

**NFATc2 ist ein Schalter der
T-Zell-Rezeptor-abhängigen Aktivierung in
humanen CD4⁺ Th-Zellen**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)

eingereicht am Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Miriam Ricarda Podtschaske
aus Berlin

Berlin, Dezember 2006

1. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

2. Gutachter: Prof. Dr. Andreas Radbruch

Disputation am: 12. Februar 2007

Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Allgemeine Grundlagen	1
1.1.1 Naive und Antigen-erfahrene CD4 ⁺ Th-Zellen in der Peripherie	2
1.2 Die Bedeutung der Signalweiterleitung in Th-Zellen	4
1.3 Aktivierung und Signalweiterleitung in T-Lymphozyten	5
1.3.1 Signalweiterleitung über den T-Zell-Rezeptor	5
1.3.2 Die Bedeutung und Erzeugung von Ca ²⁺ Signalen in Th-Zellen	8
1.3.3 Beeinflussung der zellulären Transkription durch Ca ²⁺ Signale	9
1.3.4 Sensoren und Effektoren Ca ²⁺ -sensitiver Prozesse	10
1.4 Die Phosphatase Calcineurin	11
1.4.1 Struktur und Regulation von CaN	11
1.4.2 Inhibitoren der CaN Aktivität	12
1.5 CaN als Regulator der T-Zellaktivierung	14
1.6 Die Regulation der IL-2 Transkription	15
1.6.1 Die Bedeutung von IL-2 für das Immunsystem	15
1.6.2 Regulatorische Sequenzelemente des IL-2 Gens	16
1.6.3 Aktivierungsabhängige Transkriptionsfaktoren am IL-2 Promotor	18
1.6.3.1 NFAT	18
1.6.3.2 NF-κB	21
1.6.3.3 AP-1	22
1.7 Binäre oder graduelle Geninduktion als Folge der zellulären Signaltransduktion	23
1.7.1 Prinzip der binären und graduellen Geninduktion	23
1.7.2 Potentielle Kontrollebenen einer binären IL-2 Genexpression	25
1.8 Ziele dieser Arbeit	27
2 Material	28
2.1 Chemikalien	28
2.1.1 Puffer und Medien	29
2.1.2 Reaktionskits	32
2.1.3 Enzyme	32
2.1.4 Oligonukleotid-Primer	33
2.1.5 Plasmide	33
2.1.6 Antikörper	33
3 Methoden	35
3.1 Zellbiologische Methoden	35
3.1.1 Isolierung humaner mononukleärer Zellen aus peripherem Blut	35
3.1.2 Bestimmung der Zellzahl	35
3.1.3 Kultivierung und Stimulation von CD4 ⁺ Th-Zellen	35
3.1.4 Kultivierung der Jurkat Zelllinie	36

3.1.5	Transfektion von Jurkat Zellen	36
3.1.6	Fixierung von Zellen mit Formaldehyd oder DSP.....	36
3.1.7	Intrazelluläre Färbung von Zytokinen und Oberflächenmolekülen	37
3.1.8	Färbung von Zelloberflächenmarkern.....	37
3.1.9	Beladung mit dem Calciumindikator Indo-1 für Ca^{2+} -Messung	38
3.1.10	Intrazelluläre Färbung von Transkriptionsfaktoren	38
3.1.11	Der IL-2 Sekretionsassay.....	39
3.1.12	Isolation von Zellkernen aus humanen $CD4^+$ Th-Zellen	40
3.2	Durchflusszytometrie und Methoden der Zelltrennung	40
3.2.1	Durchflusszytometrie	40
3.2.2	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS)	41
3.2.3	Magnetische Zellsortierung zur Isolierung von $CD4^+$ Th-Zellen.....	42
3.2.4	Analyse von isolierten Zellkernen mittels Durchflusszytometrie	42
3.2.5	Calciummessung mit dem Indo-1 Ca^{2+} Indikator in $CD4^+$ Th-Zellen.....	43
3.3	Proteinbiochemische Methoden	44
3.3.1	Präparation von Proteinproben für die Gelelektrophoretische Analyse.....	44
3.3.2	Isolierung von Proteinen aus fixierten Zellen	44
3.3.3	Fraktionierung von Zellextrakten aus $CD4^+$ Th-Zellen.....	44
3.3.4	Fällung von Proteinen.....	45
3.3.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	45
3.3.6	Western Blot.....	45
3.3.7	Strippen und Rehybridisieren von Western Blots.....	46
3.4	Molekularbiologische Methoden.....	46
3.4.1	Extraktion von Gesamt-RNA und mRNA	46
3.4.2	Reverse Transkription von mRNA	46
3.4.3	PCR Amplifikation von cDNA	47
3.4.4	Amplifikation von cDNA im Light Cycler	47
3.4.5	Quantitative PCR zur Amplifikation genomischer DNA	49
3.4.6	CHART-PCR Assay.....	49
4	Ergebnisse	50
4.1	Die bimodale Verteilung von IL-2 exprimierenden $CD4^+$ Th-Zellen.....	50
4.1.1	Charakterisierung der Aktivierung von $CD4^+$ Th-Zellen nach PMA und Ionomycin Stimulation	50
4.1.2	Modulation der IL-2 Expression mit PMA und Ionomycin	51
4.1.3	Der CaN Inhibitor CsA induziert eine binäre IL-2 Expression nach Stimulation mit PMA/Ionomycin oder $\alpha CD3/\alpha CD28$	53
4.1.4	CsA hat keinen Einfluss auf die Herstellung intrazellulärer Ca^{2+} Signale.....	54

