu$ -TCL1 mouse model for CLL. While complete deletion of NFAT2 in physiological B cells leads to an inhibition of B cell development and a reduction of the B1 B cell subpopulation, the analysis of the CLL model yielded different results. The E $\mu$ -TCL1 cohort with NFAT2 deletion showed an acceleration of disease with dramatically reduced animal survival and accumulation of CLL cells in peripheral organs. This observation was caused by an enhanced proliferation in the NFAT2 knock-out CLL cells. As B cell proliferation is highly regulated by B cell receptor (BCR) activation, we further analyzed the functionality of the BCR. The normal TCL1 cohort showed an anergic phenotype after  $\alpha$ IgM stimulation which results in a state of B cell unresponsiveness and a lack of Ca<sup>2+</sup> mobilization capacity. Furthermore, there was a constitutive activation of ERK and AKT signaling as well as a strong increase in the expression of the here suggested anergy genes *Cbl*, *Grail*, *Pacsin1* and *Lck*. These observations correlate with the observed phenotype in a subgroup of CLL patients which exhibit a more indolent course of disease with good prognosis. In contrast, the absence of NFAT2 in CLL cells leads to a loss of anergy and results in a highly signal-responsive CLL cell. The molecular analysis of the downstream BCR signaling revealed in contrast to the constitutive activation in the normal TCL1 cohort an induced activation of LYN, SYK, ERK and AKT due to NFAT2 deletion. Interestingly, the LCK kinase is the only one which becomes activated in anergic CLL cells. Because of these findings we propose NFAT2 and LCK which is potentially regulated by NFAT2 as significant regulators of anergy in CLL.

## DANKSAGUNG

LEIDER LÄBT SICH EINE WAHRHAFTHE DANKBARKEIT MIT WORTEN NICHT AUSDRÜCKEN

*JOHANN WOLFGANG VON GOETHE (1749-1832)*

Trotzdem möchte ich zu Beginn Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee für die Vertretung dieser Arbeit vor der Fakultät danken. Schon während meiner Diplomarbeit in seiner Abteilung hatte immer ein offenes Ohr für aufgetretene Probleme. In meiner Promotionsphase stand er mir nun stets mit guten Ratschlägen zur Seite.

Ein besonderer Dank geht an PD Dr. Dr. Martin Müller, dass er mir die Gelegenheit gegeben hat meine Promotion in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Martin verfügt über einen nahezu grenzenloses Repertoire an neuen Ideen und Kreativität. Er hatte stets das richtige Händchen, unsere Daten in die richtige Form zu bringen, was nicht zuletzt zu zahlreichen Kongressvorträgen und *Abstract Awards* führte. Er hat mir immer großes Vertrauen entgegengebracht, mich gefördert und gefordert und bei allen inner- und ausserfakultären Fortbildungen unterstützt.

Des Weiteren möchte ich auch Prof. Dr. Hans-Georg Kopp und Dr. Stefan Wirths für die Bereitschaft zur Diskussion meiner Daten danken. Stefan hat nicht zuletzt durch seine Geduld, auch mit schwierigen FACS Daten umzugehen und seinen unermüdlichen Einsatz, am guten Gelingen dieses Projektes mitgewirkt.

In den letzten 4 Jahren in der AG Müller waren meine Kolleginnen und Kollegen eine große Unterstützung. Elke, die durch ihre unglaubliche Methodenkenntnis immer einen Rat wusste und jede meiner „schwierigen“ Rechnungen überprüft hat. Steffi, die vor allem beim Präparieren der Mäuse eine große Hilfe war. Die guten Seelen der AG Müller, Bettina, David und die Pipettier-Königinnen Alex und Manu, die in den letzten Jahren unzählige Genotypisierungen gemacht haben und mir bei allen Experimenten eine riesige Hilfe waren. Die Medizindoktoranden/innen Jana, Juliane, Malaley, Anastasia und David, die immer viel Abwechslung und frischen Wind ins Labor gebracht haben. Vor allem möchte ich aber Jonas, Feli und Micha danken. Sie standen mir immer als kompetente Diskussionspartner zur Seite und haben durch Ihre Arbeit immer zum Erfolg des ganzen Projektes beigetragen.

Ein lieber Dank geht auch an Frauke und Micha, die mir im Labor, aber vor allem auch außerhalb, immer eine gute Stütze waren. Ihre Freundschaft machte meine Zeit in der Med II zu etwas ganz besonderem.

Insbesondere möchte ich auch Manuel danken. Durch seinen Rückhalt und seine beharrliche Motivation, lernte ich nicht zuletzt viel über mich selbst. Er gab mir stets den Ansporn, das Beste aus mir rauszuholen.

Abschließend geht mein liebster Dank an meine Familie, die mich immer unterstützt hat. Meine Brüder Harald, Hagen, Max und mein „großer Bruder“ Sebbi, sind die besten Brüder, die man sich wünschen kann. Meine Mam, die immer mein größtes Vorbild sein wird, ohne Sie würde ich heute nicht hier stehen.

Und ich danke alle die ich hier evtl. vergessen habe zu erwähnen...

DAS UNDANKBARSTE, WEIL UNKLÜGSTE, WAS ES GIBT, IST DANK ERWARTEN ODER VERLANGEN

*THEODOR FONTANE (1819-1898)*

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>- 1 -</b>
1.1	<b>Maligne Lymphome .....</b>	<b>- 1 -</b>
1.2	<b>Chronische Lymphatische Leukämie (CLL).....</b>	<b>- 1 -</b>
1.2.1	Molekulare Eigenschaften der CLL .....	- 3 -
1.3	<b>B-Lymphozyten.....</b>	<b>- 5 -</b>
1.3.1	B-Zell-Entwicklung in der Maus.....	- 5 -
1.3.2	BCR-Aktivierung .....	- 8 -
1.3.3	B-Zell-Anergie.....	- 10 -
1.4	<b>Ca<sup>2+</sup>/NFAT Signalweg .....</b>	<b>- 10 -</b>
1.4.1	NFAT-Transkriptionsfaktoren .....	- 10 -
1.4.2	Ca <sup>2+</sup> /NFAT Regulation .....	- 11 -
1.4.3	NFAT bei Tumorerkrankungen.....	- 13 -
1.5	<b>Aberrante Signalwege in der CLL.....</b>	<b>- 14 -</b>
1.5.1	Einflüsse von NFAT2 .....	- 14 -
1.5.2	Die Rolle des BCRs und der Anergie .....	- 15 -
1.6	<b>Transgene Mausmodelle .....</b>	<b>- 16 -</b>
1.6.1	Das E $\mu$ -TCL1 Mausmodell .....	- 16 -
1.6.2	Konditioneller Knockout.....	- 17 -
1.7	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>- 18 -</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL &amp; METHODEN .....</b>	<b>- 20 -</b>
2.1	<b>Material.....</b>	<b>- 20 -</b>
2.1.1	Verbrauchsmaterialien .....	- 20 -
2.1.2	Reagenzien & Chemikalien .....	- 21 -
2.1.3	Geräte und Zubehör.....	- 23 -
2.1.4	Puffer und Medien.....	- 24 -
2.1.5	Antikörper .....	- 24 -
2.1.6	Primer .....	- 26 -
2.2	<b>Methoden.....</b>	<b>- 27 -</b>

2.2.1	Tiermodelle .....	- 27 -
2.2.1.1	Mäusehaltung und -zucht .....	- 27 -
2.2.1.2	Transgene Mauslinien .....	- 27 -
2.2.1.3	Genotypisierung der Tiere .....	- 28 -
2.2.2	Präparation der Organe.....	- 29 -
2.2.2.1	Milz & Lymphknoten .....	- 29 -
2.2.2.2	Peritonealhöhle .....	- 29 -
2.2.2.3	Knochenmark .....	- 29 -
2.2.3	Blutentnahme und Aufarbeitung .....	- 30 -
2.2.3.1	Blutentnahme .....	- 30 -
2.2.3.2	Differential-Blutbild .....	- 30 -
2.2.3.3	Isolation der Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) .....	- 30 -
2.2.4	Isolation und Kultivierung der B-Zellen .....	- 30 -
2.2.4.1	Positive magnetische Isolation der CD19 <sup>+</sup> B-Zellen.....	- 30 -
2.2.4.2	Negative magnetische Isolation der B-Zellen.....	- 30 -
2.2.4.3	Positive magnetische Isolation der CD5 <sup>+</sup> CLL-Zellen.....	- 31 -
2.2.4.4	Kultivierung und Expansion .....	- 31 -
2.2.4.5	B-Zellrezeptorstimulation.....	- 31 -
2.2.5	Dichtegradientenzentrifugation der Splenozyten .....	- 31 -
2.2.6	Durchflusszytomtrie.....	- 32 -
2.2.6.1	Extrazelluläre Färbung .....	- 32 -
2.2.6.2	Intrazelluläre Färbung .....	- 32 -
2.2.6.3	Zellzyklusanalyse .....	- 33 -
2.2.6.4	Annexin V-Färbung .....	- 34 -
2.2.6.5	FACS-Sortierung der Zellen .....	- 34 -
2.2.7	Ca <sup>2+</sup> -Mobilisation.....	- 35 -
2.2.7.1	INDO-1-AM Beladung .....	- 35 -
2.2.7.2	Messung am LSRII.....	- 35 -
2.2.8	Nachweis der <i>in vitro</i> Proliferation .....	- 37 -
2.2.9	RNA Isolation & cDNA Synthese.....	- 37 -
2.2.10	Quantitative RT-PCR .....	- 37 -
2.2.11	Proteinisolation .....	- 38 -
2.2.12	Proteinbestimmung nach Bradford .....	- 38 -
2.2.13	<i>SDS-Page</i> .....	- 39 -
2.2.14	Western Blot .....	- 39 -
2.2.15	Histologische Analyse .....	- 41 -
2.2.15.1	Paraffin-Einbettung der Organe.....	- 41 -
2.2.15.2	H & E Färbung .....	- 41 -

2.2.16	Microarray-Experimente .....	- 42 -
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>- 43 -</b>
<b>3.1</b>	<b>Der Einfluss von NFAT2 im physiologischen B-Zell-Modell .....</b>	<b>- 43 -</b>
3.1.1	Generierung einer konditionellen NFAT2-Knockout Maus .....	- 43 -
3.1.2	NFAT2-Knockout hemmt das B1 B-Zell-Kompartiment .....	- 45 -
3.1.3	NFAT2 steuert die Proliferation und Apoptose der B-Zellen .....	- 48 -
3.1.4	NFAT2 reguliert die Expression von ZAP70 und CD38 .....	- 49 -
<b>3.2</b>	<b>Die Bedeutung von NFAT2 in der CLL .....</b>	<b>- 52 -</b>
3.2.1	NFAT2-Ko im transgenen E $\mu$ -TCL1-Modell.....	- 52 -
3.2.2	Eine Deletion von NFAT2 führt zu einem verkürzten Gesamtüberleben .....	- 54 -
3.2.3	Der Verlust von NFAT2 führt zu einer Akzelerierung der CLL .....	- 56 -
3.2.4	NFAT2-Knockout beschleunigt die Proliferation der CLL Zellen .....	- 65 -
3.2.5	Regulation der prognostischen Marker ZAP70 & CD38 durch NFAT2.....	- 68 -
3.2.6	Genexpressionsanalysen im TCL1-Modell .....	- 70 -
3.2.7	Genexpression nach B-Zellrezeptoraktivierung .....	- 73 -
3.2.7.1	Genexpressionsmuster der Anergie-assoziierten E3 Ligasen.....	- 74 -
3.2.7.1	Anergie-assoziierte Genexpressionsmuster weiterer Gene .....	- 75 -
3.2.7.2	Expression der BCR Gene .....	- 77 -
3.2.8	Ca <sup>2+</sup> -Mobilisation mit INOD1 .....	- 79 -
3.2.9	In vitro Proliferation nach B-Zellrezeptorstimulation.....	- 82 -
3.2.10	Molekulare Analyse der $\alpha$ gM-Stimulation am BCR .....	- 87 -
3.2.10.1	Induktion der Src-Kinasen LYN, SYK und LCK.....	- 88 -
3.2.10.2	Aktivierung des „Signalosoms“ .....	- 91 -
3.2.10.3	Proximale BCR-Aktivierung .....	- 92 -
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>- 94 -</b>
4.1	Der Einfluss von NFAT2 im physiologischen B-Zell-Modell .....	- 94 -
4.2	Die Bedeutung von NFAT2 in der CLL .....	- 96 -
<b>5</b>	<b>FAZIT &amp; PERSPEKTIVEN.....</b>	<b>- 109 -</b>
5.1	Erkenntnisse über NFAT2 in physiologischen B-Zellen .....	- 109 -
5.2	Erkenntnisse über NFAT2 in der CLL.....	- 110 -

<b>6</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>- 113 -</b>
<b>6.1</b>	<b>Verzeichnisse</b> .....	<b>- 113 -</b>
6.1.1	Nomenklatur.....	- 113 -
6.1.2	Abkürzungsverzeichnis .....	- 113 -
6.1.3	Abbildungsverzeichnis .....	- 116 -
6.1.4	Tabellenverzeichnis .....	- 117 -
6.1.5	Literaturverzeichnis .....	- 117 -
<b>6.2</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>- 134 -</b>
6.2.1	Bcl6 Expression in B-Zellen .....	- 134 -
6.2.2	Regulierte Transkripte im E $\mu$ -TCL1-Modell .....	- 134 -
<b>6.3</b>	<b>Publikationsverzeichnis</b> .....	<b>- 136 -</b>
<b>6.4</b>	<b>Kongressbeiträge</b> .....	<b>- 136 -</b>
6.4.1	Vorträge .....	- 136 -
6.4.2	Posterpräsentationen .....	- 136 -
<b>6.5</b>	<b>Contributions</b> .....	<b>- 137 -</b>

## **1 EINLEITUNG**

### **1.1 Maligne Lymphome**

Unter einem malignen Lymphom versteht man eine bösartige Neoplasie, die aus lymphatischen Zellen hervorgeht. Dabei werden die Lymphome in zwei Gruppen eingeteilt, Hodgkin-Lymphome (HL) und Non-Hodgkin-Lymphome (NHL). Die Hodgkin-Krankheit (Morbus Hodgkin) wurde erstmals 1832 vom englischen Arzt Thomas Hodgkin beschrieben<sup>1</sup>. Er charakterisierte eine Erkrankung mit Ausbildung von Lymphomen an den Lymphknoten, entlang des Thorax und des Abdomens und einer Splenomegalie. Die Ätiologie des Lymphoms gilt zwar noch immer als ungeklärt, allerdings liegt unter anderem eine Assoziation mit Epstein-Barr-Virus (EBV) nahe<sup>2,3</sup>. Ein Charakteristikum der Tumore sind die Sternberg-Reed-Zellen, die aus mehreren monoklonalen B-Lymphozyten fusionieren<sup>4,5</sup>.

Im Gegensatz zu den HL werden die NHL in zwei Gruppen eingeteilt, wobei diese untereinander sehr heterogen sind. Zu den T-Zell-Lymphomen, die ca. 15-20% der NHL bilden, gehören unter anderem die Chronische adulte T-Zell-Leukämie, das Anaplastisch-großzelliges Lymphom (ALCL), oder das hoch aggressive Adulte T-Zell-Lymphom<sup>6</sup>. Die größere Gruppe der NHL bilden die B-Zell-Lymphome mit 80-85%. Zu den wichtigsten Untergruppen gehören hier das Follikuläre Lymphom, das Diffuse-großzellige B-Zell-Lymphom (DLCL) sowie das hochaggressive Burkitt-Lymphom. Eine Sonderrolle nimmt hier die Chronische Lymphatische Leukämie (CLL) ein, welche zu den indolenten NHL gezählt wird.

### **1.2 Chronische Lymphatische Leukämie (CLL)**

Die CLL ist die häufigste Leukämie Form in Deutschland und wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit. In Deutschland werden pro Jahr etwa 4000 Neuerkrankungen verzeichnet (Abb. 1). Männer sind dabei deutlich häufiger betroffen als Frauen (4,1 vs. 2,1 /100.000). Das mediane Alter bei Erstdiagnose liegt bei ca. 70 Jahren, wobei aber etwa 20-30% der Patienten jünger als 55 Jahre sind. Obwohl die CLL schon 1845 vom deutschen Arzt Rudolf Virchow erstmals beschrieben wurde<sup>7</sup>, ist der Ursprung der CLL bislang ungeklärt. Trotz konventioneller Chemotherapie oder Antikörper-basierten Therapien bleibt die CLL bis heute unheilbar. Die einzige kurative Behandlungsmethode besteht in einer allogenen Stammzelltransplantation. Oft handelt es sich bei der Diagnose der CLL um einen Zufallsbefund, im Rahmen der Durchführung eines Routineblutbildes beim Hausarzt. In vielen Fällen wird die CLL auch nicht sofort nach Diagnose behandelt. Je nach Stadium der

Krankheit kann das mediane Überleben bei zehn Jahren oder mehr liegen. Die Einteilung in verschiedene Stadien der Erkrankung wird entweder nach der Rai<sup>8</sup>- oder der Binet<sup>9</sup>-Klassifizierung vorgenommen und kann in der Regel ohne histopathologische Begutachtung des Lymphknotengewebes oder des Knochenmarks durchgeführt werden. Die Diagnose kann meist durch Analyse der Zellmorphologie und durch Immunphänotypisierung des peripheren Bluts gestellt werden. Weil die Therapie der CLL keinen Vorteil bei einem frühen Einsatz der Therapie zeigt, bedient man sich der „*Watch and wait*“-Strategie. Durch regelmäßige Kontrollen des Lymphozytenspiegels im Blut alle 3-6 Monate, wird die Behandlung erst bei der Erfüllung bestimmter Kriterien begonnen. Diese beinhalten neben der Diagnose einer Anämie oder Thrombozytopenie auch das Auftreten von Splenomegalien oder Lymphadenopathien. Des Weiteren spielt die Lymphozytenverdopplungszeit ausgehend von einem Basiswert von 30000 Lymphozyten/ $\mu$ l eine essentielle Rolle<sup>10</sup>. Wenn Therapienotwendigkeit besteht wird üblicherweise eine Chemoimmunotherapie verwendet. Meist besteht diese aus der Kombination einer oder mehrerer Chemotherapeutika und dem CD20-Antikörper Rituximab. Bei der Erstlinientherapie werden vor allem die Alkylanzien Cyclophosphamid, Chlorambucil und Bendamustin oder das Purin-Analogon Fludarabin in Kombination mit Kortikosteroiden eingesetzt. Im Rezidiv werden abhängig von der eingesetzten Primärtherapie, der Remissionsdauer und dem Zustand des Patienten auch die Substanzen Doxorubicin, Vincristin oder bei Rituximab-Resistenz der CD20-Antikörper Ofatumumab verwendet. Neue Medikamente werden bereits in klinischen Studien evaluiert, darunter sind z.B. Lenalidomid, der Kinasehemmer Flavopiridol, der *B-cell lymphoma 2* (BCL2)-Inhibitor Navitoclax, der Phosphoinositid-3-Kinase $\delta$  (PI3K $\delta$ )-Inhibitor Idelalisib und der Bruton's Tyrosinkinase (BTK)-Inhibitor Ibrutinib. Die gefürchtetste Komplikation bei der CLL ist das sogenannte Richter Syndrom<sup>11</sup>, was eine Transformation in ein hochmalignes Lymphom mit sehr schlechter Prognose bedeutet. Dies tritt bei ca. 5-10% der CLL-Patienten im Verlauf der Erkrankung auf<sup>12</sup>.

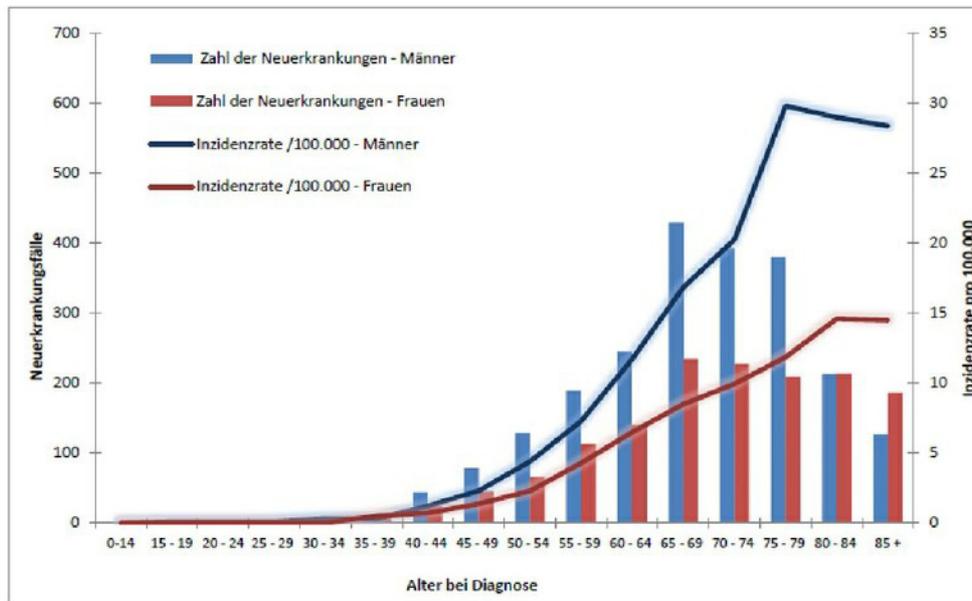


Abb. 1: CLL-Neuerkrankungen in Deutschland

Hochrechnung des Instituts für Krebs Epidemiologie e.V., Lübeck auf Basis der Neuerkrankungsdaten der Krebsregister Bremen, Hamburg, Niedersachsen, Münster, Saarland und Schleswig-Holstein in den Jahren 2007/8 (Bezugsbevölkerung  $\approx$  16 Millionen Einwohner)

(Quelle: <https://www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/cll>)

### 1.2.1 Molekulare Eigenschaften der CLL

Die CLL ist charakterisiert durch eine Akkumulation klonaler B-Zellen im peripheren Blut und im Knochenmark der Patienten. Diese exprimieren neben den B-Zellantigenen CD19, CD20 und CD23 auch das T-Zellantigen CD5<sup>13</sup>, was unter anderem das Hauptcharakteristikum der CLL-Zellen ist. Um die pathologischen Mechanismen, die der CLL zugrunde liegen, besser zu verstehen, ist die Einteilung in Subklassen äußerst hilfreich. Die populärste Einteilung erfolgt nach dem Mutationsstatus der IGVH-Gene<sup>14</sup>. Sie ist neben der Therapieentscheidung auch für die Prognose der Patienten essentiell. Hierbei zeigen Patienten mit mutierten IGVH-Mutationsstatus (M-CLL) eine deutlich bessere Prognose als Patienten mit unmutiertem IGVH-Mutationsstatus (U-CLL)<sup>15</sup>.

Neben dem Mutationsstatus sind auch weitere prognostische Faktoren von klinischer Relevanz. Die beiden bekanntesten sind die Tyrosinkinase  $\zeta$ -Ketten-assoziierte Proteinkinase 70 (ZAP70) und das Transmembran-Glykoprotein CD38, auch als zyklische Adenosindiphosphat (ADP)-Ribose-Hydrolase bekannt. Der Zusammenhang von ZAP70 und der CLL konnte erstmals durch eine Genexpressionsanalyse hergestellt werden<sup>16</sup>. Später wurde ein direkter Zusammenhang von ZAP70 und einer erhöhten B-Zell-Rezeptor (BCR)-Signalübertragung bei der CLL charakterisiert<sup>17</sup>, der mit einer schlechten klinischen Prognose für die Patienten einhergeht<sup>18</sup>. CD38 wird bei der Entwicklung physiologischer B-Zellen exprimiert<sup>19,20</sup> und korreliert bei der CLL mit einem schlechten klinischen Verlauf<sup>21</sup>.

Beide Marker sind vorzugsweise auf CLL-Zellen mit unmutierten IGVH-Genen zu finden und stehen damit im Einklang mit der bereits beschriebenen schlechteren Prognose<sup>21-23</sup>.

Ein weiterer wichtiger Faktor stellen die chromosomalen Aberrationen dar, die bei ca. 80% der CLL-Patienten auftreten<sup>24</sup>. Sie sind nur in den malignen CLL-Zellen, nicht aber in gesunden Zellen vorhanden und es ist trotz ihrer extremen Häufung nicht eindeutig geklärt, wodurch diese Aberrationen ausgelöst werden. Die wichtigsten sind die Deletion 13q14, die Trisomie 12q13 und die beiden Deletionen 11q23 und 17p13<sup>24</sup>. Die Deletion 13q14 ist mit ca. 40% die häufigste Aberration und ist durch einen positiveren Verlauf der Erkrankung gekennzeichnet. Analysen der 13q Region ergaben zwar keine Inaktivierung eines Kandidatengens, jedoch konnte hier ein komplexer, epigenetisch regulierter Tumorsuppressor-Mechanismus beschrieben werden, der unter anderem aus den microRNA Genen *Mir-15a* und *Mir-16-1* besteht<sup>25</sup>. Über den molekularen Mechanismus der Trisomie 12q ist, obwohl sie zu den häufigeren Aberrationen gehört, nur wenig bekannt und eine prognostische Relevanz konnte bislang nicht belegt werden<sup>26</sup>. 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<sup>27</sup>. 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<sup>24</sup>. Durch die Deletion kommt es zu einem Verlust des Tumorsuppressorgens TP53, was mit einem sehr schnellen Progress der Erkrankung und einer schlechten Prognose einhergeht<sup>28</sup>. Die Gesamtübersicht der betroffenen Genregionen und dass progressionsfreie Überleben, wie auch das Gesamtüberleben sind in Tab. 1 zusammengefasst.

Aberration	Inzidenz	Betroffene Gene	PFS (Mon.)	OS (Mon.)
Keine	18	?	49	111
Deletion 13q14	55	<i>Mir-15a</i> , <i>Mir-16-1</i> und nicht-kodierende RNAs	92	133
Deletion 11q23	18	ATM, ?	13	79
Trisomie 12q13	16	Gene unbekannter Funktion?	33	114
Deletion 17p13	7	<i>TP53</i>	9	32

Tab. 1: Biologische und klinische Relevanz der chromosomalen Aberrationen der CLL

Die Tabelle zeigt die Inzidenz der verschiedenen Aberrationen und die betroffenen Genregionen mit dem progressionsfreien Überleben (PFS) und dem Gesamtüberleben (OS) in Monaten.

(Quelle: Zenz, T., Mertens, D., Kupperts, R., Dohner, H. & Stilgenbauer, S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat. Rev. Cancer* (2010))

### 1.3 B-Lymphozyten

Die B-Lymphozyten (bursa-derived<sup>29</sup>) bilden einen wichtigen Teil des adaptiven Immunsystems, welches sich schon vor über 500 Millionen Jahren in Vertebraten entwickelt hat<sup>30</sup>. Sie sind aber auch bei der Ausbildung von Autoimmunerkrankungen und bei der Tumorgenese involviert. Die Beschreibung der B-Zellen selbst ging ursprünglich auf die Entdeckung von Antikörpern im Serum zurück, woraufhin deren Ursprung 1948 in Plasmazellen vermutet wurde<sup>31</sup>. B-Zellen spielen vor allem bei der humoralen Immunantwort eine essentielle Rolle. Sie sind in der Lage Antikörper gegen verschiedenste Pathogene zu produzieren. Das Prinzip der „Klonalen Selektion“ bei der Bildung von Antikörpern wurde erstmals 1957 von Sir Macfarlane Burnet beschrieben<sup>32,33</sup>. Das breite Spektrum der Pathogen-Erkennung wird durch die Expression diverser klonaler Immunglobulin-Rezeptoren auf der Zelloberfläche ermöglicht. Die Diversität der Immunglobuline wird vor allem durch kombinatorische Neuordnung, die somatische Rekombination der V, D und J (*V – variable*; *D – diversifying*; *J – joining*) Gensegmente im Locus der schweren Immunglobulin-Kette (Ig<sub>H</sub>) ermöglicht<sup>34</sup>. Dieses Phänomen wurde 1978 von Susumu Tonegawa entdeckt und einige Jahre später auch mit dem Nobelpreis für Medizin geehrt.

Die Entwicklung der B-Zellen im Knochenmark und Reifung in der Peripherie wurden intensiv untersucht. Viele Erkenntnisse wurden dabei in Mäusen als Modellorganismus gewonnen. Die B-Zell-Entwicklung beim Menschen unterscheidet sich in einigen Punkten von der in der Maus. Insbesondere konnte für einige in der Maus beschriebene Subpopulationen bis dato kein entsprechendes Pendant im humanen System gefunden werden. Im Zusammenhang mit dieser Arbeit wird im Folgenden die B-Zell-Entwicklung in der Maus näher beschrieben.

#### 1.3.1 B-Zell-Entwicklung in der Maus

B-Zellen entwickeln sich aus gemeinsamen lymphoiden Progenitoren (CLP, *common lymphoid progenitors*) von hämatopoetischen Stammzellen (HSC, *hematopoietic stem cells*) im Knochenmark<sup>35</sup>. Bei den B-Zellen wird zwischen zwei Subpopulationen unterschieden, den B1 und den B2 B-Zellen. Der Ursprung der beiden Linien ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Obwohl man vermutet, dass es für beide Linien unabhängige Progenitoren im Knochenmark und bei den B1-Progenitoren auch in der Milz gibt<sup>36-38</sup>. Abb. 2A zeigt die Entwicklung der B-Zellen im Knochenmark. Aus den B-Zell-Progenitoren entsteht durch Umlagerung der D- und J-Segmente des Ig<sub>H</sub>-Lokus die frühe pro-B-Zelle. Durch weitere Neuordnung der J-Segmente erreicht die B-Zelle das späte pro-B-Zellstadium. Im nächsten Stadium der großen prä-B-Zelle kann durch die Expression der Ig<sub>H</sub> (μ<sub>H</sub>) und einer Surrogat leichte Kette (SLC, *surrogate light chain*), die als Ersatz für die spätere echte leichte Kette dient, ein prä-BCR gebildet werden. Dies ist auch der erste Kontrollpunkt in der B-Zell-

Entwicklung. Kann hier, auch durch weitere Umlagerung der anderen möglichen V-, D- und J-Kombinationen, kein prä-BCR exprimiert werden, leitet die Zelle die Apoptose ein. Bei erfolgreicher prä-BCR-Rekonstitution wird dieser wieder internalisiert und zum Stadium der kleinen prä-B-Zelle der  $\kappa$ -Lokus der leichten Kette umgelagert. Führt dies nicht zur Expression eines funktionellen sIgM BCRs wird auch noch der  $\lambda$ -Lokus verwendet (*Rezeptor Editing*). Übersteht die B-Zelle diesen zweiten Kontrollpunkt, kann sie als unreife B-Zelle das Knochenmark verlassen, andernfalls wird die Apoptose eingeleitet<sup>35</sup>.

Die unreifen B-Zellen verlassen das Knochenmark als transitionale B-Zellen (Abb. 2B). Die B1-Zellen wandern hauptsächlich in die Peritonealhöhle und bilden dort reife B1a, B1b und B10 B-Zellen<sup>39</sup>. Transitionale B2 B-Zellen wandern hauptsächlich in die Milz, wo sie in Marginalzonen B-Zellen (MZ) und Follikuläre B-Zellen (FO) differenzieren können. Nach Antigenkontakt und Aktivierung der B-Zellen, kommt es zur klonalen Expansion. Nach der Differenzierung zu Plasmazellen werden spezifische Antikörper zur Pathogenbekämpfung produziert. Zum langanhaltenden Schutz können Gedächtnis-B-Zellen produziert werden<sup>35</sup>.

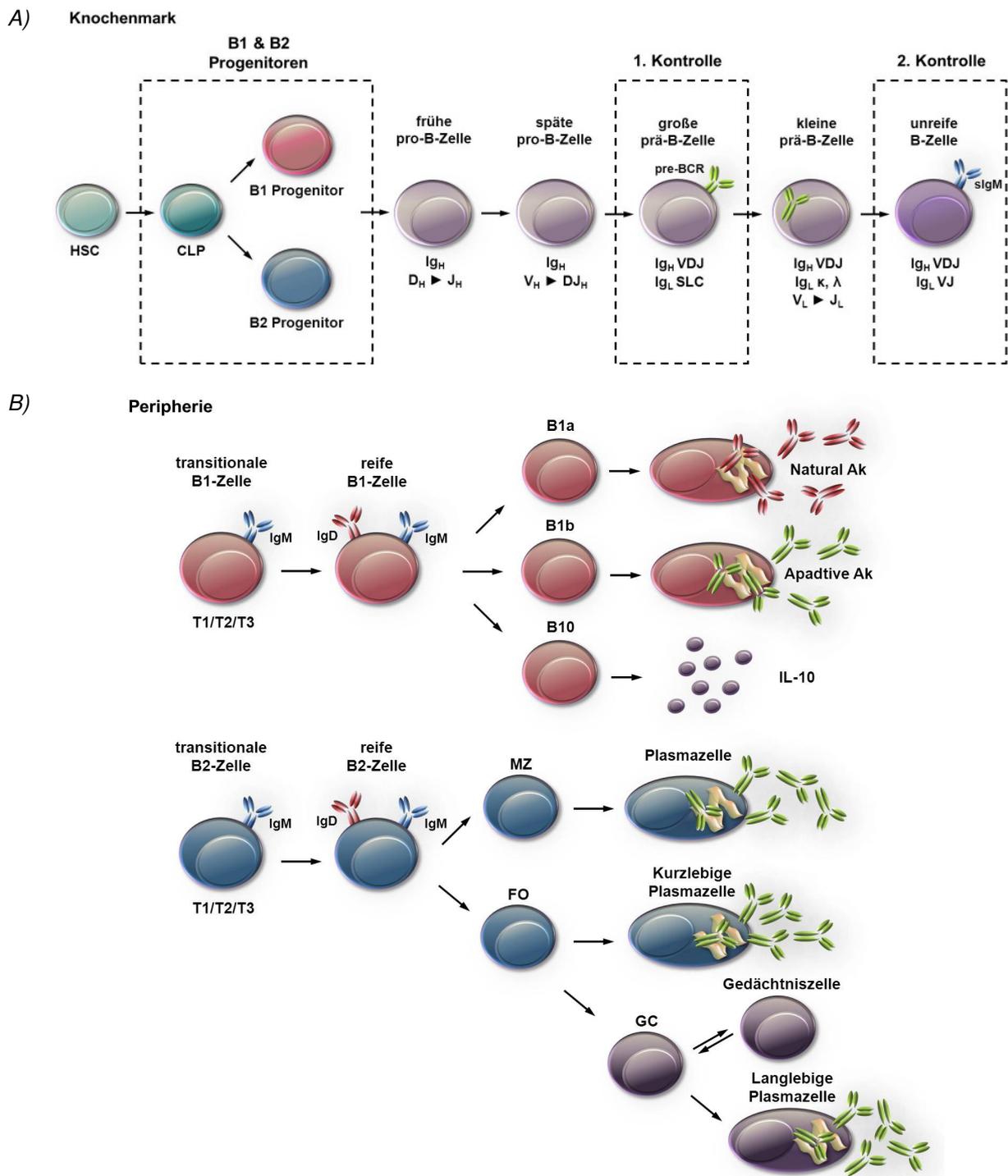


Abb. 2: B-Zell-Entwicklung in der Maus

A) B-Zell-Entwicklung im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen (HSC) in gemeinsame lymphoide Progenitoren (CLP). Bildung spezifischer B1- und B2-Progenitoren, die sich über pro- und prä-B-Zellen in unreife B-Zellen entwickeln und dann das Knochenmark verlassen.

B) Transitionale B1-Zellen in der Peripherie wandern hauptsächlich in die Peritonealhöhle und bilden dort reife B1a, B1b und B10 Zellen. Transitionale B2-Zellen reifen und bilden in den lymphatischen Organen Marginalzonen B-Zellen (MZ) und in der Milz folliculäre B-Zellen (FO) aus. Diese können als Keimzentren-B-Zellen (GC germinal center) nach Antigenkontakt in Plasmazellen oder Gedächtniszellen differenzieren.

Quelle: A) Gezeichnet nach Cambier et al 2007<sup>40</sup> und Janeway's Immunobiology 8. Edition von

*Kenneth Murphy B) Gezeichnet nach Montecino-Rodriguez et al 2012 & Le Bien et al 2008<sup>41,42</sup>*

### 1.3.2 BCR-Aktivierung

Der B-Zellrezeptor besteht aus dem membran-gebundenen Immunglobulin, welches mit dem Heterodimer aus CD79a (Ig $\alpha$ ) und CD79b (Ig $\beta$ ) nichtkovalent verbunden ist. Bindung eines Antigens löst die Signalkaskade am BCR ins Zellinnere aus (Abb. 3). Dabei werden als erstes durch die Src-Kinase *Lck/Yes novel tyrosine kinase* LYN<sup>43</sup>, die Tyrosin-basierten Aktivierungsmotive ITAM (*tyrosine-based activation motif*) am zytoplasmatischen Teil der assoziierten Ig $\alpha$  und Ig $\beta$  Ketten phosphoryliert<sup>44,45</sup>. Die duale Phosphorylierung der ITAMs sorgt für die Rekrutierung und Aktivierung der *Spleen tyrosine kinase* SYK<sup>46</sup>. Ein wichtiger Prozess während der Signalkaskade ist die Bildung des sogenannten „Signalosoms“. Hierfür wird das Adaptorprotein B-cell linker protein BLNK durch SYK phosphoryliert und ist damit in der Lage das Signalosom zu bilden<sup>47</sup>. Es unterstützt als Gerüstprotein unter anderem die Bindung von BTK, dem Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor VAV und der Phospholipase C  $\gamma$ 2 PLC $\gamma$ 2. Die Tec-Kinase BTK kann sowohl durch LYN als auch durch SYK durch Phosphorylierung aktiviert werden<sup>48</sup>. Dadurch ist die Kinase in der Lage ihrerseits PLC $\gamma$ 2 zu aktivieren<sup>49,50</sup>.

Durch die BCR-Aktivierung und die Signalosom-Rekrutierung wird auch die PI3K über den CD19-Korezeptor-Komplex aktiviert<sup>51</sup>. Diese phosphoryliert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) zu Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat (PIP3). PIP3 rekrutiert *Phosphoinositide-dependent kinase-1* Pdk1 an die innere Plasmamembran, welche dann die Proteinkinase B (AKT) und den *mammalian target of rapamycin* mTOR Signalweg aktivieren kann<sup>52</sup>.

Die PLC $\gamma$ 2 ihrerseits spaltet PIP2 in Inositol-1,4,5-triphosphat (IP3) und Diacylglycerin (DAG). DAG kann einerseits das *rat sarcoma viral oncogen* RAS binden und damit den RAF/MEK/ERK Signalweg aktivieren<sup>53</sup> oder über die Proteinkinase C $\beta$  PKC $\beta$  den *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells* NF $\kappa$ B-Signalweg initiieren.

IP3 bindet an den IP3-Rezeptor in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER). Dies sorgt für die Öffnung der Ca<sup>2+</sup>-Kanäle im ER und einem Anstieg der zytoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration. Der Calciumsensor *stromal interaction molecule* STIM im ER leitet diese Information an den Calciumsensor *calcium release-activated calcium modulator* ORAI in der Zellmembran weiter. Dieser reguliert die Öffnung der *Calcium release-activated channels* CRAC, wodurch extrazelluläres Ca<sup>2+</sup> einströmt. Ca<sup>2+</sup>-Ionen binden dann an Calmodulin CaM, welches die Phosphatase Calcineurin aktiviert. Calcineurin dephosphoryliert den Transkriptionsfaktor *Nuclear factor of activated T cells* NFAT und induziert damit die Expression NFAT-abhängiger Gene<sup>54</sup>.

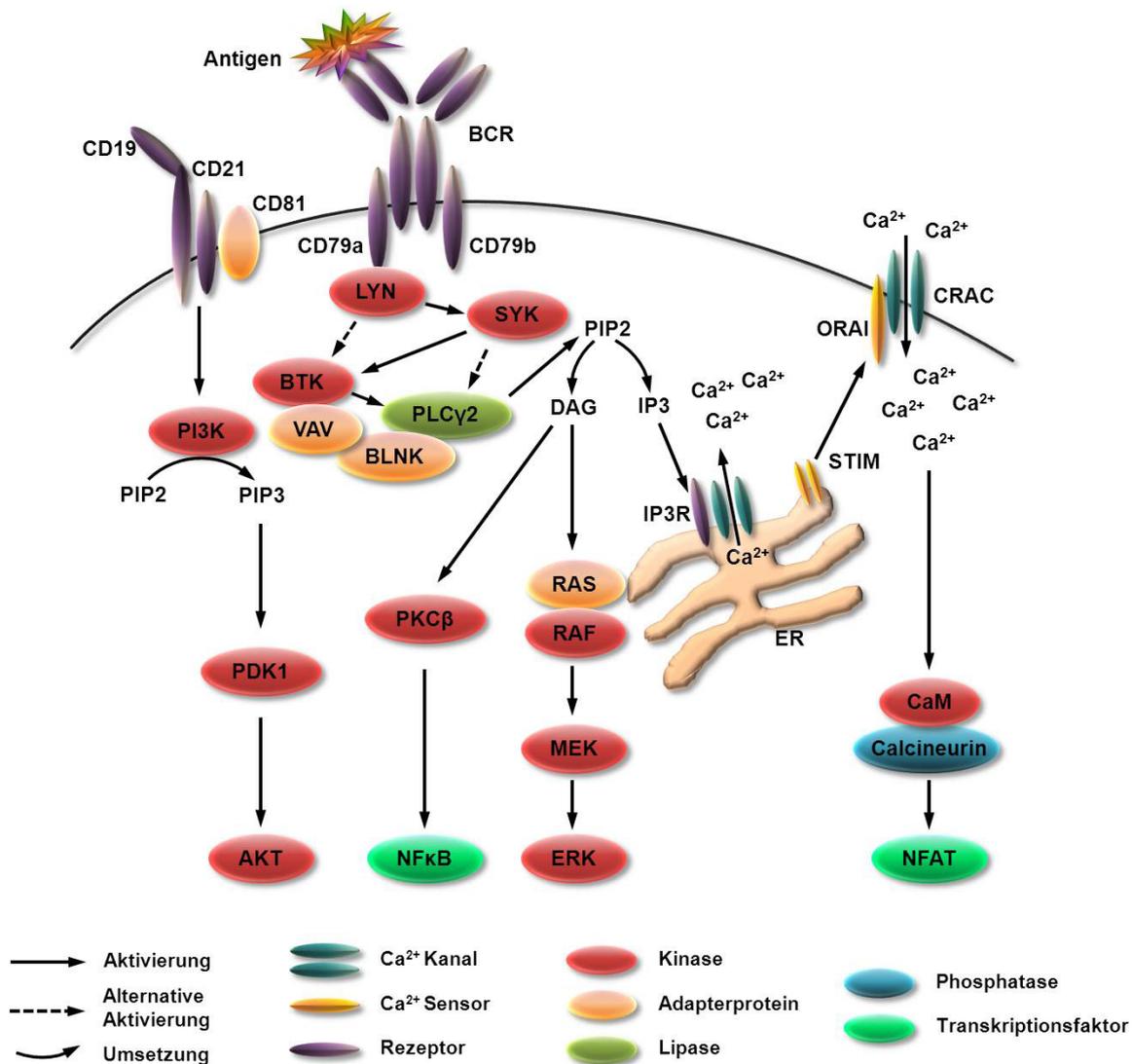


Abb. 3: B-Zell-Rezeptor Signalweg

Die Antigen-Rezeptor-Bindung löst die Phosphorylierung der Igα- und Igβ-Ketten (CD79a&b) durch LYN aus. LYN phosphoryliert SYK und initiiert damit die Bildung des „Signalosoms“ aus BTK, VAV, BLNK und PLCγ2. BTK kann über einen SYK-abhängigen oder SYK-unabhängigen Weg aktiviert werden. Nach seiner Aktivierung phosphoryliert BTK die PLCγ2, die PIP2 in IP3 und DAG spaltet. DAG kann zum einen PKCβ und damit den NFκB-Signalweg aktivieren oder zum anderen über Ras und RAF den MEK/ERK-Signalweg initiieren. IP3 bindet an seinen IP3-Rezeptor in der Membran des ER und löst dort den Ca<sup>2+</sup>-Einstrom ins Zytoplasma aus. Die Ca<sup>2+</sup>-Sensoren STIM und ORAI sorgen zusätzlich für einen extrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Einstrom über CRAC-Kanäle in der Membran. Durch den Anstieg des intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Spiegels wird über Calmodulin (CaM) und Calcineurin der NFAT-Signalweg angeregt. Die BCR-Aktivierung löst zudem über den Korezeptor-Komplex CD19/CD21/CD81 die Aktivierung der PI3K aus. Diese spaltet PIP2 zu PIP3, was über Pdk1 zur Aktivierung des Akt-Signalweges führt.

### 1.3.3 B-Zell-Anergie

Bei der Entwicklung der B-Zellen im Knochenmark kommt es auch zur Bildung von selbstreaktiven B-Zellen, die körpereigene Antigene erkennen können. Ein großer Teil dieser unreifen selbstreaktiven B-Zellen wird über das „*Rezeptor Editing*“, also dem Austausch der Gensegmente im Ig Locus, eliminiert. Gelingt dies nicht, führt das in den meisten Fällen zur Apoptose der B-Zellen. Eine weitere Möglichkeit ist das Persistieren dieser selbstreaktiven B-Zellen in einem toleranten Stadium. Dies führt zu einer unreaktiven unreifen B-Zelle, die sich durch äußere Stimuli nicht einfach wieder aktivieren lässt. Funktioniert dieser Mechanismus nicht, kommt es in der Peripherie zur Bildung von Autoantikörpern, die unter anderem Ursache von Autoimmunerkrankungen wie Rheumatoide Arthritis sind. Der Status der Toleranz ist stark anhängig von der Art der Aktivierung und des Antigens. Während bei Selbstantigenen eine starke Antigenbindung am BCR Toleranz induziert, scheinen B-Zellen mit nur schwach affinen BCRs nicht betroffen zu sein. Wird Toleranz experimentell induziert, kann diese nur unter konstanter Exposition des Antigens aufrechterhalten werden. Trotz der Sicherungsmechanismen im Knochenmark gelingt es Subpopulationen unreifer, niedrig-affiner, selbstreaktiver B-Zellen in die Peripherie zu gelangen. In der Milz reifen die B-Zellen in naive B-Zellen aus und zirkulieren über die lymphatischen Organe durch den Organismus. Dies überleben reife naive B-Zellen generell nur wenige Tage ohne Antigenkontakt. In der Peripherie kann es nun zur Aktivierung der B-Zelle oder zur Induktion von Anergie kommen. Anergie wird meist in selbstreaktiven naiven B-Zellen, durch fehlende ko-stimulierende Faktoren ausgelöst, oder durch einen tonischen BCR Stimulus. Im Zustand der Anergie wird die B-Zelle unsensibel auf äußere Stimuli und lässt sich nicht mehr aktivieren, dies geht zudem mit einer erhöhten Apoptoseresistenz einher (Übersicht in Janeways´ Immunobiology, Nossal et al. 1991, Yarkoni et al. 2010<sup>55,56</sup>).

## 1.4 Ca<sup>2+</sup>/NFAT Signalweg

### 1.4.1 NFAT-Transkriptionsfaktoren

Die Familie der NFAT-Transkriptionsfaktoren besteht aus den fünf Mitgliedern NFAT1-5 und das erste Protein wurde bereits 1988 in T-Zellen beschrieben. Dort wurde es als DNA-bindendes Protein am Interleukin 2 (IL-2) Promoter charakterisiert<sup>57</sup>. Nach Jahren intensiver Forschung konnte nicht nur in Immunzellen wie T-Zellen, B-Zellen, Natürliche Killerzellen (NK), Dendritischen Zellen (DC) und Megakaryozyten<sup>58-60</sup>, sondern auch bei der Entwicklung der Muskulatur, des Herzens und anderen Organe eine essentielle Rolle der NFAT-Faktoren beschrieben werden<sup>61</sup>. Die Struktur der NFAT-Proteine ist evolutionär hochkonserviert und auch zwischen verschiedenen Spezies homolog. In Abb. 4 ist der schematische Aufbau der

NFAT-Proteine dargestellt. Sie bestehen aus einem N-terminalen regulatorischen Element, auch bekannt als *NFAT homology region* (NHR) mit einer Transaktivierungsdomäne (TAD), einer DNA-Bindedomäne, auch *Rel-homology domain* (RHD) genannt und einer C-terminalen Domäne. Die regulatorische Domäne besteht aus mehreren Serin-reichen und Serin-Prolin Motiven (serine-rich regions SRR, serine-prolin regions SP), die durch verschiedene Kinasen wie der Casein Kinase 1 (CK1), der Glykogensynthase Kinase 3 (GSK3) und der *dual-specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase* (DYRK) phosphoryliert werden können. Zudem enthält die regulatorische Domäne auch die Calcineurin-Bindestelle, wodurch die NFAT-Aktivität maßgeblich reguliert wird. Ein wichtiger Abschnitt in dieser Domäne ist auch die nukleäre Lokationssequenz (NLS), welche für die Translokation von NFAT in den Zellkern sorgt. Die DNA-Bindedomäne verfügt über mehrere Ansatzpunkte für die Bindung von Kofaktoren wie dem *FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog* (FOS) und dem *jun proto-oncogene* (JUN). Fast alle NFAT-Faktoren werden über den intrazellulären Calcium-Signalweg reguliert, mit Ausnahme von NFAT5, welches vor allem durch osmotischen Stress aktiviert wird (Übersicht in Müller et al., 2010<sup>62</sup>).

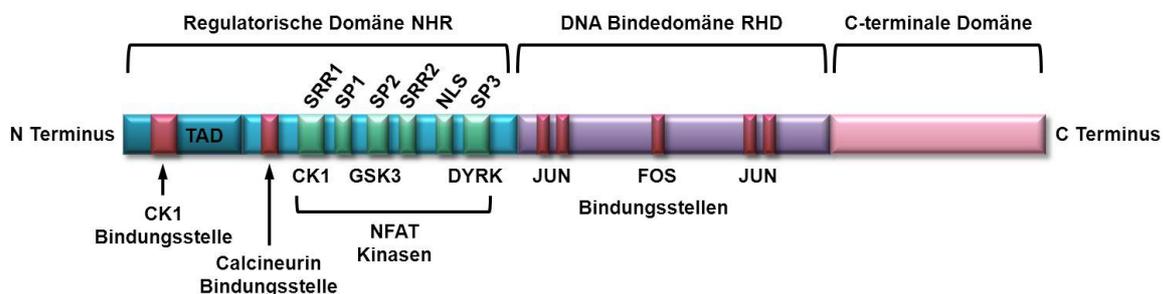


Abb. 4: Schematischer Aufbau der NFAT-Transkriptionsfaktoren

NFAT besteht aus einer N-terminalen regulatorischen Domäne (NHR), die neben der TAD Domäne Bindungsstellen für CK1 und Calcineurin besitzt. Des Weiteren enthält sie mehrere Serin- (SRR) und Serin-Prolin- (SP) reiche Motive die unter anderem als Angriffspunkte für die NFAT-Kinasen CK1 GSK3 und DYRK fungieren. In der NHR-Domäne befindet sich auch die NLS-Sequenz, die NFAT in den Zellkern transloziert. Die DNA-Bindedomäne enthält Erkennungsmotive für die Kofaktoren FOS und JUN. Der letzte Abschnitt bildet die C-terminale Domäne.

#### 1.4.2 Ca<sup>2+</sup>/NFAT Regulation

Der Ca<sup>2+</sup>/NFAT-Signalweg kann durch Rezeptoraktivierung des T-Zellrezeptors (TCR), BCRs, des *fragment crystallisable* Rezeptors (Fc-Rezeptor) und durch Chemokinrezeptoren induziert werden. Da sich diese Arbeit maßgeblich mit der Aktivierung von NFAT in B-Zellen beschäftigt, wird im Folgenden der Signalweg anhand der BCR-Aktivierung erläutert (Abb. 5). Die Bindung eines Antigens an den BCR löst die Signalkaskade aus. Der wichtigste Schritt für die NFAT-Aktivierung ist die Rekrutierung des „Signalosoms“ und die damit

verbundene Aktivierung von PLC $\gamma$ 2. Diese spaltet PIP2 in IP3 und DAG. Während DAG unter anderem den MEK/ERK-Signalweg aktiviert, bindet IP3 an den IP3-Rezeptor. Dies induziert die Öffnung der Calcium-Kanäle im endoplasmatischen Retikulum (ER) und führt zum Ca<sup>2+</sup>-Einstrom ins Zytoplasma. Die Änderung der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration löst eine Kommunikation zwischen den Ca<sup>2+</sup>-Sensoren STIM im ER und ORAI in der Zellmembran aus. ORAI reguliert dann die Öffnung des Ca<sup>2+</sup>-Kanals CRAC aus. Dies führt zum weiteren Anstieg des zytoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-Levels. Ca<sup>2+</sup> kann nun an Calmodulin binden, was zur Aktivierung der Phosphatase Calcineurin führt. Calcineurin dephosphoryliert das inaktive NFAT im Zytoplasma, was eine Translokation in den Zellkern auslöst. Dort kann NFAT in einem dimerischen Komplex aus Kofaktoren, wie dem *activator protein 1* (AP1), an die Promotorregion verschiedener Zielgene binden. Dadurch werden unter anderem die Proliferation, Aktivierung und Differenzierung der B-Zelle gesteuert. Die Transkription wird über die Rephosphorylierung von NFAT durch die Kinasen CK1, GSK3 und DYRK gesteuert (Übersicht in Müller et al., 2010<sup>62</sup>).

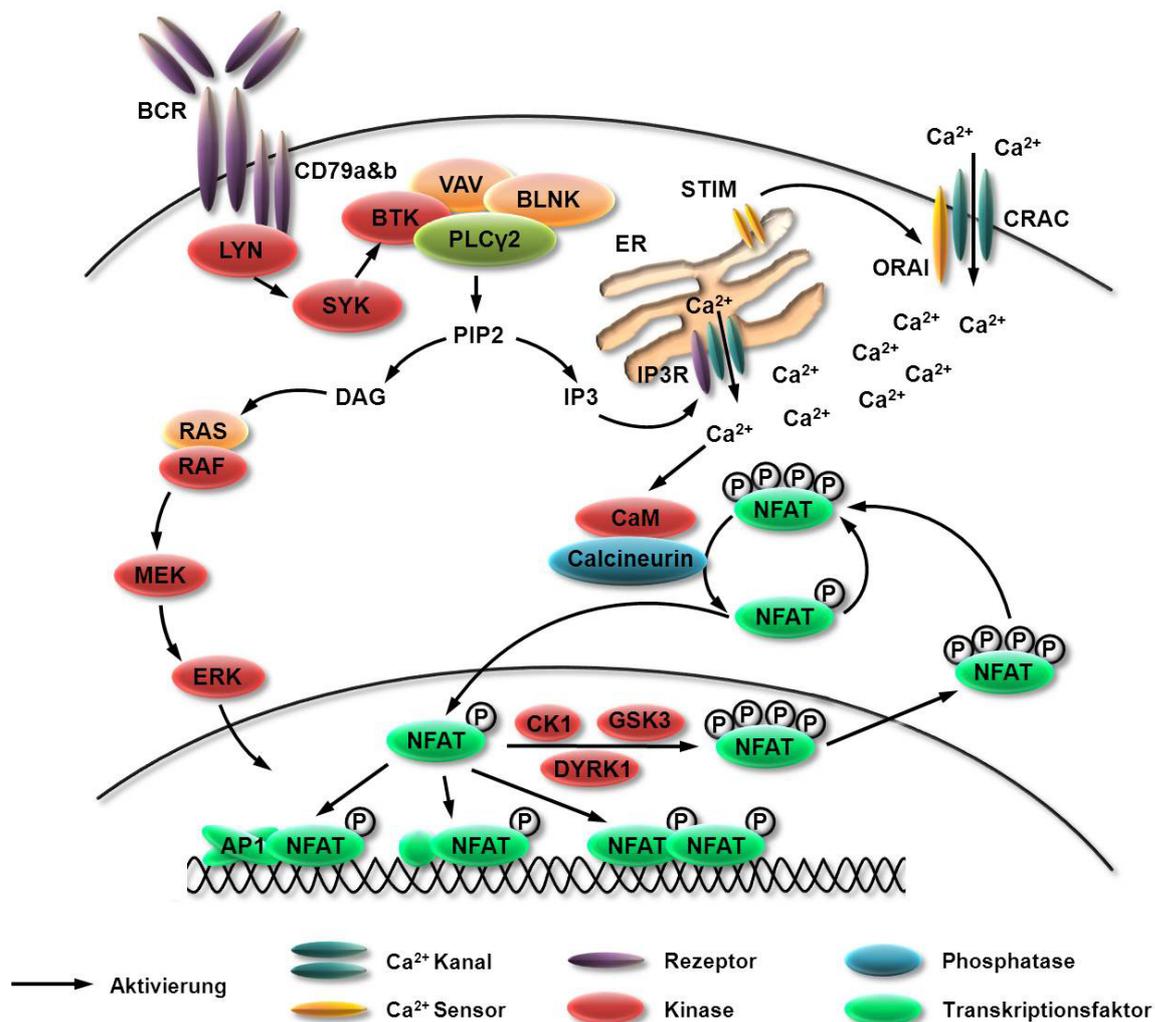


Abb. 5: Ca<sup>2+</sup>/NFAT-Signalweg in der B-Zelle

NFAT befindet sich in stark phosphoryliertem Zustand im Zytoplasma ruhender Zellen. Der Aktivierung des Rezeptors, in diesem Fall des BCRs, induziert den Ca<sup>2+</sup>/NFAT-Signalweg. Dies führt über die Aktivierung der Kinasen LYN und SYK zur Rekrutierung des Signalosoms aus BTK, VAV und PLC $\gamma$ 2 durch das Adapterprotein BLNK. PLC $\gamma$ 2 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 Ca<sup>2+</sup>-Einstrom ins Zytoplasma, was über den Ca<sup>2+</sup>-Sensor STIM an ORAI weitergeleitet wird. ORAI induziert dann die Öffnung der CRAC-Kanäle in der Zellmembran. Durch die stark erhöhte intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, wird über Calmodulin die Phosphatase Calcineurin aktiviert. Calcineurin dephosphoryliert NFAT, was zu dessen Translokation in den Zellkern führt. 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.

