

5 Diskussion

Die IL-2 Expression von CD4⁺ Th-Zellen nach spezifischer TCR Stimulation ist ein Schlüsselereignis der adaptiven Immunantwort. Eine Fehlregulation des Zytokins IL-2 hat fundamentale Auswirkungen auf die Homöostase des adaptiven Immunsystems *in vivo*. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die transkriptionelle Induktion von IL-2 während der initialen Th-Zellaktivierung modulierbar ist und einem binären und nicht graduellen Entscheidungsprozess unterliegt. Dieser Entscheidungsprozess, der zu einem stimulationsabhängigen binären IL-2 Expressionsprofil innerhalb einer humanen CD4⁺ Th-Zellpopulation führt, wurde auf Einzelzellebene untersucht und charakterisiert.

5.1 Binäre IL-2 Proteinexpression in CD4⁺ Th-Zellen

5.1.1 Stimulationsabhängige Modulation der binären IL-2 Expression

Charakteristisch für die Aktivierung einer Th-Zelle nach antigenspezifischer oder mitogener Stimulation ist die Expression des Zytokins IL-2 und der Eintritt in den Zellzyklus. In dieser Arbeit wurde für primäre humane CD4⁺ Th-Zellen ein binäres Expressionsprofil für IL-2 nach PMA/Ionomycin und α CD3/ α CD28 Stimulation gezeigt, das sich durch zwei distinkte Populationen, die IL-2 Produzenten und die IL-2 Nichtproduzenten, unterscheiden ließ. Im Vergleich zur α CD3/ α CD28 Stimulation, resultierte die Stimulation mit PMA/Ionomycin in einer deutlich höheren Anzahl an IL-2 produzierenden Zellen. PMA/Ionomycin erlaubte durch Umgehung des TCR Komplexes eine maximale Lymphozytenaktivierung [231] und die gezielte Modulation der durch sie aktivierten Signalwege.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die binäre IL-2 Expression durch Titration von Ionomycin bei konstanter PMA Konzentration modulierbar war und die Frequenz der IL-2 produzierenden Zellen, aber nicht die Intensität der IL-2 Produktion pro Zelle veränderte. Die Titration des ko-stimulatorischen Signals durch PMA bei konstanter Ionomycin Konzentration hatte keinen Effekt auf das binäre Expressionsprofil von IL-2. Die Konzentration des Ca²⁺/CaN Inhibitors CsA bei Stimulation mit PMA/Ionomycin oder α CD3/ α CD28 resultierte ebenfalls in einer binären IL-2 Expression. Dies unterstrich die Bedeutung des TCR-abhängigen Ca²⁺/CaN Signalwegs bei der IL-2 Expression. Im Gegensatz zur binären IL-2 Expression wurde für den Aktivierungsmarker CD40L (CD154) ein graduelles Expressionsprofil gefunden, dass in Übereinstimmung mit den Daten von Lindgren et.al. [232] sowohl durch PMA, als auch durch Ionomycin induzierbar war. CD40L ist, wie FasL

(CD95), ein ko-stimulatorisches Oberflächenmolekül der TNF Proteinfamilie und zählt zu den frühen Genen, den sogenannten *immediate early genes*, die kurz nach TCR Ligation aktiviert werden. Aufgrund einer defekten FasL und CD40L Expression in NFATc2 Gen-defizienten Mäusen wird vermutet, dass die transkriptionelle Induktion beider Proteine ähnlich reguliert wird [162]. Während die IL-2 Expression die kooperative Aktivierung des Ca^{2+} /CaN und des PKC θ Signalwegs benötigt, wird die CD40L Expression TCR-abhängig durch NFAT Aktivierung reguliert und zusätzlich über CD28 Ko-Stimulation durch AP-1 Aktivierung amplifiziert [232]. Im Gegensatz zum IL-2 Promotor ist die Aktivierung des CD40L/FasL Promotors zudem funktionell unabhängig von einer kooperativen NFAT/AP-1 Bindung [232-234], worin eine Erklärung für das in der vorliegenden Arbeit gefundene graduelle Expressionsprofil von CD40L nach CsA Titration liegen könnte. Da-rüber hinaus scheint eine *de novo* Synthese von Proteinen der Egr Zn²⁺-Finger Transkriptionsfaktorfamilie [234, 235] zusammen mit einer kürzlich indentifizierten NF- κ B p50 spezifischen Enhancer-Region [236] für eine optimale Funktionalität des CD40L Promotors erforderlich zu sein. Im Gegensatz zur beschriebenen synergistischen Wirkungsweise der beteiligten Signalwege am IL-2 Promotor [237, 238] handelte es sich daher bei der transkriptionellen Induktion von CD40L um eine additive Wirkung von verschiedenen Transkriptionsfaktorfamilien, die unabhängig voneinander die CD40L Expression regulieren und partiell über CsA manipulierbar waren.

5.1.2 Varianz der detektierten IL-2 Expression in humanen CD4⁺ Th-Zellen

Die maximal detektierte mit PMA/Ionomycin induzierte IL-2 Produktion der verwendeten heterologen CD4⁺ Th-Zellpopulationen variierte in dieser Arbeit spenderabhängig zwischen 50-90%. Sojka et.al. [123] beobachteten *in vivo* ebenfalls das Auftreten von bis zu 20% IL-2 Nichtproduzenten trotz mehrstündiger Stimulation und trotz Expression des Aktivierungsmarkers CD69. Allgemein werden Schwankungen in der IL-2 Produktion durch unterschiedliche genetische Voraussetzungen, den Immunstatus und das Alter der Spender zum Zeitpunkt der Blutspende oder durch die häufig beobachtete intrinsische Renitenz von kleinen Zellpopulationen erklärt, die sich aus ungeklärten Gründen *in vitro* nicht aktivieren lassen [123, 239]. Insbesondere das altersbedingte Absinken der IL-2 Produktion wird als Folge einer veränderten T-Zell Homöostase und einer mangelnden Aktivierbarkeit der Th-Zellen diskutiert [41, 240]. Die vorliegenden Ergebnisse zeigten demgegenüber zum Zeitpunkt der untersuchten Stimulation eine vollständige Aktivierung von NFATc2, NF- κ B und AP-1, und eine maximale Expression von CD40L in über 90% der CD4⁺ Th-Zellen in allen Präparationen. Da dieses Aktivierungsprofil unter optimalen Sti-

mulationsbedingungen erreicht wurde, kann die variable IL-2 Expression nicht als Folge einer mangelnden Aktivierbarkeit der Th-Zellen betrachtet werden. Stattdessen ist die spenderabhängige Varianz der IL-2 Expression vermutlich auf eine unterschiedliche benötigte Stimulationsdauer und einer damit verbundenen Asynchronität der IL-2 Expression *in vitro* zurückzuführen [239]. Sojka et.al. [123] bestätigten durch *in vivo* Analysen, dass die Frequenz der IL-2 Produktion entscheidend von der Dauer und der Konzentration der Antigenstimulation abhing. In dieser Arbeit konnten die sortierten IL-2 Produzenten nach zwei Stunden initialer Stimulation fast ausschließlich als CD4⁺ Gedächtniszellen identifiziert werden, während der überwiegende Teil der aktivierten IL-2 Nichtproduzenten aus naiven CD4⁺ Th-Zellen bestand. Es ist bekannt, dass sich das Stimulationsprofil von naiven und Gedächtniszellen innerhalb einer heterogenen CD4⁺ Th-Zellpopulation bei antigener Stimulation dramatisch in der Dauer der Stimulation, Konzentration/Beschaffenheit des Antigens und ko-stimulatorischer Signale unterscheidet [102, 241] und durch PMA/Ionomycin nicht ohne Weiteres substituiert werden kann. Iezzi et.al. zeigten zudem, dass die Stimulationsdauer bis zum Eintritt in den Zellzyklus in naiven Th-Zellen durch exogenes IL-2 verkürzt werden konnte [241] und in Abhängigkeit der IL-2 Rezeptor (IL-2R)-Dichte/Zelle durch eine kritische Anzahl an intermolekularen IL-2/IL-2R Interaktionen auf der Zelloberfläche bestimmt wurde [242]. Die unterschiedliche Reaktionsfähigkeit auf externe Stimuli, die bei naiven Th-Zellen im Vergleich zu Gedächtniszellen beobachtet werden kann, wird unter anderem auf eine geringere Kapazität zur Amplifikation von TCR Signalen, sowie die Notwendigkeit der Chromatinumlagerung vor der Proliferation zurückgeführt [102]. Der direkte Vergleich der IL-2 Produzenten und IL-2 Nichtproduzenten in der vorliegenden Arbeit ergab, dass die CD4⁺ Gedächtniszellen bereits zum Zeitpunkt der Stimulation und trotz überlappender Bereiche in der NFATc2 Expression über insgesamt höhere intrazelluläre NFATc2 Mengen verfügten als die naiven CD4⁺ Th-Zellen. In den naiven CD4⁺ Th-Zellen konnte erst nach einem Stimulationszeitraum von fünf Stunden ein Anstieg der NFATc2 Proteinexpression beobachtet werden, während die NFATc2 Expression in den CD4⁺ Gedächtniszellen keine Veränderung zeigte. Somit konnte für die IL-2 Produktion anhand eines Regressionsmodells eine deutliche Abhängigkeit von der intrazellulär verfügbaren NFATc2 Menge festgestellt werden. Dieses Ergebnis legt den Schluss nahe, dass die naiven Th-Zellen innerhalb einer CD4⁺ Zellpopulation für die IL-2 Expression eine längere Stimulationszeit als die hier verwendete initiale Stimulation zur Generation der erforderlichen Signalkomponenten benötigen. Tatsächlich wurde in anderen Arbeiten gezeigt, dass eine höhere Sensitivität von Effektor- und Gedächtniszellen gegenüber antigener Stimulation auf eine höhere Expression immun-modulatorischer Adhäsions- und Signalmoleküle und verschiedener CD45 Isoformen zurückzuführen war,

wodurch die Mobilisierung und Signalgebung der TCR-Komplexe beschleunigt wurde [63, 243].

