

# **Die Rolle von TGIF1 in der peripheren T-Zellaktivierung und Differenzierung**

## **Dissertation**

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

vorgelegt von

**Diplom-Biologin Melanie Krüger**

aus Berlin

durchgeführt am  
DRFZ

(Deutsches Rheuma-Forschungszentrum Berlin)

eingereicht im  
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin



Berlin, den 20.03.2012

Diese Arbeit wurde vom 15.07.2008 bis zum 20.03.2012 am Deutschen Rheuma-Forschungszentrum in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Ria Baumgrass angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel
2. Gutachter: PD Dr. habil. Ria Baumgrass

Disputation: 05.06.2012

## Zusammenfassung

Regulatorische T-Zellen (Treg-Zellen), die den Transkriptionsfaktor Foxp3 (*Forkehead protein P3*) exprimieren sind maßgeblich für die Aufrechterhaltung der peripheren Immuntoleranz verantwortlich. Für die Induktion der Treg-Zellen in der Peripherie ist die Stimulation des TGF- $\beta$ -Signalweges zusammen mit einer suboptimalen T-Zell-Rezeptor (TCR)-Stimulation essentiell. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob und wie der transkriptionelle Repressor des TGF- $\beta$ -Signalweges TGIF1 (*TGF- $\beta$  interacting factor*) die Induktion von peripheren Treg-Zellen beeinflusst.

Es konnte gezeigt werden, dass TGIF1 in T-Zellen exprimiert wird und seine Expressionshöhe von der TCR-Stimulationsstärke, nicht aber vom TGF- $\beta$ -Signalweg abhängig ist. Mit Hilfe von TGIF1-KO-Mäusen wurde nachgewiesen, dass die Expressionshöhe von TGIF1 in T-Zellen einen entscheidenden Einfluss auf die Induktion von peripheren Treg-Zellen hat. Eine geringe oder fehlende Expression von TGIF1 fördert die *in vitro* Differenzierung von naiven T-Zellen zu Treg-Zellen. Im Gegensatz dazu ist die Differenzierung von TGIF1-KO-Zellen zu IFN- $\gamma$ -produzierenden Th1-Zellen im Vergleich zu WT-T-Zellen eingeschränkt. Zur Identifizierung der molekularen Wirkmechanismen von TGIF1 wurden ChIP (Chromatin Immunopräzipitation) -Sequenzierungen sowie globale Genexpressionanalysen durchgeführt. Dabei konnten verschiedene Zielgene von TGIF1, wie z. B. die Transkriptionsfaktoren Foxp3, KLF10, T-bet, STAT3 und Foxo3 sowie die Rezeptoren IL12R, und TGF- $\beta$ RI identifiziert werden. Die Bindung und Wirkung von TGIF1 auf die Gene *foxp3* und *klf10* konnten bereits verifiziert werden.

Damit erweist sich TGIF1 nicht nur als Repressor der Induktion peripherer Treg-Zellen, sondern auch als Aktivator der IFN- $\gamma$  Produktion in differenzierten Th1-Zellen. Weitere *in vivo* Experimente sollen zeigen, ob die Hemmung dieser beiden Effekte durch die Inhibierung von TGIF1 einen geeigneten therapeutischen Ansatz zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen und Allergien bietet.

## Abstract

Regulatory T-cells (Tregs-cells), which are characterized by expression of the transcription factor Foxp3 (Forkehead protein P3), are pivotal for the maintenance of peripheral immunotolerance. The induction of Treg cells from naïve T cells in the periphery critically depends on sub-optimal T-cell receptor (TCR) stimulation and TGF- $\beta$  signaling. In this study the significance of TGIF1, a transcriptional repressor of TGF- $\beta$  signaling, for the peripheral induction of Treg cells was investigated.

It was shown that TGIF1 is expressed in T cells and that TGIF1 expression levels are dependent on TCR stimulation strength, but independent of TGF- $\beta$  stimulation. By using T cells isolated from TGIF-KO-mice it was demonstrated that expression levels of TGIF1 have a significant impact on the induction of peripheral Treg cells. Little or missing expression of TGIF1 protein correlate with an increased induction of Foxp3<sup>+</sup>Tregs cells from naive T-cells *in vitro*. To identify the molecular mechanisms of TGIF1 action ChIP (Chromatin Immunoprecipitation)-sequencing and microarray analysis have been carried out. In this context different target genes of TGIF1 were identified, such as the transcription factors Foxp3, KLF10, T-bet, STAT3 and Foxo3 but also receptors such as IL-12R and TGF- $\beta$ RI. In fact, binding of TGIF1 to *foxp3* and *klf10* genes as well as its impact on transcription of these genes could already be verified. Apart from effects on Treg induction, a major role of TGIF1 signaling for the differentiation of Th1 effector cells was revealed. It was shown that stimulation of TGIF1-KO-T cells under Th1 polarising conditions results in a significant reduction of IFN- $\gamma$ -producing cells in comparison to WT-T-cells.

Taken together, the results of this work demonstrate that TGIF1 does not only act as a repressor of peripheral Treg cell induction but also as an activator of IFN- $\gamma$  production in Th1-cells. Future experiments will clarify whether inhibition of TGIF1-dependent effects on T cell differentiation has potential for the therapy of autoimmune diseases and allergies.

## **Inhaltsverzeichnis**

### **Zusammenfassung**

### **Abstract**

<b>1 Einleitung</b>	<b>- 1 -</b>
<b>1.1 Das Immunsystem</b>	<b>- 1 -</b>
<b>1.2 Die Immunantwort</b> .....	<b>- 1 -</b>
1.2.1 Angeborene Immunantwort.....	- 1 -
1.2.2 Adaptive Immunantwort .....	- 2 -
<b>1.3 Toleranz</b> .....	<b>- 4 -</b>
1.3.1 Zentrale Toleranz .....	- 4 -
1.3.2 Periphere Toleranz .....	- 5 -
<b>1.4 Aktivierung von T-Zellen</b> .....	<b>- 6 -</b>
1.4.1 T-Zell-Rezeptor Signalkaskade.....	- 6 -
1.4.2 Der Co-Stimulator CD28 .....	- 8 -
1.4.3 Unphysiologische Stimulation von T-Zellen mit PMA und Ionomycin .....	- 9 -
1.4.4 TGF- $\beta$ Signalweg .....	- 9 -
<b>1.5. Differenzierung von T-Helferzellen in der Peripherie</b> .....	<b>- 11 -</b>
1.5.1 Th1-Zellen.....	- 13 -
1.5.2 Th2-Zellen.....	- 14 -
1.5.3 Th17-Zellen.....	- 15 -
1.5.4 Treg-Zellen.....	- 16 -
<b>1.6. Regulation der Foxp3 Expression</b> .....	<b>- 17 -</b>
<b>1.7 Regulation der T-Zelldifferenzierung</b> .....	<b>- 19 -</b>
<b>1.8 TGIF1</b> .....	<b>- 19 -</b>
<b>1.9 Zielstellung</b> .....	<b>- 21 -</b>
<b>2 Ergebnisse</b>	<b>- 22 -</b>
<b>2.1 Die Expression von TGIF1 ist TCR abhängig</b> .....	<b>- 22 -</b>
<b>2.2 Die TGIF1-Expression ist von der Stärke der TCR-Stimulation abhängig und         wird durch CsA beeinflusst</b> .....	<b>- 23 -</b>
<b>2.3 TGIF1 wird posttranslational modifiziert</b> .....	<b>- 25 -</b>
<b>2.4 Die TGIF1 Transkriptvariante 1 wird stimulationsabhängig exprimiert</b> .....	<b>- 27 -</b>
<b>2.5 Adenoviral vermittelte Überexpression von TGIF1-GFP in naiven T-Zellen         begünstigt die Entstehung von Th1-Zellen <i>in vitro</i></b> .....	<b>- 29 -</b>

2.5.1 Adenoviral vermittelte Transduktion von naiven T-Zellen ist sehr effizient .....	- 29 -
2.5.2 Überexpression von TGIF1 wirkt sich positiv auf die Produktion von IFN- $\gamma$ aus.....	- 30 -
2.5.3 TGIF1 beeinflusst nicht die Menge von T-bet und IFN- $\gamma$ pro Zelle .....	- 32 -
<b>2.6 Immunologische Charakterisierung der TGIF1-/- Mäuse .....</b>	<b>- 33 -</b>
2.6.1 TGIF1 defiziente Mäuse haben normale T- und B-Zellzahlen .....	- 34 -
2.6.2 Ein TGIF1 Defizit begünstigt <i>in vitro</i> die Induktion von Foxp3+ Zellen .....	- 35 -
2.6.3 TGIF1 spielt eine Rolle in der IFN- $\gamma$ Produktion <i>in vitro</i> .....	- 37 -
2.6.4 TGIF1 zeigt keinen Einfluss auf die T-Zellproliferation aber auf das Apoptoseverhalten von iTreg-Zellen.....	- 38 -
<b>2.7 Molekulare Wirkungsmechanismen von TGIF1.....</b>	<b>- 39 -</b>
2.7.1 TGIF1 bindet im <i>foxp3</i> und im <i>klf10</i> Gen .....	- 40 -
2.7.2 <i>Tbx21</i> und <i>stat3</i> sind direkte Zielgene von TGIF1 .....	- 43 -
2.7.3 Differenziell exprimierte Gene in T-Zellen von <i>tgif1</i> -/- und <i>tgif1</i> +/+ Mäusen .....	- 46 -
2.7.4 Validierung von differenziell exprimierten Genen zeigt den Einfluss von TGIF1 auf die Expression von Genen der Immunantwort .....	- 49 -
<b>2.8 Wirkung eines TGIF1 Defizits auf die Zelltransfer-induzierte Colitis .....</b>	<b>- 51 -</b>
2.8.1 Zelltransfer von naiven <i>tgif1</i> -/- T-Zellen löst schwächere Entzündungsreaktionen aus als der Transfer von Wt T-Zellen.....	- 51 -
2.8.2 Ein TGIF1 Defizit verändert die <i>in vivo</i> Expansion der T-Zellen nicht.....	- 52 -
2.8.3 TGIF1 fördert die Foxp3 und ROR $\gamma$ t Expression und hemmt die Expression von T-bet <i>in vivo</i> .....	- 53 -
2.8.4 TGIF1 spielt eine Rolle in der IFN- $\gamma$ Produktion.....	- 55 -
<b>3 Diskussion .....</b>	<b>- 57 -</b>
<b>3.1 Das Adenoviral-vermittelte System als Alternative zur retroviralen Transduktion von primären T-Zellen .....</b>	<b>- 57 -</b>
<b>3.2 TGIF1 ist ein Regulator der T-Zelldifferenzierung.....</b>	<b>- 58 -</b>
3.2.1 Die Expression von TGIF ist abhängig von Stärke und Dauer des T-Zell-Stimulus .....	- 58 -
3.2.2 TGIF1 wirkt als Repressor in naiven T-Zellen .....	- 60 -
3.2.3 TGIF1 ist ein Repressor für die Foxp3-Expression.....	- 62 -
3.2.4 TGIF1 reguliert die Foxp3 Expression auf transkriptioneller Ebene .....	- 64 -
3.2.7 TGIF1 ein Aktivator der IFN- $\gamma$ -Produktion in T-Zellen .....	- 68 -
3.2.8 Das TGIF1 Defizit wirkt sich positiv auf die ROR $\gamma$ t Induktion im Colitis-Modell aus .....	- 70 -
3.2.9 Die Rolle von TGF- $\beta$ in der Th-Zelldifferenzierung.....	- 72 -
3.2.10 TGIF1 ist ein Bindeglied zwischen TCR- und TGF- $\beta$ -Signalweg .....	- 74 -
<b>3.3 Schlussfolgerung .....</b>	<b>- 75 -</b>
<b>3.4 Ausblick .....</b>	<b>- 76 -</b>

<b>4 Material und Methoden</b>	<b>- 77 -</b>
<b>4.1 Material</b> .....	<b>- 77 -</b>
4.1.1 Chemikalien .....	- 77 -
4.1.2 Antikörper für den Westernblotnachweis.....	- 77 -
4.1.3. Oligonukleotide.....	- 78 -
4.1.4 Lösungen, Puffer und Medien.....	- 79 -
4.1.5 Geräte .....	- 79 -
<b>4.2 Molekularbiologische Arbeiten</b> .....	<b>- 80 -</b>
4.2.1 DNA-Aufreinigung .....	- 80 -
4.2.2. Chromatin Immunopräzipitation (ChIP) .....	- 80 -
4.2.2.1 Fixierung .....	- 81 -
4.2.2.2 Scherung der DNA.....	- 81 -
4.2.2.3 IP .....	- 81 -
4.2.2.4 DNA-Aufreinigung .....	- 82 -
4.2.3. ChIP-Sequenzierung.....	- 83 -
4.2.4 RNA-Aufreinigung.....	- 84 -
4.2.5. cDNA-Synthese.....	- 84 -
4.2.6 Realtime-PCR (qRT-PCR).....	- 84 -
4.2.7. Microarrays .....	- 85 -
4.2.8 SDS-Polyacrylgelelektrophorese .....	- 86 -
4.2.9 Westernblot .....	- 87 -
4.2.10 Genotypisierung der TGIF-KO-Mäuse .....	- 88 -
4.2.11 DNA-Pull Down Assay.....	- 88 -
4.2.12 Luziferase-Assay .....	- 89 -
4.2.13 5`-RACE .....	- 89 -
<b>4.3 Zellkultur</b> .....	<b>- 89 -</b>
4.3.1 Zelllinien .....	- 90 -
4.3.2 Isolation von Lymphozyten und Milzzellen.....	- 90 -
4.3.3 Sortierung von T-Zellen.....	- 90 -
4.3.4 Gewinnung von murinen CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> T-Zellen durch Magnetische Zellsortierung.....	- 91 -
4.3.5 Gewinnung von murinen CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T-Zellen durch Magnetische Zellsortierung.....	- 92 -
4.3.6 Gewinnung von murinen CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> CD45RB <sup>high</sup> T-Zellen durch FACS .....	- 92 -
4.3.7 Gewinnung von murinen CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD45RB <sup>low</sup> T-Zellen durch FACS .....	- 93 -
4.3.8 Kultivierungsbedingungen für Primärzellen .....	- 93 -
4.3.9 Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer Zählkammer .....	- 93 -
4.3.10 CFSE-Färbung.....	- 94 -
4.3.11 <i>in vitro</i> Differenzierungskulturen.....	- 94 -

4.3.12 siRNA Behandlung von primären Zellen.....	- 95 -
<b>4.4 Durchflusszytometrie.....</b>	<b>- 95 -</b>
4.4.1 Färbung von Oberflächenmarkern .....	- 96 -
4.4.2 intrazelluläre Färbung .....	- 96 -
4.4.2.1 intrazelluläre Färbung der Transkriptionsfaktoren.....	- 97 -
4.4.2.2 intrazelluläre Färbung der Cytokine.....	- 97 -
4.4.3 DAPI-Färbung.....	- 97 -
<b>4.5. Adenovirale Überexpression .....</b>	<b>- 97 -</b>
4.5.1 Klonierung.....	- 98 -
4.5.2 Virenproduktion .....	- 98 -
4.5.3 Transduktion primärer muriner T-Zellen .....	- 99 -
<b>4.6 Knockdown von TGIF1 mit shRNA.....</b>	<b>- 99 -</b>
<b>4.7 Verwendete Mausstämmе .....</b>	<b>- 100 -</b>
<b>4.8 Haltungsbedingungen der Mäuse .....</b>	<b>- 100 -</b>
<b>4.9 T-Zell Transfer induzierte Colitis .....</b>	<b>- 100 -</b>
<b>I Quellen</b>	<b>I</b>
<b>II Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>XI</b>
<b>III Publikationen</b>	<b>XIV</b>
<b>IV Danksagung</b>	<b>XV</b>
<b>V Lebenslauf</b>	<b>XVI</b>
<b>VI Eidestattliche Erklärung</b>	<b>XVII</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem bietet einen Schutz vor pathogenen, körperfremden Erregern und vor toxischen Substanzen. Es besteht aus Immunzellen (zelluläre Immunität), löslichen Serumbestandteilen (humorale Immunität) und aus lymphatischen Organen. Man unterscheidet zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem.

Zu den Immunzellen der angeborenen Immunität gehören die Granulozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen. Die Effektorzellen der adaptiven Immunität sind die B- und T-Zellen. Lösliche Bestandteile des Immunsystems sind zum Beispiel, die von B-Zellen produzierten Antikörper und Komplementfaktoren (lösliche Plasmaproteine). Zu den primären lymphatischen Organen gehören das Knochenmark und der Thymus. Sie sind Bildungs-, und Reifungsorte aller Immunzellen. Als sekundäre lymphatische Organe bezeichnet man die Milz, die Lymphknoten und die mit Schleimhäuten assoziierten lymphatischen Gewebe. In den sekundären lymphatischen Organen findet die Aktivierung von T-Zellen durch professionelle antigenpräsentierende Zellen (APCs) statt. Erkennen bei einer Infektion mit einem pathogenen Keim die Zellen des Immunsystems das Pathogen, kommt es zur Immunantwort (Murphy, 2009).

## 1.2 Die Immunantwort

Die ersten Immunzellen auf die der Erreger trifft, sind Makrophagen, Granulozyten und dendritische Zellen, die Teil des angeborenen Immunsystems sind. Sie scheiden Cytokine und Chemokine aus, die die Zellen in ihrer Umgebung beeinflussen und andere Zellen an den Ort der Infektion rekrutieren. Wird ein Pathogen von einer antigenpräsentierenden Zelle aufgenommen, präsentiert diese Fragmente davon, nach dem Transport in die lymphatischen Organen, den T-Zellen. Die Aktivierung der T-Zelle ist der Beginn der adaptiven, spezifischen Immunantwort (Murphy, 2009).

### 1.2.1 Angeborene Immunantwort

Die angeborene Immunantwort ist relativ unspezifisch und evolutionär gesehen älter, als die adaptive Immunantwort. Sie beginnt in den ersten Stunden nach der Infektion und dient der

Eindämmung des Erregers. Zu ihr gehören humorale Mechanismen wie antibakterielle und antivirale Substanzen (Komplementsystem, Interferone und Lysozyme) sowie zelluläre Mechanismen, die aus Fresszellen (Granulozyten, Makrophagen, Mastzellen) und natürlichen Killerzellen bestehen.

Die erste Hürde für das Pathogen bildet die Haut mit ihrem schwach sauren pH-Wert. Hat ein Erreger die Epithelbarriere überwunden, wird er meist sofort von Makrophagen erkannt, von ihnen durch Phagozytose aufgenommen und dadurch eine Entzündungsreaktion ausgelöst. Meist werden Strukturen erkannt, die vielen Krankheitserregern gemeinsam sind. Dies sind oft stark konservierte Merkmale, die man als Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP) bezeichnet. Die Familie der Toll-*like* Rezeptoren (TLR) erkennt diese Muster und führt zur Ausschüttung von entzündungsvermittelnden Stoffen, den Cytokinen. Weiterhin kommt es zur Anlockung weiterer Effektorzellen und dem Auslösen der adaptiven Immunantwort.

Die Mechanismen der angeborenen Immunität reichen allein nicht aus, um den Körper vor der sich ständig ändernden Umwelt zu schützen. Die adaptive (erworbene) Immunantwort bietet eine spezifische und selektive Erkennung und Bekämpfung von Krankheitserregern. Zusätzlich ermöglicht sie durch das immunologische Gedächtnis eine schnelle Bekämpfung von Pathogenen bei einer erneuten Infektion (Neumann, 2008).

### **1.2.2 Adaptive Immunantwort**

Das erworbene adaptive Immunsystem ist spezifischer, aber langsamer. Erst vier Tage nach Aktivierung der naiven T-Zelle ist die Proliferation abgeschlossen (klonale Expansion) und die Zellen sind fertig zu Effektorzellen differenziert (Murphy, 2009).

Auch das adaptive Immunsystem besteht aus einem humoralen Teil, den Antikörpern und Cytokinen und einem zellulären Teil, den B- und T-Zellen. Im Knochenmark entstehen aus Stammzellen lymphatische Vorläuferzellen. Die B-Zellen reifen im Knochenmark, nach Antigen-Kontakt differenzieren sie zu Antikörper sezernierenden Plasmazellen. Die T-Vorläuferzellen gelangen vom Knochenmark über das Blut in den Thymus, um dort zu reifen T-Zellen zu differenzieren.

Im Gegensatz zu den Zellen des angeborenen Immunsystems tragen die Zellen des adaptiven Immunsystems nur Antigenrezeptoren, die für ein einziges Epitop spezifisch sind. Die Vielfalt entsteht durch einen genetischen Mechanismus, der durch Rekombination einige Millionen

unterschiedlicher Antigenrezeptor-Spezifitäten entstehen lässt. Um zu verhindern, dass Zellen körpereigene Strukturen erkennen und bekämpfen, werden diese Zellen depletiert (s. 1.3).

B-Zellen exprimieren den B-Zellrezeptor (BCR) und T-Zellen den T-Zellrezeptor (TCR) auf ihrer Oberfläche. Alle T-Zellen exprimieren zusätzlich den CD3-Rezeptor auf ihrer Oberfläche, der zusammen mit dem TCR einen Komplex bildet. Man unterscheidet bei T-Zellen zwischen CD8-T-Zellen, die einen CD8-Co-Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren und CD4-T-Zellen, die den CD4-Co-Rezeptor tragen.

Die CD8-T-Zellen entwickeln sich nach Antigenkontakt zu cytotoxischen T-Zellen und töten ihre Zielzellen. Sie dienen in erster Linie der Zerstörung von Zellen, die mit Viren oder anderen intrazellulären Pathogenen befallen sind. Sie haben im Gegensatz zu den T-Zellen einen einheitlich cytotoxischen Phänotyp.

Bei den CD4-positiven T-Zellen unterscheidet man zwischen Th1-, Th2-, Th17- und regulatorischen T-(Treg) Zellen. Einige CD4-T-Zellen haben eine Rolle bei der Aktivierung der Antikörperproduktion von B-Zellen (Th2-Zellen), der Aktivierung von Makrophagen (Th1-Zellen), Bekämpfung von Parasiten (Th1- u. Th2-Zellen, Auslösen von Entzündungsreaktionen (Th17-Zellen) und natürlich auch der Regulation der Immunantwort (Treg-Zellen). Man nennt sie daher auch T-Helfer-Zellen (Neumann). Treg-Zellen unterdrücken die Aktivität der anderen Lymphozyten und sind so ein wichtiger Regulator für die Kontrolle der Immunantwort. Treg-Zellen sind Teil der peripheren Toleranz.

APCs präsentieren den T-Zellen über MHC-Molekülen (Haupthistokompatibilitätskomplex) die Antigen-Peptide auf ihrer Oberfläche. T-Zellen erkennen diese Strukturen über den TCR (Neumann). Wird bei der Infektion ein Lymphozyt durch ein spezifisches Antigen aktiviert, beginnt er zu proliferieren (klonale Expansion). Auf diese Weise entstehen genügend Effektorzellen für die Bekämpfung des Erregers. Nach der erfolgreichen Bekämpfung des Erregers bleibt ein Teil der aktivierten B- und T-Zellen als immunologisches Gedächtnis erhalten. Diese Zellen ermöglichen eine schnelle Erkennung und Bekämpfung im Fall einer erneuten Infektion (Murphy, 2009).

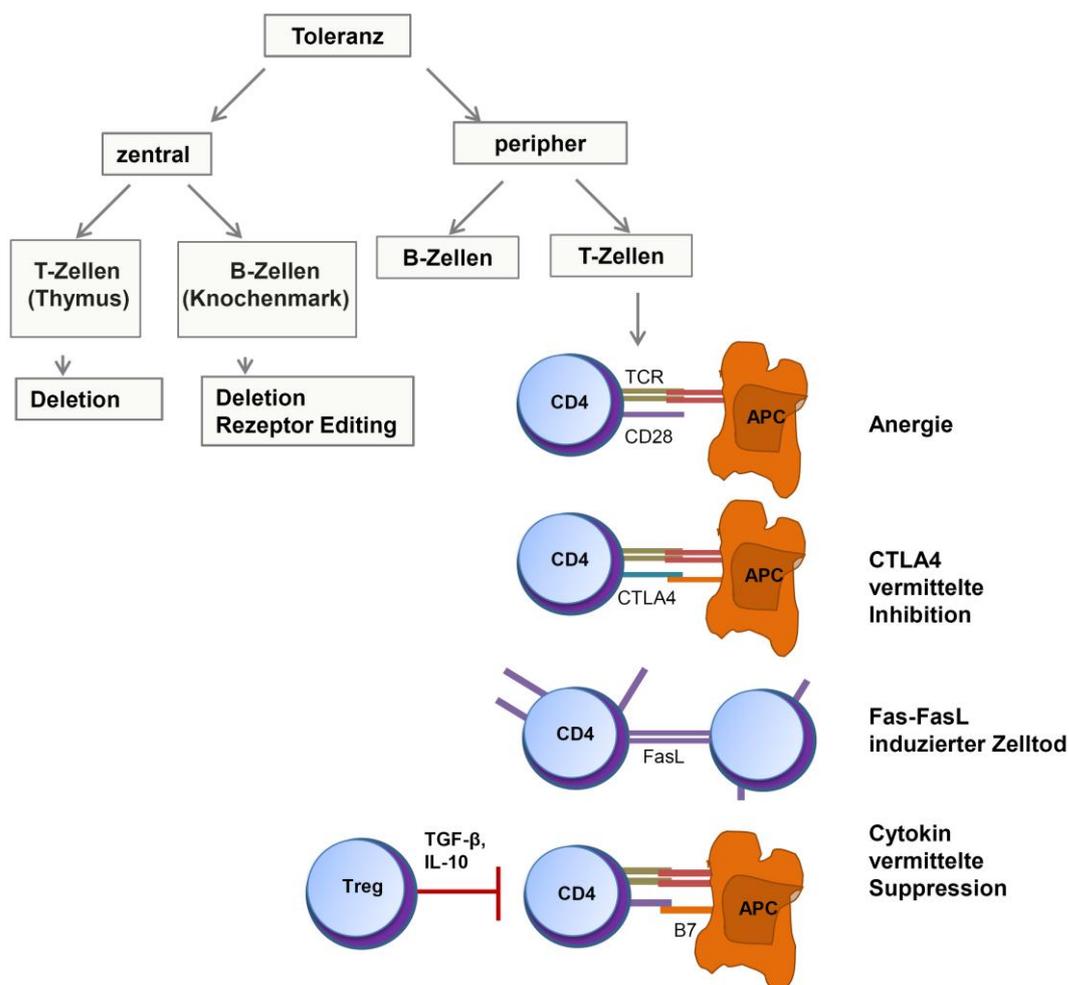
Diese Arbeit konzentriert auf die CD4-T-Zellen, speziell auf ihre Aktivierung und Differenzierung in der Peripherie.

## 1.3 Toleranz

Um die Immunantwort gegen körpereigene Strukturen (Autoimmunkrankheiten) und harmlose Antigene (Allergie) zu verhindern, besitzt der Körper verschiedene Kontrollmechanismen, die man als Toleranz bezeichnet. Man unterscheidet zwischen zentraler und peripherer Toleranz.

### 1.3.1 Zentrale Toleranz

Die zentrale Toleranz findet im Fall der B-Zellen im Knochenmark und bei den T-Zellen im Thymus statt, wohingegen die periphere Toleranz z.B. in den sekundären lymphatischen Organen oder in der Haut stattfindet (s. Abb. 1-1).



**Abb. 1-1: Toleranzmechanismen des Immunsystems.** Schematische Darstellung der Mechanismen der zentralen und peripheren Toleranz (vereinfacht).

Die aus dem Knochenmark in den Thymus gewanderten T-Vorläuferzellen werden als doppelt negative Thymozyten bezeichnet, da sie negativ für CD4 und CD8 sind. Während der Proliferation kommt es zu somatischen Rekombinationen bei der Generierung des TCRs. Im Thymus reifen T-Zellen aus T-Vorläuferzellen. Hier werden Zellen ausgesondert, die körpereigene Peptide erkennen (Murphy, 2009).

Mit der Expression von CD4 und CD8 gehen die Zellen in die positive Selektion ein und werden als doppelt positiv bezeichnet. Zellen, die mit ihrem T-Zellrezeptor ein MHC-I oder ein MHC-II Molekül binden können, überleben. Die Zellen, die MHC-I binden, stellen die CD4 Expression ein und die, die MHC-II binden, stellen die Expression von CD8 ein und treten damit in das einfach positive Stadium ein. Bindet eine T-Zelle ihr MHC Molekül in Verbindung mit einem Selbstpeptid, so bekommt sie das Signal zum Sterben (Negativselektion). Auf diesem Weg kann die Entstehung von Autoimmunkrankheiten verhindert werden. Die Negativselektion ist der letzte Schritt der T-Zellentwicklung im Thymus. Dieser Mechanismus wird auch als zentrale Toleranz bezeichnet.

Reife T-Zellen besitzen einen TCR, der potentiell ein antigenes Peptid in Verbindung mit MHC-I bzw. MHC-II erkennt. Sie verlassen als naive T-Zellen (noch kein Antigenkontakt) den Thymus und zirkulieren durch Blut und Lymphe zwischen den sekundären lymphatischen Organen (Neumann, 2008).

### **1.3.2 Periphere Toleranz**

Zu der peripheren Toleranz zählen verschiedene Mechanismen, die einer Immunantwort entgegen wirken. Zu ihnen gehört die Anergie, der Fas-vermittelte Zelltod und die Cytokin-vermittelte Suppression (s. Abb. 1-1).

Bei Aktivierung der T-Zelle über den TCR ohne Co-Stimulus (CD-28) werden T-Zellen anerg und können nicht mehr aktiviert werden. Die Immunantwort anergischer Zellen ist auf diese Art durch die fehlende Reaktion auf das Antigen abgeschaltet. Ein weiterer Toleranz-Mechanismus benötigt die Expression von CTLA4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*) einem Co-Rezeptor, der kompetitiv zu CD28 wirkt und das TCR-Signal abschwächt. Er ist z.B. auf naiven T-Zellen und verstärkt auf der Oberfläche von Treg-Zellen exprimiert. Ein weiterer Toleranzmechanismus wird über Fas vermittelt und greift bei langer Stimulationszeit der T-Zellen. Mit der TCR-Aktivierung beginnen T-Zellen FasL (CD95L) auf ihrer Oberfläche zu exprimieren. Durch die klonale Expansion sind T-Zellen einige Zeit nach der TCR-Aktivierung vor der Fas-vermittelten Apoptose geschützt, werden sie jedoch über lange Zeit

aktiviert, gehen sie durch Fas-FasL Bindung in den aktivierungsbedingten Zelltod (AICD). Dieser Prozess ist nötig um autoreaktive Zellen sowie eine überschießende Immunantwort abzuschalten.

Eine bestimmte Gruppe von T-Zellen ist in der Lage Immunreaktionen durch Ausschüttung von Cytokinen (TGF- $\beta$ , IL-10) oder direktem Zell-Kontakt zu supprimieren und so die Entstehung von Autoimmunkrankheiten zu verhindern. Man bezeichnet sie als Treg-Zellen. Die Ausschüttung von TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ) hemmt die Proliferation von B- und T-Zellen, wohingegen IL-10, Makrophagen und die Th-1 Differenzierung hemmt (Neumann, 2008).

Eine Art von Treg-Zellen zeichnet sich durch den Oberflächen-Marker CD25 (IL2-Rezeptor alpha) auf ihrer Zelloberfläche aus und exprimiert den Transkriptionsfaktor Foxp3 (*forkhead box P3*). Bei den CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg-Zellen unterscheidet man zwischen natürlichen Treg-Zellen (nTreg-Zellen), die im Thymus entstehen und den induzierten Treg-Zellen (iTreg Zellen), die durch suboptimale Aktivierungsbedingungen zusammen mit TGF- $\beta$  in der Peripherie entstehen können.

## 1.4 Aktivierung von T-Zellen

Naive T-Zellen zirkulieren im Blut und sitzen in den Lymphknoten sowie in der Milz. Naiv bezeichnet man Zellen, die noch keinen Antigenkontakt hatten. Sind sie nach der Aktivierung voll ausdifferenziert, werden sie als Effektor-T-Zellen bezeichnet (Neumann, 2008). Die Aktivierung der naiven T-Zellen erfolgt über professionelle antigenpräsentierende Zellen, den APCs. Der erste Schritt ist hierbei die Bindung des TCR-Rezeptors der T-Zelle an den MHC-II/Peptid-Komplex auf der Oberfläche der APCs. Der auf T-Zellen exprimierte TCR liegt als Heterodimer vor und bildet zusammen mit CD3 einen T-Zellrezeptor Komplex (s. Abb. 1-2). Gleichzeitig gibt es ein Co-stimulatorisches Signal, welches auf T-Zellseite durch die Familie der CD28-Rezeptoren und auf dendritischer Seite durch die Mitglieder der B7-Familie vermittelt wird.

### 1.4.1 T-Zell-Rezeptor Signalkaskade

Die Aktivierung einer T-Zelle erfolgt über die Antigenerkennung des TCR/MHC-II/Peptid-Komplexes. Das entsprechende Antigen-Peptid wird der Zelle von einer APC über ihr MHC-Klasse-II Molekül präsentiert. Die Bindung des Antigens bewirkt eine Phosphorylierung der



DAG aktiviert die Proteinkinase C (Serin/Threonin-Kinase) und das Protein RasGRP. Dieses führt durch Aktivierung von Ras zur Signalweiterleitung an die MAP-Kinase-Kaskade, die aus drei hintereinander geschalteten MAP-Kinasen besteht. Die letzte Kinase wird als Erk (*extracellular signal-related kinase*) bezeichnet. Der Ras-MAP-Kinase-Signalweg endet in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors c-FOS, der zusammen mit dem konstitutiv vorhandenen c-JUN den wichtigen Regulator AP-1 (*adaptor-related protein complex 1*) bildet (s. Abb. 1-2).

IP<sub>3</sub> erhöht die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Cytosol durch Öffnung der Calciumkanäle. Ca<sup>2+</sup> bindet an Calmodulin und bewirkt eine Konformationsänderung von Calmodulin. Der Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin-Komplex bindet und aktiviert die Serin/Threonin-Phosphatase Calcineurin, die NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) durch Dephosphorylierung aktiviert. NFAT kann nun in den Kern translozieren und die Transkription seiner Zielgene induzieren. Der Calcineurininhibitor Cyclosporin A (CsA) ist ein wichtiges therapeutisches Mittel und wird zum Beispiel als Immunsuppressivum bei Transplantationen eingesetzt.

Ein dritter Signalweg, der durch PLC- $\gamma$  angeschaltet wird, verläuft über die Aktivierung von PKC- $\theta$ . Sie phosphoryliert das Gerüstprotein CARMA1 (*caspase recruitment domain family, member 11*). CARMA1 bildet mit Bcl10 (*B-cell CLL/lymphoma 10*) und MALT1 (*mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1*) einen Proteinkomplex, der in der Lage ist die I $\kappa$ B-Kinase (IKK) zu aktivieren. Dieser induziert den Abbau von I $\kappa$ B (Inhibitor von  $\kappa$ B). I $\kappa$ B hält NF $\kappa$ B im Cytosol in einem inaktiven Zustand. Durch die Freisetzung von I $\kappa$ B kann NF $\kappa$ B (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1*) in den Kern translozieren und dort an seine Zielgene binden (s. Abb. 1-2). NF $\kappa$ B liegt im Cytosol als inaktives Dimer meist aus p50 und p65 vor.

AP-1, NFAT und NF $\kappa$ B binden an den IL-2 Promoter und stimulieren so die Expression des Cytokins Interleukin-2 (IL-2), welches die T-Zelldifferenzierung zu Effektorzellen und deren Proliferation fördert (Murphy, 2009). Die Stärke des TCR-Stimulus spielt eine entscheidende Rolle für den Differenzierungsweg, den eine naive T-Zelle einschlägt. Ein starker Stimulus begünstigt eine Th1 Antwort, wohingegen ein schwacher Stimulus die Th2 Antwort fördert (Zhu and Paul, 2008).

### 1.4.2 Der Co-Stimulator CD28

Die Aktivierung des TCR allein reicht nicht aus, um eine naive T-Zelle zu aktivieren. Es gibt mehrere Co-stimulierende Rezeptoren. Als Beispiel dient hier das gut charakterisierte Ober-

flächenmolekül CD28, das auf der Oberfläche von naiven T-Zellen exprimiert ist. Es bindet die Co-stimulierenden Liganden B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), die von APCs exprimiert werden. Bei einer Ligandenbindung wird die PI-3-Kinase (PI3K) mobilisiert. Die Signalweiterleitung erfolgt über PDK, welche die Proteinkinase Akt aktiviert, die das Überleben der Zelle ermöglicht. Zusätzlich verstärkt ein aktiviertes CD28-Molekül auch das TCR-Signal (s. Abb. 1-2). CD28 hat vielseitige Aufgaben. So stabilisiert es mRNAs, amplifiziert die Aktivierung von NFAT und NF $\kappa$ B, fördert die Cytokinproduktion, das Überlebenssignal und die Proliferation von T-Zellen (Rudd et al., 2009).

### 1.4.3 Unphysiologische Stimulation von T-Zellen mit PMA und Ionomycin

Die Behandlung von T-Zellen mit PMA (*Phorbol Myristate Acetate*) führt zu einer Aktivierung von PKC $\zeta$ . Eine zusätzliche Gabe von Ionomycin (iono) bewirkt einen massiven Calciumeinstrom (s. Abb. 1-2). Eine Stimulation von T-Zellen mit PMA/iono bewirkt eine sehr viel stärkere und gleichzeitigere Stimulation, als die über den TCR und wird in *in vitro* Experimenten genutzt, um z.B. die Cytokinproduktion von kultivierten Zellen anzuregen. Der Vorteil dieser Stimulation ist durch die nahezu synchrone Aktivierung der Zellen gegeben. Diese Art der Stimulation bietet eine Möglichkeit die T-Zellaktivierung zu simulieren.

### 1.4.4 TGF- $\beta$ Signalweg

Für die Aktivierung von naiven T-Zellen ist neben dem TCR-Stimulus und den Co-stimulatorischen Signalen auch noch das Cytokinmilieu, das zu dem Zeitpunkt der Stimulation herrscht, entscheidend. So ist z.B. das Vorhandensein von TGF- $\beta$  essentiell für die Differenzierung von iTreg-Zellen und Th17-Zellen (Murphy, 2009).

Zu der Superfamilie der TGF- $\beta$ -Proteine gehören die *Bone morphogenetic proteins* (BMPs), *Growth and differentiation factors* (GDFs), *Anti-müllerian hormone* (AMH), Activin, Nodal und die TGF $\beta$ 's (*transforming growth factors*). In Säugern sind die drei Isoformen *tgf- $\beta$ 1*, *tgf- $\beta$ 2* und *tgf- $\beta$ 3* bekannt, die von unterschiedlichen Genen kodiert werden. Im Immunsystem wird hauptsächlich TGF- $\beta$ 1 exprimiert (Govinden and Bhoola, 2003). Nachfolgend wird TGF- $\beta$ 1 nur noch als TGF- $\beta$  bezeichnet.

Die Synthese von TGF- $\beta$  erfolgt zunächst als Prepro-TGF- $\beta$  Vorläufer, wobei das Pro-Peptid im Golgi-Apparat entfernt wird während das Pre-TGF- $\beta$  ein Signalmolekül enthält (Nunes et al., 1995). TGF- $\beta$  wird als Homodimer zusammen mit LAP (*latency-associated protein*) als

latentes TGF- $\beta$  (SLC=*small latent Complex*) sekretiert. Eine weitere Möglichkeit der Sekretion ist durch die zusätzliche Bindung von LTBP (*latent-TGF- $\beta$ -binding protein*) als LLC (*large latent Complex*) möglich. Dieser Komplex bringt TGF- $\beta$  zur extrazellulären Matrix, wo das TGF- $\beta$ -Homodimer sich von dem Komplex löst und an den TGF- $\beta$ -RII bindet. *In vitro* kann dies durch einen extremem pH-Wert, Hitze und andere Prozesse simuliert werden (Annes et al., 2003).

TGF- $\beta$ -Rezeptoren sind membranständige Serin/Threonin-Kinasen, wobei der TGF- $\beta$ -RII konstitutiv aktiv ist. Aktives TGF- $\beta$ 1 bindet an den TGF- $\beta$ -RII-Komplex. Die Ligand-Bindung bringt den TGF- $\beta$ -RII in räumliche Nähe von TGF- $\beta$ -RI und aktiviert diesen durch Phosphorylierung der Kinase-Domäne. Der aktivierte TGF- $\beta$ -RI gibt das Signal durch Phosphorylierung von Smad-Proteinen (*MAD homologs*) weiter (s. Abb. 1-3).

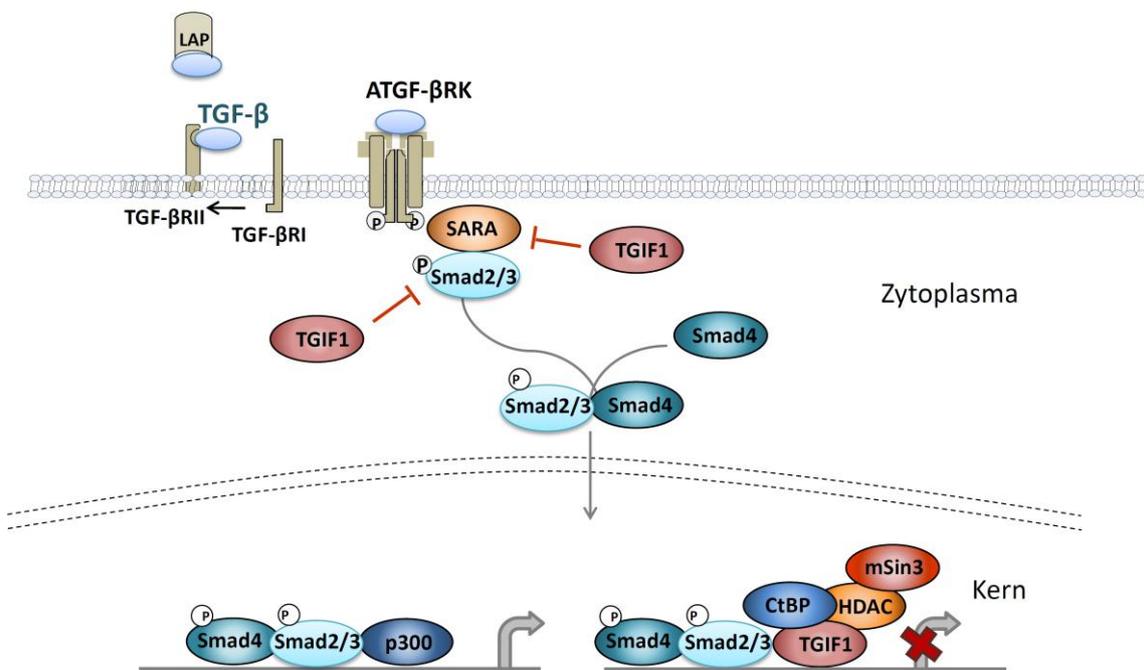


Abb. 1-3: TGF- $\beta$ -abhängiger Smad-Signalweg.

Smad-Proteine werden in drei Klassen unterteilt: die Rezeptorassoziierten R-Smads (Smad1, 2, 3, 5 und 8), der gewöhnliche Co-Regulator (Smad4) und die antagonistischen und inhibitorischen Smads (Smad6 und 7) (Shi and Massague, 2003). Smad2 und 3 werden durch das Anker-Protein SARA (*SAR1 gene homolog A*) in Rezeptornähe gehalten. Die Phosphorylierung von Smad bewirkt eine Dissoziation von SARA und eine erhöhte Affinität für die Bindung von SMAD4. Der Smad2/3-Smad4 Komplex ist in der Lage in den Kern zu translozieren und

dort die Transkription von TGF- $\beta$ -abhängigen Genen zu aktivieren. Der Smad-Komplex allein hat eine geringe DNA-Bindeaffinität, daher ist die Assoziation mit anderen Transkriptionsfaktoren wichtig (Kang et al., 2003). Zusätzlich werden Co-Aktivatoren wie Histon-Acetyl-Transferasen (HATs), p300 oder Co-Repressoren wie c-Ski/SnoN und Histon-Deacetylasen (HDAC) rekrutiert (Massague and Wotton, 2000). Es konnte gezeigt werden (Abb. 1-3), dass TGIF1 als Co-Repressor an Smads binden kann und als Folge HDACs, Sin3 und CtBP zu den Genen rekrutiert und so die Expression dieser Gene verhindert (Wotton et al., 1999b.).

Das Cytokin TGF- $\beta$  besitzt eine wichtige regulatorische Rolle in der Erhaltung der Toleranz. So reguliert TGF- $\beta$  während der Immunantwort z.B. die Chemotaxis, die Aktivierung und das Überleben von Lymphozyten, NK-Zellen, DCs, Makrophagen, Mastzellen und Granulozyten. TGF- $\beta$  ist in der Lage die Immuntoleranz zu kontrollieren ohne die Immunantwort auf Pathogene zu stören. Ein Mechanismus von TGF- $\beta$  in der Immuntoleranz ist der dosisabhängige antiproliferatorische Effekt auf Effektor-T-Zellen (Kehrl et al., 1986). Es konnte gezeigt werden, dass TGF- $\beta$  die IL-2 Produktion hemmt, die wichtig für die Proliferation der Zellen ist. TGF- $\beta$  kann aber auch die T-Zellproliferation fördern. So wird in der Gegenwart des Co-Stimulus CD28 durch TGF- $\beta$  die T-Zellapoptose gehemmt und die Proliferation gefördert (Sung et al., 2003).