### 1.4.3 NFAT bei Tumorerkrankungen

Der Einfluss des NFAT Signalwegs auf die Proliferation und Differenzierung lymphatischer Zellen wurde umfangreich untersucht und beschrieben. Der Ca<sup>2+</sup>/NFAT-Signalweg spielt auch bei verschiedenen Erkrankungen wie zum Beispiel beim schweren kombinierten Immundefekt (*severe combined immunodeficiency* SCID), beim Bruton-Syndrom (*X-linked*

*agammaglobulinemia* XLA), beim Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS) und beim systemischen Lupus erythematoses (SLE) eine essentielle Rolle. Daß NFAT-Dysregulation auch zu malignem Wachstum und Transformation führt, ist damit nicht überraschend. Für die einzelnen Familienmitglieder wurden bereits verschiedene Aspekte im Hinblick auf Tumorbildung und Metastasierung untersucht. Beim Mammakarzinom wurde beispielsweise eine tragende Rolle für NFAT1 und NFAT5 charakterisiert, vor allem in Hinblick auf Metastasierung durch die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT)<sup>63</sup>. NFAT2 und NFAT4 hingegen sind beim malignen Melanom bei der Induktion der Cyclooxygenase-2 COX2 beteiligt<sup>64</sup>. Eine Induktion von *v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog* C-MYC im Pankreaskarzinom durch NFAT2 ist ebenfalls bekannt<sup>65</sup> (Übersicht in Müller et al., 2010<sup>62</sup>).

## 1.5 Aberrante Signalwege in der CLL

### 1.5.1 Einflüsse von NFAT2

NFAT2 scheint vor allem auch bei hämatologischen Erkrankungen eine wichtige Rolle zu spielen. Während in der Chronisch-Myeloischen Leukämie (CML) NFAT2 bei der Resistenzentwicklung gegenüber Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) involviert ist<sup>66</sup>, konnte in der Akuten Lymphatischen T-Zell Leukämie (T-ALL) eine konstitutive Aktivierung von Calcineurin, das auch NFAT2 induziert, beschrieben werden<sup>67</sup>. In B-Zell-Lymphomen ist bislang eine Vielzahl an NFAT2-Aspekten charakterisiert worden. Obwohl Analysen zum Mutationsstatus von NFAT2 bei Tumorerkrankungen keine Aufschlüsse gaben<sup>68</sup>, zeigten Untersuchungen eine aberrante Aktivierung, wie Überexpression und Hyperaktivierung in einer Vielzahl von Tumoren.

Eine histopathologische Untersuchung an über 300 Biopsien verschiedener Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) zeigte eine deutliche Überexpression von NFAT2 in der überwiegenden Mehrheit der Präparate. Des Weiteren konnte in der CLL, dem Diffus-großzelligen B-Zell NHL (DLBCL) und dem Burkitt/Burkitt-like NHL eine starke aberrante nukleäre Translokation von NFAT2 nachgewiesen werden<sup>69</sup>. Die Produktion von IL-10 in CLL-Zellen wirkt sich förderlich auf deren Überleben aus: Sie wird maßgeblich durch die Expression von CD5 gesteuert, was in regulatorischem Kontakt mit NFAT2 steht. Neueren Studien gelang es sogar, eine Korrelation der BCR-Reaktivität mit dem NFAT2-Aktivierungsstatus zu dimensionieren<sup>68</sup>. Hierbei wurde das CLL-Patientenkollektiv in sogenannte *Responder* und *Non-Responder* eingeteilt. Dies beschreibt die Fähigkeit der CLL-Zellen auf αIgM-Stimulation mit erhöhter metabolischer Aktivität und Apoptoseresistenz zu reagieren<sup>70</sup>. Während alle CLL-Proben eine erhöhte NFAT2-Expression aufweisen, zeigten nur die *Responder* auf αIgM-Stimulation eine verstärkte NFAT2-DNA-Bindungskapazität. Interessanterweise

korrelierte eine erhöhte BCR-NFAT-Aktivität direkt mit einer deutlich schlechteren Prognose für die Patienten.

### 1.5.2 Die Rolle des BCRs und der Anergie

Der BCR nimmt in der CLL einen besonderen Stellenwert ein. Wo der BCR-Signalweg in physiologischen B-Zellen die Selektion, Proliferation, Differenzierung und Antikörper Produktion auslöst<sup>42</sup>, spielt er bei der Pathogenese der CLL eine kritische Rolle. Die Stimulation des BCRs in der CLL beleuchtet sehr unterschiedliche, teilweise sogar kontroverse Erkenntnisse<sup>71,72</sup>. Die Stimulation des BCRs ist an der Selektion und Expansion der malignen CLL-Klone beteiligt<sup>73</sup>. In CLL-Zellen verfügt der BCR über individuelle strukturelle Eigenheiten. Er weist eine sehr spezielle Verwendung der einzelnen schweren und der leichten Ig-Ketten auf, was zu einem „stereotypen“ BCR in der CLL führt<sup>74</sup>. Zudem lassen sich die BCRs anhand ihrer somatischen Mutationen in den variablen Regionen der IGVH charakterisieren<sup>14</sup>. Dies lässt eine Einteilung der CLL-Patienten in zwei Gruppen zu (siehe auch 1.2.1). Die Abstammung der CLL selbst und auch die ihrer Subpopulationen wird immer wieder kontrovers diskutiert. Man geht davon aus, dass die Gruppe der unmutierten IGVH (U-CLL) eher von einer naiven B-Zelle abstammt. Die mutierten M-CLLs gehen vermutlich aus Keimzentrum- (GC) oder Marginal-Zonen-B-Zellen (MZ) hervor, welche bereits den Isotypenwechsel vollzogen haben. Neben diesem Zwei-Zellen-Ursprungsmodell werden auch verschiedene Ein-Zell-Ursprungsmodelle beschrieben<sup>75</sup>. Obwohl der Ursprung noch immer nicht vollständig aufgeklärt wurde, sind die molekularen Merkmale der CLL detailliert charakterisiert worden. Die Relevanz des BCRs und seiner Fähigkeit auf externe Stimuli zu reagieren, wurde in zahlreichen Studien untersucht. Damit konnte verdeutlicht werden, dass die Gruppe der M-CLL-Patienten größtenteils nicht auf IgM-Stimulation des BCRs reagiert und sogar häufig eine Reduktion der IgM-Expression auf der Membran zeigt<sup>76</sup>. Anergie CLL-Zellen zeigen ein chronisch-aktiven BCR-Signalweg und ein leicht erhöhte Konzentration an intrazellulärem  $Ca^{2+}$ . In diesem Status der Anergie kommt es zu einer konstitutiven Aktivierung von ERK1/2 und NFAT2<sup>68,77</sup>. Diese Zellen verfügen kaum über eine relevante Expression der ungünstigen Marker CD38 und ZAP70. Bislang gestaltete sich die klinische Korrelation des anergen Status und der Prognose für CLL-Patienten als schwierig. Auch wenn die klinischen Marker ZAP70 und CD38 eher in nicht-anergen CLL-Zellen exprimiert werden, zeigen diese in Kultur ein deutlich verlängertes Überleben und Defekte in der Apoptoseinduktion<sup>77</sup>. Es bleibt in weiteren Studien zu untersuchen, wie sich die therapeutische Nutzbarkeit der Anergie auf die Prognose und den Therapiebenefit der CLL-Patienten auswirkt.

## 1.6 Transgene Mausmodelle

Um die Pathogenese von Tumorerkrankungen zu untersuchen sind Modellsysteme unerlässlich. Hierbei sind die *in vitro* Analysen von primären Zellen und Tumor-Zelllinien zwar ein wesentlicher Bestandteil der Forschung, allerdings sind die Möglichkeiten durchaus limitiert. Während sich die zelluläre Reaktion auf verschiedene Präparate und die Reaktivität der Tumorzellen sehr gut *in vitro* untersuchen lassen, ist es nahezu unmöglich die maligne Transformation selbst zu untersuchen. Die Ursache der Tumorentstehung, kann daher meist nur retrospektiv ermittelt werden. Eine Möglichkeit die zellulären und genetischen Ursachen der malignen Transformation zu untersuchen sind unter anderem transgene Mausmodelle. Hierbei handelt es sich meist um genetisch veränderte Inzuchtstämme, die unter strenger Kontrolle eigens für die Krebsforschung gezüchtet wurden.

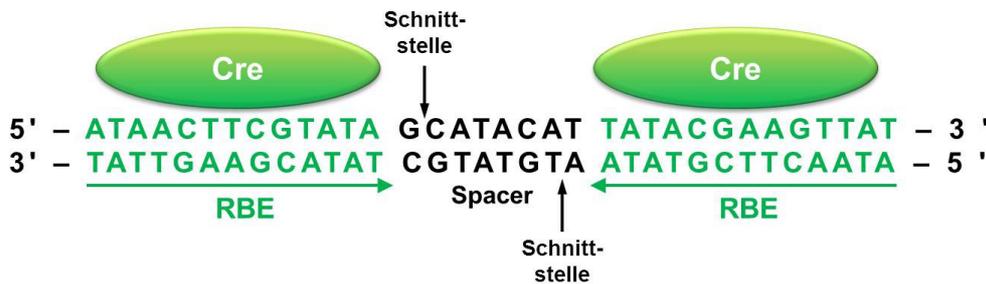
### 1.6.1 Das E $\mu$ -TCL1 Mausmodell

Um die Entstehung der CLL *in vivo* zu untersuchen, werden verschiedene transgene Mausmodelle verwendet. Dabei gibt neben den durch *Bcl2*<sup>78</sup> und dem *Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13 (Tnfsf13)*<sup>79</sup> vermittelten CLL-Modell, auch onkogene Modelle die durch das große *Simian Vacuolating Virus 40 T Antigen (SV40 T-Antigen)*<sup>80</sup> oder das *T cell lymphoma breakpoint 1 Onkogen (TCL1)*<sup>81</sup> induziert werden. Das E $\mu$ -TCL1-Modell stellt hierbei eines der am häufigsten verwendeten Modelle dar. Das *TCL1*-Gen wurde erstmals 1989 bei einem Patienten mit T-Zelleukämie entdeckt und als mögliches Onkogen beschrieben<sup>82</sup>. Der humane *TCL1*-Lokus liegt auf Chromosom 14q32.1 und ist häufig bei chromosomalen Translokationen t(14:14)(q11;q32) und Inversionen inv(14)(q11;q32) mit den T-Zell-Rezeptorgenen beteiligt<sup>82,83</sup>. Durch diese chromosomalen Aberrationen kommt es zu einer abnormalen Aktivierung des *TCL1*-Onkogens und zur Entstehung von T-Zell-Neoplasien. Das Maus *Tcl1*-Gen wurde 1997 auf Chromosom 12 identifiziert<sup>84</sup>. Im ersten Mausmodell wurde das *Tcl1*-Onkogen über die Kontrolle des *p56(Lck)* Promotors exprimiert und führte zu Entstehung einer reifzelligen T-Zell-Leukämie nach einer relativ langen Latenzzeit<sup>85</sup>. Weitere Analysen zeigten ebenso eine Expression des *Tcl1*-Gens bei der Entwicklung der B-Zellen<sup>84,86</sup>. Unter anderem konnte auch eine abnormalen Aktivierung des *TCL1*-Onkogens bei einer Vielzahl von B-Zell-Tumoren entdeckt werden<sup>87,88</sup>. Im Jahr 2002 wurde dann das erste CLL-Mausmodell von der Arbeitsgruppe um Carlo M. Croce publiziert<sup>81</sup>. Durch die B-zell-spezifische Expression des *Tcl1*-Onkogens, unter der Kontrolle des E $\mu$ -Enhancers kommt es zur Entwicklung einer oligoklonalen CLL. Diese verläuft sehr ähnlich der humanen Erkrankung und ist charakterisiert durch die klonale Expansion von CD5<sup>+</sup> B-Zellen in den lymphatischen Organen und im Blut der Tiere. Die E $\mu$ -TCL1 transgenen Tiere versterben in einem medianen Alter von 10-12 Monaten.

### 1.6.2 Konditioneller Knockout

Der konventionelle Keimbahn-Knockout stellt zwar eine wirkungsvolle Methode der Genausschaltung in einem komplexen Organismus dar, führt aber bei essentiellen Genen der embryonalen Entwicklung oft zu einem letalen Phänotyp. Um diese Problematik zu umgehen, wird in einem konditionellen Knockout der kritische Zeitpunkt der Rekombination, welcher zur Deletion des jeweiligen Gens führt, von den embryonalen Stammzellen in den sich entwickelnden Organismus gelegt. Dies wurde erstmals 1993 in der Arbeitsgruppe um Klaus Rajewsky durchgeführt<sup>89</sup>. Sie verwendeten das sequenzspezifische Cre/loxP Rekombinationssystem aus dem Bakteriophagen P1<sup>90,91</sup>. Die Zyklische Rekombinase (Cre) bildet eine dimerische Struktur, welche an spezielle *locus of crossing over [x] of P1 recombinase* (loxP) Sequenzen in der DNA bindet<sup>92</sup>. Diese loxP Sequenzen sind exakt 34 bp lang und bestehen aus je zwei 13 bp langen *recombinase binding elements* (RBE) wie in Abb. 6A dargestellt. Diese sind immer durch ein 8 bp langes Zwischenstück (*spacer*) getrennt<sup>92</sup>. Das Prinzip der Genausschaltung beruht nun auf der homologen Rekombination, in dem man das zu deletierende Gen durch zwei loxP-Sequenzen flankiert. Der schematische Aufbau ist in Abb. 6B dargestellt. Durch die flankierenden loxP-Sequenzen am Exon 3 kommt es durch die Cre-Rekombinase bei der homologen Rekombination zur Deletion dieses DNA-Abschnittes<sup>93</sup>. Die Folge ist ein vorzeitiger Stopp bei der Translation, wodurch kein funktionelles NFAT2 Protein gebildet wird. Um den Einfluss von NFAT2 B-zell-spezifisch zu untersuchen, kann ein konditioneller Knockout über CD19 oder den CD79A (immunoglobulin-associated alpha, Mb1) Promotor verwendet werden. Beide werden schon in einem sehr frühen Stadium der B-Zell-Entwicklung exprimiert<sup>94,95</sup>. In dieser Arbeit wurde die CD19-Cre-Linie verwendet, bei der die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des B-Zell-spezifischen Promotors CD19 exprimiert wird.

A)



B)

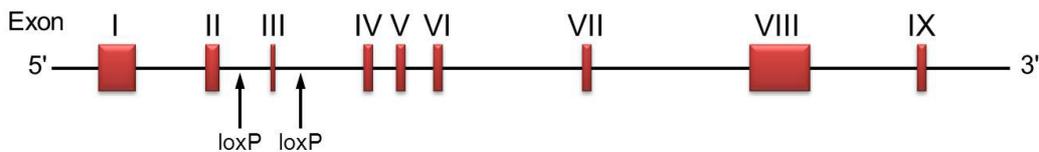


Abb. 6: Cre-Rekombinase-Aktivität an der 34 bp loxP Sequenz im NFAT2-Gen

A) Nukleotid-Abfolge der 34 bp loxP-Sequenz mit den beiden 13 bp langen RBEs und dem 8 bp Spacer. Die Pfeile (schwarz) markieren die Schnittstelle der Cre-Rekombinase.

B) Schematischer Aufbau des NFAT2-Gens mit den neun Exons. Die Pfeile (schwarz) markieren die beiden loxP Sequenzen, an denen die DNA deletiert wird.

## 1.7 Zielsetzung

Die Chronische Lymphatische Leukämie (CLL) bleibt bis heute eine nicht vollständig heilbare Erkrankung. Durch konventionelle Chemotherapeutika und Antikörper-basierte Immuntherapien ist es möglich, die Patienten möglichst lange in Remission zu halten. Kommt es zur Entwicklung von Resistenzen oder einem erneuten Rezidiv, bleibt meist nur eine allogene Stammzelltransplantation. Diese Methode verspricht nur für einen kleinen Teil der Patienten eine Aussicht auf Heilung. Aufgrund dieser ungünstigen klinischen Ausgangslage, steigt die Nachfrage an neuen Therapieansätzen stetig. So konnten durch die Untersuchung der molekularen Eigenschaften der CLL in jüngster Zeit neue Medikamente entwickelt und zugelassen werden. Zu diesen „small molecules“ gehören sowohl der BTK-Inhibitor Ibrutinib, als auch der PI3Kδ-Inhibitor Idealasib.

Ziel dieser Arbeit ist es, die molekulare Rolle des Transkriptionsfaktors NFAT2 in der Pathogenese der CLL zu untersuchen. Da bereits aus einer Vielzahl an Studien eine aberrante Aktivierung von NFAT2 in CLL-Proben bekannt war, steht in dieser Arbeit der regulatorische Mechanismus im Fokus. Zuerst soll der Einfluss von NFAT2 auf die physiologische B-Zell-Entwicklung in einem konditionellen Knockout-Mausmodell untersucht und die bereits beschriebenen Aspekte belegt werden. Des Weiteren soll im transgenen Eμ-TCL1-Mausmodell die Entwicklung der CLL unter der Abwesenheit von NFAT2 untersucht werden. Dabei sind vor allem Aspekte wie die Beeinträchtigung der Überlebensdauer und die

Dynamik der CLL essenziell. Um weiteren Aufschluss über die zugrunde liegenden Mechanismen zu erhalten, werden abschließend molekulare Analysen des BCR-Signalweges durchgeführt.

Die Analyse der Rolle des  $\text{Ca}^{2+}$ /NFAT Signalweges in der Pathogenese der CLL soll letztendlich die Relevanz dieses Signalweges beleuchten und kann damit möglicherweise neue Aspekte für zukünftige Therapieansätze bieten.

## 2 MATERIAL & METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterialien

96- <i>well</i> plate F-Bottom	Greiner bio-one, Frickenhausen
96- <i>well</i> plate V-Bottom	Greiner bio-one, Frickenhausen
96- <i>well</i> plate, Suspension culture U-Bottom	Greiner bio-one, Frickenhausen
96- <i>well</i> plate, Ultra Low attachment U-Bottom	Costar® Corning, Tewksbury, MA
96- <i>well</i> plate, withe	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
Einbettkassetten	Langenbrinck, Emmendingen
FACS Röhrrchen 5 ml	Costar® Corning, Tewksbury, MA
FACS Röhrrchen m. Deckel 5 ml	Costar® Corning, Tewksbury, MA
Falconröhrrchen 15; 50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
GeneChip® Gene 1.0 ST Array	Affymetrix, Santa Clara, CA
Gentle MACS C-tubes	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Gewebe-Kulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>	Greiner bio-one, Frickenhausen
Gewebe-Kulturschale Polystyrol PS 16/60 mm	Greiner bio-one, Frickenhausen
Handschuhe Micro-Touch	Ansell, Tamworth UK
iBlot® Transfer Stack	Novex® Life technologie, Carlsbad, CA
Kapillaren 9 µl	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
LS MACS Columns	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Microvette 500 EDTA	Sarstedt, Nümbrecht
Nitrilhandschuhe	Kimberley Clark, Weinheim
Objektträger Superfrost	Langenbrinck, Emmendingen
PCR-Reaktionsgefäße 8er Strips	Biozym, Hessisch Oldendorf
Pipette serologisch Advant. 2; 5; 10; 25; 50 ml	Costar® Corning, Tewksbury, MA
Pipettenspitzen 10; 200; 1000; 1250 µl	Eppendorf, Hamburg
QIA Shredder	Qiagen, Hilden
Reaktionsgefäße 0,5; 1,5; 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Sealing Folie	Roche, Penzberg
Spritze Insulin 1,0 ml mit Kanüle	Costar® Corning, Tewksbury, MA

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
16 % Formaldehyde (w/v) –Methanol frei	Pierce, Perbio Rockford USA
7-AAD	BD Biosciences, Heidelberg
Agarose NEE0 Ultra	Sigma-Aldrich, Steinheim
Annexin V : PE Apoptosis Detection Kit I	BD Biosciences, Heidelberg
APC BrdU Flow Kit	BD Biosciences, Heidelberg
Bolt™ LDS Sample Buffer	Invitrogen™ Life technologies, Darmstadt
Bolt™ MES SDS Running Buffer	Invitrogen™ Life technologies, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
CD19 MicroBeads (mouse)	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
CD5 (Ly-1) MicroBeads (mouse)	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Cell Fixation/Permeabilisation Kit	BD Biosciences, Heidelberg
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability	Promega, Wisconsin, USA
Decalcifizierungslösung	Richard Allan Scientific, Braunschweig
D-Glucose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DNase & Rnase freies Wasser	Promega, Wisconsin, USA
Dnase I	Invitrogen™ Life technologies, Darmstadt
dNTPs	Lonza, Basel, CH
EDTA-Lösung (0,5M)	FLUKA, Steinheim
EGTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Eosin G-Lösung 0,5% wässrig	Merck, Darmstadt
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
Formalin (37%)	Merck, Darmstadt
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom, Merck, Darmstadt
HALT Protease & Phosphatase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA

## 2 Material & Methoden

### 2.1 Material

---

Hämatoxilin	Merck, Darmstadt
HEPES	Gibco® Life technologie, Carlsbad, CA
INDO-1-AM	Invitrogen™ Life technologies, Darmstadt
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isofluran	CP-pharma, Burgdorf
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Steinheim Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Glutamin	Gibco® Life technologie, Carlsbad, CA
Licor Blocking Buffer	Li-COR Bioscience, Lincoln, US
LPS from E.coli	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lymphozytenseparationsmedium LSM 1077	PAA, GE Healthcare, Freiburg
MACS Puffer	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
MEN nicht essentielle Aminosäuren	Gibco® Life technologie, Carlsbad, CA
Methanol	Merck, Darmstadt
Midori Green	Biozym, Hessisch Oldendorf
miRNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Rneasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumpyruvat	Gibco® Life technologie, Carlsbad, CA
Neomount Eindeckmedium	Merck Millipore, Darmstadt
NE-PER Nuclear & Cytoplasmic Extraction	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Oligo(dT) <sub>23</sub> Primer	Sigma-Aldrich, Steinheim
One-Color Protein Molecular Weight Marker	Li-COR Bioscience, Lincoln, US
Orange G	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pan B Cell Isolation Kit (mouse)	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
PBS w/o Ca <sup>2+</sup> Mg <sup>2+</sup>	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin/Streptomycin-Mix	PAA, GE Healthcare, Freiburg
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pluronic F-127	Invitrogen™ Life technologies, Darmstadt
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Steinheim
QuickExtract DNA Extraktionslösung	Biozym, Hessisch Oldendorf
Red Taq + Puffer	Sigma-Aldrich, Steinheim
Reducing Agent	Life technologies, Darmstadt
RIPA-Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Rnase Dnase freies Wasser	Promega, Wisconsin, USA,

RNAse Out	Invitrogen, Darmstadt
Rneasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Roti®-Nanoquant	Carl Roth, Karlsruhe
Roticlear	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
β-Mercaptoethanol (Zellkultur)	Gibco® Life technologie, Carlsbad, CA

### 2.1.3 Geräte und Zubehör

ADVIA 120	Bayer, Leverkusen
Apotome	Zeiss, Jena
BD FACS Aria™ II	BD Biosciences, Heidelberg
BD FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg
BD LSR II	BD Biosciences, Heidelberg
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Bolt® Mini Gel Tank	Invitrogen™ Life technologies, Darmstadt
Countess™	Invitrogen™ Life technologies, Darmstadt
ELISA Reader	TECAN, Crailsheim
Eppendorf 8 Kanal elektr.	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Research Plus 2,5; 10; 100; 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Geldoku E-Box-VX2/20M	Peqlab, Erlangen
Gelkammer	Peqlab, Erlangen
Gentle MACS	Miltenyi, Bergisch Gladbach
GloMax® 96 Microplate Luminometer	Promega, Wisconsin, USA
iBlot® Gel Transfer Device	Invitrogen™ Life technologies, Darmstadt
Inkubator HERA Cell	Heraeus, Hanau
Licor Odyssey Imaging System	Li-COR Bioscience, Lincoln, US
Light Cycler LC480	Roche, Penzberg
Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau

## 2 Material & Methoden

### 2.1 Material

---

Mikroskop HBO 50	Zeiss, Jena
Mikrowelle	LG, Willich
Nanodrop	Peqlab, Erlangen
Ohrlochzange	E. Becker & Co GmbH, Castrop-Rauxel
Pipetboy acu	Integra Biosciences, Chur CH
Schüttler Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Spannungsgerät Power Pac 300	Bio-Rad, München
Sterilbank HERA safe	Heraeus, Hanau
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Vacusaft	Integra Biosciences, Chur CH
Waage Kern	Roth, Karlsruhe
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg

#### 2.1.4 Puffer und Medien

10x TBE Puffer (1 l)	107,8 g TRIS, 55 g Borsäure, 7,44 g EDTA
Ammoniumchlorid Puffer (1 l)	0,8% NH <sub>4</sub> Cl in ddH <sub>2</sub> O, 0,1 mM EDTA gepuffert mit KHCO <sub>3</sub> auf pH 7,4
Blutentnahmepuffer	PBS + 1% BSA + 5,475 µM EDTA (0,5M)
B-Zellmedium	RPMI, 10% FCS, 1% Pen/Strep, 1% MEN, 1% Natriumpyruvat 50 µM β-Mercaptoethanol
Einfrriermedium	FCS + 10% DMSO
PBS-T	PBS + 0,1% Tween-20
Medium 1	RPMI, 5% FCS, 1% Pen/Strep
Medium 2	RPMI, 10% FCS, 1% Pen/Strep
0 mM Ca <sup>2+</sup> Ringer	1 mM MgCl <sub>2</sub> , 4mM KCl, 140 mM NaCl, 10 mM D-Glucose, 0,5 mM EGTA, 10 mM HEPES
4 mM Ca <sup>2+</sup> Ringer	4 mM CaCl <sub>2</sub> , 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 4mM KCl, 140 mM NaCl, 10 mM Glucose, 0,5 mM EGTA, 10 mM HEPES

#### 2.1.5 Antikörper

αIgM	mouse IgM	Southern Biotech, Birmingham, AL
Akt Pan (40D4)	mouse, IgG <sub>1</sub>	Cell Signaling, Danvers, MA
Annexin V-eFlour450	-	BD Biosciences, Heidelberg

## 2 Material & Methoden

### 2.1 Material

---

B220-eFluor605 (RA3-6B2)	rat IgG <sub>2a</sub>	eBioscience, Frankfurt
BrdU-APC (3D4)	mouse IgG <sub>1</sub>	BD Biosciences, Heidelberg
Btk (D3H5)	rabbit IgG	Cell Signaling, Danvers, MA
Cbl-c	poly-rabbit	Cell Signaling, Danvers, MA
CD11b-Biotin (M1/70)	rat IgG <sub>2b</sub>	BD Biosciences, Heidelberg
CD19-APC (eBio1D3)	rat IgG <sub>2a</sub>	eBioscience, Frankfurt
CD19-eFluor450 (eBio1D3)	rat IgG <sub>2a</sub>	eBioscience, Frankfurt
CD19-FITC (eBio1D3)	rat IgG <sub>2a</sub>	eBioscience, Frankfurt
CD19-PECy7 (eBio1D3)	rat IgG <sub>2a</sub>	eBioscience, Frankfurt
CD23-PECy7 (B3B4)	rat IgG <sub>2a</sub>	eBioscience, Frankfurt
CD38-PE (90)	rat IgG <sub>2a</sub>	eBioscience, Frankfurt
CD3e-Biotin (145-2C11)	arm. hamster IgG	BD Biosciences, Heidelberg
CD3e-FITC (145-2C11)	arm. hamster IgG	eBioscience, Frankfurt
CD43-PE (S7)	rat IgG <sub>2a</sub>	eBioscience, Frankfurt
CD5-APC (53-7.3)	rat IgG <sub>2a</sub>	eBioscience, Frankfurt
CD5-eFluor450 (53-7.3)	rat IgG <sub>2a</sub>	eBioscience, Frankfurt
CD93-PE (AA4.1)	rat IgG <sub>2b</sub>	eBioscience, Frankfurt
GAPDH	mouse, IgG <sub>1</sub>	R&D Systems, Minneapolis, MN
Gr-1-Biotin (RB6-8C5)	rat IgG <sub>2b</sub>	BD Biosciences, Heidelberg
IgM-PE (II/41)	rat IgG <sub>2a</sub>	eBioscience, Frankfurt
IgM-PECy7 (II/41)	rat IgG <sub>2a</sub>	eBioscience, Frankfurt
IgM-PerCP (II/41)	rat IgG <sub>2a</sub>	eBioscience, Frankfurt
IRDye® 680RD Anti-Rabbit	donkey	Li-COR Bioscience, Lincoln, US
IRDye® 680LT Anti-Mouse	donkey	Li-COR Bioscience, Lincoln, US
IRDye® 800CW Anti-Mouse	donkey	Li-COR Bioscience, Lincoln, US
IRDye® 800CW Anti-Rabbit	goat	Li-COR Bioscience, Lincoln, US
Lck	poly-rabbit	Cell Signaling, Danvers, MA
Lyn	poly-rabbit	Cell Signaling, Danvers, MA
NFAT2 (7A6)	mouse IgG <sub>1</sub>	BD Biosciences, Heidelberg
p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204, Thr185/Tyr187)	poly-rabbit	Cell Signaling, Danvers, MA
Phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP	rabbit IgG	Cell Signaling, Danvers, MA
Phospho-Btk (Tyr223)	poly-rabbit	Cell Signaling, Danvers, MA
Phospho-Lck (Tyr505)	poly-rabbit	Cell Signaling, Danvers, MA
Phospho-Lck (Tyr394)	poly-rabbit	GeneTex, Irvine, CA
Phospho-Lyn (Tyr507)	poly-rabbit	Cell Signaling, Danvers, MA
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2)	poly-rabbit	Cell Signaling, Danvers, MA

Phospho-Plc $\gamma_2$ (Tyr759)	poly-rabbit	Cell Signaling, Danvers, MA
Phospho-Syk (Tyr525/526) (C87C1)	rabbit IgG	Cell Signaling, Danvers, MA
Syk (D1I5Q)	rabbit IgG	Cell Signaling, Danvers, MA
Ter-119-Biotin (Ter-119)	rat IgG <sub>2b</sub>	BD Biosciences, Heidelberg
Vav3	poly-rabbit	Merck Millipore, Darmstadt
ZAP70-PE (1E7.2)	mouse IgG <sub>1</sub>	eBioscience, Frankfurt
$\alpha$ lgM F(ab') <sub>2</sub>	mouse IgM	Dianova, Hamburg
$\beta$ -Aktin (13E5)	rabbit IgG	Cell Signaling, Danvers, MA
$\kappa$ -light chain-FITC (187.1)	rat IgG <sub>1</sub>	BD Biosciences, Heidelberg
$\lambda$ -light chain-FITC (R26-46)	Rat IgG <sub>2a</sub>	BD Biosciences, Heidelberg

### 2.1.6 Primer

NFAT2	Genotypisierung	FW: CCA TCT CTC TGA CCA ACA GAA GCC AG RV: CCT ATT TAA ACA CCT GGC TTC CTG CG
CD19	Genotypisierung	FW: ACG ACC AAG TGA CAG CAA TG RV: CTC GAC CAG TTT AGT TAC CC
E $\mu$ -TCL1	Genotypisierung	FW: CAT CTG GCA GCA GCT CGA RV: GCC GAG TGC CCG ACA CTC
Aktin	qRT-PCR	FW: TCT TGG GTA TGT AAT CCT GTG GCA RV: ACT CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT
CD38	qRT-PCR	FW: AAG ATG TTC ACC CTG GAG GA RV: ACT CCA ATG TGG GCA AGA GA
ZAP70	qRT-PCR	FW: CTC TTC CTG AAG CGA GAG AAT C RV: GCC ACG TCA ATC TGC TTC TT
NFAT2	qRT-PCR	FW: AGT CTC TTT CCC CGA CAT CA RV: CAC CTC GAT CCG AAG CTC
Cbl, Cbl-b, Grail (Rnf128), Egr2, Prdm1, Nrgn, Pcp4, Lck, Pacsin1, Plc $\gamma_2$ , Vav3, Bcl6, Ube2h, Aicda, EndoU	RT <sup>2</sup> -qPCR Primer Assay	Qiagen, Hilden

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Tiermodelle

#### 2.2.1.1 Mäusehaltung und -zucht

Die verwendeten Tiere wurden im Tierhaltungsbereich des Verfügungsgebäudes der Medizinischen Fakultät (FORS) im gelben Bereich gehalten. Hierbei handelte es sich um eine SPF (spezifiziert pathogenfreie) Haltung mit einer moderaten Trocken-Barriere und offener Käfighaltung (12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus, 23 °C). Die Tiere wurden *ad libitum* mit einer Zuchtdiät für Mäuse (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) und frischem Trinkwasser versorgt. Die Verpaarung erfolgte ab einem Alter von acht Wochen. Im Alter von vier Wochen wurden die Tiere am Ohr nach dem verwendeten Ohrlochschemata markiert. Die Ohrmarken wurden dann zur Genotypisierung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet.

Es fand eine wöchentliche Bestands- und Gesundheitskontrolle statt und ein zusätzliches Hygienemonitoring alle sechs Monate. Hierbei wurde eine virologische, bakteriologische und parasitologische Untersuchung der Einstreu-Sentinellen durchgeführt. Alle Tierversuche (Genehmigungsnr. M5/10 & M9/13) wurden vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigt und in Zusammenarbeit mit dem Tierärztlichen Dienst in Tübingen durchgeführt.

#### 2.2.1.2 Transgene Mauslinien

Für die Untersuchungen und Verpaarungen dienten C57BL/6NCrl Tiere, welche von Charles River (Sulzfeld) bezogen wurden. Aufgrund der essentiellen Bedeutung von NFAT2 für die Entwicklung multipler Organsysteme (Herz, Gefäßsystem, Zentrales Nervensystem) führt die Generierung eines konventionellen Keimbahn-Knockouts dieses Proteins zu einem embryonal-letalen Phänotyp. Um diese Schwierigkeiten zu umgehen wurde eine konditionelle Knockout-Maus für NFAT2 verwendet. Hierfür wurden „gefloxt“ NFAT2<sup>fl/fl</sup> Mäuse (C57BL/6-Hintergrund) eingesetzt, welche im Labor von Prof. A Rao (La Jolla Institute, San Diego) generiert wurden. Um eine B-Zell-spezifische Deletion von NFAT2 zu erreichen, wurden diese Tiere mit der CD19-cre Linie verpaart. Die CD19-cre Linie wurde von *The Jackson Laboratory* bezogen (Stock Nr. 006785; B6.129P2(C)-*Cd19<sup>tm1(cre)Cgn</sup>/J*). Die verwendete Versuchskohorte trug dann den Genotyp NFAT2<sup>fl/fl</sup>CD19<sup>cre/+</sup>. Als Wildtyp-Kontrolle wurde, wenn nicht anders angegeben, immer NFAT2<sup>fl/fl</sup> Tiere verwendet.

Um die Pathogenese der CLL *in vivo* zu untersuchen, wurden Eμ-*TCL1* transgene Tiere verwendet, welche uns freundlicherweise von C.M. Croce zur Verfügung gestellt wurden. Im Gegensatz zu den häufig verwendeten B6C3 Eμ-*TCL1*-Tieren, handelte es sich hierbei um Tiere rückgekreuzt (N10) auf den C57BL/6-Hintergrund.

Für die Beschreibung der Rolle von NAFTA2 in der CLL wurde das E $\mu$ -*TCL1*-Modell mit dem konditionellen NFAT2-Knockout Modell kombiniert. Die verwendeten Tiere trugen den Genotyp E $\mu$ -*TCL1*<sup>+/-</sup> NFAT2<sup>fl/fl</sup> CD19<sup>cre/+</sup>.

### 2.2.1.3 Genotypisierung der Tiere

Die Ohrmarken der Tiere wurden in mit 100  $\mu$ l DNA QuickExtract (Biozym) Extraktionspuffer versetzt und bei 65°C 15 min auf einem Thermoschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Lösung bei 98°C 2 min inaktiviert und die restlichen Gewebestandteile 1 min bei 9.300 g zentrifugiert. Die DNA-Lösungen wurden nach dem Einsatz in der PCR bei -20°C gelagert. Im PCR Ansatz wurden je 1  $\mu$ l DNA-Lösung verwendet. Die Primersequenzen sind unter 2.1.6 aufgelistet.

#### NFAT2 PCR

ddH <sub>2</sub> O	16,250 $\mu$ l	95 °C	2 min	
DMSO	1,0 $\mu$ l	94 °C	30 sec	
Red Taq Buffer (10x)	2,5 $\mu$ l	58 °C	30 sec	35 Zyklen
dNTP (je 2,5 mM)	2,0 $\mu$ l	72 °C	30 sec	
Primer fw/rv je: (10 $\mu$ M)	0,625 $\mu$ l	72 °C	5 min	
REDTaq Polymerase	1,0 $\mu$ l	10 °C	$\infty$	
	NFAT2 <sup>fl/fl</sup> $\rightarrow$ 379 bp		NFAT2 <sup>+/+</sup> $\rightarrow$ 332 bp	

#### CD19-cre PCR

ddH <sub>2</sub> O	17,125 $\mu$ l	96 °C	3 min	
DMSO	1,0 $\mu$ l	96 °C	30 sec	
Ex Taq Puffer (10x)	2,5 $\mu$ l	55 °C	30 sec	32 Zyklen
dNTP (je 2,5 mM)	2,0 $\mu$ l	72 °C	30 sec	
Primer fw/rv je: (10 $\mu$ M)	0,625 $\mu$ l	72 °C	5 min	
Ex Taq HS	0,125 $\mu$ l	4 °C	$\infty$	
	CD19 <sup>cre/+</sup> $\rightarrow$ 352 bp		CD19 <sup>+/+</sup> $\rightarrow$ keine Bande	

#### E $\mu$ -TCL1 PCR

ddH <sub>2</sub> O	17,125 $\mu$ l	96 °C	3 min	
DMSO	1,0 $\mu$ l	94 °C	30 sec	
Ex Taq Puffer (10x)	2,5 $\mu$ l	65 °C	30 sec	30 Zyklen
dNTP (je 2,5 mM)	2,0 $\mu$ l	72 °C	30 sec	
Primer fw/rv je: (10 $\mu$ M)	0,625 $\mu$ l	72 °C	7 min	
Ex Taq HS	0,125 $\mu$ l	4 °C	$\infty$	
	E $\mu$ -TCL1 <sup>+/-</sup> $\rightarrow$ 350 bp		E $\mu$ -TCL1 <sup>-/-</sup> $\rightarrow$ keine Bande	

Die PCR-Proben wurden nach der Amplifizierung mit 4 µl 6x Ladepuffer (OrangeG) vermischt und auf einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt und in der Gel-Dokumentationskammer ausgewertet. Um die DNA-Banden sichtbar zu machen, wurde das Agarosegel mit MidoriGreen (Biozym) Farbstoff (1:10000) versetzt.

## **2.2.2 Präparation der Organe**

### **2.2.2.1 Milz & Lymphknoten**

Die Milz und die entnommen inguinalen Lymphknoten wurden in jeweils ein Gentle MACS C-Tube mit 5 ml MACS-Puffer aufgenommen und mit dem Programm m\_spleen\_04 zerkleinert. Die Zellsuspension wurde über 40 µm-Zellsiebe filtriert und mit 10 ml MACS-Puffer gewaschen (300 g, 5 min, 4°C). Zur FACS-Analyse wurden die Splenozyten vorher durch eine Erythrozytenlyse behandelt, die Zellen aus dem Lymphknoten wurden direkt verwendet. Für die Lyse wurde 1 ml Zellsuspension mit 9 ml Ammoniumchlorid-Puffer vermischt und 30 sec auf Eis inkubiert. Danach wurde sofort MACS-Puffer zugegeben, um die Lyse zu stoppen. Die Zellen wurden danach 2x mit frischem Puffer gewaschen (300 g, 5 min, 4°C) und zur FACS-Analyse eingesetzt.

### **2.2.2.2 Peritonealhöhle**

Nach der Eröffnung des Peritoneums wurden je 2x 600 µl PBS in den Peritonealraum pipettiert und nach leichtem Einmassieren direkt wieder entnommen. Die so gewonnenen Zellen wurden 1x mit PBS gewaschen (300 g, 5 min, 4°C) und in MACS-Puffer zur weiteren Verwendung aufgenommen.

### **2.2.2.3 Knochenmark**

Der Femur und die Tibia wurden von beiden Seiten der Hinterläufe entnommen und in kaltem MACS-Puffer gelegt. Nach dem Entfernen der Gelenkköpfe wurde das Knochenmark mit Hilfe einer Kanüle aus dem Knochen gespült. Die Zellen wurden vereinzelt und durch einen 40 µm-Zellsiebe filtriert. Danach erfolgte die Lyse der Erythrozyten in 1 ml Puffer mit 9 ml Ammoniumchlorid-Puffer wie bereits bei der Milz beschrieben. Die Zellen wurden unter Schütteln für 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurde sofort MACS-Puffer zugegeben, um die Lyse zu stoppen. Die Zellen wurden danach 2x mit frischem Puffer gewaschen (300 g, 5 min, 4°C) und zur FACS-Analyse eingesetzt.

### **2.2.3 Blutentnahme und Aufarbeitung**

#### **2.2.3.1 Blutentnahme**

Die Tiere wurden zur Blutentnahme mit einer Inhalationsnarkose mit Isofluran-Gas betäubt. Das Blut wurde mit einer Kapillare (Hirschmann) retrobulbär entnommen und in einer EDTA-Microvette (Sarstedt) gesammelt.

#### **2.2.3.2 Differential-Blutbild**

Für die Bestimmung des Differential-Blutbildes wurde das Advia 120-Messgerät verwendet. Dafür wurden 40 µl EDTA-Blut mit 200 µl Blutentnahme-Puffer (1:6) vermischt. Die Proben wurden innerhalb der nächsten 2 h gemessen.

#### **2.2.3.3 Isolation der Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)**

Die PBMCs wurden aus dem Blut mittels einer Erythrozytenlyse gewonnen. Für die Lyse wurden 60 µl EDTA-Blut mit 540 µl Ammoniumchlorid-Puffer versetzt und die Erythrozyten unter Schütteln für 10 min auf Eis lysiert. Anschließend erfolgte ein Waschschrift (300 g, 5 min, 4°C) und die Zellen wurden zur zweiten Lyse in 100 µl Lysepuffer aufgenommen. Nach weiteren 10 min Inkubation auf Eis wurde die Lyse mit 1 ml MACS-Puffer gestoppt und die Zellen bei 300 g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 500 µl MACS-Puffer konnten die Zellen für weitere Experimente verwendet werden.

### **2.2.4 Isolation und Kultivierung der B-Zellen**

#### **2.2.4.1 Positive magnetische Isolation der CD19<sup>+</sup> B-Zellen**

Zur Positiv-Isolation der B-Zellen wurden Splenozyten als Ausgangsmaterial verwendet. Die Milz wurde entnommen und zerkleinert wie unter 2.2.2.1 beschrieben. Hier erfolgte aber keine anschließende Erythrozytenlyse, sondern die Zellsuspension wurde direkt für die Isolation verwendet. Die Zellzahl wurde ermittelt und je  $1,5 \times 10^7$  Zellen nach Miltenyi-Protokoll mit CD19-MicroBeads für 15 min inkubiert. Nach einem Waschschrift (300 g, 10 min, 4°C) wurden die Zellen in MACS-Puffer aufgenommen und über eine LS MACS-Säule im Magnetfeld isoliert. Die CD19<sup>+</sup> B-Zellen wurden nach der Entfernung des Magnetfeldes aus der Säule gespült und die Zellzahl bestimmt.

#### **2.2.4.2 Negative magnetische Isolation der B-Zellen**

Bei der Negativ-Isolation wurden als Ausgangsmaterial ebenfalls Splenozyten wie unter 2.2.2.1 beschrieben vorbereitet. Die B-Zellen wurden hier mit dem Pan B Cell Isolation Kit nach Herstellerprotokoll isoliert. Dafür wurden im ersten Schritt je  $1,5 \times 10^7$  Zellen mit dem

Pan B Cell Biotin-Antibody Cocktail (CD4, CD11c, CD49b, CD90.2, Gr-1 und Ter-119) für 5 min und für weitere 10 min mit Anti-Biotin MicroBeads inkubiert. Die Separation erfolgte über eine LS MACS Säule im magnetischen Feld. Der Durchfluss enthielt die unmarkierten B-Zellen, welche für die weiteren Versuche eingesetzt wurden. 2.2.2.1

#### **2.2.4.3 Positive magnetische Isolation der CD5<sup>+</sup> CLL-Zellen**

Um die CD5<sup>+</sup> CLL-Zellen aus den TCL1-Tieren zu isolieren wurden diese zuerst negativ isoliert wie unter 2.2.4.2 beschrieben und anschließend erfolgte die Separation mit den CD5 (Ly-1) MicroBeads nach Herstellerangaben. Hierfür wurden je  $0,5 \times 10^7$  B-Zellen mit den MicroBeads für 15 min inkubiert und nach einem Waschschrift (300 g, 10 min, 4°C) über eine LS MACS Säule separiert. Die CD5<sup>+</sup> B-Zellen wurden nach der Entfernung des Magnetfeldes aus der Säule gespült und die Zellzahl der CD5<sup>+</sup> und der CD5<sup>-</sup> Fraktion bestimmt.

#### **2.2.4.4 Kultivierung und Expansion**

Zur Kultivierung und Expansion der B-Zellen wurden diese in B-Zellmedium mit  $1 \times 10^6$  Zellen/ml aufgenommen und je 200.000 Zellen pro *well* (200 µl) in *96-well* Rundbodenplatten überführt. Die Zellen wurden mit je 1,67 µl αIgM F(ab')<sub>2</sub> (10 µg/ml) Antikörper und 2 µl Lipopolysaccharide (LPS) (10 µg/ml) pro *well* kultiviert. Die B-Zellen wurden, soweit nicht anders angegeben, für 48 h expandiert und danach geerntet.

#### **2.2.4.5 B-Zellrezeptorstimulation**

Für die BCR-Stimulation wurden negativ isolierte B-Zellen (2.2.4.2) verwendet. Diese wurden mit  $1-2 \times 10^7$  Zellen/ml in B-Zellmedium aufgenommen. Zur Untersuchung der Rezeptorkinetik der CLL-Zellen wurde je Ansatz 10 µg/ml αIgM zugegeben und die Zellen für die Phosphorylierungsanalysen nach 0, 5, 10, 15, 30 und 60 min geerntet.

### **2.2.5 Dichtegradientenzentrifugation der Splenozyten**

Hierfür wurde die Milz wie unter 2.2.2.1 beschrieben bis zur Erythrozytenlyse aufgearbeitet. Statt dieser wurde nun eine Dichtegradientenzentrifugation mittel Ficoll durchgeführt. Die Zellsuspension wurde nach dem Zerkleinern der Milz in einem Volumen von 30 ml PBS auf 15 ml des Lymphozytenseparationsmedium vorsichtig überschichtet. Die Lymphozyten wurden durch eine Zentrifugation mit 800 g bei Raumtemperatur ohne BREMSE für 20 min separiert. Anschließend konnten diese in der Interphase des Ficolls abgenommen und in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt werden. Die Zellsuspension wurde auf 50 ml mit PBS

aufgefüllt und ein mit 500 g 5 min bei RT zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgenommen wurde, erfolgte ein erneuter Waschschrift mit 50 ml PBS bei 350 g ebenfalls für 5 min bei RT. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde der letzte Waschschrift in 10 ml PBS mit 250 g für 5 min bei RT durchgeführt. Die Anzahl der gewonnenen PBMCs wurden mit Hilfe des Countess Zählgerätes (Invitrogen) bestimmt.

### 2.2.6 Durchflusszytomrie

Die verwendeten Zellen wurden wie in 2.2.2 beschrieben mittels Erythrozytenlyse präpariert und mit dem FACS Canto II analysiert. Die Daten wurden anschließend mit der FlowJo 8.5.3 Software analysiert.

#### 2.2.6.1 Extrazelluläre Färbung

Zur Färbung wurden ca.  $0,5 \cdot 10^6$  Zellen in 50  $\mu$ 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 im Falle eines biotinylierten Primärantikörpers wurde eine Sekundärfärbung mit Streptavidin erneut in 50  $\mu$ l MACS-Puffer für 15-20 min auf Eis durchgeführt. Vor der FACS-Analyse wurden die Zellen 1x mit MACS-Puffer gewaschen (300 g, 5 min, 4°C).

<u>CLL Panel</u>		<u>B1 Progneitor Panel</u>			<u>B1 B-Zell Panel</u>		
1. AK	[ $\mu$ l]	1. AK	[ $\mu$ l]	2. AK	[ $\mu$ l]	1. AK	[ $\mu$ l]
CD19-FITC	0,5	$\lambda$ /k-light		SA-		CD3e-FITC	0,3
CD38-PE	0,5	chain-FITC	0,5	PerCP	0,3	CD43-PE	0,4
IgM-PerCP	0,4	CD93-PE	0,6			IgM-PerCP	0,4
CD23-PECy7	0,3	PI	1,0			CD23-PECy7	0,3
CD5-APC	0,6	CD19-APC	1,0			CD5-APC	0,6
B220-eFluor605	1,25	B220-eFluor 605	1,25			CD19-eFlour450	2,0
		4er Dump-Biotin	1,5			B220-eFluor605	1,25

#### 2.2.6.2 Intrazelluläre Färbung

Die Intrazellulär-Färbung mit dem Cell Fixation/Permeabilisation Kit (BD) wurde eingesetzt um die Expression von ZAP70 zu untersuchen. Hierfür wurde zuerst wie unter 2.2.6.1 beschrieben eine Extrazellulär-Färbung durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen mit 100  $\mu$ l frisch angesetzter Fix/Perm-Lösung für 45 min auf Eis permeabilisiert. Danach wurden die Zellen 2x mit Perm-Puffer gewaschen (300 g, 5 min, 4°C) und der intrazelluläre Antikörper in Perm-Puffer zu den Zellen gegeben. Nach weiteren 45 min Inkubation auf Eis

erfolgte ein letzter Waschschrift mit Perm-Puffer (300 g, 5 min, 4°C) vor der Analyse im FACS.

#### ZAP70 Panel

1. AK	[ $\mu$ l]	Intrazelluläre AK	[ $\mu$ l]
CD19-FITC	0,5	ZAP70-PE	0,5
IgM-PECy7	0,25		
CD5-APC	0,6		
CD19-eFlour450	2,0		
B220-eFluor605	1,25		

#### **2.2.6.3 Zellzyklusanalyse**

Die Zellzyklusanalyse wurde durch ein *in vivo* BrdU-Labeling mit dem APC BrdU Flow Kit (BD) durchgeführt. Dafür wurde den Tieren 200  $\mu$ l einer 10 mM BrdU-Lösung i.p. injiziert. Die Tiere wurden nach 24 h oder 48 h euthanasiert und die Organe untersucht. Die Zellen wurden wie unter 2.2.2 beschrieben präpariert und für die FACS-Färbung vorbereitet. Die Antikörper wurden nach Pipettierschema und wie unter 2.2.6.1 für das extrazelluläre Staining eingesetzt. Anschließend wurden die Zellen zur Permeabilisierung in 100  $\mu$ l Cytofix/Cytoperm Puffer aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 100  $\mu$ l Perm/Wash Puffer (300 g, 5 min, 4°C) erfolgte ein weiterer Permeabilisationsschritt mit 100  $\mu$ l Cytoperm Plus Puffer für 10 min auf Eis. Nach einem erneuten Waschschrift mit Perm/Wash Puffer (300 g, 5 min, 4°C) wurde, um den Zellkern zu erreichen, zum letzten Mal auf Eis 100  $\mu$ l Cytofix/Cytoperm Puffer für 5 min zugegeben. Nach dem Waschschrift (300 g, 5 min, 4°C) schloss sich ein DNase-Verdau mit 50  $\mu$ l DNase (300  $\mu$ g/ml) in Perm/Wash Puffer an. Die Reaktion wurde für 1 h bei 37°C inkubiert. Die DNase wurde mit einem Waschschrift (300 g, 5 min, 4°C) entfernt und das inkorporierte BrdU mit einem  $\alpha$ BrdU Antikörper markiert. Dafür wurde 1  $\mu$ l BrdU-AK in 50  $\mu$ l Perm/Wash Puffer verwendet und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem letzten Waschschrift (300 g, 5 min, 4°C) wurden die Zellen in MACS-Puffer aufgenommen. Um den DNA-Gehalt zu bestimmen wurden vor der Messung 5  $\mu$ l 7-AAD Lösung hinzugegeben.

#### BrdU Panel

1. AK	[ $\mu$ l]	Intrazelluläre AK	[ $\mu$ l]
CD19-FITC	0,5	BrdU-APC	1,0
IgM-PE	0,5		
CD5-eFlour450	0,5		
B220-eFluor605	1,25		

#### **2.2.6.4 Annexin V-Färbung**

Um den Anteil an apoptotischen Zellen zu bestimmen wurde eine Annexin V-Färbung mit dem Annexin V: PE Apoptosis Detection Kit I (BD) durchgeführt. Dafür wurden ca.  $0,5-1 \times 10^6$  Zellen in 50  $\mu$ l Annexin Binding Puffer eingesetzt und die Antikörper nach Pipettierschema zugegeben. Die Inkubation erfolgte dann für 15 min bei Raumtemperatur. Vor der Analyse wurden die Zellen 1x mit Bindung Puffer gewaschen (300 g, 5 min, 4°C).

##### Annexin V Panel

1. AK	[ $\mu$ l]
CD19-FITC	0,5
CD38-PE	0,5
7-AAD	2,0
IgM-PECy7	0,25
CD5-APC	0,6
Annexin V-eFlour450	2,0
B220-eFluor605	1,25

#### **2.2.6.5 FACS-Sortierung der Zellen**

Für die FACS-Sortierung wurden die Splenozyten der Tiere verwendet, welche zuvor mittels Ficoll (2.2.5) aufgereinigt wurden. Für die FACS-Färbung wurden je bis zu  $2 \times 10^6$  Zellen in 100  $\mu$ l MACS-Puffer aufgenommen. Die Färbung erfolgte nach Pipettierschema für 30 min auf Eis. Anschließend wurden die Zellen 2x mit 500  $\mu$ l MACS-Puffer gewaschen (300 g, 5 min, 4°C). Vor der FACS-Sortierung wurden die Zellen über ein 40  $\mu$ m Zellsieb suspendiert und in 2 ml MACS-Puffer aufgenommen. Die CD5<sup>+</sup> B-Zellen wurden mit dem FACS Aria™ II nach dem *Gatingschema* in Abb. 7 sortiert. Diese wurden am Ende mit 500 ml PBS gewaschen (300 g, 5 min, 4°C) und bis zur weiteren Verarbeitung pelletiert und bei -80°C gelagert.