Die in der vorliegenden Arbeit zu unterschiedlichen Zeitpunkten und bei verschiedenen Spendern gemessene IL-2 Produktion hatte allerdings keinen Einfluss auf das induzierte binäre Expressionsprofil dieses Zytokins innerhalb einer heterogenen CD4⁺ Th-Zellpopulation und wurde daher als grundsätzlicher Regulationsmechanismus peripherer humaner CD4⁺ Th-Zellen untersucht.

5.2 Analyse von Schwellenwerten und binären Expressionsmustern bei der Zytokinproduktion in individuellen CD4⁺ Th-Zellen

5.2.1 Die Bedeutung von Aktivierungsschwellenwerten in individuellen T-Lymphozyten bei der Zytokinproduktion

Eine zentrale Frage im Verständnis der Beziehung von Antigen-basierten Signalstärken und der daraus resultierenden Immunantwort bildet die Relation von Antigenkonzentration zur relativen Produktion an Zytokinen, da die Effektorfunktionen von Th-Zellen maßgeblich von autokrin und parakrin wirkenden Zytokinen beeinflusst werden, die nach TCR Erkennung sekretiert oder an der Zelloberfläche exprimiert werden [244, 245]. Allgemein haben TCR festgelegte Aktivierungsprofile entscheidende Konsequenzen für die ausgelöste Immunantwort, indem über das Verhältnis der individuellen Zytokine zueinander entschieden wird, inwieweit überwiegend humorale oder inflammatorische Immunreaktionen [246] oder regulatorische, aktivierungsabhängige Prozesse, wie Proliferation, Anergie und Apoptose, ausgelöst werden [116, 247]. Dies wirft die Frage auf, ob die TCR-abhängige Zytokinproduktion pro Zelle festgelegt ist und sich nur quantitativ in Abhängigkeit der besetzten TCR Moleküle verändert, oder ob veränderbare Ebenen in der TCR Signalgebung unterschiedlich die Expression einzelner Zytokine regulieren. In Untersuchungen zur Effektorzellendifferenzierung wurde dargelegt, dass unterschiedliche Antigenkonzentrationen differentiell die Induktion von Th1/Th2-Zellen beeinflussen, und selektiv die Effektorzytokinproduktion von entweder IL-4 oder IFN- γ in Reaktion auf niedrige oder hohe Antigenkonzentrationen induzieren [248, 249]. Die hier vorgestellten Ergebnisse für primäre CD4⁺ Th-Zellen zeigen, dass die Stärke der TCR Stimulation die Frequenz der IL-2 produzierenden Th-Zellen bestimmte und dass die Zunahme der Stimulationsstärke in der Zunahme der IL-2 Produzenten resultierte. Tatsächlich konnte die Bedeutung der Antigenkonzentration für die Immunantwort durch andere Arbeiten bereits experimentell gezeigt werden, wodurch distinkte TCR Aktivierungsschwellenwerte als entscheidend für eine individuelle Zytokinproduktion festgestellt wurden und zusätzlich durch ko-stimulatorische Signale

moduliert werden konnten [101, 250]. Hierbei wurden erstmals durchflusszytometrisch auf Einzelzellebene verschiedene TCR Konzentrationen in Abhängigkeit der TCR Signalstärke untersucht [101, 251]. Viola et.al. konnten so für humane Th-Zellen zeigen, dass die Anzahl der aktivierten TCR Moleküle einen Schwellenwert für die Zellaktivierung und IFN- γ Expression bildeten, der durch hohe Antigendosen schneller erreicht wurde und durch CD28 Ko-Stimulation erheblich verringert werden konnte [101]. Da die Art des Liganden keinen qualitativen Einfluss auf die Aktivierung hatte, wurde vermutet, dass durch Runterregulation der TCR Moleküle nach Antigenbindung [252] eine kontinuierliche Rekrutierung neuer TCR Moleküle an die Zelloberfläche zur Aufrechterhaltung des Signals benötigt wurde, und die Anzahl der aktivierbaren TCR Moleküle an der Zelloberfläche entscheidend für die Überwindung des Aktivierungsschwellenwertes war [101]. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Titration des Ca^{2+} Ionophors Ionomycin die Frequenz der IL-2 produzierenden Th-Zellen änderte und damit mehrere unterschiedliche Schwellenwerte einer zytosolischen Ca^{2+} Konzentration für die IL-2 Expression in individuellen Th-Zellen enthüllte. Die Veränderung der zytosolischen Ca^{2+} Konzentration wird nach antigener Stimulation durch den TCR ausgelöst und allgemein als Dekoder der Art und Beschaffenheit der antigenspezifischen Stimulation beschrieben. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Amplitude, die Dauer und die Oszillationsmuster der intrazellulären Ca^{2+} Signale, durch die serielle, summierte Aktivierung der TCR-Moleküle als Folge der Affinität oder Konzentration des Antigens bestimmt wurden [68, 100, 253]. Die verschiedenen TCR bedingten Ca^{2+} Muster induzierten dabei differentiell die Aktivierung und nukleäre Translokation von Transkriptionsfaktoren und kontrollierten dadurch die stimulationsabhängige Spezifität der Genexpression und des Zellschicksals [45, 60, 61]. In der vorliegenden Arbeit konnte durch Modulation der Ca^{2+} -abhängigen Stimulation durch Ionomycin oder durch Inhibierung der Ca^{2+} /CaN Aktivität durch CsA eindeutig ein differentielles, nämlich binäres und graduelles, Aktivierungsprofil für die Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NF- κ B (p65) festgestellt werden. Die Verwendung von Ionomycin als polyklonale Stimulation zeigte darüber hinaus, dass es differenzierungsunabhängig innerhalb einer CD4^+ Th-Zellpopulation keinen allgemein festgelegten Schwellenwert der NFATc2 Aktivierung oder der IL-2 Produktion gibt, sondern dass dieser Schwellenwert individuell in der Zelle determiniert ist und in einem binären Expressionsprofil für IL-2 resultierte. Auf Einzelzellebene regulierte hierarchische Antigen-TCR Schwellenwerte sowie eine intraklonale Heterogenität für die individuelle Zytokinantwort wurden ebenfalls durch Itoh et.al. [254] bei der differentiellen Expression von IFN- γ und IL-2 beschrieben, allerdings in Abhängigkeit der Stärke der antigenspezifischen TCR-Aktivierung innerhalb einer murinen klonalen Th1 CD4^+ -Zelllinie. Hohe Antigenkonzentrationen resultierten in der Ko-Expression von IL-2 und IFN- γ , während niedrige Dosen nur die Expression von IFN- γ

induzieren konnten [254]. Itoh et.al. beobachteten darüber hinaus, dass sich, im Gegensatz zur IFN- γ Expression, die IL-2 Expression nicht in Abhängigkeit der Antigenkonzentration pro Zelle, sondern in der Zunahme IL-2-produzierender Zellen änderte [254]. Dieses Phänomen wurde ebenfalls durch frühe Arbeiten von Fiering et.al. [207] und Karttunen et.al. [255] durch Verwendung artifizieller NFAT-abhängiger IL-2 Promotorkonstrukte beschrieben. Der molekulare Mechanismus der binären Expression von IL-2 bzw. IL-2 promotorabhängigen Reportergen in individuellen Zellen wurden als konzentrationsabhängige bzw. kooperative Bindungskinetik der aktivierten Transkriptionsfaktoren NFAT und NF- κ B am IL-2 Promotor diskutiert [130, 207]. Die molekularen Ursachen, die dieser Schwellenwert-aktivierten Zytokinexpression zugrunde lagen, wurden dabei nicht untersucht. Die potentiellen molekularen Entscheidungsebenen, die für eine Schwellenwert-aktivierte und binäre IL-2 Expression in Frage kommen, sollen daher nachfolgend betrachtet werden.

5.2.2 Mechanismen der binären Proteinexpression bei der IL-2 Expression

Zwei distinkte Mechanismen der binären Proteinexpression werden allgemein unterschieden. Erstens, der Promotor als reversibler Schalter zwischen kompakter (transkriptionell inaktiver) und relaxierter (transkriptionell aktiver) Promotorkonformation kontrolliert in Abhängigkeit einer stochastischen und synergistischen Interaktion der relevanten Transkriptionsfaktoren die Proteinexpression [203]. Dieses Modell eines stochastischen Schalters der Gentranskription auf der Ebene der Promotorregulation steht für eine intrinsische Variabilität der exprimierten mRNA Menge und wäre eine Erklärung für die häufig beobachtete Diversität in der eukaryontischen zellulären Genexpression innerhalb einer homologen Zellpopulation oder von Zellklonen [203, 211, 256, 257].

Der zweite Mechanismus einer binären Proteinexpression kann durch die binäre Aktivierung von Transkriptionsfaktoren oder anderen induzierenden Aktivatoren (enzymatische Reaktionen, kooperative oder kompetitive molekulare Interaktionen von Aktivatoren/ Repressoren) innerhalb von Signalkaskaden oder positiven Rückkopplungsschleifen erklärt werden [203]. Dabei wird eine Alles-oder-Nichts Entscheidung durch einen Schwellenwert zwischen der induzierenden Substanz (z.B. Stimulation) und seinem Aktivator (z.B. Transkriptionsfaktor) bestimmt. Damit die hierbei zu beobachtende kontinuierliche Veränderung des Verhältnisses der divergierenden Zellpopulationen (z.B IL-2 Produzenten versus IL-2 Nichtproduzenten) als Folge unterschiedlicher Stimulationen eintreten kann, müssen die Zellen über ein weites Spektrum unterschiedlicher Schwellenwerte und verschiedener Konzentrationen oder Aktivitäten der entscheidenden molekularen Transmitter der betreffenden Signalkaskaden verfügen [230].