4.1.5	Aktivierung von NFAT, NF- κ B und AP-1 nach differentieller Stimulation	56
4.1.6	NFAT- und NF- κ B-vermittelte Reporterogenaktivität in Jurkat Zellen	58
4.2	Separation von IL-2 Produzenten und IL-2 Nichtproduzenten	60
4.2.1	Etablierung des IL-2 Sekretionsassays	60
4.3	Die binäre IL-2 Expression wird oberhalb der IL-2 mRNA Induktion reguliert	63
4.3.1	IL-2 mRNA wird in IL-2 Nichtproduzenten nicht effektiv induziert	63
4.4	Die IL-2 Promotor Regulation ist nicht der Schalter der binären IL-2 Expression	64
4.4.1	Regulation des proximalen IL-2 Promotors durch Chromatinumlagerung	64
4.4.2	Verwendung von <i>Dral</i> zur Untersuchung der IL-2 Promotorzugänglichkeit.....	65
4.4.3	Analyse der <i>Dral</i> Spezifität mittels PCR und Light Cycler	66
4.4.4	Die IL-2 Promotorzugänglichkeit wird nur in IL-2 Produzenten effektiv induziert.....	67
4.5	Detektion aktivierter Transkriptionsfaktoren in Zellkernen auf Einzelzellebene	68
4.5.1	Verwendung isolierter Zellkerne zur Messung von NFAT und NF- κ B im FACS	68
4.5.2	Spezifischer Nachweis von NFATc2 und NF- κ B in isolierten Zellkernen	70
4.6	Die binäre IL-2 Expression ist abhängig von der NFATc2 Translokation	72
4.6.1	IL-2 Produzenten und IL-2 Nichtproduzenten unterscheiden sich in der Menge des translozierten NFATc2	72
4.6.2	CsA beeinflusst die Frequenz der NFATc2 enthaltenden Zellkerne aber nicht die Fluoreszenzintensität von NFATc2 in Zellkernen aus CD4 ⁺ Th-Zellen	74
4.7	Die Aktivierung und nukleäre Translokation von NFATc2 wird durch CaN in einer Alles-oder-Nichts-Reaktion reguliert.....	75
4.7.1	Die maximale CaN-Aktivität führt zur vollständigen Translokation von NFATc2.....	75
4.7.2	CaN reguliert die NFATc2 Aktivierung in einer Alles-oder Nichts-Reaktion	77
4.7.3	Die Gesamtmenge an NFATc2 ist in IL-2 Produzenten größer als in IL-2 Nichtproduzenten	78
4.8	NFATc2 ist ein zellulärer Schalter der IL-2 Expression	79
4.8.1	Die NFATc2 Menge ist in CD4 ⁺ Gedächtniszellen höher als in naiven CD4 ⁺ Th- Zellen	79
4.8.2	Die binäre NFATc2 Aktivierung ist in CD4 ⁺ Gedächtniszellen der molekulare Schalter der binären IL-2 Expression	82
4.9	Modellierung der NFATc2-abhängigen binären IL-2 Expression	84
4.9.1	Die IL-2 Produzenten lassen sich durch eine höhere mittlere NFATc2 Menge charakterisieren.....	84
4.9.2	Mathematische Modellierung der binären IL-2 Expression durch kooperative Aktivierung von NFATc2	85
5	Diskussion.....	87
5.1	Binäre IL-2 Proteinexpression in CD4 ⁺ Th-Zellen.....	87
5.1.1	Stimulationsabhängige Modulation der binären IL-2 Expression	87
5.1.2	Varianz der detektierten IL-2 Expression in humanen CD4 ⁺ Th-Zellen.....	88