##### CD5<sup>+</sup> B-Zellen Sortierung

1. AK	[ $\mu$ l]
CD19-FITC	1,0
IgM-PerCP	0,6
CD5-APC	1,2
B220-eFluor605	2,5

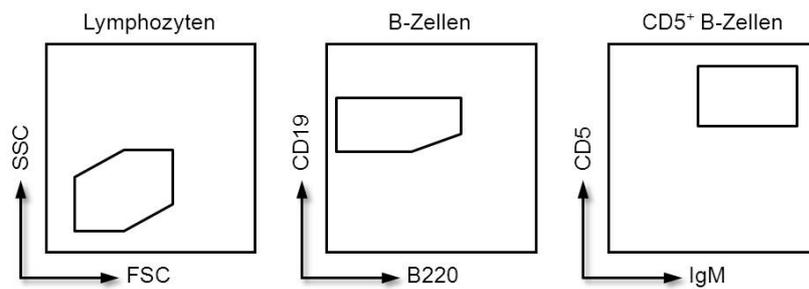


Abb. 7: Gatingschema der CD5<sup>+</sup> B-Zellen beim FACS Sorting

## 2.2.7 Ca<sup>2+</sup>-Mobilisation

### 2.2.7.1 INDO-1-AM Beladung

Für die Ca<sup>2+</sup>-Mobilisations-Experimente wurden Splenozyten verwendet. Diese wurden wie unter 2.2.5 mittels Ficoll isoliert und extrazellulär gefärbt. Dabei wurden die Zellen mit  $2 \times 10^7$  Zellen/ml in Medium 1 aufgenommen und die Antikörper nach Pipettierschema zugegeben. Nach 20 min Inkubation bei RT wurden die Zellen mit 0 mM Ca<sup>2+</sup> Ringer gewaschen. Die Beladung mit INDO-1-AM erfolgte bei 30°C für 25 min unter leichtem Schütteln (siehe Schema). Anschließend wurde die Zellsuspension 1:1 mit Medium 2 verdünnt und weitere 10 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 0 mM Ca<sup>2+</sup> Ringer wurden die Zellen zweimal mit selbiger Lösung gewaschen. Die Messung erfolgte in 200 µl 0 mM Ca<sup>2+</sup> Ringer.

<u>Ca<sup>2+</sup>-Panel</u>		<u>INDO-1-AM Beladung</u>	
1. AK	[µl] 250 µl	Medium 1	250 µl
CD3-FITC	2,5	INDO-1-AM (1 µM)	0,25 µl
CD19-PECy7	2,5	Pluronic (0,015%)	0,19 µl
CD5-APC	3,0		
B220-eFlour605	7,5		

### 2.2.7.2 Messung am LSR II

Die Messung der Ca<sup>2+</sup>-Mobilisation wurde am LSR II durchgeführt. Hierfür wurde die Konfiguration der Laser und Filter wie in Abb. 8 verwendet. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden in den verschiedenen Lasern nach Schema detektiert.

Beim Start der Ca<sup>2+</sup>-Messung wurde für 60 sec der basale Calciumflux aufgezeichnet. Danach erfolgte die BCR-Stimulation durch Zugabe von αIgM (10 µg/ml oder 40 µg/ml). Der dadurch ausgelöste intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Strom wurde für weitere 120 sec aufgezeichnet. Um den absoluten Ca<sup>2+</sup>-Strom zu detektieren, wurde anschließend 4 mM Ca<sup>2+</sup> Ringer 1:1

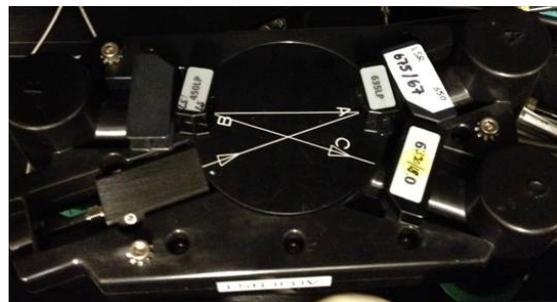
zugegeben und für weitere 240 sec gemessen. Abschließend wurden die Zellen mit 1  $\mu$ M Ionomycin stimuliert, um alle  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle maximal zu öffnen. Die Messung wurde nach weiteren 120 sec beendet. Die Auswertung erfolgte mit der FlowJo 8.5.3 Software. Um den Calciumstrom zu berechnen, wurde die Ratio aus gebundenem und ungebundenem INDO-1-AM berechnet.

Farbstoff	Filterkonfiguration	
	Laser	Filter
FITC	Blau	530/30 + 505LP
PECy7	Blau	780/60 + 735LP
APC	Rot	670/30
eFlour605	Violett	615/20 + 595LP
INDO-1-AM (gebunden)	UV1	390/18
INDO-1-AM (ungebunden)	UV2	450LP

A) Roter Laser



B) UV Laser



C) Violetter Laser



D) Blauer Laser



Abb. 8: Aufbau der Laser und Filter des LSR II

Die Fotos zeigen die verwendeten Filter, welche zur Detektion der Fluorochrome im roten, blauen, violetten und im UV-Laser eingesetzt wurden.

### 2.2.8 Nachweis der *in vitro* Proliferation

Zur Messung der Proliferation *in vitro* wurden die B-Zellen wie in 2.2.4.2 und 2.2.4.3 isoliert und in 100 µl B-Zellmedium mit  $2 \times 10^4$  Zellen/ml in weiße *96-well* Flachbodenplatten (Nunc) pipettiert. Je nach Angabe wurde das Medium zuvor mit αlgM und/oder LPS verschiedener Konzentrationen versetzt. Die Platten wurden bei 37°C 5% CO<sub>2</sub> über die angegebene Zeit inkubiert. Danach wurden die Zellen 1:1 mit der Reagenz des CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega) lysiert und die Menge des freien ATPs im Luminometer (Promega) detektiert.

### 2.2.9 RNA Isolation & cDNA Synthese

Die RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Kits (Qiagen) isoliert. Dafür wurden pelletierte Zellen verwendet, welche 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 wurde mit dem Nanodrop-Photometer bestimmt.

Um mögliche Reste der genomischen DNA zu eliminieren, wurde im Anschluss ein DNase-Verdau durchgeführt. Dafür wurde 1 µg RNA (max. 8 µl) nach Pipettierschema 15 min bei Raumtemperatur verdaut. Die DNase wurde 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 <sub>2</sub> O	< 8 µl	5x Puffer	4 µl
10x Puffer	1 µl	DTT	2 µl
DNase	1 µl	Oligo(dt) <sub>23</sub>	1 µl
EDTA (25 mM)	1 µl	dNTPs (10mM)	1 µl
		RNase Out	1 µl
		Superscript II	1 µl

### 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 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.

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

<u>PCR Programm</u>		
UDG Aktivierung	50°C	2 min
Taq Aktivierung	95°C	2 min
Amplifikation	95°C	15 sec
	60°C	1 min
Schmelzkurve	60-95°C	15 sec
Kühlen	40°C	30 sec

} 40 Zyklen

### 2.2.11 Proteinisolation

Als Ausgangsmaterial für die Proteinisolation wurden pelletierte Zellen verwendet. Zur Isolation wurden  $1 \times 10^7$  Zellen in 100 µl Ripa-Puffer lysiert. Vor Gebrauch des RIPA-Puffers wurde dieser mit je 1 µl HALT Protease/Phosphatase-Inhibitor-Cocktail auf 100 µl Puffer versetzt. Die Zellen wurden für 20 min auf Eis und anschließend weiter 30 min bei 4°C unter Schütteln lysiert. Abschließend wurden die restlichen zellulären Bestandteile bei 800g für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand enthielt das Proteinlysate, welches anschließend quantifiziert wurde.

### 2.2.12 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Methode nach Bradford mit Hilfe der Roti®-Nanoquant-Lösung angewendet. Die Konzentrationsbestimmung wurde in einer *96-well* Flachbodenplatte durchgeführt und pro *well* 49 µl ddH<sub>2</sub>O vorgelegt. Die Proteinlysate wurden 1:10 mit RIPA-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 ddH<sub>2</sub>O angefertigt. Pro *well* wurden 200 µl Roti®-Nanoquant-Arbeitslösung zugegeben und die Reaktion 5 min bei Raumtemperatur

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

RIPA-Eichgerade	
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	

### 2.2.13 SDS-Page

Zur Auftrennung der Proteine wurde eine *SDS-Page* angefertigt. Hierfür wurden Bolt® 4-12% Bis-Tris-Gele verwendet. Die Bolt® Mini Gel-Laufkammer wurde mit 400 ml 1x MES-Laufpuffer gefüllt und die Bis-Tris-Gele nach Anleitung installiert. Die Menge des benötigten Proteinlysates wurde berechnet und die Proben nach Tab. 2 hergestellt. Dafür wurden die Proteinlösungen mit dem LDS-Ladepuffer und einem Reducing Agent versetzt und auf 70°C für 10 min erhitzt. Anschließend wurden die Gele mit den Proben und 2-3 µl des Proteinstandards beladen. Die Auftrennung erfolgte bei 165 V für 45-50 min.

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

Tab. 2: Pipettierschema der Proteinproben für die *SDS-Page*

### 2.2.14 Western Blot

Die separierten Proteine aus der *SDS-Page* wurden mit dem iBlot® Gel Transfer System auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Der Aufbau der *Blotting*-Apparatur erfolgte nach Anleitung und zur Übertragung der Proteine wurde das Geräteprogramm P0 (siehe Schema) verwendet.

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

Um Restbestände der *Blotting*-Lösung zu entfernen, wurde die Membran nach dem Übertragen der Proteine 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% NaN<sub>3</sub> versetzt. Nach mind. 1 h Inkubation wurde der *Blocking* Puffer entfernt und 25 ml der Primärantikörper-Lösung nach Tab. 3/Tab. 4 zugegeben und über Nacht unter leichtem Schütteln im Kühlraum inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Primär-AK Lösung entfernt und die Membran 4x für 5 min unter Schütteln mit PBS-T gewaschen. Danach wurde die Sekundär-AK-Lösung nach Tab. 3/Tab. 5 zugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde die Membran erneut 4x für 5 min mit PBS-T gewaschen und anschließend bei 50°C im Wärmeschrank getrocknet. Nach dem Trocknen wurde die Membran mit dem ODYSSEY® Imaging System analysiert.

<u>Primärantikörper-Lösung</u>		<u>Sekundärantikörper-Lösung</u>	
Odyssey™ <i>Blocking</i> Puffer	12,5 ml	Odyssey™ <i>Blocking</i> Puffer	12,5 ml
PBS	12,5 ml	PBS	12,5 ml
0,2% Tween-20	50 µl	0,2% Tween-20	50 µl
0,01% NaN <sub>3</sub> (1%)	250 µl	0,02% SDS (10%)	50 µl
		0,01% NaN <sub>3</sub> (1%)	250 µl

Tab. 3: Zusammensetzung der Antikörperlösungen

<u>Primär-Antikörper</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Primär-Antikörper</u>	<u>Verdünnung</u>
NFAT2 (m-mouse)	1:1000	Akt (m-mouse)	1:1000
β-Aktin (m-rabbit)	1:5000	Phospho-Akt (poly-rabbit)	1:1000
Lck (poly-rabbit)	1:1000	Erk (m-rabbit)	1:1000
GAPDH (m-mouse)	1:10000	Phospho-Erk (poly-rabbit)	1:1000
Phospho-Lck (poly-rabbit)	1:1000	Phospho-Lck (poly-rabbit)	1:1000
Lyn (poly-rabbit)	1:1000	Phospho-Syk (m-rabbit)	1:1000
Phospho-Btk (poly-rabbit)	1:1000	Syk (m-rabbit)	1:1000
Btk (m-rabbit)	1:1000	Phospho-Lyn (poly-rabbit)	1:1000

Tab. 4: Verdünnung der Primärantikörper

<u>Sekundär-Antikörper</u>	<u>Verdünnung</u>
α-mouse 800CW	1:20000
α-mouse 680LT	1:60000
α-rabbit 800CW	1:20000
α-rabbit 680RD	1:20000

Tab. 5: Verdünnung der Sekundärantikörper

### 2.2.15 Histologische Analyse

#### 2.2.15.1 Paraffin-Einbettung der Organe

Die Tiere der verwendeten Kohorten wurden euthanasiert und die Organe präpariert. Die Milz, die Leber und der Lymphknoten wurden in Einbettkassetten eingebracht und diese für 5 min in PBS Lösung gelegt. Danach wurden die Organe in 4%iger Formalin-Lösung fixiert und bis zur Einbettung gelagert. Der Femur der Tiere wurde ebenfalls präpariert und für 4 h in 2%iger PFA-Lösung fixiert und anschließend für 2 h mit Dekalzifizierungslösung behandelt. Danach wurde der Knochen 10 min mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und in Abständen von je 2 min die Lösung erneuert. Abschließend wurde der Femur ebenfalls in einer Einbettkassette in 4%iger Formalin-Lösung gelagert. Die Einbettung der Proben in Paraffin wurde in der Pathologie des Klinikums durchgeführt. Nach dem Einbetten wurden 5 µm Gewebeschnitte am Mikrotom angefertigt und diese auf Objektträger aufgebracht. Im Anschluß wurden die Schnitte getrocknet und eine Hämatoxylin/Eosin (H&E) Färbung durchgeführt.

#### 2.2.15.2 H & E Färbung

Die Paraffinschnitte wurden vor der Färbung 3x für 3 min mit Roticlear behandelt. Anschließend wurde die Hämatoxylin-Färbung in einer absteigenden Alkoholreihe (s.u.) durchgeführt. Danach wurden die Gewebeschnitte mit H<sub>2</sub>O gespült. Die Eosin-Färbung wurde nach Schema angefertigt und die Objektträger mit 70% Ethanol gespült. Abschließend wurden die Paraffinschnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (s.u.) und 3x für 3 min mit Roticlear fixiert. Vor der Auswertung im Mikroskop wurden die Paraffinschnitte mit Neomount Eindeckmedium eingedeckt und getrocknet.

<u>Hämatoxylin-Färbung</u>		<u>Eosin-Färbung</u>	
Roticlear/EtOH (1:2)	1 min	50% Ethanol	1 min
100% Ethanol	1 min	70% Ethanol	1 min
100% Ethanol	1 min	0,5% Eosin	30-60 sec
70% Ethanol	1 min		
50% Ethanol	1 min		
Hämatoxylin	30 sec		
		<u>Dehydrierung</u>	
		70% Ethanol	1 min
		100% Ethanol	1 min
		100% Ethanol	1 min
		Roticlear/EtOH (1:2)	1 min

### 2.2.16 Microarray-Experimente

Für die Microarray-Analyse wurden je 3 Proben sortierter CD5<sup>+</sup> B-Zellen aus der TCL1 und der TCL+NFAT2-KO Kohorte verwendet. Aus den pelletierten Zellen wurden mit Hilfe des miRNeasy Kits die totalRNA nach Herstellerangabe isoliert. Der RNA-Gehalt und die Qualität wurden mit dem Nanodrop-Photometer bestimmt und die Proben von der Microarray Facility Tübingen analysiert.

Dort wurden 100 ng der totalRNA mit Hilfe des *WT cDNA Synthesis and Amplification Kits* polyadenyliert und über *random primer* linear *in vitro* amplifiziert. Durch eine spezielle Fragmentierung und Fluoreszenzmarkierung durch das *WT Terminal Labeling Kit* entstand robustes Genmaterial zur Expressionsanalyse. Die Proben wurden dann auf einen *Affymetrix GeneChip® Gene 1.0 ST Array* hybridisiert und mit dem *Affymetrix GeneChip® Scanner 3000* analysiert. Beim Gene 1.0 ST Array handelte es sich um einen sogenannten *Whole Transcript (WT) GeneChip®*, bei dem jedes Gen durch mehrere spezielle Gensonden abgedeckt wurde. Dabei wurden sowohl mRNA- (*messenger RNA*), als auch lincRNA- (*long intergenic non-coding RNA*) Transkripte detektiert. In der Gesamtheit ermöglichte der *GeneChip®* eine Analyse von über 28.000 kodierenden und ca. 7.000 nichtkodierenden Transkripten, wovon ungefähr 2.000 zur Kategorie der lincRNA-Transkripte gehörten.

Die Rohdaten des Microarrays wurden in der AGCC 3.0 Software ausgelesen. Zur Ermittlung der differentiell exprimierten Transkripte wurden in einem ersten Schritt die Arrays über den RMA (Robust Multichip Average) normalisiert. Anschließend wurde ein lineares Modell erstellt, woraus die Änderungsstärke der Expression logFC (logarithmisch zur Basis 2) errechnet wurde. Aus den Expressionsprofilen der entsprechenden Gene wurde eine T-Statistik ermittelt. Anschließend wurden für alle Transkripte die aus der T-Statistik resultierende p-Werte ermittelt und über „Benjamini-Hochberg“ für multiples Testen korrigiert.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Der Einfluss von NFAT2 im physiologischen B-Zell-Modell

##### 3.1.1 Generierung einer konditionellen NFAT2-Knockout Maus

Ein konventioneller Keimbahn-Knockout für den Transkriptionsfaktor NFAT2 verläuft embryonal letal. Es kommt zu einem Absterben der Embryonen an Tag E13 der Embryonalentwicklung aufgrund eines Entwicklungsdefektes bei der Ausbildung der Herzklappen. Um dieses Problem zu umgehen, wurde ein konditionelles Knockout-Modell für NFAT2 verwendet (Abb. 9).

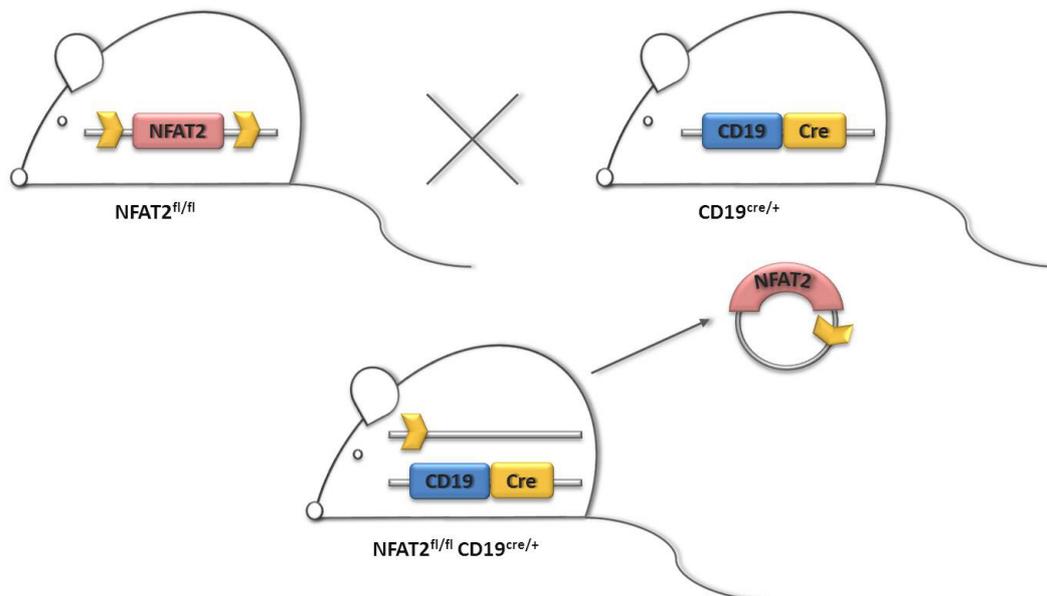


Abb. 9: Generierung des konditionellen NFAT2-Knockouts

Homozygote  $NFAT2^{fl/fl}$ -Mäuse wurden mit heterozygoten  $CD19^{cre/+}$ -Tieren gekreuzt. Die heterozygoten Tiere der F1-Generation wurden weiter untereinander verpaart, so dass in der F3-Generation  $NFAT2^{fl/fl}CD19^{cre/+}$ -Tiere als Versuchskohorte generiert werden konnten.

Hierbei wurde eine homozygot „geflochte“ NFAT2-Maus ( $NFAT2^{fl/fl}$ ) mit Mäusen der CD19-cre-Linie verpaart. In der F1-Generation erhielt man Tiere des Genotyps  $NFAT2^{fl/+}CD19^{cre/+}$  und  $NFAT2^{fl/+}CD19^{+/+}$ . Verpaarte man diese untereinander weiter, führte das in der F2-Generation neben den heterozygot „geflochten“ Tieren auch zu homozygoten  $NFAT2^{fl/fl}CD19^{+/+}$  und  $NFAT2^{fl/fl}CD19^{cre/+}$  Mäusen mit einer homozygoten B-Zell-spezifischen Deletion von NFAT2. Die homozygoten Tiere wurden dann weiter verpaart, so dass in der F3-Generation zu 50% Tiere des Genotyps  $NFAT2^{fl/fl}CD19^{+/+}$  ohne Deletion von NFAT2 und

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Der Einfluss von NFAT2 im physiologischen B-Zell-Modell

zu 50%  $NFAT2^{fl/fl}CD19^{cre/+}$  Tiere mit NFAT2-Deletion gezüchtet wurden. Das Kreuzungsschema in Abb. 10 zeigt den prozentualen Anteil der Genotypen in den verschiedenen Generationen.

Die Tiere ohne B-Zell-spezifischen Knockout von NFAT2 wurden als Kontrolltiere verwendet und als WT bezeichnet. Die Kohorte mit NFAT2-Deletion wird im Folgenden KO genannt.

<b>P:</b>		<b>NFAT2<sup>fl/fl</sup></b>	<b>X</b>	<b>CD19<sup>cre/+</sup></b>	
		50%		50%	
<b>F<sub>1</sub>:</b>		<b>NFAT2<sup>fl/+</sup>CD19<sup>+/+</sup></b>	<b>X</b>	<b>NFAT2<sup>fl/+</sup>CD19<sup>cre/+</sup></b>	
	25%	25%		25%	25%
<b>F<sub>2</sub>:</b>	<b>NFAT2<sup>fl/+</sup>CD19<sup>+/+</sup></b>	<b>NFAT2<sup>fl/fl</sup>CD19<sup>cre/+</sup></b>	<b>X</b>	<b>NFAT2<sup>fl/fl</sup>CD19<sup>cre/+</sup></b>	<b>NFAT2<sup>fl/+</sup>CD19<sup>cre/+</sup></b>
		50%		50%	
<b>F<sub>3</sub>:</b>		<b>NFAT2<sup>fl/fl</sup>CD19<sup>+/+</sup></b>	<b>X</b>	<b>NFAT2<sup>fl/fl</sup>CD19<sup>cre/+</sup></b>	
		<b>WT</b>		<b>KO</b>	

Abb. 10: Kreuzungsschema des konditionellen NFAT2-Knockouts

In der Parentalgeneration (P) wurde die transgene NFAT2-Linie mit der CD19-cre-Linie verpaart. Die prozentuale Verteilung der Genotypen unter den Nachkommen (F<sub>1</sub>-F<sub>3</sub>) ist angegeben und die Tiere für weitere Verpaarungen in rot markiert.

Der Nachweis des NFAT2-Knockouts wurde sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene durchgeführt. Hierfür wurden CD19<sup>+</sup> B-Zellen aus der Milz isoliert und 48 h mit αIgM und LPS stimuliert. Abb. 11A zeigt die Ergebnisse der qRT-PCR für die *Nfat2* mRNA. Im Vergleich zu den Kontroll-Tieren wurde bei den Knockout-Tieren eine Reduktion der mRNA auf unter 20% detektiert (1,0 vs. 0,13). In Abb. 11B zeigen die Ergebnisse des Western Blots eine vollständige Inhibierung der NFAT2-Proteinexpression.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Der Einfluss von NFAT2 im physiologischen B-Zell-Modell

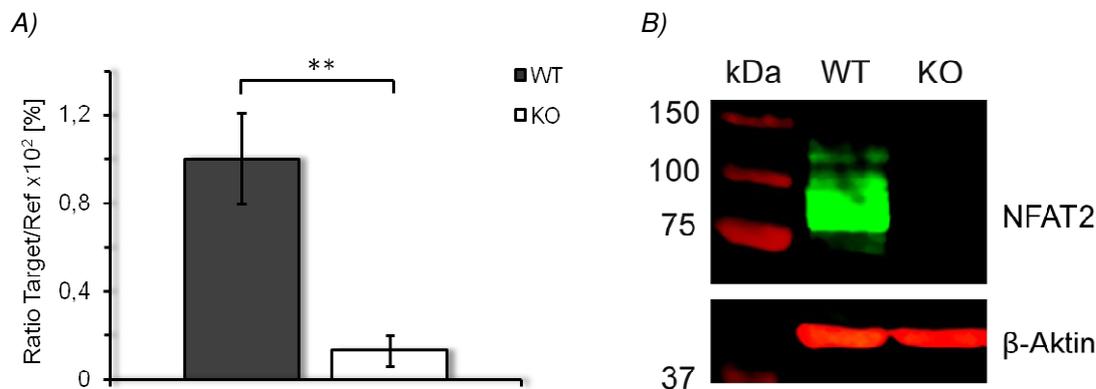


Abb. 11: NFAT2-Knockout in  $CD19^+$  B-Zellen auf mRNA- und Proteinebene

$CD19^+$  B-Zellen wurden aus Splenozyten von WT- und KO-Tieren mit Hilfe von magnetischen Beads isoliert und 48 h in Kultur mit  $\alpha gM-F(ab)_2$  und LPS stimuliert. A) Ergebnisse der qRT-PCR isolierter B-Zellen. Dargestellt ist die normalisierte Ratio der NFAT2-Expression bezogen auf das Referenzgen  $\beta$ -Aktin ( $n=7$ , \*\*  $p < 0,01$ ). B) Western Blot aus 75  $\mu g$  Proteinextrakt der isolierten B-Zellen mit NFAT2-Antikörper (7A6)  $\beta$ -Aktin (13E5) dient als Ladekontrolle.

#### 3.1.2 NFAT2-Knockout hemmt das B1 B-Zell-Kompartiment

Um die Rolle von NFAT2 auf die Bildung der B-Zellen zu untersuchen wurde unter anderem das Knochenmark der Tiere analysiert. Hierbei wurden vor allem die hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) und die gemeinsamen lymphoiden Progenitoren (CLPs) mittels Durchflusszytometrie untersucht. Allerdings ließen sich im Knochenmark der Tiere weder Veränderungen in den Stammzellpopulationen noch in den CLPs detektieren (Daten nicht abgebildet).

Für die Entstehung der B1 B-Zellreihe sind unter anderem spezielle B1-Progenitoren (B1P) verantwortlich<sup>38</sup>. Die B1-Progenitoren zeichnen sich durch die Expression von LIN<sup>-</sup> CD93<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>B220<sup>-</sup> Oberflächenmarkern aus und sind sowohl im Knochenmark<sup>36</sup>, als auch in der Milz der Tiere zu finden<sup>37</sup>. Um die Bedeutung von NFAT2 auf die Bildung der B1-Progenitoren zu untersuchen, wurden die Zellen aus dem Knochenmark und der Milz der Tiere isoliert und durchflusszytometrisch untersucht. Aus den Ergebnissen in Abb. 12 geht hervor, dass die B1P-Population sowohl im Knochenmark (Abb. 12A) als auch in der Milz (Abb. 12B) der NFAT2-Ko Tiere stark vermindert war. Der prozentuale Anteil an CD93<sup>+</sup> Progenitoren blieb hingegen unverändert. Im Knochenmark zeigte sich eine Reduktion der B1P um ca. 70% (100% vs. 33%) und in der Milz um 80% (100% vs. 21%) (Abb. 12C & D). Diese Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung von NFAT2 bei der Entstehung der B1 B-Zelllinie schon auf Progenitorebene.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Der Einfluss von NFAT2 im physiologischen B-Zell-Modell

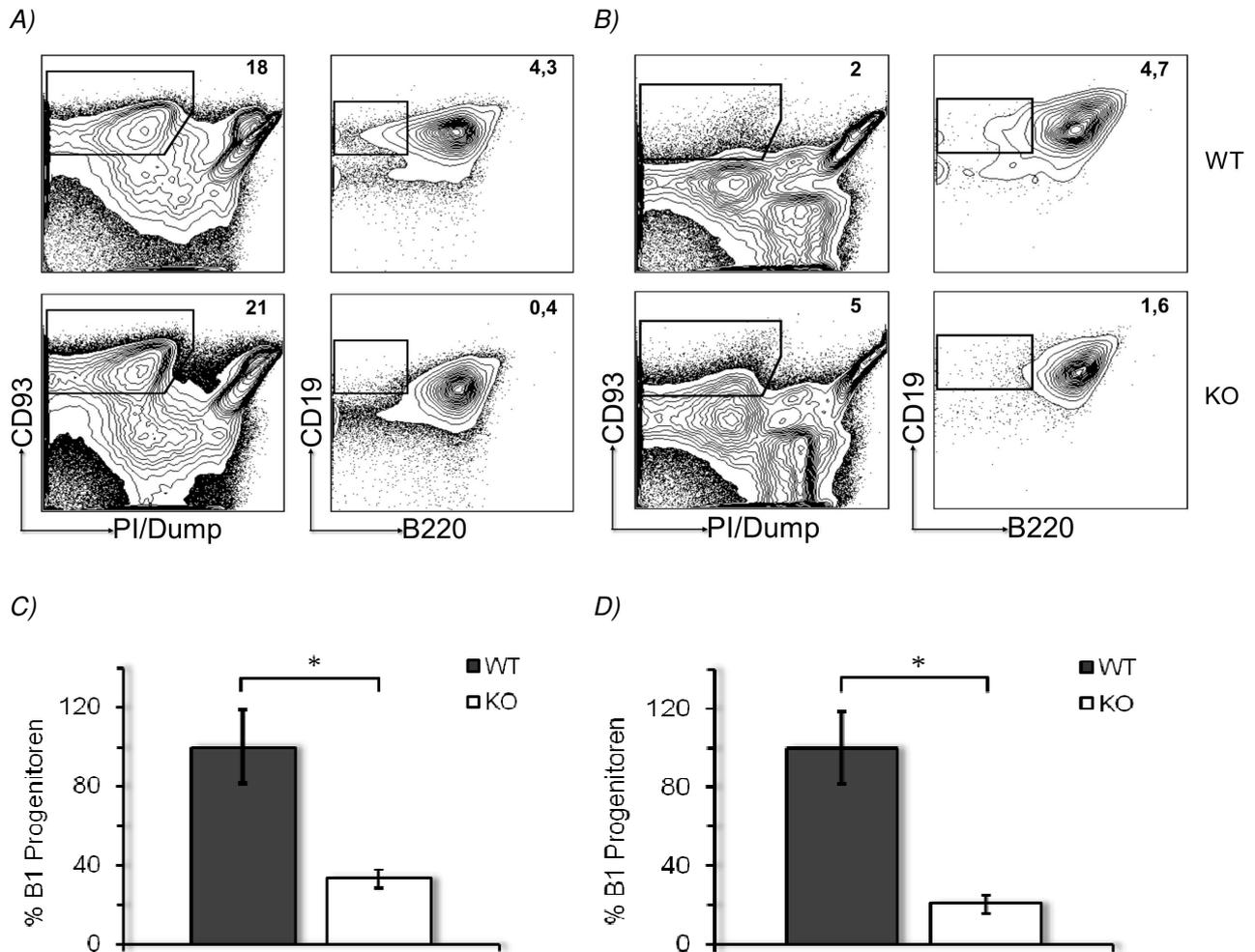


Abb. 12: Reduktion der B1-Progenitorpopulation in Knochenmark und Milz durch NFAT2-KO

Die Zellen der Organe wurden aus 4 Wochen alten Mäusen isoliert und im Durchflusszytometer untersucht. A) Exemplarisches Gatingschema der viablen B1P Zellen im Knochenmark und in der Milz (B), mit prozentualer Angabe der markierten Population. C) Statistische Auswertung des B1P-Anteils im Knochenmark und in der Milz (D) (n=3, \* p < 0,05).

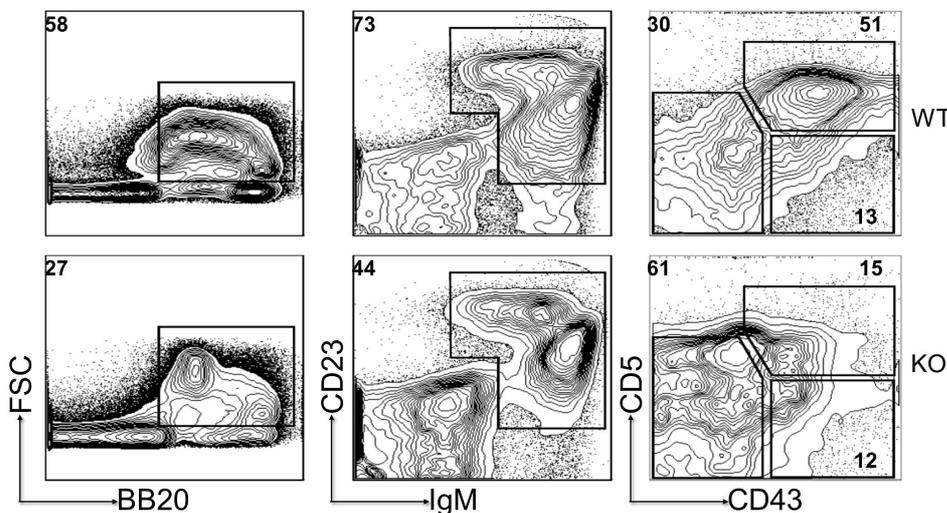
Aufgrund der Hemmung der B1P-Bildung in NFAT2-defizienten Tieren, wurde die Entwicklung der verschiedenen B-Zell-Populationen weiter untersucht. Neben der B1 B-Zelllinie bilden die B2 B-Zellen eine weitere Subpopulation der B-Zellen. B2 B-Zellen bestehen vor allem aus Marginalzonen und Follikulären B-Zellen, wohingegen zur B1 B-Zelllinie die B1a und die B1b B-Zellen gehören. Den größten Anteil der B1 B-Zellen stellen die CD5<sup>+</sup> B1a Zellen dar, die B1b Zellen sind dagegen CD5<sup>-</sup>. Um die verschiedenen B1-Populationen zu untersuchen, wurden der Peritonealraum, das Blut und die Milz der Tiere durchflusszytometrisch analysiert. In Abb. 13A ist die B220<sup>lo</sup>IgM<sup>hi</sup>CD43<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> B1a-Population, die B220<sup>lo</sup>IgM<sup>hi</sup>CD43<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup> B1b-Population und der B2 B-Zellanteil im Peritonealraum dargestellt. Durch den konditionellen NFAT2-Knockout kommt es zu einer prozentualen Verminderung der B220<sup>+</sup> Lymphozyten (58% vs. 27%), ebenso wie zu einer

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Der Einfluss von NFAT2 im physiologischen B-Zell-Modell

Reduktion der CD23<sup>lo-hi</sup>IgM<sup>+</sup> B-Zellen (73% vs. 44%). Des Weiteren zeigt sich eine starke Reduktion der CD5<sup>+</sup> B1a-Zellen im Peritonealraum. Der Anteil der peritonealen B1a B-Zellen vermindert sich um ca. 30% (51% vs. 19%), was zu einem prozentualen Anstieg der B2 B-Zellen führt (33% vs. 64%) (Abb. 13B). Die absolute Anzahl der B2- als auch der B1b-Zellen bleibt allerdings unverändert (Daten nicht abgebildet). Der B1b B-Zell-Population zeigt keine signifikante Veränderung. Demnach stellt sich NFAT2 als wesentlicher Part bei der Bildung der B1-Population heraus, wohingegen dessen Rolle im B2 B-Zellkompartiment eher vernachlässigbar zu sein scheint.

A)



B)

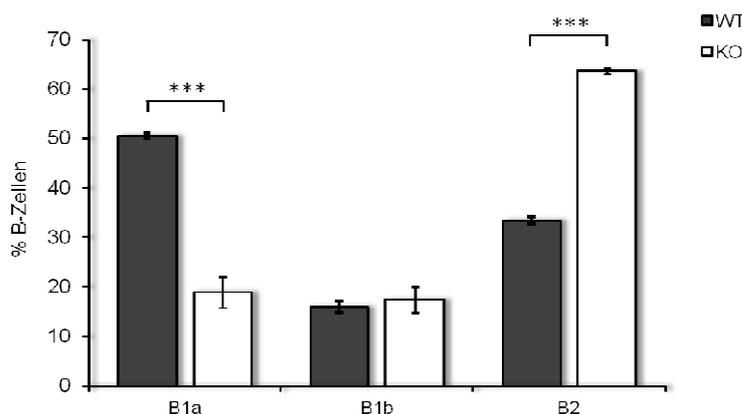


Abb. 13: NFAT2 kontrolliert die B1 B-Zell-Populationen im Peritonealraum

Die Zellen wurden aus der Peritonealhöhle 4 Wochen alter Tieren isoliert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. A) Exemplarisches Gatingschema der verschiedenen B-Zell-Populationen im Peritonealraum der Tiere mit dem prozentualen Anteil der markierten Population. B) Anteil der B1a, B1b und den B2 B-Zellen in der gesamten peritonealen B-Zell-Population (n=4, \*\*\* p < 0,001).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Der Einfluss von NFAT2 im physiologischen B-Zell-Modell

Da man bei B1 B-Zellen von einer ständigen Selbsterneuerung und Selbsterhaltung ausgeht, wurde in einer weiteren experimentellen Reihe die Entwicklung der B1-Population vom Jungtier bis zum Erwachsenenalter untersucht. Hierfür wurden das Blut und die Milz der Tiere analysiert und der Anteil an CD5<sup>+</sup> B-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die Analyse der Ergebnisse zeigt eine signifikante und konstante Reduktion der B1 B-Zellen über den gesamten untersuchten Zeitraum, sowohl im Blut als auch in der Milz der Tiere (Abb. 14 A & B). Im Alter von 4 Wochen waren die Unterschiede am höchsten, da vor allem junge Wildtyp-Tiere über einen hohen Anteil an CD5<sup>+</sup> B1 B-Zellen verfügen. Insgesamt kann man davon ausgehen, dass NFAT2 bei der lebenslangen Erhaltung der B1a-Population eine wichtige Rolle spielt.

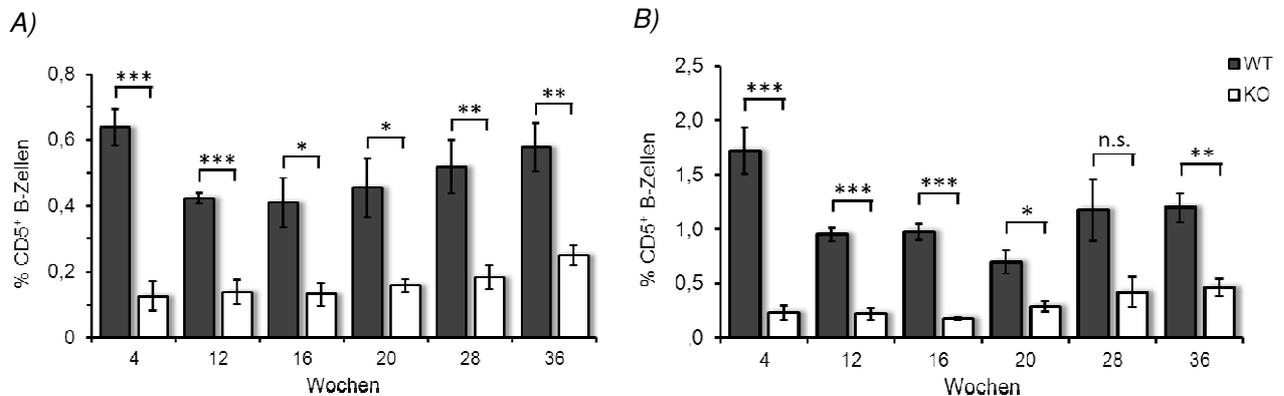


Abb. 14: Lebenslange Reduktion der B1 B-Zellen durch NFAT2-KO

WT-Tiere und Tiere mit NFAT2-KO wurden zu den angegebenen Zeitpunkten getötet und die Zellen des Blutes (A) und der Milz (B) durchflusszytometrisch analysiert. Die Grafiken zeigen den prozentualen Anteil der CD5<sup>+</sup> B-Zellen bezogen auf alle lebenden Zellen (n=5, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,005).

#### 3.1.3 NFAT2 steuert die Proliferation und Apoptose der B-Zellen

Die Familie der NFAT-Transkriptionsfaktoren spielt unter anderem eine wichtige Rolle bei der Proliferation und der Kontrolle des Zellzykluses. Unter anderem werden diese Transkriptionsfaktoren über die Stimulation des B-Zell-Rezeptors (BCR) aktiviert und durch den Calcium-Signalweg reguliert. Daher wurde in den folgenden Experimenten die *in vivo* Proliferation über 48 h und die Apoptoserate der CD5<sup>+</sup> B-Zellen bestimmt. Hierfür wurde den Tieren i.p. BrdU injiziert und die Zellen aus dem Blut, der Peritonealhöhle, der Milz und aus dem Knochenmark nach 48 h durchflusszytometrisch analysiert. Es zeigte sich, dass die Proliferation der CD5<sup>+</sup> B-Zellen in NFAT2-defizienten B-Zellen in allen untersuchten Organen signifikant verringert war, was für eine Hemmung des Zellzykluses spricht (Blut: 0,07% vs. 0,017%, Peritonealraum: 0,44% vs. 0,11%, Milz: 0,12% vs. 0,05%, Knochenmark: 0,12% vs. 0,04%) (Abb. 15). Zudem ließ sich erkennen, dass die B-Zellen je nach Kompartiment

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Der Einfluss von NFAT2 im physiologischen B-Zell-Modell

unterschiedlich stark proliferierten. In den Wildtyp-Tieren wurde generell eine deutlich höhere Proliferationsrate in Milz und im Peritonealraum im Vergleich zu Knochenmark und dem Blut der Tiere festgestellt.

Die Apoptoserate der CD5<sup>+</sup> B-Zellen zeigte in den NFAT2-Knockout Tieren nur in der Milz relevante Veränderungen, mit einer Reduktion von über 50% an Annexin V<sup>+</sup> Zellen (0,31% vs. 0,094%). In allen anderen untersuchten Organen war der Anteil an apoptotischen Zellen in beiden Genotypen annähernd gleich. Die Daten deuten hiermit auf einen großen Einfluss von NFAT2 auf die Proliferation der Zellen, wohingegen die Apoptose nur bedingt beeinflusst wird.

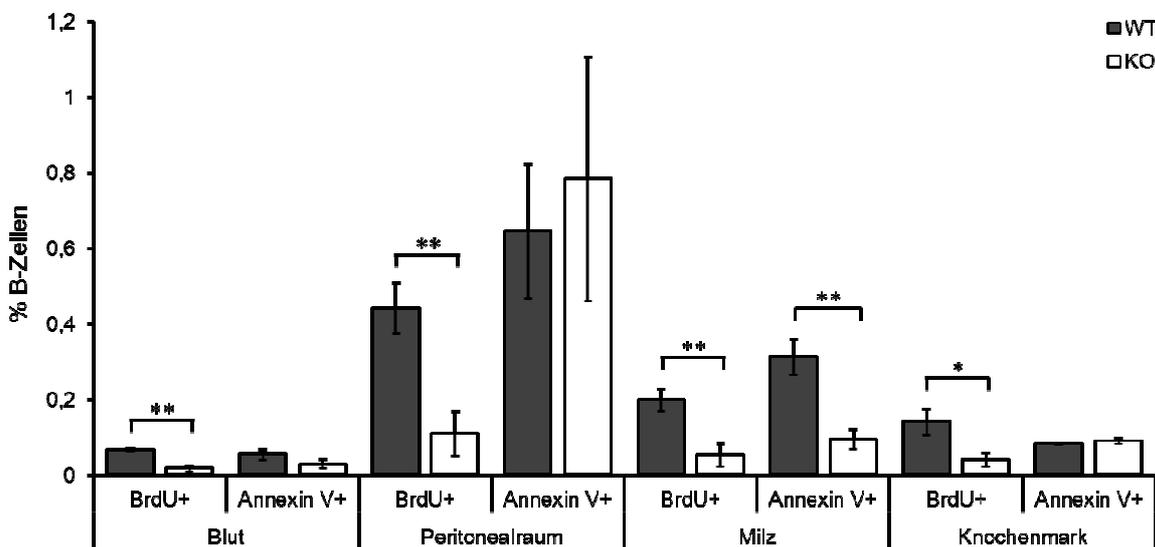


Abb. 15: NFAT2-Verlust hemmt die Proliferation der CD5<sup>+</sup> B-Zellen

Bei 4 Wochen alten Tieren wurde alle 24 h 200  $\mu$ l BrdU-Lösung (10 mM) i.p. injiziert. Nach 48 h wurden die Organe präpariert und durchflusszytometrisch analysiert. Die Grafik zeigt den Anteil an BrdU<sup>+</sup>- und Annexin V<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup> B-Zellen bezogen auf alle B-Zellen im Organ (n=5, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01).

#### 3.1.4 NFAT2 reguliert die Expression von ZAP70 und CD38

Um den Einfluss von NFAT2 auf die Genregulation in B-Zellen zu untersuchen, wurde die Expression einiger Gene mittels qRT-PCR analysiert. Aus einer vorangegangenen Microarray-Studie im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Serfling (Universität Würzburg), war bereits bekannt, dass B-Zellrezeptor-assoziierte Kinasen von NFAT2 reguliert werden können. Zu diesen gehört unter anderem die Protein-Kinase ZAP70, welche vor allem in T-Zellen beschrieben wurde. Zudem spielt die Expression von ZAP70 auf B-Zellen bei der Prognose der Chronischen Lymphatischen Leukämie eine wichtige Rolle.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Der Einfluss von NFAT2 im physiologischen B-Zell-Modell

---

Im Folgenden wurden CD19<sup>+</sup> Splenozyten *in vitro* mit  $\alpha$ gM und LPS stimuliert und die Expression verschiedener Oberflächenmarker untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass vor allem die beiden Marker ZAP70 und CD38 in NFAT2-defizienten B-Zellen deutlich reduziert exprimiert wurden. Die Untersuchung auf mRNA-Ebene zeigte eine Reduktion der Genexpression um 90% bei *Zap70* (1,0 vs. 0,13) und um 60% bei *Cd38* (1,0 vs. 0,37) in den Knockout-B-Zellen (Abb. 16A & C). Des Weiteren wurde die Proteinexpression mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Auch hier ließ sich im Vergleich zu stimulierten Wildtyp B-Zellen eine verminderte Expression der beiden Marker ermitteln (Abb. 16B & D). Die Expression der untersuchten Marker wurde hierbei über die relative Fluoreszenzintensität ermittelt und in einem Histogramm dargestellt.

Neben der *in vitro* Stimulation des BCRs wurde die Proteinexpression auch *ex vivo* bei CD5<sup>+</sup> B-Zellen verschiedener Organe untersucht (Abb. 16E). Dabei wurde insbesondere der Anteil an doppelt-positiven ZAP70<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> B-Zellen betrachtet. Der höchsten Anteil (~1%) an CD5<sup>+</sup>ZAP70<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> B-Zellen zeigte sich in der Milz der Wildtyp-Tiere, wobei auch im Knochenmark ein vergleichsweise höherer Anteil (~0,8%) dieser Zellen zu finden war. Im Blut waren deutlich weniger (~0,4%) der CD5<sup>+</sup> B-Zellen doppelt positiv für die untersuchten Marker. Im Gegensatz zu den Wildtyp Tieren, zeigte sich bei den NFAT2-defizienten Tieren eine stark verminderte Population von CD5<sup>+</sup>ZAP70<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> B-Zellen, wobei die größten Effekte in der Milz (0,93% vs. 0,29%) und im Knochenmark (0,76% vs., 0,24%) zu verzeichnen waren.

Diese Ergebnisse zeigen, dass NFAT2 bei der Regulation der prognostischen Marker ZAP70 und CD38 essentiell beteiligt ist.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Der Einfluss von NFAT2 im physiologischen B-Zell-Modell

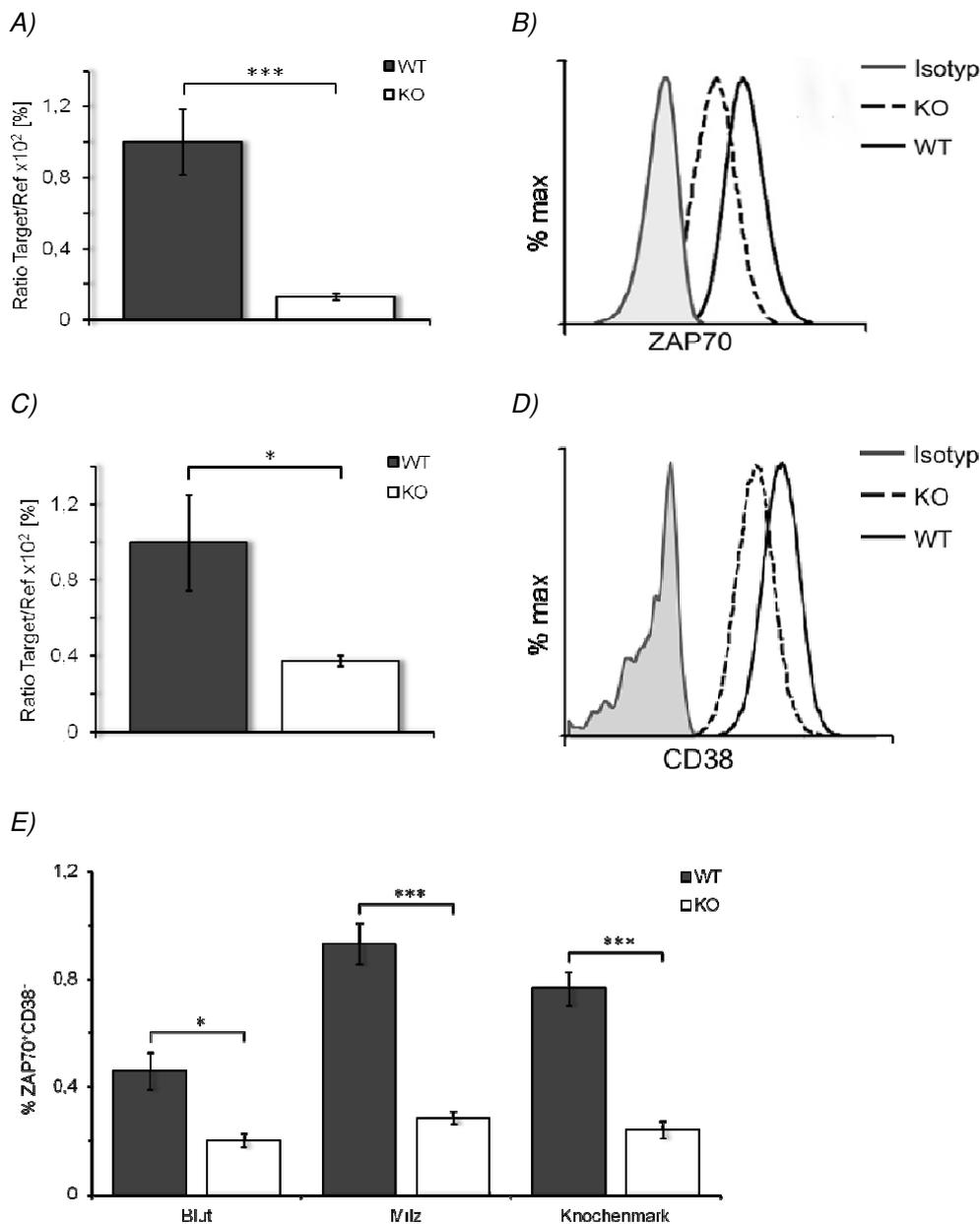


Abb. 16: NFAT2 reguliert die Expression von ZAP70 & CD38

CD19<sup>+</sup> B-Zellen wurden aus Splenozyten von WT- und KO-Tieren mit Hilfe von magnetischen Beads isoliert und nach 48 h in Kultur mit  $\alpha$ lgM-F(ab)<sub>2</sub> und LPS stimuliert. Ergebnisse der qRT-PCR isolierter B-Zellen. Dargestellt ist die normalisierte Ratio der Zap70- (A) und der Cd38-Expression (C) bezogen auf das Referenzgen Aktin (n=7, \* p < 0,05, \*\*\* p < 0,005). Durchflusszytometrisch bestimmte intrazelluläre Expression von ZAP70 (B) und Oberflächenexpression von CD38 (D). Als Kontrolle diente eine unspezifische Ig-Kontrolle. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität, welche dem relativen Anteil der Moleküle pro Zelle entspricht. E) Die Zellen wurden aus den untersuchten Organen isoliert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt ist der Anteil an CD5<sup>+</sup>ZAP70<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> B-Zellen bezogen auf die gesamte B-Zell-Population im jeweiligen Organ (n=5; \* p < 0,05, \*\*\* p < 0,005).

### 3.2 Die Bedeutung von NFAT2 in der CLL

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass NFAT2 sowohl bei der Entstehung der B1 B-Zellen eine essentielle Rolle spielt als auch bei der Regulation des Zellzyklus und nicht zuletzt bei der Expression der Marker ZAP70 und CD38 involviert ist. Diese Ergebnisse werfen die Frage nach der Bedeutung von NFAT2 in der Chronischen Lymphatischen Leukämie auf. Aus diesem Grund wurde im folgenden Kapitel die Rolle von NFAT2 bei der Pathogenese der CLL untersucht.

#### 3.2.1 NFAT2-Ko im transgenen E $\mu$ -TCL1-Modell

Um die Entwicklung der CLL *in vivo* zu untersuchen, wurde das transgene E $\mu$ -TCL1 Mausmodell verwendet. Diese Tiere wurden von Prof C.M. Croce entwickelt und für die folgenden Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Bei den E $\mu$ -TCL1-Tieren wird unter der Kontrolle des B-Zell-spezifischen Ig $_H$ -Promotors das *Tcl1* Onkogen konstitutiv exprimiert. Die Tiere entwickeln aufgrund dessen im Laufe ihres Lebens eine oligoklonale CLL, die sehr ähnlich der humanen CLL verläuft. Es kommt zu einer Expansion der CD5<sup>+</sup> B-Zellen, die bei fortschreitender Erkrankung die Organe des Tieres infiltrieren. Die Infiltration beginnt schon im Alter von 8 Wochen im Peritonealraum und ist später auch in der Milz, Lymphknoten und Leber zu detektieren. Nach ungefähr 6-8 Monaten ist dann eine deutliche Anreicherung von malignen Zellen im Knochenmark und im Blut der Tiere zu finden.

Um die Rolle von NFAT2 bei der Pathogenese der CLL zu untersuchen, wurde das konditionelle NFAT2-Knockout Modell mit dem transgenen E $\mu$ -TCL1-Modell kombiniert (Abb. 17).

### 3 Ergebnisse

#### 3.2 Die Bedeutung von NFAT2 in der CLL

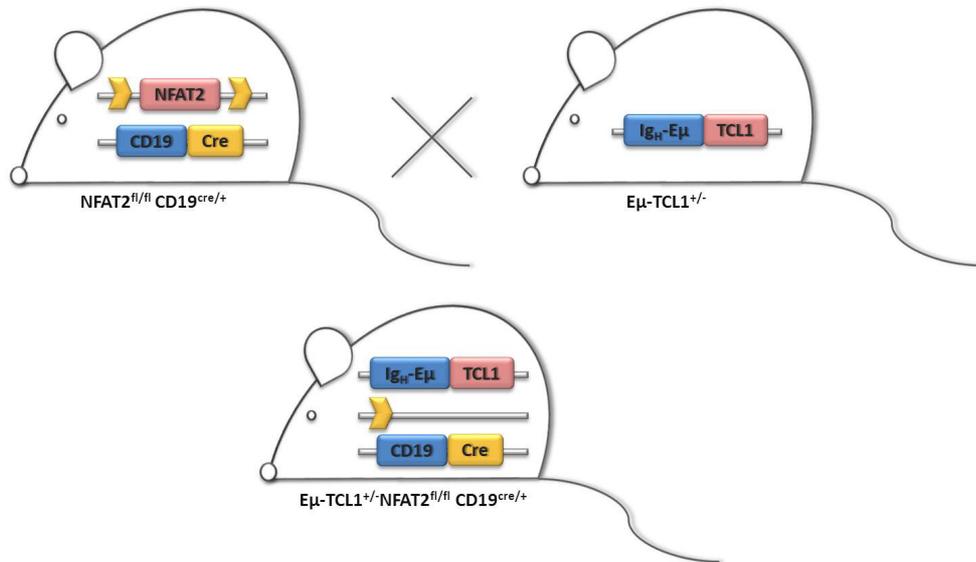


Abb. 17: Konditioneller NFAT2-Knockout im Eμ-TCL1-Modell

Homozygote Tiere vom Genotyp  $NFAT2^{fl/fl} CD19^{cre/+}$  werden mit Tieren der Eμ-TCL1 Linie verpaart. Die heterozygoten Tiere der F1-Generation werden weiter gekreuzt, so dass in der F3-Generation Eμ-TCL1<sup>+/-</sup>  $NFAT2^{fl/fl} CD19^{cre/+}$  Tiere als Versuchskohorte generiert werden.

Bei der Verpaarung von  $NFAT2^{fl/fl} CD19^{cre/+}$  mit Eμ-TCL1<sup>+/-</sup> Tieren erhält man in der F1-Generation heterozygot „geflochte“ NFAT2-Tiere, die durch erneute Kreuzung in der F2-Generation dann Tiere für die Verpaarung der Versuchskohorten ergaben. Das detaillierte Kreuzungsschema ist in Abb. 18 dargestellt. Tiere vom Genotyp Eμ-TCL1<sup>+/-</sup>  $NFAT2^{fl/fl} CD19^{cre/+}$  werden im folgenden TCL1+NFAT2-KO benannt und als Versuchskohorte untersucht. Als Kontrolltiere werden Eμ-TCL1<sup>+/-</sup>  $NFAT2^{fl/fl} CD19^{+/+}$  ohne NFAT2-Deletion verwendet, die als TCL1 bezeichnet werden.

