

**Die Rolle von NFAT2 und LCK
in der Pathophysiologie der
chronischen lymphatischen Leukämie**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Alexander Fuchs

aus Balingen

Tübingen

2019

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

Tag der mündlichen Qualifikation:	18.11.2019
Dekan:	Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee
2. Berichterstatter:	PD Dr. Dr. Martin R. Müller

*„Lernen ist wie Rudern gegen den Strom.
Hört man damit auf, treibt man zurück.“*

Laotse

Zusammenfassung

Die chronische lymphatische Leukämie (CLL) stellt die häufigste Leukämie in der westlichen Hemisphäre dar. In den vergangenen Jahren gelang zwar die kontinuierliche Verbesserung der Therapie, indem die herkömmliche Chemotherapie durch neue Ansätze (wie monoklonale Antikörper und verschiedene Inhibitoren) ergänzt wurde. Allerdings ist durch hohe Rezidiv-Raten noch immer meist keine vollständige Heilung möglich. Um nun Mechanismen der CLL-Pathogenese und mögliche Grundlagen für weitere Therapieoptionen zu evaluieren, fokussiert sich diese Arbeit auf die Untersuchung der Rolle der beiden Proteine NFAT2 und LCK in der CLL. Ein entscheidender Faktor hierbei ist eine bestimmte Unempfindlichkeit gegenüber B-Zell-Rezeptor-Stimulation, genannt Anergie. Die Untersuchungen wurden dabei hauptsächlich im TCL1-Mausmodell der CLL durchgeführt.

Mittels des TCL1-Modells konnten wir eine Anergie-Gen-Signatur bestehend aus *Cbl-b*, *Egr2*, *Grail* und *Lck* identifizieren, welche abhängig vom B-Zell-Rezeptor- und NFAT-Signaling ist. Durch den Knockout von NFAT2 im TCL1-Modell konnten wir außerdem demonstrieren, dass die Expression einiger regulatorischer Gene (*Cdkn2a* und *Trp53*) durch den Verlust von NFAT2 reduziert ist. Ebenso ist die Expression von Chemokin-Rezeptoren, die eine wichtige Rolle in der CLL spielen, verändert. Des Weiteren gelang der Nachweis von *LCK* als direktem NFAT2-Zielgen in primären Patientenproben. Außerdem konnten wir zeigen, dass LCK in anergen CLL-Zellen mit dem B-Zell-Rezeptor interagiert. Um daraufhin die Bedeutung von NFAT2 und LCK in der CLL weiter zu untersuchen, wurden diese Gene im TCL1-Modell ausgeknockt. Dabei zeigte sich durch den Verlust von NFAT2 und LCK ein verringertes Überleben. Allerdings kann im Falle des Verlusts von LCK die CLL nicht als alleinige Todesursache in Betracht gezogen werden. Des Weiteren zeigten sich im Falle der Deletion von LCK zwar Hinweise, aber keine eindeutigen Belege für eine Transformation der CLL. Durch die Deletion von LCK zeigten sich zudem zwar veränderte Zellzyklus- und Apoptoseraten, welche sich aber nicht als signifikant darstellten. Abschließende Untersuchungen der Expression wichtiger Anergie-Marker (*Prdm1* und IgM) sowie der Ca^{2+} -Mobilisation belegten jedoch den Verlust der Anergie durch den Verlust von NFAT2 und LCK.

Durch diese Ergebnisse wurden NFAT2 und LCK als entscheidende Faktoren in der Anergie von CLL-Zellen identifiziert. Die Modulation der NFAT2-LCK-Achse könnte daher neue Therapieoptionen eröffnen.

Abstract

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common leukemia in the western hemisphere. Over the last years there was a continuous improvement of the common therapy by introducing new therapeutic options (monoclonal antibodies and different inhibitors). Nevertheless, high relapse-rates still prevent a complete elimination of the CLL. To evaluate mechanisms in the CLL-pathogenesis und putative basics for novel treatment-options, we focused on the role of the proteins NFAT2 and LCK in CLL in this work. A crucial factor hereby was a certain unresponsiveness against b cell receptor stimulation, called anergy. The investigations were hereby mainly conducted in the TCL1-mouse model.

Via the TCL1-model, we identified an anergy-associated gene signature consisting of *Cbl-b*, *Egr2*, *Grail* and *Lck*. This gene signature also appeared to be dependent on B cell receptor and NFAT signaling. By knocking out NFAT2 in the TCL1-model, we also demonstrated a reduced expression of regulatory genes (*Cdkn2a* und *Trp53*) upon deletion of NFAT2. Also chemokine receptor expression, which plays an important role in CLL, is altered. Furthermore, we identified *LCK* as a direct NFAT2-target in primary patient samples. We were also able to show, that LCK interacts with the B cell receptor in case of anergy. To further investigate the role of NFAT2 and LCK in CLL, these genes were then knocked out in the TCL1-model. This featured a reduced survival of animals with CLL. However, in case of the LCK deletion the CLL could not be considered as the only cause of death. Additionally, in case of the LCK deletion we found hints but no unequivocal prove for the transformation of the CLL. We also detected altered cell cycle and apoptosis rates upon the loss of LCK, which also turned out to be not significant. Final investigations of important anergy markers (*Prdm1* und IgM) and Ca^{2+} -flux clearly demonstrated the loss of anergy upon loss of NFAT2 and LCK.

Based on these results, NFAT2 and LCK were identified as crucial factors of anergy in CLL cells. Modulation of the NFAT2-LCK-axis could thus open new therapeutic avenues.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	- 11 -
1.1	Das Immunsystem	- 11 -
1.1.1	B-Zellen	- 11 -
1.1.2	Die B-Zell-Entwicklung.....	- 12 -
1.1.3	Die B-Zell-Rezeptor-Aktivierung	- 14 -
1.1.4	Die B-Zell-Anergie	- 17 -
1.1.5	Der B-Zell-Rezeptor und die B-Zell-Anergie in der chronischen lymphatischen Leukämie.....	- 18 -
1.2	Der NFAT/Ca ²⁺ -Signalweg.....	- 19 -
1.2.1	Die NFAT-Faktoren.....	- 19 -
1.2.2	Das NFAT-Signaling	- 20 -
1.2.3	Die Rolle von NFAT in Tumorerkrankungen	- 23 -
1.3	Der LCK-Signalweg	- 23 -
1.3.1	Die Kinase LCK	- 23 -
1.3.2	Das LCK-Signaling	- 25 -
1.3.3	LCK in Tumorerkrankungen.....	- 27 -
1.4	Leukämien und maligne Lymphome	- 27 -
1.5	Die chronische lymphatische Leukämie.....	- 28 -
1.5.1	Biologische und klinische Charakteristika der CLL	- 30 -
1.6	Transgene Mausmodelle	- 31 -
1.6.1	Das TCL1-Modell.....	- 31 -
1.6.2	Knockout-Modelle	- 32 -
1.7	Zielsetzung	- 35 -
2	MATERIAL & METHODEN.....	- 36 -
2.1	Material	- 36 -
2.1.1	Verbrauchsmaterialien.....	- 36 -
2.1.2	Reagenzien & Chemikalien	- 37 -

Inhaltsverzeichnis

2.1.3	Geräte und Zubehör	- 39 -
2.1.4	Puffer und Medien	- 40 -
2.1.5	Antikörper	- 41 -
2.1.6	Primer	- 41 -
2.2	Methoden.....	- 42 -
2.2.1	Tiermodelle	- 42 -
2.2.2	Präparation der Organe	- 45 -
2.2.3	Blutentnahme und Aufarbeitung	- 46 -
2.2.4	Isolation und Kultivierung der B-Zellen	- 47 -
2.2.5	Dichtegradientenzentrifugation der Splenozyten	- 47 -
2.2.6	RNA Isolation & cDNA Synthese	- 48 -
2.2.7	Quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR).....	- 48 -
2.2.8	Proteinisolation	- 49 -
2.2.9	Proteinbestimmung nach Bradford	- 49 -
2.2.10	Sodium-Dodecyl-Sulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)....	- 49 -
2.2.11	Western Blot	- 50 -
2.2.12	Mikroskopie (Immunfluoreszenz-Färbung)	- 51 -
2.2.13	Proximitäts-Ligations-Assay (Duolink-Analyse)	- 52 -
2.2.14	Chromatin Immunopräzipitation (ChIP).....	- 54 -
2.2.15	Durchflusszytomtrie	- 56 -
2.2.16	Histologische Analyse.....	- 59 -
3	ERGEBNISSE.....	- 61 -
3.1	Die Rolle von NFAT2 in der Anergie von CLL-Zellen.....	- 61 -
3.1.1	NFAT2 steuert die Expression von Anergie-Genen	- 61 -
3.1.2	Veränderte Genexpression durch den Verlust von NFAT2.....	- 63 -
3.2	<i>LCK</i> ist ein direktes Zielgen von NFAT2	- 67 -
3.2.1	Nachweis der Interaktion von NFAT2 und <i>LCK</i> -Promotor	- 67 -
3.3	<i>LCK</i> als Akteur im BCR-Signaling.....	- 68 -
3.3.1	<i>LCK</i> interagiert im Falle der Anergie mit dem BCR.....	- 68 -

3.4	Die Bedeutung von LCK in der CLL	- 72 -
3.4.1	LCK-KO im transgenen E μ -TCL1 Modell.....	- 72 -
3.4.2	Der Verlust von LCK verringert das Überleben.....	- 73 -
3.4.3	Der Verlust von LCK führt nicht zu einer Akzelerierung der CLL	- 76 -
3.4.4	Zellzyklus- und Apoptoseraten werden nicht durch die LCK-Deletion beeinflusst.....	- 79 -
3.5	LCK ist ein entscheidender Faktor in der Anergie von CLL-Zellen	- 82 -
3.5.1	Erhöhte Expression von <i>Prdm1</i> durch den Verlust von NFAT2 und LCK	- 83 -
3.5.2	Gesteigerte Oberflächenexpression von IgM durch die Deletion von NFAT2 und LCK.....	- 84 -
3.5.3	Vermehrte Ca ²⁺ -Mobilisation durch den Verlust von NFAT2 und LCK	- 84 -
4	DISKUSSION.....	- 86 -
5	ANHANG	- 99 -
5.1	Nomenklatur	- 99 -
5.2	Abkürzungsverzeichnis	- 99 -
5.3	Abbildungsverzeichnis	- 102 -
5.4	Tabellenverzeichnis	- 103 -
5.5	Literaturverzeichnis.....	- 104 -
5.6	Publikationsverzeichnis.....	- 117 -
5.7	Kongressbeiträge.....	- 118 -
5.7.1	Vorträge.....	- 118 -
5.7.2	Posterbeiträge	- 118 -
5.8	Contributions.....	- 118 -
6	DANKSAGUNG	- 119 -

1 EINLEITUNG

1.1 Das Immunsystem

Im Allgemeinen kann das Immunsystem in das angeborene und das adaptive ImmunSystem (IS) unterteilt werden. Beide Kompartimente verfügen hierbei über Rezeptoren, um Pathogene aufzuspüren, sowie zelluläre und humorale Faktoren zur Abwehr von Krankheitserregern. Die dem angeborenen Immunsystem zugehörigen antigenpräsentierenden Zellen (*Antigen Presenting Cells* (APCs)) erkennen durch konservierte Rezeptoren (*Pathogen Recognition Receptors*, (PRRs)) Oberflächenstrukturen und Nukleinsäuren von Pathogenen und phagozytieren diese. Fragmente phagozytierter Erreger werden dann dem adaptivem Immunsystem in Form von T-Helfer-Zellen über MHC-Klasse II-Moleküle präsentiert, welche dann die weitere Immunantwort steuern. Unter anderem werden durch T-Helfer-Zellen zytotoxische T-Zellen und antikörper-produzierende B-Zellen aktiviert, um eine spezifische und effiziente Bekämpfung des betreffenden Erregers zu gewährleisten. Da sich diese Arbeit in der Hauptsache mit B-Zellen beschäftigt, wird im Folgenden nur näher auf B-Zellen (= B-Lymphozyten) eingegangen.

1.1.1 B-Zellen

B-Zellen spielen eine essentielle Rolle in der adaptiven Immunantwort, da ausschließlich sie in der Lage sind, Antikörper zu produzieren. Kommt es allerdings zu Fehlfunktionen von B-Zellen, kann dies zu diversen Autoimmunerkrankungen sowie zur Entstehung verschiedener Tumorentitäten führen.

Der Name der B-Zellen leitet sich ursprünglich nach ihrer Entdeckung in der *Bursa fabricii* von Hühnern ab¹. Das „B“ kann jedoch auch als Abkürzung für Knochenmark (*bone marrow*) stehen, in welchem die Entwicklung der B-Zellen im Menschen hauptsächlich stattfindet. Nach ihrer Entwicklung im Knochenmark wandern die naiven B-Zellen in die Peripherie.

Der Großteil der B-Zellen wandert in die Milz und die Lymphknoten, eine geringere Anzahl zirkuliert im Blut sowie der Lymphe. Sobald eine B-Zelle in Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen gerät, wandert sie in die sogenannten Keimzentren, differenziert zur Plasmazelle und sezerniert Antikörper. Eben diese Produktion von Antikörpern führte zur Entdeckung der Plasmazellen durch Astrid Fagraeus, was den Grundstein für die folgende Entdeckung und Charakterisierung der B-Zellen legte². Wie bereits erwähnt, kann jede B-Zelle nur einen spezifischen Antikörper als Rezeptor tragen und muss diesen nach Antigen-Kontakt in hoher Menge produzieren können. Dies wird durch die klonale Selektion erreicht. Auf der einen

1 EINLEITUNG

1.1 Das Immunsystem

Seite wird so eine große Variation möglicher Antikörper erhalten, auf der anderen Seite findet eine gezielte Proliferation und Differenzierung nur derjenigen B-Zelle statt, die ihr spezifisches Antigen erkannt hat. Diese Theorie der klonalen Selektion wurde erstmals 1957 von Sir Mac Farlane Burnet aufgestellt³⁻⁵.

Die Diversität der Antikörper wird unter anderem durch die sogenannte somatische Rekombination erreicht. Das zugrundeliegende Prinzip bildet hierbei die unterschiedliche Zusammenlagerung von **V**ariable- (V), **D**iversifying- (D) und **J**oining- (J) Gensegmenten, welche zusammen die schwere oder die leichte Kette (ohne das D-Segment) bilden. Dieser Mechanismus wurde 1978 von Susumu Tonegawa entdeckt⁶. Die resultierende Diversität der Antikörper ermöglicht die effiziente Bekämpfung der enormen Vielfalt an Pathogenen mittels Antikörper.

1.1.2 Die B-Zell-Entwicklung

Die Entwicklung der B-Zellen findet aus hämatopoetischen Stammzellen (**H**ematopoetic **S**tem **C**ells, (HSC)) im Knochenmark statt und ist in Abb. 1 A schematisch dargestellt. Erhalten HSC von Stromazellen die entsprechenden Signale in Form von Zytokinen, Chemokinen und Zell-Zell-Interaktionen, so differenzieren sie sich über Vorstufen zu gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzellen (**C**ommon **L**ymphoid **P**rogenitor, (CLP)). Im weiteren Verlauf bilden CLP den ersten Zelltyp der B-Zell-Linie, die frühen Pro-B-Zellen. In diesem Stadium findet auch die erste Genumlagerung des Ig_H-Lokus statt. Hierbei wird ein D-Segment an ein J_H-Segment umgelagert. Anschließend findet die Umlagerung eines V_H-Segmentes an das DJ_H-Segment in der späten Pro-B-Zelle statt. Nach dieser vollständigen Umlagerung der schweren Kette wird diese mit einer vorläufigen leichten Kette (surrogate light chain) zusammen als Prä-B-Zell-Rezeptor an der Oberfläche der großen Prä-B-Zelle exprimiert. Die Expression des Prä-B-Zell-Rezeptors dient als essentieller Schritt der Qualitätskontrolle der B-Zell-Entwicklung. Kann auch durch Umlagerung der V-, D-, und J-Segmente auf dem zweiten Chromosom kein Prä-B-Zell-Rezeptor exprimiert werden, führt das zum Zelltod. Im anderen Fall wird der Prä-B-Zell-Rezeptor internalisiert und die Umlagerung der leichten Kette wird in der kleinen Prä-B-Zelle eingeleitet⁵.

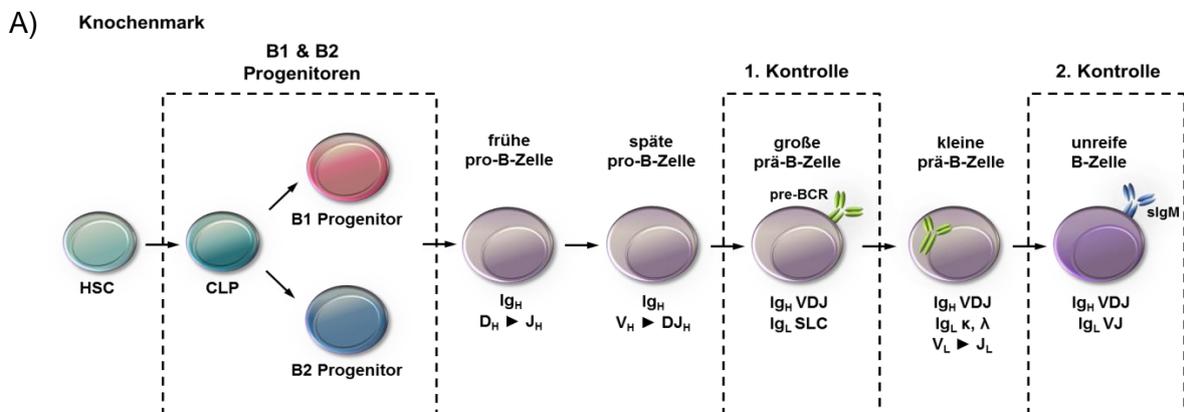
Die Umlagerung der V- und J-Segmente der leichten Kette findet dabei zuerst am κ-Lokus statt. Ergibt die Umlagerung des κ-Lokus auf beiden Chromosomen keine funktionelle leichte Kette, so wird der Umlagerungsvorgang im λ-Lokus wiederholt. Sollte auch dies nicht in einer funktionalen leichten Kette resultieren, wird die Apoptose der Zelle eingeleitet. Im Falle einer produktiven Umlagerung der Gene der leichten Kette wird IgM auf der Oberfläche (sIgM) der nun unreifen B-Zelle als B-Zell-Rezeptor exprimiert. Die unreifen B-Zellen können dann als

1 EINLEITUNG

1.1 Das Immunsystem

transiente B-Zellen das Knochenmark verlassen und in die Peripherie wandern, wo anschließend reife B-Zellen gebildet werden.

Unterschiede in Lokalisation, Funktion, Entwicklung und Phänotyp lassen außerdem eine grundsätzliche Unterscheidung zweier B-Zell-Subpopulationen zu, den B1- und B2-Zellen (siehe Abb. 1B)⁷⁻⁹. So migrieren transiente B1-Zellen hauptsächlich in den Peritonealraum, um dort reife B1a, B1b und B10 B-Zellen zu bilden¹⁰. Transiente B2-Zellen wandern vor allem in die Milz und differenzieren dort zu folliculären und Marginalzonen B-Zellen. Die Herkunft der beiden B-Zell-Linien ist nicht abschließend geklärt, wobei jedoch gängiger Weise von der Existenz unterschiedlicher Vorläufer im Knochenmark sowie der Milz ausgegangen wird^{7,8,11-14}. Treffen B-Zellen auf ihr entsprechendes Antigen, folgt die Aktivierung sowie die klonale Expansion, welche in der Differenzierung zu Plasmazellen gipfelt. Diese Plasmazellen produzieren dann antigen-spezifische Antikörper. Um einen anhaltenden Schutz zu gewähren, können einige B-Zellen zudem zu Gedächtniszellen differenzieren⁵.



1 EINLEITUNG

1.1 Das Immunsystem

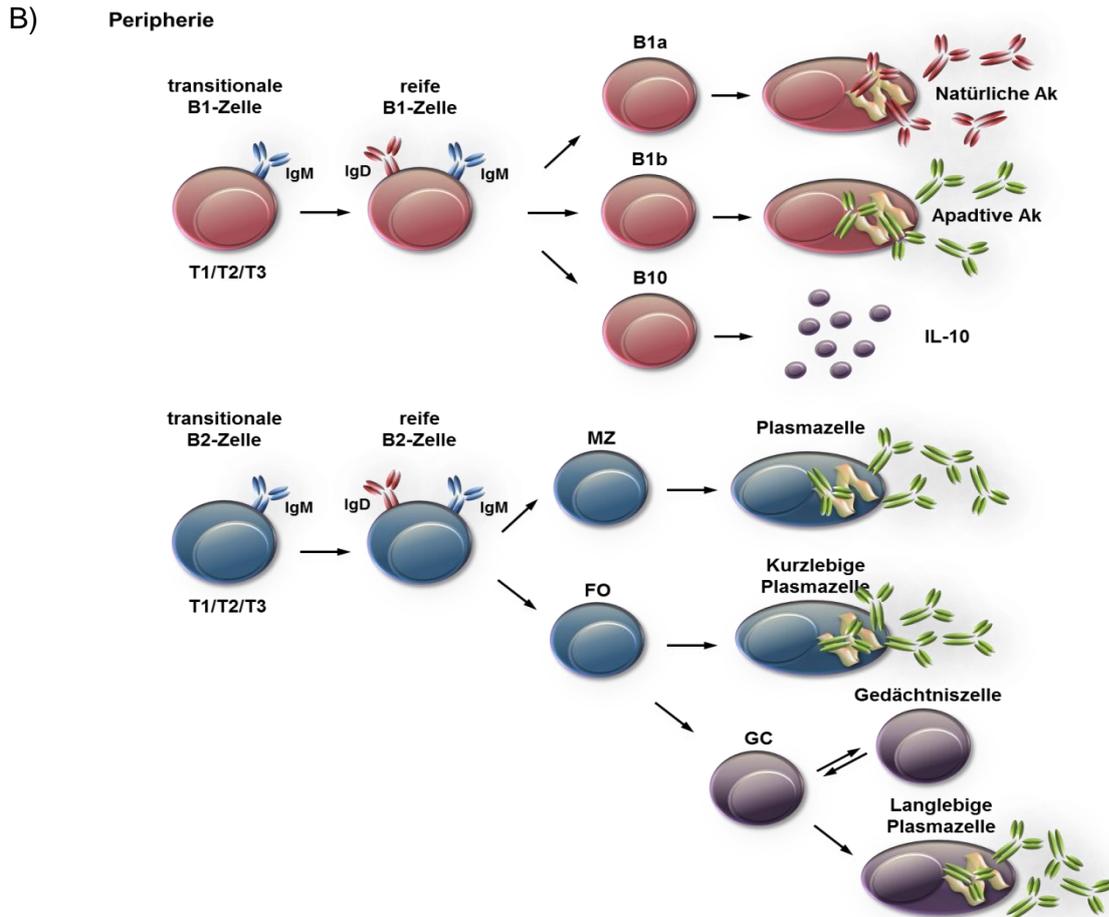


Abb. 1: B-Zell-Entwicklung

A) Schematische Darstellung der B-Zell-Entwicklung im Knochenmark. Hierbei werden aus hämatopoetischen Stammzellen (HSC) zuerst gemeinsame lymphatische Vorläuferzellen (CLP), welche sich dann zu B1- oder B2-Vorläufern entwickeln. Über verschiedene pro- und prä-B-Zell-Phasen werden dann unreife B-Zellen gebildet, die anschließend aus dem Knochenmark auswandern.

B) Verteilung der B-Zell-Subpopulationen. Transitionale B1-Zellen migrieren in der Peripherie hauptsächlich in den Peritonealraum, um dort zu B1a-, B1b- und B10-Zellen auszureifen. Transitionale B2-Zellen wandern hauptsächlich in die lymphatischen Organe inklusive der Milz und reifen dort zu Marginalzonen B-Zellen (MZ, lymphatische Organe) oder follikulären B-Zellen (FO, Milz). Diese Zellen können bei Antigenkontakt direkt zu Plasmazellen differenzieren, oder als Keimzentren B-Zellen (GC) zu Gedächtniszellen und langlebigen Plasmazellen ausdifferenzieren, wenn sie mit ihrem Antigen in Berührung kommen.

Quelle: Entnommen aus „Analyse des Transkriptionsfaktors NFAT2 in der Pathogenese der CLL“, Dissertation von Melanie Märklin

1.1.3 Die B-Zell-Rezeptor-Aktivierung

Wie bereits angemerkt, ist der B-Zell-Rezeptor (**B Cell Receptor** (BCR)) aus einem Oberflächen-gebundenen Antikörper und dem damit verknüpften intrazellulären I γ α (CD79a)-

1 EINLEITUNG

1.1 Das Immunsystem

Ig β (CD79b)-Heterodimer aufgebaut. Bindet nun ein Antigen an den Antikörperpart des BCR, wird im Zytoplasma eine Signalkaskade in Gang gesetzt (siehe Abb. 2). Der erste Akteur der BCR-Signalkaskade ist hierbei die Src-Kinase *Lck/Yes Novel tyrosine kinase* (LYN)¹⁵. LYN phosphoryliert beide Tyrosine in den *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs* (ITAMs) der Ig α - und Ig β -Ketten, wodurch die *Spleen tYrosine Kinase* (SYK) rekrutiert und aktiviert wird¹⁶⁻¹⁹.

Zudem kann LYN den CD19-Korezeptor-Komplex aktivieren, welcher daraufhin weitere LYN-Kinasen aktiviert, um das BCR-Signaling zu verstärken, oder zur Aktivierung von **PhosphoInositid-3-Kinasen** (PI3K) führt, welche in der Folge **PhosphatIdylinositol-4,5-bisPhosphat** (PIP2) zu **PhosphatIdylinositol-3,4,5-trisPhosphat** (PIP3) phosphorylieren. PIP3 rekrutiert dann die *Phosphoinositide-Dependent Kinase-1* (PDK1) an die Plasmamembran, welches dort die Proteinkinase B (AKT) sowie die *Mammalian Target Of Rapamycin* (mTOR)-Kaskade initiiert^{19,20}.

SYK wiederum phosphoryliert anschließend das Adaptorprotein *B cell LiNKer protein* (BLNK). Die Phosphorylierung dieses Adaptorproteins ist ein wichtiger Schritt bei der Bildung des Signalosoms, einem essentiellen Bestandteil der BCR-Signalkaskade. So bindet es die Tec-Kinase *Bruton's Tyrosine Kinase* (BTK), *proto-oncogen VAV* (VAV), sowie die **PhosphoLipase C γ 2** (PLC γ 2)²¹. BTK wiederum wird durch LYN oder SYK phosphoryliert, woraufhin diese Kinase PLC γ 2 aktiviert^{19,22-24}.

PLC γ 2 spaltet im Anschluß PIP2 in **Inositol-1,4,5-triPhosphat** (IP3) und **DiAcylGlycerin** (DAG). DAG kann daraufhin an *RAt Sarcoma viral antigen* (RAS) binden und die *Extracellular-signal Regulated Kinase 1/2* (ERK1/2)-Kaskade in Gang setzen, oder mittels **Proteinkinase C β** (PKC β) den *Nuclear Factor of Kappa light polypeptide gene enhancer in B cells* (NF- κ B)-Signalweg aktivieren^{19,25}.

1 EINLEITUNG

1.1 Das Immunsystem

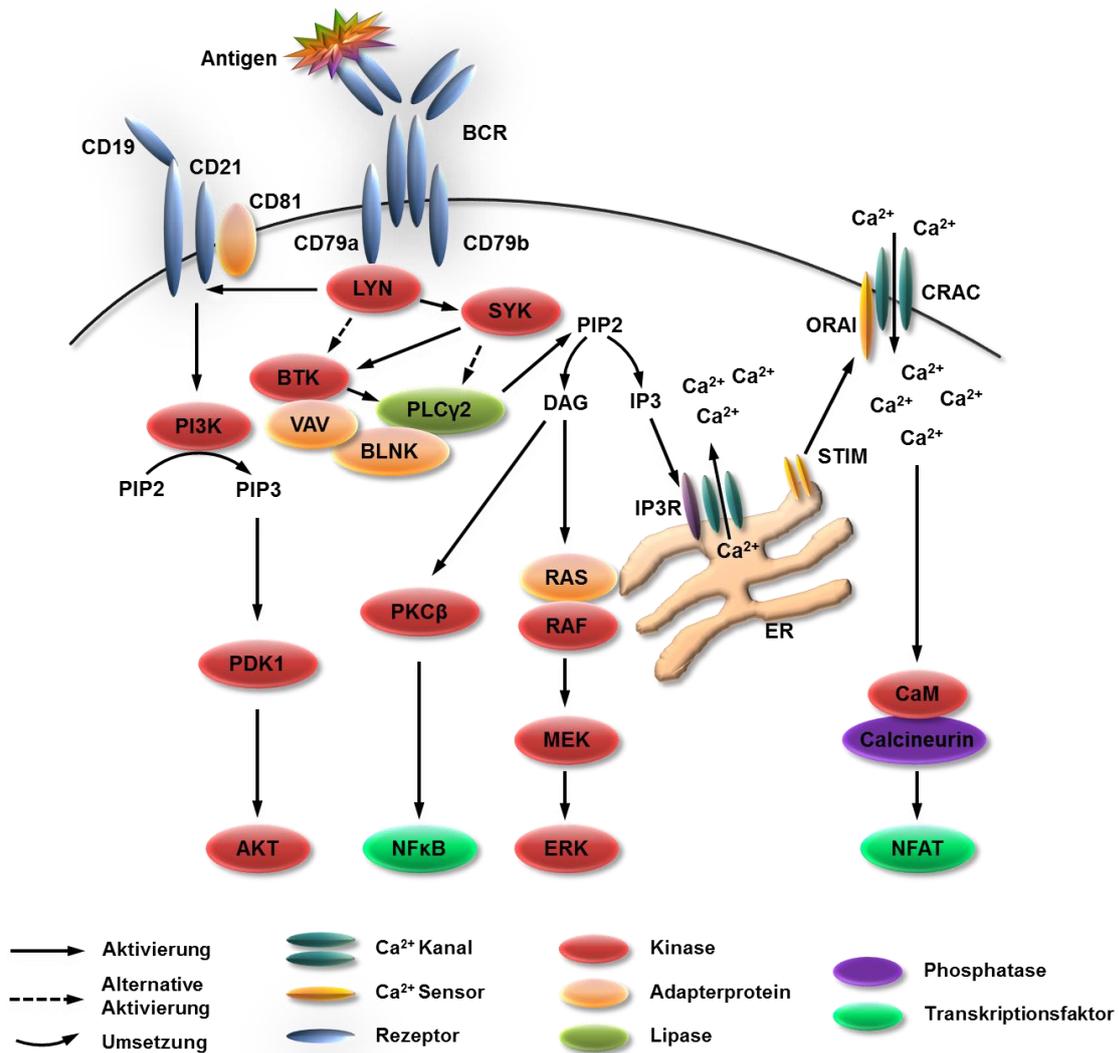


Abb. 2: B-Zell-Rezeptoraktivierung

Nach der Bindung des Antigens kommt es durch LYN zur Phosphorylierung von ITAMs von CD79a und b (I α und β). Im Folgenden kommt es durch die Aktivität von SYK zur Bildung des Signalosoms, bestehend aus BTK, VAV, BLNK und PLC γ 2. Nach seiner Aktivierung durch BTK spaltet PLC γ 2 PIP2 in DAG und IP3. DAG kann daraufhin den NF κ B- sowie den ERK-Signalweg initiieren. IP3 auf der anderen Seite führt über den IP3-Rezeptor (IP3R), STIM, ORAI und CRAC zum Einstrom von Ca²⁺-Ionen in die Zelle. Dadurch wird der NFAT-Signalweg aktiviert. Durch die Aktivierung des CD19-Korezeptor-Komplex via LYN kann auch der AKT-Signalweg initiiert werden.

Quelle: Entnommen und modifiziert nach „Analyse des Transkriptionsfaktors NFAT2 in der Pathogenese der CLL“, Dissertation von Melanie Märklin

1 EINLEITUNG

1.1 Das Immunsystem

IP3 andererseits wird am IP3-Rezeptor des Endoplasmatischen Retikulums (ER) gebunden, was dort zur Öffnung von Calcium(Ca^{2+})-Kanälen führt. Die folgende Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt zur Öffnung der **Calcium Release-Activated Channels** (CRAC) durch **STromal Interaction Molecule** (STIM) und **Calcium Release-Activated Calcium channel 1** ((CRACM1) = **Calcium Release-Activated Calcium Modulator** ORAI). Hierdurch gelangen extrazelluläre Ca^{2+} -Ionen in die Zelle. Die Calcium-Ionen binden daraufhin an Calmodulin, welches Calcineurin aktiviert. In seiner Funktion als Phosphatase dephosphoryliert Calcineurin anschließend auch **Nuclear Factor of Activated T cells** (NFAT), welcher in der Folge die Expression NFAT-abhängiger Gene induziert^{5,26}.

1.1.4 Die B-Zell-Anergie

Obwohl die Entstehung selbstreaktiver B-Zellen, wie beschrieben, in der Entwicklung durch Austausch von Gensegmenten oder Apoptose in hohem Maße verhindert wird, können einige autoreaktive B-Zellen diesen Mechanismen entkommen.

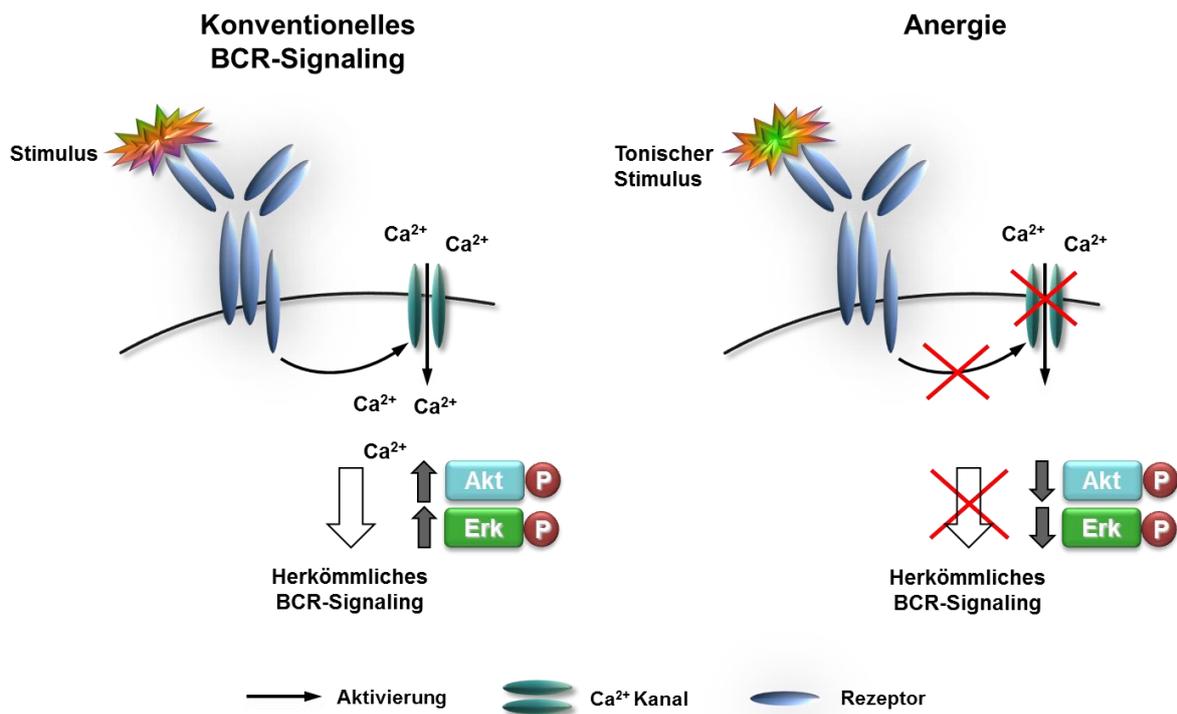


Abb. 3: B-Zell-Anergie

Gegenüberstellung des gewöhnlichen BCR-Signaling und des Signaling in der Anergie. Herkömmlicherweise führt eine Stimulation zur Aktivierung des BCR mit nachfolgendem Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle und zuvor beschriebenem Signaling. Im Falle der Anergie führt jedoch ein tonischer Stimulus zu einem für äußere Signale unempfindlichen BCR, worauf es zu keinem/sehr geringem Ca^{2+} -Einstrom und keinem herkömmlichen BCR Signaling kommt. Die CLL-Zellen einer Subgruppe von Patienten zeigt ebenfalls dieses Phänomen.

1 EINLEITUNG

1.1 Das Immunsystem

Eine Möglichkeit ist nun die Induktion der Toleranz unreifer B-Zellen, welche hierbei unreaktiv gegenüber äußeren Stimuli wird. Dies geschieht meist, wenn die Selbstantigene eine starke Bindung am BCR aufweisen, andernfalls kann es zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen kommen. Niedrigaffine, autoreaktive B-Zellen können allerdings auch diesem Mechanismus entkommen, zu naiven B-Zellen heranreifen und im Organismus zirkulieren. Die naiven autoreaktiven B-Zellen können dann entweder aktiviert werden oder es wird Anergie ausgelöst. Dies kann entweder durch fehlende Kostimulation oder eine tonische BCR-Stimulation erfolgen. Anergie B-Zellen sind unempfindlich gegenüber der Stimulation des BCR, wodurch das konventionelle BCR-Signaling nicht ausgelöst wird (siehe Abb. 3), außerdem zeigen sie eine höhere Apoptoseresistenz^{5,27,28}.

1.1.5 Der B-Zell-Rezeptor und die B-Zell-Anergie in der chronischen lymphatischen Leukämie

Der BCR und das ausgelöste Signaling beeinflussen, wie zuvor erläutert, die Proliferation, Selektion, Differenzierung und Antikörperproduktion. Daher besitzt der BCR auch in der Pathogenese der aus entarteten B-Zellen hervorgehenden **Chronischen Lymphatischen Leukämie (CLL)** eine entscheidende Funktion^{9,19,29,30}. Die Modalitäten der BCR-Aktivierung in der CLL sind Gegenstand der Forschung und Diskussion. Fest steht jedoch, dass die Stimulation des BCR an Überleben, Proliferation sowie Selektion und Expansion maligner CLL-Klone beteiligt ist²⁹⁻³². Zudem kann der BCR auf CLL-Zellen einige Besonderheiten aufweisen, wie einen „stereotypen“ BCR, der durch die erhöhte Verwendung bestimmter leichter und schwerer Ig-Ketten-Gene zustande kommt³³. Zusätzlich können CLL-Patienten durch die somatischen Mutationen in den IGHV in zwei Subgruppen unterteilt werden: **Mutierte** und **Unmutierte** CLL (M-CLL und U-CLL, respektive)³⁴. Trotz der unklaren Herkunft der CLL und ihrer Subgruppen wurden ihre molekularen Charakteristika eingehend untersucht³⁵. So konnte gezeigt werden, dass M-CLL-Zellen meist nicht auf die Stimulation des BCR reagieren, sowie vermehrt eine Reduktion von sIgM aufweisen. Aufgrund der mangelnden Reaktivität gegenüber der BCR-Stimulation durch einen tonischen Stimulus werden diese CLL Zellen auch als anerg bezeichnet (vgl. 1.1.4)³⁶.

Die reduzierte Expression von sIgM ist ebenso ein Charakteristikum aneurer CLL-Zellen, wie eine deutlich reduzierte Expression der ungünstigen prognostischen Marker **Zeta chain of T cell receptor Associated Protein kinase 70 (ZAP70)** und **CD38**³⁷. In anergen CLL-Zellen konnte außerdem eine konstitutive Aktivierung des BCR-Signalings sowie von ERK1/2 und NFAT2 demonstriert werden³⁶⁻³⁸. Weiterhin wiesen diese CLL-Zellen eine Reduktion von **PR**

1 EINLEITUNG

1.2 Der NFAT/Ca²⁺-Signalweg

DoMain zinc finger protein 1 (PRDM1, BLIMP-1) auf, wodurch es zu einem charakteristischen Differenzierungsblock kommt^{39,40}.

Trotz dieser Fakten und neuer Erkenntnisse unserer Arbeitsgruppe bleibt eine Korrelation zwischen klinischer Prognose und Anergie-Status schwierig, weshalb hier weitere Studien notwendig sind^{37,40}.

1.2 Der NFAT/Ca²⁺-Signalweg

1.2.1 Die NFAT-Faktoren

Die NFAT-Transkriptionsfaktoren-Familie wurde schon vor 30 Jahren das erste Mal in T-Zellen entdeckt, wobei das Mitglied der Familie als ein an den **InterLeukin 2** (IL-2) Promotor bindendes Protein identifiziert wurde⁴¹. Im Laufe der Jahre wurden weitere Mitglieder der NFAT-Transkriptionsfaktoren-Familie identifiziert (NFAT1-5). Zudem konnte durch langjährige Forschung gezeigt werden, dass die NFAT-Faktoren sowohl in Immunzellen, wie T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, dendritischen Zellen und Makrophagen eine wichtige Rolle einnehmen, ebenso jedoch auch unerlässlich im Entwicklungsprozess der Muskulatur und verschiedener Organe, wie z.B. des Herzens, sind^{26,42-46}.

Bei den NFAT-Transkriptionsfaktoren handelt es sich um evolutionär hochkonservierte Proteine, welche auch zwischen verschiedenen Spezies eine hohe Homologie aufweisen. Grundsätzlich bestehen NFAT-Transkriptionsfaktoren aus drei Domänen, der regulatorischen Domäne, der DNA-bindenden Domäne und der C-terminalen Domäne (siehe Abb. 4). Hierbei stellen die DNA-bindende Domäne sowie die regulatorische Domäne die wichtigsten Bestandteile dar. Die N-terminale regulatorische Domäne, welche auch als **NFAT Homology Region** (NHR) bezeichnet wird, besteht aus einer **TransAktivierungsDomäne** (TAD) sowie mehreren **SeRin-Reichen** (SRR) und **Serin-Prolin-reichen** (SP) Motiven. Diese Motive können durch regulatorische NFAT-Kinasen, wie die **Casein Kinase 1** (CK1), die **Dual-specificity tYrosine-phosphorylation-Regulated Kinase 1** und **2** (DYRK 1 und 2) und die **GlykogenSynthase Kinase 3** (GSK3) phosphoryliert werden. Außerdem befindet sich in der regulatorischen Domäne die **Nukleare LokalisationsSequenz** (NLS), welche für die Translokation von NFAT in den Nukleus zuständig ist. Eine der wichtigsten Regionen der regulatorischen Domäne stellt die Calcineurin-Bindungsstelle dar, an die die Phosphatase Calcineurin andockt, welche eine Hauptrolle bei der Aktivierung von NFAT spielt⁵.

Die DNA-bindende Domäne, die auch als **Rel-Homology Domain** (RHD) bezeichnet wird, ermöglicht die Bindung und Regulation von Zielgenen. Zudem befinden sich in der

1 EINLEITUNG

1.2 Der NFAT/Ca²⁺-Signalweg

DNA-bindenden Domäne mehrere Bindungsstellen für *FBJ murine OsteoSarkoma viral oncogene homolog* (FOS) und *JUN proto-oncogene* (JUN), wodurch Interaktionen unter anderem mit Aktivator Protein-1 (AP-1) und *Forkhead bOX P-family protein 2* und *3* (FOXP2 und 3) ermöglicht werden^{26,45}.