Ein Ansatz, um zwischen diesen beiden Mechanismen der binären Proteinexpression, also der stochastischen- und der Schwellenwert-regulierten, zu unterscheiden, ist die Messung der Transkriptionsfaktoren in individuellen Zellen, wie sie in dieser Arbeit für die Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NF- κ B (p65) durchgeführt worden ist. Hierbei wurde anhand der Dephosphorylierung und der nukleären Translokation ein binäres Aktivierungsprofil für NFATc2 detektiert, das in CD4⁺ Gedächtniszellen mit der binären IL-2 Expression korrelierte, während die Aktivität von NF- κ B (p65) graduell reguliert wurde. Ebenso konnte die Relevanz des Aktivierungsprofils von Transkriptionsfaktoren für die Ausübung einer graduellen oder binären Proteinexpression durch andere Studien gezeigt werden. Beispielsweise wurde in Reaktion auf toxische Stressfaktoren eine graduelle Induktion des Transkriptionsfaktors p53 festgestellt, die abhängig von Promotor und Zelllinie eine graduelle oder binäre Transkription induzierte [258]. In Jurkat Zellen wurde eine PMA-abhängige, binäre Oberflächenexpression von CD69 auf das binäre Expressionsprofil der JNK Kinase zurückgeführt [259]. Im Gegensatz zu der aktivierungsabhängig induzierten Expression von p53 oder JNK, sind die IL-2 induzierenden Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NF- κ B allerdings konstitutiv im Zytoplasma detektierbar und translozieren nach Aktivierung in den Zellkern. Da das Aktivierungsprofil, zumindest nach initialer Stimulation, nicht an eine aktivierungsabhängige Induktion der Proteinexpression von NFATc2 und NF- κ B (p65) gekoppelt war und zum Zeitpunkt der Untersuchungen keine phosphospezifischen Antikörper zur Unterscheidung aktivierter und nicht-aktivierter NFATc2 bzw. NF- κ B (p65) Moleküle zur Verfügung standen, konnte ein spezifisches differentielles Aktivierungs- und Translokationsprofil auf Einzelzellniveau daher nur in isolierten Zellkernen der behandelten Zellen untersucht werden. Neben der Schalterfunktion von NFATc2, stellte sich aufgrund des differentiellen fraktionsabhängigen Translokationsprofils der IL-2 Produzenten und IL-2 Nichtproduzenten, auch die absolute Menge an NFATc2 als relevant für die IL-2 Expression heraus, so dass in Abhängigkeit der Zelldifferenzierung das binäre IL-2 Expressionsprofil neben einer Schwellenwert-regulierten auch über eine stochastische Geninduktion reguliert wurde. Tatsächlich wird bei Betrachtung verschiedener Untersuchungen überwiegend die stochastische, und nicht die Schwellenwert regulierte, binäre Geninduktion als Ursache einer binären Proteinexpression beschrieben. Dies erklärt ein häufig zu beobachtendes Phänomen bei sortierten stark und schwach exprimierenden Subpopulationen einer Zellpopulation mit binärem Expressionsprofil, bei dem nach Restimulation mit dem gleichen Stimulus für jede Subpopulation wieder ein binäres Expressionsprofil induziert wird [207, 258, 260, 261]. Wären die beiden Subpopulationen jeweils zellinhärent in Form eines Schwellenwertes determiniert, müsste ihre Reaktion auf eine wiederholte Stimulation wieder unverändert stark oder schwach erfolgen. Zudem lässt sich die Dauer der Induktionszeit oftmals mit einer Zunahme der

induzierten Zellen assoziieren [207, 255, 258], wie sie auch für die IL-2 Produktion in naiven CD4⁺ Th-Zellen und CD4⁺ Gedächtniszellen gemessen wurde. Wäre auch hier allein eine Schalterentscheidung oberhalb der Geninduktion verantwortlich, müssten alle induzierten Zellen zeitgleich reagieren, anstatt verstreut innerhalb eines weiten Zeitfensters. Daher kann die Wahrscheinlichkeit, dass Schwellenwert-basierte Schalterregulationen als einziger Mechanismus einer dichotomen Geninduktion in Frage kommen, als sehr gering erachtet werden. Dies scheint auch für die binäre IL-2 Expression zu gelten, da bei ausdifferenzierten Gedächtniszellen eine klare bimodale NFATc2 Translokation mit einer binären IL-2 Expression korrelierte, während in naiven Th-Zellen bzw. aktivierten IL-2 Nichtproduzenten NFATc2 zwar ebenfalls binär reguliert wurde, die überwiegend geringeren NFATc2 Mengen neben anderen Faktoren zu diesem Zeitpunkt in den betroffenen Zellen aber offenbar für eine IL-2 Geninduktion nicht ausreichend waren und erst zusätzlich aktivierungsabhängig induziert werden musste, wie es zumindest in naiven CD4⁺ Th-Zellen nach fünf Stunden Stimulation mit PMA/Ionomycin gezeigt wurde. Neben der Detektion von NFATc2 als zellulären Schalter einer Schwellenwert-regulierten IL-2 Expression, konnten die Auswirkungen der NFATc2-abhängigen stochastischen Geninduktion anhand weiterer Regulationsebenen der IL-2 Expression in dieser Arbeit analysiert werden. Dies betraf insbesondere die aktivierungsabhängige IL-2 Promotoraktivität, Herstellung der IL-2 mRNA und Zugänglichkeit des IL-2 Promotors aufgrund von aktivierungsabhängigen Chromatinveränderungen.

5.3 Analyse der Kontrollebenen der aktivierungsabhängigen IL-2 Expression

5.3.1 Reporteranalysen zur Untersuchung der binären Proteinexpression

Die differentielle Genaktivität, d.h. das komplexe und spezifische Muster der eukaryontischen Transkription bezüglich zeitlicher, räumlicher, zelltypspezifischer, organspezifischer oder signalvermittelter Parameter, wird wesentlich durch die Aktivität der regulatorischen Transkriptionsfaktoren definiert [128]. Die Notwendigkeit, die aktivierten Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NF- κ B bei der Untersuchung der binären IL-2 Proteinexpression in isolierten Zellkernen von CD4⁺ Th-Zellen zu detektieren, wurde vor allem bei der Verwendung des GFP und DsRed gekoppelter Reporterassays zur Analyse der entsprechenden Transkriptionsfaktoraktivität deutlich. Da die detektierte NFAT- und NF- κ B-induzierte Reporteraktivität nicht mit der IL-2 Expression korrelierte bzw. die IL-2 Expression sogar substituierte, konnten keine quantitativen und qualitativen Aussagen über eine IL-2 abhängige Transkriptionsfaktoraktivität in IL-2 Produzenten und IL-2 Nichtproduzenten getroffen werden. Zudem birgt die Wahl des Reportergens hinsichtlich des zu untersu-

chenden Proteinexpressionsprofils auf Einzellebene einige Gefahren hinsichtlich der Kongruenz von Promotoraktivität und Detektion der Reporterexpression. In primären Th-Zellen wurde die IL-2 Expression bislang überwiegend als gepoolte Reaktion in Zellpopulationen beispielsweise durch Luciferase analysiert, wodurch die durchschnittliche Promotoraktivität zumeist über eine gesamte Zellpopulation verteilt und nicht auf Einzelzebene ermittelt wird. Dadurch bleiben spezifische Variationen in der Promotoraktivität, wie sie zwischen individuellen Zellen innerhalb einer Population existieren, und die Unterscheidung von binären und graduellen Transkriptionsmustern zumeist unberücksichtigt. Erst durch Verwendung fluoreszenter Reportergene wie GFP oder β -Galactosidase (β -gal) können mit Hilfe der Durchflusszytometrie oder Fluoreszenzmikroskopie graduelle oder binäre Proteinexpressionsprofile diskriminiert werden [262, 263]. Allerdings muss bei Untersuchungen der Geninduktion in eukaryontischen Zellen die Tatsache berücksichtigt werden, dass Proteinexpressionsprofile neben weiteren Faktoren durch die Halbwertszeit der mRNA und der Proteine relativ zur Promotoraktivität determiniert werden [208, 211, 212]. Daher wird bei der Wahl des Reportergens automatisch eine Limitierung in der qualitativen Aussagefähigkeit für die differentielle Genexpression festgelegt. Zhang et.al. [203] wiesen darauf hin, dass kurze mRNA und Protein Halbwertszeiten in Kombination mit einer kurzen Induktionszeit und anhaltender Promotoraktivität bei gleichzeitig hoher Sensitivität des Reportergens überwiegend binäre Proteinexpressionsmuster induzierten, während die umgekehrten Bedingungen graduelle Muster erzeugten. So besitzt beispielsweise GFP eine höhere Halbwertszeit als β -gal und Luciferase (Luc) und eine geringere Detektionssensitivität, da es im Unterschied zu β -gal und Luc als Signal nicht enzymatisch amplifiziert wird [264-267]. Folgerichtig konnten Zhang et.al. [203] für β -gal und Luc im Gegensatz zu GFP keine graduellen Expressionsmuster induzieren. Dadurch bestätigten sie, dass frühere binäre Genexpressionsstudien immer mit β -gal als Reportergenen [205, 207, 255, 268] und graduelle Expressionsmuster immer mit GFP detektiert wurden [201, 206, 269].

Bei der Bestimmung der NFAT und NF- κ B Aktivität durch Reporterexpression ist zudem die Anzahl und die Affinität der repetitiven Bindungsmotive für eine Transkriptionsinduktion entscheidend, aber nicht aussagefähig oder vergleichbar mit den endogenen Bedingungen einer so komplizierten und streng regulierten Struktur wie es beim IL-2 Promotor der Fall ist [270, 271]. Flanagan et.al. [271] detektierten beispielsweise anhand des Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT)-Reportergens mit nur drei repetitiven NFAT Bindungssequenzen als Enhancer die gleiche transkriptionelle Aktivität für CAT wie unter der Kontrolle der IL-2 Promotorsequenz. Die Bedeutung kooperativer und synergistischer Interaktionen von NFAT bei der Regulation der IL-2 Promotoraktivität werden dadurch ebensowenig erfasst, wie die Abhängigkeit der transkriptionellen Aktivität von der Struktur

und Anzahl der Bindungsmotive [134]. Differentiell exprimierte NFAT Mengen, wie sie für die IL-2 Produzenten und IL-2 Nichtproduzenten in dieser Arbeit gemessen wurden, und daraus resultierende qualitative Konsequenzen hinsichtlich der IL-2 Expression, können durch diese Methode ebenfalls nicht unterschieden werden.