<b>P:</b>		<b>NFAT2<sup>fl/fl</sup>CD19<sup>cre/+</sup></b>	<b>X</b>	<b>Eμ-TCL1<sup>+/-</sup></b>	
	25%	25%		25%	25%
<b>F<sub>1</sub>:</b>	Eμ-TCL1 <sup>+/-</sup> $NFAT2^{fl/fl} CD19^{+/+}$	<b>Eμ-TCL1<sup>+/-</sup> <math>NFAT2^{fl/fl} CD19^{+/+}</math></b>	<b>X</b>	<b>Eμ-TCL1<sup>+/-</sup> <math>NFAT2^{fl/fl} CD19^{cre/+}</math></b>	Eμ-TCL1 <sup>+/-</sup> $NFAT2^{fl/fl} CD19^{cre/+}$
	12,5%	12,5%		12,5%	12,5%
<b>F<sub>2</sub>:</b>	Eμ-TCL1 <sup>+/-</sup> $NFAT2^{fl/fl} CD19^{+/+}$	Eμ-TCL1 <sup>+/-</sup> $NFAT2^{fl/fl} CD19^{+/+}$		Eμ-TCL1 <sup>+/-</sup> $NFAT2^{fl/fl} CD19^{cre/+}$	Eμ-TCL1 <sup>+/-</sup> $NFAT2^{fl/fl} CD19^{cre/+}$
	12,5%	12,5%		12,5%	12,5%
	Eμ-TCL1 <sup>+/-</sup> $NFAT2^{fl/fl} CD19^{+/+}$	<b>Eμ-TCL1<sup>+/-</sup> <math>NFAT2^{fl/fl} CD19^{+/+}</math></b>	<b>X</b>	<b>Eμ-TCL1<sup>+/-</sup> <math>NFAT2^{fl/fl} CD19^{cre/+}</math></b>	Eμ-TCL1 <sup>+/-</sup> $NFAT2^{fl/fl} CD19^{cre/+}$
	25%	25%		25%	25%
<b>F<sub>3</sub>:</b>	Eμ-TCL1 <sup>+/-</sup> $NFAT2^{fl/fl} CD19^{+/+}$	<b>Eμ-TCL1<sup>+/-</sup> <math>NFAT2^{fl/fl} CD19^{+/+}</math></b>	<b>X</b>	<b>Eμ-TCL1<sup>+/-</sup> <math>NFAT2^{fl/fl} CD19^{cre/+}</math></b>	Eμ-TCL1 <sup>+/-</sup> $NFAT2^{fl/fl} CD19^{cre/+}$
	WT	TCL1		TCL1+NFAT2-Ko	KO

Abb. 18: Kreuzungsschema des konditionellen NFAT2-Knockouts im Eμ-TCL1-Modell

In der Parentalgeneration (P) wurde die konditionelle NFAT2-Knockout Linie mit der Eμ-TCL1 Linie verpaart. Die prozentuale Verteilung der Genotypen unter den Nachkommen (F<sub>1</sub>-F<sub>3</sub>) ist angegeben und die Tiere für weitere Verpaarungen sind in rot markiert.

Der Nachweis der NFAT2-Deletion in den  $E\mu$ -TCL1-Tieren wurde auf Proteinebene untersucht. Hierfür wurden  $CD19^+$  Splenozyten isoliert und *ex vivo* zur Proteinisolation verwendet. Die Auswertung des Western Blots (Abb. 19) zeigt eine vollständige Abwesenheit der NFAT2-Proteinexpression in Knockout-B-Zellen.

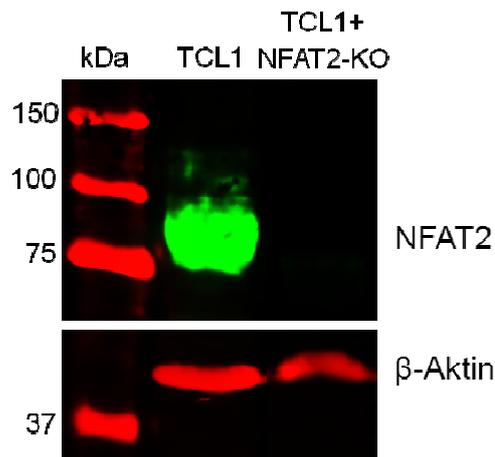


Abb. 19: Nachweis NFAT2-Knockout im  $E\mu$ -TCL1-Modell

$CD19^+$  B-Zellen wurden aus Splenozyten von  $E\mu$ -TCL1-Tieren mit und ohne NFAT2-Knockout mittels magnetischer Beads isoliert und 50  $\mu$ g der Proteinextrakt im Western Blot mit NFAT2-Antikörper (7A6) und  $\beta$ -Aktin (13E5) als Ladekontrolle verwendet.

### 3.2.2 Eine Deletion von NFAT2 führt zu einem verkürzten Gesamtüberleben

Nachdem sichergestellt wurde, dass der NFAT2-Knockout auch im  $E\mu$ -TCL1-Modell funktioniert, sollte der Einfluss von NFAT2 auf die Progression der CLL untersucht werden. Hierfür wurden Kohorten für einen Langzeitversuch gezüchtet. Dabei wurden die  $E\mu$ -TCL1<sup>+/-</sup> NFAT2<sup>fl/fl</sup>CD19<sup>cre/+</sup> mit der B-zellspezifischen NFAT2-Deletion (TCL1+NFAT2-KO) als experimentelle Kohorte verwendet. Als Kontrollkohorte dienten die  $E\mu$ -TCL1<sup>+/-</sup> NFAT2<sup>fl/fl</sup>CD19<sup>+/+</sup> Tiere ohne NFAT2-Deletion. Des Weiteren wurden NFAT2<sup>fl/fl</sup>CD19<sup>+/-</sup>- und NFAT2<sup>fl/fl</sup>CD19<sup>cre/+</sup>-Tiere als zusätzliche WT- (NFAT2<sup>fl/fl</sup>CD19<sup>+/+</sup>) und KO-Kontrollen (NFAT2<sup>fl/fl</sup>CD19<sup>cre/+</sup>) verwendet, um sicherzustellen, dass diese Gruppe keine unabhängige Erkrankung entwickelte bzw. der alleinige NFAT2-Knockout nicht für eine verminderte Lebensdauer verantwortlich ist.

Bei allen Tieren im Experiment wurde wöchentlich das Gewicht und der allgemeine Gesundheitszustand kontrolliert. Zudem wurde alle 4 Wochen retrobulbär Blut abgenommen und mittels eines Blutbildes analysiert. Zielgrößen des Experiments waren das Überleben der Tiere, die Anzahl an Leukozyten im peripheren Blut (WBC) und der Anteil an malignen  $CD5^+$  B-Zellen im Blut. Das Todesdatum jedes Tieres wurde notiert und die Überlebensdauer

in Tagen berechnet. Dabei trat der Tod entweder von selbst ein oder die Tiere wurden aus tierschutzrechtlichen Gründen wegen zu hohem krankheitsbedingten Gewichtsverlust oder anderen Krankheitssymptomen nach Rücksprache mit den zuständigen Tierärzten durch CO<sub>2</sub> euthanasiert. Die Tiere wurden *post mortem* untersucht, um eine andere Todesursache wie z.B. Infektionen auszuschließen. Alle Tiere verstarben aufgrund der fortschreitenden CLL. Die Beobachtungsdauer endete nach 400 Tagen, nachdem alle Tiere beider Leukämie-Kohorten verstorben waren.

Die Kaplan-Meier-Kurve in Abb. 20A zeigt die Überlebensrate der Tiere. In der TCL1-Kohorte verstarben alle Tiere über einen Zeitraum von 400 Tagen mit einem medianen Überleben von 325 Tagen. Im Gegensatz dazu zeigt die Kohorte mit NFAT2-Deletion eine signifikant kürzere mittlere Überlebensdauer von 265 Tagen, mit einem medianen Überleben von ca. 200 Tagen. Während des gesamten Beobachtungszeitraumes verstarb kein Tier aus den beiden Kontrollkohorten der WT- und der KO-Tiere.

Die regelmäßige Blutbildanalyse (Abb. 20B) ergab bei den Kontrollkohorten keine Erhöhung der Leukozytenzahl über den gesamten Zeitraum (~9000 Zellen/ $\mu$ l). Die TCL1-Kohorte zeigte einen deutlichen Anstieg der Leukozytenzahl im Laufe des Beobachtungszeitraums mit einem Maximalwert von bis zu ca. 26.000 Zellen/ $\mu$ l Blut. Im Gegensatz hierzu zeigte die TCL1+NFAT2-KO-Kohorte einen deutlich steileren Anstieg der Leukozyten schon nach ca. 180 Tagen von über 84.000 Zellen/ $\mu$ l. Die Spitze erreichten die ältesten Tiere der Kohorte mit über 690.000 Zellen/ $\mu$ l Blut, was bis zu 25-mal mehr Leukozyten waren, als bei normalen TCL1-Tieren ohne NFAT2-Deletion.

Parallel zur Blutbildanalyse wurde mittels Durchflusszytometrie der Anteil an malignen CD5<sup>+</sup> B-Zellen im Blut bestimmt und in Abb. 20C dargestellt. Während WT- und KO-Kontrolltiere nur einen sehr geringen Anteil an CD5<sup>+</sup> B-Zellen über den gesamten Zeitraum aufwiesen (max. 50 Zellen/ $\mu$ l), zeigten beide Leukämie-Kohorten eine deutlich höhere Anzahl an malignen Zellen im Blut. Bei der TCL1-Kohorte betrug der mittlere Anteil bis zu 27.000 Zellen/ $\mu$ l Blut. Die Akkumulation der malignen Zellen erfolgte in der TCL1-Kohorte eher langsam und wurde erst nach ca. 180 Tagen deutlich sichtbar (1.200 Zellen/ $\mu$ l). Im Vergleich dazu hatten die TCL1+NFAT2-KO-Tiere im Alter von 180 Tagen schon über 31.000 Zellen/ $\mu$ l Blut, welche im Laufe der Beobachtung noch weiter zunahmen bis auf letztendlich bis zu 476.000 Zellen/ $\mu$ l Blut.

Aus diesen Ergebnissen geht klar hervor, dass sich der Verlust von NFAT2 negativ auf das Überleben der Tiere auswirkt und für eine erheblich akzelerierte Expansion der CLL-Zellen im Blut verantwortlich ist.

### 3 Ergebnisse

#### 3.2 Die Bedeutung von NFAT2 in der CLL

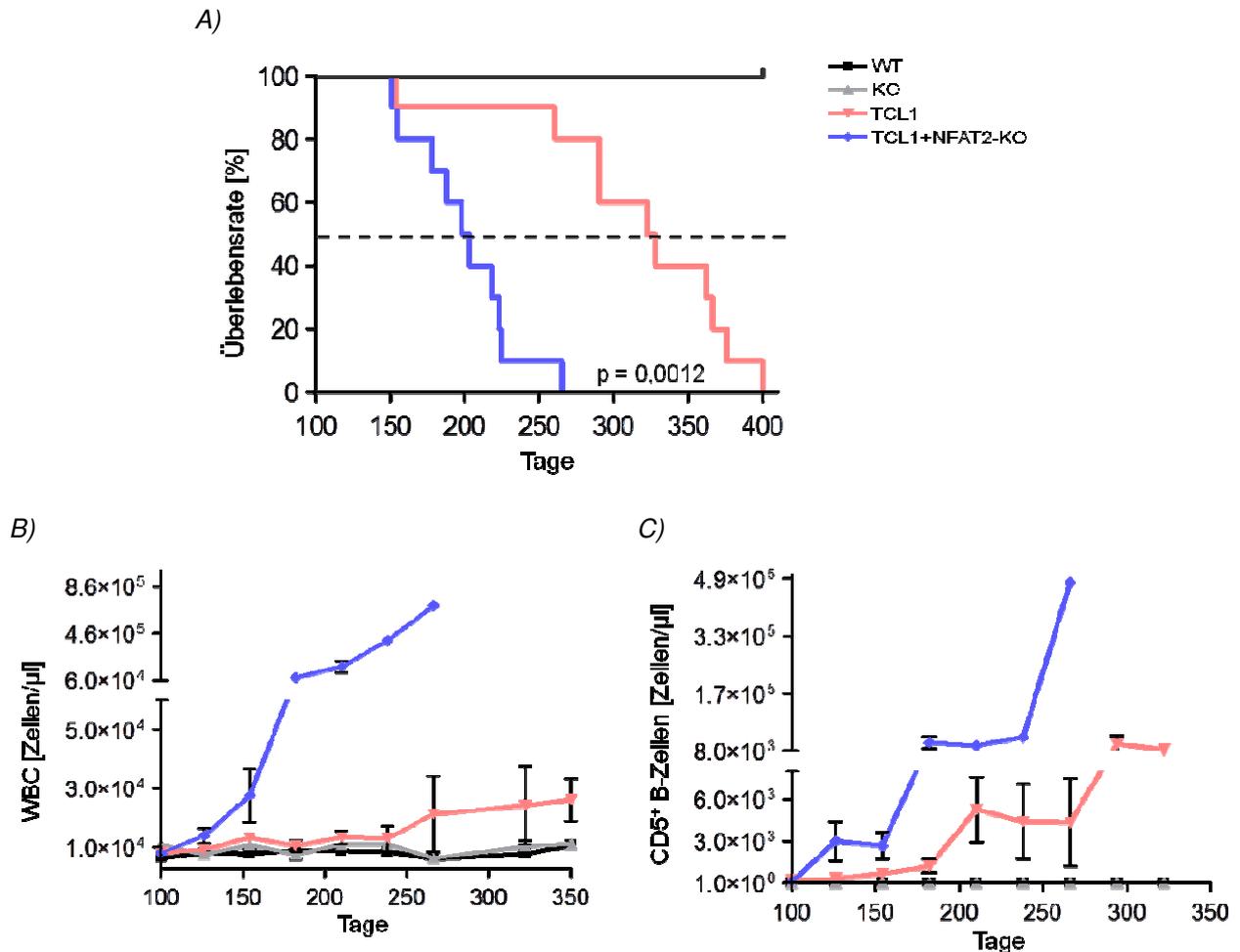


Abb. 20: NFAT2-Verlust verstärkt Progression der CLL

Tiere des Genotyps  $NFAT2^{fl/fl} CD19^{+/+}$ ,  $NFAT2^{fl/fl} CD19^{cre/+}$ ,  $E\mu-TCL1^{+/-} NFAT2^{fl/fl} CD19^{+/+}$  und  $E\mu-TCL1^{+/-} NFAT2^{fl/fl} CD19^{cre/+}$  wurden gezüchtet und dem Alter und dem Geschlecht entsprechend den Kontrollkohorten WT & KO ( $n=5$ ) und den experimentellen Kohorten TCL1 & TCL1+NFAT2-KO ( $n=10$ ) zugeordnet. Alle 4 Wochen erfolgte eine retrobulbäre Blutentnahme von ca. 100  $\mu$ l Blut. A) Kaplan-Meier-Kurve der Überlebensrate in Tagen. B) Ergebnisse des Blutbildes, welches mit einem Advia Messgerät in einer 1:6 Verdünnung bestimmt wurde. Dargestellt ist der White Blood Count (WBC) pro Kohorte im Mittel. C) Durchflusszytometrische Analyse des Blutes. Dargestellt ist der Mittelwert an  $CD5^+$  B-Zellen pro  $\mu$ l Blut der untersuchten Kohorten.

#### 3.2.3 Der Verlust von NFAT2 führt zu einer Akzelerierung der CLL

Um einen Einblick in die Dynamik der CLL-Erkrankung zu erhalten, wurden neben den Langzeitbeobachtungen weitere Kohorten gezüchtet, um verschiedene Organsysteme zu festgelegten Zeitpunkten zu untersuchen. Hier wurden je 5 Tiere pro Gruppe im Alter von 4, 12, 16, 20, 28 und 36 Wochen untersucht. Im Folgenden sind die relevanten Ergebnisse dieser Analysen dargestellt. In Abb. 21 sind die Analysen des Blutes und der Milz im Alter von 28 Wochen dargestellt.

Abb. 21A & B zeigen das Gatingsschema der CD5<sup>+</sup> B-Zellen. In der WT-Kohorte ergab sich ein nur geringer Anteil an CD5<sup>+</sup> B-Zellen und ein normales CD19<sup>+</sup>B220<sup>+</sup> B-Zellkompartiment. In der TCL1-Kohorte wies die B-Zell-Population mehr CD19<sup>+</sup>B220<sup>-</sup> Zellen auf und es wurde ein deutlicher Anstieg der CD5<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> B-Zellen verzeichnet. In der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte zeigte sich eine deutliche Vergrößerung der CD19<sup>+</sup> B-Zell-Population, die weitestgehend aus B220<sup>-</sup> B-Zellen bestand. Der größte Anteil der untersuchten Zellen exprimiert den malignen CD5<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> Phänotyp. Diese Veränderungen konnten sowohl im Blut als auch in der Milz der Tiere beobachtet werden.

Die statistische Auswertung der durchflusszytometrischen Untersuchung (Abb. 21C & D) ergab bei der TCL1-Kohorte eine signifikante Zunahme der CD5<sup>+</sup> B-Zellen im Blut (1% vs. 14%) und in der Milz (3% vs. 25%) der Tiere. In der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte ließ sich der höchste Anteil an CD5<sup>+</sup> B-Zellen detektieren, im Mittel mit bis zu 48% maligner B-Zellen im Blut und bis zu 59% in der Milz der Tiere.

Diese Ergebnisse zeigen, dass es durch den NFAT2-Verlust zu einer verstärkten Akkumulation von CLL-Zellen kommt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.2 Die Bedeutung von NFAT2 in der CLL

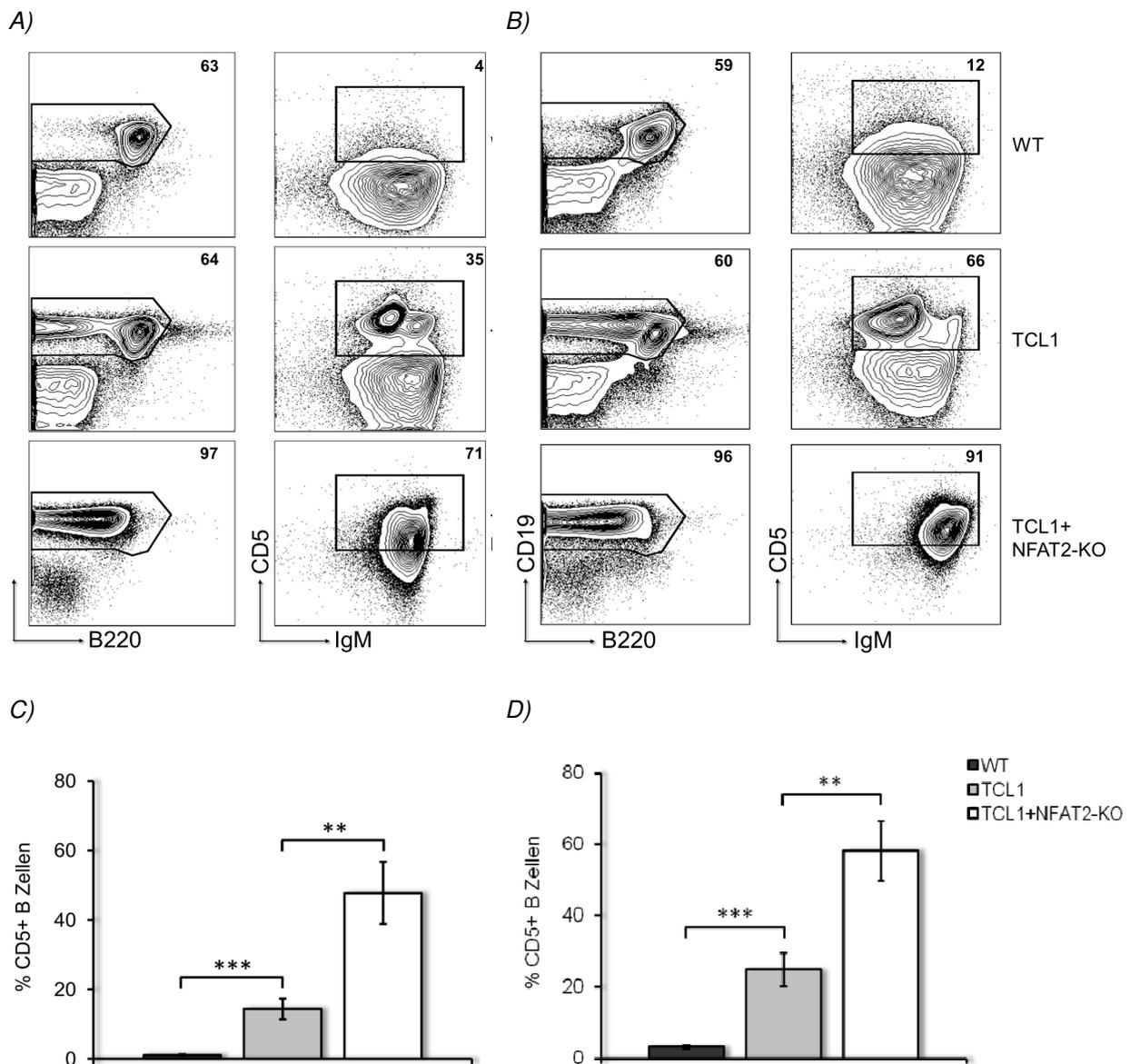


Abb. 21: Verstärkte Akkumulation der CD5<sup>+</sup> B-Zellen in Blut und Milz durch NFAT2-Verlust

Die Tiere der 3 Kohorten WT, TCL1 und TCL1+NFAT2-KO wurden im Alter von 28 Wochen euthanasiert und die Zellen aus dem Blut und der Milz durchflusszytometrisch analysiert. A) Exemplarisches Gatingschema der lebenden CD19<sup>+</sup>B220<sup>+</sup> B-Zell-Population und der CD5<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> B-Zellen im Blut (A) und in der Milz (B). Der prozentuale Anteil der markierten Populationen wurde angegeben. Statistische Auswertung der CD5<sup>+</sup> B-Zellen bezogen auf alle lebenden Zellen im Blut (C) und in der Milz (D) der Tiere (n=5, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,005).

Die Milz der experimentellen Kohorten wurde neben der durchflusszytometrischen Analyse auch makroskopisch und histologisch untersucht. Abb. 22A zeigt die Aufnahme einer exemplarischen Milz jeder Kohorte im Alter von 36 Wochen. Die Kontrollmilz des WT-Tieres zeigt keine makroskopischen Veränderungen oder Vergrößerung (0,11 g). Die Milz des TCL1-Tieres mit einem Gewicht von 0,74 g zeigt bereits eine sehr deutliche Splenomegalie

### 3 Ergebnisse

#### 3.2 Die Bedeutung von NFAT2 in der CLL

und eine 6-fache Gewichtszunahme im Vergleich zur Wildtypkontrolle. Bei dem Tier mit B-zellspezifischer NFAT2-Deletion weist die Milz ein Gewicht von 3,01 g auf, was im Vergleich zur TCL1 Milz eine 4-fache und im Vergleich zur Wildtypkontrolle eine 28-fache Gewichtszunahme darstellt. Zudem lässt sich schon makroskopisch eine Veränderung der Milzstruktur erkennen. Es kommt zu einer Infiltration der Milz durch CLL-Zellen, welche sich durch weiße Punkte auf und in der Milz darstellt.

In Abb. 22B ist das mittlere Gewicht der Milzen von 36 Wochen alten Tieren aus den untersuchten Kohorten graphisch aufgetragen. Im Vergleich zum mittleren Gewicht der Wildtyp-Kohorte mit 0,1 g zeigte die TCL1-Kohorte eine über 10-fache Gewichtszunahme mit 1,1 g im Mittel. Die Splenomegalie der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte war mit 2,7 g am stärksten und verglichen mit der Wildtyp-Kohorte um das 26-fache erhöht.

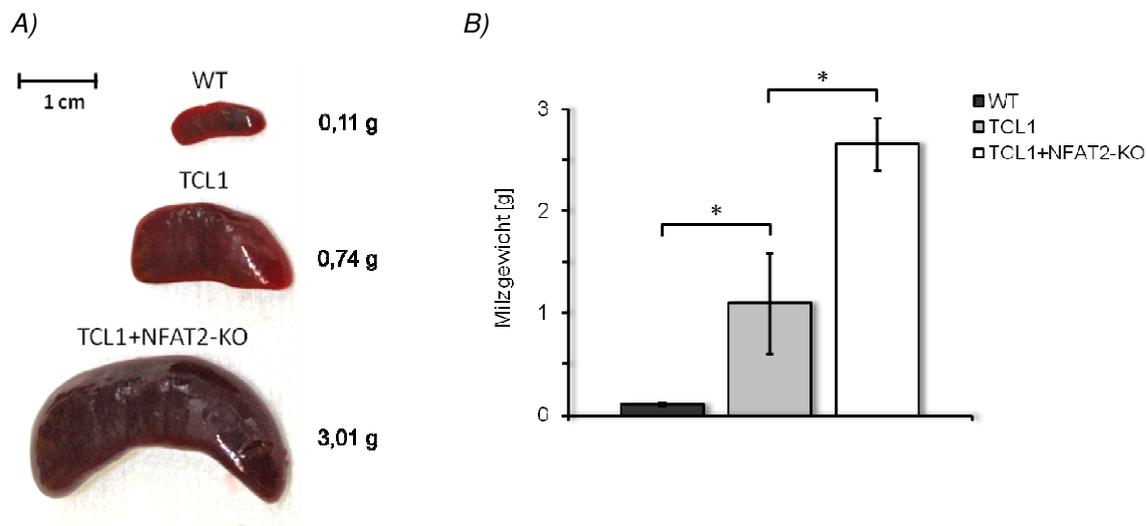


Abb. 22: Deletion von NFAT2 verstärkt die Splenomegalie der experimentellen Kohorten

Die Versuchstiere der untersuchten Kohorten wurden im Alter von 36 Wochen euthanasiert und die Milzen entnommen. A) Aufnahme der gesamten präparierten Milz. B) Mittleres Milzgewicht der untersuchten Kohorten ( $n=5$ , \*  $p < 0,05$ ).

Für die histologische Untersuchung der Milz wurden zu verschiedenen Zeitpunkten die Milzen der Tiere in Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Nach Anfertigung der Paraffinschnitte mit dem Mikrotom wurden diese mit Hämatoxylin & Eosin gefärbt und mikroskopisch analysiert. Abb. 23 zeigt ein repräsentatives Ergebnis der angefertigten Gewebsschnitte.

Bei den Jungtieren im Alter von 4 Wochen ist in allen Kohorten deutlich die Struktur der Lymphfollikel zu erkennen (Abb. 23A). Die weiße Pulpa zeichnet sich klar abgegrenzt von der roten Pulpa ab. Es können keine Infiltration von Lymphozyten beobachtet werden.

8 Wochen später ist erstmals in der TCKL1+NFAT2-KO Kohorte eine leichte Ausdehnung der weißen Pulpa zu beobachten, wobei die Strukturen noch klar definiert voneinander zu unterscheiden waren (Abb. 23B). Beim TCL1-Tier zeigten sich keine Veränderungen.

Im Alter von 20 Wochen weisen die Milzen der Leukämie-Kohorten bereits deutliche Veränderungen auf (Abb. 23C). Im Vergleich zum Wildtyp zeigt hier die TCL1-Kohorte eine Infiltration der weißen Pulpa, welche sich leicht vergrößert darstellt. Zudem wirkt die Abgrenzung der weißen Pulpa nicht mehr so prägnant. Bei der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte ist die Infiltration weiter fortgeschritten und sorgt für eine diffuse Verteilung von Lymphozyten im Gewebe. Die Höfe der weißen Pulpa sind nur noch undeutlich zu erkennen.

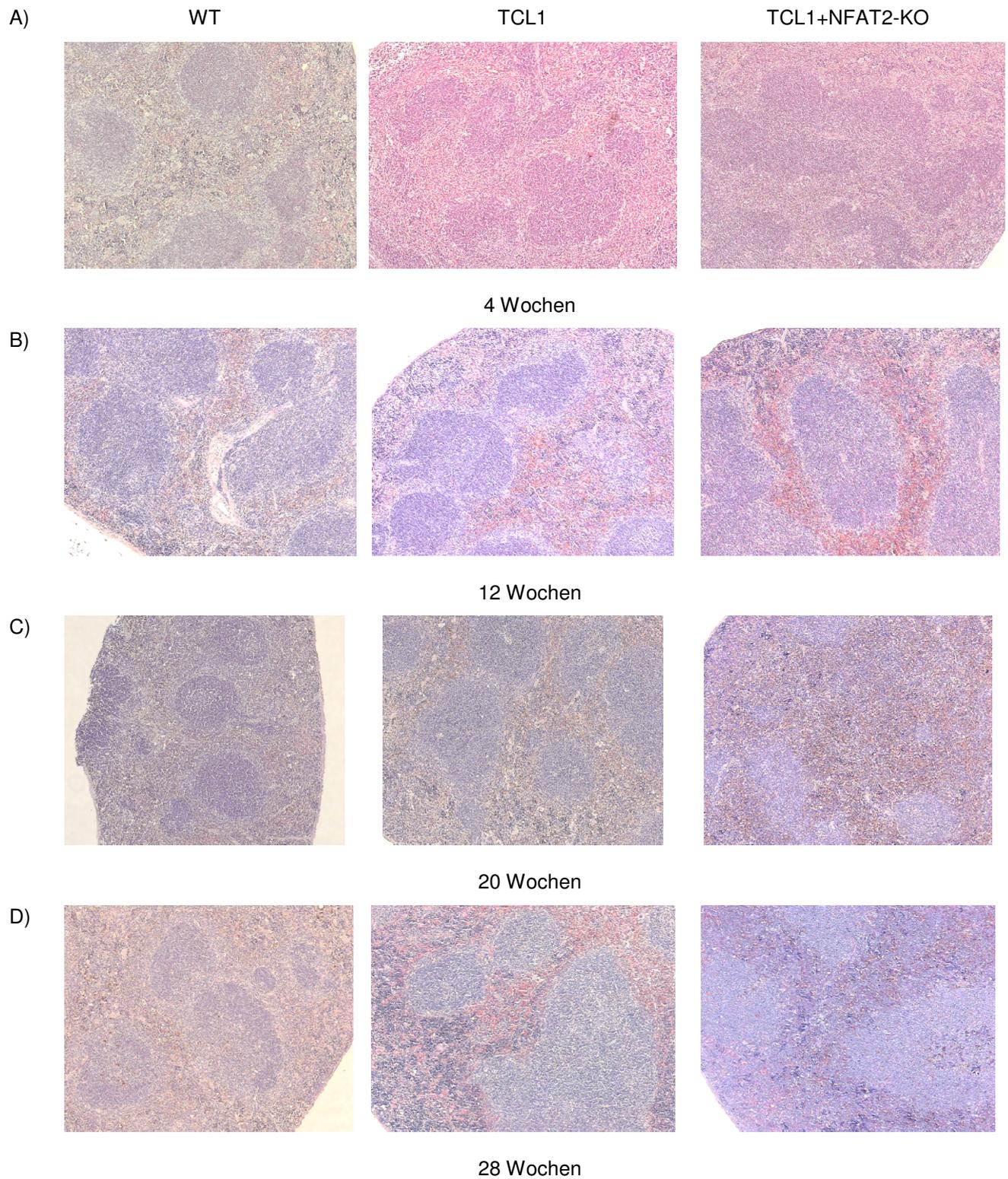
Mit fortschreitender Erkrankung der Tiere (28 Wochen) intensivierte sich die Ausbreitung der infiltrierenden Lymphozyten im Gewebe (Abb. 23D). Die TCL1-Kohorte weist eine extrem vergrößerte weiße Pulpa auf, Lymphozyteninfiltrate sind nun auch in der roten Pulpa zu finden. Deutlich extremer ist dieser Effekt in der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte zu beobachten. Die Ausbreitung der weißen Pulpa zieht sich durch fast das gesamte Gewebe, die Struktur war durch die Infiltrate weitgehend aufgelöst.

Die letzte Analyse nach 36 Wochen zeigt in der TCL1-Kohorte eine fast vollständige Auflösung der normalen Milzstruktur (Abb. 23E). Die Lymphfollikel sind durch die extreme Infiltration der Lymphozyten nur noch sehr schwer zu erkennen. In der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte kommt es zu einer kompletten Zerstörung der Milzstruktur. Es lässt sich keine weiße Pulpa mehr abgrenzen und auch die rote Pulpa wurde von Lymphozyteninfiltraten überschwemmt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.2 Die Bedeutung von NFAT2 in der CLL

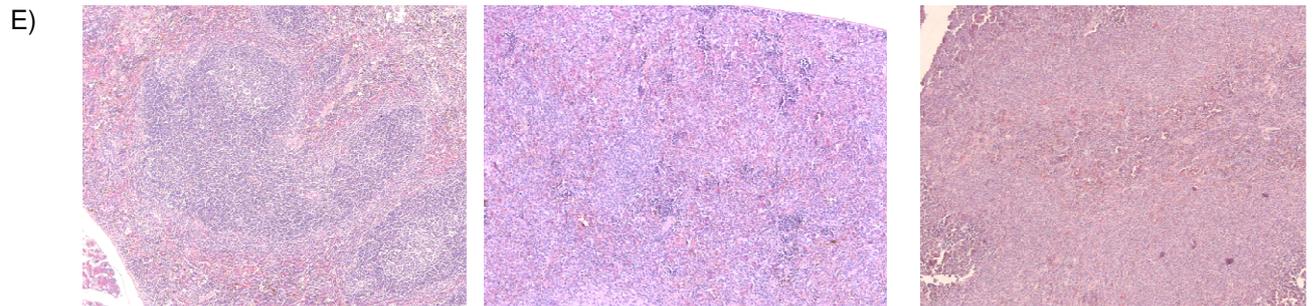
---



### 3 Ergebnisse

#### 3.2 Die Bedeutung von NFAT2 in der CLL

---



36 Wochen

*Abb. 23: Akzelerierte Infiltration der Milz mit CLL-Zellen nach B-Zell-spezifischer NFAT2-Deletion*

*Die Milz der Versuchstiere wurde zu den angegebenen Zeitpunkten präpariert und in einer 4%-Formalinlösung fixiert. Anschließend wurden die Organe in Paraffin eingebettet und mit dem Mikrotom 5 µm dicke Gewebsschnitte angefertigt. Mit den Gewebsschnitten wurde eine Eosin & Hämatoxylin-Färbung durchgeführt und diese danach mikroskopisch analysiert. Die Aufnahmen zeigen je einen repräsentativen Gewebeschnitt pro Kohorte.*

In den folgenden Experimenten wurde die Progression der CLL im Blut der Tiere untersucht. Hier wurden, wie bereits beschrieben, zu definierten Zeitpunkten die Leukämie-Kohorten analysiert. Dabei wurde ein Blutbild angefertigt und durchflusszytometrisch der Anteil an B-Zellen im peripheren Blut bestimmt. Dies ermöglichte eine Umrechnung der untersuchten Zellen auf das Blutvolumen der Tiere.

Abb. 24A zeigt die Akkumulation der CD5<sup>+</sup> B-Zellen über 28 Wochen. In jungen TCL1-Tieren (4 Wochen) war der Anteil an CD5<sup>+</sup> B-Zellen noch signifikant höher als in der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte (98.000 vs. 12.000 Zellen/ml). Im Alter von 12 Wochen glich sich der Anteil der Zellen durch eine Zunahme der CD5<sup>+</sup> Zellen in der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte (100.000 vs. 66.000 Zellen/ml) an, wobei der Anteil in der TCL1-Kohorte gleich blieb. Nach 16 Wochen überwog der Anteil an malignen Zellen in der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte im Vergleich zur TCL1-Gruppe (500.000 vs. 1,6 Mio. Zellen/ml). Aufgrund der Heterogenität innerhalb der Kohorten wurde dieser Unterscheid allerdings nicht signifikant. Vier Wochen später war dieser Unterschied dann als signifikant einzustufen (680.000 vs. 12,9 Mio. Zellen/ml). Der letzte Messwert bei 28 Wochen alten Tieren bestätigte diese Ergebnisse nochmals und zeigte mit ~141 Mio. Zellen/ml eine extrem hohe Anzahl an CLL-Zellen im peripheren Blut. Die Anzahl in der TCL1-Kohorte pendelte sich hier bei 1,4 Mio. Zellen/ml ein und war damit fast 100-fach niedriger als bei Tieren mit NFAT2-Deletion.

Da die Expansion der CD5<sup>+</sup> B-Zellen auf einen Ursprung der Leukämie in den B1 B-Zellen hindeutete, wurde parallel auch der Anteil der B2-Population im Blut durchflusszytometrisch ermittelt. Hierbei wurden die Marginalzonen-B-Zellen und Follikulären B-Zellen zusammengefasst und in Abb. 24B dargestellt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.2 Die Bedeutung von NFAT2 in der CLL

Es zeigten sich über den ganzen untersuchten Zeitraum von 28 Wochen keine Veränderungen im Anteil der B2 B-Zellen im peripheren Blut mit im Mittel ~2,2 Mio. Zellen/ml in der TCL1- und ~2,0 Mio Zellen/ml in der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte.

Trotz der Zunahme an B1 B-Zellen ließen sich diese Effekte demnach nicht für B2 B-Zellen ermitteln, wodurch von einer reinen B1 B-Zell-Leukämie ausgegangen werden kann.

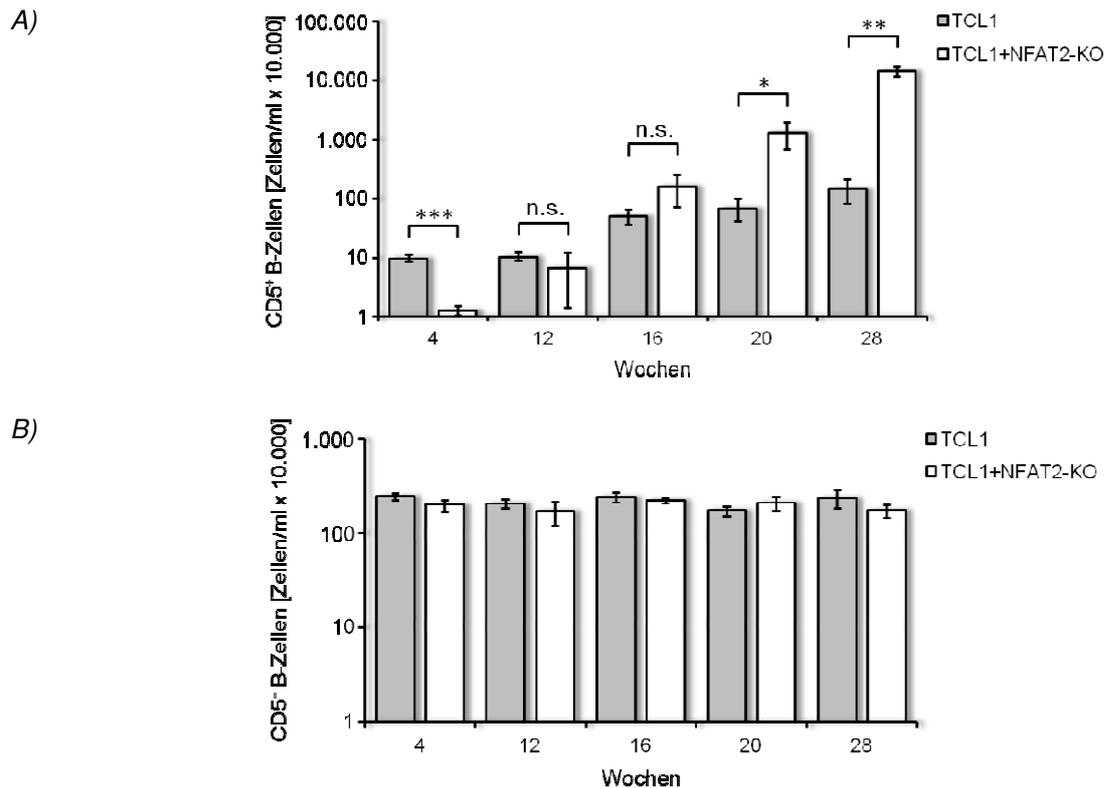


Abb. 24: NFAT2-Verlust führt zur Expansion der B1 aber nicht der B2 B-Zellen

Die Versuchstiere beider Kohorten wurden zu den angegebenen Zeitpunkten euthanasiert und das vorher retrobulbär gewonnene Blut analysiert. Es wurde ein Blutbild angefertigt und zudem wurden die kernhaltigen Zellen aus dem Blut mittels Erythrozytenlyse isoliert und durchflusszytometrisch bestimmt. Anhand des ermittelten WBCs im Blutbild konnte der durchflusszytometrisch bestimmte Anteil der verschiedenen B-Zell-Populationen auf die Zellzahl pro ml Blut rückgerechnet werden. A) Anteil der CD5<sup>+</sup> B-Zellen/ml Blut zu den angegeben Zeitpunkten. B) Anteil der B2 B-Zellen bestehend aus den Marginalzonen-B-Zellen und den Follikulären B-Zellen. Zur besseren Übersicht wurden die y-Achsen logarithmiert dargestellt ( $\log_{10}$ ) ( $n=5$ , \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,005$ ).

Im Zuge der Untersuchungen der CLL-Progression im Blut wurden auch weitere Organe bzw Zellpopulationen wie in Milz, im Peritonealraum, im Lymphknoten und im Knochenmark der Tiere analysiert. Es war bereits bekannt, dass die fortschreitende Erkrankung der TCL1-Tiere zu einer Akkumulation der malignen CD5<sup>+</sup> B-Zellen in diesen Organen führt<sup>81</sup>. Um mehr über die Pathogenese und den Progress der Erkrankung in einzelnen Organsystemen zu

erfahren, wurden die Tiere der beiden Leukämie-Kohorten wie oben beschrieben zu den gegebenen Zeitpunkten euthanasiert und die Organe durchflusszytometrisch analysiert.

In Abb. 25A ist die Expansion der CD5<sup>+</sup> CLL-Zellen in der Milz dargestellt. Hier zeigte sich in jungen Tieren im Alter von 4 Wochen ein deutlich höherer Anteil an malignen Zellen in der TCL1-Kohorte ohne NFAT2-Deletion (2,8% vs. 0,9%). Während der nächsten Untersuchungszeitpunkte zu 12 und 16 Wochen stieg dieser Anteil in beiden Kohorten weiter an, wobei hier die TCL1-Kohorte immer noch den größeren Anteil an CD5<sup>+</sup> B-Zellen aufwies, mit einem Anteil von 14,5% vs. 8,8% im Alter von 16 Wochen. Diese Differenzen waren, aufgrund der Varianz innerhalb der Kohorten, allerdings nicht mehr als signifikant einzustufen. Bei 20 Wochen alten Tieren zeigte erstmals die TCL1+NFAT2-KO-Kohorte einen höheren Anteil an malignen Zellen (17,9% vs. 34,8%), was im Alter von 28 Wochen zu einem signifikanten Unterscheid führte (25,2% vs. 72,7%).

Anders stellte sich das bei der Untersuchung der Peritonealhöhle dar (Abb. 25B). Hier zeigte sich ein annähernd gleich hoher Anteil an CD5<sup>+</sup> B-Zellen in jungen Tieren (27,3% vs. 21,8%). Über die untersuchten Zeitpunkte von bis zu 28 Wochen alten Tieren entwickelte die TCL1-Kohorte eine höhere Expansion der malignen Zellen. In erwachsenen älteren Tieren war dieser Unterschied am stärksten ausgeprägt, mit 85,4% CLL-Zellen bei den TCL1-Tieren, wohingegen die TCL1+NFAT2-KO-Kohorte nur 44,4% der CD5<sup>+</sup> B-Zellen aufwies. Damit lag dieser Wert nur knapp 15% über dem Ausgangswert junger TCL1-Tiere im Alter von 4 Wochen.

Im Lymphknoten der Tiere ließ sich ebenfalls eine Infiltration durch CD5<sup>+</sup> B-Zellen nachweisen (Abb. 25C). Hier zeigten sowohl junge TCL1-Tiere mit 4 Wochen (0,6% vs. 0,1%) als auch bereits adulte Tiere im Alter von 16 Wochen (1,0% vs. 0,4%) einen signifikant höheren Anteil an malignen Zellen. Erst im Alter von 20 Wochen glich sich der Prozentsatz an infiltrierenden Zellen im Lymphknoten in beiden Kohorten annähernd aus (1,2% vs. 0,95%). Zum Untersuchungszeitpunkt von 28 Wochen allerdings kam es zu einer drastischen Zunahme der CD5<sup>+</sup> B-Zellen in der Kohorte mit NFAT2-Deletion (2,7% vs. 8,4%). Die Dynamik der Erkrankung im Knochenmark ist in Abb. 25D dargestellt. Sowohl in jungen Tieren mit 4 Wochen (0,25% vs. 0,05%) als auch in 12 Wochen alten Tieren (1,3% vs. 0,4%) war die Infiltration der CD5<sup>+</sup> B-Zellen in der TCL1-Kohorte deutlich höher als in der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte. Im Zeitraum zwischen 16 und 20 Wochen überstieg dann der Anteil an malignen Zellen in der TCL1+NFAT2-KO-Gruppe die der TCL1-Kohorte mit 5,9% vs. 12,8% im Alter von 20 Wochen. Im Alter von 28 Wochen ließ sich dann eine signifikant höherer Infiltration im Vergleich zur TCL1-Gruppe detektieren (2,5% vs. 15,1%).

Generell stellte sich am Anfang der Anteil an CD5<sup>+</sup> B-Zellen in jedem untersuchten Organ in der TCL1-Kohorte immer deutlich höher heraus als in der Vergleichsgruppe mit NFAT-

### 3 Ergebnisse

#### 3.2 Die Bedeutung von NFAT2 in der CLL

Knockout. Erst im Laufe der Zeit kam es, mit Ausnahme der Zellen im Peritonealraum, zu einer Angleichung der Werte. Im späten Erwachsenenalter wurde die TCL1-Kohorte dann deutlich überholt. Dieser Effekt stellte sich in der Milz und im Knochenmark, aber auch im Blut (Abb. 24A) schon nach spätestens 20 Wochen ein, während dies im Lymphknoten erst nach 28 Wochen der Fall war. Der Zeitpunkt an welchem die TCL1+NFAT2-KO-Kohorte einen höheren Anteil an malignen Zellen in der Peritonealhöhle aufwies trat über die gesamte Untersuchungsdauer nicht ein.

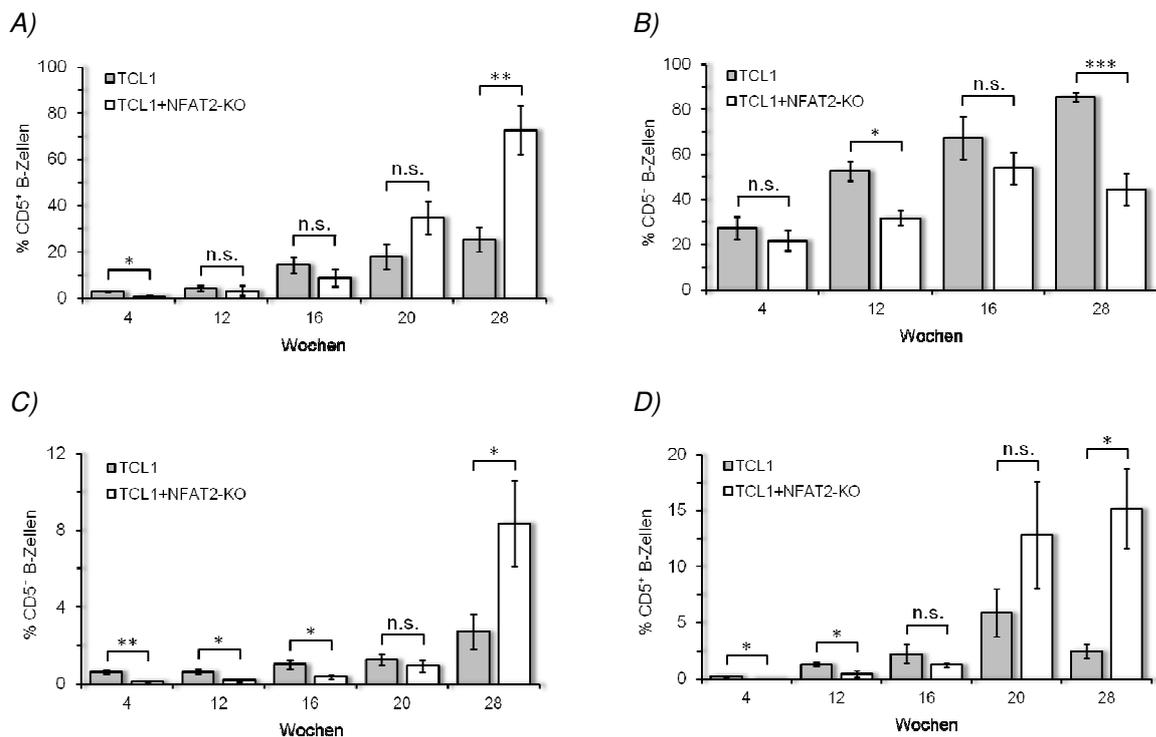


Abb. 25: Höhere Dynamik der CLL-Erkrankung durch den Verlust von NFAT2

Die Versuchstiere beider Kohorten wurden zu den angegebenen Zeitpunkten euthanasiert und die Zellen aus der Milz (A), der Peritonealhöhle (B), dem Lymphknoten (C) und dem Knochenmark (D) isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist jeweils der Anteil an CD5<sup>+</sup> B-Zellen bezogen auf die Gesamtzahl der Lymphozyten im jeweiligen Organ ( $n=5$ , \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,005$ ).

#### 3.2.4 NFAT2-Knockout beschleunigt die Proliferation der CLL Zellen

Um einen Einblick in die Ursache der unterschiedlich schnellen Verbreitung der CD5<sup>+</sup> CLL-Zellen in verschiedenen Organen zu erhalten, wurde die *in vivo*-Proliferation und die Apoptoserate dieser Zellen ermittelt. Hierfür wurden die Versuchstiere der beiden Leukämie-Kohorten sowohl als Jungtiere im Alter von 4 Wochen als auch als adulte Tiere im Alter von 20 Wochen analysiert. Die Tiere wurden vor der Organentnahme über 48 h mit BrdU-Lösung behandelt, welche 2x im Abstand von 24 h i.p. injiziert wurde. Anschließend wurden die

Zellen isoliert und durchflusszytometrisch der Anteil an BrdU<sup>+</sup> proliferierenden Zellen und der Anteil an apoptotischen Annexin V<sup>+</sup> Zellen bestimmt (Abb. 26).

Bei der Analyse des Blutes junger Tiere zeigte sich bisweilen eine leicht erhöhte Proliferation in der TCL1-Kohorte, die aber nicht das Signifikanzniveau erreichte (0,11% vs. 0,05%) (Abb. 26A). Anders hingegen im Alter von 20 Wochen, hier war der Anteil an BrdU<sup>+</sup> Zellen in der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte nun deutlich erhöht (1,7% vs. 8,5%). Zudem ließ sich zu diesem Zeitpunkt auch ein erhöhter Anteil an apoptotischen Zellen in dieser Kohorte erkennen (0,3% vs. 2,3%).

In der Milz der Tiere stellten sich ähnliche Effekte verglichen mit dem Blut ein (Abb. 26B). Auch hier war der Anteil an proliferierenden Zellen bei 4 Wochen alten Tieren der TCL1-Kohorte erhöht, erreichte hier aber das Signifikanzniveau (0,2% vs. 0,03%). Dieser beobachtete Effekt kehrte sich im Alter von 20 Wochen um. Hier überstieg der Anteil an BrdU<sup>+</sup> Zellen in den Tieren mit NFAT2-Deletion die TCL1-Kohorte deutlich (2,9% vs. 12,7%). Veränderungen im Anteil der Annexin V<sup>+</sup> Zellen in der Milz konnten zu keinem Zeitpunkt detektiert werden.

Die Effekte im Peritonealraum der Tiere stellten sich bei adulten Tieren gänzlich anders als im Blut und in der Milz dar. Zwar zeigten auch hier die jungen Tiere der TCL1-Gruppe eine deutlich höhere Proliferationsrate (3,8% vs. 1,4%), dieser Effekt kehrte sich im erwachsenen Alter allerdings nicht um. Der Anteil an BrdU<sup>+</sup> Zellen stieg in der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte zwar auf nahezu dasselbe Level an, überstieg es aber nicht (5,7% vs. 5,2%). Auch im Peritonealraum ließen sich keine Veränderungen in der Apoptoserate feststellen.

Die Proliferationsraten im Knochenmark der jungen Tiere (4 Wochen) zeigten keine signifikante Veränderung, aber eine leichte Erhöhung in der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte (0,05% vs. 0,08%). Ein ähnlicher, nicht signifikanter Effekt stellte sich bei der Ermittlung der Apoptoserate ein (0,003% vs. 0,19%). Im Alter von 20 Wochen waren sowohl Proliferations- als auch Apoptoserate deutlich höher als bei den jüngeren Versuchstieren. Zudem zeigte die Kohorte mit NFAT2-Deletion einen deutlich erhöhten Anteil an BrdU<sup>+</sup> (0,2% vs. 1,1%) und an Annexin V<sup>+</sup> B-Zellen (1,6% vs. 4,4%).

Diese Ergebnisse zeigen sehr deutlich, dass der Verlust von NFAT2 in CLL-Zellen zu einer erhöhten Proliferation vor allem in adulten Tieren führt. Dies ließ sich für alle untersuchten Organe ermitteln, mit Ausnahme der Zellen des Peritonealraums. Auch die Apoptose der Zellen wird durch NFAT2 reguliert, was in einigen Organsystemen zu einem erhöhten Zelltod führte.

### 3 Ergebnisse

#### 3.2 Die Bedeutung von NFAT2 in der CLL

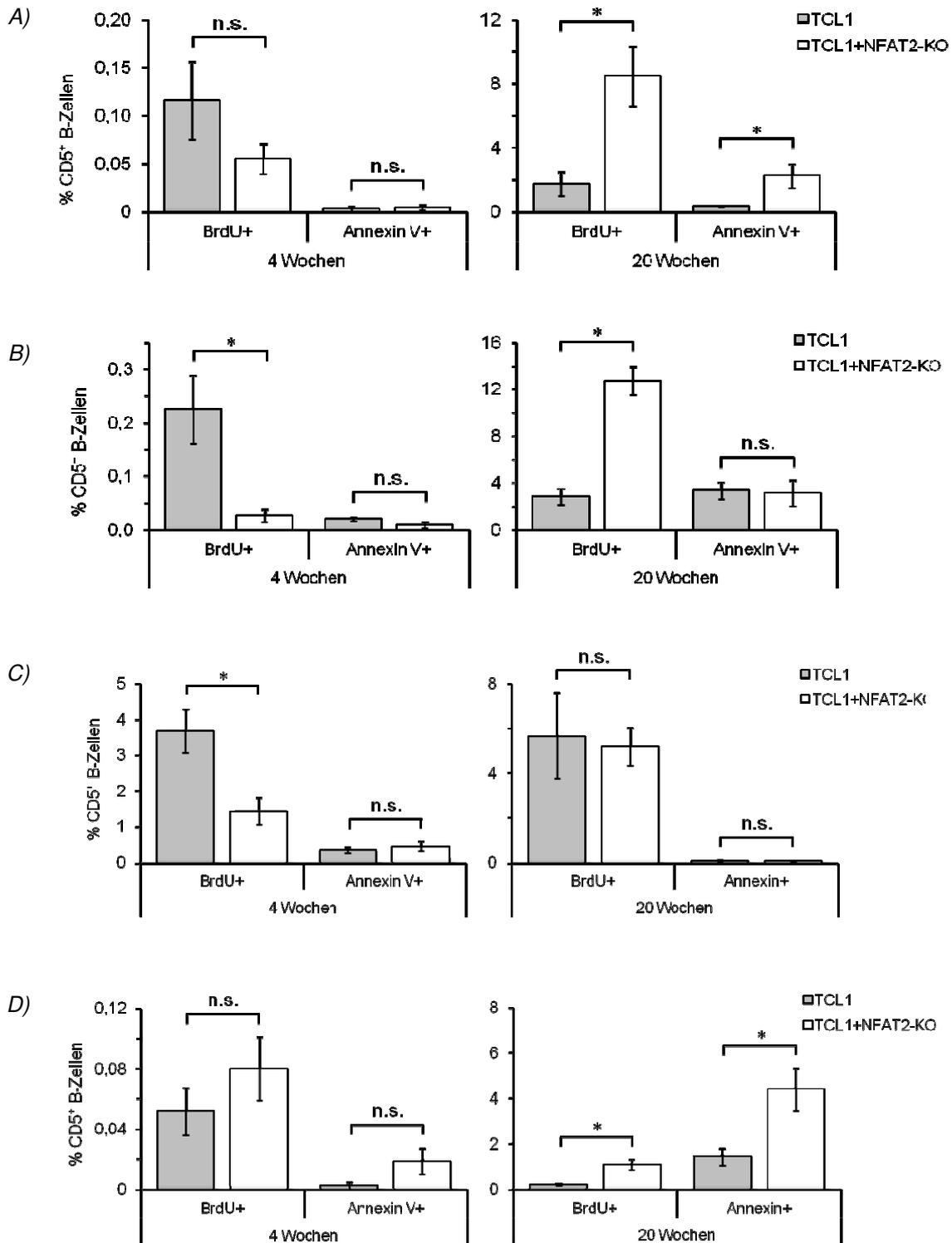


Abb. 26: NFAT2-Verlust steigert die Proliferation maligner CLL-Zellen

Bei Versuchstieren im Alter von 4 und 20 Wochen wurde alle 24 h 200  $\mu$ l BrdU-Lösung (10 mM) i.p. injiziert. Nach 48 h wurden die Organe präpariert und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die CD5<sup>+</sup> B-Zell-Population mit dem jeweiligen Anteil an proliferierenden BrdU<sup>+</sup> und apoptotischen Annexin V<sup>+</sup> Zellen im Blut (A), in der Milz (B), im Peritonealraum (C) und im Knochenmark (D) der Tiere (n=5, \* p < 0,05).