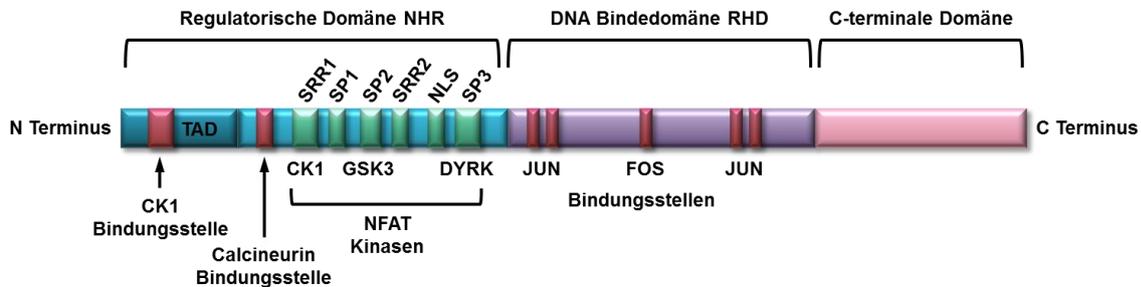


Abb. 4: Aufbau der NFAT-Transkriptionsfaktoren

Im Prinzip bestehen die NFAT-Faktoren aus drei Domänen, der regulatorischen Domäne (NHR), der DNA Bindedomäne (RHD) und der C-terminalen Domäne. Die regulatorische Domäne enthält Regionen, die essentiell für die Steuerung der Aktivität von NFAT sind, wie die Bindestellen für CK1 und Calcineurin. Außerdem sind in der NHR Serin- (SSR) und Serin-Prolin- (SP) reiche Motive enthalten, welche durch NFAT-Kinasen wie CK1, GSK3 und DYRK phosphoryliert werden können. Die NLS-Region steuert die Translokation von NFAT in den Zellkern. Die DNA-Bindedomäne ermöglicht die Regulation von Zielgenen und besitzt Binderegionen für FOS- und JUN-Domänen von Interaktionspartnern.

Quelle: Entnommen aus „Analyse des Transkriptionsfaktors NFAT2 in der Pathogenese der CLL“, Dissertation von Melanie Märklin

1.2.2 Das NFAT-Signaling

Die Aktivierung des NFAT/Ca²⁺-Signalweges kann durch Ligandenbindung an verschiedenen Rezeptoren ausgelöst werden (unter anderem den T-Zell-Rezeptor (*T Cell Receptor* (TCR)), den BCR, den *Fragment Crystallisable* Rezeptor (Fc-Rezeptor) sowie einige Chemokin- und Zytokin-Rezeptoren⁵. Da in dieser Arbeit hauptsächlich das NFAT-Signaling in B-Zellen untersucht wurde, findet im Folgenden eine exemplarische Erörterung des durch Aktivierung des BCR ausgelösten NFAT-Signaling statt, welcher in 1.1.3 schon angesprochen wurde und in Abb. 5 skizziert ist.

So kommt es durch Antigenbindung des BCRs zum nachfolgenden Signaling, in dessen Verlauf auch das Signalosom gebildet wird. Dieser Schritt ist essentiell für die Induktion des NFAT-Signalweges durch den BCR, da hierbei PLC γ 2 aktiviert wird. Durch PLC γ 2 wird PIP2

1 EINLEITUNG

1.2 Der NFAT/Ca²⁺-Signalweg

in DAG und IP3 aufgespalten, wobei durch DAG unter anderem die MAP-Kinase-Kaskade ausgelöst wird, während IP3 über den IP3-Rezeptor einen Ca²⁺-Ausstrom aus dem ER bewirkt. Dadurch wird die zytoplasmatische Ca²⁺-Konzentration erhöht, was durch eine Interaktion von STIM und ORAI die Öffnung der CRAC-Kanäle bedingt. Durch den folgenden Einstrom extrazellulärer Ca²⁺-Ionen in die Zelle wird die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration weiter erhöht. Dies führt in der Folge zur Bindung von Calcium an Calmodulin, welches Calcineurin aktiviert. Calcineurin erfüllt anschließend seine Funktion als Phosphatase und dephosphoryliert unter anderem NFAT (*nuclear factor of activated T cells*), wodurch NFAT in den Zellkern transloziert und dort seine Funktion als Transkriptionsfaktor wahrnimmt. So reguliert NFAT in B-Zellen unter anderem die Aktivierung, Differenzierung und Proliferation^{5,26,46,47}.

1 EINLEITUNG

1.2 Der NFAT/Ca²⁺-Signalweg

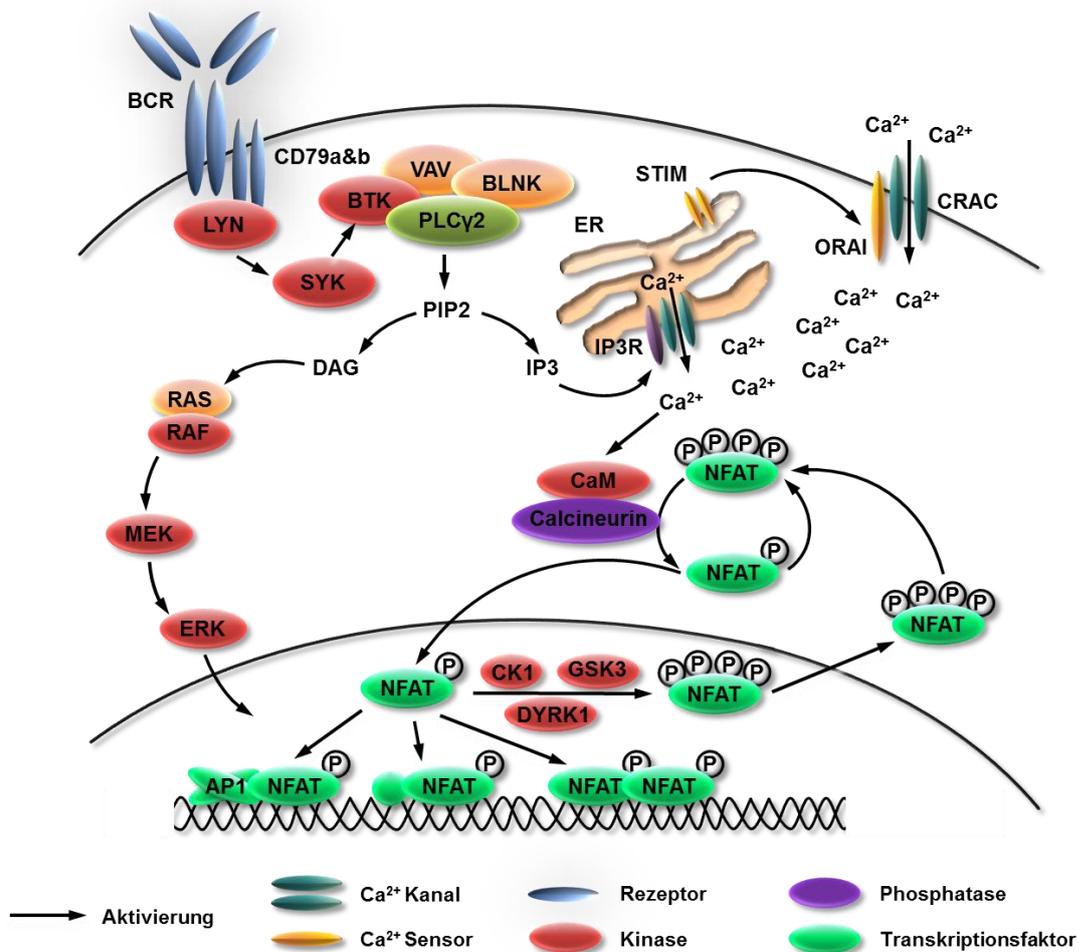


Abb. 5: NFAT-Signaling in B-Zellen

Nach Antigenkontakt kommt es mittels LYN und SYK zur Bildung des Signalosoms, bestehend aus BTK, VAV, BLNK und PLC γ 2. Nach seiner Aktivierung durch BTK spaltet PLC γ 2 PIP2 in DAG und IP3. DAG kann im Folgenden den ERK-Signalweg initiieren, während IP3 an den IP3-Rezeptor (IP3R) des ER bindet. Dies führt zur Freisetzung von Ca²⁺-Ionen aus dem ER, was durch die Interaktion von STIM und ORAI, welches die Öffnung der CRAC-Kanäle bewirkt, in einem Ca²⁺-Einstrom in die Zelle resultiert. Die erhöhte Ca²⁺-Konzentration in der Zelle sorgt anschließend über Calmodulin für die Aktivierung von Calcineurin. Diese Phosphatase sorgt wiederum dafür, dass inaktives, stark phosphoryliertes NFAT aus dem Zytoplasma in den Zellkern transloziert wird. Hier steuert NFAT die Transkription von Zielgenen und kann mit Interaktionspartnern wie z.B. AP1 kooperieren. Um eine übermäßige Transkription von NFAT-abhängigen Genen zu verhindern, wird NFAT durch die NFAT-Kinasen CK1, GSK3 und DYRK1 wieder phosphoryliert und gelangt zurück in das Zytoplasma.

Quelle: Entnommen und modifiziert nach „Analyse des Transkriptionsfaktors NFAT2 in der Pathogenese der CLL“, Dissertation von Melanie Märklin

1.2.3 Die Rolle von NFAT in Tumorerkrankungen

Da der NFAT-Signalweg, wie oben beschrieben, von großer Bedeutung unter anderem in Immunzellen ist, kann ein aberrantes Signaling der verschiedenen NFAT-Faktoren in unterschiedlichen Tumorerkrankungen eine Rolle bei der Entstehung, Transformation und Metastasierung spielen. So wurde zum Beispiel für das Mamma- und Kolonkarzinom demonstriert, dass NFAT 1 und 5 eine zentrale Funktion in der Migration und Metastasierung spielen^{26,48,49}. Ebenso wurde gezeigt, dass NFAT eine wichtige Rolle bei der Steuerung von Proliferation und Überleben von Prostatakarzinom-Zellen zukommt^{26,50}. Für NFAT2 konnte auch eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des malignen Melanoms, sowie für die Proliferation von Zellen des Pankreaskarzinoms gezeigt werden^{26,51-53}.

Da in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich NFAT2 und dessen Rolle in der CLL untersucht wurden, soll im Folgenden vermehrt auf NFAT2 in hämatologischen Tumoren, vor allem in der CLL, eingegangen werden. So wurde die Überexpression und konstitutive Aktivierung von NFAT2 in einer großen Anzahl von Tumorerkrankungen, unter anderem einigen B-Zell-Lymphomen, beschrieben^{26,54}. Für eine Reihe unterschiedlicher **Non-Hodgkin-Lymphome** (NHL) konnte hierbei eine Überexpression von NFAT2 festgestellt werden, ferner konnte in der CLL, dem diffus-großzelligen B-Zell-Lymphom (*Diffuse Large B Cell Lymphoma* (DLBCL)) sowie dem Burkitt/Burkitt-like Lymphom eine erhöhte nukleäre Lokalisation von NFAT demonstriert werden⁵⁴. Des Weiteren konnte in der CLL eine Korrelation zwischen der Reaktivität des BCR und der Aktivierung von NFAT2 gezeigt werden³⁸. Hierbei ging in CLL-Patienten, deren maligne Zellen auf eine α gM-Stimulation reagierten, eine erhöhte BCR-Reaktivität mit einer vermehrten NFAT2-DNA-Bindung und einer schlechteren Prognose einher. Dem gegenüber konnte im Rahmen einer aktuellen Veröffentlichung unserer Arbeitsgruppe (Märklin et al., Nat Commun, 2017) ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten NFAT2-Expression, der Anergie von CLL-Zellen und einem milderem Verlauf hergestellt werden⁴⁰. Dies untermauert die komplexe Rolle von NFAT2 in der CLL und die Notwendigkeit weiterer Studien in diesem Bereich.

1.3 Der LCK-Signalweg

1.3.1 Die Kinase LCK

Die *Lymphocyte Cell-specific Protein-tyrosine Kinase* (LCK) wurde bereits 1983 entdeckt und zuerst als Proto-Onkogen in der murinen T-Zell-Lymphom-Linie LSTRA identifiziert^{55,56}. Später wurde die Zugehörigkeit zu den **SRC-Family-Kinasen** (SFK) festgestellt und bereits in den frühen 1990iger-Jahren konnte LCK als essentieller Bestandteil des TCR-Signalings

1 EINLEITUNG

1.3 Der LCK-Signalweg

identifiziert werden⁵⁷⁻⁶⁰. Neben der tragenden Rolle der Proteintyrosinkinase LCK in der Aktivierung von T-Zellen, wurde die Wichtigkeit von LCK sowohl hinsichtlich des Überlebens als auch der Entwicklung und Funktion von CD4- und CD8-positiven T-Zellen beschrieben⁶¹⁻⁶⁵.

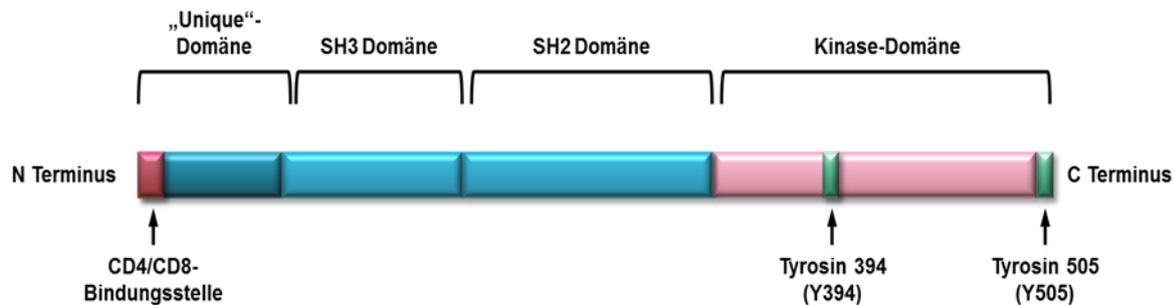


Abb. 6: Aufbau der Kinase LCK

Die Kinase LCK gehört zu den SFK und besteht wie die anderen Familienmitglieder aus vier Domänen, der N-terminalen „Unique“-Domäne, den SH3- und SH2-Domänen und der C-terminalen Kinase-Domäne. Die „Unique“-Domäne enthält zum einen ein Motiv zur Bindung an CD4/CD8, sowie einzigartige Aminosäure-Sequenzen. Die SH3- und SH2-Domänen dienen der Interaktion mit Prolinreichen Sequenzen und Phosphotyrosin-Motiven von Zielproteinen und erfüllen regulatorische Funktionen. Die Kinase-Domäne ermöglicht die katalytische Funktion als Phosphotyrosinkinase und besitzt regulatorische Tyrosinreste. Hierbei wirkt die Phosphorylierung von Y394 aktivierend, während die Phosphorylierung von Y505 eine inaktivierende Wirkung besitzt.

Quelle: Modifiziert nach <https://www.thermofisher.com/antibody/product/Phospho-LCK-Tyr505-Antibody-Polyclonal/44-850G>

Die 56 kDa schwere Kinase, die daher auch als p56-LCK bezeichnet wird, besteht aus vier Domänen (vgl. Abb. 6). Diese vier Domänen sind die N-terminale „Unique“ Domäne, die SRC-Homologie-Domänen 3 und 2 (SH3 und SH2) und die C-terminale Kinase-Domäne⁶⁶. Hierbei bindet die Unique-Domäne kovalent an zytoplasmatische Regionen von CD4 oder CD8, während die SH3 und SH2-Domänen eine wichtige Rolle bei der Bindung von Zielproteinen sowie der Regulation von LCK spielen. Weitere essentielle Bestandteile der Regulation von LCK sind ein carboxy-terminales inhibitorisches Tyrosin (Tyr505), sowie ein aktivierender Tyrosinrest in der katalytischen Domäne (Tyr394). Die Kinase-Domäne wiederum phosphoryliert die Tyrosin-Reste von ITAMs in CD3, sowie von Zielproteinen wie ZAP70 oder PLC γ 2⁶⁷⁻⁶⁹.

1.3.2 Das LCK-Signaling

LCK steht am Anfang des TCR-Signalwegs und gestaltet damit das weitere Signaling, wie in Abb. 7 dargestellt. Die Antigen-Bindung des TCR sowie die MHC-Bindung der Ko-Rezeptoren CD4 oder CD8 führt zur Aktivierung von LCK. Daraufhin phosphoryliert LCK ITAM-Sequenzen der zytoplasmatischen CD3-Ketten. Dies sorgt für die Rekrutierung von ZAP70, welches wiederum von LCK phosphoryliert und anschließend selbst Adapterproteine, wie *Linker for Activation of T-cells family member 1* (LAT1), phosphoryliert. Durch dieses Adapterprotein wird dann PLC γ 2 rekrutiert und aktiviert. Analog zum in 1.1.3 beschriebenen BCR-Signaling sorgt PLC γ 2 für die Spaltung von PIP2 in DAG und IP3. Anschließend bindet IP3 an den IP3-Rezeptor und löst einen Ca²⁺-Ausstrom aus dem ER aus. Dies erhöht die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration, was durch eine Interaktion von STIM und ORAI die Öffnung der CRAC bedingt. Durch den folgenden Einstrom extrazellulärer Ca²⁺-Ionen in die Zelle wird die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration weiter erhöht. Dies wiederum kann über die Aktivierung von Calcineurin die NFAT-Faktoren induzieren^{69,70}. Des Weiteren kann LCK über die Interaktion mit der **ProteinKinase D2** (PKD2) die NFAT-Faktoren aktivieren^{5,71}.

Neben der Rolle von LCK in T-Zellen wurde auch eine Expression von LCK in B-1-Zellen und CLL-Zellen demonstriert^{72,73}. Hierbei wird jedoch die Rolle von LCK kontrovers diskutiert. So wurde auf der einen Seite eine verstärkende Wirkung von LCK auf das BCR-Signaling in B1-Zellen ausgemacht, während eine andere Gruppe eine Verringerung des BCR-Signalings durch LCK feststellte. Eine weitere Gruppe postulierte, dass die Rolle von LCK vernachlässigbar sei⁷⁴⁻⁷⁶. Zusammengefasst gilt LCK als wichtiger Faktor des BCR-Signalings in CLL Zellen, die prognostische Relevanz ist jedoch umstritten^{40,77-79}.

1 EINLEITUNG

1.3 Der LCK-Signalweg

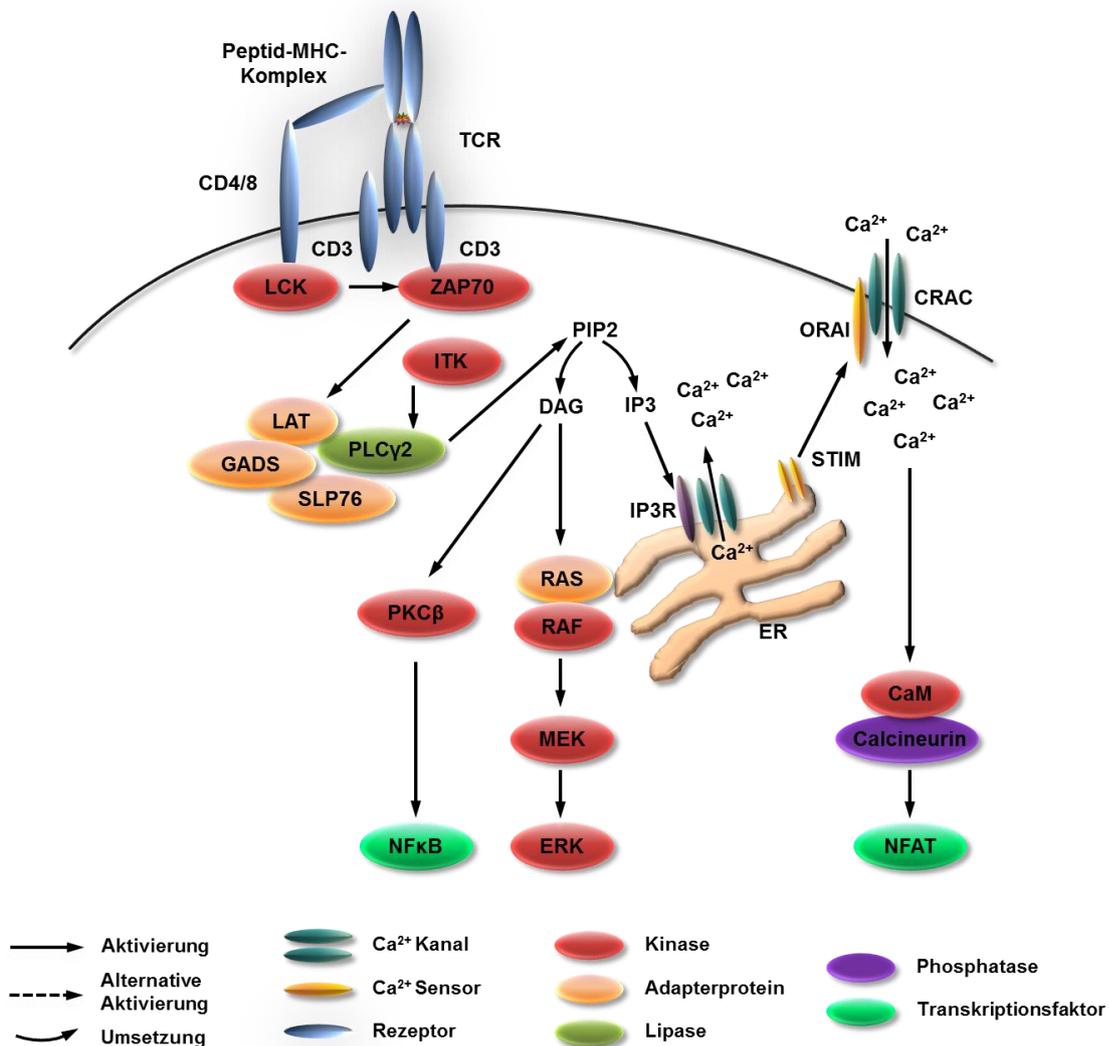


Abb. 7: LCK-Signaling in T-Zellen

Die Erkennung eines Peptid-MHC-Komplexes durch den TCR führt zu einer nachfolgenden Signalkaskade. Dabei phosphoryliert LCK ITAMs in zytoplasmatischen Regionen des CD3, wenn CD4 oder CD8-Korezeptoren den MHC-Komplex binden. Anschließend bindet ZAP70 an die phosphorylierten ITAMs und wird ebenfalls durch LCK phosphoryliert. In der Folge führt das aktivierte ZAP70 zur Rekrutierung des GADS/SLP-76/LAT-Komplexes. Dieser Komplex rekrutiert daraufhin PLCγ2. Nach seiner Aktivierung durch ITK spaltet PLCγ2 PIP2 in DAG und IP3. DAG kann daraufhin den NFκB- sowie den ERK-Signalweg initiieren. IP3 auf der anderen Seite führt über den IP3-Rezeptor (IP3R), STIM, ORAI und CRAC zum Einstrom von Ca²⁺-Ionen in die Zelle. Dadurch wird der NFAT-Signalweg aktiviert.

Quelle: Entnommen und modifiziert nach „Analyse des Transkriptionsfaktors NFAT2 in der Pathogenese der CLL“, Dissertation von Melanie Märklin

1.3.3 LCK in Tumorerkrankungen

Wie bereits angesprochen, wurde LCK in einer Tumorzelllinie erstmals beschrieben und ebenso seine Fähigkeit, eine neoplastische Transformation auszulösen^{55,56,80}. So überrascht es nicht, dass LCK auch eine Rolle in verschiedenen Tumorerkrankungen spielt⁸¹. So wurde eine Überexpression von LCK in der **Akuten Lymphatischen Leukämie (ALL)** beschrieben, wobei die Funktion von LCK hier nur in einer Subgruppe der B-Zell-Vorläufer ALL (**B Cell Precursor (BCP)-ALL**) aufgeklärt werden konnte. So gibt es Belege, dass LCK dort über die Überaktivierung von STAT5 das Überleben und die Proliferation der Tumorzellen erhöht⁸².

Eine ektopische Expression von LCK wurde dagegen für die **Akute Myeloische Leukämie (AML)**, für das Kolonkarzinom und das Kleinzellige Lungenkarzinom (**Small Cell Lung Carcinoma (SCLC)**) gezeigt^{81,83,84}. Im Falle des kleinzelligen Lungenkarzinoms wird eine Interaktion von Kit und LCK vermutet, durch welche die Proliferation, sowie die Inhibition der Apoptose in SCLC-Zellen ausgelöst wird⁸¹. Ebenso wird LCK in einer Reihe von B-Zell-Neoplasien, wie dem Burkitt-Lymphom und, wie oben beschrieben, der CLL exprimiert^{72,85}. Der Mechanismus, über den LCK hierbei fungiert, ist jedoch nicht geklärt. Auf der einen Seite wurde gezeigt, dass LCK für die Transformation von B-Zellen, die dem **Epstein-Barr-Virus (EBV)** ausgesetzt wurden, eine wichtige Rolle spielt⁸⁶. Auf der anderen Seite wurde der Verlust von LCK in der CLL und DLBCL als Schutzmechanismus gegenüber der Apoptose demonstriert^{87,88}. Zudem scheint LCK in der CLL im BCR-Signaling involviert zu sein, wobei der Mechanismus ungeklärt und der prognostische Nutzen umstritten ist^{40,77-79}.

1.4 Leukämien und maligne Lymphome

Wenn Zellen des blutbildenden Systems entarten und maligne Zellen hervorbringen, werden die entstehenden Tumorarten nach den betroffenen Geweben charakterisiert. Betrifft die Erkrankung vor allem das Knochenmark und das periphere Blut, spricht man von Leukämien. Sind hauptsächlich lymphatische Organe betroffen, wird von einem Lymphom gesprochen. Die im weiteren Verlauf näher betrachtete CLL wird als Leukämie des **B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom (B-NHL)-Typs** klassifiziert.

Leukämien werden grundsätzlich in akute und chronische Formen eingeteilt. Erkrankungen des Lymphsystems werden in **Hodgkin-Lymphome (HL, Morbus Hodgkin)** sowie **Non-Hodgkin-Lymphome (NHL)** aufgeteilt. Da sich die vorliegende Arbeit auf die CLL konzentriert, soll im Folgenden nur kurz auf die Klassifikation eingegangen werden.

1 EINLEITUNG

1.5 Die chronische lymphatische Leukämie

Zum ersten Mal wurden Hodgkin-Lymphome 1832 von Thomas Hodgkin charakterisiert, der in sieben Patienten Lymphadenopathien sowie eine Splenomegalie feststellte⁸⁹. Charakteristisch für HL sind hierbei die typischen Hodgkin-Zellen^{90,91}. Zwar ist die Ursache für den Morbus Hodgkin nicht vollständig aufgeklärt, jedoch wird das EBV als Verursacher vermutet. Der genaue Mechanismus ist allerdings bisher unklar⁹²⁻⁹⁴.

NHL werden entsprechend ihrer Herkunft entweder aus der **B-Zell-Linie** (B-NHL) oder der **T-Zell-Linie** (T-NHL) in die genannten Gruppen eingeteilt, sowie in hoch- und niedrigmaligne Untergruppen klassifiziert. Hierbei sind B-NHL mit einem Anteil von etwa 80-90% der NHL deutlich häufiger als T-NHL. Hierbei bilden das DLBCL sowie das folliculäre Lymphom die wichtigsten Subgruppen⁹⁵. Einen Spezialfall bildet die CLL, die den niedrig-malignen B-NHL zugeordnet wird.

1.5 Die chronische lymphatische Leukämie

Die chronische lymphatische Leukämie stellt die häufigste Leukämie bei Erwachsenen in der westlichen Hemisphäre dar und ist ein Hauptbestandteil der vorliegenden Arbeit. Auch in Deutschland zählt die CLL mit circa 40% der Leukämien und etwa 5000 Neuerkrankungen pro Jahr zur häufigsten Leukämie-Form (vgl. Abb. 8). Das mediane Erkrankungsalter liegt zwischen 70-75 Jahren, womit die CLL eine Alterserkrankung darstellt. Außerdem sind Männer häufiger betroffen als Frauen (7,4 gegenüber 4,8 pro 100000)^{96,97}.

Die Erstbeschreibung der CLL erfolgte 1845 durch Rudolf Virchow, dennoch sind die exakten Mechanismen der Entstehung bislang unbekannt, wobei die Erforschung der Pathogenese durch die biologische und klinische Heterogenität der Erkrankung erschwert wird⁹⁸. Fest steht, dass gewisse genetische Prädispositionen existieren, die das Entstehen einer CLL begünstigen, ebenso wie einige Gefahrenstoffe eine CLL auslösen können^{99,100}. Einer CLL geht meist eine **Monoklonale B Lymphozytose** (MBL) voraus. Auch die zelluläre Herkunft der CLL ist nicht geklärt, wobei entweder Marginalzonen-B-Zellen, B1-B-Zellen oder transitionale B-Zellen als Ursprung vermutet werden¹⁰¹.

Die Diagnose einer CLL erfolgt meist als Zufallsbefund und wird über mikroskopische und genetische Untersuchungen, sowie einer Immunphänotypisierung getroffen. Außerdem wird oft nicht direkt therapiert, sondern über eine „*watch-and-wait*“ genannte Strategie beobachtet. Hierbei werden unter anderem die Lymphozytenzahl im Blut, sowie das Vorhandensein von Lymphadenopathien oder Splenomegalien als Kriterien angelegt und alle 3-12 Monate untersucht. Verschiedene Stadien der Krankheit lassen sich entweder durch die

1 EINLEITUNG

1.5 Die chronische lymphatische Leukämie

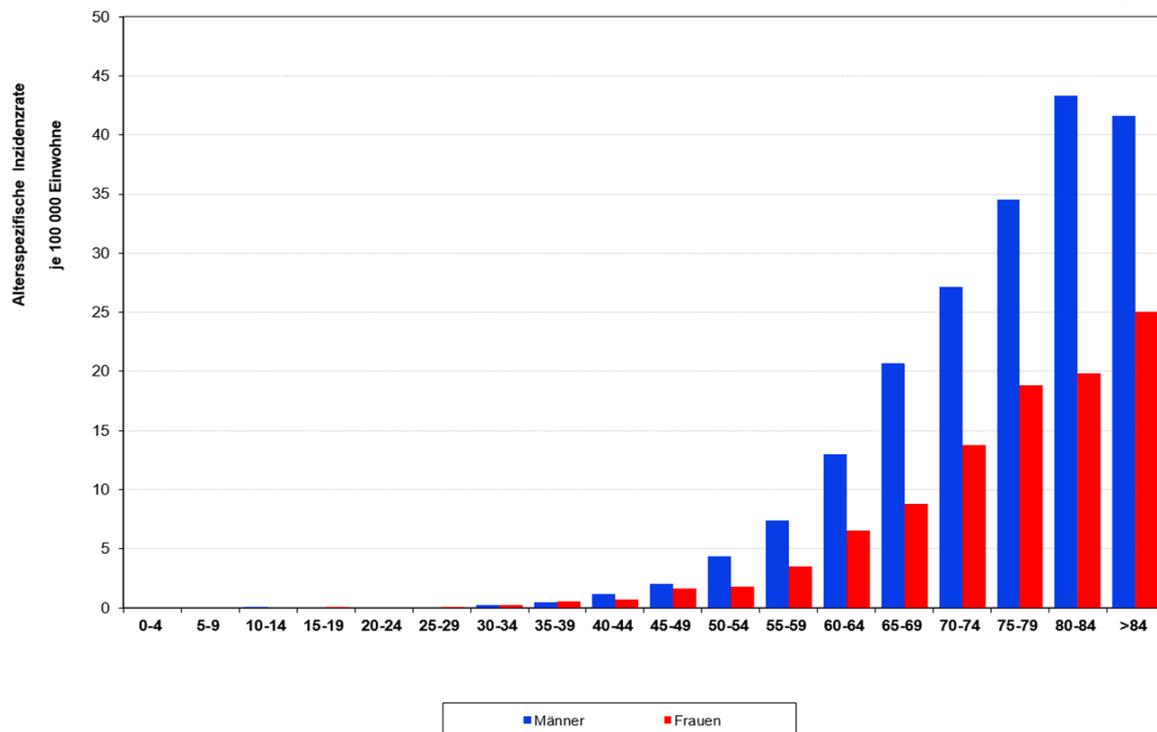


Abb. 8: Anzahl der CLL-Neuerkrankungen in Deutschland

Hochrechnung der altersspezifischen CLL-Neuerkrankungen für 2011 aufgrund von Daten des Zentrums für Krebsregisterdaten, GEKID.

Quelle: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/chronische-lymphatische-leukaemie-cll/@@view/html/index.html#ID0EXE>

Einteilung nach Rai oder Binet vornehmen, wobei die Binet-Klassifikation in Europa gebräuchlicher ist^{97,102,103}. Des Weiteren sind das Vorhandensein von mehr als 5000 klonalen B-Lymphozyten pro μl im Blut und die Lymphozytenverdopplungszeit wichtige Parameter¹⁰⁴⁻¹⁰⁶.

Sobald die Einleitung einer Therapie indiziert ist, wird standardmäßig eine Chemoimmunotherapie eingesetzt¹⁰⁷. Hierbei kommen in der Erstlinientherapie Chemotherapeutika wie Fludarabin (Purin-Analogon), Chlorambucil, Cyclophosphamid und Bendamustin (Alkylanzien) zum Einsatz. Ebenso werden Doxorubicin (Anthracyclin) und Vincristin (Alkaloid) verwendet. Auch Immunsuppressiva wie Cortison, bzw. Prednison (Kortikosteroide) werden eingesetzt. Meist wird in Kombination damit der anti-CD20-Antikörper Rituximab gegeben, es stehen jedoch auch die anti-CD20-Antikörper Ofatumumab and Obinutuzumab zur Verfügung. Auch Kinaseinhibitoren wie Ibrutinib (BTK-Inhibitor) und Idelalisib (PI3K δ -Inhibitor) sowie der **B Cell Lymphoma 2** (BCL-2)-Inhibitor

1 EINLEITUNG

1.5 Die chronische lymphatische Leukämie

Venetoclax werden zunehmend auch in früheren Therapielinien eingesetzt und haben die Therapieoptionen deutlich verbessert. Dabei sind der Allgemeinzustand des Patienten, sowie verschiedene genetische Marker entscheidend bei der Auswahl der eingesetzten Therapeutika. Kommt es zu einem Rezidiv, wird die Kombination oder Anwendung der Therapeutika verändert, oder alternative Substanzen werden verabreicht¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. Eine weitere Therapiemethode ist eine allogene Stammzelltransplantation. Trotz bedeutender Verbesserung der Therapie in den vergangenen Jahren bleibt die CLL bis heute nicht komplett heilbar. Eine weitere Komplikation der CLL ist die sogenannte Richter-Transformation, die in 5-10% der Patienten im Krankheitsverlauf auftritt und die Transformation in ein hochmalignes Lymphom mit schlechter Prognose darstellt^{108,109}.

1.5.1 Biologische und klinische Charakteristika der CLL

Generell beschreibt die CLL eine Akkumulation maligner, klonaler B-Zellen im Knochenmark, weiteren lymphatischen Geweben und dem peripheren Blut von Patienten. CLL-B-Zellen sind durch die Koexpression der B-Zell-Antigene CD19, CD20 und CD23 mit dem T-Zell-Antigen CD5 charakterisiert. Zur besseren Untersuchung pathologischer Eigenschaften wird die CLL in Subgruppen unterteilt, wobei der geläufigsten Unterteilung der Mutationsstatus der IGHV-Gene zugrunde liegt. Der IGHV-Status spielt sowohl bei der klinischen Prognose, als auch bei der Auswahl des Therapieregimes eine wichtige Rolle. So weisen Patienten mit mutierten IGHV-Genen (M-CLL) eine günstigere Prognose auf als Patienten mit unmutierten IGHV-Genen (U-CLL).

Weitere prognostisch ungünstige Marker sind CD38 und ZAP70. So wird CD38 auch in gesunden B-Zellen exprimiert, spricht in der CLL jedoch für einen ungünstigen Verlauf. Für ZAP70 konnte zunächst die Expression in CLL-Zellen nachgewiesen werden, während später ein Zusammenhang zwischen der ZAP70-Expression und einem erhöhten BCR-Signaling belegt werden konnte. Beide Marker werden ferner häufig in der prognostisch ungünstigen U-CLL exprimiert⁵.

Zusätzliche prognostische Marker stellen Chromosomen-Aberrationen und Mutationen dar. Chromosomen-Aberrationen kommen in 80% der CLL-Patienten vor und sind dort nur in den CLL-Zellen zu finden. Die Ursache der Chromosomen-Aberrationen liegt jedoch im Unklaren. Die wichtigsten Aberrationen sind die Deletionen 13q14, 11q22.3 und 17p13 und die Trisomie 12q13. Hierbei stellt die Deletion 13q14 die häufigste Aberration dar, welche zudem als einzige Aberration eine günstige Prognose aufweist^{110,111}. Das zugrundeliegende Phänomen stellt einen komplexen Suppressor-Mechanismus dar, in dem unter anderem die microRNAs Mir-15a und Mir-16-1 involviert sind¹¹². Die ungünstigsten Aberrationen sind die

1 EINLEITUNG

1.6 Transgene Mausmodelle

Deletionen 11q22.3 sowie 17p13, welche das *Ataxia Teleangiectatica-Mutierten* (ATM)-Gen oder das Tumorsuppresorgen **P53** (TP53) betreffen. Beide Gene spielen eine zentrale Rolle bei der Reparatur von DNA-Schäden^{113,114}. Hierbei tritt die Deletion von 11q22.3 häufiger auf (ca. 10% der CLL-Patienten) als die Deletion 17p13, welche initial sehr selten ist (ca. 4% der CLL-Patienten). Jedoch weisen etwa ein Drittel der Patienten mit einer rezidierten oder refraktären CLL diese Aberration auf, welche mit einer ungünstigen Prognose einhergeht^{110,114}.

Zudem können direkte Mutationen und Deletionen des TP53-Gens auftreten, welche neben Mutationen des *neurogenic locus NOTCH homolog protein 1* (NOTCH1) und Mutationen des *Splicing Factor 3B subunit 1* (SF3B1) zu den wichtigsten Mutationen in CLL-Zellen zählen. Alle genannten Mutationen sind hierbei mit einer ungünstigen Prognose verknüpft^{115,116}. Mutationen von TP53 und SF3B1 spielen bei defekten Antworten auf DNA-Schäden und/oder der Häufung von DNA-Schäden in CLL-Zellen eine wichtige Rolle^{117,118}. Währenddessen gehen NOTCH1-Mutationen mit einem erhöhten Überleben von CLL-Zellen einher¹¹⁹. Des Weiteren sind TP53 und NOTCH1-Mutationen mit einer erhöhten Chemoresistenz der CLL-Zellen, sowie einem erhöhten Risiko einer Richter-Transformation assoziiert^{114,119-121}. Außerdem konnte vor Kurzem eine Koevolution von genetischen und epigenetischen Aberrationen in Fällen mit Hochrisiko-CLL aufgezeigt werden, was die Bedeutung von Mutationen in der CLL weiter unterstreicht und die wachsende Wichtigkeit der Untersuchung epigenetischer Mechanismen in der CLL deutlich macht¹²².

1.6 Transgene Mausmodelle

Zur Erforschung der Pathogenese von Tumorerkrankungen sind Modellsysteme wie transgene Mauslinien unersetzbar. Dies liegt unter anderen an eingeschränkten Möglichkeiten von *In-vitro*-Analysen primärer Patientenzellen sowie von Tumorzelllinien. So lassen sich zwar die Aktivität von Tumorzellen, sowie ihre Reaktion auf verschiedene Stimuli gut *in vitro* ermitteln. Die Entwicklung und Transformation von Tumorzellen sowie deren genetischen und zellulären Ursachen lassen sich *in vitro* jedoch nur retrospektive analysieren, während im Mausmodell die Pathogenese unter spezifischen Voraussetzungen untersucht werden kann. Hierzu werden genetisch veränderte Inzuchtstämme verwendet.

1.6.1 Das TCL1-Modell

Zur Untersuchung der CLL in Modellorganismen gibt es eine Vielzahl an Möglichkeiten. Hierbei stellt das Eμ-TCL1-Modell eines der am häufigsten verwendeten Modelle dar¹²³⁻¹²⁶. Das TCL1-Gen wurde zuerst im Menschen in der T-Zell-Prolymphozytenleukämie (T-PLL) beschrieben¹²⁷. Des Weiteren ist TCL1 ebenfalls ein wichtiger Faktor in der Entwicklung von

1 EINLEITUNG

1.6 Transgene Mausmodelle

T- und B-Zellen, außerdem wird es in verschiedenen T- und B-Zell-Erkrankungen exprimiert¹²⁸⁻¹³¹. Ferner spielt TCL1 auch eine Rolle in einer Subgruppe von CLL-Patienten^{132,133}.

2002 wurde in der Gruppe von Carlo M. Croce das erste TCL1-CLL-Mausmodell entwickelt und publiziert¹²⁶. Hierbei kommt es zur Expression von TCL1 unter der Kontrolle des B-Zell-spezifischen E μ -Enhancers. Dies führt zur Entstehung einer oligoklonalen CLL, welche äußerst ähnlich zur humanen CLL verläuft. Im Verlauf kommt es dabei in den Mäusen zur malignen Expansion CD5⁺-positiver B-Zell-Klone im Blut, sowie den Organen des Lymphsystems, wodurch die Tiere in einem medianen Alter von 10-12 Monaten versterben.

1.6.2 Knockout-Modelle

Um Knockouts in Mauslinien einzubringen, gibt es grundsätzlich mehrere Möglichkeiten: Den konditionellen Knockout oder den konventionellen Keimbahn-Knockout. Im Folgenden soll zuerst der konditionelle Knockout vorgestellt werden, da das zuerst verwendete TCL1 NFAT2-KO-Modell darauf basiert.

Erstmals wurde ein konditionaler Knockout mittels Cre/loxP-Rekombinationssystem des P1 Bakteriophagen 1993 durch Klaus Rajewski erfolgreich erzeugt¹³⁴⁻¹³⁶. Grundlage dieses Systems ist die Bindung der zyklischen Rekombinase (Cre) an sogenannte *locus of crossing over [x] of P1 recombinase (loxP)*-Sequenzen¹³⁷. Wird das gewünschte Gen nun durch loxP-Sequenzen flankiert, kommt es während der homologen Rekombination zur Deletion des Gens durch die Cre-Rekombinase. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Mausmodell verwendet, in dem loxP-Sequenzen in Exon 3 von NFAT2 eingebracht wurden¹³⁸. Hierdurch kommt es zu einem frühzeitigen Stop der Translation, wodurch kein funktionelles NFAT2 gebildet werden kann. Um einen B-Zell-spezifischen Knockout zu erhalten, wurde die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des B-Zell-spezifischen CD19-Promotors exprimiert, der schon frühzeitig in der B-Zellentwicklung aktiviert wird¹³⁹ (siehe Abb. 9 und 11).

Ein konventioneller Knockout lässt sich durch das Einbringen einer Mutation oder einer Sequenz, die zum frühzeitigen Abbruch der Transkription führt, generieren. Dies wurde im verwendeten LCK-Knockout-Modell durch die Einführung einer Neomycin- Resistenz im Zielgen erreicht (siehe Abb. 10 und Abb. 11), wodurch eine nichtfunktionale oder inaktivierte Version des Zielgens exprimiert wird⁶³. Ein konventioneller Knockout führt bei Genen, die in der Entwicklung eine wichtige Rolle spielen, jedoch häufig zu einem embryonal-lethalen Phänotyp. Um dies zu umgehen, kann ein konditioneller Knockout verwendet werden.