Dieses Problem bei der Analyse differentieller Expressionsprofile von Einzelzellen wurde daher durch Sortierung der IL-2 Produzenten und IL-2 Nichtproduzenten sowie durch die durchflusszytometrische Detektion der aktivierten Transkriptionsfaktoren in Zellkernen gelöst. Der IL-2 Sekretionsassay wurde bereits zur Analyse von IL-2 Expressionskinetiken primärer muriner Th-Zellen *in vivo* verwendet [123] und ermöglicht eine unmittelbare Aussage über die individuelle zellspezifische Zytokinsekretion nach initialer Aktivierung, da keine Restimulation nötig ist. Zudem ist der IL-2 Sekretionsassay sensitiver und physiologischer als beispielsweise der IL-2 GFP knock-in Reporterassay, mit dem ebenfalls IL-2 Expressionsstudien in transgenen murinen Th-Zellen durchgeführt wurde [218, 239]. Durch Etablierung des IL-2 Sekretionsassays für PMA/Ionomycin stimulierte humane primäre CD4⁺ Th-Zellen gelang es in dieser Arbeit, die in der Literatur diskutierten Ebenen einer potentiellen Schalterregulation für binäre Proteinexpressionsprofile in unmittelbarer Abhängigkeit zur IL-2 Expression in humanen primären CD4⁺ Th-Zellen zu untersuchen. Für die Regulation der IL-2 Expression werden Chromatinmodifikationen [138], Stabilität der IL-2 mRNA Transkripte [214] und translationelle Kontrollereignisse [215] beschrieben. Die Kontrollebenen, die zu einer stochastisch-regulierten, binären IL-2 Geninduktion führen und durch Ionomycin und CsA beeinflusst werden, konnten hinsichtlich der Generation und Degradation der IL-2 mRNA und der Zugänglichkeit des IL-2 Promotors durch Chromatinveränderungen beobachtet werden.

5.3.2 NFATc2-abhängige Induktion der IL-2 mRNA

Die unmittelbare transkriptionelle Induktion nach mitogener Stimulation und *de novo* Synthese von IL-2 ist ein anerkanntes Phänomen der IL-2 Expression [134]. Charakteristisch sind die kurzen Halbwertszeiten der IL-2 mRNA infolge stark selektiver Degradationsmechanismen und daher eine kontinuierliche Stimulation zur Aufrechterhaltung der IL-2 Expression erfordern [125, 140, 142]. Abbruch oder Inhibierung der mitogenen Stimulation durch CsA oder FK506 bewirkt die rapide Degradation der mRNA und den unmittelbaren Abbruch der IL-2 Proteinexpression [125, 272]. Aufgrund der Tatsache, dass IL-2 bereits 30-60 Minuten nach Stimulation sekretiert wird [123], kann zudem eine hohe Synchronisation zwischen der Transkription, Translation und Sekretion von IL-2 angenommen werden. Die relative IL-2 mRNA Menge, die in dieser Arbeit nach zwei Stunden Stimulation mit PMA/Ionomycin gemessen wurde, betrug in Relation zu den IL-2 Produ-

zenten gemittelt nur 4.7% in den IL-2 Nichtproduzenten. Aufgrund der geringen mRNA Mengen, die nicht effizient für eine IL-2 Produktion in den IL-2 Nichtproduzenten waren, wurden daher translationelle Regulationsmechanismen ausgeschlossen. Zudem wurde angenommen, dass degradative Prozesse nicht ursächlich sondern regulativ auf die verbleibende mRNA Expression eingreifen und die IL-2 mRNA grundsätzlich nicht effektiv hergestellt werden konnte. Im Gegensatz dazu beschrieben Garcia-Sanz et.al. [215] eine hohe IL-2 mRNA Expression für anerge humane Th-Zellen nach Ionomycin Stimulation und diskutierten die ausbleibende IL-2 Proteinproduktion als Folge einer reprimierten Translation durch eine gestörte Ribosomenbeladung. Diese Beobachtungen stehen im Widerspruch zu Untersuchungen von Bill et al. [273], Macian et.al. [105] und eigenen Messungen in der Arbeitsgruppe Baumgraß, bei denen keine vergleichbar hohe transkriptionelle IL-2 mRNA Induktion nach Ionomycin Stimulation festgestellt werden konnte. Darüber hinaus konnten Macian et al. [105] im Gegensatz zu Garcia-Sanz bei einer NFAT-vermittelten Anergie-Induktion durch Ionomycin keine AP-1 und NF- κ B DNA-Bindungsaktivität feststellen und charakterisierten das genetische Programm der Anergie als Ergebnis einer Inhibierung der NFAT/AP-1 Interaktion, wie sie beispielsweise am IL-2 Promotor notwendig ist, mit einem entsprechenden differentiell exprimierten Genprofil.

Die Ursachen einer reprimierten IL-2 mRNA Expression sind eng verbunden mit drei Prämissen der Transkriptionsinitiation am IL-2 Promotor: Erstens, die einzelnen Transkriptionsfaktoren können *in vivo* nur synergistisch in einer kooperativen Bindung mit ihren benachbarten Faktoren eine stabile Bindung an ihren spezifischen regulatorischen DNA Erkennungsregionen am IL-2 Promotor eingehen [134]. Zweitens, die Behinderung eines spezifischen Faktors in seiner Bindung an die IL-2 Promotorregion ist ausreichend für eine starke Attenuierung bzw. vollständige Hemmung der IL-2 Transkription [128]. Drittens, bei vollständiger Bindung aller Faktoren am IL-2 Promotor führt die nachträgliche pharmakologische Inaktivierung eines Faktors zur Aufhebung der DNA-Bindung aller anderen Faktoren und damit zum Abbruch der IL-2 Transkription [274]. Andere Studien zeigten, dass nach Inhibierung von NFAT der IL-2 Promotor auch durch NF- κ B und AP-1 nicht partiell, sondern komplett unbesetzt blieb, obwohl keine generelle Hemmung der funktionellen Aktivität und DNA-Bindungsfähigkeit dieser Faktoren in Zellkernextrakten festgestellt wurde [128, 130]. In der vorliegenden Arbeit konnte mit CsA zwar eine graduelle Inhibierung der nukleären Translokation von NF- κ B (p65) in den Zellkernen von IL-2 Produzenten nachgewiesen werden, allerdings wirkte sich dies offenbar nicht nachteilig für die transkriptionelle Aktivität von NF- κ B (p65) für die IL-2 Expression aus. Stattdessen unterschieden sich die IL-2 Nichtproduzenten von den IL-2 Produzenten nicht durch den Anteil an nukleärem NF- κ B (p65) oder AP-1, sondern an der Verfügbarkeit von aktiviertem NFATc2. Tatsächlich gilt vor allem die Anwesenheit von NFAT am IL-2 Promotor als ent-

scheidender Faktor der IL-2 Expression. Der Einfluss von CsA auf die transkriptionelle Regulation des IL-2 Promotors wurde daher auch vorrangig durch Inhibierung der Ca^{2+} /CaN-abhängigen Aktivierung und Translokation von NFAT [35, 275] und durch Hemmung einer Ca^{2+} -abhängigen Neusynthese von NF- κ B Proteinen für die Aufrechterhaltung der IL-2 Expression erklärt. Im Gegensatz dazu ist die AP-1 kontrollierte Transkriptionsinitiation nicht CsA sensitiv [276], und die unabhängig von einer Proteinneusynthese erfolgte Induktion von NF- κ B durch PMA kann nicht durch CsA supprimiert werden [200].

In den IL-2 Produzenten und IL-2 Nichtproduzenten aus CD4^+ Gedächtniszellen konnte deutlich gezeigt werden, dass eine CsA modulierte binäre IL-2 Expression mit einer bimodalen Verteilung von NFATc2 im Zellkern korrelierte. Allerdings zeigten die aktivierten IL-2 Nichtproduzenten einer heterogenen CD4^+ Th-Zellpopulation ebenfalls ein vollständiges transloziertes dephosphoryliertes NFATc2 Profil, ohne aber IL-2 zu produzieren. Der Unterschied dieser überwiegend aus naiven Th-Zellen bestehenden Population bestand hinsichtlich der IL-2 Expression zumindest in der absoluten Menge an NFATc2, die zwar die gleiche Intensität der CD40L Expression wie bei den IL-2 Produzenten ermöglichte, aber als initiale Konzentration für die vollständige Aktivierung des IL-2 Promotors möglicherweise nicht ausreichte und erst mit Fortsetzung der Stimulation synthetisiert werden musste. Daher kann spekuliert werden, dass eine attenuierte Transkriptionsfaktorbindung am IL-2 Promotor durch den Mangel an NFATc2 als Ursache für die abortive IL-2 mRNA Transkription hervorgerufen wurde.