Nach der Proliferation der CD5<sup>+</sup> B-Zellen wurde in einem weiteren Experiment die Zellzyklusrate der beiden Leukämie-Kohorten ermittelt. Hierfür wurde 20 Wochen alten Tieren eine BrdU-Lösung injiziert und das Blut 24 h später durchflusszytometrisch analysiert. Die Färbung mit einem  $\alpha$ BrdU-Antikörper und 7-AAD für den DNA-Gehalt ermöglichte dann eine Einteilung in die verschiedenen Zellzyklusphasen (Abb. 27).

In Abb. 27A ist ein exemplarisches Gatingschema der G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>, G<sub>2</sub>/M und S-Phase der CD5<sup>+</sup> B-Zellen in beiden Kohorten gezeigt. Bereits hier fiel auf, dass der Anteil an Zellen in der S-Phase in der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte erhöht zu sein schien. Die statistische Analyse der Kohorten (Abb. 27B) verdeutlichte die signifikante Zunahme an CD5<sup>+</sup> B-Zellen in der S-Phase. Zudem zeigte sich ein G<sub>2</sub>/M-Arrest in der TCL1-Kohorte mit einem deutlich erhöhten Anteil an Zellen in dieser Phase des Zellzyklus.

Diese Ergebnisse deuten auf einen G<sub>2</sub>/M-Arrest in TCL1-Tieren hin, welcher durch den Verlust von NFAT2 aufgehoben wird und den Übergang in die S-Phase begünstigt.

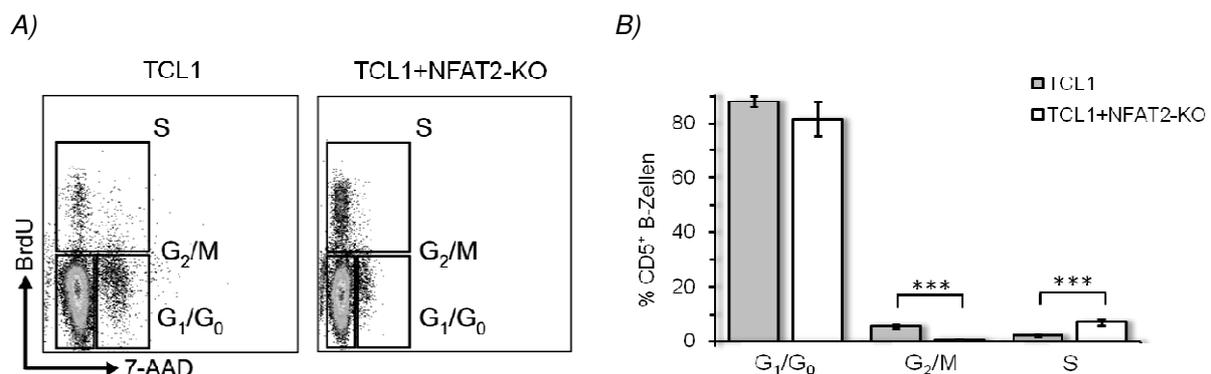


Abb. 27: NFAT2 reguliert G<sub>2</sub>/M-Arrest in CLL Zellen

Bei Versuchstieren im Alter von 20 Wochen wurde 24 h vor der Analyse 200  $\mu$ l BrdU-Lösung (10 mM) i.p. injiziert. Anschließend wurde das Blut retrobulbär gewonnen und durchflusszytometrisch untersucht. A) Exemplarisches Gatingschema der G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>, G<sub>2</sub>/M und S-Phasen im Zellzyklus. B) Statistische Auswertung der Zellzyklusphasen. Dargestellt ist der Anteil der CD5<sup>+</sup> B-Zellen im Blut. (n=5, \*\*\* p < 0,005).

### 3.2.5 Regulation der prognostischen Marker ZAP70 & CD38 durch NFAT2

Die Progression der CLL-Erkrankung ist unter anderem durch die beiden prognostischen Markern ZAP70 und CD38 charakterisiert. Die Expression dieser Marker auf CLL-Zellen korreliert mit einer schlechteren Prognose für die Patienten.

Um den Einfluss von NFAT2 auf diese Marker im TCL1-Modell zu untersuchen, wurden Tiere im Alter von 20 und 28 Wochen analysiert. Dafür wurden die Versuchstiere der beiden

Leukämie-Kohorten zu den angegebenen Zeitpunkten euthanasiert und die Zellen der Organe durchflusszytometrisch untersucht (Abb. 28:).

Die Analyse des Blutes ergab zu beiden untersuchten Zeitpunkten einen erhöhten Anteil an CD5<sup>+</sup> B-Zellen, die sowohl ZAP70 als auch CD38 auf der Oberfläche ko-exprimierten (6,7% vs. 34%; 12% vs. 53%).

In der Milz konnte im Alter von 20 Wochen eine erhöhte Population der ZAP70<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> B-Zellen in der TCL1-Kohorte detektiert werden (40,7% vs. 1,5%). Dieses Verhältnis kehrte sich allerdings im Alter von 28 Wochen um und der Anteil in der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte überwog deutlich (6% vs. 77%).

Eine Infiltration an doppelt-positiven CD5<sup>+</sup> B-Zellen konnte auch im Lymphknoten beider Kohorten verzeichnet werden. Im Alter von 20 Wochen war der prozentuale Anteil zwar noch sehr gering, allerdings bereits zu Gunsten der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte (0,8% vs. 2,8%). Diese Beobachtung verstärkte sich noch bei 28 Wochen alten Tieren (0,6% vs. 41,3%).

Bei der Untersuchung des Knochenmarkes der Tiere zeigten sich ähnlich Effekte wie zuvor in der Milz beobachtet. Zum Messzeitpunkt 20 Wochen war der Anteil an ZAP70<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> B-Zellen in der TCL1-Kohorte noch deutlich erhöht (40,2% vs. 2,7%). Auch hier änderte sich die Verteilung im Alter von 28 mit einer stark vergrößerten Population in den Tieren mit NFAT2-Deletion (2% vs. 56%).

### 3 Ergebnisse

#### 3.2 Die Bedeutung von NFAT2 in der CLL

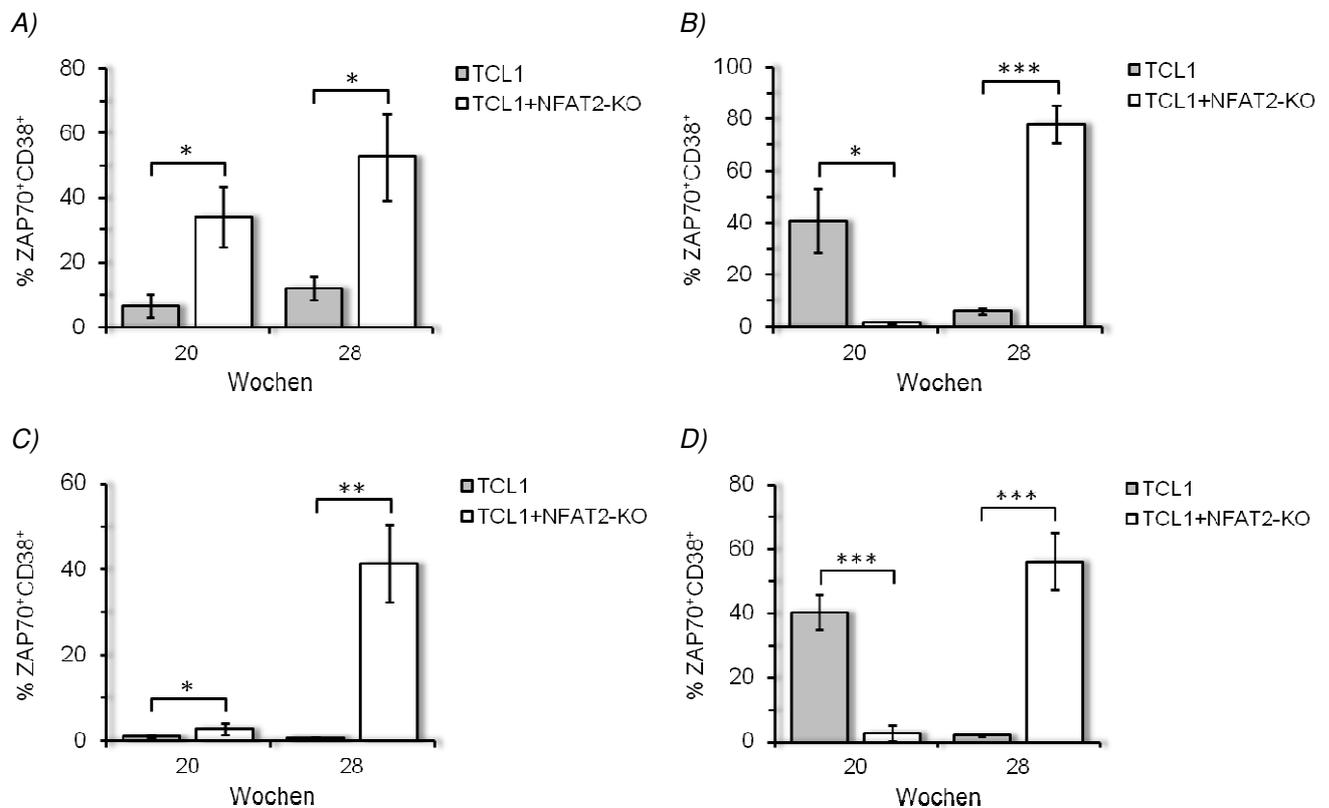


Abb. 28: Die Expression von ZAP70 & CD38 wird durch NFAT2 reguliert

Die Versuchstiere der beiden Leukämie-Kohorten wurden zu den angegebenen Zeitpunkten euthanasiert und die Organe präpariert. Die Zellen wurden isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist der Anteil an CD5<sup>+</sup> B-Zellen, die ZAP70 und CD38 exprimieren bezogen auf die gesamte B-Zell-Population im Blut (A), in der Milz (B), im Lymphknoten (C) und im Knochenmark (D) der Tiere (n=5, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,005).

#### 3.2.6 Genexpressionsanalysen im TCL1-Modell

Durch die Analyse der Rolle von NFAT2 auf die Progression der CLL konnten die phänotypischen Auswirkungen charakterisiert werden. Um auch einen Einblick in die zugrunde liegenden Mechanismen zu erhalten, wurde im Folgenden eine Genexpressionsanalyse mittels Microarrays durchgeführt. Dabei war vor allem von großem Interesse, welche Gene und Signalwege durch das Fehlen des Transkriptionsfaktors betroffen waren. Hierfür wurde die Milz von 3 Tieren der TCL1- und der TCL1+NFAT2-KO-Kohorten im Alter von 20 Wochen präpariert. Nach der Antikörperfärbung wurden die Zellen mit Hilfe des FACS Aria Sorters sortiert und die Fraktion der malignen CD5<sup>+</sup> B-Zellen gesammelt. Aus der mRNA dieser Zellen wurden eine Microarray-Analyse mit Affymetrix® Gene Chips durchgeführt. Ein schematischer Ablauf des Procedere ist in Abb. 29 dargestellt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.2 Die Bedeutung von NFAT2 in der CLL

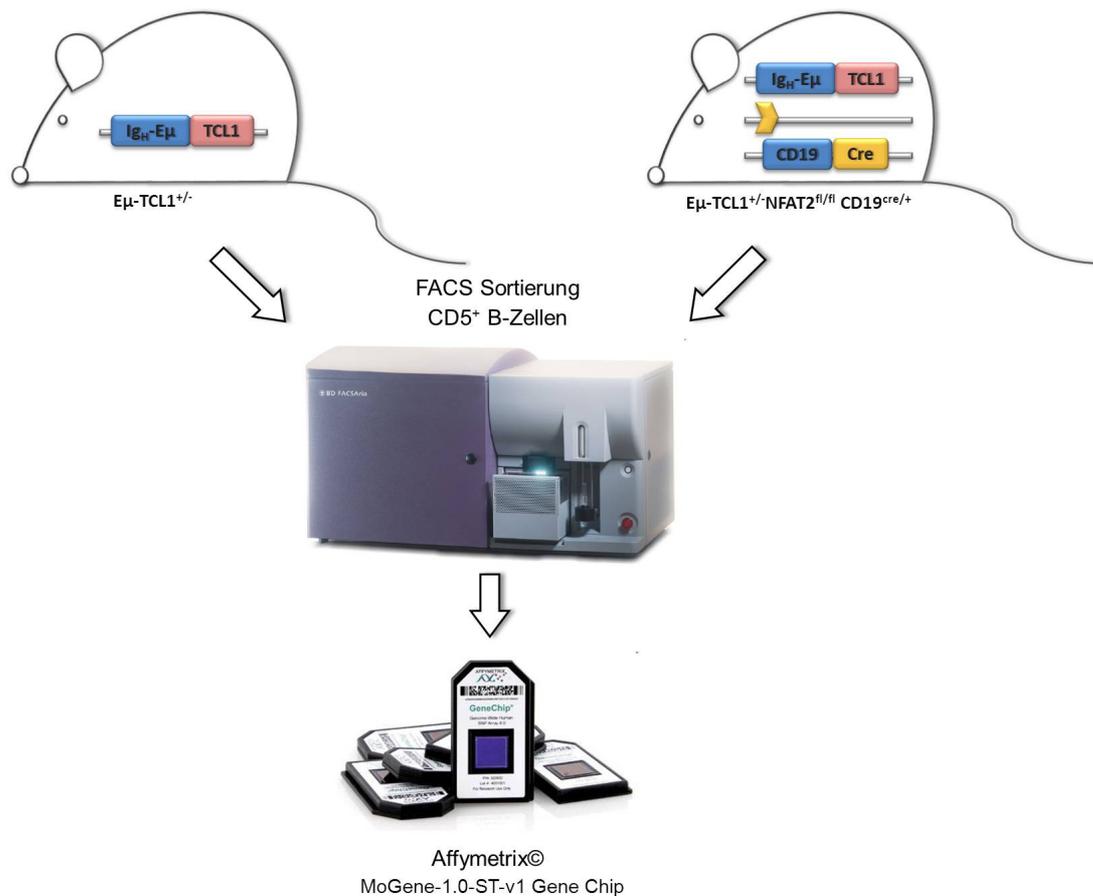


Abb. 29: Skizze des Microarray-Experiments

Jeweils 3 Tiere der TCL1- und der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte wurden im Alter von 20 Wochen euthanasiert und die Milz präpariert. Anschließend wurde mit Hilfe des BD Aria Zellsorters die CD5<sup>+</sup> B-Zellen sortiert. Nach der RNA-Isolation wurden die Proben in der Microarray Facility Tübingen mittels Affymetrix© Gene Chips analysiert.

Quelle Bilder: FACS Aria - [www.fli-leibniz.de/images/research/BD\\_Aria\\_Pic.jpg](http://www.fli-leibniz.de/images/research/BD_Aria_Pic.jpg); Gene Chips - [www.acsu.buffalo.edu/~ljhovind/images/AffyChip.jpg](http://www.acsu.buffalo.edu/~ljhovind/images/AffyChip.jpg) (abgerufen am 15.11.2012)

Die Daten der Gene Chips wurden durch die Microarray Facility Tübingen ausgewertet und eine Liste der signifikant regulierten Transkripte erstellt. Im Anhang (Tab. 6) ist eine Auflistung der zwanzig am stärksten negativ und positiv regulierten Gene aufgeführt. Insgesamt ergab die Analyse 201 signifikant regulierte Transkripte, welche für die weiteren Analysen als Datengrundlage verwendet wurden. Diese Daten wurden mit Hilfe der Ingenuity Plattform ausgewertet. Hier wurden die Transkripte in einer unüberwachten Analyse verschiedenen Signalwegen zugeordnet und eine Hitliste der am stärksten regulierten Signalwege erstellt. Dabei zeigte sich, dass vor allem Gene aus dem Zellzyklus aber auch des B-Zellrezeptorsignalweges betroffen waren. Die Clusteranalyse in Abb. 30 zeigt das Expressionsmuster der ermittelten Gene der beiden Signalwege. Jedes Kästchen stellt die

Expressionsstärke eines Gens im untersuchten Tier dar. Dabei sind die roten Signale herab- und die grünen Signale hoch-reguliert.

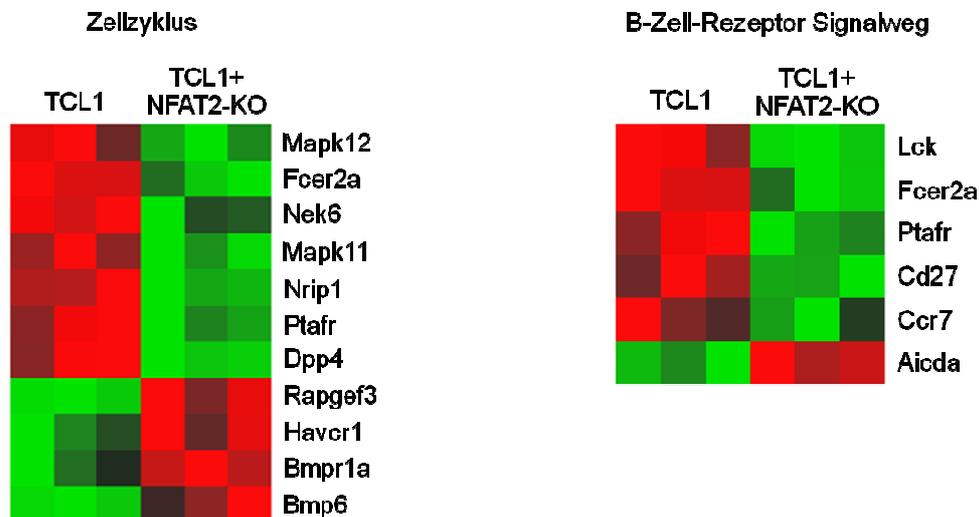


Abb. 30: Clusteranalyse der Microarray-Ergebnisse

Die Transkripte der Microarray-Experimente wurden mit Hilfe der Ingenuity Software in einer unüberwachten Analyse untersucht. Daraus erfolgte eine Zuordnung der verschiedenen Transkripte in die jeweiligen beteiligten Signalwege. Anschließend wurde mit den Fold change ( $\log_2$ )-Werten jeder Kohorte mit Hilfe des Statistikprogramms JMP eine Clusteranalyse durchgeführt. Dabei sind die einzelnen Werte in ihrer Expressionsstärke zueinander mit einem Farbcode versehen. Negativ-regulierte Werte wurden mit rot und positiv-regulierte mit grünen Feldern kodiert.

Die Tatsache, dass im  $\text{E}\mu$ -TCL1-Modell der NFAT2-Knockout vor allem Auswirkungen auf den Zellzyklus und die Apoptose hat, konnte bereits in den vorangegangenen Versuchen beobachtet werden (Abb. 26). Die zusätzlichen Hinweise auf Veränderungen in der Signalkaskade des B-Zellrezeptors warf die Frage nach einem Zusammenhang dieser Mechanismen auf. Ein Mechanismus, der sowohl bei der Proliferation als auch bei der Stimulation des B-Zellrezeptors eine wichtige Rolle spielt, ist neben der Aktivierung der B-Zelle der Mechanismus der Anergie. Im Stadium der Anergie ist die B-Zelle unempfindlich gegenüber äußeren Stimuli. Neuere Studien zeigen, dass dieser Mechanismus auch bei einer Subpopulation der CLL-Patienten auftritt<sup>77</sup>. Aufgrund des bisherigen Kenntnisstandes der Literatur wurden die Ergebnisse der Microarray-Analysen auf Anergie-assoziierte Gene untersucht. Es wurde ebenfalls eine Clusteranalyse durchgeführt (Abb. 31). Einige der dargestellten Gene wurden in der Literatur bereits als „induziert im anergischen Status“ beschrieben<sup>96,97</sup>. Um die Signifikanz der Microarray-Daten zu verifizieren, wurden zwei der Gene, *Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 1* (Pacsin1) und die *lymphocyte-specific protein tyrosine kinase* (Lck) mittels qRT-PCR untersucht. Dabei wurde die bereits isolierte RNA der Tiere eingesetzt, welche auch zur Microarray-Analyse verwendet wurde. Abb. 32 zeigt die Ergebnisse der qRT-PCR, welche die deutlich

### 3 Ergebnisse

#### 3.2 Die Bedeutung von NFAT2 in der CLL

verringerte Expression beider Gene im TCL1+NFAT2-KO verifiziert. Die in B-Zellen *ex vivo* verminderte Expression konnte für Lck auch auf Proteinebene bestätigt werden (Abb. 32).

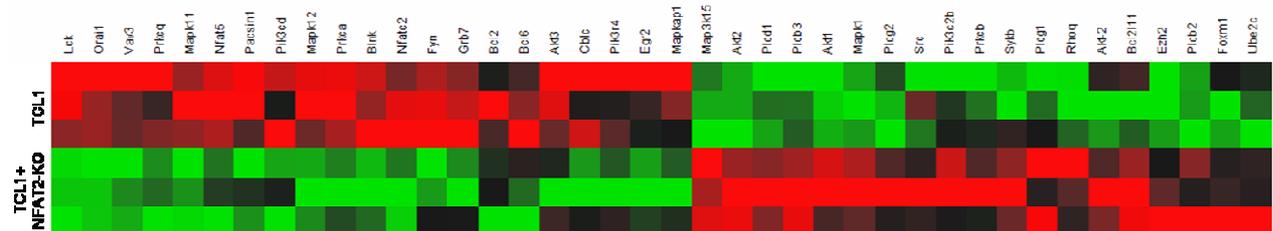


Abb. 31: Clusteranalyse Energie-assoziiertes Gene

Die regulierten Transkripte wurden mit Hilfe der Ingenuity Software und Literaturanalysen auf ihre Rolle bei der Vermittlung von Energie und B-Zellaktivierung untersucht. Mit den Fold change ( $\log_2$ )-Werten dieser Gene wurde mit Hilfe des Statistikprogramms JMP eine Clusteranalyse durchgeführt. Dabei sind die einzelnen Werte in ihrer Expressionsstärke zueinander mit einem Farbcode versehen. Negativregulierte Werte wurden mit rot und positivregulierte mit grünen Feldern kodiert.

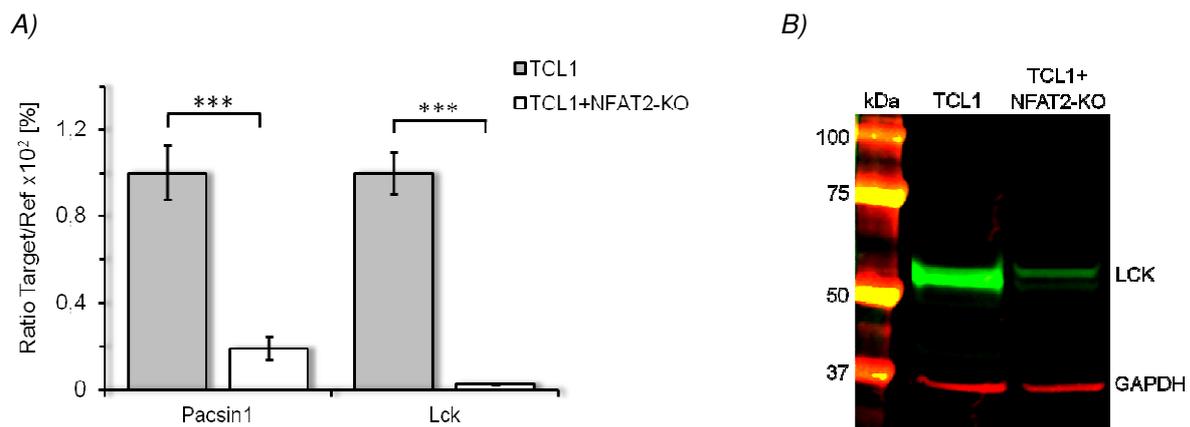


Abb. 32: NFAT2 reguliert die Expression der Energie-assoziierten Gene Lck und Pacsin1

A) Die RNA Proben der für die Microarray verwendeten Tiere jeder Kohorte wurden zur Analyse mittels qRT-PCR eingesetzt. Dargestellt ist die normalisierte Ratio der untersuchten Gene Pacsin1 und Lck bezogen auf das Referenzgen Aktin ( $n=3$ ,  $*** p < 0,005$ ). B) B-Zellen wurden aus den Splenozyten beider Kohorten über CD19 magnetische Beads isoliert und das Proteinextrakt (50  $\mu\text{g}$ ) im Western Blot eingesetzt.

#### 3.2.7 Genexpression nach B-Zellrezeptoraktivierung

Die Ergebnisse aus der Microarray-Studie ergaben bei der Clusteranalyse (Abb. 31) weitere Hinweise auf regulierte Gene, welche sowohl bei der B-Zellrezeptor-Aktivierung als auch der B-Zellenergie eine wichtige Rolle spielen. Daher wurden im Folgenden CLL-Zellen beider Leukämie-Genotypen isoliert und *ex vivo* bzw. nach 6 h Stimulation mit  $\alpha\text{IgM}$  untersucht. Mittels qRT-PCR wurden die Expression und die Induktion verschiedener relevanter Gene ermittelt.

### **3.2.7.1 Genexpressionsmuster der Anergie-assoziierten E3 Ligasen**

Das *Casitas B-lineage lymphoma (Cbl)* Gen kodiert für die E3 Ligasen, welche sowohl negativ als auch positiv regulierende Einflüsse auf die B-Zellaktivierung haben. Sie gehört zu den Syk-bindenden E3 Ligasen und wird für die Ubiquitinierung des B-Zellrezeptors benötigt<sup>98</sup>. In unstimulierten CLL-Zellen *ex vivo* ließ sich eine deutlich erhöhte Expression des *Cbl* Gens in der TCL1+NFAT2-KO Maus feststellen (

Abb. 33A). Nach Stimulation mit  $\alpha$ lgM wurde in TCL1 CLL-Zellen *Cbl* induziert und dadurch die Expression auf denselben Level wie in NFAT2-defizienten CLL-Zellen erhöht.

Im Gegensatz dazu zeigen CLL-Zellen der TCL1-Kohorte eine erhöhte Expression von *Cbl-b*, die durch BCR-Stimulation noch gesteigert wird. Das Level von *Cbl-b* in der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte blieb weitestgehend gleich (

Abb. 33B).

Beim *Ring finger protein 128 (Grail)* handelt es sich ebenfalls um eine E3 Ligase, die vor allem bei der Anergie-Induktion in T-Zellen eine essentielle Rolle spielt<sup>99,100</sup>. Hier ist bekannt, dass es bei anergischen T-Zellen zu einer Induktion des *Grail*-Transkriptes kommt. Über die Rolle von *Grail* in B-Zellen ist derzeit nur wenig bekannt. Die Ergebnisse in Abb. 33C zeigen allerdings eine deutlich erhöhte Expression von *Grail* in TCL1 CLL-Zellen. Nach Stimulation mit  $\alpha$ lgM kommt es in beiden Genotypen zu einer starken Induktion, wobei das Expressionsniveau in der TCL1-Kohorte stets niedriger blieb.

### 3 Ergebnisse

#### 3.2 Die Bedeutung von NFAT2 in der CLL

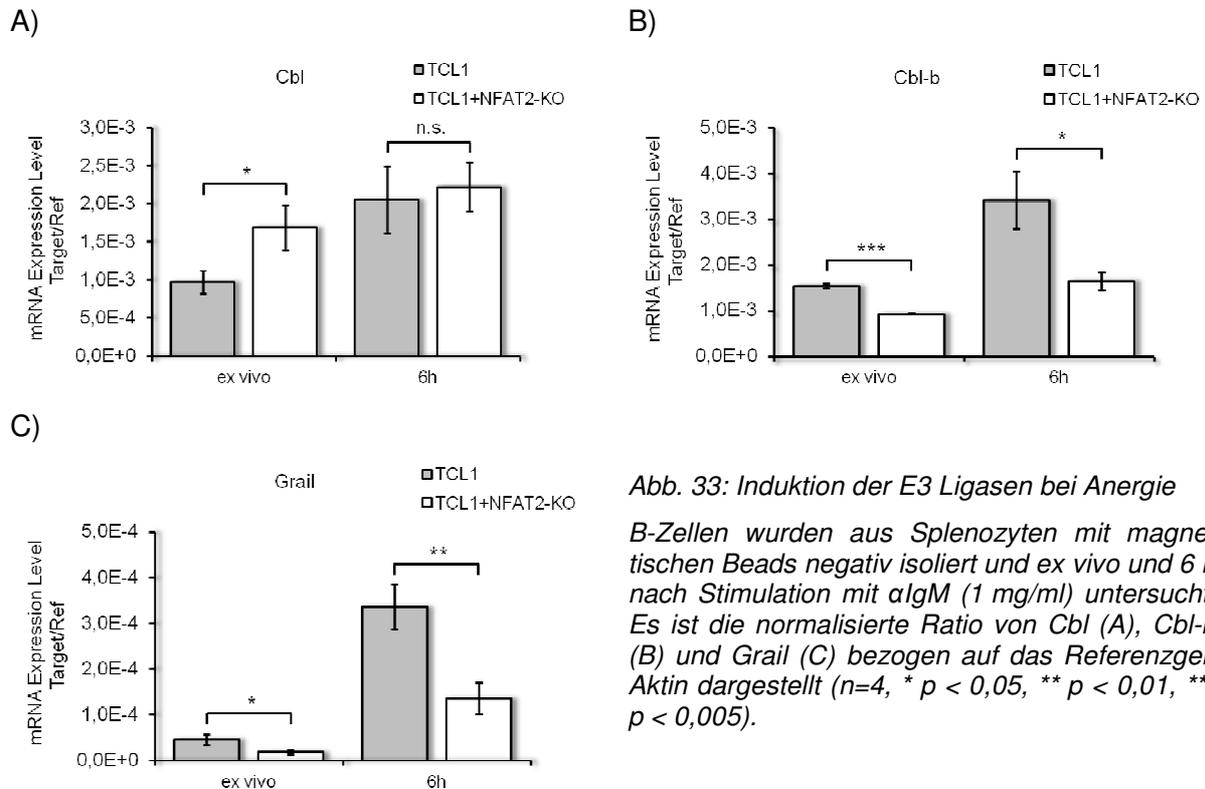


Abb. 33: Induktion der E3 Ligasen bei Anergie

B-Zellen wurden aus Splenozyten mit magnetischen Beads negativ isoliert und ex vivo und 6 h nach Stimulation mit algM (1 mg/ml) untersucht. Es ist die normalisierte Ratio von Cbl (A), Cbl-b (B) und Grail (C) bezogen auf das Referenzgen Aktin dargestellt (n=4, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,005).

#### 3.2.7.1 Anergie-assoziierte Genexpressionsmuster weiterer Gene

*Early growth response 2 (Egr2)* ist ein Transkriptionsfaktor, welcher durch das  $Ca^{2+}$ -Level reguliert wird und bei der T-Zellanergie benötigt wird<sup>101</sup>. Deutlich wird eine stark erhöhte Expression von *Egr2* in der TCL1-Kohorte, die unter BCR-Aktivierung noch deutlich gesteigert werden konnte. In ex vivo TCL1+NFAT2-KO CLL-Zellen war *Egr2* dagegen in nahezu allen Proben nicht nachweisbar und nur eine leichte Induktion durch algM-Stimulation messbar.

Die *PR domain containing 1 (Prdm1)* kodiert für den onkogenen Repressor *B lymphocyte-induced maturation protein-1 (Blimp1)*, der bei der Plasmazell-Differenzierung unerlässlich ist<sup>102</sup>. In TCL1 CLL-Zellen wurde ex vivo eine niedrigere Expression als in der NFAT2-defizienten Kohorte ermittelt. Bei Induktion des BCRs steigerte sich diese in beiden Gruppen (Abb. 34B).

Die Expression von *Pacsin1* wurde zusätzlich zur Microarray-Analyse ebenfalls noch einmal in unabhängigen Experimenten verifiziert. Es zeigte sich sowohl direkt nach Isolation als auch 6 h nach Stimulation mit algM eine stark erhöhte Expression von *Pacsin1* in der TCL1-Kohorte im Vergleich zur NFAT2-Knockout Gruppe (Abb. 34C).

Die Gene Neurogranin (*Nrgn*) und das *Purkinje cell protein 4* (*Pcp4*) wurden ursprünglich in Neuronen charakterisiert. Beide sind durch ihre Bindung an Calmodulin an der Regulation des Ca<sup>2+</sup>-Signalweg beteiligt<sup>103,104</sup>. Es wurde *ex vivo* sowohl eine erhöhte Expression von *Nrgn* als auch von *Pcp4* in der TCL1-Kohorte detektiert. Durch Stimulation des BCRs wurde die Expression beider Gene induziert und war im Vergleich zur TCL1+NFAT2-KO-Kohorte stark erhöht (Abb. 34D & E).

Die Tyrosinkinase *Lck* wurde bereits im Zusammenspiel mit Anergie beschrieben<sup>96</sup>. Die mittels qRT-PCR bestimmte Expression von *Lck* zeigte sich bei *ex vivo* untersuchten CLL-Zellen der TCL1-Kohorte deutlich erhöht (Abb. 34F). Durch die extrazelluläre Stimulation mit  $\alpha$ lgM kommt es in der TCL1-Kohorte zu einer starken Induktion des *Lck*-Transkriptes, während das Expressionsniveau in der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte konstant blieb. Die B-Zellrezeptoraktivierung führt im Falle des NFAT2-KO nicht zu einer Aktivierung von *Lck*.

### 3 Ergebnisse

#### 3.2 Die Bedeutung von NFAT2 in der CLL

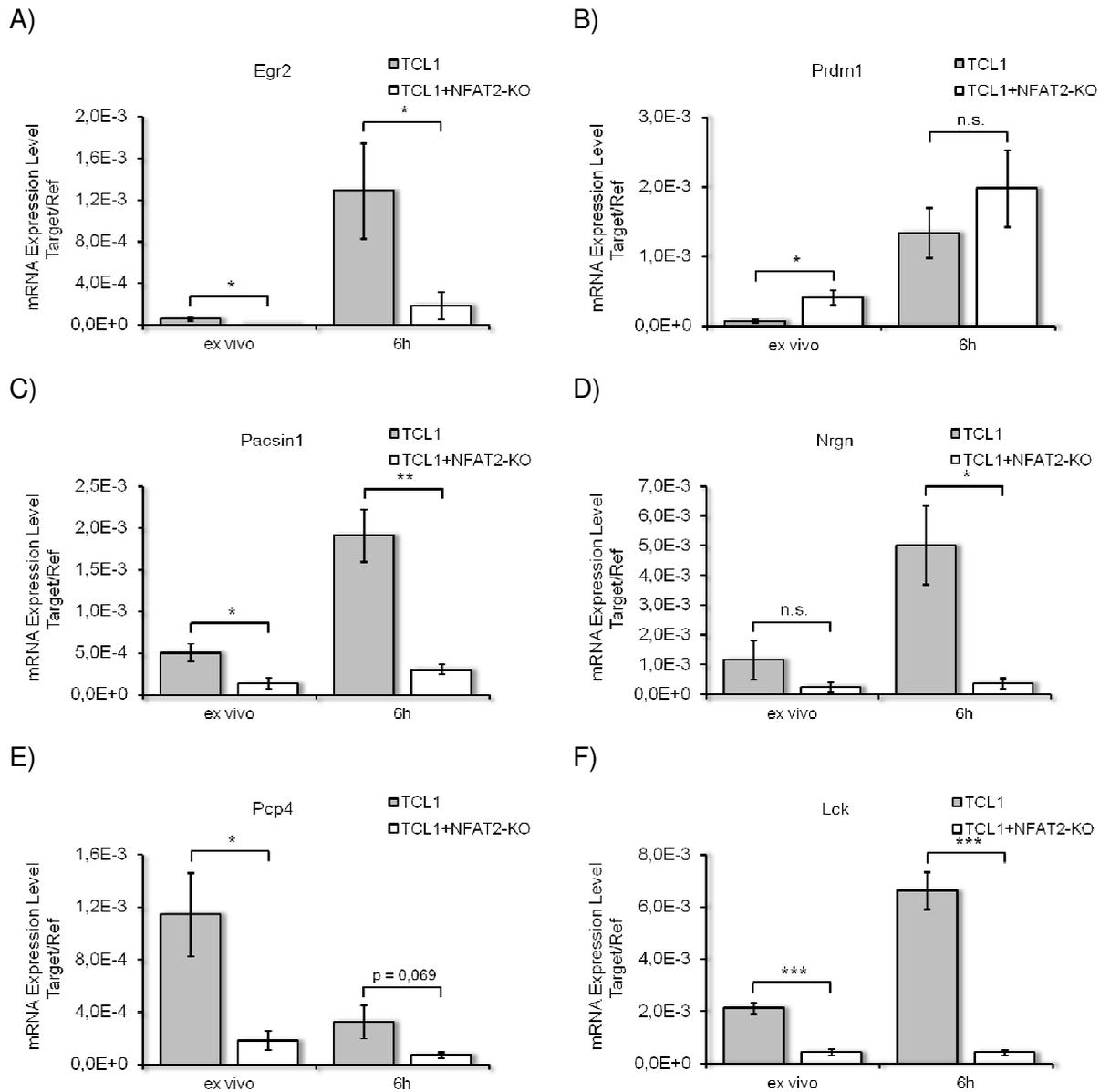


Abb. 34: Überexpression energie-assoziiertes Gene in TCL1 CLL-Zellen

B-Zellen wurden aus Splenozyten mit magnetischen Beads negativ isoliert und ex vivo und 6 h nach Stimulation mit *algM* (1 mg/ml) untersucht. Es ist die normalisierte Ratio der untersuchten Gene bezogen auf das Referenzgen Aktin dargestellt (n=4, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,005).

#### 3.2.7.2 Expression der BCR Gene

Die Phospholipase C  $\gamma 2$  (Plc $\gamma 2$ ) wird durch Ca<sup>2+</sup>-Mobilisation aktiviert<sup>105</sup> und zeigt ex vivo ein gleich hohes mRNA-Level in beiden Leukämie-Kohorten (Abb. 35A). 6h nach Stimulation mit *algM* kommt es nur in der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte zu einer starken Induktion von *Plc $\gamma 2$* .

Der Zink-Finger Transkriptionsfaktor B-cell lymphoma 6 protein (Bcl6) ist ein onkogener Repressor<sup>106</sup>, der vor allem beim Diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom (DLBCL)

beschrieben ist. Die Aktivierung des BCRs reguliert die Expression von *Bcl6* unter anderem durch den MAPK/ERK-Signalweg. *Ex vivo* ist das generelle Expressionsniveau von *Bcl6* in beiden Leukämie-Kohorten niedriger, wobei die TCL1-Kohorte ein deutlich erhöhtes Niveau aufwies. Nach 6 h Stimulation mit  $\alpha$ lgM wird *Bcl6* induziert. Allerdings verblieb auch hier das Transkriptionslevel in der TCL1-Kohorte auf einem signifikant erhöhten Niveau.

Bei der Aktivierung des B-Zellrezeptors ist eine Vielzahl weiterer Gene involviert. *Vav3* beispielsweise reguliert die B-Zellaktivierung indem es die Produktion von PIP<sub>3</sub> und damit auch den Ca<sup>2+</sup>-Flux fördert<sup>107</sup>. Die CLL-Zellen der TCL1-Kohorte zeigten in der qRT-PCR Analyse *ex vivo* eine signifikant höhere Expression von *Vav3*, die bei  $\alpha$ lgM-Stimulation noch weiter anstieg. Währenddessen blieb die Expression in der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte auf einem gleichbleibenden niedrigen Niveau.

Einen weiteren Part des B-Zellsignalwegs übernimmt das Ubiquitin-konjugierende Enzym E2 H (*Ube2h*). Es ubiquitiniert nach BCR-Aktivierung unter anderem den B-Zellrezeptor selbst, was zu Internalisierung und damit zur Dämpfung des Signals führt<sup>108</sup>. Ohne Rezeptorstimulation *ex vivo* wird *Ube2h* in beiden Leukämie-Kohorten nur schwach exprimiert. Nach Aktivierung mit  $\alpha$ lgM wird die Genexpression in der TCL1-Kohorte stark induziert, im TCL1+NFAT2-KO hingegen nicht.

Die *Activation-induced cytidine deaminase/AID* (*Aicda*) desaminiert verschiedene BCR-Signalwegs-relevante Loci und korreliert unter anderem mit einer schlechten Prognose der CLL<sup>109,110</sup>. Die Expression der *Aicda* war nur sehr niedrig in CLL-Zellen der TCL1-Kohorte. Dies war unabhängig von der BCR-Stimulation. Die TCL1+NFAT2-KO-Kohorte hingegen zeigte ein deutlich erhöhtes Niveau an *Aicda*-Transkript *ex vivo* und konnte durch  $\alpha$ lgM noch gesteigert werden. Dabei war die Expression zwischen den untersuchten Tieren nicht immer einheitlich (Abb. 35E).

Die *polyU-specific endonuclease* (*EndoU*) ist eine Endonuklease die beim "Activation Induced Cell Death" (AICD) nach BCR-Stimulation induziert wird<sup>111</sup>. Die Expression von *EndoU* wurde in beiden Leukämie-Kohorten durch  $\alpha$ lgM-Stimulation nur mäßig beeinflusst. Allerdings zeigte sich in der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte eine stark erhöhtes Level an *EndoU* im Vergleich zur TCL1-Gruppe (Abb. 35F).

### 3 Ergebnisse

#### 3.2 Die Bedeutung von NFAT2 in der CLL

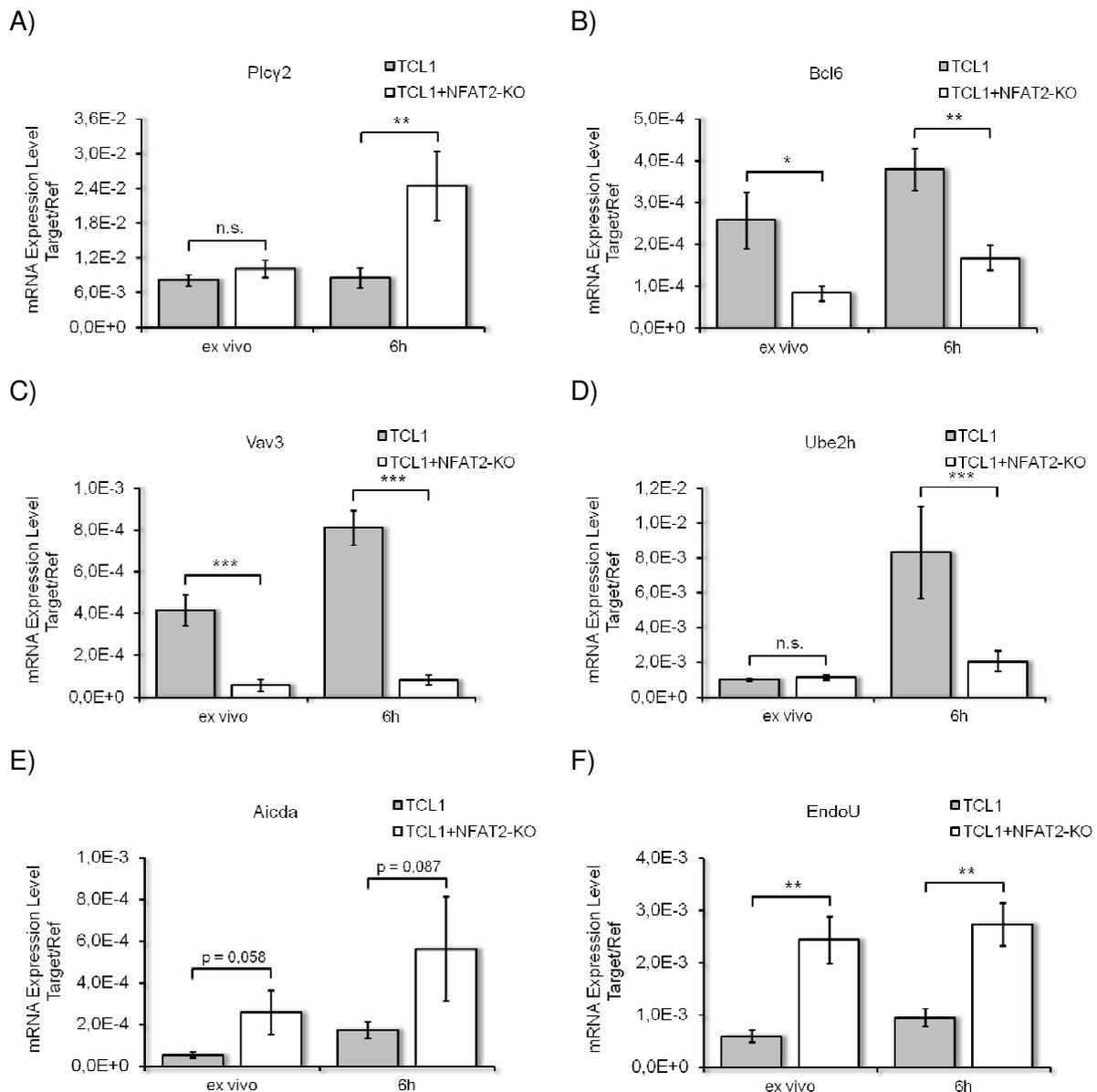


Abb. 35: NFAT2 reguliert Gene des B-Zell-Rezeptorsignalwegs

B-Zellen wurden aus Splenozyten mit magnetischen Beads negativ isoliert und ex vivo und 6 h nach Stimulation mit algM (1 mg/ml) untersucht. Es ist die normalisierte Ratio der untersuchten Gene bezogen auf das Referenzgen Aktin dargestellt (n=4, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,005).

#### 3.2.8 Ca<sup>2+</sup>-Mobilisation mit INOD1

Die Ergebnisse aus 3.2.7 führten zur Erkenntnis, dass die Signalweiterleitung in den CLL-Zellen durch den Verlust von NFAT2 deutlich verändert ist. Zwar konnte durch die Änderung der Transkriptionslevel noch keine konkrete Aussage über die Aktivierung und die evtl. damit verbundene Proliferation getroffen werden. Allerdings zeigte sich in der TCL1-Kohorte eine Induktion Anergie-assoziiierter Gene wie *Grail*, *Lck* und *Vav3* nach algM-Stimulation. Eine der aussagekräftigsten Methoden, die Reaktivität der B-Zellen zu messen, ist die

Bestimmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisation nach Rezeptorstimulation. Nach Rezeptoraktivierung kommt es in einer gesunden B-Zelle zum  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom ins Zytoplasma, wodurch die Signalweiterleitung gesteuert wird. Reagiert eine B-Zelle nach BCR-Stimulation nicht mit einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, spricht man von einem anergischem Zustand.

Im folgenden Versuch wurde die Fähigkeit der B-Zellen zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisation analysiert. Dafür wurden die B-Zellen von WT-Tieren und die CLL-Zellen der beiden Leukämie-Kohorten im Alter von 5 Monaten negativ isoliert. Anschließend wurden die Zellen mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -reaktiven Farbstoff INDO1-AM beladen und extrazellulär mit Fluoreszenz-Antikörpern markiert. Vor der Messung am LSR II wurden die Zellen in absolut  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Ringer Lösung gehalten. Für die Auswertung wurden in allen Kohorten zwischen  $\text{CD5}^+$  und  $\text{CD5}^-$  B-Zellen unterschieden.

Das basale  $\text{Ca}^{2+}$ -Level der  $\text{CD5}^+$  B-Zellen wurde für 60 sec detektiert (Abb. 36A). Hier zeigte sich ein gleichmäßiges  $\text{Ca}^{2+}$ -Level in allen drei Tieren. Darauf folgte die Rezeptorstimulation mit  $\alpha\text{IgM}$ . Es kam in den WT-Tieren zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom ins Zytoplasma, welches aus den intrazellulären Speichern des endoplasmatischen Retikulums freigesetzt wurde. Beim  $\text{TCL1+N FAT2-KO}$ -Tier war der  $\text{Ca}^{2+}$ -Flux deutlich höher als bei den WT-Zellen und stieg auch etwas schneller an. In der  $\text{TCL1}$ -Kohorte hingegen führte die Rezeptorstimulation zu nahezu keinem messbaren  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom. Durch die Zugabe von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  in die Lösung konnte zusätzlich der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch die geöffneten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle gemessen werden. Aber auch hier ließ sich bei der  $\text{TCL1}$ -Kohorte so gut wie keine  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisation messen. Bei den  $\text{CD5}^+$  WT B-Zellen und den CLL-Zellen der  $\text{TCL1+N FAT2-KO}$ -Kohorte konnte dagegen ein extrazellulärer Einstrom des zugegebenen  $\text{Ca}^{2+}$  detektiert werden, der sich in beiden Kohorten ähnlich hoch darstellte. Die Stimulation mit dem Ionophor Ionomycin zeigte als Kontrolle den maximal möglichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Flux in den Zellen. Hier zeigte sich, dass sowohl die WT B-Zellen als auch die beiden CLL-Zelltypen über eine ähnliche Anzahl an  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen verfügen, die durch Öffnen zu einem massiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zellen führten.

Überraschenderweise stellte sich die Reaktion der  $\text{CD5}^-$  B-Zellen auf Rezeptorstimulation gänzlich anders dar (Abb. 36B). Hier ließ sich bei den  $\text{CD5}^-$  B-Zellen aller drei Gruppen eine vergleichbare  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisation detektieren. Die Zellen reagierten nach Rezeptorstimulation mit  $\alpha\text{IgM}$  mit einem ähnlich hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, welcher bei Zugabe von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  noch weiter anstieg.

In einem Kontrolleexperiment (Abb. 36C) wurde zu den CLL-Zellen beider Kohorten (ohne vorherige Stimulation des BCRs mit  $\alpha\text{IgM}$ ) extrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  zugegeben. Dies sollte sicherstellen, dass der vorher detektierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Flux tatsächlich durch die Rezeptoraktivierung

### 3 Ergebnisse

#### 3.2 Die Bedeutung von NFAT2 in der CLL

---

bedingt wurde. Es kam hier wie erwartet zu keinem  $\text{Ca}^{2+}$ -Flux. Erst nach Gabe von Ionomycin öffneten sich die Ionenkanäle und ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom wurde detektiert.

Während die gesunden WT B-Zellen eine normale  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisation aufwiesen, zeigten auch die  $\text{CD5}^-$  B-Zellen der Leukämie-Tiere, welche dem nicht-malignen Phänotyp entsprechen, ebenfalls eine normale Rezeptorstimulation. Bei den  $\text{CD5}^+$  B-Zellen hingegen zeigte die TCL1-Kohorte nahezu keine Mobilisation des  $\text{Ca}^{2+}$ , wohingegen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisation in der TCL1-NFAT2-KO Kohorte deutlich stärker war. Sie überstieg sogar das  $\text{Ca}^{2+}$ -Level der gesunden  $\text{CD5}^+$  WT B-Zellen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass NFAT2 zur Induktion bzw. Erhaltung der Anergie essentiell ist. Der Verlust von NFAT2 führt zu einem hochreaktiven Phänotyp.

### 3 Ergebnisse

#### 3.2 Die Bedeutung von NFAT2 in der CLL

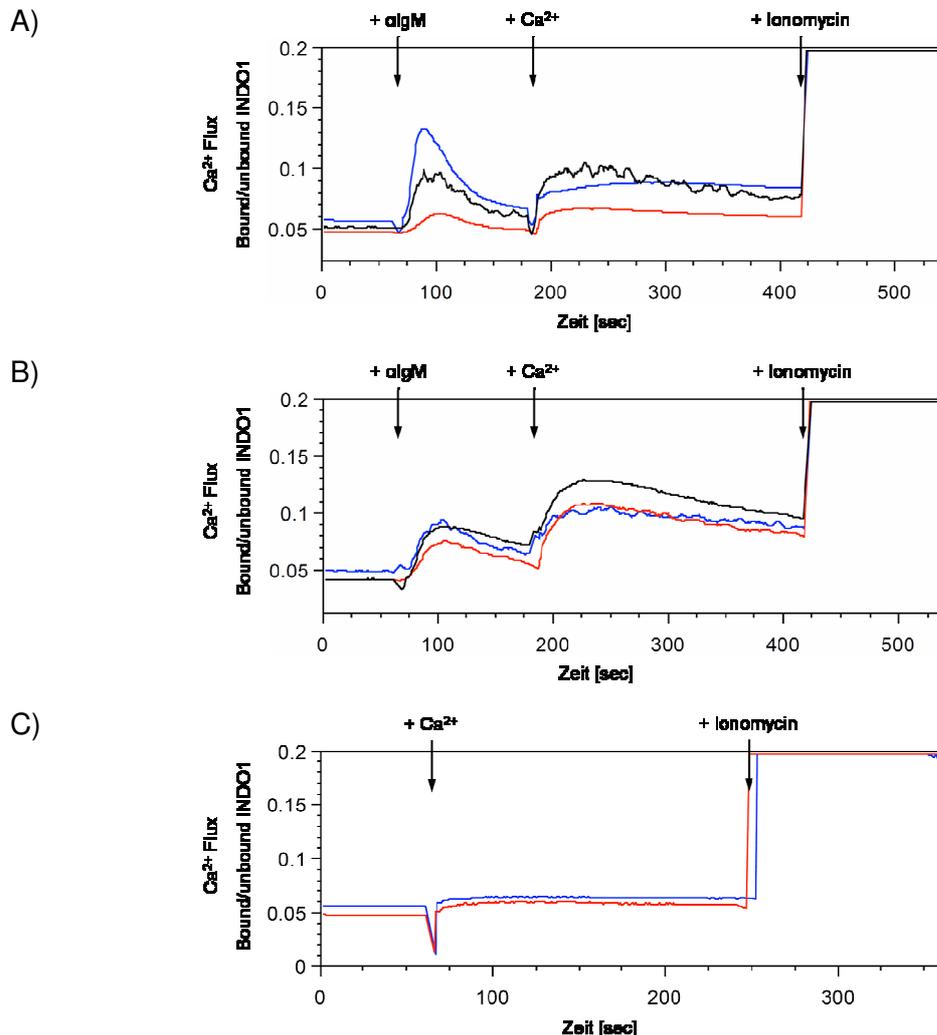


Abb. 36: NFAT2 induziert Anergie in CLL-Zellen

B-Zellen aus WT, TCL1 und TCL1+NFAT2-KO Tieren wurden mit Hilfe von magnetischen Beads negativ isoliert. Nach der Beladung mit INDO1 und einer Extrazellulär-Färbung wurden die Zellen in Ca<sup>2+</sup>-freiem Medium (0 mM Ringer) am LSR II analysiert. Das basale Ca<sup>2+</sup>-Level wurde für 60 sec detektiert. Anschließend erfolgte die BCR-Stimulation mit 10 mg/ml algM und die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Mobilisation wurde bestimmt. Nach 120 sec wurde 4 mM Ringer Lösung zugeben und der extrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Flux detektiert. Die Stimulation mit Ionomycin 10 µM erfolgte nach 240 sec weiterer Messzeit. A) Ergebnisse der Ca<sup>2+</sup>-Mobilisation der CD5<sup>+</sup> B-Zellen. B) Ergebnisse der Ca<sup>2+</sup>-Mobilisation der CD5<sup>+</sup> B-Zellen. C) Ca<sup>2+</sup>-Mobilisation ohne Rezeptorstimulation mit algM als Negativkontrolle. Das basale Ca<sup>2+</sup>-Level wurde für 60 sec detektiert und anschließend 4 mM Ringer Lösung zugeben. Nach 180 sec Messzeit erfolgte die Stimulation mit 10 µM Ionomycin.