5.2	Analyse von Schwellenwerten und binären Expressionsmustern bei der Zytokinproduktion in individuellen CD4 ⁺ Th-Zellen.....	90
5.2.1	Die Bedeutung von Aktivierungsschwellenwerten in individuellen T-Lymphozyten bei der Zytokinproduktion.....	90
5.2.2	Mechanismen der binären Proteinexpression bei der IL-2 Expression	92
5.3	Analyse der Kontrollebenen der aktivierungsabhängigen IL-2 Expression	94
5.3.1	Reportergeranalysen zur Untersuchung der binären Proteinexpression	94
5.3.2	NFATc2-abhängige Induktion der IL-2 mRNA	96
5.3.3	NFATc2-abhängige Chromatinumlagerungen am IL-2 Promotor	98
5.3.3.1	Chromatinumlagerungen zur Regulation der Zytokininduktion	98
5.3.3.2	Einfluss der allelen Exklusion auf die IL-2 Expression in IL-2 Produzenten	100
5.3.3.3	Struktur des IL-2 Promotors als Ursache einer stochastischen binären IL-2 Geninduktion	101
5.4	NFATc2 als zellulärer Schalter der IL-2 Expression.....	103
5.4.1	Die Identifikation von NFATc2 als binärem Schalter der TCR Aktivierung	103
5.4.2	Die Bedeutung von NFATc2 in CD4 ⁺ Th-Zellen.....	104
5.4.3	Regulation der CaN Aktivität als Voraussetzung der NFATc2 Aktivierung.....	106
5.5	Modell des NFATc2 Schalters.....	107
5.6	Die Bedeutung des NFATc2 Schalters für das Immunsystem.....	109
	Zusammenfassung.....	111
	Summary	112
6	Literaturverzeichnis.....	113

Abkürzungsverzeichnis

AICD	Aktivierungsinduzierter Zelltod (<i>Activation-Induced Cell Death</i>)
α	(griech.) anti
Ak	Antikörper
AP-1	Activator Protein 1
APC	Antigenpräsentierende Zelle
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
$[Ca^{2+}]_i$	Freie zytosolische und nukleäre Calciumionenkonzentration
CaM	Calmodulin
CaN	Calcineurin
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA
CRAC	durch Ca^{2+} Freisetzung aktivierter Ca^{2+} -Kanal
CsA	Cyclosporin A
Cyp	Cyclophilin
DAG	1,2-Diacylglycerol
d.h.	dass heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Durchflusszytometer (<i>Fluochrome Activated Cell Sorting</i>)
FCS	Fötales Kälberserum
FK506	Tacrolimus
FKBP	FK506-bindendes Protein
FL-1	Fluoreszenzkanal 1
FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>Forward scatter</i>)
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
IC ₅₀	Inhibitorkonzentration, die zu einer halbmaximalen Hemmung führt
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G

I κ B	NF- κ B -Inhibitor
IL	Interleukin
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
JNK	c-jun-N-terminale-Kinase
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	Molar
MAPK	Mitogen-aktivierte-Proteinkinase
MFI	gemittelte Fluoreszenzintensität (<i>Mean fluorescence intensity</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
NFAT	Nuclear Factor of Activated T-cells
NF- κ B	Nuclear Factor κ B
P/I	PMA/Ionomycin
PJ	Propidiumjodid
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-Myristate-13-Acetat
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunde
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>Sideward scatter</i>)
TCR	T-Zell-Rezeptor (<i>T-cell receptor</i>)
Th	T-Helferzelle