

Aus dem
Department für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und
Pharmakogenomik der Universität Tübingen
Abteilung Pharmakologie und Experimentelle Therapie und
Toxikologie

**Die molekulare Rolle von SLy1 in der
Thymozytenentwicklung**

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

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

**vorgelegt von
Kümmerle, Helen Sophie**

2025

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. S. Beer-Hammer

2. Berichterstatter: Professorin Dr. K. Klingel

Tag der Disputation: 19.03.2025

Inhalt

Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem.....	1
1.1.1 Entwicklung der T-Zellen im Thymus.....	1
1.1.2 Notch-Signalweg.....	4
1.1.3 IL-7/IL-7-Rezeptor-Signalweg.....	5
1.2 SLy/Sash-Proteinfamilie	8
1.2.1 SLy1 in Entwicklung und Funktion der T-Zellen.....	8
1.3 Zellzyklus und Apoptose	10
1.4 Transkriptionsfaktoren in der Thymozytenentwicklung.....	12
1.5 Zielsetzung der Arbeit	14
2 Material und Methoden.....	15
Material	15
2.1 Materialliste	15
2.2 Antikörper.....	17
2.3 Puffer und Lösungen.....	19
Methoden	21
2.4 Versuchstiere	21
2.4.1 Mausmodell	21
2.4.2 Tierzucht und Haltung.....	21
2.4.3 Organentnahme.....	22
2.5 Molekularbiologische Methoden.....	22
2.5.1 Genotypisierung der Mäuse.....	22
2.6 Zellbiologie	23
2.6.1 Zellisolation.....	23
2.6.2 Inkubation und Stimulation	23
2.6.3 Stimulation der SLy1- und p-SLy1-Expression	23
2.7 Proteinbiochemische Methoden	23

2.7.1	Proteingewinnung	23
2.7.2	Nukleäre und zytoplasmatische Auftrennung	24
2.7.3	Gelelektrophoretische Auftrennung	24
2.7.4	Western Blot	25
2.8	Durchflusszytometrie (FACS).....	25
2.8.1	Gatingstrategie	27
2.9	MACS.....	30
2.10	Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP).....	30
2.11	qPCR.....	31
2.12	Statistische Methoden	32
3	Ergebnisse	33
3.1	Proteinbiochemische Analyse der Lokalisation von SLy1 und p-SLy1	33
3.2	Analyse der Expression von Notch1 und Notch3 in SLy1 ^{KO} -Thymozyten	35
3.3	Analyse der intrazellulären Signalwege in SLy1 ^{KO} - Thymozyten nach IL- 7R-Stimulation.....	36
3.3.1	Analyse des IL-7R-Signalwegs.....	36
3.3.2	Auswirkungen der SLy1-Defizienz auf die Apoptose	49
3.4	Zellzyklus in SLy1 ^{KO} -Thymozyten	55
3.5	Analyse der Transkriptionsfaktoren am <i>Il7r</i> -Gen	56
4	Diskussion.....	58
4.1	Analyse der Lokalisation von SLy1 und p-SLy1	58
4.2	Auswirkung der SLy1-Defizienz auf die Expression von Notch1 und Notch3 in Thymozyten.....	59
4.3	Analyse der intrazellulären Signalwege in Thymozyten nach IL-7R- Stimulation	61
4.3.1	Analyse des IL-7R-Signalwegs.....	61
4.3.2	Auswirkungen der SLy1-Defizienz auf die Apoptose	63
4.4	Auswirkungen der SLy1-Defizienz auf den Zellzyklus.....	65
4.5	Analyse der Wirkung von SLy1 auf die Transkriptionsfaktoren des <i>Il7r</i> - Gens.....	66
4.6	SLy1 im klinischen Kontext	69
5	Zusammenfassung.....	71

6	Literaturverzeichnis	72
7	Anhang	85
8	Erklärung zum Eigenanteil	I
9	Veröffentlichungen	II
9.1	Posterpräsentation	II
9.2	Publikation in Vorbereitung	II
10	Danksagung	III

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der intrathymischen T-Zellentwicklung	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Struktur von SLy1	9
Abbildung 3: Gatingstrategie für Thymozyten und T-Zellen aus Thymus oder Milz	27
Abbildung 4: Intrazelluläre Bestimmung der Jak-Stat5-Signalkaskade	28
Abbildung 5: Untersuchung der Apoptose in Thymozyten und T-Zellen.....	29
Abbildung 6: Bestimmung der Proliferation von stimulierten Thymozyten	29
Abbildung 7: Expressionsanalyse von SLy1 und p-SLy1 in Thymozyten nach Stimulation.....	34
Abbildung 8: Expressionsanalyse von Notch1 und Notch3 in Thymozyten	36
Abbildung 9: Darstellung der Stat5-Expression nach Stimulation.....	37
Abbildung 10: Analyse der Stat5-Expression	39
Abbildung 11: Analyse der p-Stat5-Expression	40
Abbildung 12: Darstellung der Phosphorylierung von Stat5	41
Abbildung 13: Verhältnis von p-Stat5 zu Stat5	42
Abbildung 14: Analyse der p-Jak1-Expression	44
Abbildung 15: Analyse der p-Jak3-Expression	46
Abbildung 16: Expression von Stat5, p-Stat5, p-Jak1 und p-Jak3 in Thymozyten	47
Abbildung 17: Expression von Stat5, p-Stat5, p-Jak1 und p-Jak3 in DN-Thymozyten.....	48
Abbildung 18: Expression von Stat5, p-Stat5, p-Jak1 und p-Jak3 in T-Zellen..	49
Abbildung 19: Analyse der Apoptose in Thymozyten	51
Abbildung 20: Analyse der Apoptose in DN-Thymozyten.....	52
Abbildung 21: Analyse der Apoptose in T-Zellen.....	54
Abbildung 22: Zellzyklusanalyse in Thymozyten	55
Abbildung 23: Proliferation in stimulierten Thymozyten.....	56
Abbildung 24: ChIP-Assay von PU.1 am <i>Il7r</i> -Gen in DN-Thymozyten	57
Abbildung 25: Modell der möglichen Interaktion von SLy1 mit dem IL-7R-Signalweg.....	68

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte.....	15
Tabelle 2: Materialien/Kits	15
Tabelle 3: Chemikalien.....	16
Tabelle 4: Fluoreszenzgekoppelte Farbstoffe/Antikörper	17
Tabelle 5: Western Blot: Primäre Antikörper	18
Tabelle 6: Western Blot: Sekundäre Antikörper.....	18
Tabelle 7: ChIP-Antikörper	18
Tabelle 8: Primer	19
Tabelle 9: Puffer	19
Tabelle 10: Stimulanzen	21
Tabelle 11: Programm für SLy1-Genotypisierung	22
Tabelle 12: MACS-Material	30
Tabelle 13: Programm LightCycler.....	31
Tabelle 14: Ergebnisse der Analyse der Lokalisation von SLy1 und p-SLy1....	85
Tabelle 15: Relative Notch-Proteinexpression in SLy1 ^{WT} - und SLy1 ^{KO} -Thymo- zyten.....	85
Tabelle 16: Vergleich der Expression der IL-7R-Signalwegproteine	86
Tabelle 17: Zellzyklusanalyse in Thymozyten	86
Tabelle 18: Analyse der IL-7R-Signalweganalyse nach IL-7R-Stimulation.....	87
Tabelle 19: Analyse der IL-7R-Signalweganalyse nach TZR-Stimulation	89
Tabelle 20: Analyse der Apoptose nach IL-7R-Stimulation	91
Tabelle 21: Analyse der Apoptose nach TZR-Stimulation	92

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
Abb.	Abbildung
Bcl	<i>B-cell lymphoma</i>
bp	Basenpaar
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
ca.	circa
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDK	Cyclin-abhängige Kinasen
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
dd	doppelt destilliert
DL	Delta-like
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DN-Thymozyten	doppelt-negative Thymozyten (CD4 ⁻ , CD8 ⁻)
DP-Thymozyten	doppelt-positive Thymozyten (CD4 ⁺ , CD8 ⁺)
DTT	Dithiothreitol
ETP	<i>early T-cell progenitor</i> , entspricht dem DN1-Stadium
FCS	Fetales Kälberserum
FMO	<i>Fluorescence Minus One</i>
Fox	<i>Forkhead-box</i>
FSC	<i>forward scatter scale</i>
GABP	<i>GA-binding protein</i>
h	Stunde
HLH	Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktorfamilie
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IC	Input Kontrolle
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-7R	Interleukin-7-Rezeptor
Jak	Janus-Kinase
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
M-Phase	Mitosephase
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>
Mdm2	<i>mouse double minute 2 homolog</i> -Ligase
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
ml	Milliliter

NICD	intrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NLS	Nukleäres Lokalisierungssignal
ns	nicht signifikant
p	phosphoryliert
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP	Polypropylen
pT α	Prä-TZR- α Komplex
qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
RAG	<i>recombination-activating gene</i>
rev	<i>reverse</i>
Rb	Retinoblastomprotein
RNA	Ribonukleinsäure
s.	siehe
S-Phase	Synthesephase
SAM	<i>sterile alpha motif</i>
SCID	<i>severe combined immunodeficiency disease</i>
Ser	Serin
SH3	<i>Src-homology 3</i>
SLy	<i>SH3 lymphocyte protein</i>
SLy1 Δ/Δ	Trunkierte SLy1-Variante
SLy1 KO	SLy1-defizient
SOCS	<i>suppressor of cytokine signaling</i>
SP-Thymozyten	CD4 $^{+}$ - oder CD8 $^{+}$ -Thymozyten
SSC	<i>side scatter scale</i>
Stat	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
T-ALL	T-Zell akute lymphatische Leukämie
Tab.	Tabelle
TBS/T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TCF-1	T-Zell Faktor 1
TF	Transkriptionsfaktor
Thymozyten	alle isolierten Thymozyten, Synonym für Gesamthymozyten
TNF	Tumornekrosefaktor
TZR	T-Zellrezeptor
unst.	unstimuliert
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem setzt sich aus verschiedenen Komponenten zusammen, die in komplexer Zusammenarbeit den Körper vor exogenen Pathogenen, sowie fehlerhaften körpereigenen Zellen schützen. Es besteht aus mechanischen und chemischen Barrieren, aber auch aus verschiedenen Zelltypen, lymphatischen Organen, humoralen Faktoren und Zytokinen. Das Immunsystem teilt sich in das angeborene und erworbene Immunsystem.

Das angeborene Immunsystem bildet die schnelle, unspezifische Abwehr auf körperfremde Strukturen. Es besteht unter anderem aus Phagozyten und Mastzellen, die in Zusammenarbeit fremde Oberflächenstrukturproteine erkennen und eliminieren können. Eine spezifische Abwehr gegen Viren oder Tumorzellen bilden Natürliche Killer (NK)-Zellen. Das erworbene Immunsystem ist die spezifisch gegen Pathogene gerichtete Abwehr. Durch die zielgerichtete Adaptation braucht diese Form der Abwehr länger. B-Zellen produzieren nach Kontakt mit antigenpräsentierenden Zellen neutralisierende Antikörper, während T-Zellen nach der Aktivierung zellgerichtet auf MHC Klasse I (MHC-I) oder MHC Klasse II (MHC-II) präsentierte Pathogene wirken.

Für diese Arbeit wird im Folgenden die Entwicklung der T-Zellen im Thymus genauer betrachtet.

1.1.1 Entwicklung der T-Zellen im Thymus

Für die Entwicklung der T-Zellen wandern unreife Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in den Thymus ein. Aus lymphoiden Vorläuferzellen können sie sich noch zu B-, T- oder dendritischen Zellen differenzieren. Eine Festlegung der Vorläuferzellen auf die T-Zelllinie findet durch verschiedene Faktoren und Signalwege statt. Eine wichtige Rolle in den frühen Entwicklungsstufen spielen dabei der IL-7-Signalweg und der Notch-Signalweg, die in den folgenden Abschnitten genauer beschrieben werden.

1. Einleitung

Die verschiedenen Entwicklungsstufen lassen sich durch die Oberflächenexpression von CD4, CD8 und dem TZR $\alpha\beta$ charakterisieren. In den frühen Entwicklungsstufen findet sich auch eine CD117 (c-Kit) Expression, die über das *B-cell lymphoma* (Bcl)-2 Protein für eine Proliferation der Zellen sorgt (Rodewald et al., 1995; Akashi und Weissman, 1996). In den ersten Entwicklungsstufen, bestehend aus den sogenannten doppelt-negativen (DN-) Thymozyten, findet sich keine Expression von CD4 oder CD8 (Godfrey et al., 1993). Zur weiteren Unterscheidung der DN-Thymozyten wird die Expression von CD44 und der Interleukin-2 Rezeptor α -Kette (CD25) betrachtet (Godfrey et al., 1993). Entsprechend können die Zellen in vier verschiedene Stadien eingeteilt werden (Godfrey et al. 1993). Das DN1-Stadium zeichnet sich durch CD44⁺ und CD25⁻ aus (Godfrey et al., 1993). Im nächsten Stadium (DN2) findet durch die Hochregulation der Expression von CD25 eine erste Proliferation des Zellklons statt (Godfrey et al., 1993). Im Prä-T-Zellstadium (DN3) finden sich CD44⁻ CD25⁺-Thymozyten, die nun vollständig in die T-Zelllinie eingetreten sind (Godfrey et al., 1993). Im DN4-Stadium wird zusätzlich die Expression von CD25 heruntergefahren (Godfrey et al., 1993). Dabei kommt es zu einer Neuordnung und Expression der TZR β -, TZR γ - und TZR δ -Gene, gesteuert durch die *recombination-activating gene* (RAG)-1 und 2 (Oettinger et al., 1990; Mombaerts et al. 1992; Levelt et al. 1995). Die RAG-1 und 2 Expression für die V(D)J (*variable-diversity-joining*) Rekombination der β -Kette wird dabei durch Interleukin-7 (IL-7) gestützt (Muegge et al., 1993). Nach erfolgreicher Expression eines TZR β -Allels folgt die β -Selektion (Dudley et al. 1994). Bei der β -Selektion formiert sich der prä-TZR durch die Zusammenlagerung von prä-TZR α (pT α) und funktionierender β -Kette zusammen mit CD3, was zu Proliferation und Expansion der Zellen führt (Groettrup et al. 1993, Dudley et al. 1994). Durch den funktionierenden prä-TZR Komplex erhalten die Zellen außerdem Signale zu einer Neuordnung der α -Kette, sowie der Expression von CD4- und CD8-Corezeptoren auf der Oberfläche (Fehling und von Boehmer, 1997). Mit diesem Schritt treten die Thymozyten in das doppelt-positive (DP-) Stadium ein, in dem sich mit 80 bis 90 % ein Großteil der Thymozyten befindet (Fehling und von Boehmer, 1997). Nach Bildung des TZR $\alpha\beta$ -Rezeptors auf der Zelloberfläche

1. Einleitung

findet eine Testung der Kompatibilität mit MHC-Komplexen und den variabel präsentierten exogenen und endogenen Antigenen auf den Stromazellen des Thymus statt (Klein et al., 2001; Derbinski et al., 2008; Takahama et al., 2010). Während der positiven Selektion erhalten die Zellen Signale für die Expression von RAG-1 und 2, und folglich weitere Signale für Überleben, Differenzierung und Migration (Takahama et al., 2010). Dabei sind Signale von kortikalen Epithelzellen in der Umgebung entscheidend (Takahama et al., 2010). Zellen ohne passenden Rezeptor gehen durch fehlende Signale der kortikalen Epithelzellen in die sogenannte *apoptosis by neglect* und werden durch Makrophagen phagozytiert (Suhr und Sprent, 1994; Klein et al., 2014). Umgekehrt führt eine zu starke Bindung des TZR an die MHC-Komplexe bei der negativen Selektion zur Apoptose der Zellen, womit eine Autoreaktivität der späteren T-Zellen verhindert wird (Alam et al. 1996; Suhr und Sprent, 1994). Nach erfolgreicher Selektion entstehen CD4⁺- oder CD8⁺-T-Zellen (SP) (Petrie, 2002). Einige der dabei beteiligten Signalwege werden in den folgenden Abschnitten genauer beschrieben. Eine schematische Übersicht findet sich in Abbildung 1. Die CD4⁺- oder CD8⁺-Zellen treten als reife, naive T-Zellen aus dem Thymus in den Blutkreislauf ein (Petrie, 2002). Mithilfe des TZRαβ-Rezeptors sowie der Corezeptoren CD4 oder CD8 können die reifen T-Zellen Peptidantigene auf MHC-I oder MHC-II erkennen. Dabei bindet CD4 spezifisch an MHC-II und CD8 an MHC-I.

Während Vorläuferzellen aus dem Knochenmark an der Grenze zwischen Medulla und Kortex in den Thymus eintreten, wandern die Zellen im Laufe ihrer Entwicklung von der äußeren Medulla durch den Kortex bis zur subkapsulären Zone, wo der Übergang vom DN- zum DP-Stadium stattfindet (Lind et al., 2001; Klein et al., 2014). Nach Abschluss von positiver und negativer Selektion wandern die Thymozyten in Richtung Medulla (Petrie, 2002). Jeder Abschnitt des Thymus bietet dabei eine einzigartige Umgebung für die einzelnen Entwicklungsschritte (Petrie, 2002).

1. Einleitung

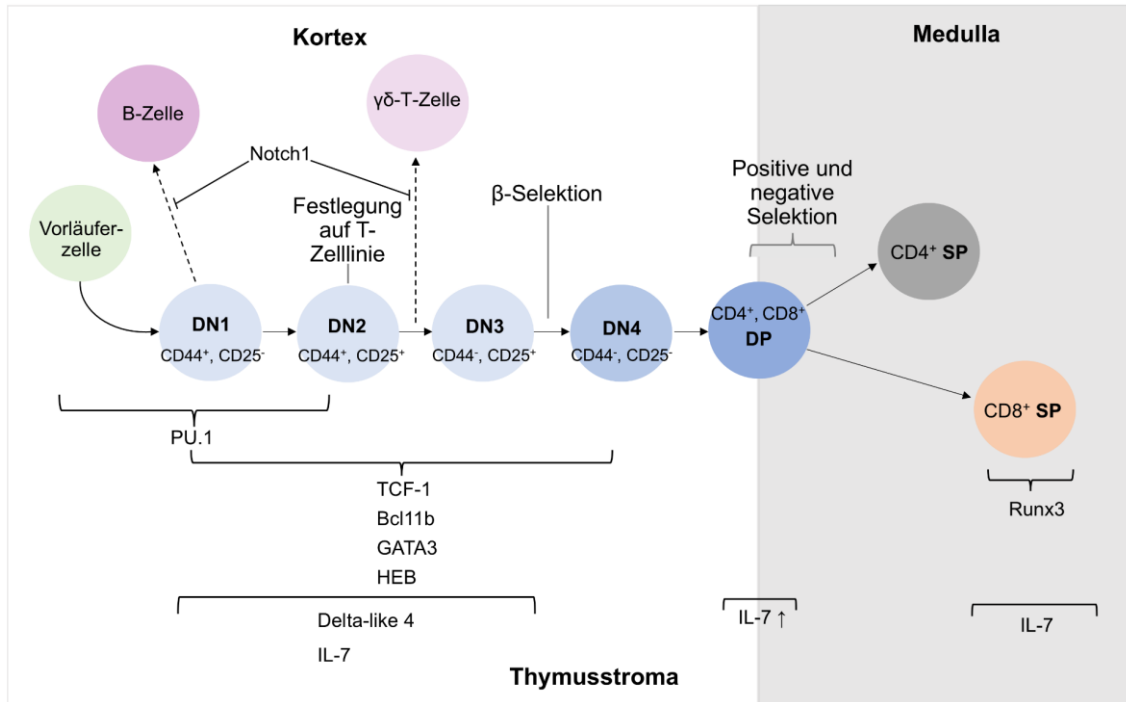


Abbildung 1: Schematische Darstellung der intrathymischen T-Zellentwicklung

Übersicht über die T-Zellentwicklung im Thymus. Die verschiedenen Stadien und Entwicklungsschritte sind schematisch dargestellt. Beteiligte Transkriptionsfaktoren sind mit Klammern gekennzeichnet. Signale, die von Stromazellen des Thymus bereitgestellt werden, sind unten im Bild mit Linien gekennzeichnet. Die Wanderung der Thymozyten zwischen Kortex und Medulla ist schematisch dargestellt. Schaubild modifiziert und erweitert nach Shah und Zúñiga-Pflücker, 2014.

1.1.2 Notch-Signalweg

Die Notch-Signalkaskade spielt als Interaktion zwischen Zellen eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Differenzierung von verschiedenen Zellpopulationen bis zur Bildung von Organen. Die Signalübertragung erfolgt dabei zwischen benachbarten Zellen. Es sind vier heterodimere transmembranäre Notch-Rezeptoren (Notch1-4) und fünf Notch-Liganden, Jagged 1 und 2 sowie Delta-like 1, 3 und 4 beschrieben (Shah und Zúñiga-Pflücker, 2014). Bei der Bindung eines Liganden an den Rezeptor wird durch eine proteolytische Spaltung die intrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors (NICD) abgespalten (Schroeter et al., 1998). Im Nukleus interagiert NICD mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren, wodurch die Transkription von verschiedenen Zielgenen aktiviert wird (Jarriault et al., 1995). Im Thymus spielt die Interaktion von Notch1 und Delta-like 4 auf Epithelzellen für die T-Zelldifferenzierung in den frühen Entwicklungsstufen eine entscheidende Rolle (Hozumi et al., 2008; Koch et al.,

2008). Für eine erfolgreiche T-Zellentwicklung ist vor allem Notch1 und in späteren Stadien auch Notch3 entscheidend, während Notch2 in der B-Zellentwicklung eine wichtige Rolle spielt (Saito et al., 2003). In den DN-Stadien ist eine hohe Notch1-Expression notwendig, im DP-Stadium wird Notch1 herunterreguliert, während im SP-Stadium wieder eine mittlere Notch1-Expression vorhanden ist (Hasserjian et al., 1996). Bei verminderter Notch1-Expression kommt es zu einer verminderten $\alpha\beta$ T-Zellzahl und es entstehen mehr B-Vorläuferzellen im Thymus (Radtke et al., 1999). Notch nimmt ebenfalls Einfluss auf die $\alpha\beta$ TZR- oder $\gamma\delta$ TZR-Entscheidung (Washburn et al., 1997). Bei einer hohen Expression des Notch1-Rezeptors bilden sich mehr $\alpha\beta$ T-Zellen (Washburn et al., 1997). Bei einem verminderten oder defekten Notch1-Rezeptor ist die Differenzierung zu $\gamma\delta$ T-Zellen nicht beeinträchtigt oder findet vermehrt statt, wenn die Zellen eine reduzierte Notch1-Rezeptordichte im Vergleich zu benachbarten Zellen haben (Washburn et al., 1997). Für den Ablauf der β -Selektion wird ebenfalls eine hohe Expression von Notch-Signalen benötigt (Wong et al., 2012). Die Regulation findet über den PI3K/Akt-Signalweg durch eine Modulation von Hes1, Phosphatase- und Tensin-Homolog (PTEN) und c-Myc statt (Wong et al., 2012). Direkte Zell-Zellinteraktionen über Delta-like 4 Signale sind ebenfalls notwendig für die Transition zu DP (Hirano et al., 2015). Eine Aktivierung von Notch beeinflusst dabei auch die Entwicklung zu CD4⁺- oder CD8⁺-SP-T-Zellen, wobei mehr CD8⁺-SP-Zellen entstehen (Robey et al., 1996). Während der späten DN-Stadien findet sich ebenfalls eine hohe Notch3-Expression, während sie beim Übergang zu DP abfällt (Felli et al., 1999). Notch3 aktiviert in Kombination mit dem prä-TZR NF- κ B, was folglich zu Überleben, Schutz vor Apoptose und Proliferation der Zelle führt (Voll et al., 2000; Vacca et al., 2006).

1.1.3 IL-7/IL-7-Rezeptor-Signalweg

Ein weiterer wichtiger Signalweg für die Entwicklung der T-Zellen ist der IL-7-Signalweg. Wie Notch gehört auch IL-7 zu der einzigartigen Umgebung des Thymus, die für die Entwicklung der T-Zellen in den sogenannten Nischen notwendig ist. Die entsprechenden Zytokine werden im Thymus vor allem von Epithelzellen und mesenchymalen Stromazellen produziert (Shitara et al., 2013).

1. Einleitung

Die Epithelzellen mit der höchsten IL-7 Produktion finden sich dabei im adulten Thymus primär in der kortikomedullären Verbindungszone (Alves et al., 2009).

Der IL-7-Rezeptor (IL-7R) setzt sich aus der α - und γ -Kette zusammen. Das *Il7r*-Gen, das die IL-7R α -Kette kodiert, besteht aus 8 Exons mit einer Größe von 24 kbp in der Maus und 19 kbp im Menschen mit hochkonservierten Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren zwischen verschiedenen Spezies (Pleiman et al., 1991). IL-7 bindet mit hoher Affinität an die α -Kette und in der Folge wird die γ_c -Kette rekrutiert und es erfolgt die Dimerisierung des Rezeptors (Jiang et al., 2005). Es gibt Hinweise, dass der IL-7R α auf der Zelloberfläche auch ohne eine Bindung von IL-7 in inaktiver Form als Homodimer oder mit der γ_c -Kette als Heterodimer vorliegt (McElroy et al., 2012). Durch die Dimerisierung kommen die mit der IL-7R α -Kette assoziierte Januskinase 1 (Jak1) und die an die IL-7R γ_c -Kette gebundene Januskinase 3 (Jak3) in Kontakt und phosphorylieren und aktivieren sich damit gegenseitig (Suzuki et al., 2000; Jiang et al., 2005). Dadurch werden Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren *signal transducers and activators of transcription* (Stat)-Proteine 1, 2, 3 und 5 geschaffen. Durch IL-7 werden in T-Zellen dabei vor allem Stat5a/b und zu einem geringeren Anteil auch Stat1 und Stat3 aktiviert (Yu et al., 1998). Dabei können Stat5a und Stat5b durch Jak1 und Jak3 phosphoryliert werden (Foxwell et al., 1995). Die Dimerisierung von Stat5 und Translokation in den Nukleus führt zur Aktivierung spezifischer Gene (Foxwell et al. 1995). Durch die Regulation der anti-apoptotischen Bcl-2-Proteinfamilie nimmt IL-7 Einfluss auf das Überleben und die Proliferation der Zellen (Sentman et al., 1991; von Freeden-Jeffry et al., 1997). Dabei spielt auch die Regulation von pro-apoptotischen Faktoren wie zum Beispiel Bax eine Rolle (Khaled et al., 2002).

Bei *in vivo* Versuchen mit anti-IL-7-Antikörpern kommt es zu einer starken Reduktion der Thymus-Zellzahl mit dem größten Verlust bei DP-Zellen, was auf eine wichtige Rolle von IL-7 in den frühen Stadien hinweist (Bhatia et al., 1995). Bereits in frühesten Stadien der Entwicklung bei den *early T-cell progenitors* (ETP) oder DN1 führt ein Fehlen von IL-7-Signalen zu einer kleineren Zellpopulation unter anderem durch eine gestörte Regulation des Zellzyklus (Paiva et al., 2022). Ab Stadium DN2/DN3 ist der IL-7-Signalweg für Proliferation

1. Einleitung

und Überleben entscheidend (von Freedon-Jeffry et al., 1997). Es zeigte sich, dass in diesen Stadien die Rekombination der γ -Kette, die für die Entwicklung der $\gamma\delta$ TZR-T-Zellen benötigt wird, durch IL-7R-Signale entscheidend mitreguliert wird (Maki et al., 1996). Für den Ablauf der positiven Selektion zu einer Testung des TZR in DP-Zellen wird eine Signalübertragung über den IL-7-Signalweg unter anderem durch *suppressor of cytokine signaling* (SOCS)-1 aktiv unterdrückt (Yu et al., 2006). Nach erfolgreicher positiver Selektion wandern die Thymozyten weiter Richtung Medulla zur kortikomedullären Verbindungszone mit hohen IL-7-Spiegeln, wobei deutlich wird, dass eine extrinsische Steuerung der Zytokinkonzentration auch durch eine räumliche Verteilung erreicht wird (Alves et al., 2009). Das zeigt sich auch an der Differenzierung der nun intermediären CD4⁺CD8⁻-Zellen zu entweder CD4⁺- oder CD8⁺-SP-Zellen, an der IL-7 ebenfalls beteiligt ist (Yu et al., 2003). Eine höhere extrinsische IL-7-Konzentration und folglich höhere Aktivität der Stat-Signale ist an der Induktion des Transkriptionsfaktors Runx3 beteiligt (Park et al., 2010). Dieser Zusammenhang ist noch nicht final geklärt, da neuere Studien widersprüchliche Ergebnisse liefern (Steier et al., 2023). Runx3 ist für die Entwicklung der Thymozyten zu reifen, zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen essentiell (Park et al., 2010). Währenddessen unterstützen kontinuierliche IL-7R-Signale die Suppression von CD4-Genen (Yu et al., 2003). Für die Bildung von CD4⁺-SP ist wiederum eine verstärkte TZR-Aktivierung gestützt durch MHC-II erforderlich, während die TZR-Aktivierung für CD8⁺-Zellen in diesem Stadium eine untergeordnete Rolle spielt (Steier et al., 2023). Zusätzlich zu einer Hochregulation von Bcl-2 wird auch der Glucose Transporter (Glut)-1 stärker exprimiert, was zu einer besseren metabolischen Versorgung der Zellen führt (Yu et al., 2003). Auch nach Verlassen des Thymus exprimieren naive CD4⁺- oder CD8⁺-T-Zellen weiterhin IL-7R, wodurch das Zytokin IL-7 vor allem in CD8⁺-T-Zellen weiter zu Überleben und Proliferation der Zellen beiträgt (Tan et al., 2001). Im Menschen zeigt sich ein Defekt der IL-7R-Signalkaskade als *severe combined immunodeficiency disease* (SCID) in einer schweren Immundefizienz (Puel et al., 1998). Dabei ist die Entwicklung von T-Zellen gestört, was zu einer stark verminderten T-Zellzahl führt, während die B-Zellzahl, anders als im Mausmodell, unverändert bleibt (Puel et al., 1998).

1.2 SLy/Sash-Proteinfamilie

Die SLy (*SH3 protein expressed in lymphocytes*)/SASH-Proteinfamilie besteht aus drei Mitgliedern, die trotz deutlicher funktioneller Unterschiede untereinander hoch konservierte Sequenzähnlichkeiten besitzen (Jaufmann et al., 2021). Eine mögliche Adapterproteinfunktion in verschiedenen Signalkaskaden kommt durch die funktionellen Abschnitte, bestehend aus einem zweigeteilten nukleären Lokalisationssignal (NLS), einer *Src-homology 3* (SH3)-Domäne und einer *sterile alpha motif* (SAM)-Domäne zustande (Jaufmann et al., 2021). Das SLy1/SASH3 Protein wird ausschließlich in T- und B-Zellen in lymphatischem Gewebe exprimiert (Beer et al., 2001). Das SLy2/HACS1 (*Hematopoietic adaptor containing SH3 and SAM domains 1*) Protein kommt vor allem in hämatopoetischem Gewebe und Myelomen vor (Claudio et al., 2001). SLy3/SASH1 (*SAM and SH3 domain containing 1*) wurde zuerst in Brustkrebs entdeckt (Zeller et al., 2003).

1.2.1 SLy1 in Entwicklung und Funktion der T-Zellen

Für diese Arbeit wurde besonders die Rolle von SLy1 in verschiedenen Signalwegen genauer betrachtet. Das Gen sowohl für humanes als auch für murines SLy1 ist auf dem X-Chromosom lokalisiert (Beer et al., 2001). Das Protein besteht aus 381 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 55 kDa (Beer et al., 2001). Zwischen murinem und humanem SLy1 findet sich eine Homologie von 89 % in der Nukleotidsequenz und 94 % in der Sequenz der Aminosäuren (Beer et al., 2001). Eine vereinfachte Darstellung der funktionellen Domänen von SLy1 findet sich in Abbildung 2. Nach Aktivierung des T- oder B-Zellrezeptor wird SLy1 an Serin (Ser-27) phosphoryliert (Astoul et al., 2003). Am wahrscheinlichsten erfolgt die Phosphorylierung nach Aktivierung des TZR über einen Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)- oder Proteinkinase C (PKC)-abhängigen Signalweg (Beer et al., 2005; Astoul et al., 2003). Intrazellulär findet sich SLy1 in T-Zellen im Nukleus, nach TZR-Aktivierung wird SLy1 phosphoryliert und verbleibt im Zytoplasma, was die Interaktion mit verschiedenen Signalproteinen ermöglicht (Beer et al., 2005; Schäll et al., 2015).

1. Einleitung

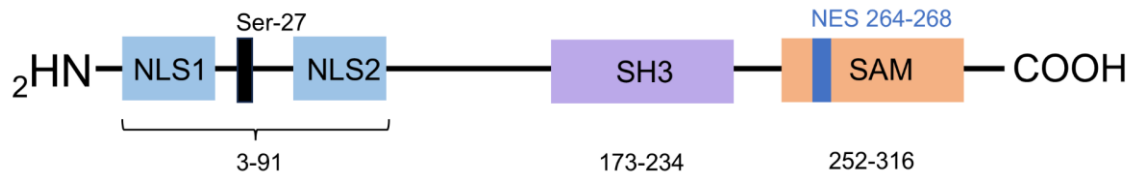


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Struktur von SLy1

Darstellung der funktionellen Domänen von SLy1 mit NLS, SH3-, SAM-Domäne und Phosphorylierungsstelle an Ser-27 (Modifiziert nach Beer et al., 2001; Jauffmann et al., 2021).