TGF- $\beta$  beeinflusst zudem die Differenzierung von T-Zellen. So wird z.B. die Induktion von iTreg-Zellen in der Peripherie durch TGF- $\beta$  und IL-2 vermittelt. Bei einer Kombination von IL-6 und TGF- $\beta$  dagegen wird die Differenzierung von Th17-Zellen gefördert. Es ist zudem bekannt, dass TGF- $\beta$  die Th2-Differenzierung durch Hemmung der GATA3-Expression und die Th1-Differenzierung durch eine reduzierte Expression des IL-12R $\beta$ 2 und T-bet blockiert (Gorelik et al., 2002; Gorelik et al., 2000; Heath et al., 2000).

Die Rolle von TGF- $\beta$  in der Aufrechterhaltung der Immuntoleranz zu untersuchen, wurde erst interessant, als bekannt wurde, dass TGF- $\beta$ 1 in der Lage ist iTreg-Zellen zu induzieren. Der Mechanismus der Differenzierung und der Erhaltung von iTreg-Zellen ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt (Li et al., 2006). Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Aufklärung der von TGF- $\beta$  vermittelten iTreg-Induktion in der Peripherie.

## 1.5. Differenzierung von T-Helferzellen in der Peripherie

Nach der Aktivierung der TCR- und Cytokin-vermittelten Signalwege können naive T-Zellen in der Peripherie differenzieren. 1986 beschrieben Mosmann und Coffman zwei Subpopulati-

onen (Th1-, Th2-Zellen) von aktivierten Th-Zelltypen, die sich in ihrer Cytokinexpression und ihrer Funktion unterscheiden (Mosmann et al., 1986).

Erst 2005 wurde eine dritte Klasse von Th-Zellen entdeckt, die sich komplett von den bis dahin bekannten Th1-Zellen und Th2-Zellen unterscheidet und durch die Produktion von IL-17 gekennzeichnet ist, die Th17-Zellen (Harrington et al., 2005; Park et al., 2005a). 1995 beschrieb Sakaguchi den IL-2-Rezeptor (CD25) als Oberflächenmarker für regulatorische T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg-Zellen).

Im Jahr 2000 wurde von Breitfeld eine weitere T-Zellpopulation beschrieben, die während der T-Zellabhängigen Immunantwort die Follikel betritt. Er nannte sie folliculäre B-Helfer-T-Zellen (Tfh) (Breitfeld et al., 2000). Viele weitere T-Zellsubpopulationen werden derzeit charakterisiert wie z.B. die Th9-Zellen. Diese Arbeit beschränkt sich bei den Untersuchungen auf die vier Hauptpopulationen Th1-, Th2-, Th17-, und Treg-Zellen. Die verschiedenen Subpopulationen unterscheiden sich durch ihre unterschiedlichen Aufgaben in der Immunantwort und tragen unterschiedliche Oberflächenmarker auf ihrer Oberfläche (s. Abb. 1-4).

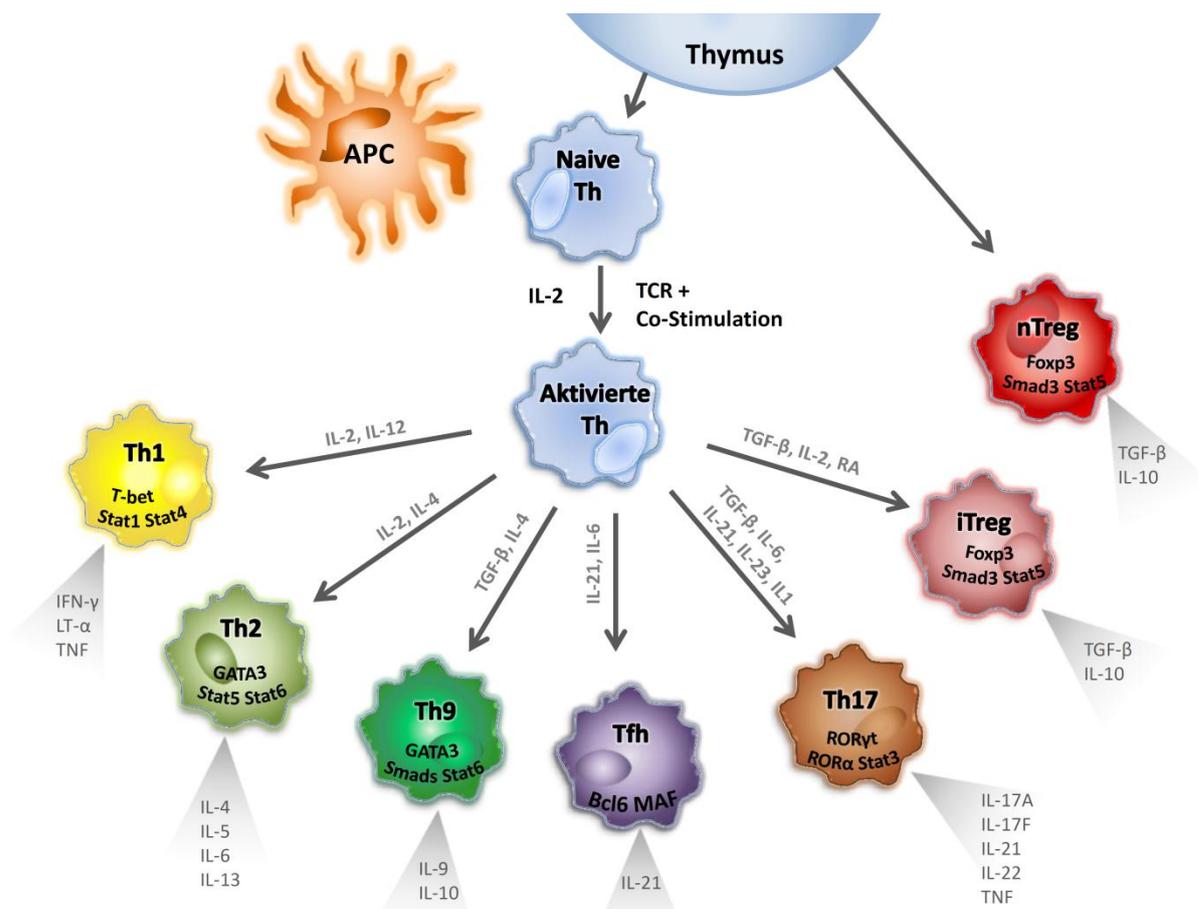


Abb. 1-4: Th-Zelldifferenzierung in der Peripherie.

Eine wichtige Entscheidung über den Differenzierungsweg der naiven T-Zelle wird über das, zum Zeitpunkt der TCR-Stimulierung, herrschende Cytokinmilieu getroffen. Die Affinität des erkannten Antigens sowie die zugänglichen Co-Stimuli spielen ebenfalls eine wichtige Rolle. Die Aktivierung, Differenzierung und Expansion der Th-Zellen werden durch die Aktivität und die relative Expression der charakteristischen Mastertranskriptionsfaktoren reguliert (Zhu and Paul, 2008). Im Folgenden wird nur auf Th1-, Th2-, Th17- und regulatorische T-Zellen eingegangen.

### 1.5.1 Th1-Zellen

Th1-Zellen helfen bei der Bekämpfung von intrazellulären Bakterien und Viren. Sie zeichnen sich durch die Sekretion von IFN- $\gamma$  aus. Dieses aktiviert Makrophagen, die die infizierten Zellen vernichten. Außerdem stimulieren Th1-Zellen den Ig-Klassenwechsel von B-Zellen. Bei Defekten in der Th1-Antwort kommt es zu Organ-spezifischen Autoimmunkrankheiten.

Die Differenzierung zu Th1-Zellen aus naiven T-Zellen wird durch einen starken TCR-Stimulus begünstigt und benötigt Interleukin 2 (IL-2), Interleukin 12 (IL-12) und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (s. Abb. 1-4). Die initiale Polarisierungsrichtung wird vorgegeben, wenn IFN- $\gamma$  über den Janus Kinasen (JAKs)-Signalweg und den IFN- $\gamma$  Rezeptor STAT1 aktiviert wird und somit die Expression des Mastertranskriptionsfaktors T-bet bewirkt. T-bet aktiviert die Expression von IFN- $\gamma$  und der  $\beta$ 2 Kette des IL-12-Rezeptor (IL-12R $\beta$ 2) durch direkte Bindung an deren Promoter. Zu einem späteren Zeitpunkt in der Abwesenheit vom TCR-Stimulus ist die T-bet Expression abhängig vom IL-12-STAT4-Signalweg (Afkarian et al., 2002; Mullen et al., 2001; Shi et al., 2008).

T-bet defiziente Mäuse entwickeln spontan Lungeneosinophilie, bronchiale Überempfindlichkeit und einen erhöhten Atemwegswiderstand (Finotto et al., 2002). In früheren Studien konnte zudem gezeigt werden, dass T-bet eine Rolle in allergischem Asthma bei Kindern spielt (Munthe-Kaas et al., 2008). Daher ist das Verständnis der Regulation von T-bet von großer Bedeutung in der Immunologie.

Eine Studie von 2009 zeigt, dass der Transkriptionsfaktor EGR1 durch direkte Bindung die Expression von *tbx21* (kodiert für T-bet) induziert (Shin et al., 2009). 2011 konnte die Gruppe von Amy S. Weinmann zeigen, dass der Mastertranskriptionsfaktor T-bet *Socs1*, *Socs3* und *Tcf7* negativ reguliert. Außerdem fanden sie heraus, dass T-bet *Bcl-6* in der späten Th1-Phase zum *ifn- $\gamma$* -Lokus rekrutiert wird, und so eine zu hohe Expression von IFN- $\gamma$  verhindert. Hohe IFN- $\gamma$  Level sind ein Merkmal vieler Autoimmunkrankheiten (Oestreich et al., 2011). Es ist

zudem bekannt, dass T-bet auch mit einem geringem Level von Treg-Zellen, Th17 und Tfh Zellen exprimiert wird (Nurieva et al., 2008; Szabo et al., 2000).

T-bet kann nicht nur die Genexpression selbst direkt beeinflussen, sondern auch die epigenetische Umgebung von Genen verändern. So kommt es zu einer indirekten Regulation von T-bet durch die Rekrutierung von Methyltransferasen (Jmjd3 H3K27Demethylase, Set7/9 H3K4-Methyltransferase) an den *ifn- $\gamma$*  Lokus. Dadurch werden die Histonmodifikationen H3K27me3 und H3K4me2 entfernt und so ein neuer epigenetischen Status geschaffen (Lewis et al., 2007). T-bet ist auch in der Lage eine Umprogrammierung des Zellprogrammes durchzuführen. So kann T-bet in Th-2 Zellen die IFN- $\gamma$  Produktion induzieren und die Produktion von IL-4 hemmen (Szabo et al., 2000).

### 1.5.2 Th2-Zellen

Th2-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Bekämpfung von extrazellulären Pathogenen und Helminthen. Sie zeichnen sich durch die Produktion von IL-4 aus und helfen so den B-Zellen IgE zu produzieren (Kopf et al., 1993). Sie können auch eine Reihe anderer Cytokine sezernieren. So helfen sie durch die Produktion von IL-4 und IL-13 bei der alternativen Aktivierung von Makrophagen (Gordon, 2003), rekrutieren Eosinophile durch die Produktion von IL-5 (Coffman et al., 1989), aktivieren Mastzellen über IL-9 (Townsend et al., 2000) und haben eine Wirkung auf Epithelzellen über IL-9, IL-13 und Amphiregulin (Kuperman et al., 2002; Longphre et al., 1999; Zaiss et al., 2006).

Defekte in der Th2-Differenzierung führen oft zu Allergien und Asthma (Zhu and Paul, 2008). Die Gruppe von W.E. Paul konnte zur gleichen Zeit wie die Arbeitsgruppe von Swain zeigen, wie aus naiven Th-Zellen IL4-Produzenten entstehen können. Hierzu muss während der TCR-Stimulation ein gewisses Cytokinmilieu herrschen. Die Cytokine IL-4 und IL-2 sind essentiell für die Differenzierung von Th2-Zellen (Le Gros et al., 1990; Swain et al., 1990), (s. Abb. 1-4). Für die Differenzierung zu Th2-Zellen ist ein schwacher TCR-Stimulus wichtig, der zu einem stetigen Anstieg (über 24h) von GATA3 mRNA führt. Gleichzeitig wird IL-2 durch den TCR-Stimulus produziert und aktiviert STAT5. Diese beiden Ereignisse führen zu einer frühen Produktion von IL-4. IL-4 bindet an den IL-4 Rezeptor und aktiviert über diesen Signalweg den Transkriptionsfaktor STAT6, der wiederum die Expression von IL-4 und GATA3 kontrolliert (Ansel et al., 2006). Über den IL-4R/STAT6 Signalweg wird GATA3 weiter hochreguliert und STAT5 aktiv gehalten. So entsteht ein positiver Feed-back-Loop der kontinuierlichen IL-4 Produktion und der Erhaltung des Th2-Phenotypes. GATA3 ist der Master-

transkriptionsfaktor der Th2-Zellen und bindet seinerseits an viele regulatorische Stellen im *il4*- Gen. Bei einer starken TCR-Stimulation wird die GATA3 Expression durch Erk inhibiert (Paul, 2010). Es gibt eine Studie, die zeigt, dass NFκB (p50) ebenfalls wichtig für die GATA3 Expression ist (Gorelik et al., 2002). Allerdings ist der genaue Mechanismus noch nicht aufgeklärt.

### 1.5.3 Th17-Zellen

Th17-Zellen zeichnen sich durch die Produktion von IL-17 aus. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Immunantwort und bei der Entstehung von Autoimmunkrankheiten. IL-17 ist wichtig für die Abwehr von extrazellulären Bakterien (z.B. *Klebsiella pneumoniae*) und Pilzen (z.B. *Mycobacterium tuberculosis*) (Stockinger and Veldhoen, 2007). Die Th17-Zellen können eine Reihe von Cytokinen produzieren, z.B. IL-17A, IL-17F; TNF, IL-21, IL-22. Einige von ihnen können auch IFN-γ oder IL-10 produzieren (O'Shea et al., 2009).

Die Differenzierung zu Th17-Zellen wird vorrangig durch IL-6 und TGF-β bestimmt (Mangan et al., 2006; Veldhoen et al., 2006), (s. Abb. 1-4). Th17-Zellen können selbst kein IL-6 produzieren (Kolls and Linden, 2004). IL-6 wird in großen Mengen von APCs ausgeschüttet. Ein weiteres Cytokin IL-23 ist wichtig für das Auswachsen schon differenzierter Th17-Zellen und bei der Erhaltung der Effektorfunktion (Aggarwal et al., 2003). Es konnte schon gezeigt werden, dass IL-23 defiziente Mäuse geschützt vor EAE und Collagen-induzierter Arthritis sind (Langrish et al., 2005) und keine IL-17 positiven Zellen besitzen. EAE (*Experimental autoimmune encephalomyelitis*) ist ein Mausmodell für MS (Multiple Sklerose). IL-23 wird außerdem eine Rolle bei Darmerkrankungen zugeschrieben (Hue et al., 2006; Kullberg et al., 2006). Der Mastertranskriptionsfaktor von Th17-Zellen ist RORγt (Ivanov et al., 2006). RORγt gehört zu der Familie der Kern-Hormon-Rezeptoren. RORγt wird für die stabile Expression von IL-17 von Th17-Zellen in der intestinalen Lamina Propria und der *in vitro* Differenzierung von naiven T-Zellen zu Th17-Zellen benötigt (Ivanov et al., 2006). Ein Mitglied der STAT-Familie spielt in der transkriptionellen Regulierung von Th-17 eine entscheidende Rolle. So konnte gezeigt werden, dass STAT3 direkt an den Promoter von *il-17* und *il-21* und bindet und dessen Expression reguliert (Chen et al., 2006; Wei et al., 2007). STAT3 selbst wird von IL-6, IL-21 und IL-23 aktiviert.

Ein negativer Regulator in der Th17-Differenzierung ist IL-2 (Laurence et al., 2007). IL-2 inhibiert die Th17-Differenzierung über den STAT5-Signalweg. In Abwesenheit von IL-6

wirkt auch TGF- $\beta$  hemmend auf die Th17-Entwicklung. Tritt IL-2 zusammen mit TGF- $\beta$  auf fördert es die Entwicklung von iTreg-Zellen (Davidson et al., 2007).

### 1.5.4 Treg-Zellen

Die in der Peripherie befindenden regulatorische T-Zellen sind eine heterogene Gruppe. Ein Teil von ihnen entwickelt sich im Thymus und zeichnet sich durch die Expression von IL-12R $\alpha$  (CD25) aus. Im Thymus gereifte CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen (nTreg-Zellen) machen 5 – 10 % der T-Zellen in der Peripherie in Mensch und Maus aus. Sie spielen eine essentielle Rolle in der Regulation der Immunantwort und der Verhinderung von Autoimmunkrankheiten (Sakaguchi et al., 2006). Sie exprimieren dauerhaft den Transkriptionsfaktor Foxp3, der wichtig für die Immun-Homöostase und die Selbst-Toleranz ist.

Die T<sub>H</sub>3-Zellen und die T<sub>R</sub>1-Zellen sind regulatorische T-Zellen die im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter betrachtet werden. Die weitere Gruppe von adaptiven Treg-Zellen, exprimiert Foxp3 und kann sich in der Peripherie mit Hilfe von TGF- $\beta$  aus naiven T-Zellen entwickeln. In der Peripherie entstandene Treg-Zellen nennt man auch iTreg-Zellen (induzierte Treg-Zellen). In der Peripherie wird die Entstehung von Treg-Zellen durch einen schwachen TCR-Stimulus oder durch die Kombination eines schwachen TCR-Stimulus und einer hohen TGF- $\beta$ -Konzentration begünstigt (Chen et al., 2003b). Zudem ist bekannt, dass Retinolsäure (RA) die TGF- $\beta$  vermittelte Treg Induktion verstärken kann (Mucida et al., 2009). RA ist außerdem unabhängig von Cytokinen in der Lage, die Induktion von Treg-Zellen aus naiven T-Zellen zu fördern (Nolting et al., 2009).

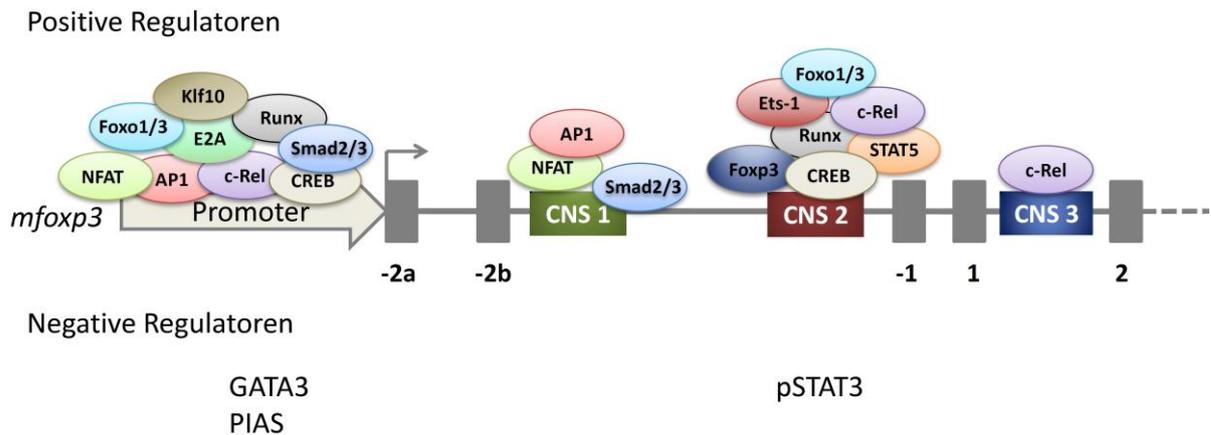
Foxp3 ist der Mastertranskriptionsfaktor für Foxp3<sup>+</sup> Treg-Zellen. Foxp3 defiziente Mäuse werden als *scurfy* Mäuse bezeichnet und zeigen wenige Wochen nach der Geburt einen massiven Ausbruch von polyendocrinen letalen Autoimmunkrankheiten, wie z.B. Typ-1 Diabetes, chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Lymphadenopathie, Splenomegalie, Hepatomegalie und massive Infiltration von Lymphozyten, die auf fehlende Treg Zellen zurückzuführen sind (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003). Beim Menschen ist das IPEX Syndrom (*immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome*) beschrieben, welches durch eine Mutation im *foxp3*-Gen entsteht (Bennett et al., 2001). Durch den T-Zelldefekt kommt es zu Lymphadenopathie, chronischer Diarrhoe, und Infektionen mit verschiedenen Viren und Bakterien. Weitere Symptome sind z.B. Diabetes, ekzematöse Dermatitis, Nageldystrophie oder Blasenbildung der Haut. Treg-Zellen spielen zudem eine wichtige Rolle in der Organ-Transplantations-Toleranz (Kang et al., 2007). Es gibt zudem wichtige Hinweise,

dass Treg-Zellen auch in der Tumorentwicklung eine Rolle spielen (Kosmaczewska et al., 2008). Dort haben sie allerdings eine negative Rolle, indem sie das Tumorwachstum durch die Hemmung der Immunantwort gegen den Tumor fördern. Es ist daher nicht verwunderlich, dass die Regulation der Foxp3 Expression von großem Interesse für die Forschung ist.

## 1.6. Regulation der Foxp3 Expression

Foxp3 stammt aus der Familie der Forkhead-Proteine und ist auf dem X-Chromosom lokalisiert. Foxp3 spielt eine entscheidende Rolle für die suppressive Aktivität von Treg-Zellen, die sie in Abwesenheit von Foxp3 verlieren (Williams and Rudensky, 2007). TGF- $\beta$  ist nötig für den Erhalt der Foxp3 Expression. Für die Entwicklung der Foxp3<sup>+</sup>Treg-Zellen (nTreg-Zellen) im Thymus ist TGF- $\beta$  nicht essentiell (Marie et al., 2005). Die Induktion von peripheren Foxp3<sup>+</sup>Treg-Zellen (iTreg-Zellen) aus naiven T-Zellen ist jedoch abhängig von TGF- $\beta$ . Die Gegenwart von TGF- $\beta$  in den ersten 12 h entscheidet über die Induktion von Foxp3 und die Treg-Zell-Differenzierung. Das Protein Foxp3 wird aber erst nach 48 h exprimiert (Wirnsberger et al., 2009). Was passiert in der Zwischenzeit? Man nimmt an, dass die Foxp3 Induktion in der Peripherie ein Zwei-Schritt-Prozess ist. Der erste Schritt ist TCR abhängig und der zweite Schritt wird durch RA verstärkt oder durch pro-inflammatorische Cytokine inhibiert (Lio and Hsieh, 2008). Die genaue Regulation von Foxp3 ist bis heute noch nicht verstanden. 2006 wurde erstmals durch Mantel der humane *foxp3*-Promoter charakterisiert. Der *foxp3*-Promoter ist hoch konserviert für Mensch, Maus und Ratte und enthält mehrere NFAT und AP1 Bindestellen (Mantel et al., 2006). Viele Transkriptionsfaktoren binden an den Promoter und haben so eine Funktion als Aktivator der Foxp3 Expression (s. Abb. 1-5). So wird Smad zum Promoter rekrutiert und bildet dort einen Komplex mit c-Rel, p65, NFAT, Runx und CREB (Ruan et al., 2009). Ein weiterer positiver Regulator ist KLF10 (=TIEG1). Es konnte gezeigt werden, dass die Monoubiquitinylierung von KLF10 durch die E3-Ligase Itch zur direkten Bindung an den *foxp3*- Promoter führt (Venuprasad et al., 2008). Für die Bindung von Foxo1, Foxo3 und E2A am Promoter konnte ebenfalls eine aktivierende Wirkung auf die Foxp3 Expression gezeigt werden (Kerdiles et al., 2010).

In naiven T-Zellen erhält die SUMO E3 Ligase PIAS den repressiven Chromatin-Status am *foxp3*-Promoter und rekrutiert DNA-Methyltransferasen an den Promoter (Liu et al., 2010), (s. Abb. 1-5). Es konnte zudem gezeigt werden, dass GATA3 an den Promoter binden kann und sich repressiv auf die Expression von Foxp3 auswirkt (Maruyama et al., 2010). GATA3 und PIAS wirken so als Repressoren der Foxp3 Expression.



**Abb. 1-5: Transkriptionelle Regulation des *foxp3*-Genes.** Ausschnitt der regulatorischen Regionen aus dem *mfoxp3*-Gen. CNS=Conserved Non-Coding -Region.

Für das *foxp3*-Gen sind außerdem drei wichtige konservierte nicht-codierende Enhancer-Regionen bekannt, sie als CNS1, CNS2 und CNS3 (*Conserved non-Coding-DNA -element*) bezeichnet. 2010 veröffentlichte die Gruppe von Rudensky eine Studie, in der die Funktionen der einzelnen Regionen durch Reportergermäuse untersucht wurden. Es wurden drei *foxp3*-GFP-Reportergermäuse hergestellt, in denen jeweils eines der CNS Elemente fehlte. Die CNS1-KO-Maus zeigte eine verringerte nTreg Zahl im Thymus. Die CNS1-Region scheint daher für die *de novo* Synthese von Foxp3 wichtig zu sein. Für die CNS3 Region wurde eine Rolle in der peripheren Induktion von Foxp3 beschrieben, wohingegen die CNS2 wichtig für die Stabilität der Foxp3 Expression zu sein scheint (Zheng et al., 2010).

Die CNS1 enthält ein TGF $\beta$ -Antwort-Element und Bindestellen für NFAT und Smad (Tone et al., 2008). Die Bindung der beiden Transkriptionsfaktoren ist absolut notwendig für die Histonacetylierung in diesem Bereich. In einer Studie von Xu wird vermutet, dass AP1 als positiver Regulator die Smad-Bindung an die CNS1 verstärkt (Xu et al., 2010); (s. Abb. 1-5).

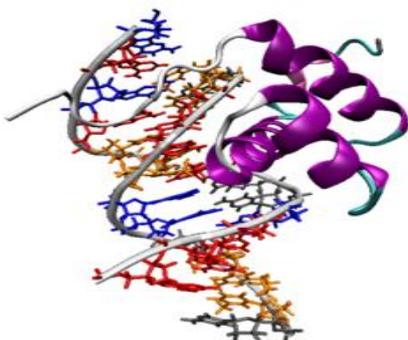
Die CNS2 wird auch als TSDR (*Treg-specific demethylated region*) bezeichnet und ist in Nicht-Treg-Zellen vollständig methyliert und in Treg-Zellen hypomethyliert. In iTreg-Zellen wird die Region nur teilweise demethyliert (Floess et al., 2007). Es konnte gezeigt werden, dass diese Region durch die Bindung eines Aktivorkomplexes (CREB-Runx-Komplex) kontrolliert wird (Bruno et al., 2009; Rudra et al., 2009). Weitere Aktivoren, die in dieser Region binden sind Foxp3 selbst, c-Rel (Kim et al., 2007), Ets-1 (*E26 avian leukemia oncogene 1, 5' domain*) und STAT5 (Long et al., 2009). pSTAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) ist der einzige bisher charakterisierte negative Regulator, der in CNS2 bindet (Xu et al., 2010); (s. Abb. 1-5). Es konnte gezeigt werden, dass c-Rel an den CNS3 Enhancer

bindet und die initiale Phase der Foxp3 Induktion koordiniert. Dies führt zur Öffnung und Re-Modellierung des *foxp3* Lokus (Zheng et al., 2010), (s. Abb. 1-5). Wie TGF- $\beta$  die Foxp3 Expression fördert wird intensiv untersucht. Der exakte Signalweg konnte noch nicht bestimmt werden.

## 1.7 Regulation der T-Zelldifferenzierung

An der Regulierung und am Fine-Tuning des Differenzierungsprozesses sind viele weitere Transkriptionsfaktoren beteiligt und bilden ein durchkonstruiertes transkriptionelles Regulationsnetzwerk. Die Aktivierung, Differenzierung und die Expansion von Th-Zellen wird stark von der Aktivität und relativen Expression von spezifischen Transkriptionsfaktoren bestimmt. Eine defekte Regulierung der Th-Zellimmunantwort auf Infektionen mit Pathogenen führt zu chronischen Infektionen. Wohingegen eine zu starke unkontrollierte Immunantwort zu Autoimmunkrankheiten, Allergien und Asthma führen kann. Daher ist ein ausgewogenes Gleichgewicht zwischen Effektor-T-Zellen und Treg-Zellen notwendig. Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem bisher in T-Zellen nicht charakterisierten Transkriptionsfaktor TGIF1. Wie hier gezeigt werden konnte, hat TGIF1 Einfluss auf die Entscheidung, ob eine naive T-Zelle zu einer Effektorzelle oder einer Treg-Zelle differenziert.

## 1.8 TGIF1



**Abb. 1-6: TGIF1-Bindung an DNA.**

TGIF1 (*TG-interacting factor*) ist ein Mitglied der TALE (*three-amino-acid loop extension*) Superfamilie von Proteinen mit einer Homeo-Domäne (s. Abb. 1-6). Diese zeichnen sich durch zwei Helices aus, die durch einen Loop, der an der Interaktion mit anderen Proteinen beteiligt ist, voneinander getrennt sind (Burglin, 1997). Der Transkriptionsfaktor TGIF1 wurde erstmalig 1995 von E. Bertolino beschrieben (Bertolino et al., 1995). Es konnte bisher gezeigt werden, dass TGIF1 an neuronalen Prozessen beteiligt ist. So zeigen verschiedene Patientenstudien eine starke Assoziation von Mutationen in TGIF1 und HPE (Holoprosencephalie). So konnte in 25% der HPE Patienten eine Mutation in einem der vier Gene *tgif1*, *sin3*, *shh* oder *zic2* identifiziert werden, wobei Mutationen in *tgif1* nur in 2% der Fälle zu beobachten waren (Keaton et al., 2011). HPE ist eine Fehlbildung des Vorderhirns, die in der dritten bis sechsten Woche der embryonalen

Entwicklung, durch eine unvollständige Teilung der beiden Hemisphären entsteht. In einer von 250 Schwangerschaften tritt diese Fehlbildung auf und in einer von 8.000 Geburten, allerdings ist die Sterberate sehr hoch (Dubourg et al., 2007). Dass TGIF1 eine wichtige Rolle im Nervensystem hat, zeigen auch SNP- (*Single-Nucleotid-Polymorphism*) Analysen auf Chromosom 18. Sie zeigen eine starke Verbindung von Psychosen und Mutationen im *tgif1*-Gen (Chavarria-Siles 2007, molecular psychiatry). Auch für die Entstehung der Volkskrankheit Diabetes Mellitus wird TGIF1 diskutiert. Es konnte gezeigt werden, dass Insulin den SMAD-Corepressor TGIF1 stabilisiert und so die Differenzierung von Pre-Adipozyten fördert (Horie, 2008). Das TGIF1 auch in anderen Zelllinien eine Wirkung auf die Differenzierung und Apoptose von Zellen hat konnte eine weitere Studie durch einen Knockdown mit sh-RNA und Überexpression von TGIF1 zeigen (Hamid and Brandt, 2009).

Einige Studien in Zelllinien zeigten zudem, dass TGIF1 ein Repressor des TGF- $\beta$  Signalweges ist. TGIF1 hemmt den TGF- $\beta$  Signalweg auf verschiedenen Ebenen (s. Abb.1-3). Auf der nicht-transkriptionellen Ebene hemmt TGIF1 die Interaktion des TGF- $\beta$  RII mit dem Adapterprotein SARA, und die Phosphorylierung von SMAD2 sowie die Interaktion von SMAD2 und SMAD4 (Wotton et al., 1999a). Auf transkriptioneller Ebene inhibiert TGIF die Transkription von SMAD abhängigen Genen und rekrutiert andere Co-Repressoren wie HDACs, CtBP und mSin3 zu einem Multiproteinkomplex (Gripp et al., 2000; Wotton et al., 2001; Wotton et al., 1999a; Wotton et al., 1999b). Für die Induktion von iTreg-Zellen in der Peripherie ist das Cytokin TGF- $\beta$  entscheidend. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob TGIF1 in T-Zellen im Fall der TGF- $\beta$  abhängigen iTreg Induktion als Repressor wirkt. Es konnte zudem gezeigt werden, dass TGIF1 auch TGF- $\beta$  unabhängig an DNA binden und die Transkription von RA-abhängigen Genen hemmen kann (Wotton et al., 1999b). RA beeinflusst die Proliferation von Treg-Zellen positiv. Diese Befunde lassen vermuten, dass TGIF1 eine Funktion in der iTreg Differenzierung hat, da sowohl TGF- $\beta$  als auch RA einen positiven Einfluss auf Treg-Zellen haben und TGIF1 für beide Signalwegen wichtig zu sein scheint.

Die Aufklärung der Treg-Induktion aus naiven T-Zellen ist seit einigen Jahren Forschungsgebiet vieler Arbeitsgruppen und doch sind die molekularen Mechanismen nicht vollständig aufgeklärt. Ziel dieser Arbeit war es, den Mechanismus der TGF- $\beta$  abhängigen Treg-Induktion auf transkriptioneller Ebene durch einen bisher in T-Zellen nicht charakterisierten Transkriptionsfaktor weiter aufzuklären.

## 1.9 Zielstellung

Foxp3<sup>+</sup>Treg- (regulatorische T-) -Zellen tragen einen wichtigen Anteil zur Immuntoleranz bei. Das Gleichgewicht zwischen Treg-Zellen und Effektorzellen ist entscheidend für ein intaktes Immunsystem. In vielen Autoimmunkrankheiten ist dieses Gleichgewicht durch eine zu geringe Zahl und oder einer Verminderung der suppressiven Aktivität von Treg-Zellen gestört. Die Induktion und Expansion von Foxp3<sup>+</sup>Treg-Zellen ist daher ein therapeutischer Ansatzpunkt um z.B. überschießende Immunreaktionen im Fall von Autoimmunkrankheiten zu dämpfen. Es ist bekannt, dass die Expression von Foxp3 essentiell für die Funktion und Stabilität dieser Treg-Zellen ist. In einer Studie von 2010 wird postuliert, dass Foxp3 durch einen Aktivator-Komplex zahlreicher Transkriptionsfaktoren reguliert wird. Die genauen molekularen Mechanismen der TGF- $\beta$  abhängigen Foxp3-Induktion in der Peripherie sind bislang jedoch wenig aufgeklärt. Der Transkriptionsfaktor TGIF1 wurde bisher in verschiedenen Zelllinien als Repressor des TGF- $\beta$  Signalweges beschrieben. In T-Zellen wurde jedoch TGIF1 bisher noch nicht charakterisiert.

In dieser Arbeit sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Ist die adenoviral-vermittelte Überexpression von Transkriptionsfaktoren (in diesem Fall TGIF1) in primären T-Zellen von Do11.10-CAR Mäusen eine Alternative zur Retroviralen Transduktion um Differenzierungsprozesse zu untersuchen?
2. Spielt TGIF1 eine Rolle bei der frühen Entscheidung für die Richtung in die die T-Zelldifferenzierung in der Peripherie verläuft?
3. Wie wirkt sich die Überexpression von TGIF1 in naiven T-Zellen auf die Differenzierungsrichtung aus?
4. Zeigen sich beim Knockdown von TGIF1 gegensätzliche Effekte auf die Differenzierungsprozesse im Vergleich zur Überexpression?
5. Wenn TGIF1 in der T-Zelldifferenzierung involviert ist, welche molekularen Mechanismen stehen sind dafür verantwortlich?
6. Wie wirkt sich die TGIF1 Defizienz auf die Differenzierung von T-Zellen in einem Krankheitsmodell aus?

## 2 Ergebnisse

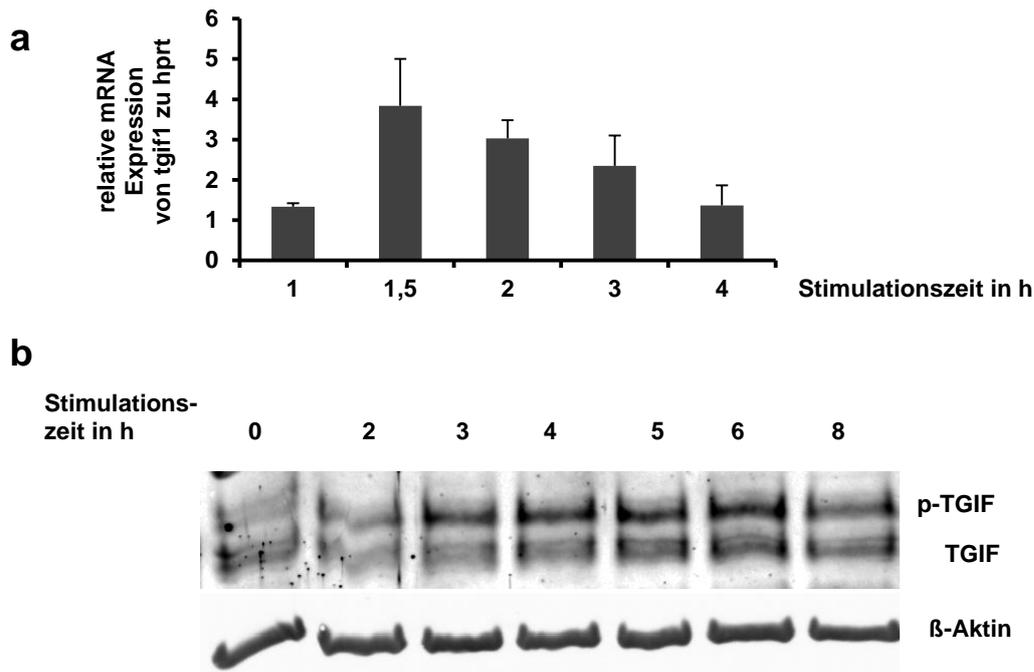
TGIF1 ist ein Transkriptionsfaktor, für den eine wichtige Rolle als Repressor in dem TGF- $\beta$  abhängigen SMAD-Signalweg in verschiedenen Zelllinien beschrieben wurde (Wotton et al., 1999a). Da das Cytokin TGF- $\beta$  eine essentielle Aufgabe in der peripheren Induktion und Persistenz von regulatorischen T-Zellen hat, stellte sich die Frage, ob TGIF1 für diese Prozesse relevant ist.

### 2.1 Die Expression von TGIF1 ist TCR abhängig

Die Aktivierung der naiven T-Zelle in der Peripherie wird durch die Stimulation des TCR und des vorherrschenden Cytokinmilieus bestimmt. Zunächst konnte mit einer vorrausgehenden Transkriptomanalyse (Microarrays), von humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach TCR-Stimulation, gezeigt werden, dass sich der Transkriptionsfaktor TGIF1 als TCR abhängig erweist. Die Validierung dieser Daten mittels qRT-PCR wurde von Britta Lamottke im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt. Sie konnte zeigen, dass TGIF1 in humanen T-Zellen exprimiert ist und die Expression wenige Stunden nach TCR-Stimulation stark induziert wird.

In den vorliegenden Untersuchungen sollte untersucht werden, ob TGIF1 in murinen Zellen auf dem gleichen Weg reguliert wird. Die Arbeit mit murinen T-Zellen ermöglicht eine bessere Manipulation im Vergleich zur Arbeit mit humanen Zellen. So lässt sich in murinen T-Zellen die funktionelle Bedeutung eines Proteins durch die Möglichkeit der Überexpression und des Knockdowns bzw. der Verwendung von Knockout-Mäusen besser untersuchen. Humane T-Zellen lassen sich schwer bis gar nicht manipulieren. In dieser Arbeit wurde daher der Transkriptionsfaktors TGIF1 in murinen T-Zellen untersucht.

Wie die Untersuchungen des mRNA und des Proteinlevels zeigten, ist die Expression von TGIF1 auch in murinen CD4<sup>+</sup> T-Zellen vom TCR-Stimulus abhängig (s. Abb. 2-1). Eine Zeitkinetik der T-Zellaktivierung mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern zeigte eine initiale Induktion der Expression von *tgif1*. So hatte die mRNA-Expression von *tgif1* bei starker TCR-Stimulation ihren Höhepunkt bei 1,5 h und fiel vier Stunden nach Stimulation auf das Basisexpressionslevel zurück (s. Abb. 2-1a). Das Proteinlevel von TGIF1 zeigte in murinen T-Zellen seinen Höhepunkt zwischen vier und sechs Stunden nach Stimulation. Bereits acht Stunden nach Stimulation des TCR war eine Abnahme der Expression von TGIF1 zu beobachten (s. Abb. 2-1b).



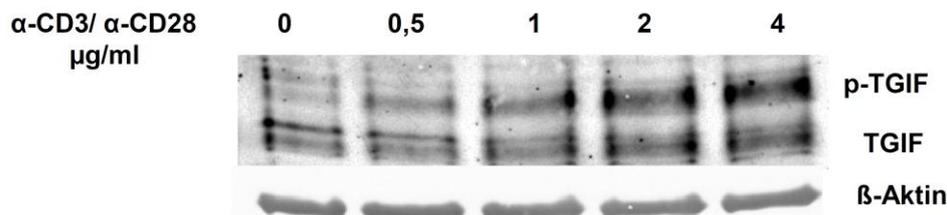
**Abb. 2-1: Zeitkinetik der Expression von TGIF in murinen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen.** Die Zellen wurden mit je 4 µg/ml α-CD3 und α-CD28 Antikörpern, welche an Kultivierungsplatten gebunden waren, für die angegebene Zeit stimuliert. a) Die mRNA-Expression von *tgif1* aus isolierter Total-RNA mit anschließender cDNA-Synthese wurde mit qRT-PCR gemessen und zum Kontrollgen HPRT normalisiert. Angegeben ist der Fold-change zur unstimulierten Probe (n=3). b) Die Proteinexpression von TGIF1 wurde mit Westernblot-Analyse der Zelllysate untersucht. Als Ladekontrolle diente β-Aktin. Gezeigt ist eines von zwei durchgeführten Experimenten.

Zusammenfassend konnte so gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor TGIF1 basal in CD4<sup>+</sup>-Zellen exprimiert und nach TCR-Stimulation hochreguliert wird.

## 2.2 Die TGIF1-Expression ist von der Stärke der TCR-Stimulation abhängig und wird durch CsA beeinflusst

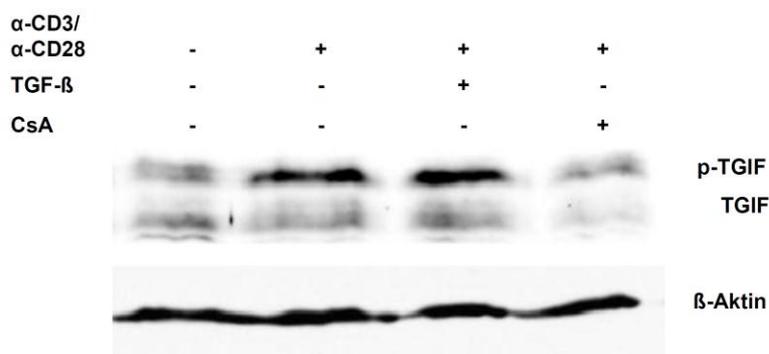
Für die T-Zelldifferenzierung ist nicht nur der TCR-Stimulus an sich wichtig, sondern auch die Stärke der Stimulation und das vorherrschende Cytokinmilieu sind entscheidend für die Richtung, die eine naive T-Zelle einschlägt. Neben der TCR-Signalweiterleitung, sind die Cytokine TGF-β und IL-2 essentiell für die periphere Treg-Induktion. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass TGIF1 z. B. in Hepatozyten eine wichtige Rolle im TGF-β-Signalweg spielt (Wotton et al., 1999a). Zudem zeigten erste Untersuchungen mit humanen T-Zellen eine Abhängigkeit der TGIF1 Expression von NFAT (unveröffentlichte Daten, Britta Lamottke). Um eine mögliche Abhängigkeit der TGIF1 Expression von dem TCR-, IL-2- und TGF-β-Signalweges näher zu untersuchen, wurden weitere Westernblot-Analysen für TGIF1 in murinen T-Zellen durchgeführt.

Stimuliert man naive T-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von  $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 Antikörpern, ließ sich eine Abhängigkeit des TGIF1-Proteinlevels von der Stimulationsstärke beobachten (s. Abb. 2-2). Wie eine Westernblot-Analyse zeigte, steigt die Proteinmenge von TGIF1 proportional zum TCR-Stimulus.



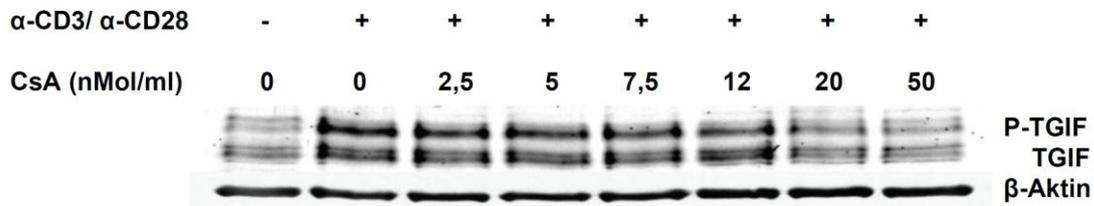
**Abb. 2-2: Die Proteinexpression von TGIF1 ist von der Stimulationsstärke abhängig.**  $CD4^+CD25^-$  Zellen wurden mit den angegebenen Antikörpermengen ( $\alpha$ -CD3 und  $\alpha$ -CD28 Antikörper an Kultivierungsplatte gebunden) für fünf Stunden stimuliert und anschließend die Zellysate der Zellen mit Hilfe einer Westernblot-Analyse untersucht. Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von drei durchgeführten Experimenten.