5.3.3 NFATc2-abhängige Chromatinumlagerungen am IL-2 Promotor

5.3.3.1 Chromatinumlagerungen zur Regulation der Zytokininduktion

In den untersuchten humanen CD4^+ Th-Zellen konnte analog zu murinen CD4^+ Th-Zellen [136] eine Erhöhung der aktivierungsabhängigen Promotorzugänglichkeit durch *Dra1* am proximalen IL-2 Promotor festgestellt werden. Dies steht in Übereinstimmung mit Rao et.al. [137], die für murine Th-Zellen eine transkriptionelle Aktivierung des IL-2 Gens infolge einer stimulationsabhängigen reversiblen Öffnung des proximalen IL-2 Promotors durch Chromatinveränderungen nachwies. In der vorliegenden Arbeit konnte darüber hinaus durch Sortierung der IL-2 Produzenten und IL-2 Nichtproduzenten erstmals eine deutliche Selektivität dieser Promotoröffnung gezeigt werden, die mit bis zu 85% erwartungsgemäß in den IL-2 Produzenten sehr hoch war, während die detektierte Promotor-

öffnung in den IL-2 Nichtproduzenten deutlich darunter lag. Generell spielt die kompakte Struktur des Chromatins, neben der Anordnung und Interaktion verschiedener Transkriptionsfaktoren, eine dynamische Rolle in der Regulation der eukaryontischen Gentranskription [226]. Chromatinumlagerungen werden bislang als ATP-abhängige Vorgänge und Histondeacetylierungen diskutiert [277], die durch Veränderungen der Chromatinfaltung den Zugang der Transkriptionsfaktoren zu den DNA-Bindestellen begrenzen und damit indirekt die Aktivität der Transkriptionsfaktoren bestimmen [278]. Zusammen mit epigenetischen Veränderungen der DNA durch Methylierung von CpG Motiven konnte ein funktioneller Zusammenhang von Chromatinumlagerungen an den Genloci von Effektorzytokinen mit der Ausbildung eines bestimmten T-Zell Phänotyps während der T-Zelldifferenzierung nachgewiesen werden [279-282]. Demnach korrelierte eine differentielle Expression von IL-4 und IFN- γ vollständig mit der Zugänglichkeit des Chromatins und Histonmodifikationen in den entsprechenden Genbereichen der Zytokine, während diese Bereiche in naiven Th-Zellen in einer geschlossenen Konformation blieben [281, 283]. Richter et.al. konnten zeigen, dass Th-Zellen in den Zellzyklus eintraten bzw. mindestens eine Zellteilung vollzogen hatten, bevor das Effektorzytokin IL-4 transkribiert wurde [284]. Im Gegensatz dazu ist der distale Promotorbereich des IL-2 Gens in naiven Th-Zellen bereits im Thymus zugänglich, so dass unmittelbar nach Aktivierung in der Peripherie die Expression von IL-2 möglich ist [136]. Bruniquel et.al. [138] fanden heraus, dass nach Aktivierung in naiven Th-Zellen *in vitro* und *in vivo* eine Demethylierung der IL-2 Enhancer Region etabliert wurde, die eine erhöhte IL-2 Promotoraktivität induzierte und womöglich Gedächtniszellen eine effektivere IL-2 Transkription in Reaktion auf geringe Antigen Dosen gewährleistete. Allerdings wurden für das IL-2 Gen bisher keine Hinweise auf ein zellspezifisches Methylierungsmuster gefunden, das sich in unstimulierten T-Zellen von anderen Zellen unterscheidet [135-137]. Während die Existenz von Aktivatoren oder Repressoren am IL-2 Promotorbereich kontrovers diskutiert wurde [128, 285], scheint die minimale Enhancer/Promotorregion in unstimulierten T-Zellen in dem gleichen Maß ‚unbesetzt‘ zu sein wie in Nicht-T-Zellen. Zudem werden die aktivierungsabhängigen Transkriptionsfaktoren NFAT, NF- κ B und AP-1 auch in Nicht-T-Zellen exprimiert und sind daher nicht spezifisch für Th-Zellen. Die T-Zell-typische IL-2 Expression wird daher auf die Aktivierung von Signalwegen zurückgeführt, die in ihrer Kombination T-Zell-spezifisch sind, da sie die benötigte simultane Aktivierung und Kombination der IL-2-relevanten Transkriptionsfaktoren induzieren können [128].

5.3.3.2 Einfluss der allelen Exklusion auf die IL-2 Expression in IL-2 Produzenten

Zwar wurde eine stimulationsabhängige Promotoröffnung am IL-2 Promotor detektiert, allerdings konnte entgegen der detektierten IL-2 Expression in den IL-2 Produzenten in keinem der untersuchten Ansätze eine maximale Promotorzugänglichkeit mit *DraI* gemessen werden. Eine Erklärung hierfür, neben einer zunehmenden Reversion der aktivierungsabhängigen Promotoröffnung während der Präparation, könnte ein weiterer Mechanismus der Genregulation sein, die allele Exklusion. Holländer et.al. [286] haben eine monoallele Genregulation am IL-2 Genlocus als Kontrolle einer quantitativen und zeitlichen IL-2 Produktion während einer Immunreaktion vorgeschlagen. Monoallele Expression konnte bereits für den BCR [287], TCR [288] und beim genetischen Imprinting [289, 290] nachgewiesen werden. Allerdings zeigten Chiodetti et al. [291] in Übereinstimmung mit Naramura [292], dass eine biallele Expression des IL-2 Gens unter optimalen Stimulationsbedingungen möglich ist, so dass die von Holländer beschriebene monoallele Expression als Folge suboptimaler Stimulation oder Limitation in der initialen Konzentration an Transkriptionsfaktoren diskutiert wurde [291, 293]. Zudem fand Chiodetti, dass die Wahl des IL-2 Allels zunächst zufällig und reversibel, aber nicht selektiv durch Inaktivierung oder Imprinting erfolgte [291] und vermutete, dass das Allel erst bei erfolgreicher Expression während des Zellzyklus möglicherweise durch Chromatinumlagerungen oder DNA-Modifikationen festgelegt werden könnte [282]. Dagegen spricht allerdings, dass Chiodetti auch unter optimalen Stimulationsbedingungen anstelle einer vermuteten doppelten IL-2 Produktion eine sehr hohe Varianz der IL-2 Menge pro Zelle feststellte, was eher auf eine posttranskriptionale Regulation [294] als eine allele Exklusion zur Kontrolle der IL-2 Expression nach Stimulation schließen lässt. Die Möglichkeit einer sowohl monoallelen als auch biallelen Genexpression vor dem Hintergrund einer offenbar Genlocus-unabhängigen Varianz in der IL-2 Transkription wäre daher eine Erklärung für die verbleibende eingeschränkte Promotorzugänglichkeit von *DraI* in den sortierten IL-2 Produzenten. Dadurch würden unter den gewählten Stimulationsbedingungen in der vorliegenden Arbeit bestimmte Zellen im Sinne einer biallelen IL-2 Expression maximal aktiviert werden, während andere nur ein Allel exprimieren. Die Menge des synthetisierten IL-2 pro Zelle würde aber aufgrund posttranskriptionaler Regulationen innerhalb der Fraktion der IL-2 Produzenten ähnlich bleiben.

5.3.3.3 Struktur des IL-2 Promotors als Ursache einer stochastischen binären IL-2 Geninduktion

Im Gegensatz zur IL-2 Promotoröffnung der IL-2 Produzenten fällt zunächst auf, dass sich in den IL-2 Nichtproduzenten, insbesondere in den aktivierten IL-2 Nichtproduzenten, eine signifikante Promotorzugänglichkeit (15-19%) messen ließ, obwohl in dieser Population keine effektive IL-2 mRNA Induktion stattfand. Im Gegensatz dazu konnten sowohl in den IL-2 Produzenten, also auch in den IL-2 Nichtproduzenten, alle Komponenten des NF- κ B und AP-1 Komplexes in den Zellkernen auch nach CsA Behandlung detektiert werden. Untersuchungen von Rao et.al. [137], die eine CsA vermittelte Hemmung der aktivierungsabhängigen Chromatinveränderungen am IL-2 Promotor beobachteten, führten zu der Schlussfolgerung, dass die Anwesenheit aktivierter Transkriptionsfaktoren, insbesondere NFAT oder NF- κ B, oder weiterer Faktoren zur Umlagerung des Chromatins am IL-2 Promotor erforderlich war oder sogar induzierte. Unter Einfluss des nukleären NF- κ B und AP-1 könnte daher trotz der Abwesenheit von NFATc2 in den nicht-aktivierten IL-2 Produzenten bzw. trotz limitierter Anwesenheit von NFATc2 in den aktivierten IL-2 Nichtproduzenten in den Zellkernen, im Vergleich zu den IL-2 Produzenten eine partielle Promotoröffnung am IL-2 Promotor induziert werden. Für das in den Zellen und Zellkernen der aktivierten IL-2 Nichtproduzenten nachgewiesene komplett dephosphorylierte, aber im Vergleich zu den IL-2 Produzenten stark limitierte NFATc2, konnte dabei keine Einschränkung für die NFAT-abhängige Expression von CD40L festgestellt werden, was die Frage aufwirft, warum trotz nukleärem NFATc2 keine IL-2 mRNA oder nur eine partielle Promotoröffnung induziert wurde. Durch den Vergleich der regulatorischen Elemente des IL-2 und CD40L Promotors hinsichtlich Bindungsaffinität und Bindungsstellen von NFAT lassen sich weitere Erklärungsansätze für eine differentielle IL-2 Geninduktion finden. Der IL-2 Promotor enthält insgesamt fünf NFAT Bindestellen, darunter vier zusammengesetzte NFAT/AP-1 Elemente, die für eine optimale funktionelle Promotoraktivität essentiell sind und besetzt sein müssen [130]. Im Gegensatz dazu tragen zu einer funktionellen Aktivierung des CD40L Promotors nur zwei allerdings hoch-affine NFAT Bindungsstellen bei, die voneinander unabhängig aktiv sind und keine kooperative AP-1 Bindung benötigen [146, 232, 295]. Fiering et.al. [207] zeigten, dass die zusammengesetzten NFAT/AP-1 Stellen einen Schwellenwert zur Aktivierung der NFAT-abhängigen Transkription bildeten und nur durch hohe Konzentrationen von NFAT und AP-1 im Zellkern erreicht wurde, während niedrige Konzentrationen von NFAT und AP-1 nach Aktivierung und nukleärer Lokalisation wirkungslos blieben [207]. Daher wurde postuliert, dass die Bindungsaffinitäten der Aktivatoren an den verschiedenen Promotorbereichen entscheidend für die Festlegung eines solchen Schwellenwertes sind [204, 293], insbesondere da alle Elemente des IL-2

Promotors, speziell die proximalen NFAT/AP-1 Bindungsmotive, überwiegend schwache bzw. nieder-affine Bereiche darstellen [130, 144]. Dies wird durch die Tatsache unterstrichen, dass die Optimierung eines der nieder-affinen Bindungsmotive zu den bekannten Konsensussequenzen zum Verlust einer aktivierungsabhängigen IL-2 Induktion und/oder zelltypspezifischen Bindung des IL-2 Promotors führte [270]. Im Gegensatz dazu konnten Zhang et.al. [296] für das distale (-280 bis -255) NFAT/AP-1 Motiv im IL-2 Promotor auch eine ausschließliche NFAT-DNA Interaktion nachweisen, die in Anwesenheit von AP-1 kooperativ verstärkt wurde und für eine IL-2 Expression unerlässlich war. Durch Deletion dieser distalen NFAT DNA-Bindungssequenz wurde eine komplette Blockade der transkriptionalen Aktivität trotz intakter proximaler NFAT Bindungssequenzen induziert [296], was die zuvor durch Mutationsanalysen gezeigte grundlegende Bedeutung des distalen NFAT/AP-1 Motivs für die IL-2 Expression im Vergleich zu den *cis*-Elementen für NF- κ B und AP-1 bestätigte [228].