1 EINLEITUNG

1.6 Transgene Mausmodelle

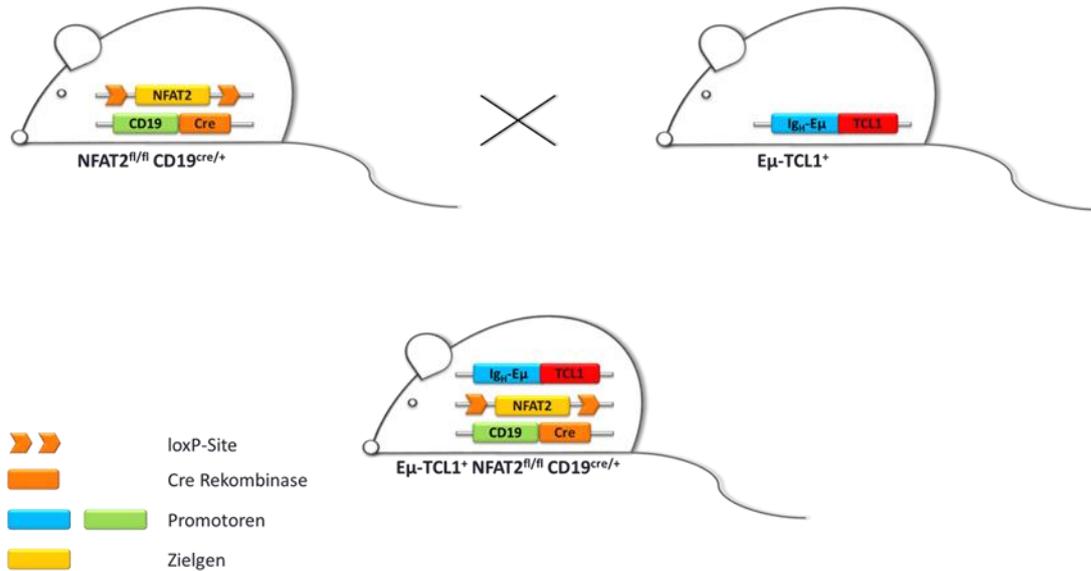


Abb. 9: $E\mu-TCL1$ -Modell mit konditionellem $NFAT2$ -KO

Durch Kreuzung der $E\mu-TCL1$ -Linie mit homozygoten Tieren der $NFAT2^{fl/fl} CD19^{cre/+}$ ($NFAT2$ -KO)-Linie werden Tiere mit dem Genotyp $E\mu-TCL1 NFAT2^{fl/fl} CD19^{cre/+}$ ($TCL1 NFAT2$ -KO) generiert.

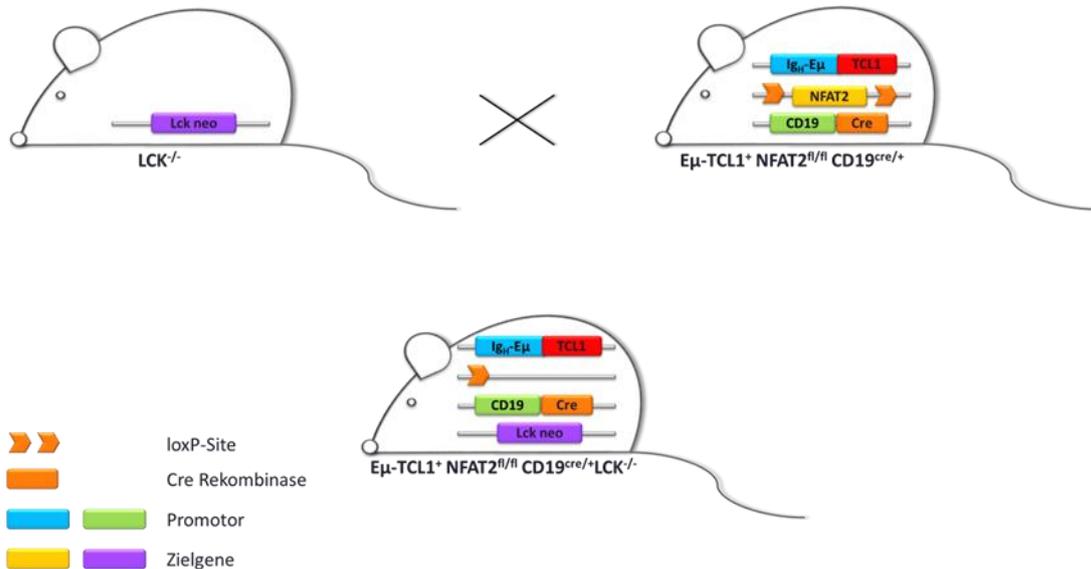


Abb. 10: $E\mu-TCL1$ -Modell mit konventionellem LCK -KO

Die zuvor eingeführte $E\mu-TCL1 NFAT2^{fl/fl} CD19^{cre/+}$ ($TCL1 NFAT2$ -KO)-Linie wird zur Generierung der neuen Modellsystems mit homozygoten Tieren der $B6.129S2-LCK^{tm1Mak}/J$ ($LCK^{-/-}$, LCK -KO)-Linie verpaart. Hierdurch erhält man in der F3-Generation die gewünschten $TCL1 NFAT2$ -KO LCK -KO-Tiere.

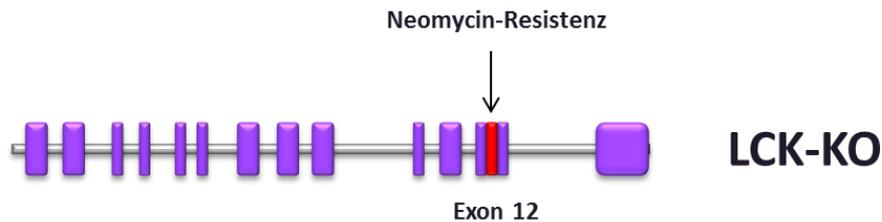
1 EINLEITUNG

1.6 Transgene Mausmodelle

Zusätzlich dazu, kann bei einem konditionellen Knockout eine räumliche und zeitliche Kontrolle des Knockouts erreicht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Knockout von LCK mithilfe eines konventionellen Knockouts generiert, während der Knockout von NFAT2 mittels eines konditionellen Knockouts erreicht wurde (schematische Darstellung der verwendeten Modelle siehe Abb. 9-11).

A)



B)

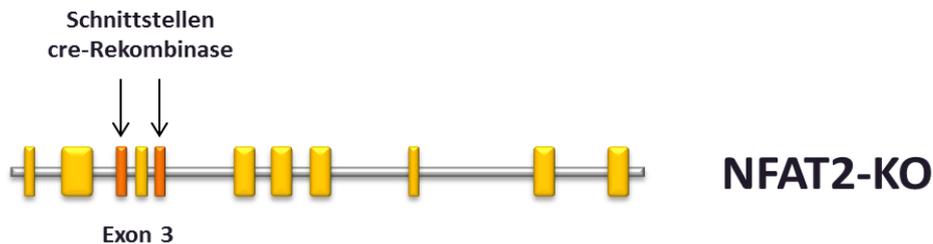


Abb. 11: Darstellung der verwendeten Knockouts auf genetischer Ebene

A) Der konditionelle Knockout von LCK wird durch das Einbringen einer Neomycin-Resistenz erreicht, wodurch kein funktionales Protein mehr gebildet werden kann.

B. Der konditionelle Knockout von NFAT2 beruht auf dem Einbringen zweier loxP Sequenzen, die Exon 3 flankieren und als Schnittstellen der cre-Rekombinase dienen und wodurch das Gen deletiert wird.

1.7 Zielsetzung

Bis zum heutigen Tag ist die CLL in den meisten Fällen unheilbar. Zwar hat sich in den vergangenen Jahren die Therapie der CLL durch den Einsatz therapeutischer Antikörper wie Rituximab (CD20-Antikörper) und Kinaseinhibitoren wie Idelalisib (PI3K δ -Inhibitor) und Ibrutinib (BTK-Inhibitor) sowie dem BCL-2-Inhibitor Venetoclax drastisch verbessert. Dennoch ist die einzige kurative Behandlung die allogene Stammzell-Transplantation, welche jedoch nur in einem kleinen Anteil der Patienten durchgeführt werden kann. Hauptsächlich erleiden die Patienten wiederholte Rezidive, in deren Verlauf es auch zu einer Richter-Transformation kommen kann. Aufgrund der eingeschränkten Behandlungsmöglichkeiten ist das Interesse an neuen Therapieoptionen groß.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Analyse der molekularen Mechanismen von NFAT2 und LCK in der CLL und deren Einfluss auf die Anergie von CLL-Zellen. Zuerst soll dabei im TCL1-Mausmodell die Expression verschiedener Anergie-Gene nach Beeinflussung des BCR- und NFAT-Signalings untersucht werden.

Anschließend wird eine detailliertere Analyse der Beteiligung von LCK am BCR-Signaling sowie am NFAT-Signaling durchgeführt, um eine Lokalisierung von LCK in den beiden Signalwegen zu ermöglichen.

In einem weiteren TCL1-Mausmodell, in das zusätzlich ein LCK-Knockout eingebracht wurde, sollen abschließend die Auswirkungen des Verlusts von LCK auf den Verlauf der CLL untersucht werden. Hierbei steht der Einfluss auf die Überlebensdauer und die Dynamik der Erkrankung im Fokus. Letztlich soll auch die Auswirkung der Abwesenheit von LCK auf die Anergie der CLL-Zellen untersucht werden, um die Bedeutung für mögliche neue Therapien näher zu erläutern.

2 MATERIAL & METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

96-well plate F-Bottom	Greiner bio-one, Frickenhausen
96-well plate V-Bottom	Greiner bio-one, Frickenhausen
96-well plate, white	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 Röhrchen 5 ml	Costar® Corning, Tewksbury, MA
Falconröhrchen 15; 50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Gentle MACS C-tubes	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Gewebe-Kulturflaschen 75 cm ²	Greiner bio-one, Frickenhausen
Gewebe-Kulturschale Polystyrol PS 16/60 mm	Greiner bio-one, Frickenhausen
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
Shearingtubes microTUBE AFA 6x16mm	Covaris, Woburn, MA
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

2 MATERIAL & METHODEN

2.1 Material

Zellsieb 40 µm, steril	Costar® Corning, Tewksbury, MA
Zellsieb 70 µm, steril	Costar® Corning, Tewksbury, MA

2.1.2 Reagenzien & Chemikalien

100 bp DNA Ladder	Invitrogen™, Life technologies, Darmstadt
37 % Formaldehyd p.a., ACS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
7-AAD	BD Biosciences, Heidelberg
Agarose NEEO Ultra	Sigma-Aldrich, Steinheim
Annexin V : PE Apoptosis Detection Kit I	BD Biosciences, Heidelberg
APC BrdU Flow Kit	BD Biosciences, Heidelberg
Biocoll (Dichte 1,077g/ml)	Merck, Darmstadt
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
Cell Fixation/Permeabilisation Kit	BD Biosciences, Heidelberg
Cell Lysis Buffer (10X)	New England Biolabs, Ipswich, MA
ddH ₂ O	Merck, Darmstadt
D-Glucose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DNase & RNase freies Wasser	Promega, Wisconsin, USA,
Dnase I	Invitrogen™ Life technologies, Darmstadt
Duolink® In Situ Red Starter Kit Mouse/Rabbit	Merck, Darmstadt
EDTA-Lösung (0,5M)	FLUKA, Steinheim
EGTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Eosin G-Lösung 0,5% wässrig	Merck, Darmstadt
Erythrozytenlysepuffer	ccpro GmbH, Oberdorla
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
FuraRed™, AM, cell permeant	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Merck, Darmstadt

2 MATERIAL & METHODEN

2.1 Material

HALT Protease & Phosphatase Inhibitor (100X)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Hämatoxinilin	Merck, Darmstadt
HEPES	Gibco® Life technologie, Carlsbad, CA
iDeal ChIP-seq kit for Histones	Diagenode S.A., Seraing, Belgien
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isofluran	CP-pharma, Burgdorf
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Steinheim Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
KAPA2G Fast HotStart Genotyping Mix	Merck, Darmstadt
KAPA Extraktionspuffer	Merck, Darmstadt
KAPA Express Extract Enzym	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Gibco® Life technologie, Carlsbad, CA
Licor Blocking Buffer	Li-COR Bioscience, Lincoln, US
MACS Puffer	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
MEN nicht essentielle Aminosäuren	Gibco® Life technologie, Carlsbad, CA
Methanol	Merck, Darmstadt
Midori Green	Biozym, Hessisch Oldendorf
Rneasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Midori Green	Nippon Genetics Europe GmbH, Düren
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumpyruvat	Gibco® Life technologie, Carlsbad, CA
Neomount Eindeckmedium	Merck Millipore, Darmstadt
Orange G	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pan B Cell Isolation Kit (mouse)	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
PBS w/o Ca ²⁺ Mg ²⁺	Sigma-Aldrich, Steinheim
PerfeCTa Quanta SYBR Green FastMix	QuantaBio, Beverly, MA
Penicillin/Streptomycin-Mix	Merck, Darmstadt
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pluronic™ F-127 (20% Solution in DMSO)	Invitrogen™ Life technologies, Darmstadt
qScript cDNA Super Mix	QuantaBio, Beverly, MA
QuickExtract DNA Extraktionslösung	QuantaBio, Beverly, MA
Reducing Agent	Life technologies, Darmstadt
RNAse & DNAse freies Wasser	Promega, Wisconsin, USA,

2 MATERIAL & METHODEN

2.1 Material

Rneasy Mini Plus 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
Wasser, AFA-grade	Covaris, Woburn, MA
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
β-Mercaptoethanol (Zellkultur)	Gibco® Life technologie, Carlsbad, CA

2.1.3 Geräte und Zubehör

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
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
M220 Focused-ultrasonicator™	Covaris, Woburn, MA

2 MATERIAL & METHODEN

2.1 Material

Magnetisches Rack, DynaMag™-15 Magnet	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau
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 ₄ Cl in ddH ₂ O, 0,1 mM EDTA gepuffert mit KHCO ₃ auf pH 7,4
B-Zellmedium	RPMI, 10% FCS, 1% Pen/Strep, 1% MEN, 1% Natriumpyruvat 50 µM β-Mercaptoethanol
Einfriermedium	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 ²⁺ Ringer	1 mM MgCl ₂ , 4mM KCl, 140 mM NaCl, 10 mM D-Glucose, 0,5 mM EGTA, 10 mM HEPES
4 mM Ca ²⁺ Ringer	4 mM CaCl ₂ , 1 mM MgCl ₂ , 4mM KCl, 140 mM NaCl, 10 mM Glucose, 0,5 mM EGTA, 10 mM HEPES

2 MATERIAL & METHODEN

2.1 Material

2.1.5 Antikörper

MHC I (20-8-4S)	mouse IgG _{2a}	AG Stefanovic
αIgM	mouse IgM	Southern Biotech, Birmingham, AL
Annexin V-PE	-	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-acetyl-Histone H3 Antibody	poly-rabbit	Millipore, Billerica, MA
B220-eFluor605 (RA3-6B2)	rat IgG _{2a}	eBioscience, Frankfurt
BrdU-APC (3D4)	mouse IgG ₁	BD Biosciences, Heidelberg
CD19-FITC (eBio1D3)	rat IgG _{2a}	eBioscience, Frankfurt
CD19-PECy7 (eBio1D3)	rat IgG _{2a}	eBioscience, Frankfurt
CD3e-FITC (145-2C11)	arm. hamster IgG	eBioscience, Frankfurt
CD5-APC (53-7.3)	rat IgG _{2a}	eBioscience, Frankfurt
CD5-eFlour450 (53-7.3)	rat IgG _{2a}	eBioscience, Frankfurt
Cofilin	poly-rabbit	Cell Signaling, Danvers, MA
GAPDH	mouse, IgG ₁	R&D Systems, Minneapolis, MN
Goat anti-Mouse IgG2a, Alexa-Flour 488	Poly-goat IgG	Thermo Fisher Scientific
IgG Isotype Control	rabbit IgG	Cell Signaling, Danvers, MA
IgM-PE (II/41)	rat IgG _{2a}	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
NFAT2 (7A6)	mouse IgG ₁	BD Biosciences, Heidelberg
NFAT2 (7A6) ChIP grade	mouse IgG ₁	Abcam, Cambridge, UK
anti-(α)IgM F(ab') ₂	mouse IgM	Dianova, Hamburg
β-Aktin (13E5)	rabbit IgG	Cell Signaling, Danvers, MA

2.1.6 Primer

CD40L Promotor	ChIP	ACTCGGTGTTAGCCAGG GGGCTCTTGGGTGCTATTGT
IL2 Promotor	ChIP	TCCAAAGAGTCATCAGAAGAG GGCAGGAGTTGAGGTTACTGT

2 MATERIAL & METHODEN

2.2 Methoden

LCK Promotor	ChIP	CAGGCAAAACAGGCACACAT CCTCCAGTGA CTCTGTTGGC
CD19	Genotypisierung	ACG ACC AAG TGA CAG CAA TG CTC GAC CAG TTT AGT TAC CC
E μ -TCL1	Genotypisierung	CAT CTG GCA GCA GCT CGA GCC GAG TGC CCG ACA CTC GTC ATT CAG AAC CTG GAG AGA GGC
LCK	Genotypisierung	CAG AGT CAG AGT CCA TGT GTG CAC ACC CGT GAT ATT GCT GAA GAG CTT
NFAT2	Genotypisierung	CCA TCT CTC TGA CCA ACA GAA GCC AG CCT ATT TAA ACA CCT GGC TTC CTG CG TCT TGG GTA TGT AAT CCT GTG GCA
Aktin	qRT-PCR	ACT CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT AGT CTC TTT CCC CGA CAT CA
NFAT2	qRT-PCR	CAC CTC GAT CCG AAG CTC
Cbl-b	RT ² -qPCR Primer Assay	Qiagen, Hilden
CCR1	RT ² -qPCR Primer Assay	Qiagen, Hilden
CCR7	RT ² -qPCR Primer Assay	Qiagen, Hilden
CCR9	RT ² -qPCR Primer Assay	Qiagen, Hilden
Cdkn2a	RT ² -qPCR Primer Assay	Qiagen, Hilden
CXCR3	RT ² -qPCR Primer Assay	Qiagen, Hilden
CXCR4	RT ² -qPCR Primer Assay	Qiagen, Hilden
CXCR5	RT ² -qPCR Primer Assay	Qiagen, Hilden
Egr2	RT ² -qPCR Primer Assay	Qiagen, Hilden
Grail (Rnf128)	RT ² -qPCR Primer Assay	Qiagen, Hilden
Lck	RT ² -qPCR Primer Assay	Qiagen, Hilden
Trp53	RT ² -qPCR Primer Assay	Qiagen, Hilden

2.2 Methoden

2.2.1 Tiermodelle

2.2.1.1 Haltung und Zucht der Mäuse

Die in dieser Arbeit verwendeten Tiere wurden in der Tierhaltung des Verfügungsgebäudes der Medizinischen Fakultät (FORS) im gelben Bereich gehalten. Dabei handelte es sich um

2 MATERIAL & METHODEN

2.2 Methoden

eine Spezifiziert PathogenFreie (SPF) - Haltung mit einer moderaten Trockenbarriere in offener Käfighaltung (12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus, 23 °C), sowie eine Haltung in *Individually Ventilated Cages* (IVCs). Die Versorgung der Tiere erfolgte *ad libitum* mit einer Zuchtdiät für Mäuse (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) und frischem Trinkwasser. Verpaarungen erfolgten nach der Geschlechtsreife im Alter von acht Wochen. Im Alter von vier Wochen wurden die Tiere mittels Ohrlochmarkierung nach dem verwendeten Ohrlochschemata markiert. Die Ohrmarken wurden dann zur Genotypisierung mittels PCR aufgearbeitet.

Eine Bestands- und Gesundheitskontrolle fand wöchentlich statt und ein zusätzliches Hygienemonitoring alle sechs Monate. Hierfür wurde eine virologische, bakteriologische und parasitologische Untersuchung der Einstreu-Sentinellen durchgeführt. Alle Tierversuche wurden vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigt und in Zusammenarbeit mit dem Tierärztlichen Dienst in Tübingen durchgeführt (Genehmigungsnr. M9/13 & M11/16).

2.2.1.2 Verwendete transgene Mauslinien

Zur Zucht und tierexperimentellen Untersuchung dienten genetisch veränderte Tiere des C57BL/6J-Hintergrundes. So wurde, da NFAT2 für die Entwicklung verschiedener Organsysteme (Herz, Gefäßsystem, ZNS) essentiell ist, eine konditionelle Knockout-Linie für NFAT2 verwendet. Aufgrund des embryonal-lethalen Phänotyps eines konventionellen NFAT2-Knockouts wurden daher „gefloxt“ NFAT2^{fl/fl} Mäuse eingesetzt, welche aus dem Labor von Prof. A Rao (La Jolla Institute, San Diego) stammen. Um eine B-Zell-spezifische Deletion von NFAT2 zu erreichen, wurden diese Tiere mit der CD19-cre Linie verpaart (B6.129P2(C)-*Cd19^{tm1(cre)Cgn}/J*). Der Genotyp dieser Tiere wurde mit NFAT2^{fl/fl}CD19^{cre/+} (NFAT2-KO) angegeben.

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

Für die Beschreibung der Rolle von NFAT2 in der CLL wurde das Eμ-*TCL1*-Modell mit dem konditionellen NFAT2 Knockout-Modell kombiniert. Die verwendeten Tiere trugen den Genotyp Eμ-*TCL1*^{+/-}NFAT2^{fl/fl}CD19^{cre/+} (TCL1 NFAT2-KO). In dieser Linie kommt es durch die B-Zell-spezifische Defizienz von NFAT2 zu einer Akzelerierung der Leukämie mit einer verminderten Überlebensdauer und einer aggressiven Transformation⁴⁰.

2 MATERIAL & METHODEN

2.2 Methoden

Um die Rolle von LCK in der CLL-Pathogenese zu analysieren, wurden Tiere der Linie B6.129S2-LCK^{tm1Mak}/J (LCK^{-/-}, LCK-KO) verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Linie, die einen Keimbahn-Knockout von LCK aufweist. Dies wurde durch das Einbringen einer Neomycin-Kassette in Exon 12 erreicht, was im Verlust der Proteinexpression resultiert⁶³. Dadurch kommt es vor allem zu einer eingeschränkten Funktion und Entwicklung der T-Zellen. Damit geht eine erhöhte Infektanfälligkeit in der offenen Haltung einher, welche jedoch durch die Haltung in IVCs vollständig ausgeglichen wurde. Die Tiere waren fertil, jedoch war die durchschnittliche Wurfgröße mit vier Tieren geringfügig kleiner als bei herkömmlichen B6-Mäusen.

Um Tiere sowohl mit dem NFAT2 Knockout, als auch dem LCK Knockout zu erhalten, wurden Tiere der E μ -TCL1^{1+/-}NFAT2^{fl/fl}CD19^{cre/+}-Linie mit B6.129S2-LCK^{tm1Mak}/J-Mäusen gekreuzt. Die resultierende Linie trug den Genotyp E μ -TCL1^{1+/-}NFAT2^{fl/fl}CD19^{cre/+}LCK^{-/-} (TCL1 NFAT2-KO LCK-KO).

2.2.1.3 Genotypisierung der Tiere

Zur Extraktion der DNA wurden die gewonnenen Ohrmarken der Tiere in mit 88 μ l DNase & RNase freiem Wasser, 10 μ l KAPA Extraktionspuffer und 2 μ l KAPA Express Extract Enzym versetzt und bei 75 °C 10 min in einem Thermoschüttler inkubiert. Die Lösung wurde abschließend bei 95 °C 5 min inaktiviert. Die DNA Lösungen wurden nach dem Einsatz in der PCR bei -20 °C gelagert. Für den PCR-Ansatz wurden je 1 μ l der extrahierten DNA eingesetzt. Die verwendeten Primersequenzen sind unter 2.1.6 aufgelistet.

Tab. 1: Zusammensetzung der PCR-Mixe und verwendete PCR-Programme

NFAT2 PCR

DNase & RNase freies H ₂ O	8,0 μ l	95 °C	3 min	} 35 Zyklen
DMSO	1,0 μ l	94 °C	15 s	
KAPA Mouse Genotyping	12,5 μ l	58 °C	15 s	
Hot Start Kit Mix				
Primer fw/rv je: (10 μ M)	1,25 μ l	72 °C	15 s	
		72 °C	1 min	
		10 °C	∞	
NFAT2 ^{fl/fl} \rightarrow 397 bp		NFAT2 ^{+/+} \rightarrow 332 bp		

CD19-cre PCR

DNase & RNase freies H ₂ O	9,0 μ l	95 °C	1 min
---------------------------------------	-------------	-------	-------

2 MATERIAL & METHODEN

2.2 Methoden

KAPA Mouse Genotyping Hot Start Kit Mix	12,5 µl	95 °C	15 s	} 30 Zyklen
Primer fw/rv je: (10 µM)	1,25 µl	55 °C	15 s	
		72 °C	10 s	
		4 °C	∞	
CD19 ^{cre/+} → 352 bp		CD19 ^{+/+} → keine Bande		

Eµ-TCL1 PCR

DNase & RNase freies H ₂ O	9,0 µl	96 °C	3 min	} 30 Zyklen
KAPA Mouse Genotyping Hot Start Kit Mix	12,5 µl	95 °C	15 s	
Primer fw/rv je: (10 µM)	1,25 µl	65 °C	15 s	
		72 °C	10 s	
		4 °C	∞	
Eµ-TCL1 ^{+/-} → 350 bp		Eµ-TCL1 ^{-/-} → keine Bande		

LCK PCR

DNase & RNase freies H ₂ O	7,75 µl	95 °C	3 min	} 35 Zyklen
KAPA Mouse Genotyping Hot Start Kit Mix	12,5 µl	95 °C	15 s	
		61 °C	15 s	
		72 °C	15 s	
Primer fw/neo fw/rv je: (10 µM)	1,25 µl	72 °C	1 min	
		4 °C	∞	
LCK ^{-/-} = LCK ^{neo/neo} → 421 bp		LCK ^{+/+} → 292 bp		

Im Anschluss an die Amplifizierung wurden die PCR-Proben auf einem 1,5 %-Agarosegel aufgetrennt und in einer Geldokumentationskammer ausgewertet. Um die DNA-Banden sichtbar zu machen, wurde das Agarosegel mit MidoriGreen Farbstoff (1:10000) versetzt.

2.2.2 Präparation der Organe

Für die Präparation und anschließende Aufarbeitung der Organe wurden die Tiere mittels CO₂ euthanasiert. Die Arbeitsschritte für die entsprechenden Organe werden im Folgenden detailliert beschrieben.

2.2.2.1 Milz

Die Milzen wurden aus dem Abdomen freipräpariert in jeweils ein Gentle MACS C-Tube mit 5 ml MACS-Puffer aufgenommen. Mittels des Programm m_spleen_04 des Gentle MACS erfolgte durch die Zerkleinerung die Herstellung einer Zellsuspension. Diese Zellsuspension wurde über 40 µm Zellsiebe filtriert und mit 10 ml MACS-Puffer gewaschen (300 x g, 5 min, 4 °C). Vor durchflusszytometrischen Analysen wurden die Splenozyten mit einer Erythrozytenlyse behandelt. Hierfür wurde 1 ml Zellsuspension mit 9 ml Ammoniumchlorid-Puffer vermischt und 30 s auf Eis inkubiert. Danach wurde sofort 40 ml MACS-Puffer zugegeben, um die Lyse zu stoppen. Abschließend wurden die Zellen zwei Mal mit frischem Puffer gewaschen (300 x g, 5 min, 4 °C) und zur FACS-Analyse eingesetzt.

2.2.2.2 Knochenmark

Femur und Tibia wurden von beiden Seiten der Hinterläufe entnommen und in kalten 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 40 µm Zellsiebe filtriert. Danach erfolgte die Lyse der Erythrozyten mit 9 ml Ammoniumchlorid-Puffer wie bereits für die Milz beschrieben. Am Ende wurden die Zellen zwei Mal mit frischem Puffer gewaschen (300 x g, 5 min, 4 °C) und zur FACS Analyse eingesetzt.

2.2.3 Blutentnahme und Aufarbeitung

2.2.3.1 Blutentnahme

Für die Blutabnahme wurden die Tiere durch eine Inhalationsnarkose mittels Isofluran betäubt. Die Entnahme erfolgte retroorbital mittels Kapillare, das gewonnene Blut wurde in EDTA-Microvetten aufgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung zwischengelagert.

2.2.3.2 Isolation der PBMCs

Die PBMCs wurden aus dem Blut mittels Erythrozytenlyse gewonnen. Für die Lyse wurden 30 µl EDTA-Blut mit 270 µl Ammoniumchlorid-Puffer versetzt und die Erythrozyten unter Schütteln 10 min auf Eis lysiert. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt (300 x g, 5 min, 4 °C), woraufhin die Zellen zur zweiten Lyse in 100 µl Lysepuffer aufgenommen wurden. Nach weiteren 10 min Inkubation auf Eis wurde die Lyse mit 1 ml MACS-Puffer gestoppt und die Zellen bei 300 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Nach einem letzten Waschschrift mit 500 µl MACS-Puffer wurden die Zellen für anschließende Analysen verwendet.

2.2.4 Isolation und Kultivierung der B-Zellen

2.2.4.1 Negative magnetische Isolation der B-Zellen

Für die Negativ-Isolation von murinen B-Zellen wurden als Ausgangsmaterial Splenozyten, wie unter 2.2.2.1 beschrieben, vorbereitet. Die B-Zellen wurden hierfür mit dem Pan B Cell Isolation Kit nach Herstellerprotokoll isoliert. Dafür wurden im ersten Schritt je $1-2 \times 10^8$ Zellen mit dem Pan B Cell Biotin-Antibody Cocktail (CD4, CD11c, CD49b, CD90.2, Gr-1 und Ter-119) für 5 min inkubiert und für weitere 10 min mit Anti-Biotin MicroBeads. Die Separation erfolgte über LS MACS Säulen im magnetischen Feld. Der Durchfluss enthielt die unmarkierten B-Zellen, welche für die weiteren Versuche eingesetzt wurden.

2.2.4.2 B-Zell-Rezeptor-Stimulation

Für die BCR-Stimulation wurden negativ isolierte B-Zellen (siehe 2.2.4.1) verwendet. Diese wurden á $1-2 \times 10^7$ Zellen/ml in B-Zellmedium aufgenommen. Zur Untersuchung der Anergie-Signatur muriner CLL-Zellen wurden die Ansätze entweder unbehandelt inkubiert oder aber mit $10 \mu\text{g/ml}$ αIgM stimuliert. Außerdem wurden neben αIgM zu den jeweiligen Ansätzen auch $1 \mu\text{M}$ CsA, $1 \mu\text{M}$ FK506, $1 \mu\text{M}$ INCA oder $10 \mu\text{M}$ VIVIT zugegeben und nach 1 h oder 6 h geerntet.

2.2.5 Dichtegradientenzentrifugation der Splenozyten

Hierfür wurde die Milz, wie unter 2.2.2.1 beschrieben, bis zur Erythrozytenlyse aufgearbeitet. Statt der Lyse wurde anschließend eine Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll durchgeführt. Dafür wurde die Zellsuspension nach dem Zerkleinern der Milz auf ein Volumen von 30 ml mit PBS aufgefüllt. Danach wurde die Zellsuspension vorsichtig auf 15 ml Biocoll-Lösung überschichtet. Anschließend wurden die Lymphozyten durch eine Zentrifugation mit $563 \times g$ bei Raumtemperatur für 20 min ohne Bremse separiert. Daraufhin konnten die Lymphozyten, welche sich in der Interphase des Ficolls befanden, abgenommen und in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt werden. Die Zellsuspension wurde mit 50 ml PBS bei $361 \times g$ für 5 min bei Raumtemperatur (RT) gewaschen. Nachdem der Überstand abgenommen wurde, erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt mit 50 ml PBS bei $276 \times g$ ebenfalls für 5 min bei RT. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde der letzte Waschschrift mit 10 ml PBS mit $203 \times g$ für 5 min bei RT durchgeführt. Nach der Aufnahme des Pellets in 1 ml MACS-Puffer wurde die Anzahl der gewonnenen PBMCs mit Hilfe des Countess-Zählgerätes bestimmt.

2.2.6 RNA Isolation & cDNA Synthese

Die RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Plus Kits isoliert. Dafür wurden pelletierte Zellen verwendet, welche in 600 µl RLT-Puffer mit β-Mercaptoethanol lysiert wurden. Die RNA-Isolation erfolgte nach Hersteller-Protokoll. Am Ende wurde die RNA in 30 µl RNase- & DNase freiem Wasser eluiert. Der RNA Gehalt und die Reinheit wurde mit dem Nanodrop bestimmt.

Im Anschluss wurde die cDNA Synthese durchgeführt. Hierfür wurden bis zu 16 µl RNA (möglichst 1 µg, Minimum 1 pg) eingesetzt, falls nötig mit DNase & RNase freiem H₂O aufgefüllt und 4 µl cDNA Super Mix zugegeben. Es folgte eine Inkubation für 5 min bei 25 °C und die cDNA-Synthese bei 42 °C für 30 min. Am Ende wurde die Reaktion bei 85 °C für 5 min inhibiert und die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.7 Quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR)

Die Bestimmung der verschiedenen Genexpressionen erfolgte durch eine **Quantitative RealTime-PCR** (qRT-PCR). Hierfür wurde der Roche Light Cycler 480 mit 96-well Platten verwendet. Der PerfeCTa Quanta SYBR Green FastMix wurde nach dem folgenden Schema mit den verwendeten Primern versetzt und in die 96-well Platte vorgelegt. Die cDNA wurde mit RNase freiem Wasser nach Pipettierschema verdünnt und zum vorgelegten Mastermix pipettiert. Die Platte wurde vor der Messung mit einer selbstklebenden Folie verschlossen und bei 300 x g für 1 min zentrifugiert. Die Messung der Proben erfolgte nach dem angegebenen PCR-Programm und wurde anschließend mit der Lightcycler Software (Roche) analysiert.

Tab. 2: Zusammensetzung des DNA- und Primer-Mix und verwendetes RT-PCR-Programm

<u>cDNA Ansatz</u>			<u>PerfeCTa Quanta SYBR Green FastMix Ansatz</u>	
cDNA	1 µl		Mastermix	10 µl
DNase & RNase freies H ₂ O	8 µl		Primer fw/rv	1 µl
Gesamtvolumen. pro Well	9 µl		Gesamtvolumen pro Well	11 µl
<u>PCR Programm</u>				
Taq Aktivierung	95 °C	30 s		
Amplifikation	95 °C	5 s	40 Zyklen	
	60 °C	30 s		
Schmelzkurve	60-95 °C	15 s		
Kühlen	40 °C	30 s		

2.2.8 Proteinisolation

Zur Isolation des Gesamtproteins wurden 2×10^7 pelletierte Zellen verwendet. Diese wurden mit 100 μ l Lysepuffer resuspendiert. Der Lysepuffer wurde zuvor mit Cell Lysis Buffer (10X) und HALT Protease/Phosphatase Inhibitor (100X) in destilliertem Wasser angesetzt. Die resuspendierten Zellen wurden für 10 min auf Eis inkubiert. Danach folgten zwei Inkubationen für 5 min im Ultraschall-Wasserbad, zwischen denen die Proben 2 min auf Eis gelagert wurden. Um die isolierten Proteine vom Zelldebris zu trennen, wurde das Lysat anschließend mit $15700 \times g$ für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.9 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein Bradford-Assay mit Hilfe der Roti®-Nanoquant Lösung durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung wurde in einer 96-well Flachbodenplatte durchgeführt und pro Well 49 μ l ddH₂O vorgelegt. Die Proteinlysate wurden 1:5 mit ddH₂O vorverdünnt und es wurde je 1 μ l der verdünnten Proteinlösung und der Eichgeraden pro Well hinzugegeben. Zur Herstellung der Roti®-Nanoquant Arbeitslösung wurde eine 1:5 Verdünnung in ddH₂O angefertigt. Pro Well wurden 200 μ l Roti®-Nanoquant Arbeitslösung zugegeben und die Reaktion 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Farbreaktion mit dem ELISA-Reader bei 590 nm und 450 nm detektiert und der Quotient der Absorptionen bei 590 nm und 450 nm zur Bestimmung der Proteinkonzentration verwendet.

Tab. 3: Verwendeter Proteinkonzentration-Standard

NEB Cell Lysis Buffer-Eichgerade	
0 mg/ml	0,5 mg/ml
0,0625 mg/ml	1 mg/ml
0,125 mg/ml	2 mg/ml
0,25 mg/ml	4 mg/ml

2.2.10 Natrium-Dodecyl-Sulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine wurde durch eine **Natrium-Dodecyl-Sulfat PolyAcrylamid Gelelektrophorese** (SDS-PAGE) erreicht. Hierfür wurden Bolt® 4-12 % Bis-Tris Gele verwendet. Die Bolt® Mini Gel-Laufkammer wurde mit 400 ml 1X MES-Laufpuffer befüllt und die Bis-Tris Gele nach Anleitung installiert. Die Menge des benötigten Proteinlysates wurde

2 MATERIAL & METHODEN

2.2 Methoden

berechnet und die Proben nach Tab. 4 hergestellt. Dafür wurden die Proteinlösungen mit LDS-Ladepuffer und dem Reducing Agent versetzt und auf 70 °C für 10 min erhitzt. Anschließend wurden die Gele mit den Proben und 3-5 µl des Proteinstandards beladen. Die Auftrennung erfolgte bei 165 V für 45-50 min.

Tab. 4: Pipettierschema der Proteinproben für die SDS-Page

Gesamt Vol.	10 µl	20 µl	30 µl	40 µl	50 µl	60 µl
LDS-Puffer	2,5 µl	5 µl	7,5 µl	10 µl	12,5 µl	15 µl
Reducing Agent	1 µl	2 µl	3 µl	4 µl	5 µl	6 µl
Protein + H ₂ O	max. 6,5 µl	max. 13 µl	max. 19,5 µl	max. 26 µl	max. 32,5 µl	max. 39 µl

2.2.11 Western Blot

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mit dem iBlot® Gel Transfer System auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Der Aufbau der Blotting Apparatur erfolgte nach Herstellerangaben. Zur Übertragung der Proteine wurde das Geräteprogramm P0 (siehe Tab. 5) verwendet. Um die Übertragung der Proteine zu verbessern, wurden die Gele vor der Übertragung für 10 min in 20 % Ethanol inkubiert.

Tab. 5: Verwendetes Blotting-Programm

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

Danach erfolgte das Blockieren mit 20 ml Odyssey™ Blocking Puffer 1:2 in TBS verdünnt. Nach mind. 1-3 h Inkubation wurde der Blocking Puffer entfernt und 10 ml der Primäantikörper-Lösung nach Tab. 6 und Tab. 7 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 TBS-T (0,2% Tween 20) gewaschen. Danach wurde die Sekundär-AK Lösung nach Tab. 6 und Tab. 8 zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde die Membran erneut vier Mal für 5 min mit TBS-T (0,1 % Tween 20) und einmal mit TBS gewaschen und anschließend bei 50 °C im Wärmeschrank getrocknet. Nach dem Trocknen wurde die Membran mit dem ODYSSEY® Imaging System analysiert.

2 MATERIAL & METHODEN

2.2 Methoden

Tab. 6: Zusammensetzung der Antikörperlösungen für Western Blot

<u>Primärantikörper-Lösung</u>		<u>Sekundärantikörper-Lösung</u>	
Odyssey™ Blocking Puffer	5 ml	Odyssey™ Blocking Puffer	10 ml
TBS	5 ml	PBS	10 ml
0,2 % Tween-20	20 µl	0,2 % Tween-20	40 µl
0,01 % NaN ₃ (10 %)	10 µl	0,02 % SDS (10 %)	40 µl

Tab. 7: Verdünnung der Primärantikörper für Western Blot

<u>Primär-Antikörper</u>	<u>Verdünnung</u>
NFAT1 (m-mouse)	1:1000
NFAT2 (m-mouse)	1:2000
β-Aktin (m-rabbit)	1:5000
GAPDH (m-mouse)	1:1000
LCK (poly-rabbit)	1:1000
Cofilin (p-rabbit)	1:1000

Tab. 8: Verdünnung der Sekundärantikörper für Western Blot

<u>Sekundär-Antikörper</u>	<u>Verdünnung</u>
α-mouse 800CW	1:20000
α-mouse 680LT	1:15000
α-rabbit 800CW	1:20000
α-rabbit 680	1:15000

2.2.12 Mikroskopie (Immunfluoreszenz-Färbung)

2.2.12.1 Vorbereitung der Objektträger

Für die Immunfluoreszenz wurden PBMCs aus extrahiertem murinen Blut gewonnen. Dazu wurden 100 µl Blut mit 1 ml Erythrozytenlysepuffer versetzt und für 5 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt mit 400 x g für 5 min bei 4 °C. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet mit 1 ml MACS-Puffer für 5 min mit 400 x g bei 4 °C gewaschen. Im Anschluss folgte die Bestimmung der Zellzahl in 1 ml MACS-Puffer mittels Countess Zählgerät. Danach wurden 2x10⁶ Zellen für 5 min mit 400 x g bei 4 °C pelletiert und in 500-600 µl PBS aufgenommen. Mittels Zytospin-Zentrifuge wurden die Zellen auf Objektträger aufgebracht. Hierzu wurden 100 µl der Zellsuspension mit 800 rpm für 2 min zentrifugiert und 3 min in Aceton fixiert. Die Objektträger wurden dann bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

2.2.12.2 Immunfluoreszenz-Färbung

Zur Färbung wurden die Objektträger aufgetaut und getrocknet. Daraufhin wurden die Zellpellets mit einem Fettstift umrandet und kurz in PBS gewaschen. Es folgte das Permeabilisieren der Zellen für 8 min mit 0,2 % TritonX. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden mit 100 µl 5 % BSA/PBS 1 h bei RT blockiert. Daraufhin wurde die Blockierlösung abgekippt, der Primärantikörper nach Tab. 9 in 1 % BSA/PBS verdünnt und je 100 µl pro Zytospin-Probe zugegeben. In einer Feuchtigkeitskammer wurden die Objektträger dann bei 4 °C über Nacht mit dem Primärantikörper inkubiert.