Um die Frage zu beantworten, ob TGIF1 selbst von TGF- $\beta$  beeinflusst wird, wurden die Zellen zusätzlich zum TCR-Stimulus mit dem Cytokin TGF- $\beta$  behandelt. Eine Westernblot-Analyse fünf Stunden nach TCR-Stimulation zeigte, dass TGF- $\beta$  selbst keine Auswirkung auf die TGIF1 Expression hat (s. Abb. 2-3). Das zweite für neben TGF- $\beta$  differenzierungsbestimmende Cytokin für die iTreg-Zellinduktion ist IL-2. Die Expression von IL-2 wird u.a. durch NFATc2 induziert. NFATc2 wiederum wird durch Calcineurin aktiviert (s. Abb. 1-1). Durch Zugabe des Calcineurin Inhibitors CsA, während der TCR-Stimulation, konnte eine verminderte Expression von TGIF1 (s. Abb.2-3) beobachtet werden.



**Abb. 2-3: Das Proteinlevel von TGIF wird von CsA gehemmt, aber ist nicht von TGF- $\beta$  abhängig.**  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen wurden für 5 h mit je 4  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 Antikörpern (an Kultivierungsplatten gebunden) stimuliert. Zusätzlich wurden die Zellen mit 2 ng TGF- $\beta$  bzw. 50 ng/ml CsA behandelt. Anschließend wurden die Zellysate mit Hilfe von Westernblot-Analysen untersucht. Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin. Hier ist ein repräsentatives Experiment von vier durchgeführten Experimenten gezeigt.

Mit einer Titration der CsA Konzentration während der TCR-Stimulation konnte auf Proteinebene gezeigt werden, dass ab einer Konzentration von 7,5 nMol/ml eine hemmende Wirkung auf die TGIF1 Induktion zu beobachten war. Eine CsA Konzentration von 50 nMol/ml hemmte die TCR-abhängige Expression von TGIF1 komplett (s. Abb. 2-4).



**Abb. 2-4: Zugabe von CsA verhindert die Induktion der TGIF1 Expression durch TCR-Stimulation.** CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen wurden für 5 h mit  $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 Antikörpern (an Kultivierungsplatten gebunden) stimuliert und anschließend die Zelllysate mit Hilfe von Westernblot-Analysen untersucht. Der Inhibitor CsA wurde in den angegebenen Konzentrationen 20 min vor dem Stimulationsstartpunkt dazu gegeben. Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin (n=1).

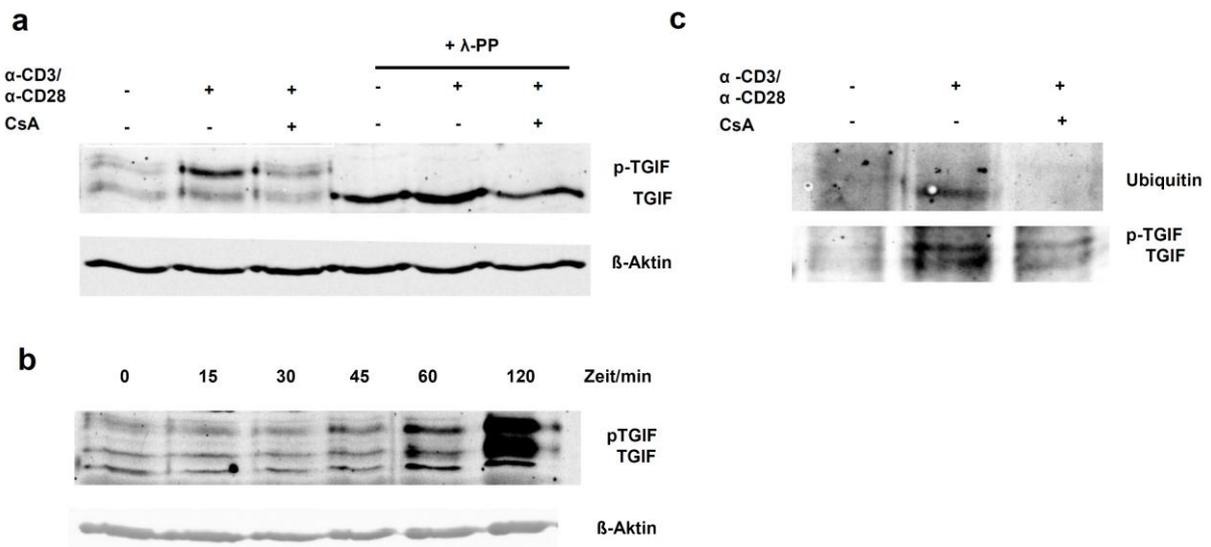
Zusammengenommen zeigten diese Experimente eine Abhängigkeit des TGIF1 Proteingehaltes von der Stärke der TCR-Stimulation. Zudem konnte gezeigt werden, dass diese Neusynthese von TGIF1 von NFATc2 abhängig war, wohingegen TGF- $\beta$  keinen Einfluss auf die Expression zeigte.

### 2.3 TGIF1 wird posttranslational modifiziert

Es ist bekannt, dass posttranslative Modifikationen die Proteinaktivität verändern können (Mann and Jensen, 2003). Zu diesen Modifikationen zählen u.a. Phosphorylierung und Ubiquitinierung von Proteinen. Um die Frage zu beantworten, ob TGIF1 in T-Zellen nach der Transkription modifiziert wird, wurde eine Co-Immunopräzipitation (Co-IP) für TGIF1 durchgeführt und zusätzlich das Phosphorylierungsverhalten untersucht.

Da für TGIF1 16 potenzielle Phosphorylierungsstellen (PhosphoSite) vorhergesagt werden, wurde der Phosphorylierungsstatus von TGIF1 in murinen T-Zellen durch Zugabe von  $\lambda$ -Phosphatase ( $\lambda$ -PP) geprüft. Dieses Experiment bestätigte, dass TGIF1 phosphoryliert vorlag und diese Phosphorylierung nach TCR-Stimulation verstärkt wurde (s. Abb. 2-5a). Dies konnte auch durch Verwendung einer anderen Phosphatase (antarktische Phosphatase) bestätigt werden (nicht gezeigt). Die zusätzliche Phosphorylierung von neu induziertem TGIF1 in

murinen T-Zellen setzte bei starker TCR-Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern 60 min nach TCR-Stimulation ein (s. Abb. 2-5b).



**Abb. 2-5: TGIF wird nach TCR-Stimulation phosphoryliert und monoubiquitiniert.** a) TGIF1 wird 5 h nach TCR-Stimulation induziert und phosphoryliert. Murine  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen wurden unstimuliert (-) oder für fünf Stunden mit 4  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 Antikörpern (an Kultivierungsplatten gebunden) stimuliert (+). Zusätzlich wurde bei für eine Probe vor der TCR-Stimulation 50nM/ml CsA hinzugefügt (CsA). Anschließend wurde ein Teil der Zellen für 15 min mit  $\lambda$ -Phosphatase ( $\lambda$ -PP) behandelt und die Zellysate mit Westernblot-Analyse untersucht. b) Gezeigt ist eine Westernblot-Analyse von  $CD4^+CD25^-$  Zellen, die mit 6  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 (an Kultivierungsplatten gebunden) für die angegebene Zeit stimuliert wurden. c) Für die Co-IP wurden  $CD4^+CD25^-$  Zellen für fünf Stunden mit  $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 (an Kultivierungsplatten gebunden) stimuliert und TGIF1 mit anti-TGIF-Antikörper präzipitiert. Mit einer Westernblot-Analyse konnte TGIF1 und co-präzipitiertes Ubiquitin mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Experiment von zwei durchgeführten Experimenten.

Eine weitere untersuchte posttranslative Modifikation ist die Ubiquitinierung von Proteinen. Die Ubiquitin-Anzahl ist entscheidend für die Bedeutung der Modifikation für das Protein. Eine Mono-Ubiquitinierung ist meist mit einer Aktivierung und Stabilisierung des Proteins verbunden, wohingegen eine Poly-Ubiquitinierung das Protein meist für die Degradierung bestimmt (Sadowski and Sarcevic, 2011). Mit Hilfe einer Co-IP ließ sich eine Mono-Ubiquitinierung von TGIF1 nach TCR-Stimulierung nachweisen (s. Abb. 2-5c). Es konnte nur eine Bande mit dem Ubiquitin-Antikörper nachgewiesen werden, wohingegen bei einer Polyubiquitinierung mehrere Banden oder ein Schmier zu beobachten wäre.

Diese Experimente belegten, dass TGIF1 nach dem TCR-Stimulus in naiven T-Zellen neusynthetisiert und posttranslational modifiziert wird.

## 2.4 Die TGIF1 Transkriptvariante 1 wird stimulationsabhängig exprimiert

Um die funktionelle Bedeutung eines Proteins zu untersuchen, ist die Manipulation der Expression meist unerlässlich. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit die Menge an TGIF1 pro T-Zelle mit siRNA und Überexpression manipuliert werden. Es stellte sich daher zunächst die Frage, welche Transkriptionsvarianten in T-Zellen exprimiert werden und welche von ihnen für die Induktion nach TCR-Stimulation verantwortlich sind. Zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit waren 11 Transkriptvarianten für das murine *tgif1* bekannt (s. Tab. 2-1). Zehn von ihnen kodieren für ein Protein.

**Tab.: 2-1: Annotierte Transkriptvarianten von dem murinen *tgif1*-Gen (Ensembl Stand Nov. 2011).**

Name	Transkript ID <sub>a</sub>	Länge (bp <sub>b</sub> )	Länge (aa <sub>c</sub> )	Biotyp
Tgif1-001	ENSMUST00000059775	1639	272	Protein kodierend
Tgif1-002	ENSMUST00000117294	1714	252	Protein kodierend
Tgif1-003	ENSMUST00000118283	1385	252	Protein kodierend
Tgif1-004	ENSMUST00000127719	923	242	Protein kodierend
Tgif1-005	ENSMUST00000132825	522	39	Protein kodierend
Tgif1-006	ENSMUST00000134654	679	58	Protein kodierend
Tgif1-007	ENSMUST00000125329	772	-	-
Tgif1-008	ENSMUST00000156484	613	57	Protein kodierend
Tgif1-009	ENSMUST00000135007	898	158	Protein kodierend
Tgif1-201	ENSMUST00000166395	1720	305	Protein kodierend
Tgif1-202	ENSMUST00000172229	1446	252	Protein kodierend

<sup>a</sup>ID = Identitätsnummer, <sup>b</sup>bp = Basenpaare, <sup>c</sup>aa = Aminosäuren.

Das *tgif1*-Gen ist im Mausgenom auf dem Chromosom 17 lokalisiert. Die Transkriptvarianten unterscheiden sich vorrangig im ersten Exon. Es wurde die 5`-RACE Methode (*rapid amplification of cDNA-ends*) gewählt, um die in T-Zellen exprimierten Transkriptvarianten zu untersuchen. Diese Methode ermöglicht die Transkriptionsstartpunkte zu identifizieren. Mit den gewählten Oligonukleotiden wurden alle proteinkodierenden Varianten bis auf die Variante Tgif1-008 erfasst. Da diese Variante Tgif1-008 zu einem sehr kleinem Protein translatiert wird, wurde sie vernachlässigt. Die Größe des mit Westernblot-Analysen detektierten TGIF1-Proteins (TCR- und CsA abhängig) lag bei 35 kDa und entsprach somit eher den Transkriptvarianten Tgif1-001 bis Tgif1-004 und Tgif1-201 sowie Tgif1-202. Für die 5`-RACE wurden murine T-Zellen für drei Stunden mit  $\alpha$ -CD3 und  $\alpha$ -CD28 Antikörpern mit und ohne CsA Behandlung stimuliert. Als Kontrolle dienten hier unstimulierte T-Zellen. Nach der Amplifi-

kation durch die 5'-RACE wurden die entstandenen PCR-Produkte mit einer Gelelektrophorese analysiert.

In Abbildung 2-6 sind die zwei unterschiedlich großen PCR-Produkte als Ergebnis der 5'-RACE auf einem Agarosegel zu sehen. Das kleinere PCR-Produkt war nicht stimulationsabhängig und wurde auch durch CsA-Behandlung nicht beeinflusst, da es in allen Proben auftauchte. Das größere PCR-Produkt hingegen zeigte sich TCR- und CsA-abhängig, da es nur in der stimulierten Probe ohne CsA-Behandlung detektiert werden konnte.



**Abb. 2-6: Die Transkriptvariante 1 von TGIF1 wird durch TCR-Stimulation induziert.** Agarosegelelektrophorese der RACE. Murine CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen wurden für 3 h mit 3 µg/ml α-CD3/α-CD28 Antikörpern (an Kulturplatten gebunden) stimuliert. Zusätzlich wurde zu einer Probe vor der Stimulation 50 nMol/ml CsA (stim + CsA) hinzu gegeben. Die entstandenen PCR-Produkte wurden anschließend mit einem Agarosegel aufgetrennt. Als Kontrolle für die Spezifität diente eine PCR-Probe ohne DNA (H<sub>2</sub>O). Gezeigt ist eines von zwei durchgeführten Experimenten. Unstim = ohne TCR Stimulus, stim = mit TCR-Stimulus; stim + CsA = mit TCR-Stimulus und CsA Behandlung.

Die Sequenzierung der einzelnen PCR-Produkte nach einer TOPO-TA-Klonierung erbrachte, dass es sich bei dem größeren PCR-Produkt um die Transkriptvariante Tgif1-001 handelte und bei dem kleinen PCR-Produkt um die Transkriptvariante Tgif1-009.

Mit diesem Experiment wurde gezeigt, dass die Transkriptvarianten Tgif-001 (1) und Tgif-009 (9) in murinen T-Zellen exprimiert wird und die Transkriptvariante 1 durch den TCR-Stimulus induziert wird. Die Transkriptvariante 1 wurde daher für die Generierung des Überexpressionsvektors und der siRNA gegen TGIF1 als Ausgangspunkt verwendet.

## 2.5 Adenoviral vermittelte Überexpression von TGIF1-GFP in naiven T-Zellen begünstigt die Entstehung von Th1-Zellen *in vitro*

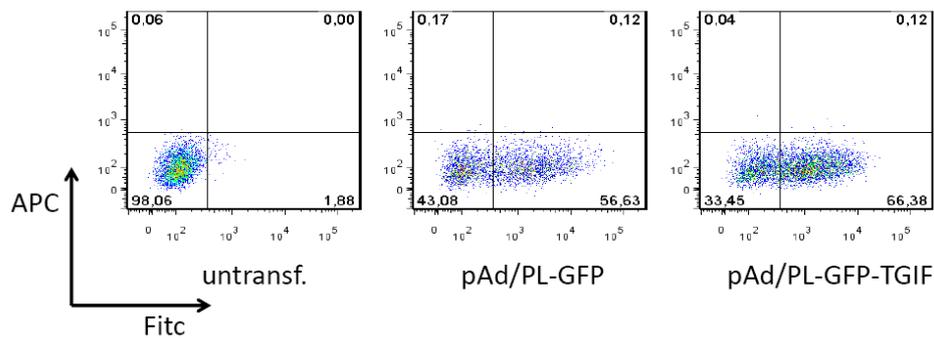
TGIF1 war bisher aus Studien mit Hepatozyten als Repressor im TGF- $\beta$  Signalweg bekannt und das Cytokin TGF- $\beta$  ist für die Induktion von iTreg-Zellen und Th17-Zellen aus naiven T-Zellen in der Peripherie essentiell (Hatton and Weaver, 2009). Es sollte daher im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von TGIF1 auf die Induktion von Th17 und iTreg Zellen in der Peripherie untersucht werden. Hierfür wurde das adenoviral vermittelte System (s. 4.4) gewählt. TGIF1 sollte in naiven T-Zellen überexprimiert werden und anschließend die Auswirkung des erhöhten Proteingehaltes auf die T-Zelldifferenzierung von naiven T-Zellen *in vitro* analysiert werden.

### 2.5.1 Adenoviral vermittelte Transduktion von naiven T-Zellen ist sehr effizient

Primäre T-Zellen lassen sich nur schlecht transfizieren. Die Etablierung eines Systems zur Manipulation von naiven T-Zellen war ein Ziel dieser Arbeit. Das adenoviral-vermittelte System wurde gewählt, da keine Voraktivierung der naiven T-Zellen, wie z.B. bei Retroviren, notwendig ist und so initiale Differenzierungsvorgänge untersucht werden können.

Zunächst wurde in einem GFP-Vektor das murine *tgif1* Gen unter der Kontrolle eines Ubiquitin-Promoters kloniert. Nach einer erfolgreichen Rekombinasereaktion in den Zielvektor pAd/PL-DEST konnte mit speziellen HEK293A Zellen der Virusüberstand für die Transduktion der naiven T-Zellen hergestellt werden. Naive T-Zellen aus speziellen DO.11.10 CAR Mäusen wurden dann mit dem Virusüberstand des leeren Vektors, oder des Vektors mit TGIF1-GFP transduziert und anschließend *in vitro* unter den verschiedenen Polarisierungsbedingungen für fünf Tage kultiviert (s. 4.4).

Die Transduktionseffizienz wurde mit Durchflusszytometrie und am Mikroskop anhand der GFP-Expression am zweiten Tag nach der Transduktion bestimmt. Mit dieser Methode wurde eine Transduktionseffizienz, der naiven T-Zellen, zwischen 50 - 70 % erreicht (s. Abb. 2-7). Die Zellen zeigten zudem eine gute Vitalität von 80 % (DAPI-Färbung toter Zellen; nicht gezeigt).



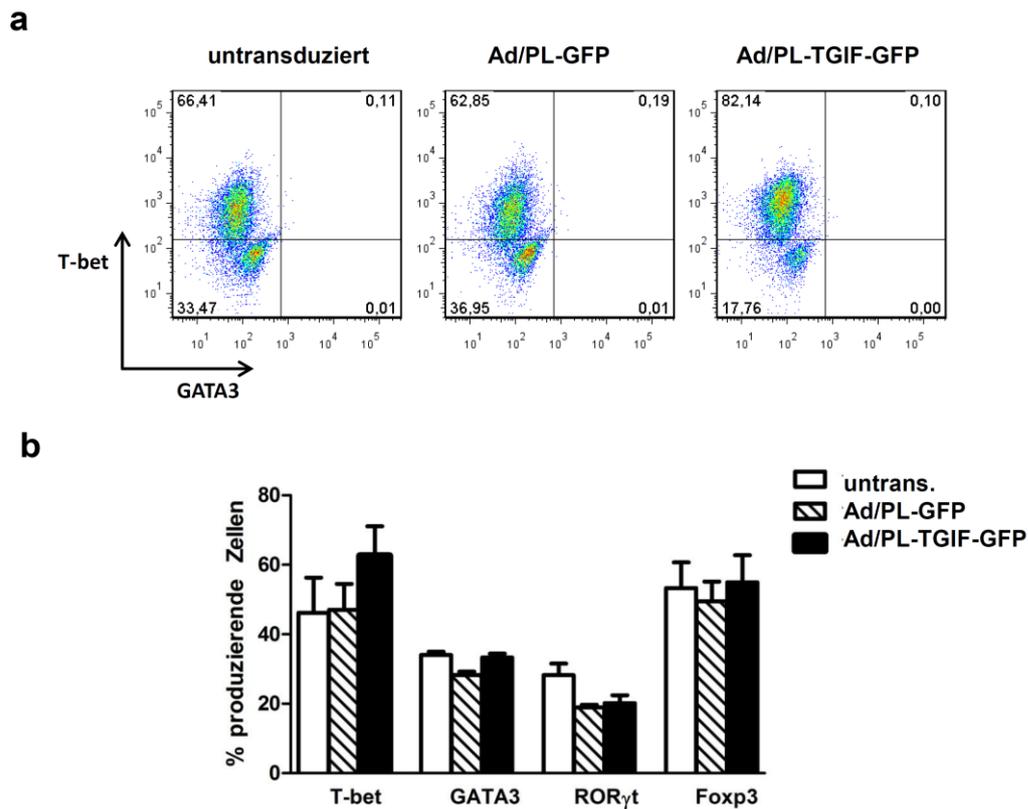
**Abb.: 2-7: Transduktionsrate von naiven primären murinen T-Zellen mittels Durchflusszytometrie an Tag 2 nach der Transduktion bestimmt.** Die Transduktionseffizienz von naiven T-Zellen mit dem adenoviralen Vektor gemessen anhand der GFP-Produzenten wurde anhand der Fluoreszenzintensität der GFP-Produktion zwei Tage nach Transduktion mit Durchflusszytometrie im Fitc-Kanal bestimmt. Hierzu wurden murine CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen mit einem Virusüberstand von pAd/PL- GFP-TGIF bzw. dem Kontrollvektor pAd/PL-GFP transduziert und anschließend für zwei Tage mit  $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 Antikörpern (an Kultivierungsplatte gebunden) und unter Zugabe von IL-2 und TGF- $\beta$  kultiviert.

## 2.5.2 Überexpression von TGIF1 wirkt sich positiv auf die Produktion von IFN- $\gamma$ aus

Die Manipulation des TGIF1-Proteinlevels sollte Aufschluss über die Rolle von TGIF1 in der peripheren T-Zelldifferenzierung von naiven T-Zellen zu Effektor-T-Zellen und Treg-Zellen geben.

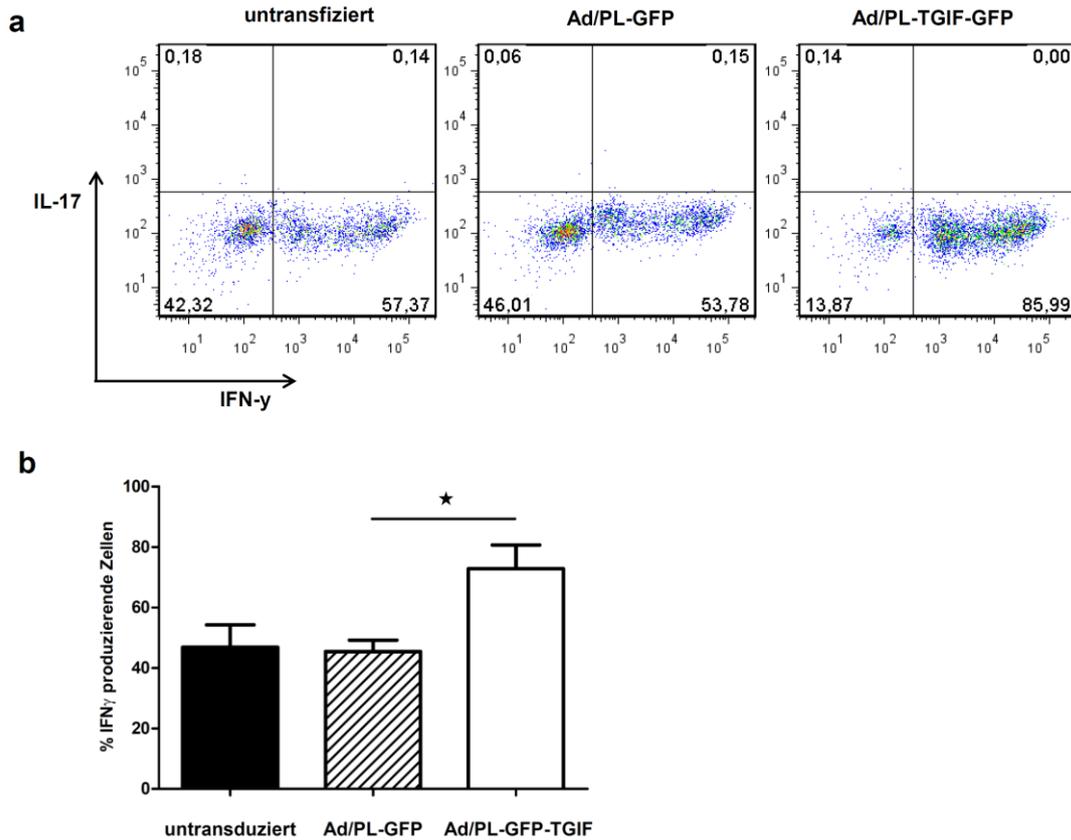
Die adenoviral-vermittelte Überexpression von TGIF1 in naiven T-Zellen (wie zuvor in 2.5.1 beschrieben) führte zu einer leicht erhöhten Anzahl von T-bet positiven Zellen nach fünftägiger Kultivierung (nach Transduktion) unter Th1 polarisierenden Bedingungen im Vergleich zu Zellen, die mit dem leeren Vektor transduziert wurden (s. Abb. 2-8a). Die Mastertranskriptionsfaktoren von Th2- (GATA3), Th17- (ROR $\gamma$ t) und Treg-Zellen (Foxp3) zeigten sich dagegen unbeeinflusst von der TGIF-Überexpression fünf Tage nach Kultivierung unter Th2-, bzw. Th17- oder Treg-Zell-polarisierenden Bedingungen (s. Abb. 2-8b).

Da T-bet als der Mastertranskriptionsfaktor von Th1-Zellen nicht allein die Funktionalität von Th1-Effektorzellen bestimmt, wurde zusätzlich die IFN- $\gamma$  Produktion der kultivierten Zellen untersucht. IFN- $\gamma$  ist ein inflammatorisches Cytokin, das vorrangig von Th1-Zellen produziert wird. Die Zellen, die TGIF1-GFP überexprimierten, zeigten eine signifikant erhöhte Zahl an IFN- $\gamma$  Produzenten nach fünf Stunden Re-Stimulation mit PMA/iono und Brefeldin A im Vergleich zu Zellen, die mit dem Leervektor transduziert wurden (s. Abb. 2-9).



**Abb. 2-8: Die Überexpression von TGIF1 wirkt sich positiv auf *in vitro* Differenzierung von Th1-Zellen aus.** Naive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen von DO11.10CAR Mäusen wurden mit dem Virusüberstand der angegebenen Konstrukte transduziert und anschließend insgesamt für fünf Tage unter Th1, Th2, Th17 oder iTreg polarisierenden Bedingungen kultiviert. Die Zellen wurden für drei Tage mit anti-CD3/anti-CD28 Antikörpern (plattengebunden) und den entsprechenden Cytokinen stimuliert und dann 1:2 gesplittet und mit frischem rIL-2 für zwei weitere Tage kultiviert. Anschließend wurden die Mastertranskriptionsfaktoren T-bet (Th1), GATA3 (Th2), ROR $\gamma$ t (Th17) und Foxp3 (Treg) nach Färbung mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern mit Durchflusszytometrie gemessen. a) T-bet-Expression der Th1-kultivierten Zellen. Ein stellvertretendes Durchflusszytometrie-Experiment von zwei durchgeführten Experimenten wurde im Dotplot dargestellt. b) Gezeigt ist die Proteinexpression der Mastertranskriptionsfaktoren. Prozentzahl der Produzenten des jeweiligen Mastertranskriptionsfaktor mit Durchflusszytometrie bestimmt und als Balkendiagramm dargestellt. Zusammengefasst sind die Mittelwerte aus zwei Experimenten in Duplikaten durchgeführt (n=2). Als Kontrolle dienten untransduzierte Zellen (untrans. bzw. untransduziert) sowie Zellen, die mit dem leeren Vektor (pAd/PL-GFP) transduziert wurden.

Nicht nur die Anzahl der T-bet Produzenten war durch eine Überrepräsentation von TGIF1 erhöht, sondern diese waren auch in der Lage, das inflammatorische Cytokin IFN- $\gamma$  zu produzieren. Die Anzahl der IFN- $\gamma$  Produzenten war signifikant höher, wobei bei der Analyse alle Zellen (untransduziert und transduziert) betrachtet worden sind. Nur 60 % der Zellen zeigten eine Überexpression von TGIF1.

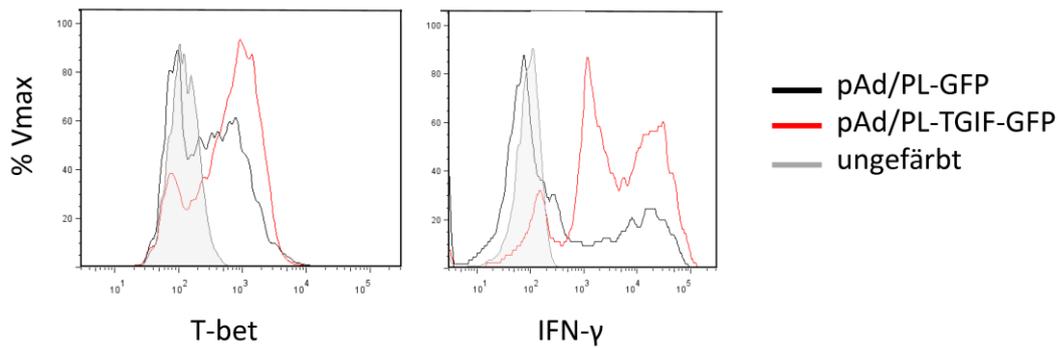


**Abb. 2-9: Überexpression von TGIF1 wirkt sich positiv auf *in vitro* Produktion von IFN- $\gamma$  aus.** Naive T-Zellen von DO11.10CAR Mäusen wurden für fünf Tage unter Th1, Th2, Th17 oder Treg polarisierenden Bedingungen kultiviert und dann die IFN- $\gamma$ -Produktion fünf Stunden nach Re-Stimulation mit PMA/iono und Bref A Behandlung mit Durchflusszytometrie gemessen. a) Dargestellt ist die IFN- $\gamma$ -Expression der unter Th1-Bedingungen kultivierten Zellen. Stellvertretendes Durchflusszytometrie-Experiment im Dotplot dargestellt. b) IFN- $\gamma$ -Produzenten der *in vitro* kultivierten Zellen aus drei Experimenten im Balkendiagramm dargestellt (n=3).

### 2.5.3 TGIF1 beeinflusst nicht die Menge von T-bet und IFN- $\gamma$ pro Zelle

Es stellte sich die Frage, ob TGIF1 nur die Anzahl der IFN- $\gamma$  Produzenten beeinflusst, oder auch die Menge von T-bet und IFN- $\gamma$  die jede Zelle produziert?

Betrachtete man die FIs (Fluoreszenz-Intensitäten) in Histogrammen, so sah man, dass TGIF1 die Anzahl der T-bet und IFN- $\gamma$  Produzenten beeinflusste, nicht aber die Menge pro Zelle (s. Abb. 2-10). Zusätzlich war eine zweite große Population an IFN- $\gamma$  Produzenten, die weniger IFN- $\gamma$  produzierten, nach der Überexpression von TGIF1 zu beobachten.

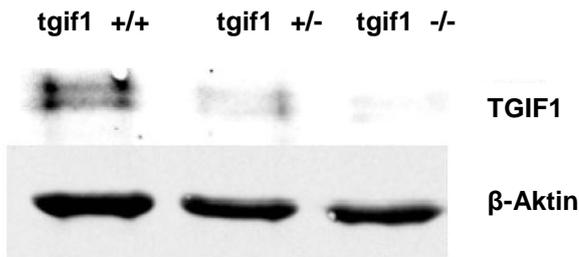


**Abb. 2-10: Menge an T-bet und IFN- $\gamma$  pro Zelle bleibt bei Überexpression von TGIF1 unbeeinflusst.** CD4+CD25- Zellen wurden mit Hilfe von Adenoviren mit den angegebenen Vektoren transduziert und anschließend für fünf Tage kultiviert. Die Zellen wurden für 5 h restimuliert mit PMA/iono und T-bet und IFN- $\gamma$  mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt. Dargestellt sind die FI aller Zellen im Histogramm von FACS-Analysen.

Zusammengefasst konnte mit diesen Versuchen gezeigt werden, dass sich das adenoviral-vermittelte System eignet, um Differenzierungsvorgänge von murinen naiven T-Zellen *in vitro* zu analysieren. Dieses Experiment zeigte *in vitro*, dass TGIF1 in T-Zellen den Mastertranskriptionsfaktor der Th1-Zellen T-bet positiv reguliert und Einfluss auf die IFN- $\gamma$  Produktion der kultivierten Th1-Zellen hatte. Der erwartete Einfluss auf die Differenzierung zu Th17- bzw. Treg-Zellen konnte nicht beobachtet werden. Um die beobachteten Effekte zu validieren, war es nötig, ein zweites System der Manipulation zu verwenden. Es wurden daher Knockout-Mäuse für TGIF1 (TGIF1-KO) verwendet.

## 2.6 Immunologische Charakterisierung der TGIF1<sup>-/-</sup> Mäuse

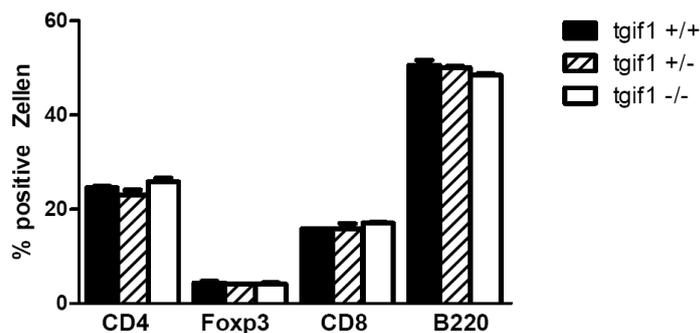
Um zu beweisen, dass die Befunde der Überexpression von TGIF1 keine Artefakte der Methode waren, wurden im Rahmen einer Kooperation mit Pamela Hoodless (Kanada) *tgif1*<sup>-/-</sup> Mäuse für die Validierung verwendet. Die Mäuse zeigen keinen sichtbaren Phänotyp (Mar and Hoodless, 2006). Ein Westernblot-Nachweis zeigte das Fehlen von TGIF1-Protein in den importierten Mäusen (s. Abb. 2-11).



**Abb. 2-11: Westernblotnachweis der TGIF1 Defizienz in *tgif1*<sup>-/-</sup> Mäusen.** Die Zellysate von  $1 \times 10^6$  CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen wurden verwendet und die Proteinexpression von TGIF1 mit anti-TGIF Antikörper nachgewiesen.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle.

### 2.6.1 TGIF1 defiziente Mäuse haben normale T- und B-Zellzahlen

Zunächst wurden die B- und T-Zellpopulationen der *tgif1*<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zu C57BL/6-Wildtypzellen aus Milz und Lymphknoten acht Wochen alter Mäusen mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Dazu wurden die Oberflächenmarker CD4, CD8, CD25 zur Charakterisierung der T-Zellen nach Färbung mit spezifischen Antikörpern mit Durchflusszytometrie gemessen. Eine zusätzliche intrazelluläre Färbung des Mastertranskriptionsfaktor Foxp3 zur Oberflächenfärbung von CD25 wurde zur Bestimmung der sich im Thymus entwickelten nTreg-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) verwendet. Um den Anteil an B-Zellen in den Lymphozyten und Milzzellen zu bestimmen, wurde B220 als typischer B-Zellmarker angefärbt (s. Abb. 2-12).



**Abb. 2-12: *Tgif1*<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen keine Auffälligkeiten in der Anzahl von B- und T-Zellen in den isolierten Zellen.** Ausgangspunkt für jedes Experiment waren Lymphknoten und Milzzellen aus je zwei Mäusen (*tgif1*<sup>-/-</sup> = homozygote TGIF1-KO; *tgif1*<sup>+/-</sup> = heterozygote TGIF1-KO; *tgif1*<sup>+/+</sup> = Wildtyp). Es wurde eine Durchflusszytometrie der Zellen nach Färbung mit spezifischen fluoreszenzgekoppelten Antikörpern durchgeführt. Drei unabhängige Experimente wurden in Duplikaten durchgeführt.

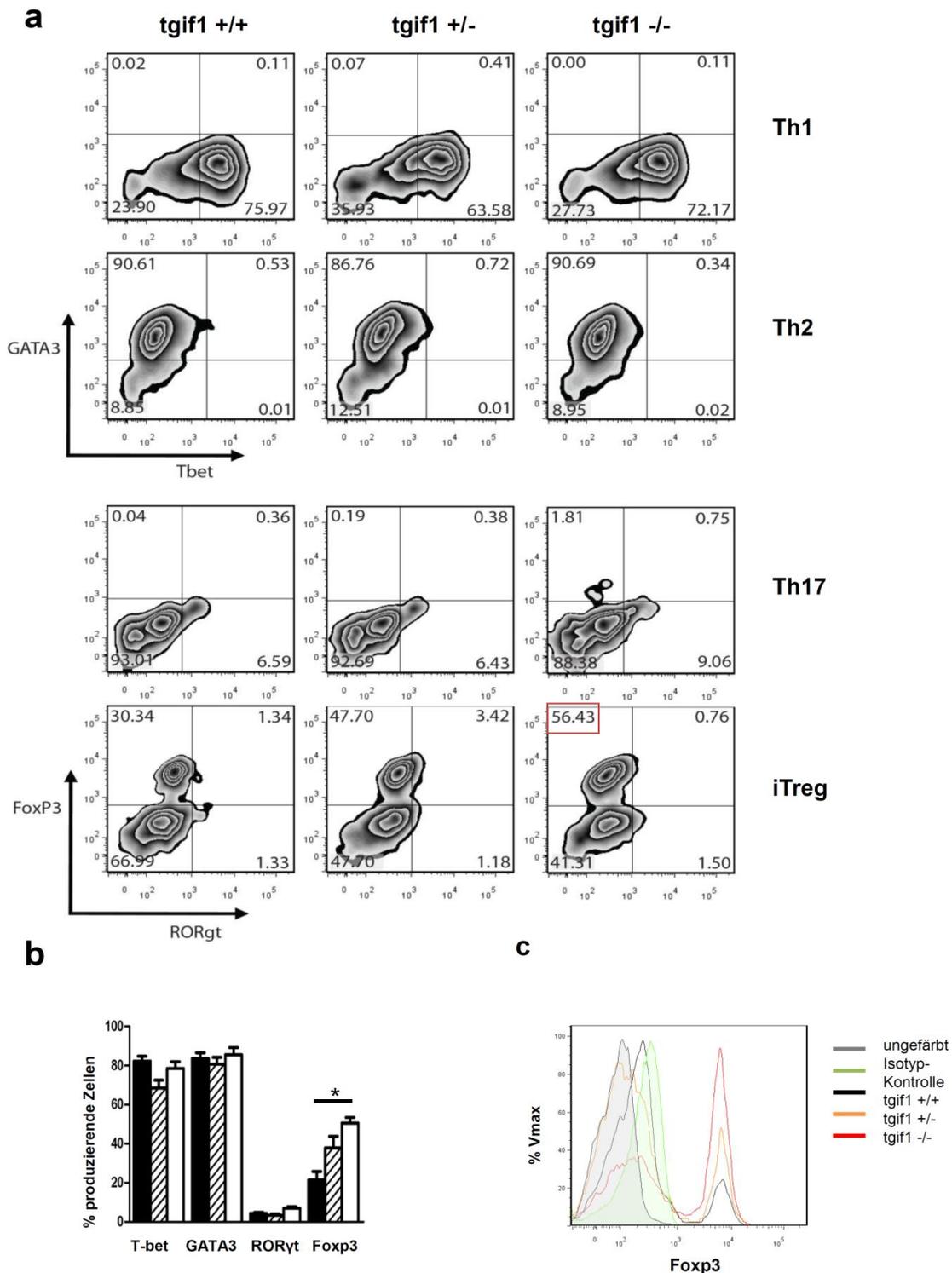
Beim Vergleich der Prozentzahlen von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zwischen *tgif1*<sup>-/-</sup> und *tgif1*<sup>+/+</sup> (WT) Mäusen zeigte sich kein Unterschied. Das Gleiche galt für den Prozentanteil der cytotoxischen CD8<sup>+</sup> -Zellen sowie der natürlichen Treg-Zellen an dem Gesamtpool der isolierten Zellen.

Aus diesen Untersuchungen zeigte sich keine phänotypische Erscheinung der T- und B-Zellen der TGIF1 defizienten Mäuse. In den weiteren Versuchen wurden nur CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T-Zellen betrachtet.

### **2.6.2 Ein TGIF1 Defizit begünstigt *in vitro* die Induktion von Foxp3<sup>+</sup> Zellen**

In der Prozentanzahl der nTreg-Zellen in den TGIF-KO Mäusen zeigte sich kein Unterschied im Vergleich zu den WT-Zellen. Da TGIF1 als Repressor für den TGF- $\beta$  Signalweg bekannt war und TGF- $\beta$  nur für die Induktion von iTreg-Zellen in der Peripherie und nicht für die Entwicklung von nTreg-Zellen im Thymus essentiell ist, wurde als nächster Schritt die iTreg-Zellinduktion untersucht. Hierzu wurden naive T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD45RB<sup>high</sup>) aus den Lymphknoten und der Milz von TGIF-KO-Mäusen sowie WT-Mäusen isoliert und für fünf Tage *in vitro* unter den verschiedenen polarisierenden Bedingungen kultiviert. Anschließend diente die Messung der Mastertranskriptionsfaktoren mit Durchflusszytometrie zur Überprüfung wie viele Zellen welche Differenzierungsrichtung eingeschlagen hatten.

Die naiven T-Zellen der *tgif1*<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten eine begünstigte Foxp3-Induktion von 30 auf 56% fünf Tage nach Kultivierung mit TGF- $\beta$  und IL-2 zusammen mit einem TCR-Stimulus im Vergleich zu den Kontrollzellen aus C57BL/6 Mäusen (s Abb. 2-13a, b). Die heterozygoten Tiere zeigten ebenfalls eine deutlich höhere Treg-Zellinduktion von 47%. Die Anzahl von Foxp3 positiver Zellen war nach Kultivierung unter Treg polarisierenden Bedingungen bei den *tgif1*<sup>-/-</sup> T-Zellen signifikant höher ( $p = 0,0128$ ) im Vergleich zu den WT-T-Zellen. Vergleich man jedoch die Menge von Foxp3 pro Zelle konnte man keinen Unterschied zwischen TGIF1-KO und WT-Zellen erkennen (s. Abb. 2-13c). Nicht nur die Entwicklung zu iTreg-Zellen ist TGF- $\beta$  abhängig, sondern auch die Differenzierung zu Th17-Zellen. Unter Th17 polarisierenden Bedingungen konnten nach fünf Tagen mehr ROR $\gamma$ t positive Zellen in den TGIF1 defizienten T-Zellen beobachtet werden (s. Abb. 2-13a, b). Zudem gab es eine kleine Zellpopulation von Foxp3 Produzenten unter Th17 polarisierenden Bedingungen bei den *tgif1*<sup>-/-</sup> T-Zellen (s. Abb. 2-13a). Bei der *in vitro* Kultivierung zu Th1- und Th2-Zellen zeigten sich keine Veränderungen durch das TGIF1 Defizit.



**Abb. 2-13: Ein TGIF1-Defizit fördert die TGF- $\beta$  vermittelte Foxp3 Induktion *in vitro*.** Naive T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD45RB<sup>high</sup>) aus den Lymphknoten und der Milz wurden aus *tgif1*<sup>-/-</sup>, *tgif1*<sup>+/-</sup> und *tgif1*<sup>+/+</sup> Mäusen isoliert, mit anti-CD3/anti-CD28 Antikörpern (an Kulturplatten gebunden) stimuliert und für fünf Tage unter Th1, Th2, Th17 oder Treg fördernden Bedingungen kultiviert und dann die Expression der Mastertranskriptionsfaktoren nach Färbung mit spezifischen Antikörpern mit Durchflusszytometrie gemessen. a) Dargestellt ist ein Density-Plot für die Mastertranskriptionsfaktoren der T-Zellpopulationen. Gezeigt ist ein Experiment von drei durchgeführten Experimenten. b) Gezeigt ist der Mittelwert der Foxp3-Expression aus drei unabhängigen Experimenten als Balkendiagramm. c) Fluoreszenz-Intensitäten der Foxp3-Expression, ein stellvertretendes Experiment von drei durchgeführten Experimenten.

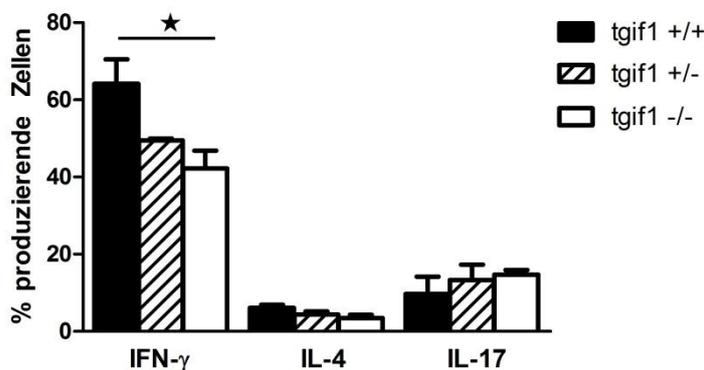
Die Mastertranskriptionsfaktoren von Th1- (T-bet) und Th2-Zellen (GATA3) wurden nach fünf Tagen von ähnlich vielen Zellen von *tgif1*<sup>-/-</sup> und *tgif1*<sup>+/+</sup> T-Zellen exprimiert.

Fasst man die Ergebnisse zusammen, war in diesem Experiment ein positiver Effekt der TGIF1 Defizienz auf die TGF- $\beta$  abhängige periphere Foxp3 Induktion aus naiven T-Zellen zu vermerken.

### 2.6.3 TGIF1 spielt eine Rolle in der IFN- $\gamma$ Produktion *in vitro*

Da in Analogie zur Überexpression von TGIF1 bei der Deletion von TGIF1 eine verringerte Th1-Differenzierung erwartet wurde, wurden zusätzlich zu den Transkriptionsfaktoren auch die Expression der Cytokine in den *in vitro* kultivierten Zellen nach Re-Stimulation analysiert. Es konnte tatsächlich eine signifikant verminderte Anzahl von IFN- $\gamma$  Produzenten ( $p = 0,0478$ ) in den *tgif1*<sup>-/-</sup> T-Zellen beobachtet werden (s. Abb. 2-14), die unter Th1-polarisierenden Bedingungen kultiviert wurden. Zusätzlich wurde die Cytokinproduktion von Th17-Zellen anhand von IL-17 und bei Th2-Zellen anhand von IL-4 gemessen. Die Anzahl der IL-17 Produzenten in den unter Th17-Bedingungen kultivierten T-Zellen zeigte bei einer Defizienz von TGIF1 keine Veränderung im Vergleich zu Wildtypzellen. Bei der Betrachtung der IL-4 Produzenten unter den Th-2 Zellen, zeigte sich ebenfalls kein Unterschied.