Der Einfluss auf die T-Zellentwicklung zeigt sich bei Veränderungen von SLy1. Bei einem Funktionsverlust der Phosphorylierungsstelle an Serin-27 und der NLS-Sequenz findet sich SLy1, als SLy1 $\Delta\Delta$ nur noch im Zytoplasma der Zellen (Beer et al., 2005). Mit dem Verlust der Translokation in den Nukleus kommt es zu einer reduzierten Zahl an T-Zellen sowie einer beeinträchtigten antigenvermittelten Aktivierung (Beer et al., 2005). Für eine weitere Differenzierung der Funktion wurde eine komplette Inaktivierung von SLy1 zu genotypisch SLy1 KO in Mäusen durchgeführt (Reis et al., 2009). Dabei fanden sich ebenfalls stark reduzierte Zellzahlen in den lymphatischen Geweben mit verminderter Organgröße (Reis et al., 2009). Im Thymus zeigt sich zum Beispiel eine Reduktion der Zellzahl um 46 % (Reis et al., 2009). Während die Zellzahlen von CD4 $^{+}$ - und CD8 $^{+}$ -DP- und SP-Zellen deutlich reduziert sind, findet sich im prozentualen Verhältnis eine Verdopplung der DN-Thymozyten (Reis et al., 2009). Dabei befinden sich weniger Zellen in den Stadien DN1 und DN4, während mehr Zellen in DN2 und DN3 sind, was auf eine Beteiligung von SLy1 in der Entwicklung der DN-Stadien schließen lässt (Reis et al., 2009). SLy1 hat dabei eine anti-apoptotische Funktion durch einen mTOR-vermittelten Schutz vor Apoptose im DN3-Stadium (Reis et al., 2009).

In peripheren T-Zellen konnte nach einer *in vitro* Stimulation des TZR in SLy1 KO -Mäusen eine Inhibierung des Zellzyklus im Vergleich zu WT-Mäusen nachgewiesen werden (Schäll et al., 2015). Dies wird durch eine höhere Proteinexpression der Zellzyklusinhibitoren p27 und p130 bedingt (Schäll et al., 2015). Die Genexpression von p27 und p130 wird unter anderem durch den Transkriptionsfaktor FoxO1 der *Forkhead-box*-(Fox) Transkriptionsfaktorfamilie beeinflusst. Nach einer TZR-Aktivierung phosphoryliert Akt FoxO1 und inaktiviert auf diese Weise die transkriptionelle Interaktion (Charvet et al., 2006; Schäll et

al., 2015). Es konnte nachgewiesen werden, dass FoxO1 in Abwesenheit von SLy1 schneller dephosphoryliert wird, was wiederum zu einer höheren Expression von p27 und p130 führt (Schäll et al., 2015). SLy1 spielt auch in NK-Zellen eine bedeutende Rolle. In SLy1^{KO}-Mäusen findet sich eine verminderte NK-Zellzahl, sowie eine ribosomale Instabilität, was zu einer gestörten Funktion zum Beispiel in der Abwehr von malignen Zellen führt (Arefanian et al., 2016).

Eine 2021 im Menschen neu beschriebene X-chromosomale Immundefizienz konnte auf Varianten im humanen *SLy1*-Gen zurückgeführt werden (Delmonte et al., 2021). Die Patienten präsentierten sich mit rezidivierenden sinonasalen und pulmonalen Infektionen sowie Hautinfektionen. Blutanalysen zeigten reduzierte CD4⁺-T-, B- und NK-Zellzahlen (Delmonte et al., 2021). Wie im Mausmodell mit trunkiertem oder fehlendem SLy1 zeigt sich eine verminderte T-Zellproliferation, Zellzyklusprogression, sowie eine erhöhte Apoptoserate als Reaktion auf Zellstress (Delmonte et al., 2021).

1.3 Zellzyklus und Apoptose

Proliferation und Apoptose sind in Zellen zwei entgegengesetzte Prozesse. Für die Entwicklung von Geweben oder Zellpopulationen ist dabei ein Zusammenspiel von beiden notwendig. Das Ziel des Zellzyklus ist die Vermehrung einer Ausgangszelle, während die Apoptose den kontrollierten Zelltod herbeiführt. Der Zellzyklus teilt sich in vier Stadien ein. In der Proliferation verdoppeln sich Zellen mit Ablauf des Zellzyklus. Nach der G₁-Phase treten sie in die Synthesephase (S-Phase) ein, in der die DNA repliziert wird. Darauf folgt die G₂-Phase, die wiederum der Überprüfung der Zelle dient. Im Anschluss erfolgt die Mitose (M-Phase) und die Zelle teilt sich in zwei identische Tochterzellen. Nach Beenden der Proliferation treten die Zellen erneut in die G₁-Phase oder in die G₀- oder Ruhephase ein. Die verschiedenen Phasen werden durch eine unterschiedliche Expression von Zellzyklusproteinen vor allem durch die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK), einer Familie von Serin-Threonin-Proteinkinasen, gesteuert (Morgan, 1997). CDK2 ist dabei für die G₁/S-Transition, die S-Phase sowie die G₂-Phase entscheidend. Die Regulation der CDKs erfolgt wiederum durch CDK-aktivierende Kinasen, CDK-Inhibitoren sowie Cycline (Morgan,

1. Einleitung

1997). In der G₁-Phase erfolgt die Aktivierung von CDK4 und CDK6 mit Cyclin-Untereinheiten wie Cyclin E, D und A zu Komplexen (Sherr und Roberts, 1999). In der Folge der Kaskade werden zahlreiche Proteine phosphoryliert, darunter Mitglieder der Retinoblastomprotein (Rb)-Familie und p27 (Sherr und Roberts, 1999). Das phosphorylierte Rb setzt Proteine der E2F-Familie frei, welche wiederum die Transkription von verschiedenen S-Phase-Genen aktivieren (Weinberg, 1995). Die Inhibierung der CDKs erfolgt unter anderem durch die Ink4 (*Inhibitor of CDK4*)-Familie wie zum Beispiel p16 und p18 und die CIP/KIP (*CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein*)-Familie wie zum Beispiel p21 und p27 (Sherr und Roberts, 1999). Insgesamt ist die Expression, Aktivierung und Proteolyse der Zellzyklusproteine durch die verschiedenen Beteiligten eng geregelt.

Die Apoptose einer Zelle wird über den extrinsischen oder intrinsischen Signalweg vermittelt. Der intrinsische Weg, der einen Großteil ausmacht, betrifft die Mitochondrien und wird durch pro- und anti-apoptotische Proteine der Bcl-2-Familie vermittelt (Green und Llambi, 2015). Zellstress wie Schäden in der DNA oder fehlende Überlebenssignale werden durch die Gruppe der pro-apoptotischen BH3-Proteine erkannt, dazu gehören unter anderem Bad, Bim oder Puma (Green und Llambi, 2015). Diese aktivieren Effektorproteine, wie Bax oder Bak, die die Mitochondrienmembran permeabilisieren und Cytochrom C ins Zytoplasma freisetzen (Eskes et al., 2000). Cytochrom C lagert sich mit dem *apoptotic protease-activating factor 1* (APAF1) und ATP zu einem Komplex zusammen (Green und Llambi, 2015). Nach Zusammenlagerung von sieben Komplexen zu einem Apoptosom kann die Aktivierungscaspase-9 aktiviert werden (Green und Llambi, 2015). Anti-apoptotische Proteine wie Bcl-2 können die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran und damit die Freisetzung von Cytochrom C regulieren (Yang et al., 1997). Der Tumorsuppressor p53 ist ebenfalls in der Lage durch Interaktionen mit Bcl-2 oder Bcl-X_L die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran und damit die Apoptose einer Tumorzelle auszulösen (Mihara et al., 2003). Der extrinsische Weg wird über die Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptor-Familie aktiviert. Nach Bindung von TNF oder Fas an die jeweiligen Rezeptoren kann die Caspase-8 rekrutiert und aktiviert

werden (Green und Llambi, 2015). Durch den extrinsischen und intrinsischen Weg werden verschiedene Caspasen aktiviert, die wiederum zur Aktivierung der Effektorcaspasen (Caspase-3, -6, -7) und damit durch Proteolyse von Zellstrukturproteinen, Fragmentierung der DNA, sowie Freisetzung von Phosphatidylserin an die Membranoberfläche zur Apoptose führen (Shi, 2002). In der Folge kann die apoptotische Zelle durch Makrophagen phagozytiert werden (Krahling et al., 1999).

1.4 Transkriptionsfaktoren in der Thymozyten-entwicklung

Für die Steuerung von biologischen Prozessen wie Proliferation und Differenzierung in Zellen spielen zahlreiche extrinsische und intrinsische Signale eine Rolle. Für die erfolgreiche Transkription von Genen durch die RNA-Polymerase ist das Zusammenspiel von verschiedenen Proteinen wichtig. Neben der Struktur des Chromatins gehören auch Transkriptionsfaktoren, Co-Faktoren oder Histone dazu (Spitz und Furlong, 2012). Die Transkriptionsfaktoren lassen sich aufgrund von verschiedenen strukturellen Besonderheiten der DNA-Bindungsdomäne in unterschiedliche Gruppen einteilen (Luscombe et al., 2000). Dazu gehören zum Beispiel die Familie der Zinkfinger-Proteine, die Gruppe der Helix-Loop-Helix (HLH)-Faktoren oder Hormonrezeptor-Proteine (Luscombe et al., 2000). Wie in anderen Differenzierungsprogrammen, sind auch für die T-Zellentwicklung verschiedene Transkriptionsfaktoren entscheidend. Dabei gibt es keinen Faktor, der exklusiv in der T-Zelldifferenzierung exprimiert wird, wie zum Beispiel PAX5 in der B-Zelldifferenzierung (Schebesta et al., 2007, Hosokawa und Rothenberg, 2021).

Durch definierende Ereignisse wie die TZR-Expression oder β -Selektion, wie bereits weiter oben beschrieben, lässt sich die Entwicklung im Thymus dabei in einzelne Phasen einteilen. Entsprechend der Wirkung ist dabei die Expression von Transkriptionsfaktoren von Phase zu Phase verschieden, während die Dynamik durch Notch-Signale und in der Folge auch Interaktionen der Faktoren untereinander gesteuert wird (Hosokawa und Rothenberg, 2021; Shin et al., 2024). Im Folgenden werden einige der beteiligten Faktoren genauer beleuchtet

1. Einleitung

(siehe schematische Zusammenfassung in Abb. 1). In den ersten Entwicklungsschritten im Thymus befinden sich noch pluripotente Vorläuferzellen. Erst durch Hochregulation von Notch-Signalen und in der Folge von Transkriptionsfaktoren wie dem T-Zell Faktor-1 (TCF-1) und GATA3 erfolgt eine erste Expression von Genen der T-Zellentwicklung und damit eine schrittweise Festlegung auf die T-Zelllinie (Zhou et al., 2019). Der Zink-Finger-Transkriptionsfaktor GATA3 spielt dabei eine wichtige Rolle für die Hochregulation von T-Zell spezifischen Proteinen sowie die Steuerung der β -Selektion (Zhou et al., 2019). Die Aktivität von GATA3 bleibt dabei auch für Funktion und Proliferation von reifen peripheren T-Zellen von Bedeutung, da ein Fehlen von GATA3 über c-Myc die Proliferation von CD8⁺-Zellen stark einschränkt (Wang et al., 2013). TCF-1 ist in der Lage neben T-Zell spezifischen Genen auch die Transkription von *Gata3* und *Bcl11b* zu steuern (Weber et al., 2011). Weitere an der T- sowie B-Zelldifferenzierung beteiligte Transkriptionsfaktoren aus der Zinkfingerfamilie sind die Ikaros-Familie oder Runx-Familie, wie zum Beispiel Runx1 (Wang et al., 1996; Ichikawa et al., 2004). Die HLH-Transkriptionsfaktoren E2A und HEB sind unter anderem an der Transkription der pT α -Kette in den DN2- und DN3-Stadien beteiligt (Takeuchi et al., 2001). Ein weiterer Faktor, der vor allem in den frühesten Stadien vorhanden ist und ab dem DN2a-Stadium herunterreguliert wird, ist der ETS-Transkriptionsfaktor PU.1 (Champhekar, 2015). Neben GATA3 gehört auch PU.1 zu den Vorreiterfaktoren, die an Chromatin binden und durch Strukturänderungen unter anderem die Zugänglichkeit für andere Transkriptionsfaktoren erst ermöglichen (Tanaka et al., 2020; Minderjahn et al., 2020). PU.1 kann dabei Faktoren wie Runx1 und Satb1 an andere Bindungsstellen im Genom rekrutieren und damit die Expression auch von T-Zell-spezifischen Zielgenen in pro-T-Zellen verändern (Hosokawa et al., 2018).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit soll die Funktion des Adapterproteins SLy1 und dessen Beteiligung in verschiedenen Signalwegen während der Thymozytenentwicklung betrachtet werden. Dabei soll eine mögliche Shuttlefunktion zwischen Nukleus und Zytoplasma nach Aktivierung und konsekutiver Phosphorylierung genauer untersucht werden. In der komplexen Entwicklung der Thymozyten zu reifen, naiven T-Zellen hat der Notch-Signalweg eine große Bedeutung. Ergänzend zu bereits vorhandenen Daten soll nun das Expressionslevel der Notch-Proteine in SLy1^{KO} im Vergleich zu SLy1^{WT} im Mausmodell untersucht werden. Weiter spielt auch der IL-7/IL-7R-Signalweg eine wichtige Rolle in der T-Zellentwicklung. Hier soll die Aktivität der beteiligten Signalproteine Jak1, Jak3 und Stat5 nach Stimulation des IL-7R ermittelt werden. In vorangegangenen Arbeiten zeigte sich außerdem, dass SLy1^{KO}-Thymozyten in den DN-Stadien eine veränderte Expression von Zellzyklusproteinen aufweisen (Schäll et al., 2015). In weiteren Untersuchungen sollen nun die Proliferation und mögliche Unterschiede in den Phasen des Zellzyklus in Thymozyten beurteilt werden. Dabei ist für das Überleben der Zellen auch die Apoptoserate in SLy1^{KO}- und SLy1^{WT}-Thymozyten und T-Zellen unter verschiedenen Bedingungen von Relevanz und soll in dieser Arbeit ebenfalls näher betrachtet werden. Vor allem geht es um die Beteiligung von SLy1 bei der Regulation der Apoptose in Thymozyten, die durch IL-7R- oder TZR-Stimulation aktiviert wurden. Es ist bekannt, dass SLy1 in T-Zellen nach Aktivierung aus dem Nukleus in das Zytoplasma transloziert (Reis et al., 2009), allerdings ist noch unklar, welche Funktionen das Protein dabei innehat. Es stellt sich die Frage, welchen Einfluss SLy1 auf DNA-Ebene auf die Transkription von Genen hat, die an der T-Zellentwicklung beteiligt sind. Es kommen dabei mögliche Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren infrage, was im Folgenden genauer untersucht werden soll.

2 Material und Methoden

Material

2.1 Materialliste

Tabelle 1: Geräte

Gerät	Hersteller
FACS Canto II	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
IncuSafe	Sanyo, Osaka, Japan
LightCycler 480 II	Roche, Mannheim, Deutschland
Mikroskop PrimoVert	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Nano Photometer	Implen, Westlake Village, CA, USA
QIAxcel	Qiagen, Hilden, Deutschland
Thermal Cycler C1000 Touch	BioRad, München, Deutschland
VersaDoc	BioRad, München, Deutschland
Vibrax VXR	IKA, Staufen, Deutschland
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tabelle 2: Materialien/Kits

Materialien/Kits	Hersteller
Amersham Protran Nitrocellulose Membran	GE Healthcare Life Science, Freiburg, Deutschland
AMPLIFYME Universal RT-qPCR Mix	Blirt, Gdańsk, Polen
Annexin V Binding Buffer, 10x conc.	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
BIOTAQ DNA Polymerase Kit	Bioline, London, Großbritannien
Direct Lysis Genopuffer DirectPCR	Viagen, Los Angeles, CA, USA
FITC BrdU Flow Kit	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Fixation Buffer	BioLegend, San Diego, CA, USA

2. Material und Methoden

Isofluran	CP Pharma, Burgdorf, Deutschland
Milchpulver (Blotting Grade, fettarm)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nukleasefreies Wasser	Qiagen, Hilden, Deutschland
Pierce™ Agarose CHIP Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Phosphatase Inhibitor PhosSTOP	Roche, Mannheim, Deutschland
Proteinase Inhibitor cOmplete	Roche, Mannheim, Deutschland
Proteinase K	Gene On, Nürnberg, Deutschland
TruePhosPerm-Buffer	BioLegend, San Diego, CA, USA
24 Well Cell Culture Plate	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
96 Well Sapphire Mikroplatte, PP	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
WESTAR Supernova	Cyanagen, Bologna, Italien
Zellsieb 70µm	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Tabelle 3: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Fetal Bovine Serum	Gibco, Darmstadt, Deutschland
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
2-Mercaptoethanol	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
PMSF	Serva, Heidelberg, Deutschland
Roti-Load 1	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
RPMI-1640 Medium	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypanblau	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.2 Antikörper

Tabelle 4: Fluoreszenzgekoppelte Farbstoffe/Antikörper

Antigen - Konjugat	Artikel-nr.	Hersteller
7-AAD	559925	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Annexin V - Brilliant Violet 510	640937	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD4 - PerCP-Cy5.5	561115	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
CD4 - Pacific Blue	558107	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
CD8a - PerCP-Cy5.5	551162	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
CD8a - V500	560776	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
CD90.2 - APC	553007	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
anti-Rabbit IgG - PE	406421	BioLegend, San Diego, CA, USA
TZR $\gamma\delta$ - FITC	553177	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
TZR $\gamma\delta$ - PE	107508	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Stat5 - Pacific Blue	560311	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Purified anti-CD16/32	101302	BioLegend, San Diego, CA, USA

2. Material und Methoden

Tabelle 5: Western Blot: Primäre Antikörper

Antigen	Spezies	Artikelnr.	Hersteller.
β-Aktin	Rabbit	ab8227	Abcam, Cambridge, Großbritannien
GAPDH	Mouse	5G4	HyTest, Turku, Finnland
p-Jak1	Rabbit	D7N47	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
p-Jak3	Rabbit	D44E3	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Lamin A/C	Rabbit	2032	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Notch1	Mouse	sc-376403	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
Notch3	Mouse	sc-515825	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
SLy1	Rabbit	-	Eurogentec, Seraing, Belgien
p-SLy1	Rabbit	-	Eurogentec, Seraing, Belgien
Stat5	Rabbit	D206Y	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA

Tabelle 6: Western Blot: Sekundäre Antikörper

Antigen	Bezeichnung	Hersteller
anti-Mouse IgG (HRP)	GTX221667-01	Genetex, Irvine, CA, USA
anti-Rabbit IgG (HRP)	7074S	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA

Tabelle 7: ChIP-Antikörper

Antigen	Bezeichnung	Hersteller
Histon-H3	2650S	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
PU.1	ab227835	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Normal Rabbit IgG	2729S	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA

2. Material und Methoden

Tabelle 8: Primer

Name	Primer right/forward	Primer left/reverse
IL-7R	5'-cga aac tcc aga acc caa ga-3'	5'-aat ggt gac act tgg caa gac-3'
β -Aktin	5'-aag gcc aac cgt gaa aag at-3'	5'-gtg gta cga cca gag gca tac-3'
Bcl-2	5'-agt acc tga acc ggc atc tg-3'	5'-ggg gcc ata tag ttc cac aaa-3'
SLy1	5'-tga cgg cag tag gga tgg tag-3'	5'-agt ggc ctg ggg gag atg t-3' neo-rev: 5'-cgc ctt ct tgac gag ttc ttc t-3'

2.3 Puffer und Lösungen

Tabelle 9: Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Coomassie Brilliant Blue	0,25 % Coomassie Blue R 10 % 100 % Essigsäure 45 % Ethanol absolut
Coomassie-Entfärbelösung	10 % 100 % Essigsäure 20 % Methanol absolut
Erythrozytenlysepuffer	500 ml ddH ₂ O 0,155 M HH ₄ Cl 0,01 M KHCO ₃ 0,1 mM EDTA
FACS Staining Puffer	500 ml PBS 0,5 % (w/v) BSA 0,09 % (w/v) NaN ₃
Laufpuffer	1000 ml ddH ₂ O 2,5 mM Tris 20 mM Glycin 0,11 % SDS
MACS Puffer	500 ml PBS 0,5 % (w/v) BSA 2 mM EDTA

2. Material und Methoden

Milchpuffer	50 mM Tris 150 mM NaCl 0,05 % (v/v) Tween 20 5 % (w/v) Milchpulver
NP40-Lysepuffer	1 % (v/v) Igepal CA-630 50 mM Tris-HCl, pH 7,4 150 mM NaCl 2 mM EDTA
Nukleärer Lysepuffer	20 mM HEPES (pH 7,9) 0,4 M KCl 0,1 mM EDTA (pH 8,0) 1 mM EGTA (pH 7) 1 mM DTT 100 mM PMSF
Ponceau S	0,1 % Ponceau S 5 % 100 % Essigsäure
4x Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
TBS/T	50 mM Tris 150 mM NaCl 0,05 % (v/v) Tween 20
Transferpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol
4x Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)
Tris-Glycin-SDS-Laufpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % SDS
Zellkulturmedium	500 ml RPMI-1640 10 % FCS 100 U/ml Pen-Strep 2 mM L-Glutamin 0,05 mM 2-Mercaptoethanol

2. Material und Methoden

Zytoplasmatischer Lysepuffer	10 mM HEPES (pH 7,9) 10 mM KCl 10 mM EDTA (pH 8,0) 0,1 mM EGTA (pH 7) 1 mM DTT 100 mM PMSF
------------------------------	---

Tabelle 10: Stimulanzen

Stimulanz	Hersteller
Purified NA/LE Hamster anti-Mouse CD3 ϵ	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Purified NA/LE Hamster anti-Mouse CD28	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Recombinant Mouse IL-7 (carrier-free)	BioLegend, San Diego, CA, USA

Methoden

2.4 Versuchstiere

2.4.1 Mausmodell

In der vorliegenden Arbeit wurden die bereits beschriebenen SLy1-defizienten Mäuse verwendet (Reis et al., 2009). Es wurden männliche und weibliche Tiere des Genotyps SLy1^{KO} beziehungsweise SLy1^{WT} (Kontrollgruppe) für die Versuche verwendet. Für die Expressionsanalyse von SLy1 und p-SLy1 wurden weibliche C57BL/6N Tiere von Charles River erworben.

2.4.2 Tierzucht und Haltung

Die Mäuse werden regelmäßig mit C57BL/6N von Jackson Laboratories zurückgekreuzt. Gehalten und gezüchtet werden die Mäuse in der Tierhaltung Pharmakologie/Toxikologie der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen. Durch den Einsatz von heterozygoten Tieren in der Zucht, ergeben sich verschiedene Genotypen in einem Wurf. Mit ca. 3-4 Wochen werden die Tiere durch eine Ohrlochung markiert und genotypisch bestimmt (siehe 2.5.1.).

2.4.3 Organentnahme

Alle tierexperimentellen Arbeiten wurden unter Einhaltung der EU-Richtlinie 2010/63/EU zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere durchgeführt. Die Tierversuche wurden dem Regierungspräsidium Tübingen angezeigt (§4 Anz. vom 26.04.18). Für die Organentnahme wurden die Tiere im Alter von 8 bis 12 Wochen mit Isofluran betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Nachfolgend wurden Thymus und gegebenenfalls Milz entnommen und bis zur weiteren Analyse in kaltes PBS gegeben.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Genotypisierung der Mäuse

Das Material der Ohrlochung wurde für die Genotypisierung verwendet. Dafür wurde DirectPCR Lysepuffer nach Herstellerangaben mit Proteinase K vorbereitet und das Gewebe bei 55°C für 6 Stunden lysiert. Die Inaktivierung der Proteinase K erfolgte bei 85°C für 45 Minuten. Gewebereste wurden durch Zentrifugation sedimentiert und der Überstand wurde in ein frisches Eppendorf Röhrchen überführt und bis zur Analyse bei 4°C gelagert. Die PCR erfolgte mit spezifischen Primern (Tab. 8) und folgendem Programm:

Tabelle 11: Programm für SLy1-Genotypisierung

Zyklen	Dauer	Temperatur	Funktion
1	3 Minuten	95°C	Präinkubation
30	15 Sekunden	95°C	Denaturierung
	30 Sekunden	64°C	Hybridisierung der Primer
	90 Sekunden	72°C	Elongation
1	10 Minuten	72°C	Finale Elongation

Anschließend wurden die Produkte mit dem QIAxcel DNA- und RNA-Analyzer-System analysiert. Die Bestimmung erfolgte anhand der Größe des amplifizierten SLy1-Gens. Bei SLy1^{WT} liegt die Bande bei 1206 bp, bei SLy1^{KO} bei 704 bp.

2.6 Zellbiologie

2.6.1 Zellisolation

Es wurden der Thymus und gegebenenfalls die Milz entnommen und in PBS aufbewahrt. Zur Zellisolation wurde das Gewebe durch ein 70 µm Sieb gedrückt, zentrifugiert und zur Zellzahlbestimmung in 10 ml PBS in Suspension gebracht. Die Bestimmung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer mithilfe von Trypanblau.

2.6.2 Inkubation und Stimulation

Für die Analysen nach TZR- oder IL-7R Stimulation wurden die Zellen entweder mit 5 µg/ml anti-CD3 und 2,5 µg/ml anti-CD28 oder 100 ng/ml IL-7 in Zellkulturmedium inkubiert (Tab. 10). Für eine Aktivierung des TZR an anti-CD3 ist eine vorherige Fixierung des Antikörpers an das Inkubationsgefäß notwendig. Die Bindung von anti-CD3 an die jeweilige Platte erfolgte über Nacht bei 4°C, dann wurde anti-CD28 in gelöstem Zustand dazugegeben. Es wurde jeweils eine Kontrolle ohne Stimulation mitgeführt. Alle Zentrifugationsschritte mit lebenden Zellen erfolgten bei 500 g und 4°C für 5 Minuten.

2.6.3 Stimulation der SLy1- und p-SLy1-Expression

Für die Analyse der SLy1- und p-SLy1-Expression wurden Thymozyten aus C57BL/6 Tieren isoliert und in RPMI-Medium mit anti-CD3 (5 µg/ml) und anti-CD28 (2,5 µg/ml) Antikörpern inkubiert. Die Stimulation erfolgte für 20 und 60 Minuten bei 37°C im Inkubator. Zum Abstoppen wurden die Zellen in kaltem PBS gewaschen und bei 500 g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert.

2.7 Proteinbiochemische Methoden

2.7.1 Proteingewinnung

Zur Proteingewinnung für Western Blots wurden die Zellen nach Stimulation mit PBS gewaschen und bei 500 g für 5 Minuten zentrifugiert. Zur Lyse wurde NP40-Lysepuffer mit Zusatz von Phosphatase- und Proteinaseinhibitoren mit 10 µl für 10⁶ Zellen verwendet. Die Lyse erfolgte für 30 Minuten auf Eis, dabei wurden die Proben durch mehrmaliges Vortexen gemischt. Die Zentrifugation des Lysats fand bei 14.000 g für 10 Minuten statt. Alle Lysate wurden bei -80°C aufbewahrt.

Die Lysate für die Notch1- und Notch3-Expressionsanalyse wurden freundlicherweise von Barbara Schneider zur Verfügung gestellt.

2.7.2 Nukleäre und zytoplasmatische Auftrennung

Zur Analyse der SLy1- und p-SLy1-Expression wurden die Zellen nach Stimulation in die nukleäre und zytoplasmatische Fraktion aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert.

Zur Vorbereitung der beiden Lysepuffer wurde DTT und PMSF in den entsprechenden Konzentrationen zugesetzt (Tab. 3). Protease- und Phosphataseinhibitoren wurden in einer Endkonzentration von 1 % eingesetzt. Zur Auftrennung wurden 10^7 Zellen in 188 μ l Zytoplasmatischem Lysepuffer resuspendiert und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden 12 μ l 10 % (v/v) NP-40 dazugegeben und für 5 Sekunden durch Vortexen gemischt und für 10 Minuten erneut auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation bei 10.000 g für 5 Minuten erfolgte die Abnahme des zytoplasmatischen Überstands in ein frisches Röhrchen. Das verbleibende Kernpellet wurde mit 400 μ l Zytoplasmatischem Lysepuffer gewaschen und bei 2000 g für 5 Minuten erneut zentrifugiert. Nach Resuspension in 50 μ l Nukleärem Lysepuffer wurden die Proben auf einem Schüttler für 30 Minuten bei maximaler Einstellung bei 4°C gerüttelt. Nach der Zentrifugation bei 15.000 g für 10 Minuten wurde die nukleäre Fraktion abgenommen. Sowohl die zytoplasmatischen als auch die nukleären Proben wurden bei -80°C gelagert.

2.7.3 Gelelektrophoretische Auftrennung

Für die Gelelektrophorese wurden SDS-Gele mit 10 % Acrylamid in 1 mm Dicke mit 10 oder 15 Taschen hergestellt. Fand die Herstellung einen Tag vor der Gelelektrophorese statt, wurden die Gele feuchtgehalten und bei 4°C aufbewahrt. Die aufzutrennenden Proteine wurden im Verhältnis von 4:1 mit 4xRoti-Load für 5 Minuten bei 95°C erhitzt und dann entsprechend der Zellzahl auf ein SDS-Gel geladen. Die Proteine wurden zunächst bei 90 V für ca. 10 Minuten gesammelt und im Anschluss bei 140 V für ca. 100 Minuten aufgetrennt.

2.7.4 Western Blot

Nach der Gelelektrophorese wurden die Gele vor der Weiterverarbeitung für 25 Minuten bei 4°C in Transferpuffer equilibriert. Im Anschluss wurde das Gel mit der entsprechenden Membran und Filterpapieren in die Fächer der Kammer gepackt und die Proteine für 90 Minuten bei 100 V mittels Wet-Blot übertragen. Eine Kontrolle für eine erfolgreiche Übertragung wurde mittels der Coomassie Färbung für das Gel und der Ponceau S Färbung für die Membran durchgeführt. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation der Membran in 5 % Milchpuffer für eine Stunde, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu blockieren. Die verwendeten Antikörper sind in Tab. 5 zu finden. Die Konzentrationen waren: 1:1000 für Lamin A/C, Notch1 und Notch3; 1:2000 für SLy1, p-SLy1; 1:5000 für GAPDH und 1:10.000 für β -Aktin. Die Membran wurde über Nacht bei 4°C auf einem Rollenmischer bewegt. Nach der Inkubation wurde die Membran jeweils für 5 Minuten in TBS/T gewaschen. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Für die Inkubation mit den sekundären Antikörpern wurden die HRP-gekoppelten Antikörper (Tab. 6) 1:2000 verdünnt und die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Rollenmischer inkubiert. Der Waschschrift in TBS/T für 5 Minuten wurde anschließend dreimal je 5 Minuten durchgeführt. Zur Entwicklung im VersaDoc wurde die Membran mit ECL-Reagenz (Westar Supernova) für 60 Sekunden inkubiert und dann entwickelt.

2.8 Durchflusszytometrie (FACS)

Für die durchflusszytometrische Analyse mittels eines BD FACS Canto II wurden die Zellen nach TZR- oder IL-7R-Stimulation über 15 Minuten, 2 Stunden oder 6 Stunden mit kaltem PBS gewaschen und für 5 Minuten bei 500 g zentrifugiert. Zellen aus der Milz wurden vor der Färbung zunächst mit einem F_c-Block (CD16/CD32) mit 1:50 resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert, um unspezifische Bindungen an den F_c-Rezeptor zu verhindern. Die Färbung erfolgte mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern: APC-CD90.2 1:600, FITC-TCR $\gamma\delta$ 1:100, Pacific Blue-CD4 1:400, FITC-CD8a 1:200 (Tab. 4). Die Zellen wurden für 30 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubiert, mit PBS gewaschen und 5 Minuten bei 500 g zentrifugiert.

2. Material und Methoden

Bei fixierten Zellen für den Nachweis von Jak1, Jak3 und Stat5 wurden höhere Konzentrationen verwendet. Brilliant Violet 500-CD8a 1:200, APC-CD90.2 1:400, PerCP-Cy5.5-CD4 1:200, FITC-TZRY δ 1:100. Die Etablierung der intrazellulären Färbungen erfolgte nach dreimaliger Durchführung mit einer Kontrollfärbung mit β -Aktin.

Für die Unterscheidung zwischen lebenden, apoptotischen und toten Zellen wurden 10^6 Zellen nach Stimulation zweimal mit PBS gewaschen und nach Herstellerangaben mit Annexin V Binding Buffer in Suspension gebracht. Die Zellen wurden mit 3 μ l Brilliant Violet 510-Annexin V und 5 μ l Aminoactinomycin D (7-AAD) gefärbt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Lösung wurde mit Annexin Binding Buffer auf 200.000 Zellen/ml verdünnt und direkt analysiert.

Für die Analyse intrazellulärer Signalwege wurden die Zellen nach Stimulation und Färbung der Oberflächenmarker nach Herstellerangaben mit dem Fixation Buffer fixiert und mit dem TruePhosPerm-Buffer permeabilisiert. Die intrazelluläre Färbung für Stat5, p-Jak1 und p-Jak3 (Tab. 5) erfolgte mit einer Konzentration von je 1:100 für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen mit PBS und Zentrifugation bei 1000 g für 5 Minuten wurden die Zellen im zweiten Schritt mit PE-anti-Rabbit IgG mit 1:125 gefärbt (Tab. 4). Der Phosphorylierungsstatus von Stat5 wurde mit Pacific Blue-Stat5 markiert. Die Inkubation fand bei Raumtemperatur für 30 Minuten im Dunkeln statt. Im Anschluss daran wurde je dreimal mit PBS gewaschen und bei 1000 g für 5 Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in 300 ml FACS Staining Buffer resuspendiert und analysiert.

Die Analyse des Zellzyklus erfolgte mit dem BD FITC BrdU Flow Kit nach Herstellerangaben. Die Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern oder IL-7 erfolgte dabei für 24, 48 und 72 Stunden und die stimulierten Proben wurden mit einer unstimulierten Kontrolle verglichen.