Tab. 9: Verdünnung der Primärantikörper für Immunfluoreszenz-Färbung

<u>Primär-Antikörper</u>	<u>Verdünnung</u>
α-LCK	1:50
α-LYN	1:100
α-CD79a (mouse)	1:200
α-CD79a (rabbit)	1:100

Am folgenden Tag wurde die Primärantikörper-Lösung verworfen und die Objektträger zwei Mal 10 min und einmal 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurde der entsprechende Sekundärantikörper (goat-anti-mouse-FITC, oder anti-rabbit-TexasRed, jeweils 1:50) in 1 %iger BSA/PBS-Lösung mit DAPI (1:5000) aufgenommen und 1-1,5 h lichtgeschützt bei RT inkubiert. Die folgenden Schritte erfolgten ebenfalls lichtgeschützt in einer Feuchtigkeitskammer. So wurden die Zytospins zwei Mal für 10 min in PBS gewaschen und danach für 5 min in Aqua dest. gewaschen. Nach der Trocknung der Objektträger wurde vorsichtig ein Tropfen Mounting-Medium aufgetropft und für 24 h bei 4 °C ausgehärtet. Bis zur Analyse wurden die Objektträger bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

2.2.13 Proximitäts-Ligations-Assay (Duolink-Analyse)

2.2.13.1 Stimulation und Vorbereitung der Objektträger

Die Zellen für das Proximitäts-Ligations-Assay (Duolink-Analyse) wurden, wie zuvor in 2.2.12.1 beschrieben, einer Erythrozytenlyse unterzogen. Nach dem Waschen der Zellen erfolgte eine Aufnahme in 100 µl B-Zell-Medium und im Falle einer Stimulation eine Zugabe von 20 µg/ml αIgM sowie eine Inkubation für 10 min bei 37 °C. Unstimulierte Zellen wurden direkt in kaltem PBS für 5 min mit 400 x g bei 4 °C gewaschen. Nach der Stimulation wurde 1 ml kaltes PBS zugegeben und für 5 min mit 400 x g bei 4 °C gewaschen. Dann wurden die Zellen für 5 min mit 400 x g bei 4 °C pelletiert und in 500-600 µl PBS aufgenommen. Mittels

2 MATERIAL & METHODEN

2.2 Methoden

Zytospin-Zentrifuge wurden die Zellen auf Objektträger aufgebracht. Hierzu wurden 100 µl der Zellsuspension mit 800 rpm für 2 min zentrifugiert und 3 min in Aceton fixiert. Die Objektträger wurden dann bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

2.2.13.2 Färbung für Duolink-Experimente

Die Zellen wurden, wie in 2.2.13.1 beschrieben, gewaschen und permeabilisiert. Nachdem die Objektträger kurz in PBS gewaschen wurden, erfolgt die Duolink-Färbung. Hierfür wurden die Zytospins zuerst mit 100 µl Blocking Solution für 30 min in einer Feuchtigkeitskammer bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Blocking Solution verworfen. Anschließend wurden die beiden Primärantikörper (Nr. 1 und Nr. 2) wie in Tab. 10 beschrieben in der Antibody-Diluent-Lösung kombiniert und verdünnt und 100 µl pro Zytospin zugegeben. Bei 4 °C erfolgte über Nacht eine Inkubation in einer Feuchtigkeitskammer.

Tab. 10: Kombination und Verdünnung der Primärantikörper für Duolink-Experimente

<u>Primär-Antikörper Nr. 1</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Primär-Antikörper Nr. 2</u>	<u>Verdünnung</u>
CD79α (rabbit mAb)	1:100	LYN (mouse mAb)	1:100
CD79α (mouse mAb)	1:100	LCK (rabbit mAb)	1:50

Am folgenden Tag wurde die Primärantikörperlösung verworfen und die Objektträger zwei Mal 5 min in 1X Wash Buffer A gewaschen. Die Oligonukleotid-gekoppelten Sekundärantikörper (PLA plus und PLA minus) wurden 1:5 in Antibody Diluent verdünnt, auf die Zytospins gegeben und für 1 h bei 37 °C in einer Feuchtigkeitskammer inkubiert. Danach wurde die Lösung mit den Sekundärantikörpern verworfen. Die Objektträger wurden zwei Mal 5 min in 1X Wash Buffer A gewaschen. Im Anschluss wurde eine 1:5 Ligations-Lösung mit ddH₂O angesetzt, welche nach Zugabe der Ligase (1:40 in der Ligations-Lösung) auf die Proben gegeben wurde. Nach einer 30 min Inkubation bei 37 °C in einer Feuchtigkeitskammer wurde die Ligations-Lösung abgekippt. Daraufhin wurden die Objektträger zwei Mal 2 min in 1X Wash Buffer A gewaschen. Es folgte das Ansetzen der 1:5 Amplifikations-Lösung, in der die Polymerase 1:80 verdünnt wurde. Diese Mischung wurde auf die Zytospins gegeben und für 100 min bei 37 °C in einer Feuchtigkeitskammer inkubiert. Im Folgenden wurde die Amplifikations-Polymerase-Lösung verworfen und die Objektträger zwei Mal 10 min in 1X Wash Buffer B sowie einmal 1 min in 0,01X Wash Buffer B gewaschen. Die Objektträger wurden anschließend bei RT im Dunkeln getrocknet. Abschließend wurde Duolink in situ Mounting Medium mit DAPI auf die Proben gegeben. Nach Auflegen von Deckgläschen wurden die Proben mit Nagellack versiegelt und nach 15 min Inkubation mikroskopiert. Die Lagerung der Objektträger erfolgte bei -20 °C im Dunkeln.

2.2.14 Chromatin Immunopräzipitation (ChIP)

2.2.14.1 Stimulation und Fixierung der Zellen

Für die ChIP-Experimente wurden Zellen der Jurkat-Zelllinie oder aus CLL-Patienten gewonnene PBMCs verwendet. Hierfür wurden die Zellen einmal in dem entsprechenden Kulturmedium (RPMI + 10 % FCS + 1 % P/S bei Jurkat-Zellen und B-Zellmedium für CLL-Zellen) bei 4 °C mit 203 x g für 5 min gewaschen. Danach wurden die Zellen á 2x10⁷ Zellen/ml in Kulturmedium aufgenommen und mit 20 ng/ml PMA und 0.75 µg/ml Ionomycin für 16 h inkubiert.

Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen für 5 min bei 203 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zell-Pellet in 500 µl PBS aufgenommen. Nach Zugabe von 13,5 µl 37 % Formaldehyd erfolgte eine Fixierung für 2,5 min bzw. 5 min bei RT. Die Fixierung wurde durch 57 µl Glycin-Lösung abgestoppt. Daraufhin erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C mit 500 x g für 5 min. Nach der Abnahme des Überstandes wurde das Pellet zwei Mal mit 1 ml PBS für 5 min bei 4 °C mit 200 x g gewaschen.

2.2.14.2 Sonifikation der Zellen

Nachfolgend wurden die Zellen mittels iDEAL ChIP seq Kit von Diagenode nach modifizierten Herstellerangaben lysiert. So wurden die Jurkat-Zellen vor der Lyse 10 s in flüssigem Stickstoff behandelt. Das Zellpellet wurde in 5 ml iL1 resuspendiert und für 10 min unter Schütteln auf Eis inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt mit 500 x g für 5 min bei 4 °C. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 5 ml Lysepuffer iL2 aufgenommen. Nach einer Inkubation für 10 min auf Eis unter Schütteln wurden die Zellen bei 500 x g für 5 min mit 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und die Zellen in 140 µl Shearingpuffer iS1 mit Proteinaseinhibitor aufgenommen. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurde die Zellsuspension in Sonicator-Gefäße überführt.

Daraufhin wurde das Chromatin-Shearing für 7,5 min (Patientenproben) oder 10 min (Jurkat-Zellen) im Ultrasonicator M220 mit einer durchschnittlichen Leistung von 9.375 W durchgeführt, um 200–500 bp große DNA-Fragmente zu erhalten. Abschließend wurden die Proben mit 15700 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand in einem frischen 1,5 ml-Reaktionsgefäß gesammelt. Um die Qualität des gescherten Chromatins und die tatsächliche Bandengröße festzustellen, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.14.3 Immunopräzipitation und DNA-Isolation

Die Immunpräzipitation wurde mithilfe des iDEAL ChIP seq kit und angepassten Herstellerangaben durchgeführt. Zu Beginn wurden 20 µl magnetische Protein-A-Beads 5X

2 MATERIAL & METHODEN

2.2 Methoden

in 1X CHIP-Puffer iC1 gewaschen. Anschließend wurden die CHIP-Reaktionen wie in Tab. 11 angegeben angesetzt. Es wurden 10 µg des anti-NFAT2-Antikörper 7A6 sowie 2,5 µg des Isotyp-Antikörpers zugegeben.

Tab. 11: Zusammensetzung der CHIP-Reaktionen

<u>Primär-Antikörper</u>	<u>Volumen [µl] pro IP</u>
5 % BSA	6
100X Halt Protease Inhibitor	1:100
5X CHIP-Puffer iC1	56
geschertes Chromatin	15
Protein-A-Beads	20
CHIP seq Wasser	170 - x
Antikörper (anti-NFAT2 oder Isotyp)	x

Der Reaktions-Mix wurde über Nacht bei 4 °C auf einem Rotator inkubiert. Am Folgetag wurden die Reaktionsgefäße zentrifugiert, für 1 min im magnetischen Rack inkubiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die magnetischen Beads in 350 µl iW1-, iW2-, iW3- und iW4-Waschpuffer für je 5 min bei 4 °C auf einem Rotator gewaschen. Nach einer Inkubation für 1 min im magnetischen Rack und der Abnahme des Überstandes wurden die Schritte mit dem folgenden Waschpuffer wiederholt.

Nach dem letzten Waschschrift wurden die Beads in 100 µl Elutionspuffer iE1 aufgenommen und für 30 min auf einem Rotator inkubiert. Die Proben wurden kurz anzentrifugiert und 1 min im magnetischen Rack platziert. Daraufhin wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 4 µl Elutionspuffer iE2 versetzt. Für die Input-Kontrolle wurde 1 µl geschertes Chromatin mit 99 µl Elutionspuffer iE1 und 4 µl Elutionspuffer iE2 gemischt. Anschließend wurden die Proben für 4 h bei 65 °C und 1300 rpm im Thermomixer inkubiert. Nach diesem Schritt wurden 100 µl 100 % Isopropanol und 10 µl magnetische iPure2-Beads hinzugefügt und diese Mischung für 1 h bei RT in einem Rotator inkubiert. Im Anschluß an die Inkubation wurden die Proben zentrifugiert und 1 min im magnetischen Rack ruhen gelassen. Der Überstand wurde verworfen und die Beads in 100 µl Waschpuffer 1 resuspendiert. Es folgte nach dem Invertieren der Reaktionsgefäße für 5 min bei RT eine Inkubation auf einem Rotator. Dieser Schritt wurde mit dem Waschpuffer 2 wiederholt. Um die präzipitierte DNA zu eluieren, wurden die Beads nach 1 min Inkubation im magnetischen Rack und Abnahme des Überstandes in 55 µl Elutionspuffer (Buffer C) für 15 min bei RT auf einem Rotator inkubiert. Die Proben wurden zentrifugiert, 1 min im magnetischen Rack inkubiert und der Überstand in frische

2 MATERIAL & METHODEN

2.2 Methoden

5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwertung bei -20 °C gelagert.

2.2.14.4 qRT-PCR

Die Detektion der NFAT2-Zielgene in CLL-Zellen erfolgte durch eine qRT-PCR. Hierfür wurde der Roche Light Cycler 480 mit 96-Well-Platten verwendet. Eine Verdünnungsreihe der Input-Kontrolle wurde zur Kalkulation der relativen Anreicherung verwendet. Der PerfeCTa Quanta SYBR Green FastMix wurde nach dem folgenden Schema mit den verwendeten Primern versetzt und in die 96-Well-Platte vorgelegt. Die präzipitierte DNA wurde zum vorgelegten Mastermix pipettiert. Die Platte wurde vor der Messung mit einer selbstklebenden Folie verschlossen und bei 300 x g für 1 min zentrifugiert. Die Messung der Proben erfolgte nach dem angegebenen PCR-Programm und wurde anschließend mit der Lightcycler Software (Roche) analysiert.

Tab. 12: Zusammensetzung des DNA- und Primer-Mix und verwendetes RT-PCR-Programm

<u>cDNA Ansatz</u>		<u>PerfeCTa Quanta SYBR Green FastMix</u>	
		<u>Ansatz</u>	
Präzipitierte DNA (NFAT2-Probe oder Negativ-Kontrolle)	9 µl	Mastermix	10 µl
Ges. pro Well	9 µl	Primer (CD40L, IL-2 oder LCK) fw/rv	1 µl
		Ges. pro Well	11 µl

	<u>PCR Programm</u>		
Taq Aktivierung	95 °C	30 s	
Amplifikation	95 °C	5 s	40 Zyklen
	60 °C	30 s	
Schmelzkurve	60-95 °C	15 s	
Kühlen	40 °C	30 s	

2.2.15 Durchflusszytomtrie

Die verwendeten Zellen wurden, wie in 2.2.3 beschrieben, mittels Erythrozytenlyse präpariert und mit dem FACS Canto II analysiert. Die Daten wurden anschließend mit der FlowJo Version 10 Software analysiert.

2 MATERIAL & METHODEN

2.2 Methoden

2.2.15.1 MHC-Oberflächenfärbung

Die Detektion der MHC-Expression erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Hierzu wurden $0,5 \cdot 10^6$ Zellen in 50 μ l MACS-Puffer aufgenommen und der Primärantikörpermix nach Pipettierschema zugegeben. Nach einer Inkubation für 30 min auf Eis wurden die Zellen einmal mit MACS-Puffer gewaschen (300 x g, 5 min, 4 °C). Im Anschluss wurde der Sekundärantikörper zugegeben und für 60 min bei 4 °C inkubiert. Vor der Analyse wurden die Zellen zweimal mit MACS-Puffer gewaschen (300 x g, 5 min, 4°C).

Tab. 13: Zusammensetzung der Antikörperlösung für die MHC-Oberflächenfärbung

<u>MHC-Oberflächen Panel</u>			
1. AK	[μ l]	2. AK	[μ l]
CD19-PECy7	0,4	Alexa-Flour 488 α -mouse	0,1
CD3e-FITC	0,3		
IgM-PE	0,5		
CD5-APC	0,5		
B220-eFluor605	1,25		
MHC I (20-8-4S)	0,5		
7-AAD	2		

2.2.15.2 Färbung der CLL-Zellen

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

Tab. 14: Zusammensetzung der Antikörperlösung für die Färbung der CLL-Zellen

<u>CLL Panel</u>	
1. AK	[μ l]
CD19-PECy7	0,4
CD3e-FITC	0,3
IgM-PE	0,5
CD5-APC	0,5
B220-eFluor605	1,25
7-AAD	2

2.2.15.3 Zellzyklusanalyse

Die Zellzyklusanalyse wurde durch ein *in vivo* BrdU-Labeling mit dem APC BrdU Flow Kit durchgeführt. Dafür wurde den Tieren 200 µl einer 10 mM BrdU-Lösung IntraPeritoneal (i.p.) injiziert. Anschließend wurden die Tiere nach 24 h euthanasiert und die Organe untersucht. Die Zellen wurden wie unter 2.2.2 und 2.2.3 beschrieben präpariert und für die FACS-Färbung vorbereitet. Die Antikörper wurden nach Pipettierschema und wie unter 2.2.15.2 beschrieben für das Staining der CLL-Zellen eingesetzt. Anschließend wurden die Zellen zur Permeabilisierung in 100 µl Cytofix/Cytoperm Puffer aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 100 µl Perm/Wash Puffer (300 x g, 5 min, 4 °C) folgte ein weiterer Permeabilisationsschritt mit 100 µl Cytoperm Plus Puffer für 10 min auf Eis. Nach einem weiteren Waschschrift mit Perm/Wash Puffer (300 x g, 5 min, 4 °C) wurde auf Eis 100 µl Cytofix/Cytoperm Puffer für 5 min zugegeben. Nach dem Waschschrift (300 x g, 5 min, 4 °C) schloss sich ein DNase-Verdau mit 50 µl DNase (300 µg/ml) in Perm/Wash Puffer an. Die Reaktion wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die DNase wurde mit einem Waschschrift (300 x g, 5 min, 4 °C) entfernt und das inkorporierte BrdU mit einem BrdU-Antikörper markiert. Dafür wurde 1 µl BrdU-AK in 50 µl Perm/Wash Puffer verwendet und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem letzten Waschschrift (300 x g, 5 min, 4 °C) wurden die Zellen in MACS-Puffer aufgenommen. Um den DNA-Gehalt zu bestimmen, wurden vor der Messung 5 µl 7-AAD Lösung hinzugegeben.

Tab. 15: Zusammensetzung der Antikörperlösungen für das BrdU-Assay

<u>BrdU Panel</u>			
1. AK	[µl]	Intrazelluläre AK	[µl]
CD19-FITC	0,5	BrdU-APC	1,0
IgM-PE	0,5		
CD5-eFlour450	0,5		

2.2.15.4 Annexin V Färbung

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

2 MATERIAL & METHODEN

2.2 Methoden

Tab. 16: Zusammensetzung der Antikörperlösungen für das Annexin-Assay

<u>Annexin V Panel</u>	
1. AK	[μ l]
CD3e-FITC	0,3
7-AAD	1,0
CD19-PECy7	0,25
CD5-APC	0,6
Annexin V-PE	2,0

2.2.15.5 Ca^{2+} -Flux-Messung mittels FuraRed

Für die Ca^{2+} -Mobilisations-Experimente wurden Splenozyten verwendet, welche mittels Ficoll isoliert (siehe 2.2.5) und extrazellulär gefärbt wurden. Dabei wurden die Zellen á 2×10^7 Zellen/ml in Medium 1 aufgenommen. Daraufhin erfolgte die Beladung mit FuraRed für 25 min bei 30 °C unter leichtem Schütteln im Dunkeln. Anschließend wurde 1 ml Medium 2 zugegeben und für 10 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Nach der Zugabe von 3 ml 0 mM Ca^{2+} Ringer folgte eine Zentrifugation mit 203 x g für 5 min. Die Zellen wurden dann mit 2 ml 0 mM Ca^{2+} Ringer mit 203 x g für 5 min gewaschen. Die folgende Antikörper-Färbung wurde in 1 ml Medium 1 nach dem angegebenen Schema durchgeführt (vgl. Tab 17). Im Anschluß an eine Inkubation für 20 min wurden die Proben bei 203 x g für 5 min zentrifugiert. Es folgte ein Waschschrift mit 4 mM Ca^{2+} Ringer bei 203 x g für 5 min. Für die Messung wurden die Zellen in 1 ml 4 mM Ca^{2+} Ringer aufgenommen und jeweils 250 μ l eingemessen. Während des Einmessens erfolgte auch die Stimulation mithilfe von 10 μ g α lgM sowie mit Ionomycin als Positivkontrolle.

Tab. 17: Zusammensetzung der Antikörperlösungen für die Messung des Calcium-Einstroms

<u>Ca^{2+} Panel</u>		<u>FuraRed Beladung</u>	
1. AK	[μ l]		[μ l]
CD19-FITC	2,5	Medium 1	1000
CD5-APC	3,0	FuraRed (1 μ M)	10,0
		Pluronic (0,02 %)	1,0

2.2.16 Histologische Analyse

2.2.16.1 Paraffin-Einbettung der Organe

Die Tiere der verwendeten Kohorten wurden euthanasiert und die Milz wie beschrieben präpariert. Anschließend wurde die Milz in Einbettkassetten eingebracht und für 10 min in

2 MATERIAL & METHODEN

2.2 Methoden

PBS Lösung gewaschen. Danach wurden die Organe in 4 %iger Formalin-Lösung fixiert und bis zur Einbettung gelagert. Die Einbettung der Proben in Paraffin wurde im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt. Nach dem Einbetten wurden 5 µm Gewebeschnitte am Mikrotom angefertigt und diese auf Objektträger aufgebracht. Im Anschluss wurden die Schnitte getrocknet und eine Färbung mittels Hämatoxylin/Eosin (H & E Färbung) durchgeführt.

2.2.16.2 H & E Färbung

Die Paraffinschnitte wurden vor der Färbung drei Mal für 3 min mit Roticlear behandelt. Anschließend wurde die Hämatoxylin-Färbung in einer absteigenden Alkoholreihe (siehe Tab. 18) durchgeführt. Danach wurden die Gewebeschnitte mit H₂O gewaschen. Die Eosin-Färbung wurde nach dem angegebenen Schema angefertigt und die Objektträger mit 70 % Ethanol gewaschen. Abschließend wurden die Paraffinschnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydratisiert (siehe Tab. 18) und drei Mal für 3 min mit Roticlear fixiert. Vor der Auswertung im Mikroskop wurden die Paraffinschnitte mit Neomount Eindeckmedium eingedeckt und getrocknet.

Tab. 18: Färbeschema für die histologischen Analysen

Hämatoxylin-Färbung

Roticlear/EtOH (1:2)	1 min
100 % Ethanol	1 min
100 % Ethanol	1 min
70 % Ethanol	1 min
50 % Ethanol	1 min
Hämatoxylin	30 s

Eosin-Färbung

50 % Ethanol	1 min
70 % Ethanol	1 min
0,5 % Eosin	30-60 s

Dehydrierung

70 % Ethanol	1 min
100 % Ethanol	1 min
100 % Ethanol	1 min
Roticlear/EtOH (1:2)	1 min

3 ERGEBNISSE

Teile der hier gezeigten Ergebnisse wurden zuvor in Publikationen verwendet. Die entsprechenden Publikationen sind in den betreffenden Abbildungen vermerkt, ebenso ob die Abbildungen modifiziert wurden. Die gezeigten Daten wurden dabei sowohl im Falle von Märklin et al., Nat Commun, 2017 (doi:10.1038/s41467-017-00830-y) (Nutzung nach CC BY 4.0, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode>) als auch im Falle von Fuchs et al., J Vis Exp, 2018 (doi:10.3791/58270) vom Autor dieser Arbeit generiert.

3.1 Die Rolle von NFAT2 in der Anergie von CLL-Zellen

3.1.1 NFAT2 steuert die Expression von Anergie-Genen

Im Rahmen einer aktuellen Studie konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die Deletion von NFAT2 im TCL1-Modell zu einer Akzelerierung der CLL sowie zu einem verringerten Überleben führt⁴⁰. Zudem ist bekannt, dass das BCR-Signaling eine entscheidende Rolle in der CLL spielt. Nachdem bereits zuvor spekuliert wurde, dass die Anergie in CLL-Zellen von Bedeutung ist und eine Reduktion Anergie-assoziiierter Gene mittels Microarray durch unsere Arbeitsgruppe detektiert wurde, konnte der zugrundeliegende Mechanismus aufgeklärt werden^{37,40,140}.

Hierzu wurden CLL-Zellen aus 20 Wochen alten TCL1-Mäusen isoliert und mittels negativer Selektion aufgereinigt. Anschließend wurden die Zellen für 1 h oder 6 h inkubiert und mit α gM stimuliert. Zudem wurden die Inhibitoren Cyclosporin A (CsA), Tacrolimus (FK506) sowie das VIVIT-Peptid eingesetzt. Dabei inhibieren CsA und FK506 die Funktion von Calcineurin und dadurch indirekt NFAT, während VIVIT NFAT direkt durch die kompetitive Bindung von Calcineurin inhibiert. Die finale Analyse der Zellen erfolgte nach der Isolation der RNA mittels qRT-PCR.

Die Ergebnisse der Analyse sind in Abb. 12 dargestellt. Zur Überprüfung des Ansatzes wurde zuerst der autoregulatorische Mechanismus von NFAT2 untersucht. So konnte festgestellt werden, dass im Falle der BCR-Stimulation die Expression von NFAT2 deutlich erhöht wird, während die Inkubation mit verschiedenen Inhibitoren für 1 h eine signifikante Verringerung der NFAT2-Expression zur Folge hatte. Zudem gelang durch dieses Setup die Identifizierung der BCR- und NFAT-abhängigen Expression einer Reihe von Genen, die aus der T-Zell-Anergie bekannt sind, namentlich *Cbl-b*, *Egr2*, *Grail* und *Lck*. So konnte für alle diese Gene eine signifikant erhöhte Expression durch BCR-Stimulation nachgewiesen werden, was deren Abhängigkeit vom BCR-Signaling belegt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Die Rolle von NFAT2 in der Anergie von CLL-Zellen

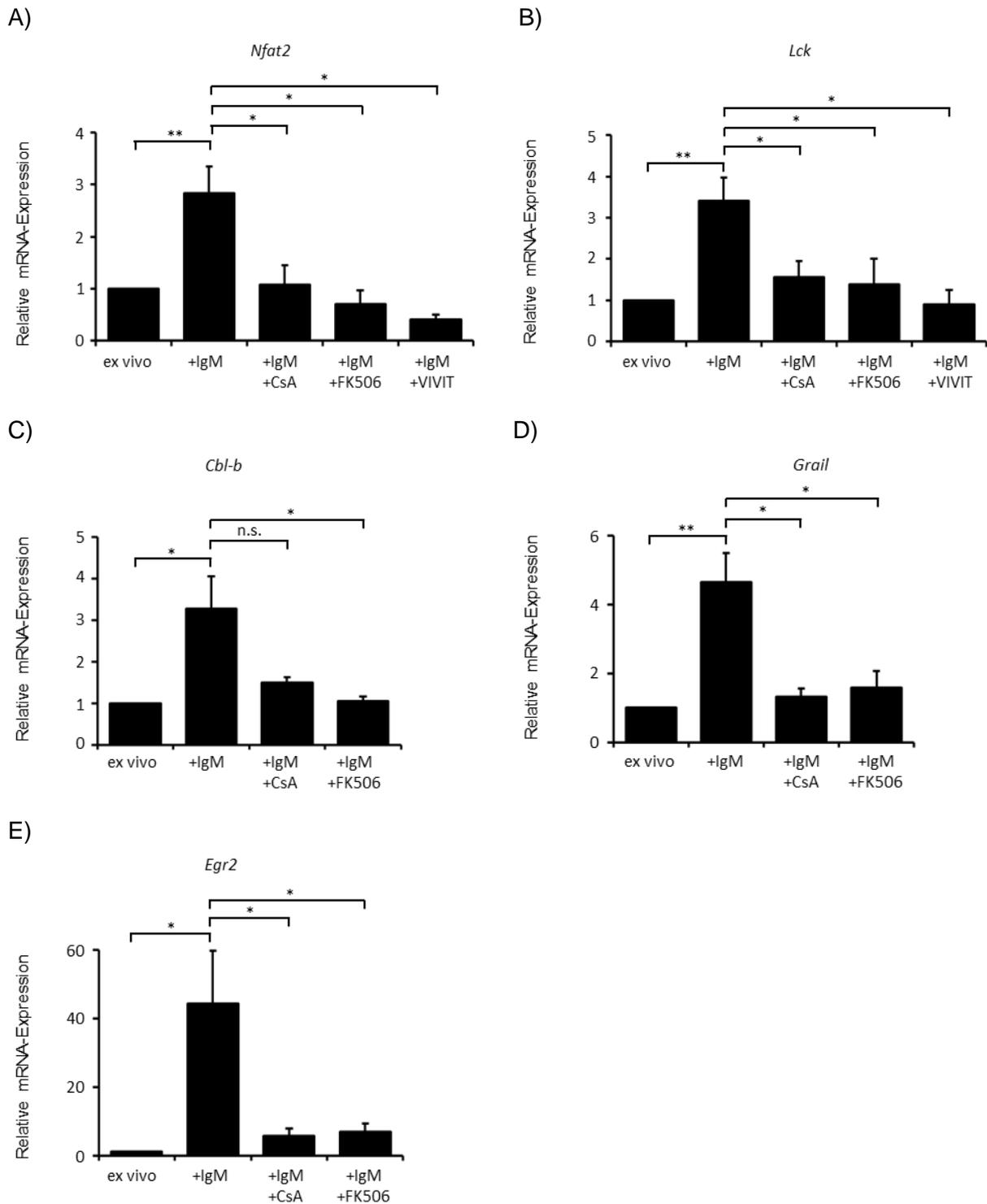


Abb. 12: Veränderte Expression von Anergie-Genen

CLL-Zellen wurden aus Tieren der TCL1-Linie isoliert und für 1 oder 6 h in B-Zell-Medium inkubiert. Durch Zugabe von 10 µg/ml αIgM-Antikörper wurden die Zellen stimuliert. Das NFAT-Signaling wurde mittels hinzugeben von 1 µM CsA, 1 µM FK506 oder 10 µM VIVIT blockiert. Abschließend wurde die Expression einer definierten Anergie-Signatur durch RT-PCR analysiert und auf die Expression von β-Actin normalisiert. Dargestellt sind die Ergebnisse für *Nfat2* (A), *Lck* (B), *Cbl-b* (C), *Grail* (D) sowie *Egr2* (E) (n=5, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001). Modifiziert nach Märklin et al., Nat Commun, 2017 (doi:10.1038/s41467-017-00830-y).

3 ERGEBNISSE

3.1 Die Rolle von NFAT2 in der Anergie von CLL-Zellen

Die Inhibition von Calcineurin mittels CsA oder FK506 führte zu einer drastisch verringerten Expression von *Egr2*, *Grail* und *Lck*. Von besonderem Interesse ist der signifikante Rückgang der Expression von *Lck* nach einstündiger Inkubation mit dem VIVIT-Peptid. Dies legt nahe, dass *Lck* ein direktes Zielgen von NFAT ist.

Die Analyse und Identifikation von *Cbl-b*, *Egr2*, *Grail* und *Lck*, sowie die Tatsache, dass diese Gene in der T-Zell-Anergie eine wichtige Rolle spielen, hatte zur Folge, dass diese Gene von uns als Anergie-Gen-Signatur postuliert wurden.

3.1.2 Veränderte Genexpression durch den Verlust von NFAT2

3.1.2.1 Die Deletion von NFAT2 hat eine Expression regulatorischer Gene analog zur Richter-Transformation zur Folge

Weitere Analysen unserer Arbeitsgruppe konnten zudem belegen, dass es durch den Verlust von NFAT2 zu einer Transformation der CLL kommt, welche der Richter-Transformation im Menschen ähnelt. Hierzu wurden weitere Untersuchungen der Genexpression angestellt. Aus dem Richter-Syndrom ist bekannt, dass es zur Fehlregulation einiger Gene wie *Trp53* und *Cdkn2a* kommt^{120,121}. Da der Nachweis der Transformation der CLL durch den Knockout von NFAT2 gelang, wollten wir belegen, dass der Verlust von NFAT2 ebenfalls zu einer veränderten Expression der genannten regulatorischen Gene führt.

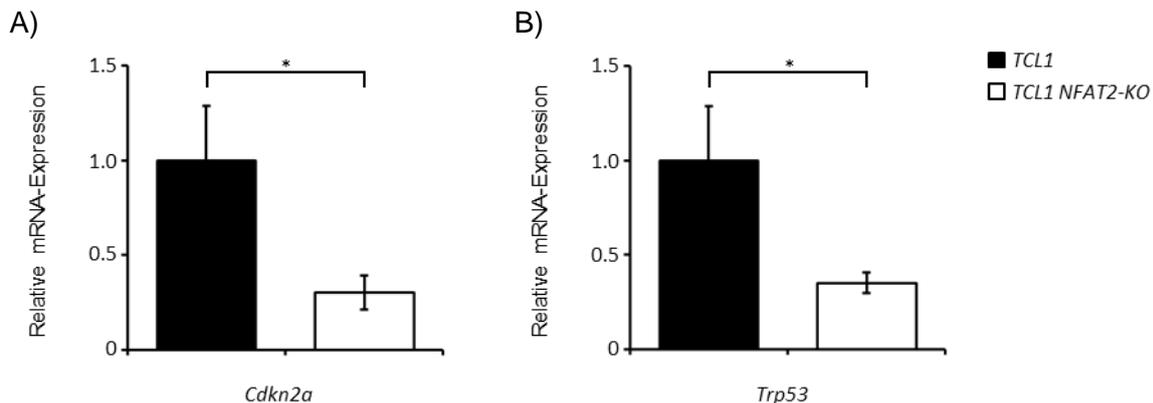


Abb. 13: Expression von Richter-Genen im TCL1-Modell

Aus Tieren der TCL1- und der TCL1 NFAT2-KO-Gruppe wurden CLL-Zellen isoliert und 1h in B-Zell-Medium inkubiert. Anschließend wurde die RNA aus den Zellen isoliert und via RT-PCR analysiert. Dargestellt sind die Ergebnisse für *Cdkn2a* (A) und *Trp53* (B) ($n=5$, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$). Modifiziert nach Märklin et al., Nat Commun, 2017 (doi:10.1038/s41467-017-00830-y).

3 ERGEBNISSE

3.1 Die Rolle von NFAT2 in der Anergie von CLL-Zellen

Um dies zu demonstrieren, wurden CLL-Zellen aus 20 Wochen alten TCL1-Mäusen mit oder ohne NFAT2-Knockout isoliert und mittels negativer Selektion aufgereinigt. Die Analyse der Zellen erfolgte im Anschluss an die Isolation der RNA mittels qRT-PCR.

Die resultierenden Daten zeigen, dass die Expression der regulatorischen Gene *Trp53* und *Cdkn2a* signifikant reduziert vorliegt, wenn NFAT2 deletiert wurde (vgl. Abb. 13). Diese verringerte Expression ist analog zur humanen Richter-Transformation.

3.1.2.2 Der Verlust von NFAT2 wirkt sich auf die Expression von Chemokin-Rezeptoren aus

Da durch den Verlust von NFAT2 eine veränderte Expression sowohl von Anergie-assoziierten Genen sowie von regulatorischen Genen gezeigt werden konnte, sollten nachfolgend weitere Auswirkungen des NFAT2-Knockouts auf die Genexpression untersucht werden. Über die letzten Jahre konnte eine wichtige Rolle des Mikromilieus für das Überleben der CLL-Zellen demonstriert werden¹⁴¹. So sind CLL-Zellen abhängig vom Pro-Survival-Effekt von CXCL12, welches von Nurse-like Zellen (NLCs) abgegeben wird, oder sie können selbst regulatorische T-Zellen mittels CCL3 und 4 rekrutieren. Somit spielen Chemokine und Chemokin-Rezeptoren eine wichtige Rolle in der CLL und es gibt Hinweise für eine Interaktion des BCR-Signalings mit dem Signalweg einiger Chemokin-Rezeptoren^{142,143}. Aufgrund des Zusammenhangs des BCR mit dem NFAT-Signaling und die Bedeutung der Chemokin-Rezeptoren in der Pathophysiologie der CLL wollten wir im Folgenden die Auswirkungen des NFAT2-Knockouts auf die Expression einiger Chemokin-Rezeptoren, die in der humanen CLL eine wichtige Rolle spielen, untersuchen.

Hierzu isolierten wir CLL-Zellen aus 20 Wochen alten TCL1-Mäusen mit oder ohne NFAT2-Knockout, welche anschließend mithilfe negativer Selektion aufgereinigt wurden. Die Analyse der Zellen erfolgte daraufhin nach der Isolation der RNA mittels qRT-PCR.

Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abb. 14 dargestellt. So waren wir hier in der Lage zu demonstrieren, dass der Knockout von NFAT2 zu einer signifikant verringerten Expression von CCR1, CCR7 und CXCR3 führt. Besonders deutlich war der Unterschied in der Expression von CXCR4 und CXCR5. Im Gegensatz dazu war im Fall von CCR9 durch eine hohe Varianz innerhalb der Kohorten kein signifikanter Unterschied feststellbar.

3 ERGEBNISSE

3.1 Die Rolle von NFAT2 in der Anergie von CLL-Zellen

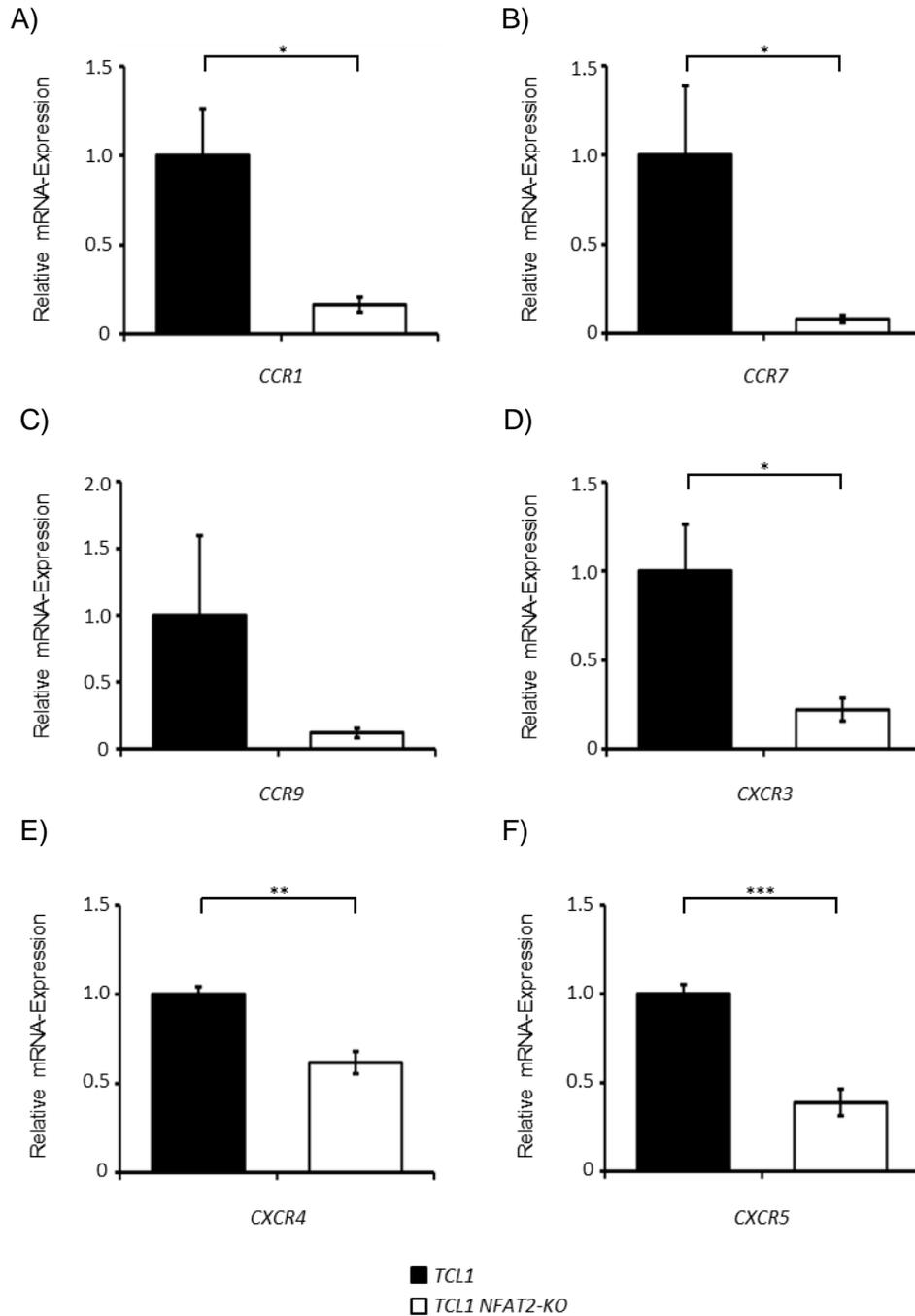


Abb. 14: Veränderte Expression von Chemokin-Rezeptoren im TCL1-Modell

CLL-Zellen wurden aus Tieren der TCL1- sowie der TCL1 NFAT2-KO-Linie isoliert. Im Anschluss wurde eine RNA-Isolation durchgeführt, die Expression von Chemokin-Rezeptoren durch RT-PCR analysiert und auf die Expression von β -Actin normalisiert. Dargestellt sind die Ergebnisse für CCR1 (A), CCR7 (B), CCR9 (C), CXCR3 (D), CXCR4 (E) sowie CXCR5 (E) ($n=5$, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$).

3 ERGEBNISSE

3.1 Die Rolle von NFAT2 in der Anergie von CLL-Zellen

3.1.2.3 Die Deletion von NFAT2 beeinflusst nicht die Expression von NFAT1

Da zuvor bei Brustkrebs ein Zusammenhang von erhöhter NFAT2- mit erhöhter NFAT1-Expression beschrieben wurde¹⁴⁴, wollten wir evaluieren, ob dies auch im Fall der CLL feststellbar ist.

Hierfür wurden aus TCL1-Tieren mit oder ohne NFAT2-Knockout CLL-Zellen isoliert, einer Proteinisolierung unterzogen und mittels Western Blot analysiert.

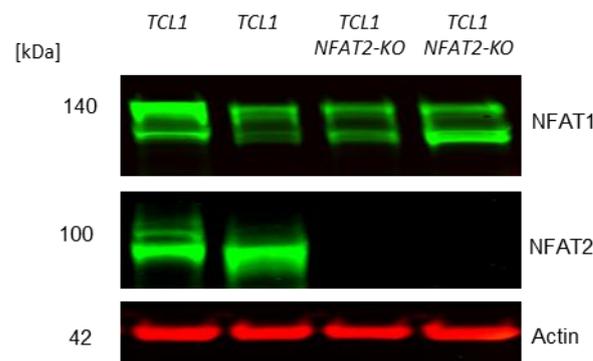


Abb. 15: Effekt des NFAT2-KO auf NFAT1

Aus TCL1- und TCL1 NFAT2-KO-Tieren wurden CLL-Zellen isoliert. Nach einer 1 h-Inkubation in B-Zell-Medium erfolgte eine Protein-Extraktion aus den Zellen und abschließend mit 20 µg des Proteinextraktes eine Protein-Gelelektrophorese mit Western-Blot. Dargestellt sind die Ergebnisse für je zwei repräsentative Tiere pro Gruppe für NFAT1 und NFAT2 sowie β-Actin als Ladekontrolle. Modifiziert nach Märklin et al., Nat Commun, 2017 (doi:10.1038/s41467-017-00830-y).

Dabei ließ sich kein signifikanter Unterschied in der Expression von NFAT1 in Tieren mit oder ohne NFAT2-Expression nachweisen (siehe Abb. 15).

3.1.2.4 Der Verlust von NFAT2 hat keine Auswirkungen auf die MHC I-Expression

Neben der Beeinflussung des Mikromilieus besitzen Tumorzellen noch weitere Mechanismen zur Immunevasion. Dabei ist der erworbene Verlust der MHC I-Expression ein entscheidender Mechanismus, mit dem Tumorzellen der Erkennung durch zytotoxische T-Zellen entkommen^{145,146}. Aufgrund des veränderten Verlaufs der CLL und der veränderten Genexpression in CLL-Zellen durch die Deletion von NFAT2 wollten wir untersuchen, ob sich der Verlust von NFAT2 auch auf die MHC I-Expression auswirkt.

3 ERGEBNISSE

3.2 LCK ist ein direktes Zielgen von NFAT2

Dafür wurden CLL-Zellen aus 20 Wochen alten TCL1-Mäusen mit oder ohne NFAT2-Expression extrahiert. Anschließend wurde eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt. Hierbei war jedoch, wie in Abb. 16 sichtbar, kein signifikanter Unterschied in der MHC I-Expression feststellbar.

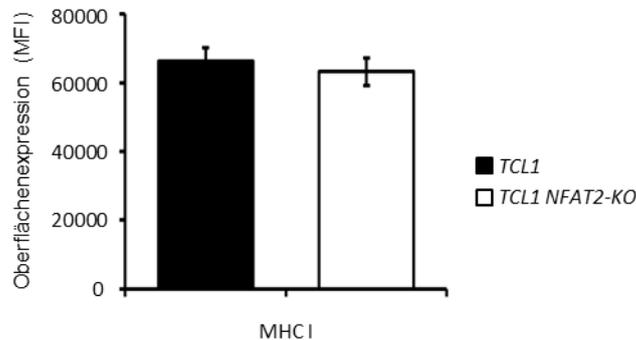


Abb. 16: Oberflächenexpression von MHC I im TCL1-Modell

CLL-Zellen aus TCL1- und TCL1 NFAT2-KO-Tieren wurden isoliert. Nach der Isolation wurden die Zellen für 1 h in B-Zell-Medium inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) als Maß für die MHC I-Expression, gemessen mit dem Antikörper 20-8-4S (n=5).