Diese Experimente zeigten, dass TGIF1 eine Rolle für die TGF- $\beta$ -abhängige iTreg Induktion *in vitro* hat. Zudem zeigte sich, wie bei der Überexpression, dass TGIF1 einen Einfluss auf die IFN- $\gamma$  Produktion bei *in vitro* kultivierten Th1-Zellen hat.

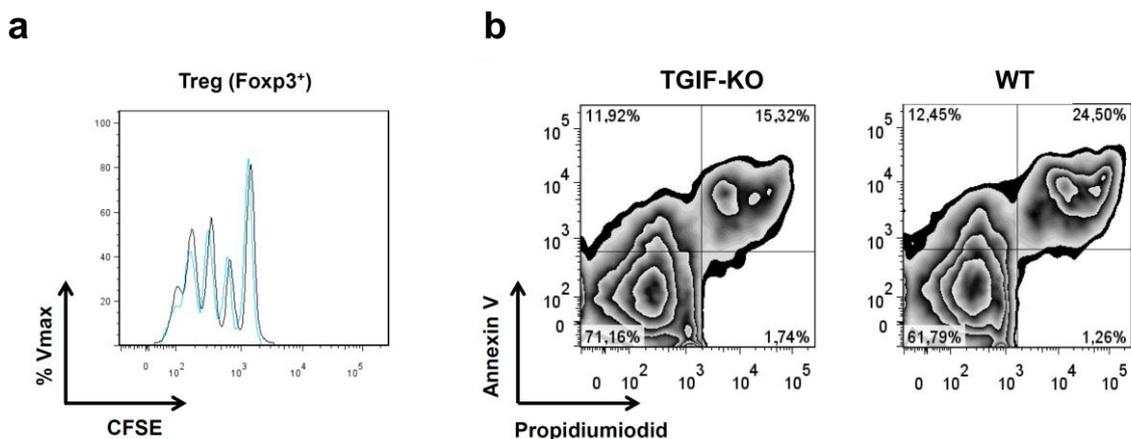


**Abb. 2-14: TGIF1-Defizit wirkt sich negativ auf die Anzahl der INF- $\gamma$  Produzenten aus.** Naive T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD45RB<sup>high</sup>) aus den Lymphknoten und der Milz wurden aus *tgif1*<sup>-/-</sup>, *tgif1*<sup>+/-</sup> und *tgif1*<sup>+/+</sup> Mäusen isoliert, wurden für fünf Tage mit anti-CD3/anti-CD28 Antikörpern (an Kulturplatten gebunden) stimuliert und unter Th1, Th2, Th17 oder Treg fördernden Bedingungen kultiviert. Anschließend wurde die Cytokinsekretion von IL-4, IFN- $\gamma$  und IL-17 nach Re-Stimulation (5 h) mit PMA/iono + Brefeldin A und Färbung mit spezifischen Antikörpern mit der Durchflusszytometrie gemessen (n = 3).

## 2.6.4 TGIF1 zeigt keinen Einfluss auf die T-Zellproliferation aber auf das Apoptoseverhalten von iTreg-Zellen

Eine Studie mit einer myeloiden Zelllinie konnte einen Einfluss von TGIF1 sowohl auf die Apoptose als auch auf die Differenzierung von Zelllinien beobachten (Bengoechea-Alonso and Ericsson, 2010). So wurde beim Knockdown von TGIF1 eine geringere Zellteilung und eine leicht erhöhte Apoptose der Zellen beobachtet. Es sollte daher untersucht werden, ob TGIF1 auch in T-Zellen einen Einfluss auf die Apoptose und Proliferation der Zellen hat.

Zunächst wurden dafür naive T-Zellen von B16 Mäusen (WT) und *tgif1*<sup>-/-</sup> Mäusen (TGIF-KO) mit CFSE markiert und dann unter Treg polarisierenden Bedingungen für fünf Tage kultiviert. An Tag fünf wurden die Zellen dann für den Treg-spezifischen Transkriptionsfaktor Foxp3 mit Hilfe von Durchflusszytometrie analysiert. Bei der Betrachtung der Foxp3 positiven Zellen konnte keine Veränderung des Proliferationsverhalten der iTreg-Zellen durch die TGIF1 Defizienz beobachtet werden (s. Abb. 2-15a).



**Abb. 2-15: TGIF1 hat keinen Einfluss auf die Proliferation von iTreg-Zellen aber beeinflusst die Apoptose der Zellen.** CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD45RB<sup>high</sup> Zellen von WT (blau) und TGIF-KO (schwarz) Mäusen wurden an Tag 0 mit CFSE markiert und anschließend *in vitro* unter Treg polarisierenden Bedingungen und Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28 Antikörpern (an Kulturplatten gebunden) kultiviert. a) CFSE Färbung von Durchflusszytometrie an Tag fünf nach Färbung mit einem spezifischen Foxp3-Antikörper gated auf Foxp3<sup>+</sup> Zellen. Dargestellt ist ein von drei durchgeführten Experimenten im Histogramm. b) Annexin V und Propidiumiodidfärbung der Zellen an Tag 5. Dargestellt ist jeweils eines von zwei durchgeführten Experimenten.

Zusätzlich wurde das Apoptoseverhalten der iTreg-Zellen analysiert. So wurde ein Teil der Zellen an Tag 5 der Kultivierung für Annexin V und Propidiumiodid angefärbt. Propidiumiodid ist ein Zellgift, das von lebenden Zellen aktiv rausgepumpt wird, während tote Zellen angefärbt bleiben. Annexin V ist ein Marker für Zellen die im frühen Apoptosestadium sind. Bei sterbenden Zellen kommt es zum Verlust der Membran-Integrität. So werden Phosphatidylserine, die normalerweise auf der Membranninnenseite lokalisiert sind nach außen gestülpt und

können von Annexin V gebunden werden. Fünf Tage nach Kultivierung unter iTreg-Bedingungen zeigten die TGIF1 defizienten Zellen weniger tote Zellen (15,32%) (Annexin V und Propidiumiodid positiv) im Vergleich zu den WT-Zellen (24,50%) (s. Abb. 2-15b), wohingegen in der Pro-apoptotischen Phase ähnlich viele Zellen zu beobachten waren. Die Gesamtzahl der apoptotischen Zellen, also proapoptotische (Annexin V positiv) und tote Zellen (positiv für Annexin V und Propidiumiodid) lag bei den TGIF-Ko-Zellen bei 27,24% der Zellen und bei den WT-Zellen bei 36,95%). Die Wirkung von TGIF1 auf Apoptose und Proliferation scheint zellspezifisch zu sein, da sich die Beobachtungen dieser Studie von denen aus der Studie mit myeloiden Zellen unterschieden.

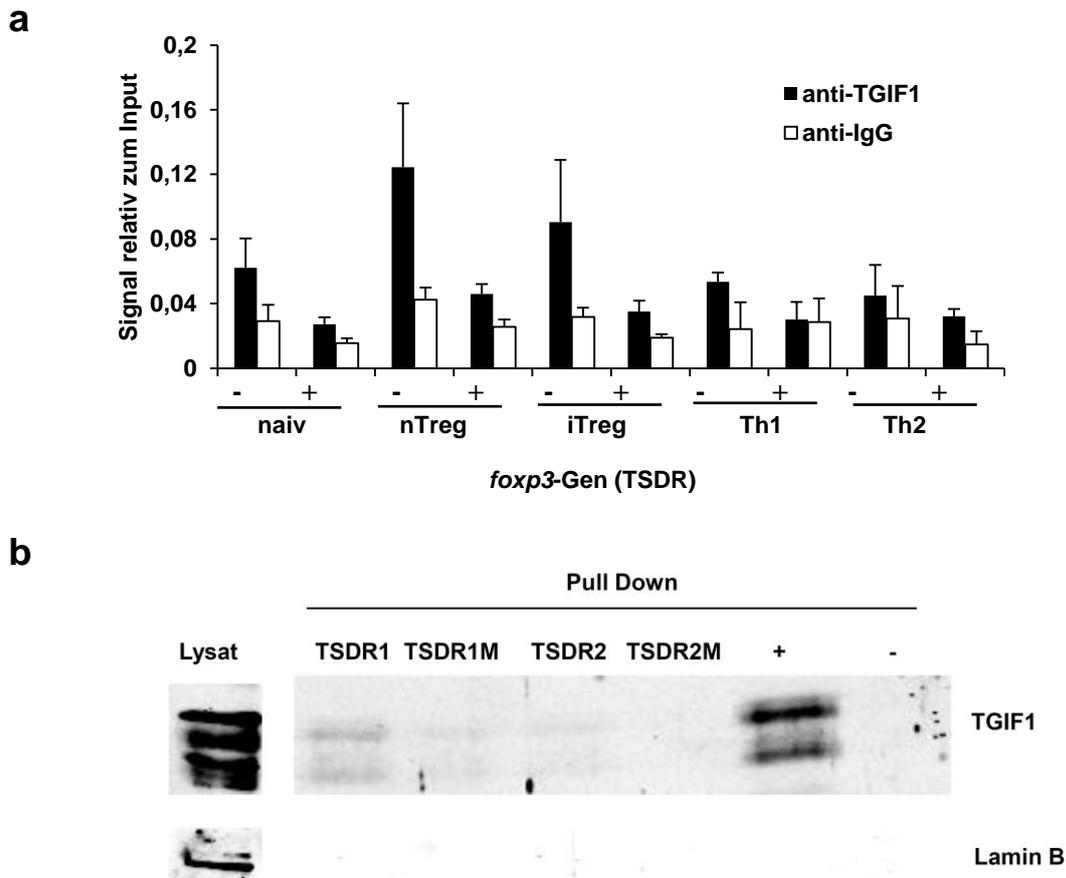
Zusammengefasst wirkte sich ein Fehlen von TGIF1 positiv auf die iTreg Induktion aus. Die Foxp3 Menge pro Zelle blieb dabei jedoch unbeeinflusst. Ein TGIF1 Defizit wirkte sich nicht auf das Proliferationsverhalten der iTreg-Zellen aus, wobei die Zellen etwas mehr als WT-Zellen vor Apoptose geschützt zu sein scheinen. Zudem konnte beobachtet werden, dass ein Knockout von TGIF1 eine hemmende Wirkung auf die IFN- $\gamma$  Produktion unter Th1 polarisierenden Bedingungen *in vitro* hat.

## 2.7 Molekulare Wirkungsmechanismen von TGIF1

Zu klären, ob TGIF1 eine direkte Wirkung auf die Expression von Foxp3 durch Bindung an regulatorische Bereiche des *foxp3*-Gens hat, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit. Um die molekularen Mechanismen von TGIF1 in T-Zellen zu untersuchen, sollten zunächst direkte Zielgene von TGIF1 identifiziert werden. Ein erster Schritt war dabei die genomweite *in silico* Analyse potenzieller Bindestellen von TGIF1. Zusätzlich wurde die Methode der Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) genutzt, um die die Bindung von TGIF1 an die vermuteten Bindestellen zu bestätigen. Für die globale Analyse tatsächlicher Bindestellen von TGIF1 *in vivo* wurde eine relativ neue Methode gewählt, die ChIP-Sequenzierung (ChIP-Seq). Dies ist eine ChIP, gekoppelt mit massiven parallel verlaufenden Sequenzierungen von kurzen präzipitierten DNA-Fragmenten. Mit einer Genexpressionsanalyse von TGIF-KO T-Zellen im Vergleich zu WT-T-Zellen sollte anschließend die Wirkung von TGIF1 auf die Expression von Genen untersucht werden.

### 2.7.1 TGIF1 bindet im *foxp3* und im *klf10* Gen

Eine *in silico* Analyse mit Vorhersage-Programmen für bekannte TF-Bindestellen (MatInspector, RVista) rückte das Augenmerk auf eine bekannte regulatorische Region von *foxp3*, die TSDR-Region. In dieser Region wurden zwei putative Bindestellen für TGIF1 vorhergesagt. Die Bindung von TGIF1 in dieser Region konnte in iTreg-Zellen nTreg-Zellen und in naiven T-Zellen mit Chromatin-Immunoprecipitationen (ChIP) bestätigt werden (s. Abb. 2-16a).



**Abb. 2-16: TGIF1 bindet an eine regulatorische Region im *foxp3*-Gen (TSDR).** a) ChIP mit anti-TGIF1 Antikörper und anti-IgG Antikörper (Kontrollantikörper, sollte kein spezifisches Epitop erkennen). Es wurden  $CD4^+CD25^-$  (naiv) und  $CD4^+CD25^+$  (nTreg) T-Zellen aus Milz und Lymphknoten von Balb/c Mäusen isoliert. Wobei - für ohne TCR-Stimulation und + für TCR-Stimulation 5 h mit je  $3\mu\text{g/ml}$   $\alpha\text{-CD3}/\alpha\text{-CD28}$  Antikörpern (an Kultivierungsplatten gebunden). Zusätzlich wurden  $CD4^+CD25^-$  für fünf Tage unter Th1, iTreg und Th2 polarisierenden Bedingungen kultiviert. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt und die präzipitierte DNA mit q-RT-PCR mit spezifischen Oligonukleotiden für die TSDR-Region in Duplikaten gemessen. b) Pull Down von TGIF1 mit spezifischen biotinylierten Oligonukleotiden von der TSDR-Region mit putativen TGIF-Bindestellen (TSDR1; TSDR2), bzw. mutierte Bindestellen (TSDR1M; TSDR2M). Als Kontroll-Oligonukleotide diente eine TGIF/Meis2 Konsensus-Sequenz (+ Positiv-Kontrolle) und die mutierte Form dieser Sequenz (- Negativ-Kontrolle), die von Santa Cruz erworben wurde. Es wurden Zelllysate von RLM-11 Zellen für den Pull Down mit anti-TGIF Antikörper verwendet. Westernblot-Nachweis von TGIF1 und Lamin B als Kontrolle ( $n = 2$ ).

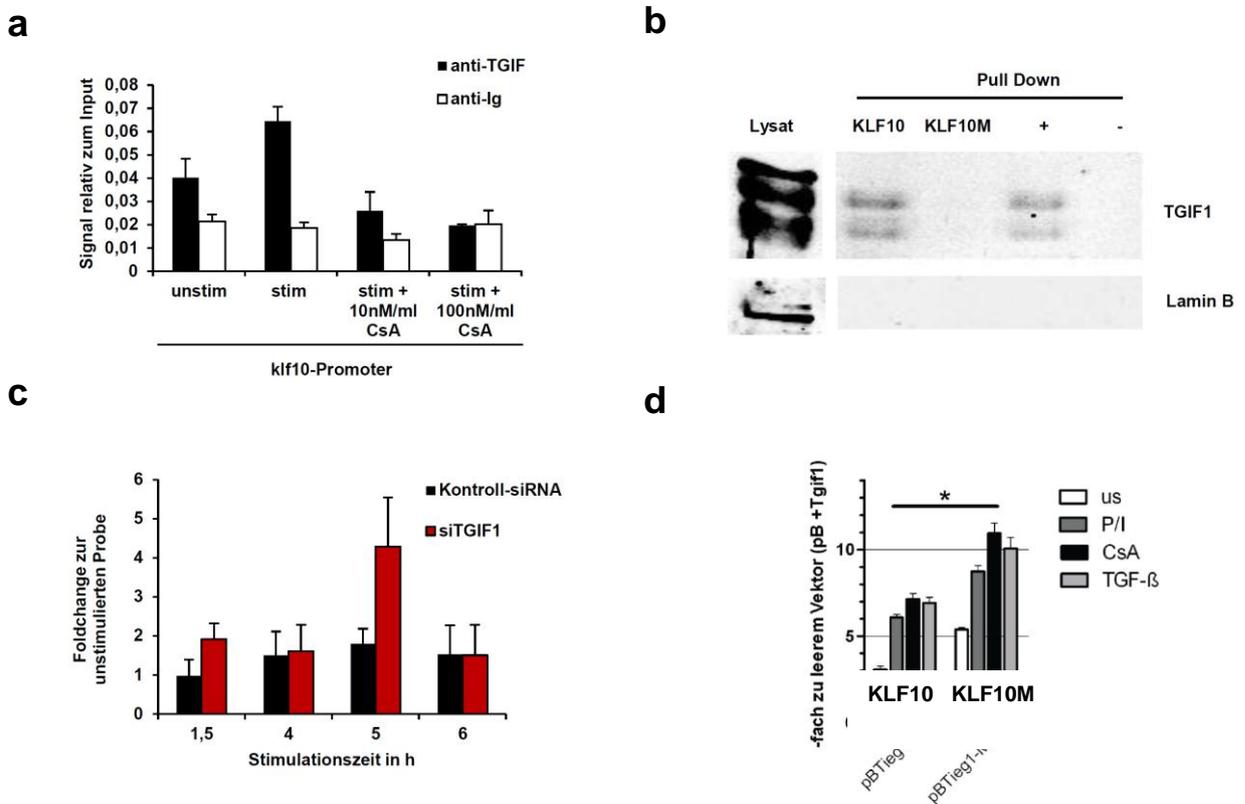
Fünf Stunden nach TCR-Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern zeigte sich die DNA-Bindung von TGIF1 an die TSDR-Region stark vermindert. TGIF1 scheint basal an diese Region zu binden. Um weitere Hinweise auf die Bindungskapazität von TGIF1 an diese Region zu bekommen, wurden zusätzlich Pull Down Experimente mit biotinylierten Oligonukleotiden für TGIF1 mit RLM-11 Zelllysaten durchgeführt. Die dafür verwendeten Oligonukleotide waren spezifisch für den Teil der TSDR-Region, der je eine der beiden Bindestellen für TGIF1 enthielt (TSDR1; TSDR2). Zusätzlich wurden Oligonukleotide benutzt, die eine mutierte TGIF1-Bindestelle enthielten (TSDR1M; TSDR2M). Als Kontroll-Oligonukleotide diente eine TGIF/Meis2 Konsensus-Sequenz (Positiv-Kontrolle) und die mutierte Form dieser Sequenz (Negativ-Kontrolle), die von Santa Cruz erworben wurde. Durch den Pull Down konnte die Bindung von TGIF1 an eine der beiden Bindestellen (TSDR1) validiert werden, wohingegen an der zweiten Stelle kaum TGIF1 binden konnte (Abb. 2-16b; Masterarbeit von Martin Karl, unveröffentlichte Daten). Durch eine Mutation der Bindestelle von TGIF1 in dem TSDR-spezifischem Oligonukleotid konnte die Bindung von TGIF1 an diese Region verhindert werden, da kein TGIF1 Protein mit dem Oligonukleotid präzipitiert werden konnte.

Eine weitere putative Bindestelle von TGIF1 konnte am *klf10* (*tiegl1*) Promoter mit ChIP in murinen naiven T-Zellen verifiziert werden (s. Abb. 2-17a). Der Transkriptionsfaktor KLF10 ist aus der Literatur als Aktivator für *Foxp3* bekannt (Venuprasad et al., 2008). Die Bindung von TGIF1 am *klf10*-Promoter verhielt sich im Gegensatz zur Bindung im *foxp3*-Gen proportional zum TGIF1 Proteinlevel in T-Zellen. So stieg die Bindung von TGIF1 an die DNA (*klf10*-Promoter) in naiven Zellen nach TCR-Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern. Durch zusätzliche CsA Behandlung der Zellen während der Stimulation wurde weniger DNA mit  $\alpha$ -TGIF1 präzipitiert. Dies passte zu der im Westernblot beobachteten Proteinkonzentration von TGIF1 in T-Zellen, die durch CsA Behandlung gesenkt wurde (s. Abb. 2-2).

Das TGIF1 an den proximalen *klf10*-Promoter binden konnte wurde zusätzlich durch Pull Down Experimente für TGIF1 mit biotinylierten Oligonukleotiden mit RLM-11 Zelllysaten verifiziert (s. Abb. 2-17b; Masterarbeit Martin Karl). Mutierte man die Bindestelle von TGIF1 in diesem Bereich, konnte kein Protein mehr präzipitiert werden. Dies spricht für eine direkte Bindung von TGIF1 in der untersuchten Promoter-Region von *klf10*.

Ob sich die TGIF1 Bindung auch auf die Expression von KLF10 auswirkt, wurde durch die Behandlung mit siRNA gegen TGIF1 überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass TGIF1 die Expression von KLF10 fünf Stunden nach TCR-Stimulation inhibiert (s. Abb. 2-17c). Bei

einem Knockdown von TGIF1 mit siRNA ließ sich eine erhöhte RNA-Expression von *klf10* messen.



**Abb. 2-17: TGIF1 reprimiert die Expression von KLF10 durch direkte Bindung an den proximalen Promoter.** Naive T-Zellen von Balb/c Mäusen wurden mit je 3 µg/ml α-CD3/α-CD28 Antikörpern (an Kulturplatten gebunden) für fünf Stunden stimuliert: a) ChIP von TGIF am *klf10*-Promoter mit und ohne Vorbehandlung mit dem Inhibitor CsA. Als Kontrolle diente ein unspezifischer Ig-Antikörper. Mit qRT-PCR wurde die präzipitierte DNA mit spezifischen Oligonukleotiden für das *klf10*-Gen analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei durchgeführten Experimenten. b) Pull Down von TGIF1 mit biotinylierten Oligos mit RLM-11 Lysaten. Verwendet wurden folgende Oligonukleotide: KLF10, welches eine putative Bindestelle von TGIF1 im *klf10*-Promoter enthielt, KLF10M mit mutierte Bindestelle von TGIF1 im *klf10*-Promoter. Als Kontroll-Oligonukleotide diente eine TGIF/Meis2 Konsensus-Sequenz (+ Positiv-Kontrolle) und die mutierte Form dieser Sequenz (- Negativ-Kontrolle), die von Santa Cruz erworben wurde. c) qRT-PCR nach Behandlung mit siRNA gegen TGIF1 oder unspezifischer Kontroll-si-RNA und angegebener TCR-Stimulation. Als Referenzen diente HPRT. Alle Proben wurden auf die unstimulierte Probe normalisiert. d) Luciferaseassay in RLM-11 Zellen mit Co-Transfektion von TGIF-GFP und pGL3-*klf10*-Promoter ohne (KLF10) und mit mutierter Bindestelle von TGIF1 (KLF10M) 24h nach Stimulation bzw. 48h nach Transfektion (us: unstimuliert; P/I: stimuliert mit PMA/iono; CSA: PMA/iono + CsA; TGF-β: PMA/iono + TGF-β Stimulation). Gezeigt ist eines von zwei durchgeführten Experimenten.

Zusätzlich konnte mit einem Luciferaseassay die direkte Regulation der Expression von KLF10 durch TGIF1 verifiziert werden. So wurde zunächst beobachtet, dass eine Co-Expression von TGIF1-GFP und pGL3-*klf10*-Promoter in RLM-11 Zellen eine Erhöhung der Promoter-Aktivität von *klf10* nach TCR-Stimulation zeigte. Dies steht im Gegensatz zu den siRNA Analysen, bei der TGIF1 die Expression von KLF10 vermindert. Mutiert man die

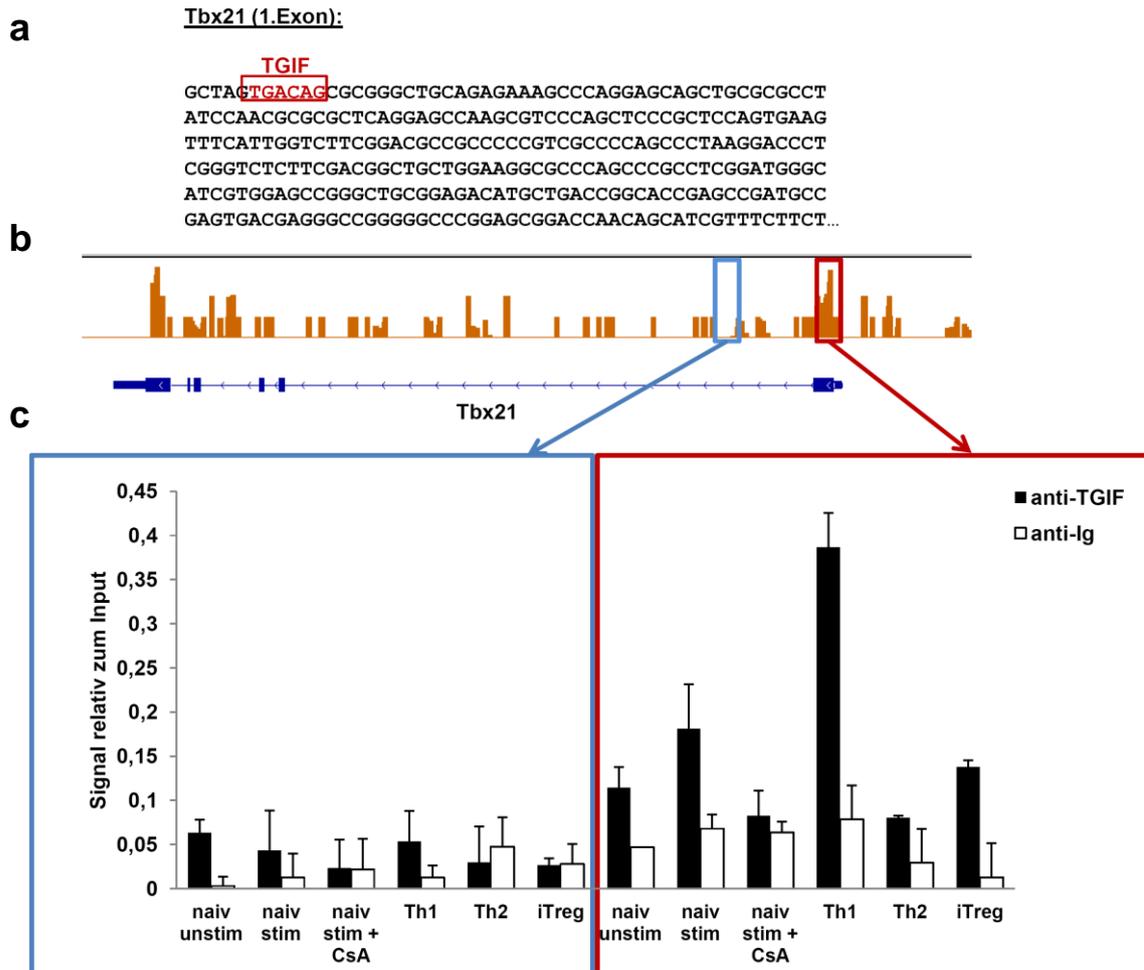
TGIF1-Bindestelle in dem Promoter Konstrukt, so wird die die Aktivität noch einmal gesteigert (s. Abb. 2-17d). Dieser Befund stand im Einklang mit dem siRNA Versuch und der reprimierende Wirkung der direkten TGIF1-Bindung auf die Expression von KLF10.

Zusammengenommen konnte mit diesen Versuchen eine direkte Bindung von TGIF1 an zwei Treg assoziierte Gene nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass TGIF1 direkt an das *foxp3*-Gen und den *klf10*-Promoter binden kann und deren Expression reprimiert.

### **2.7.2 *Tbx21* und *stat3* sind direkte Zielgene von TGIF1**

Um weitere direkte Zielgene von TGIF1 in murinen T-Zellen zu finden, wurde eine ChIP-Sequenzierung (ChIP-Seq) durchgeführt. Diese NGS (*next generation sequencing*) Methode ermöglicht genomweit Zielgene von TGIF1 zu identifizieren. Es wurden naive T-Zellen von B16 Mäusen fünf Stunden mit und ohne CsA Behandlung mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern stimuliert. Anschließend wurden ChIPs von je zehn Proben mit  $\alpha$ -TGIF1 durchgeführt. Die präzipitierte DNA wurde dann von je zehn Proben vereinigt und eine DNA-Bibliothek aus den gepoolten Proben erstellt. Die ChIP-Seq wurde durchgeführt und die Ergebnisse des Sequenzierers (Illumina) bioinformatisch ausgewertet (s. 4.5.3).

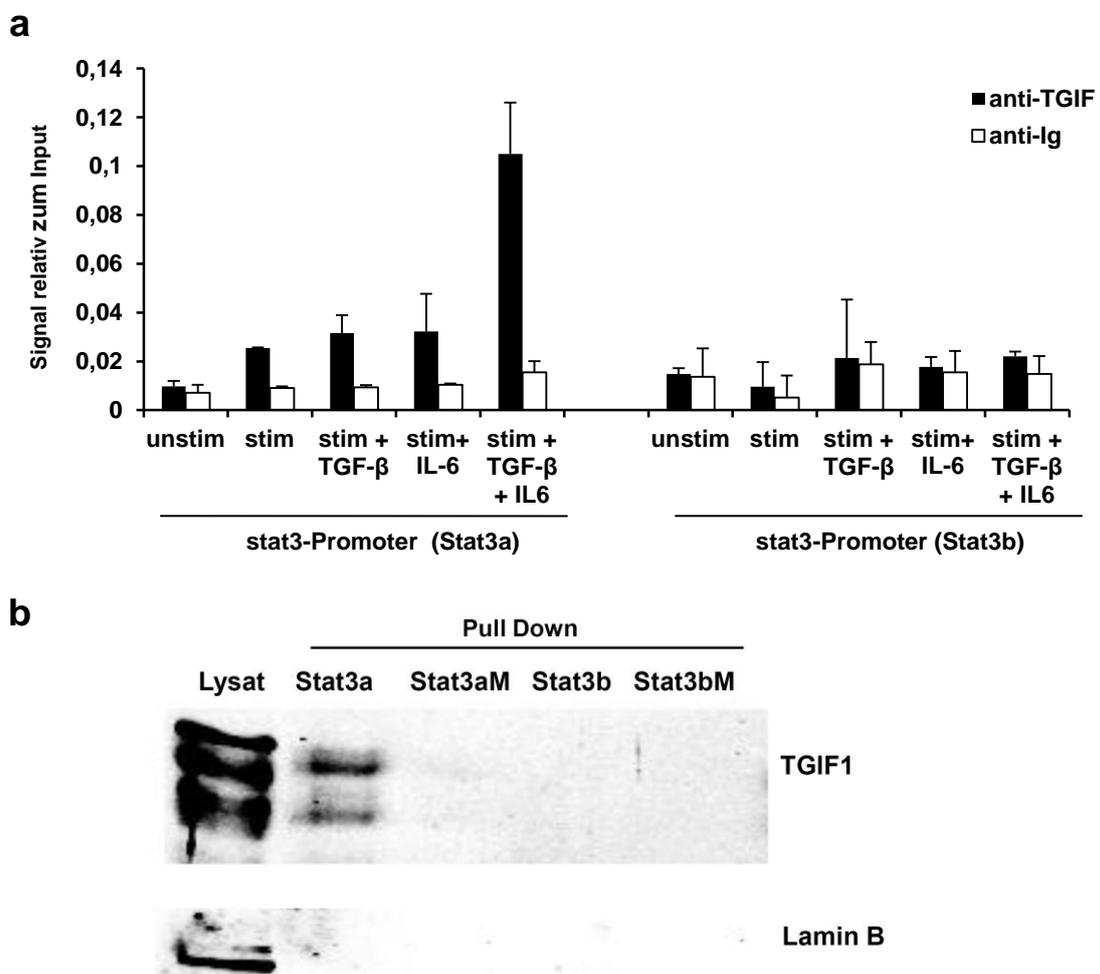
Da TGIF1 die IFN- $\gamma$  Produktion beeinflusste, wurde bei der Auswertung der sequenzierten Proben das *ifng*-Gen einschließlich des Promoterbereiches nach möglichen Bindestellen für TGIF1 untersucht. Mit den gängigen Programmen MatInspector und RVista wurde keine Bindestelle in diesem Bereich des murinen Genoms für TGIF1 vorhergesagt. Daher wurden andere Th1-spezifische Gene analysiert und es zeigte sich eine interessante Stelle bei dieser globalen Analyse im 1.Exon vom *tbx21*-Gen, das für T-bet kodiert. Die Herangehensweise der Analyse der ChIP-Seq-Daten ist am Beispiel *tbx21* in Abb. 2-19 dargestellt. In Abb. 2-19a ist die putative Bindestelle von TGIF1 im *tbx21*-Gen zu sehen. Die Häufung der sequenzierten Fragmente in dieser Region, die dem Mausgenom zugeordnet werden konnten, ist in Abb. 2-19b dargestellt. Die Validierung mit ChIP und anschließender qRT-PCR der präzipitierten DNA mit *tbx21*-spezifischen Oligonukleotiden zeigte eine Bindung von TGIF1 nach TCR-Stimulation von naiven T-Zellen und in *in vitro* polarisierten Th1-Zellen (fünf Tage), jedoch nicht in unstimulierten naiven Zellen oder in Th2-Zellen (fünf Tage unter Th2 polarisierten Bedingungen stimuliert; Abb. 2-19c). Als Kontrollregion für die Überprüfung der Spezifität der TGIF1 Bindung diente eine Stelle im ersten Intron von *tbx21*, in der keine TGIF1 Bindestelle vorhergesagt wird. In dieser Region konnte keine spezifische Bindung von TGIF1 nachgewiesen werden.



**Abb. 2-19: TGIF1 bindet an eine regulatorische Region im *Tbx21* Promoter.** CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> naive T-Zellen wurden aus Milz und Lymphozyten von B16 Mäusen isoliert. Naive T-Zellen wurden für unstim: ohne TCR-Stimulation analysiert oder stim: TCR-Stimulation 5 h mit je 3µg/ml α-CD3/α-CD28 Antikörpern (an Kulturplatten gebunden) mit und ohne Voinkubation von 50 nMol/ml CsA. Für Th1, Th2 und iTreg wurden naive T-Zellen für fünf Tage unter polarisierenden Bedingungen kultiviert und anschließend für fünf Stunden mit anti-CD3/anti-CD28 Antikörpern (an Kulturplatten gebunden) stimuliert. Die TGIF1 Bindung wurde mit anti-TGIF bzw. anti-Ig Antikörper mit ChIP analysiert. a) putative TGIF1 Bindestelle im 1. Exon des *tbx21*-Gens im murinen Genom. b) Häufung von sequenzierten Abschnitten aus der ChIP-Seq für TGIF1 in naiven 5 h mit anti-CD3/anti-CD28 Antikörpern (an Kulturplatten gebunden) stimulierten T-Zellen. c) qRT-PCR nach ChIP mit α-TGIF1 oder α-Ig von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Zellen mit spezifischen Oligonukleotiden im *tbx21*-Gen. blau: Kontrollregion, rot: regulatorische Region mit TGIF1 Bindestelle. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

Ein weiterer interessanter Peak aus der ChIP-Seq von TGIF1 konnte mit ChIP und anschließender qRT-PCR bestätigt werden. Zusätzlich zu der Bindung an *tbx21* konnte die Bindung von TGIF1 an *stat3* nachgewiesen werden. Der Transkriptionsfaktor STAT3 ist wie T-bet ein wichtiger Faktor in der T-Zelldifferenzierung. Es ist bekannt, dass der Transkriptionsfaktor STAT3 durch IL-6 über den IL-6R und die JAK-Kinasen aktiviert wird. Bisher konnte gezeigt werden, dass STAT3 an der Entscheidung beteiligt ist, ob eine naive Zelle zu einer Th17 oder einer Treg Zelle differenziert. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass TGIF1 an den

*stat3*-Promoter (Stat3a) in Abhängigkeit von einer TCR-Stimulation binden kann (s. Abb. 2-20a). Ein Teil der naiven T-Zellen wurde für fünf Stunden unter Th17-Bedingungen (IL-6 + TGF- $\beta$ ) oder unter iTreg Bedingungen (TGF- $\beta$ ) kultiviert. In dem durchgeführten Experiment konnte mit ChIP eine verstärkte Bindung von TGIF1 an *stat3* durch eine zusätzliche Behandlung der naiven T-Zellen mit TGF- $\beta$  und IL-6 während der TCR-Stimulation beobachtet werden (polarisierende Bedingungen für Th17-Differenzierung). Die untersuchte Promoterregion von *stat3* beherbergt eine weitere potentielle Bindestelle für TGIF1. Die Bindung von TGIF1 in dieser Region (Stat3b) konnte weder mit ChIP noch mit einem Pull Down nachgewiesen werden (s. Abb. 2-20a, b).



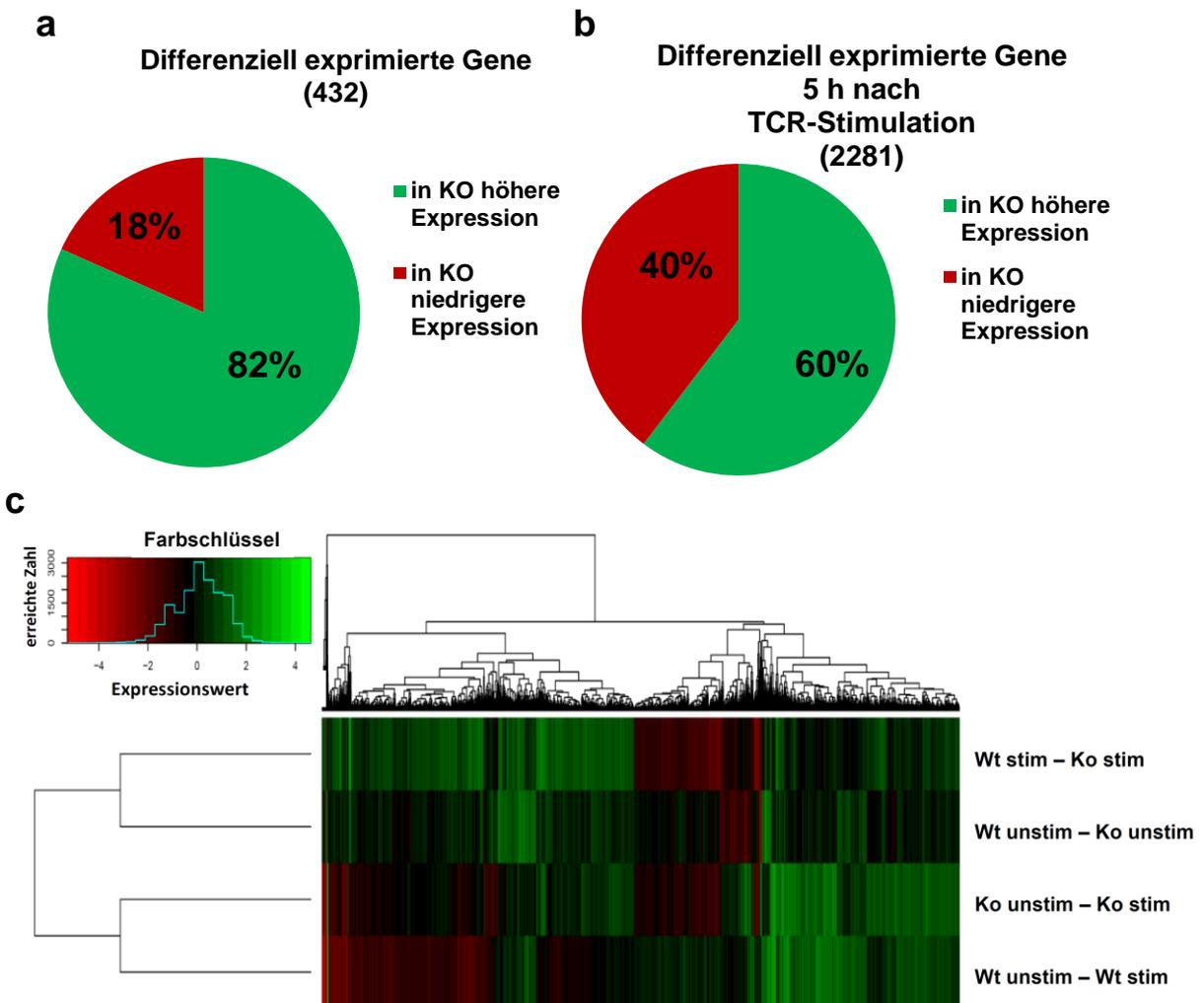
**Abb. 2-20: TGIF1 bindet stimulationsabhängig an den *stat3*- Promoter.** a) RT-PCR nach ChIP mit  $\alpha$ -TGIF1 und *stat3* spezifischen Primern. Es wurden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen von Balb/c Mäusen verwendet. Unstim: ohne TCR-Stimulation; stim: TCR-Stimulation 5 h mit je 3  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 Antikörpern (an Kulturplatten gebunden) stimuliert. Zusätzlich wurden die Zellen während der Stimulation mit TGF- $\beta$  und oder IL-6 behandelt. b) Pull Down von TGIF1 mittels biotinylierten Oligonukleotiden aus dem *stat3*-Promoter. Lysate von RLM-11 Zellen wurden verwendet. Zwei Bindestellen von TGIF1 im *stat3*-Promoter wurden untersucht (Stat3a und Stat3b) als Kontrolle dienten die gleichen Oligonukleotide mit einer mutierten TGIF1-Bindestelle (Stat3aM; Stat3bM).

Um die Bindung von TGIF1 an den *stat3*-Promoter zu verifizieren, wurde zusätzlich ein Pull Down mit zwei biotinylierten Oligonukleotiden (Stat3a, Stat3b), die potentielle TGIF1 Bindestellen im *stat3*-Promoter enthielten, durchgeführt. Die Bindung von TGIF1 an das Oligonukleotid mit der intakten Bindestelle (Stat3a) konnte mit dieser Methode nachgewiesen werden (s. Abb. 2-20b). Mutiert man die Bindestelle von TGIF1 in dieser Region (Stat3aM), konnte keine Bindung von TGIF1 nachgewiesen werden. Die Bindung von TGIF1 in der Region Stat3b war ebenfalls nicht nachweisbar.

Zusammenfassend konnten mit dieser globalen Analyse der ChIP-Seq-Methode 3065 mögliche Zielgene von TGIF1 in T-Zellen identifiziert werden, von denen bisher die Bindung von TGIF1 an *tbx21* und *stat3* verifiziert werden konnten.

### **2.7.3 Differenziell exprimierte Gene in T-Zellen von *tgif1*<sup>-/-</sup> und *tgif1*<sup>+/+</sup> Mäusen**

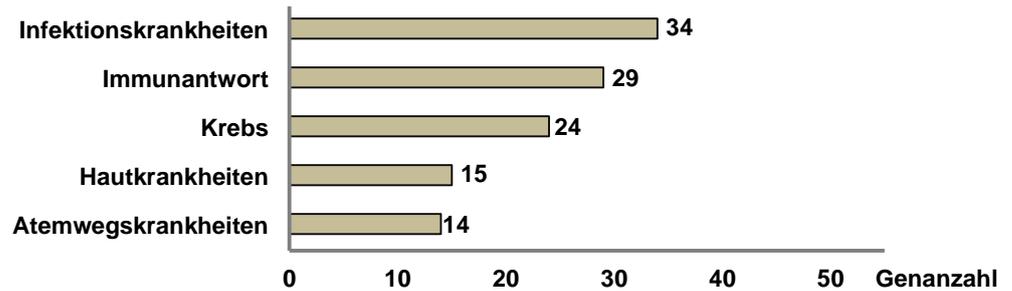
Die ChIP bietet zwar die Möglichkeit die DNA-Bindung eines Proteins *in vivo* nachzuweisen, sagt jedoch nichts über die Funktionalität der Bindung aus. Ob die Expression eines Genes durch die Bindung von TGIF1 beeinflusst wird, sollte mit DNA-Gen-Chips von Wildtyp (Bl6) und *tgif1*<sup>-/-</sup> (KO) T-Zellen untersucht werden. DNA-Gen-Chips bieten den Vorteil einer globalen Analyse des Transkriptoms. Diese Analyse verschafft auch einen Einblick in die Signalwege, an denen TGIF1 in T-Zellen beteiligt ist. Verglichen wurden dabei die Expressionsdaten von unstimulierten naiven T-Zellen von Bl6 (WT)-Mäusen mit Zellen von *tgif1*<sup>-/-</sup> Mäusen, sowie für fünf Stunden mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern stimulierte Zellen. Im Vergleich zu den WT-T-Zellen waren in naiven T-Zellen von *tgif1*<sup>-/-</sup> Mäuse (KO) 432 Gene unterschiedlich reguliert. TGIF1 war bisher vorrangig als Repressor von Signalwegen in Zelllinien bekannt. Es fiel auf, dass 82 % der differenziell exprimierten Gene in den T-Zellen der *tgif1*<sup>-/-</sup> Mäuse höher exprimiert waren als in den WT-Zellen (s. Abb. 2-21a). Betrachtet man die Zellen dazu, im Vergleich 5 h nach TCR-Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern, so waren 2281 Gene differenziell reguliert. 60 % der unterschiedlich exprimierten Gene waren nach Aktivierung in den KO-Zellen höher exprimiert (s. Abb. 2-21b). In Abb. 2-21c ist deutlich zu sehen, dass TGIF1 in unstimulierten Zellen als Repressor wirkt, da die Mehrheit der unterschiedlich differenzierten Gene in den KO-Zellen höher exprimiert ist (Verteilung von grün in Zeile zwei der Clusteranalyse). Nach TCR Stimulation zeigt das Fehlen von TGIF1 positive und negative Effekte auf die Expression von Genen.