Aufgrund dieser unterschiedlich-affinen Bindungsmotive am proximalen IL-2 Promotor kann daher postuliert werden, dass in den aktivierten IL-2 Nichtproduzenten an den höher-affinen distalen NFAT/AP-1 DNA-Sequenzen eine partielle IL-2 Promotoröffnung stattfand. Allerdings führte die Limitierung der initialen NFATc2 Konzentration in Konkurrenz zur hoch-affinen CD40L NFAT Sequenz nur zu einer abortiven Bindung an den schwach-affinen proximalen NFAT Bereichen des IL-2 Promotors, wodurch kein effektiver Transkriptionsinitiationskomplex induziert werden konnte. Aufgrund des dynamischen simultanen Zusammenspiels aller Transkriptionsfaktoren am IL-2 Promotor kann, in Übereinstimmung mit Rothenberg et.al [134], die Wahrscheinlichkeit einer transkriptionellen Induktion kinetisch eng an die unmittelbare Verfügbarkeit des am stärksten limitierten Transkriptionsfaktors geknüpft werden. Da zudem kein einziges Bindungsmotiv im IL-2 Promotor mit den bekannten optimalen Konsensussequenzen übereinstimmt [270], aber jeweils hochkonserviert ist [297], gewährleistet die offensichtlich systematisch niedrig-affine Bindungsstruktur des IL-2 Promotors durch die simultane Bindung aller Faktoren einen Mechanismus der korrekten IL-2 Regulation. Dadurch wird letztlich auch die prinzipiell kontinuierliche Zugänglichkeit des IL-2 Gens, wie sie theoretisch auch für Nicht-T-Zellen gilt, entsprechend des Differenzierungsstadiums der Th-Zelle während einer Immunantwort über den nukleären Pool, d.h. über Kombination und Konzentration, an aktivierten Transkriptionsfaktoren kontrolliert.

5.4 NFATc2 als zellulärer Schalter der IL-2 Expression

5.4.1 Die Identifikation von NFATc2 als binärem Schalter der TCR Aktivierung

Neben der Detektion von Transkriptionsfaktoren in ganzen Zellen wurde in dieser Arbeit durch Isolation der Zellkerne auch das spezifische Aktivierungsprofil der translozierten Transkriptionsfaktoren NF- κ B (p65) und NFATc2 in CD4⁺ Th-Zellen gemessen. Die Ergebnisse zeigten zusammen mit den Western Blot Analysen, dass NFATc2 der molekulare Schalter einer binären IL-2 Expression in CD4⁺ Th-Zellen ist und durch die Ca²⁺-abhängige Phosphatase CaN reguliert wird. Dies wurde insbesondere durch die Analyse von aufgereinigten CD4⁺ Gedächtniszellen unterstrichen, in denen nach partieller Aktivierung das jeweils induzierte binäre IL-2 Expressionsprofil mit einer binären NFATc2 Translokation korrelierte, während NF- κ B ein graduelles Translokationsprofil zeigte. Dieser binäre NFATc2-Schalter wurde auch für eine heterogene CD4⁺ Th-Zellpopulation nachgewiesen, die, neben einer kleinen refraktären Population von nicht-aktivierten IL-2 Nichtproduzenten, insbesondere durch die Anwesenheit von IL-2 Produzenten und aktivierten IL-2 Nichtproduzenten charakterisiert wurde. Die Sortierung und Analyse der verschiedenen Subpopulationen offenbarte ein zellinhärentes, fraktionsspezifisches, binäres NFATc2 Translokationsprofil in isolierten Zellkernen, das sich zudem quantitativ unterscheiden ließ. Die IL-2 Produktion korrelierte dabei mit der interzellulären heterogenen NFATc2 Verteilung und könnte daher in Übereinstimmung mit Fiering et.al. [207] als einer der limitierenden Faktoren der IL-2 Expression benannt werden. Im Gegensatz dazu wurde für die anderen aktivierungsabhängigen und für die IL-2 Expression essentiellen Transkriptionsfaktoren, NF- κ B und AP-1, insgesamt keine fraktionsabhängige differentielle Expression festgestellt. Ebenso wenig zeigten diese Komponenten für ihr spezifisches Aktivierungsprofil eine mit NFATc2 vergleichbare Sensitivität gegenüber CsA Behandlung.

Generell lässt sich die Bedeutung und nicht-redundante Funktion von NFAT für die IL-2 Expression durch folgende Aussagen unterstreichen:

Erstens, die NFAT Aktivierung korreliert mit der IL-2 Expression [127, 129] und es gibt mehrere NFAT Bindungselemente am IL-2 Promotor, die alle besetzt sein müssen, um eine effektive IL-2 Transkription zu induzieren [127, 130]. Zweitens, NFAT ist das direkte Zielsubstrat einer reversiblen und Ca²⁺/CaM-abhängigen Aktivierung durch CaN [61, 82, 163, 298]. Die Aktivierung von NFAT ist gekennzeichnet durch die vollständige Dephosphorylierung an 13 Serin-Resten, die zu einer konformationellen Änderung der Molekülstruktur führt und durch Exposition einer Kernlokalisationssequenz die Transloka-

tion in den Zellkern einleitet [168, 169, 223]. Drittens, die IL-2 Expression wird *in vitro* mit einer dominant-negativen NFAT Mutante durch Unterdrückung der aktivierungsabhängigen nukleären Translokation von NFAT gehemmt und durch Überexpression von CaN wieder aufgehoben [298]. Ebenso kann die Aktivierung von NFAT und eine damit verbundene IL-2 Transkription durch eine dominant-negative CaN Mutante inhibiert werden [299]. Viertens wird der Einfluss der CaN-abhängigen Aktivierung von NFAT für die IL-2 Expression durch spezifische Inhibierung der CaN Aktivität durch den CsA/Cyclophilin Komplex besonders hervorgehoben [28, 83, 163, 300].

Darüber hinaus kann der NFATc2 Schalter aufgrund der hier vorgestellten Ergebnisse zudem als zellulärer Schalter der TCR-spezifischen T-Zellaktivierung identifiziert werden, da der graduelle Ca^{2+} Einstrom durch Titration von Ionomycin oder eine graduelle Inhibierung der CaN Aktivität durch CsA in einem binären IL-2 Expressionsprofil resultierte. Dieses binäre IL-2 Expressionsprofil war durch ein entweder vollständig dephosphoryliertes, nukleäres oder ein phosphoryliertes, zytoplasmatisches NFATc2 Aktivierungsprofil gekennzeichnet und stimmte in Abhängigkeit einer zellendifferenzierungsabhängigen Expression von NFATc2 mit der IL-2 Produktion überein. Im Gegensatz dazu gewährleistete PMA eine graduelle Aktivierung von NF- κ B und AP-1 für die Induktion von IL-2, hatte aber weder Einfluss auf die Aktivierung von NFATc2 und die Frequenz der IL-2 Produzenten, noch auf die Intensität der IL-2 Produktion pro Zelle. Das bedeutet, dass die beobachtete binäre IL-2 Regulation auf einer binären Aktivierung des gesamten zellulären NFATc2 in individuellen Zellen basierte, und NFATc2 als ein zellulärer Schalter und TCR-spezifischer Signaltransmitter ein graduelles Aktivierungssignal über den TCR in eine produktive Entscheidung der IL-2 Produktion und gleichzeitig in die Frequenz der IL-2 produzierenden Zellen übersetzte.

5.4.2 Die Bedeutung von NFATc2 in CD4^+ Th-Zellen

Keiner der aktivierungsabhängigen Transkriptionsfaktoren NFAT, NF- κ B und AP-1, die für die IL-2 Expression benötigt werden, sind als T-Zell-spezifische Proteine kategorisiert, sondern in vielen Zellen und Geweben detektierbar [38]. Dennoch scheinen sowohl die synergistischen Aktivierungsprofile als auch die Kombination der exprimierten Transkriptionsfaktoren der spezifische Auslöser einer entsprechenden Genexpression und spezifisch für die IL-2 Transkription in T-Zellen zu sein. Für NFATc2 konnte in dieser Arbeit, offenbar in Abhängigkeit des Differenzierungsgrads der Th-Zelle, eine differentielle Expression festgestellt werden, die Auswirkungen auf die IL-2 Expression hatte.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Aktivierungs- und Expressionsprofil von NFATc2 in Zellkernen und ganzen Zellen detektiert. Die Tatsache, dass NFATc2 eine nachgewiesene Halbwertszeit von 22 Stunden in stimulierten und unstimulierten Zellen besitzt [301, 302], unterstreicht in den hier gezeigten Ergebnissen zur Aktivität und Translokation von NFATc2, dass die Regulation von NFATc2 durch CaN und nicht durch Degradation und Proteinneusynthese von NFATc2 kontrolliert wurde. Die Expression von NFATc1 in CD4⁺ Th-Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt, da die Funktionen von NFATc1 vor allem in der Aufrechterhaltung der TCR-abhängigen IL-2 Expression und der weiteren Differenzierung gesehen werden [156, 303] und damit das Spektrum der initialen Stimulation überstieg.