3.2 LCK ist ein direktes Zielgen von NFAT2

3.2.1 Nachweis der Interaktion von NFAT2 und LCK-Promotor

Nachdem zuvor im Mausmodell die Abhängigkeit von *Lck* vom BCR- und NFAT2-Signaling demonstriert werden konnte (siehe 3.1.1), sollte im Anschluss die Aufklärung des zugrundeliegenden Mechanismus erfolgen. Aufgrund der Inhibition der *Lck*-Expression durch den NFAT-Inhibitor VIVIT sowie der Tatsache, dass schon zuvor eine mögliche NFAT2-Bindestelle im *LCK*-Promotor beschrieben wurde¹⁴⁷, vermuteten wir eine direkte Interaktion von NFAT2 mit dem *LCK*-Gen.

Um dies zu überprüfen, wurden Jurkat-Zellen sowie aus Patienten isolierte CLL-Zellen für 16 h mit Ionomycin stimuliert und eine Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) durchgeführt. Die finale Analyse der präzipitierten DNA-Fragmente wurde danach via qRT-PCR durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

3.3 LCK als Akteur im BCR-Signaling

Zuerst wurde zu Testzwecken die Jurkat-Zelllinie verwendet, welche bekanntermaßen eine hohe Expression von NFAT2 aufweist. Zudem wurde der IL-2-Promotor als Positiv-Kontrolle verwendet, da IL-2 ein gut beschriebenes Zielgen von NFAT2 darstellt. In Abb. 17 ist deutlich zu erkennen, dass wir die spezifische Bindung von NFAT2 an den IL-2-Promotor durch den verwendeten Assay nachweisen konnten. Die hohe Anreicherung des *LCK*-Promotors in der

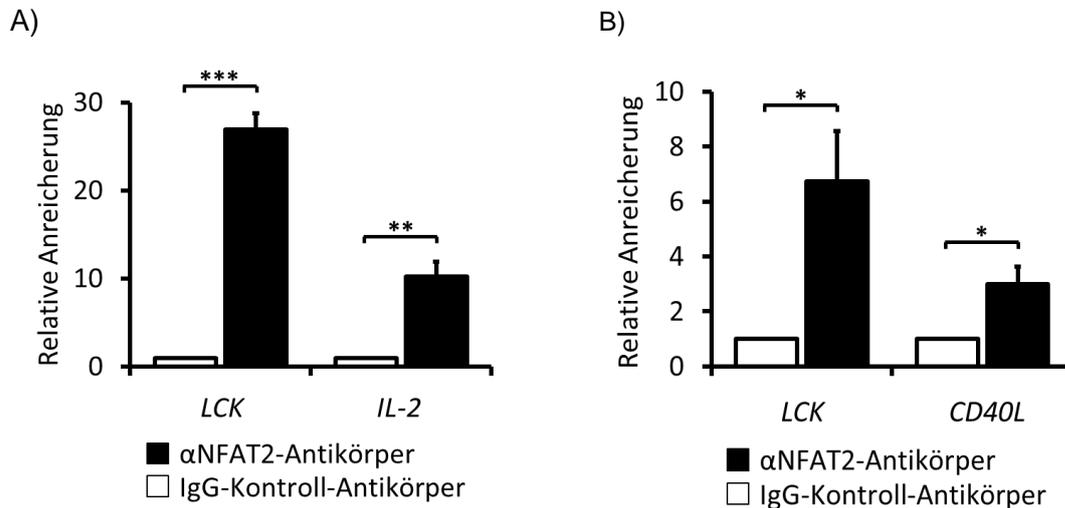


Abb. 17: Nachweis von *LCK* als direktes Zielgen von NFAT2

Um zu zeigen, dass *LCK* ein direktes Zielgen von NFAT2 ist, wurde eine ChIP durchgeführt. Hierfür wurden Jurkat-Zellen oder CLL-Zellen aus Patienten für 16 h \dot{a} 2×10^7 Zellen/ml mit 20 ng/ml PMA und 0,75 μ g/ml Ionomycin in Kulturmedium inkubiert. Darauf folgte die Sonifikation der Zellen und die Immunpräzipitation von NFAT2 mitsamt gebundener DNA-Sequenzen. Abschließend wurde eine RT-PCR der gebundenen DNA-Sequenzen durchgeführt, um nachzuweisen, dass NFAT2 die Promotor-Regionen von *LCK*, *IL-2* und *CD40L* bindet. Dargestellt sind die Ergebnisse für Jurkat-Zellen (A) und CLL-Zellen aus Patienten (B) ($n=5$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Modifiziert nach Fuchs et al., *J Vis Exp*, 2018 (doi:10.3791/58270).

präzipitierten DNA bestätigte ebenfalls die Hypothese, dass *LCK* ein Zielgen von NFAT2 ist. Nachdem der Nachweis in einer Zelllinie gelang, sollte daraufhin auch in humanen CLL-Zellen die Bindung von NFAT2 an den *LCK*-Promotor gezeigt werden. Hierbei diente *CD40L* als Positiv-Kontrolle, da es zuvor als Zielgen von NFAT2 in CLL-Zellen beschrieben wurde. Neben einer deutlichen Anreicherung des *CD40L* konnte ebenfalls eine große Menge des *LCK*-Promotors präzipitiert werden. Dies belegt, dass *LCK* in humanen CLL-Zellen ein direktes Zielgen von NFAT2 ist.

3.3 LCK als Akteur im BCR-Signaling

3.3.1 LCK interagiert im Falle der Anergie mit dem BCR

Da gezeigt werden konnte, dass *LCK* ein direktes Zielgen von NFAT2 darstellt, wollten wir ebenfalls ergründen, welche Rolle *LCK* im BCR-Signaling spielt, da die Expression von *LCK*

3 ERGEBNISSE

3.3 LCK als Akteur im BCR-Signaling

in CLL-Zellen zuvor mehrfach beschrieben wurde^{72,77}. Basierend auf der Funktion von LCK in T-Zellen sollte daraufhin eine mögliche Interaktion des BCR mit LCK nachgewiesen werden. Hierfür wurde die Duolink-Analyse verwendet. Die Funktionsweise ist schematisch in Abb. 18 dargestellt. So werden die Zellen zuerst mit Antikörpern gegen die Interaktionspartner behandelt. Dabei ist wichtig, dass die Antikörper aus verschiedenen Wirtsspezies stammen (z.B. Ratte und Maus). Im Anschluss werden gegen die Primärantikörper gerichtete Sekundärantikörper zugegeben. An diese Sekundärantikörper sind Oligonukleotide gekoppelt. In den folgenden Schritten findet eine Ligation sowie eine anschließende Amplifikation mit diesen Oligonukleotiden statt. Zum Abschluss wurden an Fluorophore gekoppelte DNA-Sonden zugegeben. Diese hybridisieren an komplementäre Bereiche der vervielfältigten Oligomere, wodurch es zu einem Fluoreszenzsignal im Falle einer Interaktion kommt.

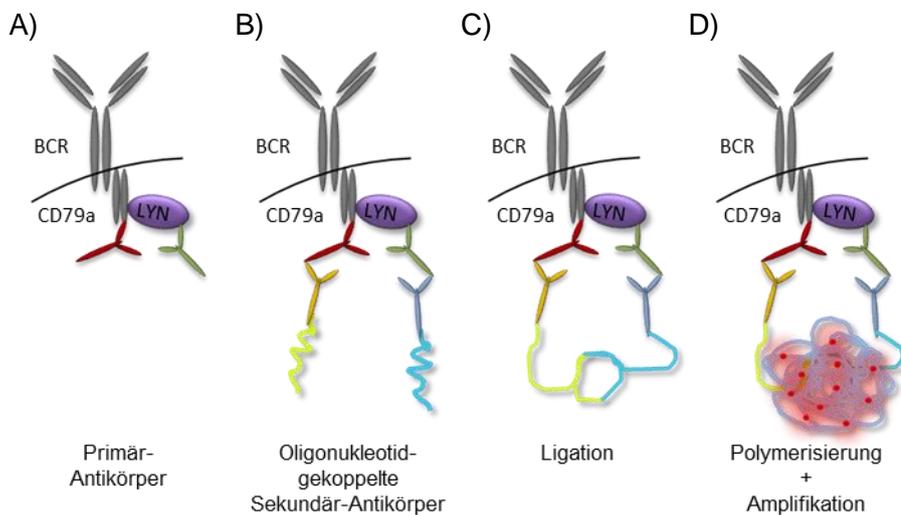


Abb. 18: Schematische Darstellung der Duolink-Analyse

Die Duolink-Analyse wurde eingesetzt, um zu demonstrieren, dass LCK direkt mit dem BCR interagiert. Die Grafik zeigt schematisch die Funktionsweise des Assays. Hierbei erkennen Primär- (A) und Oligonukleotid-gekoppelte Sekundärantikörper (B) die Interaktionspartner. Durch die Ligation (C) und Polymerisation (D) angehefteter Oligonukleotide mithilfe von Fluoreszenz-gekoppelten Nucleotiden entsteht dann im Falle einer Interaktion ein Fluoreszenzsignal. Modifiziert nach Märklin et al., Nat Commun, 2017 (doi:10.1038/s41467-017-00830-y).

Zuerst wurden herkömmliche Immunfluoreszenz-Färbungen gegen LYN und LCK durchgeführt und mittels Mikroskopie analysiert. Dabei wurde deutlich, dass LYN und LCK in der Nähe der Zellmembran vorliegen (vgl. Abb. 19). Während die Deletion von NFAT2 die Expression von LYN nicht beeinflusst (Abb. 19A), ist in Abb. 19B sichtbar, dass LCK durch den NFAT2-Knockout deutlich schwächer exprimiert wird.

3 ERGEBNISSE

3.3 LCK als Akteur im BCR-Signaling

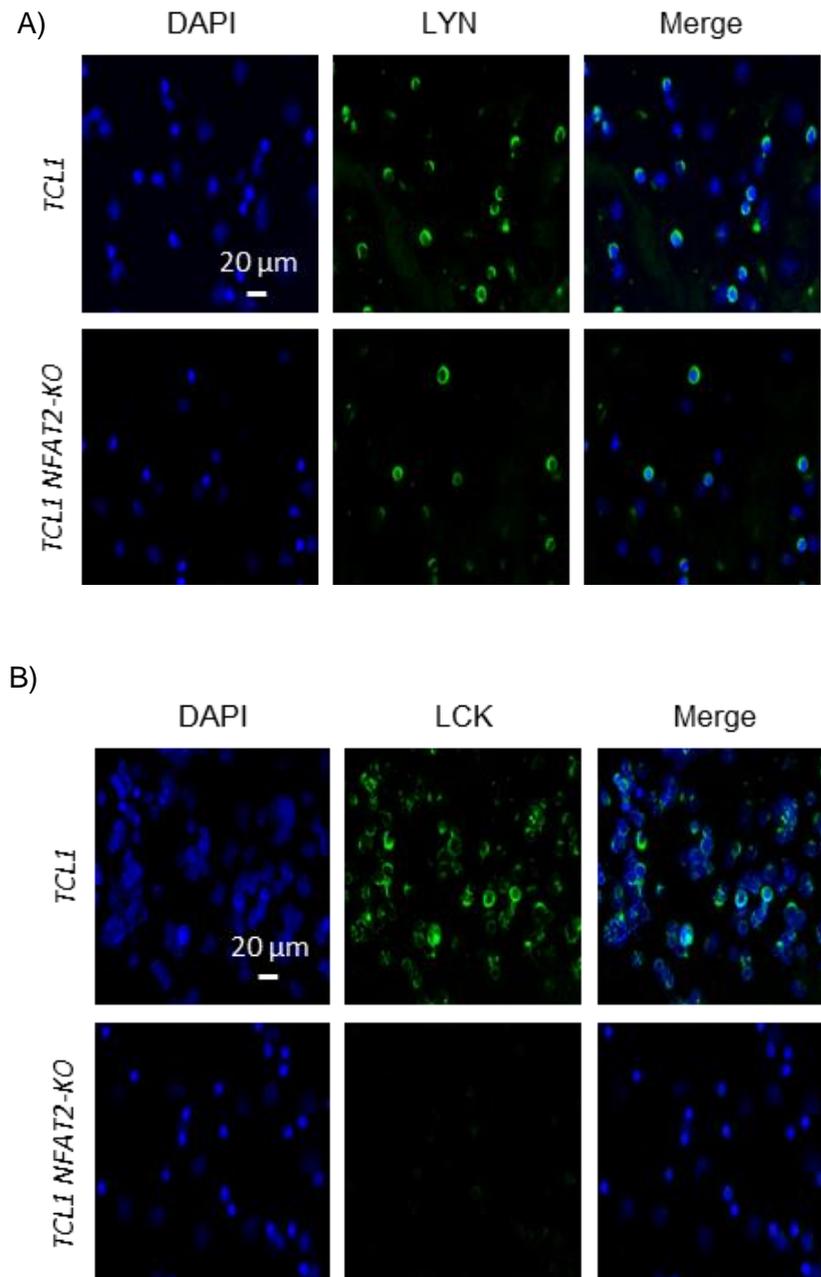


Abb. 19: LYN und LCK sind an der Zellmembran von CLL-Zellen lokalisiert

Mit CLL-Zellen aus TCL1- und TCL1 NFAT2-KO-Tieren wurden Zytospins angefertigt. Anschließend wurden die Zellkerne durch eine DAPI-Färbung (blau) und die Zielproteine durch Antikörper (grün) angefärbt. Gezeigt sind die Färbungen für LYN (A) oder LCK (B) (Vergrößerung: 200x). Modifiziert nach Märklin et al., Nat Commun, 2017 (doi:10.1038/s41467-017-00830-y).

3 ERGEBNISSE

3.3 LCK als Akteur im BCR-Signaling

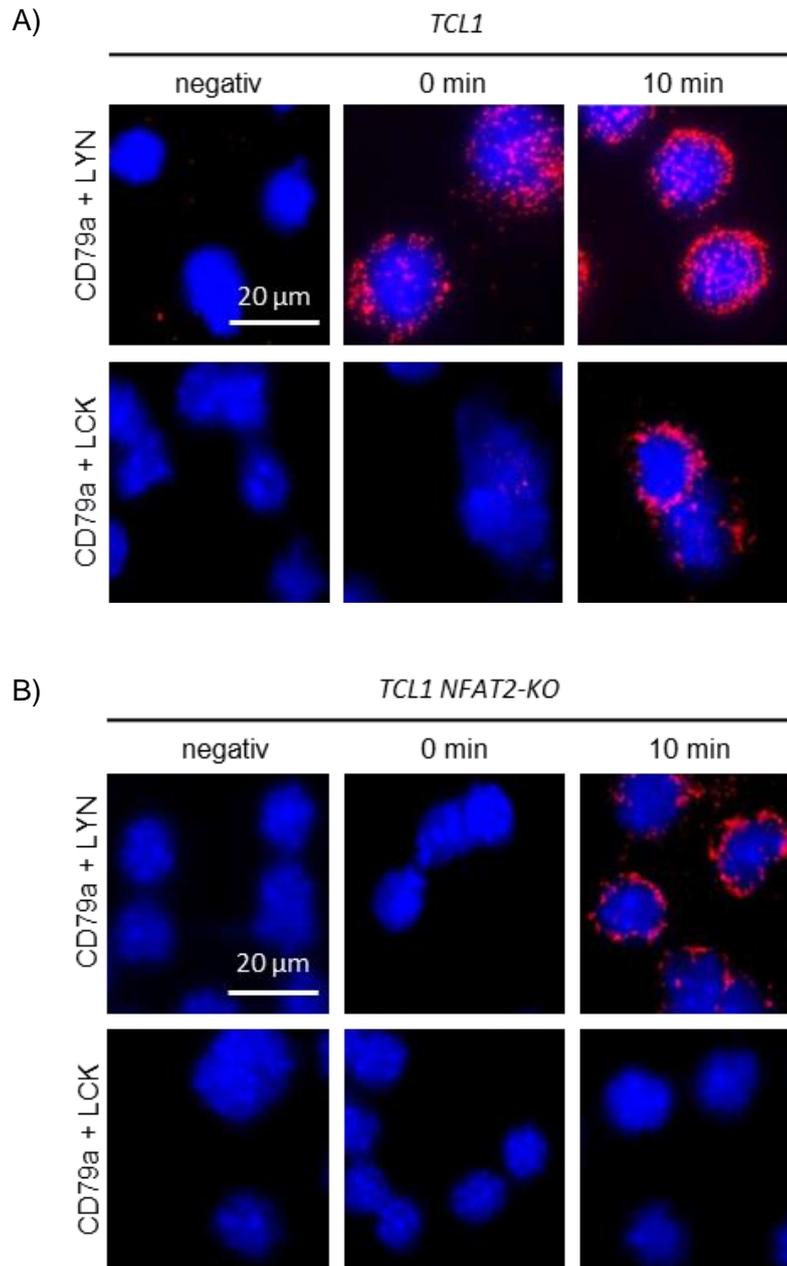


Abb. 20: LCK interagiert mit dem BCR in CLL-Zellen

CLL-Zellen aus *TCL1*- und *TCL1 NFAT2-KO*-Tieren wurden isoliert und 10 min bei 37 °C in B-Zell-Medium mit 20 µg/ml algM stimuliert oder unbehandelt belassen. Anschließend wurden Zytospins angefertigt und das Proximitäts-Ligations-Assay durchgeführt. Die Zellkerne wurden außerdem durch DAPI (blau) angefärbt. Gezeigt sind die Interaktionen von CD79a und LYN oder CD79a und LCK in herkömmlichen *TCL1*-Tieren (A), sowie in *TCL1 NFAT2-KO*-Tieren (B) (Vergrößerung: 630x). Modifiziert nach Märklin et al., *Nat Commun*, 2017 (doi:10.1038/s41467-017-00830-y).

Für die Interaktions-Analysen wurden PBMCs aus dem Blut von *TCL1*-Tieren mit oder ohne *NFAT2*-Deletion isoliert und nach einer BCR-Stimulation mittels Zytospin auf Objektträger aufgebracht. Daraufhin erfolgte die Färbung gemäß des Duolink-Protokolls des Herstellers.

3 ERGEBNISSE

3.4 Die Bedeutung von LCK in der CLL

Via Mikroskopie wurde die finale Analyse der Zellen durchgeführt (Abb. 20). Die Interaktion zwischen LYN und dem BCR diente dabei als Positiv-Kontrolle. Die Stimulation des BCRs führte hierbei in CLL-Zellen aus herkömmlichen TCL1-Mäusen (siehe Abb. 20A) zur Rekrutierung von LCK an den BCR, nicht jedoch im Falle des Verlusts von NFAT2 (vgl. Abb. 20B).

3.4 Die Bedeutung von LCK in der CLL

Um die Rolle von LCK im Verlauf der CLL detaillierter zu untersuchen, wurde ein TCL1-Mausmodell generiert, welches ebenfalls einen LCK- und NFAT2-Knockout enthält. Im TCL1-Modell, das freundlicherweise von Prof. C.M. Croce zur Verfügung gestellt wurde, führt die Expression des TCL1-Onkogens unter Kontrolle des B-Zell-spezifischen E μ -Enhancers zur Ausbildung einer CLL. So entwickeln die Tiere eine oligoklonale CLL, welcher der Erkrankung im Menschen stark ähnelt. Durch Vorarbeiten von Dr. Märklin in unserer Gruppe konnte in diese Linie eine über den CD19-Promotor gesteuerte, B-Zell-spezifische Deletion von NFAT2 eingebracht werden. Der Verlust von NFAT2 führte im TCL1-Modell zu einem aggressiveren Verlauf der CLL. Um nun die Rolle von LCK in diesem Kontext zu untersuchen, wurde ein konventioneller LCK-KO in die TCL1-Linie mit NFAT2-KO eingebracht.

3.4.1 LCK-KO im transgenen E μ -TCL1 Modell

Bei der Generierung der neuen Linie wurden in der Parental-Generation Tiere aus der LCK-KO-Kohorte (B6.129S2-LCK^{tm1Mak}/J-Linie) mit Tieren aus der TCL1 NFAT2-KO-Linie (TCL1^{+/-} NFAT2^{fl/fl}CD19^{cre/+}) verpaart. Hierdurch erhielt man in der F1-Generation Tiere, die heterozygot für den LCK-KO und den NFAT2-KO sind und welche zur weiteren Verpaarung mit der LCK-KO-Linie verwendet wurden. Daraus entstanden Tiere, die den LCK-Knockout homozygot tragen und heterozygot für NFAT2 sind. Indem diese Mäuse verpaart wurden, erhielt man in der F3-Generation die gewünschten TCL1 LCK-KO (TCL1^{+/-}LCK^{-/-} NFAT2^{fl/fl}CD19^{+/+})- und LCK-KO NFAT2-KO (TCL1^{-/-}LCK^{-/-}NFAT2^{fl/fl}CD19^{cre/+})-Tiere zur Züchtung der TCL1 LCK-KO NFAT2-KO (TCL1^{+/-}LCK^{-/-}NFAT2^{fl/fl}CD19^{cre/+}) Versuchskohorte. In Abb. 21 ist das Vorgehen hierfür skizziert.

3 ERGEBNISSE

3.4 Die Bedeutung von LCK in der CLL

P:		Lck ^{-/-}	X	Eμ-TCL1 ^{+/-} NFAT2 ^{fl/fl} CD19 ^{cre/+}
F ₁ :		Lck ^{-/-}	X	25% Eμ-TCL1 ^{+/-} NFAT2 ^{fl/wt} CD19 ^{cre/+} Lck ^{+/+}
F ₂ :		6,28% Eμ-TCL1 ^{+/-} NFAT2 ^{fl/wt} CD19 ^{cre/+} Lck ^{-/-}	X	6,28% Eμ-TCL1 ^{+/-} NFAT2 ^{fl/wt} CD19 ^{+/+} Lck ^{-/-}
F ₃ :		8% Eμ-TCL1 ^{+/-} NFAT2 ^{fl/fl} CD19 ^{+/+} Lck ^{-/-}	X	8% Eμ-TCL1 ^{-/-} NFAT2 ^{fl/fl} CD19 ^{cre/+} Lck ^{-/-}
F ₄ :	25% Eμ-TCL1 ^{+/-} NFAT2 ^{fl/fl} CD19 ^{+/+} Lck ^{-/-}	25% Eμ-TCL1 ^{+/-} NFAT2 ^{fl/fl} CD19 ^{cre/+} Lck ^{-/-}	X	25% Eμ-TCL1 ^{-/-} NFAT2 ^{fl/fl} CD19 ^{cre/+} Lck ^{-/-}
				25% Eμ-TCL1 ^{-/-} NFAT2 ^{fl/fl} CD19 ^{+/+} Lck ^{-/-}
	TCL LCK-KO	TCL LCK-KO NFAT2-KO		LCK-KO NFAT2-KO
				LCK-KO

Abb. 21: Kreuzungsschema des konventionellen LCK Knock-outs im Eμ-TCL1 Modell

In der Parentalgeneration (P) wurde die Linie mit konventionellem LCK-Knockout mit der Eμ-TCL1 NFAT2-KO Linie verpaart. Genotyp und prozentuale Verteilung der für weitere Verpaarungen verwendeten Nachkommen (F₁-F₃) sind angegeben.

Der Nachweis des Verlusts von LCK in den LCK-KO-Tieren, sowie im Fall des Verlustes von NFAT2, wurde mit isolierten CLL-Zellen auf Proteinebene erbracht. Hierfür wurden CLL-Zellen aus Milzen extrahiert. Der nachfolgende Western-Blot (Abb. 22) erbrachte einen erneuten Nachweis für den Verlust der Expression von LCK in TCL1 NFAT2-KO-Tieren.

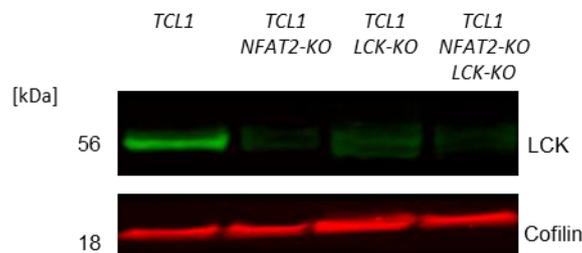


Abb. 22: Nachweis des LCK-Knockout im TCL1 LCK-KO NFAT2-KO-Modell

Aus TCL1 NFAT2-KO-, TCL1 LCK-KO und TCL1 NFAT2-KO LCK-KO-Tieren wurden CLL-Zellen isoliert. Mit diesen Zellen wurde eine Protein-Extraktion durchgeführt. Im Anschluss wurden 20 µg des Proteinextraktes für eine Protein-Gelelektrophorese mit Western-Blot verwendet. Dargestellt sind die Ergebnisse für je ein repräsentatives Tier pro Gruppe für LCK sowie Cofilin als Ladekontrolle.

Der Verlust der LCK-Expression war ebenso in den neu generierten TCL1 LCK-KO- und TCL1 NFAT2-KO- LCK-KO-Tieren feststellbar.

3.4.2 Der Verlust von LCK verringert das Überleben

Da der LCK-Knockout im Eμ-TCL1 Modell zu einem Verlust der Proteinexpression führte, sollte anschließend untersucht werden, welche Auswirkungen dies auf den Verlauf der CLL hat. Hierfür wurde ein Langzeitversuch mit den entsprechenden Kohorten durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

3.4 Die Bedeutung von LCK in der CLL

Hierbei stellten TCL1 LCK-KO NFAT2-KO und TCL1 LCK-KO-Tiere die experimentellen Kohorten dar. Als Kontrollkohorten wurden Tiere der LCK-KO NFAT2-KO- und LCK-KO-Gruppen verwendet. Des Weiteren wurden Daten aus einer vorangegangenen Langzeitanalyse der TCL1- und TCL1 NFAT2-KO-Tiere herangezogen⁴⁰.

Bei sämtlichen Tieren im Experiment fanden wöchentlich eine Gewichtskontrolle und eine Erfassung des allgemeinen Gesundheitszustandes statt. Der Todeszeitpunkt jedes Tieres wurde vermerkt und die Überlebensdauer in Tagen berechnet. Der Tod trat hierbei entweder von selbst ein oder aber durch eine Euthanasie mittels CO₂ aus tierschutzrechtlichen Gründen aufgrund eines zu hohen krankheitsbedingten Gewichtsverlustes. Die Beobachtung endete nach 400 Tagen, als alle Tiere verstorben waren. Außerdem erfolgte ab einem Alter von drei Monaten alle vier Wochen eine retrobulbäre Blutabnahme. Das abgenommene Blut wurde dann für die Analyse mittels Durchflusszytometrie aufgearbeitet. Somit sollten mit diesem Experiment das Überleben der Tiere und der Anteil an malignen CD5⁺ B-Zellen im Blut festgestellt werden.

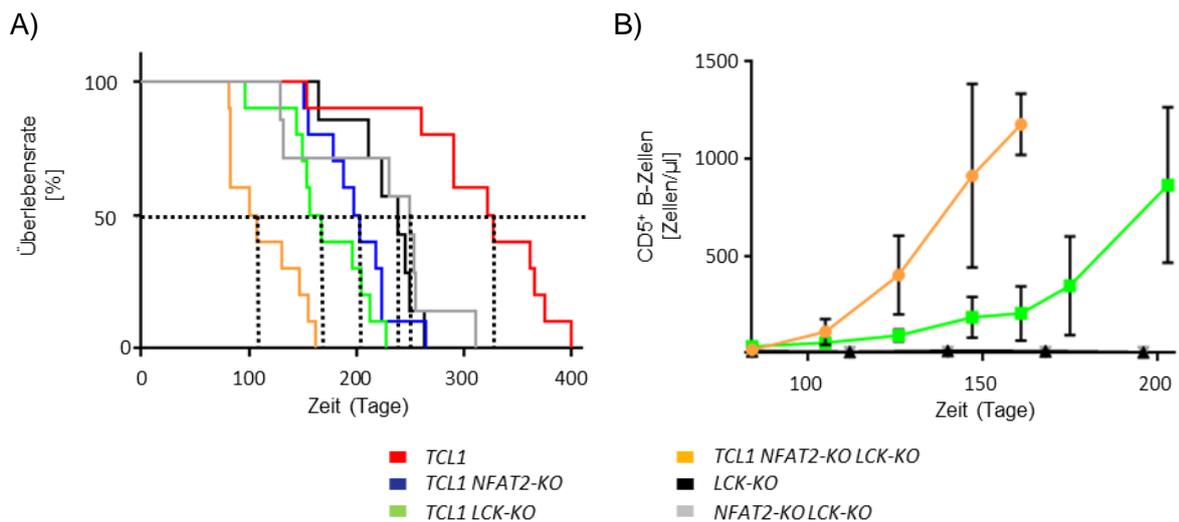


Abb. 23: Der Verlust von LCK verringert das Überleben und sorgt für eine Vermehrung der CLL-Zellen

Tiere der verschiedenen Genotypen wurden gezüchtet und dem Alter und dem Geschlecht entsprechend den Kontrollkohorten LCK-KO & NFAT2-KO LCK-KO ($n=7$) und den experimentellen Kohorten TCL1, TCL1 NFAT2-KO, TCL1 LCK-KO sowie TCL1 NFAT2-KO LCK-KO ($n=10$) zugeordnet. Alle 2-3 Wochen erfolgte eine retrobulbäre Blutentnahme von ca. 50 µl Blut. A) Kaplan-Meier-Kurve der Überlebensrate in Tagen. B) Durchflusszytometrische Analyse des Blutes. Dargestellt ist der Mittelwert an CD5⁺ B-Zellen pro µl Blut der untersuchten Kohorten ($n=7-10$).

In Abb. 23A ist die Kaplan-Meier-Kurve der Überlebensraten gezeigt. So wiesen die TCL1-Tiere mit einer LCK-Deletion ein medianes Überleben von 162,5 Tagen auf mit einer maximalen Überlebensdauer von 210 Tagen. Währenddessen verstarben die Tiere der

3 ERGEBNISSE

3.4 Die Bedeutung von LCK in der CLL

TCL1 NFAT2-KO LCK-KO-Kohorte signifikant früher innerhalb eines Zeitraums von 162 Tagen mit einem medianen Überleben von 104 Tagen. Somit zeigte sich bei weiterer Analyse der Daten ein signifikanter Unterschied zwischen der TCL1-Kohorte mit einem medianen Überleben von 325 Tagen (Überlebensdauer: 400 Tage) und den TCL1-Tieren mit LCK-Deletion sowie LCK- und NFAT2-Deletion. Die TCL1 NFAT2-KO-Kohorte mit Überlebensdauer von 265 Tagen und einem medianen Überleben von 200,5 Tagen zeigte dem gegenüber einen zur TCL1 LCK-KO-Kohorte sehr ähnlichen Verlauf, sowie einen signifikanten Unterschied zur TCL1 LCK-KO NFAT2-KO-Gruppe. Die Tiere aus den LCK-KO- und LCK-KO NFAT2-KO- Kontrollkohorten verstarben nach 263 beziehungsweise 311 Tagen. Durch ein medianes Überleben von 239 beziehungsweise 249 Tagen ließ sich damit kein signifikanter Unterschied zwischen herkömmlichen TCL1-Tieren und den LCK-KO- und LCK-KO NFAT2-KO- Kontrollkohorten feststellen.

Die durchflusszytometrische Analyse des malignen CD5⁺ B-Zell-Anteils im Blut ist in Abb. 23B dargestellt. Hierbei zeigte sich in den LCK-KO und LCK-KO NFAT2-KO Tieren ein äußerst geringer Anteil an CD5⁺ B-Zellen (max. 12 Zellen/ μ l), der sich im gesamten Zeitraum nicht veränderte. Im Gegensatz dazu wiesen beide TCL1-Kohorten eine deutlich höhere Anzahl an malignen B-Zellen im Blut auf. So waren bei der TCL1 LCK-KO-Kohorte durchschnittlich bis zu 900 Zellen/ μ l messbar, wobei sich nach 130 Tagen eine deutliche Zunahme dieser Zellen zeigte (200 Zellen/ μ l). Der Anteil der CD5⁺ B-Zellen in TCL1-Mäusen mit LCK-KO und NFAT2-KO betrug im Gegensatz 500 Zellen/ μ l nach 130 Tagen und maximal 1.400 Zellen/ μ l im Durchschnitt bei 180 Tagen.

Die Deletion von LCK wirkte sich also negativ auf das Überleben der Tiere aus. Zudem vermuteten wir aufgrund der Daten eine stärkere Expansion der CLL-Zellen im Blut durch den Verlust von LCK. Da jedoch auch die Mäuse der LCK-KO-Kontrollgruppen starben, kann die CLL hier jedoch nicht die alleinige Todesursache sein.

3 ERGEBNISSE

3.4 Die Bedeutung von LCK in der CLL

3.4.3 Der Verlust von LCK führt nicht zu einer Akzelerierung der CLL

Um einen weiteren Einblick in die Auswirkungen des Verlusts von LCK in der CLL zu erhalten, wurden neben den Tieren für die Langzeitanalyse weitere Kohorten gezüchtet. Bei diesen wurden in einem Alter von fünf Monaten verschiedene Organe untersucht. So wurde unter anderem die Milz entnommen und deren Größe und Gewicht analysiert.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb. 24 dargestellt. So wiesen Milzen von herkömmlichen TCL1-Mäusen nach 20 Wochen ein Gewicht von durchschnittlich 105,7 mg auf. Tiere, welche sowohl das TCL1-Onkogen als auch den NFAT2-KO trugen, hatten mit einem Milzgewicht von 235,4 mg eine im Vergleich 2-fache Gewichtszunahme.

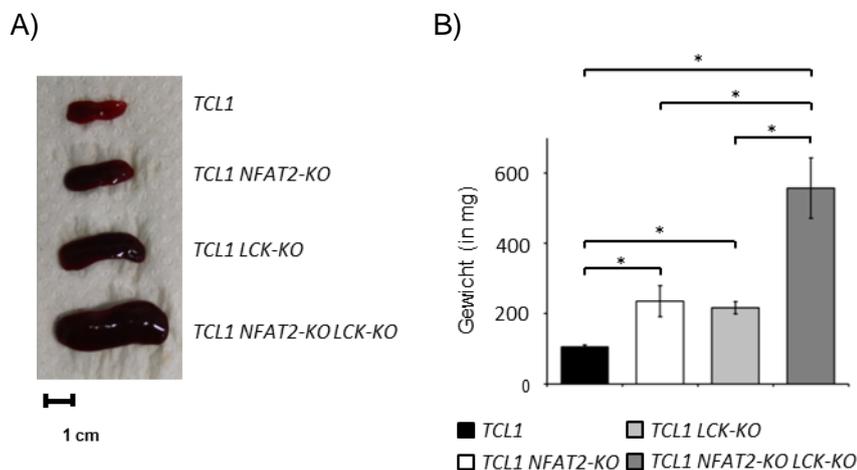


Abb. 24: Der Verlust von LCK führt zu einer Splenomegalie

Tieren der TCL1-, TCL1 NFAT2-KO-, TCL1 LCK-KO- sowie TCL1 NFAT2-KO LCK-KO-Kohorte wurden im Alter von 5 Monaten die Milzen entnommen. A) Aufnahmen entnommener Milzen. B) Gewicht entnommener Milzen. Dargestellt ist der Mittelwert ($n=6-14$, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$).

Außerdem zeigte sich hier schon eine leichte Splenomegalie. Ein ähnliches Bild konnte für die TCL1 LCK-KO-Kohorte demonstriert werden. So wiesen Tiere dieser Kohorte im Mittel ein Milzgewicht von 216,7 mg und eine Splenomegalie auf. Am stärksten ausgeprägt stellte sich die Situation in der TCL1 NFAT2-KO LCK-KO-Gruppe dar. So war hier unter anderem eine deutliche Splenomegalie sichtbar. Außerdem zeigte sich mit einem Milzgewicht von 557,8 mg eine im Vergleich zu herkömmlichen TCL1-Tieren über 5-fache beziehungsweise im Vergleich mit TCL1 NFAT2-KO-Tieren eine über 2-fache Gewichtszunahme.

3 ERGEBNISSE

3.4 Die Bedeutung von LCK in der CLL

Des Weiteren fanden durchflusszytometrische Untersuchungen verschiedener Organe statt. Hierzu wurde die Milz, Blut und Knochenmark aus Tieren isoliert, aufgearbeitet und einer Analyse mittels Durchflusszytometrie unterzogen.

Im Verlauf der Analysen konnten wir vorherige Ergebnisse bestätigen, nach denen im Alter von 5 Monaten der Anteil der CLL-Zellen in TCL1-Tieren mit NFAT2-KO in Blut, Milz und Knochenmark im Vergleich zu herkömmlichen TCL1-Tieren erhöht ist. Jedoch stellte sich dieser Unterschied nicht in allen Organen im gleichen Ausmaß signifikant dar.

So konnte im Blut (vgl. Abb. 25B) von TCL1 NFAT2-KO-Tieren ein signifikant erhöhter Anteil maligner Zellen von 54,8 % im Vergleich zu 26,2 % in der TCL1-Kohorte nachgewiesen werden. Den geringsten Anteil an CLL-Zellen wiesen TCL1-Tiere mit LCK-KO (17,7 %) auf. Währenddessen zeigte sich in TCL1-Tieren mit NFAT2-KO und LCK-KO ein Anteil von 38,2 % maligner Zellen, womit diese Kohorte sowohl im Vergleich zu herkömmlichen TCL1-Mäusen als auch zu TCL1-Mäusen mit LCK-KO signifikant mehr CLL-Zellen besaß.

In der Milz (Abb. 25C) bot sich ein ähnliches Bild, wobei hier die TCL1 NFAT2-KO LCK-KO-Kohorte mit 38,6 % den höchsten Anteil an CLL Zellen aufwies, verglichen mit der TCL1-Kohorte sowie TCL1-Tieren mit NFAT2-KO oder LCK-KO (26,3 % vs. 37,1 % vs. 20,4 %). Diese Werte waren durch gruppeninterne Varianzen jedoch nicht als signifikant zu klassifizieren.

Den geringsten Anteil an CLL-Zellen wies in allen Gruppen das Knochenmark auf (vgl. Abb. 25D). So wiesen TCL1-Tiere hier einen Anteil maligner Zellen von 4,1 % auf, TCL1-Tiere mit NFAT2-KO einen Anteil von 11,3 %. Für die TCL1-Kohorten mit LCK-KO sowie NFAT2-KO und LCK-KO ließ sich im Knochenmark dagegen ein Anteil von 3,0 %, beziehungsweise 7,4 % ermitteln. Hier stellte sich nur der Unterschied zwischen TCL1-Tieren und TCL1-Tieren mit NFAT2-KO sowie zwischen TCL1-Tieren mit NFAT2-KO und TCL1-Tiere mit LCK-KO als signifikant dar.

3 ERGEBNISSE

3.4 Die Bedeutung von LCK in der CLL

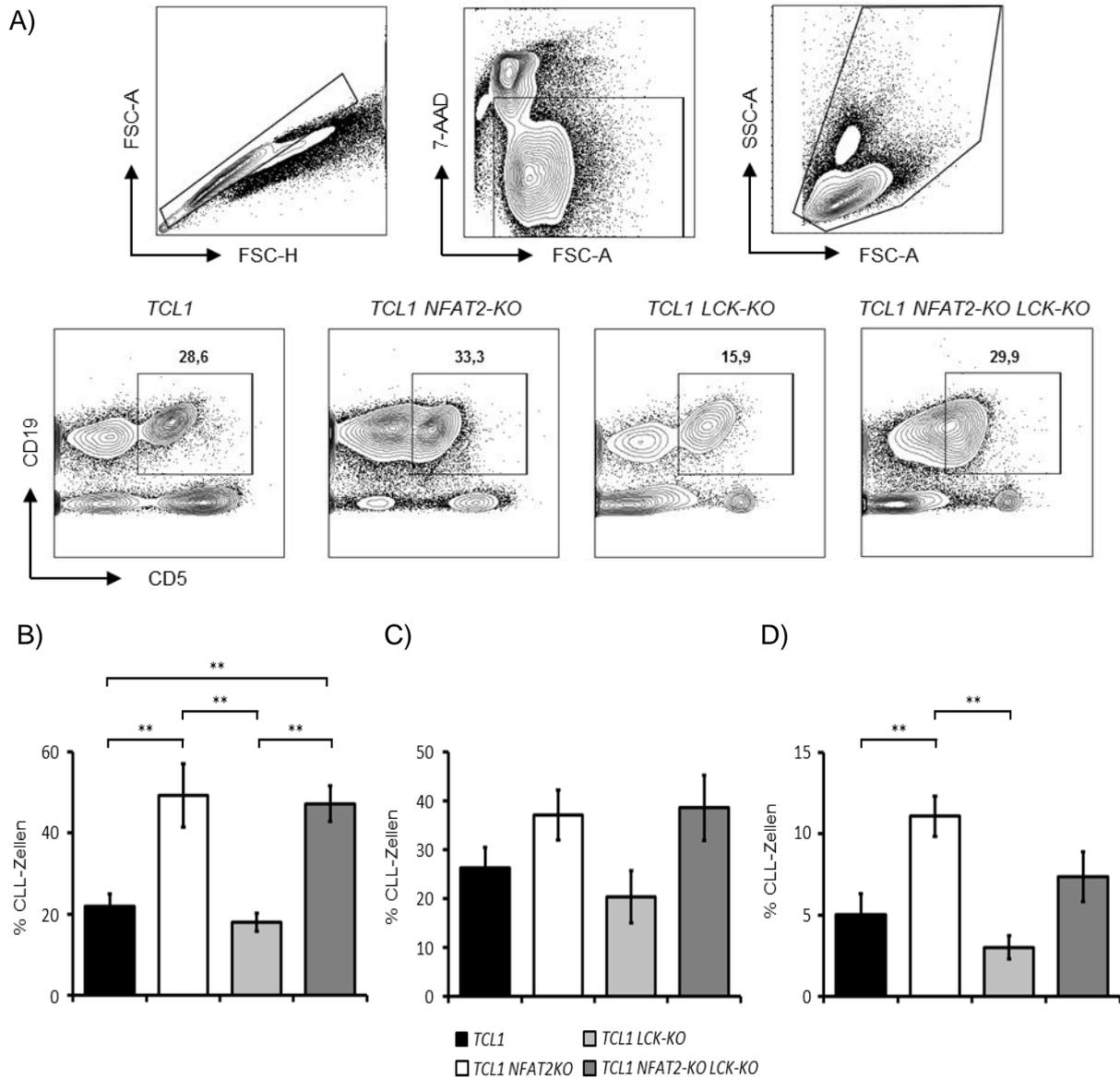


Abb. 25: Anteil der CLL-Zellen in verschiedenen Organen

Zellen aus *TCL1*-, *TCL1 NFAT2-KO*-, *TCL1 LCK-KO*- sowie *TCL1 NFAT2-KO LCK-KO*-Tieren wurden isoliert und via Antikörper angefärbt. Anschließend erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse. Gezeigt sind die angewendete Gating-Strategie (A) sowie die Anteile der CLL-Zellen im Blut (B), in der Milz (C) sowie im Knochenmark (D) ($n=5$, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$).