2.8.1 Gatingstrategie

In den durchflusszytometrischen Analysen wurden Thymozyten und DN-Thymozyten, sowie T-Zellen aus der Milz untersucht. Die Festlegung der Gates erfolgte mithilfe von entsprechend gefärbten Kontrollproben als *Fluorescence Minus One* (FMOs) (Abb. 3). Für die Bestimmung von Thymozyten (Abb. 3) wurden zuerst einzelne Zellen aus einem Lymphozytengate bestimmt, die weiter in CD90.2⁺ sowie TCRγδ⁻ aufgeteilt wurden. Im letzten Schritt erfolgte die Bestimmung von DN-Thymozyten durch Ausschluss von CD4⁺- und CD8⁺-Zellenfraktionen. Für die Bestimmung von T-Zellen aus der Milz (Abb 3.) wurde analog verfahren.

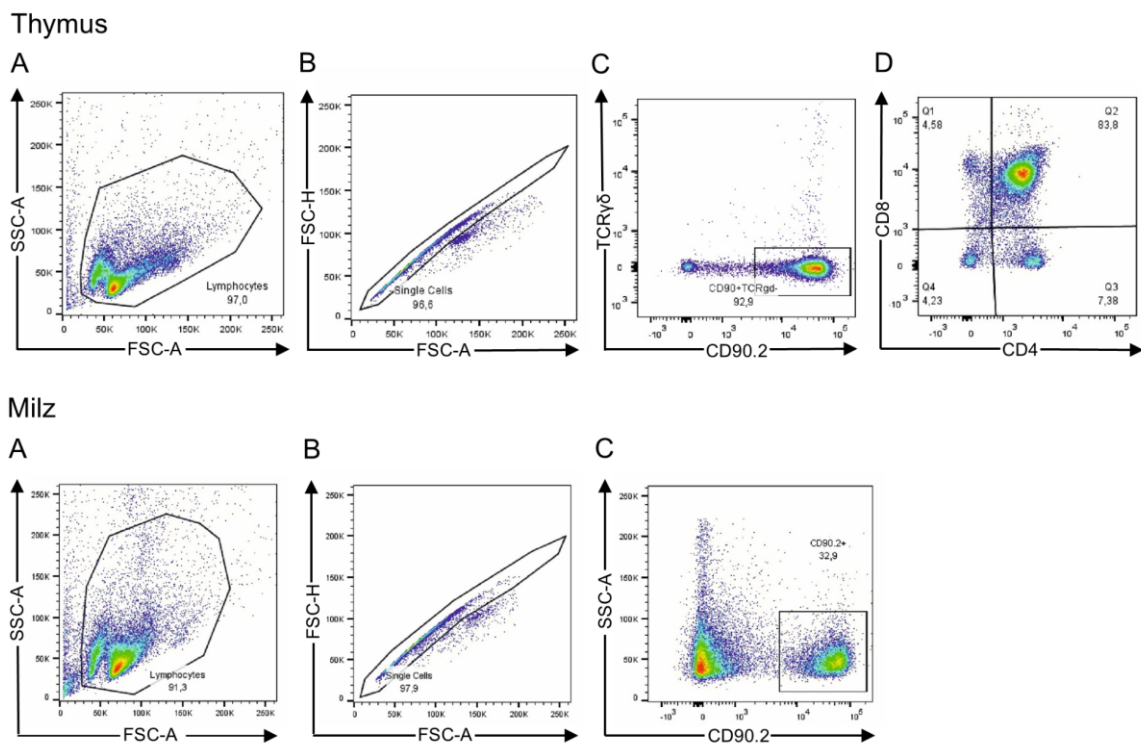


Abbildung 3: Gatingstrategie für Thymozyten und T-Zellen aus Thymus oder Milz

Thymus: (A und B) Zellen aus dem Thymus wurden als Einzelzellen sowie im nächsten Schritt als (C) CD90.2⁺ und TCRγδ⁻ Thymozyten bestimmt. Die Bestimmung der (D) DN-Thymozyten erfolgte mit der Färbung von CD4 und CD8 und ist in Q4 zu finden. Milz: (A und B) T-Zellen aus der Milz wurden als Einzelzellen sowie (C) CD90⁺ Zellen bestimmt.

Intrazelluläre Färbungen

Für die intrazellulären Färbungen mittels Stat5 wurde nach Ermittlung der Thymozyten- oder T-Zellfraktion (Abb. 3) eine Bestimmung des Geometric Mean der Fluoreszenz des Antikörpers durchgeführt (Abb. 4). Als Kontrolle diente eine Färbung mit Isotyp. Analog wurde mit den Färbungen von p-Stat5, p-Jak1 und p-Jak3 verfahren.

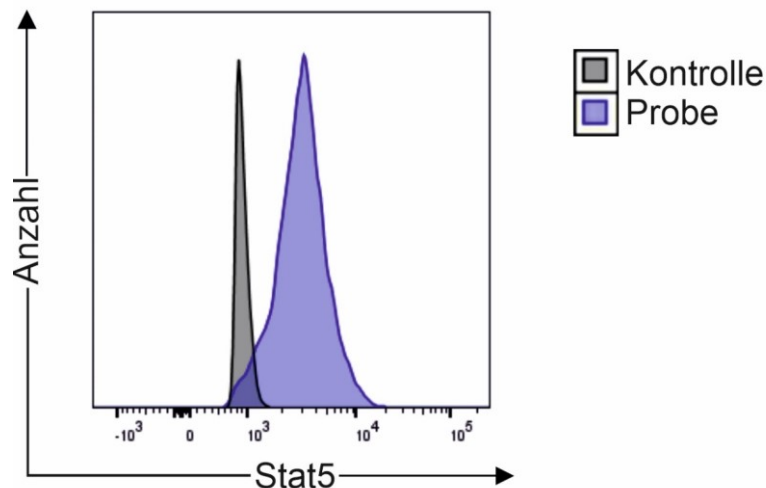


Abbildung 4: Intrazelluläre Bestimmung der Jak-Stat5-Signalkaskade

Repräsentative Färbung für Stat5. Für die Kontrolle wurde eine FMO-Probe mit Isotyp genutzt. Analog wurde für die Färbungen von p-Stat5, p-Jak1 und p-Jak3 verfahren.

Apoptose

Für die Bestimmung der Apoptose wurden Thymozyten oder T-Zellen zusätzlich mit Annexin V und dem DNA-Farbstoff 7-AAD gefärbt (Abb. 5). Im ersten Schritt wurden die Thymozyten oder T-Zellen wie oben beschrieben ermittelt (Abb. 3). Die Aufteilung in lebende, apoptotische und tote Zellen erfolgte über die 7-AAD/Annexin V-Färbung. Lebende Zellen befinden sich in der Annexin V⁻, 7-AAD⁻ Fraktion, apoptotische Zellen in der Annexin V⁺, 7-AAD⁻ Fraktion und tote Zellen in der Annexin V⁺, 7-AAD⁺ Fraktion.

2. Material und Methoden

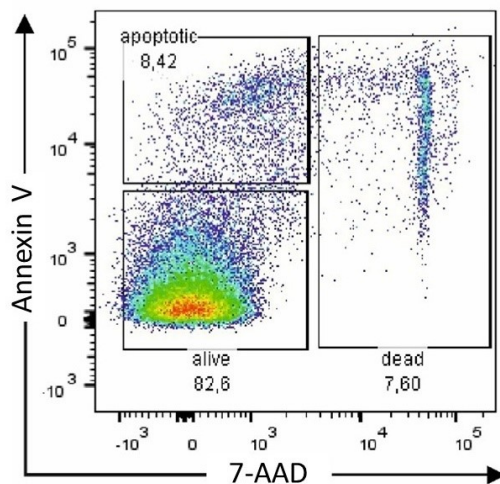


Abbildung 5: Untersuchung der Apoptose in Thymozyten und T-Zellen

Ermittlung des Anteils von lebenden (alive: Annexin V⁻, 7-AAD⁻), apoptotischen (apoptotic: Annexin V⁺, 7-AAD⁻) und toten (dead: Annexin V⁺, 7-AAD⁺) Zellen nach Stimulation des TZR-/IL-7R.

Zellzyklus

Zur Bestimmung des Zellzyklus erfolgte eine Färbung mit Bromdesoxyuridin (BrdU) und 7-AAD (Abb. 6). Der Anteil proliferierender Zellen in der Synthesephase ist BrdU⁺ sowie 7-AAD^{+/++}. Der Anteil von BrdU⁻ und 7-AAD⁺⁺ Zellen befindet sich in der G1-/Mitosephase. Der Anteil von BrdU⁻ und 7-AAD⁺ Zellen befindet sich in der G0- oder G1-Phase.

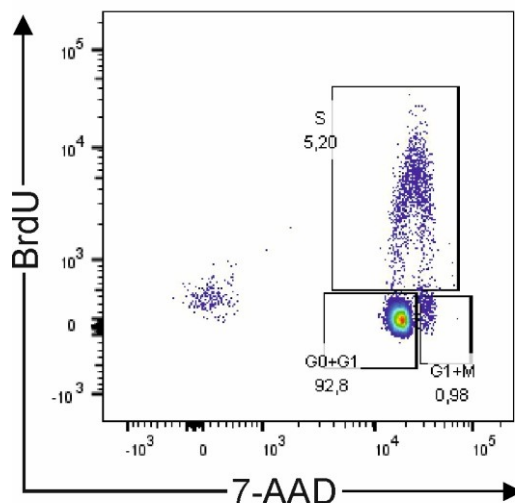


Abbildung 6: Bestimmung der Proliferation von stimulierten Thymozyten

Repräsentative Analyse des Zellzyklus ohne Stimulation mittels FITC-BrdU Flow Kit. Bestimmung der proliferierenden Thymozyten nach TZR-Stimulation. BrdU⁺ und 7-AAD^{+/++} Zellen befinden sich in der Synthesephase (S-Phase). BrdU⁻ und 7-AAD⁺⁺ Zellen befinden sich in der G1/Mitosephase (G1+M). BrdU⁻ und 7-AAD⁺ Zellen befinden sich in der G0/G1-Phase.

2.9 MACS

Die Isolation von DN-Thymozyten erfolgte mittels magnetischer Zellsortierung (MACS). Die Zellen wurden nach Bestimmung der Zellzahl und Suspension in MACS-Puffer entsprechend den Angaben des Herstellers mit dem TCR $\gamma\delta$ -Isolation-Kit und anti-Ter-119 für 5 Minuten bei 4°C inkubiert (Tab. 12). Im nächsten Schritt wurde der anti-Biotin Antikörper dazugegeben und die Zellen für weitere 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 300 g und 4°C erfolgte die Resuspension in MACS-Puffer. Die Depletion von Erythrozyten, TZR $\gamma\delta$ -positiven Zellen, sowie CD11b- und CD45R-positiven Zellen fand in LD-Säulen statt. Nach der Kontrolle der Zellzahl wurden die verbleibenden Zellen mit anti-CD8a und anti-CD4 für 15 Minuten inkubiert, gewaschen und zentrifugiert und erneut auf eine LD-Säule gegeben. Der Durchfluss enthält die DN-Zellen. Die Reinheit wurde mittels FACS-Analyse bestimmt. Diese lag bei ca. 92 %.

Tabelle 12: MACS-Material

MACS-Material	Hersteller
CD4 (L3T4) MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD8a (Ly-2) MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
LD Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS MultiStand	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MidiMACS Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
TCR $\gamma\delta$ T Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Ter-119 MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

2.10 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Die Durchführung der Chromatin-Immunopräzipitation erfolgte mit dem Pierce Agarose ChIP Kit von Thermo Fisher Scientific. Es wurden DN-Thymozyten aus der MACS-Isolation verwendet. Die Durchführung fand nach Herstellerangaben statt. Die Zellzahl für einen ChIP-Assay wurde auf $2,5 \cdot 10^6$ DN-Thymozyten erhöht. Zur Optimierung der Bedingungen für einen Durchlauf wurde eine Bestimmung der Fragmentlängen mit einer Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Es wurde dabei eine Konzentration von 0,3 μ l Nuclease pro ChIP

2. Material und Methoden

ermittelt. Die Antikörper wurden mit Konzentrationen von 7,68 µg/µl für PU.1, 5 µg/µl für H3, sowie 10 µg/µl für IgG eingesetzt (Tab. 7). Die Herstellung der Input Kontrolle, Elution und DNA-Recovery Schritte wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

Eine Bestimmung der isolierten DNA-Konzentrationen erfolgte mit einem NanoDrop. Die DNA wurde bis zu der Analyse mittels qPCR bei -80°C gelagert.

2.11 qPCR

Die Analyse der in der ChIP isolierten DNA erfolgte durch eine quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) mithilfe des AMPLIFYME Universal RT-qPCR Mix von Blirt. Für eine Reaktion wurden 5 µl des RT-qPCR Mix, 0,4 µl Primer forward [10 µM] und Primer reverse [10 µM], sowie 1,7 µl H₂O eingesetzt. Zur Analyse wurden 2,5 µl DNA in eine 96-well Platte pipettiert. Es wurden die Gene von IL-7R und Bcl-2, als Kontrolle der Etablierung, sowie das Referenzgen β-Aktin als Positivkontrolle analysiert (Tab. 8). Als Negativkontrolle wurde H₂O statt DNA verwendet. Für eine valide Messung wurden pro Probe Triplets pipettiert. Die Platte wurde für 1 Minute bei 1000 g zentrifugiert, um die Reaktionslösung am Boden zu sammeln. Die Analyse erfolgte in einem LightCycler 480 II mit dem Programm aus Tab. 13.

Tabelle 13: Programm LightCycler

Zyklen	Dauer	Temperatur	Funktion
1	5 Minuten	95°C	Präinkubation
45	10 Sekunden	95°C	Denaturierung
	10 Sekunden	60°C	Hybridisierung der Primer
	10 Sekunden	72°C	Elongation
1	5 Minuten	72°C	Finale Elongation

Als Referenz dienten die nach Herstellerangaben während der ChIP gewonnenen und aufbereiteten Input Kontrollen (IC). Eine Analyse der Daten erfolgte mit der LightCycler Software.

2.12 Statistische Methoden

Die statistische Analyse der Ergebnisse erfolgte mit GraphPad Prism. Die verwendete Methode ist jeweils in der Abbildung beschrieben. Die Auswertung der Daten erfolgte mit FlowJo, ImageLab und der LightCycler 480 Software. Die Erstellung der Grafiken erfolgte mit CorelDraw und PowerPoint.

3 Ergebnisse

3.1 Proteinbiochemische Analyse der Lokalisation von SLy1 und p-SLy1

Es ist bekannt, dass SLy1 in peripheren T-Zellen nach einer TZR-Aktivierung phosphoryliert wird und vom Nukleus ins Zytoplasma transloziert (Reis, 2007, Schäll et al., 2015). Dort kann es unter anderem mit 14-3-3 Proteinen interagieren (Schäll et al., 2015). Die Phosphorylierung von SLy1 in T-Zellen erfolgt nach einer TZR-Aktivierung am ehesten durch PI3K oder PKC, da gezeigt werden konnte, dass in Anwesenheit von PI3K- und PKC-Inhibitoren sowohl keine Phosphorylierung als auch keine Translokation mehr stattfindet (Astoul et al., 2003; Reis, 2007).

Es soll nun einerseits bestätigt werden, dass SLy1 auch in Thymozyten nach der Phosphorylierung ins Zytoplasma transloziert und andererseits überprüft werden, mit welcher Kinetik dieser Prozess abläuft. Hierfür wurden SLy1^{WT}-Thymozyten mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern für 20 und 60 Minuten stimuliert. Nach biochemischer Auftrennung in die nukleäre und zytoplasmatische Fraktion zeigt sich 20 Minuten nach Beginn der TZR-Stimulation ein signifikanter Anstieg der SLy1- sowie der p-SLy1-Expression im Zytoplasma (Abb. 7A und B, Tab. 14). Auch nach 60 Minuten Stimulation sind die Proteinlevel von SLy1 sowie p-SLy1 im Zytoplasma im Vergleich zum nicht-stimulierten Zustand noch tendenziell erhöht, jedoch nicht signifikant. Im Nukleus hingegen lässt sich kein signifikanter Unterschied der SLy1-Expression vor und nach Stimulation nachweisen. Es zeigt sich nach 20 Minuten im Nukleus bei p-SLy1 ein leichter, nicht signifikanter Anstieg, während SLy1 keine Veränderung zeigt. Nach 60 Minuten findet sich im Nukleus für SLy1 und p-SLy1 eine vergleichsweise leichte Reduktion des Proteinlevels. Die vielfache Phosphorylierung von SLy1 im Verhältnis zu p-SLy1 ergibt eine tendenzielle Erhöhung mit Maximum im Zytoplasma nach 20 Minuten und im Nukleus nach 60 Minuten, die aber nicht signifikant ist (Abb. 7C, Tab. 14).

3. Ergebnisse

Damit kann gezeigt werden, dass die Aktivierung bereits 20 Minuten nach Beginn der Stimulation in einem signifikanten Maß stattgefunden hat und p-SLy1 im Zytoplasma nachgewiesen werden kann. Eine Shuttlefunktion kann nicht sicher bestätigt werden, da kein signifikanter Abfall von SLy1 im Nucleus gemessen werden kann.

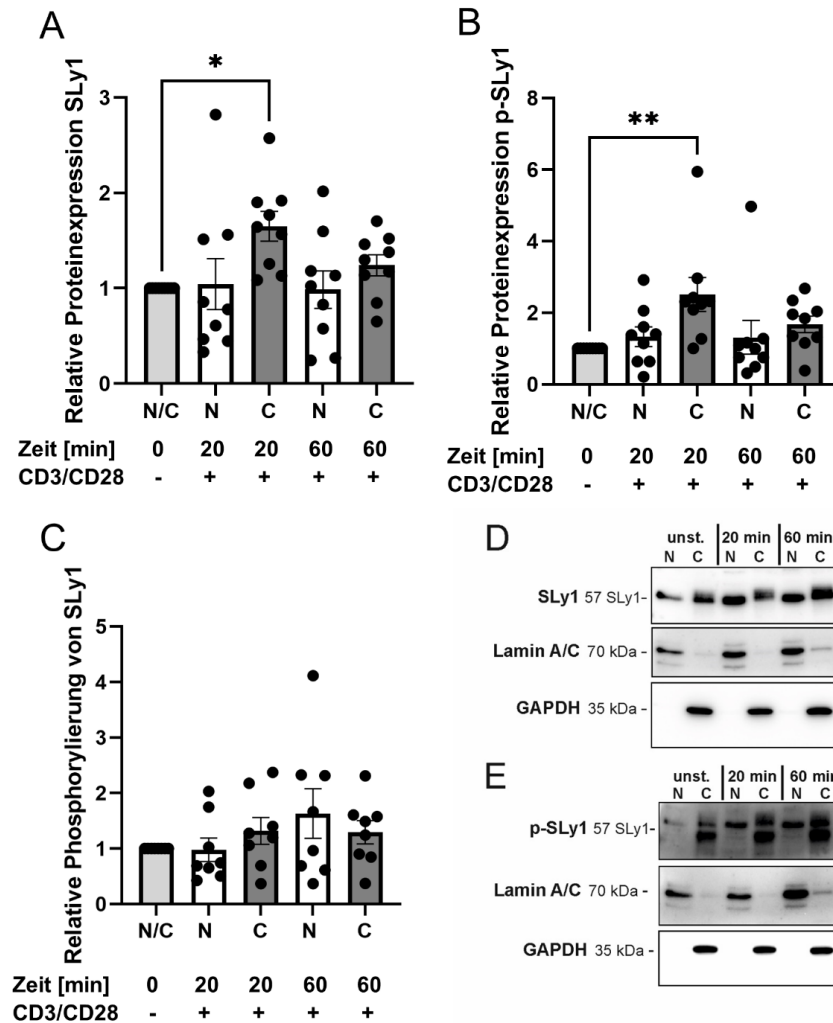


Abbildung 7: Expressionsanalyse von SLy1 und p-SLy1 in Thymozyten nach Stimulation

Auftrennung der nukleären (N) und zytoplasmatischen (C) Fraktion und Analyse der jeweiligen relativen Proteinexpression in Thymozyten von SLy1^{WT}-Mäusen nach TZR-Stimulation für 20 und 60 Minuten. Quantitative Auswertung der (A) SLy1- und (B) p-SLy1-Expression normalisiert auf Lamin A/C (nukleär) und GAPDH (zytoplasmatisch). Die Normierung der Werte erfolgte bezogen auf die unstimulierte Kontrolle. (C) Relative Phosphorylierung von p-SLy1 im Verhältnis zu SLy1. Repräsentativer Western Blot von (D) SLy1 und (E) p-SLy1. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SEM aus n=9 unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test. Signifikanzen sind mit * gekennzeichnet, *p<0,05, **p<0,01. Tabellarische Ergebnisse der Analyse siehe Anhang, Tab.14.

3.2 Analyse der Expression von Notch1 und Notch3 in SLy1^{KO}-Thymozyten

Der Notch-Signalweg ist für die Entwicklung von Thymozyten von großer Bedeutung. In den DN-Stadien ist eine hohe Expression von Notch1 für eine Festlegung auf die T-Zelllinie entscheidend (Radtke et al., 1999). Notch3 ist mit einer Beteiligung an der Expression der β -Kette sowie von CD4 und CD8 in der T-Zelldifferenzierung in den späten DN-Stadien bis zum DP-Stadium involviert (Bellavia et al., 2002). Die Expression von Notch ist in den DN-Stadien hoch und wird bei Notch1 mit Übergang zu den DP-Zellen herunterreguliert, während die Expression von Notch3 auch in DP-Zellen hoch ist (Hasserjian et al., 1996, Felli et al., 1999). Da die Entwicklung von Thymozyten in SLy1^{KO}-Mäusen gestört ist, ist eine Beteiligung von SLy1 an der Regulation des Notch-Signalwegs möglich (Reis et al., 2009). In vorangegangenen Versuchen konnten signifikant erhöhte Notch1 und Notch3 mRNA-Level in Thymozyten detektiert werden (Kloos, 2022). Außerdem ist die mRNA-Expression von Notch3 in SLy1^{KO} DN-Stadien signifikant erhöht, während sich keine Unterschiede in DP-Stadien finden (Kloos, 2022). Zur Bestätigung der Ergebnisse aus den Voruntersuchungen wurde eine proteinbiochemische Analyse der Notch1- und Notch3-Expression in Thymozyten durchgeführt. Die Lysate bestehen dabei aus Thymozyten. In der untenstehenden Abbildung findet sich eine signifikant erhöhte Expression von Notch1 in SLy1^{KO}-Thymozyten (Abb. 8A, Tab. 15). Die Expression ist um den Faktor 1,8 erhöht. Für Notch3 findet sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen SLy1^{KO}- und SLy1^{WT}-Thymozyten (Abb. 8B, Tab. 15). Damit kann bestätigt werden, dass SLy1 an der Regulation von Notch1 beteiligt ist. Für Notch3 hat sich keine unterschiedliche Proteinexpression in SLy1^{KO}-Thymozyten gezeigt.

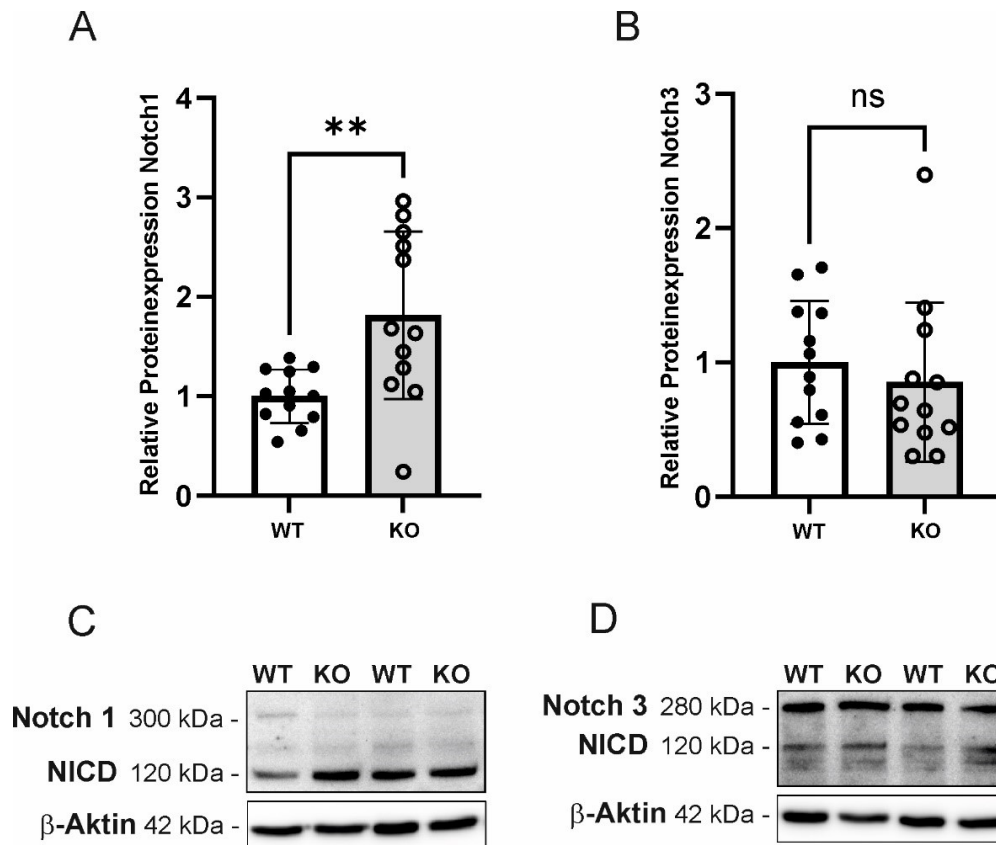


Abbildung 8: Expressionsanalyse von Notch1 und Notch3 in Thymozyten

Quantitative Auswertung der (A) Notch1 und (B) Notch3-Expression in Thymozyten von SLy1^{WT} und SLy1^{KO} Mäusen mit Werten aus drei unabhängigen Experimenten. Die Normalisierung erfolgte zunächst auf β -Aktin und die Normierung auf die SLy1^{WT}-Werte. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD für n=12. Statistische Analysen erfolgten mit einem t-Test für unabhängige Stichproben. Signifikanzen sind mit * gekennzeichnet, *p<0,05, **p<0,01, ns = nicht signifikant. Repräsentativer Western Blot von (C) Notch1 und (D) Notch3. Notch1 und Notch3 bezeichnet die entsprechende Intermembrandomäne. NICD zeigt die intrazelluläre Notch-Domäne nach Aktivierung und Spaltung durch die γ -Secretase. Tabellarische Ergebnisse der Analyse siehe Anhang, Tab. 15.

3.3 Analyse der intrazellulären Signalwege in SLy1^{KO}-Thymozyten nach IL-7R-Stimulation

3.3.1 Analyse des IL-7R-Signalwegs

Der IL-7/IL-7R-Signalweg ist für Entwicklung, Proliferation und Überleben von T-Zellen unverzichtbar (von Freedden-Jeffrey et al., 1997; Yu et al., 2006). Im Thymus gehört die IL-7R/Jak1/3/Stat5-Achse in den DN-Stadien zu den Regulatoren für die Steuerung von Zielgenen wie zum Beispiel von anti-apoptotischen Proteine wie Bcl-2 (Sentman et al., 1991). Auch nach Verlassen des Thymus als naive T-Zellen trägt IL-7 zur Homöostase und Proliferation bei (Chu et al., 2004). Ebenso

3. Ergebnisse

sind Signale über den in der T-Zellentwicklung gebildeten TZR $\alpha\beta$ wichtig für das weitere Überleben sowie die Differenzierung und Migration der Zellen im Thymus (Takahama et al., 2010). Da Stat5 ebenfalls nach TZR-Aktivierung über die Kinase Lck phosphoryliert und aktiviert wird (Welte et al., 1999), ergibt sich für den Versuchsaufbau damit eine Stimulationskontrolle. Es ist aus vorherigen Arbeiten bekannt, dass die mRNA-Expression von IL-7R α in SLy1^{KO}-Thymozyten und DN-Thymozyten signifikant erhöht ist, während auch die mRNA-Expression von Stat5b in Thymozyten von SLy1^{KO}-Mäusen signifikant erhöht ist (Kloos, 2022). Bei der Untersuchung der Phosphorylierungsrate von Stat5 in SLy1^{KO}- im Vergleich zu SLy1^{WT}-Thymozyten konnte eine signifikante Erhöhung festgestellt werden (Kloos, 2022).

3.3.1.1 Analyse der Stat5-Expression

Um die Auswirkung von SLy1 auf die Aktivierung des Stat5-Signalwegs mithilfe der Durchflusszytometrie beurteilen zu können, erfolgt eine *in vitro* IL-7R- und TZR-Stimulation im Zeitverlauf von 6 Stunden. Die Etablierung des Versuchs wurde mit Expressionsanalysen von Stat5 mit peripheren aus der Milz isolierten T-Zellen durchgeführt (Abb. 9). Die Messpunkte lagen bei 15 Minuten, 2 Stunden und 6 Stunden nach Beginn der Stimulation mit entweder IL-7 oder anti-CD3/CD28. Gleichzeitig wurde die Aktivität von Jak1 und Jak3 nach einer IL-7R-Aktivierung betrachtet. Die Analyse erfolgte in SLy1^{KO}- und SLy1^{WT}-Thymozyten, DN-Thymozyten und aus der Milz isolierten peripheren T-Zellen (Abb. 10, Tab. 18 und 19).

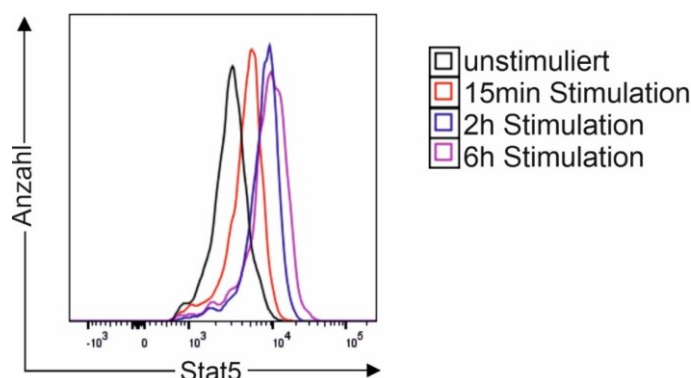


Abbildung 9: Darstellung der Stat5-Expression nach Stimulation

Darstellung der Expression von Stat5 unstimuliert (schwarz) und nach 15 Minuten (rot), 2 Stunden (blau) und 6 Stunden (lila) IL-7R-Stimulation in T-Zellen. Analog erfolgte die Analyse in (DN-) Thymozyten sowie nach TZR-Stimulation.

3. Ergebnisse

Es kann für keine der Zellgruppen in der Stat5-Expression ein signifikanter Unterschied zwischen SLy1^{KO} und SLy1^{WT} gemessen werden (Abb. 10, Tab. 18 und 19). In Thymozyten zeigt sich nach einer IL-7R-Stimulation kein signifikanter Unterschied in der Stat5-Expression nach 15 Minuten, 2 Stunden oder 6 Stunden (Abb. 10, Tab. 18). In DN-Thymozyten kann über den Stimulationsverlauf ebenfalls keine signifikante Änderung der Stat5-Expression gemessen werden. In T-Zellen findet sich nach 15 Minuten und 2 Stunden eine signifikante Abnahme von Stat5 für SLy1^{KO} und SLy1^{WT} (Abb. 10, Tab. 18). Das könnte für eine verstärkte Phosphorylierung von Stat5 nach IL-7R-Aktivierung sprechen. Nach 6 Stunden werden wieder annähernd die Ausgangswerte bei Stimulationsbeginn gemessen (Abb. 10, Tab. 18).

Nach der TZR-Stimulation zeigt sich in Thymozyten eine signifikante Zunahme der Stat5-Expression nach 15 Minuten für SLy1^{KO}- und SLy1^{WT}-Zellen (Abb. 10, Tab. 19). In DN-Thymozyten kann tendenziell eher eine Abnahme für beide Genotypen gemessen werden, die aber nicht signifikant ist (Abb.10, Tab. 19). In T-Zellen zeigt sich eine signifikante Zunahme der Stat5-Expression über alle Zeitintervalle bis 6 Stunden für SLy1^{KO} und SLy1^{WT} (Abb. 10, Tab. 19).