#### 3.2.9 In vitro Proliferation nach B-Zellrezeptorstimulation

Nachdem die Ergebnisse der Ca<sup>2+</sup>-Messungen eine veränderte BCR-Antwort in CD5<sup>+</sup> B-Zellen aufwiesen, die in der TCL1-Kohorte der Definition eines anergischen Phänotyps entspricht, wurde die Reaktion auf BCR-Stimulation über einen längeren Zeitraum *in vitro* untersucht. Dafür wurden ebenfalls B-Zellen von WT-Tieren und CD5<sup>+</sup> CLL-Zellen beider

Leukämie-Kohorten isoliert. Diese wurden dann über 96 h kultiviert und mittels zellbasierter Proliferationsassays untersucht. Hierfür wurden die Zellen zu den verschiedenen Messzeitpunkten mit dem CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega) analysiert. Bei dieser Methode werden die Zellen mit der Detektionsreagenz versetzt, was zur Lyse der Zellen führte. Das Reagenz setzte proportional zum vorhandenen ATP-Gehalt des Lysates eine Luciferase-Reaktion in Gang. Die Intensität des entstandenen Lumineszenz-Signals wurde dann im GloMax Messgerät detektiert. Um den Effekt der BCR-Aktivierung auf die Proliferation zu untersuchen, wurden die Zellen der drei untersuchten Kohorten entweder mit  $\alpha$ IgM, LPS oder unbehandelt inkubiert.

In einem ersten Experiment wurde die Durchführung mit WT B-Zellen etabliert. Dafür wurden der ATP-Gehalt der Zellen zum Zeitpunkt 0 h bestimmt und als Ausgangswert für 100% lebende Zellen verwendet. Nach 24 h in Kultur waren sowohl bei unbehandelten als auch bei den mit  $\alpha$ IgM behandelten Zellen noch ~60% der B-Zellen am Leben. Die verminderte Viabilität ist vor allem durch die Isolationsprozedur zu erklären, bei der meist ein Teil der Zellen abstirbt. Lediglich die mit LPS behandelte Positivkontrolle generierte ausreichende Überlebenssignale, sodass der Anteil an lebenden Zellen hier bei 147% lag. Bei weiterer Kultivierung über 72 h wird deutlich, dass B-Zellen ohne äußeren Stimulus absterben (9%). Durch die Stimulation des B-Zellrezeptors mit  $\alpha$ IgM können die B-Zellen über 72 h kultiviert werden und es kam zu einer leichten Vermehrung der Zellen (101%). Die Kontrolle mit LPS führte zur massiven Expansion der Zellen, mit über 2500% lebenden Zellen nach 72 h Kultur. Diese Ergebnisse zeigen, dass WT B-Zellen in Kultur durch BCR-Stimulation expandiert werden können und dass LPS-Stimulation zur massiven Proliferation führt.

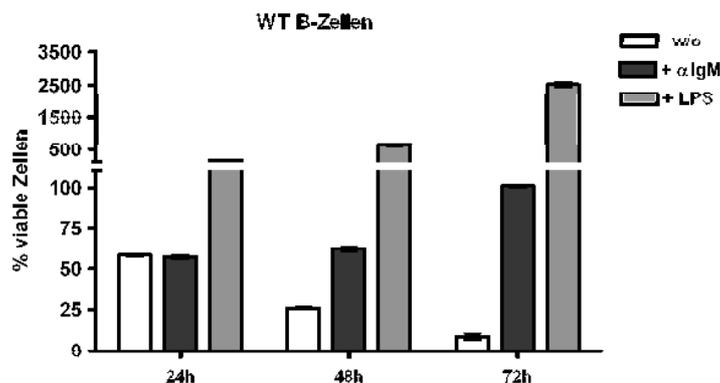


Abb. 37: B-Zellen expandieren nach BCR-Stimulation in vitro

B-Zellen von WT-Tieren wurden mittels magnetischer Beads negativ isoliert. In weiße 96-well Flachbodenplatten wurde 2000 Zellen/well ausgesät und entweder unbehandelt oder mit 10 mg/ml  $\alpha$ IgM oder 10 mg/ml LPS inkubiert. Nach 0 h, 24 h, 48 h und 72 h wurden die Zellen mit CTG-Reagenz versetzt und die Lumineszenz im GloMax-Messgerät analysiert. Die detektierten Signale wurden auf den 0 h Wert normalisiert und der prozentuale Anteil an viablen Zellen berechnet (n=3).

Um ebenfalls Erkenntnisse über die BCR-induzierte Proliferation der CLL-Zellen zu erhalten, wurde die CD5<sup>+</sup> CLL-Zellen aus den TCL1- und der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte isoliert und ebenfalls *in vitro* über 72 h kultiviert.

Betrachtet man die Viabilität der CLL-Zellen nach 24 h in Kultur ohne externen Stimulus (Abb. 38A) fiel auf, dass im Vergleich zu WT B-Zellen deutlich weniger Zellen überlebten. Dies liegt unter anderem an der doppelten Isolationsprozedur begründet, welche die Zellen erheblich mehr beeinträchtigt. Im Vergleich zu den CLL-Zellen der TCL1 Kohorte zeigen NFAT2-defiziente Zellen schon nach 24 h eine verminderte Viabilität (29% vs. 11%). Über 72 h ohne Stimulus sterben die CLL-Zellen beider Kohorte ab. Wobei die CLL-Zellen der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte eine deutlich geringere Viabilität aufwiesen (4% vs. 2%).

Die BCR-Stimulation mit  $\alpha$ gM (Abb. 38B) hatte bei CLL-Zellen der TCL1-Kohorte in den ersten 48 h keinen Effekt. Die Zellen reagierten nicht auf den äußeren Stimulus mit nur 4% viablen Zellen nach 48 h. Erst nach 72 h zeigte die Stimulation mit  $\alpha$ gM einen proliferativen Effekt und die Viabilität steigerte sich leicht auf 7%. Bei der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte hingegen kam es durch die BCR-Stimulation mit  $\alpha$ gM zu einem erhöhtem Absterben der Zellen über 72 h (2% nach 48 h und 1% nach 72 h). Es stellte sich hier keine Proliferation ein.

Die Positivkontrolle unter LPS-Behandlung (Abb. 38C) belegte, dass nicht nur gesunden WT B-Zellen sondern auch die malignen CLL-Zellen beider Kohorten durch die extrazelluläre Stimulation mit LPS expandiert werden konnten. Hier ließen sich über 72 h die NFAT2-defizienten CLL-Zellen etwas besser kultivieren als die der TCL1-Kohorte (196% vs. 243%). Diese Ergebnisse zeigten, dass auch CLL-Zellen ohne Stimulus *in vitro* nicht proliferieren, sondern sich der Zelltod einstellt. Unter Behandlung mit LPS konnten die CLL-Zellen beider Kohorten zur Proliferation stimuliert werden. Die TCL1 CLL-Zellen reagierten anfangs (48 h) überhaupt nicht auf BCR-Stimulation mit  $\alpha$ gM, wobei sich aber nach 72 h eine proliferative Antwort zeigte. Die  $\alpha$ gM-Stimulation in NFAT2-defizienten CLL-Zellen induzierte den Zelltod deutlich schneller als in der unbehandelten Kontrollgruppe.

### 3 Ergebnisse

#### 3.2 Die Bedeutung von NFAT2 in der CLL

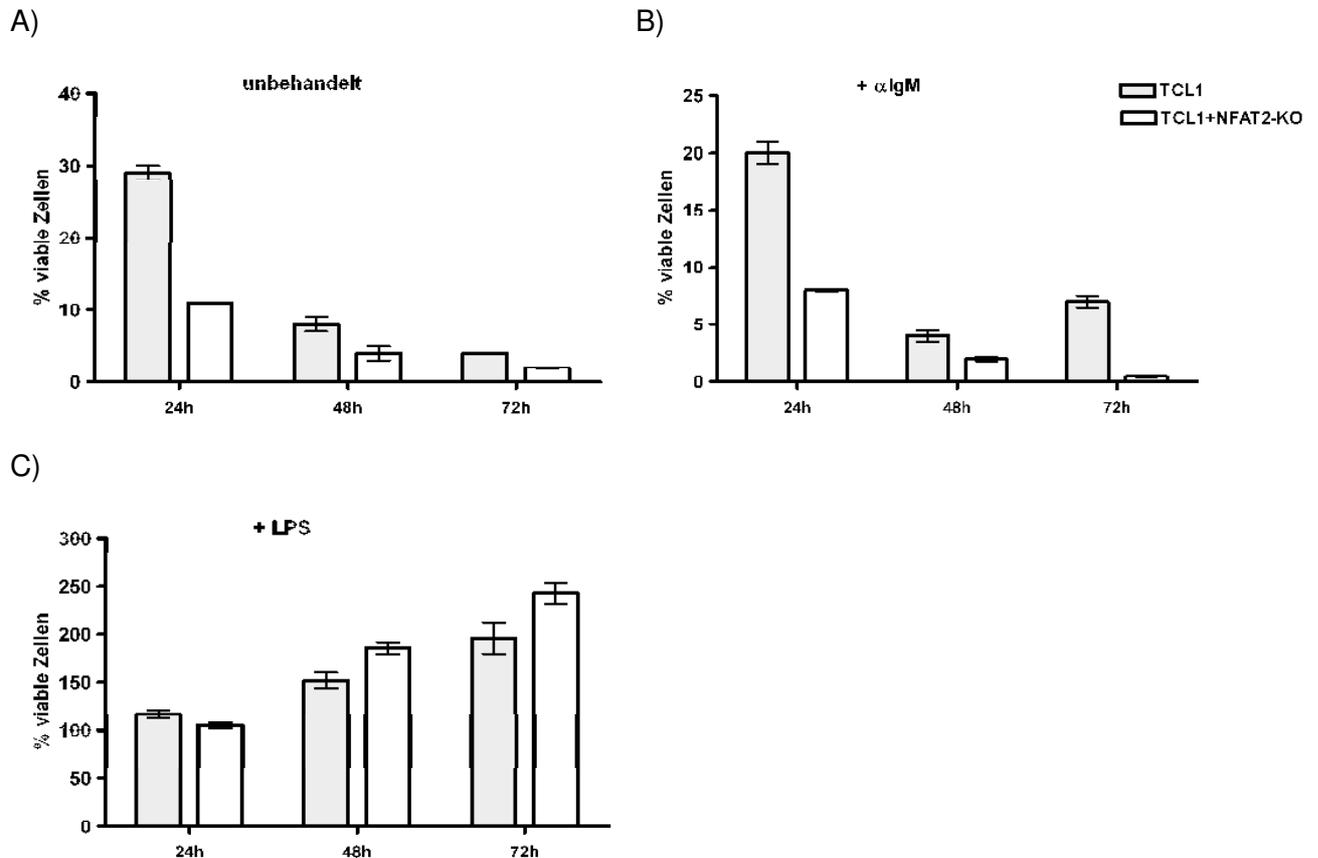


Abb. 38: *In vitro* Behandlung mit  $\alpha$ IgM reduziert die Viabilität bei NFAT2-defizienten CLL Zellen

CLL-Zellen der TCL1 und der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte wurden mittels magnetischer Beads negativ isoliert und ein weiteres Mal auf die CD5-Expression selektiert. In weiße 96-well Flachbodenplatten wurde 2000 Zellen/well ausgesät und entweder unbehandelt (A) oder mit 10 mg/ml  $\alpha$ IgM (B) oder 10 mg/ml LPS (C) inkubiert. Nach 0 h, 24 h, 48 h und 72 h wurden die Zellen mit CTG-Reagenz versetzt und die Lumineszenz im GloMax-Messgerät analysiert. Die detektierten Signale wurden auf den 0 h Werte normalisiert und der prozentuale Anteil an viablen Zellen berechnet (n=3).

Die Ergebnisse der zellbasierten Analyse gaben über die Bestimmung des ATP-Gehaltes, Rückschlüsse auf den Anteil an viablen Zellen. Allerdings konnte mit dieser Methode keine direkten Rückschlüsse auf die Proliferation oder Apoptose der Zellen gezogen werden. Um dies parallel zu untersuchen, wurden die B-Zellen und die CLL-Zellen beider Leukämie-Kohorten in 96-well-Rundbodenplatten ausgesät und über 72 h unbehandelt oder mit  $\alpha$ IgM oder LPS kultiviert. Zu Beginn und nach 72 h wurden die Zellen fotografiert und die Aufnahmen in Abb. 39 dargestellt.

Die Zellen der WT- und der Leukämie-Kohorten zeigten zu Beginn keine Auffälligkeiten und setzten sich im Rundboden ab. Bei den WT B-Zellen wurden aufgrund der hohen Ausbeute nach der Isolation etwas mehr Zellen ausgesät, was aber für die weiteren Untersuchungen

keine Bedeutung hatte. Die TCL1+NFAT2-KO-Zellen wurden, wie die CLL-Zellen der TCL1-Kohorte auch in geringerer Anzahl eingesetzt.

Nach 72 h in Kultur ohne Behandlung befanden sich die Zellen der drei Kohorten im Ruhezustand am Boden der Platte. Die dunklen Areale wurden bedingt durch den hohen Anteil an toten Zellen, welche das mikroskopische Durchlicht nicht mehr reflektieren konnten. Der Anteil an toten Zellen lässt sich allerdings mit dieser Methode nicht exakt bestimmen, trotzdem deuteten die dunklen Zellen auf eine sehr hohe Anzahl an toten Zellen hin.

Unter Behandlung mit  $\alpha$ gM ließen sich bei den WT B-Zellen große Proliferationscluster erkennen. Auch bei den CD5<sup>+</sup> TCL1 CLL-Zellen waren vereinzelt sehr kleine Proliferationscluster zu beobachten. Bei den CD5<sup>+</sup> CLL-Zellen der TCL1+NFAT2-KO-Tiere konnte keine Clusterbildung beobachtet werden. Der Anteil an dunklen toten Zellen war auch unter  $\alpha$ gM Stimulation relativ hoch.

Die Stimulation mit LPS führte bei allen drei Gruppen zu einer Expansion der Zellen, wobei die WT B-Zellen am stärksten expandierten und riesige Cluster bildeten. Generell fiel auf, dass die Proliferationsherde aller drei Gruppen unter LPS-Behandlung deutlich größer und nicht so klar abgegrenzt waren wie durch  $\alpha$ gM-Stimulation.

Die Aufnahmen der *in vitro*-Kulturen bestätigen die Ergebnisse der ATP-Messungen und zeigen aber auch, dass TCL1 CLL-Zellen nach 72 h in der Lage sind, unter  $\alpha$ gM-Stimulation mit einer leichten Proliferation zu reagieren.

### 3 Ergebnisse

#### 3.2 Die Bedeutung von NFAT2 in der CLL

---

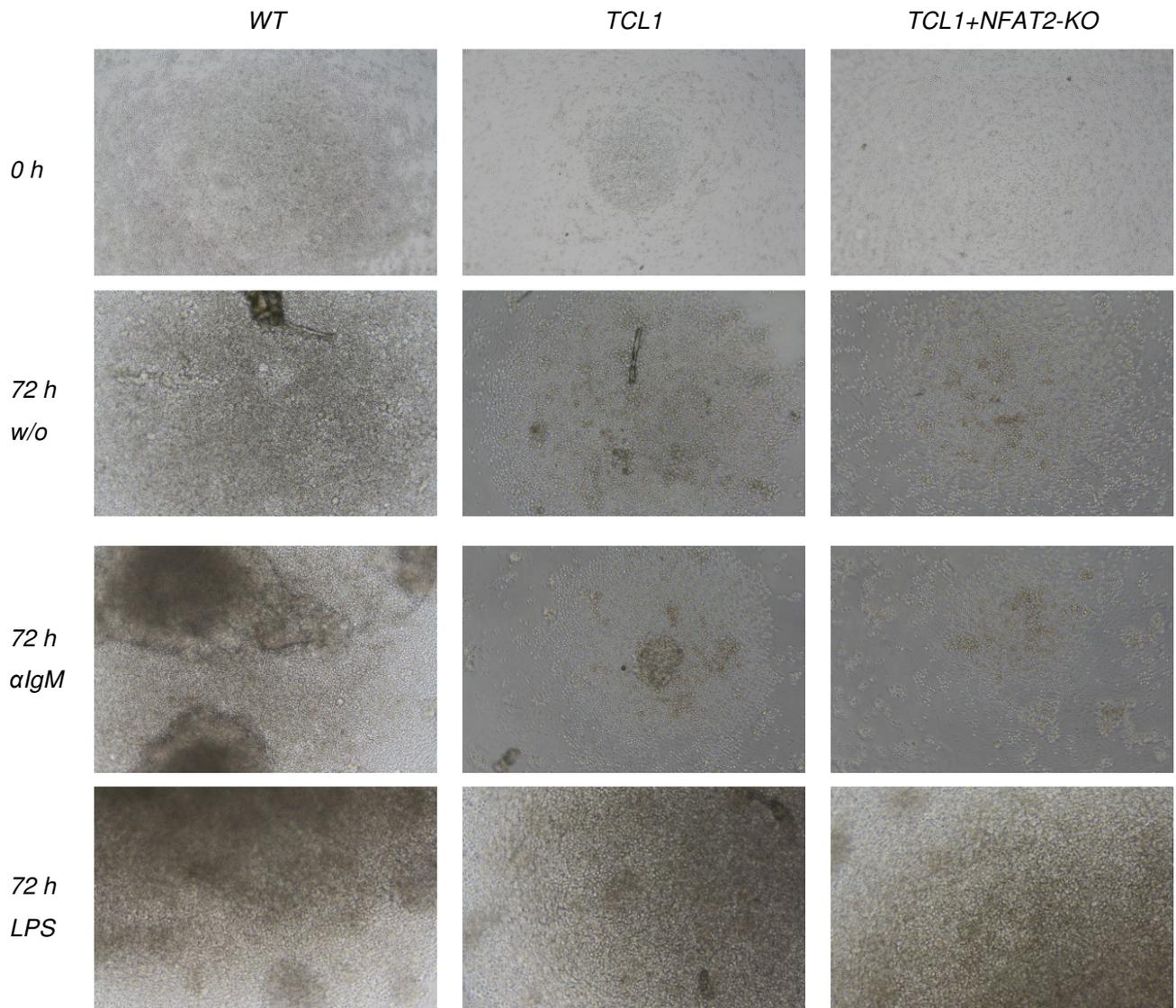


Abb. 39: *In vitro*-Behandlung mit *algM* führt nach 72 h zur Proliferation der TCL1 CLL-Zellen

*B*-Zellen von WT-Tieren und CLL-Zellen der TCL1- und der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte wurden mittels magnetischer Beads negativ isoliert und die CLL-Zellen auf ein weiteres Mal auf die CD5-Expression selektiert. Die Zellen wurden in 96-well Rundbodenplatten ausgesät und entweder unbehandelt oder mit 10 mg/ml *algM* oder 10 mg/ml LPS inkubiert. Nach 0 h und 72 h wurden die Kultur fotografiert (10-fache Vergrößerung).

#### 3.2.10 Molekulare Analyse der *algM*-Stimulation am BCR

Durch die Ergebnisse der *in vitro*-Analysen über 72 h (Kapitel 3.2.9) konnten neue Erkenntnisse über die Langzeitauswirkungen der Stimulation des BCR mit *algM* gewonnen werden. Neben dem anfänglich wirkungslosen Effekt von *algM* bei den TCL1 CLL-Zellen und der sogar nachteiligen Effekte bei den TCL1+NFAT2-KO CLL-Zellen sollte nun die direkte molekulare Auswirkung der BCR-Stimulation untersucht werden. Dafür wurden wie in den

vorherigen Experimenten die CLL-Zellen beider Kohorten negativ isoliert und in Kultur über einen Zeitraum von 60 min mit  $\alpha$ lgM behandelt. Anschließend wurden die Zellen geerntet und ein Proteinlysate hergestellt. Dieses wurde mittels *SDS-Page* und *Western Blotting* auf die Expression verschiedener BCR-Signalwegs-relevanter Kinasen und Proteine untersucht. Zudem wurde der Phosphorylierungsstatus der verschiedenen Kinasen untersucht, welcher Rückschlüsse auf deren Aktivierungszustand ermöglichte.

##### **3.2.10.1 Induktion der Src-Kinasen LYN, SYK und LCK**

Durch die Bindung von  $\alpha$ lgM werden im zytoplasmatischen Bereich des BCRs die ITAMs des assoziierten Heterodimers CD79a und CD79b phosphoryliert<sup>43</sup>. Die Tyrosinkinase LYN ist die Kinase, welche für diese Phosphorylierung verantwortlich ist. Sie bindet an die SH2-Domäne der ITAMs, wodurch ihre Aktivität erhöht wird<sup>44,45</sup>.

Die Ergebnisse in Abb. 40A zeigten eine deutlich stärkere Expression an LYN in TCL1+NFAT2-KO CLL-Zellen und diese stieg nach BCR-Stimulation mit  $\alpha$ lgM weiter an. Der Aktivitätszustand von LYN konnte anhand der Phosphorylierung an Tyr507 bestimmt werden, welche die Aktivität der Kinase inhibiert. In den CLL-Zellen der TCL1-Tiere zeigte LYN eine deutlich gesteigerten Anteil an inhibitorischer Phosphorylierung, der nach BCR-Stimulation noch weiter zunahm. Die BCR-Stimulation in NFAT2-defizienten CLL-Zellen zeigte allerdings keine gesteigerte Inhibierung von LYN. Nur ein kleiner Anteil der LYN-Kinase lag hier im inhibierten Zustand vor.

Bei der BCR-Aktivierung kommt es zu einer LYN-vermittelten dualen Phosphorylierung der ITAMs. Dies ermöglicht der Tyrosinkinase SYK eine Bindung durch ihre dualen SH2-Domänen<sup>46</sup>. Die Phosphorylierung von SYK im „*activation loop*“ an Tyr519/520 ist essentiell für seine Funktion<sup>112</sup>.

Bei der Stimulation der TCL1 CLL-Zellen mit  $\alpha$ lgM kam es zu einer leicht verminderten Expression der SYK-Kinase, wohingegen die Proteinexpression in der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte deutlich zunahm (Abb. 40B). Die Phosphorylierung der Kinase war in der TCL1-Kohorte nur sehr schwach 5 min nach  $\alpha$ lgM zu detektieren. In der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte hingegen wurde SYK an Tyr520 stark phosphoryliert. Diese Aktivierung war bereits nach 5 min auf ihrem Maximum und hielt über 30 min nach Rezeptorstimulation an.

Die LCK-Kinase wurde vor allem bei der Aktivierung des T-Zellrezeptors beschrieben. Aktuelle Ergebnisse zeigen aber auch eine Expression von LCK in B1 B-Zellen und vor allem in Proben von CLL-Patienten<sup>113</sup>. Nach diesen Studien steht LCK in direkter Korrelation mit der Stärke des BCR-Signals und potenziert dieses. Zudem sorgte eine Inhibierung von LCK unter anderem für eine Inhibition des ERK- und AKT-Signalwegs<sup>114</sup>.

In den CLL-Zellen der TCL1 und der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte wurde neben der unphosphorylierten Expression von LCK, auch die Phosphorylierungen an Tyr505 und Tyr394 untersucht. Die Phosphorylierung des Tyr505 am Carboxy-Terminus von LCK vermindert seine katalytische Aktivität, wohingegen die Phosphorylierung an Tyr394 diese steigert. Bei der Analyse der unphosphorylierten Form bestätigten sich die in Abb. 32 bereits dargestellten Ergebnisse mit einer deutlich erhöhten Gesamtexpression der LCK-Kinase in TCL1 CLL-Zellen (Abb. 40C/D). Bei der Expression der inhibitorischen Phosphorylierung an Tyr505 ließ sich, verglichen mit der gesamten unmodifizierten Proteinexpression, eine verstärkte inhibitorische LCK-Expression in der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte feststellen. Diese wurde durch die Stimulation des BCRs mit  $\alpha$ lgM allerdings nicht weiter beeinflusst (Abb. 40C). Bei der aktivierenden Phosphorylierung an Tyr394 hingegen zeigte sich in der TCL1-Kohorte bereits *ex vivo* eine Aktivierung von LCK, welche sich durch die BCR-Stimulation mit  $\alpha$ lgM noch weiter induzieren ließ (Abb. 40D). In der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte zeigte die BCR-Stimulation keinen Einfluss auf den Aktivierungsstatus von LCK.

Die Analyse der Src-Kinasen verdeutlichte, dass nach BCR-Stimulation in anergischen TCL1 CLL-Zellen die beiden Kinasen LYN und SYK nicht aktiviert werden, stattdessen ließ sich eine starke Aktivierung von LCK detektieren. CLL-Zellen der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte hingegen zeigten eine Aktivierung von LYN und SYK, während LCK hauptsächlich in inaktiver Konformation vorlag.

### 3 Ergebnisse

#### 3.2 Die Bedeutung von NFAT2 in der CLL

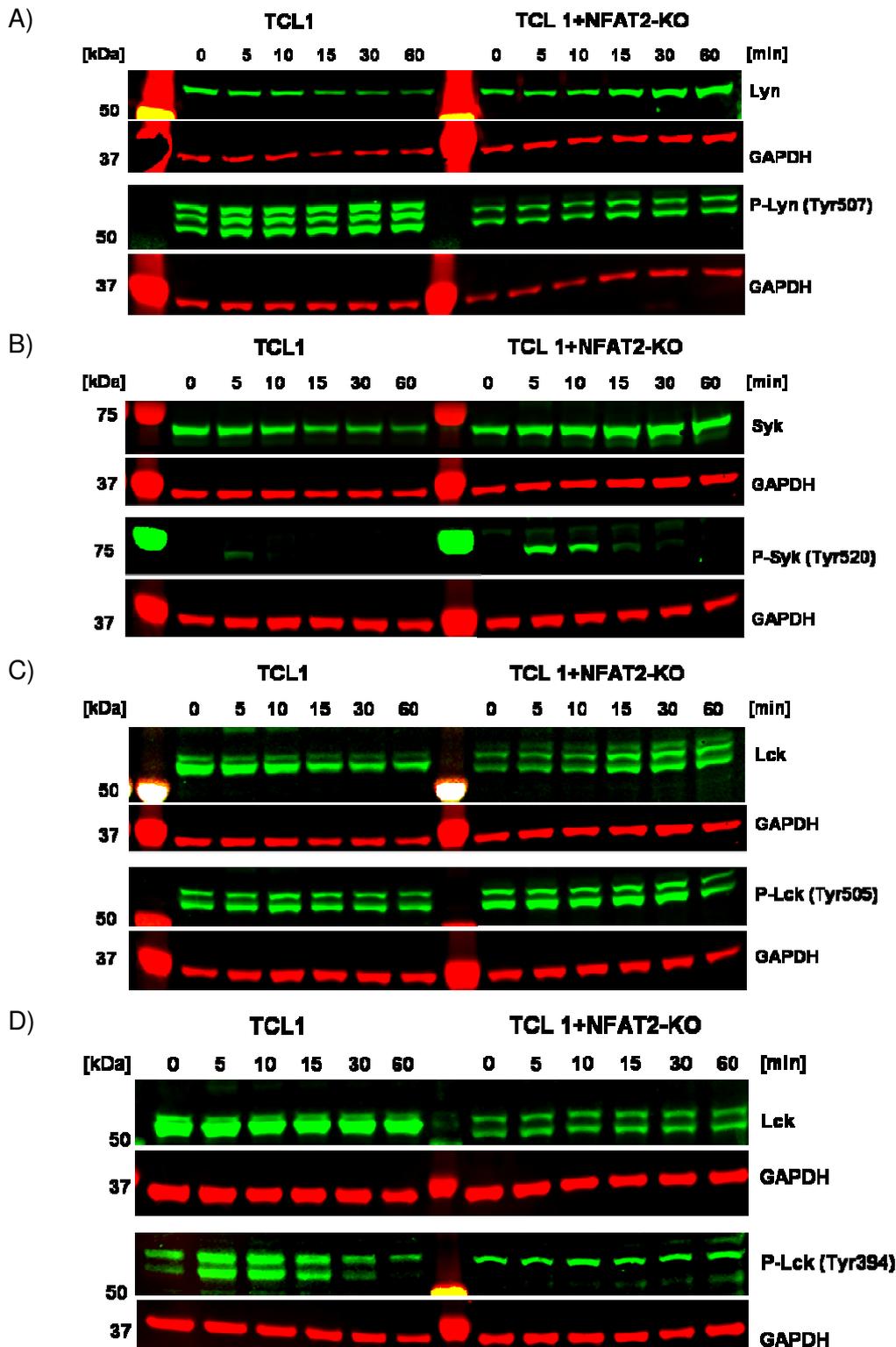


Abb. 40: In anergen TCL1-Zellen wird LYN und SYK inhibiert und LCK aktiviert

CLL-Zellen der TCL1- und der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte wurden mittels magnetischer Beads negativ isoliert und *in vitro* mit 10 mg/ml  $\alpha$ GalM bis zu den angegebenen Zeitpunkten stimuliert. Anschließend wurden 20  $\mu$ g Proteinextrakt mit Hilfe von SDS-Page und Western Blotting analysiert. Dabei wurde sowohl die unphosphorylierte als auch die phosphorylierte Form des Proteins auf zwei separaten Membranen untersucht.

### **3.2.10.2 Aktivierung des „Signalosoms“**

Nach der Phosphorylierung der ITAMs im BCR und der Aktivierung der Rezeptor-assoziierten Src-Kinasen kommt es Rekrutierung des „Signalosoms“. Dieses besteht neben der SYK-Kinase unter anderem aus BLNK, VAV-Proteinen, CD19, PI3K, BTK und PLC $\gamma$ 2<sup>47</sup>. Die Aktivierung des „Signalosoms“ führt dann zur Induktion des Ca<sup>2+</sup>-Signalweges und auch des AKT- und ERK-Signalwegs.

Die Tyrosinkinase BTK gehört zur Familie der zytoplasmatischen Tec-Kinasen und die transiente Phosphorylierung von Tyr551 und Tyr223 führt zu dessen Aktivierung. Dabei wird Tyr551 in der Aktivierungsregion durch SYK phosphoryliert. Dies führt dann zur Autophosphorylierung an Tyr223, was für die vollständige Aktivität von BTK essentiell ist<sup>115</sup>.

Stimulierte man die CLL-Zellen der beiden Leukämie-Kohorten mit  $\alpha$ lgM kam es bei der unphosphorylierten Form zu keiner Expressionsänderung (Abb. 41A). Die aktive Tyr223-Form hingegen wurde nur CLL-Zellen der TCL1-Kohorte detektiert. Hier ließ sich bereits ohne BCR-Aktivierung eine konstitutive Aktivierung von BTK detektieren. Die CLL-Zellen der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte zeigte keine detektierbare Aktivierung.

Sowohl BTK als auch LCK sind in der Lage PLC $\gamma$ 2 zu aktivieren<sup>48</sup>. Dies wird durch eine Phosphorylierung an Tyr759 vermittelt. PLC $\gamma$ 2 seinerseits ist dann in der Lage, über die Spaltung von PIP<sub>2</sub>, IP<sub>3</sub> und DAG zu generieren. IP<sub>3</sub> sorgt dann für die Öffnung der Ca<sup>2+</sup>-Kanäle im endoplasmatischen Retikulum, was zum Einstrom von Ca<sup>2+</sup> ins Zytoplasma führt.

Bei den CLL-Zellen der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte fiel auf, dass bereits ohne BCR-Aktivierung eine Phosphorylierung von PLC $\gamma$ 2 vorlag. Diese blieb auch nach  $\alpha$ lgM konstant. In der TCL1-Kohorte hingegen, zeigten die CLL-Zellen erst auf BCR-Stimulation eine leichte PLC $\gamma$ 2-Aktivierung, die über 30 min zu detektieren war.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Aktivierung des Signalosoms durch den NFAT2-Knockout in den CLL-Zellen verändert wird. Die TCL1-Kohorte zeigte eine starke Aktivierung von BTK, wohingegen PLC $\gamma$ 2 nur sehr schwach aktiviert wird. In NFAT2-defizienten Zellen wird BTK nach BCR-Stimulation nicht aktiviert. Dafür lag PLC $\gamma$ 2 in stark aktivierter Form vor.

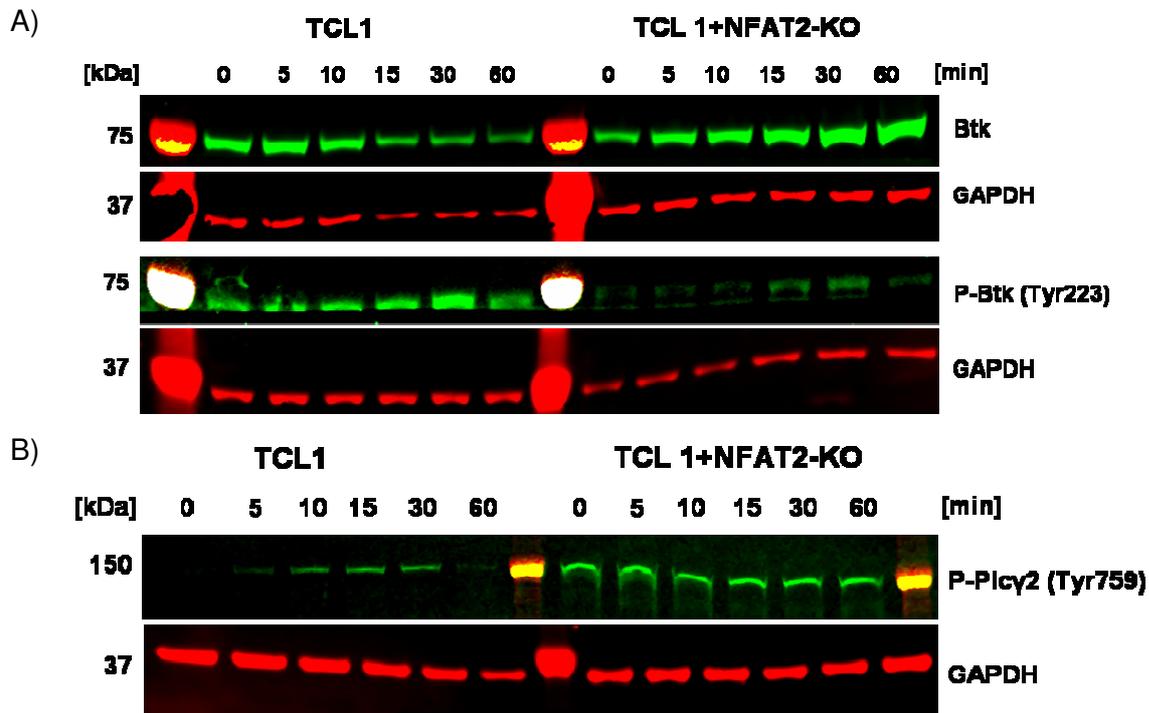


Abb. 41: Aktivierung des Signalosoms in CLL Zellen

CLL-Zellen der TCL1- und der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte wurden mittels magnetischer Beads negativ isoliert und *in vitro* mit 10 mg/ml  $\alpha$ IgM bis zu den angegebenen Zeitpunkten stimuliert. Anschließend wurden 20  $\mu$ g Proteinextrakt mit Hilfe von SDS-Page und Western Blotting analysiert. Dabei wurde sowohl die unphosphorylierte als auch die phosphorylierte Form des Proteins auf zwei separaten Membranen untersucht.

### 3.2.10.3 Proximale BCR-Aktivierung

Die Stimulation des BCR und die damit induzierte Bildung des Signalosoms führen zur weiteren Aktivierung verschiedener nachgeschalteter Signalwege. Dabei wird unter anderem über den RAS/RAF-Signalweg die MAPK/ERK-Kinase aktiviert und durch die PI3K der AKT-Signalweg induziert<sup>116,117</sup>. Die Aktivierung von ERK1/2 wird durch die Phosphorylierung von ERK1 an Thr202/Tyr204 und von ERK2 an Thr185/Tyr187 reguliert. Der PI3K/AKT-Signalweg und der mTOR-Signalweg spielen eine entscheidende Rolle bei vielen Aspekten des Zellwachstums und des Überlebens der Zellen. Dies gilt für physiologische Bedingungen, aber auch für pathophysiologische Zustände (z.B. bei Karzinomen und Leukämien<sup>52</sup>). Die Aktivierung der PI3K führt zur Bildung des „second messengers“ PI3P, welcher notwendig für die Aktivierung von AKT ist. Die Aktivierung von AKT durch die PDK1 geht mit der Phosphorylierung von Thr308 in der Aktivierungsregion und von Ser473 am Carboxy-Terminus einher.

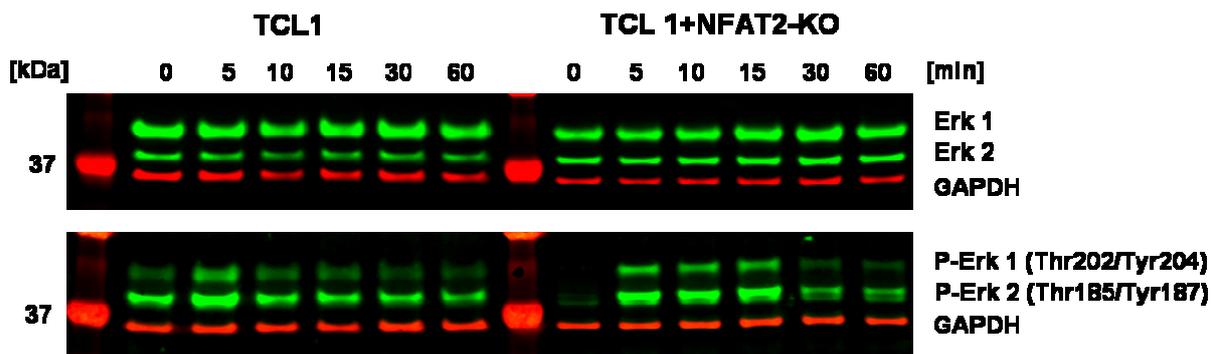
### 3 Ergebnisse

#### 3.2 Die Bedeutung von NFAT2 in der CLL

Bei der Analyse des ERK-Signalweges zeigten die NFAT2-defizienten CLL-Zellen ohne BCR-Aktivierung keine Aktivierung von ERK1/2. Aber bereits 5 min nach  $\alpha$ lgM-Stimulation ließ sich die aktivierende Phosphorylierung von ERK1/2 nachweisen. Im Gegensatz hierzu wurde bei den CLL-Zellen der TCL1-Kohorte eine konstitutive ERK1/2-Aktivierung nachgewiesen. Diese wurde durch BCR-Stimulation nahezu nicht beeinflusst und blieb über den gesamten untersuchten Zeitraum erhalten.

Verglichen mit den Ergebnissen des ERK-Signalweges wurde in den CLL-Zellen der TCL1-Kohorte ebenfalls eine konstitutive Aktivierung von AKT verzeichnet, welche sich durch BCR-Stimulation in ihrer Stärke nicht weiter veränderte. Bei den CLL-Zellen der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte wurde AKT durch die Stimulation mit  $\alpha$ lgM phosphoryliert. Diese Aktivierung blieb über die untersuchten 60 min aufrechterhalten.

A)



B)

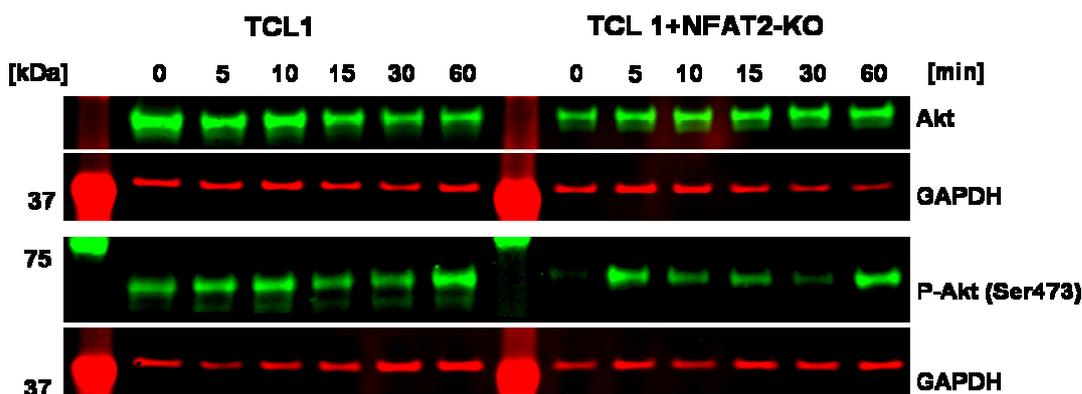


Abb. 42: Konstitutive Aktivierung des ERK- und AKT-Signalweges in TCL1-Zellen

CLL-Zellen der TCL1- und der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte wurden mittels magnetischer Beads negativ isoliert und *in vitro* mit 10 mg/ml  $\alpha$ lgM bis zu den angegebenen Zeitpunkten stimuliert. Anschließend wurden 20  $\mu$ g Proteinextrakt mit Hilfe von SDS-Page und Western Blotting analysiert. Dabei wurde sowohl die unphosphorylierte als auch die phosphorylierte Form des Proteins auf zwei separaten Membranen untersucht.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Der Einfluss von NFAT2 im physiologischen B-Zell-Modell

Zahlreiche Untersuchungen haben sich bislang mit der Frage, welchen Einfluss die Familie der NFAT-Transkriptionsfaktoren auf die Entwicklung und Aktivierung der B-Zellen hat, beschäftigt. Während NFAT ursprünglich in T-Zellen entdeckt wurde<sup>118</sup>, konnte die Expression verschiedener Familienmitglieder später auch in B-Zellen beschrieben werden<sup>119-122</sup>. NFAT-Aktivierung kann durch BCR-Bindung induziert werden<sup>93,123</sup> und der Knockout von NFAT1 und NFAT2 resultiert in einem hyperreaktiven B-Zell-Phänotyp<sup>124</sup>. Dies legt die Vermutung einer essentiellen Rolle von NFAT-Proteinen auch in B-Zellen nahe. Als Berland und Wortis zwei funktionelle NFAT-Bindungsstellen im *CD5-Enhancer* identifizieren konnten<sup>125</sup>, analysierten sie die Rolle von NFAT1 und NFAT2 in allotyp-hybriden Knochenmarks-chimären Mäusen. Sie kamen in diesen Experimenten zu dem Erkenntnis, dass NFAT1 für die B-Zell-Entwicklung der B1 B-Zellen verzichtbar ist, während NFAT2 essentiell für deren Entwicklung und Überleben ist<sup>126</sup>. NFAT2 wurde aber als verzichtbar für B2 B-Zellen wie Marginalzonen B-Zellen charakterisiert.

Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse belegen einen bedeutenden Einfluss von NFAT2 auf die B-Zell-Entwicklung des B1 B-Zell-Kompartiments. Die Analysen im konditionellen B-zellspezifischen Knockout-Modell verdeutlichen die bereits vermutete essentielle Rolle dieses Transkriptionsfaktors<sup>126</sup>. Es konnte neben dem supportiven Effekt von NFAT2 auf die Entwicklung der B1 B-Zellreihe auch eine deutliche Reduktion der spezifischen B1 B-Zell-Progenitoren in der Milz und im Knochenmark belegt werden (Abb. 12). Bisher konnte ein regulatorischer Einfluss von NFAT auf B1-Progenitoren nicht gezeigt werden. Die am stärksten betroffene Subpopulation war die der CD5<sup>+</sup> B1a B-Zellen im Peritonealraum, aber auch die Populationen in der Milz und im peripheren Blut waren betroffen (Abb. 13). Zudem konnte gezeigt werden, dass die verminderte B1a-Population über die gesamte Lebensspanne anhaltend war (Abb. 14). Ein Einfluss von NFAT2 auf die B2 B-Zell-Population, wie Marginalzonen-B-Zellen oder folliculäre B-Zellen konnte nicht detektiert werden.

Das NFAT-Transkriptionsfaktoren das Überleben von Lymphozyten beeinflussen, konnte bereits durch mehrere andere Gruppen belegt werden<sup>93,127</sup>. Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen eine extrem verminderte Proliferationsfähigkeit der B-Zellen in allen untersuchten Organen *in vivo* (Abb. 15). Die reduzierte Proliferation NFAT2-defizienter B-Zellen konnte bereits in anderen Arbeiten *in vitro* charakterisiert werden. Zudem wurde auch ein schlechteres Ansprechen auf αIgM- und LPS-Stimulation beschrieben<sup>93,126</sup>.

Apoptosedefekte aufgrund der NFAT2-Defizienz wurden in dieser Arbeit nur in B-Zellen der Milz detektiert. Möglicherweise sind die Keimzentren der Milz als Ort der Antigenpräsentation und Immunantwort einem höheren Umsatz an B-Zellen ausgesetzt. Dies könnte eine Erklärung darstellen, warum sich nur dort der Verlust von NFAT2 auf die Apoptose der B-Zellen auswirkt. Möglicherweise würde sicher diese Tatsache auch in den Lymphknoten widerspiegeln, welche hier allerdings nicht untersucht wurden.

Interessanterweise zeigten sich speziell zwei der prognostischen Marker der CLL, ZAP70 und CD38, durch den NFAT2-KO betroffen (Abb. 16). Die Verbindung zwischen dem NFAT-Signalweg und der Tyrosinkinase ZAP70 konnte in T-Zellen bereits charakterisiert werden. Dort fand man heraus, dass die ZAP70-Aktivität notwendig ist, um die TCR-vermittelte NFAT-Aktivierung zu gewährleisten<sup>128,129</sup>. Wohingegen nach früherem Erkenntnis eine ZAP70-Expression nur in T- und NK-Zellen bekannt war<sup>130</sup>, ist deren Relevanz nun auch in B-Zellen beschrieben. Dort spielt ZAP70 eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von Pro-B- in Pre-B-Zellen<sup>131</sup>. Genexpressionsanalysen hatten bereits eine deutliche Verminderung des ZAP70 Transkriptes in NFAT2-KO B-Zellen ergeben<sup>93</sup>. Dies steht im Einklang mit den Analysen dieser Arbeit, wobei eine Reduktion der ZAP70-Expression auch auf Proteinebene gezeigt werden konnte (Abb. 16).

Das Transmembran-Glykoprotein CD38 ist vor allem im Zusammenhang mit einer Verschlechterung der Prognose in der CLL bekannt<sup>21,132</sup>. Allerdings wurde die Expression auch auf physiologischen humanen B-Zellen beschrieben<sup>19</sup>, wo CD38 auch während der Entwicklung der B-Zellen exprimiert wird<sup>20</sup>. Die Signaltransduktion über CD38 steigert unter anderem die BCR-Antwort<sup>133</sup>. Bezüglich der Interaktion von CD38 und NFAT-Transkriptionsfaktoren ist bislang kein direkter Zusammenhang bekannt. Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen aber eine deutliche Reduktion der CD38 mRNA und Proteinexpression in NFAT2-defizienten Zellen, was auf eine regulatorische Kommunikation der beiden Faktoren untereinander hinweist.

Zusammenfassend konnte im ersten Teil dieser Arbeit mit den konditionellen NFAT2-Knockout Tieren ein funktionales Modell zur B-Zell-spezifischen Analyse von NFAT2 beschrieben werden. Bereits in anderen Zusammenhängen beschriebene Funktionen von NFAT2 konnten erneut belegt werden. Zudem wurden neue Aspekte über die NFAT2-regulierten prognostischen Marker ZAP70 und CD38 erarbeitet. Interessant wäre auch den genauen Ablauf der Immunantwort auf verschiedene Antigene zu untersuchen, um weitere Einflüsse von NFAT2 zu ermitteln. Des Weiteren wurde bislang auch noch keine mögliche kombinatorische Wirkung von NFAT2 mit anderen NFAT-Familienmitgliedern untersucht. Denkbar wären auch Analysen eines induzierbaren konditionellen Knockouts (z.B. mit Tamoxifen), wodurch NFAT2 erst im adulten Tier ausgeschaltet wird. Dies könnte

Aufschluss darüber geben, ob NFAT2 nur für die Bildung der B1 B-Zellreihe essentiell ist oder auch zur Erhaltung der Population beiträgt. Mögliche weitere Aspekte in Bezug auf die Rolle von NFAT2 in B-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen wären ebenfalls denkbar, da bereits essentielle Funktionen für NFAT2 in regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ ) verzeichnet wurden<sup>134</sup>. Welche Rolle NFAT2 bei der Pathogenese der CLL spielt, wird in folgendem Abschnitt diskutiert.

## 4.2 Die Bedeutung von NFAT2 in der CLL

Über die Rolle von NFAT-Transkriptionsfaktoren in der Pathogenese der CLL sind bislang nur wenige Details bekannt. Ein Zusammenhang zwischen NFAT1 (NFATp) und CLL wurde erstmals 1996 beschrieben. Hier konnte die konstitutive Aktivierung von NFAT2 als Merkmal von unstimulierten CLL-Patientenproben charakterisiert werden<sup>135</sup>. Weitere Studien zeigten, dass die CD23-Expression auf CLL-Zellen, unter anderem durch die Bindung von NFAT1 und NFAT2 reguliert werden kann, da der CD23-Promotor über zwei NFAT-Bindungsstellen verfügt<sup>136</sup>. Bei einer Studie mit annähernd 300 Routinebiopsien von Lymphom-Patienten, konnte eine zytoplasmatische Expression von NFAT2 in nahezu allen neoplastischen Zellen detektiert werden. Zudem ließ sich in den meisten Proben von Patienten mit DLBCL (Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom) oder Burkitt-Lymphom eine aberrante Aktivierung von NFAT2 und damit eine Translokation in den Zellkern feststellen<sup>69</sup>. Die im Ergebnis teil gezeigten Analysen implizieren einen Zusammenhang der NFAT2-Expression und der Pathogenese hämatologischer Erkrankungen. Mögliche mechanistische Zusammenhänge und einen kleinen Einblick in die potentielle Funktion von NFAT2 konnte eine Studie aus 2008 erarbeiten. Hier wurde für eine Subgruppe von CLL-Patienten eine Korrelation zwischen dem konstitutiv aktivierten MAPK/ERK-Signalweg und einem erhöhtem NFAT2-Aktivierungszustand ermittelt<sup>76</sup>.

Um ein tieferes Verständnis für die funktionellen Mechanismen von NFAT2 bei der CLL zu erhalten, wurde in dieser Arbeit dessen Rolle im E $\mu$ -TCL1-Modell charakterisiert. Hierbei konnte durch den konditionellen Knockout von NFAT2 eine protektive Rolle für diesen Transkriptionsfaktor ermittelt werden. Die Ergebnisse aus der Langzeitanalyse zeigten eine drastische Verminderung der Gesamtüberlebenszeit in Tieren ohne NFAT2-Expression. Die Reduktion der Überlebensdauer stand im direkten Zusammenhang mit der Akkumulation maligner CLL im peripheren Blut der Tiere. Die beschriebene Infiltration lymphatischer Organe im E $\mu$ -TCL1-Modell<sup>81</sup> wurde auch in der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte detektiert. Das konditionelle Ausschalten von NFAT2 führte mit Fortschreiten der Erkrankung zu einer deutlichen Akzeleration der CLL (Abb. 21) und in Folge dessen zu einer gesteigerten

Lymphozytose und einer extremen Splenomegalie (Abb. 22). Bei der Identifikation der CLL-Zellen ist die Expression des CD5-Antigens ein klares Charakteristikum<sup>137</sup>. Während der Progression der Erkrankung zeigten Analysen der CD5-Expression, dass es sich in beiden Leukämie-Kohorten, unabhängig vom NFAT2-Status um eine CLL des B1-Phänotyps handelte (Abb. 24). Die malignen CLL-Zellen infiltrierte neben dem Blut und Milz auch den Peritonealraum, Lymphknoten, Knochenmark und zu späten Zeitpunkten auch die Leber der Tiere. In nahezu allen Organen führte der Verlust von NFAT2 zu einer deutlich verstärkten Infiltration durch maligne Zellen. Interessanterweise zeigte sich nicht in allen Organen dieselbe Dynamik. Zu Beginn der Untersuchungen in jungen Tieren war der Anteil an CLL-Zellen in E $\mu$ -TCL1-Zellen ohne NFAT2-Deletion höher als in der Vergleichsgruppe (Abb. 25). Dies wurde vor allem durch den erhöhten Anteil an proliferierenden Zellen in der TCL1-Kohorte bedingt (Abb. 26). Mit fortschreitender Erkrankung zeigte sich in allen Organen der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte, mit Ausnahme der Peritonealhöhle, eine gesteigerte Zellteilung. Dies führte zu einem erhöhten Anteil an CLL-Zellen im Blut dieser Gruppe. Dass sich diese Dynamik der NFAT2-defizienten Kohorte nicht im Peritonealraum zeigte, könnte zum einen an dem bereits hohen Anteil an physiologischen B1 B-Zellen im Peritonealraum liegen und zum anderen möglicherweise an einem zu geringen Beobachtungszeitraum. Dass B-Zellen ohne NFAT2 eine verminderte Proliferation nach BCR-Stimulation zeigen, wurde bereits in NFAT2-defizienten Knochenmarks-Chimären beschrieben<sup>138</sup>. Zudem konnte NFAT2 als wichtiger B-Zell-intrinsischer Faktor charakterisiert werden, welcher auch bei der Bildung von B1 Zellen essentiell ist<sup>126</sup>. Über den Einfluss von NFAT2 im Zellzyklus der malignen CLL-Zellen ist nur wenig bekannt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen einen Zellzyklusarrest in der G<sub>2</sub>-Phase in der TCL1-Kohorte (Abb. 27), was vermutlich der Grund für die stagnierende Proliferation mit Fortschreiten der Erkrankung ist. Der Knockout von NFAT2 führt im Gegensatz zu einer massiven Zunahme der Zellen in der S-Phase. NFAT2 wirkt hier als negativer Zellzyklus-Regulator und sein Verlust begünstigt das Eintreten in den Zellzyklus.

Durch eine Genexpressionsanalyse konnte erstmals ein Zusammenhang zwischen dem Mutationsstatus der CLL und der ZAP70-Expression hergestellt werden<sup>16</sup>. Aus der Analyse von SYK-defizienten B-Zellen war bereits bekannt, dass ZAP70 die fehlende Funktion von SYK am BCR kompensieren kann<sup>139</sup>. Später wurde ein direkter Zusammenhang von ZAP70 und einer erhöhten BCR-Signalübertragung bei der CLL charakterisiert<sup>17</sup>, der mit einer schlechten klinischen Prognose für die Patienten einhergeht<sup>18</sup>. Der Aktivierungsmarker CD38 wurde 1987 erstmals auf einer malignen B-Zell Zelllinie beschrieben und korreliert ebenfalls mit einem ungünstigeren klinischen Verlauf<sup>19,21</sup>. Die Analyse der Koexpression beider prognostischen Marker auf den CLL-Zellen der Leukämie-Kohorten zeigt einen direkten

Zusammenhang mit dem Verlauf der Erkrankung. Die TCL1+NFAT2-KO-Kohorte hatte eine deutlich schlechtere Prognose und ein vermindertes Gesamtüberleben. Dies stand in direktem Verhältnis mit der Expression beider prognostischer Marker (Abb. 28). Diese Ergebnisse verdeutlichen einen direkten regulatorischen Einfluss von NFAT2 auf ZAP70 und CD38 bei der CLL, wie auch in physiologischen B-Zellen.

Um die zugrunde-liegenden Mechanismen zu untersuchen und weitere Erkenntnisse über den Einfluss von NFAT2 auf die Genexpression in der CLL zu erhalten, wurden Microarray-Analysen durchgeführt. In dieser Arbeit wurden die CD5<sup>+</sup> CLL-Zellen beider Leukämie-Kohorten isoliert und direkt *ex vivo* analysiert. Die unüberwachte Analyse der signifikanten Gene gab Auskunft über die am stärksten regulierten Signalwege, nämlich dem BCR-Signalweg und der Zellzyklus-Regulation. Der wichtigste BCR-abhängige Mechanismus neben der Aktivierung der B-Zelle ist die Vermittlung von Toleranz. Das Phänomen der Toleranz wurde schon 1953 in Transplantationsexperimenten mit Mausembryonen verschiedener Mausstämmen beschrieben<sup>140</sup>. Burnet charakterisierte in den folgenden Jahren die Toleranz zu Selbst-Antigenen<sup>141</sup>, die anfänglich auch mit „*direct antigen-mediated unresponsiveness*“ beschrieben wurde<sup>142</sup>. Die Charakteristika der immunologischen Toleranz der B-Zellen wurden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* weiter analysiert<sup>143-145</sup> und die Anergie wurde als Mechanismus der Toleranzentwicklung bei B-Zellen charakterisiert<sup>146,147</sup>.