Des Weiteren erfolgten histologische Analysen entnommener Milzen der verschiedenen Kohorten zum Zeitpunkt 20 Wochen (siehe Abb. 26). Diese zeigten in *TCL1*-Tieren eine leichte Expansion der weißen Pulpa, sowie eine geringe Infiltration von CLL-Zellen in die rote Pulpa. In Tieren der *TCL1 LCK-KO*- sowie *TCL1 NFAT2-KO*-Kohorte konnte eine Atrophie der weißen Pulpa und eine erhöhte Infiltration maligner B-Zellen in der roten Pulpa nachgewiesen werden. In *TCL1 LCK-KO*-Mäusen fand sich jedoch auch eine stark erhöhte

3 ERGEBNISSE

3.4 Die Bedeutung von LCK in der CLL

Granulopoese, welche auf Infektionen dieser Tiere hindeutet. Auch in der TCL1 LCK-KO NFAT2-KO-Kohorte konnte eine veränderte Struktur der Milz gezeigt werden. Dabei waren die Effekte mit einer deutlichen Verringerung der weißen Pulpa, sowie einer signifikanten Expansion der roten Pulpa noch weiter ausgeprägt. Dies wurde auf eine starke Infiltration durch CLL-Zellen zurückgeführt. Während die CLL-Zellen in den anderen Kohorten kleine Zellen mit geringem Anteil an Zytoplasma darstellten, waren die Zellen hier mittelgroß mit einem mittleren Zytoplasmagehalt. Die Beschaffenheit des Chromatins war zwischen der TCL1 und der TCL1 LCK-KO-Kohorte recht ähnlich, da beide stark kondensiertes Chromatin aufwiesen. Dem gegenüber lag in TCL1 NFAT2-KO- und TCL1 LCK-KO NFAT2-KO-Tieren eine offenere Struktur des Chromatins mit auffälligen Nucleoli vor.

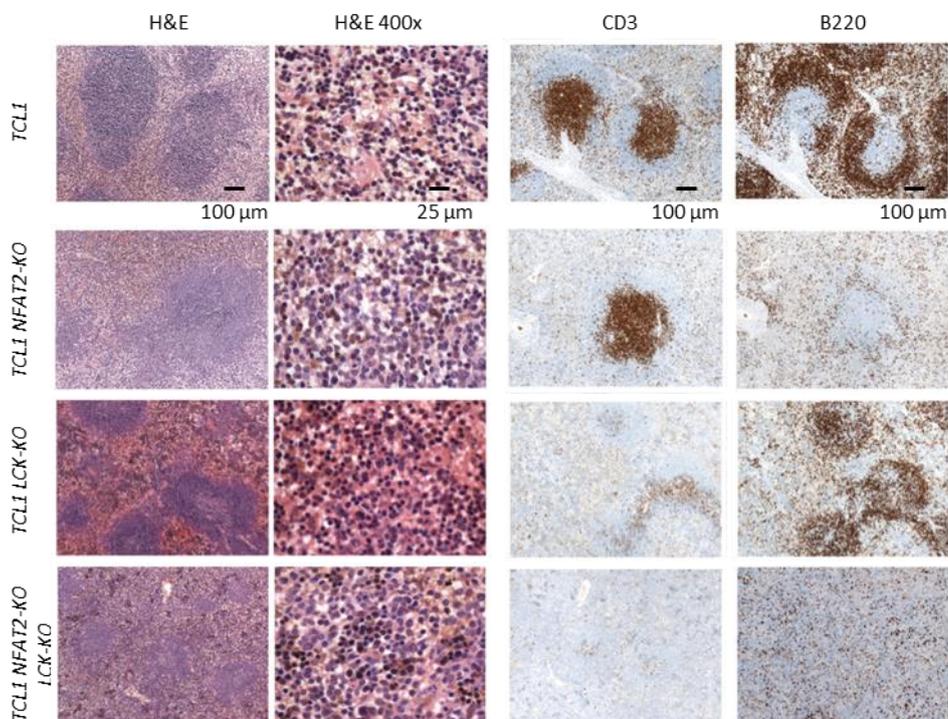


Abb. 26: Histologische Analyse der Milzen

Tieren der TCL1-, TCL1 NFAT2-KO-, TCL1 LCK-KO- sowie TCL1 NFAT2-KO LCK-KO-Kohorten wurden im Alter von 5 Monaten die Milzen entnommen und einer histologischen Analyse unterzogen. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen entnommener Milzen aus TCL1-, TCL1 NFAT2-KO-, TCL1 LCK-KO- und TCL1 NFAT2-KO LCK-KO-Tieren (Vergrößerung: 100x (bei H&E, CD und B220) und 400x (bei H&E)).

3.4.4 Zellzyklus- und Apoptoseraten werden nicht durch die LCK-Deletion beeinflusst

Um anschließend zu überprüfen, ob ein Unterschied im Zellzyklus in den verschiedenen Kohorten vorliegt, wurde bei Tieren der jeweiligen Kohorten eine i.p.-Injektion mit BrdU 24 h

3 ERGEBNISSE

3.4 Die Bedeutung von LCK in der CLL

vor der Analyse durchgeführt. Um mögliche Unterschiede in der Apoptoserate feststellen zu können, wurden die isolierten Zellen außerdem einer Annexin V-Färbung unterzogen. In den anschließenden durchflusszytometrischen Analysen wurde der Anteil der Zellen in den verschiedenen Zellzyklus-Phasen durch Färbung auf BrdU bzw. 7-AAD sowie der Anteil der apoptotischen Zellen mittels Annexin V-Färbung ermittelt.

Hierbei zeigte sich, dass sich sowohl im Blut, als auch in der Milz und im Knochenmark der Großteil der Zellen aller Genotypen in der G0/G1-Phase befand (Abb. 27). Im Blut folgte anteilmäßig darauf die G2/M-Phase, während sich die wenigsten Zellen in der S-Phase fanden (vgl. Abb. 27B). In herkömmlichen TCL1-Tieren waren so 9,4 % der Zellen im Stadium der S-Phase, während in den TCL1-Tieren mit den jeweiligen Knockouts etwa doppelt so viele Zellen vorhanden waren (24,7 % vs. 23,8 % vs. 22,2 % (TCL1 NFAT2-KO vs. TCL1 LCK-KO vs. TCL1 NFAT2-KO LCK-KO)). Durch gruppeninterne Abweichungen ließ sich hier jedoch kein signifikanter Unterschied demonstrieren.

In der Milz waren die G2/M- (12,4 %-32,1 % der Zellen) und die S-Phase (9,8 %-25,4 % der Zellen) etwa gleich verteilt, mit etwas mehr Zellen in der G2/M-Phase (siehe Abb. 27C). Demgegenüber zeigte sich im Knochenmark ein heterogenes Bild (vgl. Abb. 27D). So waren hier in herkömmlichen TCL1-Mäusen und TCL1-Tieren mit NFAT2-KO etwa doppelt so viele Zellen in der S-Phase als in der G2/M-Phase. Dieses Verhältnis stellte sich in TCL1-Tieren mit LCK-KO oder NFAT2-KO und LCK-KO jedoch umgekehrt dar.

Was die Apoptoseraten betrifft, zeigte die Annexin V-Färbung im Blut, in der Milz, sowie im Knochenmark, dass herkömmliche TCL1-Tiere im Vergleich zu TCL1-Tieren mit Knockouts einen verminderten Anteil apoptotischer CLL-Zellen aufweisen (vgl. Abb. 28).

3 ERGEBNISSE

3.4 Die Bedeutung von LCK in der CLL

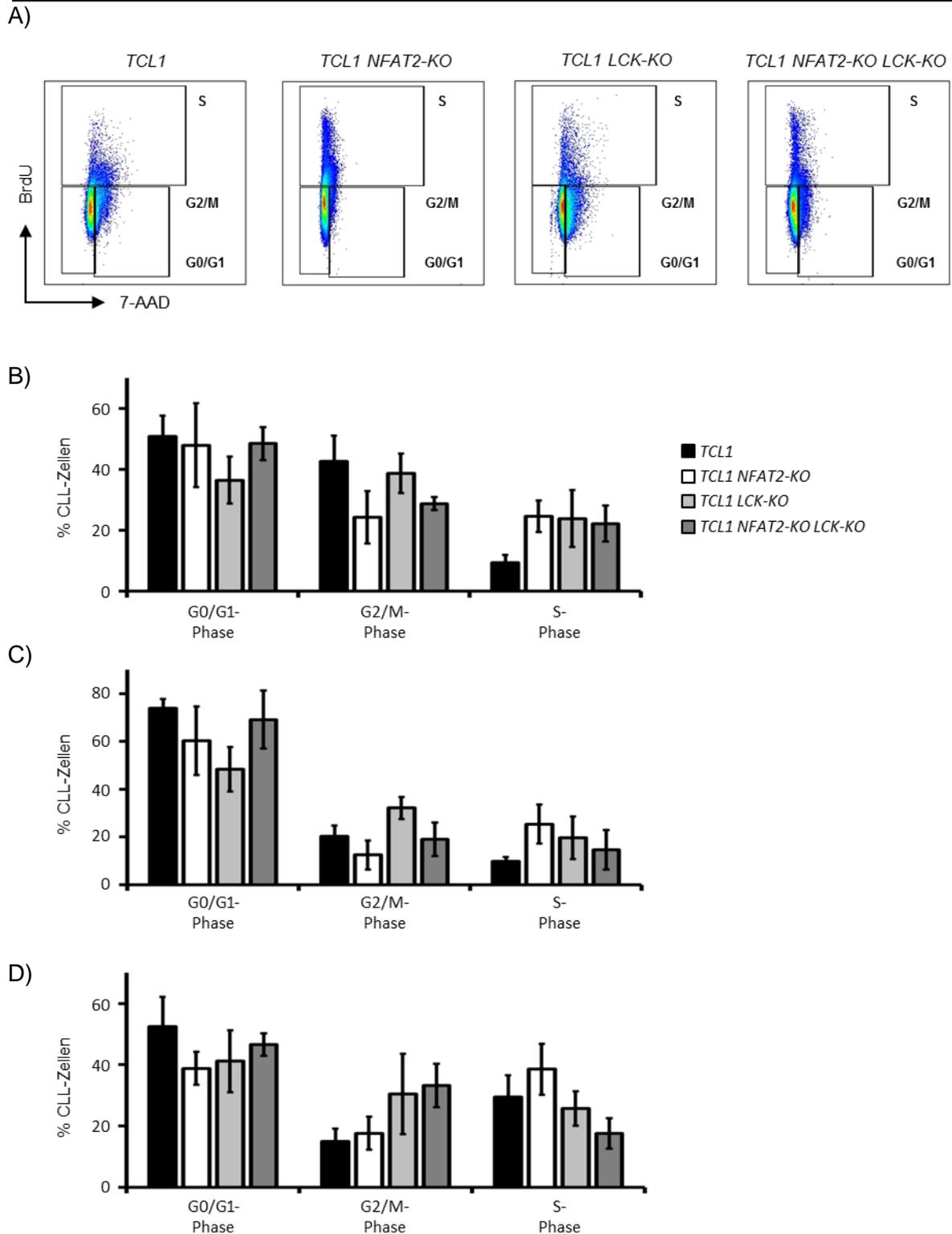


Abb. 27: Unterschiede im Zellzyklus der verschiedenen TCL1-Kohorten

Für die Zellzyklusanalyse wurde Tieren der verschiedenen Kohorten (TCL1- und TCL1 NFAT2-KO, TCL1 LCK-KO sowie TCL1 NFAT2-KO LCK-KO) 24 h vor der Analyse 150 μ l BrdU-Lösung injiziert. Am Analysetag wurden die Organe präpariert und eine Antikörperfärbung durchgeführt. Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Gezeigt sind die verwendete Gating-Strategie (A) sowie der Anteil der CLL-Zellen in den verschiedenen Stadien des Zellzyklus im Blut (B), in der Milz (C) sowie im Knochenmark (D) ($n=5$, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$).

3 ERGEBNISSE

3.5 LCK ist ein entscheidender Faktor in der Anergie von CLL-Zellen

Am deutlichsten stellte sich dieser Unterschied im Blut und im Knochenmark zwischen TCL1- und TCL1 NFAT2-KO LCK-KO-Mäusen dar (35,2 % vs. 80,4 % im Blut (Abb. 28A) gegenüber 55,9 % vs. 83,0 % im Knochenmark (Abb. 28C)). Während in Blut und Knochenmark TCL1-Tiere mit NFAT2-KO und LCK-KO die höchsten Apoptoseraten aufwiesen, zeigten in der Milz TCL1 LCK-KO-Tiere mit 79,92 % den größten Anteil apoptotischer Zellen. In der Milz stellten sich die Unterschiede jedoch nicht signifikant dar. Durch die genannten Ergebnisse konnten wir zwar vorherige Ergebnisse reproduzieren^{5,40}. Allerdings ließ sich trotz Hinweisen auf Veränderungen im Zellzyklus sowie der Apoptose der CLL-Zellen kein klarer, signifikanter Effekt des Knockouts von LCK auf den Verlauf der CLL zeigen.

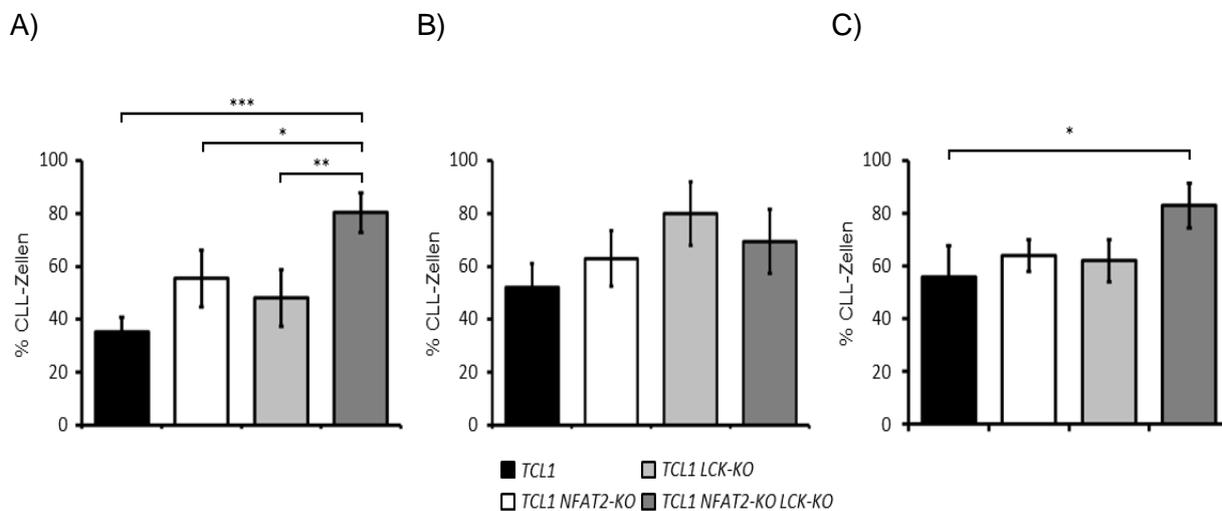


Abb. 28: Erhöhte Apoptoseraten in CLL-Zellen mit Knockouts

Die Analyse der Apoptoseraten erfolgte durch Annexin V- und Antikörperfärbung. Hierzu wurden aus TCL1-, TCL1 NFAT2-KO-, TCL1 LCK-KO sowie TCL1 NFAT2-KO LCK-KO-Tieren die Organe entnommen und die Zellen angefärbt. Im Anschluss wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind die Apoptoseraten von CLL-Zellen aus dem Blut (A), aus der Milz (B) sowie aus dem Knochenmark (C) (n=5, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001).

3.5 LCK ist ein entscheidender Faktor in der Anergie von CLL-Zellen

Nachdem in den vorangegangenen Experimenten somit kein klarer Einfluss von LCK auf die Proliferation und Apoptose der CLL-Zellen nachgewiesen werden konnte, sollte die Auswirkung der Deletion von LCK auf die Anergie untersucht werden, da LCK zuvor als Teil der Anergie-Gen-Signatur identifiziert wurde. Um die Anergie in CLL-Zellen zu untersuchen, wurden verschiedene Parameter analysiert. So wurde eine erhöhte Expression von *Prdm1*

3 ERGEBNISSE

3.5 LCK ist ein entscheidender Faktor in der Anergie von CLL-Zellen

(*Blimp1*) schon zuvor als Marker für den Verlust der Anergie identifiziert, ebenso wie eine gesteigerte IgM-Oberflächenexpression^{37,39,148}. Ein weiterer wichtiger Marker für die Anergie stellt die Calcium-Mobilisation dar, da diese nach Stimulation des BCR-Rezeptors in gesunden Zellen zunimmt, in anergen B-Zellen jedoch nicht^{37,148}.

3.5.1 Erhöhte Expression von *Prdm1* durch den Verlust von NFAT2 und LCK

Um einen Anhaltspunkt bezüglich der Anergie in TCL1-Tieren mit LCK-KO zu erhalten, wurde zuerst die Genexpression von *Prdm1* untersucht, welches in anergen CLL-Zellen nur in geringem Maße exprimiert wird³⁹. Dazu wurden CLL-Zellen aus 20 Wochen alten TCL1-Mäusen isoliert, mittels negativer Selektion aufgereinigt und anschließend nach einer RNA-Isolation via RT-PCR analysiert.

Es zeigte sich, dass *Prdm1* in TCL1 NFAT2-KO-Tieren signifikant höher exprimiert vorliegt als in der TCL1-Kohorte (3,1-fache vs. 1,0-fache relative mRNA-Expression) (vgl. Abb. 29). Eine weitere Erhöhung des *Prdm1*-Levels zeigte sich in der TCL1 LCK-KO-Kohorte sowie der TCL1 NFAT2-KO LCK-KO-Kohorte (lag in beiden Kohorten bei der 4,7-fachen relativen mRNA-Expression). Somit konnte ein erster Hinweis auf den Verlust der Anergie in den TCL1-Tieren mit LCK-KO ausfindig gemacht werden.

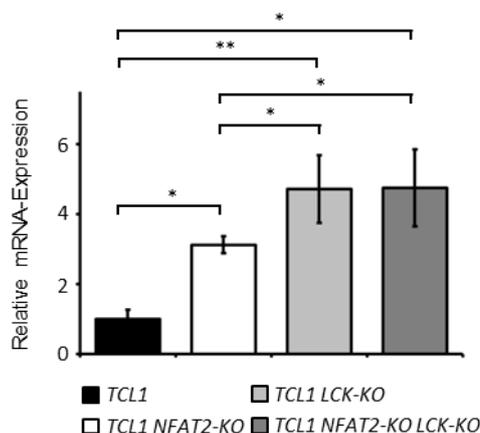


Abb. 29: Verstärkte *Prdm1*-Expression in TCL1-Tieren mit LCK-KO und NFAT2-KO

Zuerst wurden CLL-Zellen aus TCL1-, TCL1 NFAT2-KO-, TCL1 LCK-KO-, und TCL1 NFAT2-KO LCK-KO-Tieren isoliert. Anschließend erfolgte eine RNA-Isolation. Die finale Analyse erfolgte mittels RT-PCR. Dargestellt ist die auf β -Actin normalisierte mRNA-Expression ($n=5$, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$).

3.5.2 Gesteigerte Oberflächenexpression von IgM durch die Deletion von NFAT2 und LCK

Um den Verlust der Anergie durch die Deletion von LCK zu untermauern, wurde die Oberflächenexpression von IgM analysiert, da Apolonio et al demonstrieren konnten, dass der BCR im Falle der Anergie in verringertem Maße auf der Zelloberfläche vorliegt³⁷. Zur Untersuchung der IgM-Oberflächenexpression wurden Splenozyten isoliert und mittels Durchflusszytometrie untersucht.

So ist in Abb. 30 erkennbar, dass TCL1-Tiere eine geringe Expression von IgM aufwiesen (MFI von 9088), während TCL1-Tiere mit NFAT2-KO oder LCK-KO eine signifikant vermehrte Expression von IgM zeigten (MFI von 37942 oder 29400). Die höchste IgM-Expression wiesen jedoch Tiere aus der TCL1 LCK-KO NFAT2-KO-Kohorte auf (MFI von 63075).

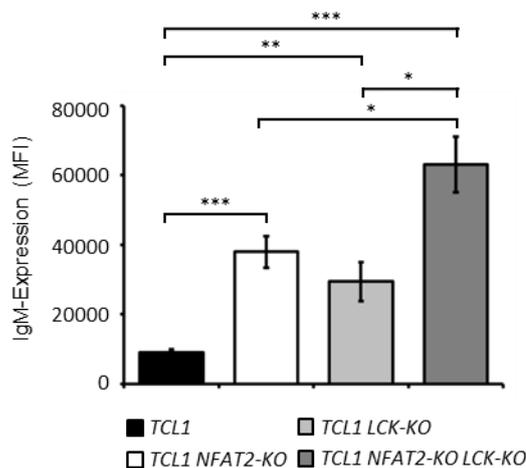


Abb. 30: Vermehrte Oberflächenexpression von IgM durch LCK und NFAT2-KO in TCL1-Tieren

Nachdem aus Tieren der TCL1-, TCL1 NFAT2-KO-, TCL1 LCK-KO-, und TCL1 NFAT2-KO LCK-KO-Kohorte Splenozyten isoliert wurden, erfolgte eine Oberflächen-Färbung mithilfe von Antikörpern. Die abschließende Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt sind Mittelwerte der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) ($n=5$, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$).

3.5.3 Vermehrte Ca^{2+} -Mobilisation durch den Verlust von NFAT2 und LCK

Zur Untersuchung der Reaktivität der B-Zellen wurde außerdem die Ca^{2+} -Mobilisation nach Rezeptorstimulation herangezogen. So kommt es in gesunden B-Zellen nach Stimulation des BCRs zu einer erhöhten Ca^{2+} -Mobilisation, jedoch nicht, wenn ein anergischer Zustand vorliegt³⁷. Zur Untersuchung der Ca^{2+} -Mobilisation wurden Splenozyten isoliert, mit dem Ca^{2+} -reaktiven Farbstoff FuraRed beladen und extrazellulär mit Fluoreszenz-Antikörpern angefärbt. Anfangs wurde der basale Ca^{2+} -Einstrom der CLL-Zellen für 30 s detektiert (Abb. 31).

3 ERGEBNISSE

3.5 LCK ist ein entscheidender Faktor in der Anergie von CLL-Zellen

Dabei war in Tieren mit LCK-KO ein leicht erhöhter Einstrom feststellbar. Anschließend erfolgte die Rezeptorstimulation mittels Zugabe von α lgM. Dabei zeigte sich ein verzögerter und schwacher Einstrom von Calcium in anergen CLL-Zellen aus TCL1-Tieren. Dem gegenüber stand eine unmittelbare und sehr hohe Ca^{2+} -Mobilisation in den TCL1-Kohorten mit den jeweiligen Knockouts. Die abschließende Stimulation mithilfe von Ionomycin diente als Positiv-Kontrolle für die Fähigkeit der Zellen der Ca^{2+} -Mobilisation.

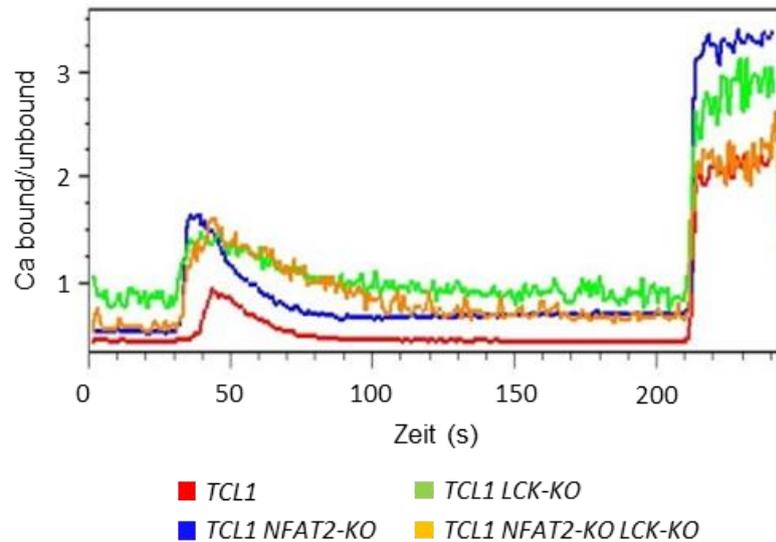


Abb. 31: Erhöhte Ca^{2+} -Mobilisation von TCL1 Zellen mit Knockouts

Splenozyten aus TCL1, TCL1 NFAT2-KO, TCL1 LCK-KO, und TCL1 NFAT2-KO LCK-KO Tieren wurden isoliert und anschließend mit FuraRed beladen. Mittels Antikörpern erfolgte eine Oberflächen-Färbung. Zuerst wurde daraufhin der basale Ca^{2+} -Einstrom für 30 s aufgenommen. Anschließend erfolgte die BCR-Stimulation mit $10 \mu\text{g/ml}$ α lgM und die Ca^{2+} -Mobilisation wurde bestimmt. Nach 180 s Messzeit wurde $10 \mu\text{M}$ Ionomycin als Positivkontrolle zugegeben. Dargestellt ist die Ca^{2+} -Mobilisation der CLL-Zellen.

4 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit sollten die Rolle von NFAT2 und LCK in der CLL ergründet, sowie näher beleuchtet werden. Zugrundeliegend waren hierbei Vorarbeiten und aktuelle Erkenntnisse unserer Arbeitsgruppe, die demonstrierten, dass der Verlust von NFAT2 sowohl im TCL1-Modell als auch in Patienten in einem Verlust der Anergie von CLL-Zellen resultiert. Dies wiederum gipfelt in einem aggressiveren Verlauf der CLL in Einheit mit einer Transformation der Erkrankung^{5,40}.

In dieser Arbeit konnte im TCL1-Mausmodell eine Anergie-Gen-Signatur beschrieben werden, welche abhängig vom NFAT- und BCR-Signaling ist. Zudem zeigte sich die Expression einiger regulatorischer Gene analog zur humanen Richter-Transformation. Die Deletion von NFAT2 schlug sich außerdem auf die Expression von Chemokin-Rezeptoren nieder. Bei der weiteren Untersuchung gelang es zudem, *LCK* als direktes Zielgen von NFAT2 zu identifizieren. Da *LCK* außerdem in vorherigen Publikationen als Bestandteil des BCR-Signalsoms vermutet wurde, wollten wir ebenfalls eine mögliche Beteiligung von *LCK* untersuchen. Dabei gelang uns der Nachweis, dass *LCK* in der Anergie mit dem BCR interagiert. Mittels Langzeit-Untersuchungen konnten wir ebenso ein verringertes Überleben von TCL1-Tieren mit NFAT2-KO, *LCK*-KO oder NFAT2-KO und *LCK*-KO zeigen, wobei allerdings im Falle der Deletion von *LCK* die CLL nicht als alleinige Todesursache in Betracht gezogen werden konnte. Außerdem waren in weiteren Untersuchungen keine eindeutigen Belege für eine Akzelerierung oder Transformation der CLL durch den Verlust von *LCK* nachweisbar. Da des Weiteren der Zellzyklus und die Apoptose zwar verändert erschienen, die Unterschiede sich meist jedoch als nicht signifikant herausstellten, konnten keine klaren Schlüsse gezogen werden. In abschließenden Experimenten, in denen die Expression wichtiger Anergie-Marker sowie der Calcium-Flux analysiert wurde, ließ sich allerdings belegen, dass *LCK* eine wichtige Rolle in der Anergie von CLL-Zellen spielt.

Ein aneriger Phänotyp in CLL-Zellen wurde schon zuvor beschrieben, ebenso wurden verschiedene Charakteristika dieser Zellen identifiziert³⁶⁻³⁹. Zu den Eigenschaften aneriger CLL-Zellen zählt unter anderem die konstitutive Phosphorylierung von MEK1/2 und ERK1/2, eine fehlende Phosphorylierung von AKT, die Überexpression von NFAT2 und ein für *algM*-Stimulation unempfindlicher BCR³⁶. Die konstitutive Phosphorylierung von ERK1/2 wurde anschließend bestätigt, außerdem wurde eine reduzierte IgM-Oberflächenexpression, sowie eine reduzierte Calcium-Mobilisation nach BCR-Stimulation festgestellt³⁷. Des Weiteren wurde in anerigen CLL-Zellen eine verringerte Expression von *Prdm1* nachgewiesen³⁹. Auch

4 DISKUSSION

NFAT2 wurde schon früher in CLL-Zellen exprimiert gefunden, sowie aktiviert in Burkitt-Lymphom und DLBCL⁵⁴. Eine Studie durch Le Roy et al. konnte außerdem einen Zusammenhang zwischen der Aktivierung des BCR und NFAT2 sowie dem Verlauf der CLL demonstrieren³⁸. Übereinstimmend mit Muzio et al., die eine erhöhte NFAT2-Aktivierung mit dem in der Anergie konstitutiv aktivierten MAP/ERK-Signalweg in Zusammenhang bringen konnten, waren wir in der Lage, eine gesteigerte Expression von NFAT2 in anergen CLL-Zellen zu zeigen³⁶. Eine andere Studie konnte zudem aufzeigen, dass NFAT2 in der Entwicklung von B-1a-Zellen eine essentielle Rolle spielt, was die wichtige Funktion von NFAT2 in B-Zellen untermauert.^{5,149} Zusätzlich zur Beschreibung der Wichtigkeit der NFAT2-Expression gelang uns ebenso die Charakterisierung einer NFAT2-abhängigen Anergie-Gen-Signatur. Diese Anergie-Gen-Signatur besteht aus *Lck*, *Cbl-b*, *Grail* und *Egr2* (siehe Abb. 12) und somit aus Faktoren, welche zuvor in der T-Zell-Anergie beschrieben wurden¹⁵⁰⁻¹⁵⁶.

Der interessanteste Faktor in diesem Zusammenhang ist die Proteintyrosinkinase LCK. Dies liegt unter anderem an der Tatsache, dass *Lck* in Microarray-Analysen als eines der Top5 der NFAT2-regulierten Gene identifiziert wurde und die Expression von *Lck* sehr stark durch den NFAT-Inhibitor VIVIT verringert werden kann⁴⁰. Außerdem wurde die enorme Bedeutung von LCK für die T-Zell-Aktivierung und die T-Zell-Anergie gezeigt^{150,151,157}. Die Expression der Kinase wurde zudem in unterschiedlichen Tumorentitäten nachgewiesen (Kolon- und Rektumkarzinom^{84,158}, sowie verschiedene Lymphome⁸⁸). Des Weiteren wurde LCK in B-Zellen/B1-Zellen und CLL-Zellen beschrieben^{72,80,159,160}. Die Rolle von LCK in diesen Zellen ist allerdings umstritten. So konnte von einigen Autoren gezeigt werden, dass LCK wichtig für das BCR-Signaling, jedoch nicht für die B-1-Zell-Entwicklung ist, oder sogar verstärkend im BCR-Signaling wirkt^{74,75}. In anderen Arbeiten wurde LCK hingegen als vernachlässigbar für das BCR-Signaling beschrieben¹⁶¹. Auch die Expression von LCK in CLL-Patienten stellt sich heterogen dar^{81,88,162}. Während unsere Arbeitsgruppe LCK als wichtigen Faktor im BCR-Signaling, sowie eine erhöhte LCK-Expression mit einem indolenten Verlauf der CLL feststellte, wird in anderen Arbeiten zwar die Wichtigkeit im BCR-Signaling in CLL-Zellen bestätigt, jedoch nicht die Bedeutung im Verlauf der CLL^{77,78}.

Die E3-Ubiquitinligase CBL-B wurde zuvor ebenfalls als negativer Aktivierungsregulator und in der T-Zell-Anergie beschrieben¹⁵². Hierbei reguliert CBL-B die TCR-Expression ebenso wie die TCR-abhängige NF-κB-Aktivierung herunter^{163,164}. Eine ähnliche Rolle als negativer Regulator wurde für CBL-B ebenso im BCR-Signaling beschrieben¹⁶⁵, wobei der zugrundeliegende Mechanismus hier die Ubiquitylierung von SYK ist. Ebenso wurde CBL-

4 DISKUSSION

B als wichtiger Faktor in der Kontrolle der B-Zell-Anergie via BCR-Signaling identifiziert¹⁶⁶. Zusätzlich wurde ein Signalweg in T-Zellen aufgedeckt, der einen Zusammenhang zwischen NFAT1-2 und CBL-B aufzeigt. Dabei regulieren NFAT1 und NFAT2 die Expression von Deltex1, welches wiederum die Expression von CBL-B steuert. Außerdem wurde eine Interaktion zwischen Deltex1 und Egr2 festgestellt, die eine optimale Expression von CBL-B ermöglicht und so die T-Zell-Anergie fördert¹⁶⁷. Auch eine umgekehrte Wechselwirkung, bei der CBL-B NFAT1-4 aktiviert, wurde in T-Zellen beschrieben¹⁶⁸. Unsere Ergebnisse zeigen CBL-B als an der Anergie von CLL-Zellen beteiligt, wobei die Regulation hier über NFAT2 und den BCR stattfindet.

Eine weitere E3-Ubiquitinligase mit einer wichtigen Rolle in der Anergie von T-Zellen stellt GRAIL dar¹⁵³⁻¹⁵⁵. Hier wurde eine bedeutende Rolle von NFAT1 ermittelt, da die Expression von GRAIL durch NFAT1-Dimere reguliert wird¹⁶⁹. Eine weitere Studie fand zudem heraus, dass die Expression von GRAIL und CBL-B abhängig von NFAT1 ist¹⁷⁰. Wie jedoch GRAIL seine Wirkung entfaltet, ist größtenteils unbekannt. Mögliche Zielproteine einer Ubiquitylierung durch GRAIL in der T-Zell-Anergie sind die Rho-GTPase oder CD40L^{171,172}. Unsere Untersuchungen in den TCL1-Tieren zeigen, dass GRAIL auch in der Anergie von CLL-Zellen eine wichtige Rolle spielt und hierbei durch NFAT2 und das BCR-Signaling reguliert wird.

Der Transkriptionsfaktor EGR2 stellt einen weiteren wichtigen Akteur in der T-Zell-Anergie dar¹⁵⁶. Zusammen mit EGR3 wurde dieser Transkriptionsfaktor als wichtiger negativer Aktivationsregulator in T-Zellen festgestellt, der unter anderem die Expression von CBL-B beeinflusst¹⁷³. Außerdem wurde herausgefunden, dass EGR2 durch NFAT1-4 reguliert wird und die negative Regulation der T-Zell-Aktivität hauptsächlich durch NFAT1 und NFAT4 via EGR2 und EGR3 vermittelt wird^{174,175}. Eine weitere Studie konnte zudem aufzeigen, dass EGR2 ein direktes Zielgen von NFAT1-3 darstellt¹⁷⁶. Außerdem wurde eine Beteiligung von EGR2 nicht nur in der Entwicklung von T-Zellen, sondern auch von B-Zellen festgestellt¹⁷⁷. Auch im BCR-Signaling spielt EGR2 eine Rolle¹⁷⁸. So konnte EGR2 nicht nur als negativer Regulator der B-Zell-Aktivität identifiziert werden, sondern ebenso beteiligt an der Anergie von B-Zellen¹⁷⁹⁻¹⁸¹. In der TCL1-Kohorte konnten wir EGR2 ebenso als Anergie-Gen identifizieren, das durch NFAT und das BCR-Signaling moduliert wird.

Spannend für weitere Untersuchungen wäre nun, die Expression dieser Anergie-Gene in CLL-Patienten zu untersuchen, um die Rolle der Anergie-Gen-Signatur auch in der humanen

4 DISKUSSION

Erkrankung zu belegen. Des Weiteren wäre eine Korrelation mit weiteren prognostischen Markern wie dem IGHV-Status, sowie der CD38- und ZAP70-Expression von Interesse.

Im Falle einer Richter-Transformation der CLL spielen bestimmte Gene der Zellzyklusregulation eine wichtige Rolle. Dabei können Mutationen in diesen Genen entweder zu einem Verlust der Expression, oder einer gesteigerten Aktivität führen. So wurden als Risikofaktoren einer Richter-Transformation Mutationen identifiziert, die zum Verlust der CDKN2A- und Trp53-Expression oder zu nichtfunktionalen Proteinen führen und damit die Regulation des Zellzyklus und der Apoptose verhindern. Aber auch Mutationen, die eine übermäßige Aktivierung von C-MYC und NOTCH1 zur Folge haben und damit zu einer unregulierten Proliferation führen, spielen hierbei eine wichtige Rolle^{108,109,120,121,182,183}. Der Verlust von *Trp53* und *Cdkn2a* wurde dabei als Hauptmechanismus der Richter-Transformation beschrieben^{184,185}. Eine stark verringerte Expression von *Trp53* und *Cdkn2a* konnten wir auch hier darstellen (siehe Abb.13). und damit weiter verifizieren, dass der Verlust von NFAT2 zu einer Transformation analog zur Richter-Transformation führt. In einer weiteren Arbeit gelang es unserer Arbeitsgruppe zudem nachzuweisen, dass diese Transformation mit einer beschleunigten klonalen Evolution und einem resultierenden, größtenteils unmutierten IGHV-Repertoire der NFAT2-defizienten CLL-Zellen zusammenhängt¹⁸⁶. Die Korrelation von NFAT2 und LCK mit den CDKN2A- und Trp53-Proteinlevel in humanen CLL-Proben, sowie eine Untersuchung des IGHV- und des allgemeinen Mutations-Status, könnten hier weitere Einblicke in die Bedeutung von NFAT2 und LCK in der humanen CLL bieten.

Die Rolle des Microenvironments in der CLL ist ebenfalls von enormer Bedeutung. Eine besondere Bedeutung kommt hierbei den Chemokinen und den entsprechenden Chemokin-Rezeptoren zu¹⁴¹⁻¹⁴³. Im Zuge dieser Arbeit konnten wir eine veränderte Expression von Chemokin-Rezeptoren aufgrund des NFAT2-KO ausmachen (vgl. Abb. 14). Zuvor wurden verschiedene Chemokin-Rezeptoren als wichtige Faktoren für das Überleben von CLL-Zellen identifiziert, oder als prognostische Faktoren der CLL vorgeschlagen. So wurde CCR1 als Rezeptor von Makrophagen-sezernierten Signalen identifiziert, welche in einem höheren Überleben von CLL-Zellen resultieren¹⁸⁷. Auch CCR7 wurde in diesem Zusammenhang als Pro-Survival-Faktor identifiziert¹⁸⁸. Dies deckt sich mit der gesteigerten Apoptoserate von NFAT2-defizienten CLL-Zellen^{5,40}. Eine weitere Studie fand zudem eine Korrelation der CCR7- und CXCR4-Expression mit dem Rai-Staging¹⁸⁹.

4 DISKUSSION

Als weiterer prognostischer Marker wurde CXCR3 vorgeschlagen. Hier fand eine Arbeitsgruppe einen negativen Zusammenhang zwischen der Expression von CXCR3 und der Rai-Klassifizierung. CLL-Patienten mit niedriger CXCR3-Expression hatten also eine schlechtere Prognose^{190,191}. Dies wurde in einer weiteren Arbeit bestätigt und mit der CXCR4-Expression kombiniert. Dabei zeigte sich, dass eine geringe CXCR3-Expression in Zusammenhang mit einer hohen CXCR4-Expression auf einen aggressiveren Verlauf der CLL hinweist¹⁹². Eine Reduktion von CXCR4 wurde auch durch **Brain-derived neurotrophic factor** (BDNF) ausgelöst, was ebenfalls einen milderen Verlauf der CLL zur Folge hatte¹⁹³. Während unsere Resultate in Hinblick auf CXCR3 die Ergebnisse bestätigten, gelang uns dies bezüglich der CXCR4-Expression nicht. Eine mögliche Erklärung dafür bieten Arbeiten, die herausfanden, dass CXCR4 durch BCR-Aktivität herunterreguliert wird und wir eine höhere BCR-Aktivität in TCL1 NFAT2-KO-Tieren feststellten¹⁹⁴⁻¹⁹⁶. Zudem wurde im Falle des **Mucosa Associated Lymphoid Tissue** (MALT)-Lymphoms der Verlust von CXCR4 mit einer Progression zu einem DLBCL verknüpft¹⁹⁷, was ebenso eine mögliche Erklärung bietet, da ein NFAT2-Verlust, wie gezeigt, in einer Transformation der CLL resultiert. Ebenso als schützend vor Apoptose wurde die CXCR5-Überexpression demonstriert¹⁹⁸. Auch hier zeigten unsere Ergebnisse, dass ein Verlust von NFAT2 mit einem Verlust von CXCR5, sowie einer erhöhten Apoptoserate der CLL-Zellen einhergeht⁴⁰.

Da das Microenvironment auch in der humanen CLL als sehr wichtig angesehen wird, wäre hier eine Korrelation von LCK und NFAT2 mit der Expression von Chemokinen und Chemokin-Rezeptoren auch in primären Patientenproben interessant. Da eine Vielzahl von Antikörpern, Rezeptor-Antagonisten, Signaling-Inhibitoren (auch gegen Akteure der BCR-Signalkaskade) als zielgerichtete Therapien gegen Chemokine und Chemokin-Rezeptoren getestet werden^{141-143,199}, wäre es spannend zu untersuchen, ob sich diese Behandlungen auch in der NFAT2- oder LCK-Expression niederschlagen, oder ob die Inhibition von NFAT2 und LCK eine Auswirkung auf die Expression der Chemokine und Chemokin-Rezeptoren hat. Da zudem nicht nur Chemokine sondern auch verschiedene Zellen im Microenvironment der CLL verändert sind (regulatorischen T-Zellen (Tregs), „*nurse-like*“-Zellen und myeloide Suppressor-Zellen)²⁰⁰⁻²⁰³, wären auch hier weitere Untersuchungen im Zusammenhang mit NFAT2 und LCK von Interesse. Außerdem könnten Analysen bezüglich des Zusammenhangs von oxidativem Stress- und Metabolit-Level^{204,205} mit der NFAT2 und LCK-Expression im TCL1-Modell, sowie in humanen CLL-Patienten mögliche prognostische oder therapeutische Ansätze aufzeigen.

4 DISKUSSION

Bei Brustkrebs konnte ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten NFAT2- und einer erhöhten NFAT1-Expression nachgewiesen werden, wobei NFAT2 die Expression von NFAT1 reguliert¹⁴⁴. Um zu untersuchen, ob dies auch analog in der CLL gilt, griffen wir auf TCL1-Mäuse zurück. Im Falle des TCL1-Modells konnten wir jedoch keine Abhängigkeit der NFAT1-Expression von NFAT2 feststellen (siehe Abb. 15). Ein Hauptmechanismus, über den Tumore der Immunosurveillance entkommen, ist die Modulierung der MHC-Klasse-I-Expression²⁰⁶⁻²¹⁰. Da außerdem ein niedriges Level der MHC-Expression mit einem aggressiveren Tumorverhalten assoziiert wurde²¹¹, wollten wir untersuchen, ob sich dieser Zusammenhang auch im Falle des aggressiveren CLL-Phänotyps durch den NFAT2-KO zeigt. Allerdings konnten wir keine Korrelation zwischen der NFAT2-Deletion und einer verringerten MHC-Expression aufweisen, da wir vergleichbare Levels der MHC-Expression in der TCL1 und der TCL1 NFAT2-KO-Kohorte vorfanden (siehe Abb. 16). Eine Übertragung der Ergebnisse auf die humane Erkrankung wäre auch hier von Interesse. Zudem wäre eine Untersuchung der anderen NFAT-Familien-Mitglieder sowie die Auswirkung von NFAT2 und LCK-Inhibition auf andere NFAT-Familien-Mitglieder in humanen CLL-Patienten spannend.