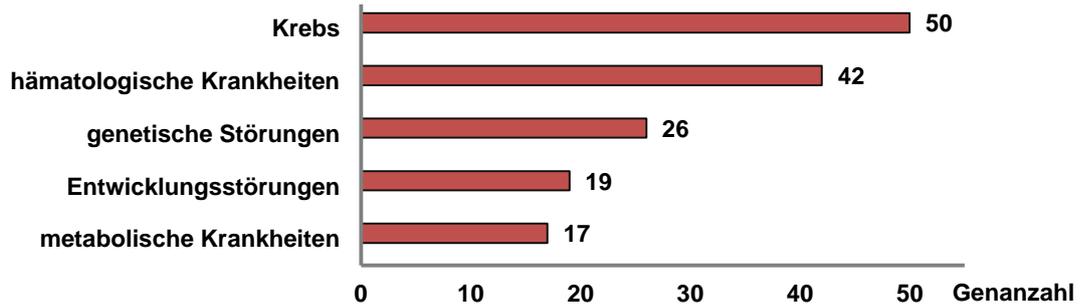
**Abb. 2-21: Differenziell exprimierte Gene im Vergleich von naiven T-Zellen aus *tgif1*<sup>-/-</sup> (KO) und *tgif1*<sup>+/+</sup> (WT) Mäusen.** Microarray-Analyse der RNA-Expression von naiven CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T-Zellen aus Milz und Lymphknoten mit DNA-Genchips (n = 3). a) Gene, die in unstimulierten naiven Zellen unterschiedlich reguliert sind. b) Differenziell exprimierte Gene nach 5 h Stimulation mit  $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 Antikörpern (an Kulturplatten gebunden). c) Clusteranalyse der Genexpression aller differenziell exprimierten Gene, verglichen wurde die Expression von *tgif1*<sup>-/-</sup> Zellen zu Wt-Zellen in unstimulierten naiven Zellen (Wt unstim – Ko unstim) sowie in stimulierten Zellen (Wt stim – Ko stim). Zusätzlich ist die Veränderung der Genexpression durch die TCR- Stimulation in Wt und in Ko-Zellen aufgetragen (Ko unstim – Ko stim; Wt unstim – Wt stim).

Um eine Zuordnung der differenziell exprimierten Gene zu ermöglichen, wurde eine Analyse der Daten mit der IPA Software von Ingenuity Systems durchgeführt. Diese Software bietet z.B. die Möglichkeit, eine Assoziationsanalyse der Gene, zu bekannten Signalwegen, durchzuführen (<http://www.ingenuity.com/>). Als Ausgangspunkt dienten in diesem Fall die Ensemble Gene IDs, der differenziell exprimierten Gene aus der Genexpressionsanalyse. Mit einer Kernanalyse der differenziell exprimierten Gene wurde zunächst die Assoziation der differenziell exprimierten Gene mit bekannten Krankheiten und Funktionsstörungen betrachtet. So zeigte sich unter den differenziell exprimierten Genen eine signifikante Häufung von Genen, die mit Infektionskrankheiten, der Immunantwort oder Krebs assoziiert sind (s. Abb. 2-22a).

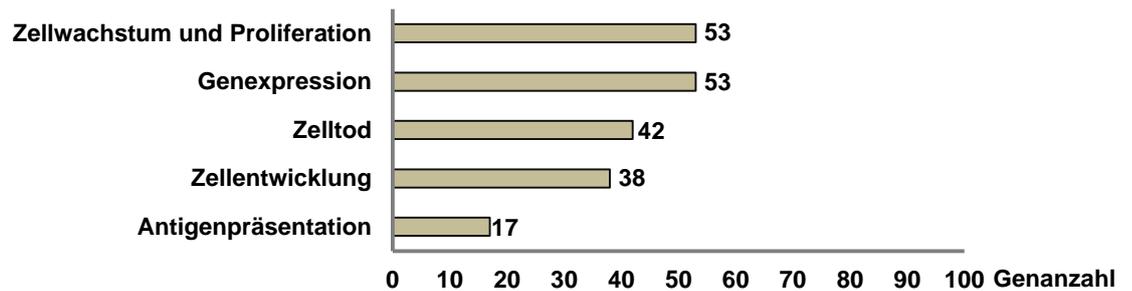
**a** Krankheiten und Funktionsstörungen Wt unstim – Ko unstim



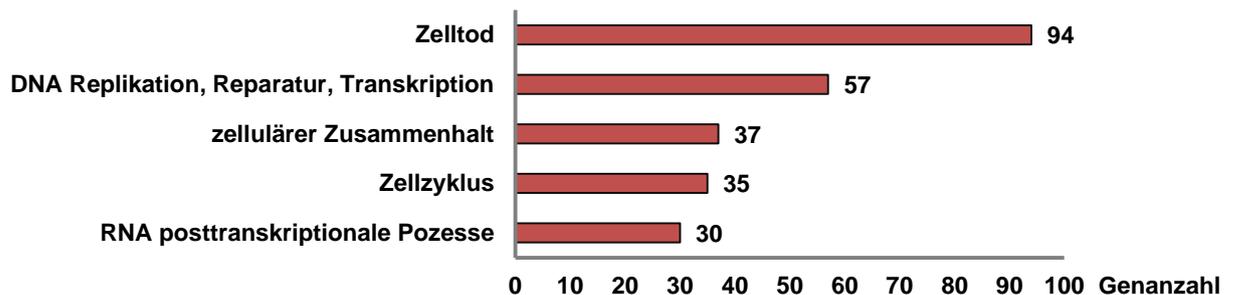
**b** Krankheiten und Funktionsstörungen Wt stim – Ko stim



**c** molekulare und zelluläre Funktionen Wt unstim – Ko unstim



**d** molekulare und zelluläre Funktionen Wt stim – Ko stim



**Abb. 2-22: Assoziationsanalyse von Differenziell exprimierte Gene zwischen *tgif1*<sup>-/-</sup> (KO) und *tgif1*<sup>+/+</sup> (WT) Mäusen mit IPA Software.** Die Ensembl GeneIDs von den differenziell exprimierten Genen aus der Microarrayanalyse wurden für die Analyse verwendet. Dargestellt sind je die Top 5 der signifikant gehäuften Treffer. Assoziation der differenziell exprimierten Gene zwischen Wt- und Ko-Zellen zu bekannten Krankheiten und Funktionsstörungen zwischen a) den unstimulierten Zellen (unstim) in beige und b) den stimulierten T-Zellen in rot. Assoziation der differenziell exprimierten Gene zwischen Wt- und Ko-Zellen zu bekannten molekularen und zellulären Funktionen zwischen c) den unstimulierten Zellen (unstim) in beige und d) den stimulierten T-Zellen in rot.

Bei der Betrachtung der zwischen TGIF-KO und WT-T-Zellen differenziell exprimierten Gene fünf Stunden nach TCR-Stimulation zeigte sich z.B. eine signifikante Häufung von Genen mit Assoziationen zu Krebs, hämatologischen Krankheiten oder genetischen Entwicklungsstörungen (s. Abb. 2-22b). Zur weiteren Einordnung der differenziell exprimierten Gene wurde deren Assoziation mit molekularen und zellulären Prozessen betrachtet. Es zeigten sich Häufungen von Genen, die mit Zellwachstum und Proliferation (53 Gene), Genexpression (53 Gene), Zelltod (42 Gene) und der Zellentwicklung (38) in Verbindung stehen (s. Abb. 2-22c). Für iTreg-Zellen konnten wir bei TGIF-KO Zellen keine veränderte Proliferation nach fünf Tagen beobachten. Möglicherweise wirkt sich TGIF1 auf die Proliferation von Effektor-T-Zellen aus. Bei der Betrachtung der zwischen TGIF-KO und WT-T-Zellen differenziell exprimierten Gene fünf Stunden nach TCR-Stimulation zeigte sich eine starke signifikante Häufung von Genen (94), die mit dem Zelltod assoziiert werden sowie mit Vorgängen an der DNA (57) assoziiert werden (s. Abb. 2-22d).

Zusammenfassend ist zu vermerken, dass 82 % der differenziell exprimierten Gene in unstimulierten naiven T-Zellen mit TGIF1 Defizit eine erhöhte Expression im Vergleich zu den WT-Zellen zeigten. TGIF1 scheint im Basalzustand der naiven T-Zelle als Repressor zu wirken. Nach TCR-Aktivierung der Zellen sind zwischen WT und KO, im Vergleich zum Basalzustand der T-Zellen, fünfmal mehr Gene unterschiedlich reguliert. Die Assoziationsanalysen der differenziell exprimierten Gene weisen auf eine Bedeutung von TGIF1 für den Zelltod hin. Weiterhin scheint TGIF1 für die Immunantwort wichtig zu sein.

#### **2.7.4 Validierung von differenziell exprimierten Genen zeigt den Einfluss von TGIF1 auf die Expression von Genen der Immunantwort**

Die Methode der globalen Genexpressionsanalyse mittels Genchips ist natürlich nicht fehlerfrei. So kann die Anzahl der auf dem Genchips repräsentierten Transkripte und die Verteilung auf dem Chip zu falschen Interpretationen der Ergebnisse führen. Es ist wichtig, die Richtigkeit der als differenziell exprimierten ausgewerteten Gene durch eine qRT-PCR mit spezifischen Oligonukleotiden zu bestätigen. Dabei wurde sich zunächst auf Gene konzentriert, die dafür bekannt sind an der T-Zelldifferenzierung und Immunregulation beteiligt zu sein. Es wurden einige differenziell exprimierten Gene ausgewählt, die mit qRT-PCR in naiven T-Zellen von *tgif1*<sup>-/-</sup> und *tgif1*<sup>+/+</sup> Mäusen verifiziert werden sollten. Zusätzlich wurde die Expression einiger Gene in *in vitro* polarisierten Th1-Zellen nach einem Knockdown von TGIF1 mit shRNA untersucht (retroviralen Transduktion mit shRNA gegen TGIF1). Tab. 2-3

zeigt die zusammengefassten Ergebnisse der bisher untersuchten Gene. Mit qRT-PCR mit spezifischen Oligonukleotiden konnte die differenzielle Expression von *casp4*, *fosl1*, *foxo3*, *il12r2b* und von *tgfbr2* bestätigt werden (s. Tab. 2-3). Die in den Genchips beobachtete differenziell exprimierte Expression von *hdac5* und *ifnz* konnte dagegen nicht bestätigt werden.

**Tab. 2-3: Ausgewählte identifizierte Zielgene von TGIF1**

Genname	unstimuliert <sub>a</sub> WT-KO	stimuliert <sub>b</sub> WT-KO	qRT-PCR <sub>c</sub>	sh RNA <sub>d</sub> gegen TGIF1
<b>Casp4</b>	-	<b>1,54</b> ↑	+	<b>n.u.</b>
<b>CCL22</b>	-	<b>1,80</b> ↑	<b>n.u.</b>	<b>n.u.</b>
<b>CCR8</b>	-	<b>1,61</b> ↓	<b>n.u.</b>	<b>n.u.</b>
<b>Fosl1</b>	-	<b>1,22</b> ↓	+	<b>n.u.</b>
<b>Foxo3</b>	-	<b>1,60</b> ↓	+	+
<b>Foxp3</b>	-	-	+	<b>n.u.</b>
<b>HDAC5</b>	<b>1,45</b> ↑	<b>2,1</b> ↓	-	<b>n.u.</b>
<b>Ifny</b>	-	-	+	+
<b>Ifnz</b>	-	<b>1,34</b> ↑	-	<b>n.u.</b>
<b>Il12Rb2</b>	-	<b>1,35</b> ↓	+	+
<b>Itch</b>	<b>1,57</b> ↓	-	+	+
<b>Klf10</b>	-	-	<b>n.u.</b>	+
<b>SOCS2</b>	-	<b>1,57</b> ↑	<b>n.u.</b>	<b>n.u.</b>
<b>SOCS3</b>	<b>1,04</b> ↑	-	<b>n.u.</b>	<b>n.u.</b>
<b>Tbx21</b>	-	-	+	+
<b>TGF-βRI</b>	-	<b>1,06</b> ↓	+	<b>n.u.</b>

<sub>a</sub> Die Genexpression von naiven CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD45RB<sup>high</sup> Zellen aus *tgif1* +/+ (WT) und *tgif1* -/- (KO) Mäusen wurde unbehandelt (unstimuliert) mit Genchips analysiert. Angegeben ist der Foldchange der Expression zur Wt-Probe wobei ↑ hochreguliert und ↓ runterreguliert bedeutet.

<sub>b</sub> Die Genexpression von naiven CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD45RB<sup>high</sup> Zellen aus *tgif1* +/+ (WT) und *tgif1* -/- (KO) Mäusen wurden nach 5 h Stimulation mit je 3µg/ml α-CD3/ α-CD28 Antikörpern (an Kulturplatten gebunden) (stimuliert) mit Genchips untersucht (n = 3). Angegeben ist der Foldchange der Expression zur Wt-Probe wobei ↑ hochreguliert und ↓ runterreguliert bedeutet.

<sub>c</sub> qRT-PCR Validierung der Genchipexpressionsdaten. Isolierung von RNA aus WT und *tgif1*-/- T-Zellen mit anschließender c-DNA Synthese gefolgt von einer qRT-PCR mit den spezifischen Primern für das jeweils angegebene Gen (n = 2). (n.u. = nicht untersucht; - = keine veränderte Expression; + = differenziell exprimiert).

<sub>d</sub> shRNA: 2 Tage Kultivierung von naiven T-Zellen unter Th1-polarisierenden Bedingungen. Retrovirale Transduktion mit shRNA gegen TGIF1 oder einer Kontroll- shRNA. Analyse der Genexpression mit qRT-PCR nach vier weiteren Tagen der Kultivierung (n = 3). (n.u. = nicht untersucht; - = keine veränderte Expression; + = differenziell exprimiert).

Mit der Hilfe eines retroviral-vermittelten Knockdown von TGIF1 mit shRNA sollte, in *in vitro* polarisierten Th1-Zellen, die Beeinflussung von TGIF1 untersucht werden. Die mRNA Expression der Th1-assoziierten Gene *tbx21*, *ifng* und *il12rb2* war nach vier Tage unter Th1 polarisierenden Bedingungen bei einem shRNA Knockdown von TGIF1 niedriger als bei den Kontrollzellen. Dies passt zu den vorhergehenden Experimente, die eine aktivierende Rolle für TGIF1 in Th1-Zellen vermuten ließen. Der Knockdown von TGIF1 führte zudem zu einer

geringeren Expression von *foxo3* und *itch*. Beide Gene sind mit der Zellapoptose assoziiert. Die geringere Expression in den TGIF1 defizienten Zellen passt zu der beobachteten verringerten Apoptose der iTreg-Zellen der TGIF-KO-Zellen.

In den vorangegangenen Experimenten zeigte sich, dass TGIF1 eine repressive Wirkung auf die Expression des Foxp3-Aktivators KLF10 hat. Wie erwartet zeigte sich *klf10* durch den Knockdown von TGIF1 als höher exprimiert im Vergleich zu den Kontrollzellen. *Foxp3*, *ifng*, *tbx21* und *klf10* tauchten nicht in den Genchips als differenziell exprimiert auf. Für *foxp3*, *ifng* und *tbx21* lässt sich das Ergebnis durch den frühen Zeitpunkt der Analyse (5 h nach TCR-Stimulation) erklären. Alle drei Gene werden erst zu einem späteren Zeitpunkt hochreguliert. Für *klf10* hätten wir eine veränderte Expression erwartet.

Zusammenfassend zeigten diese Versuche, dass TGIF1 in naiven T-Zellen eine repressive Wirkung auf die Expression vieler Gene hat. Nach TCR-Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern kann TGIF1 eine aktivierende (z.B. auf Foxo3) oder eine repressive Wirkung (z.B. auf Casp4) auf die Expression haben. Die Assoziationsanalyse der differenziell exprimierten Gene ließ vermuten, dass TGIF1 die Expression vieler Gene, die eine Rolle in der Immunantwort spielen beeinflusst. Zudem scheint TGIF1 eine Rolle für den Zelltod zu spielen.

## 2.8 Wirkung eines TGIF1 Defizits auf die Zelltransfer-induzierte Colitis

Die Frage, ob die *in vitro* produzierten Daten auch *in vivo* eine Bedeutung haben, sollte mit einem inflammatorischen Mausmodell untersucht werden. Hierzu wurde das Transfer-induzierte Colitis Modell mit RAG<sup>-/-</sup> Mäusen gewählt. Transferiert man naive Treg-freie T-Zellen in die B- und T-zelllosen RAG<sup>-/-</sup> Mäusen, wird eine Entzündung durch die im Darm lebenden Bakterien hervorgerufen. Diese Immunantwort ist vorrangig eine Th1-Antwort. Außerdem ist bekannt, dass eine *de novo* Induktion von Treg-Zellen aus den transferierten naiven T-Zellen in diesem Modell möglich ist (Sun et al., 2007). Daher eignete sich dieses Modell um die Relevanz der vermehrten Foxp3 Induktion und die verringerte Th1-Antwort von *tgif1*<sup>-/-</sup> Zellen *in vivo* zu untersuchen.

### 2.8.1 Zelltransfer von naiven *tgif1*<sup>-/-</sup> T-Zellen löst schwächere Entzündungsreaktionen aus als der Transfer von Wt T-Zellen

Zunächst wurden naive Treg-freie WT (*tgif1*<sup>+/+</sup>) oder naive KO-Zellen (*tgif1*<sup>-/-</sup>) i. v. in acht Wochen alte RAG-Mäuse transferiert. Als Kontrolle dienten RAG<sup>-/-</sup> Mäuse, die anstelle der Zellen PBS erhielten. Vier Wochen nach dem Transfer entwickelten die Mäuse eine leichte Colitis (s. Tab. 2-4), wobei die WT-Zellen in mehr Mäusen eine stärkere Entzündungsreaktion auslösten. Der Score für die Entzündungsreaktion wurde von der Pathologin Dr. Anja Kühl der Charité gegeben und beruht auf einer in der Literatur (Asseman et al., 1999) beschriebenen Skala von 1 - 5. In Tab. 2-4 sind die Score-Werte der histologischen Analyse der Dickdärme zu sehen. Es zeigten mehr KO-Mäuse (*tgif1*<sup>-/-</sup>) einen Score von 2 im Vergleich zu den WT-Mäusen (*tgif1*<sup>+/+</sup>). Die Kontrollmäuse hatten, wie erwartet, einen gesunden Darm mit einem Score von 0.

**Tab. 2-4: Bewertung der histologischen Befunde der Dickdärme der RAG<sup>-/-</sup> Mäuse.**

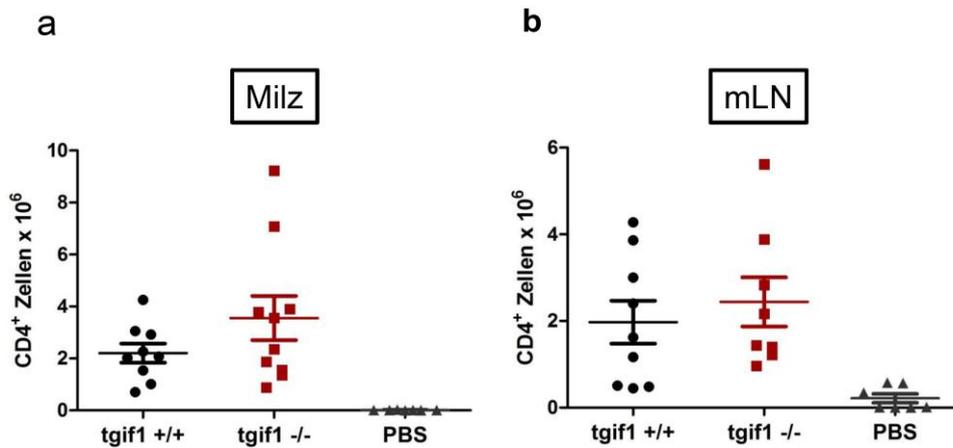
<b>tgif1 +/+<sub>a</sub></b> <b>(n=5)</b>	<b>tgif1 -/-<sub>a</sub></b> <b>(n=4)</b>	<b>PBS<sub>b</sub></b> <b>(n=5)</b>
<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
<b>2</b>	<b>2</b>	<b>0</b>
<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
<b>2</b>		<b>0</b>

<sup>a</sup> Scores für die Stärke der Colitis anhand von Dickdarmschnitten. *Ex vivo* isolierte Milz- und mLN-Zellen vier Wochen nach einem Colitis induzierenden adoptiven Transfer von naiven, Treg-freien (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup>) *tgif1*<sup>-/-</sup> Zellen oder wt-Zellen (*tgif1*<sup>+/+</sup>) in RAG<sup>-/-</sup> Mäuse.

<sup>b</sup> Injektion von PBS anstatt Zellen.

### 2.8.2 Ein TGIF1 Defizit verändert die *in vivo* Expansion der T-Zellen nicht

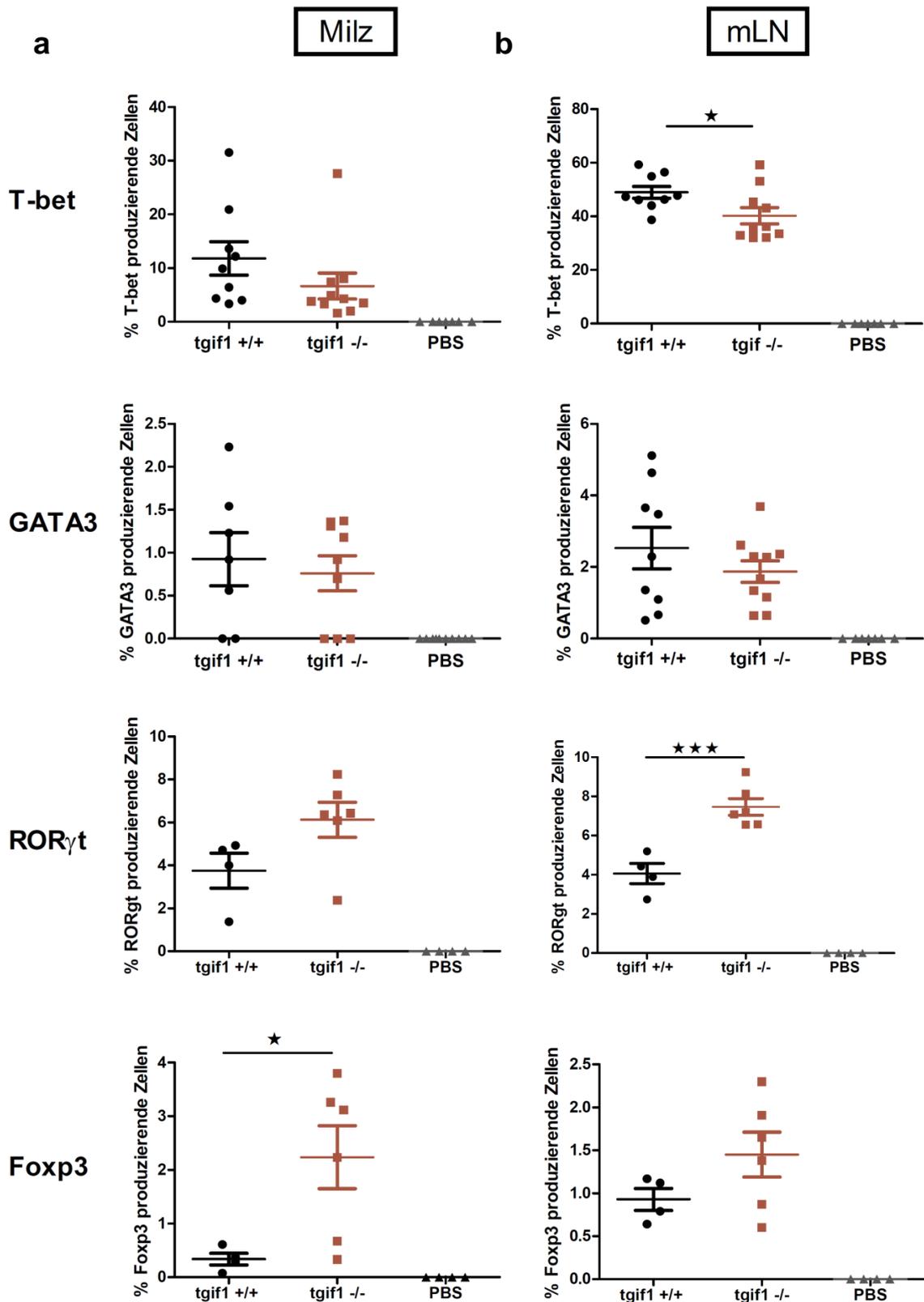
Um die Frage zu beantworten, ob die naiven T-Zellen aus TGIF1 defizienten Mäuse eine veränderte Expansion in den T-Zell und B-Zell-freien System der RAG<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten, wurde die Zellzahl der *ex vivo* isolierten T-Zellen bestimmt. Nach dem Versuch wurden die Milz- und mLN-Zellen separat aufgereinigt und die Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Folgend wurden die isolierten Zellen fixiert und gefärbt. Durch die Oberflächenfärbung und anschließender Durchflusszytometrie konnte der prozentuale Anteil an CD4 positiven Zellen bestimmt werden. Bezogen auf die Menge aller isolierten Zellen wurde die Zellzahl der CD4 positiven Zellen bestimmt. In der Totalzellzahl der *ex vivo* isolierten CD4<sup>+</sup> Zellen aus Milz und mLN der RAG-Mäuse zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den expandierenden *tgif1*<sup>-/-</sup> und *tgif1*<sup>+/+</sup> Zellen (s. Abb. 2-23).



**Abb. 2-23: TGIF1 Defizienz hat keine Auswirkung auf die Proliferation der CD4-Zellen in RAG<sup>-/-</sup> Mäusen.** *Ex vivo* isolierte Milz- und mLN-Zellen vier Wochen nach einem Colitis induzierenden adaptiven Transfer von naiven, Treg-freien (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD45RB<sup>high</sup>) *tgif1*<sup>-/-</sup> Zellen oder wt-Zellen (*tgif1*<sup>+/+</sup>) in RAG<sup>-/-</sup> Mäuse. Totale Zellanzahl von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in a) Milz und b) mLN. Durchflusszytometrie-Analyse von CD4<sup>+</sup>-Zellen und Hochrechnung auf direkt nach Isolation gezählter Gesamtzellzahl der Milzzellen bzw. der Zellen aus den mLN (Neubauer-Zählkammer). Milz: *tgif1*<sup>-/-</sup> (n = 10), *tgif1*<sup>+/+</sup> (n = 9), PBS (n = 7); mLN: *tgif1*<sup>-/-</sup> (n = 8), *tgif1*<sup>+/+</sup> (n = 9), PBS (n = 7).

### 2.8.3 TGIF1 fördert die Foxp3 und ROR $\gamma$ t Expression und hemmt die Expression von T-bet *in vivo*

Es stellte sich die Frage, ob die erhöhte Anzahl an Foxp3-Produzenten, die in den *tgif1*<sup>-/-</sup> T-Zellen in den *in vitro* Kulturen zu beobachten war, auch *in vivo* zu sehen ist. Betrachtete man die *ex vivo* isolierten T-Zellen der Mäuse, in denen eine Colitis induziert wurde, so sah man signifikante Unterschiede in der Expression der Mastertranskriptionsfaktoren je nachdem, ob naive WT-T-Zellen oder KO-T-Zellen transferiert worden. Die Anzahl der Th17-Zellen (ROR $\gamma$ t p = 0,001) und der Treg-Zellen (Foxp3 p = 0,03) aus den *ex vivo* isolierten Zellen war wie erwartet höher in den KO-Zellen. Die TGIF1 defiziente Zellen entwickelten sich in der Transfer-induzierten Colitis signifikant häufiger zu Foxp3 und ROR $\gamma$ t positiven Zellen. Die Zahl der GATA3 positiven Zellen war wie zu erwarten in der Th1 dominierten Immunantwort der RAG-Colitis sehr gering und nicht signifikant unterschiedlich zwischen den WT und KO-T-Zelltransferierten Gruppen. Die Zahl der T-bet Produzenten war in mLN signifikant niedriger (p = 0,0362) in den T-Zellen der RAG-Mäuse, die die KO-Zellen (*tgif1*<sup>-/-</sup>) bekommen haben (s. Abb. 2-24). Die *ex vivo* isolierten Milzzellen der RAG-Mäuse zeigten eine weite Streuung der Zahl an T-bet positiven Zellen und somit auch keine signifikanten Unterschiede allerdings mit der Tendenz zu geringeren T-bet Zellzahlen in den *tgif1*<sup>-/-</sup> Zellen.



**Abb. 2-24: *In vivo* Differenzierung von TGIF1 defizienten CD4 Zellen in RAG<sup>-/-</sup> Mäusen.** Adoptiver Transfer von naiven, Treg-freien (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup>) *tgif1*<sup>-/-</sup> Zellen oder wt-Zellen (*tgif1*<sup>+/+</sup>) in RAG<sup>-/-</sup> Mäuse. Vier Wochen nach Transfer erfolgte die Isolierung der Milz- und mLN-Zellen. Die Mastertranskriptionsfaktoren von Th1(T-bet), Th2 (GATA3), Th17(ROR $\gamma$ t) und Treg-Zellen (Foxp3) wurden nach Färbung mit spezifischen Antikörpern mit Durchflusszytometrie analysiert. a) *ex vivo* isolierte Milzzellen. b) *ex vivo* isolierte mLN-Zellen. Als Kontrolle dienten Mäuse, die an Stelle der Zellen nur PBS bekommen haben.

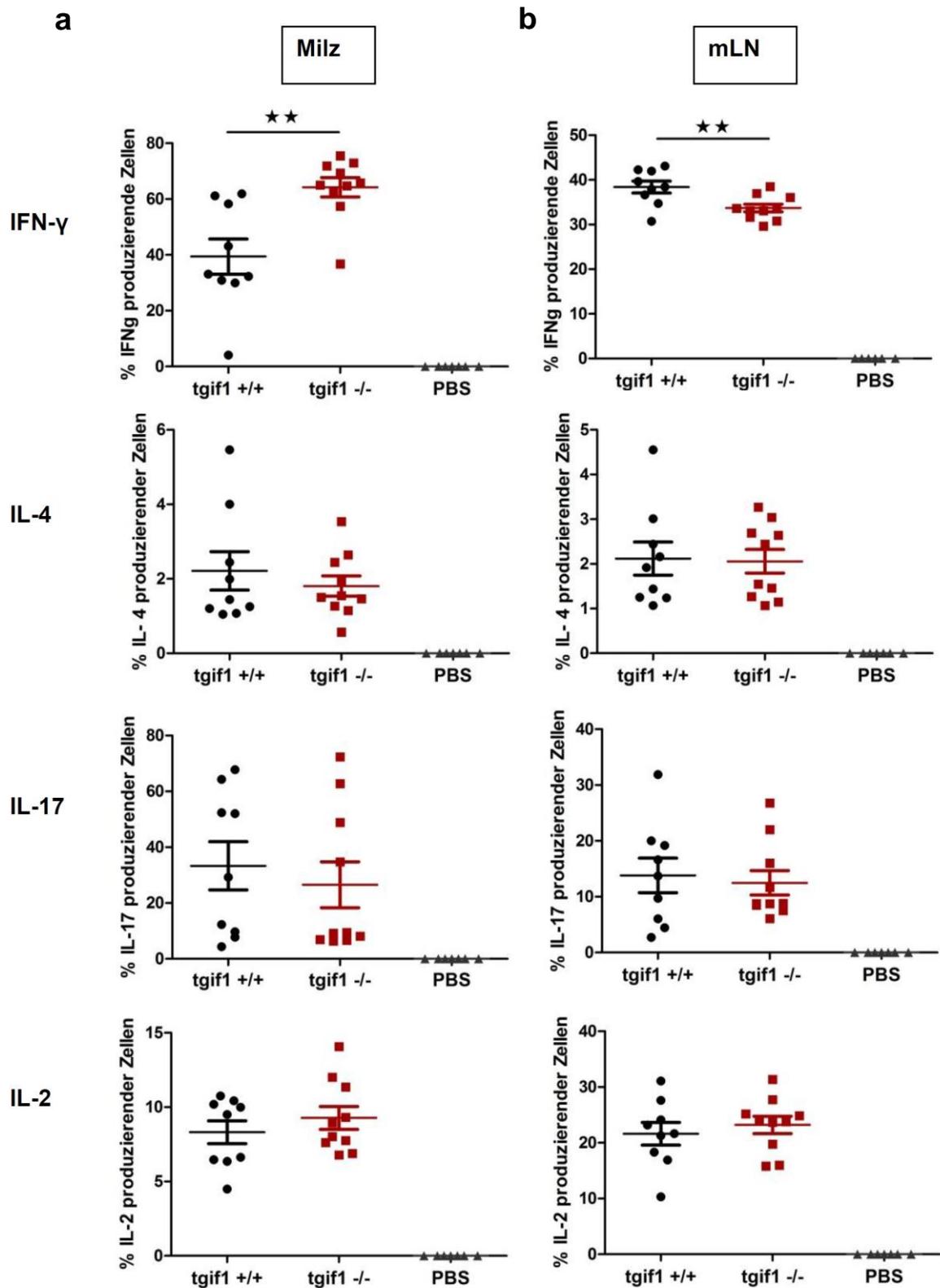
## 2.8.4 TGIF1 spielt eine Rolle in der IFN- $\gamma$ Produktion

Die Immunantwort wird maßgeblich von der Cytokinproduktion bestimmt. Zusätzlich zu den Transkriptionsfaktoren wurde daher auch die Cytokinproduktion nach Re-Stimulation der *ex vivo* isolierten Zellen aus dem Colitis-Experiment mit Durchflusszytometrie untersucht.

In dem RAG *-/-* Transfer induziertem Colitis-Modell zeigen sich unter den *ex vivo* isolierten Zellen aus den RAG-Mäusen, die naive Zellen von *tgif1 -/-* Mäusen bekommen haben in der Milz signifikant mehr ( $p = 0,0025$ ) und in den mLN ( $p = 0,008$ ) signifikant weniger IFN- $\gamma$  Produzenten nach Re-Stimulation mit PMA/iono (s. Abb. 2-25). Im Vergleich zu der IFN- $\gamma$  Produktion hatte TGIF1 keinen Einfluss auf die Produktion von IL-4, IL-2 und IL-17 nach Re-Stimulation der *ex vivo* isolierten Zellen. Abbildung 2-25 zeigt, dass keine Unterschiede in der Zahl der IL-2, IL-4 und IL-17 Produzenten nach Re-Stimulation der *ex vivo* isolierten Zellen im Vergleich von *wt-* und *tgif1 -/-* transferierten Zellen bestanden.

Zusammengefasst zeigte sich in dem Colitis-Modell, dass bei TGIF1 Defizienz der naiven T-Zellen weniger Th1-Zellen in den RAG Mäusen induziert wurden. Eine TGIF1 Defizienz der transferierten naiven T-Zellen führte zudem zu einer verringerten Anzahl an IFN- $\gamma$  Produzenten nach Restimulation der *ex vivo* Zellen aus den mLN. Diese Befunde stehen in Einklang mit den *in vitro* Daten. Die Zahl der IFN- $\gamma$  Produzenten in der Milz war jedoch höher in den TGIF1 defizienten Zellen. Dieser Gegensatz muss in nachfolgenden Untersuchungen weiter beleuchtet werden. Die Zahl der sich entwickelten T-Zell-Subpopulationen in den RAG-Mäusen, dessen Induktion in der Peripherie von TGF- $\beta$  abhängig ist (Th17 und iTreg-Zellen), war bei dem Transfer von *tgif1 -/-* naiven T-Zellen höher als bei dem Transfer von naiven WT-T-Zellen. Dieser Befund war stimmig zu den *in vitro* Kulturen mit den TGIF 1 defizienten Zellen. Bei der *in vitro* Induktion von iTreg Zellen war keine Wirkung von TGIF1 auf die Proliferation zu beobachten. Die Total-Zellzahlen der *ex vivo* isolierten Zellen aus den RAG-*-/-* Mäusen vier Wochen nach Transfer unterschieden sich wie erwartet weder in mLN noch in der Milz.

Abschließend ist festzustellen, dass TGIF1 einen signifikanten Einfluss auf die T-Zelldifferenzierung *in vitro* und *in vivo* hat.



**Abb. 2-25: *In vivo* Differenzierung von TGIF1 defizienten CD4 T-Zellen in RAG<sup>-/-</sup> Mäusen.** Adoptiver Transfer von naiven, Treg-freien (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup>) *tgif1*<sup>-/-</sup> Zellen oder wt-Zellen (*tgif1*<sup>+/+</sup>) in RAG<sup>-/-</sup> Mäuse. Vier Wochen nach Transfer erfolgte die Isolierung der Milz- und mLN-Zellen. Die Cytokinproduktion wurde 5 h nach Re-Stimulation mit PMA/iono und Brefeldin und Färbung mit spezifischen Antikörpern mit Durchflusszytometrie analysiert. a) *ex vivo* isolierte Milzzellen; b) *ex vivo* isolierte mLN-Zellen. Als Kontrolle dienten Mäuse, die an Stelle der Zellen nur PBS transferiert bekommen haben. Dargestellt sind die Tiere aus zwei Experimenten. Jeder Punkt steht für ein Tier.

## 3 Diskussion

### 3.1 Das Adenoviral-vermittelte System als Alternative zur retroviralen Transduktion von primären T-Zellen

Primärzellen lassen sich schlecht bis gar nicht mit herkömmlichen Methoden, wie z.B. der Calcium-Phosphat-Methode oder der Elektroporation transfizieren. Ein Problem bei diesen Methoden ist der hohe Calciumeinstrom, der schon ungewünschte Signaltransduktionsprozesse einleitet. Ein weiteres Problem ist die hohe Sterberate der Primärzellen bei diesen Methoden (Hurez et al., 2002b).

Durch adenoviral-vermittelten Gentransfer lassen sich ruhende und proliferierende Zellen mit hoher Rate transduzieren (s. Abb. 2-7). Der Virusstock lässt sich mit HEK293A Zellen mit hohem Titer leicht generieren und es können auch sehr große Vektoren in Zellen eingeschleust werden (Nevins et al., 1997). Eine bessere Expressionsrate bei Verwendung eines Ubiquitin-Promoters im Vergleich zu einem CMV-Promoter konnte in mehreren Studien beobachtet werden, daher wurde in den hier durchgeführten Experimenten ein U6-Promoter verwendet (Hurez et al., 2002a; Wan et al., 2000). Die Eignung dieses Systems für adoptiven Transfer von Zellen wurde in einer Studie von 2000 geprüft. Auch *in vivo* Transduktionen lassen sich mit diesem Modell untersuchen (Wan et al., 2000).

Die T-Zell-spezifische Überexpression von TGIF1 in naiven Zellen *ex vivo* isolierten Zellen wurde durch die Etablierung der adenoviral-vermittelten Transduktion ermöglicht. Diese Methode zur Manipulation von primären T-Zellen bietet viele Vorteile im Vergleich zu einem retroviral-vermittelten System. In dem System ist keine Voraktivierung der T-Zellen, wie bei Retroviren nötig. Die Zellen behalten daher ihre Naivität bei. Die DO11.10-CAR Maus bietet zudem die Möglichkeit einer Antigen-spezifischen Stimulation mit dem Ova-Peptid. Nachteile dieses Systems sind die transiente Expression des Gens und das Arbeiten unter S2-Bedingungen.

Die Transduktion von primären T-Zellen mit Adenoviren ist ein gutes Werkzeug für die Untersuchung von Aktivierungs- und Differenzierungsprozessen. So lässt sich anstelle der Überexpression auch ein Knockdown des zu untersuchenden Gens durch sh-RNA untersuchen.

## 3.2 TGIF1 ist ein Regulator der T-Zelldifferenzierung

Das adaptive Immunsystem ist abhängig von einer intakten T-Zelldifferenzierung. Die Differenzierung von naiven T-Zellen zu Th-Zellen und iTreg-Zellen in der Peripherie ist ein vielschichtiger Prozess. Die Entscheidung über die Differenzierungsrichtung, die eine Zelle einschlägt wird durch die Aktivierung der Zelle über den TCR-Stimulus und das vorherrschende Cytokinmilieu getroffen. Ein schwacher TCR-Stimulus, sowie das Vorhandensein von TGF- $\beta$  lassen eine Differenzierung zu iTreg-Zellen zu. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor TGIF1 die Differenzierung von naiven T-Zellen zu iTreg-Zellen inhibiert.

### 3.2.1 Die Expression von TGIF ist abhängig von Stärke und Dauer des T-Zell-Stimulus

Ein Ziel dieser Arbeit war es, einen Transkriptionsfaktor zu charakterisieren, der an der frühen Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen beteiligt ist. Im Rahmen der dokumentierten Versuche konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor TGIF1 wenige Stunden nach TCR-Stimulation induziert und aktiviert wird (s. Abb. 2-1 bis 2-5). Das Proteinlevel von TGIF1 stieg proportional zum TCR-Stimulus. Wie wird die Expression von TGIF1 reguliert? In verschiedenen Zelllinien wie z.B. HUT78 und HepG2 Zellen konnte gezeigt werden, dass die Expression von TGIF1 von TGF- $\beta$  abhängig ist (Chen et al., 2003a). Im Gegensatz dazu zeigten die Untersuchungen dieser Arbeit keine Beeinflussung der Expression von TGIF1 von TGF- $\beta$  in T-Zellen, weder auf RNA-(nicht gezeigt) noch auf Proteinebene (s. Abb. 2-3). Dies spricht für eine zellspezifische Regulierung von TGIF1. Allerdings wurde in einer Studie von 2010 eine Abhängigkeit der TGIF1 Expression von Smad2 und 3 in T-Zellen gezeigt. So zeigten Smad-defiziente Zellen nach vier Tagen iTreg Polarisierung eine verringerte RNA-Expression von TGIF1 im Vergleich zu den WT-Zellen (Li et al., 2008). Die TGIF1 Expression soll in weiterführenden Experimenten in polarisierten Zellen in einer Zeitkinetik untersucht werden. Erste vorläufige Experimente zeigten jedoch im Gegensatz zu einer Studie von 2008, in der eine erhöhte TGIF1 Expression in iTregs sowie in nTregs gezeigt wurde, dass TGIF1 in Th1-Zellen höher und in Treg-Zellen geringer exprimiert ist im Vergleich zu naiven T-Zellen (Wei et al., 2009). Aber wie wird die Expression von TGIF1 wenige Stunden nach TCR-Stimulation reguliert?

Eine Möglichkeit der Regulation der TGIF1-Expression in T-Zellen konnten vorhergehende ChIP Experimente aufzeigen. So konnte eine Bindung von NFATc2 an den *tgif1*-Promoter

beobachtet werden (Vladimir Pavlovic; unveröffentlichte Daten). Der Transkriptionsfaktor NFATc2 ist einer der essentiellen Transkriptionsfaktoren in der T-Zellaktivierung und Differenzierung (Rao et al., 1997). Er wird in den meisten Zellen des Immunsystems exprimiert und hat diverse Rollen in der transkriptionellen Kontrolle der Immunantwort (s. Abb. 1-2). In T-Zellen ist NFATc2 ubiquitär exprimiert und transloziert wenige Minuten nach TCR-Aktivierung in den Kern, wo NFATc2 die transkriptionelle Expression von Cytokinen und weiterer Transkriptionsfaktoren reguliert. CsA hemmt die NFAT Aktivierung über Calcineurin (Roehrl et al., 2004). In den durchgeführten Experimenten konnte eine Inhibierung der Expression von TGIF1 durch CsA Behandlung gezeigt werden. Die Hemmung könnte so indirekte über NFATc2 erfolgen.

Im Rahmen dieser Studie konnte gezeigt werden, dass *tgif1* nicht nur NFAT-abhängig nach TCR-Stimulation exprimiert wird sondern zudem posttranslational modifiziert wird (s. Abb. 2-3, 2-5 und 3-1).

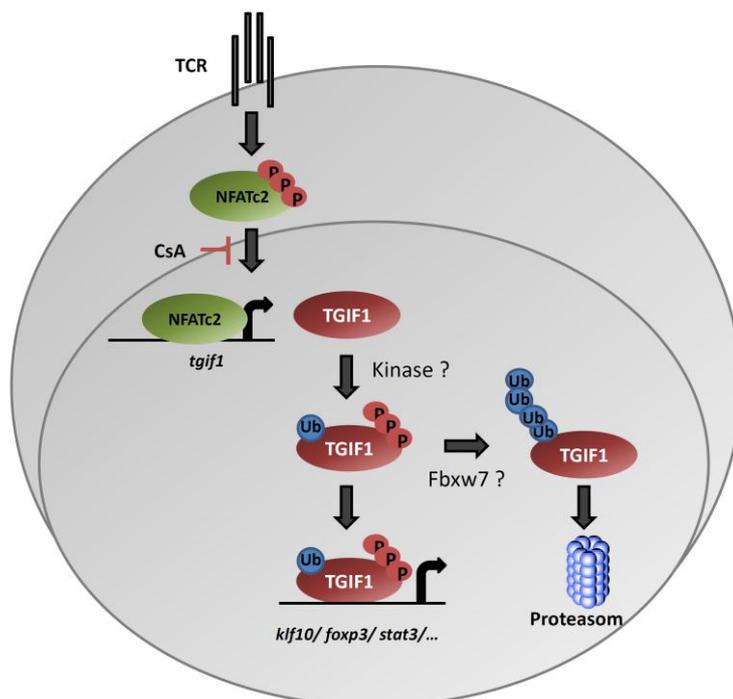


Abb. 3-1: Modell für die Aktivierung und den Abbau von TGIF1 in T-Zellen nach TCR-Stimulation.

So konnte in dieser Arbeit eine Monoubiquitinierung nach TCR-Stimulation nachgewiesen werden. Die Mono-Ubiquitinierung bestimmt im Gegensatz zur Poly-Ubiquitinierung das Protein nicht für den Abbau sondern erhöht die Stabilität des Proteins, sowie seine Bindungskapazität (Venuprasad et al., 2008). In dieser Arbeit konnten neben einer Mono-Ubiquitinierung auch Phosphorylierungen des Proteins in T-Zellen nach Stimulation beobachtet werden. TGIF1 liegt jedoch auch in unstimulierten Zellen phosphoryliert vor. Ob die

Phosphorylierung einen Einfluss auf die Aktivität des Proteins hat bleibt noch zu klären. Welche Kinase TGIF1 phosphoryliert ist bisher noch nicht bekannt. Der Einsatz von spezifischen Kinaseinhibitoren könnte Aufschluss über die verantwortliche Kinase geben.