Die Anergie spielt nicht nur bei der immunologischen Überwachung der Lymphozyten eine wichtige Rolle, sondern konnte auch als wesentlicher Mechanismus in diversen Erkrankungen charakterisiert werden. Ein Mangel an Anergie bzw. ein Übermaß an Reaktivität spielt zum Beispiel bei Autoimmunerkrankungen wie Diabetes mellitus (Typ 1), Multiple Sklerose oder Rheumatoide Arthritis eine entscheidende Rolle. Auch bei Tumorerkrankungen ist die Reaktivität des Immunsystems meist verändert. Bei der CLL wurde die Anergie erstmals in Zusammenhang mit der Aktivierung tumorspezifischer T-Zellen untersucht<sup>148</sup>. Diese Ergebnisse zeigten einen direkten Zusammenhang zwischen der Expression von kostimulatorischen Molekülen (B7-1 & B7-2) auf CLL Zellen und der Entwicklung einer T-Zell-Toleranz. Diese kann unter anderem durch die Stimulation der CLL-Zellen über CD40 wieder aufgehoben werden<sup>149</sup>. Auch weitere kostimulatorische Moleküle wie CD152 (CTLA-4) und OX40-Ligand unterstützen die Anti-Tumorantwort der T-Zellen bei der CLL<sup>150-152</sup>. Weitere Studien zum Aktivierungszustand der CLL-Zellen geben Aufschlüsse über die Rolle der B-Zell-intrinsischen Anergie. So konnten durch die Einteilung der Patienten in solche mit unmutierten (U-CLL) und solche mit mutierten (M-CLL) variable Ig-Regionen zwei Subpopulationen charakterisiert werden<sup>21,153</sup>. Bei der U-CLL wird der Ursprung in naiven B-Zellen und bei der M-CLL in Memory B-Zellen vermutet. Patienten mit unmutierten Ig-Regionen zeigten eine deutlich schlechtere klinische Prognose und reagieren

auf  $\alpha$ lgM-Stimulation mit erhöhter SYK-Phosphorylierung<sup>15,21</sup>. Zudem konnte gezeigt werden, dass die BCR-vermittelte  $Ca^{2+}$ -Mobilisation stark mit dem Mutationsstatus, der CD38-Expression und der IgM-Expression korreliert. Neben den Erkenntnissen zur Syk-Phosphorylierung wurde ein genereller Einfluss des BCR-Signalwegs auf die Anergie in der CLL untersucht<sup>76</sup>.

Um die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse auf die bereits erwähnten Erkenntnisse hin zu untersuchen, wurden vor allem Gene analysiert, die bereits im Zusammenhang mit B-Zell-Anergie beschrieben wurden. Im Jahr 2000 führte die Gruppe um Glynne in einem transgenen *hen egg lysozyme* (HEL)-Mausmodell eine Genexpressionsstudie durch, wodurch das Genprofil in toleranten B-Zellen ermittelt werden konnte<sup>96</sup>. Diese Ergebnisse konnten in einer anderen Studie aus dem Jahr 2006 zum Teil bestätigt werden<sup>97</sup>. Verglichen mit den Ergebnissen diesen Arbeiten lassen sich in der vorliegenden Arbeit vor allem zwei vielversprechende Kandidaten charakterisieren, *Lck* und *Pacsin1*.

*Pacsin1* (auch Syndapin genannt) ist vor allem aus dem Bereich der Neurowissenschaften bekannt<sup>154</sup>. Die Kinase spielt dort bei der Entwicklung von Neuronen und der Ausbildung der Aktinfilamente eine entscheidende Rolle<sup>154,155</sup>. Durch die Interaktion von *Pacsin1* und dem Huntingtin-Protein, welches bei der Trinukleotiderkrankung Chorea Huntington durch Akkumulation im Striatum zu dessen Zerstörung führt, kommt *Pacsin1* vor allem in frühen Stadien der Erkrankung eine tragende Rolle zu<sup>156,157</sup>. Neuere Studien charakterisierten auch eine immunologische Rolle für *Pacsin1*. Es reguliert zum einen die *Toll-like receptor 7/9* (TLR7/9)-vermittelte Interferon-Produktion in plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs) und zum anderen vermittelt die Kinase eine suppressive Wirkung bei Hepatitis C Virus (HCV)-Infektionen<sup>158,159</sup>. Interessanterweise kann *Pacsin1* auch durch die *Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase* (CaMKK) an Thr355 phosphoryliert und aktiviert werden<sup>160</sup>. Hierdurch könnte ein neuer  $Ca^{2+}$ -abhängiger Signalweg entstehen, welcher unabhängig von den bereits bekannten nachfolgenden Signalkaskaden abläuft. Inwieweit die Suppression von *Pacsin1* in der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte (Abb. 32) mit der  $Ca^{2+}$ -Reaktivität zusammenhängt und ob es evtl. eine mögliche Feedbackschleife gibt, müsste in weiteren Analysen untersucht werden.

Über die Tyrosinkinase LCK ist vor allem im Zusammenhang mit dem BCR-Signalweg bereits eine Vielzahl an Interaktionen beschrieben. Als ein Mitglied der SRC-Kinasen-Familie wurde LCK erstmals als potentiell Onkogen in lymphoiden und in nicht lymphoiden Tumorerkrankungen beschrieben<sup>161,162</sup>. Neben einer tragenden Rolle bei der T-Zell-Aktivierung<sup>163,164</sup> konnte in T-Zellen ein klarer Zusammenhang zwischen Anergie und erhöhter LCK-Expression festgehalten werden<sup>165</sup>. LCK wird auch in humanen B-Zell-Populationen exprimiert und dort vor allem in B1 B-Zellen<sup>113,166</sup>. Die Funktion in B1 B-Zellen

wird kontrovers diskutiert. Während einige Studien eine Potenzierung des BCR-Signalwegs durch LCK postulieren<sup>167</sup>, zeigen andere eine Suppression der BCR-Signalübertragung durch LCK<sup>168</sup>. Andere wiederum halten LCK nicht für einen essentiellen Faktor der BCR-Signalübertragung in B1 B-Zellen<sup>169</sup>. Auch in CLL-Patienten konnte die Expression von LCK nachgewiesen werden, wobei diese sich innerhalb des Patientenkollektivs sehr unterschiedlich darstellte<sup>113,170,171</sup>. Neure Studien suggerieren, dass die erhöhte Präsenz von LCK eine Resistenz gegenüber Glucocorticoiden vermittelt und mit einer erhöhten BCR-vermittelten Aktivierung von IKK, AKT und dem ERK-Signalweg einhergeht<sup>114,172</sup>.

Die *ex vivo* erhöhte *Lck*-Expression in der TCL1-Kohorte (Abb. 32 & Abb. 34) gibt ebenfalls Hinweise auf einen möglicherweise anergischen Zustand der CLL in der TCL1-Kohorte. Generell ist über die genaue Interaktion von *Lck* und Anergie bislang nur wenig bekannt, aber von einer essentiellen Rolle von *Lck* beim BCR-vermittelten Signalweg kann ausgegangen werden.

Aus der mRNA-Expressionsanalysen gingen weitere, durch BCR-Aktivierung differentiell exprimierte Gene hervor. Ziel dieser Analyse war auf Genregulationsebene bereits mögliche regulatorische Verbindungen zur Anergie zu eruieren. Aus der Vielzahl an Studien zur Anergie in T-Zellen konnte die Familie der RING-Finger E3-Ligasen als wichtiger Mediator der Anergie identifiziert werden<sup>173,174</sup>. Die RING-Finger-Domäne der CBL-Proteine enthält einen evolutionär hochkonservierten Bereich, welcher für die Bindung und Ubiquitinierung der SYK Kinase essentiell ist<sup>98</sup>. Die Rolle von zwei Mitgliedern der CBL-Familie, CBL (c-CBL) und CBL-b, wird bis heute kontrovers diskutiert und es herrscht noch immer kein Konsens über ihre Funktion in der BCR-Biologie<sup>175</sup>. Einige Studien beschreiben eine negativ regulierende Wirkung von CBL auf die BCR-Aktivierung durch die Ubiquitinierung von SYK<sup>50,98,176</sup>. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für CBL-b in Knockout-Tieren beschrieben<sup>177</sup>, wobei in DT40 B-Zellen auch eine aktivierende Wirkung von CBL-b auf den Ca<sup>2+</sup>-Signalweg skizziert wurde. Dort wirkte CBL-b als strukturbildendes Protein, welches die Bindung von PLC $\gamma$ 2 und BTK vermittelt<sup>178</sup>. Das Adapterprotein CBL ist nach Erkenntnissen aus CBL-Knockout Mäusen auch in der Lage durch Ubiquitinierung die SRC-Kinase LYN zu regulieren<sup>179</sup>. Da LYN sowohl hemmende als auch aktivierende Funktionen im BCR-Signalweg besitzt<sup>180</sup> kann CBL in beide Richtungen wirken. Zudem zeigen neuere Studien die direkte BCR-Ubiquitinierung durch CBL als positiven Regulator für die BCR-vermittelte Antigenprozessierung und -präsentation<sup>175</sup>. Die für diese Arbeit relevantesten Ergebnisse wurden in CBL/CBL-b Doppel-Knockout-Tieren charakterisiert, die eine deutlich erhöhte Reifung der B-Zellen zeigten, was zur Entwicklung einer systemischen Lupus erythematodes (SLE) ähnlichen Erkrankung führte<sup>181</sup>. Demnach kontrollieren die CBL-Proteine den B-Zell-

intrinsischen Kontrollpunkt der Immuntoleranz durch die Koordination des proximalen BCR-Signalwegs während der Anergie-Induktion.

Durch die kontroverse Funktion gestaltet sich die Interpretation der *Cbl* und *Cbl-b* Expression von den untersuchten Leukämie-Kohorten als schwierig. Während die Unterschiede in der *Cbl*-Expression nur marginal waren, ließ sich für *Cbl-b* eine deutlich gesteigerte Expression in der TCL1-Kohorte detektieren. Dies entspricht den Erkenntnissen aus Studien zur Anergie in T-Zellen und könnte für den anergen Status der TCL1-Kohorte sprechen. Generell gilt es, die Rolle der CBL-Familie in B-Zellen noch genauer zu untersuchen.

Eine weitere RING-Finger E3-Ligase stellt GRAIL dar. Einige Analysen identifizierten GRAIL als Schlüsselprotein in der Anergie-Induktion von T-Zellen, wo es vor allem die Produktion von IL-2 inhibiert<sup>100,174</sup>. Über den Wirkmechanismus von GRAIL ist nur sehr wenig bekannt. Es wird zum Beispiel vermutet, dass die RhoA-GTPase als mögliches Substrat dient<sup>182</sup>. Neuere Studien zeigen aber auch eine Ubiquitin-vermittelte Repression des kostimulatorischen Moleküls CD40L auf T-Zellen<sup>99</sup>. Die Expression von *Grail* wird durch die direkte Bindung von NFAT-Homodimeren an die Promotor-Region von *Grail* gesteuert<sup>183</sup>. Diese NFAT-abhängige Expression von *Grail* konnte auch in der Genexpressionsanalyse der TCL1-Tiere nachgewiesen werden. Im unstimulierten Zustand *ex vivo* war die *Grail*-Expression in der NFAT2-defizienten Kohorte schon deutlich reduziert. Nach der Stimulation mit αlgM und damit der Aktivierung des NFAT-Signalweges wurde in den TCL1 CLL-Zellen eine starke, vermutlich NFAT2-abhängige Induktion verzeichnet. Die nur sehr schwache *Grail*-Induktion in NFAT2-defizienten CLL-Zellen lässt auf eine hauptsächliche Aktivierung von *Grail* durch NFAT2-abhängige Mechanismen schließen. Insgesamt erscheint die *Grail*-Expression als deutliche Indikation für einen anergischen Phänotyp der TCL1 CLL-Zellen.

Die Analyse der Anergie-assoziierten Gene ermöglicht eine neue Beschreibung der relevanten Gene in der CLL. Der Transkriptionsfaktor *Egr2* konnte in mehreren Studien als induziert in anergen B-Zellen charakterisiert werden<sup>96,97</sup>. In T-Zellen ist bereits bekannt, dass *Egr2* an einer optimalen Expression von *Cbl-b* beteiligt ist<sup>184</sup>, um den Anergie-Zustand zu induzieren<sup>185</sup>. Diese Beobachtung fügt sich sehr passend in die Ergebnisse der *Egr2*-Analysen in der TCL1-Kohorte. Aktuelle Untersuchungen zeigen eine starke Relevanz der *Prdm1*-Expression bei der CLL und eine negative Korrelation mit Anergie<sup>102</sup>. Diese Ergebnisse konnten in der Untersuchung der *Prdm1*-Expression in der TCL1-Kohorte bestätigt werden.

Neben der bereits erwähnten Rolle von PACSIN1 zeigen auch die weiteren untersuchten neuronalen Gene eine klare Beteiligung an der Anergie-Induktion in B-Zellen. Während PACSIN1 durch die CaMKK aktiviert werden kann<sup>160</sup>, binden NRG1 und PCP4 an

Calmodulin<sup>103,104</sup>. Somit spielen alle drei neuronalen Proteine eine wichtige Rolle im Ca<sup>2+</sup>-Signalweg. Des Weiteren konnten Studien belegen, dass alle drei Gene bei Anergie induziert werden<sup>96,97</sup>. Dies entspricht den Beobachtungen in der untersuchten TCL1-Kohorte.

In dieselbe Richtung deuten auch die Analysen der *Lck*-Expression. Auch wenn die Signatur der *Lck*-Kinase im Zusammenhang mit B-Zell-Anergie noch nicht im Detail analysiert wurde, konnte ein regulatorischer Zusammenhang charakterisiert werden<sup>96</sup>. Die stark erhöhte Expression in der TCL1-Kohorte deutet genau in diese Richtung. Die hier gemachten Beobachtungen korrelieren klar mit den Ergebnissen zur Anergie-Induktion in T-Zellen<sup>165</sup>. Ein Zusammenspiel von *Lck* und NFAT wurde bei der T-Zell-Aktivierung bereits evaluiert<sup>165,186,187</sup>. Dass es in NFAT2-defizienten CLL-Zellen keine BCR-vermittelte *Lck*-Induktion gibt, spricht ebenfalls für ein Zusammenspiel der beiden Proteine.

Bei Betrachtung der Genexpression der Phospholipase C  $\gamma$ 2 (Plc $\gamma$ 2) stehen die Ergebnisse im klaren Zusammenhang mit der Fähigkeit der CLL-Zellen zur Ca<sup>2+</sup>-Mobilisation nach BCR-Aktivierung. Nach der BCR-Aktivierung mit  $\alpha$ lgM kommt es durch LCK oder auch BTK zu einer Aktivierung der PLC $\gamma$ 2<sup>49,105</sup>. Da in der TCL1-Kohorte die Stimulation des BCRs unter dem anergischen Zustand zu keiner Ca<sup>2+</sup>-Mobilisation führt, wird die Genexpression der PLC $\gamma$ 2 auch nur in der NFAT2-defizienten Kohorte induziert. Damit stehen die Ergebnisse im Einklang mit den vorangegangenen Beobachtungen.

Klinische Studien korrelieren die Expression des transkriptionellen Repressors BCL6 mit einer schlechten Prognose für CLL-Patienten<sup>106,188</sup>. BCL6 tritt nahezu ausschließlich in Kombination mit einer Mutation in der variablen Region der Ig<sub>H</sub>-Kette (M-CLL)<sup>188</sup>. Die Ergebnisse dieser Arbeit würden, daher wegen der stark erhöhten *Bcl6*-Expression in der TCL1-Kohorte im Widerspruch zur deutlich besseren Prognose der TCL1-Kohorte stehen. Betrachtet man allerdings die *Bcl6*-Expression in physiologischen B-Zellen, ist dort die Expression fast dreifach erhöht im Vergleich zu den CLL-Zellen der TCL1-Kohorte (Anhang Abb. 43). Somit würde man in der TCL1-Kohorte nicht von einer Induktion, sondern im Gegenteil von einer Reduktion der *Bcl6*-Expression im Vergleich zu WT B-Zellen sprechen. Frühere Untersuchungen zeigen eine starke Expression von *Bcl6* im B-Zell-Kompartiment, die unter anderem für die B-Zell-Entwicklung und die Funktion der B-Zellen in den Keimzentren essentiell ist<sup>189,190</sup>. Demnach spielt *Bcl6* nicht nur bei der Lymphomagenese eine wichtige Rolle, sondern auch in der Funktion von physiologischen B-Zellen. Es bleibt die ausgeprägte Reduktion in der NFAT2-defizienten TCL1-Kohorte zu interpretieren. Hierfür ist es unerlässlich die regulativen Mechanismen von BCL6 genauer zu betrachten. BCL6 inhibiert *Prdm1* (auch bekannt als *Blimp1*) durch eine direkte Bindung von BCL6 an das hochkonservierte *Bcl6 response element* (BRE) im *Prdm1*-Gen<sup>191,192</sup>. Zusammengefasst

zeigen die Expression von *Bcl6* und *Prdm1* in den beiden untersuchten Leukämie-Kohorten eine klare Korrelation. Die starke Expression von *Bcl6* in TCL1 CLL-Zellen inhibiert die *Prdm1*-Expression. Diese Beobachtung unterstützt die These zur Rolle des anergen Phänotyps in TCL1-Modell. Durch den Verlust von NFAT2-KO kommt es dann durch bislang nicht aufgedeckte Mechanismen zur Suppression von *Bcl6* und damit zu einer starken Induktion von *Prdm1*, was den anergen Zustand aufhebt und im TCL1-Modell zur akzelerierten Erkrankung führt.

Ursprünglich wurde VAV als Onkogen in hämatopoetischen Zellen entdeckt<sup>193</sup>. Patientenanalysen zeigen, dass sich in einem Drittel der CLL-Patienten eine generelle VAV-Überexpression und -Phosphorylierung detektieren lässt. Diese findet sich in CLL-Patienten, die eine 13q-Deletion zeigen<sup>194</sup>. Alle VAV-Proteine sind an der Regulation der T- und B-Zell-Aktivierung beteiligt<sup>195,196</sup>, indem sie die Aktivierung des NFκB-Signalwegs induzieren<sup>197</sup>. In B-Zellen wird VAV3 als Regulator der B-Zellantwort vermutet, wobei es die anhaltende Produktion von PIP3 und damit den Ca<sup>2+</sup>-Flux fördert<sup>196</sup>. Interessanterweise zeigen einige Studien einen regulatorischen Zusammenhang zwischen VAV und NFAT. Zum einen kann VAV die NFAT-Bindungsstelle im IL-2 Promotor aktivieren und damit die IL-2 Produktion in T-Zellen erhöhen<sup>198</sup>, zum anderen ist VAV3 in der Lage die BCR-vermittelte NFAT-Aktivierung zu induzieren unter anderem durch Regulation des RAS/MEK/ERK-Signalweges<sup>199-201</sup>. Obwohl die Ergebnisse der Expressionsanalyse von *Vav3* eine klare Expression und BCR-abhängige Induktion in TCL1 CLL-Zellen zeigten, bleibt die Interpretation dieser Beobachtung schwierig. NFAT2-defiziente CLL-Zellen exprimierten nahezu kein *Vav3*, was eine NFAT2-abhängige Komponente in der Regulation des Gens vermuten lässt. Während der regulatorisch Einfluss von VAV-Proteinen auf die NFAT-Aktivierung mehrfach belegt wurde, ist ein möglicher umgekehrter Wirkmechanismus bislang nicht bekannt. Denkbar wäre in den CLL-Zellen der TCL1-Kohorte aber eine Induktion von *Vav3* im anergischen Zustand durch LCK, da LCK stark überexprimiert vorliegt und VAV ein Substrat dieser Kinase darstellt<sup>202,203</sup>.

Ubiquitin-konjugierende Enzyme spielen beim proteasomalen Abbau verschiedener Proteine eine wichtige Rolle. Das Ubiquitin-konjugierende Enzym UBE2H wurde erstmals als Homolog des Hefeenzym Ubc8 beschrieben, welcher *in vitro* Histon H2A ubiquitinieren kann<sup>204</sup>. Eine relevante Funktion *in vivo* konnte damals aber nicht beschrieben werden. Die Genexpressionsanalyse von der Gruppe um Glynne konnte *Ube2h* als induziert in toleranten B-Zellen identifizieren<sup>96</sup>. Die Relevanz der Ubiquitinierung in der Regulation des BCR-Signalweges wurde bereits in einer Vielzahl von Studien diskutiert. Dabei lag der Fokus vor allem auf der Ubiquitinierung verschiedener Signalwegs-relevanter Proteine (z.B. SYK oder LYN)<sup>175,205</sup>. Allerdings konnte bereits eine Studie eine direkte Ubiquitinierung der schweren

Kette des BCRs charakterisieren. Hierbei werden die Lysin-Motive im zytoplasmatischen Teil des BCRs als wahrscheinlichster Angriffspunkt für eine Ubiquitinierung vermutet. Zudem werden auch fünf Lysine-Reste im BCR-Adapterprotein CD79 als Stelle der Ubiquitin-Konjugation postuliert<sup>108</sup>. Obwohl eine Vermittlung durch CBL-Proteine vermutet wird, konnte die definitive Ubiquitin-Ligase für die BCR-Ubiquitinierung bis dato nicht identifiziert werden. Möglicherweise liegt hier auch die Rolle des UBE2H-Enzymes. Die Ergebnisse der hier durchgeführten Microarray-Analyse zeigen eine stark verminderte Expression in NFAT2-defizienten CLL-Zellen (Daten nicht gezeigt) und die BCR-Stimulation mit  $\alpha$ gM führt in der TCL1-Kohorte zu einer starken Induktion von *Ube2h* (Abb. 35). Möglicherweise ubiquitiniert UBE2H hier Signalwegs-relevante Proteine, welche die Aufrechterhaltung eines anergischen Zustandes ermöglichen. Erkenntnisse zu den Wirkmechanismen anderer Mitglieder der E2 Ubiquitin-konjugierende Enzymfamilie und zur unterstützenden Rolle von UBC13 in der B-Zell-Entwicklung und Aktivierung<sup>206</sup> unterstützen diese These.

Durch die Bestimmung der Rezeptoraktivität und der damit verbundenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisation konnte der anerge Phänotyp in den TCL1 CLL-Zellen belegt werden. Es zeigte sich nach BCR-Stimulation nur in der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte ein starker  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, wohingegen die TCL1 CLL-Zellen ohne nennenswerte rezeptorvermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung reagierten. Dass CLL-Zellen von Patienten auf Rezeptorstimulation mit einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisation reagieren können, wurde erstmals 1988 nachgewiesen<sup>207</sup>. Schon damals konnten Unterscheide zwischen den einzelnen Patienten beobachtet werden. Während eine Subgruppe auf BCR-Stimulation mit einer gesteigerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisation und damit induzierter Proliferation reagierte, zeigten andere Patienten zwar einen erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aber keine Proliferation. Die dritte Gruppe zeigte keinerlei Reaktion auf BCR-Stimulation in Bezug auf  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisation oder Proliferation. In einer Vielzahl an weiteren Studien wurde die BCR-Antwort auf  $\alpha$ gM-Bindung analysiert und der Versuch einer prognostisch relevante Einteilung verschiedener Subgruppen unternommen. Dabei wurden verschiedene Marker wie  $\text{Ig}_H$ -Mutationsstatus, CD38- & ZAP70-Expression oder distale BCR-Signalkaskaden untersucht<sup>71,77,208,209</sup>. Allen diesen Untersuchungen gemein ist der Konsens, dass eine Unempfindlichkeit gegenüber äußerer Einflüsse (z.B. die BCR-Stimulation) einen anergischen Status der CLL beschreibt. Dies äußert sich unter anderem in einer Unfähigkeit zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisation wie es auch hier für die TCL1-Kohorte gezeigt werden konnte.

CLL-Zellen zeigen *in vivo* eine Resistenz gegenüber Apoptose, was unter anderem durch die starke Expression von BCL2 und *BCL2-associated X protein* (BAX) vermittelt wird<sup>210-212</sup>. Im Gegensatz dazu ist *in vitro* eine hohe spontane Apoptoserate bei der CLL zu beobachten<sup>213</sup>.

Welcher Mechanismus CLL-Zellen *in vivo* am Leben erhält, wird immer wieder kontrovers diskutiert. Neben Überlebenssignalen aus dem Microenvironment des Knochenmarks<sup>214</sup> und von sogenannten „*nurse-like*“ Zellen<sup>215</sup> können auch lösliche Zytokine (z.B. TNF<sup>216</sup>) sowie die Aktivierung des NFκB-Signalwegs<sup>217</sup> das Überleben der CLL verbessern. Neuere Studien dokumentieren auch eine überlebensfördernde Wirkung durch die Aktivierung des BCR<sup>218,219</sup>. Die Aktivierung der BCR-Signalkaskade führt in reifen B-Zellen zur Ca<sup>2+</sup>-Mobilisation und damit zu einer Aktivierung der Zellen, was wiederum zur Proliferation und Differenzierung in Plasmazellen führt. Neben der Aktivierung kann es auch zur Einleitung der Apoptose durch den *activation induced cell death* (AICD) kommen, wie es vor allem bei unreifen B-Zellen der Fall ist. Die klassische Induktion des AICD wird über Todesrezeptoren wie CD95/APO-1 vermittelt<sup>220,221</sup>. CLL-Zellen besitzen in der Regel eine stark verminderte Expression von CD95<sup>222,223</sup>, was unter anderem eine mögliche Ursache für ihre Apoptoseresistenz darstellt. Wenn CLL-Zellen nach BCR-Stimulation weder mit Aktivierung noch mit AICD reagieren, befinden sie sich im Stadium der Anergie<sup>148</sup>.

Die Ergebnisse aus der *in vitro*-Kultivierung (Kap. 3.2.9) der CLL-Zellen beider Leukämie-Kohorten zeigen eine spontane Apoptosaktivität, wie sie bereits in der Literatur beschrieben werden konnte. Die Behandlung der CLL-Zellen der TCL1-Kohorte mit αIgM offenbart eine leicht positive Wirkung auf das Überleben der anergischen Zellen, die nach ca. 48 h ihren anergen Status verlieren und dann wieder in der Lage sind zu proliferieren. Der Verlust der Anergie nach 48 h *in vitro*-Kultivierung wurde ebenfalls bereits beschrieben<sup>208,224</sup>. Die Reaktion anergischer B-Zellen auf die Stimulation mit LPS wird differenziert betrachtet<sup>225</sup>. Es herrscht kein klarer Konsens, ob anergische B-Zellen allein durch LPS oder nur in Kombination mit einer TLR-Stimulation proliferieren können<sup>225</sup>. Möglicherweise handelt es sich bei der LPS-Antwort auch um einen dosisabhängigen Effekt. Allerdings gilt als gesichert, dass die Stimulation von CLL-Zellen *in vitro* mit LPS zur Proliferation führt und eine starkes proliferatives Ansprechen auf LPS auch mit einer schlechteren klinischen Prognose korreliert<sup>226,227</sup>. Dieser proliferative Effekt wurde in beiden TCL1 Leukämie-Kohorten detektiert und war in der NFAT2-defizienten Population etwas erhöht.

Interessant ist die Tatsache, dass in NFAT2-defizienten CLL-Zellen, durch BCR-Ansteuerung Apoptose induziert wird (Abb. 38). Hierbei wird es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um AICD handeln, die unter anderem durch die Stimulation des BCRs ausgelöst werden kann<sup>228,229</sup>. Studien ergaben eine dramatische Zunahme des AICD in NFAT2-Knockout Mäusen nach αIgM-Stimulation<sup>93</sup>. Diese These wird durch die hier analysierten Ergebnisse der Microarray Daten und der Genexpressionsanalyse (Kap. 3.2.6) unterstützt. Die Genexpressionsanalysen der TCL1- und TCL1+NFAT2-KO-Kohorten ergaben eine starke Überexpression von *Aicda* als auch von *EndoU* in der NFAT2-KO Gruppe.

Die AICDA initiiert die somatische Hypermutation und die Isotypen-Rekombination<sup>110,230</sup> durch die Desaminierung von Cytidin zu Uridin speziell am Ig-Lokus<sup>231</sup>. Der Knockout von AICDA führt zur erhöhten Apoptosisresistenz<sup>232,233</sup>, aber eine genaue Funktion in der Lymphomagenese wird nach wie vor kontrovers diskutiert. AICDA soll als Onkogen wirken und wird in ca. 40% der CLL-Patienten exprimiert<sup>234</sup>. Studien zeigen eine Korrelation mit einer schlechteren Prognose der Patienten<sup>109,235</sup>. Bei ENDOU handelt es sich um eine Endonuklease, die zielgerichtet an Poly-Uridin Sequenzen in der *single strand RNA* (ssRNA) bindet<sup>111</sup>, was vermutlich zum Abbau dieser ssRNA führt. Studien in transgenen Mäusen zeigen während dem AICD eine starke Induktion von *EndoU*<sup>111</sup>.

Die Rolle des BCR in der CLL besitzt ein hohes Potential für Kontroverse. Der BCR-Signalweg spielt eine kritische Rolle bei der Pathogenese der CLL, obwohl der zugehörige Mechanismus oft sehr heterogen ist<sup>71,72</sup>. Die BCR-Aktivierung kann entweder durch Antigene oder Liganden-unabhängig durch ein tonisches Signal stattfinden. Durch die Erkenntnis, dass CLL-Zellen über ein ganz eigenes BCR-Repertoire verfügen, das sich von dem physiologischer B-Zellen stark unterscheidet<sup>14</sup>, müssen die Ergebnisse des BCR-Signalwegs stets differenziert betrachtet werden. Die Experimente aus Kapitel 3.2.10 geben Aufschluss über den BCR-Signalweg in der CLL im TCL1-Modell und den spezifischen Einfluss von NFAT2.

Bei einer BCR-Stimulation ist die erste Kinase, welche aktiviert wird, die Src-Kinase LYN<sup>44,236</sup>, die direkt mit der Ig $\alpha$  Kette assoziiert ist<sup>237</sup>. LYN kann nach BCR-Bindung SYK und BTK phosphorylieren und aktivieren<sup>115,238</sup> oder über einen SYK-unabhängigen Mechanismus wirken, welcher vermutlich den Anergie-Status initiieren kann<sup>239,240</sup>. In LYN-defiziente Zellen, konnte eine verminderte Ca<sup>2+</sup>-Mobilisation identifiziert werden<sup>241</sup>. Dies galt auch für SYK-defiziente Zellen, wobei hier zusätzlich eine fehlende Induktion der PLC $\gamma$ 2 beschrieben wurde<sup>241</sup>.

Die starke Inhibierung von LYN in der untersuchten TCL1-Kohorte steht im Einklang mit der bereits bekannten verminderten Ca<sup>2+</sup>-Mobilisation und der fehlenden SYK-Aktivierung. Im Gegensatz hierzu löst die BCR-Stimulation in NFAT2-defizienten CLL-Zellen die SYK-abhängige Signalkaskade aus, was mit einer starken Aktivierung der PLC $\gamma$ 2 und einem Ca<sup>2+</sup>-Einstrom einhergeht. In der TCL1-Kohorte löst die BCR-Bindung von  $\alpha$ lgM eine Aktivierung von LCK und BTK aus.

LCK ist vor allem aus dem TCR-Signalweg bekannt, wo es unter anderem ZAP70 aktiviert<sup>242,243</sup>. Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt diskutiert ist die LCK-Rekrutierung mit einer Aktivierung des AKT- und ERK-Signalweges assoziiert<sup>114,172</sup>. Die *in vitro* BCR-Stimulation von CLL-Zellen führt durch die Induktion von LCK zum verbesserten Überleben

der CLL Zellen<sup>114</sup>. Die hier durchgeführten Analysen zeigten eine starke IgM-vermittelte Aktivierung von LCK in der TCL1-Kohorte, die auch mit einem leicht verbesserten Überleben dieser CLL-Zellen in vitro einherging (Abb. 38).

BTK, eine in B-Zellen exprimierte Tec-Kinase<sup>244</sup>, kann durch einen SYK-abhängigen Mechanismus aktiviert werden und befindet sich dann membran-assoziiert im Zytoplasma<sup>115,245</sup>. Da in der CLL die tonische oder chronische antigen-vermittelte Aktivierung des BCR eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese spielt, wurde das Bedürfnis das BCR-Signalosom inhibieren zu können größer<sup>246</sup>. Seit der Entwicklung klinischer relevanter BTK-Inhibitoren<sup>247</sup>, wird die Rolle von BTK immer wieder neu beleuchtet. Das Fehlen von BTK führt zur Entwicklung einer x-chromosomalen Agammaglobulinämie (XLA)<sup>248</sup>. In der CLL ist BTK sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene überexprimiert, wobei nicht in allen CLL-Patienten eine konstitutive Aktivierung von BTK vorliegt<sup>249</sup>. Xenotransplant-Versuche mit TCL1-Zellen aus E $\mu$ -TCL1 Mäusen konkretisierten den positiven Effekt auf das Überleben der Tiere unter Behandlung mit dem BTK-Inhibitor Ibrutinib<sup>250</sup>.

Mit Hinblick auf die hier ermittelte konstitutive Aktivierung von BTK im TCL1-Modell (Abb. 41) sind die Ergebnisse der Ibrutinib Behandlung der Tiere nachvollziehbar. Allerdings bleibt zu klären, wie BTK aktiviert wird, da die relevanten Kinasen SYK und LYN in der TCL1-Kohorte keine Aktivierung zeigten. Möglicherweise ist auch die Src-Kinase LCK in der Lage BTK unabhängig von SYK und LYN zu aktivieren. Dies würde die Phosphorylierungsanalysen der TCL1-Kohorte erklären. Die Ergebnisse der PLC $\gamma$ 2-Aktivierung in der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte fügt sich in das Bild der BCR-Aktivierung und den damit induzierten Ca<sup>2+</sup>-Einstrom. PLC $\gamma$ 2 kann durch SYK phosphoryliert werden<sup>241</sup>, was ebenso zum aktivierten SYK-Zustand der NFAT2-defizienten Tiere passt. Nicht zu vernachlässigen ist die konstitutive PLC $\gamma$ 2-Aktivierung, welche bereits ohne  $\alpha$ lgM-Stimulation detektiert werden konnte. Bislang sind zur konstitutiven Aktivierung von PLC $\gamma$ 2 und mögliche Zusammenhänge mit der BCR-Signaltransduktion keine Erkenntnisse vorhanden. Auch eine direkte Interaktion von PLC $\gamma$ 2 und NFAT2 sind nicht bekannt. Allerdings könnte die konstitutive Aktivierung von PLC $\gamma$ 2 möglicherweise mit der Fähigkeit AICD zu aktivieren, einhergehen.

Die Analyse der nachgeschalteten ERK- und AKT-Signalwege charakterisieren eine konstitutive Aktivierung von ERK1/2 und AKT in der TCL1-Kohorte. IgM-vermittelte BCR-Aktivierung führt zur Aktivierung des MEK/ERK-Signalweges, wobei ERK2 stärker aktiviert wird als ERK1<sup>251</sup>. Die Inhibierung durch spezifische ERK-Inhibitoren unterdrückt die BCR-vermittelte Proliferation in reifen B-Zellen, wohingegen der Zellzyklusarrest und die Apoptose nicht beeinflusst werden<sup>252</sup>. Die Aktivierung des ERK-Signalweges induziert Transkriptionsfaktoren wie ELK und das *cAMP responsive element binding protein 1* (CREB), die die Expression verschiedener Gene wie *c-Myc*, *c-Fos*, *Egr-1/2* und *Mef2*

regulieren<sup>116</sup>. Analysen von CLL-Patienten deuten auf eine konstitutive Aktivierung von ERK1/2 hin<sup>76</sup>, was dem Profil von toleranten B-Zellen entspricht<sup>253</sup>. Das Aktivierungsmuster in der hier untersuchten TCL1-Kohorte zeigt dieselben Eigenschaften wie das der anergen CLL-Patienten.

Die Relevanz der AKT-Aktivierung in CLL-Patienten hingegen bleibt kontrovers. Während mehrere Studien zwar eine AKT-Expression in allen CLL-Proben detektieren konnten, verzeichneten sie keinerlei Aktivierung dieser Kinase<sup>76,254</sup>. Andere Analysen wiederum ergaben neben der AKT-Expression auch eine AKT-Phosphorylierung in allen dort untersuchten Patientenproben<sup>255</sup>. Eine entscheidende Rolle scheint hier die Probenaufarbeitung zu spielen. Während die AKT-aktivierten Proben direkt nach Entnahme und Ficoll-Präparation untersucht wurden, wurde bei den Studien, welche keine AKT-Aktivierung detektieren konnten, die CLL-Zellen nach dem Ficoll noch über extra Separationsverfahren isoliert. Generell spricht die konstitutive AKT-Aktivierung in CLL-Zellen eher für einen anergen Phänotyp, wenn man von einer tonischen BCR-Aktivierung bei der CLL ausgeht. Dies wird durch die hier durchgeführten Analysen und die Ergebnisse der TCL1-Kohorte weiter unterstützt.

## 5 FAZIT & PERSPEKTIVEN

### 5.1 Erkenntnisse über NFAT2 in physiologischen B-Zellen

Im folgenden Abschnitt soll der detaillierte Einfluss von NFAT2 auf die BCR-Aktivierung und die Entwicklung der B-Zellen, welcher in dieser Arbeit untersucht wurde, zusammengefasst werden. In NFAT2-defizienten Mäusen bzw. B-Zellen führt dieser Verlust des Transkriptionsfaktors zu einer starken Reduktion des B1 B-Zell-Kompartiments. Dies konnte sowohl in bereits publizierten Analysen gezeigt, als auch in dieser Arbeit bestätigt werden<sup>126</sup>. Dabei handelt es sich tatsächlich um einen Mangel an CD5<sup>+</sup> B-Zellen und nicht um eine einfache Reduktion dieses Markers. Dies steht im Einklang mit der Erkenntnis, dass der Verlust von NFAT2 nicht zu unreifen B-Zellen in der Peripherie führt<sup>256</sup>, die dann auch kein CD5 exprimieren würden. Die Reduktion der CD5<sup>+</sup> B-Zellen wird auch durch die Abwesenheit der B1-Progenitoren zusätzlich belegt. Was mit diesen Experimenten noch nicht geklärt werden konnte, ist die Frage, ob NFAT2 nur für die Bildung oder auch für die Erhaltung der B1 B-Zellen notwendig ist. Da B1 B-Zellen über eine Selbsterneuerung und Selbsterhaltung verfügen, könnte möglicherweise NFAT2 nur für die embryonale Entstehung der CD5<sup>+</sup> B-Zellen essentiell sein. Diese Fragestellung könnte mit einem induzierbaren NFAT2-Knockout untersucht werden, wobei beispielsweise ein Tamoxifen-induzierbares Cre-Modell (MerCreMer), zur spezifischen Ausschaltung von NFAT2 verwendet werden könnte<sup>257</sup>.

Der Verlust von NFAT2 in der noch vorhandenen B1 Population führt hauptsächlich zur Hemmung der Proliferation *in vivo*. Einflüsse auf die Regulation der Apoptose konnten in dieser Arbeit nur bedingt beschrieben werden, wobei hier nur die Proliferation im Rahmen der Selbsterneuerung untersucht wurde. Interessant wäre auch die Reaktion der verschiedenen B-Zell-Populationen auf die Stimulation mit verschiedenen Antigenen. Studien in NFAT2-defizienten MZ B-Zellen zeigten eine Beeinträchtigung des Isotypenwechsels nach Impfung mit T-Zell-unabhängigen Antigenen Typ II (4-Hydroxy-3-nitrophenylacetyl-Ficoll, NP-Ficoll), wohingegen T-Zell-abhängige Antigene wie NP-Keyhole Limpet Hemocyanin (NP-KLH) keine Effekte zeigten<sup>93</sup>.

In dieser Arbeit und auch in früheren Studien<sup>93</sup> konnte auch ein regulatorischer Einfluss von NFAT2 auf die Expression von ZAP70 und CD38 beschrieben werden. Da beide Proteine an der Regulation des BCR-Signalwegs beteiligt sind, wäre hier eine Beeinträchtigung naheliegend. Detaillierte Analysen über die BCR-Antwort nach Rezeptorstimulation würden hier weiteren Aufschluss über die molekularen Mechanismen von NFAT2 im Rahmen der BCR-Aktivierung geben.

Die therapeutische Nutzbarkeit des  $\text{Ca}^{2+}$ /NFAT-Signalweges konnte bereits in mehreren Studien untersucht werden<sup>66</sup>. Zudem wird durch die Anwendung von Immunsuppressiva wie Cyclosporin A Calcineurin inhibiert und damit wird auch den NFAT-Signalweg blockiert. Welches Potential damit auch für mögliche B-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankungen besteht, sollte in weiteren Studien genauer untersucht werden.

## 5.2 Erkenntnisse über NFAT2 in der CLL

In dieser Arbeit konnten neue Aspekte über die Rolle von NFAT2 in der Pathogenese der CLL charakterisiert werden. Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten aus den transgenen TCL1-Tieren belegen eine konstitutive Aktivierung von NFAT2 und eine aberrante Translokation in den Zellkern. Dies konnte auch in humanen CLL-Proben charakterisiert werden<sup>68,69</sup>. Neben der Aktivierung von NFAT2 konnten neuere Studien auch einen Zusammenhang zwischen der Stimulierbarkeit des BCRs durch IgM und dem NFAT2 Status erarbeiten<sup>76,77</sup>. Sie beschrieben eine Subpopulation der CLL-Patienten deren CLL-Zellen nicht auf BCR-Stimulation reagierten und postulierten die Anergie als ein typisches Kennzeichen einer CLL-Zelle. Bislang reichen die Erkenntnisse über den anergen Status nicht aus, um eine klare klinische Prognose zu treffen. Allerdings zeigen anergische Zellen eher Eigenschaften einer indolent verlaufenden CLL. Dies geht einher mit einer niedrigen Expression von ZAP70 und CD38<sup>77</sup>. Diese Ergebnisse lassen sich sehr gut auf das TCL1-Modell übertragen. Auch hier zeigten die CLL-Zellen einen anergischen Phänotyp mit einem Fehlen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisation. Der aggressive proliferative Phänotyp der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte korreliert stark mit der deutlich erhöhten ZAP70- und CD38-Expression. In der CLL kann es in 5-10% der Fälle zu einer Richter Transformation kommen<sup>11,12</sup>. Aus eigenen Untersuchungen in CLL-Patientenproben ließ sich der Verlust von NFAT2 bei der Richter-Transformation nachweisen (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung deutet auf einen möglichen Mechanismus von NFAT2 bei der Erhaltung der Anergie in der CLL hin.

Des Weiteren ist bei der Anergie der Status des BCRs essentiell. Auch in klinischen Studien nimmt die Manipulation des BCRs-Signalweges eine immer wichtiger therapeutische Rolle ein. Dies wird vor allem aus den neuen Erkenntnissen über den BTK-Inhibitor Ibrutinib und die neueren PI3K-Inhibitoren wie Idelalisib deutlich. Wie Untersuchungen mit CLL-Patientenproben zeigen konnten, verfügen anerge CLL-Zellen über eine konstitutive Aktivierung des BCR-Signalweges. Diese aberrante konstitutive Aktivierung konnte auch in den TCL1 CLL-Zellen beschrieben werden. Die CLL-Zellen dieser Kohorte zeigten *ex vivo* bereits eine konstitutive Aktivierung von ERK1/2 und AKT, aber auch von BTK. Der

eindeutigste Hinweis auf Anergie in den TCL1 CLL-Zellen liegt aber sicherlich in ihrer Unfähigkeit zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisation.

Da die Anergie in B-Zellen und auch in der CLL nur unzureichend untersucht ist, wurde in dieser Arbeit ein Genexpressionsmuster der Anergie charakterisiert. Dabei wurde die Induktion verschiedener Transkripte in den anergen TCL1-Zellen untersucht. Diese erschlossen sich vor allem aus bekannten Analysen mit toleranten bzw. anergen B-Zellen<sup>96,97</sup>. Das Anergie-Expressionsmuster wird vor allem durch die gesteigerte Expression von den E3 Ligasen *Cbl-b* und *Grail*, *Eg2*, *Prdm1*, *Pacsin1*, *Pcp4*, *Nrgn* und der Kinase *Lck* geprägt.

Vor allem die starke Induktion von *Lck* sollte hier berücksichtigt werden. LCK wurde bereits bei der Induktion von Anergie in T-Zellen charakterisiert<sup>165</sup> und auch bei toleranten B-Zellen beschrieben<sup>96</sup>. Neue Erkenntnisse schreiben LCK eine tragende Rolle in der BCR-Signalübertragung bei der CLL zu<sup>114</sup>. Besonders bemerkenswert sind diesbezüglich die Ergebnisse zur LCK-Expression in der TCL1-Kohorte. Hier zeigte sich eine deutliche Aktivierung von LCK, die in der TCL1+NFAT2-KO-Kohorte gänzlich fehlte. Dies gibt möglicherweise einen Hinweis auf die essentiellen Rollen von LCK und NFAT2 als mögliche Regulatoren der Anergie in CLL-Zellen.

Der *Lck*-Promotor verfügt über mehrere potentielle NFAT-Bindestellen, die homolog zur NFAT-Bindestelle im IL-2 Promoter sind<sup>258</sup>. Unpublizierte Studien von Kooperationspartnern konnten ebenso einen regulatorischen Zusammenhang von NFAT2 und LCK in T-Zellen beschreiben. Um die Theorie der Anergie-Induktion durch LCK, welches zumindest teilweise über NFAT2 reguliert wird, zu überprüfen, sind weitere Studien notwendig. Zum einen sollte die BCR-Stimulation von anergen CLL-Zellen eine Bindung von NFAT2 an den *Lck*-Promotor auslösen. Des Weiteren könnte durch die Blockade von LCK durch LCK-Inhibitoren wie A-770041 ein regulatorischer Zusammenhang aufgeklärt werden. Möglicherweise lässt sich damit die Anergie am B-Zell-Rezeptor wieder aufheben. Dies könnte durch Messung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisation nach Inhibitorgabe untersucht werden. Die Gabe des Inhibitors in der TCL1-Kohorte wäre ebenfalls eine Möglichkeit diese Fragestellung genauer zu untersuchen. Die Relevanz der LCK-Aktivierung in anergen CLL-Patienten sollte ebenfalls charakterisiert werden.

Ein weiterer wichtiger Aspekt besteht in der Übertragung der aus dem TCL1-Modell ermittelten Anergie-Signatur auf Proben von CLL-Patienten. Auch hier könnte die Expression der Anergie-assoziierten Gene untersucht werden, um mögliche Subpopulationen zu charakterisieren, ferner könnte in anergen humanen Proben die BCR-Antwort weiter untersucht und mit den Daten des TCL1-Modells verglichen werden.

Ein Aspekt, welcher in dieser Arbeit nicht thematisiert wurde, ist die Rolle der anderen NFAT-Familienmitglieder. Interessant wäre dabei vor allem der unmittelbare Einfluss des NFAT2-Knockouts auf die Expression der anderen NFAT-Mitglieder. Diese Möglichkeit wird derzeit in der Arbeitsgruppe weiter untersucht. Hierfür wurde in der CLL-Zelllinie MEC1 ein stabiler shRNA-vermittelter *Knock-down* der verschiedenen NFAT-Familienmitglieder induziert. Diese sollen in der Zukunft im Hinblick auf Veränderungen in der Proliferation, der Apoptose und der Fähigkeit zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisation und zur Tumorinduktion in Mäusen, charakterisiert werden.

Abschließend lässt sich schlussfolgern, dass NFAT2 nicht nur eine essentielle Rolle in der physiologischen B1 B-Zellentwicklung sondern auch in der Pathogenese der CLL spielt. Der  $\text{Ca}^{2+}$ /NFAT-Signalweg birgt auch für die Zukunft großes therapeutisches Potential. Durch die Ergebnisse dieser Arbeit kann NFAT2 als möglicher Mediator der Anergie in der CLL beschrieben werden. Zudem wird die Induktion der Anergie durch die Regulation von LCK durch NFAT2 postuliert. Diese These gilt es in nachfolgenden Untersuchungen genauer zu beleuchten und eine Bindung von NFAT2 an den LCK-Promotor molekularbiologisch zu charakterisieren.

## 6 ANHANG

### 6.1 Verzeichnisse

#### 6.1.1 Nomenklatur

Die Nomenklatur der Gene und Proteine wurde nach dem HUGO *Gene Nomenclature Committee* durchgeführt.

Gen- und Protein-Konventionen für die *lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*

	Gen-Symbol	Protein-Symbol
Human	<i>LCK</i>	LCK
Maus	<i>Lck</i>	LCK

#### 6.1.2 Abkürzungsverzeichnis

ADP - Adenosindiphosphat	BRE - <i>Bcl6 response element</i>
AICD - <i>Activation Induced Cell Death</i>	BTK - Bruton's Tyrosinkinase
<i>Aicda</i> - <i>Activation-induced cytidine deaminase/AID</i>	B-Zellen - <i>bone marrow-derived</i>
AK - Antikörper	Ca <sup>2+</sup> - Calciumion
AKT - Proteinkinase B	CaM - Calmodulin
ALCL - Anaplastisch-großzelliges Lymphom	CaMKK - <i>Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase</i>
ALL - Akute lymphatische Leukämie	CBL - <i>Casitas B-lineage lymphoma</i>
AML - Akute myeloische Leukämie	CD - <i>cluster of differentiation</i>
AP1 - <i>activator protein 1</i>	CD79A - immunoglobulin-associated alpha
ATM - Ataxia teleangiectatica-mutierten Gen	CK1 - Casein Kinase 1
B1P - B1-Progenitoren	CLL – Chronische Lymphatische Leukämie
BAX - <i>BCL2-associated X protein</i>	CLP - gemeinsamen lymphoiden Progenitoren ( <i>common lymphoid progenitors</i> )
BCL-2 - <i>B-cell lymphoma 2</i>	CML – Chronisch-myeloische Leukämie
<i>Bcl6</i> - <i>B-cell lymphoma 6 protein</i>	C-MYC - <i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
BCR - B-Zell-Rezeptor	COX2 - Cyclooxygenase-2
Blimp1 - <i>B lymphocyte-induced maturation protein-1</i>	Cre - Zyklische Rekombinase
BLNK - <i>B-cell linker protein</i>	
BrdU – Bromdesoxyuridin	

---

CREB - <i>cAMP responsive element binding protein 1</i>	ITAM - Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv ( <i>tyrosine-based activation motif</i> )
CTLA-4 - <i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>	J-Segment – <i>joining</i> Segment
DAG - Diacylglycerin	JUN - <i>jun proto-oncogene</i>
DC - Dendritischen Zellen	KO – Knockout
DLBCL - Diffus-großzelliges B-Zell NHL	LCK - <i>lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>
DNA - Desoxiribonukleinsäure	lincRNA - <i>long intergenic non-coding RNA</i>
D-Segment – <i>diversifying</i> Segment	loxP - <i>locus of crossing over [x] of P1 recombinase</i>
DT40 B-Zellen – B-Zelllinie aus dem Huhn	LPS - Lipopolysaccharide
EBV - Epstein-Barr-Virus	LYN - <i>Lck/Yes novel tyrosine kinase</i>
Egr2 - <i>Early growth response 2</i>	MAPK- <i>mitogen-activated protein kinase</i>
EMT - epitheliale-mesenchymale Transition	M-CLL – mutierte Chronisch lymphatische Leukämie
EndoU - <i>polyU-specific endonuclease</i>	mRNA - <i>messenger RNA</i>
ER - endoplasmatischen Retikulum	mTOR - <i>mechanistic target of rapamycin</i>
ERK - ( <i>MAPK</i> ) <i>mitogen-activated protein kinase</i>	MZ - Marginalzonen B-Zellen
Fc.- <i>fragment crystallisable</i>	MZL - Marginalzonen-B-Zell-Lymphom
FO - Follikuläre B-Zellen	NFAT - <i>Nuclear factor of activated T cells</i>
FOS - <i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>	NFκB - <i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells</i>
GC - Keimzentren-B-Zellen ( <i>germinal center</i> )	NHL - Non-Hodgkin-Lymphome
GRAIL - <i>Ring finger protein 128</i>	NHR - <i>NFAT homology region</i>
GSK3 - Glykogensynthase Kinase 3	NK - Natürliche Killerzellen
H & E – Hämatoxylin & Eosin	NLS - nukleäre Lokationssequenz
HCV - Hepatitis C Virus	NP-Ficoll - 4-Hydroxy-3-nitrophenylacetyl-Ficoll
HEL - <i>hen egg lysozyme</i>	NP-KLH - NP-Keyhole Limpet Hemocyanin
HL - Hodgkin-Lymphome	Nrgn - Neurogranin
HSC - hämatopoetischen Stammzellen ( <i>hematopoietic stem cells</i> )	ORAI - <i>calcium release-activated calcium modulator</i>
i.p. – intraperitoneal	OS - Gesamtüberleben ( <i>overall survival</i> )
Ig <sub>H</sub> L – leichte Kette der Immunglobuline	OX40 Ligand - <i>tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4 (TNFSF4)</i>
Ig <sub>H</sub> V - schweren Kette der Immunglobuline	
IL-2 - Interleukin 2	
IP3 - Inositoltriphosphat	

---

Pacsin1 - Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 1	ssRNA - <i>single strand RNA</i>
PBMC - Peripheral blood mononuclear cell	STIM - <i>stromal interaction molecule</i>
PBS – <i>Phosphate-buffered Saline</i>	SV40 T-Antigen - <i>Simian Vacuolating Virus 40 T Antigen</i>
Pcp4 - <i>Purkinje cell protein 4</i>	SYK - <i>Spleen tyrosine kinase</i>
PCR - Polymerase-Kettenreaktion	TAD - Transaktivierungsdomäne
pDCs - plasmazytoide dendritische Zellen	T-ALL - Akuten Lymphatischen T-Zell Leukämie
PDK1 - <i>Phosphoinositide-dependent kinase-1</i>	TCL1 - <i>T cell lymphoma breakpoint 1</i>
PFA - Paraformaldehyd	Onkogen
PFS – progressionsfreie Überleben	TCR - T-Zellrezeptors
PI3K - Phosphoinositid-3-Kinase	Th - Threonin
PIP2 - Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat	TKI - Tyrosinkinase-Inhibitoren
PIP3 - Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat	TLR – <i>toll-like receptor</i>
PKC $\beta$ - Protein Kinase C $\beta$	TNF - <i>tumor necrosis factor</i>
PLC $\gamma$ 2 - Phospholipase C $\gamma$ 2	TNFSF13 - <i>Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13</i>
Prdm1 - <i>PR domain containing 1</i>	TP53 - Tumorsuppressors 53
qRT-PCR – quantitative reverse Transkriptase PCR	T <sub>reg</sub> - regulatorischen T-Zellen
RBE - <i>recombinase binding elements</i>	Tyr - Tyrosin
RHD - <i>Rel-homology domain</i>	Ube2h - Ubiquitin-konjugierende Enzym E2 H
RhoA - <i>ras homolog family member A</i>	U-CLL – unmutierte Chronisch lymphatischen Leukämie
Ring - <i>Really Interesting New Gene</i>	VAV - <i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
RNA - Ribonukleinsäure	V-Segment – <i>variable</i> Segment
RT - Raumtemperatur	WAS - Wiskott-Aldrich-Syndrom
SCID - schweren kombinierten Immundefekt ( <i>severe combined immunodeficiency</i> )	WBC – <i>White blood count</i>
Ser - Serin	XLA - Bruton-Syndrom ( <i>X-linked agammaglobulinemia</i> )
SLC - Surrogat leichte Kette ( <i>surrogate light chain</i> )	ZAP70 - $\zeta$ - <i>chain-associated protein kinase 70</i>
SLE - Lupus erythematodes	
SPF - spezifiziert pathogenfrei	
SR - Serin-Prolin reiche Motive ( <i>serine-prolin regions</i> )	
SRR - Serin-reiche Motive( <i>serine-rich regions</i> )	

### 6.1.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: CLL-Neuerkrankungen in Deutschland	3
Abb. 2: B-Zell-Entwicklung in der Maus	7
Abb. 3: B-Zell-Rezeptor Signalweg	9
Abb. 4: Schematischer Aufbau der NFAT-Transkriptionsfaktoren	11
Abb. 5: $Ca^{2+}$ /NFAT-Signalweg in der B-Zelle	13
Abb. 6: Cre-Rekombinase-Aktivität an der 34 bp loxP Sequenz im NFAT2-Gen	18
Abb. 7: Gatingsschema der $CD5^+$ B-Zellen beim FACS Sorting	35
Abb. 8: Aufbau der Laser und Filter des LSR II	36
Abb. 9: Generierung des konditionellen NFAT2-Knockouts	43
Abb. 10: Kreuzungsschema des konditionellen NFAT2-Knockouts	44
Abb. 11: NFAT2-Knockout in $CD19^+$ B-Zellen auf mRNA- und Proteinebene	45
Abb. 12: Reduktion der B1-Progenitorpopulation in Knochenmark und Milz durch NFAT2-KO	46
Abb. 13: NFAT2 kontrolliert die B1 B-Zell-Populationen im Peritonealraum	47
Abb. 14: Lebenslange Reduktion der B1 B-Zellen durch NFAT2-KO	48
Abb. 15: NFAT2-Verlust hemmt die Proliferation der $CD5^+$ B-Zellen	49
Abb. 16: NFAT2 reguliert die Expression von ZAP70 & CD38	51
Abb. 17: Konditioneller NFAT2-Knockout im $E\mu$ -TCL1-Modell	53
Abb. 18: Kreuzungsschema des konditionellen NFAT2-Knockouts im $E\mu$ -TCL1-Modell	53
Abb. 19: Nachweis NFAT2-Knockout im $E\mu$ -TCL1-Modell	54
Abb. 20: NFAT2-Verlust verstärkt Progression der CLL	56
Abb. 21: Verstärkte Akkumulation der $CD5^+$ B-Zellen in Blut und Milz durch NFAT2-Verlust	58
Abb. 22: Deletion von NFAT2 verstärkt die Splenomegalie der experimentellen Kohorten	59
Abb. 23: Akzelerierte Infiltration der Milz mit CLL-Zellen nach B-Zell-spezifischer NFAT2-Deletion	62
Abb. 24: NFAT2-Verlust führt zur Expansion der B1 aber nicht der B2 B-Zellen	63
Abb. 25: Höhere Dynamik der CLL-Erkrankung durch den Verlust von NFAT2	65
Abb. 26: NFAT2-Verlust steigert die Proliferation maligner CLL-Zellen	67
Abb. 27: NFAT2 reguliert $G_2/M$ -Arrest in CLL Zellen	68
Abb. 28: Die Expression von ZAP70 & CD38 wird durch NFAT2 reguliert	70
Abb. 29: Skizze des Microarray-Experiments	71
Abb. 30: Clusteranalyse der Microarray-Ergebnisse	72
Abb. 31: Clusteranalyse Anergie-assoziiierter Gene	73
Abb. 32: NFAT2 reguliert die Expression der Anergie-assoziierten Gene <i>Lck</i> und <i>Pacsin1</i>	73
Abb. 33: Induktion der E3 Ligasen bei Anergie	75
Abb. 34: Überexpression anergie-assoziiierter Gene in TCL1 CLL-Zellen	77
Abb. 35: NFAT2 reguliert Gene des B-Zell-Rezeptorsignalwegs	79

Abb. 36: NFAT2 induziert Anergie in CLL-Zellen -----	82 -
Abb. 37: B-Zellen expandieren nach BCR-Stimulation in vitro -----	83 -
Abb. 38: In vitro Behandlung mit <i>algM</i> reduziert die Viabilität bei NFAT2-defizienten CLL Zellen ---	85 -
Abb. 39: In vitro-Behandlung mit <i>algM</i> führt nach 72 h zur Proliferation der TCL1 CLL-Zellen -----	87 -
Abb. 40: In anergen TCL1-Zellen wird LYN und SYK inhibiert und LCK aktiviert-----	90 -
Abb. 41: Aktivierung des Signalosoms in CLL Zellen-----	92 -
Abb. 42: Konstitutive Aktivierung des ERK- und AKT-Signalweges in TCL1-Zellen-----	93 -

#### 6.1.4 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Biologische und klinische Relevanz der chromosomalen Aberrationen der CLL -----	4 -
Tab. 2: Pipettierschema der Proteinproben für die SDS-Page -----	39 -
Tab. 3: Zusammensetzung der Antikörperlösungen-----	40 -
Tab. 4: Verdünnung der Primäantikörper-----	40 -
Tab. 5: Verdünnung der Sekundäantikörper-----	40 -
Tab. 6: Top-Hits der Genexpressionsanalyse-----	135 -

#### 6.1.5 Literaturverzeichnis

1. Hodgkin. On some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen. *Med. Chir Trans.* **17**, 68-114 (1832).
2. Henle,W. & Henle,G. Evidence for an oncogenic potential of the Epstein-Barr virus. *Cancer Res.* **33**, 1419-1423 (1973).
3. Klucis,E., Jackson,L. & Parsons,P.G. Survey of human lymphoblastoid cell lines and primary cultures of normal and leukaemic leukocytes for oncornavirus production. *Int. J. Cancer* **18**, 413-420 (1976).
4. HOFFMAN,G.T. & ROTTINO,A. Phase microscopy studies of Hodgkin's disease lymph nodes in relation to histogenesis of the Sternberg-Reed cell. *Blood* **5**, 74-8, illust (1950).
5. Küppers,R., Re,D., Wolf,J. & Diehl,V. Zellbiologie des Morbus Hodgkin. *Onkologe* **6**, (2000).
6. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood* **89**, 3909-3918 (1997).
7. Virchow R. Weisses Blut. *Natur- und Heilkunde* **36**, 151-156 (1845).
8. Rai,K.R. *et al.* Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **46**, 219-234 (1975).