3. Ergebnisse

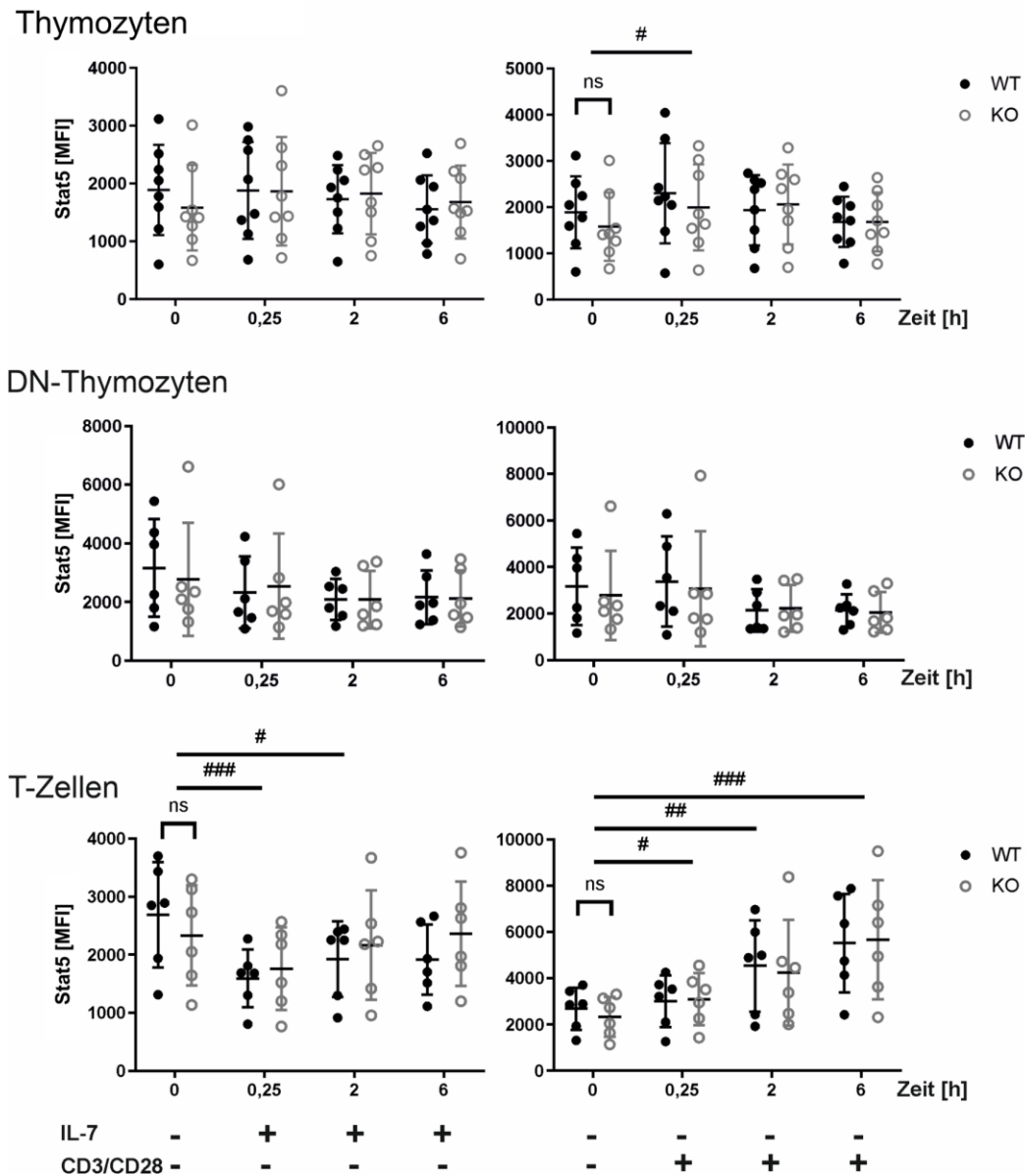


Abbildung 10: Analyse der Stat5-Expression

Auswertung der Fluoreszenzintensität durch den Geometric Mean für Stat5 in SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-Thykozyten, DN-Thykozyten und T-Zellen nach IL-7R- oder TZR-Stimulation nach 15 Minuten, 2 Stunden und 6 Stunden aus n=8 unabhängigen Experimenten für Thykozyten und aus n=6 unabhängigen Experimenten für DN-Thykozyten und T-Zellen. Eine unstimulierte Probe dient als Kontrolle. Gezeigt ist der Mittelwert ± SD. Statistische Analysen erfolgten durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse (Two-Way ANOVA) für zusammengehörende Werte über die Zeit. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen SLy1^{WT} und SLy1^{KO}. Signifikanzen zwischen verschiedenen Zeitpunkten sind mit # gekennzeichnet, #p<0,05, ###p<0,01. ####p<0,001, ns = nicht signifikant. Tabellarische Ergebnisse der Analyse siehe Anhang, Tab.18 und 19.

3. Ergebnisse

3.3.1.2 Analyse der p-Stat5-Expression

Für die Phosphorylierung von Stat5 kann mit dieser Methode in der Durchflusszytometrie kein signifikanter Unterschied zwischen den Zeitintervallen oder zwischen SLy1^{KO} und SLy1^{WT} gemessen werden (Abb. 11, Tab. 18 und 19).

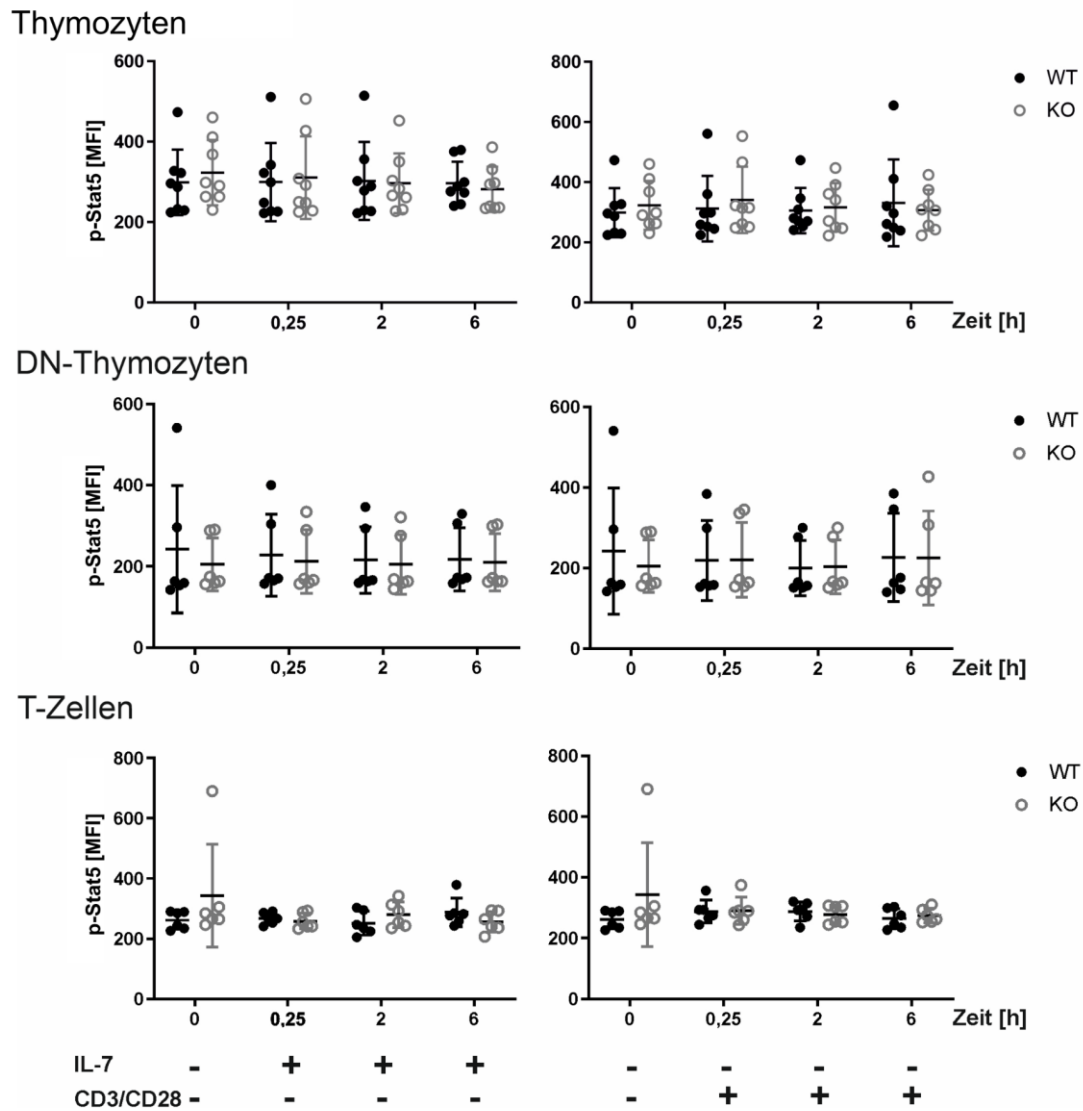


Abbildung 11: Analyse der p-Stat5-Expression

Auswertung der Fluoreszenzintensität durch den Geometric Mean für p-Stat5 in SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-Thymozyten, DN-Thymozyten und T-Zellen nach IL-7R- oder TZR-Stimulation nach 15 Minuten, 2 Stunden und 6 Stunden aus n=8 unabhängigen Experimenten für Thymozyten und aus n=6 unabhängigen Experimenten für DN-Thymozyten und T-Zellen. Eine unstimulierte Probe dient als Kontrolle. Statistische Analysen erfolgten durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse für zusammengehörnde Werte über die Zeit. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied gemessen werden. Tabellarische Ergebnisse der Analyse siehe Anhang, Tab.18 und 19.

3. Ergebnisse

Um den Sachverhalt genauer zu betrachten, wurde auch das Verhältnis von p-Stat5 zu Stat5 zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht (Abb. 12).

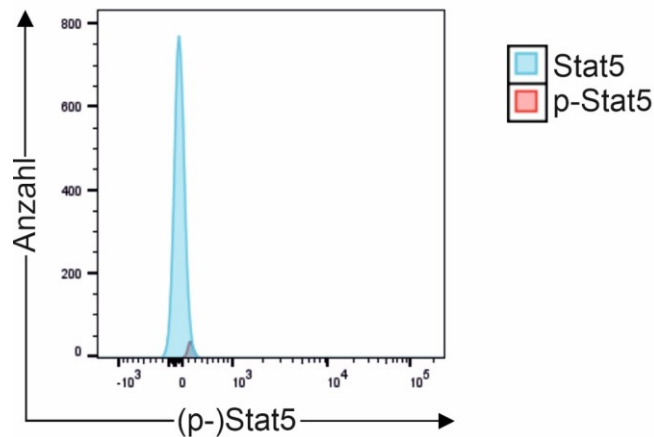


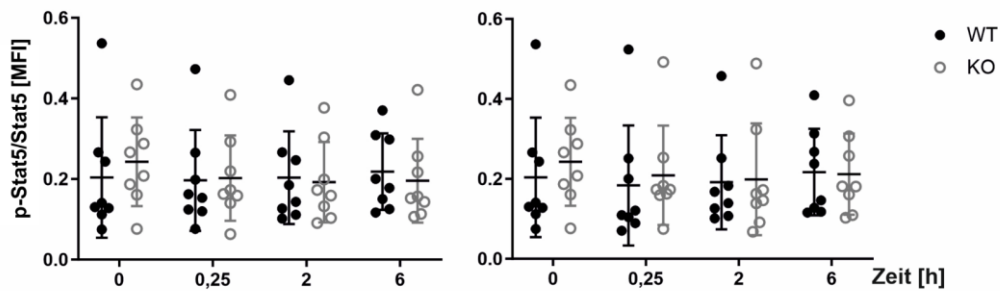
Abbildung 12: Darstellung der Phosphorylierung von Stat5

Exemplarische Darstellung der Stat5-Expression in unstimulierten T-Zellen, sowie der p-Stat5-Expression nach 2 Stunden Stimulation in T-Zellen.

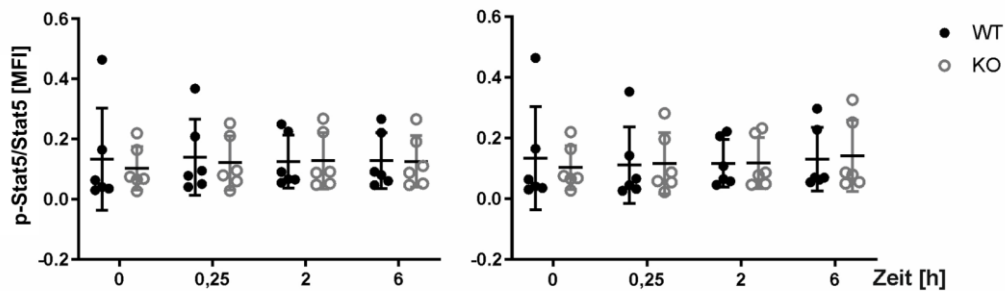
In Thymozyten und DN-Thymozyten können nach Stimulationen keine relevanten Änderungen der Phosphorylierungsrate gemessen werden (Abb. 13), obwohl dies zu erwarten gewesen wäre. In T-Zellen kann nach der IL-7R-Stimulation eine tendenzielle Zunahme der Phosphorylierungsrate beobachtet werden, die aber nicht signifikant ist (Abb. 13). Nach der TZR-Stimulation kann in T-Zellen, bedingt durch die Steigerung der Stat5-Expression, eine signifikante Abnahme der Phosphorylierungsrate über alle Zeitintervalle beobachtet werden (Abb. 13). Insgesamt zeigt sich für SLy1^{KO}- und SLy1^{WT}-T-Zellen nach IL-7R- und TZR-Stimulation innerhalb von 2 Stunden eine Zunahme der Stat5-Expression, während die Phosphorylierungsrate nicht signifikant verändert ist.

3. Ergebnisse

Thymozyten



DN-Thymozyten



T-Zellen

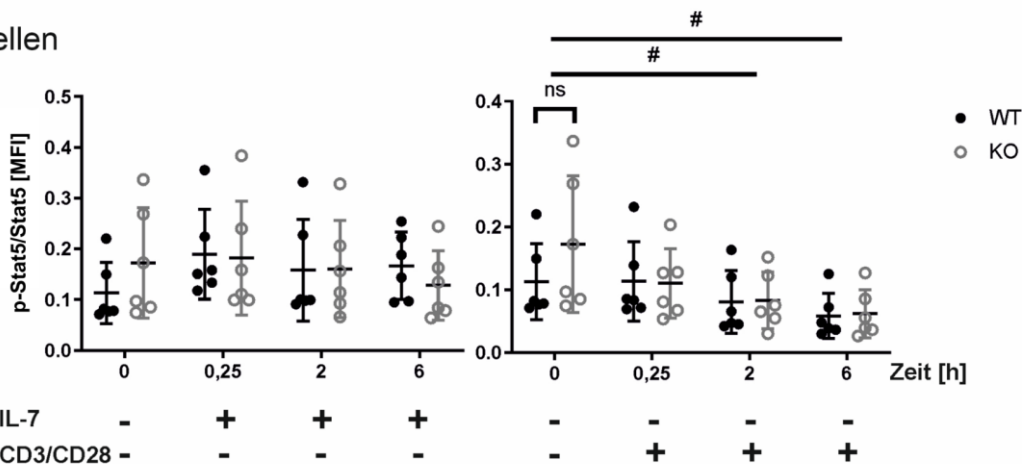


Abbildung 13: Verhältnis von p-Stat5 zu Stat5

Verhältnis der Fluoreszenzintensität nach Geometric Mean von p-Stat5 zu Stat5 in SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-Thymozyten, DN-Thymozyten und T-Zellen nach IL-7R- oder TZR-Stimulation nach 15 Minuten, 2 Stunden und 6 Stunden aus n=8 unabhängigen Experimenten für Thymozyten und aus n=6 unabhängigen Experimenten für DN-Thymozyten und T-Zellen. Eine unstimulierte Probe dient als Kontrolle. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD. Statistische Analysen erfolgten durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse für zusammengehörende Werte über die Zeit. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen SLy1^{WT} und SLy1^{KO}. Signifikanzen zwischen verschiedenen Zeitpunkten sind mit # gekennzeichnet, #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001, ns = nicht signifikant.

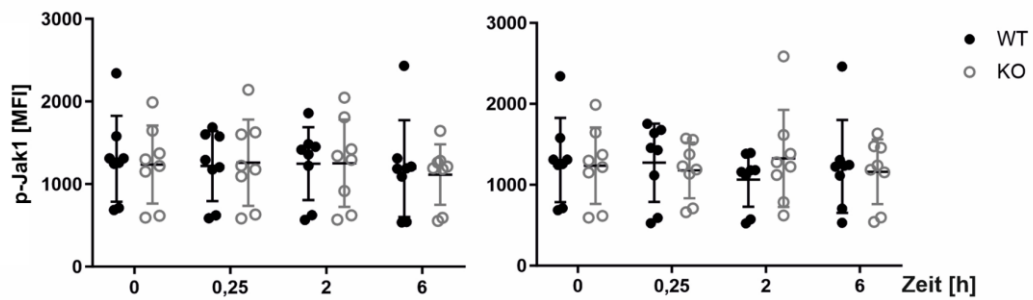
3. Ergebnisse

3.3.1.3 Analyse der p-Jak1-Expression

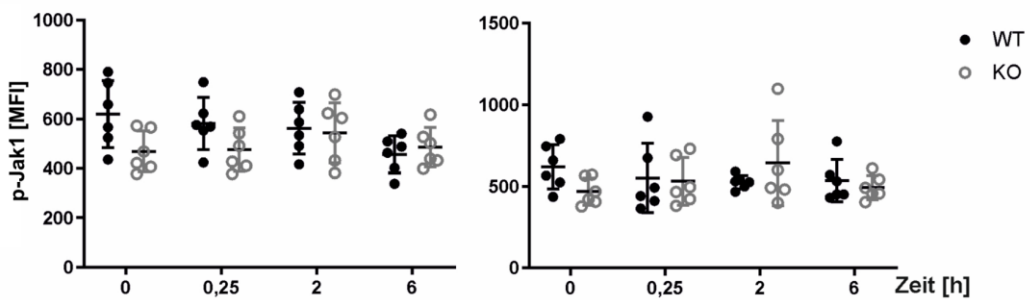
Die Kinase Jak1 ist mit dem IL-7R α assoziiert und wird nach IL-7R-Aktivierung durch Jak3 phosphoryliert (Jiang et al., 2005). Die Phosphorylierung nach TZR-Aktivierung wird in diesem Versuchsaufbau als Kontrolle ebenfalls gemessen, da Signale über den TZR in T-Zellen durch die Regulation durch microRNAs zu einer Inhibierung der Jak1-Proteinsynthese führen (Katz et al., 2014). Vorherige Arbeiten mithilfe von Immunoblots zeigten, dass die Proteinexpression von Jak1 in SLy1^{KO}-Thymozyten erhöht ist, während bei der Phosphorylierung keine signifikante Änderung festgestellt werden konnte (Schneider, 2022). Bei der durchflusszytometrischen Analyse der Phosphorylierung von Jak1 nach Aktivierung des IL-7R zeigt sich keine signifikante Erhöhung von p-Jak1, weder in den SLy1^{KO}- noch in den SLy1^{WT}-Zellgruppen (Abb. 14, Tab. 18). Nach einer TZR-Aktivierung kann weder in SLy1^{KO}- noch SLy1^{WT}-Thymozyten oder T-Zellen ein signifikanter Unterschied gemessen werden (Abb. 14, Tab. 19).

3. Ergebnisse

Thymozyten



DN-Thymozyten



T-Zellen

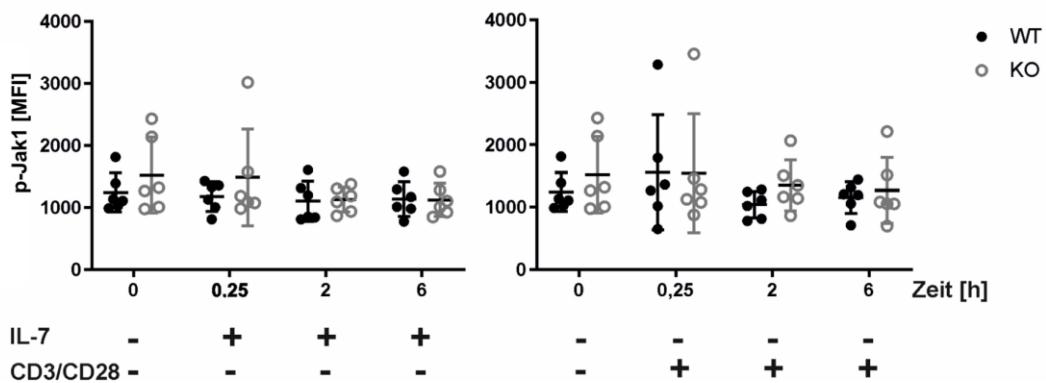


Abbildung 14: Analyse der p-Jak1-Expression

Auswertung der Fluoreszenzintensität durch den Geometric Mean für p-Jak1 in SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-Thymozyten, DN-Thymozyten und T-Zellen nach IL-7R- oder TZR-Stimulation nach 15 Minuten, 2 Stunden und 6 Stunden aus n=8 unabhängigen Experimenten für Thymozyten und aus n=6 unabhängigen Experimenten für DN-Thymozyten und T-Zellen. Eine unstimulierte Probe dient als Kontrolle. Statistische Analysen erfolgten durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse für zusammengehörnde Werte über die Zeit. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied gemessen werden. Tabellarische Ergebnisse der Analyse siehe Anhang, Tab.18 und 19.

3. Ergebnisse

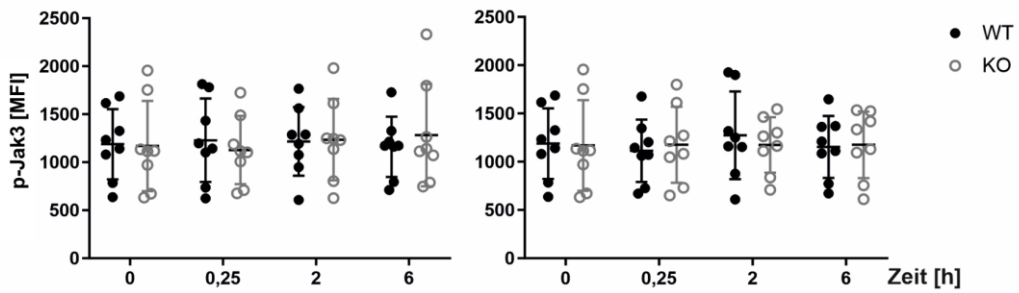
3.3.1.4 Analyse der p-Jak3-Expression

Eine weitere am IL-7/IL-7R-Signalweg beteiligte Kinase ist Jak3, die mit der γ_c -Kette des IL-7R assoziiert ist (Suzuki et al., 2000). Nach Bindung von IL-7 an den Rezeptor wird Jak3 durch Jak1 phosphoryliert und damit aktiviert (Jiang et al., 2005). Die Phosphorylierung nach TZR-Aktivierung wird in diesem Versuchsaufbau als Kontrolle mitgemessen, da nach einer TZR-Stimulation Jak3 vermittelt über die Kinase Lck direkt aktiviert wird (Tomita et al., 2001). In Vorarbeiten ergab sich in SLy1^{KO}-Thymozyten eine signifikant reduzierte Phosphorylierung von Jak3, im Vergleich zu SLy1^{WT}-Zellen allerdings keine signifikanten Unterschiede in der Expression (Schneider, 2022).

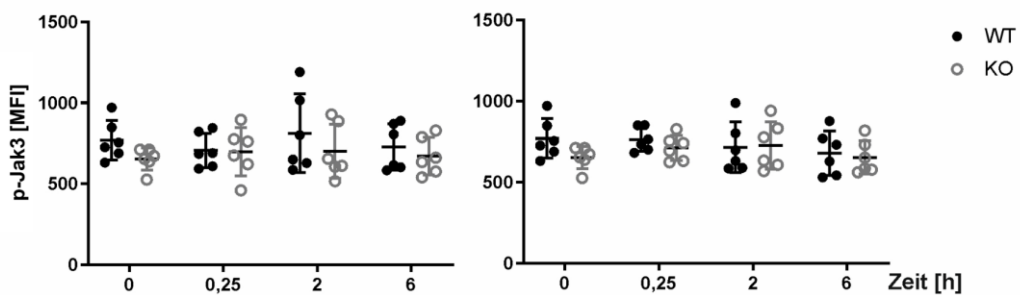
In der Analyse mittels Durchflusszytometrie zeigt sich für die verschiedenen Zellgruppen ebenfalls keine signifikante Veränderung der Phosphorylierung von Jak3 nach IL-7R-Stimulation (Abb. 15, Tab. 18). Nach TZR-Stimulation zeichnet sich keine signifikante Veränderung der Phosphorylierung von Jak3 ab (Abb.15, Tab. 19). Unabhängig von der Stimulationsart konnte kein signifikanter Unterschied zwischen SLy1^{KO} und SLy1^{WT} gemessen werden (Abb. 15, Tab. 18 und 19).

3. Ergebnisse

Thymozyten



DN-Thymozyten



T-Zellen

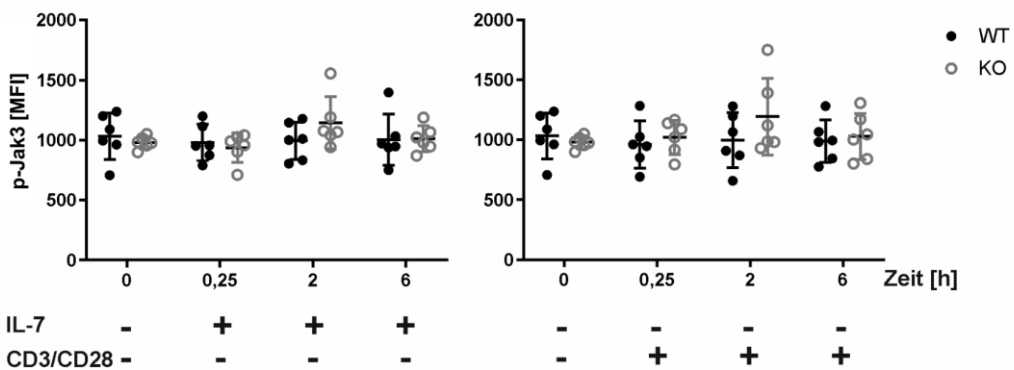


Abbildung 15: Analyse der p-Jak3-Expression

Auswertung der Fluoreszenzintensität durch den Geometric Mean für p-Jak3 in SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}- Thymozyten, DN-Thymozyten und T-Zellen nach IL-7R- oder TZR-Stimulation nach 15 Minuten, 2 Stunden und 6 Stunden aus n=8 unabhängigen Experimenten für Thymozyten und aus n=6 unabhängigen Experimenten für DN-Thymozyten und T-Zellen. Eine unstimulierte Probe dient als Kontrolle. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD. Statistische Analysen erfolgten durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse für zusammengehörende Werte über die Zeit. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied gemessen werden. Tabellarische Ergebnisse der Analyse siehe Anhang, Tab.18 und 19.

3. Ergebnisse

3.3.1.5 Vergleich der Expression der IL-7R-Signalwegproteine

Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde die Expression der Mitglieder des IL-7R-Signalwegs in den drei Zellgruppen ohne Stimulation genauer betrachtet. Aus Vorarbeiten ist bekannt, dass die Expression von Stat5b signifikant erhöht ist, während sich bei p-Stat5 keine signifikanten Unterschiede zwischen SLy1^{KO}- und SLy1^{WT}-Thymozyten finden lassen (Kloos, 2022). Weiter konnte in der Expression von p-Jak1 keine signifikante Veränderung festgestellt werden, während die Expression von p-Jak3 in SLy1^{KO} signifikant reduziert war (Schneider, 2022).

In der Analyse mittels Durchflusszytometrie von Stat5, p-Stat5, p-Jak1 und p-Jak3 können zwischen SLy1^{KO}- und SLy1^{WT}-Thymozyten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 16, Tab. 16). Damit können die zuvor beschriebenen Veränderungen von Stat5b und p-Jak3 in SLy1^{KO}-Thymozyten mittels Durchflusszytometrie nicht bestätigt werden.

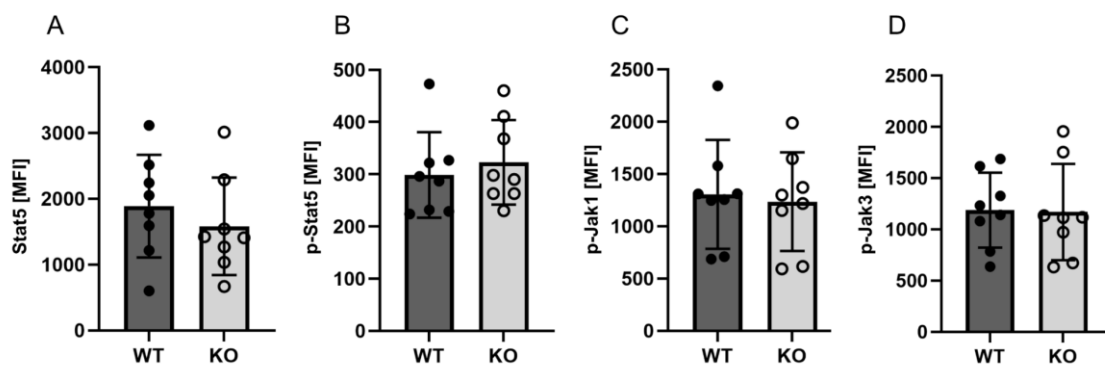


Abbildung 16: Expression von Stat5, p-Stat5, p-Jak1 und p-Jak3 in Thymozyten

Auswertung der Fluoreszenzintensität durch den Geometric Mean für Stat5 (A), p-Stat5 (B), p-Jak1 (C) und p-Jak3 (D) in unstimulierten SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-Thymozyten aus n=6 unabhängigen Experimenten. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD. Statistische Analysen erfolgten mit einem t-Test für unabhängige Stichproben. Tabellarische Ergebnisse der Analyse siehe Anhang, Tab. 16.

In DN-Thymozyten zeigen sich ebenfalls keine Unterschiede zwischen SLy1^{KO} und SLy1^{WT} bei der Stat5 oder p-Stat5-Expression (Abb. 17A und B, Tab. 16). Damit kann bestätigt werden, dass SLy1 keinen Einfluss auf die Stat5-Expression und Phosphorylierung in DN-Thymozyten zu haben scheint (Kloos, 2022). In Vorarbeiten konnten keine signifikanten Unterschiede in der p-Jak1-Proteinexpression gefunden werden (Schneider, 2022).

3. Ergebnisse

In der Analyse mittels Durchflusszytometrie kann interessanterweise eine reduzierte p-Jak1-Expression nachgewiesen werden (Abb. 17 C, Tab. 16). Für p-Jak3 konnte bereits eine signifikant verminderte p-Jak3-Proteinexpression nachgewiesen werden (Schneider, 2022), während sich hier eine tendenzielle, aber nicht signifikant reduzierte p-Jak3-Expression in DN-Thymozyten zeigt (Abb. 17D, Tab. 16).

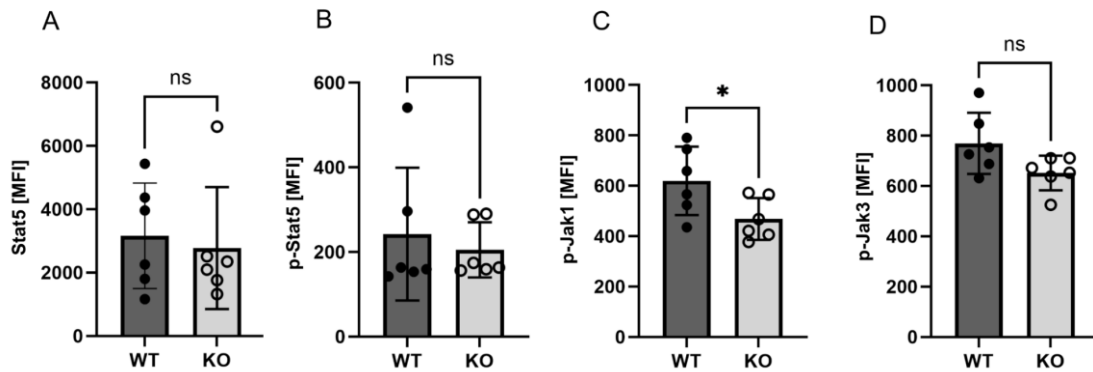


Abbildung 17: Expression von Stat5, p-Stat5, p-Jak1 und p-Jak3 in DN-Thymozyten

Auswertung der Fluoreszenzintensität durch den Geometric Mean für Stat5 (A), p-Stat5 (B), p-Jak1 (C) und p-Jak3 (D) in unstimulierten SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-DN-Thymozyten aus n=6 unabhängigen Experimenten. Statistische Analysen erfolgten mit einem t-Test für unabhängige Stichproben. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD. Signifikanzen sind mit * gekennzeichnet, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ns = nicht signifikant. Tabellarische Ergebnisse der Analyse siehe Anhang, Tab. 16.

Zur Expression des IL-7R-Signalwegs in SLy1^{KO}-T-Zellen lagen bisher noch keine Daten vor. In der Durchflusszytometrie können jedoch ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen SLy1^{KO}- und SLy1^{WT}-T-Zellen in der Expression von Stat5, p-Stat5, p-Jak1 oder p-Jak3 gefunden werden (Abb. 18, Tab. 16). Das spricht dafür, dass SLy1 in peripheren T-Zellen keinen Einfluss auf die Expression der IL-7R-Signalproteine zu haben scheint. Für eine definitive Aussage sind allerdings noch weitere Untersuchungen notwendig.

3. Ergebnisse

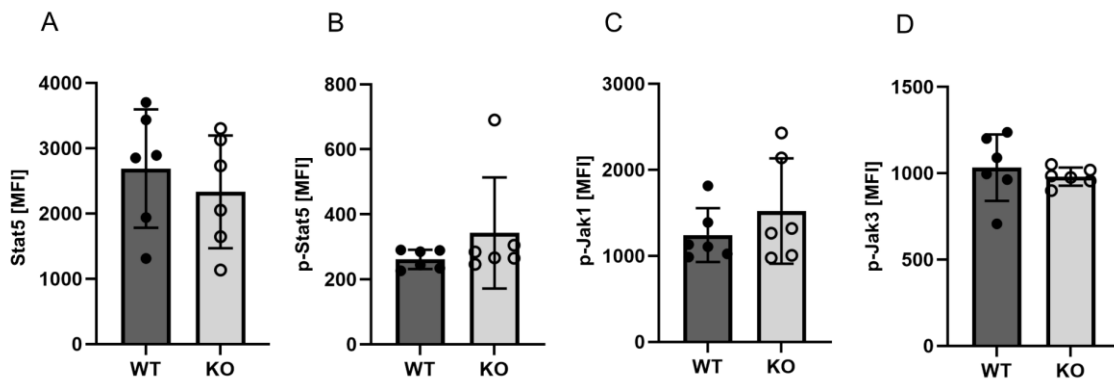


Abbildung 18: Expression von Stat5, p-Stat5, p-Jak1 und p-Jak3 in T-Zellen

Auswertung der Fluoreszenzintensität durch den Geometric Mean für Stat5 (A), p-Stat5 (B), p-Jak1 (C) und p-Jak3 (D) in unstimulierten SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-T-Zellen aus n=6 unabhängigen Experimenten. Statistische Analysen erfolgten mit einem t-Test für unabhängige Stichproben. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD. Tabellarische Ergebnisse der Analyse siehe Anhang, Tab. 16.