Weiterhin stellte sich die Frage wie die Expression von TGIF1 wieder gesenkt wird. Bereits acht Stunden nach TCR-Stimulation fällt das TGIF-Proteinlevel auf die basale Expression. Die Dephosphorylierung und oder die Polyubiquitinierung von TGIF1 könnten Mechanismen sein, die es ermöglichen TGIF1 wieder abzuschalten. Welches Protein vermittelt den Abbau von TGIF? In Krebszelllinien konnte gezeigt werden, dass Fbxw7 für die Degradation von TGIF1 verantwortlich ist (Bengozhea-Alonso and Ericson 2010; s. Abb. 3-1). Ob der Tumorsuppressor Fbxw7 auch in T-Zellen TGIF1 für den Abbau bestimmt, könnte z.B. mit Co-IPs aufgeklärt werden.

Wie kann man sich die Regulierung von TGIF1 in der T-Zelle vorstellen? Der TCR-Stimulus führt zur Aktivierung von NFATc2 durch Dephosphorylierung. Aktiviertes NFATc2 transloziert in den Kern und aktiviert durch direkte Bindung an den *tgif1*-Promoter dessen Expression. TGIF1 wird durch eine Kinase phosphoryliert und monoubiquitiniert. Es bindet so an seine Zielgene und reguliert die frühe Differenzierungsphase der T-Zellen. Bereits nach acht Stunden erfolgt der Abbau von TGIF1. Durch Polyubiquitinierung von Fbxw7 könnte TGIF1 für den proteasomalen Abbau markiert werden (s. Abb.3-1).

### **3.2.2 TGIF1 wirkt als Repressor in naiven T-Zellen**

Viele Gene, die in der frühen Aktivierungsphase hochreguliert werden, sind maßgeblich an den Differenzierungsprozessen der Zellen beteiligt (Venuprasad et al., 2008). Welche Aufgaben hat TGIF1 in der frühen Regulation der Differenzierung von naiven T-Zellen? Betrachtete man die Gen-Expressionsanalysen der naiven T-Zellen dieser Arbeit, so waren 82 % der differenziell exprimierten Gene (432) in den T-Zellen von *tgif1*<sup>-/-</sup> Mäusen höher exprimiert im Vergleich zu den Wildtypzellen (*tgif1*<sup>+/+</sup>). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass TGIF1 in naiven Zellen eine vorwiegend repressive Wirkung hat. TGIF1 könnte auf diesem Weg die Bindung aktivierender Transkriptionsfaktoren an diese Genloci verhindern und so den Ruhezustand der naiven Zellen beibehalten. Es konnte zudem in Zelllinien gezeigt werden, dass TGIF1 andere Co-Repressoren rekrutiert und mit ihnen interagiert. So konnte in COS1 Zellen gezeigt werden, dass TGIF1 die Co-Repressoren CtBP (*carboxyl terminus binding protein*), mSin3 und HDAC1 zu TGF- $\beta$  abhängigen Genen rekrutiert und so dessen Expression reprimiert (Wotton et al., 1999a);(Melhuish and Wotton, 2000). Ob TGIF1 in

T-Zellen mit den gleichen Co-Repressoren interagiert soll in zukünftigen Versuchen mittels Co-IPs und SILAC (*Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture*) geprüft werden. In 5h stimulierten T-Zellen, zeigten sich mehr als 2000 Gene als differenziell exprimiert zwischen Wildtyp und TGIF1 defizienten T-Zellen. Die hohe Anzahl der durch das TGIF1 Defizit unterschiedlich exprimierten Gene wirft die Frage auf, ob TGIF1 selbst viele Zielgene hat oder über einen anderen Faktor indirekt wirkt? In einer Studie von 2001 konnte gezeigt werden, dass TGIF1 mit c-Jun interagieren kann und durch diese Bindung die Bindung von TGIF1 zu Smad-Proteinen stabilisiert wird (Pessah et al., 2001). Da diese Befunde ebenfalls aus Zelllinien (COS7, HepG2, Mv1Lu) stammen, ist zu prüfen, ob c-Jun auch in T-Zellen ein Bindungspartner von TGIF1 ist. C-Jun bildet zusammen mit c-Fos den Transkriptionsfaktor AP1, der wie NFATc2 eine wichtige Rolle in der T-Zellaktivierung und Differenzierung spielt. So ist AP1 z.B. für die Induktion der IL-2 Produktion essentiell (Bendfeldt et. al., unveröffentlicht).

Mit Hilfe der ChIP-Sequenzierung wurden 3065 mögliche Zielgene von TGIF1 identifiziert. Allerdings konnte keine signifikante Häufung des bekannten TGIF1 Bindemotifs unter ihnen ausgemacht werden. Das TGIF1 auch indirekt an Gene ohne TGIF1 Bindestelle über Smad-Proteine binden kann, konnte in einer Studie von 2005 gezeigt werden. In diesem Zusammenhang konnte die Inhibierung von RA-abhängigen Genen durch TGIF1 in Zelllinien gezeigt werden (Bartholin et al., 2006). In der Literatur ist in einer weiteren Studie beschrieben, dass TGIF1 RA-abhängige Gene reguliert (Hamid and Brandt, 2009). Sie konnten mit einer ChIP-Sequenzierung von TGIF1 in einer myeloiden Zelllinie und parallel verlaufenden Expressionsanalysen zeigen, dass TGIF1 einige TGF- $\beta$  abhängige und RA-abhängige Gene reguliert. In den ChIP-Seq-Analysen und den Genexpressionsanalysen, der in dem Rahmen dieser Studie durchgeführten Versuche konnten jedoch nur wenige Übereinstimmungen beobachtet werden. So tauchten lediglich die Gene *cd38*, *ifnz*, *itch* und *stat3* in beiden Studien als TGIF1 Zielgene auf. Die geringe Übereinstimmung lässt vermuten, dass TGIF1 in myeloiden Zellen andere Aufgaben im Vergleich zu T-Zellen hat. Zudem zeigen Signalwege in Krebszelllinien oft kein Abbild gesunder Zellen.

In Abbildung 3-2 sind die möglichen transkriptionellen Wirkmechanismen von TGIF1 in T-Zellen auf transkriptioneller Ebene dargestellt. So kann man sich vorstellen, dass TGIF1 direkt über ein TGIF1-Bindemotif allein oder mit einem oder mehreren Transkriptionsfaktoren an die DNA bindet und so eine aktive bzw. repressive Wirkung auf die Genexpression hat. Oder aber TGIF1 bindet indirekt über Smad-Proteine oder andere Transkriptionsfaktoren an die DNA und reguliert so die Genexpression.

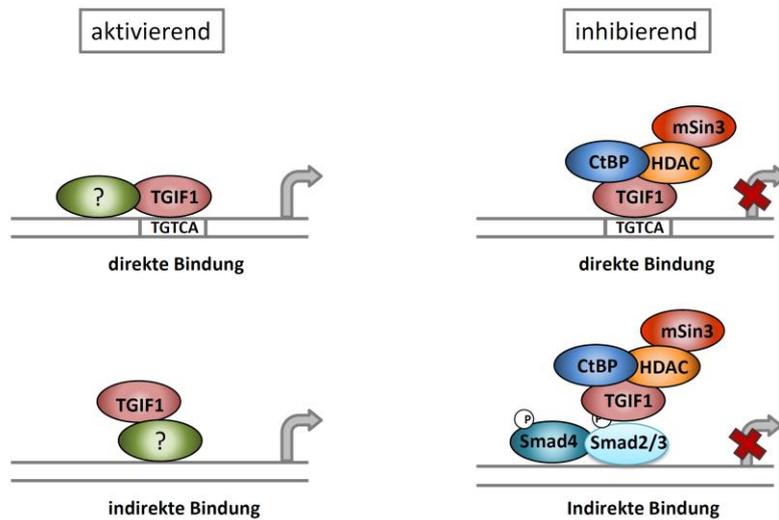


Abb. 3-2: Mögliche Wirkungsmechanismen der transkriptionellen Regulierung durch TGIF1

Ob TGIF1 nach TCR-Stimulation nur als transkriptioneller Repressor wirkt oder auch als Aktivator fungiert, bleibt noch zu klären. Im Fall von *klf10* konnte eine inhibierende Wirkung von TGIF1 auf dessen Expression bestätigt werden (s. Abb. 2-17). KLF10 ist als Aktivator von der Foxp3-Induktion bekannt (Cao et al., 2009; Venuprasad et al., 2008).

### 3.2.3 TGIF1 ist ein Repressor für die Foxp3-Expression

Die Stärke der TCR-Stimulation ist ein wichtiger Faktor für die Differenzierungsrichtung, die eine naive T-Zelle einschlägt. So fördert eine starke TCR-Stimulation die Differenzierung zu Th1-Zellen, wohingegen ein sub-optimaler TCR-Stimulus die Th2-Antwort begünstigt (Zhu and Paul, 2008). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von TGIF1 von der Stärke der Stimulation abhängig ist. Die Treg Induktion wird gegensätzlich zur TGIF1 Expression durch einen suboptimalen TCR-Stimulus gefördert (Oliveira et al., 2011). Zudem ist für die Induktion von iTreg-Zellen das Cytokin TGF- $\beta$  essentiell. TGIF1 ist in Zelllinien als Repressor des TGF- $\beta$ -Signalweges bekannt (Wotton et al., 1999a). Somit stellte sich die Frage, ob der Repressor TGIF1 auch eine inhibierende Wirkung auf die TGF- $\beta$  vermittelte iTreg Induktion hat. Treg Zellen haben eine suppressive Wirkung auf diverse Immunantworten, überwachen die Immunhomöostase und leisten einen Beitrag zur Erhaltung der peripheren Toleranz. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass Treg Zellen von großer Bedeutung für die Vermeidung von Autoimmunkrankheiten sind (Baecher-Allan and Hafler, 2006; Sakaguchi et al., 2006). Es ist zudem bekannt, dass Treg-Zellen zur Toleranz nach Organtransplantationen beitragen (Kang et al., 2007; Xia et al., 2009). In der Tumorbologie sind Treg-Zellen

von Interesse, da sie in vielen Krebsarten hoch frequentiert sind und so die gegen den Tumor gerichtete Immunantwort unterdrücken, was zu einem ungehemmten Wachstum führen kann (Kosmaczewska et al., 2008). Eine spezielle Art von Treg-Zellen exprimiert den Transkriptionsfaktor Foxp3 (Foxp3<sup>+</sup>Treg-Zellen).

Um den Einfluss von TGIF1 auf die iTreg-Induktion zu untersuchen wurden naive T-Zellen von TGIF-KO Mäusen unter Treg polarisierenden Bedingungen kultiviert und die iTreg-Induktion anhand der Foxp3-Expression gemessen. Mit den durchgeführten Versuchen konnte eine hemmende Wirkung von TGIF1 auf die iTreg-Induktion *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden. Bei einem TGIF-Defizit kam es zur vermehrten Foxp3-Induktion *in vitro* (s. Abb. 2-13). Im Fall einer Überexpression von TGIF1 in naiven T-Zellen wurde eine verminderte Foxp3 Induktion erwartet. Es zeigte sich jedoch keine negative Beeinflussung von übermäßig vorhandenem TGIF1 Protein auf die Foxp3 Induktion *in vitro* (s. Abb. 2-8). Wie lassen sich diese gegensätzlichen Ergebnisse erklären? Es konnte gezeigt werden, dass die Foxp3-Induktion in naiven T-Zellen von dem Vorhandensein von TGF- $\beta$  in den ersten Stunden abhängig ist (Wirnsberger et al., 2009). Die direkte Kultivierung unter polarisierenden Bedingungen nach der Transduktion der naiven Zellen mit Viruspartikeln, führt dazu, dass die Überexpression von TGIF1 erst 24 - 48 h nach Kultivierungsbeginn messbar ist. Die Ergebnisse sprechen für eine initiale Funktion von TGIF1 für die TGF- $\beta$  abhängige Foxp3 Induktion. Möglicherweise findet die Überexpression zu spät statt, um einen Effekt auf die TGF- $\beta$  vermittelte Foxp3 Induktion zu bewirken. In weiterführenden Studien soll geklärt werden, ob bei einer späteren Kultivierung der transduzierten Zellen ein Einfluss auf die Foxp3 Induktion zu sehen ist. Hierzu wäre es nötig, die Zellen für einen Tag ohne TCR-Stimulation zu kultivieren, und erst mit dem Einsetzen der Überexpression von TGIF1 die Zellen den polarisierenden Bedingungen auszusetzen.

Die iTreg-Induktion wurde zusätzlich zu den *in vitro* Versuchen in einem Tiermodell untersucht. Hierzu wurde das RAG-Colitis-Modell gewählt. Die Induktion einer Colitis durch adoptiven Transfer naiver Treg freier T-Zellen zeigte eine signifikant erhöhte Zahl induzierter Foxp3 positiver Zellen, die sich aus den naiven *tgif1*<sup>-/-</sup> Zellen entwickelt haben und somit eine mildere Form der Colitis (s. Abb. 2-25). Die TGIF1 Defizienz der T-Zellen hatte, wie schon dem *in vitro* Versuch eine positive Wirkung auf die iTreg Induktion.

### 3.2.4 TGIF1 reguliert die Foxp3 Expression auf transkriptioneller Ebene

Foxp3 ist der Faktor, der die suppressive Aktivität von iTreg-Zellen bestimmt. Bei einem Verlust von Foxp3 verlieren die Zellen auch ihre suppressive Wirkung (Williams and Rudensky, 2007). Aufgrund der Wichtigkeit von Foxp3 für die Aufrechterhaltung der Toleranz, ist die Aufklärung der Foxp3 Regulation von großer Bedeutung. Eine Grauzone ist die Signalweiterleitung zwischen der TGF- $\beta$  vermittelten Aktivierung von Smad-Proteinen und der Induktion von Foxp3. Erstens liegt zwischen der Phosphorylierung von Smad nach wenigen Minuten und der ersten *foxp3* RNA nach 10 - 12 h Stunden eine lange Zeit. Zweitens gibt es nur eine beschriebene Smad-Bindestelle in den Kontrollregionen von *foxp3*. Diese Tatsachen weisen auf das Vorhandensein von zwischengeschalteten Transkriptionsfaktoren hin (Maruyama et al., 2011). Maruyama et al. postulieren Id3 (Inhibitor of DNA binding protein 3) als einen solchen Transkriptionsfaktor (Maruyama et al., 2010). Id3 defiziente Mäuse zeigen eine Ausprägung des Sjogren's Syndroms, einer T-Zell vermittelten Autoimmunkrankheit (Li et al., 2004). Die Id3-Ko-Mäuse zeigen zudem eine geringere Treg Anzahl im Thymus, der Milz und den Lymphknoten. Es wird diskutiert, dass Id3 die Bindung von E2A an den Foxp3-Promoter vermittelt. E2A verhindert die Bindung von dem Repressor GATA3 an den Foxp3-Promoter.

Diese Studie zeigt, dass TGIF1 ein weiterer Schlüsselfaktor in dem Netzwerk der TGF- $\beta$  abhängigen Foxp3 Regulation ist (s. Abb. 3-3). Welches sind die molekularen Mechanismen durch die TGIF1 die Foxp3 Induktion hemmt? Über den molekularen Mechanismus der *foxp3*-Regulation ist schon vieles bekannt. So wurde in einer Studie von 2010 die Hypothese aufgestellt, dass ein Komplex aus mehreren Transkriptionsfaktoren die Foxp3 Induktion steuert. Dieses Enhancesom besteht aus Smad3, NFATc2, Rel-A, CREB und p65 und bindet an den Promoter von *foxp3* (Ruan et al., 2009). Der Transkriptionsfaktor KLF10 ist ein weiterer transkriptioneller Aktivator für die Foxp3-Induktion, für den eine Bindung an den *foxp3*-Promoter und den *tgf- $\beta$*  Promoter nachgewiesen werden konnte (Cao et al., 2009; Venuprasad et al., 2008). Auch weitere Mitglieder der Familie der KLFs sind durch Genregulation an der Zelldifferenzierung, Proliferation, dem Zellwachstum und der Apoptose beteiligt (Cao et al., 2010). Dass TGIF1 die Expression von KLF10 hemmt, konnte in dieser Arbeit durch eine gesteigerte mRNA Produktion von *klf10* nach Behandlung mit TGIF1 siRNA gezeigt werden (s. Abb. 2-17). Zusätzlich konnte in einem Luziferase-Versuch nachgewiesen werden, dass die Co-Transfektion des *klf10*-Promoter-Reporterplasmids mit einem TGIF-GFP-Konstrukt eine gesteigerte Promoteraktivität bewirkte. Möglicherweise fängt TGIF1 andere Co-Repressoren von *klf10* ab. Eine Protein-Protein-Interaktion von TGIF1 mit diversen

Co-Repressoren wie mSin und HDAC wurde schon beschrieben (Wotton et al., 2001; Wotton et al., 1999a). Die Mutation der Bindestelle von TGIF1 im *klf10*-Promoter führte zu einer weiteren Erhöhung der Promoteraktivität im Luciferase-Versuch und weist somit darauf hin, dass TGIF1 als Repressor für KLF10 wirkt. Die Bindung von TGIF1 an *klf10* könnte somit ein indirekter Regulationsmechanismus von TGIF1 für die Foxp3-Expression sein (s. Abb. 3-3).

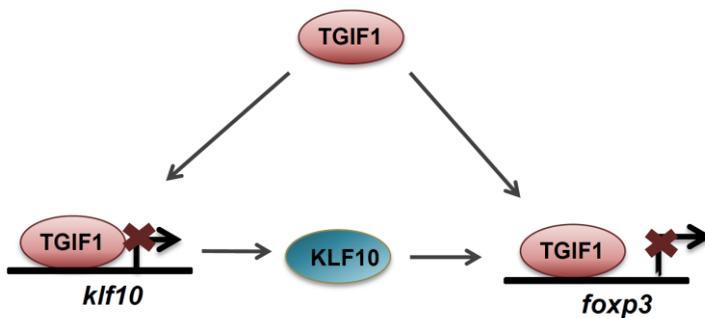


Abb. 3-3: Modell für mögliche molekulare Mechanismen der Foxp3-Repression durch TGIF1.

Ein direkter Mechanismus, der Hemmung von Foxp3 durch TGIF1, ist die direkte Bindung an die regulatorische Region TSDR im *foxp3*-Gen selbst (s. Abb. 2-16a). Die TSDR wurde 2007 charakterisiert (Floess et al., 2007). Diese Region unterscheidet sich im Methylierungsstatus von Treg-Zellen und Nicht-Treg-Zellen. So ist sie in Nicht-Treg-Zellen vollständig methyliert, wohingegen sie in nTreg-Zellen komplett demethyliert vorliegt. In iTreg-Zellen, die keine stabile Foxp3-Expression zeigen, ist diese Region nur zum Teil demethyliert. Man geht davon aus, dass die TSDR für die Stabilität der Treg-Zellen wichtig ist (Zheng et al., 2010). In dieser Studie konnte eine direkte Bindung von TGIF1 an die TSDR in naiven T-Zellen sowie in iTreg-Zellen und nTreg-Zellen gezeigt werden. Im Gegensatz zu der Bindung von TGIF1 an *klf10* konnte nach TCR-Stimulation eine verringerte Bindung von TGIF1 an die TSDR beobachtet werden. Möglicherweise wird TGIF1 nach TCR-Stimulation von der TSDR durch einen anderen Transkriptionsfaktor verdrängt. Nach TCR-Stimulation wird die Foxp3-Expression von iTreg-Zellen gehemmt. Eine Vermutung wäre so, dass TGIF1 an der TSDR nach TCR-Stimulation durch einen Repressor wie z.B. pStat3 ersetzt wird (Xu et al., 2010); (s. Abb. 1-5).

Zusammenfassend weisen diese Versuche auf einen direkten Regulationsmechanismus über die Bindung von TGIF1 am *foxp3*-Promoter sowie auf einen indirekten Mechanismus durch die Inhibierung von KLF10 hin (s. Abb. 3-3).

### 3.2.5 HDAC5 als möglicher Bindepartner von TGIF1

Nicht nur das Zusammenspiel von Transkriptionsfaktoren ist entscheidend für die Expression, auch epigenetische Modifikationen rücken immer mehr in den Fokus der Forschung. Um eine optimale Funktionalität der Treg-Zellen zu gewährleisten, bedarf es Acetylierungen im *foxp3*-Promoter. So sind Acetylierungen auch für die Bindung von Foxp3 an *il-2* Gen nötig (Li et al., 2007). Acetylierungen werden durch Histonacetylasen (HATs) vorgenommen. HDACs (Histondeacetylasen) sind eine Familie von Enzymen, die als Gegenspieler von Histonacetylasen (HATs) fungieren. HDACs entfernen Acetylgruppen von Lysinresten von Histonen. Es ist bekannt, dass die Behandlung mit HDAC-Inhibitoren *in vivo* zu einer erhöhten Anzahl an Foxp3 positiven Zellen führt (Lucas et al., 2009). Histone sind aber nicht die einzigen Substrate von HDACs und HATs. Viele weitere Proteine wie p53, cMyc, GATA3, STAT3, Foxp3 und NFkB untergehen einer Acetylierung (Patel et al., 2004). Diese Acetylierung führt zu einer gesteigerten Proteinstabilität.

In den Expressionsanalysen der T-Zellen der KO-Mäuse gehörte *hdac5* (Histondeacetylase 5) zu den differenziell regulierten Genen. HDAC5 gehört zu den Klasse II HDACs, die zunächst induziert werden und dann in den Kern translozieren. TGIF1 beeinflusst die Expression von HDAC5 positiv, da die Expressionsdaten der T-Zellen von KO-Mäusen eine verringerte Expression von HDAC5 nach TCR-Stimulation zeigten. Mit einer qRT-PCR konnten die Arrayergebnisse jedoch nicht bestätigt werden. Eine mögliche Erklärung ist das Vorhandensein von neun Transkriptvarianten für *hdac5*. Mit der durchgeführten PCR wurden nicht die Varianten erfasst, die auf den Arrays repräsentiert waren. Mit Westernblot-Analysen soll Klarheit über das Proteinlevel von HDAC5 in TGIF1 defizienten Mäusen geschaffen werden. HDAC5 könnte ein transkriptioneller Bindungspartner von TGIF1 sein und wie TGIF1 als Co--Repressor fungieren. So konnte schon gezeigt werden, dass TGIF1 in verschiedenen Zelllinien mit Sin3 und HDAC1 interagieren kann (Wotton et al., 2001).

Die Regulation der Foxp3 Transkription ist ein vielschichtiger Prozess. Er reflektiert die Notwendigkeit der Feinregulierung von Treg-Zellen unter zahlreichen verschiedenen Bedingungen im Immunsystem. Für die Regulation von Foxp3 sind folgende Transkriptionsfaktoren als Aktivatoren beschrieben NFAT, AP1, CREB, Foxo1, Foxo3, c-Rel, AP1, KLF10, c-Rel, Ets1 und Runx. Als Repressoren dagegen sind bisher nur ID, GATA3 und Stat3 bekannt (s. Abschnitt 1.6). Die in dieser Studie durchgeführten Experimente offenbaren TGIF1 als weiteren Repressor in der transkriptionellen Regulation von Foxp3. Die durchgeführten Experimente weisen auf einen direkten Regulierungsmechanismus über die Bindung von TGIF1 in der TSDR des *foxp3*-Lokus und einen indirekten Mechanismus über KLF10 hin.

HDAC5 könnte als Bindungspartner von TGIF1 ähnlich wie T-bet am *ifn- $\gamma$*  Promoter die epigenetische Umgebung der Zielgene verändern.

### 3.2.6 TGIF1 ist an der Regulation der Zellapoptose beteiligt

Um auszuschließen, dass die erhöhte Anzahl an Foxp3<sup>+</sup>-Zellen durch ein verändertes Proliferationsverhalten der *tgif1*<sup>-/-</sup> Zellen hervorgerufen wurde, wurde die Teilungsrate der Zellen *in vitro* verglichen. Bei der *in vitro* Induktion von Treg-Zellen konnte keine veränderte Proliferation der KO-Zellen im Vergleich zu den WT-Zellen festgestellt werden (s. Abb. 2-15). Der Effekt der höheren Anzahl an Foxp3 positiven Zellen von TGIF1 defizienten T-Zellen in den RAG<sup>-/-</sup> Mäusen lässt sich daher nicht durch eine bessere Proliferation der Treg-Zellen erklären, sondern nur durch eine Neuinduktion von iTreg-Zellen. Gegenätzlich zu den Ergebnissen dieser Studie wurde in einer Studie von 2009 beschrieben, dass TGIF1 für die Proliferation einer myeloiden Zelllinie eine positive Wirkung hat (Hamid and Brandt, 2009). Dies lässt sich z.B. dadurch erklären, dass eine Krebszelllinie ein anderes Wachstumsverhalten zeigt im Vergleich zu Primärzellen. Ein Vergleich ist daher nur bedingt möglich.

Zusätzlich zum Proliferationsverhalten wird die Zellzahl auch durch das Apoptose-Verhalten bestimmt. Eine Studie von 2012 zeigt, dass iTreg-Zellen und Tcon (konventionelle Th-Zellen wie z.B. Th1-Zellen) ein unterschiedliches Apoptose-Verhalten in Gegenwart von TGF- $\beta$  bzw. IL-2 zeigen (Tischner et al., 2012). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TGIF1 defiziente T-Zellen nach fünf Tagen Kultivierung unter iTreg-Zellen polarisierenden Bedingungen weniger apoptotische Zellen zeigten (s. Abb. 2-15). Zusätzlich konnte in den durchgeführten Expressionsanalysen der TGIF1-KO-Zellen eine eindeutige Häufung von differenziell exprimierten Genen, die für die Apoptose verantwortlich sind beobachtet werden (s. Abb. 2-22). So konnte z.B. eine verminderte Expression der E3-Ligase Itch in den TGIF1-defizienten Zellen im Vergleich zu den WT-Zellen gemessen werden. Eine Studie von 2009 zeigte, dass Itch an der TNF- $\alpha$  induzierten Zell-Apoptose in MDCK-Zellen beteiligt ist (Demange et al., 2009). Es wurde zudem gezeigt, dass TGIF1 mit Itch interagieren kann und so die Ubiquitin vermittelte Degradation von cFLIP vermittelt. Möglicherweise tragen die von TGIF1 beeinflussten Gene wie z.B. Itch dazu bei, dass die iTreg-Zellen der *tgif1*<sup>-/-</sup> Mäuse einen gewissen Schutz gegen Apoptose besitzen.

### 3.2.7 TGIF1 ein Aktivator der IFN- $\gamma$ -Produktion in T-Zellen

Viele Autoimmunkrankheiten wie z.B. RA (Rheumatische Arthritis) und MS (Multiple Sklerose) sind vorrangig von Th1-Zellen bestimmt. Sie sind gekennzeichnet durch eine erhöhte Expression von IFN- $\gamma$  (Zhang, 2007). IFN- $\gamma$  ist ein Typ II Interferon und ist weit verbreitet, vom Fisch bis zum Menschen. Es nimmt wichtige Rollen in der Verteidigung des Wirts gegen Pathogene ein. So induziert IFN- $\gamma$  einen IgG2a Klassenwechsel von B-Zellen. Es wird von aktivierten T-Zellen, von NK-Zellen und Makrophagen sekretiert (Saha et al., 2009). IFN- $\gamma$  hat nicht nur Funktionen in der Umsetzung der Immunantwort sondern auch in der Beendigung von Immunantworten. So reduziert es die Produktion von IgE, das bei allergischen Reaktionen erhöht ist (Saha et al., 2009). Außerdem supprimiert es die Entwicklung von Th17-Zellen im EAE-Modell und in der Kollagen-induzierten Arthritis (Ferber et al., 1996; Vermeire et al., 1997). IFN- $\gamma$  stabilisiert auf der einen Seite den Th1-Phänotyp durch die positive Regulierung der T-bet Expression (positiver Feed-back-Loop (Szabo et al., 2002). Auf der anderen Seite konnte zudem gezeigt werden, dass T-bet auch in Treg-Zellen wichtig für die suppressive Aktivität ist (Lazarevic and Glimcher, 2011). So leitet IFN- $\gamma$  die Differenzierung von Foxp3<sup>+</sup>T-bet<sup>+</sup> Treg-Zellen ein, die die Th1-Antwort hemmen (negativer Feed-back-loop (Koch et al., 2009). Diese Befunde sprechen für eine wichtige Rolle von IFN- $\gamma$  in der Regulation der Immunhomöostase.

Die durchgeführten Experimente belegen, dass ein TGIF1 Defizit in den *in vitro* Kulturen zu einer signifikanten Abnahme der IFN- $\gamma$  Produzenten fünf Tage nach Th1-Polarisierung (s. Abb. 2-13) führte. Die adenoviral vermittelte Überexpression von TGIF1 in naiven T-Zellen bestätigte die Annahme, dass TGIF1 eine fördernde Wirkung auf die Produktion von IFN- $\gamma$  hatte (s. Abb. 2-9). Unter inflammatorischen Bedingungen *in vivo* in den mLN (mesenterialen Lymphknoten; am Darm lokalisiert) wurde eine negative Wirkung eines TGIF1 Defizits auf die IFN- $\gamma$  Produktion beobachtet (s. Abb. 2-26). In der Milz jedoch konnte eine erhöhte Anzahl an IFN- $\gamma$  Produzenten der TGIF1 defizienten Zellen beobachtet werden. Dieses gegensätzliche Ergebnis konnte durch eine fehlgeleitete Migration der TGIF1 defizienten Zellen hervorgerufen worden sein. Möglicherweise ist das Homing der Zellen durch einen fehlenden Chemokinrezeptor gestört. Wie die durchgeführten *in vivo* Experimente belegten, sammeln sich mehr IFN- $\gamma$  Produzenten der TGIF1 defizienten Zellen in den Milzzellen der RAG<sup>-/-</sup> Mäuse und weniger in den mLN. Bekanntermaßen kontrolliert T-bet die Migration von Th1-Zellen durch die Regulation des Chemokinrezeptors CXCR3 und den Chemokinen CCL3 und CCL4 (Lord et al., 2005). Da in den RAG<sup>-/-</sup> Mäusen eine verringerte T-bet Expression der *tgif1*<sup>-/-</sup> Zellen zu messen war, könnte auf diesem Weg die Expression von Che-

mokinen und Chemokinrezeptoren verändert sein. Die Expression von CXCR3 war in den KO-Zellen im Vergleich zu den WT-Zellen nicht verändert (nicht gezeigt). In den Genexpressionsanalysen zeigte sich der Chemokinrezeptor CCR8 als differenziell exprimiert in den *tgif*<sup>-/-</sup> T-Zellen im Vergleich zu Wt-Zellen. Daher soll in nachfolgenden Versuchen die Proteinexpression von CCR8 in den TGIF-Ko-Mäusen untersucht werden.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Studie eine Abhängigkeit der IFN- $\gamma$  Produktion und Migration von IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen von TGIF1 in einem Entzündungsmodell.

Wie wird die Produktion von IFN- $\gamma$  in T-Zellen reguliert? In der Literatur werden T-bet und Eomes als Hauptregulatoren der IFN- $\gamma$  Produktion diskutiert (Yang et al., 2008). Es ist zudem bekannt, dass die Expression von IFN- $\gamma$  durch die Bindung von T-bet, STAT4, STAT5 und CTCF an den *ifn- $\gamma$*  Promoter reguliert wird (Djuretic et al., 2007; Sekimata et al., 2009; Shi et al., 2008; Szabo et al., 2000). Weitere Bindungspartner von T-bet in der IFN- $\gamma$  Regulation sind Transkriptionsfaktoren, wie Hlx und Runx3, die durch T-bet hochreguliert werden und so die IFN- $\gamma$  Expression aktivieren (Djuretic et al., 2007; Mullen et al., 2002). In naiven Zellen dagegen verhindert ein Repressorkomplex aus Sin3A und HDACs am Promoter die Expression von IFN- $\gamma$ . T-bet vermittelt die Entfernung des Komplexes und eine Anhäufung von H4-Acetylierung und reguliert so die Produktion von IFN- $\gamma$  in Th1-Zellen (Chang et al., 2008).

Wie reguliert TGIF1 die IFN- $\gamma$  Produktion? In den durchgeführten Experimenten konnte eine direkte Bindung von TGIF1 an den *tbx21* Promoter in naiven Zellen nach TCR-Stimulation und in Th1-Zellen nachgewiesen werden (s. Abb. 2-19). Das *tbx21*-Gen kodiert für den Mastertranskriptionsfaktor der Th1-Zellen T-bet. Dies könnte eine Möglichkeit der Regulation der IFN- $\gamma$  Expression von TGIF1 sein (s. Abb. 3-4).

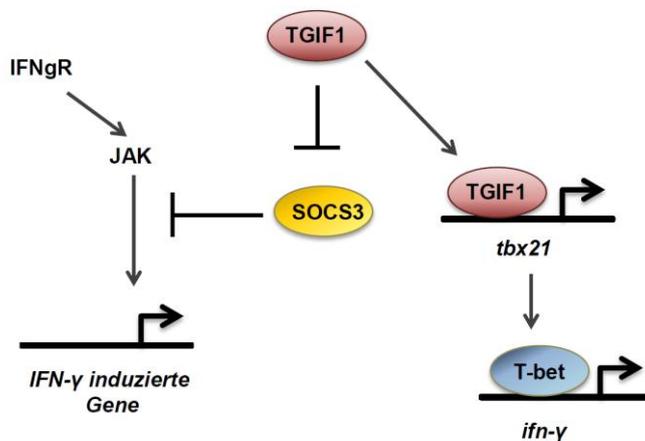


Abb. 3-4: Modell für die Regulation der IFN- $\gamma$  Produktion durch TGIF1.

Die *in vitro* Differenzierungskulturen mit *tgif1*<sup>-/-</sup> Zellen zeigten jedoch keinen Einfluss von TGIF1 auf die T-bet Expression. Die Überexpression von TGIF1 in naiven T-Zellen bewirkte dagegen eine Zunahme der IFN- $\gamma$  und der T-bet Produzenten im Vergleich zu den *in vitro* generierten Th1-Zellen der Wt-Mäuse. In dem Colitis-Modell konnte eine geringere Anzahl von T-bet positiven Zellen in den aus *tgif1*<sup>-/-</sup> expandierten T-Zellen gemessen werden.

Warum zeigten die *in vitro* Th1-polarisierten Zellen der *tgif1*<sup>-/-</sup> Mäuse keine verringerte Anzahl T-bet Produzenten wie die *in vivo* induzierten Th1-Zellen? Möglicherweise spielt TGIF1 bei der T-bet Expression nur eine untergeordnete Rolle, die durch andere Faktoren ausgeglichen werden kann. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass TGIF1 die Aktivität und nicht die Expression von T-bet beeinflusst. So konnte in einer Studie eine Abhängigkeit der IFN- $\gamma$  Produktion von T-bet ohne Expressionsveränderung T-bet beobachtet werden. Die Gruppe von L. J. Berg zeigte 2008, dass die Bindung von T-bet an *ifn*- $\gamma$  von JAK3 (Janus Kinase 3) abhängig ist. So konnten sie zeigen, dass JAK3 24 - 72 h nach TCR-Aktivierung die Acetylierung (und damit Aktivierung) des IFN- $\gamma$  Promoters aktiviert (Shi et al., 2008). In den naiven Zellen, der TGIF1 defizienten Zellen, konnte fünf Stunden nach TCR-Stimulation keine veränderte JAK2 oder JAK3 Expression gemessen werden. Allerdings zeigten sich SOCS2 (*suppressor of cytokine signaling*) und SOCS3 als differenziell exprimiert. SOCS-Proteine spielen eine wichtige Rolle in der Regulierung der Cytokinproduktion. Sie schalten die Cytokinproduktion ab und sind so wichtige Regulatoren der Immunantwort (Egwuagu et al., 2002). Die Expression von SOCS Proteinen wird durch IFN- $\gamma$  induziert. So konnte bisher gezeigt werden, dass SOCS1 die katalytische Aktivität von JAK1, 2, 3 wohingegen SOCS3 nur JAK2 inhibiert (Saha et al., 2009). In den Genexpressionsanalysen zeigte sich SOCS3 als höher exprimiert in den *tgif1*<sup>-/-</sup> T-Zellen. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass SOCS3 die Differenzierung zu Th1-Zellen inhibiert (Seki et al., 2003). In zukünftigen Experimenten soll geprüft werden, ob SOCS Proteine direkte Zielgene von TGIF1 in T-Zellen sind. Ein denkbarer Mechanismus wäre die Suppression von SOCS durch TGIF1 in der frühen Phase der Th1-Antwort. Somit könnte die IFN- $\gamma$  Produktion ermöglicht werden (s. Abb. 3-4).

### **3.2.8 Das TGIF1 Defizit wirkt sich positiv auf die ROR $\gamma$ t Induktion im Colitis-Modell aus**

Th17-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Immunantwort und bei der Entstehung von Autoimmunkrankheiten. Sie produzieren IL-17, welches eine wichtige Aufgabe für die Abwehr von extrazellulären Bakterien und Pilzen (Stockinger and Veldhoen, 2007) hat. Ihr Mas-

tertranskriptionsfaktor ist ROR $\gamma$ t. Die Differenzierung von naiven T-Zellen zu Th17-Zellen wird vorrangig durch IL-6 und TGF- $\beta$  bestimmt (Mangan et al., 2006; Veldhoen et al., 2006), (s. Abb. 1-4). Die durchgeführten Experimente zeigten, dass TGIF1 neben den Treg-Zellen auch eine leicht inhibierende Wirkung auf die Th17-Differenzierung hat *in vitro* hat (s. Abb. 2-13). Zusätzlich wurde eine erhöhte Anzahl an ROR $\gamma$ t positiven Zellen in den TGIF1 defizienten Zellen in dem Colitis-Experiment gefunden (s. Abb. 2-24). Die Gemeinsamkeit der Differenzierungsrichtung von iTreg-Zellen und Th17-Zellen ist daher die TGF- $\beta$ -Abhängigkeit. Es liegt daher nahe, dass TGIF1 die Th17-Differenzierung über den TGF- $\beta$  Signalweg hemmt (s. Abb. 3-5).

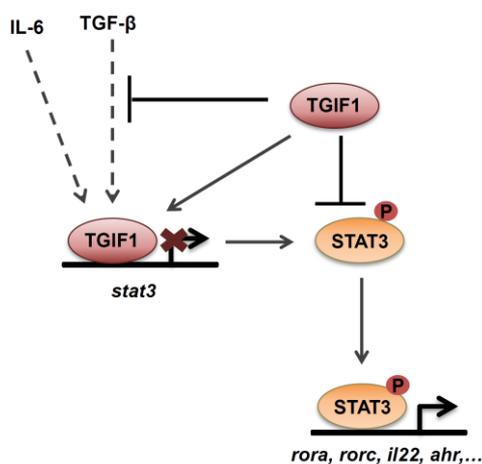


Abb. 3-5: Modell für die ROR $\gamma$ t Regulierung von TGIF1.

Th17-Zellen sind an vielen Autoimmunerkrankungen wie z.B. auch IBD (*Inflammatory-Bowel-Disease*) beteiligt. SNPs in Th17 relevanten Genen wie IL-23, JAK2 und STAT3 sind im Menschen mit chronischen Darmerkrankungen (z.B. IBD) assoziiert. STAT3 ist ein wichtiger Faktor z. B. für die Knochen- und Zahnentwicklung. So sind *stat3*<sup>-/-</sup> Mäuse nicht lebensfähig (Takeda et al., 1997). In Immunzellen ist STAT3 an der Aktivierung der Cytokinproduktion beteiligt. So kommt es als Antwort auf IL-6 über JAK2 zur Aktivierung von STAT3, der so als transkriptioneller Aktivator die Th17-Differenzierung steuert. STAT3 bindet direkt an viele Th17-spezifische Gene wie z.B. *ahr*, *il-22* oder *rorc* bzw. *rora*. Zusammen mit Foxp3 kann STAT3 an den IL-6 und den TGF- $\beta$ -Promoter bindet (Chaudhry et al., 2009). Zudem konnte eine Studie zeigen, dass STAT3 nicht nur für Th17-Zellen, sondern auch in Treg-Zellen wichtig für die Unterdrückung von IBD ist (Liu et al., 2008). In dieser Arbeit konnte mittels ChIP gezeigt werden, dass TGIF1 an den STAT3-Promoter bindet. Die Phosphorylierung, sowie die Expression von STAT3 soll in nachfolgenden Versuchen in den TGIF1 defi-

zienten Zellen geprüft werden. Möglicherweise reguliert TGIF1 durch Hemmung des TGF- $\beta$  Signalweges und durch die Hemmung der STAT3-Expression und oder -Aktivierung die Differenzierung von ROR $\gamma$ t positiven Th17-Zellen (s. Abb. 3-5).

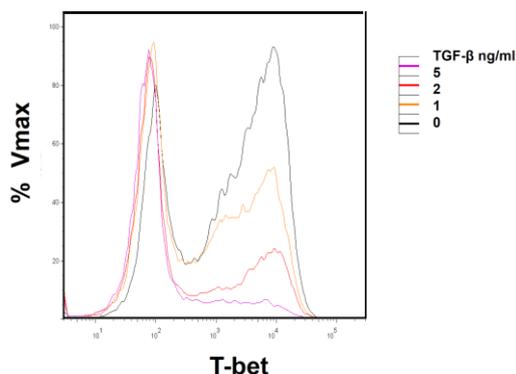
Die durchgeführten Experimente zeigten, dass TGIF1 neben den Treg-Zellen auch eine inhibierende Wirkung auf die Th17-Differenzierung hat. Ob dieser Effekt aus dem TGF- $\beta$  vermittelten Signalweg herrührt, oder über den STAT3 vermittelten Cytokin-Signalweg entsteht, bleibt noch zu klären. Es scheint jedoch offensichtlich, dass die Signalwege miteinander verknüpft sind.

### 3.2.9 Die Rolle von TGF- $\beta$ in der Th-Zelldifferenzierung

Die Hemmung der IL-2-Produktion durch TGF- $\beta$  ist bekannt. Die Gruppe von Yoshimura konnte zeigen, dass Smad2 und 3 TGF- $\beta$  abhängig zum *il-2*-Promoter rekrutiert werden und dort, durch Regulation der Histonmodifikationen, die IL-2 Produktion inhibieren (Wakabayashi et al., 2011). TGIF1 könnte als Smad-Repressor diesem entgegenwirken und die Bindung von Smad verhindern. Die Repression von TGIF1 auf den TGF- $\beta$  abhängigen Smad-Signalweg konnte bisher nur in Hepatozyten gezeigt werden (Wotton et al., 1999b). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass TGIF1 auf transkriptioneller Ebene die durch TGF- $\beta$  induzierten Transkriptionsfaktoren KLF10 und Foxp3 hemmt. Zudem zeigte sich der TGF- $\beta$ -Rezeptor TGF- $\beta$ RI in den Expressionsanalysen der naiven T-Zellen aus den *tgif1*<sup>-/-</sup> Mäusen als differenziell exprimiert. Sollte sich dies auf Proteinebene bestätigen lassen, wäre dies eine weitere mögliche Wirkungsart von TGIF1 den TGF- $\beta$  Signalweg zu hemmen. Smad-Proteine sind wie TGF- $\beta$  Teil des TGF- $\beta$ -Signalweges. Eine Studie von 2010 zeigt, dass Smad2 und Smad3 eine redundante essentielle Funktion in der Foxp3 Induktion und gleichzeitig in der IFN- $\gamma$  Suppression haben (Takimoto et al., 2010). Wie die Suppression bewirkt, wird ist noch nicht ausreichend verstanden. Es ist lediglich bekannt, dass Smad2 und Smad3 die IL-2-Produktion inhibieren. Die Smads zeigen sich in den Genexpressions-Analysen nicht als differenziell exprimiert. Die Aktivität von Smad2 und Smad3 wird durch ihre Phosphorylierung bestimmt. In Zelllinien konnte gezeigt werden, dass TGIF1 die Phosphorylierung von Smad-Proteinen hemmen kann. Sollte dies auch für T-Zellen zutreffen könnte so den TGF- $\beta$  Signalweg beeinflussen ohne die Expression der Smads zu verändern. Daher soll in nachfolgenden Studien die Expression und die Phosphorylierung sowie Interaktion der am TGF- $\beta$  Signalweg teilhabenden Proteine in den TGIF1 defizienten Mäusen mit Hilfe des Western-Blots

geprüft werden. Bisher waren umfangreiche Westernblot-Analysen nicht möglich, da sie hohe Zellanzahlen benötigen und die Mäuse sich sehr schlecht züchten lassen.

Aus der Literatur ist bekannt, dass TGF- $\beta$  die iTreg-Induktion zusammen mit IL-2 und die Th17-Differenzierung in Gegenwart von IL-6 begünstigt (Hatton and Weaver, 2009). Niedrige Konzentrationen von TGF- $\beta$  begünstigen die Differenzierung zu Th17-Zellen, wohingegen hohe Konzentrationen an TGF- $\beta$  den IL23R hemmen und die Foxp3 Expression begünstigen (Ghoreschi et al., 2010; Lee et al., 2009). Die Expression von T-bet wird im Gegenzug durch TGF- $\beta$  gehemmt (Park et al., 2005b). Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von T-bet proportional zu steigenden TGF- $\beta$  Konzentrationen abnimmt (s. Abb. 3-6).



**Abb. 3-6: TGF- $\beta$  hemmt konzentrationsabhängig die Expression von T-bet.**

Zudem ist bekannt, dass die Expression des TGF- $\beta$  Repressors Smad 7 durch IFN- $\gamma$  induziert wird (Ulloa et al., 1999). STAT1 ist ein weiterer Th1-relevanter Faktor, für den gezeigt werden konnte, dass er den TGF- $\beta$  Signalweg hemmt. So konnte gezeigt werden, dass STAT1 an Smad3 bindet und so dessen Funktion inhibiert (Ghosh et al., 2001). Diese Befunde zeigen, dass TGF- $\beta$  nicht nur für die Induktion von iTregs und Th17-Zellen entscheidend ist sondern auch eine Rolle in der Th1-Induktion spielt. In Abb. 3-7 ist die Verbindung schematisch dargestellt.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass TGIF1 als Repressor der TGF- $\beta$  Signalweiterleitung wirkt und so die Differenzierung zu iTreg-Zellen und Th17-Zellen hemmt und die Produktion des Th1-spezifischen Cytokins IFN- $\gamma$  positiv beeinflusst (s. Abb.3-7).