Die differentielle Aktivierung und Bedeutung für die Transkription von NFATc1 und NFATc2 wurde bislang insbesondere bei der Th1/Th2 Zelldifferenzierung analysiert und diskutiert, da die funktionelle Aktivität der NFAT Proteine für die IL-2 Expression redundant zu sein scheinen. In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings ein zell-differenzierungsabhängiges und, trotz überlappender Bereiche, differentielles NFATc2 Expressionsprofil detektiert, das eine große Abhängigkeit der IL-2 Produktion von der NFATc2 Menge bestätigte. Biochemische Untersuchungen der proximalen Signalereignisse am TCR zeigten keine offensichtlichen Unterschiede zwischen kurzer und anhaltender Stimulation [185]. Daher wird vermutet, dass die andauernde Stimulation vor allem der Akkumulation des induzierenden Signals [102] und der Generation weiterer Signalmoleküle während dieser Initialphase der Stimulation dient, wie es auch für die stufenweise Aktivierung von Genen zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der T-Zellaktivierung beschrieben wurde [228, 304]. Dies gilt insbesondere bei der Aktivierung naiver CD4⁺ Th-Zellen, bei denen die Dauer der Rezeptorbindung über eine partielle oder komplette T-Zellaktivierung entscheidet und der Induktion weiterer Oberflächen- und Signalmoleküle zur Aufrechterhaltung und Amplifikation der TCR Signale dient [185], wie es auch für NFATc2 in den naiven CD4⁺ Th-Zellen in der vorliegenden Arbeit nach fünf Stunden Stimulation beobachtet wurde. Daher kann spekuliert werden, dass die limitierten Mengen an NFATc2 trotz optimaler CaN Stimulation eine letzte Hürde für die IL-2 Geninduktion in naiven CD4⁺ Th-Zellen darstellen und erst durch anhaltend lange Signale zur Generation von NFATc2 und weiterer Signalmoleküle überwunden werden können. Hinweise, dass eine differentiell exprimierte NFATc2 Menge oder eine aktivierungsabhängige Erhöhung einer bestehenden NFATc2 Proteinmenge entscheidende Konsequenzen für das Aktivierungs- und Differenzierungsprofil von CD4⁺ Th-Zellen haben, werden durch andere Untersuchungen bestätigt. Mercedes Rincon berichtete beispielsweise, dass sich Gedächtniszellen von naiven Th-Zellen durch höhere NFATc2 und NFATc1 Mengen unterscheiden [305]. Cron et.al. [306] zeigten zudem, dass sich in humanen restimulierten CD4⁺ Th-

Zellen das NFATc2 Niveau im Vergleich zu frisch isolierten CD4⁺ Th-Zellen deutlich erhöhte und mit einer verstärkten NFATc2 Aktivität und IL-4 Expression korrelierte, während Porter et.al. [106] die selektive Induktion von IFN- γ exprimierenden Th1-Zellen aus murinen Th-Zellen unter dem Einfluss von konstitutiv aktivem NFATc1 zeigte. Diehl et.al. [307] fanden ebenfalls Hinweise, dass IL-6 die Th2-Zelldifferenzierung und Expression von IL-4 durch eine starke Induktion der NFATc2 Expression förderte. Im Konflikt dieser redundanten und konträren Funktionen von NFAT Proteinen vermuteten Brogdon et.al. [308] daher, dass die TCR Signalstärke differentiell die NFATc2 und NFATc1 DNA Bindungsaffinität regulierte und durch Veränderung des NFATc2/NFATc1 Verhältnisses im Zellkern die IL-4 Expression in naiven CD4⁺ Th-Zellen unabhängig von STAT6 beeinflusste. Brogdon et.al. fanden bei starken TCR Signalen eine gleich starke Bindungsaffinität für NFATc2 und NFATc1 im Zellkern, die sich bei schwachen TCR Signalen in Richtung NFATc1 verschob und mit einer geringeren nukleären Lokalisation von NFATc2 gegenüber NFATc1 und einer IL-4 Expression korrelierte [308]. Diese Ergebnisse stimmen mit anderen Untersuchungen überein, in denen die Stärke der TCR-Signalgebung dramatische Veränderung des Th1/Th2 Differenzierungsprozesses verursachte und überwiegend Th1-Zellen bei starken TCR-Signalen und überwiegend Th2-Zellen bei schwachen TCR Signalen induzierte [11, 309].

5.4.3 Regulation der CaN Aktivität als Voraussetzung der NFATc2 Aktivierung

Eine Kardinalfrage der Ca²⁺/CaN kontrollierten NFATc2 Aktivierung bleibt die endogene Regulation der CaN Aktivität. CaN gilt als der zentrale Effektor Ca²⁺/CaM modulierter Signale [28, 104], indem CaN die in Abhängigkeit der Stärke der TCR Stimulation ausgelösten Ca²⁺ Signale in eine Aktivierungsreaktion übersetzt. Die über den TCR ausgelösten Ca²⁺ Signale bilden aktivierungsabhängig ein breites Spektrum an oszillierenden, amplituden- und frequenzmodulierten, zellspezifischen Ca²⁺ Mustern [60, 68]. Dass der Ionomycin modulierte Ca²⁺ Einstrom in der vorliegenden Arbeit bei der binären IL-2 Expression die CaN Aktivität regulierte, wurde durch die reproduzierbare Inhibierung und Induktion der binären IL-2 Expression durch Titration von CsA bei maximaler Stimulation mit Ionomycin deutlich. Die Modulation der CaN Aktivität durch Ionomycin oder CsA limitierte in einer Alles-oder-Nichts-Reaktion die Anzahl der reagierenden CD4⁺ Th-Zellen unabhängig ihres Differenzierungsstadiums und trotz optimaler Ko-Stimulation durch PMA. Aufgrund anderer Untersuchungen zur CaN Aktivität spekulierten Crabtree and Clipstone [35], dass eine geringe Expression von CaN Molekülen bzw. die CaN Aktivität ein limitierender Schritt in der T-Zellaktivierung sein könnte. Tatsächlich konnte durch Überexpression von CaN ein Anstieg der Sensitivität der Signalwege gegenüber ihren aktivierenden Stimulanzen be-

obachtet werden [28, 82, 299]. Zudem wurde in hypertrophischen adulten Herzen *in vivo* ein insgesamt erhöhtes Proteinniveau der CaNA Untereinheiten, verbunden mit einer erhöhten NFAT Aktivität, im Vergleich zu gesunden Herzen nachgewiesen [310, 311] und eine gewebsspezifische Kontrolle der CaN Aktivität über eine transkriptionelle Regulation beschrieben [312]. Die inhibierende Wirkung von CsA auf die CaN Aktivität bei der IL-2 Expression, wie sie in der vorliegenden Arbeit vorgestellt wurde, zeigte darüber hinaus, dass CaN seine Aktivität pro Zelle nicht nur als selbstregulatives Enzym mit eingebautem Ca^{2+} /CaM Schalter bestimmt, sondern durch weitere Faktoren über verschiedene Wirkmechanismen kontrolliert werden kann, wie es beispielsweise für endogene Inhibitoren der CaN Aktivität, Calcipressin (Csp1/MCIP/DSCR1), AKAP 79 und Cain/Cabin-1, belegt wurde [96, 313].

Aufgrund der vielfältigen Funktionen und der Verbreitung von CaN im Organismus liegt die Schlussfolgerung nahe, dass die Aktivität anderer Ca^{2+} /CaM abhängiger Enzyme unter bestimmten physiologischen Umständen oder in Abhängigkeit der Zelldifferenzierung benötigt wird, während die Aktivität von CaN abgeschaltet oder reguliert werden muss. Den einfachsten Weg zur Ausführung dieser differentiellen Regulation stellt die Expression spezifischer endogener Inhibitoren dar, die die zelluläre CaN Aktivität während der IL-2 Expression kontrollieren, wie es in der vorliegenden Arbeit durch die Aktivität des CsA/Cyclophilin-Komplexes auf die CaN Aktivierung simuliert wurde.

5.5 Modell des NFATc2 Schalters

Im Zusammenhang mit dem von Okamura et.al. [169] vorgeschlagenen Modell eines hypothetischen konformationellen Schalters für NFAT auf Molekülebene, lässt sich in Kombination mit den hier vorgestellten Ergebnissen ein Strukturmodell für die Bedeutung von NFATc2 als Schalter in CD4^+ Th-Zellen auf molekularer, auf zellulärer und auf Populationsebene erstellen (s. Abbildung 5.1). Okamura et.al. postulierten, dass die kooperative Dephosphorylierung von NFATc2 durch CaN an 13 Serin-Resten und eine damit verbundene Exposition der Kernlokalisationssequenz einen konformationellen Schalter auf Molekülebene zwischen der aktiven und der inaktiven Konformation von einzelnen NFATc2 Proteinen darstellt (Abbildung 5.1, links).

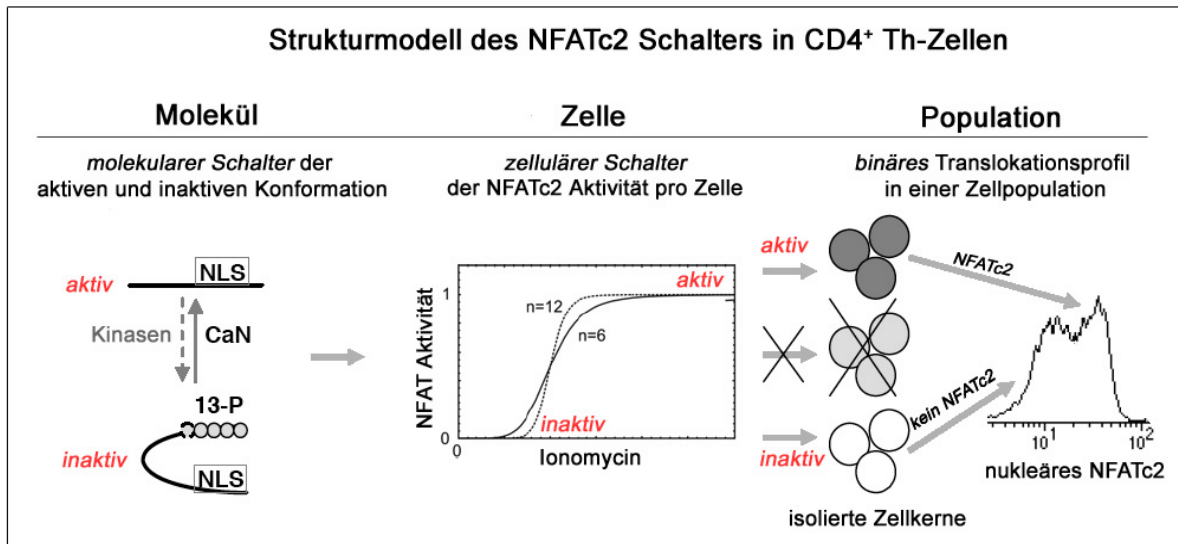


Abbildung 5.1 Strukturmodell des NFATc2 Schalters in CD4⁺ Th-Zellen. Die Schalterfunktion von NFATc2 kann auf drei Ebenen betrachtet werden: 1. Auf molekularer Ebene wirkt die Calcineurin-vermittelte kooperative Dephosphorylierung von 13 Serin-Resten an NFATc2 als konformationeller Schalter von der inaktiven zur aktiven Konformation am NFATc2 Molekül, wodurch die Kernlokalisationssequenz (NLS) exponiert wird. 2. Auf zellulärer Ebene bewirken nach Überschreitung des Aktivierungsschwellenwertes durch Ionomycin und der positiven Kooperativität der Dephosphorylierungen am NFATc2 Molekül, bereits 7 Dephosphorylierungsstellen (Hill-Koeffizient $n=6$) eine steile Stimulations-Reaktionskurve, die die nukleäre Translokation aller NFATc2 Moleküle pro Zelle als zellulären Schalter erklärt. 3. Auf Populationsebene findet aufgrund des binären Translokationsprofils von NFATc2 in Abhängigkeit der Stimulation eine Aufspaltung in Zellen mit komplett nukleärem NFATc2 und Zellen ohne nukleärem NFATc2 statt.

Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit ermittelten Daten zur Ionomycin-abhängigen binären IL-2 Expression konnte eine positive Kooperation in der Dephosphorylierung von bereits 7 der 13 Serin-Resten als ausreichend für eine steile sigmoidale Aktivierungskurve für NFATc2 nach gradueller Stimulation ermittelt werden (Prof. Thomas Höfer, Humboldt-Universität Berlin [178]). Vorausgesetzt CaN liegt im Bereich der Substratsättigung und in lokaler Nähe zu NFATc2 und erreicht die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}), wird mit hoher Wahrscheinlichkeit die Kooperation für eine quantitative Dephosphorylierung von NFATc2 auf zellulärer Ebene induziert. Dies führt zu einer schalterähnlichen Aktivierung und nukleären Translokation des gesamten zellulären NFAT (Abbildung 5.1, Mitte) und resultiert in dem detektierten Alles-oder-Nichts-Translokationsprofil für NFATc2 in isolierten Zellkernen einer Zellpopulation (Abbildung 5.1, rechts).

In Abhängigkeit eines graduell steigenden Stimulationssignals kann daher in einer zunehmenden Anzahl Zellen eine zelluläre Schalterentscheidung für die Transkription stark NFATc2-abhängiger Gene getroffen werden. Hinweise für eine allgemeingültige Funktion dieses zellulären NFAT Schalters finden sich auch für andere NFAT-aktivierungsabhängige Gene. In der Arbeitsgruppe Baumgraß wurde in humanen CD4⁺ Gedächtniszellen ein ebenfalls binäres Expressionsprofil für das Zytokin IFN- γ nach CsA oder Ionomycin Titration festgestellt. Im Gegensatz dazu zeigte der NFAT-unabhängige, aber stark NF- κ B-abhängige Aktivierungsmarker CD69 [314] unter denselben Stimulationsbedingungen ein graduelles Expressionsprofil. Darüber hinaus finden sich auch Hin-

weise für die generelle Relevanz des NFAT-Schalters durch eigene Untersuchungen mit murinen CD4⁺ Th-Zellen aus DO.11.10 Mäusen, die für eine Woche in Richtung Th2 polarisiert worden waren. Die Expression des Th2-Effektorzytokins IL-4 wurde nach Restimulation mit PMA/Ionomycin und Titration CsA ebenfalls binär reguliert. Aufgrund der IL-2-ähnlichen, modularen Promotorstruktur und CsA-sensitiven Expression der Effektorzytokine IFN- γ und IL-4 [279], kann eine NFAT-basierte binäre transkriptionelle Induktion daher auch hier als sehr wahrscheinlich betrachtet werden, wurde aber speziell für NFATc2 oder NFATc1 bisher nicht näher untersucht.

5.6 Die Bedeutung des NFATc2 Schalters für das Immunsystem

Die Reaktionsfähigkeit des Immunsystems auf vielfältige Signale wird durch fundamentale Entscheidungsprozesse determiniert, welche die Unterscheidung zwischen Selbst- und Fremdantigen sicherstellen. Die erfolgreiche Induktion einer Immunantwort mit klonaler Expansion und Differenzierung zu Effektor/Gedächtniszellen hängt dabei von der Dauer und Stärke der TCR Aktivierung ab. Die Signalstärke wird über die Effektivität einer seriellen TCR Aktivierung festgelegt, die durch Dauer, Dichte und Affinität der Antigen-TCR Interaktion bestimmt wird und die stufenweise die T-Zellaktivierung mit hierarchischen Schwellenwerten für Proliferation, Differenzierung und Apoptose reguliert [101, 241, 251, 254, 315]. Die partielle Aktivierung von Th-Zellen reflektiert somit die Stärke der Stimulation und wird durch die Unfähigkeit oder eingeschränkte Fähigkeit, IL-2 zu produzieren, charakterisiert [291, 316]. Ein essentieller Unterschied zwischen partieller und voller Aktivierung der aktivierten Th-Zellen scheint daher in der Verfügbarkeit von IL-2 zu liegen. Die Generation anergischer Zellen durch partielle Stimulation oder Stimulation ohne kostimulatorisches Signal ist durch Zugabe von exogenem IL-2 reversibel [214]. Die Expression von IL-2 infolge einer optimalen Stimulation erhöht zudem die ‚Fitness‘ der Th-Zellen und bildet die Grundlage zu erhöhten Effektorfunktionen und Überlebenschancen [239, 317]. Im Gegensatz dazu benötigen regulatorische T-Zellen suboptimale Antigenkonzentrationen und IL-2 für ihre Generation und Aktivität [15, 318, 319]. Daher kann angenommen werden, dass die unterschiedlichen Zellschicksale durch unterschiedliche Schwellenwerte in der Anzahl bzw. Avidität der T-Zell-Rezeptoren und auch IL-2/IL-2-Rezeptor Interaktionen festgelegt ist. Bislang konnte kein für die Festlegung dieser Schwellenwerte verantwortlicher Signaltransduktionsprozess eindeutig identifiziert werden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass NFATc2 ein zellulärer Schalter der unmittelbar TCR-abhängigen Ca²⁺/CaN Signaltransduktion ist. Der NFATc2 Schalter wäre diesbezüglich eine mögliche Antwort auf die Frage, wie durch starke oder schwache TCR Signale differentielle Aktivie-

lungsmuster in individuellen Th-Zellen ausgelöst werden könnten, indem eine Alles-oder-Nichts Entscheidung für die zelluläre NFATc2 Aktivität zu einer zellulären Entscheidung in der Aktivierung der individuellen Zelle wird. Damit bestimmt der NFATc2 Schalter nicht nur einen individuellen effektiven Schwellenwert der TCR-abhängigen Signalkaskade in einer CD4⁺ Th-Zelle, sondern bildet darüber hinaus einen funktionellen zellulären Schalter zur Ausübung eines spezifischen T-Zellaktivierungs- oder Differenzierungsprogramms. Dies wird insbesondere über die Verfügbarkeit einer kooperativen Aktivität mit AP-1 bei der T-Zellaktivierung oder mit Foxp3 bei der Ausübung der supprimierenden T-Zellaktivität aber auch in Abwesenheit von AP-1 bei der Auslösung der Anergie sichtbar [105, 107, 275]. Zudem übersetzt der NFAT-Schalter die Signalstärke bzw. die Antigen dosis der antigenspezifischen T-Zellaktivierung in die effektive Anzahl an aktivierten CD4⁺ Th-Zellen und bestimmt damit den Grad der ausgelösten Immunreaktion. Der NFAT-Schalter kontrolliert dadurch nicht nur die individuelle zelluläre Entscheidung einer TCR-abhängigen Aktivierung in einer CD4⁺ Th-Zelle, sondern agiert darüber hinaus als Entscheidungsträger bezüglich der Anzahl an effektiven CD4⁺ Th-Zellen auf Populationsebene. Am NFAT-Schalter kann somit die Entscheidungsebene der TCR-abhängigen Aktivierung lokalisiert und festgelegt werden. Dies weist über die von Kendall Smith postulierte *Quantal Theory of Immunity* [320] hinaus, in der die Möglichkeit zur Unterscheidung distinkter aktivierungsabhängiger Prozesse eines T-Zell-basierten Immunsystems nur in Abhängigkeit einer kritischen Anzahl an aktivierten T-Zell-Rezeptoren und IL-2-Rezeptoren beschrieben wird, die entsprechend ihres ausgelösten Aktivierungsprofils in einer aktivierungsspezifischen Reaktion der Zelle resultiert. Hierdurch könnte erklärt werden, wie das Immunsystem allein über die Affinität und Dichte der aktivierten T-Zell-Rezeptoren und über die Expression von IL-2 sowohl in der Peripherie als auch im Thymus während der Thymozytenreifung mit zunehmender Signalstärke über die Ausführung von Anergie, Toleranz, klonaler Expansion und Apoptose bzw. ‚Death by Neglect‘, positiver Selektion, T_{reg} Differenzierung und negativer Selektion differenzieren könnte [320]. In allen genannten Fällen wäre der NFAT-Schalter als Folge der verfügbaren CaN Aktivität, reguliert über endogene Inhibitoren und die TCR Avidität, und als Regulator der IL-2 Expression, ein zellulärer Schalter und Überträger verschiedener Differenzierungsprogramme in individuellen Zellen des Immunsystems in Reaktion auf externe Stimulationssignale über den T-Zell-Rezeptor. Der zelluläre NFAT-Schalter ist damit der Übersetzer eines graduellen, quantitativen T-Zell-Rezeptor-Signals in eine qualitative T-Zellantwort in individuellen CD4⁺ Th-Zellen.