3.3.2 Auswirkungen der SLy1-Defizienz auf die Apoptose

Die Apoptose ist ein integraler Bestandteil der Entwicklung von T-Zellen im Thymus. So gehen DN-Thymozyten, die bestimmte Entwicklungsschritte wie die Ausbildung des TZR $\alpha\beta$ oder TZR $\gamma\delta$ nicht erreichen, in die Apoptose (Falk et al., 2001). Die Induktion der Apoptose in einer Zelle läuft dabei hauptsächlich über den intrinsischen Weg und zu einem geringeren Teil über den extrinsischen Weg ab (Green und Llambi, 2015). Die Regulation des intrinsischen, mitochondrialen Wegs erfolgt über die Expression von anti-apoptotischen Proteinen wie Bcl-2 und pro-apoptotischen Proteinen wie Bim, Puma oder Bax (Green und Llambi, 2015; Khaled et al., 2002). Der IL-7R-Signalweg hat in der Entwicklung, sowie in peripheren T-Zellen unter anderem Einfluss auf Bcl-2 und damit auf die Steuerung des Überlebens (Sentman et al., 1991; Tan et al., 2001). Nach wiederholter Aktivierung des TZR *in vivo*, zum Beispiel durch Antigene, zeigten sich periphere T-Zellen ebenfalls anfälliger für die Apoptose (Taylor et al., 2007).

In vorherigen Versuchen konnte eine Bcl-2-Überexpression in SLy1^{KO}-Thymozyten bereits festgestellt werden (Schäll, 2015). Es konnte aber in einer ersten Apoptoseanalyse in Mäusen, die mit *Listeria monocytogenes* infiziert waren, zwischen SLy1^{KO}- und SLy1^{WT}-T-Zellen kein signifikanter Unterschied in lebenden oder apoptotischen Zellen gezeigt werden (Schäll et al., 2015). Um die Apoptose auch in Thymozyten genauer beurteilen zu können, wurden nun

3. Ergebnisse

Stimulationsversuche mit Stimulation des IL-7R oder TZR in Thymozyten, DN-Thymozyten und T-Zellen durchgeführt. Es erfolgte in der Durchflusszytometrie eine Unterteilung in lebende (Annexin⁻, 7-AAD⁻), apoptotische (Annexin⁺, 7-AAD⁻) und tote (Annexin⁺, 7-AAD⁺) Zellen. Die Messungen fanden ohne Stimulation sowie 15 Minuten, 2 Stunden und 6 Stunden nach Stimulationsbeginn statt.

3.3.2.1 Apoptose in Thymozyten

In Thymozyten finden sich in toten und lebenden Populationen nach Stimulation weder zwischen verschiedenen Zeitpunkten, noch zwischen SLy1^{KO} und SLy1^{WT} signifikante Unterschiede (Abb. 19, Tab. 20 und 21). In apoptotischen Zellen können nach IL-7R-Stimulation ebenfalls keine signifikanten Unterschiede detektiert werden. Nach TZR-Stimulation kann eine signifikante Zunahme des Anteils an apoptotischen Zellen nach 2 und 6 Stunden gemessen werden, es zeigen sich aber ebenfalls keine Unterschiede zwischen SLy1^{KO} und SLy1^{WT} (Abb. 19, Tab. 20).

3.3.2.2 Apoptose in DN-Thymozyten

Die DN-Thymozyten zeigen unabhängig von SLy1 sowie der IL-7R- oder TZR-Stimulation eine signifikante Abnahme des Anteils an lebenden Zellen bereits nach 2 Stunden und ebenfalls nach 6 Stunden (Abb. 20, Tab. 20 und 21). Das deutet auf eine Instabilität *in vitro* im Vergleich zu peripheren T-Zellen (Abb. 21) hin. Bei der Stimulation des IL-7R ist der Anteil an apoptotischen Zellen in SLy1^{KO} im Vergleich zu SLy1^{WT}-DN-Thymozyten signifikant reduziert. Dieser Unterschied findet sich nach TZR-Stimulation nicht. Es kann allerdings stimulationsunabhängig nach 2 und 6 Stunden eine Zunahme der apoptotischen Zellen festgestellt werden (Abb. 20, Tab. 20 und 21). Bei dem Anteil an toten Zellen kann ebenfalls kein Unterschied zwischen SLy1^{KO} und SLy1^{WT} festgestellt werden. Es findet sich eine signifikante Zunahme des Anteils an toten Zellen nach IL-7R-Stimulation nach 6 Stunden, sowie tendenziell über die Zeit eine generelle Zunahme unabhängig von der Stimulationsart, die aber nicht signifikant ist.

3. Ergebnisse

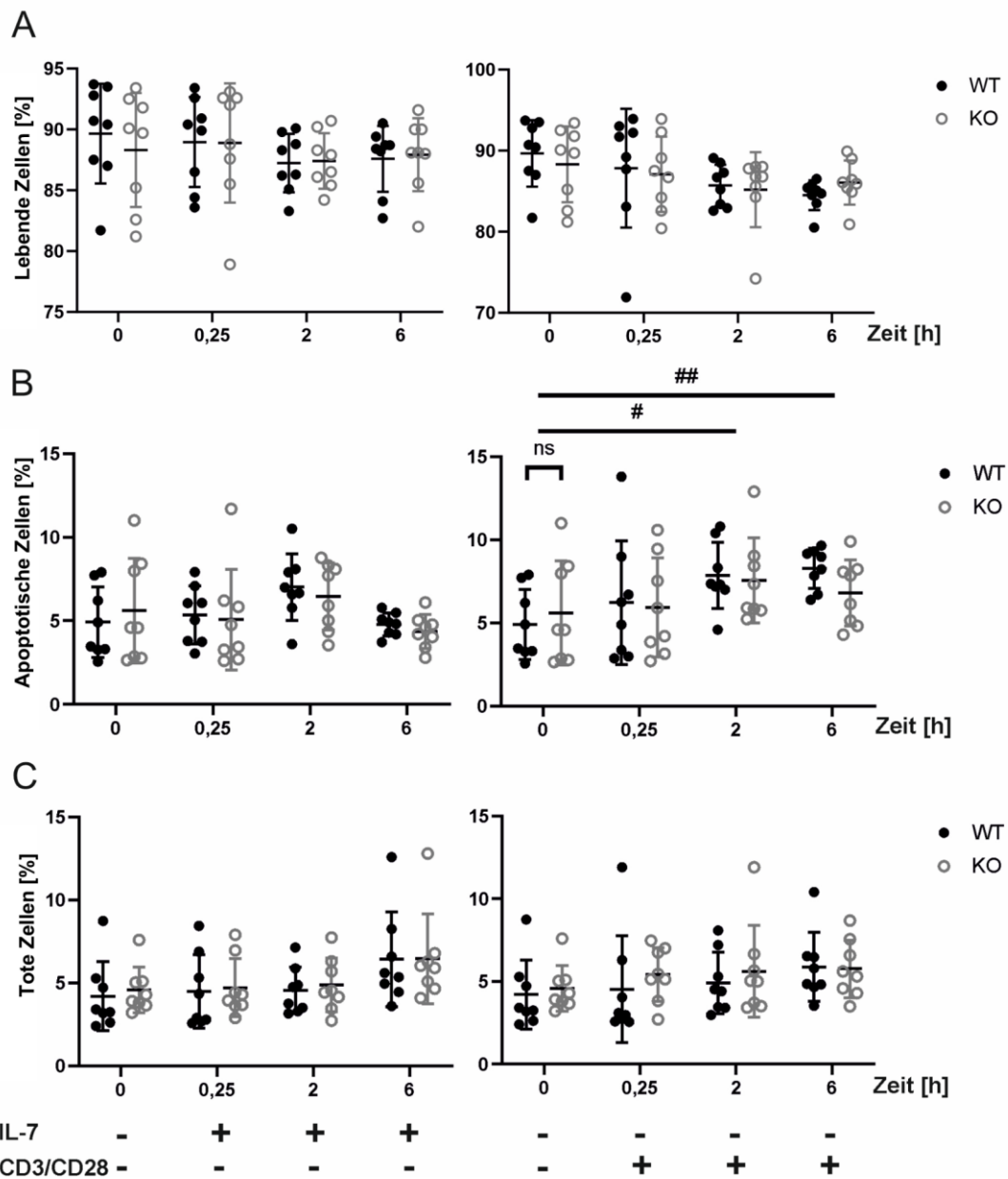


Abbildung 19: Analyse der Apoptose in Thymozyten

Auswertung des prozentualen Anteils an **(A)** lebenden, **(B)** apoptotischen und **(C)** toten SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-Thymozyten nach IL-7R- oder TZR-Stimulation nach 15 Minuten, 2 Stunden und 6 Stunden aus n=8 unabhängigen Experimenten. Eine unstimulierte Probe dient als Kontrolle. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD. Statistische Analysen erfolgten durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse für zusammengehörende Werte über die Zeit. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen SLy1^{WT} und SLy1^{KO}. Signifikanzen zwischen verschiedenen Zeitpunkten sind mit # gekennzeichnet, #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001, ns = nicht signifikant. Tabellarische Ergebnisse der Analyse siehe Anhang, Tab. 20 und 21.

3. Ergebnisse

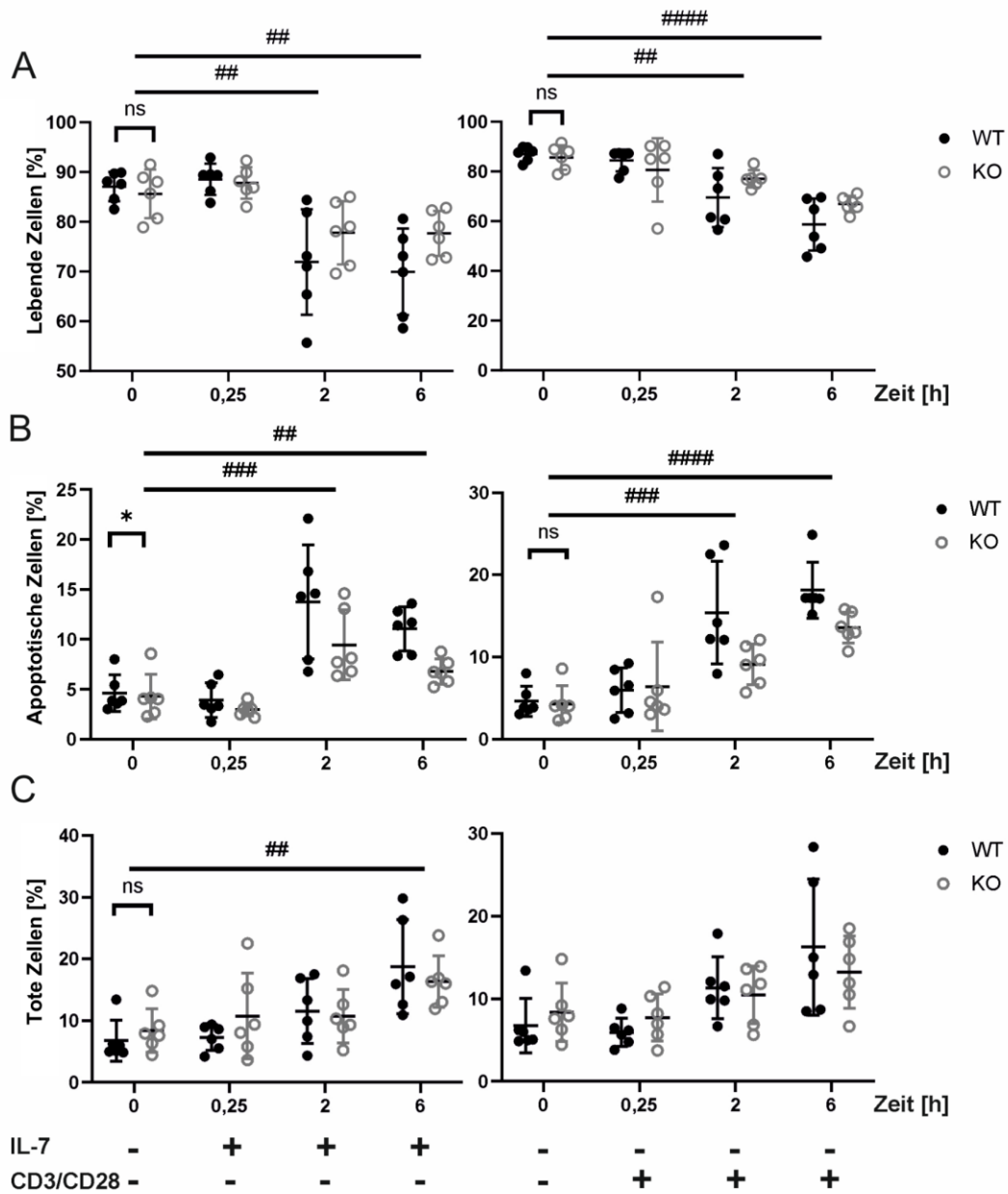


Abbildung 20: Analyse der Apoptose in DN-Thymozyten

Auswertung des prozentualen Anteils an **(A)** lebenden, **(B)** apoptotischen und **(C)** toten SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-DN-Thymozyten nach IL-7R- oder TZR-Stimulation nach 15 Minuten, 2 Stunden und 6 Stunden aus n=6 unabhängigen Experimenten. Eine unstimulierte Probe dient als Kontrolle. Gezeigt ist der Mittelwert ± SD. Statistische Analysen erfolgten durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse für zusammengehörende Werte über die Zeit. Signifikanzen zwischen SLy1^{WT} und SLy1^{KO} sind mit * gekennzeichnet, *p<0,05, **p<0,01. Signifikanzen zwischen verschiedenen Zeitpunkten sind mit # gekennzeichnet, #p<0,05, ###p<0,01, ####p<0,001, #####p<0,0001, ns=nicht signifikant. Tabellarische Ergebnisse der Analyse siehe Anhang, Tab. 20 und 21.

3. Ergebnisse

3.3.2.3 Apoptose in T-Zellen

In Bezug auf Apoptose und Überleben zeigen sich abhängig von Stimulanz und Genotyp deutliche Unterschiede in T-Zellen. Für die lebenden Zellen kann nach IL-7R-Stimulation ein signifikant reduzierter Anteil von SLy1^{KO}-T-Zellen gemessen werden. Für SLy1^{KO} und SLy1^{WT} zeigt sich interessanterweise ein signifikanter Anstieg des Anteils an lebenden Zellen nach 2 und 6 Stunden (Abb. 18, Tab. 20). Die TZR-Stimulation wirkt sich negativ auf das Überleben aus, was unabhängig von SLy1 durch den signifikanten Abfall des Anteils an lebenden Zellen über alle Zeitintervalle gezeigt werden kann (Abb. 18, Tab. 20). Bei apoptotischen Zellen können in der IL-7R-Stimulation signifikant höhere Anteile von SLy1^{KO}-Zellen unabhängig von der Stimulationsdauer gemessen werden. Gleichzeitig zeigt sich nach 2 und 6 Stunden ein signifikanter Abfall an apoptotischen Zellen unabhängig von SLy1 (Abb. 18, Tab. 20). Bei der Stimulation des TZR finden sich keine Unterschiede zwischen SLy1^{KO}- und SLy1^{WT}-T-Zellen. Allerdings kann ein signifikanter Anstieg der Apoptose über alle Zeitintervalle gemessen werden (Abb. 18, Tab. 21). SLy1 nimmt damit Einfluss auf das Überleben von T-Zellen. Bei der IL-7R- und TZR-Stimulation ist der Anteil an toten Zellen im Vergleich zwischen den Stimulanzien ähnlich hoch, während SLy1^{KO}-T-Zellen jeweils signifikant höhere Anteile zeigen. Gleichzeitig zeigt sich nach 6 Stunden IL-7R-Stimulation ein signifikanter Abfall an toten Zellen (Abb. 18, Tab. 20).

Insgesamt zeigt sich, dass SLy1 über Interaktionen mit dem IL-7R-Signalweg an Überleben und Apoptose beteiligt ist. Gleichzeitig können IL-7-Signale auch in SLy1^{KO}-T-Zellen noch zum Überleben beitragen, wie ein Vergleich der IL-7R- und TZR-Stimulation zeigt. Allerdings hat sich auch gezeigt, dass noch weitere Signalkaskaden involviert sind, da die Unterschiede nicht allein durch eine IL-7R-Stimulation erklärt werden können.

3. Ergebnisse

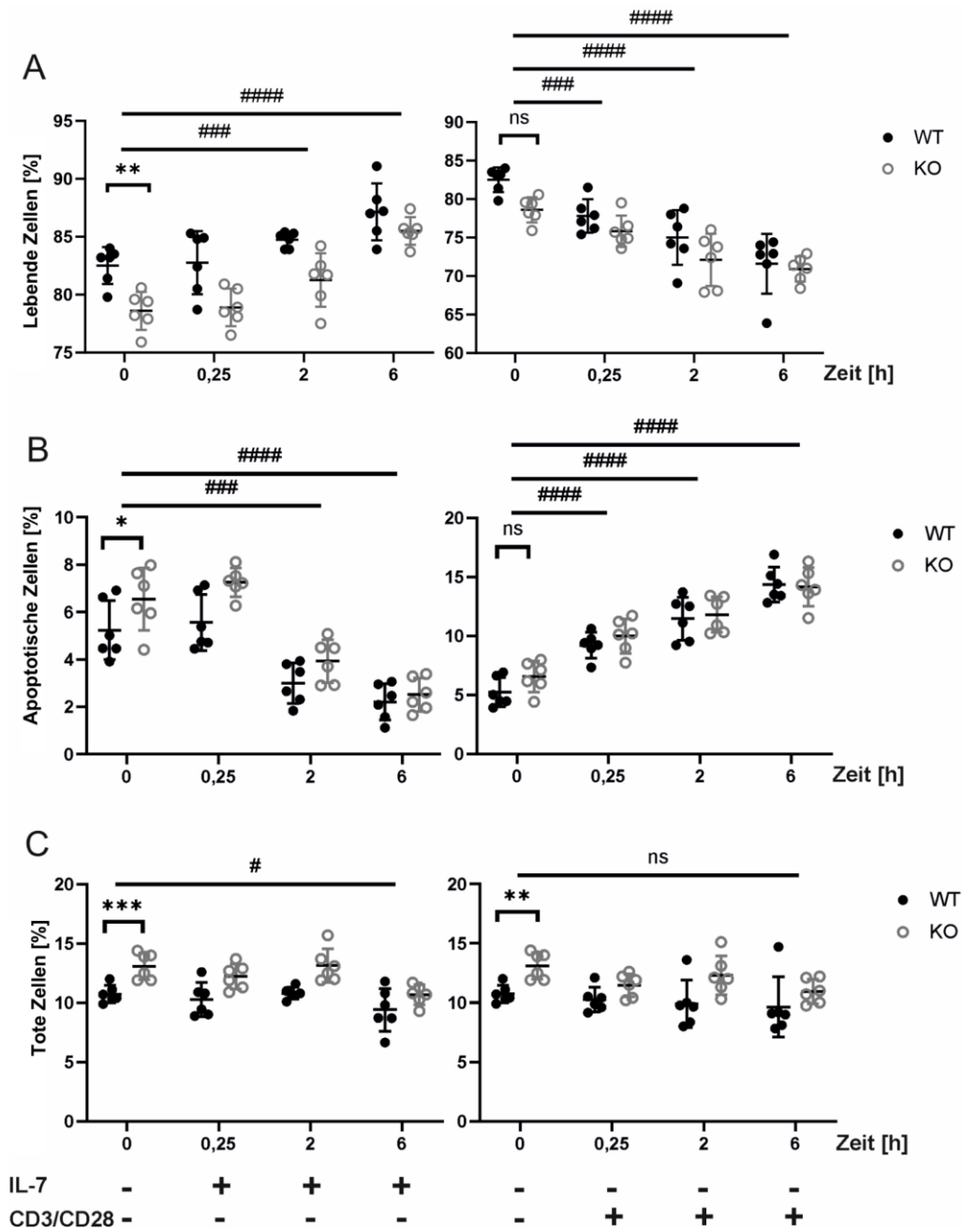


Abbildung 21: Analyse der Apoptose in T-Zellen

Auswertung des prozentualen Anteils an **(A)** lebenden, **(B)** apoptotischen und **(C)** toten SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-T-Zellen nach IL-7R- oder TZR-Stimulation nach 15 Minuten, 2 Stunden und 6 Stunden aus n=6 unabhängigen Experimenten. Eine unstimulierte Probe dient als Kontrolle. Gezeigt ist der Mittelwert ± SD. Statistische Analysen erfolgten durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse für zusammengehörende Werte über die Zeit. Signifikanzen zwischen SLy1^{WT} und SLy1^{KO} sind mit * gekennzeichnet, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. Signifikanzen zwischen verschiedenen Zeitpunkten sind mit # gekennzeichnet, #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001, ####p<0,0001, ns = nicht signifikant. Tabellarische Ergebnisse der Analyse siehe Anhang, Tab. 20 und 21.

3.4 Zellzyklus in SLy1^{KO}-Thymozyten

Ergänzend wurde das Proliferationsverhalten von Thymozyten nach Stimulation untersucht. In vorherigen Arbeiten konnte eine reduzierte Expansion in SLy1^{KO}-T-Zellen nach 48 und 72 Stunden *in vitro* TZR-Stimulation nachgewiesen werden (Schäll, 2015). Um zu untersuchen, ob Thymozyten *in vitro* nach der Stimulation des TZR proliferieren, wurden Zellen isoliert und mit anti-CD3/CD28 stimuliert. Anschließend wurden die Phasen des Zellzyklus mittels Durchflusszytometrie analysiert. Es können keine signifikanten Unterschiede in den Zellzyklusphasen zwischen SLy1^{KO}- und SLy1^{WT}-Thymozyten gefunden werden (Abb. 22, Tab. 17). Die Aussagekraft für die Proliferation der Thymozyten nach Stimulation in dieser Analyse ist reduziert, da sich im Vergleich zu Stimulationsbeginn nach 24 und 48 Stunden kein eindeutig abzugrenzender Anteil an Zellen in der Synthesephase befindet (Abb. 23). Daher ist mit diesem *in vitro* Versuch keine eindeutige Aussage zur Proliferation von Thymozyten möglich.

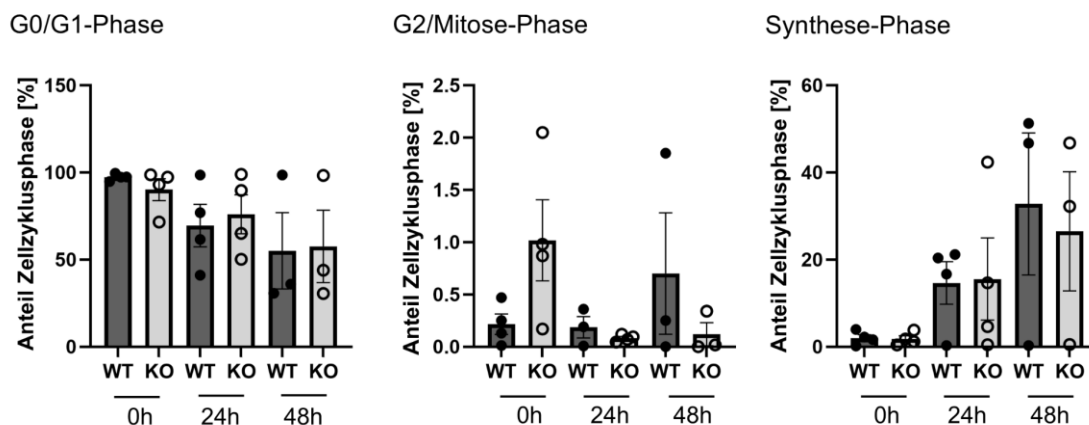


Abbildung 22: Zellzyklusanalyse in Thymozyten

Auswertung des Anteils an Thymozyten in den einzelnen Phasen ohne Stimulation oder nach 24 Stunden und 48 Stunden TZR-Stimulation. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM aus n=3-4 unabhängigen Experimenten. Statistische Analysen erfolgten durch einen t-Test für unabhängige Stichproben. Tabellarische Ergebnisse der Analyse siehe Anhang, Tab. 17.

3. Ergebnisse

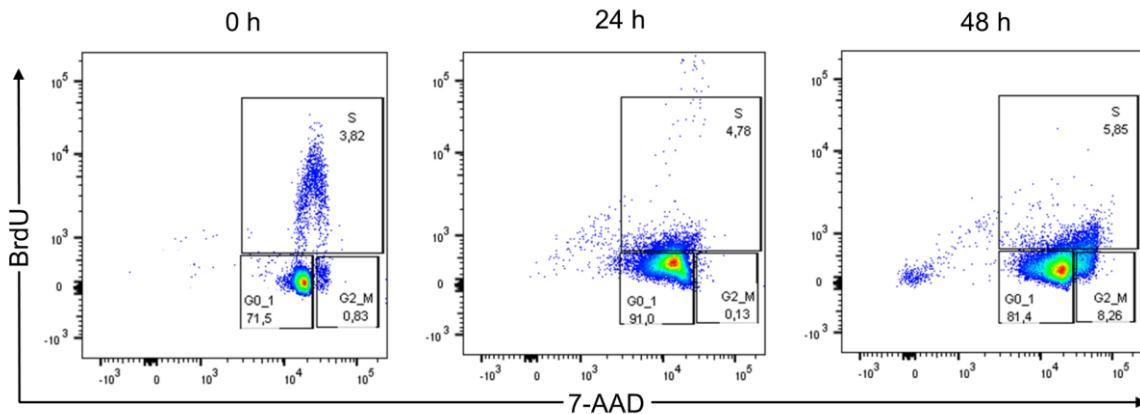


Abbildung 23: Proliferation in stimulierten Thymozyten

Repräsentative Analyse der Zellzyklusphasen in der Durchflusszytometrie mittels FITC-BrdU Flow Kit ohne Stimulation und nach 24 Stunden und 48 Stunden TZR-Stimulation in Thymozyten.

3.5 Analyse der Transkriptionsfaktoren am *Il7r*-Gen

Signale über den IL-7R sind wichtig für die Entwicklung sowohl von T- als auch von B-Zellen (Peschon et al., 1994). In vorherigen Arbeiten wurde eine signifikant erhöhte IL-7R mRNA-Expression in SLy1^{KO}-Thymozyten und DN-Thymozyten im Vergleich zu SLy1^{WT} gefunden (Kloos, 2022). Es stellte sich daher die Frage, ob SLy1 in der Thymozytenentwicklung die Transkription von verschiedenen Genen zum Beispiel über die beteiligten Transkriptionsfaktoren beeinflusst. Mögliche Kandidaten stammen aus der Familie der ETS-Transkriptionsfaktoren und können die Transkription von Genen aktivieren oder hemmen (Sharrocks, 2001). ETS-Transkriptionsfaktoren zeichnen sich durch eine ETS-Domäne mit einer Variante der Helix-Turn-Helix (HTH)-Struktur aus (Liang et al., 1994; Sharrocks, 2001). Ein ETS-Transkriptionsfaktor, der die Genexpression in frühen T-Zellen steuert, ist PU.1 (Hosokawa et al., 2018). Die Aktivierung der Transkription am *Il7r*-Gen, das für die IL-7R α -Kette kodiert, wird in sich entwickelnden B-Zellen durch PU.1 und das *GA-binding protein* (GABP) reguliert (DeKoter et al., 2007). Erste Analysen zu einem möglichen Zusammenhang mit SLy1 zeigten in SLy1^{KO}-DN-Thymozyten eine signifikant erhöhte mRNA-Expression, während für die GABP α -Untereinheit keine signifikante Veränderung messbar war (unveröffentlichte Daten, S. Beer-Hammer).

3. Ergebnisse

Um die Interaktion von PU.1 am *Il7r*-Gen in SLy1^{KO}- und SLy1^{WT}-DN-Thymozyten genauer zu untersuchen, wurden Chromatin-Immunopräzipitations-Assays etabliert und durchgeführt. Für einen Durchlauf muss die DNA der DN-Thymozyten aus rund 10 Mäusen gepoolt werden. Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit der DNA konnte nur ein ChIP-Assay durchgeführt werden. Die Messung wurde durch die Bestimmung von Histon H3 als Positivkontrolle und IgG als Hintergrundsignalkontrolle ergänzt (Abb. 24B). Bei differenzierterer Betrachtung abzüglich der Hintergrundsignale lassen sich keine relevanten Unterschiede feststellen (Abb. 24A). In diesem ersten Versuch können keine relevanten Unterschiede in der Interaktion von PU.1 am *Il7r*-Gen von SLy1^{KO}- und SLy1^{WT}-DN-Thymozyten festgestellt werden. Der Mechanismus, der zu einer veränderten IL-7R-Expression in SLy1^{KO}-Thymozyten führt, ist damit weiter ungeklärt.

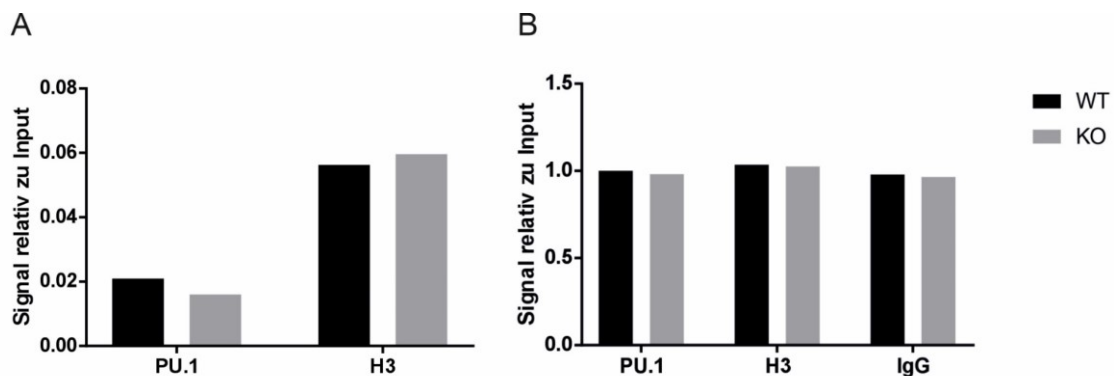


Abbildung 24: ChIP-Assay von PU.1 am *Il7r*-Gen in DN-Thymozyten

Analyse aus einem Experiment mit gepoolten DN-Thymozyten aus SLy1^{WT} (n=9) und SLy1^{KO} Mäusen (n=13). Cp-Werte aus einer Triplet Analyse je Probe im Verhältnis zur jeweiligen Input Kontrolle. Histon 3 dient als Positivkontrolle, IgG dient als Negativkontrolle. **(A)** Darstellung des Signals relativ zu Input als Differenz zu IgG. **(B)** Darstellung des Signals relativ zu Gesamtinput.

4 Diskussion

4.1 Analyse der Lokalisation von SLy1 und p-SLy1

Adapterproteine sind Signalproteine, die sich durch Protein-Proteininteraktionsdomänen ohne eigene enzymatische Aktivität auszeichnen (Pawson und Scott, 1997). Dadurch sind sie in der Lage die Signalvermittlung in komplexen Signalsystemen, wie zum Beispiel auch in Lymphozyten, zu übernehmen (Pawson und Scott, 1997; Janssen und Zhang, 2003). SLy1 zählt durch Aufbau und Funktion in der Signalvermittlung ebenfalls zu den Adapterproteinen (Beer et al., 2001, Astoul et al., 2003). Nach einer TZR-Aktivierung erfolgt in SLy1 die Phosphorylierung an Serin (Astoul et al., 2003). Dadurch ist das Protein in der Lage in T-Zellen vom Nukleus ins Zytoplasma zu translozieren und dort beispielsweise mit 14-3-3 Proteinen zu interagieren (Reis, 2007, Schäll et al., 2015). Bei fehlender Phosphorylierungsstelle und NLS-Sequenz findet keine Translokation zwischen Nukleus und Zytoplasma mehr statt und SLy1 ist nur noch im Zytoplasma vorhanden (Beer et al., 2005). Die subzelluläre Lokalisation von SLy1 wurde bereits von Bernhard Reis in peripheren T-Zellen nach einer Aktivierung der Zelle untersucht (Reis, 2007), allerdings wurden diesbezüglich keine Daten für Thymozyten erhoben. In T-Zellen konnte eine signifikante Phosphorylierung von SLy1 nach 60 Minuten nachgewiesen werden (Reis, 2007). In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass in Thymozyten das Maximum der Phosphorylierung von SLy1 sowie die Translokation von p-SLy1 ins Zytoplasma nach TZR-Aktivierung bereits nach 20 Minuten nachgewiesen werden kann. Nach 60 Minuten fand sich im Zytoplasma noch eine tendenzielle, aber keine signifikante Erhöhung von p-SLy1. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass in Thymozyten nach erfolgter Aktivierung die Phosphorylierung und Translokation von SLy1 schneller ablaufen als in T-Zellen.