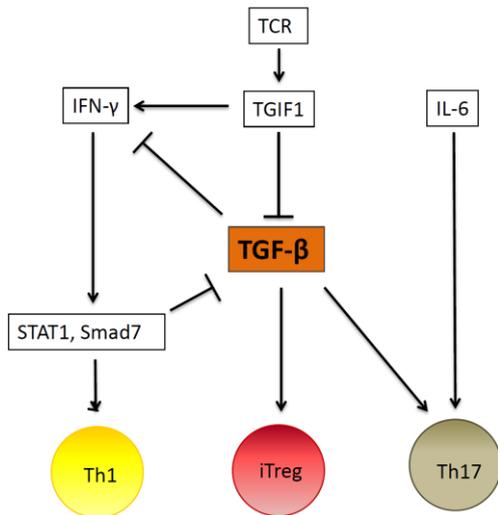


Abb. 3-7: Schematische Darstellung der Regulation der T-Zelldifferenzierung durch TGF- $\beta$

### 3.2.10 TGIF1 ist ein Bindeglied zwischen TCR- und TGF- $\beta$ -Signalweg

Mit den Versuchen dieser Studie konnte gezeigt werden, dass TGIF1 eine Schlüsselrolle in der Verknüpfung von TCR- und TGF- $\beta$ -Signalweg hat. So wird die Expression von TGIF1 durch die Stärke der TCR-Stimulation gesteuert. Und es konnte gezeigt werden, dass TGIF1 den TGF- $\beta$  Signalweg in T-Zellen hemmt. Bei einer starken Stimulation wird TGIF1 hoch exprimiert, hemmt die iReg-Induktion und fördert gleichzeitig die Induktion von Th1-Zellen (s. Abb. 3-8). Wird bei einem schwachen TCR-Stimulus in der Gegenwart von TGF- $\beta$  wenig TGIF1 exprimiert, so wird dadurch die iReg-Induktion gefördert und die Differenzierung zu Th1-Zellen gehemmt (s. Abb. 3-8).

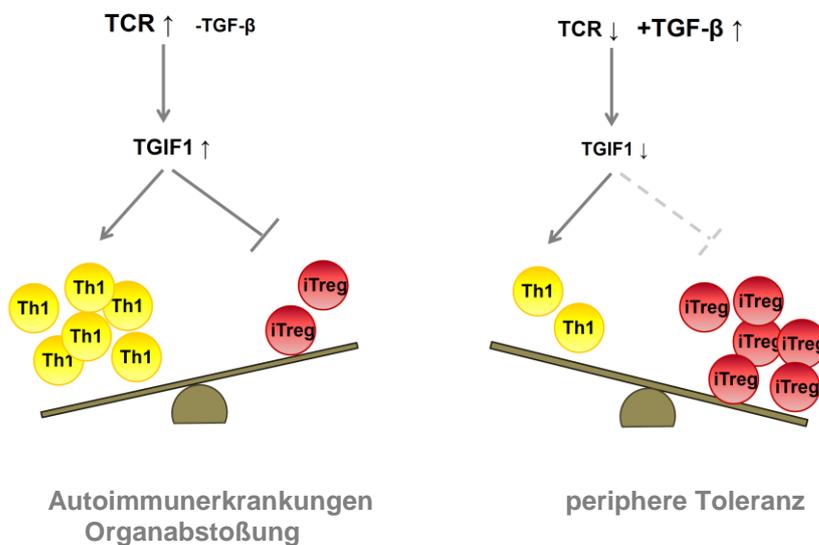


Abb. 3-8: TGIF1 reguliert die T-Zellbalance zwischen Effektor-T-Zellen und regulatorischen T-Zellen.

### 3.3 Schlussfolgerung

In dieser Studie wurde der Transkriptionsfaktor TGIF1 in Mäusen auf seine Rolle in der T-Zelldifferenzierung hin eingehend untersucht. Das zentrale Ziel bei der Untersuchung von Immunantworten in Mäusen ist die Hilfe beim Verstehen und schlussendlich der Behandlung von Erkrankungen des Menschen. Einige Immunsystem-vermittelte Krankheiten im Menschen sind direkt auf genetische Mutationen in Schlüssel-Transkriptionsfaktoren zurückzuführen. Das IPEX Syndrom ist zum Beispiel mit Mutationen im *foxp3*-Gen assoziiert (Brunkow et al., 2001). Zudem resultieren einige *stat3* Mutationen in dem Hyper-IgE-Syndrom, das mit dem Verlust der Th17-Zell-Antwort auf extrazelluläre Bakterien und Pilzinfektionen einhergeht (Milner et al., 2008). Insofern hat das exakte Verständnis der molekularen Mechanismen, in denen das Netzwerk aus Transkriptionsfaktoren die T-Zelldifferenzierung, Heterogenität, Plastizität und Stabilität reguliert, gute Aussichten eine breite Reihe an Immunsystem-vermittelter Krankheiten inklusive chronischer Infektionen, Autoimmunkrankheiten, Allergien und Tumoren zu heilen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor TGIF1 ein Repressor der TGF- $\beta$  vermittelten iTreg-Induktion ist. Diese Befunde helfen dabei die molekularen Mechanismen der Induktion von iTreg-Zellen besser zu verstehen. Dadurch ist es z.B. möglich die iTreg-Induktion über TGIF1 zu manipulieren. So könnten z.B. Inhibitoren gegen TGIF1 zum Einsatz kommen, um unerwünschte Immunantworten durch die Induktion von iTreg zu unterdrücken. So könnte in der Zukunft z.B. die Behandlung von Patienten mit Inhibitoren von TGIF1 vor der Organabstoßung nach Transplantationen dienen.

### 3.4 Ausblick

In Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TGIF1 an der Regulation der TGF- $\beta$  induzierten iTreg-Induktion beteiligt ist. In Studien mit verschiedenen Zelllinien wurde die Verbindung von TGIF1 mit dem RA-Signalweg beschrieben (Zhang et al., 2009). Da RA auch die Treg-Induktion fördert sollen in weiteren Experimenten folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Sind die durch das TGIF1-Defizit induzierten Tregs suppressiv?
2. Welche Bindungspartner hat TGIF1 in T-Zellen?
3. Ist TGIF1 in T-Zellen an der RA-vermittelten Treg-Induktion beteiligt?
4. Ist TGIF1 auch in T-Zellen ein Bindeglied zwischen dem TGF- $\beta$  und dem RA-Signalweg?
5. Hemmt TGIF1 den TGF- $\beta$  Signalweg auch in T-Zellen auf nicht-transkriptioneller Ebene?

Diese Studie konnte zeigen, dass TGIF1 an der Produktion von IFN- $\gamma$  in Th1-polarisierten Zellen beteiligt ist. Viele Autoimmunkrankheiten zeichnen sich durch eine fehlgeleitete Produktion von IFN- $\gamma$ . In weiterführenden Experimenten sollen daher folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Welche Rolle spielt TGIF1 in der IFN- $\gamma$  Produktion in Th1- Gedächtnis-Zellen?
2. Wie reguliert TGIF1 die IFN- $\gamma$  Produktion?
3. Ist TGIF1 in Patienten mit Autoimmunkrankheiten differenziell exprimiert?

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Chemikalien

Sofern nicht angegeben, wurden alle Chemikalien von Roth, Merck oder Sigma-Aldrich bezogen.

Odyssey Blocking Buffer	LiCor Biosciences, Bad Homburg
dNTPs Invitrogen,	Karlsruhe
Lachsspermien-DNA	Invitrogen, Karlsruhe
SeeBlueo Plus 2 Prestained Standard	Invitrogen, Karlsruhe
GeneRuler™DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Cyclosporin A	MPI für Enzymologie, Halle/Saale
Lymphozyten Separationsmedium	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
EDTA Free Complete Protease	
Inhibitor Tablets	Roche, Grenzach-Wyhlen
LE Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
CFSE	eBioscience
APS	BioRad
BSA	PAA Laboratories
Magermilchpulver	Reformhaus

#### 4.1.2 Antikörper für den Westernblotnachweis

Alle Antikörper (s. Tab. 4-1) wurden in einer Antikörperlösung aus Blockierungspuffer (Odyssey) und PBST (1:1) verdünnt.

**Tab. 4-1: Alle für den Westernblot verwendeten Antikörper**

Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Klon
anti-Mensch/Maus $\beta$ -Aktin	1 : 10 000	Santa Cruz	C4
anti-Mensch/Maus Lamin B	1 : 1000	Santa Cruz	M-20
anti-Mensch/Maus-Ubiquitin	1 : 1000	Santa Cruz	P4D1
anti-Mensch/Maus TGIF	1 : 200	Santa Cruz	H-172
IRDye 680LT Ziege anti Maus IgG	1 : 10 000	LI-COR Biosciences	polyklonal
IRDye 680LT Ziege anti Kaninchen IgG	1 : 10 000	LI-COR Biosciences	Polyklonal
IRDye 800 CW Ziege anti Maus IgG	1 : 10 000	LI-COR Biosciences	Polyklonal
IRDye 800CW Ziege anti Maus IgG	1 : 10 000	LI-COR Biosciences	polyklonal

### 4.1.3. Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide (s. Tab. 4-2, -3, -4) wurden von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin) synthetisiert. Die Oligonukleotide wurden durch eine Sephadex Gelfiltration aufgereinigt und lyophilisiert geliefert.

**Tab. 4-2: Für die RT-PCR von cDNA verwendete Oligonukleotide.**

Name	Sequenz
LacZ 201 (mu_rv)	GGCCTCTTCGATATTACGCC
m TGIF_VP_fw	TGGCAAGAGAAGGAGGAGAGGCAA
m TGIF-VP_rv	GGCGGGCGTTGATGAACCAG
mCasp4_fw	GGGAAACATGCTTGCTCTTGT
mCasp4_rv	CAGTTGCCAGGAAAGAGGTA
mFoxo3_fw	CTTCCCATATACCGCCAAGAG
mFoxo3_rv	GAAGAGAAGGTGGCTGGTC
mHdac5_fw	ATCAGCCAGAAGATGTACG
mHdac5_rv	TCCATTCTTCTTGAGCTCTCCTG
mHPRT_fw	GCTGGTGAAAAGGACCTCT
mHPRT_rv	CACAGGACTAGAACACCTGC
mIFNz_fw	CTCTGGAAGTGTCTGCCTGT
mIFNz_rv	GGTTTGGTTTGGTCTCCTTT
mItch_fw	ACAGCTTGATTCCATGGGTA
mItch_rv	TTCCACTTGGGACTGTTTGT
TGIF 105 (wt_fw)	TTCCCTGCTGGTGAAAGCAA
TGIF 207 (wt_rv)	TGTTTCATACAGCCAGTCTCG
TIEGfor	GGACACACACAGGTGAGAAGA
TIEGrev	TGTACCGTAATTTCCAGCCTC
Fos11_fw	AGAGCTGCAGAAGCAGAAGG
Fos11_rv	CAAGTACGGGTCCTGGAGAA
Il12R_fw	GCACAAACACCAGTGAGTGGC
Il12R_rev	ATGCAGCCCCTTTGCTCCGG
Ifng_fw	AGTTTGAGGTCAACAACCCACAGG
Ifng_rv	ACCCCGAATCAGCAGCGACT
mRPS18_fw	AGGATGTGAAGGATGGGAG
mRPS18_rv	TTGGATACACCCACAGTTCG

**Tab. 4-3: Für die 5'-RACE verwendete Oligonukleotide.**

	Oligo	Sequenz
<b>TGIF 001-009</b>	GSP1	GCCTCTCCTCCTTCTCTTGC
	GSP2	GCTGCTGATGAGGAAAGGTC
	GSP3	GGGACTGTCCATGCTGTCTT

**Tab. 4-4: Für die RT-PCR nach der ChIP verwendeten Oligos für die präzipitierte genomische DNA.**

Name	Sequenz
mTIEGp_fw	AGTCAGGTGGTCCCCGGAGTT
mTIEGp_rv	GGGCCTAGTGTGACCAATCA
Stat3_f1	CGGGCTTTTTTGTAAAGCTAGGC
Stat3_f2	CACACGTGGAAATGGCAAGTAC
Stat3_r1	CGCCTCTAGGAGAGAAGGC
Stat3_r2	GCTGATTGGTCAGCTCACAG
Tbet_fw	CAGCCCTAAGGACCCTCGG
Tbet_rv	AGAAGAAACGATGCTGTTGGTCCG
Tbx21_c1	CCGCCGGAACAACGACTTTC
Tbx21_c2	CTCCCCGTCTCCTAAACTGA

#### 4.1.4 Lösungen, Puffer und Medien

Die Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen und Puffer sind in den Abschnitten angegeben, in denen die jeweilige Methode beschrieben steht. Bei allen Puffern und Medien handelt es sich um wässrige Lösungen.

#### 4.1.5 Geräte

Alle in dieser Arbeit verwendeten Laborgeräte sind in Tab. 4-5 zusammengefasst.

**Tab. 4-5: Verwendete Geräte.**

Gerät	Hersteller
AutoMACS Cell Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
FACSFortessa	BD Biosciences, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop	Leica, Mannheim
Gelapparatur	Biometra, Göttingen
GeneChip-Array-Plattform	Affymetrix, Santa Clara (USA)
Heizblock Thermomixer Kompakt	Eppendorf, Hamburg
Heraeus BIOFUGE fresco	Thermo, Waltham (USA)
Inkubatoren	Thermo, Waltham (USA)
Lichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss, Jena
MACS Separator	Miltenyi biotec, Bergisch Gladbach
Megafuge 1.0 R	Thermo, Waltham (USA)
MPX Blotter	LiCor Biosciences, Bad Homburg

Gerät	Hersteller
Multi MACS Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Multifuge 3 S-R	Thermo, Waltham (USA)
MultiMACS M96 Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Nanodrop	Thermo Fischer Scientific, Bonn
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH &Ko. KG, Lauda Königshofen
Odyssey Infrared Imaging System	LiCor Biosciences, Bad Homburg
Qubit Fluorometer	Invitrogen, Karlsruhe
Spannungsquelle Power Pac HC	Bio-Rad, München
Speed Vac	Eppendorf, Hamburg
Stabsonifikator	Bandelin, Berlin
Sterilbänke	Heraeus, Osterode
Stratagene Mx3005P	Agilent Technologies
WB-Apparatur	BioRad, München
PCR-Gerät	MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler
Amaxa Nucleofektor II	Lonza, Köln
Blotapparatur	Bio-Rad, München

## 4.2 Molekularbiologische Arbeiten

### 4.2.1 DNA-Aufreinigung

Die Aufreinigung von Plasmiden erfolgte nach Herstellerangaben mit dem Plasmid-Mini oder Medi-Kit von Machery-Nagel.

Die Aufreinigung von PCR-Produkten und Enzymreaktionen erfolgte mit dem Quigenkit Mini-Elute-Kit.

DNA aus Agarosegelen wurde mit dem Quigenkit isoliert.

Die gewonnenen Chromatinfragmente aus der ChIP wurden mit dem Nucleo-ExtractII Kit von MacheryNagel aufgereinigt.

### 4.2.2. Chromatin Immunopräzipitation (ChIP)

Die ChIP wurde im Jahr 2000 von V. Orlando etabliert (Orlando, 2000) und bietet die Möglichkeit die Proteinbindung an DNA *in vivo* zu analysieren.

Diese bahnbrechende Methode ermöglicht die Bindung von Transkriptionsfaktoren zu verschiedenen Zeitpunkten unter verschiedenen Bedingungen und unterschiedlichen Zeitpunkten zu erfassen.

#### **4.2.2.1 Fixierung**

Für eine ChIP-Probe wurden zunächst  $2 \times 10^6$  T-Zellen geerntet und zweimal mit PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte mit 1 % iger Formaldehydlösung. Die Zellen wurden für 10 min bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Durch Zugabe von Glycin (Endkonzentration 0,125 Molar) wurde dann die Fixierung abgestoppt. Nach 5 min Inkubation erfolgte ein Waschschritt mit PBS.

#### **4.2.2.2 Scherung der DNA**

Mit Hilfe von ChIP-Lysepuffer (50  $\mu$ l /  $2 \times 10^6$  Zellen) und einer 10 minütigen Inkubation auf Eis erfolgte der Aufbruch der Zellen. Vor der Sonifikation wurden 150  $\mu$ l ChIP-Verdünnungspuffer hinzugegeben. Die Scherung der genomischen DNA wurde durch Sonifikation mit einem Stabsonifikator der Firma Bandelin erreicht. Hierfür wurde bei 36-38 % Power für fünf Mal 10 s sonifiziert und zwischendurch je 20 s auf Eis inkubiert. Mit einem 2 % igem Agarosegel wurde die Größe der gescherten DNA überprüft (durchschnittliche Größe 200-500 bp). Anschließend erfolgte die Abtrennung der Zellbruchstücke durch Zentrifugation (10 min 13 000 rpm, 4°C). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 300  $\mu$ l ChIP-Verdünnungspuffer (s. Tab.: 4-6) versetzt. 40  $\mu$ l der Probe wurden als Input abgenommen und bei -20 °C gelagert.

#### **4.2.2.3 IP**

Die Probe wurde über Nacht mit 2  $\mu$ g des jeweiligen Antikörpers bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die magnetischen Protein-A-Beads (bzw. Protein-G-Beads) durch eine einstündige Inkubation an den Antikörper gekoppelt. Vor dem Auftragen auf die Säule wurde die Probe durch Zugabe von 5 % igem Magermilchpulver abgesättigt, um unspezifische Bindungen zu Vermeiden. Die IP erfolgte mit dem MultiMACS M96 Separator von Milltenyi. Hierfür wurden Multi-8-Columns mit 100  $\mu$ l 1 % igem NP-40 und anschließend mit 100  $\mu$ l ChIP-Verdünnungspuffer equilibriert. Die mit Magermilch versetzte Probe wurde über die

Säule gegeben und dann die Säule mit je 4 x 250 µl der vier Waschpuffer (s. Tab. 4-6) gewaschen. Die Elution der DNA erfolgte mit 65 °C warmen Elutionspuffer (s. Tab. 4-6) und wurde 4 x mit je 50 µl durchgeführt.

#### 4.2.2.4 DNA-Aufreinigung

Die Defixierung des DNA-Protein-Komplexes wurde durch eine hohe Salzkonzentration (0,2 M NaCl) und Hitze (Inkubation von 4 h bei 65 °C) erreicht. Die Aufreinigung der DNA erfolgte nach dem Protokoll für SDS-haltige Proben des Nucleo Extract II Kit von Machery und Nagel. Die aufgereinigte DNA wurde dann unverdünnt für die qRT-PCR (4.2.6) eingesetzt. Die Anreicherung der DNA wurde wie folgt berechnet  $2^{(DNAInput-DNA\text{spezifischeIP})}$ . Verwendete Oligonukleotide sind in Tab. 4-3 aufgeführt.

**Tab. 4-6: Für die ChIP verwendeten Puffer.**

Puffer	Zusammensetzung
SDS-Lysepuffer (pH 8,5)	1 % SDS 10 mM EDTA 50 mM Tris + 1 Tablette EDTA freier Protease Inhibitor /20 ml
ChIP-Verdünnungspuffer (pH 8,1)	0,01 % SDS 1,1 % Triton X-100 1,2 mM EDTA 16,7 mM Tris-HCl 167 mM NaCl + 1 Tablette EDTA freier Protease Inhibitor +100 µg/ml Hering Sperm DNA
1. Waschpuffer: Low Salt Puffer (pH 8,1)	20 mM Tris-HCl 0,1% SDS 1 % Triton X-100 2 mM EDTA 150 mM NaCl
2. Waschpuffer: High Salt Puffer (pH 8,1)	0,1 % SDS 1 % Triton X-100 2 mM EDTA 20 mM Tris-HCl 500 mM NaCl
3. Waschpuffer: LiCl Puffer (pH 8,1)	0,25 M LiCl 1 % IGEPAL-CA630 1 % Natriumdeoxycholol 1 mM EDTA 10 mM Tris
4. Waschpuffer: TE-Puffer (pH 8,0)	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA
Elutionspuffer	0,1 M NaHCO <sub>3</sub> 1 % SDS

### 4.2.3. ChIP-Sequenzierung

ChIP-Seq ist eine NGS-Methode, die es erst seit 2007 gibt. Sie erlaubt die Protein-DNA Bindung *in vivo* genomweit zu analysieren.

Um die transkriptionelle Regulation komplett zu verstehen, ist die Genom-weite Erfassung von Protein-DNA Interaktionen und epigenetischen Markierungen wichtig. Die Methoden des NGS (Next-Generation-Sequencing) ermöglichen uns Millionen von kurzen DNA-Sequenzen parallel zu sequenzieren. Eine NGS-Methode ist die ChIP-Seq, sie bietet mehrere Vorteile im Vergleich zu der Vorgängermethode der ChIP-on Chip. Zum einen benötigt man sehr wenig Ausgangsmaterial und zum anderen erfasst man das komplette Genom.

Ein schematischer Ablauf der Prozedur ist Abbildung 4-1 zusehen.

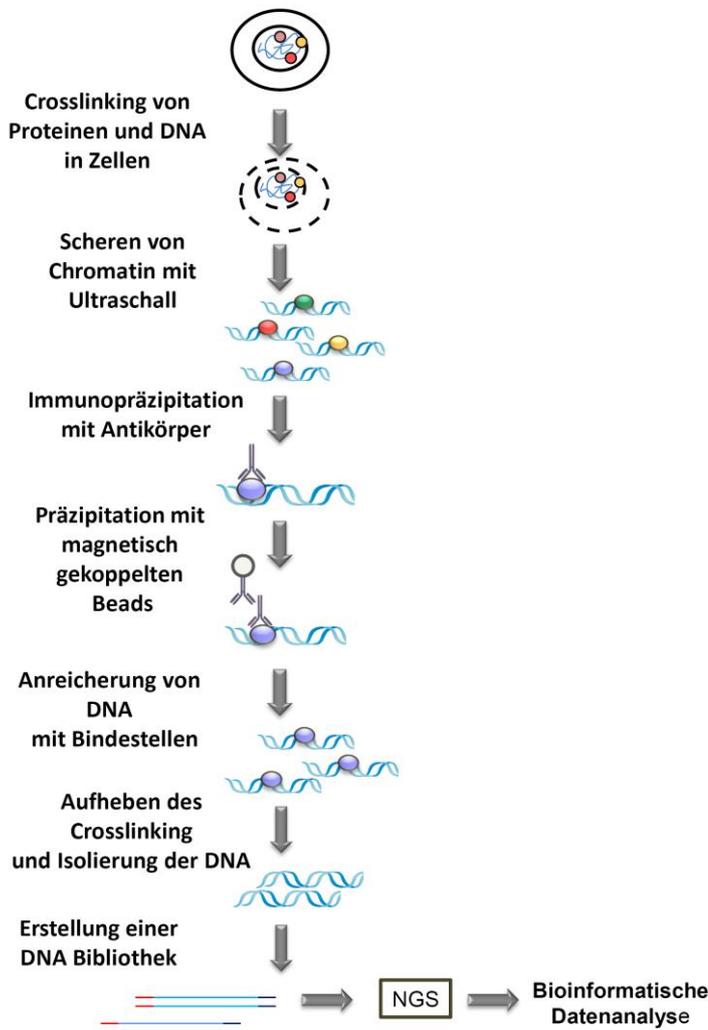


Abb. 4-1: Schema für ChIP-Sequenzierung.

Für die ChIP-Sequenzierung wurde zunächst das ChIP-Protokoll verwendet, jedoch wurde auf den Zusatz der Lachsspermien-DNA verzichtet, da diese bei der Sequenzierung stört.

Zudem wurden spezielle Reaktionsgefäße sowie Pipettenspitzen verwendet, an die weniger DNA und weniger Protein binden kann, als an den herkömmlichen. Die Sonifikation erfolgte bei einer Stärke von 40 - 42 %, da Fragmente zwischen 200 - 300 bp nötig sind. Die gewonnene DNA wurde von mehreren Proben gepoolt und durch die Speed-Vac konzentriert. Die DNA Konzentration wurde mittels Qubit und dem HS-DNA-Kit von Invitrogen bestimmt. Für die Erstellung der DNA-Bibliothek wurden 15-20 ng DNA der gepoolten ChIP-DNA eingesetzt. Sie erfolgte nach Herstellerangaben von Illumina. Die Quantität und die Qualität wurden mit einem Bioanalyserlauf (Aligent) überprüft. Die Vorbereitung der *Flow-cell*, die eigentliche Sequenzierung und Auswertung der Rohdaten erfolgten in dem Labor der AG Chen (MDC-Berlin Buch). Das Programm Bowtie (Langmead and Jha, 2009) wurde für den Abgleich, der sequenzierten Fragmente, mit dem Mausgenom verwendet. Weiterhin wurden die Programme MACS (Zhang et al., 2008) und *custom Python Scripts* verwendet.

#### **4.2.4 RNA-Aufreinigung**

Für die Extraktion von Total-RNA wurde das RNeasy Mini Kit von Qiagen verwendet. Die Isolierung erfolgte nach Herstellerangaben.

#### **4.2.5. cDNA-Synthese**

Die Umschreibung von RNA in cDNA erfolgte mit dem Superscript II-Kit von Invitrogen. Für die cDNA Synthese wurde zwischen 100 ng und 1 µg RNA eingesetzt.

#### **4.2.6 Realtime-PCR (qRT-PCR)**

Die totale RNA von  $1 - 5 \times 10^6$  Zellen wurde zunächst mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) isoliert und anschließend eine cDNA-Synthese mit dem Reverse Transkriptase Superscript II-Kit (Invitrogen) durchgeführt. Die Real-time PCR wurde in Duplikaten für je drei unabhängige Experimente am Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies) und dem Quiagen Sybr Green im 96 well Format durchgeführt. Hierzu wurde das Qiagen SybrGreen Kit verwendet. Die Spezifität der Produkte wurde durch die Schmelzkurvenanalyse überprüft. Für die verwendeten Oligos wurde eine Standardkurve bestimmt. Anschließend wurde die mRNA Expression mit der mRNA Expression des Referenzgens HPRT normalisiert.

Hierzu wurde die  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Methode (Yuan et al., 2006) verwendet:

$$Ratio = \frac{(E_{target})^{\Delta Ct_{target}}}{(E_{reference})^{\Delta Ct_{reference}}}$$

$$\Delta Ct_{target} = Ct_{control} - Ct_{treatment} \quad \text{und} \quad \Delta Ct_{reference} = Ct_{control} - Ct_{treatment}$$

$$Ratio = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{reference} - \Delta Ct_{target}$$

#### 4.2.7. Microarrays

Die Durchführung von Microarrays ermöglicht eine globale Untersuchung der Gen-Expression in zellulären Prozessen. So lassen sich in einem einzigen Experiment tausende von Genen gleichzeitig untersuchen. Auf einem Genchip sind kurze Oligonukleotide, die die kodierenden Regionen aller Gene des Genoms repräsentieren auf einem Glaträger fixiert. Die cDNA der Proben wird mehreren Wasch- und Hybridisierungsschritten mit Farbstoffen markiert und an die Sonden hybridisiert. Die Verbindung der cDNA und der Oligos auf dem Genchips wird über Wasserstoffbrücken realisiert. Nach dem Scannen lässt sich so eine Aussage über das Expressionsmuster treffen.

Für die Microarrays wurden naive  $CD4^+CD25^-CD45RB^{high}$  T-Zellen von B16 Mäusen verwendet. Die Sortierung erfolgte am AriaII-Cytometer (BD). Je  $7 \times 10^6$  Zellen wurden für 0, 2, 5 und 7 h mit und ohne Vorinkubation mit CsA mit  $5 \mu\text{g/ml}$  anti-CD3/anti-CD28 stimuliert. Aus den stimulierten Zellen wurden die lebenden Zellen durch eine DAPI-Färbung im AriaII von den toten Zellen getrennt. Zusätzlich wurden aus den *tgif1*<sup>-/-</sup> Mäusen nach der gleichen Strategie Proben für 0 h und für 5 h mit je  $5 \mu\text{g/ml}$   $\alpha$ -CD3 und  $\alpha$ -CD28 stimuliert.

Aus den sortierten Zellen erfolgte die Isolierung der Gesamt-RNA mit dem RNAeasy Kit von Qiagen. Die Konzentration der gewonnenen RNA wurde mit dem Qubit (Invitrogen) und dem RNA-Kit bestimmt und die Qualität im Bioanalyser (Agilent) überprüft. Für die Arrays wurde je 100 ng DNA eingesetzt. Es wurden die 1.0 ST Mouse Gene Arrays der Firma Affymetrix verwendet. Die Hybridisierung und die DNA-Synthese wurden mit dem Ambion WT Expression Kit, dem WT Terminal Labeling and Controls Kit und dem Hybridization, Wash and Stain Kit von Affymetrix von Heidi Schliemann (Labormanagerin im DRFZ) durchgeführt. Die Genearrays wurden mit einer Microarrayplattform (Affymetrix GeneChip Fluidics Workstation 400) nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurde der Affymetrix GeneChip Scanner 3000 (MG430Av2 arrays) verwendet. Aus den Signalintensitäten lassen sich Informatio-

nen gewinnen. Zur Auswertung der Daten wurde die Microarray Suite 5.0 Software (Affymetrix) herangezogen. Das Experiment wurde dreimal unabhängig voneinander wiederholt. Die Auswertung der Expressionsdaten wurde von Stefan Kröger durchgeführt. Die Qualitätskontrolle der gescannten Arrays wurde mit Hilfe des R Pakets *arrayQualityMetrics* (Kauffmann et al., 2009). Kein Microarray wurde auf Grund von offensichtlich-starker Mängel/ Defekte ausgeschlossen. Diskussionsbedarf besteht bzgl. des dritten KO-5h Arrays (TGIF-KO\_CD4\_stim\_5h\_c.CEL wurde als *outlier* markiert) aber wurde zunächst im Set gelassen wurde. Zur Normalisierung und Hintergrundkorrektur wurden das R *bioconductor* pakete “simpleaffy” (<http://www.bioconductor.org>) benutzt. Die Expressionswerte wurden dabei mittels der Methode “*robust multi-array average*” (*RMA*) *expression measure* bestimmt. Die Ergebnisse der Hintergrund Korrektur und Normalisierung zeigen die Abbildungen im Anhang (a, b). Zur Bestimmung der differenziell-exprimierter Transkripte wurde das das R Paket *limma* [4] genutzt. Die Expressionsunterschiede wurden zwischen den ausgewählten Zeitpunkten/Stimulationen die ermittelt (Vergleiche). Dafür wurde zum einen der *fold change* berechnet und zum andere mittels des T-Tests bestimmt ob diese Änderung der Expression signifikant ist. Zusätzlich zum minimalen Signifikanz-Niveau ( $p\text{-Wert} < 0.05$ ) wurde als weiteres Kriterium der minimale Absolutbetrag des *fold changes* auf größer 1 gesetzt. Daraus ergaben sich für die einzelnen Vergleiche die folgenden differenziell exprimierten Transkripte: (siehe im Anhang Tabelle der differenziell exprimierten Gene). Die Zuordnung der Transkripte zu Genen erfolgte mittels des R Pakets “*biomaRt*” (Durinck et al., 2005) welches den Zugriff auf den *biomaRt* (Kasprzyk et al., 2004) service von “ensembl” ermöglicht. Die Assoziationsanalysen der differenziell exprimierten Gene erfolgten mit der IPA-Software von Ingenuity Systems. Durchgeführt wurde eine *core analysis*. Dafür wurden die Ensemble Gen-IDs und der *Foldchange* der Expression der KO-Zellen im Vergleich zum WT eingespeist.

#### 4.2.8 SDS-Polyacrylgelelektrophorese

Das Zellpellet wurde hierfür mit 3 x Laemmli-Puffer versetzt ( $10 \mu\text{l}/1 \times 10^6$  Zellen) und für 45 s mechanisch mit einem Ultraschallstab aufgeschlossen und anschließend für fünf Minuten bei  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  aufgeköcht. Je nach Proteingröße wurde ein 10 % iges (bzw. 12 % iges) Gel (s. Tab. 4-7) verwendet. Als Größenstandard wurde der SeeBlue Plus2 von Invitrogen verwendet. Für 1,5 h wurde eine Spannung von 120 V angelegt.

**Tab. 4-7: Zusammensetzung eines SDS-Gels**

Gel 1x	Trenngel (10%)	Sammelgel
dest. Wasser [ml]	2,85	1,4
AA/Bis [ml]	1,15	0,42
Trenngelpuffer [ml]	1,75	-
Sammelgelpuffer [ml]	-	0,6
10 % SDS [ $\mu$ l]	70	25
APS [ $\mu$ l]	32,5	17,5
Temed [ $\mu$ l]	3,5	2,5

#### 4.2.9 Westernblot

Für den Transfer der Proteine auf die Membran wurde zunächst mit einem Skalpell das Sammelgel entfernt und dann das Trenngel zwischen zwei Kunststoffschwämmen und zwei Lagen Filterpapier mit einer Nitrocellulosemembran als Sandwich in die mit 1 x Blotpuffer gefüllte Tank-Blot-Apparatur gesteckt. Der Transfer erfolgte bei 0,4 A für 45 min auf einem Magnetrührer bei 4 °C (s. Tab. 4-8). Unspezifische Bindungen des Antikörpers wurden durch eine halbstündige Inkubation auf einem Schwenkschüttler mit Blockingpuffer verhindert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurde 3 x für fünf Minuten mit Blot-Waschpuffer gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde für 45 min bei RT inkubiert und anschließend der Blot erneut drei Mal für fünf Minuten gewaschen. Die verwendeten Antikörper sind in Tab. 4-9 zusammengefasst. Die Detektion des Fluoreszenzsignals erfolgte mit dem LiCor imaging Scanner (Licor). Die Auswertung wurde mit der von Odyssey Software (Licor) vorgenommen.

**Tab. 4-8: Zusammensetzung der Puffer für den Westernblot.**

Puffer	Zusammensetzung
Laemmli Puffer (6x)	300 mM Tris
	600 mM DTT
	12 % SDS
	60 % Glycerin
Laufpuffer (pH 8,3; 10x)	0,3 % Trypan Blau
	3,03 % Tris
	14,4 % Glycin
	1 % SDS
Blotpuffer (1x)	16 mM Tris
	0,12 M Glycin
	20 % Methanol
Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,5 M Tris-HCl
Sammelgelpuffer (pH6,8)	0,5 M Tris-HCl
Waschpuffer	PBS
	0,1 % Tween 20

#### 4.2.10 Genotypisierung der TGIF-KO-Mäuse

Zunächst wurde den 4 - 8 Wochen alten Tieren ein 0,2 - 0,5 cm großes Stück vom Schwanzende mit einer Schere entfernt und dieses in 500 µl Schwanz-Lyse-Puffer und Proteinase K (20 µg/ml) über Nacht bei 56 °C in einem Schüttelinkubator inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Haare und Knochen durch zentrifugieren (13000 rpm für 10 min) entfernt und der Überstand mit einem Volumen eiskaltem Isopropanol invertieren. Die Fällung der DNA erfolgte bei 13000 rpm für 10 min bei 4 °C. Mit 70 % EtOH wurde das Pellet anschließend gewaschen und erneut durch Zentrifugation gefällt. Die DNA wurde bei 37 °C getrocknet und in 100 µl TE-Puffer aufgenommen. Die DNA-Menge wurde am Nanodrop bestimmt und je 100 ng für die PCR eingesetzt.

##### PCR:

x µl (100 ng DNA)  
1 µl Polymerase Puffer  
1 µl dNTPs  
0,5 µl Taq Polymerase  
1 µl Primer 1  
1 µl Primer 2  
mit H<sub>2</sub>O auf 10 µl auffüllen

#### 4.2.11 DNA-Pull Down Assay

Um die Bindung von TGIF1 an gefundene Bindemotive zu bestätigen, wurde der DNA-Pull Down Assay gewählt. Für diese Methode werden biotinylierte Oligonukleotide, die das Bindemotif aus der gewünschten Region tragen genutzt.

Zunächst wurden Agarosebeads an die Oligos gebunden. Hierfür wurden 50 µl Streptavidin-Agarose-beads mit einem ml Waschpuffer (s. Tab. 4-9) gewaschen und pelletiert. Anschließend wurden die Beads in 400 µl Bindepuffer aufgenommen und mit biotinylierten Oligodesoxynukleotiden für 1 h bei schüttelnd bei RT inkubiert. Das Entfernen der nichtgebundenen Nukleotide wurde durch zweimaliges Waschen mit 1 ml Bindepuffer erreicht.

RLM-11 Zellen in Passage 6 – 18 wurden für Herstellung von Kernextrakten verwendet. Die beladenen Beads wurden in 400 µl Bindepuffer (s. Tab. 4-9) gelöst und mit 50 ng Kernextrakt für 3 h bei gleichmäßiger Bewegung und 4 °C inkubiert. Es folgten vier Waschschritte.

Die gebundenen Proteine wurden dann mit 30 - 50 µl Lämmli-Puffer (3 x) und einem Hitzeschritt für 10 min bei 95 °C eluiert. Die Proben wurden anschließend kurz auf Eis gekühlt. Die gelösten Beads wurden durch Zentrifugation von den Proteinen getrennt und der Überstand mittels SDS-PAGE (4.5.8) analysiert.

**Tab. 4-9: Zusammensetzung der Puffer für den Pull Down.**

Waschpuffer		Bindepuffer	
60 mM	KCl	1 mM	DTT
12 mM	HEPES	1 x	Protease-Inhibitoren
4 mM	Tris	2,5 % (w/v)	Heringsperma-DNA
500 µM	EDTA	in Waschpuffer	
5 % (v/v)	Glycerol		
in H <sub>2</sub> O, pH 8,0 mit HCl			

#### 4.2.12 Luziferase-Assay

Die Beeinflussung der TGIF1-Bindung auf die Expression des Genes sollte mit Hilfe von Luziferaseassays analysiert werden.

Zunächst wurde der *klf10*-Promoter in den pGL3-basic-Vektor kloniert, und in *E. coli* amplifiziert. Die pGL3-Vektoren kodieren für Luziferase aus dem Glühwürmchen (*Photinus pyralis*). Luziferasen zerfallen bei Reaktion mit ihrem Substrat unter Biolumineszenz, die als Leuchtsignal gemessen wird, und so Auskunft über die Expressionsstärke gibt. Der pRL-TK-Vektor exprimiert die Renilla Luziferase und wurde als interner Standard co-transfiziert.

2 x 10<sup>6</sup> RLM11-Zellen wurden mit dem Amaxa Cell Line Nucleofektor Kit L und dem Programm C-009 transfiziert. Anschließend wurden die Zellen in RPMI-Medium bei 37 °C für 24 h inkubiert.

#### 4.2.13 5'-RACE

Da nicht bekannt war, welche Transkriptvarianten von TGIF1 in T-Zellen exprimiert werden, wurde das 5'-RACE-Kit von Invitrogen verwendet. Es ermöglicht die Transkriptionsstartpunkte eines Genes zu finden. Das Protokoll wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 4-4 aufgeführt. Nach der zweiten PCR wurden die entstandenen Produkte auf einem 1 % iges Agarosegel aufgetrennt. Die DNA-Fragmente wurden einzeln aus dem Agarosegel mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) aufgereinigt und mit einer TOPO-TA-Klonierung (TOPO-TA Cloning for Sequencing Kit, Invitrogen) und anschließender Sequenzierung analysiert.

### 4.3 Zellkultur

Alle Zentrifugationsschritte mit lebenden Zellen erfolgten bei 600 x g für 8 min. Alle Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in einem Brutschrank der Firma Heraeus kultiviert. Die Sti-

mulation der Zellen erfolgte mit an zuvor an die Kultivierungs-Platten gekoppelten  $\alpha$ -CD3 und  $\alpha$ -CD28 Antikörpern.

In manchen Fällen wurde die unphysiologische Stimulationsmethode mit PMA/iono genutzt. So zum Beispiel auch für die Re-Stimulation der Cytokinproduktion.

### **4.3.1 Zelllinien**

Für die Vermehrung der Adenoviren wurde der Fibroblastenstamm HEK 293-A (Invitrogen) verwendet. Diese Zelllinie exprimiert das Protein E1, das für die Replikation des Virus nötig ist. Die HEK293-A Zellen wurden nach Herstellerangaben in DMEM-Kulturmedium bei 37 °C kultiviert.

Die murine CD4-Zelllinie RLM-11 wurde für die Luziferaseassays und die Pull Down verwendet. Für den Pull Down und den Luziferaseassay wurde eine murine T-Zelllinie (RLM-11) verwendet. Diese Zelllinie zeichnet sich durch eine hohe Expression von CD3 und des TCR aus (Literatur). Die Zellen sind  $CD3^+CD4^+CD8^-$  und haben ein intaktes TGF- $\beta$  Signaling (Diplomarbeit, Claudia Schlundt). Die Zellen wurden in 175 cm in RPMI-Medium kultiviert und alle zwei Tage 1:20 gesplittet.

### **4.2.2 Isolation von Lymphozyten und Milzzellen**

Zunächst wurden die Tiere mit Isofluran betäubt und mit Genickbruch getötet. Die Milz und die Lymphknoten (oberflächliche Hals-, achsiale, mesenteriale, inguinale, lumbare, caudale, renale, brachiale) wurden mit einer Pinzette entfernt und eine Einzelzellsuspension mit Hilfe eines feinporigen Metallsiebes erstellt. Die Erythrozyten aus der Milz wurden mit Erythrozytenlysebuffer entfernt (3 min RT, 1 ml pro Milz). Die Zellsuspension in PSA/BSA wurde dann mit den entsprechenden Antikörpern behandelt.

### **4.3.3 Sortierung von T-Zellen**

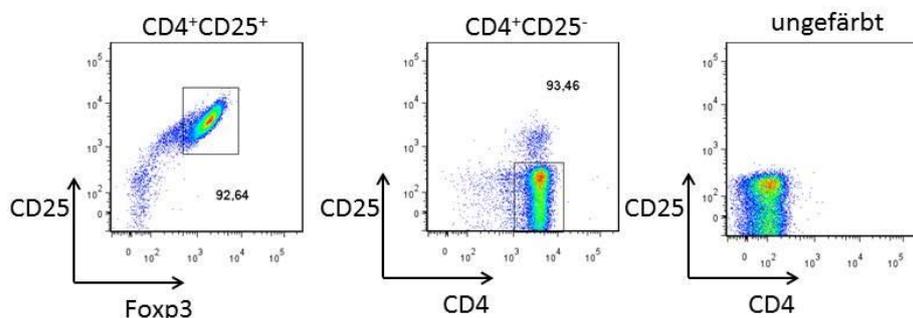
Die Einzelsuspension nach der Erythrozytenlyse wurde mit 20  $\mu$ g/ml Fc $\gamma$ -Blocker versetzt um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern. Anschließend wurden die Zellen mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert und mit Hilfe von magnetischer Zellsortierung am Automacs oder über Fluoreszenzfärbung der Oberflächenmarker am Zellsortierer AriaII sortiert.

**Tab. 4-10: Für die Sortierung verwendete Antikörper und Microbeads.**

Antikörper	Hersteller
CD4-Fitc	BD
CD25-APC	eBioscience
CD45RB-Pe	eBioscience
Microbeads	Hersteller
Anti-Fitc Microbeads	Milltenyi
Anti-APC-Microbeads	Milltenyi
Anti Mouse CD4 Beads	Milltenyi

#### 4.3.4 Gewinnung von murinen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen durch Magnetische Zellsortierung

Die Zellen wurden mit dem CD25-APC Antikörper für 10 min bei 4 °C inkubiert und anschließend mit PBS/BSA gewaschen. Anti-APC-Beads wurden für 15 min bei 4 °C zu den Zellen gegeben. Die Sortierung erfolgte nach einem erneuten Waschschrift und Vereinzeln der Zellen durch einen Separationfilter mit dem DepleteS Programm des Automacs-Gerätes. Die gewonnene CD25<sup>-</sup>-Fraktion wurde gewaschen und anschließend mit CD4-direkt-Beads für 15 min bei 4 °C inkubiert. Die Positiv-Selektion erfolgte durch einen zweiten Sortierungsschritt mit dem Posseld2 Programm des Automacs-Gerätes. Die erhaltenen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Zellen wurden auf ihre Reinheit am Durchflusszytometer überprüft. Sie waren bis zu 95 % rein für die Oberflächenmarker (s. Abb. 4-2).



**Abb. 4-2: Überprüfung der Reinheit der MACS sortierten Zellen. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Zellen, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Fcpx3<sup>+</sup> Zellen und eine ungefärbte Probe als Kontrolle.**

### 4.3.5 Gewinnung von murinen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen durch Magnetische Zellsortierung

Mit dem CD25-APC Antikörper wurden die Zellen für 10 min bei 4 °C inkubiert und anschließend mit PBS/BSA gewaschen. Anti-APC-Beads wurden 1:20 für 10 min bei 4 °C zu den Zellen gegeben. Die Sortierung erfolgte nach einem erneuten Waschschrift und Vereinzeln der Zellen durch einen Separationfilter mit dem Posseld2 Programm des Automacs-Gerätes. Die gewonnene CD25<sup>+</sup>-Fraktion wurde gewaschen und die Reinheit der Zellen durch eine intrazelluläre Foxp3-Färbung und anschließender Analyse am Durchflusszytometer überprüft. Mit dieser Methode erreicht man eine Reinheit von ~90 %. (s. Abb. 4-2).