Bereits 1995 wurde *LCK* als potentiell Zielgen von NFAT2 identifiziert¹⁴⁷. Im Zuge dieser Arbeit verwendeten wir eine Methode namens Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) um *LCK* in Patientenproben als direktes Zielgen von NFAT2 zu identifizieren (vgl. Abb. 17)^{40,212}. Hierbei diente CD40L als Positivkontrolle, da die Bindung von NFAT2 an den zugehörigen Promotor in B-Zell-Lymphomen beschrieben wurde²¹³. Im Hinblick auf die ChIP-Experimente stellten sich auf methodischer Ebene einige zentrale Herausforderungen. So war die Findung eines passenden Antikörpers, der NFAT2 auch unter den gegebenen Bedingungen bindet, eine der großen Hürden. Hier zeigten sich auch Unterschiede im selben Klon (7A6) von verschiedenen Herstellern. Dies lag zum Großteil daran, dass die Epitope einiger verwendeten Antikörper durch die Formaldehyd-Fixierung maskiert wurden. Auch die Bedingungen für das Shearing der Zellen und die Größe der resultierenden DNA-Fragmente mussten optimiert werden. So mussten die Zellen, sowie die enthaltene DNA so fragmentiert werden, dass die resultierenden DNA-Fragmente die optimale Größe von 200-500 bp aufwiesen, zum anderen sollten die gebundenen Proteine nicht zerstört werden. Waren die erhaltenen DNA-Fragmente kleiner oder größer als 200-500 bp, so ließ sich entweder die Bindung von NFAT2 nicht nachweisen, oder es kam zu einer hohen unspezifischen Bindung durch den Kontroll-Antikörper. Weitere Untersuchungen in dieser Richtung sind mittels Electric Mobility Shift Assay (EMSA) oder verschiedener Reporter-Assays möglich, um die Affinität von NFAT2 zum *LCK*-Promotor weiter zu charakterisieren.

4 DISKUSSION

Mittels ChiP-on-Chip oder ChiP-Seq ließen sich auch neue Zielgene von NFAT2 identifizieren, sowie die Wirkung verschiedener Therapeutika testen, welche sich auf die DNA-Methylierung oder Histon-Modifikationen auswirken²¹². Diese epigenetischen Mechanismen wurden als bedeutende Faktoren in der CLL entdeckt und ein direkter Zusammenhang zwischen einem hypomethylierten Promotor und einer erhöhten NFAT2-Expression konnte in der CLL belegt werden^{122,214-220}. Weitere epigenetische Veränderungen des NFAT2-Promotors führten zu einer verringerten Expression²²¹, weshalb hier eine mögliche therapeutische Nutzung von methylierenden/demethylierenden Agenzien gegen NFAT2²²⁰ untersucht werden sollte. Auch eine mögliche Reaktivierung der NFAT2-LCK-Achse, mittels Einbringen von NFAT2 oder LCK durch RNA oder Retroviren in aggressiven CLL-Zellen, könnte neue therapeutische Strategien aufzeigen.

LCK wurde schon früh in CLL-Zellen beschrieben⁷². Die Rolle von LCK im BCR-Signaling wird, wie oben bereits angesprochen, jedoch kontrovers diskutiert. So existieren zum einen Daten, die zeigen, dass LCK das BCR-Signaling verstärkt⁷⁴, zum anderen wurde LCK mit einer Verringerung des BCR-Signaling in Verbindung gebracht⁷⁵. Eine weitere Arbeitsgruppe wiederum demonstrierte, dass LCK keine Auswirkung auf das BCR-Signaling hat¹⁶¹. Die verstärkende Wirkung wurde dabei auf eine veränderte Phosphorylierung verschiedener Faktoren der BCR-Kaskade, sowie die Aktivierung des Raf-MEK-Erk-Signalweg via LCK zurückgeführt⁷⁴. Dal Porto et al zeigten dem gegenüber, dass eine höhere LCK-Expression eine Verringerung des BCR-Signaling in B1-Zellen mit sich bringt. Dabei scheint vor allem die Koexpression von LCK und CD5 wichtig, welche mit einer erhöhten CD5-Phosphorylierung einhergeht, was eine verminderte Ca²⁺-Mobilisation und eine veränderte Phosphorylierung zur Folge hat⁷⁵. Da wir neben der Lokalisation von LCK nahe des BCR (Abb. 20) auch einen erhöhten Ca²⁺-Flux durch LCK/NFAT2-KO (Abb. 31) feststellen konnten, legen unsere Daten einen ähnlichen Mechanismus in CLL-Zellen nahe.

Auch in Hinblick auf die Bedeutung der Koexpression von LCK und CD5 stimmen unsere Daten überein, da wir neben der verringerten LCK-Expression auch eine geringere CD5-Expression in aggressiveren CLL-Zellen detektierten⁴⁰. Zudem wurde CD5 nicht nur als negativer Regulator des BCR-Signaling beschrieben, sondern auch von Friedman et al. als prognostischer Faktor für einen günstigeren Verlauf der CLL gewertet²²². Auch LCK wurde als wichtiger Faktor im BCR-Signaling von CLL-Zellen beschrieben, wobei der prognostische Nutzen aktuell jedoch noch immer debattiert wird, da andere Arbeitsgruppen keine Korrelation von LCK mit dem Verlauf der CLL feststellen konnten^{40,77,78}. Eine Möglichkeit, wie LCK am BCR-Signaling beteiligt ist, besteht in der Phosphorylierung von IKK, AKT und ERK

4 DISKUSSION

durch LCK nach BCR-Stimulation⁷⁷. Hier könnten in weiterführenden Versuchen verschiedene LCK-Inhibitoren²²³ zum Einsatz kommen, um potentielle Auswirkungen auf das BCR-Signaling zu erforschen. Andererseits wäre die Analyse der NFAT2- und LCK-Expression, sowie Aktivierung nach Gabe von BCR-Signaling-Inhibitoren wie Ibrutinib und Idelalisib interessant.

Zuerst wurde in den Tieren mit LCK-KO die Effizienz des LCK-KOs untersucht. Hierbei konnten wir feststellen, dass die Expression von LCK durch den Knockout verloren geht, ebenso konnte der Verlust der LCK-Expression auch durch die Deletion von NFAT2, wie zuvor gezeigt, demonstriert werden^{5,40}. Die residuale Expression von LCK in Tieren mit LCK-KO wurde ebenfalls zuvor beschrieben, stellt jedoch keine Rettung des Genotyps dar⁶³.

Weitere Analysen zeigten, dass der Knockout von NFAT2 und LCK zu einer Verringerung des Überlebens in TCL1-Tieren führt. Die Überlebenskurven sind jedoch nicht eindeutig zu bewerten, da alle Kohorten mit einem LCK-KO eine verringerte Lebenszeit aufwiesen, auch ohne das TCL1-Transgen (vgl. Abb.23). Weitere Untersuchungen deckten auf, dass diese Tiere eine opportunistische Infektion mit *Pneumocystis jirovecii* erleiden, was zu einer Pneumonie der Tiere führt (die Feststellung der Erreger erfolgte durch den tierärztlichen Dienst). Durch die Beeinträchtigung des Immunsystems mittels des Keimbahn-knockouts von LCK verläuft diese Infektion tödlich. Die hier erzielten Ergebnisse müssen daher mit einer gewissen Vorsicht betrachtet werden, da die Auswirkungen der CLL auf das Überleben durch die Infektion maskiert wurden. Während in vorhergehenden Studien keine Auswirkungen des LCK-KO auf das Überleben festgestellt wurden⁶³, konnten wir dies hier durch die in diesen Tieren auftretende Pneumonie nicht bestätigen. Eine Möglichkeit dieses Problem zu beheben, bestünde in der Gabe des Antibiotikums Cotrimoxazol mittels Trinkwasser in allen Kohorten, um die Infektion in den LCK-KO Tieren zu verhindern. Eine weitere Möglichkeit besteht auch im Wechsel der Tierhaltung oder der Transplantation der CLL-Zellen aus den TCL-Kohorten mit und ohne LCK-KO in **NOD Scid Gamma** (NSG)-Mäuse. Bei diesen Lösungen würde jedoch das Problem bestehen bleiben, dass durch den Keimbahn-knockout von LCK auch andere Zellen als B-Zellen betroffen wären. Dies ließe sich nur mithilfe einer neuen Mauslinie lösen, welche einen B-Zell-spezifischen, z.B. CD19-vermittelten, LCK-KO durch das Cre-flox-System oder CRISPR-Cas9 aufweist.

Trotz der Pneumonie kann man eine CLL in den Tieren beobachten, was unter anderem die Splenomegalie sowie die Zunahme der CLL-Zellen zeigt (siehe Abb.23-25). Hierbei kommt es zu einem recht schnellen Anstieg der CLL-Zellen in TCL1-Tieren mit LCK-KO oder

4 DISKUSSION

NFAT2-KO und LCK-KO verglichen mit herkömmlichen TCL1-Tieren (vergl. Abb. 23B und Märklin et al.^{5,40}). Es fällt jedoch auf, dass eine verringerte Gesamtanzahl an CLL-Zellen verglichen mit herkömmlichen TCL1-Tieren oder TCL1 NFAT2-KO-Tieren vorliegt, was für eine mögliche Rolle von LCK in der B-Zell-Entwicklung spricht (vergleiche Abb. 23B und Märklin et al.^{5,40}). Dies weicht von den Ergebnissen von Ulivieri et al. ab, die zeigten, dass es keinen Unterschied in der B-Zell-Entwicklung zwischen LCK-defizienten und Wildtyp-Mäusen gibt⁷⁴. Allerdings wurden in dieser Studie nur peritoneale B-Zellen untersucht. Zum Zeitpunkt 3 Monate konnten wir in den verschiedenen Organen (Blut, Milz und Knochenmark) zwischen herkömmlichen TCL1-Tieren und TCL1 LCK-KO-Tieren, was den prozentualen Anteil der CLL-Zellen betrifft, jedoch auch keinen Unterschied feststellen. Die geringere Gesamtanzahl der B-Zellen durch den LCK-KO wurde parallel zu unseren Ergebnissen allerdings auch bei Dal Porto et al. beschrieben⁷⁵.

Eine weitere mögliche Erklärung für die geringere Anzahl an CLL-Zellen kann auch darin liegen, dass sich der Keimbahn-knockout von LCK auch auf andere Zellen auswirkt. Alle Tiere mit LCK-KO haben unter anderem nur noch eine sehr geringe Anzahl an T-Zellen, da LCK ein essentieller Faktor in der Entwicklung von T-Zellen ist⁶³. So ist LCK nicht nur an der Aktivierung von T-Zellen beteiligt, sondern auch an jeder Phase in der Entwicklung der T-Zellen^{62,159,224-226}. Da T-Zellen wichtige Signale für B-Zellen und deren Entwicklung liefern, liegt die Vermutung nahe, dass sich Veränderungen des T-Zell-Kompartiments auf B-Zellen und dadurch auch CLL-Zellen auswirkt²²⁷. So konnte in den Keimzentren der Lymphknoten ein T-Zell-abhängiger Mechanismus belegt werden. Dort ist Interleukin 21 (IL-21), welches von follikulären T-Helfer-Zellen sezerniert wird, für einen korrekten Klassenwechsel von Antikörpern und das Überleben der B-Zellen essentiell. Auch die Differenzierung und Proliferation, ebenso wie die Entwicklung von B-Zellen mittels IL-21 gesteuert und über **B Cell Lymphoma 6** (BCL-6) in den B-Zellen vermittelt wird²²⁷⁻²²⁹. Neben der T-Zellaktivität, die auch gesunde B-Zellen betrifft, spielen vor allem die Tregs in der CLL eine wichtige Rolle²³⁰. Einige Studien konnten eine höhere Anzahl an Tregs in CLL-Patienten feststellen, so dass ein möglicher prognostischer Nutzen vorgeschlagen wurde²³¹⁻²³³. Des Weiteren lagen Tregs in einem TCL1-Transplant-Modell in einem aktivierten Status vor, die CLL-Zellen durch ihre stark immunsupprimierenden Eigenschaften vor zytotoxischen T-Zellen schützen²³⁰. Somit sind wesentliche Faktoren, die sich für CLL-Zellen vorteilhaft auswirken, wie durch T-Zellen bereitgestellte Zytokine, im Falle des LCK-KO drastisch verändert, was eine Bewertung der Ergebnisse erschwert. Auch hier wären Analysen in einem Mausmodell mit einer B-Zell-spezifischen Deletion von LCK von Interesse.

4 DISKUSSION

Die im TCL1-Modell beschriebene Infiltration mit CLL-Zellen¹²⁶ war auch im Fall der verschiedenen Knockouts mittels Histologie feststellbar (siehe Abb. 26). Es zeigte sich zudem, dass die Deletion von NFAT2 und LCK schon im Alter von fünf Monaten zu einer verstärkten Infiltration mit CLL-Zellen in die Milz mit Splenomegalie führte (vgl. Abb. 24 und 26). Während in TCL1-Tieren mit NFAT2-KO mit sieben Monaten eine Transformation der CLL-Zellen feststellbar war⁴⁰, konnte dies hier für das Alter von fünf Monaten noch nicht eindeutig gezeigt werden, auch wenn Hinweise darauf vorhanden waren. Dass der Verlust von NFAT2 und LCK zu einer Transformation der CLL führt, konnte auch in CLL-Patienten mit einer Richter-Transformation demonstriert werden⁴⁰.

Mittels Durchflusszytometrie konnten wir CLL-Zellen außer in der der Milz auch im Blut und im Knochenmark feststellen (vgl. Abb. 25). Die CLL-Zellen zeigten hier die typische Expression von CD5²³⁴. Allerdings ließen sich keine Unterschiede zwischen dem Anteil an CLL-Zellen aus herkömmlichen TCL1-Mäusen und TCL1-Tieren mit LCK-KO nachweisen. Die Deletion von NFAT2 auf der anderen Seite zeigte sowohl allein, als auch in Kombination mit dem LCK-KO eine Erhöhung des CLL-Zell-Anteils. Durch die zuvor erwähnten Komplikationen mit dem LCK-KO sind diese Ergebnisse nicht eindeutig zu bewerten. Möglich ist jedoch, dass NFAT2 über einen nicht nur durch LCK-vermittelten Mechanismus Einfluss auf die Dynamik der CLL nimmt.

Aufgrund der von uns zuvor festgestellten Rolle von NFAT2 für den Zellzyklus und die Apoptose der CLL-Zellen, wollten wir weiter untersuchen, ob durch den Verlust von LCK ebenfalls eine Änderung in dem Zellzyklus oder der Apoptoserate auftritt (vgl. Abb. 27 und 28). Im Blut und in der Milz konnten wir in herkömmlichen TCL1-Tieren eine vermehrte Anzahl der CLL-Zellen in der G2-/M-Phase vorfinden, während die Zellen in der S-Phase vermindert waren. Die Deletion von NFAT2 und LCK führte dagegen zu einer verringerten Anzahl an CLL-Zellen in der G2-/M-Phase und zu einer erhöhten Anzahl der CLL-Zellen, die in die S-Phase eintraten. Eine mögliche Interpretation ist hierbei, dass NFAT2 und LCK den Zellzyklus negativ beeinflussen und ihre Deletion diese Regulation aufhebt, wodurch der Zellzyklus beschleunigt wird, was sich mit vorangegangenen Ergebnissen unsere Arbeitsgruppe decken würde⁵. Die Ergebnisse wiesen hierbei allerdings keinen statistisch signifikanten Unterschied auf. Zudem ist über die Zellzyklusregulation von NFAT2 sehr wenig bekannt.

Des Weiteren wollten wir die Auswirkungen der verschiedenen Knockouts auf die Apoptose untersuchen. Hierbei wurde zuvor in unserer Arbeitsgruppe eine erhöhte Apoptoserate im

4 DISKUSSION

Blut und im Knochenmark von NFAT2-defizienten TCL1-Tieren gezeigt. Eine erhöhte Apoptoserate deutete sich auch in den CLL-Zellen aus TCL1-Tieren mit den verschiedenen Knockouts im Vergleich zu herkömmlichen TCL1-Tieren an. Jedoch waren hier nur die Apoptoseraten im Blut und im Knochenmark der TCL1 NFAT2-KO LCK-KO-Kohorte signifikant höher als in herkömmlichen TCL1-Tieren. Die Rolle von LCK in der Apoptose ist zudem umstritten, da es Ergebnisse gibt, die zeigen, dass der Knock-down von LCK keine Apoptose auslöst¹⁶². Auf der anderen Seite gibt es Untersuchungen, die zeigen, dass durch Inhibition von LCK eine erhöhte Glucocorticoid-Sensitivität und Apoptose resultiert⁸⁷. Allerdings konnten wir durch die hohen Apoptoseraten auch nicht die zuvor *in vivo* beschriebene BCL-2 und BAX-vermittelte Apoptoseresistenz²³⁵⁻²³⁷ der CLL-Zellen zeigen. Bei dieser Apoptoseresistenz der CLL-Zellen *in vivo* ist wiederum das Microenvironment sowie „*nurse-like*“-Zellen und eine verminderte CD95-Expression von Bedeutung²³⁸⁻²⁴².

Unsere Ergebnisse lassen hingegen nicht den Rückschluss zu, dass LCK eine Rolle im Zellzyklus oder der Apoptose spielt. Aufgrund der nicht eindeutigen Ergebnisse und der Rolle der durch den LCK-KO fehlenden T-Zellen in der Entwicklung von B1- und CLL-Zellen²²⁷⁻²³³, besteht auch die Möglichkeit, dass der Verlust der LCK-Expression kein initiales sondern ein späteres Ereignis in der CLL darstellt. Hierzu sind weitere Untersuchungen notwendig. Eine *In-vitro*-Kultivierung der CLL-Zellen aus den verschiedenen Kohorten bietet eine alternative Untersuchungsmöglichkeit, um die Zellen unabhängig von unterschiedlichen Gegebenheiten des Microenvironments der Mausmodelle zu untersuchen. Zusätzlich könnten hierzu aus TCL1-Mäusen mit und ohne den entsprechenden Knockout CLL-Zellen entnommen werden und in NSG-Mäuse transplantiert werden (wie in Märklin et al. beschrieben⁴⁰). Um ein eindeutigeres Bild bezüglich der Infiltration und Dynamik der CLL-Zellen durch den Verlust von LCK zu erhalten, sind weitere Analysen, zum Beispiel in einem Mausmodell mit einer B-Zell-spezifischen Deletion von LCK oder in humanen CLL-Patienten notwendig. Um den prognostischen Nutzen der Analysen zu steigern, wäre eine Korrelation mit ZAP70 und CD38 oder dem IGHV-Status spannend.

Die wichtige Rolle von LCK in der Anergie von CLL-Zellen konnte in dieser Arbeit demonstriert und untermauert werden. Die Auswirkungen von LCK auf die Anergie wurden zuerst über die *Prdm1*-Expression untersucht (Abb. 29). So wurde eine verringerte *Prdm1*-Expression zuvor als Marker für anerge CLL-Zellen identifiziert³⁹. Da *Prdm1* in der Differenzierung von B-Zellen eine wichtige Rolle spielt, ist diese Differenzierung in anergen CLL-Zellen beeinträchtigt. Die Rolle von *Prdm1* in der Anergie und der zugrundeliegende Mechanismus sind jedoch nicht vollständig geklärt. Ein möglicher Erklärungsansatz besteht

4 DISKUSSION

in einem vermuteten Zusammenhang von *Prdm1* mit BCL-6⁵, einem weiteren wichtigen Faktor in der B-Zell-Entwicklung und der Entwicklung von Lymphomen^{243,244}. So wurde neben der verringerten *Prdm1*-Expression in anergen CLL-Zellen eine höhere BCL-6-Expression festgestellt⁵. Da *Prdm1* via BCL-6 durch die direkte Bindung von BCL-6 an das **BCL-6 Response Element (BRE)** im *Prdm1*-Gen inhibiert wird, ist die negative Korrelation plausibel^{243,245}. Allerdings gibt es auch eine Studie, die eine schlechtere Prognose in CLL-Patienten mit einer erhöhten BCL-6-Expression beschreibt²⁴⁶.

Neben einer geringeren *Prdm1*-Expression wurde auch die verminderte IgM-Expression von anergen CLL-Zellen durch die Deletion von NFAT2 und LCK aufgehoben, was weiter auf einen Verlust der Anergie durch den NFAT2-KO, sowie den LCK-KO hinweist (vgl. Abb. 30). So wurde ein aneργer Phänotyp mit einer reduzierten IgM-Expression korreliert, während ein prognostisch ungünstiger unmutierter IGHV-Status mit einer höheren Expression von IgM in Verbindung gebracht wurde^{37,148}. Zusammenhänge zwischen der LCK und IgM konnten in Hinblick auf die Sekretion schon gezeigt werden. So wurde eine erhöhte IgM-Sekretion bei Molina et al. und Dal Porto et al. in gesunden B-Zellen nach LCK-KO festgestellt^{63,75}. Eine Begründung der reduzierten Oberflächenexpression von IgM im LCK-KO liegt möglicherweise in einem Mechanismus, der kürzlich entdeckt wurde. Hierbei wurde allerdings ebenfalls nur die verminderte Sekretion von IgM durch einen LCK vermittelten Mechanismus beschrieben²⁴⁷. Es besteht die Möglichkeit, dass dieser Mechanismus auch für die verringerte IgM-Oberflächenexpression verantwortlich ist. Dies würde auch eine Erklärung für die geringe IgM-Expression in anergen CLL-Zellen bieten, da diese Zellen unseren Ergebnissen nach auch eine höhere LCK-Expression aufweisen. Da die höhere LCK-Expression von uns mit einer höheren NFAT2-Expression korreliert wurde^{5,40,212}, ist damit auch eine mögliche Verbindung der NFAT2-Expression mit einer verringerten IgM-Expression begründbar.

Auch eine erhöhte Ca²⁺-Mobilisation wurde durch die Deletion von LCK ausgelöst (siehe Abb. 31). Da eine verringerte Ca²⁺-Mobilisation mit der Anergie verbunden ist^{37,40}, zeigen diese Ergebnisse ebenfalls einen Verlust der Anergie durch den Verlust von LCK. Dass es in CLL-Patienten einen Unterschied zwischen verschiedenen Subgruppen und dem BCR-vermittelten Ca²⁺-Einstrom gibt, wurde von Hivroz et al. schon 1988 entdeckt²⁴⁸. So fand deren Studie zwei Patienten-Subgruppen, die eine hohe Ca²⁺-Mobilisation aufwiesen, jedoch eine unterschiedliche CLL-Zell-Proliferation zeigten, und eine Subgruppe, in der keinerlei Ca²⁺-Mobilisation nach BCR-Stimulation nachweisbar war. Spätere Untersuchungen konnten eine negative Korrelation der Ca²⁺-Mobilisation mit weiteren prognostischen

4 DISKUSSION

Faktoren wie CD38, ZAP70 und IGHV-Status und der Aktivierung des BCR-Signalings feststellen^{29,37,148,249}. Diese Ergebnisse decken sich mit unseren Daten, die einen milderen Verlauf der CLL mit der Anergie der CLL-Zellen verbinden. Außerdem zeigen unsere Ergebnisse, dass die Anergie mit einer hohen NFAT2- und LCK-Expression einhergeht.

Weitere Korrelationen der Anergienmerkmale (verminderte IgM- und Prdem1-Expression sowie verringerte Ca²⁺-Mobilisation) mit prognostischen Markern wie CD38, ZAP70 und IGHV-Status sowie Rai- oder Binet-Stadium wären hier von Interesse.

5 ANHANG

5.1 Nomenklatur

Die Nomenklatur der Gene und Proteine erfolgte nach dem HUGO Gene Nomenclature Committee.

Die Nomenklatur der *Lymphocyte Cell-specific Protein-tyrosine Kinase* ist wie folgt:

	Gen	Protein
murin	<i>Lck</i>	LCK
human	<i>LCK</i>	LCK

5.2 Abkürzungsverzeichnis

AK - Antikörper	BRE - <i>Bcl6 response element</i>
AKT - Proteinkinase B	BTK - Bruton's Tyrosinkinase
ALL - Akute lymphatische Leukämie	B-Zellen - <i>bone marrow-derived</i>
AML - Akute myeloische Leukämie	Ca ²⁺ - Calciumion
AP1 - <i>activator protein 1</i>	CaM - Calmodulin
ATM - Ataxia teleangiectatica-mutierten Gen	CaMKK - <i>Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase</i>
B1P - B1-Progenitoren	CBL - <i>Casitas B-lineage lymphoma</i>
BAX - <i>BCL2-associated X protein</i>	CD - <i>cluster of differentiation</i>
BCL-2 - <i>B-cell lymphoma 2 protein</i>	CD79A - immunoglobulin-associated alpha
BCL-6 - <i>B-cell lymphoma 6 protein</i>	CK1 - Casein Kinase 1
BCR - B-Zell-Rezeptor	CLL – Chronische lymphatische Leukämie
Blimp1 - <i>B lymphocyte-induced maturation protein-1</i>	CLP - gemeinsamen lymphoiden Progenitoren (<i>common lymphoid progenitors</i>)
BLNK - <i>B-cell linker protein</i>	CML - Chronische myeloische Leukämie
BrdU – Bromdesoxyuridin	

5 ANHANG

5.2 Abkürzungsverzeichnis

C-MYC - <i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>	GC - Keimzentren-B-Zellen (<i>germinal center</i>)
COX2 - Cyclooxygenase-2	GRAIL - <i>Ring finger protein 128</i>
Cre - Zyklische Rekombinase	GSK3 - Glykogensynthase Kinase 3
CREB - <i>cAMP responsive element binding protein 1</i>	H & E – Hämatoxylin & Eosin
CTLA-4 - <i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>	HCV - Hepatitis C Virus
DAG - Diacylglycerin	HEL - <i>hen egg lysozyme</i>
DC - Dendritischen Zellen	HL - Hodgkin-Lymphome
DLBCL - Diffus-großzelliges B-Zell NHL	HSC - hämatopoetischen Stammzellen (<i>hematopoietic stem cells</i>)
DNA - Desoxiribonukleinsäure	i.p. – intraperitoneal
D-Segment – <i>diversifying</i> Segment	Ig _H L – leichte Kette der Immunglobuline
DT40 B-Zellen – B-Zelllinie aus dem Huhn	Ig _H V - schweren Kette der Immunglobuline
EBV - Epstein-Barr-Virus	IL-2 - Interleukin 2
Egr2 - <i>Early growth response 2</i>	IL-21 – Interleukin 21
EMT - epitheliale-mesenchymale Transition	IP3 - Inositoltriphosphat
ER - endoplasmatischen Retikulum	ITAM - Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv (<i>tyrosine-based activation motif</i>)
ERK - (<i>MAPK</i>) <i>mitogen-activated protein kinase</i>	IVC - <i>individually ventilated cages</i>
Fc.- <i>fragment crystallisable</i>	J-Segment – <i>joining</i> Segment
FO - Follikuläre B-Zellen	JUN - <i>jun proto-oncogene</i>
FOS - <i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>	KO – Knockout
	LCK - <i>lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>

5 ANHANG

5.2 Abkürzungsverzeichnis

loxP - <i>locus of crossing over [x] of P1 recombinase</i>	pDCs - plasmazytoide dendritische Zellen
LPS - Lipopolysaccharide	PDK1 - <i>Phosphoinositide-dependent kinase-1</i>
LYN - <i>Lck/Yes novel tyrosine kinase</i>	PFS – progressionsfreie Überleben
MAPK- <i>mitogen-activated protein kinase</i>	PI3K - Phosphoinositid-3-Kinase
M-CLL – mutierte Chronische lymphatische Leukämie	PIP2 - Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
mRNA - <i>messenger RNA</i>	PIP3 - Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat
mTOR - <i>mechanistic target of rapamycin</i>	PKC β - Protein Kinase C β
MZ - Marginalzonen B-Zellen	PLC γ 2 - Phospholipase C γ 2
MZL - Marginalzonen-B-Zell-Lymphom	Prdm1 - <i>PR domain containing 1</i>
NFAT - <i>Nuclear factor of activated T cells</i>	qRT-PCR – quantitative reverse Transkriptase PCR
NF κ B - <i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells</i>	RBE - <i>recombinase binding elements</i>
NHL - Non-Hodgkin-Lymphome	RHD - <i>Rel-homology domain</i>
NHR - <i>NFAT homology region</i>	RhoA - <i>ras homolog family member A</i>
NK - Natürliche Killerzellen	Ring - <i>Really Interesting New Gene</i>
NLS - nukleäre Lokationssequenz	RNA - Ribonukleinsäure
ORAI - <i>calcium release-activated calcium modulator</i>	RT - Raumtemperatur
OS - Gesamtüberleben (<i>overall survival</i>)	SCID - schweren kombinierten Immundefekt (<i>severe combined immunodeficiency</i>)
OX40 Ligand - <i>tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4 (TNFSF4)</i>	Ser - Serin
PBMC - Peripheral blood mononuclear cell	SLC - Surrogat leichte Kette (<i>surrogate light chain</i>)
PBS – <i>Phosphate-buffered Saline</i>	
PCR - Polymerase-Kettenreaktion	

5 ANHANG

5.3 Abbildungsverzeichnis

SLE - Lupus erythematoses	TLR – <i>toll-like receptor</i>
SPF - spezifiziert pathogenfrei	TNF - <i>tumor necrosis factor</i>
SR - Serin-Prolin reiche Motive (serine-prolin regions)	TNFSF13 - <i>Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13</i>
SRR - Serin-reiche Motive(<i>serine-rich regions</i>)	TP53 - Tumorsuppressors 53
ssRNA - <i>single strand RNA</i>	T _{reg} - regulatorischen T-Zellen
STIM - <i>stromal interaction molecule</i>	Tyr - Tyrosin
SV40 T-Antigen - <i>Simian Vacuolating Virus 40 T Antigen</i>	Ube2h - Ubiquitin-konjugierende Enzym E2 H
SYK - <i>Spleen tyrosine kinase</i>	U-CLL – unmutierte Chronische lymphatische Leukämie
TAD - Transaktivierungsdomäne	VAV - <i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
T-ALL - Akuten Lymphatischen T-Zell Leukämie	V-Segment – <i>variable</i> Segment
TCL1 - <i>T cell lymphoma breakpoint 1</i> Onkogen	WAS - Wiskott-Aldrich-Syndrom
TCR - T-Zellrezeptors	WBC – <i>White blood count</i>
Th - Threonin	XLA - Bruton-Syndrom (<i>X-linked agammaglobulinemia</i>)
TKI - Tyrosinkinase-Inhibitoren	ZAP70 - <i>ζ-chain-associated protein kinase</i>
	70

5.3 Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1: B-Zell-Entwicklung</i>	- 14 -
<i>Abb. 2: B-Zell-Rezeptoraktivierung</i>	- 16 -
<i>Abb. 3: B-Zell-Anergie</i>	- 17 -
<i>Abb. 4: Aufbau der NFAT-Transkriptionsfaktoren</i>	- 20 -
<i>Abb. 5: NFAT-Signaling in B-Zellen</i>	- 22 -
<i>Abb. 6: Aufbau der Kinase LCK</i>	- 24 -
<i>Abb. 7: LCK-Signaling in T-Zellen</i>	- 26 -

<i>Abb. 8: Anzahl der CLL-Neuerkrankungen in Deutschland.....</i>	<i>- 29 -</i>
<i>Abb. 9: Eμ-TCL1-Modell mit konditionellem NFAT2-KO</i>	<i>- 33 -</i>
<i>Abb. 10: Eμ-TCL1-Modell mit konventionellem LCK-KO.....</i>	<i>- 33 -</i>
<i>Abb. 11: Darstellung der verwendeten Knockouts auf genetischer Ebene</i>	<i>- 34 -</i>
<i>Abb. 12: Veränderte Expression von Anergie-Genen</i>	<i>- 62 -</i>
<i>Abb. 13: Expression von Richter-Genen im TCL1-Modell.....</i>	<i>- 63 -</i>
<i>Abb. 14: Veränderte Expression von Chemokin-Rezeptoren im TCL1-Modell</i>	<i>- 65 -</i>
<i>Abb. 15: Effekt des NFAT2-KO auf NFAT1.....</i>	<i>- 66 -</i>
<i>Abb. 16: Oberflächenexpression von MHC I im TCL1-Modell.....</i>	<i>- 67 -</i>
<i>Abb. 17: Nachweis von LCK als direktes Zielgen von NFAT2.....</i>	<i>- 68 -</i>
<i>Abb. 18: Schematische Darstellung der Duolink-Analyse</i>	<i>- 69 -</i>
<i>Abb. 19: LYN und LCK sind an der Zellmembran von CLL-Zellen lokalisiert.....</i>	<i>- 70 -</i>
<i>Abb. 20: LCK interagiert mit dem BCR in CLL-Zellen</i>	<i>- 71 -</i>
<i>Abb. 21: Kreuzungsschema des konventionellen LCK Knock-outs im Eμ-TCL1 Modell... -</i>	<i>73 -</i>
<i>Abb. 22: Nachweis des LCK-Knockout im TCL1 LCK-KO NFAT2-KO-Modell.....</i>	<i>- 73 -</i>
<i>Abb. 23: Der Verlust von LCK verringert das Überleben und sorgt für eine Vermehrung der CLL-Zellen.....</i>	<i>- 74 -</i>
<i>Abb. 24: Der Verlust von LCK führt zu einer Splenomegalie.....</i>	<i>- 76 -</i>
<i>Abb. 25: Anteil der CLL-Zellen in verschiedenen Organen</i>	<i>- 78 -</i>
<i>Abb. 26: Histologische Analyse der Milzen</i>	<i>- 79 -</i>
<i>Abb. 27: Unterschiede im Zellzyklus der verschiedenen TCL1-Kohorten.....</i>	<i>- 81 -</i>
<i>Abb. 28: Erhöhte Apoptoseraten in CLL-Zellen mit Knockouts</i>	<i>- 82 -</i>
<i>Abb. 29: Verstärkte Prdm1-Expression in TCL1-Tieren mit LCK-KO und NFAT2-KO</i>	<i>- 83 -</i>
<i>Abb. 30: Vermehrte Oberflächenexpression von IgM durch LCK und NFAT2-KO in TCL1-Tieren.....</i>	<i>- 84 -</i>
<i>Abb. 31: Erhöhte Ca²⁺-Mobilisation von TCL1 Zellen mit Knockouts.....</i>	<i>- 85 -</i>

5.4 Tabellenverzeichnis

<i>Tab. 1: Zusammensetzung der PCR-Mixe und verwendete PCR-Programme.....</i>	<i>- 44 -</i>
<i>Tab. 2: Zusammensetzung des DNA- und Primer-Mix und verwendetes RT-PCR-Programm.</i>	<i>- 48 -</i>
<i>Tab. 3: Verwendeter Proteinkonzentration-Standard</i>	<i>- 49 -</i>
<i>Tab. 4: Pipettierschema der Proteinproben für die SDS-Page.....</i>	<i>- 50 -</i>
<i>Tab. 5: Verwendetes Blotting-Programm.....</i>	<i>- 50 -</i>
<i>Tab. 6: Zusammensetzung der Antikörperlösungen für Western Blot</i>	<i>- 51 -</i>

Tab. 7: Verdünnung der Primärantikörper für Western Blot	- 51 -
Tab. 8: Verdünnung der Sekundärantikörper für Western Blot.....	- 51 -
Tab. 9: Verdünnung der Primärantikörper für Immunfluoreszenz-Färbung	- 52 -
Tab. 10: Kombination und Verdünnung der Primärantikörper für Duolink-Experimente ...	- 53 -
Tab. 11: Zusammensetzung der ChIP-Reaktionen	- 55 -
Tab. 12: Zusammensetzung des DNA- und Primer-Mix und verwendetes RT-PCR-Programm	- 56 -
Tab. 13: Zusammensetzung der Antikörperlösung für die MHC-Oberflächenfärbung	- 57 -
Tab. 14: Zusammensetzung der Antikörperlösung für die Färbung der CLL-Zellen	- 57 -
Tab. 15: Zusammensetzung der Antikörperlösungen für das BrdU-Assay.....	- 58 -
Tab. 16: Zusammensetzung der Antikörperlösungen für das Annexin-Assay	- 59 -
Tab. 17: Zusammensetzung der Antikörperlösungen für die Messung des Calcium-Einstroms	- 59 -
Tab. 18: Färbeschema für die histologischen Analysen.....	- 60 -

5.5 Literaturverzeichnis

- 1 Glick, B., Chang, T. S. & Jaap, R. G. The Bursa of Fabricius and Antibody Production. *Poultry Science* **35**, 224-225, doi:10.3382/ps.0350224 (1956).
- 2 Fagraeus, A. Antibody Production in Relation to the Development of Plasma Cells: In vivo and In vitro Experiments. (1948).
- 3 Burnet, F. M. A Modification of Jerne's Theory of Antibody Production using the Concept of Clonal Selection. *Australian J. Sci.* **20**, 67-69 (1957).
- 4 Burnet, F. M. A modification of jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **26**, 119-121, doi:10.3322/canjclin.26.2.119 (1976).
- 5 Märklin, M. *Analyse des Transkriptionsfaktors NFAT2 in der Pathogenese der CLL*, Eberhard Karls Universität Tübingen, (2015).
- 6 Brack, C., Hirama, M., Lenhard-Schuller, R. & Tonegawa, S. A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell* **15**, 1-14 (1978).
- 7 Rothstein, T. L., Herzenberg, L. A., Holodick, N. E. & Ghosn, E. B-1 Cell Development and Function. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1362**, v-vi, doi:doi:10.1111/nyas.12949 (2015).
- 8 Baumgarth, N. A Hard(y) Look at B-1 Cell Development and Function. *J Immunol* **199**, 3387-3394, doi:10.4049/jimmunol.1700943 (2017).
- 9 LeBien, T. W. & Tedder, T. F. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* **112**, 1570-1580, doi:10.1182/blood-2008-02-078071 (2008).
- 10 Hardy, R. R. B-1 B cell development. *J Immunol* **177**, 2749-2754 (2006).
- 11 Montecino-Rodriguez, E., Leathers, H. & Dorshkind, K. Identification of a B-1 B cell-specified progenitor. *Nat Immunol* **7**, 293-301, doi:10.1038/ni1301 (2006).
- 12 Esplin, B. L., Welner, R. S., Zhang, Q., Borghesi, L. A. & Kincade, P. W. A differentiation pathway for B1 cells in adult bone marrow. *PNAS* **106**, 5773-5778, doi:10.1073/pnas.0811632106 (2009).
- 13 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. *PNAS* **108**, 2879-2884, doi:10.1073/pnas.1019764108 (2011).

-
- 14 Montecino-Rodriguez, E. & Dorshkind, K. B-1 B cell development in the fetus and adult. *Immunity* **36**, 13-21, doi:10.1016/j.immuni.2011.11.017 (2012).
- 15 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).
- 16 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, doi:10.1038/343760a0 (1990).
- 17 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. *Current biology : CB* **3**, 645-657 (1993).
- 18 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).
- 19 Packard, T. A. & Cambier, J. C. B lymphocyte antigen receptor signaling: initiation, amplification, and regulation. *F1000prime reports* **5**, 40, doi:10.12703/p5-40 (2013).
- 20 Porta, C., Paglino, C. & Mosca, A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Frontiers in oncology* **4**, 64, doi:10.3389/fonc.2014.00064 (2014).
- 21 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).
- 22 Hendriks, R. W., Yuvaraj, S. & Kil, L. P. Targeting Bruton's tyrosine kinase in B cell malignancies. *Nat Rev Cancer* **14**, 219-232, doi:10.1038/nrc3702 (2014).
- 23 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, doi:10.1074/jbc.M103675200 (2001).
- 24 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).
- 25 Aiba, Y. *et al.* Activation of RasGRP3 by phosphorylation of Thr-133 is required for B cell receptor-mediated Ras activation. *PNAS* **101**, 16612-16617, doi:10.1073/pnas.0407468101 (2004).
- 26 Muller, M. R. & Rao, A. NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age. *Nat Rev Immunol* **10**, 645-656, doi:10.1038/nri2818 (2010).
- 27 Nossal, G. J. Molecular and cellular aspects of immunologic tolerance. *Eur J Biochem* **202**, 729-737 (1991).
- 28 Yarkoni, Y., Getahun, A. & Cambier, J. C. Molecular underpinning of B-cell anergy. *Immunol Rev* **237**, 249-263, doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00936.x (2010).
- 29 Duhren-von Minden, M. *et al.* Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling. *Nature* **489**, 309-312, doi:10.1038/nature11309 (2012).
- 30 Chiorazzi, N. & Efremov, D. G. Chronic lymphocytic leukemia: a tale of one or two signals? *Cell research* **23**, 182-185, doi:10.1038/cr.2012.152 (2013).
- 31 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, doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141018 (2003).
- 32 Woyach, J. A., Johnson, A. J. & Byrd, J. C. The B-cell receptor signaling pathway as a therapeutic target in CLL. *Blood* **120**, 1175-1184, doi:10.1182/blood-2012-02-362624 (2012).
- 33 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, doi:10.1182/blood-2011-11-393694 (2012).

- 34 Fais, F. *et al.* Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *The Journal of clinical investigation* **102**, 1515-1525, doi:10.1172/jci3009 (1998).
- 35 Chiorazzi, N. & Ferrarini, M. Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. *Blood* **117**, 1781-1791, doi:10.1182/blood-2010-07-155663 (2011).
- 36 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, doi:10.1182/blood-2007-09-111344 (2008).
- 37 Apollonio, B. *et al.* Targeting B-cell anergy in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **121**, 3879-3888, s3871-3878, doi:10.1182/blood-2012-12-474718 (2013).
- 38 Le Roy, C. *et al.* The degree of BCR and NFAT activation predicts clinical outcomes in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **120**, 356-365, doi:10.1182/blood-2011-12-397158 (2012).
- 39 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, doi:10.1182/blood-2013-11-539049 (2014).
- 40 Märklin, M. *et al.* NFAT2 is a critical regulator of the anergic phenotype in chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Commun* **8**, 755, doi:10.1038/s41467-017-00830-y (2017).
- 41 Shaw, J. P. *et al.* Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science* **241**, 202-205 (1988).
- 42 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).
- 43 Hardison, S. E. & Brown, G. D. C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. *Nat Immunol* **13**, 817-822, doi:10.1038/ni.2369 (2012).
- 44 Herbst, S. *et al.* Phagocytosis-dependent activation of a TLR9-BTK-calcineurin-NFAT pathway co-ordinates innate immunity to *Aspergillus fumigatus*. *EMBO molecular medicine* **7**, 240-258, doi:10.15252/emmm.201404556 (2015).
- 45 Hogan, P. G., Chen, L., Nardone, J. & Rao, A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev* **17**, 2205-2232, doi:10.1101/gad.1102703 (2003).
- 46 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, doi:10.1074/jbc.M109.049999 (2009).
- 47 Winslow, M. M., Gallo, E. M., Neilson, J. R. & Crabtree, G. R. The calcineurin phosphatase complex modulates immunogenic B cell responses. *Immunity* **24**, 141-152, doi:10.1016/j.immuni.2005.12.013 (2006).
- 48 Jauliac, S. *et al.* The role of NFAT transcription factors in integrin-mediated carcinoma invasion. *Nature cell biology* **4**, 540-544, doi:10.1038/ncb816 (2002).
- 49 Yoeli-Lerner, M. *et al.* Akt Blocks Breast Cancer Cell Motility and Invasion through the Transcription Factor NFAT. *Molecular Cell* **20**, 539-550, doi:https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.10.033 (2005).
- 50 Lehen'kyi, V., Flourakis, M., Skryma, R. & Prevarskaya, N. TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca(2+)/NFAT-dependent pathways. *Oncogene* **26**, 7380-7385, doi:10.1038/sj.onc.1210545 (2007).
- 51 Flockhart, R. J., Armstrong, J. L., Reynolds, N. J. & Lovat, P. E. NFAT signalling is a novel target of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *British journal of cancer* **101**, 1448-1455, doi:10.1038/sj.bjc.6605277 (2009).
- 52 Buchholz, M. *et al.* Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca²⁺/calcineurin signaling pathway. *Embo j* **25**, 3714-3724, doi:10.1038/sj.emboj.7601246 (2006).