4.2 Auswirkung der SLy1-Defizienz auf die Expression von Notch1 und Notch3 in Thymozyten

Neben Signalen über den prä-TZR ist auch der Notch-Signalweg in den DN-Stadien für das Überleben und die weitere Entwicklung ausschlaggebend. Dabei sind Signale über den Notch1-Rezeptor entscheidend, während Notch3 in der Thymozytenentwicklung eine untergeordnete Rolle spielt (Shah und Zúñiga-Pflücker, 2014; Shi et al., 2011). Im Thymus von SLy1^{KO}-Mäusen kann eine signifikante Zellzahlreduktion beobachtet werden (Beer et al., 2001). In bisherigen Arbeiten wurde auch der Einfluss von SLy1 auf den Notch-Signalweg untersucht, um die Ursache der Entwicklungsstörung genauer einzugrenzen. Signale über Notch und den prä-TZR koordinieren dabei die Proliferation in DN-Thymozyten (Zhao et al., 2019). Mit RAG1^{KO}-Mäusen, die keinen funktionalen prä-TZR ausbilden können, wurde *in vitro* der Einfluss von SLy1 auf das Notch-vermittelte Überleben untersucht (Schäll, 2015). Es konnten aber keine Unterschiede in der Apoptoserate zwischen SLy1^{KO}- und SLy1^{WT}-DN-Thymozyten gefunden werden (Schäll, 2015). Damit konnte ein direkter Einfluss von SLy1 auf die Wirkung des Notch-Signalwegs ausgeschlossen werden. Um ein differenzierteres Bild dieses Sachverhalts zu erhalten, wurden anschließend Expressionsanalysen der Notch-Rezeptoren durchgeführt. Erste Ergebnisse von untersuchten Notch1 mRNA-Leveln zeigten eine signifikante Erhöhung in SLy1^{KO}-Thymozyten und DP-Thymozyten, während in DN-Thymozyten keine Unterschiede festgestellt werden konnten (Kloos, 2022). Für Notch3 zeigte sich eine signifikante Erhöhung in SLy1^{KO}-DN-Thymozyten, aber nicht in DP-Thymozyten. Es kann in dieser Arbeit bestätigt werden, dass SLy1 an der Notch1-Regulation in sich entwickelnden Thymozyten beteiligt ist. Eine Abwesenheit von SLy1 führt zu einer signifikant höheren Proteinexpression des Notch1-Rezeptors in Thymozyten. Für Notch3 zeigten sich in der Proteinexpression zwischen SLy1^{KO} und SLy1^{WT} keine Veränderungen. In der T-Zellentwicklung überschneiden sich Notch1 und Notch3 nicht in ihrer Funktion (Shi et al., 2011), weshalb ein Einfluss von SLy1 nur auf die Regulation von Notch1 ohne eine konsekutive Veränderung von Notch3 möglich ist. Die höchste Expression von Notch-Zielgenen findet sich in den DN-Stadien mit einem

4. Diskussion

Maximum vor der β -Selektion im DN3-Stadium, was auf die höchste Signalaktivität in den frühen Entwicklungsstadien schließen lässt (Shi et al., 2011). Daher ist für eine genauere Einordnung der Regulation durch SLy1 im weiteren Verlauf eine Betrachtung der Expression von Notch1 und Notch3 in den einzelnen DN-Stadien sinnvoll. Weiter ist auch offen, ob die Notch1-Expression als Reaktion auf das Proliferationsdefizit erhöht ist, oder SLy1 als Adapterprotein die Transkription des *Notch1*-Gens beeinflussen kann. Die Regulation der Transkription der Notch-Gene in Thymozyten ist bisher noch nicht vollständig verstanden (Yashiro-Ohtani et al., 2009). Die Herunterregulation der Transkription findet einerseits durch eine Autoregulation durch Notch1 selbst statt und andererseits durch Signale über den prä-TZR, besonders im DN3-Stadium (Yashiro-Ohtani et al., 2009). Durch die Aktivierung der prä-TZR Signalkaskade über Id3 wird E47, eine Isoform des Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktors E2A, herunterreguliert, wodurch die Transkription des *Notch1*-Gens sinkt (Yashiro-Ohtani et al., 2009). E47 ist in der Lage mit 14-3-3 Proteinen zu interagieren (Teachenor et al., 2012), während SLy1 ebenfalls an 14-3-3 Proteine binden kann (Schäll et al., 2015). Es ist daher möglich, dass nach Aktivierung SLy1 als Adapterprotein in Kombination mit 14-3-3 Proteinen den Transkriptionsfaktor E47 ebenfalls bindet und ins Zytoplasma rekrutiert. Damit kann Notch1 in Abwesenheit von SLy1 am Übergang von DN3 zu DN4 nicht ausreichend herunterreguliert werden. Für eine Untersuchung dieses Sachverhalts wären weitere Stimulationsanalysen in DN3-Thymozyten mit Bestimmung einer solchen Interaktion im Zytoplasma notwendig.

Die posttranskriptionelle Regulation von Notch1 findet unter anderem durch die Modulation der Spaltung der intrazellulären Domäne (NICD) nach Aktivierung des Rezeptors statt (Gordon et al., 2008). Der Tumorsuppressor p53 hemmt in Thymozyten unter anderem über Presenilin1 die Abspaltung der NICD vom Notch1-Rezeptor und folglich die Aktivierung von Zielgenen (Laws und Osborne, 2004). In SLy1^{KO}-Thymozyten konnte gezeigt werden, dass die Expression von p53 signifikant hochreguliert ist (Gruber, 2022). Bezogen auf die einzelnen Entwicklungsstadien konnte die signifikante Hochregulation von p53 allerdings für DP-Thymozyten, nicht aber für DN-Thymozyten bestätigt werden (Gruber,

2022). In den DN-Entwicklungsstufen mit hoher Notch-Expression ist daher in SLy1^{KO}-Thymozyten keine vermehrte Regulation durch diesen Mechanismus zu erwarten. Interessant wäre aber dennoch die Überprüfung der NICD in DP-Thymozyten von SLy1^{KO}-Mäusen.

4.3 Analyse der intrazellulären Signalwege in Thymozyten nach IL-7R-Stimulation

Signale über den IL-7R sind wichtig für die Entwicklung sowohl von T- als auch von B-Zellen (Peschon et al., 1994). IL-7-Signale spielen eine Rolle für Überleben und Differenzierung in den frühen DN-Stadien, vor allem im DN3-Stadium (von Freeden-Jeffry et al., 1997). Im Übergang zum DP-Stadium wird der IL-7/IL-7R-Signalweg herunterreguliert, da unter anderem durch die Inhibierung von beteiligten Transkriptionsfaktoren keine weitere Differenzierung stattfinden kann (Yu et al., 2004). Daniel Schäll vermutete, dass als Ursache für die verminderte Zellzahl im Thymus von SLy1^{KO}-Mäusen ein Einfluss von SLy1 auf den IL-7/IL-7R-Signalweg während der Thymozytenentwicklung infrage kommt (Schäll, 2015). In peripheren T-Zellen wird der IL-7R weiterhin exprimiert, wobei IL-7 vor allem in CD8⁺-T-Zellen weiter zum Überleben und der Proliferation der Zellen beiträgt (Tan et al., 2001).

4.3.1 Analyse des IL-7R-Signalwegs

In der Stimulationsanalyse war die Phosphorylierung von Stat5 nach einer IL-7R-Stimulation im Vergleich von SLy1^{KO}- zu SLy1^{WT}-Thymozyten signifikant erhöht (Kloos, 2022). Zu einer genaueren Untersuchung wurden nun in der vorliegenden Arbeit Stimulationen zu verschiedenen Zeiten durchgeführt. Dabei sollte die Aktivierung der IL-7R-Signalkaskade und die Expression der beteiligten Signalmoleküle in SLy1^{KO}- und SLy1^{WT}-Thymozyten und peripheren T-Zellen überprüft werden.

In der IL-7R-Stimulationsanalyse konnte in dieser Arbeit für die Stat5-Expression in (DN-) Thymozyten kein Unterschied zwischen SLy1^{KO} und SLy1^{WT} gemessen werden. Für p-Stat5 konnte trotz optimierter Bedingungen und Messungen zu mehreren Zeitpunkten keine eindeutige Stat5-Phosphorylierung nach erfolgter

4. Diskussion

Stimulation gemessen werden, auch im berechneten Verhältnis von p-Stat5 zu Stat5 nicht. Damit können die Ergebnisse von Isabel Kloos mit dieser Analyse nicht bestätigt werden (Kloos, 2022). Die p-Jak1-Expression war in unstimulierten SLy1^{KO}-DN-Thymozyten signifikant reduziert und die p-Jak3-Expression tendenziell reduziert. Interessanterweise war p-Jak1 in DN-Thymozyten in vorausgegangenen Arbeiten nicht signifikant verändert, während p-Jak3 signifikant reduziert war (Schneider, 2022). Für die Expression von p-Jak1 und p-Jak3 konnten nach Stimulationsbeginn weder in Thymozyten, noch in DN-Thymozyten signifikante Unterschiede gemessen werden. In der TZR-Stimulation zeigten sich in Thymozyten und DN-Thymozyten keine Unterschiede für Stat5, p-Stat5, p-Jak1 oder p-Jak3. In T-Zellen zeigte sich eine signifikante Zunahme der Stat5-Expression über alle Zeitintervalle für beide Genotypen. Für p-Stat5 konnten keine Unterschiede nachgewiesen werden, wodurch im Verhältnis von p-Stat5 zu Stat5 in T-Zellen eine signifikante Abnahme über den Verlauf der Stimulation beobachtet werden konnte. Es konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen SLy1^{KO} und SLy1^{WT} für p-Jak1 oder p-Jak3 beobachtet werden.

Stat5 besteht aus den beiden Isoformen Stat5a und Stat5b, die untereinander eine sehr hohe Homologie haben, und wiederum durch die Gene *Stat5a* und *Stat5b* kodiert werden (Liu et al., 1995). Über die Regulation der *Stat5a*- und *Stat5b*-Transkription ist bisher wenig bekannt. In einer bioinformatischen Analyse zu möglichen Transkriptionsfaktoren an humanen *Stat5a*- und *Stat5b*-Promotoren wurde eine negative Regulation durch Ikaros und GABP vorausgesagt (Crispi et al., 2004). In Analysen von Isabel Kloos konnte kein Unterschied in der mRNA-Expression von Stat5a, aber eine signifikante Erhöhung von Stat5b in SLy1^{KO}-Thymozyten gemessen werden (Kloos, 2022). Mit der hier durchgeführten Analyse konnte für die Stat5-Expression allerdings kein Unterschied zwischen SLy1^{KO} und SLy1^{WT} festgestellt werden. Daher sind weitere Untersuchungen sinnvoll, da in Thymozyten eine Interaktion von SLy1 mit den beschriebenen Transkriptionsfaktoren möglich ist (siehe 4.5).

In peripheren T-Zellen wird nach einer TZR-Aktivierung eine höhere Stabilität des Stat5-Proteins über die Ligase *mouse double minute 2 homolog* (Mdm2), einem negativen Regulator von p53, erreicht, da durch Mdm2 ein vorzeitiger Abbau von Stat5 verhindert wird (Zhou et al., 2021). Es zeigt sich außerdem, dass IL-7-Signale über den PI3K/Akt-Signalweg Mdm2 beeinflussen (Mayo und Donner, 2001; Chibaya et al., 2021). Diese Regulation scheint durch SLy1 jedoch nicht beeinflusst zu werden, da sich sowohl in SLy1^{KO}- als auch in SLy1^{WT}-T-Zellen eine Zunahme an Stat5 ohne wesentliche Unterschiede zwischen den Genotypen zeigt. Das lässt sich auch dadurch stützen, dass die von Barbara Schneider gemessene Proteinexpression von Mdm2 weder in SLy1^{KO}-Thymozyten noch in T-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verändert war (Schneider, 2022). Insgesamt konnte ein direkter Einfluss von SLy1 auf den IL-7R-Signalweg mittels dieser Stimulationsanalyse trotz Optimierungen nicht dargestellt werden. Eine Möglichkeit für eine detailliertere Analyse des Signalwegs ist es, die IL-7-Stimulation *in vivo* durchzuführen und nachfolgend Thymozyten und periphere T-Zellen vergleichsweise zu analysieren.

4.3.2 Auswirkungen der SLy1-Defizienz auf die Apoptose

In frühen Stadien der Thymozytenentwicklung wird Bcl-2 durch IL-7-Signale hochreguliert, was zu einer Zunahme der Überlebensrate beiträgt (von Freedden-Jeffrey et al., 1997). Dieser Effekt kann auch in peripheren T-Zellen beobachtet werden (Yu et al., 2004). Die OP9-DL1 Stromazelllinie stellt ein Modell dar, um die Thymopoese *in vitro* studieren zu können (de Pooter und Zúñiga-Pflücker, 2007). Bei der Inkubation auf OP9-DL1 Zellen zeigte sich in SLy1^{KO}- und SLy1^{ΔΔ}-DN-Thymozyten eine erhöhte Apoptoserate im Vergleich zur Kontrollgruppe (Reis, 2007). Weiter konnte in vorherigen Arbeiten eine Bcl-2-Überexpression in SLy1^{KO}-Thymozyten festgestellt werden (Schäll, 2015). Daher kann von einer Beteiligung von SLy1 an der Regulation der IL-7R-Bcl-2-Signalkaskade ausgegangen werden. Zur Bestätigung erfolgte in dieser Arbeit die Testung, ob SLy1 die Funktion des IL-7R nach *in vitro* Stimulation in Bezug auf das Überleben von Thymozyten aus verschiedenen Entwicklungsstadien oder T-Zellen beeinflusst. In Thymozyten konnten hier interessanterweise nach Stimulationen keine Unterschiede zwischen SLy1^{KO}- und SLy1^{WT}-Thymozyten gefunden

4. Diskussion

werden. Generell zeigte sich für Thymozyten und DN-Thymozyten eine Zunahme toter Zellen und Abnahme lebender Zellen über die Stimulationsdauer hinweg. Eine verstärkte Apoptoserate in SLy1^{KO}-DN-Thymozyten (Schäll, 2015) konnte damit nicht bestätigt werden. Stattdessen zeigte sich ein signifikant reduzierter Anteil an apoptotischen SLy1^{KO}-DN-Thymozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe, während für lebende und tote Anteile keine signifikanten Unterschiede gemessen werden konnten. SLy1 scheint damit in Thymozyten für die Funktion und Regulation des Überlebens durch den IL-7R-Signalwegs eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. Allerdings konnte in dem hier durchgeführten *in vitro* Versuchsaufbau die Umgebung und Zytokinkonzentration innerhalb des Thymus nicht physiologisch abgebildet werden. Bei SLy1^{KO}-T-Zellen fand sich ein signifikant höherer Anteil von apoptotischen und toten Zellen, sowie eine signifikante Reduktion des Anteils an lebenden Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Damit zeigte sich, dass SLy1 an der Regulation der Homöostase in peripheren T-Zellen beteiligt zu sein scheint. Für beide Genotypen konnte auch ein anti-apoptotischer Effekt durch IL-7-Signale nach Stimulation nachgewiesen werden, der in T-Zellen stärker ausfiel als in Thymozyten. Die Reaktion einer Zelle auf IL-7 ist nicht nur von der Expression des IL-7R auf der Zelloberfläche abhängig, sondern wird auch intrinsisch beeinflusst (Kim et al., 2016). So zeigten beispielsweise kürzlich aus dem Thymus ausgewanderte T-Zellen eine effektivere Aktivierung der Signalkaskade nach Stimulation des IL-7R im Vergleich zu naiven T-Zellen (Kim et al., 2016). Weitere Untersuchungen in verschiedenen SLy1^{KO}-Zellpopulationen in der Thymozytenentwicklung können daher künftig Klarheit zu der beobachteten Apoptoserate bringen.

Die antigenvermittelte Aktivierung des TZR führt zu einer Reduktion der Apoptose und damit zu einer höheren Überlebensrate von CD8⁺-T-Zellen (Koenen et al., 2013). Allerdings scheint SLy1 keinen Einfluss auf die antigenvermittelte Regulation der Apoptose zu haben, da bei einer infektiösierten Apoptose durch *Listeria monocytogenes* keine Unterschiede in der Apoptoserate zwischen SLy1^{KO}- und SLy1^{WT}-T-Zellen gefunden werden konnten (Schäll et al., 2015). Durch eine mitogene TZR-Aktivierung mit anti-CD3 wird die Apoptose in Thymozyten und peripheren T-Zellen induziert (Kabelitz et

al., 1993; Tiso et al., 1995). In T-Zellen kommt es nach einer TZR-Stimulation durch anti-CD3 zu einer Hochregulation der pro-apoptotischen Proteine Bim und Bax und dadurch zur Inhibition von Bcl-2 (Koenen et al., 2013). Die erhöhte Expression von anti-apoptotischen Proteinen wie Bcl-xL wirkt diesem Prozess teilweise entgegen (Koenen et al., 2013). Das zeigte sich auch in der hier durchgeführten Analyse in einer über die Stimulationsdauer signifikanten Zunahme des Anteils an apoptotischen (DN-) Thymozyten und T-Zellen. Dieser Mechanismus scheint aber unabhängig von SLy1 zu sein, da in T-Zellen keine signifikanten Unterschiede im Anteil von lebenden und apoptotischen Zellen auftraten und nur der Anteil der toten SLy1^{KO}-T-Zellen signifikant erhöht war. Damit kann die Hypothese von Daniel Schäll bestätigt werden, dass SLy1 nicht im TZR-Signalweg zu verorten ist (Schäll, 2015).

4.4 Auswirkungen der SLy1-Defizienz auf den Zellzyklus

Neben der Apoptose wurde auch die Proliferation in Thymozyten genauer untersucht. In der Thymozytenentwicklung führen Signale über den prä-TZR zu einer Proliferation und Expansion der Zellen (Groettrup et al. 1993; Dudley et al. 1994). In T-Zellen induziert eine TZR-Stimulation den PI3K/Akt-Signalweg und inhibiert damit über die Inaktivierung des Transkriptionsfaktors FoxO1 die Transkription des Zellzyklusinhibitors p27, sodass die Zelle in der Folge in die S-Phase des Zellzyklus eintreten und damit proliferieren kann (Stahl et al., 2002; Charvet et al., 2006). Nach einer Stimulation des TZR zeigte sich in SLy1^{KO}-T-Zellen ein Proliferationsdefizit (Schäll et al., 2015). Als Ursache wurde eine beschleunigte Dephosphorylierung und damit Aktivierung von FoxO1 in SLy1^{KO}-T-Zellen gefunden, was zu einer erhöhten Expression der Zellzyklusinhibitoren p27 und p130 führte (Schäll et al., 2015). Es wurde geprüft, ob in Thymozyten nach einer *in vitro* TZR-Stimulation eine Proliferation festgestellt werden kann, und sich eine Zellzyklusinhibition auch in SLy1^{KO}-Thymozyten bestätigen lässt. Es zeigten sich nach verschiedenen Stimulationsintervallen für die einzelnen Zellzyklusphasen keine Unterschiede zwischen SLy1^{KO}- und SLy1^{WT}-Thymozyten. Es konnte zudem festgestellt werden, dass ein Großteil der Zellen

nicht proliferiert und sich in der G0/G1-Phase befindet. Das ist in Übereinstimmung damit, dass sich *in vitro* generell die höchste Proliferationsrate in DN-Thymozyten findet, während DP-Thymozyten, die den größten Teil der Thymozyten ausmachen, nicht proliferieren (Wood et al., 1990; Fehling und von Boehmer, 1997). Die Bestimmung der Proliferation *in vitro* findet idealerweise nach Isolation und separater Inkubation einzelner Stadien statt (Wood et al., 1990). Die Aussagekraft der Ergebnisse in Bezug auf die Proliferation ist daher eingeschränkt. Für zukünftige Untersuchungen der Proliferation in SLy1^{KO}-Thymozyten könnten die DN- und SP-Populationen des Thymus isoliert und inkubiert werden, oder Stimulationen *in vivo* durchgeführt werden, wo die physiologische Umgebung des Thymus erhalten bleibt. In SLy1^{KO}-DN-Thymozyten zeigte sich nach einer *in vitro* Differenzierung auf OP9-DL1-Zellen eine verminderte Proliferation (Reis, 2007). Die Expansion der DN-Thymozyten konnte dabei durch die Zugabe von IL-7 *in vitro* nahezu wiederhergestellt werden (Reis, 2007). Koenen et al. konnten zeigen, dass eine Kombination der TZR- und IL-7R-Stimulation *in vitro* die Proliferation von T-Zellen nicht zusätzlich im Vergleich zu alleinigen TZR-Signalen verstärkt (Koenen et al., 2013). Es wäre dennoch interessant die Wirkung dieser Kombination auf die Proliferation in SLy1^{KO}-T-Zellen und DN-Thymozyten genauer zu untersuchen. Insbesondere nachdem in T-Zellen in dieser Arbeit bereits signifikante Unterschiede zwischen SLy1^{KO} und SLy1^{WT} in der Apoptoserate nach einer Stimulation festgestellt werden konnten.

4.5 Analyse der Wirkung von SLy1 auf die Transkriptionsfaktoren des *Il7r*-Gens

Um den Einfluss von SLy1 in der Thymozytenentwicklung weiter zu untersuchen, wurde neben der Funktion der IL-7R-Signalkaskade auch die Transkription des *Il7r*-Gens, das für die IL-7R α -Kette kodiert, betrachtet. Für SLy1 sind bisher keine Daten zu einer direkten DNA-Interaktion vorhanden, daher ist eine indirekte Regulation über Transkriptionsfaktoren oder DNA-Modulatoren wahrscheinlicher, wie dies bereits für SLy2 nachgewiesen wurde (Jaufmann et al., 2019; Jaufmann et al., 2021). Die Regulation der Transkription des *Il7r*-Gens

4. Diskussion

ist bisher noch nicht bis ins Detail beschrieben. Bekannt ist, dass IL-7 eine zytokinabhängige Reduktion der *Il7r*-Transkription in naiven T-Zellen auslöst, was durch Transkriptionsfaktoren vermittelt wird (Park et al., 2004). Die Familie der ETS-Transkriptionsfaktoren kann die Transkription von Genen aktivieren oder hemmen (Sharrocks, 2001). Ein ETS-Transkriptionsfaktor, der die Genexpression in frühen T-Zellstadien steuert, ist PU.1 (Hosokawa et al., 2018). Die Aktivierung der Transkription am *Il7r*-Gen wird auch durch PU.1 und GABP in sich entwickelnden B-Zellen reguliert (DeKoter et al., 2007). PU.1 kann dabei Faktoren wie Runx1 und Satb1 an andere Bindungsstellen im Genom rekrutieren und damit die Expression auch von T-Zell-spezifischen Zielgenen in prä-T-Zellen verändern (Hosokawa et al., 2018). Um die signifikant erhöhte Expression des IL-7R in Abwesenheit von SLy1 (Kloos, 2022) zu erklären, stellt sich die Frage, ob SLy1 als Adapterprotein bereits an der Transkription des *Il7r*-Gens beteiligt ist. Möglich wäre, dass SLy1 nach einer Translokation durch eine direkte Bindung an Transkriptionsfaktoren die Genexpression beeinflusst oder indirekt über andere Adapterproteine und Regulatoren den Transport der Faktoren ins Zytoplasma stabilisiert, wie zum Beispiel zusammen mit 14-3-3 Proteinen (Muslin und Xing, 2000; Schäll et al., 2015). Ein Schema dieses möglichen Zusammenhangs ist in Abbildung 25 dargestellt. Nach der Translokation ins Zytoplasma erfolgt die Degradation von Proteinen wie Transkriptionsfaktoren dann am ehesten durch das Ubiquitin-Proteasom-System (Desterro et al., 2000). In SLy1^{KO}-T-Zellen konnte bereits im Zusammenhang mit dem Überleben eine erhöhte Dephosphorylierung von FoxO1 nachgewiesen werden (Schäll et al., 2015). FoxO1 reguliert die IL-7R-Expression in T-Zellen durch seine Wirkung als ein Transkriptionsfaktor des *Il7r*-Gens (Ouyang et al., 2009; Kerdiles et al., 2010). Während der Thymozytenentwicklung ist FoxO1 für eine normale Entwicklung und Differenzierung der Zellen herunterreguliert und wird erst während des SP-Stadiums hochreguliert (Shi et al., 2017). FoxO1 ist aber in der Lage die *Il7r*-Transkription auch in DP-Thymozyten zu induzieren (Shi et al., 2017). Allerdings ist eine Interaktion von SLy1 mit FoxO1 in DN-Thymozyten eher weniger ausschlaggebend für die Entwicklung, da FoxO1 in diesen Stadien nur wenig exprimiert wird, und für SLy1 in T-Zellen kein Einfluss auf die FoxO1-Expression

4. Diskussion

gefunden wurde (Shi et al., 2017; Schäll, 2015). Allerdings kann erst nach einer Untersuchung der FoxO1-Expression in SLy1^{KO}-DN-Thymozyten eine definitive Aussage getroffen werden.

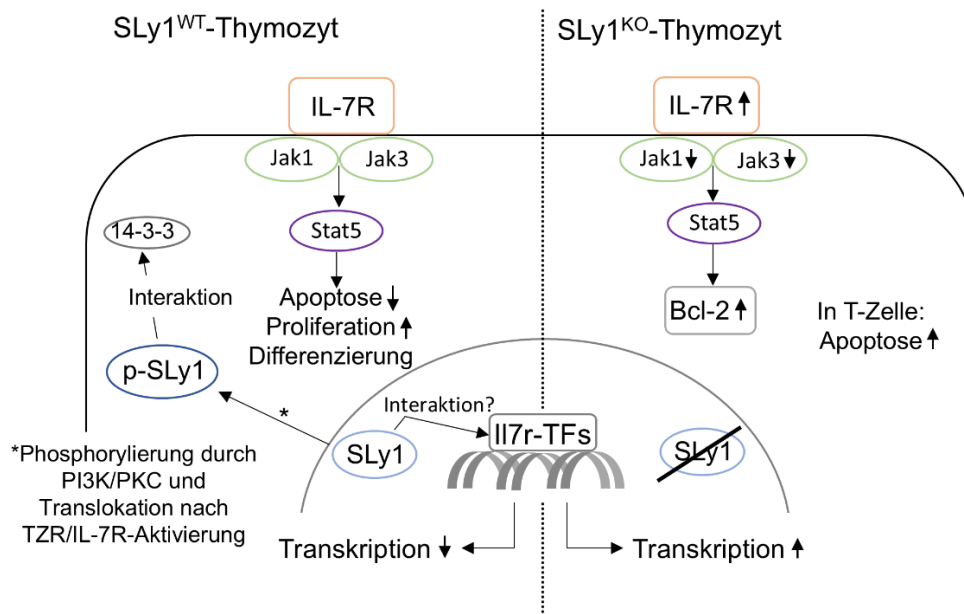


Abbildung 25: Modell der möglichen Interaktion von SLy1 mit dem IL-7R-Signalweg

Exemplarische Darstellung des Einflusses von SLy1 auf die Regulation der IL-7R-Signalkaskade in Nucleus und Zytoplasma in Thymozyten. Es sind die beobachteten Veränderungen in der Expression der Signalkaskade sowie eine mögliche Interaktion mit Transkriptionsfaktoren und damit der Einfluss auf die Transkription von Genen, wie dem *I17r*-Gen, dargestellt.

Für die Analyse der Transkriptionsregulation in Thymozyten kommen Interaktionen mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren infrage. Eine mögliche Interaktion mit PU.1 könnte dabei ursächlich sein. Erste Analysen zu einem möglichen Zusammenhang mit SLy1 zeigten in SLy1^{KO}-DN-Thymozyten eine signifikant erhöhte mRNA-Expression von PU.1 (unveröffentlichte Daten, S. Beer-Hammer). In der hier durchgeführten Untersuchung konnte allerdings kein durch SLy1 bedingter Unterschied in der Bindung von PU.1 am *I17r*-Gen nachgewiesen werden. Für eine definitive Aussage sollten allerdings weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Interessant wäre auch eine Betrachtung von möglichen Unterschieden im Hinblick auf periphere T-Zellen, da sich in der Untersuchung der Apoptose stärkere Differenzen zwischen SLy1^{KO}- und SLy1^{WT}-T-Zellen auf eine Stimulation des IL-7R als in Thymozyten gezeigt hatten. Während PU.1 bereits in der Entwicklung der Thymozyten im Übergang zum DP-

Stadium herunterreguliert wird, kommen weitere Mitglieder aus der ETS-Familie dafür infrage (Anderson et al., 2002). Ein möglicher Kandidat ist GABP, das ebenfalls die Expression der IL-7R α -Kette in T-Zellen und Thymozyten reguliert (Xue et al., 2004; Yu et al., 2010). In einer ersten Untersuchung zeigte sich in SLy1^{KO}-DN-Thymozyten in der GABP α mRNA-Expression keine signifikante Veränderung im Vergleich zur Kontrollgruppe (unveröffentlichte Daten, S. Beer-Hammer). Weitere untersuchte Transkriptionsfaktoren waren der Faktor Miz-1, der über die Regulation von SOCS1 den IL-7R/Bcl-2-Signalweg beeinflusst (Saba et al., 2011), sowie der Faktor Runx1, der an Transkriptionsstartstellen des *I17r*-Gens binden kann (Lee et al., 2005). Für beide Transkriptionsfaktoren konnten allerdings in Voruntersuchungen in der Expression keine signifikanten Unterschiede zwischen SLy1^{KO}- und SLy1^{WT}-DN-Thymozyten gefunden werden (unveröffentlichte Daten, S. Beer-Hammer). Eine Beeinflussung bezüglich der Expression der im Vorfeld untersuchten Faktoren durch SLy1 erscheint eher weniger wahrscheinlich. Es bleibt damit weiterhin offen, ob SLy1 in Thymozyten und T-Zellen in der Lage ist mit Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel GABP α zu interagieren. Ein zukünftiger Nachweis wäre auch mittels Chromatin-Immunopräzipitation-Sequenzierung (ChIP-Seq) denkbar.

4.6 SLy1 im klinischen Kontext

SLy1 ist in der Entwicklung von Thymozyten zu funktionsfähigen T-Zellen essenziell, und auch an Überleben und Homöostase von peripheren T-Zellen beteiligt. Daraus resultierende Erkenntnisse können auch im klinischen Kontext relevant sein. SLy1^{KO}-T-Zellen zeigten im Mausmodell eine schwächere Reaktion auf Infektionen (Schäll et al., 2015). Im Menschen zeigt sich eine Funktionsstörung von SLy1 ebenfalls in einer X-chromosomalen Immundefizienz mit erhöhter Infektanfälligkeit (Delmonte et al., 2021). Diese ist, wie im Mausmodell, auf eine verminderte T-Zellproliferation, Zellzyklusprogression sowie eine erhöhte Apoptoserate zurückzuführen (Delmonte et al., 2021). Resultate aus der weiteren Erforschung tragen zum Verständnis der T-Zell-spezifischen Immunabwehr von Infektionen und möglicher therapeutischer Ansatzpunkte bei. Es gibt auch Hinweise, dass SLy1 in humanen lymphoproliferativen Erkrankungen, wie der T-Zell akuten lymphatischen

4. Diskussion

Leukämie (T-ALL), dysreguliert ist (Schäll, 2015). So stellte sich in weiteren Untersuchungen eine signifikante Hochregulation der SLy1 mRNA-Expression und gleichzeitig eine signifikante Reduktion der p-SLy1-Proteinexpression in T-ALL-Zellen heraus, was einen Hinweis auf ein verändertes SLy1-Aktivitätsniveau in der T-ALL liefert (unveröffentlichte Daten, T. Stefan). Es hat sich bestätigt, dass SLy1 in Thymozyten durch eine Beteiligung an der Regulation des Notch1-Signalwegs die Entwicklung beeinflusst, sowie in T-Zellen das Überleben durch den IL-7/IL-7R-Signalweg verbessert (Schäll, 2015; Kloos, 2022). Bei einer p53-Defizienz schützt eine zusätzliche SLy1-Defizienz vor Raumforderungen in Thymus, Milz oder Lymphknoten (Schneider, 2022). Daher ist eine Funktion als (Proto-) Onkogen möglich, wie bereits hypothetisiert wurde (Kloos, 2022; Schneider, 2022). Weitere Untersuchungen der Zusammenhänge im Mausmodell und humanen T-ALL-Zellen können darüber Aufschluss geben, sowie mögliche therapeutische Ansätze besonders für leukämische Erkrankungen oder T-Zelltumore liefern.

5 Zusammenfassung

Die Entwicklung der T-Zellen aus Vorläuferzellen erfordert ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Signalkaskaden. Das Adapterprotein SLy1 ist neben einer Beteiligung in B- und NK-Zellen auch in die Entwicklung und Funktion von T-Zellen involviert. SLy1 beeinflusst Proliferation und Überleben in Thymozyten und peripheren T-Zellen. Dabei sind die molekularen Mechanismen zur Regulation von wichtigen Signalwegen, wie dem Notch- und IL-7/IL-7R-Signalweg, noch nicht vollständig verstanden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von SLy1 während der Thymozytenentwicklung genauer untersucht. Für den Nachweis der Phosphorylierung und Translokation von SLy1 nach TZR-Aktivierung konnte in Thymozyten eine signifikante Zunahme von p-SLy1 im Zytoplasma nach 20 Minuten beobachtet werden. Bei der Untersuchung des Notch-Signalwegs konnte eine erhöhte Notch1-Expression in SLy1^{KO}-Thymozyten bestätigt werden. Für den ebenfalls an der Entwicklung beteiligten IL-7R-Signalweg konnten in Thymozyten und DN-Thymozyten keine signifikanten Unterschiede in der Phosphorylierung und damit Aktivierung von Jak1, Jak3 und Stat5 nach IL-7R-Stimulation festgestellt werden. In der Untersuchung der Apoptoserate nach IL-7R-Stimulation zeigte sich in SLy1^{KO}-T-Zellen ein signifikant reduziertes Überleben, während in Thymozyten und DN-Thymozyten keine eindeutigen Unterschiede nachgewiesen werden konnten. Fehlende signifikante Unterschiede in der Apoptoserate nach TZR-Stimulation bestätigen, dass SLy1 nicht an der TZR-Signalkaskade beteiligt zu sein scheint. In der Proliferationsanalyse von Thymozyten war mit der hier durchgeführten Methodik kein Proliferationsdefizit in SLy1^{KO}-Thymozyten messbar. Auf molekularer Ebene wurde eine mögliche Beeinflussung der *Il7r*-Transkription in DN-Thymozyten durch SLy1 untersucht. Eine damit einhergehende Interaktion mit Transkriptionsfaktoren, wie dem hier untersuchten Faktor PU.1, konnte nicht nachgewiesen werden. Für eine weitere Eingrenzung der Regulation der Transkription des *Il7r*-Gens sollten anschließende Untersuchungen zu Interaktionen von SLy1 mit Transkriptionsfaktoren erfolgen.