9. Binet, J.L. *et al.* A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* **48**, 198-206 (1981).
10. Hallek, M. *et al.* Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* **111**, 5446-5456 (2008).
11. Richter, M.N. Generalized Reticular Cell Sarcoma of Lymph Nodes Associated with Lymphatic Leukemia. *Am. J. Pathol.* **4**, 285-292 (1928).
12. Jain, P. & O'Brien, S. Richter's transformation in chronic lymphocytic leukemia. *Oncology (Williston Park)* **26**, 1146-1152 (2012).
13. Matutes, E. *et al.* The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia* **8**, 1640-1645 (1994).
14. Fais, F. *et al.* Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J. Clin. Invest* **102**, 1515-1525 (1998).
15. Hamblin, T.J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D.G. & Stevenson, F.K. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **94**, 1848-1854 (1999).
16. Rosenwald, A. *et al.* Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J. Exp. Med.* **194**, 1639-1647 (2001).
17. Chen, L. *et al.* Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **100**, 4609-4614 (2002).
18. Wiestner, A. *et al.* ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* **101**, 4944-4951 (2003).
19. Pesando, J.M., Stucki, M. & Hoffman, P. Altered expression of surface antigens with appearance of HLA class II molecules on a malignant human B-cell line. *Hum. Immunol.* **19**, 235-243 (1987).
20. Grammer, A.C., McFarland, R.D., Heaney, J., Darnell, B.F. & Lipsky, P.E. Expression, regulation, and function of B cell-expressed CD154 in germinal centers. *J. Immunol.* **163**, 4150-4159 (1999).
21. Damle, R.N. *et al.* Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **94**, 1840-1847 (1999).
22. Rassenti, L.Z. *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.* **351**, 893-901 (2004).
23. Crespo, M. *et al.* ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1764-1775 (2003).

24. Dohner, H. *et al.* Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **343**, 1910-1916 (2000).
25. Calin, G.A. *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* **99**, 15524-15529 (2002).
26. Zenz, T., Mertens, D., Kuppers, R., Dohner, H. & Stilgenbauer, S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 37-50 (2010).
27. Lavin, M.F. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 759-769 (2008).
28. Zenz, T. *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* **112**, 3322-3329 (2008).
29. Glick, B., Chang, T.S. & Jackson, L. The bursa of fabricius and antibody production. *Poultry Science* **35**, 224-225 (1956).
30. Cooper, M.D. & Alder, M.N. The evolution of adaptive immune systems. *Cell* **124**, 815-822 (2006).
31. FAGRAEUS, A. The plasma cellular reaction and its relation to the formation of antibodies in vitro. *J. Immunol.* **58**, 1-13 (1948).
32. Burnet FM. A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *Aust J Sci.* **20**, 67-69 (1957).
33. Burnet, F.M. A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *CA Cancer J Clin.* **26**, 119-121 (1976).
34. Brack, C., Hirama, M., Lenhard-Schuller, R. & Tonegawa, S. A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell* **15**, 1-14 (1978).
35. Kenneth Murphy. *Janeways's Immunobiology*. Taylor & Francis Ltd., (2011).
36. Esplin, B.L., Welner, R.S., Zhang, Q., Borghesi, L.A. & Kincade, P.W. A differentiation pathway for B1 cells in adult bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **106**, 5773-5778 (2009).
37. Ghosn, E.E., Sadate-Ngatchou, P., Yang, Y., Herzenberg, L.A. & Herzenberg, L.A. Distinct progenitors for B-1 and B-2 cells are present in adult mouse spleen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **108**, 2879-2884 (2011).
38. Montecino-Rodriguez, E., Leathers, H. & Dorshkind, K. Identification of a B-1 B cell-specified progenitor. *Nat. Immunol.* **7**, 293-301 (2006).
39. Hardy, R.R. B-1 B cell development. *J Immunol.* **177**, 2749-2754 (2006).
40. Cambier, J.C., Gauld, S.B., Merrell, K.T. & Vilen, B.J. B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells? *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 633-643 (2007).

41. Montecino-Rodriguez,E. & Dorshkind,K. B-1 B cell development in the fetus and adult. *Immunity*. **36**, 13-21 (2012).
42. LeBien,T.W. & Tedder,T.F. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* **112**, 1570-1580 (2008).
43. Hombach,J., Tsubata,T., Leclercq,L., Stappert,H. & Reth,M. Molecular components of the B-cell antigen receptor complex of the IgM class. *Nature* **343**, 760-762 (1990).
44. Yamanashi,Y., Kakiuchi,T., Mizuguchi,J., Yamamoto,T. & Toyoshima,K. Association of B cell antigen receptor with protein tyrosine kinase Lyn. *Science* **251**, 192-194 (1991).
45. Law,D.A., Chan,V.W., Datta,S.K. & DeFranco,A.L. B-cell antigen receptor motifs have redundant signalling capabilities and bind the tyrosine kinases PTK72, Lyn and Fyn. *Curr. Biol.* **3**, 645-657 (1993).
46. Johnson,S.A. *et al.* Phosphorylated immunoreceptor signaling motifs (ITAMs) exhibit unique abilities to bind and activate Lyn and Syk tyrosine kinases. *J Immunol.* **155**, 4596-4603 (1995).
47. Kabak,S. *et al.* The direct recruitment of BLNK to immunoglobulin alpha couples the B-cell antigen receptor to distal signaling pathways. *Mol. Cell Biol.* **22**, 2524-2535 (2002).
48. Hendriks,R.W., Yuvaraj,S. & Kil,L.P. Targeting Bruton's tyrosine kinase in B cell malignancies. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 219-232 (2014).
49. Watanabe,D. *et al.* Four tyrosine residues in phospholipase C-gamma 2, identified as Btk-dependent phosphorylation sites, are required for B cell antigen receptor-coupled calcium signaling. *J. Biol. Chem.* **276**, 38595-38601 (2001).
50. Yasuda,T. *et al.* Cbl suppresses B cell receptor-mediated phospholipase C (PLC)-gamma2 activation by regulating B cell linker protein-PLC-gamma2 binding. *J. Exp. Med.* **191**, 641-650 (2000).
51. Packard,T.A. & Cambier,J.C. B lymphocyte antigen receptor signaling: initiation, amplification, and regulation. *F1000Prime. Rep.* **5**, 40 (2013).
52. Porta,C., Paglino,C. & Mosca,A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Front Oncol.* **4**, 64 (2014).
53. Aiba,Y. *et al.* Activation of RasGRP3 by phosphorylation of Thr-133 is required for B cell receptor-mediated Ras activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 16612-16617 (2004).
54. Muller,M.R. & Rao,A. NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 645-656 (2010).
55. Nossal,G.J. Molecular and cellular aspects of immunologic tolerance. *Eur. J Biochem.* **202**, 729-737 (1991).
56. Yarkoni,Y., Getahun,A. & Cambier,J.C. Molecular underpinning of B-cell anergy. *Immunol. Rev.* **237**, 249-263 (2010).

57. Shaw, J.P. *et al.* Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science*. 1988. 241: 202-205. *J Immunol.* **185**, 4972-4975 (2010).
58. Goodridge, H.S., Simmons, R.M. & Underhill, D.M. Dectin-1 stimulation by *Candida albicans* yeast or zymosan triggers NFAT activation in macrophages and dendritic cells. *J Immunol.* **178**, 3107-3115 (2007).
59. 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.* **284**, 33719-33728 (2009).
60. Crist, S.A., Sprague, D.L. & Ratliff, T.L. Nuclear factor of activated T cells (NFAT) mediates CD154 expression in megakaryocytes. *Blood* **111**, 3553-3561 (2008).
61. Hogan, P.G., Chen, L., Nardone, J. & Rao, A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* **17**, 2205-2232 (2003).
62. Muller, M.R. & Rao, A. NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 645-656 (2010).
63. Jauliac, S. *et al.* The role of NFAT transcription factors in integrin-mediated carcinoma invasion. *Nat. Cell Biol.* **4**, 540-544 (2002).
64. Flockhart, R.J., Armstrong, J.L., Reynolds, N.J. & Lovat, P.E. NFAT signalling is a novel target of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *Br. J Cancer* **101**, 1448-1455 (2009).
65. Buchholz, M. *et al.* Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca<sup>2+</sup>/calcineurin signaling pathway. *EMBO J* **25**, 3714-3724 (2006).
66. Gregory, M.A. *et al.* Wnt/Ca<sup>2+</sup>/NFAT signaling maintains survival of Ph<sup>+</sup> leukemia cells upon inhibition of Bcr-Abl. *Cancer Cell* **18**, 74-87 (2010).
67. Medyouf, H. *et al.* Targeting calcineurin activation as a therapeutic strategy for T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Med.* **13**, 736-741 (2007).
68. Le Roy, C. *et al.* The degree of BCR and NFAT activation predicts clinical outcomes in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **120**, 356-365 (2012).
69. Marafioti, T. *et al.* The NFATc1 transcription factor is widely expressed in white cells and translocates from the cytoplasm to the nucleus in a subset of human lymphomas. *Br. J. Haematol.* **128**, 333-342 (2005).
70. Deglesne, P.A. *et al.* Survival response to B-cell receptor ligation is restricted to progressive chronic lymphocytic leukemia cells irrespective of Zap70 expression. *Cancer Res.* **66**, 7158-7166 (2006).
71. Duhren-von Minden, M. *et al.* Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling. *Nature* **489**, 309-312 (2012).
72. Chiorazzi, N. & Efremov, D.G. Chronic lymphocytic leukemia: a tale of one or two signals? *Cell Res.* **23**, 182-185 (2013).

73. Chiorazzi,N. & Ferrarini,M. B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 841-894 (2003).
74. Agathangelidis,A. *et al.* Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies. *Blood* **119**, 4467-4475 (2012).
75. Garcia-Munoz,R., Galiacho,V.R. & Llorente,L. Immunological aspects in chronic lymphocytic leukemia (CLL) development. *Ann. Hematol.* **91**, 981-996 (2012).
76. Muzio,M. *et al.* Constitutive activation of distinct BCR-signaling pathways in a subset of CLL patients: a molecular signature of anergy. *Blood* **112**, 188-195 (2008).
77. Apollonio,B. *et al.* Targeting B-cell anergy in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **121**, 3879-8 (2013).
78. Zapata,J.M., Krajewska,M., Morse,H.C., III, Choi,Y. & Reed,J.C. TNF receptor-associated factor (TRAF) domain and Bcl-2 cooperate to induce small B cell lymphoma/chronic lymphocytic leukemia in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 16600-16605 (2004).
79. Planelles,L. *et al.* APRIL promotes B-1 cell-associated neoplasm. *Cancer Cell* **6**, 399-408 (2004).
80. ter Brugge,P.J. *et al.* A mouse model for chronic lymphocytic leukemia based on expression of the SV40 large T antigen. *Blood* **114**, 119-127 (2009).
81. Bichi,R. *et al.* Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 6955-6960 (2002).
82. Russo,G. *et al.* Molecular analysis of a t(14;14) translocation in leukemic T-cells of an ataxia telangiectasia patient. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **86**, 602-606 (1989).
83. Virgilio,L. *et al.* Chromosome walking on the TCL1 locus involved in T-cell neoplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 9275-9279 (1993).
84. Narducci,M.G. *et al.* The murine Tc1 oncogene: embryonic and lymphoid cell expression. *Oncogene* **15**, 919-926 (1997).
85. Virgilio,L. *et al.* Deregulated expression of TCL1 causes T cell leukemia in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 3885-3889 (1998).
86. Virgilio,L. *et al.* Identification of the TCL1 gene involved in T-cell malignancies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 12530-12534 (1994).
87. Takizawa,J. *et al.* Expression of the TCL1 gene at 14q32 in B-cell malignancies but not in adult T-cell leukemia. *Jpn. J. Cancer Res.* **89**, 712-718 (1998).
88. Narducci,M.G. *et al.* Regulation of TCL1 expression in B- and T-cell lymphomas and reactive lymphoid tissues. *Cancer Res.* **60**, 2095-2100 (2000).
89. Gu,H., Zou,Y.R. & Rajewsky,K. Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell* **73**, 1155-1164 (1993).

90. Sternberg,N., Hamilton,D., Austin,S., Yarmolinsky,M. & Hoess,R. Site-specific recombination and its role in the life cycle of bacteriophage P1. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **45 Pt 1**, 297-309 (1981).
91. Stricklett,P.K., Nelson,R.D. & Kohan,D.E. Site-specific recombination using an epitope tagged bacteriophage P1 Cre recombinase. *Gene* **215**, 415-423 (1998).
92. Guo,F., Gopaul,D.N. & van Duyne,G.D. Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse. *Nature* **389**, 40-46 (1997).
93. Bhattacharyya,S. *et al.* NFATc1 affects mouse splenic B cell function by controlling the calcineurin--NFAT signaling network. *J. Exp. Med.* **208**, 823-839 (2011).
94. Nadler,L.M. *et al.* B4, a human B lymphocyte-associated antigen expressed on normal, mitogen-activated, and malignant B lymphocytes. *J. Immunol.* **131**, 244-250 (1983).
95. Sakaguchi,N., Kashiwamura,S., Kimoto,M., Thalmann,P. & Melchers,F. B lymphocyte lineage-restricted expression of mb-1, a gene with CD3-like structural properties. *EMBO J.* **7**, 3457-3464 (1988).
96. Glynne,R., Ghandour,G., Rayner,J., Mack,D.H. & Goodnow,C.C. B-lymphocyte quiescence, tolerance and activation as viewed by global gene expression profiling on microarrays. *Immunol. Rev.* **176**, 216-246 (2000).
97. Merrell,K.T. *et al.* Identification of anergic B cells within a wild-type repertoire. *Immunity.* **25**, 953-962 (2006).
98. Ota,S. *et al.* The RING finger domain of Cbl is essential for negative regulation of the Syk tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* **275**, 414-422 (2000).
99. Lineberry,N.B. *et al.* Cutting edge: The transmembrane E3 ligase GRAIL ubiquitinates the costimulatory molecule CD40 ligand during the induction of T cell anergy. *J. Immunol.* **181**, 1622-1626 (2008).
100. Anandasabapathy,N. *et al.* GRAIL: an E3 ubiquitin ligase that inhibits cytokine gene transcription is expressed in anergic CD4+ T cells. *Immunity.* **18**, 535-547 (2003).
101. Harris,J.E. *et al.* Early growth response gene-2, a zinc-finger transcription factor, is required for full induction of clonal anergy in CD4+ T cells. *J Immunol.* **173**, 7331-7338 (2004).
102. Duckworth,A., Glenn,M., Slupsky,J.R., Packham,G. & Kalakonda,N. Variable induction of PRDM1 and differentiation in chronic lymphocytic leukemia is associated with anergy. *Blood* **123**, 3277-3285 (2014).
103. Johanson,R.A., Sarau,H.M., Foley,J.J. & Slemmon,J.R. Calmodulin-binding peptide PEP-19 modulates activation of calmodulin kinase II In situ. *J Neurosci.* **20**, 2860-2866 (2000).
104. Huang,K.P. *et al.* Neurogranin/RC3 enhances long-term potentiation and learning by promoting calcium-mediated signaling. *J Neurosci.* **24**, 10660-10669 (2004).

105. Ozdener,F., Dangelmaier,C., Ashby,B., Kunapuli,S.P. & Daniel,J.L. Activation of phospholipase Cgamma2 by tyrosine phosphorylation. *Mol. Pharmacol.* **62**, 672-679 (2002).
106. Chiorazzi,N., Allen,S.L. & Ferrarini,M. Clinical and laboratory parameters that define clinically relevant B-CLL subgroups. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **294**, 109-133 (2005).
107. Inabe,K. *et al.* Vav3 modulates B cell receptor responses by regulating phosphoinositide 3-kinase activation. *J Exp. Med.* **195**, 189-200 (2002).
108. Drake,L., McGovern-Brindisi,E.M. & Drake,J.R. BCR ubiquitination controls BCR-mediated antigen processing and presentation. *Blood* **108**, 4086-4093 (2006).
109. Hancer,V.S., Kose,M., Diz-Kucukkaya,R., Yavuz,A.S. & Aktan,M. Activation-induced cytidine deaminase mRNA levels in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma* **52**, 79-84 (2011).
110. Muramatsu,M. *et al.* Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* **102**, 553-563 (2000).
111. Poe,J.C. *et al.* EndoU is a novel regulator of AICD during peripheral B cell selection. *J. Exp. Med.* **211**, 57-69 (2014).
112. Zhang,J., Billingsley,M.L., Kincaid,R.L. & Siraganian,R.P. Phosphorylation of Syk activation loop tyrosines is essential for Syk function. An in vivo study using a specific anti-Syk activation loop phosphotyrosine antibody. *J Biol. Chem.* **275**, 35442-35447 (2000).
113. Majolini,M.B. *et al.* Expression of the T-cell-specific tyrosine kinase Lck in normal B-1 cells and in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* **91**, 3390-3396 (1998).
114. Talab,F., Allen,J.C., Thompson,V., Lin,K. & Slupsky,J.R. LCK is an important mediator of B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia cells. *Mol. Cancer Res.* **11**, 541-554 (2013).
115. Rawlings,D.J. *et al.* Activation of BTK by a phosphorylation mechanism initiated by SRC family kinases. *Science* **271**, 822-825 (1996).
116. Yasuda,T. *et al.* Erk kinases link pre-B cell receptor signaling to transcriptional events required for early B cell expansion. *Immunity.* **28**, 499-508 (2008).
117. Craxton,A., Jiang,A., Kurosaki,T. & Clark,E.A. Syk and Bruton's tyrosine kinase are required for B cell antigen receptor-mediated activation of the kinase Akt. *J Biol. Chem.* **274**, 30644-30650 (1999).
118. Shaw,J.P. *et al.* Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science* **241**, 202-205 (1988).
119. Ullman,K.S., Northrop,J.P., Verweij,C.L. & Crabtree,G.R. Transmission of signals from the T lymphocyte antigen receptor to the genes responsible for cell proliferation and immune function: the missing link. *Annu. Rev. Immunol.* **8**, 421-452 (1990).

120. Yaseen,N.R., Maizel,A.L., Wang,F. & Sharma,S. Comparative analysis of NFAT (nuclear factor of activated T cells) complex in human T and B lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **268**, 14285-14293 (1993).
121. Timmerman,L.A. *et al.* Redundant expression but selective utilization of nuclear factor of activated T cells family members. *J. Immunol.* **159**, 2735-2740 (1997).
122. Ho,S.N. *et al.* NFATc3, a lymphoid-specific NFATc family member that is calcium-regulated and exhibits distinct DNA binding specificity. *J. Biol. Chem.* **270**, 19898-19907 (1995).
123. Venkataraman,L. *et al.* Cyclosporin-A sensitive induction of NF-AT in murine B cells. *Immunity.* **1**, 189-196 (1994).
124. Peng,S.L., Gerth,A.J., Ranger,A.M. & Glimcher,L.H. NFATc1 and NFATc2 together control both T and B cell activation and differentiation. *Immunity.* **14**, 13-20 (2001).
125. Berland,R. & Wortis,H.H. An NFAT-dependent enhancer is necessary for anti-IgM-mediated induction of murine CD5 expression in primary splenic B cells. *J. Immunol.* **161**, 277-285 (1998).
126. Berland,R. & Wortis,H.H. Normal B-1a cell development requires B cell-intrinsic NFATc1 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 13459-13464 (2003).
127. Li-Weber,M., Laur,O. & Krammer,P.H. Novel Egr/NF-AT composite sites mediate activation of the CD95 (APO-1/Fas) ligand promoter in response to T cell stimulation. *Eur. J. Immunol.* **29**, 3017-3027 (1999).
128. Qian,D., Mollenauer,M.N. & Weiss,A. Dominant-negative zeta-associated protein 70 inhibits T cell antigen receptor signaling. *J. Exp. Med.* **183**, 611-620 (1996).
129. Martelli,M.P., Lin,H., Zhang,W., Samelson,L.E. & Bierer,B.E. Signaling via LAT (linker for T-cell activation) and Syk/ZAP70 is required for ERK activation and NFAT transcriptional activation following CD2 stimulation. *Blood* **96**, 2181-2190 (2000).
130. Chan,A.C., Iwashima,M., Turck,C.W. & Weiss,A. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell* **71**, 649-662 (1992).
131. Schweighoffer,E., Vanes,L., Mathiot,A., Nakamura,T. & Tybulewicz,V.L. Unexpected requirement for ZAP-70 in pre-B cell development and allelic exclusion. *Immunity.* **18**, 523-533 (2003).
132. Del Poeta,G. *et al.* Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **98**, 2633-2639 (2001).
133. Lund,F.E., Yu,N., Kim,K.M., Reth,M. & Howard,M.C. Signaling through CD38 augments B cell antigen receptor (BCR) responses and is dependent on BCR expression. *J. Immunol.* **157**, 1455-1467 (1996).
134. Vaeth,M. *et al.* Dependence on nuclear factor of activated T-cells (NFAT) levels discriminates conventional T cells from Foxp3+ regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **109**, 16258-16263 (2012).

135. Schuh,K., Avots,A., Tony,H.P., Serfling,E. & Kneitz,C. Nuclear NF-ATp is a hallmark of unstimulated B cells from B-CLL patients. *Leuk. Lymphoma* **23**, 583-592 (1996).
136. Kneitz,C. *et al.* The CD23b promoter is a target for NF-AT transcription factors in B-CLL cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1588**, 41-47 (2002).
137. Royston,I., Majda,J.A., Baird,S.M., Meserve,B.L. & Griffiths,J.C. Human T cell antigens defined by monoclonal antibodies: the 65,000-dalton antigen of T cells (T65) is also found on chronic lymphocytic leukemia cells bearing surface immunoglobulin. *J. Immunol.* **125**, 725-731 (1980).
138. Yoshida,H. *et al.* The transcription factor NF-ATc1 regulates lymphocyte proliferation and Th2 cytokine production. *Immunity.* **8**, 115-124 (1998).
139. Kong,G.H., Bu,J.Y., Kurosaki,T., Shaw,A.S. & Chan,A.C. Reconstitution of Syk function by the ZAP-70 protein tyrosine kinase. *Immunity.* **2**, 485-492 (1995).
140. BILLINGHAM,R.E., BRENT,L. & MEDAWAR,P.B. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* **172**, 603-606 (1953).
141. Burnet,F.M. The clonal selection theory of acquired immunity. Cambridge University Press, New York (1959).
142. Asherson,G.L. & Barnes,R.M. Classification of immunological unresponsiveness and tolerance. *Proc. R. Soc. Med.* **66**, 468-471 (1973).
143. Kay,T.W., Pike,B.L. & Nossal,G.J. Mechanisms of clonal abortion tolerogenesis. IV. Verification of the hypothesis in living mice. *J. Immunol.* **124**, 1579-1584 (1980).
144. Nossal,G.J. & Pike,B.L. Mechanisms of clonal abortion tolerogenesis. I. Response of immature hapten-specific B lymphocytes. *J. Exp. Med.* **148**, 1161-1170 (1978).
145. Waters,C.A., Pilarski,L.M., Wegmann,T.G. & Diener,E. Tolerance induction during ontogeny. I. Presence of active suppression in mice rendered tolerant to human gamma-globulin in utero correlates with the breakdown of the tolerant state. *J. Exp. Med.* **149**, 1134-1151 (1979).
146. Nossal,G.J. & Pike,B.L. Clonal anergy: persistence in tolerant mice of antigen-binding B lymphocytes incapable of responding to antigen or mitogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **77**, 1602-1606 (1980).
147. Pike,B.L., Boyd,A.W. & Nossal,G.J. Clonal anergy: the universally anergic B lymphocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **79**, 2013-2017 (1982).
148. Dorfman,D.M. *et al.* In vivo expression of B7-1 and B7-2 by follicular lymphoma cells can prevent induction of T-cell anergy but is insufficient to induce significant T-cell proliferation. *Blood* **90**, 4297-4306 (1997).
149. Buhmann,R., Nolte,A., Westhaus,D., Emmerich,B. & Hallek,M. CD40-activated B-cell chronic lymphocytic leukemia cells for tumor immunotherapy: stimulation of allogeneic versus autologous T cells generates different types of effector cells. *Blood* **93**, 1992-2002 (1999).

150. Frydecka,I. *et al.* Alterations of the expression of T-cell-related costimulatory CD28 and downregulatory CD152 (CTLA-4) molecules in patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Cancer* **90**, 2042-2048 (2004).
151. Biagi,E. *et al.* Molecular transfer of CD40 and OX40 ligands to leukemic human B cells induces expansion of autologous tumor-reactive cytotoxic T lymphocytes. *Blood* **105**, 2436-2442 (2005).
152. Motta,M. *et al.* Increased expression of CD152 (CTLA-4) by normal T lymphocytes in untreated patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* **19**, 1788-1793 (2005).
153. Schroeder,H.W., Jr. & Dighiero,G. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. *Immunol. Today* **15**, 288-294 (1994).
154. Plomann,M. *et al.* PACSIN, a brain protein that is upregulated upon differentiation into neuronal cells. *Eur. J. Biochem.* **256**, 201-211 (1998).
155. Qualmann,B. & Kelly,R.B. Syndapin isoforms participate in receptor-mediated endocytosis and actin organization. *J. Cell Biol.* **148**, 1047-1062 (2000).
156. DiProspero,N.A. *et al.* Early changes in Huntington's disease patient brains involve alterations in cytoskeletal and synaptic elements. *J. Neurocytol.* **33**, 517-533 (2004).
157. Modregger,J., DiProspero,N.A., Charles,V., Tagle,D.A. & Plomann,M. PACSIN 1 interacts with huntingtin and is absent from synaptic varicosities in presymptomatic Huntington's disease brains. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 2547-2558 (2002).
158. Esashi,E., Bao,M., Wang,Y.H., Cao,W. & Liu,Y.J. PACSIN1 regulates the TLR7/9-mediated type I interferon response in plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **42**, 573-579 (2012).
159. Lee,A., Liu,S. & Wang,T. Identification of novel human kinases that suppress hepatitis C virus infection. *J. Viral Hepat.* (2013).
160. Fujimoto,T. *et al.* Identification of a novel CaMKK substrate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **410**, 45-51 (2011).
161. Veillette,A., Foss,F.M., Sausville,E.A., Bolen,J.B. & Rosen,N. Expression of the lck tyrosine kinase gene in human colon carcinoma and other non-lymphoid human tumor cell lines. *Oncogene Res.* **1**, 357-374 (1987).
162. Marth,J.D. *et al.* Localization of a lymphocyte-specific protein tyrosine kinase gene (lck) at a site of frequent chromosomal abnormalities in human lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **83**, 7400-7404 (1986).
163. Marth,J.D. *et al.* Regulation of pp56lck during T-cell activation: functional implications for the src-like protein tyrosine kinases. *EMBO J.* **6**, 2727-2734 (1987).
164. Koga,Y. *et al.* A human T cell-specific cDNA clone (YT16) encodes a protein with extensive homology to a family of protein-tyrosine kinases. *Eur. J. Immunol.* **16**, 1643-1646 (1986).

165. Fujimaki,W. *et al.* Functional uncoupling of T-cell receptor engagement and Lck activation in anergic human thymic CD4+ T cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 17455-17460 (2001).
166. Perlmutter,R.M. *et al.* Structure and expression of lck transcripts in human lymphoid cells. *J. Cell Biochem.* **38**, 117-126 (1988).
167. Ulivieri,C., Valensin,S., Majolini,M.B., Matthews,R.J. & Baldari,C.T. Normal B-1 cell development but defective BCR signaling in Lck-/- mice. *Eur. J. Immunol.* **33**, 441-445 (2003).
168. Dal Porto,J.M., Burke,K. & Cambier,J.C. Regulation of BCR signal transduction in B-1 cells requires the expression of the Src family kinase Lck. *Immunity.* **21**, 443-453 (2004).
169. Frances,R., Tumang,J.R. & Rothstein,T.L. B-1 cells are deficient in Lck: defective B cell receptor signal transduction in B-1 cells occurs in the absence of elevated Lck expression. *J. Immunol.* **175**, 27-31 (2005).
170. Paterson,J.C. *et al.* The differential expression of LCK and BAFF-receptor and their role in apoptosis in human lymphomas. *Haematologica* **91**, 772-780 (2006).
171. Huber,S. *et al.* Sorafenib induces cell death in chronic lymphocytic leukemia by translational downregulation of Mcl-1. *Leukemia* **25**, 838-847 (2011).
172. Harr,M.W. *et al.* Inhibition of Lck enhances glucocorticoid sensitivity and apoptosis in lymphoid cell lines and in chronic lymphocytic leukemia. *Cell Death. Differ.* **17**, 1381-1391 (2010).
173. Bachmaier,K. *et al.* Negative regulation of lymphocyte activation and autoimmunity by the molecular adaptor Cbl-b. *Nature* **403**, 211-216 (2000).
174. Heissmeyer,V. & Rao,A. E3 ligases in T cell anergy--turning immune responses into tolerance. *Sci. STKE.* **2004**, e29 (2004).
175. Katkere,B., Rosa,S. & Drake,J.R. The Syk-binding ubiquitin ligase c-Cbl mediates signaling-dependent B cell receptor ubiquitination and B cell receptor-mediated antigen processing and presentation. *J. Biol. Chem.* **287**, 16636-16644 (2012).
176. Rao,N. *et al.* The non-receptor tyrosine kinase Syk is a target of Cbl-mediated ubiquitylation upon B-cell receptor stimulation. *EMBO J.* **20**, 7085-7095 (2001).
177. Sohn,H.W., Gu,H. & Pierce,S.K. Cbl-b negatively regulates B cell antigen receptor signaling in mature B cells through ubiquitination of the tyrosine kinase Syk. *J. Exp. Med.* **197**, 1511-1524 (2003).
178. Yasuda,T. *et al.* Cbl-b positively regulates Btk-mediated activation of phospholipase C-gamma2 in B cells. *J. Exp. Med.* **196**, 51-63 (2002).
179. Shao,Y., Yang,C., Elly,C. & Liu,Y.C. Differential regulation of the B cell receptor-mediated signaling by the E3 ubiquitin ligase Cbl. *J. Biol. Chem.* **279**, 43646-43653 (2004).

180. DeFranco,A.L., Chan,V.W. & Lowell,C.A. Positive and negative roles of the tyrosine kinase Lyn in B cell function. *Semin. Immunol.* **10**, 299-307 (1998).
181. Kitaura,Y. *et al.* Control of the B cell-intrinsic tolerance programs by ubiquitin ligases Cbl and Cbl-b. *Immunity.* **26**, 567-578 (2007).
182. Su,L., Lineberry,N., Huh,Y., Soares,L. & Fathman,C.G. A novel E3 ubiquitin ligase substrate screen identifies Rho guanine dissociation inhibitor as a substrate of gene related to anergy in lymphocytes. *J. Immunol.* **177**, 7559-7566 (2006).
183. Soto-Nieves,N. *et al.* Transcriptional complexes formed by NFAT dimers regulate the induction of T cell tolerance. *J. Exp. Med.* **206**, 867-876 (2009).
184. Hsiao,H.W. *et al.* Deltex1 is a target of the transcription factor NFAT that promotes T cell anergy. *Immunity.* **31**, 72-83 (2009).
185. Zheng,Y., Zha,Y., Driessens,G., Locke,F. & Gajewski,T.F. Transcriptional regulator early growth response gene 2 (Egr2) is required for T cell anergy in vitro and in vivo. *J Exp. Med.* **209**, 2157-2163 (2012).
186. Li,Q., Sun,X., Wu,J., Lin,Z. & Luo,Y. PKD2 interacts with Lck and regulates NFAT activity in T cells. *BMB. Rep.* **42**, 35-40 (2009).
187. Sugie,K., Jeon,M.S. & Grey,H.M. Activation of naive CD4 T cells by anti-CD3 reveals an important role for Fyn in Lck-mediated signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 14859-14864 (2004).
188. Jantus,L.E. *et al.* BCL6: somatic mutations and expression in early-stage chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma* **50**, 773-780 (2009).
189. Cattoretti,G. *et al.* BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. *Blood* **86**, 45-53 (1995).
190. Staudt,L.M., Dent,A.L., Shaffer,A.L. & Yu,X. Regulation of lymphocyte cell fate decisions and lymphomagenesis by BCL-6. *Int. Rev. Immunol.* **18**, 381-403 (1999).
191. Tunyaplin,C. *et al.* Direct repression of prdm1 by Bcl-6 inhibits plasmacytic differentiation. *J. Immunol.* **173**, 1158-1165 (2004).
192. Shaffer,A.L. *et al.* BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity.* **13**, 199-212 (2000).
193. Katzav,S., Martin-Zanca,D. & Barbacid,M. vav, a novel human oncogene derived from a locus ubiquitously expressed in hematopoietic cells. *EMBO J.* **8**, 2283-2290 (1989).
194. Prieto-Sanchez,R.M. *et al.* Overexpression of the VAV proto-oncogene product is associated with B-cell chronic lymphocytic leukaemia displaying loss on 13q. *Br. J. Haematol.* **133**, 642-645 (2006).
195. Wu,J., Katzav,S. & Weiss,A. A functional T-cell receptor signaling pathway is required for p95vav activity. *Mol. Cell Biol.* **15**, 4337-4346 (1995).

196. Inabe,K. *et al.* Vav3 modulates B cell receptor responses by regulating phosphoinositide 3-kinase activation. *J. Exp. Med.* **195**, 189-200 (2002).
197. Vigorito,E., Gambardella,L., Colucci,F., McAdam,S. & Turner,M. Vav proteins regulate peripheral B-cell survival. *Blood* **106**, 2391-2398 (2005).
198. Kaminuma,O., Deckert,M., Elly,C., Liu,Y.C. & Altman,A. Vav-Rac1-mediated activation of the c-Jun N-terminal kinase/c-Jun/AP-1 pathway plays a major role in stimulation of the distal NFAT site in the interleukin-2 gene promoter. *Mol. Cell Biol.* **21**, 3126-3136 (2001).
199. Villalba,M., Hernandez,J., Deckert,M., Tanaka,Y. & Altman,A. Vav modulation of the Ras/MEK/ERK signaling pathway plays a role in NFAT activation and CD69 up-regulation. *Eur. J. Immunol.* **30**, 1587-1596 (2000).
200. Foucault,I. *et al.* The adaptor protein 3BP2 associates with VAV guanine nucleotide exchange factors to regulate NFAT activation by the B-cell antigen receptor. *Blood* **105**, 1106-1113 (2005).
201. Charvet,C., Canonigo,A.J., Billadeau,D.D. & Altman,A. Membrane localization and function of Vav3 in T cells depend on its association with the adapter SLP-76. *J. Biol. Chem.* **280**, 15289-15299 (2005).
202. Gulbins,E. *et al.* Tyrosine kinase-stimulated guanine nucleotide exchange activity of Vav in T cell activation. *Science* **260**, 822-825 (1993).
203. Evans,G.A., Howard,O.M., Erwin,R. & Farrar,W.L. Interleukin-2 induces tyrosine phosphorylation of the vav proto-oncogene product in human T cells: lack of requirement for the tyrosine kinase lck. *Biochem. J.* **294 ( Pt 2)**, 339-342 (1993).
204. Kaiser,P. *et al.* A human ubiquitin-conjugating enzyme homologous to yeast UBC8. *J. Biol. Chem.* **269**, 8797-8802 (1994).
205. Tezuka,T. *et al.* Physical and functional association of the cbl protooncogen product with an src-family protein tyrosine kinase, p53/56lyn, in the B cell antigen receptor-mediated signaling. *J. Exp. Med.* **183**, 675-680 (1996).
206. Yamamoto,M. *et al.* Key function for the Ubc13 E2 ubiquitin-conjugating enzyme in immune receptor signaling. *Nat. Immunol.* **7**, 962-970 (2006).
207. Hivroz,C., Grillot-Courvalin,C., Labaume,S., Miglierina,R. & Brouet,J.C. Cross-linking of membrane IgM on B CLL cells: dissociation between intracellular free Ca<sup>2+</sup> mobilization and cell proliferation. *Eur. J. Immunol.* **18**, 1811-1817 (1988).
208. Mockridge,C.I. *et al.* Reversible anergy of sIgM-mediated signaling in the two subsets of CLL defined by VH-gene mutational status. *Blood* **109**, 4424-4431 (2007).
209. Zupo,S. *et al.* CD38 expression distinguishes two groups of B-cell chronic lymphocytic leukemias with different responses to anti-IgM antibodies and propensity to apoptosis. *Blood* **88**, 1365-1374 (1996).
210. Dameshek,W. Chronic lymphocytic leukemia--an accumulative disease of immunologically incompetent lymphocytes. *Blood* **29**, Suppl-84 (1967).

211. McConkey,D.J. *et al.* Apoptosis sensitivity in chronic lymphocytic leukemia is determined by endogenous endonuclease content and relative expression of BCL-2 and BAX. *J. Immunol.* **156**, 2624-2630 (1996).
212. Kitada,S. *et al.* Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood* **91**, 3379-3389 (1998).
213. Collins,R.J. *et al.* Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture in vitro. *Br. J. Haematol.* **71**, 343-350 (1989).
214. Lagneaux,L., Delforge,A., Bron,D., De Bruyn,C. & Stryckmans,P. Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood* **91**, 2387-2396 (1998).
215. Burger,J.A. *et al.* Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood* **96**, 2655-2663 (2000).
216. Cordingley,F.T. *et al.* Tumour necrosis factor as an autocrine tumour growth factor for chronic B-cell malignancies. *Lancet* **1**, 969-971 (1988).
217. Furman,R.R., Asgary,Z., Mascarenhas,J.O., Liou,H.C. & Schattner,E.J. Modulation of NF-kappa B activity and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *J. Immunol.* **164**, 2200-2206 (2000).
218. Bernal,A. *et al.* Survival of leukemic B cells promoted by engagement of the antigen receptor. *Blood* **98**, 3050-3057 (2001).
219. Pede,V. *et al.* CLL cells respond to B-Cell receptor stimulation with a microRNA/mRNA signature associated with MYC activation and cell cycle progression. *PLoS. One.* **8**, e60275 (2013).
220. Nagata,S. & Golstein,P. The Fas death factor. *Science* **267**, 1449-1456 (1995).
221. Krammer,P.H. CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv. Immunol.* **71**, 163-210 (1999).
222. De Fanis,U. *et al.* Altered constitutive and activation-induced expression of CD95 by B- and T-cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* **87**, 325-327 (2002).
223. De Fanis,U. *et al.* Differences in constitutive and activation-induced expression of CD69 and CD95 between normal and chronic lymphocytic leukemia B cells. *Oncol. Rep.* **10**, 653-658 (2003).
224. Gauld,S.B., Benschop,R.J., Merrell,K.T. & Cambier,J.C. Maintenance of B cell anergy requires constant antigen receptor occupancy and signaling. *Nat. Immunol.* **6**, 1160-1167 (2005).
225. Noorchashm,H. *et al.* Characterization of anergic anti-DNA B cells: B cell anergy is a T cell-independent and potentially reversible process. *Int. Immunol.* **11**, 765-776 (1999).

226. Juliusson,G. & Gahrton,G. Clinical implications of CLL cell proliferation in vitro. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* **30**, 399-401 (1988).
227. Sadamori,N., Matsui,S., Han,T. & Sandberg,A.A. Comparative results with various polyclonal B-cell activators in aneuploid chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.* **11**, 25-29 (1984).
228. Shlomchik,M.J. Sites and stages of autoreactive B cell activation and regulation. *Immunity.* **28**, 18-28 (2008).
229. Goodnow,C.C. *et al.* Self-tolerance checkpoints in B lymphocyte development. *Adv. Immunol.* **59**, 279-368 (1995).
230. Revy,P. *et al.* Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* **102**, 565-575 (2000).
231. Ramiro,A.R., Stavropoulos,P., Jankovic,M. & Nussenzweig,M.C. Transcription enhances AID-mediated cytidine deamination by exposing single-stranded DNA on the nontemplate strand. *Nat. Immunol.* **4**, 452-456 (2003).
232. Kuraoka,M. *et al.* Activation-induced cytidine deaminase mediates central tolerance in B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **108**, 11560-11565 (2011).
233. Zaheen,A. *et al.* AID constrains germinal center size by rendering B cells susceptible to apoptosis. *Blood* **114**, 547-554 (2009).
234. Okazaki,I.M. *et al.* Constitutive expression of AID leads to tumorigenesis. *J. Exp. Med.* **197**, 1173-1181 (2003).
235. Reiniger,L. *et al.* Richter's and prolymphocytic transformation of chronic lymphocytic leukemia are associated with high mRNA expression of activation-induced cytidine deaminase and aberrant somatic hypermutation. *Leukemia* **20**, 1089-1095 (2006).
236. Burkhardt,A.L., Brunswick,M., Bolen,J.B. & Mond,J.J. Anti-immunoglobulin stimulation of B lymphocytes activates src-related protein-tyrosine kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**, 7410-7414 (1991).
237. Clark,M.R. *et al.* The B cell antigen receptor complex: association of Ig-alpha and Ig-beta with distinct cytoplasmic effectors. *Science* **258**, 123-126 (1992).
238. Kurosaki,T. *et al.* Syk activation by the Src-family tyrosine kinase in the B cell receptor signaling. *J. Exp. Med.* **179**, 1725-1729 (1994).
239. Hsueh,R.C., Hammill,A.K., Marches,R., Uhr,J.W. & Scheuermann,R.H. Antigen receptor signaling induces differential tyrosine kinase activation and population stability in B-cell lymphoma. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **246**, 299-304 (1999).
240. Hsueh,R.C. & Scheuermann,R.H. Tyrosine kinase activation in the decision between growth, differentiation, and death responses initiated from the B cell antigen receptor. *Adv. Immunol.* **75**, 283-316 (2000).
241. Takata,M. *et al.* Tyrosine kinases Lyn and Syk regulate B cell receptor-coupled Ca<sup>2+</sup> mobilization through distinct pathways. *EMBO J.* **13**, 1341-1349 (1994).

242. Iwashima,M., Irving,B.A., van Oers,N.S., Chan,A.C. & Weiss,A. Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science* **263**, 1136-1139 (1994).
243. Karnitz,L. *et al.* Effects of p56lck deficiency on the growth and cytolytic effector function of an interleukin-2-dependent cytotoxic T-cell line. *Mol. Cell Biol.* **12**, 4521-4530 (1992).
244. Geneviev,H.C. *et al.* Expression of Bruton's tyrosine kinase protein within the B cell lineage. *Eur. J. Immunol.* **24**, 3100-3105 (1994).
245. Park,H. *et al.* Regulation of Btk function by a major autophosphorylation site within the SH3 domain. *Immunity.* **4**, 515-525 (1996).
246. Stevenson,F.K., Krysov,S., Davies,A.J., Steele,A.J. & Packham,G. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **118**, 4313-4320 (2011).
247. Pan,Z. *et al.* Discovery of selective irreversible inhibitors for Bruton's tyrosine kinase. *ChemMedChem.* **2**, 58-61 (2007).
248. Vetrie,D. *et al.* The gene involved in X-linked agammaglobulinaemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases. *Nature* **361**, 226-233 (1993).
249. Herman,S.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* **117**, 6287-6296 (2011).
250. Woyach,J.A. *et al.* Bruton's tyrosine kinase (BTK) function is important to the development and expansion of chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood* **123**, 1207-1213 (2014).
251. Sutherland,C.L., Heath,A.W., Pelech,S.L., Young,P.R. & Gold,M.R. Differential activation of the ERK, JNK, and p38 mitogen-activated protein kinases by CD40 and the B cell antigen receptor. *J. Immunol.* **157**, 3381-3390 (1996).
252. Richards,J.D., Dave,S.H., Chou,C.H., Mamchak,A.A. & DeFranco,A.L. Inhibition of the MEK/ERK signaling pathway blocks a subset of B cell responses to antigen. *J. Immunol.* **166**, 3855-3864 (2001).
253. Healy,J.I. *et al.* Different nuclear signals are activated by the B cell receptor during positive versus negative signaling. *Immunity.* **6**, 419-428 (1997).
254. Ringshausen,I. *et al.* Constitutively activated phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) is involved in the defect of apoptosis in B-CLL: association with protein kinase Cdelta. *Blood* **100**, 3741-3748 (2002).
255. Plate,J.M. PI3-kinase regulates survival of chronic lymphocytic leukemia B-cells by preventing caspase 8 activation. *Leuk. Lymphoma* **45**, 1519-1529 (2004).
256. Ranger,A.M. *et al.* Delayed lymphoid repopulation with defects in IL-4-driven responses produced by inactivation of NF-ATc. *Immunity.* **8**, 125-134 (1998).

257. Verrou,C., Zhang,Y., Zurn,C., Schamel,W.W. & Reth,M. Comparison of the tamoxifen regulated chimeric Cre recombinases MerCreMer and CreMer. *Biol. Chem.* **380**, 1435-1438 (1999).
258. Muise-Helmericks,R.C. & Rosen,N. Identification of a novel repressive element in the proximal lck promoter. *J Biol. Chem.* **270**, 27538-27543 (1995).

## 6.2 Ergebnisse

### 6.2.1 Bcl6 Expression in B-Zellen

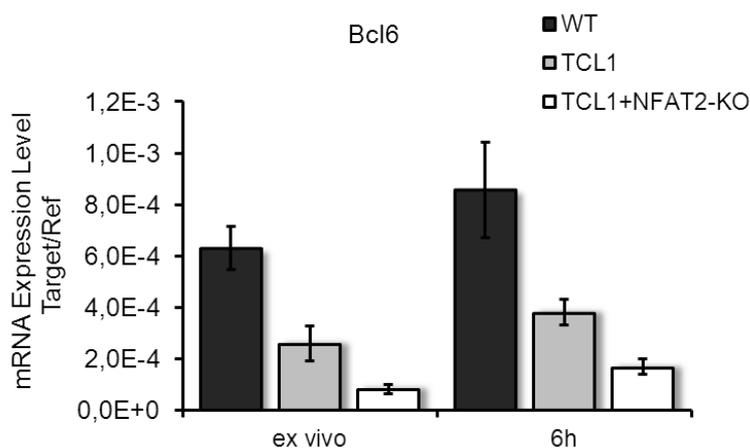


Abb. 43: Bcl6 Expression in WT B-Zellen ist erhöht

B-Zellen wurden aus Splenozyten mit magnetischen Beads negativ isoliert und ex vivo und 6 h nach Stimulation mit  $\alpha$ IgM (1 mg/ml) untersucht. Es ist die normalisierte Ratio der untersuchten Gene bezogen auf das Referenzgen Aktin dargestellt (n=4, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,005).

### 6.2.2 Regulierte Transkripte im E $\mu$ -TCL1-Modell

Gene Symbol	Gene Title	logFC	adj. p-value
Wdfy3	WD repeat and FYVE domain containing 3	3,4593	0,00250
Aicda	activation-induced cytidine deaminase	3,2873	0,00126
Rgl1	ral guanine nucleotide dissociation stimulator,-like 1	3,2598	0,00066
Rgs13	regulator of G-protein signaling 13	2,7799	0,00370
Tppp3	tubulin polymerization-promoting protein family member 3	2,7262	0,00026
Wdfy3	WD repeat and FYVE domain containing 3	2,6638	0,00339
Cd93	CD93 antigen	2,5668	0,03878
Cnn3	calponin 3, acidic	2,3812	0,01300
Il4i1	interleukin 4 induced 1	2,1574	0,00997
Cubn	cubilin (intrinsic factor-cobalamin receptor)	2,1406	0,00370
Gnb3	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta 3	2,1089	0,01659
Dse	dermatan sulfate epimerase	2,0331	0,01347
Lphn2	latrophilin 2	2,0288	0,04734
Tubb2b	tubulin, beta 2B	2,0093	0,01169
Bmpr1a	bone morphogenetic protein receptor, type 1A	1,9954	0,04780
Bmp6	bone morphogenetic protein 6	1,9432	0,02676
Map3k15	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 15	1,9310	0,00370
Trpm5	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 5	1,9246	0,04390
Havcr1	hepatitis A virus cellular receptor 1	1,9091	0,02668
Lphn2	latrophilin 2	1,8995	0,03146
Ccr7	chemokine (C-C motif) receptor 7	-2,2491	0,04644
Vav3	vav 3 oncogene	-2,2837	0,01874
Mcoln3	mucolipin 3	-2,3009	0,01169
Pigr	polymeric immunoglobulin receptor	-2,3100	0,00260
Itga6	integrin alpha 6	-2,4280	0,02458
Dmxl2	Dmx-like 2	-2,4313	0,00950
Gm16970	predicted gene, 16970	-2,4402	0,03310
Pbx3	pre B-cell leukemia transcription factor 3	-2,6459	0,04213
Epcam	epithelial cell adhesion molecule	-2,9906	0,00314
Lck	lymphocyte protein tyrosine kinase	-3,0698	0,00126
Dmxl2	Dmx-like 2	-3,2335	0,01202
Dpp4	dipeptidylpeptidase 4	-3,2474	0,00142
Gm10561	predicted gene 10561	-3,2918	0,01712
Ccr9	chemokine (C-C motif) receptor 9	-3,4173	0,00370
Actn1	Aktinin, alpha 1	-3,6864	0,00020
Wls	wntless homolog (Drosophila)ku	-4,1538	0,00020
Pstpip2	proline-serine-threonine phosphatase-interAkting protein 2	-4,5983	0,03310
Parp8	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 8	-4,9919	0,00034
Emb	embigin	-5,4271	0,00260

Tab. 6: Top-Hits der Genexpressionsanalyse

Auszüge aus der Auswertung der Genexpressionsanalysen. Dargestellt sind die 20 am höchsten differentiell regulierten Gene. Der Unterschied der TCL1 zur TCL1+NFAT2-KO-Kohorte ist in einer Fold-change (FC) angegeben, welche über  $\text{Log}_2\text{FC}$  berechnet werden kann. Das Signifikanzniveau ist mit p-Werten korrigiert durch die Benjamini-Hochberg-Prozedur angegeben.

### 6.3 Publikationsverzeichnis

„Steady-state neutrophil homeostasis is dependent on TLR4/TRIF signaling“; Bugl S, Wirths S, Radsak MP, Schild H, Stein P, André MC, Müller MR, Malenke E, Wiesner T, Märklin M, Frick JS, Handgretinger R, Rammensee HG, Kanz L, Kopp HG; Blood Jan 2013

### 6.4 Kongressbeiträge

Teile dieser Arbeit wurden im Rahmen von nationalen und internationalen Kongressen bereits in Form von Vorträgen und Poster-Präsentationen vorgestellt.

#### 6.4.1 Vorträge

- |                   |  |
|-------------------|--|
| 12/2011-12/2014   | Jährliches Meeting der American Society of Hematology (ASH)<br><i>Jedes Jahr Gewinner des ASH Abstract Achievement Award</i> |
| 10/2012-10/2014   | Jährliches Meeting der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und<br>medizinische Onkologie (DGHO)                           |
| 11/2013 & 11/2014 | Jährliches Meeting der Signal Transduction Society (STS)<br><i>Beide Jahre Gewinner des Reisestipendiums</i>                 |
| 02/2013           | 11 <sup>th</sup> B Cell Forum, Schluchsee  |

#### 6.4.2 Posterpräsentationen

- |                   |  |
|-------------------|--|
| 10/2011           | Jährliches Meeting der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und<br>medizinische Onkologie (DGHO)<br><i>Gewinner des Posterpreises 2011</i> |
| 08/2014           | ASH Meeting on Lymphoma Biology<br><i>Gewinner des ASH Abstract Achievement Award</i>  |
| 11/2011 & 11/2012 | Jährliches Meeting der Signal Transduction Society (STS)<br><i>Gewinner des Reisestipendiums 2012</i>  |

## **6.5 Contributions**

Die Genotypisierungen der Versuchstiere wurden über die gesamte Dauer der Promotion vom technischen Personal der Arbeitsgruppe Alexandra Poljak, Manuela Ganser, David Worbs und Bettina Hackl durchgeführt. Die Paraffinschnitte und H&E Färbungen wurden von Frau Bettina Hackel angefertigt. Die qRT-PCRs wurden zum Teil von Frau Alexandra Poljak pipettiert. Ein erheblicher Anteil der Phospho-Western Blots wurde von der wissenschaftlichen Hilfskraft Michael Gutknecht beigesteuert. Der Nachweis des NFAT2-KO in den E $\mu$ -TCL1 Tieren wurde vom Medizinstudent Jonas Heitmann durchgeführt.

Die durchflusszytometrische Sortierung der CLL Zellen für die Microarray Analysen wurde von Frau Sabrina Grimm der FACS Core Facility Tübingen koordiniert.

Die Genexpressionsdaten wurden mit dem GeneChip® Gene 1.0 ST Array von der Microarray Facility Tübingen erhoben.