-
- 53 Koenig, A. *et al.* NFAT-induced histone acetylation relay switch promotes c-Myc-dependent growth in pancreatic cancer cells. *Gastroenterology* **138**, 1189-1199.e1181-1182, doi:10.1053/j.gastro.2009.10.045 (2010).
- 54 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. *British journal of haematology* **128**, 333-342, doi:10.1111/j.1365-2141.2004.05313.x (2005).
- 55 Casnellie, J. E., Harrison, M. L., Hellstrom, K. E. & Krebs, E. G. A lymphoma cell line expressing elevated levels of tyrosine protein kinase activity. *J Biol Chem* **258**, 10738-10742 (1983).
- 56 Voronova, A. F., Buss, J. E., Patschinsky, T., Hunter, T. & Sefton, B. M. Characterization of the protein apparently responsible for the elevated tyrosine protein kinase activity in LSTRA cells. *Mol Cell Biol* **4**, 2705-2713 (1984).
- 57 Burgess, K. E. *et al.* Biochemical identification of a direct physical interaction between the CD4:p56lck and Ti(TcR)/CD3 complexes. *Eur J Immunol* **21**, 1663-1668, doi:10.1002/eji.1830210712 (1991).
- 58 Straus, D. B. & Weiss, A. Genetic evidence for the involvement of the lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor. *Cell* **70**, 585-593, doi:https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90428-F (1992).
- 59 Barber, E. K., Dasgupta, J. D., Schlossman, S. F., Trevillyan, J. M. & Rudd, C. E. The CD4 and CD8 antigens are coupled to a protein-tyrosine kinase (p56lck) that phosphorylates the CD3 complex. *PNAS* **86**, 3277-3281 (1989).
- 60 Rudd, C. E., Trevillyan, J. M., Dasgupta, J. D., Wong, L. L. & Schlossman, S. F. The CD4 receptor is complexed in detergent lysates to a protein-tyrosine kinase (pp58) from human T lymphocytes. *PNAS* **85**, 5190-5194 (1988).
- 61 Zamoyska, R. *et al.* The influence of the src-family kinases, Lck and Fyn, on T cell differentiation, survival and activation. *Immunol Rev* **191**, 107-118 (2003).
- 62 Palacios, E. H. & Weiss, A. Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. *Oncogene* **23**, 7990-8000, doi:10.1038/sj.onc.1208074 (2004).
- 63 Molina, T. J. *et al.* Profound block in thymocyte development in mice lacking p56lck. *Nature* **357**, 161-164, doi:10.1038/357161a0 (1992).
- 64 Killeen, N. & Littman, D. R. Helper T-cell development in the absence of CD4-p56lck association. *Nature* **364**, 729-732, doi:10.1038/364729a0 (1993).
- 65 Zamoyska, R. *et al.* Inability of CD8 alpha' polypeptides to associate with p56lck correlates with impaired function in vitro and lack of expression in vivo. *Nature* **342**, 278-281, doi:10.1038/342278a0 (1989).
- 66 Briese, L. & Willbold, D. Structure determination of human Lck unique and SH3 domains by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *BMC Structural Biology* **3**, 3-3, doi:10.1186/1472-6807-3-3 (2003).
- 67 Sicheri, F. & Kuriyan, J. Structures of Src-family tyrosine kinases. *Current Opinion in Structural Biology* **7**, 777-785, doi:https://doi.org/10.1016/S0959-440X(97)80146-7 (1997).
- 68 Eck, M. J., Atwell, S. K., Shoelson, S. E. & Harrison, S. C. Structure of the regulatory domains of the Src-family tyrosine kinase Lck. *Nature* **368**, 764-769, doi:10.1038/368764a0 (1994).
- 69 Özdener, F., Dangelmaier, C., Ashby, B., Kunapuli, S. P. & Daniel, J. L. Activation of Phospholipase Cy2 by Tyrosine Phosphorylation. *Molecular Pharmacology* **62**, 672-679, doi:10.1124/mol.62.3.672 (2002).
- 70 Rossy, J., Owen, D. M., Williamson, D. J., Yang, Z. & Gaus, K. Conformational states of the kinase Lck regulate clustering in early T cell signaling. *Nat Immunol* **14**, 82, doi:10.1038/ni.2488 <https://www.nature.com/articles/ni.2488#supplementary-information> (2012).

5 ANHANG

5.5 Literaturverzeichnis

- 71 Li, Q., Sun, X., Wu, J., Lin, Z. & Luo, Y. PKD2 interacts with Lck and regulates NFAT activity in T cells. *BMB reports* **42**, 35-40 (2009).
- 72 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).
- 73 Abts, H., Jücker, M., Diehl, V. & Tesch, H. Human chronic lymphocytic leukemia cells regularly express mRNAs of the protooncogenes *lck* and *c-fgr*. *Leukemia Research* **15**, 987-997, doi:10.1016/0145-2126(91)90103-Z (1991).
- 74 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, doi:10.1002/immu.200310019 (2003).
- 75 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, doi:https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.07.018 (2004).
- 76 Francés, R., Tumang, J. R. & Rothstein, T. L. Cutting Edge: 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, doi:10.4049/jimmunol.175.1.27 (2005).
- 77 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. *Molecular cancer research : MCR* **11**, 541-554, doi:10.1158/1541-7786.Mcr-12-0415-t (2013).
- 78 Till, K. J. *et al.* Lck is a relevant target in chronic lymphocytic leukaemia cells whose expression variance is unrelated to disease outcome. *Scientific reports* **7**, 16784, doi:10.1038/s41598-017-17021-w (2017).
- 79 Theofani, E. *et al.* Ectopic Lck expression in CLL demarcates intratumoral subpopulations with aberrant B-cell receptor signaling. *Blood advances* **2**, 877-882, doi:10.1182/bloodadvances.2017015321 (2018).
- 80 Marth, J. D. *et al.* Neoplastic transformation induced by an activated lymphocyte-specific protein tyrosine kinase (pp56lck). *Mol Cell Biol* **8**, 540-550 (1988).
- 81 Majolini, M. B., Boncristiano, M. & Baldari, C. Dysregulation of the Protein Tyrosine Kinase LCK in Lymphoproliferative Disorders and in Other Neoplasias. *Leukemia & lymphoma* **35**, 245-254, doi:10.3109/10428199909145727 (1999).
- 82 Cazzaniga, V. *et al.* LCK over-expression drives STAT5 oncogenic signaling in PAX5 translocated BCP-ALL patients. *Oncotarget* **6**, 1569-1581, doi:10.18632/oncotarget.2807 (2015).
- 83 Sartor, O. *et al.* Selective expression of alternative lck mRNAs in human malignant cell lines. *Mol Cell Biol* **9**, 2983-2988 (1989).
- 84 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 research* **1**, 357-374 (1987).
- 85 Von Knethen, A., Abts, H., Kube, D., Diehl, V. & Tesch, H. Expression of p56lck in B-cell neoplasias. *Leukemia & lymphoma* **26**, 551-562, doi:10.3109/10428199709050891 (1997).
- 86 Cheung, R. K. & Dosch, H. M. The tyrosine kinase lck is critically involved in the growth transformation of human B lymphocytes. *J Biol Chem* **266**, 8667-8670 (1991).
- 87 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, doi:10.1038/cdd.2010.25 (2010).
- 88 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).
- 89 Hodgkin. On some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen. *Medico-chirurgical transactions* **17**, 68-114 (1832).

- 90 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**, 74-78, illust (1950).
- 91 Küppers, R., Re, D., Wolf, J. & Diehl, V. Zellbiologie des Morbus Hodgkin. *Der Onkologe* **6**, 1134-1141, doi:10.1007/s007610070012 (2000).
- 92 Henle, W. & Henle, G. Evidence for an oncogenic potential of the Epstein-Barr virus. *Cancer Res* **33**, 1419-1423 (1973).
- 93 Wolf, J. & Diehl, V. [Hodgkin disease--pathogenesis and therapy]. *Therapeutische Umschau. Revue therapeutique* **53**, 140-146 (1996).
- 94 Vockerodt, M., Cader, F. Z., Shannon-Lowe, C. & Murray, P. Epstein-Barr virus and the origin of Hodgkin lymphoma. *Chinese journal of cancer* **33**, 591-597, doi:10.5732/cjc.014.10193 (2014).
- 95 A Clinical Evaluation of the International Lymphoma Study Group Classification of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Blood* **89**, 3909-3918 (1997).
- 96 Byrd, J. C., Jones, J. J., Woyach, J. A., Johnson, A. J. & Flynn, J. M. Entering the era of targeted therapy for chronic lymphocytic leukemia: impact on the practicing clinician. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **32**, 3039-3047, doi:10.1200/jco.2014.55.8262 (2014).
- 97 Chronische Lymphatische Leukämie (CLL) Leitlinie der DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V. (2017).
- 98 Virchow, R. Weisses blut. *Neue Notizen Gebiete Natur-Heilkunde* **36**, 151-156 (1845).
- 99 Goldin, L. R., Landgren, O., Marti, G. E. & Caporaso, N. E. Familial Aspects of Chronic Lymphocytic Leukemia, Monoclonal B-Cell Lymphocytosis (MBL), and Related Lymphomas. *European journal of clinical & medical oncology* **2**, 119-126 (2010).
- 100 Cerhan, J. R. & Slager, S. L. Familial predisposition and genetic risk factors for lymphoma. *Blood* **126**, 2265-2273, doi:10.1182/blood-2015-04-537498 (2015).
- 101 Garcia-Munoz, R., Galiacho, V. R. & Llorente, L. Immunological aspects in chronic lymphocytic leukemia (CLL) development. *Annals of hematology* **91**, 981-996, doi:10.1007/s00277-012-1460-z (2012).
- 102 Rai, K. R. *et al.* Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **46**, 219-234 (1975).
- 103 Binet, J. L. *et al.* A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* **48**, 198-206 (1981).
- 104 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, doi:10.1182/blood-2007-06-093906 (2008).
- 105 Stilgenbauer, S. Prognostic markers and standard management of chronic lymphocytic leukemia. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program* **2015**, 368-377, doi:10.1182/asheducation-2015.1.368 (2015).
- 106 Eichhorst, B. *et al.* Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* **26 Suppl 5**, v78-84, doi:10.1093/annonc/mdv303 (2015).
- 107 Jain, N. & O'Brien, S. Initial treatment of CLL: integrating biology and functional status. *Blood* **126**, 463-470, doi:10.1182/blood-2015-04-585067 (2015).
- 108 Jain, P. & O'Brien, S. Richter's transformation in chronic lymphocytic leukemia. *Oncology (Williston Park, N.Y.)* **26**, 1146-1152 (2012).
- 109 Swords, R., Bruzzi, J. & Giles, F. Recent advances in the diagnosis and therapy of Richter's syndrome. *Medical oncology (Northwood, London, England)* **24**, 17-32 (2007).

- 110 Dohner, H. *et al.* Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine* **343**, 1910-1916, doi:10.1056/nejm200012283432602 (2000).
- 111 Edelmann, J. *et al.* High-resolution genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia reveals new recurrent genomic alterations. *Blood* **120**, 4783-4794, doi:10.1182/blood-2012-04-423517 (2012).
- 112 Zenz, T., Mertens, D., Kupperts, R., Dohner, H. & Stilgenbauer, S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer* **10**, 37-50, doi:10.1038/nrc2764 (2010).
- 113 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, doi:10.1038/nrm2514 (2008).
- 114 Zenz, T., Benner, A., Dohner, H. & Stilgenbauer, S. Chronic lymphocytic leukemia and treatment resistance in cancer: the role of the p53 pathway. *Cell Cycle* **7**, 3810-3814, doi:10.4161/cc.7.24.7245 (2008).
- 115 Baliakas, P. *et al.* Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* **29**, 329-336, doi:10.1038/leu.2014.196 (2015).
- 116 Zent, C. S. & Burack, W. R. Mutations in chronic lymphocytic leukemia and how they affect therapy choice: focus on NOTCH1, SF3B1, and TP53. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program* **2014**, 119-124, doi:10.1182/asheducation-2014.1.119 (2014).
- 117 Te Raa, G. D. *et al.* The impact of SF3B1 mutations in CLL on the DNA-damage response. *Leukemia* **29**, 1133-1142, doi:10.1038/leu.2014.318 (2015).
- 118 Blaise, R. *et al.* Chromosomal DNA and p53 stability, ubiquitin system and apoptosis in B-CLL lymphocytes. *Leukemia & lymphoma* **42**, 1173-1180, doi:10.3109/10428190109097742 (2001).
- 119 Arruga, F. *et al.* Functional impact of NOTCH1 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* **28**, 1060-1070, doi:10.1038/leu.2013.319 (2014).
- 120 Rossi, D. *et al.* The genetics of Richter syndrome reveals disease heterogeneity and predicts survival after transformation. *Blood* **117**, 3391-3401, doi:10.1182/blood-2010-09-302174 (2011).
- 121 Parikh, S. A., Kay, N. E. & Shanafelt, T. D. How we treat Richter syndrome. *Blood* **123**, 1647-1657, doi:10.1182/blood-2013-11-516229 (2014).
- 122 Oakes, C. C. *et al.* Evolution of DNA methylation is linked to genetic aberrations in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer discovery* **4**, 348-361, doi:10.1158/2159-8290.Cd-13-0349 (2014).
- 123 Zapata, J. M., Krajewska, M., Morse, H. C., 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. *PNAS* **101**, 16600-16605, doi:10.1073/pnas.0407541101 (2004).
- 124 Planelles, L. *et al.* APRIL promotes B-1 cell-associated neoplasm. *Cancer Cell* **6**, 399-408, doi:https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.08.033 (2004).
- 125 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, doi:10.1182/blood-2009-01-198937 (2009).
- 126 Bichi, R. *et al.* Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression. *PNAS* **99**, 6955-6960, doi:10.1073/pnas.102181599 (2002).
- 127 Russo, G. *et al.* Molecular analysis of a t(14;14) translocation in leukemic T-cells of an ataxia telangiectasia patient. *PNAS* **86**, 602-606 (1989).
- 128 Virgilio, L. *et al.* Identification of the TCL1 gene involved in T-cell malignancies. *PNAS* **91**, 12530-12534, doi:10.1073/pnas.91.26.12530 (1994).
- 129 Narducci, M. G. *et al.* The murine Tcl1 oncogene: embryonic and lymphoid cell expression. *Oncogene* **15**, 919, doi:10.1038/sj.onc.1201246 (1997).

- 130 Gaudio, E. *et al.* Tcl1 interacts with Atm and enhances NF-kappaB activation in hematologic malignancies. *Blood* **119**, 180-187, doi:10.1182/blood-2011-08-374561 (2012).
- 131 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).
- 132 Pekarsky, Y. *et al.* Tcl1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer Res* **66**, 11590-11593, doi:10.1158/0008-5472.Can-06-3613 (2006).
- 133 Bresin, A. *et al.* TCL1 transgenic mouse model as a tool for the study of therapeutic targets and microenvironment in human B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cell Death & Disease* **7**, e2071, doi:10.1038/cddis.2015.419 (2016).
- 134 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 Harbor symposia on quantitative biology* **45 Pt 1**, 297-309 (1981).
- 135 Gu, H., Zou, Y. R. & Rajewsky, K. Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *J Immunol* **191**, 7-16 (2013).
- 136 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).
- 137 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, doi:10.1038/37925 (1997).
- 138 Bhattacharyya, S. *et al.* NFATc1 affects mouse splenic B cell function by controlling the calcineurin--NFAT signaling network. *J Exp Med* **208**, 823-839, doi:10.1084/jem.20100945 (2011).
- 139 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).
- 140 Woyach, J. A. Survival of the weak (signalers): anergy in CLL. *Blood* **121**, 3781-3783, doi:10.1182/blood-2013-03-489849 (2013).
- 141 ten Hacken, E. & Burger, J. A. Microenvironment dependency in Chronic Lymphocytic Leukemia: The basis for new targeted therapies. *Pharmacology & therapeutics* **144**, 338-348, doi:10.1016/j.pharmthera.2014.07.003 (2014).
- 142 Burger, J. A. Chemokines and chemokine receptors in chronic lymphocytic leukemia (CLL): from understanding the basics towards therapeutic targeting. *Seminars in cancer biology* **20**, 424-430, doi:10.1016/j.semcancer.2010.09.005 (2010).
- 143 Ten Hacken, E. & Burger, J. A. Microenvironment interactions and B-cell receptor signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia: Implications for disease pathogenesis and treatment. *Biochim Biophys Acta* **1863**, 401-413, doi:10.1016/j.bbamcr.2015.07.009 (2016).
- 144 Quang, C. T. *et al.* The calcineurin/NFAT pathway is activated in diagnostic breast cancer cases and is essential to survival and metastasis of mammary cancer cells. *Cell death & disease* **6**, e1658, doi:10.1038/cddis.2015.14 (2015).
- 145 Yoshihama, S. *et al.* NLRC5/MHC class I transactivator is a target for immune evasion in cancer. *PNAS* **113**, 5999-6004, doi:10.1073/pnas.1602069113 (2016).
- 146 Starling, S. Immune editing shapes the cancer landscape. *Nat Rev Immunol* **17**, 729, doi:10.1038/nri.2017.129 (2017).
- 147 Muise-Helmericks, R. C. & Rosen, N. Identification of a novel repressive element in the proximal Ick promoter. *J Biol Chem* **270**, 27538-27543 (1995).
- 148 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, doi:10.1182/blood-2006-11-056648 (2007).
- 149 Berland, R. & Wortis, H. H. Normal B-1a cell development requires B cell-intrinsic NFATc1 activity. *PNAS* **100**, 13459-13464, doi:10.1073/pnas.2233620100 (2003).

- 150 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, doi:10.1074/jbc.M101072200 (2001).
- 151 Thomas, S., Kumar, R., Preda-Pais, A., Casares, S. & Brumeanu, T. D. A model for antigen-specific T-cell anergy: displacement of CD4-p56(lck) signalosome from the lipid rafts by a soluble, dimeric peptide-MHC class II chimera. *J Immunol* **170**, 5981-5992 (2003).
- 152 Jeon, M. S. *et al.* Essential role of the E3 ubiquitin ligase Cbl-b in T cell anergy induction. *Immunity* **21**, 167-177, doi:10.1016/j.immuni.2004.07.013 (2004).
- 153 Mueller, D. L. E3 ubiquitin ligases as T cell anergy factors. *Nat Immunol* **5**, 883-890, doi:10.1038/ni1106 (2004).
- 154 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).
- 155 Soares, L. *et al.* Two isoforms of otubain 1 regulate T cell anergy via GRAIL. *Nat Immunol* **5**, 45-54, doi:10.1038/ni1017 (2004).
- 156 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, doi:10.1084/jem.20120342 (2012).
- 157 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).
- 158 Nakamura, K., Chijiwa, Y. & Nawata, H. Augmented expression of LCK message directed from the downstream promoter in human colorectal cancer specimens. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* **32a**, 1401-1407 (1996).
- 159 Perlmutter, R. M. *et al.* Structure and expression of lck transcripts in human lymphoid cells. *Journal of cellular biochemistry* **38**, 117-126, doi:10.1002/jcb.240380206 (1988).
- 160 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. *PNAS* **83**, 7400-7404 (1986).
- 161 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).
- 162 Huber, S. *et al.* Sorafenib induces cell death in chronic lymphocytic leukemia by translational downregulation of Mcl-1. *Leukemia* **25**, 838-847, doi:10.1038/leu.2011.2 (2011).
- 163 Naramura, M. *et al.* c-Cbl and Cbl-b regulate T cell responsiveness by promoting ligand-induced TCR down-modulation. *Nat Immunol* **3**, 1192, doi:10.1038/ni855 <https://www.nature.com/articles/ni855#supplementary-information> (2002).
- 164 Qiao, G. *et al.* T-cell receptor-induced NF-kappaB activation is negatively regulated by E3 ubiquitin ligase Cbl-b. *Mol Cell Biol* **28**, 2470-2480, doi:10.1128/mcb.01505-07 (2008).
- 165 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, doi:10.1084/jem.20021686 (2003).
- 166 Kitaura, Y. *et al.* Control of the B cell-intrinsic tolerance programs by ubiquitin ligases Cbl and Cbl-b. *Immunity* **26**, 567-578, doi:10.1016/j.immuni.2007.03.015 (2007).
- 167 Hsiao, H. W. *et al.* Deltex1 is a target of the transcription factor NFAT that promotes T cell anergy. *Immunity* **31**, 72-83, doi:10.1016/j.immuni.2009.04.017 (2009).
- 168 Zhang, Z., Elly, C., Qiu, L., Altman, A. & Liu, Y. C. A direct interaction between the adaptor protein Cbl-b and the kinase zap-70 induces a positive signal in T cells. *Current biology : CB* **9**, 203-206 (1999).
- 169 Soto-Nieves, N. *et al.* Transcriptional complexes formed by NFAT dimers regulate the induction of T cell tolerance. *J Exp Med* **206**, 867-876, doi:10.1084/jem.20082731 (2009).

- 170 Heissmeyer, V. *et al.* Calcineurin imposes T cell unresponsiveness through targeted proteolysis of signaling proteins. *Nat Immunol* **5**, 255-265, doi:10.1038/ni1047 (2004).
- 171 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).
- 172 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).
- 173 Safford, M. *et al.* Egr-2 and Egr-3 are negative regulators of T cell activation. *Nat Immunol* **6**, 472-480, doi:10.1038/ni1193 (2005).
- 174 Collins, S. *et al.* Opposing regulation of T cell function by Egr-1/NAB2 and Egr-2/Egr-3. *Eur J Immunol* **38**, 528-536, doi:10.1002/eji.200737157 (2008).
- 175 Rengarajan, J. *et al.* Sequential involvement of NFAT and Egr transcription factors in FasL regulation. *Immunity* **12**, 293-300 (2000).
- 176 Lazarevic, V. *et al.* The gene encoding early growth response 2, a target of the transcription factor NFAT, is required for the development and maturation of natural killer T cells. *Nat Immunol* **10**, 306, doi:10.1038/ni.1696 <https://www.nature.com/articles/ni.1696#supplementary-information> (2009).
- 177 Li, S. *et al.* Early growth response gene-2 (Egr-2) regulates the development of B and T cells. *PLoS One* **6**, e18498, doi:10.1371/journal.pone.0018498 (2011).
- 178 Gomez-Martin, D., Diaz-Zamudio, M., Galindo-Campos, M. & Alcocer-Varela, J. Early growth response transcription factors and the modulation of immune response: implications towards autoimmunity. *Autoimmunity reviews* **9**, 454-458, doi:10.1016/j.autrev.2009.12.006 (2010).
- 179 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).
- 180 Merrell, K. T. *et al.* Identification of anergic B cells within a wild-type repertoire. *Immunity* **25**, 953-962, doi:10.1016/j.immuni.2006.10.017 (2006).
- 181 Li, S. *et al.* The transcription factors Egr2 and Egr3 are essential for the control of inflammation and antigen-induced proliferation of B and T cells. *Immunity* **37**, 685-696, doi:10.1016/j.immuni.2012.08.001 (2012).
- 182 Rozovski, U. *et al.* Outcomes of Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia and Richter's Transformation After Transplantation Failure. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **33**, 1557-1563, doi:10.1200/jco.2014.58.6750 (2015).
- 183 Rossi, D., Spina, V. & Gaidano, G. Biology and treatment of Richter syndrome. *Blood* **131**, 2761-2772, doi:10.1182/blood-2018-01-791376 (2018).
- 184 Chigrinova, E. *et al.* Two main genetic pathways lead to the transformation of chronic lymphocytic leukemia to Richter syndrome. *Blood* **122**, 2673-2682, doi:10.1182/blood-2013-03-489518 (2013).
- 185 Rossi, D. & Gaidano, G. Richter syndrome: pathogenesis and management. *Seminars in oncology* **43**, 311-319, doi:10.1053/j.seminoncol.2016.02.012 (2016).
- 186 Muller, D. J. *et al.* Loss of NFAT2 expression results in the acceleration of clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia. *J Leukoc Biol* **105**, 531-538, doi:10.1002/jlb.2ab0218-076rr (2019).
- 187 van Attekum, M. H. A. *et al.* Macrophages confer survival signals via CCR1-dependent translational MCL-1 induction in chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene* **36**, 3651-3660, doi:10.1038/onc.2016.515 (2017).
- 188 Cuesta-Mateos, C. *et al.* Analysis of migratory and prosurvival pathways induced by the homeostatic chemokines CCL19 and CCL21 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Experimental hematology* **38**, 756-764, doi:10.1016/j.exphem.2010.05.003 (2010).

- 189 Ghobrial, I. M. *et al.* Expression of the chemokine receptors CXCR4 and CCR7 and disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia/ small lymphocytic lymphoma. *Mayo Clin Proc* **79**, 318-325, doi:10.4065/79.3.318 (2004).
- 190 Ocana, E. *et al.* The prognostic role of CXCR3 expression by chronic lymphocytic leukemia B cells. *Haematologica* **92**, 349-356 (2007).
- 191 Jones, D., Benjamin, R. J., Shahsafaei, A. & Dorfman, D. M. The chemokine receptor CXCR3 is expressed in a subset of B-cell lymphomas and is a marker of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **95**, 627-632 (2000).
- 192 Ganghammer, S. *et al.* Combined CXCR3/CXCR4 measurements are of high prognostic value in chronic lymphocytic leukemia due to negative co-operativity of the receptors. *Haematologica* **101**, e99-102, doi:10.3324/haematol.2015.133470 (2016).
- 193 Azoulay, D. *et al.* Elevated serum BDNF levels are associated with favorable outcome in CLL patients: Possible link to CXCR4 downregulation. *Experimental hematology* **63**, 17-21.e11, doi:10.1016/j.exphem.2018.04.005 (2018).
- 194 Quiroga, M. P. & Burger, J. A. BCR-mediated decrease of CXCR4 and CD62L in CLL. *Cancer Res* **70**, 5194; author reply 5195, doi:10.1158/0008-5472.Can-09-3759 (2010).
- 195 Vlad, A. *et al.* Down-regulation of CXCR4 and CD62L in chronic lymphocytic leukemia cells is triggered by B-cell receptor ligation and associated with progressive disease. *Cancer Res* **69**, 6387-6395, doi:10.1158/0008-5472.Can-08-4750 (2009).
- 196 Saint-Georges, S. *et al.* Protein kinase D-dependent CXCR4 down-regulation upon BCR triggering is linked to lymphadenopathy in chronic lymphocytic leukaemia. *Oncotarget* **7**, 41031-41046, doi:10.18632/oncotarget.9031 (2016).
- 197 Deutsch, A. J. *et al.* Chemokine receptors in gastric MALT lymphoma: loss of CXCR4 and upregulation of CXCR7 is associated with progression to diffuse large B-cell lymphoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **26**, 182-194, doi:10.1038/modpathol.2012.134 (2013).
- 198 Chunsong, H. *et al.* CXC chemokine ligand 13 and CC chemokine ligand 19 cooperatively render resistance to apoptosis in B cell lineage acute and chronic lymphocytic leukemia CD23+CD5+ B cells. *J Immunol* **177**, 6713-6722 (2006).
- 199 Han, T. T., Fan, L., Li, J. Y. & Xu, W. Role of chemokines and their receptors in chronic lymphocytic leukemia: function in microenvironment and targeted therapy. *Cancer biology & therapy* **15**, 3-9, doi:10.4161/cbt.26607 (2014).
- 200 Lad, D. *et al.* Regulatory T-cells drive immune dysfunction in CLL. *Leukemia & lymphoma* **59**, 486-489, doi:10.1080/10428194.2017.1330475 (2018).
- 201 Jitschin, R. *et al.* CLL-cells induce IDOhⁱ CD14+HLA-DR^{lo} myeloid-derived suppressor cells that inhibit T-cell responses and promote TRegs. *Blood* **124**, 750-760, doi:10.1182/blood-2013-12-546416 (2014).
- 202 Riches, J. C. *et al.* T cells from CLL patients exhibit features of T-cell exhaustion but retain capacity for cytokine production. *Blood* **121**, 1612-1621, doi:10.1182/blood-2012-09-457531 (2013).
- 203 Gassner, F. J. *et al.* Chronic lymphocytic leukaemia induces an exhausted T cell phenotype in the TCL1 transgenic mouse model. *British journal of haematology* **170**, 515-522, doi:10.1111/bjh.13467 (2015).
- 204 D'Arena, G. *et al.* Prognostic relevance of oxidative stress measurement in chronic lymphocytic leukaemia. *European journal of haematology* **99**, 306-314, doi:10.1111/ejh.12918 (2017).
- 205 Wojtowicz, W. *et al.* Serum NMR metabolomics to differentiate haematologic malignancies. *Oncotarget* **9**, 24414-24427, doi:10.18632/oncotarget.25311 (2018).
- 206 George, J. T. & Levine, H. Stochastic modeling of tumor progression and immune evasion. *Journal of theoretical biology* **458**, 148-155, doi:10.1016/j.jtbi.2018.09.012 (2018).
- 207 Lampen, M. H. & van Hall, T. Strategies to counteract MHC-I defects in tumors. *Curr Opin Immunol* **23**, 293-298, doi:10.1016/j.coi.2010.12.005 (2011).

- 208 Schreiber, R. D., Old, L. J. & Smyth, M. J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* **331**, 1565-1570, doi:10.1126/science.1203486 (2011).
- 209 Mittal, D., Gubin, M. M., Schreiber, R. D. & Smyth, M. J. New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol* **27**, 16-25, doi:10.1016/j.coi.2014.01.004 (2014).
- 210 Campoli, M. & Ferrone, S. HLA antigen changes in malignant cells: epigenetic mechanisms and biologic significance. *Oncogene* **27**, 5869-5885, doi:10.1038/onc.2008.273 (2008).
- 211 Solana, R., Romero, J., Alonso, C. & Pena, J. MHC class I antigen expression is inversely related with tumor malignancy and ras oncogene product (p21ras) levels in human breast tumors. *Invasion & metastasis* **12**, 210-217 (1992).
- 212 Fuchs, A. R. *et al.* A Chromatin Immunoprecipitation Assay to Identify Novel NFAT2 Target Genes in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Journal of visualized experiments : J Vis Exp*, doi:10.3791/58270 (2018).
- 213 Pham, L. V., Tamayo, A. T., Yoshimura, L. C., Lin-Lee, Y. C. & Ford, R. J. Constitutive NF-kappaB and NFAT activation in aggressive B-cell lymphomas synergistically activates the CD154 gene and maintains lymphoma cell survival. *Blood* **106**, 3940-3947, doi:10.1182/blood-2005-03-1167 (2005).
- 214 D'Avola, A. *et al.* Surface IgM expression and function are associated with clinical behavior, genetic abnormalities, and DNA methylation in CLL. *Blood* **128**, 816-826, doi:10.1182/blood-2016-03-707786 (2016).
- 215 Drennan, S. *et al.* IL-10 production by CLL cells is enhanced in the anergic IGHV mutated subset and associates with reduced DNA methylation of the IL10 locus. *Leukemia* **31**, 1686-1694, doi:10.1038/leu.2016.356 (2017).
- 216 Mansouri, L., Wierzbinska, J. A., Plass, C. & Rosenquist, R. Epigenetic deregulation in chronic lymphocytic leukemia: Clinical and biological impact. *Seminars in cancer biology* **51**, 1-11, doi:10.1016/j.semcan.2018.02.001 (2018).
- 217 Pei, L. *et al.* Genome-wide DNA methylation analysis reveals novel epigenetic changes in chronic lymphocytic leukemia. *Epigenetics* **7**, 567-578, doi:10.4161/epi.20237 (2012).
- 218 Scialdone, A. *et al.* The HDAC inhibitor valproate induces a bivalent status of the CD20 promoter in CLL patients suggesting distinct epigenetic regulation of CD20 expression in CLL in vivo. *Oncotarget* **8**, 37409-37422, doi:10.18632/oncotarget.16964 (2017).
- 219 Wernig-Zorc, S. *et al.* Global distribution of DNA hydroxymethylation and DNA methylation in chronic lymphocytic leukemia. *Epigenetics & chromatin* **12**, 4, doi:10.1186/s13072-018-0252-7 (2019).
- 220 Wolf, C. *et al.* NFATC1 activation by DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia correlates with clinical staging and can be inhibited by ibrutinib. *Int J Cancer* **142**, 322-333, doi:10.1002/ijc.31057 (2018).
- 221 Puente, X. S. *et al.* Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* **475**, 101-105, doi:10.1038/nature10113 (2011).
- 222 Friedman, D. R., Guadalupe, E., Volkheimer, A., Moore, J. O. & Weinberg, J. B. Clinical outcomes in chronic lymphocytic leukaemia associated with expression of CD5, a negative regulator of B-cell receptor signalling. *British journal of haematology* **183**, 747-754, doi:10.1111/bjh.15632 (2018).
- 223 Huang, S. *et al.* Discovery of 2-amino-6-carboxamidobenzothiazoles as potent Lck inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **18**, 2324-2328, doi:10.1016/j.bmcl.2008.02.079 (2008).
- 224 Levelt, C. N. *et al.* Regulation of thymocyte development through CD3: functional dissociation between p56lck and CD3 sigma in early thymic selection. *Immunity* **3**, 215-222 (1995).

- 225 Chiang, Y. J. & Hodes, R. J. T-cell development is regulated by the coordinated function of proximal and distal Lck promoters active at different developmental stages. *Eur J Immunol* **46**, 2401-2408, doi:10.1002/eji.201646440 (2016).
- 226 Moore, J. B., Blanchard, R. K., McCormack, W. T. & Cousins, R. J. cDNA array analysis identifies thymic LCK as upregulated in moderate murine zinc deficiency before T-lymphocyte population changes. *The Journal of nutrition* **131**, 3189-3196, doi:10.1093/jn/131.12.3189 (2001).
- 227 Awe, O. *et al.* PU.1 Expression in T Follicular Helper Cells Limits CD40L-Dependent Germinal Center B Cell Development. *J Immunol* **195**, 3705-3715, doi:10.4049/jimmunol.1500780 (2015).
- 228 Linterman, M. A. *et al.* IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *J Exp Med* **207**, 353-363, doi:10.1084/jem.20091738 (2010).
- 229 Zotos, D. *et al.* IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. *J Exp Med* **207**, 365-378, doi:10.1084/jem.20091777 (2010).
- 230 Hanna, B. S. *et al.* PI3Kdelta inhibition modulates regulatory and effector T-cell differentiation and function in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, doi:10.1038/s41375-018-0318-3 (2018).
- 231 Weiss, L. *et al.* Regulatory T cells predict the time to initial treatment in early stage chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* **117**, 2163-2169, doi:10.1002/cncr.25752 (2011).
- 232 D'Arena, G. *et al.* Regulatory T-cell number is increased in chronic lymphocytic leukemia patients and correlates with progressive disease. *Leukemia research* **35**, 363-368, doi:10.1016/j.leukres.2010.08.010 (2011).
- 233 D'Arena, G. *et al.* Regulatory T-cells in chronic lymphocytic leukemia: actor or innocent bystander? *Am J Blood Res* **3**, 52-57 (2013).
- 234 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).
- 235 Dameshek, W. Special Article: Chronic Lymphocytic Leukemia—an Accumulative Disease of Immunologically Incompetent Lymphocytes. *Blood* **29**, 566 (1967).
- 236 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).
- 237 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).
- 238 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).
- 239 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).
- 240 Cordingley, F. T. *et al.* Tumour necrosis factor as an autocrine tumour growth factor for chronic B-cell malignancies. *Lancet (London, England)* **1**, 969-971 (1988).
- 241 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).
- 242 De Fanis, U. *et al.* Differences in constitutive and activation-induced expression of CD69 and CD95 between normal and chronic lymphocytic leukemia B cells. *Oncology reports* **10**, 653-658 (2003).

- 243 Shaffer, A. L. *et al.* BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity* **13**, 199-212 (2000).
- 244 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).
- 245 Tunyaplin, C. *et al.* Direct repression of *prdm1* by Bcl-6 inhibits plasmacytic differentiation. *J Immunol* **173**, 1158-1165 (2004).
- 246 Jantus Lewintre, E. *et al.* BCL6: somatic mutations and expression in early-stage chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & lymphoma* **50**, 773-780, doi:10.1080/10428190902842626 (2009).
- 247 Zhou, J., Zhang, Q., Henriquez, J. E., Crawford, R. B. & Kaminski, N. E. Lymphocyte-Specific Protein Tyrosine Kinase (LCK) is Involved in the Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Impairment of Immunoglobulin Secretion in Human Primary B Cells. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **165**, 322-334, doi:10.1093/toxsci/kfy133 (2018).
- 248 Hivroz, C., Grillot-Courvalin, C., Labaume, S., Migliarina, R. & Brouet, J. C. Cross-linking of membrane IgM on B CLL cells: dissociation between intracellular free Ca²⁺ mobilization and cell proliferation. *Eur J Immunol* **18**, 1811-1817, doi:10.1002/eji.1830181124 (1988).
- 249 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).

5.6 Publikationsverzeichnis

Teile der hier dargestellten Daten waren Bestandteil verschiedener Publikationen.

"NFAT2 is a critical regulator of the anergic phenotype in chronic lymphocytic leukaemia"

Märklin M, Heitmann JS, Fuchs AR, Truckenmüller FM, Gutknecht M, Bugl S, Saur SJ, Lazarus J, Kohlhofer U, Quintanilla-Martinez L, Rammensee HG, Salih HR, Kopp HG, Haap M, Kirschniak A, Kanz L, Rao A, Wirths S, Müller MR.

Nat Commun., Oktober 2017

"ChIP Assay to Identify Novel NFAT2 Target Genes in Chronic Lymphocytic Leukemia"

Alexander R. Fuchs, Melanie Märklin, Jonas S. Heitmann, Stefan Futterknecht, Michael Haap, Stefan Wirths, Hans-Georg Kopp, Clemens Hinterleitner, Daniela Dörfel und Martin R. Müller

J. Vis. Exp., Dezember 2018

"Loss of NFAT2 expression results in the acceleration of clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia"

Müller DJ, Wirths S, Fuchs AR, Märklin M, Heitmann JS, Sturm M, Haap M, Kirschniak A, Sasaki Y, Kanz L, Kopp HG, Müller MR

J Leukoc Biol., März 2019

5.7 Kongressbeiträge

Teile der hier dargestellten Daten wurden auf verschiedenen Kongressen in Form von Vorträgen oder Postern vorgestellt.

5.7.1 Vorträge

Vortrag auf der Jahrestagung der DGHO 10.2016

"*Genetischer Verlust von NFAT2 führt zur CLL- Transformation*" Fuchs, Alexander Rolf, Märklin M., Heitmann J. S., Truckenmüller F. M., Saur S. J., Ganser M., Bugl S., Kopp H.-G., Kanz L., Rao A., Wirths S., Müller M. R.

Vortrag auf der Jahrestagung der DGHO 10.2017

"*Lck ist ein direktes Zielgen von NFAT2 in der CLL*" Fuchs, Alexander R., Märklin M., Heitmann J.S., Truckenmüller F.M., Saur S.J., Ganser M., Bugl S., Kopp H.-G., Kanz L., Rao A., Wirths S., Müller M.R.

5.7.2 Posterbeiträge

Posterpräsentation auf der Jahrestagung der ASH 12.2017

"*Lck is a crucial energy regulator in CLL*"

Alexander R. Fuchs, Melanie Märklin, Jonas Heitmann, Felicia Truckenmüller, Sebastian Jonas Saur, Manuela Ganser, Stefanie Bugl, Ursula Kohlhofer, Leticia Quintanilla-Martinez, Hans-Georg Kopp, Lothar Kanz, Anjana Rao, Stefan Wirths und Martin R Müller

Gewinner eines „Abstract-Achievement-Awards“

5.8 Contributions

Die Genotypisierung der Versuchstiere wurde während der gesamten Dauer der Promotion von Manuela Ganser und Stefan Futterknecht durchgeführt. Einen erheblichen Teil der qRT-PCRs hat Frau Dr. Melanie Märklin beigesteuert. Ebenso stammen die Daten des Langzeitexperiments der TCL1- und TCL1 NFAT2-Kohorte von ihr. Die Immunhistochemie wurden durch das Institut für Pathologie unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Leticia Quintanilla-Martinez de Fend erhoben.

6 DANKSAGUNG

„Keine Schuld ist dringender, als die, Dank zu sagen.“

Marcus Tullius Cicero

In diesem Sinne möchte ich mich zuerst bei Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee dafür danken, dass er diese Arbeit vor der Fakultät vertritt. Seit meinem Aufhalten und meiner Masterarbeit in seiner Abteilung unterstütze er mich immer mit gutem Rat und innovativen Einfällen. Auch während der Promotion waren die Diskussionen mit ihm immer eine Quelle der Inspiration und Motivation.

Besonders bedanken möchte ich mich bei PD Dr. Dr. Martin Müller für die Gelegenheit meine Promotion in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Sein unermesslicher Fundus an Kreativität und neuen Ideen trieb dabei nicht nur das Projekt voran, sondern spornte auch mich immerzu an. Dabei waren seine Ansätze für die Darstellung von Daten und seine fantastischen Formulierungen ein Fundament für die zahlreichen Kongressbeiträge und Publikationen.

Melly möchte ich für die beste erdenkliche Einarbeitung und Betreuung danken. Dabei wurde ich von ihr nicht nur in alle experimentellen Techniken eingearbeitet, sondern auch in sämtliche organisatorischen Feinheiten. Auch Jonas brachte nicht nur immer wieder neue Ansätze ein, sondern war vor allem bei den ChIP-Experimenten ein wichtiger Ansprechpartner. Manu und Stefan waren eine Riesenhilfe bei den vielen Genotypisierungen. Elke brachte mir neben der Immunhistologie weitere Tipps und Tricks im Labor bei und stand mir ab und an beim chemischen Rechnen bei. Durch die Medizindoktoranden David und Juliane war für eine frische, abwechslungsreiche Atmosphäre gesorgt. Besonders erwähnen möchte ich hier außerdem alle Mitglieder der AG Salih. Ein Dank geht auch an die gesamte Innere Med II für die großartige Arbeitsatmosphäre.

Ein besonderer Dank geht an den Judo Club Balingen e.V. und all seine Mitglieder. Hervorzuheben ist dabei die Shotokan-Ryû-Karate-Dô-Abteilung und speziell Martin und Phine. Danke für all die Ratschläge und das harte Training, die mich nicht nur im richtigen Moment ablenkten, sondern mir auch immer Kraft gaben, weiter zu gehen.

6 DANKSAGUNG

Außerdem geht ein riesiges Dankeschön an all die Freunde, die mir während der Doktorarbeit stets zur Seite standen. Vor allem Flo, Moritz, Markus, Caro, Mina, Anne und Calvin seien hier genannt.

Natürlich geht ein ganz spezieller Dank an meine Eltern, die mir nicht nur meinen bisherigen Lebensweg ermöglichten, sondern mich auch in jeder erdenklichen Weise unterstützt haben. Meine Geschwister Tobias, Fabian und Ramona müssen hier ebenso erwähnt werden, da auch sie stets ein offenes Ohr oder Aufmunterungen parat hatten.

Auch möchte ich mich bei allen Freunden, Verwandten und Weggefährten, die nicht namentlich genannt wurden, bedanken.