6 Literaturverzeichnis

- Akashi, K. and I. L. Weissman (1996). "The c-kit⁺ maturation pathway in mouse thymic T cell development: lineages and selection." *Immunity* 5(2): 147-161 DOI: 10.1016/s1074-7613(00)80491-4
- Alam, S. M., P. J. Travers, J. L. Wung, W. Nasholds, S. Redpath, S. C. Jameson and N. R. Gascoigne (1996). "T-cell-receptor affinity and thymocyte positive selection." *Nature* 381(6583): 616-620 DOI: 10.1038/381616a0
- Alves, N. L., O. Richard-Le Goff, N. D. Huntington, A. P. Sousa, V. S. Ribeiro, A. Bordack, F. L. Vives, L. Peduto, A. Chidgey, A. Cumano, R. Boyd, G. Eberl and J. P. Di Santo (2009). "Characterization of the thymic IL-7 niche in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(5): 1512-1517 DOI: 10.1073/pnas.0809559106
- Anderson, M. K., A. H. Weiss, G. Hernandez-Hoyos, C. J. Dionne and E. V. Rothenberg (2002). "Constitutive expression of PU.1 in fetal hematopoietic progenitors blocks T cell development at the pro-T cell stage." *Immunity* 16(2): 285-296 DOI: 10.1016/s1074-7613(02)00277-7
- Arefanian, S., D. Schäll, S. Chang, R. Ghasemi, R. Higashikubo, A. Zheleznyak, Y. Guo, J. Yu, H. Asgharian, W. Li, A. E. Gelman, D. Kreisel, A. R. French, H. Zaher, B. Plougastel-Douglas, L. Maggi, W. Yokoyama, S. Beer-Hammer and A. S. Krupnick (2016). "Deficiency of the adaptor protein SLY1 results in a natural killer cell ribosomopathy affecting tumor clearance." *Oncoimmunology* 5(12): e1238543 DOI: 10.1080/2162402x.2016.1238543
- Astoul, E., A. D. Laurence, N. Totty, S. Beer, D. R. Alexander and D. A. Cantrell (2003). "Approaches to define antigen receptor-induced serine kinase signal transduction pathways." *J Biol Chem* 278(11): 9267-9275 DOI: 10.1074/jbc.M211252200
- Beer, S., T. Scheikl, B. Reis, N. Hüser, K. Pfeffer and B. Holzmann (2005). "Impaired immune responses and prolonged allograft survival in SLY1 mutant mice." *Mol Cell Biol* 25(21): 9646-9660 DOI: 10.1128/mcb.25.21.9646-9660.2005
- Beer, S., A. B. Simins, A. Schuster and B. Holzmann (2001). "Molecular cloning and characterization of a novel SH3 protein (SLY) preferentially expressed in lymphoid cells." *Biochim Biophys Acta* 1520(1): 89-93 DOI: 10.1016/s0167-4781(01)00242-1
- Bellavia, D., A. F. Campese, S. Checquolo, A. Balestri, A. Biondi, G. Cazzaniga, U. Lendahl, H. J. Fehling, A. C. Hayday, L. Frati, H. von Boehmer, A. Gulino and I. Screpanti (2002). "Combined expression of pTalpha and Notch3 in T cell leukemia identifies the requirement of preTCR for leukemogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(6): 3788-3793 DOI: 10.1073/pnas.062050599

6. Literaturverzeichnis

- Bhatia, S. K., L. T. Tygrett, K. H. Grabstein and T. J. Waldschmidt (1995). "The effect of in vivo IL-7 deprivation on T cell maturation." *J Exp Med* 181(4): 1399-1409 DOI: 10.1084/jem.181.4.1399
- Champhekar, A., S. S. Damle, G. Freedman, S. Carotta, S. L. Nutt and E. V. Rothenberg (2015). "Regulation of early T-lineage gene expression and developmental progression by the progenitor cell transcription factor PU.1." *Genes Dev* 29(8): 832-848 DOI: 10.1101/gad.259879.115
- Charvet, C., A. J. Canonigo, S. Bécart, U. Maurer, A. V. Miletic, W. Swat, M. Deckert and A. Altman (2006). "Vav1 promotes T cell cycle progression by linking TCR/CD28 costimulation to FOXO1 and p27kip1 expression." *J Immunol* 177(8): 5024-5031 DOI: 10.4049/jimmunol.177.8.5024
- Chibaya, L., B. Karim, H. Zhang and S. N. Jones (2021). "Mdm2 phosphorylation by Akt regulates the p53 response to oxidative stress to promote cell proliferation and tumorigenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 118(4) DOI: 10.1073/pnas.2003193118
- Chu, Y. W., S. A. Memon, S. O. Sharrow, F. T. Hakim, M. Eckhaus, P. J. Lucas and R. E. Gress (2004). "Exogenous IL-7 increases recent thymic emigrants in peripheral lymphoid tissue without enhanced thymic function." *Blood* 104(4): 1110-1119 DOI: 10.1182/blood-2003-10-3635
- Claudio, J. O., Y. X. Zhu, S. J. Benn, A. H. Shukla, C. J. McGlade, N. Falcioni and A. K. Stewart (2001). "HACS1 encodes a novel SH3-SAM adaptor protein differentially expressed in normal and malignant hematopoietic cells." *Oncogene* 20(38): 5373-5377 DOI: 10.1038/sj.onc.1204698
- Crispi, S., E. Sanzari, J. Monfregola, N. De Felice, G. Fimiani, R. Ambrosio, M. D'Urso and M. V. Ursini (2004). "Characterization of the human STAT5A and STAT5B promoters: evidence of a positive and negative mechanism of transcriptional regulation." *FEBS Lett* 562(1-3): 27-34 DOI: 10.1016/s0014-5793(04)00166-8
- de Pooter, R. and J. C. Zúñiga-Pflücker (2007). "T-cell potential and development in vitro: the OP9-DL1 approach." *Curr Opin Immunol* 19(2): 163-168 DOI: 10.1016/j.coi.2007.02.011
- DeKoter, R. P., B. L. Schweitzer, M. B. Kamath, D. Jones, H. Tagoh, C. Bonifer, D. A. Hildeman and K. J. Huang (2007). "Regulation of the interleukin-7 receptor alpha promoter by the Ets transcription factors PU.1 and GA-binding protein in developing B cells." *J Biol Chem* 282(19): 14194-14204 DOI: 10.1074/jbc.M700377200
- Delmonte, O. M., J. R. E. Bergerson, T. Kawai, H. S. Kuehn, D. H. McDermott, I. Cortese, M. T. Zimmermann, A. K. Dobbs, M. Bosticardo, D. Fink, S. Majumdar, B. Palterer, F. Pala, N. R. Dsouza, M. Pouzolles, N. Taylor, K. R. Calvo, S. R. Daley, D. Velez, A. Agharahimi, K. Myint-Hpu, L. K. Dropulic, J. J. Lyons, S. M. Holland, A. F. Freeman, R. Ghosh, M. B. Similuk, J. E. Niemela, J. Stoddard, D. B. Kuhns, R. Urrutia, S. D. Rosenzweig, M. A. Walkiewicz, P. M. Murphy and L. D. Notarangelo (2021). "SASH3 variants cause a novel form of X-linked combined

6. Literaturverzeichnis

- immunodeficiency with immune dysregulation." *Blood* 138(12): 1019-1033
DOI: 10.1182/blood.2020008629
- Derbinski, J., S. Pinto, S. Rösch, K. Hexel and B. Kyewski (2008). "Promiscuous gene expression patterns in single medullary thymic epithelial cells argue for a stochastic mechanism." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(2): 657-662
DOI: 10.1073/pnas.0707486105
- Desterro, J. M., M. S. Rodriguez and R. T. Hay (2000). "Regulation of transcription factors by protein degradation." *Cell Mol Life Sci* 57(8-9): 1207-1219 DOI: 10.1007/pl00000760
- Dudley, E. C., H. T. Petrie, L. M. Shah, M. J. Owen and A. C. Hayday (1994). "T cell receptor beta chain gene rearrangement and selection during thymocyte development in adult mice." *Immunity* 1(2): 83-93 DOI: 10.1016/1074-7613(94)90102-3
- Eskes, R., S. Desagher, B. Antonsson and J. C. Martinou (2000). "Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane." *Mol Cell Biol* 20(3): 929-935 DOI: 10.1128/mcb.20.3.929-935.2000
- Falk, I., G. Nerz, I. Haidl, A. Krotkova and K. Eichmann (2001). "Immature thymocytes that fail to express TCRbeta and/or TCRgamma delta proteins die by apoptotic cell death in the CD44(-)CD25(-) (DN4) subset." *Eur J Immunol* 31(11): 3308-3317 DOI: 10.1002/1521-4141(200111)31:11<3308::aid-immu3308>3.0.co;2-5
- Fehling, H. J. and H. von Boehmer (1997). "Early alpha beta T cell development in the thymus of normal and genetically altered mice." *Curr Opin Immunol* 9(2): 263-275 DOI: 10.1016/s0952-7915(97)80146-x
- Felli, M. P., M. Maroder, T. A. Mitsiadis, A. F. Campese, D. Bellavia, A. Vacca, R. S. Mann, L. Frati, U. Lendahl, A. Gulino and I. Screpanti (1999). "Expression pattern of notch1, 2 and 3 and Jagged1 and 2 in lymphoid and stromal thymus components: distinct ligand-receptor interactions in intrathymic T cell development." *Int Immunol* 11(7): 1017-1025 DOI: 10.1093/intimm/11.7.1017
- Foxwell, B. M., C. Beadling, D. Guschin, I. Kerr and D. Cantrell (1995). "Interleukin-7 can induce the activation of Jak 1, Jak 3 and STAT 5 proteins in murine T cells." *Eur J Immunol* 25(11): 3041-3046 DOI: 10.1002/eji.1830251109
- Godfrey, D. I., J. Kennedy, T. Suda and A. Zlotnik (1993). "A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression." *J Immunol* 150(10): 4244-4252
- Gordon, W. R., K. L. Arnett and S. C. Blacklow (2008). "The molecular logic of Notch signaling--a structural and biochemical perspective." *J Cell Sci* 121(Pt 19): 3109-3119 DOI: 10.1242/jcs.035683

6. Literaturverzeichnis

- Green, D. R. and F. Llambi (2015). "Cell Death Signaling." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7(12) DOI: 10.1101/cshperspect.a006080
- Groettrup, M., K. Ungewiss, O. Azogui, R. Palacios, M. J. Owen, A. C. Hayday and H. von Boehmer (1993). "A novel disulfide-linked heterodimer on pre-T cells consists of the T cell receptor beta chain and a 33 kd glycoprotein." *Cell* 75(2): 283-294 DOI: 10.1016/0092-8674(93)80070-u
- Gruber, L.-C. (2022). *Molekulare Analyse der Rolle von SLy1 im p53-Signalweg*. Medizinische Dissertationsschrift, Eberhard Karls Universität, Tübingen
- Hasserjian, R. P., J. C. Aster, F. Davi, D. S. Weinberg and J. Sklar (1996). "Modulated expression of notch1 during thymocyte development." *Blood* 88(3): 970-976
- Hirano, K., N. Negishi, M. Yazawa, H. Yagita, S. Habu and K. Hozumi (2015). "Delta-like 4-mediated Notch signaling is required for early T-cell development in a three-dimensional thymic structure." *Eur J Immunol* 45(8): 2252-2262 DOI: 10.1002/eji.201445123
- Hosokawa, H. and E. V. Rothenberg (2021). "How transcription factors drive choice of the T cell fate." *Nat Rev Immunol* 21(3): 162-176 DOI: 10.1038/s41577-020-00426-6
- Hosokawa, H., J. Ungerbäck, X. Wang, M. Matsumoto, K. I. Nakayama, S. M. Cohen, T. Tanaka and E. V. Rothenberg (2018). "Transcription Factor PU.1 Represses and Activates Gene Expression in Early T Cells by Redirecting Partner Transcription Factor Binding." *Immunity* 48(6): 1119-1134.e1117 DOI: 10.1016/j.immuni.2018.04.024
- Hozumi, K., C. Mailhos, N. Negishi, K. Hirano, T. Yahata, K. Ando, S. Zuklys, G. A. Holländer, D. T. Shima and S. Habu (2008). "Delta-like 4 is indispensable in thymic environment specific for T cell development." *J Exp Med* 205(11): 2507-2513 DOI: 10.1084/jem.20080134
- Ichikawa, M., T. Asai, T. Saito, S. Seo, I. Yamazaki, T. Yamagata, K. Mitani, S. Chiba, S. Ogawa, M. Kurokawa and H. Hirai (2004). "AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis." *Nat Med* 10(3): 299-304 DOI: 10.1038/nm997
- Janssen, E. and W. Zhang (2003). "Adaptor proteins in lymphocyte activation." *Curr Opin Immunol* 15(3): 269-276 DOI: 10.1016/s0952-7915(03)00044-x
- Jarriault, S., C. Brou, F. Logeat, E. H. Schroeter, R. Kopan and A. Israel (1995). "Signalling downstream of activated mammalian Notch." *Nature* 377(6547): 355-358 DOI: 10.1038/377355a0
- Jaufmann J, Fleischmann M-T, Schmitt F, Beer-Hammer S. (2019). "IL-6-Mediated Stimulation of RPMI 8226 Cells Induces Upregulation of the Inhibitory Adaptor SLy2 and Is Accompanied by Alterations in HDAC-Target Gene Expression." *J Hematol Mult Myeloma*. 2019;4(1):1019.

6. Literaturverzeichnis

- Jaufmann, J., F. C. Franke, A. Sperlich, C. Blumendeller, I. Kloos, B. Schneider, D. Sasaki, K. P. Janssen and S. Beer-Hammer (2021). "The emerging and diverse roles of the SLy/SASH1-protein family in health and disease- Overview of three multifunctional proteins." *Faseb j* 35(4): e21470 DOI: 10.1096/fj.202002495R
- Jiang, Q., W. Q. Li, F. B. Aiello, R. Mazzucchelli, B. Asefa, A. R. Khaled and S. K. Durum (2005). "Cell biology of IL-7, a key lymphotrophin." *Cytokine Growth Factor Rev* 16(4-5): 513-533 DOI: 10.1016/j.cytogfr.2005.05.004
- Kabelitz, D., T. Pohl and K. Pechhold (1993). "Activation-induced cell death (apoptosis) of mature peripheral T lymphocytes." *Immunol Today* 14(7): 338-339 DOI: 10.1016/0167-5699(93)90231-9
- Katz, G., L. A. Pobeziński, S. Jeurling, M. Shinzawa, F. Van Laethem and A. Singer (2014). "T cell receptor stimulation impairs IL-7 receptor signaling by inducing expression of the microRNA miR-17 to target Janus kinase 1." *Sci Signal* 7(340): ra83 DOI: 10.1126/scisignal.2005221
- Kerdiles, Y. M., E. L. Stone, D. R. Beisner, M. A. McGargill, I. L. Ch'en, C. Stockmann, C. D. Katayama and S. M. Hedrick (2010). "Foxo transcription factors control regulatory T cell development and function." *Immunity* 33(6): 890-904 DOI: 10.1016/j.immuni.2010.12.002
- Khaled, A. R., W. Q. Li, J. Huang, T. J. Fry, A. S. Khaled, C. L. Mackall, K. Muegge, H. A. Young and S. K. Durum (2002). "Bax deficiency partially corrects interleukin-7 receptor alpha deficiency." *Immunity* 17(5): 561-573 DOI: 10.1016/s1074-7613(02)00450-8
- Kim, H. K., A. T. Waickman, E. Castro, F. A. Flomerfelt, N. V. Hawk, V. Kapoor, W. G. Telford and R. E. Gress (2016). "Distinct IL-7 signaling in recent thymic emigrants versus mature naïve T cells controls T-cell homeostasis." *Eur J Immunol* 46(7): 1669-1680 DOI: 10.1002/eji.201546214
- Klein, L., B. Kyewski, P. M. Allen and K. A. Hogquist (2014). "Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see)." *Nat Rev Immunol* 14(6): 377-391 DOI: 10.1038/nri3667
- Klein, L., B. Roettinger and B. Kyewski (2001). "Sampling of complementing self-antigen pools by thymic stromal cells maximizes the scope of central T cell tolerance." *Eur J Immunol* 31(8): 2476-2486 DOI: 10.1002/1521-4141(200108)31:8<2476::aid-immu2476>3.0.co;2-t
- Kloos, I. (2022). Die Rolle von SLy1 bei der Entwicklung einer T-Zell-akuten lymphatischen Leukämie. Medizinische Dissertationsschrift, Eberhard Karls Universität, Tübingen
- Koch, U., E. Fiorini, R. Benedito, V. Besseyrias, K. Schuster-Gossler, M. Pierres, N. R. Manley, A. Duarte, H. R. Macdonald and F. Radtke (2008). "Delta-like 4 is the essential, nonredundant ligand for Notch1 during thymic T cell lineage commitment." *J Exp Med* 205(11): 2515-2523 DOI: 10.1084/jem.20080829

6. Literaturverzeichnis

- Koenen, P., S. Heinzl, E. M. Carrington, L. Hoppo, W. S. Alexander, J. G. Zhang, M. J. Herold, C. L. Scott, A. M. Lew, A. Strasser and P. D. Hodgkin (2013). "Mutually exclusive regulation of T cell survival by IL-7R and antigen receptor-induced signals." *Nat Commun* 4: 1735 DOI: 10.1038/ncomms2719
- Krahling, S., M. K. Callahan, P. Williamson and R. A. Schlegel (1999). "Exposure of phosphatidylserine is a general feature in the phagocytosis of apoptotic lymphocytes by macrophages." *Cell Death Differ* 6(2): 183-189 DOI: 10.1038/sj.cdd.4400473
- Laws, A. M. and B. A. Osborne (2004). "p53 regulates thymic Notch1 activation." *Eur J Immunol* 34(3): 726-734 DOI: 10.1002/eji.200324772
- Lee, H. C., H. Shibata, S. Ogawa, K. Maki and K. Ikuta (2005). "Transcriptional regulation of the mouse IL-7 receptor alpha promoter by glucocorticoid receptor." *J Immunol* 174(12): 7800-7806 DOI: 10.4049/jimmunol.174.12.7800
- Levelt, C. N., B. Wang, A. Ehrfeld, C. Terhorst and K. Eichmann (1995). "Regulation of T cell receptor (TCR)-beta locus allelic exclusion and initiation of TCR-alpha locus rearrangement in immature thymocytes by signaling through the CD3 complex." *Eur J Immunol* 25(5): 1257-1261 DOI: 10.1002/eji.1830250519
- Liang, H., X. Mao, E. T. Olejniczak, D. G. Nettesheim, L. Yu, R. P. Meadows, C. B. Thompson and S. W. Fesik (1994). "Solution structure of the ets domain of Fli-1 when bound to DNA." *Nat Struct Biol* 1(12): 871-875
- Lind, E. F., S. E. Prockop, H. E. Porritt and H. T. Petrie (2001). "Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development." *J Exp Med* 194(2): 127-134 DOI: 10.1084/jem.194.2.127
- Liu, X., G. W. Robinson, F. Gouilleux, B. Groner and L. Hennighausen (1995). "Cloning and expression of Stat5 and an additional homologue (Stat5b) involved in prolactin signal transduction in mouse mammary tissue." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(19): 8831-8835 DOI: 10.1073/pnas.92.19.8831
- Luscombe, N. M., S. E. Austin, H. M. Berman and J. M. Thornton (2000). "An overview of the structures of protein-DNA complexes." *Genome Biol* 1(1): Reviews001 DOI: 10.1186/gb-2000-1-1-reviews001
- Maki, K., S. Sunaga, Y. Komagata, Y. Kodaira, A. Mabuchi, H. Karasuyama, K. Yokomuro, J. I. Miyazaki and K. Ikuta (1996). "Interleukin 7 receptor-deficient mice lack gammadelta T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(14): 7172-7177 DOI: 10.1073/pnas.93.14.7172
- Mayo, L. D. and D. B. Donner (2001). "A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(20): 11598-11603 DOI: 10.1073/pnas.181181198

6. Literaturverzeichnis

- McElroy, C. A., P. J. Holland, P. Zhao, J. M. Lim, L. Wells, E. Eisenstein and S. T. Walsh (2012). "Structural reorganization of the interleukin-7 signaling complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(7): 2503-2508 DOI: 10.1073/pnas.1116582109
- Mihara, M., S. Erster, A. Zaika, O. Petrenko, T. Chittenden, P. Pancoska and U. M. Moll (2003). "p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria." *Mol Cell* 11(3): 577-590 DOI: 10.1016/s1097-2765(03)00050-9
- Minderjahn, J., A. Schmidt, A. Fuchs, R. Schill, J. Raithel, M. Babina, C. Schmidl, C. Gebhard, S. Schmidhofer, K. Mendes, A. Ratermann, D. Glatz, M. Nützel, M. Edinger, P. Hoffmann, R. Spang, G. Längst, A. Imhof and M. Rehli (2020). "Mechanisms governing the pioneering and redistribution capabilities of the non-classical pioneer PU.1." *Nat Commun* 11(1): 402 DOI: 10.1038/s41467-019-13960-2
- Mombaerts, P., J. Iacomini, R. S. Johnson, K. Herrup, S. Tonegawa and V. E. Papaioannou (1992). "RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes." *Cell* 68(5): 869-877 DOI: 10.1016/0092-8674(92)90030-g
- Morgan, D. O. (1997). "Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors." *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 261-291 DOI: 10.1146/annurev.cellbio.13.1.261
- Muegge, K., M. P. Vila and S. K. Durum (1993). "Interleukin-7: a cofactor for V(D)J rearrangement of the T cell receptor beta gene." *Science* 261(5117): 93-95 DOI: 10.1126/science.7686307
- Muslin, A. J. and H. Xing (2000). "14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference." *Cell Signal* 12(11-12): 703-709 DOI: 10.1016/s0898-6568(00)00131-5
- Oettinger, M. A., D. G. Schatz, C. Gorka and D. Baltimore (1990). "RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination." *Science* 248(4962): 1517-1523 DOI: 10.1126/science.2360047
- Ouyang, W., O. Beckett, R. A. Flavell and M. O. Li (2009). "An essential role of the Forkhead-box transcription factor Foxo1 in control of T cell homeostasis and tolerance." *Immunity* 30(3): 358-371 DOI: 10.1016/j.immuni.2009.02.003
- Paiva, R. A., C. V. Ramos, G. Leiria and V. C. Martins (2022). "IL-7 Receptor Drives Early T Lineage Progenitor Expansion." *J Immunol* 209(10): 1942-1949 DOI: 10.4049/jimmunol.2101046
- Park, J. H., S. Adoro, T. Guinter, B. Erman, A. S. Alag, M. Catalfamo, M. Y. Kimura, Y. Cui, P. J. Lucas, R. E. Gress, M. Kubo, L. Hennighausen, L. Feigenbaum and A. Singer (2010). "Signaling by intrathymic cytokines, not T cell antigen receptors, specifies CD8 lineage choice and promotes the differentiation of cytotoxic-lineage T cells." *Nat Immunol* 11(3): 257-264 DOI: 10.1038/ni.1840

6. Literaturverzeichnis

- Park, J. H., Q. Yu, B. Erman, J. S. Appelbaum, D. Montoya-Durango, H. L. Grimes and A. Singer (2004). "Suppression of IL7Ralpha transcription by IL-7 and other prosurvival cytokines: a novel mechanism for maximizing IL-7-dependent T cell survival." *Immunity* 21(2): 289-302 DOI: 10.1016/j.immuni.2004.07.016
- Pawson, T. and J. D. Scott (1997). "Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins." *Science* 278(5346): 2075-2080 DOI: 10.1126/science.278.5346.2075
- Peschon, J. J., P. J. Morrissey, K. H. Grabstein, F. J. Ramsdell, E. Maraskovsky, B. C. Gliniak, L. S. Park, S. F. Ziegler, D. E. Williams, C. B. Ware, J. D. Meyer and B. L. Davison (1994). "Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice." *J Exp Med* 180(5): 1955-1960 DOI: 10.1084/jem.180.5.1955
- Petrie, H. T. (2002). "Role of thymic organ structure and stromal composition in steady-state postnatal T-cell production." *Immunol Rev* 189: 8-19 DOI: 10.1034/j.1600-065x.2002.18902.x
- Pleiman, C. M., S. D. Gimpel, L. S. Park, H. Harada, T. Taniguchi and S. F. Ziegler (1991). "Organization of the murine and human interleukin-7 receptor genes: two mRNAs generated by differential splicing and presence of a type I-interferon-inducible promoter." *Mol Cell Biol* 11(6): 3052-3059 DOI: 10.1128/mcb.11.6.3052-3059.1991
- Puel, A., S. F. Ziegler, R. H. Buckley and W. J. Leonard (1998). "Defective IL7R expression in T(-)B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency." *Nat Genet* 20(4): 394-397 DOI: 10.1038/3877
- Radtke, F., A. Wilson, G. Stark, M. Bauer, J. van Meerwijk, H. R. MacDonald and M. Aguet (1999). "Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1." *Immunity* 10(5): 547-558 DOI: 10.1016/s1074-7613(00)80054-0
- Reis, B. (2007). SLY1-Charakterisierung der Funktion und Rolle im Immunsystem. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Dissertationsschrift, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Reis, B., K. Pfeffer and S. Beer-Hammer (2009). "The orphan adapter protein SLY1 as a novel anti-apoptotic protein required for thymocyte development." *BMC Immunol* 10: 38 DOI: 10.1186/1471-2172-10-38
- Robey, E., D. Chang, A. Itano, D. Cado, H. Alexander, D. Lans, G. Weinmaster and P. Salmon (1996). "An activated form of Notch influences the choice between CD4 and CD8 T cell lineages." *Cell* 87(3): 483-492 DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81368-9
- Rodewald, H. R., K. Kretzschmar, W. Swat and S. Takeda (1995). "Intrathymically expressed c-kit ligand (stem cell factor) is a major factor driving expansion of very immature thymocytes in vivo." *Immunity* 3(3): 313-319 DOI: 10.1016/1074-7613(95)90116-7

6. Literaturverzeichnis

- Saba, I., C. Kosan, L. Vassen and T. Möröy (2011). "IL-7R-dependent survival and differentiation of early T-lineage progenitors is regulated by the BTB/POZ domain transcription factor Miz-1." *Blood* 117(12): 3370-3381 DOI: 10.1182/blood-2010-09-310680
- Saito, T., S. Chiba, M. Ichikawa, A. Kunisato, T. Asai, K. Shimizu, T. Yamaguchi, G. Yamamoto, S. Seo, K. Kumano, E. Nakagami-Yamaguchi, Y. Hamada, S. Aizawa and H. Hirai (2003). "Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development." *Immunity* 18(5): 675-685 DOI: 10.1016/s1074-7613(03)00111-0
- Schäll, D. (2015). Das Adapterprotein SLy1 - Ein Zelltyp-spezifischer Regulator des Immunsystems. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Dissertationsschrift, Eberhard Karls Universität, Tübingen
- Schäll, D., F. Schmitt, B. Reis, S. Brandt and S. Beer-Hammer (2015). "SLy1 regulates T-cell proliferation during *Listeria monocytogenes* infection in a Foxo1-dependent manner." *Eur J Immunol* 45(11): 3087-3097 DOI: 10.1002/eji.201545609
- Schebesta, A., S. McManus, G. Salvagiotto, A. Delogu, G. A. Busslinger and M. Busslinger (2007). "Transcription factor Pax5 activates the chromatin of key genes involved in B cell signaling, adhesion, migration, and immune function." *Immunity* 27(1): 49-63 DOI: 10.1016/j.immuni.2007.05.019
- Schneider, B. (2022). Molekulare Analyse der Rolle von SLy1 in der T-Zell-Entwicklung. Medizinische Dissertationsschrift, Eberhard Karls Universität, Tübingen
- Schroeter, E. H., J. A. Kisslinger and R. Kopan (1998). "Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain." *Nature* 393(6683): 382-386 DOI: 10.1038/30756
- Sentman, C. L., J. R. Shutter, D. Hockenbery, O. Kanagawa and S. J. Korsmeyer (1991). "bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes." *Cell* 67(5): 879-888 DOI: 10.1016/0092-8674(91)90361-2
- Shah, D. K. and J. C. Zúñiga-Pflücker (2014). "An overview of the intrathymic intricacies of T cell development." *J Immunol* 192(9): 4017-4023 DOI: 10.4049/jimmunol.1302259
- Sharrocks, A. D. (2001). "The ETS-domain transcription factor family." *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(11): 827-837 DOI: 10.1038/35099076
- Sherr, C. J. and J. M. Roberts (1999). "CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression." *Genes Dev* 13(12): 1501-1512 DOI: 10.1101/gad.13.12.1501
- Shi, J., M. Fallahi, J. L. Luo and H. T. Petrie (2011). "Nonoverlapping functions for Notch1 and Notch3 during murine steady-state thymic lymphopoiesis." *Blood* 118(9): 2511-2519 DOI: 10.1182/blood-2011-04-346726

6. Literaturverzeichnis

- Shi, L. Z., J. Saravia, H. Zeng, N. S. Kalupahana, C. S. Guy, G. Neale and H. Chi (2017). "Gfi1-Foxo1 axis controls the fidelity of effector gene expression and developmental maturation of thymocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 114(1): E67-e74 DOI: 10.1073/pnas.1617669114
- Shi, Y. (2002). "Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis." *Mol Cell* 9(3): 459-470 DOI: 10.1016/s1097-2765(02)00482-3
- Shin, B., S. J. Chang, B. W. MacNabb and E. V. Rothenberg (2024). "Transcriptional network dynamics in early T cell development." *J Exp Med* 221(10) e20230893 DOI: 10.1084/jem.20230893
- Shitara, S., T. Hara, B. Liang, K. Wagatsuma, S. Zuklys, G. A. Holländer, H. Nakase, T. Chiba, S. Tani-ichi and K. Ikuta (2013). "IL-7 produced by thymic epithelial cells plays a major role in the development of thymocytes and TCR $\gamma\delta$ + intraepithelial lymphocytes." *J Immunol* 190(12): 6173-6179 DOI: 10.4049/jimmunol.1202573
- Spitz, F. and E. E. Furlong (2012). "Transcription factors: from enhancer binding to developmental control." *Nat Rev Genet* 13(9): 613-626 DOI: 10.1038/nrg3207
- Stahl, M., P. F. Dijkers, G. J. Kops, S. M. Lens, P. J. Coffey, B. M. Burgering and R. H. Medema (2002). "The forkhead transcription factor FoxO regulates transcription of p27Kip1 and Bim in response to IL-2." *J Immunol* 168(10): 5024-5031 DOI: 10.4049/jimmunol.168.10.5024
- Steier, Z., D. A. Aylard, L. L. McIntyre, I. Baldwin, E. J. Y. Kim, L. K. Lutes, C. Ergen, T. S. Huang, E. A. Robey, N. Yosef and A. Streets (2023). "Single-cell multiomic analysis of thymocyte development reveals drivers of CD4(+) T cell and CD8(+) T cell lineage commitment." *Nat Immunol* 24(9): 1579-1590 DOI: 10.1038/s41590-023-01584-0
- Surh, C. D. and J. Sprent (1994). "T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus." *Nature* 372(6501): 100-103 DOI: 10.1038/372100a0
- Suzuki, K., H. Nakajima, Y. Saito, T. Saito, W. J. Leonard and I. Iwamoto (2000). "Janus kinase 3 (Jak3) is essential for common cytokine receptor gamma chain (gamma(c))-dependent signaling: comparative analysis of gamma(c), Jak3, and gamma(c) and Jak3 double-deficient mice." *Int Immunol* 12(2): 123-132 DOI: 10.1093/intimm/12.2.123
- Takahama, Y., T. Nitta, A. Mat Ripen, S. Nitta, S. Murata and K. Tanaka (2010). "Role of thymic cortex-specific self-peptides in positive selection of T cells." *Semin Immunol* 22(5): 287-293 DOI: 10.1016/j.smim.2010.04.012
- Takeuchi, A., S. Yamasaki, K. Takase, F. Nakatsu, H. Arase, M. Onodera and T. Saito (2001). "E2A and HEB activate the pre-TCR alpha promoter during immature T cell development." *J Immunol* 167(4): 2157-2163 DOI: 10.4049/jimmunol.167.4.2157

6. Literaturverzeichnis

- Tan, J. T., E. Dudl, E. LeRoy, R. Murray, J. Sprent, K. I. Weinberg and C. D. Surh (2001). "IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(15): 8732-8737 DOI: 10.1073/pnas.161126098
- Tanaka, H., Y. Takizawa, M. Takaku, D. Kato, Y. Kumagawa, S. A. Grimm, P. A. Wade and H. Kurumizaka (2020). "Interaction of the pioneer transcription factor GATA3 with nucleosomes." *Nat Commun* 11(1): 4136 DOI: 10.1038/s41467-020-17959-y
- Taylor, S. R., D. R. Alexander, J. C. Cooper, C. F. Higgins and J. I. Elliott (2007). "Regulatory T cells are resistant to apoptosis via TCR but not P2X7." *J Immunol* 178(6): 3474-3482 DOI: 10.4049/jimmunol.178.6.3474
- Teachenor, R., K. Beck, L. Y. Wright, Z. Shen, S. P. Briggs and C. Murre (2012). "Biochemical and phosphoproteomic analysis of the helix-loop-helix protein E47." *Mol Cell Biol* 32(9): 1671-1682 DOI: 10.1128/mcb.06452-11
- Tiso, M., R. Gangemi, A. Bargellesi Severi, S. Pizzolitto, M. Fabbi and A. Risso (1995). "Spontaneous apoptosis in human thymocytes." *Am J Pathol* 147(2): 434-444
- Tomita, K., K. Saijo, S. Yamasaki, T. Iida, F. Nakatsu, H. Arase, H. Ohno, T. Shirasawa, T. Kuriyama, J. J. O'Shea and T. Saito (2001). "Cytokine-independent Jak3 activation upon T cell receptor (TCR) stimulation through direct association of Jak3 and the TCR complex." *J Biol Chem* 276(27): 25378-25385 DOI: 10.1074/jbc.M011363200
- Vacca, A., M. P. Felli, R. Palermo, G. Di Mario, A. Calce, M. Di Giovine, L. Frati, A. Gulino and I. Screpanti (2006). "Notch3 and pre-TCR interaction unveils distinct NF-kappaB pathways in T-cell development and leukemia." *Embo j* 25(5): 1000-1008 DOI: 10.1038/sj.emboj.7600996
- Voll, R. E., E. Jimi, R. J. Phillips, D. F. Barber, M. Rincon, A. C. Hayday, R. A. Flavell and S. Ghosh (2000). "NF-kappa B activation by the pre-T cell receptor serves as a selective survival signal in T lymphocyte development." *Immunity* 13(5): 677-689 DOI: 10.1016/s1074-7613(00)00067-4
- von Freeden-Jeffry, U., N. Solvason, M. Howard and R. Murray (1997). "The earliest T lineage-committed cells depend on IL-7 for Bcl-2 expression and normal cell cycle progression." *Immunity* 7(1): 147-154 DOI: 10.1016/s1074-7613(00)80517-8
- Wang, J. H., A. Nichogiannopoulou, L. Wu, L. Sun, A. H. Sharpe, M. Bigby and K. Georgopoulos (1996). "Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation." *Immunity* 5(6): 537-549 DOI: 10.1016/s1074-7613(00)80269-1
- Wang, Y., I. Misumi, A. D. Gu, T. A. Curtis, L. Su, J. K. Whitmire and Y. Y. Wan (2013). "GATA-3 controls the maintenance and proliferation of T cells downstream of TCR and cytokine signaling." *Nat Immunol* 14(7): 714-722 DOI: 10.1038/ni.2623

6. Literaturverzeichnis

- Washburn, T., E. Schweighoffer, T. Gridley, D. Chang, B. J. Fowlkes, D. Cado and E. Robey (1997). "Notch activity influences the alphabeta versus gammadelta T cell lineage decision." *Cell* 88(6): 833-843 DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81929-7
- Weber, B. N., A. W. Chi, A. Chavez, Y. Yashiro-Ohtani, Q. Yang, O. Shestova and A. Bhandoola (2011). "A critical role for TCF-1 in T-lineage specification and differentiation." *Nature* 476(7358): 63-68 DOI: 10.1038/nature10279
- Weinberg, R. A. (1995). "The retinoblastoma protein and cell cycle control." *Cell* 81(3): 323-330 DOI: 10.1016/0092-8674(95)90385-2
- Welte, T., D. Leitenberg, B. N. Dittel, B. K. al-Ramadi, B. Xie, Y. E. Chin, C. A. Janeway, Jr., A. L. Bothwell, K. Bottomly and X. Y. Fu (1999). "STAT5 interaction with the T cell receptor complex and stimulation of T cell proliferation." *Science* 283(5399): 222-225 DOI: 10.1126/science.283.5399.222
- Wong, G. W., G. C. Knowles, T. W. Mak, A. A. Ferrando and J. C. Zúñiga-Pflücker (2012). "HES1 opposes a PTEN-dependent check on survival, differentiation, and proliferation of TCR β -selected mouse thymocytes." *Blood* 120(7): 1439-1448 DOI: 10.1182/blood-2011-12-395319
- Wood, G. W., J. H. Greenwood and L. Mauser (1990). "Growth of murine thymocytes in vitro in chemically defined medium." *Immunology* 69(2): 303-311
- Xue, H. H., J. Bollenbacher, V. Rovella, R. Tripuraneni, Y. B. Du, C. Y. Liu, A. Williams, J. P. McCoy and W. J. Leonard (2004). "GA binding protein regulates interleukin 7 receptor alpha-chain gene expression in T cells." *Nat Immunol* 5(10): 1036-1044 DOI: 10.1038/ni1117
- Yang, J., X. Liu, K. Bhalla, C. N. Kim, A. M. Ibrado, J. Cai, T. I. Peng, D. P. Jones and X. Wang (1997). "Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked." *Science* 275(5303): 1129-1132 DOI: 10.1126/science.275.5303.1129
- Yashiro-Ohtani, Y., Y. He, T. Ohtani, M. E. Jones, O. Shestova, L. Xu, T. C. Fang, M. Y. Chiang, A. M. Intlekofer, S. C. Blacklow, Y. Zhuang and W. S. Pear (2009). "Pre-TCR signaling inactivates Notch1 transcription by antagonizing E2A." *Genes Dev* 23(14): 1665-1676 DOI: 10.1101/gad.1793709
- Yu, C. R., H. A. Young and J. R. Ortaldo (1998). "Characterization of cytokine differential induction of STAT complexes in primary human T and NK cells." *J Leukoc Biol* 64(2): 245-258 DOI: 10.1002/jlb.64.2.245
- Yu, Q., B. Erman, A. Bhandoola, S. O. Sharrow and A. Singer (2003). "In vitro evidence that cytokine receptor signals are required for differentiation of double positive thymocytes into functionally mature CD8⁺ T cells." *J Exp Med* 197(4): 475-487 DOI: 10.1084/jem.20021765

6. Literaturverzeichnis

- Yu, Q., B. Erman, J. H. Park, L. Feigenbaum and A. Singer (2004). "IL-7 receptor signals inhibit expression of transcription factors TCF-1, LEF-1, and ROR γ : impact on thymocyte development." *J Exp Med* 200(6): 797-803 DOI: 10.1084/jem.20032183
- Yu, Q., J. H. Park, L. L. Doan, B. Erman, L. Feigenbaum and A. Singer (2006). "Cytokine signal transduction is suppressed in preselection double-positive thymocytes and restored by positive selection." *J Exp Med* 203(1): 165-175 DOI: 10.1084/jem.20051836
- Yu, S., D. M. Zhao, R. Jothi and H. H. Xue (2010). "Critical requirement of GABPA for normal T cell development." *J Biol Chem* 285(14): 10179-10188 DOI: 10.1074/jbc.M109.088740
- Zeller, C., B. Hinzmann, S. Seitz, H. Prokoph, E. Burkhard-Goettges, J. Fischer, B. Jandrig, L. E. Schwarz, A. Rosenthal and S. Scherneck (2003). "SASH1: a candidate tumor suppressor gene on chromosome 6q24.3 is downregulated in breast cancer." *Oncogene* 22(19): 2972-2983 DOI: 10.1038/sj.onc.1206474
- Zhao, B., K. Yoganathan, L. Li, J. Y. Lee, J. C. Zúñiga-Pflücker and P. E. Love (2019). "Notch and the pre-TCR coordinate thymocyte proliferation by induction of the SCF subunits Fbxl1 and Fbxl12." *Nat Immunol* 20(10): 1381-1392 DOI: 10.1038/s41590-019-0469-z
- Zhou, J., I. Kryczek, S. Li, X. Li, A. Aguilar, S. Wei, S. Grove, L. Vatan, J. Yu, Y. Yan, P. Liao, H. Lin, J. Li, G. Li, W. Du, W. Wang, X. Lang, W. Wang, S. Wang and W. Zou (2021). "The ubiquitin ligase MDM2 sustains STAT5 stability to control T cell-mediated antitumor immunity." *Nat Immunol* 22(4): 460-470 DOI: 10.1038/s41590-021-00888-3
- Zhou, W., M. A. Yui, B. A. Williams, J. Yun, B. J. Wold, L. Cai and E. V. Rothenberg (2019). "Single-Cell Analysis Reveals Regulatory Gene Expression Dynamics Leading to Lineage Commitment in Early T Cell Development." *Cell Syst* 9(4): 321-337.e329 DOI: 10.1016/j.cels.2019.09.008

7 Anhang

Tabelle 14: Ergebnisse der Analyse der Lokalisation von SLy1 und p-SLy1

Ergebnisse der Expression von SLy1 und p-SLy1 nach Stimulation des TZR in SLy1^{WT}-Thymozyten (s. Abb. 7). Es sind die Mittelwerte \pm SEM der Proteinexpression von SLy1 und p-SLy1 relativ zu Lamin A/C (Nukleus) und GAPDH (Zytoplasma) in SLy1^{WT}-Thymozyten dargestellt. Die Signifikanzen sind nach dem Kruskal-Wallis-Test gekennzeichnet mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und ns = nicht signifikant.

Protein	Anzahl (n)	Zeit [min]	Nukleus \pm SEM	p-Wert (Signifikanz)	Zytoplasma \pm SEM	p-Wert (Signifikanz)
SLy1	9	20	1,04 \pm 0,27	0,9999 (ns)	1,65 \pm 0,16	0,0125 (*)
	9	60	0,99 \pm 0,20	0,9999 (ns)	1,24 \pm 0,11	0,5026 (ns)
p-SLy1	9	20	1,33 \pm 0,27	0,8289 (ns)	2,51 \pm 0,47	0,0023 (**)
	9	60	1,31 \pm 0,47	0,9999 (ns)	1,67 \pm 0,23	0,0840 (ns)

Tabelle 15: Relative Notch-Proteinexpression in SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-Thymozyten

Ergebnisse der Analyse der Proteinexpression von Notch1 und Notch3 in SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-Thymozyten (s. Abb. 8). Es sind die Mittelwerte \pm SD der Proteinexpression relativ zu β -Aktin von Notch1 und Notch3 in SLy1^{KO} und SLy1^{WT} dargestellt. Die Signifikanzen sind nach t-Test für unabhängige Stichproben gekennzeichnet mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und ns = nicht signifikant.

Protein	Anzahl (n)	SLy1 ^{WT} \pm SD	SLy1 ^{KO} \pm SD	p-Wert	Signifikanz
Notch1	12	1,00 \pm 0,27	1,81 \pm 0,84	0,0043	**
Notch3	12	1,00 \pm 0,46	0,85 \pm 0,59	0,5053	ns

Tabelle 16: Vergleich der Expression der IL-7R-Signalwegproteine

Ergebnisse der Expression von Stat5, p-Stat5, p-Jak1 und p-Jak3 in nicht-stimulierten SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-Thymozyten, DN-Thymozyten und T-Zellen (s. Abb. 16, Abb. 17, Abb. 18). Es sind die Mittelwerte der Fluoreszenzintensität durch den Geometric Mean \pm SD dargestellt. Die Signifikanzen sind nach t-Test für unabhängige Stichproben gekennzeichnet mit *p<0,05, **p<0,01 und ns = nicht signifikant.

Zelltyp	Protein	Anzahl (n)	SLy1 ^{WT} \pm SD	SLy1 ^{KO} \pm SD	p-Wert	Signifikanz
DN	Stat5	6	3265 \pm 1667	2777 \pm 1926	0,7168	ns
	p-Stat5	6	242,3 \pm 157,3	205 \pm 65,35	0,6027	ns
	p-Jak1	6	619,8 \pm 135,9	468,2 \pm 83,14	0,0420	*
	p-Jak3	6	769,5 \pm 121,9	651,5 \pm 68,66	0,0658	ns
Thymozyten	Stat5	8	1889 \pm 779,9	1581 \pm 739,7	0,4314	ns
	p-Stat5	8	298,8 \pm 81,73	322,9 \pm 81,15	0,5630	ns
	p-Jak1	8	1305 \pm 520,1	1235 \pm 472,6	0,7823	ns
	p-Jak3	8	1188 \pm 365	1169 \pm 469,3	0,9288	ns
T-Zellen	Stat5	6	2689 \pm 906,8	2332 \pm 862,5	0,501	ns
	p-Stat5	6	261,3 \pm 29,81	342,7 \pm 171,3	0,2786	ns
	p-Jak1	6	1241 \pm 313,6	1522 \pm 612,4	0,3415	ns
	p-Jak3	6	1032 \pm 192,6	980,3 \pm 52,37	0,5390	ns

Tabelle 17: Zellzyklusanalyse in Thymozyten

Ergebnisse der Auswertung des Anteils SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-Thymozyten nach IL-7R-Stimulation (s. Abb. 22). Es sind die Mittelwerte \pm SEM der Fluoreszenzintensität in Thymozyten dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mittels t-Test für unabhängige Stichproben, ns = nicht signifikant.

Phase Zellzyklus	Stimulationszeit in Stunden	Anzahl (n)	SLy1 ^{WT} \pm SD	SLy1 ^{KO} \pm SD	p-Wert	Signifikanz
G0/G1-Phase	0	4	97,28 \pm 0,98	90,15 \pm 12,66	0,3085	ns
	24	4	69,53 \pm 12,15	75,98 \pm 11,17	0,7094	ns
	48	3	55,07 \pm 21,82	57,57 \pm 35,91	0,9378	ns
G2/Mitose-Phase	0	4	0,22 \pm 0,098	1,02 \pm 0,39	0,0919	ns
	24	3	0,19 \pm 0,102	0,08 \pm 0,02	0,2879	ns
	48	3	0,70 \pm 0,58	0,12 \pm 0,11	0,3805	ns
Synthese-Phase	0	4	1,99 \pm 0,79	1,81 \pm 0,72	0,8753	ns
	24	4	14,64 \pm 4,89	15,55 \pm 9,436	0,9349	ns
	48	3	32,77 \pm 16,29	26,51 \pm 13,66	0,7830	ns

Tabelle 18: Analyse des IL-7R-Signalwegs nach IL-7R-Stimulation

Ergebnisse der Expression von Stat5, p-Stat5, p-Jak1 und p-Jak3 in SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-Thymozyten, DN-Thymozyten und T-Zellen nach IL-7R-Stimulation (s. Abb. 10, Abb. 11, Abb. 14, Abb. 15). Es sind die Mittelwerte der Fluoreszenzintensität durch den Geometric Mean \pm SD dargestellt. Die Statistische Analyse erfolgte mittels Two-Way ANOVA. Einzelne Vergleiche sind auf die nicht-stimulierte Kontrollgruppe bezogen. Signifikanzen zwischen SLy1^{KO} und SLy1^{WT} sind gekennzeichnet mit *p<0,05, **p<0,01. Signifikanzen zwischen verschiedenen Zeitpunkten sind gekennzeichnet mit #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001, ####p<0,0001, ns = nicht signifikant.

Protein	Zellgruppe	Anzahl (n)	SLy1	p-Wert (Signifikanz) SLy1 ^{KO/WT}	IL-7R Stimulation (bezogen auf Kontrollgruppe)					
					15 min (Mean \pm SD)	p-Wert (Signifikanz)	2 h (Mean \pm SD)	p-Wert (Signifikanz)	6 h (Mean \pm SD)	p-Wert (Signifikanz)
Stat5	Thymozyten	8	WT	0,9423 (ns)	1878,5 \pm 838,43	0,5233 (ns)	1729 \pm 590,70	0,9793 (ns)	1555,88 \pm 586,85	0,7903 (ns)
		8	KO		1866,4 \pm 938,89		1824,13 \pm 703,62		1679,75 \pm 630,41	
	DN-Thymozyten	6	WT	0,9375 (ns)	2325,8 \pm 1227,8	0,0368 (#)	2089,33 \pm 698,92	0,0974 (ns)	2161,67 \pm 920,52	0,1575 (ns)
		6	KO		2538,8 \pm 1788,8		2080,83 \pm 979,59		2120,83 \pm 955,02	
	T-Zellen	6	WT	0,7736 (ns)	1592,5 \pm 497,09	0,0003 (###)	1926,33 \pm 651,28	0,0300 (#)	1915,33 \pm 606,65	0,2455 (ns)
		6	KO		1762,83 \pm 711,3		2165,17 \pm 942,14		2363 \pm 898,03	
p-Stat5	Thymozyten	8	WT	0,9271 (ns)	299,625 \pm 97,37	0,9729 (ns)	302,13 \pm 97,07	0,7430 (ns)	296,88 \pm 53,39	0,5540 (ns)
		8	KO		310,5 \pm 102,7		296,63 \pm 74,24		281,5 \pm 56,14	
	DN-Thymozyten	6	WT	0,7325 (ns)	227,83 \pm 100,98	0,9929 (ns)	215,67 \pm 82,20	0,9299 (ns)	217,5 \pm 77,97	0,9635 (ns)
		6	KO		212,5 \pm 78,11		205,17 \pm 73,80		210,17 \pm 70,45	
	T-Zellen	6	WT	0,3549 (ns)	267,67 \pm 19,01	0,7365 (ns)	251,33 \pm 39,41	0,7650 (ns)	287,33 \pm 47,69	0,7650 (ns)
		6	KO		258,5 \pm 25,83		279,83 \pm 42,77		255,83 \pm 34,5	

p-Jak1	Thymozyten	8	WT	0,9185 (ns)	1217,5 ± 423,06	0,9695 (ns)	1247 ± 441,52	0,9652 (ns)	1187,63 ± 586,61	0,0619 (ns)
		8	KO		1259 ± 522,84		1252,25 ± 529,13		1114,38 ± 366,06	
	DN- Thymozyten	6	WT	0,1795 (ns)	582 ± 105,37	0,9632 (ns)	562,17 ± 104,98	0,9933 (ns)	456,5 ± 74,85	0,3087 (ns)
		6	KO		476,177 ± 88,42		544,33 ± 121,05		486 ± 79,74	
	T-Zellen	6	WT	0,4351 (ns)	1173,83 ± 238,93	0,9715 (ns)	1101,5 ± 324,00	0,1266 (ns)	1132,33 ± 280,52	0,2767 (ns)
		6	KO		1484,83 ± 778,55		1125 ± 201,06		1120,83 ± 269,46	
p-Jak3	Thymozyten	8	WT	0,9802 (ns)	1228,38 ± 434,42	0,9999 (ns)	1216 ± 357,19	0,6591 (ns)	1160 ± 313,58	0,8132 (ns)
		8	KO		1126,5 ± 355,48		1235,38 ± 424,95		1281,75 ± 533,45	
	DN- Thymozyten	6	WT	0,2863 (ns)	706,67 ± 105,49	0,9897 (ns)	811,17 ± 243,39	0,8058 (ns)	727,5 ± 142,45	0,9901 (ns)
		6	KO		697,5 ± 149,91		700,33 ± 167,14		670,83 ± 115,58	
	T-Zellen	6	WT	0,8245 (ns)	980,67 ± 151,65	0,6791 (ns)	995 ± 154,03	0,7891 (ns)	1006 ± 213,68	>0,9999 (ns)
		6	KO		937,67 ± 121,51		1145,67 ± 215,69		1012 ± 108,70	

Tabelle 19: Analyse des IL-7R-Signalwegs nach TZR-Stimulation

Ergebnisse der Expression von Stat5, p-Stat5, p-Jak1 und p-Jak3 in SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-Thymozyten, DN-Thymozyten und T-Zellen nach TZR-Stimulation (s. Abb. 10, Abb. 11, Abb. 14, Abb. 15). Es sind die Mittelwerte der Fluoreszenzintensität durch den Geometric Mean \pm SD dargestellt. Die Statistische Analyse erfolgte mittels Two-Way ANOVA. Einzelne Vergleiche sind auf die nicht-stimulierte Kontrollgruppe bezogen. Signifikanzen zwischen SLy1^{KO} und SLy1^{WT} sind gekennzeichnet mit *p<0,05, **p<0,01. Signifikanzen zwischen verschiedenen Zeitpunkten sind gekennzeichnet mit #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001, ####p<0,0001, ns = nicht signifikant.

Protein	Zellgruppe	Anzahl (n)	SLy1	p-Wert (Signifikanz) SLy1 ^{KO/WT}	TZR-Stimulation (bezogen auf Kontrollgruppe)					
					15 min (Mean \pm SD)	p-Wert (Signifikanz)	2 h (Mean \pm SD)	p-Wert (Signifikanz)	6 h (Mean \pm SD)	p-Wert (Signifikanz)
Stat5	Thymozyten	8	WT	0,7458 (ns)	2303,38 \pm 1083,85	0,0177 (#)	1933,50 \pm 761,35	0,2030 (ns)	1681,75 \pm 543,46	0,9527 (ns)
		8	KO		1995,13 \pm 931,79		2058,75 \pm 863,24		1680,00 \pm 637,66	
	DN-Thymozyten	6	WT	0,8309 (ns)	3374,00 \pm 1936,05	0,4278 (ns)	2141,17 \pm 912,62	0,1443 (ns)	2134,67 \pm 695,99	0,1163 (ns)
		6	KO		3067,33 \pm 2472,53		2226,17 \pm 994,55		2049,67 \pm 873,38	
	T-Zellen	6	WT	0,9058 (ns)	3015,50 \pm 1116,67	0,0323 (#)	4533,67 \pm 1982,6	0,0036 (##)	5517,83 \pm 2125,19	0,0002 (###)
		6	KO		3091,17 \pm 1129,01		4234,83 \pm 2292,2		5659,50 \pm 2584,08	
p-Stat5	Thymozyten	8	WT	0,8148 (ns)	312,00 \pm 109,13	0,7331 (ns)	305,375 \pm 75,33	>0,9999 (ns)	331,125 \pm 144,21	0,9846 (ns)
		8	KO		341,25 \pm 110,51		316,25 \pm 80,55		307,25 \pm 67,98	
	DN-Thymozyten	6	WT	0,8827 (ns)	218,50 \pm 99,03	0,9931 (ns)	200,00 \pm 69,13	0,7509 (ns)	226,17 \pm 109,35	0,9997 (ns)
		6	KO		220,83 \pm 92,95		203,00 \pm 67,18		224,67 \pm 116,91	
	T-Zellen	6	WT	0,3777 (ns)	287,8333 \pm 38,11	0,9696 (ns)	287,50 \pm 31,10	0,9573 (ns)	264,33 \pm 32,76	0,8112 (ns)
		6	KO		290,00 \pm 45,17		277,50 \pm 30,02		274,33 \pm 23,17	

p-Jak1	Thymozyten	8	WT	0,9721 (ns)	1273,25 ± 483,3	0,9479 (ns)	1063,38 ± 334,16	0,8294 (ns)	1228 ± 573,19	0,5576 (ns)
		8	KO		1177,875 ± 343,84		1327 ± 600,06		1160,375 ± 400,28	
	DN- Thymozyten	6	WT	0,7032 (ns)	551,1767 ± 213,15	>0,9999 (ns)	525,33 ± 41,27	0,9238 (ns)	534,83 ± 129,65	0,6605 (ns)
		6	KO		531,33 ± 145,43		643 ± 260,73		492,67 ± 73,92	
	T-Zellen	6	WT	0,5402 (ns)	1561,17 ± 925,30	0,7488 (ns)	1040,33 ± 212,89	0,6937 (ns)	1152,67 ± 253,41	0,7496 (ns)
		6	KO		1544,83 ± 956,68		1347 ± 412,83		1267,5 ± 530,65	
p-Jak3	Thymozyten	8	WT	0,9620 (ns)	1112,875 ± 323,06	0,7695 (ns)	1274,5 ± 454,61	0,7740 (ns)	1153,875 ± 320,63	0,9921 (ns)
		8	KO		1175,75 ± 394,21		1174,38 ± 287,51		1175,375 ± 345,41	
	DN- Thymozyten	6	WT	0,4169 (ns)	763,33 ± 73,60	0,7668 (ns)	715 ± 156,70	0,9928 (ns)	679,17 ± 136,95	0,6101 (ns)
		6	KO		711,1767 ± 78,45		726,33 ± 146,86		653,17 ± 102,32	
	T-Zellen	6	WT	0,4977 (ns)	960,67 ± 196,29	0,9827 (ns)	997,17 ± 229,40	0,7600 (ns)	991,17 ± 177,82	0,9999 (ns)
		6	KO		1021,67 ± 142,19		1193,83 ± 319,57		1028,83 ± 192,56	

Tabelle 20: Analyse der Apoptose nach IL-7R-Stimulation

Ergebnisse der Auswertung des Anteils lebender, apoptotischer und toter SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-Zellen von Thymozyten, DN-Thymozyten und T-Zellen nach IL-7R-Stimulation (s. Abb. 19, Abb. 20, Abb. 21). Es sind die Mittelwerte der Fluoreszenzintensität durch den Geometric Mean \pm SD dargestellt. Die Statistische Analyse erfolgte mittels Two-Way ANOVA. Einzelne Vergleiche sind auf die nicht-stimulierte Kontrollgruppe bezogen. Signifikanzen zwischen SLy1^{KO} und SLy1^{WT} sind gekennzeichnet mit *p<0,05, **p<0,01. Signifikanzen zwischen verschiedenen Zeitpunkten sind gekennzeichnet mit #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001, ####p<0,0001, ns = nicht signifikant.

Zellgruppe	Anteil d. Zellen	Anzahl (n)	SLy1	p-Wert (Signifikanz) SLy1 ^{KO/WT}	IL-7R-Stimulation (bezogen auf Kontrollgruppe)					
					15 min (Mean \pm SD)	p-Wert (Signifikanz)	2 h (Mean \pm SD)	p-Wert (Signifikanz)	6 h (Mean \pm SD)	p-Wert (Signifikanz)
Thymozyten	lebend	8	WT	0,8225	88,96 \pm 3,69	0,8225	87,24 \pm 2,40	0,5653	87,59 \pm 2,71	0,8255
		8	KO	(ns)	88,89 \pm 4,90	(ns)	87,41 \pm 2,28	(ns)	87,925 \pm 2,99	(ns)
	apoptotisch	8	WT	0,8606	5,345 \pm 1,73	0,9995	7,015 \pm 1,98	0,1361	4,78 \pm 0,69	0,6483
		8	KO	(ns)	5,06 \pm 3,01	(ns)	6,46 \pm 2,01	(ns)	4,37 \pm 1,01	(ns)
	tot	8	WT	0,7069	4,49 \pm 2,22	0,9453	4,55 \pm 1,41	0,9478	6,43 \pm 2,86	0,1275
		8	KO	(ns)	4,72 \pm 1,76	(ns)	4,88 \pm 1,62	(ns)	6,46 \pm 2,71	(ns)
DN-Thymozyten	lebend	6	WT	0,1741	88,53 \pm 3,14	0,1033	71,92 \pm 10,61	0,0089	69,95 \pm 8,709	0,0076
		6	KO	(ns)	87,8 \pm 3,17	(ns)	77,8 \pm 6,35	(##)	77,67 \pm 4,522	(##)
	apoptotisch	6	WT	0,0498	3,93 \pm 1,73	0,2172	13,76 \pm 5,69	0,0003	11,045 \pm 2,20	0,0025
		6	KO	(*)	2,98 \pm 0,65	(ns)	9,45 \pm 3,50	(###)	6,80 \pm 1,26	(##)
	tot	6	WT	0,9111	5,94 \pm 1,71	0,6992	11,31 \pm 3,74	0,2126	16,265 \pm 8,24	0,0539
		6	KO	(ns)	7,717 \pm 2,86	(ns)	10,48 \pm 3,48	(ns)	13,21 \pm 4,38	(ns)
T-Zellen	lebend	6	WT	0,0035	82,77 \pm 2,72	0,9332	84,73 \pm 0,68	0,0007	87,15 \pm 2,45	<0,0001
		6	KO	(**)	78,9 \pm 1,62	(ns)	81,27 \pm 2,31	(###)	85,5 \pm 1,19	(####)
	apoptotisch	6	WT	0,0436	5,56 \pm 1,18	0,1647	3,005 \pm 0,86	0,0002	2,21 \pm 0,77	<0,0001
		6	KO	(*)	7,25 \pm 0,60	(ns)	3,93 \pm 0,90	(###)	2,52 \pm 0,71	(####)
	tot	6	WT	0,0007	10,28 \pm 1,43	0,3992	10,82 \pm 0,49	0,9980	9,42 \pm 1,81	0,0129
		6	KO	(***)	12,23 \pm 1,06	(ns)	13,15 \pm 1,42	(ns)	10,68 \pm 0,84	(#)

Tabelle 21: Analyse der Apoptose nach TZR-Stimulation

Ergebnisse der Auswertung des Anteils lebender, apoptotischer und toter SLy1^{WT}- und SLy1^{KO}-Zellen von Thymozyten, DN-Thymozyten und T-Zellen nach TZR-Stimulation (s. Abb. 19, Abb. 20, Abb. 21). Es sind die Mittelwerte der Fluoreszenzintensität durch den Geometric Mean \pm SD dargestellt. Die Statistische Analyse erfolgte mittels Two-Way ANOVA. Einzelne Vergleiche sind auf die nicht-stimulierte Kontrollgruppe bezogen. Signifikanzen zwischen SLy1^{KO} und SLy1^{WT} sind gekennzeichnet mit *p<0,05, **p<0,01. Signifikanzen zwischen verschiedenen Zeitpunkten sind gekennzeichnet mit #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001, ####p<0,0001, ns = nicht signifikant.

Zellgruppe	Anteil d. Zellen	Anzahl (n)	SLy1	p-Wert (Signifikanz) SLy1 ^{KO/WT}	TZR-Stimulation (bezogen auf Kontrollgruppe)					
					15 min (Mean \pm SD)	p-Wert (Signifikanz)	2 h (Mean \pm SD)	p-Wert (Signifikanz)	6 h (Mean \pm SD)	p-Wert (Signifikanz)
Thymozyten	lebend	8	WT	0,8192	87,84 \pm 7,33	0,2088	85,713 \pm 2,56	0,1970	84,5 \pm 1,85	0,0377
		8	KO	(ns)	87,90 \pm 4,65	(ns)	85,19 \pm 4,62	(ns)	86,06 \pm 2,72	(#)
	apoptotisch	8	WT	0,7129	6,23 \pm 3,72	0,3453	7,87 \pm 1,99	0,0454	8,29 \pm 1,22	0,0058
		8	KO	(ns)	5,93 \pm 2,98	(ns)	7,56 \pm 2,56	(#)	6,81 \pm 1,99	(##)
	tot	8	WT	0,3548	4,52 \pm 3,23	0,3730	4,92 \pm 1,85	0,7044	5,88 \pm 2,08	0,2015
		8	KO	(ns)	5,433 \pm 1,63	(ns)	5,613 \pm 2,78	(ns)	5,76 \pm 1,74	(ns)
DN-Thymozyten	lebend	6	WT	0,2418	84,42 \pm 4,38	0,6242	69,52 \pm 11,88	0,0037	58,7 \pm 10,46	<0,0001
		6	KO	(ns)	80,62 \pm 12,72	(ns)	77,02 \pm 3,49	(##)	66,92 \pm 3,30	(####)
	apoptotisch	6	WT	0,0530	5,97 \pm 2,73	0,5830	15,425 \pm 6,25	0,0007	18,13 \pm 3,41	<0,0001
		6	KO	(ns)	6,41 \pm 5,43	(ns)	9,10 \pm 2,49	(###)	13,58 \pm 1,90	(####)
	tot	6	WT	0,7424	7,27 \pm 2,09	0,8567	11,56 \pm 5,28	0,1784	18,77 \pm 7,61	0,0042
		6	KO	(ns)	10,75 \pm 6,97	(ns)	10,74 \pm 4,33	(ns)	16,32 \pm 4,11	(##)
T-Zellen	lebend	6	WT	0,0582	77,82 \pm 2,17	0,0009	75,02 \pm 3,54	<0,0001	71,6 \pm 3,90	<0,0001
		6	KO	(ns)	75,83 \pm 2,04	(###)	72,12 \pm 3,39	(####)	70,92 \pm 1,64	(####)
	apoptotisch	6	WT	0,4005	9,21 \pm 1,08	<0,0001	11,45 \pm 1,82	<0,0001	14,35 \pm 1,49	<0,0001
		6	KO	(ns)	9,98 \pm 1,46	(####)	11,8 \pm 1,45	(####)	14,15 \pm 1,63	(####)
	tot	6	WT	0,0080	10,27 \pm 1,02	0,1681	9,895 \pm 1,99	0,5082	9,65 \pm 2,54	0,0804
		6	KO	(**)	11,47 \pm 0,98	(ns)	12,32 \pm 1,65	(ns)	10,96 \pm 1,03	(ns)

8 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Pharmakogenomik - Abteilung für Pharmakologie, Experimentelle Therapie und Toxikologie unter Betreuung von Prof. Dr. Sandra Beer-Hammer durchgeführt. Die Konzeption der Studien erfolgte durch Prof. Dr. Sandra Beer-Hammer.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Claudia Müller, Renate Riehle und Jennifer Jaufmann von mir eigenständig durchgeführt. Die Lysate der Thymozyten, die in der Notch-Proteinexpressionsanalyse verwendet wurden, wurden freundlicherweise von Barbara Schneider zur Verfügung gestellt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, 27.11.2024

Helen Kümmerle

9 Veröffentlichungen

9.1 Posterpräsentation

Helen Kümmerle, Isabel Kloos, Lena-Christin Gruber, Daniel Schäll and Sandra Beer-Hammer: *The molecular role of SLy1 in thymocyte development*. 10.10.-15.10.2021, Autumn School (DGfI), Merseburg, Deutschland.

9.2 Publikation in Vorbereitung

Christin Nothnagel, Lisa Rebmann, Barbara Schneider, Lena-Christin Gruber, **Helen Kümmerle**, Daniel Schäll, Isabel Kloos, Bernhard Reis, Veronika Leiss and Sandra Beer-Hammer: *“SLy1 regulates thymocyte development via control of IL-7R expression.”*

10 Danksagung

Hiermit bedanke ich mich bei all jenen, die zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Sandra Beer-Hammer für die Bereitstellung des Themas und die hervorragende Betreuung und aufmerksame Unterstützung zu jedem Zeitpunkt bedanken.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Dr. Bernd Nürnberg für die Möglichkeit am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Pharmakogenomik promoviert haben zu dürfen.

Weiter möchte ich mich beim Interdisziplinären Promotionskolleg Medizin (IZKF) für die fachliche und finanzielle Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit bedanken.

Ein ganz herzliches Dankeschön geht an alle Mitarbeitenden des Instituts für die Hilfsbereitschaft und die freundliche Zusammenarbeit. Vielen herzlichen Dank vor allem an Claudia Müller und Renate Riehle für die technische Unterstützung.

Ein besonderer Dank auch für die Zusammenarbeit, Unterstützung und den Austausch mit den anderen Doktorandinnen und Doktoranden, vor allem an Jennifer Jaufmann, Victoria Eiperle, Barbara Schneider und Tessa Stefan.

Zuletzt möchte ich mich auch bei meiner Familie und besonders meiner Mutter für die Unterstützung während der Arbeit an dieser Dissertation bedanken.