### 4.3.6 Gewinnung von murinen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD45RB<sup>high</sup> T-Zellen durch FACS

Die Zellen wurde mit einer Antikörperlösung mit CD4-Fitc, CD25-APC und CD45RB-Pe für 10 min inkubiert und mit PBS/BSA gewaschen. Eine Vorsortierung der CD4<sup>+</sup> Zellen erfolgte durch Koppeln von Anti-Fitc Beads und Sortierung über eine LS-Säule von Milltenyi per Hand. Die vorsortierten Zellen wurden am Aria II nach CD4<sup>+</sup> und im zweiten Schritt nach CD25<sup>-</sup> und CD45RB<sup>high</sup> sortiert. Die erhalten Zellen waren bis zu 99,9 % Foxp3 negativ (s. Abb. 4-3).

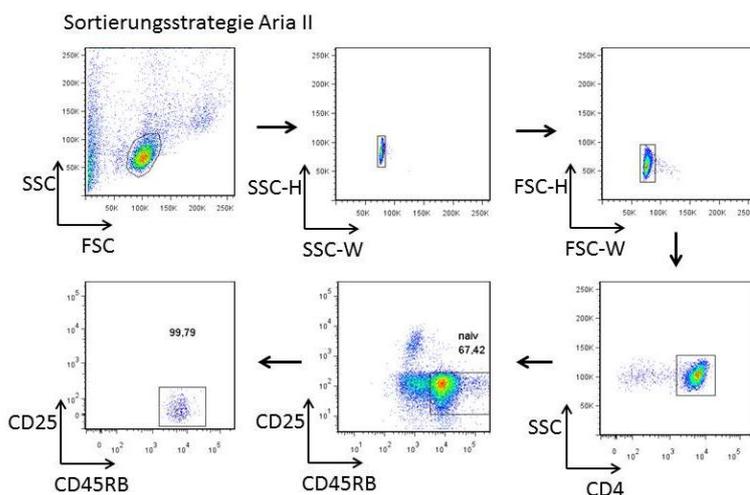


Abb. 4-3: Überprüfung der Reinheit der am Durchflusszytometer sortierten Zellen. Gating-Strategie am Zellsortierer ARIAI.

### **4.3.7 Gewinnung von murinen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup> T-Zellen durch FACS**

Es wurde wie in 4.3.6 verfahren und das Gate auf die CD25<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup> Zellen gesetzt. Die Reinheit der Treg-Zellen wurde durch eine intrazelluläre Foxp3 Färbung am Durchflusszytometer überprüft. Die Reinheit betrug bis zu 99,8 %.

### **4.3.8 Kultivierungsbedingungen für Primärzellen**

Die Isolierung und Kultivierung von primären T-Zellen erfolgte an Sterilbänken der Firma Heraeus. So wurde gewährleistet, dass keine fremden Keime in die T-Zelldifferenzierung beeinflussen. Alle Zellen wurden in Brutschränken der Firma Heraeus bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt kultiviert. Die Zellen wurden in RPMI-Medium (Invitrogen) mit den nachfolgend genannten Zusätzen kultiviert.

#### **RPMI 1640 komplett (DRFZ):**

RPMI 1640 (GlutaMAX)

FKS (10 %)

Mercaptoethanol (10 µg/ml)

Penicillin (100 U/ml)

Streptomycin (100 U/ml)

### **4.3.9 Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer Zählkammer**

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die jeweilige Zellsuspension entsprechend verdünnt und mit Trypanblau gefärbt (färbt tote Zellen) und in die Zählkammer pipettiert. Unter dem Lichtmikroskop wurde nun die Zellzahl nach folgender Formel berechnet:

$$A = B \times 10^4 \times VF \times V$$

A = Zellzahl [1/ml]

B = Mittelwert der 4 Großquadrate

V = Gesamtvolumen der Zellsuspension [ml]

VF = Verdünnungsfaktor

### 4.3.10 CFSE-Färbung

Die CFSE-Färbung bietet eine Möglichkeit, den Verlauf der Proliferation von kultivierten T-Zellen zu analysieren. Der Farbstoff CFDA-SE (Carboxyfluorescein *N*-succinimidyl Ester) diffundiert in die Zellen und wird in CFSE Derivaten gespalten, die in der Zelle verbleiben. Der Farbstoff wird an die Tochterzellen weitergegeben und verdünnt sich so mit jedem Teilungsschritt. Am FACS lassen sich so die einzelnen Populationen anhand der Farbstoffmenge pro Zelle unterscheiden.

Zunächst wurden die zu markierenden Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann  $5 \times 10^6$  Zellen pro ml PBS mit dem Farbstoff versetzt. Die Inkubationszeit war 1 min und 40 s bei RT im Dunkeln. Anschließend wurden die Zellen mit RPMI gewaschen und weiter kultiviert.

### 4.3.11 *in vitro* Differenzierungskulturen

Naive  $CD4^+CD25^-CD45RB^{high}$  Zellen wurden mit den in Tabelle 4-3 angegebenen Zusätzen für fünf Tagen kultiviert. Der TCR-Stimulus erfolgte durch je 1  $\mu\text{g/ml}$   $\alpha$ -CD3 und  $\alpha$ -CD28 das vorher an die Platte gekoppelte wurde. Nach drei Tagen wurden die Zellen 1:2 gesplittet und mit frischem Medium plus neuem IL-2 aufgefüllt. IL-2 ist wichtig für das Überlebenssignal von primären T-Zellen.

**Tab. 4-11: Kultivierungsbedingungen für die *in vitro* Th-Zelldifferenzierung.**

Zusätze	ng/ml				Hersteller
	Th-1	Th-2	Th-17	Treg	
rmIL-2	10	10	-	10	R&D
rmIL-4	-	30	-	-	R&D
rmIL-6	-	-	20	-	Reprotec
rmIL-12	20	-	-	-	R&D
rmIL-23	-	-	20	-	Reprotec
rmTGF- $\beta$	-	-	1	2	R&D
Anti-IL-4	10.000	-	10.000	10.000	DRFZ
Anti-IL-12	-	10.000	-	-	DRFZ
Anti-IFN $\gamma$	-	10.000	10.000	10.000	DRFZ

### 4.3.12 siRNA Behandlung von primären Zellen

Zunächst wurden 24well Platten mit PBS/BSA abgesättigt. Für die Transfektion wurden je  $5 \times 10^6$  CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen in 900µl Optimem (Gibco) in den abgesättigten Platten für eine halbe Stunde bei 37 °C inkubiert. 1 nM siRNA wurde in mit 89 µl Optimem und 6 µl Hyperfekt (Quiagen) vorsichtig gemischt und für eine halbe Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurde die siRNA Mischung vorsichtig auf die Zellen getropft und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Transfektion wurde durch Waschen der Zellen beendet und die Zellen in RPMI aufgenommen.

Für die Versuche wurden folgende siRNAs von Qiagen verwendet:

siTGIF1: Mm\_Tgif1\_2 FlexiTube siRNA  
Kontroll-siRNA: AllStars Negative Control siRNA.

## 4.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie bietet die Möglichkeit Zellen auf Einzelzellebene zu analysieren. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Zellen anhand ihrer Lichtstreuungseigenschaften unterschieden werden. Ein Durchflusszytometer wird auch FACS-Gerät (*fluorescence-activated cell sorter*) genannt. Photodetektoren messen das gestreute und emittierte Licht der einzeln vorbei schwimmenden Zellen. Mit diesen Informationen lassen sich Aussagen über die Größe und die Granularität der Zellen treffen. So lassen sich Lymphozyten von anderen Zellen trennen. Mit fluoreszierenden Antikörpern gekoppelte Zellen werden mit bis zu vier Lasern (LSRFortessa, BD) blau, rot, violett und UV angeregt und ermöglichen Analysen von bis zu 18 verschiedenen Farben gleichzeitig. Alle verwendeten Antikörper für die Durchflusszytometrie-Analysen sind in Tab. 4-12 zusammengefasst. Alle Durchflusszytometrie-Messungen wurden an einem LSRFortessa durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der Software FlowJo.

**Tab. 4-12: Für die Durchflusszytometrie verwendete Antikörper.**

Antikörper	Klon	Firma
$\alpha$ -IL-2-APC	JES6-5H	BD
$\alpha$ -IL-4-Pe	11B11	BD
$\alpha$ -IL-17A-Fitc	17B7	eBioscience
$\alpha$ -Foxp3-APC,-Pe,-PeCy7	FJK-16a	eBioscience
$\alpha$ -T-bet-Pe, BV	4B10	eBioscience
$\alpha$ -GATA3-APC	TWA3	eBioscience
$\alpha$ -ROR $\gamma$ t-Pe	AFKJS-9	eBioscience
$\alpha$ -IFN $\gamma$ -PeCy7	NK-1.1 (PK136)	BD
$\alpha$ -CD4-Fitc, PacBlue	GK1.5	BD
$\alpha$ -CD25-APC	PC61.5	eBioscience
$\alpha$ -CD8-Fitc	53-6.72	DRFZ
$\alpha$ -B220-Pe	RA3.6B2	DRFZ
$\alpha$ -Annexin V-APC		BD

#### 4.4.1 Färbung von Oberflächenmarkern

Die Expression der Oberflächenproteine von T-Zellen lässt sich mit der Durchflusszytometrie messen. Die isolierten Zellen wurden hierzu zunächst mit PBS/BSA gewaschen (Zentrifugation bei 400 x g, 10 min, 4 C) und dann für zehn min mit 100  $\mu$ l Färbelösung bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die Antikörper wurden hierfür in PBS/BSA entsprechend ihrer Färbeeigenschaften verdünnt. Anschließend wurden die Zellen erneut mit PBS/BSA gewaschen. Die Messung erfolgte ebenfalls in PBS/BSA.

#### 4.4.2 intrazelluläre Färbung

Um die Transkriptionsfaktoren der T-Zellen sowie ihre Cytokinproduktion im FACS-Gerät zu analysieren muss zuerst die Zellmembran der Zellen aufgebrochen werden und die Proteine fixiert werden. Nur so können die Antikörper in die Zelle gelangen. Für die Analyse der Cytokinproduktion muss zusätzlich die Sekretion der produzierten Cytokine durch Brefeldin A verhindert werden. Dieses wird von Pilzen wie z.B. *Eupenicillium brefeldianum* produziert

und wirkt in kürzester Zeit als Zellgift. Es verhindert den Transport vom Endoplasmatischem Retikulum zum Golgi-Apparat (Klausner et al., 1992).

#### **4.4.2.1 intrazelluläre Färbung der Transkriptionsfaktoren**

Die Fixierung und Färbung der Mastertranskriptionsfaktoren der T-Zelldifferenzierung erfolgte mit dem Foxp3-Staining Kit (eBioscience). Zunächst wurden die Zellen in 500 µl Fix/Perm-Lösung für eine halbe Stunde bei 4 °C im Dunkeln fixiert. Dann wurden sie zweimal mit 1 x Perm-Puffer gewaschen (Zentrifugation bei 400 x g, 10 min, 4 C). Die Färbung erfolgte in 1 x Perm-Puffer in 100 µl ebenfalls für eine halbe Stunde bei 4 °C im Dunkeln. Nach dem Waschen mit Perm-Puffer und PBS/BSA wurden die Zellen am Durchflusszytometer analysiert.

#### **4.4.2.2 intrazelluläre Färbung der Cytokine**

Die Fixierung der Zellen erfolgte mit Formaldehyd (2%) bei einer 30minütigen Inkubation bei RT im Dunkeln. Nach dem Abzentrifugieren wurde 0,5 %iges Saponin zu den Zellen gegeben und für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in einer Saponin-Antikörperlösung für 30 min bei RT gefärbt. Die Zellen wurden dann einmal mit Saponin und einmal mit PBS/BSA gewaschen.

#### **4.4.3 DAPI-Färbung**

Um tote von lebenden Zellen unterscheiden zu können, wurde in einigen Versuchen eine DAPI-Färbung (4',6-Diamidin-2-phenylindol durchgeführt). Dieser Fluoreszenzfarbstoff diffundiert in die Zelle und wird von lebenden Zellen aktiv wieder aus der Zelle gepumpt. In toten Zellen interkaliert er mit der DNA. So lassen sich am FACS tote (farbige) von lebenden (unfarbigen) Zellen unterscheiden

### **4.5. Adenovirale Überexpression**

Die adenoviral-vermittelte Überexpression bietet mehrere Vorteile. Zum einen gelangen die Viruspartikel durch den CAR-Rezeptor der DO11.10-CAR Mäuse spezifisch nur in die T-Zellen. Zum anderen ist keine Vor-Aktivierung nötig, wie es bei der Transduktion mit Ret-

roviren der Fall ist. So lassen sich in diesem Modell Aktivierungs- und Differenzierungsprozesse untersuchen, da die Zellen zum Zeitpunkt der Transduktion tatsächlich noch naiv sind.

### 4.5.1 Klonierung

Der Vektor pACDC-TGIF wurde von Vigo Heissmeyer (LMU) zur Verfügung gestellt. Der zweite Schritt erfolgte über eine Rekombinasereaktion, bei der TGIF-GFP mit IRES und Ub-Promoter in den Zielvektor pAd/PL-DEST (Invitrogen) nach Herstellerangaben rekombiniert wurde. Der sequenzierte Vektor wurde mit dem Maxi-Plasmid-Kit von Machery und Nagel nach Herstellerangaben aufgereinigt und anschließend mit dem Enzym PacI linearisiert.

### 4.5.2 Virenproduktion

Die Virenproduktion erfolgte ebenfalls nach Herstellerangaben mit dem speziellen Fibroblastenstamm HEK293A. Dieser produziert das E1-Protein, welches für die Vermehrung der Adenoviren benötigt wird. Die Viren können sich nur in Zellen, die das E1-Protein exprimieren vermehren.

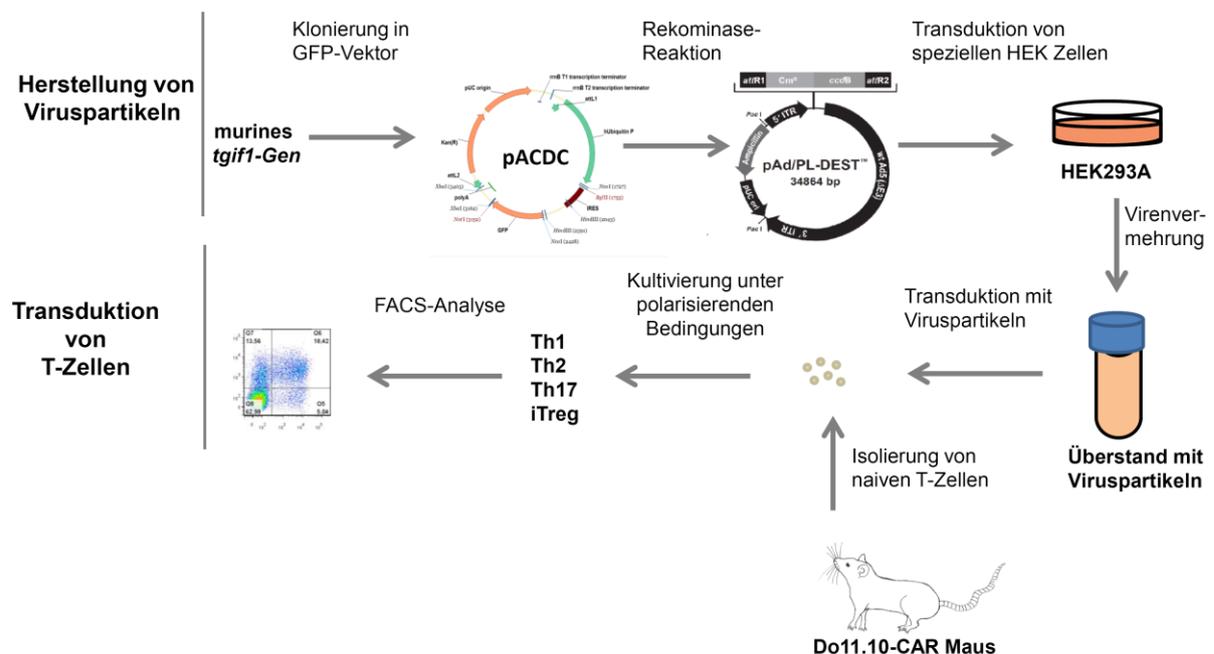


Abb. 4-4: Schematische Darstellung der adenoviral vermittelten Überexpression in naiven T-Zellen.

### 4.5.3 Transduktion primärer muriner T-Zellen

Für die Transduktion wurden die naiven  $CD4^+CD25^-CD45RB^{high}$  Zellen  $2 \times 10^6/ml$  in DMEM-Medium mit 10 % HEPES aufgenommen zusammen mit dem austitrierten Virusüberstand für TGIF-GFP oder GFP für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Zeit wurde das Medium durch RPMI ausgetauscht und die Zellen für fünf Tagen unter Th1, Th2, Th17 und Treg-Zellbedingungen kultiviert (siehe 4.2.3 T-Zell-Differenzierung). Die FACS-Analyse erfolgte mit den in der Tabelle 4-5 aufgelisteten Antikörpern. In Abbildung 4-4 ist der Ablauf der adenoviral vermittelten Überexpression von TGIF1 schematisch dargestellt.

### 4.6 Knockdown von TGIF1 mit shRNA

Für den Knockdown von TGIF1 mit shRNA (GGCCAAACTCACAGCTTAA) wurde der pQCXIX (CLONTECH) verwendet. Zunächst wurden HEK293-FT Zellen mit der Calcium-Phosphat-Methode transduziert. Hierfür wurden je 20 µg von pQCXIX-shTGIF1 und den Verpackungsplasmiden pCGP und pEco in einer 1 % iger  $CaCl_2$ -Lösung aufgenommen und mit einem Volumen HBS-Puffer vermischt. Die Transfektionslösung wurde dann auf die HEK293-FT Zellen getropft. Nach vier Stunden wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in DMEM für 24 - 48 h kultiviert. Die Ernte des Virusüberstandes erfolgte durch Filtrieren der Zellen durch einen 0,45 µm Filter. Der Virusüberstand wurde mit 10 mM HEPES abgepuffert.

Für die Transduktion von T-Zellen mit Retroviren ist eine Voraktivierung nötig, da der Virus nur in sich teilende Zellen tranloziert.  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen von Balb/c Mäusen wurden mit 1 µg/ml  $\alpha$ -CD3 und  $\alpha$ -CD28 unter Th1-Bedingungen (s. 4.) für 48 h kultiviert. Die Transduktion der primären T-Zellen erfolgte durch Zentrifugation für 1 h bei 700 xg und 30 °C. Für den Zentrifugationsschritt wurden  $2,5 \times 10^6$  Zellen und 1,5 ml Virus mit 8 µg/ml Polybrene und 10 mM HEPES vermischt. Anschließend wurde das Medium gewechselt und die Zellen unter Th1-Bedingungen für weitere zwei Tage kultiviert. Die Re-Stimulation an Tag vier erfolgte mit PMA/iono für vier Stunden. Die Analyse der interessanten Gene erfolgte mit RT-PCR mit spezifischen Oligos (s. Tab. 4-2).

## 4.7 Verwendete Mausstämme

Für die Charakterisierung des Expressionsmusters von TGIF1 wurden BALB/c Mäuse verwendet. Diese Linie wird üblicherweise für die immunologische Forschung genutzt, da sie sich leicht zur Antikörperproduktion anregen lassen. Für die Überexpression wurden spezielle Balb/c Mäuse (DO11.10-CAR) verwendet, die zum einen den transgenen TCR tragen, der spezifische Aktivierung der T-Zellen mit Ova-Albumin erlaubt und zum anderen tragen die T-Zell humanen Coxsackie/Adenovirus Rezeptor im dem die cytosolische Domäne fehlt (CAR $\Delta$ -I). Für die Microarrays und für die Wildtypkontrolle der *tgif1*<sup>-/-</sup> -Mäuse wurden C57BL/6NCrI (Bl6) Mäuse verwendet, da die *tgif1*<sup>-/-</sup> Ko-Mäuse auf Bl6 Hintergrund gezüchtet wurden. *Tgif1*<sup>-/-</sup> Mäuse sind KO-Mäuse, die durch einen Knock-In entstanden sind. Für das Colitis-Modell wurden RAG2<sup>-/-</sup> Mäuse verwendet, die sich durch das Fehlen von B- und T-Zellen auszeichnen. Sie eignen sich z.B. hervorragend für einen adoptiven Transfer von naiven Zellen, durch den im Darm eine Immunreaktion ausgelöst wird.

**Tab.4-13: Verwendete Linien von Laborinzucht- und Transgenen Mausstämmen.**

Mausstamm	Firma
BALB/cAnNCrI	Charles River
C57BL/6NCrI	Charles River
BALB/cJ-Tg(DO11.10)	BfR (Berlin)
RAG2 <sup>-/-</sup>	BfR (Berlin)
TGIF1 <sup>-/-</sup>	Labor von Pamela Hoodless (Kanada)
BALB/cJ-Tg(DO11.10)10Dlo Tg(CAR $\Delta$ -I)	Labor von Vigo Heissmeyer (München)

## 4.8 Haltungsbedingungen der Mäuse

Die Versuchstiere wurden in IVCs (individuell ventilierte Käfige) gehalten. Die Käfige im Regalsystem sind geschlossen und werden von durch einen HEPA-Filter gefilterte Luft durchströmt. Die Tiere wurden in einem 12 Stunden Hell/Dunkel-Rhythmus gehalten.

## 4.9 T-Zell Transfer induzierte Colitis

Um die gewonnenen *in vitro* Daten auch in einem *in vivo* Versuch zu verifizieren habe ich mich für die T-Zell induzierte Colitis in RAG defizienten Mäusen entschieden. Diese Mäuse



# I Quellen

Afkarian, M., Sedy, J.R., Yang, J., Jacobson, N.G., Cereb, N., Yang, S.Y., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2002). T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells. *Nat Immunol* 3, 549-557.

Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M.H., de Sauvage, F.J., and Gurney, A.L. (2003). Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* 278, 1910-1914.

Annes, J.P., Munger, J.S., and Rifkin, D.B. (2003). Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci* 116, 217-224.

Ansel, K.M., Djuretic, I., Tanasa, B., and Rao, A. (2006). Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility. *Annu Rev Immunol* 24, 607-656.

Asseman, C., Mauze, S., Leach, M.W., Coffman, R.L., and Powrie, F. (1999). An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* 190, 995-1004.

Baecher-Allan, C., and Hafler, D.A. (2006). Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. *Immunol Rev* 212, 203-216.

Bartholin, L., Powers, S.E., Melhuish, T.A., Lasse, S., Weinstein, M., and Wotton, D. (2006). TGIF inhibits retinoid signaling. *Mol Cell Biol* 26, 990-1001.

Bengoechea-Alonso, M.T., and Ericsson, J. (2010). Tumor suppressor Fbxw7 regulates TGFbeta signaling by targeting TGIF1 for degradation. *Oncogene* 29, 5322-5328.

Bennett, C.L., Brunkow, M.E., Ramsdell, F., O'Briant, K.C., Zhu, Q., Fuleihan, R.L., Shigeoka, A.O., Ochs, H.D., and Chance, P.F. (2001). A rare polyadenylation signal mutation of the FOXP3 gene (AAU-AAA-->AAUGAA) leads to the IPEX syndrome. *Immunogenetics* 53, 435-439.

Bertolino, E., Reimund, B., Wildt-Perinic, D., and Clerc, R.G. (1995). A novel homeobox protein which recognizes a TGT core and functionally interferes with a retinoid-responsive motif. *J Biol Chem* 270, 31178-31188.

Breitfeld, D., Ohl, L., Kremmer, E., Ellwart, J., Sallusto, F., Lipp, M., and Forster, R. (2000). Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med* 192, 1545-1552.

Brunkow, M.E., Jeffery, E.W., Hjerrild, K.A., Paepfer, B., Clark, L.B., Yasayko, S.A., Wilkinson, J.E., Galas, D., Ziegler, S.F., and Ramsdell, F. (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 27, 68-73.

Bruno, L., Mazarrella, L., Hoogenkamp, M., Hertweck, A., Cobb, B.S., Sauer, S., Hadjur, S., Leleu, M., Naoe, Y., Telfer, J.C., *et al.* (2009). Runx proteins regulate Foxp3 expression. *J Exp Med* 206, 2329-2337.

Burglin, T.R. (1997). Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals. *Nucleic Acids Res* 25, 4173-4180.

Cao, Z., Sun, X., Icli, B., Wara, A.K., and Feinberg, M.W. (2010). Role of Kruppel-like factors in leukocyte development, function, and disease. *Blood* 116, 4404-4414.

Cao, Z., Wara, A.K., Icli, B., Sun, X., Packard, R.R., Esen, F., Stapleton, C.J., Subramaniam, M., Kretschmer, K., Apostolou, I., *et al.* (2009). Kruppel-like factor KLF10 targets transforming growth factor-beta1 to regulate CD4(+)CD25(-) T cells and T regulatory cells. *J Biol Chem* 284, 24914-24924.

- Chang, S., Collins, P.L., and Aune, T.M. (2008). T-bet dependent removal of Sin3A-histone deacetylase complexes at the *Ifng* locus drives Th1 differentiation. *J Immunol* *181*, 8372-8381.
- Chaudhry, A., Rudra, D., Treuting, P., Samstein, R.M., Liang, Y., Kas, A., and Rudensky, A.Y. (2009). CD4<sup>+</sup> regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science* *326*, 986-991.
- Chen, F., Ogawa, K., Nagarajan, R.P., Zhang, M., Kuang, C., and Chen, Y. (2003a). Regulation of TG-interacting factor by transforming growth factor-beta. *Biochem J* *371*, 257-263.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003b). Conversion of peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> naive T cells to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* *198*, 1875-1886.
- Chen, Z., Laurence, A., Kanno, Y., Pacher-Zavisin, M., Zhu, B.M., Tato, C., Yoshimura, A., Hennighausen, L., and O'Shea, J.J. (2006). Selective regulatory function of *Socs3* in the formation of IL-17-secreting T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 8137-8142.
- Coffman, R.L., Seymour, B.W., Hudak, S., Jackson, J., and Rennick, D. (1989). Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science* *245*, 308-310.
- Davidson, T.S., DiPaolo, R.J., Andersson, J., and Shevach, E.M. (2007). Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cells. *J Immunol* *178*, 4022-4026.
- Demange, C., Ferrand, N., Prunier, C., Bourgeade, M.F., and Atfi, A. (2009). A model of partnership co-opted by the homeodomain protein TGIF and the Itch/AIP4 ubiquitin ligase for effective execution of TNF-alpha cytotoxicity. *Mol Cell* *36*, 1073-1085.
- Djuretic, I.M., Levanon, D., Negreanu, V., Groner, Y., Rao, A., and Ansel, K.M. (2007). Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate *Ifng* and silence *Il4* in T helper type 1 cells. *Nat Immunol* *8*, 145-153.
- Dubourg, C., Bendavid, C., Pasquier, L., Henry, C., Odent, S., and David, V. (2007). Holoprosencephaly. *Orphanet J Rare Dis* *2*, 8.
- Durinck, S., Moreau, Y., Kasprzyk, A., Davis, S., De Moor, B., Brazma, A., and Huber, W. (2005). BioMart and Bioconductor: a powerful link between biological databases and microarray data analysis. *Bioinformatics* *21*, 3439-3440.
- Egwuagu, C.E., Yu, C.R., Zhang, M., Mahdi, R.M., Kim, S.J., and Gery, I. (2002). Suppressors of cytokine signaling proteins are differentially expressed in Th1 and Th2 cells: implications for Th cell lineage commitment and maintenance. *J Immunol* *168*, 3181-3187.
- Ferber, I.A., Brocke, S., Taylor-Edwards, C., Ridgway, W., Dinisco, C., Steinman, L., Dalton, D., and Fathman, C.G. (1996). Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Immunol* *156*, 5-7.
- Finotto, S., Neurath, M.F., Glickman, J.N., Qin, S., Lehr, H.A., Green, F.H., Ackerman, K., Haley, K., Galle, P.R., Szabo, S.J., *et al.* (2002). Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science* *295*, 336-338.
- Floess, S., Freyer, J., Siewert, C., Baron, U., Olek, S., Polansky, J., Schlawe, K., Chang, H.D., Bopp, T., Schmitt, E., *et al.* (2007). Epigenetic control of the *foxp3* locus in regulatory T cells. *PLoS Biol* *5*, e38.
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Immunol* *4*, 330-336.
- Ghoreschi, K., Laurence, A., Yang, X.P., Tato, C.M., McGeachy, M.J., Konkel, J.E., Ramos, H.L., Wei, L., Davidson, T.S., Bouladoux, N., *et al.* (2010). Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature* *467*, 967-971.

- Ghosh, A.K., Yuan, W., Mori, Y., Chen, S., and Varga, J. (2001). Antagonistic regulation of type I collagen gene expression by interferon-gamma and transforming growth factor-beta. Integration at the level of p300/CBP transcriptional coactivators. *J Biol Chem* 276, 11041-11048.
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3, 23-35.
- Gorelik, L., Constant, S., and Flavell, R.A. (2002). Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *J Exp Med* 195, 1499-1505.
- Gorelik, L., Fields, P.E., and Flavell, R.A. (2000). Cutting edge: TGF-beta inhibits Th type 2 development through inhibition of GATA-3 expression. *J Immunol* 165, 4773-4777.
- Govinden, R., and Bhoola, K.D. (2003). Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta. *Pharmacol Ther* 98, 257-265.
- Gripp, K.W., Wotton, D., Edwards, M.C., Roessler, E., Ades, L., Meinecke, P., Richieri-Costa, A., Zackai, E.H., Massague, J., Muenke, M., *et al.* (2000). Mutations in TGIF cause holoprosencephaly and link NODAL signalling to human neural axis determination. *Nat Genet* 25, 205-208.
- Hamid, R., and Brandt, S.J. (2009). Transforming growth-interacting factor (TGIF) regulates proliferation and differentiation of human myeloid leukemia cells. *Mol Oncol* 3, 451-463.
- Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and Weaver, C.T. (2005). Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6, 1123-1132.
- Hatton, R.D., and Weaver, C.T. (2009). Duality in the Th17-Treg developmental decision. *F1000 Biol Rep* 1, 5.
- Heath, V.L., Murphy, E.E., Crain, C., Tomlinson, M.G., and O'Garra, A. (2000). TGF-beta1 down-regulates Th2 development and results in decreased IL-4-induced STAT6 activation and GATA-3 expression. *Eur J Immunol* 30, 2639-2649.
- Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057-1061.
- Hue, S., Ahern, P., Buonocore, S., Kullberg, M.C., Cua, D.J., McKenzie, B.S., Powrie, F., and Maloy, K.J. (2006). Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *J Exp Med* 203, 2473-2483.
- Hurez, V., Dzialo-Hatton, R., Oliver, J., Matthews, R.J., and Weaver, C.T. (2002a). Efficient adenovirus-mediated gene transfer into primary T cells and thymocytes in a new coxsackie/adenovirus receptor transgenic model. *BMC Immunol* 3, 4.
- Hurez, V., Hautton, R.D., Oliver, J., Matthews, R.J., and Weaver, C.K. (2002b). Gene delivery into primary T cells: overview and characterization of a transgenic model for efficient adenoviral transduction. *Immunol Res* 26, 131-141.
- Ivanov, II, McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., and Littman, D.R. (2006). The orphan nuclear receptor RORgamma directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 126, 1121-1133.
- Kang, S.M., Tang, Q., and Bluestone, J.A. (2007). CD4+CD25+ regulatory T cells in transplantation: progress, challenges and prospects. *Am J Transplant* 7, 1457-1463.
- Kang, Y., Chen, C.R., and Massague, J. (2003). A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Mol Cell* 11, 915-926.
- Kasprzyk, A., Keefe, D., Smedley, D., London, D., Spooner, W., Melsopp, C., Hammond, M., Rocca-Serra, P., Cox, T., and Birney, E. (2004). EnsMart: a generic system for fast and flexible access to biological data. *Genome Res* 14, 160-169.

- Kauffmann, A., Gentleman, R., and Huber, W. (2009). arrayQualityMetrics--a bioconductor package for quality assessment of microarray data. *Bioinformatics* 25, 415-416.
- Keaton, A.A., Solomon, B.D., Kauvar, E.F., El-Jaick, K.B., Gropman, A.L., Zafer, Y., Meck, J.M., Bale, S.J., Grange, D.K., Haddad, B.R., *et al.* (2011). TGIF Mutations in Human Holoprosencephaly: Correlation between Genotype and Phenotype. *Mol Syndromol* 1, 211-222.
- Kehrl, J.H., Wakefield, L.M., Roberts, A.B., Jakowlew, S., Alvarez-Mon, M., Derynck, R., Sporn, M.B., and Fauci, A.S. (1986). Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med* 163, 1037-1050.
- Kerdiles, Y.M., Stone, E.L., Beisner, D.R., McGargill, M.A., Ch'en, I.L., Stockmann, C., Katayama, C.D., and Hedrick, S.M. (2010). Foxo transcription factors control regulatory T cell development and function. *Immunity* 33, 890-904.
- Kim, J.Y., Kim, H.J., Hurt, E.M., Chen, X., Howard, O.M., and Farrar, W.L. (2007). Functional and genomic analyses of FOXP3-transduced Jurkat-T cells as regulatory T (Treg)-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 362, 44-50.
- Klausner, R.D., Donaldson, J.G., and Lippincott-Schwartz, J. (1992). Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol* 116, 1071-1080.
- Koch, M.A., Tucker-Heard, G., Perdue, N.R., Killebrew, J.R., Urdahl, K.B., and Campbell, D.J. (2009). The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat Immunol* 10, 595-602.
- Kolls, J.K., and Linden, A. (2004). Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 21, 467-476.
- Kopf, M., Le Gros, G., Bachmann, M., Lamers, M.C., Bluethmann, H., and Kohler, G. (1993). Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* 362, 245-248.
- Kosmaczewska, A., Ciszak, L., Potoczek, S., and Frydecka, I. (2008). The significance of Treg cells in defective tumor immunity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 56, 181-191.
- Kullberg, M.C., Jankovic, D., Feng, C.G., Hue, S., Gorelick, P.L., McKenzie, B.S., Cua, D.J., Powrie, F., Cheever, A.W., Maloy, K.J., *et al.* (2006). IL-23 plays a key role in Helicobacter hepaticus-induced T cell-dependent colitis. *J Exp Med* 203, 2485-2494.
- Kuperman, D.A., Huang, X., Koth, L.L., Chang, G.H., Dolganov, G.M., Zhu, Z., Elias, J.A., Sheppard, D., and Erle, D.J. (2002). Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. *Nat Med* 8, 885-889.
- Langmead, C.J., and Jha, S.K. (2009). Symbolic approaches for finding control strategies in Boolean Networks. *J Bioinform Comput Biol* 7, 323-338.
- Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W.M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J.D., McClanahan, T., Kastelein, R.A., and Cua, D.J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201, 233-240.
- Laurence, A., Tato, C.M., Davidson, T.S., Kanno, Y., Chen, Z., Yao, Z., Blank, R.B., Meylan, F., Siegel, R., Hennighausen, L., *et al.* (2007). Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 26, 371-381.
- Lazarevic, V., and Glimcher, L.H. (2011). T-bet in disease. *Nat Immunol* 12, 597-606.
- Le Gros, G., Ben-Sasson, S.Z., Seder, R., Finkelman, F.D., and Paul, W.E. (1990). Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *J Exp Med* 172, 921-929.

- Lee, Y.K., Mukasa, R., Hatton, R.D., and Weaver, C.T. (2009). Developmental plasticity of Th17 and Treg cells. *Curr Opin Immunol* 21, 274-280.
- Lewis, M.D., Miller, S.A., Miazgowiec, M.M., Beima, K.M., and Weinmann, A.S. (2007). T-bet's ability to regulate individual target genes requires the conserved T-box domain to recruit histone methyltransferase activity and a separate family member-specific transactivation domain. *Mol Cell Biol* 27, 8510-8521.
- Li, B., Samanta, A., Song, X., Iacono, K.T., Bembas, K., Tao, R., Basu, S., Riley, J.L., Hancock, W.W., Shen, Y., *et al.* (2007). FOXP3 interactions with histone acetyltransferase and class II histone deacetylases are required for repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 4571-4576.
- Li, H., Dai, M., and Zhuang, Y. (2004). A T cell intrinsic role of Id3 in a mouse model for primary Sjogren's syndrome. *Immunity* 21, 551-560.
- Li, M.O., Wan, Y.Y., Sanjabi, S., Robertson, A.K., and Flavell, R.A. (2006). Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 24, 99-146.
- Li, Q., Pangas, S.A., Jorgez, C.J., Graff, J.M., Weinstein, M., and Matzuk, M.M. (2008). Redundant roles of SMAD2 and SMAD3 in ovarian granulosa cells in vivo. *Mol Cell Biol* 28, 7001-7011.
- Lio, C.W., and Hsieh, C.S. (2008). A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity* 28, 100-111.
- Liu, B., Tahk, S., Yee, K.M., Fan, G., and Shuai, K. (2010). The ligase PIAS1 restricts natural regulatory T cell differentiation by epigenetic repression. *Science* 330, 521-525.
- Liu, X., Lee, Y.S., Yu, C.R., and Egwuagu, C.E. (2008). Loss of STAT3 in CD4+ T cells prevents development of experimental autoimmune diseases. *J Immunol* 180, 6070-6076.
- Long, M., Park, S.G., Strickland, I., Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2009). Nuclear factor-kappaB modulates regulatory T cell development by directly regulating expression of Foxp3 transcription factor. *Immunity* 31, 921-931.
- Longphre, M., Li, D., Gallup, M., Drori, E., Ordonez, C.L., Redman, T., Wenzel, S., Bice, D.E., Fahy, J.V., and Basbaum, C. (1999). Allergen-induced IL-9 directly stimulates mucin transcription in respiratory epithelial cells. *J Clin Invest* 104, 1375-1382.
- Lord, G.M., Rao, R.M., Choe, H., Sullivan, B.M., Lichtman, A.H., Luscinskas, F.W., and Glimcher, L.H. (2005). T-bet is required for optimal proinflammatory CD4+ T-cell trafficking. *Blood* 106, 3432-3439.
- Lucas, J.L., Mirshahpanah, P., Haas-Stapleton, E., Asadullah, K., Zollner, T.M., and Numerof, R.P. (2009). Induction of Foxp3+ regulatory T cells with histone deacetylase inhibitors. *Cell Immunol* 257, 97-104.
- Mangan, P.R., Harrington, L.E., O'Quinn, D.B., Helms, W.S., Bullard, D.C., Elson, C.O., Hatton, R.D., Wahl, S.M., Schoeb, T.R., and Weaver, C.T. (2006). Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 441, 231-234.
- Mann, M., and Jensen, O.N. (2003). Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol* 21, 255-261.
- Mantel, P.Y., Ouaked, N., Ruckert, B., Karagiannidis, C., Welz, R., Blaser, K., and Schmidt-Weber, C.B. (2006). Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells. *J Immunol* 176, 3593-3602.
- Mar, L., and Hoodless, P.A. (2006). Embryonic fibroblasts from mice lacking Tgif were defective in cell cycling. *Mol Cell Biol* 26, 4302-4310.
- Marie, J.C., Letterio, J.J., Gavin, M., and Rudensky, A.Y. (2005). TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med* 201, 1061-1067.

- Maruyama, T., Konkel, J.E., Zamarron, B.F., and Chen, W. (2011). The molecular mechanisms of Foxp3 gene regulation. *Semin Immunol* 23, 418-423.
- Maruyama, T., Li, J., Vaque, J.P., Konkel, J.E., Wang, W., Zhang, B., Zhang, P., Zamarron, B.F., Yu, D., Wu, Y., *et al.* (2010). Control of the differentiation of regulatory T cells and T(H)17 cells by the DNA-binding inhibitor Id3. *Nat Immunol* 12, 86-95.
- Massague, J., and Wotton, D. (2000). Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J* 19, 1745-1754.
- Melhuish, T.A., and Wotton, D. (2000). The interaction of the carboxyl terminus-binding protein with the Smad corepressor TGIF is disrupted by a holoprosencephaly mutation in TGIF. *J Biol Chem* 275, 39762-39766.
- Milner, J.D., Brenchley, J.M., Laurence, A., Freeman, A.F., Hill, B.J., Elias, K.M., Kanno, Y., Spalding, C., Elloumi, H.Z., Paulson, M.L., *et al.* (2008). Impaired T(H)17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome. *Nature* 452, 773-776.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., and Coffman, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136, 2348-2357.
- Mucida, D., Pino-Lagos, K., Kim, G., Nowak, E., Benson, M.J., Kronenberg, M., Noelle, R.J., and Cheroutre, H. (2009). Retinoic acid can directly promote TGF-beta-mediated Foxp3(+) Treg cell conversion of naive T cells. *Immunity* 30, 471-472; author reply 472-473.
- Mullen, A.C., High, F.A., Hutchins, A.S., Lee, H.W., Villarino, A.V., Livingston, D.M., Kung, A.L., Cereb, N., Yao, T.P., Yang, S.Y., *et al.* (2001). Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science* 292, 1907-1910.
- Mullen, A.C., Hutchins, A.S., High, F.A., Lee, H.W., Sykes, K.J., Chodosh, L.A., and Reiner, S.L. (2002). Hlx is induced by and genetically interacts with T-bet to promote heritable T(H)1 gene induction. *Nat Immunol* 3, 652-658.
- Munthe-Kaas, M.C., Carlsen, K.H., Haland, G., Devulapalli, C.S., Gervin, K., Egeland, T., Carlsen, K.L., and Undlien, D. (2008). T cell-specific T-box transcription factor haplotype is associated with allergic asthma in children. *J Allergy Clin Immunol* 121, 51-56.
- Murphy, K.T., P.; Walport, M. (2009). *Janeway Immunologie*, 7 edn (Spektrum).
- Neumann, J. (2008). *Immunologie Eine Einführung* (Heidelberg, Springer Verlag).
- Nevins, J.R., DeGregori, J., Jakoi, L., and Leone, G. (1997). Functional analysis of E2F transcription factor. *Methods Enzymol* 283, 205-219.
- Nolting, J., Daniel, C., Reuter, S., Stuelten, C., Li, P., Sucov, H., Kim, B.G., Letterio, J.J., Kretschmer, K., Kim, H.J., *et al.* (2009). Retinoic acid can enhance conversion of naive into regulatory T cells independently of secreted cytokines. *J Exp Med* 206, 2131-2139.
- Nunes, I., Shapiro, R.L., and Rifkin, D.B. (1995). Characterization of latent TGF-beta activation by murine peritoneal macrophages. *J Immunol* 155, 1450-1459.
- Nurieva, R.I., Chung, Y., Hwang, D., Yang, X.O., Kang, H.S., Ma, L., Wang, Y.H., Watowich, S.S., Jetten, A.M., Tian, Q., *et al.* (2008). Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity* 29, 138-149.
- O'Shea, J.J., Steward-Tharp, S.M., Laurence, A., Watford, W.T., Wei, L., Adamson, A.S., and Fan, S. (2009). Signal transduction and Th17 cell differentiation. *Microbes Infect* 11, 599-611.
- Oestreich, K.J., Huang, A.C., and Weinmann, A.S. (2011). The lineage-defining factors T-bet and Bcl-6 collaborate to regulate Th1 gene expression patterns. *J Exp Med* 208, 1001-1013.

- Oliveira, V.G., Caridade, M., Paiva, R.S., Demengeot, J., and Graca, L. (2011). Sub-optimal CD4+ T-cell activation triggers autonomous TGF-beta-dependent conversion to Foxp3+ regulatory T cells. *Eur J Immunol* *41*, 1249-1255.
- Orlando, V. (2000). Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. *Trends Biochem Sci* *25*, 99-104.
- Park, H., Li, Z., Yang, X.O., Chang, S.H., Nurieva, R., Wang, Y.H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., *et al.* (2005a). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* *6*, 1133-1141.
- Park, I.K., Shultz, L.D., Letterio, J.J., and Gorham, J.D. (2005b). TGF-beta1 inhibits T-bet induction by IFN-gamma in murine CD4+ T cells through the protein tyrosine phosphatase Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1. *J Immunol* *175*, 5666-5674.
- Patel, J.H., Du, Y., Ard, P.G., Phillips, C., Carella, B., Chen, C.J., Rakowski, C., Chatterjee, C., Lieberman, P.M., Lane, W.S., *et al.* (2004). The c-MYC oncoprotein is a substrate of the acetyltransferases hGCN5/PCAF and TIP60. *Mol Cell Biol* *24*, 10826-10834.
- Paul, W.E. (2010). What determines Th2 differentiation, in vitro and in vivo? *Immunol Cell Biol* *88*, 236-239.
- Pessah, M., Prunier, C., Marais, J., Ferrand, N., Mazars, A., Lallemand, F., Gauthier, J.M., and Atfi, A. (2001). c-Jun interacts with the corepressor TG-interacting factor (TGIF) to suppress Smad2 transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 6198-6203.
- Rao, A., Luo, C., and Hogan, P.G. (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* *15*, 707-747.
- Roehrl, M.H., Kang, S., Aramburu, J., Wagner, G., Rao, A., and Hogan, P.G. (2004). Selective inhibition of calcineurin-NFAT signaling by blocking protein-protein interaction with small organic molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 7554-7559.
- Ruan, Q., Kameswaran, V., Tone, Y., Li, L., Liou, H.C., Greene, M.I., Tone, M., and Chen, Y.H. (2009). Development of Foxp3(+) regulatory t cells is driven by the c-Rel enhanceosome. *Immunity* *31*, 932-940.
- Rudd, C.E., Taylor, A., and Schneider, H. (2009). CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol Rev* *229*, 12-26.
- Rudra, D., Egawa, T., Chong, M.M., Treuting, P., Littman, D.R., and Rudensky, A.Y. (2009). Runx-CBFbeta complexes control expression of the transcription factor Foxp3 in regulatory T cells. *Nat Immunol* *10*, 1170-1177.
- Sadowski, M., and Sarcevic, B. (2010). Mechanisms of mono- and poly-ubiquitination: Ubiquitination specificity depends on compatibility between the E2 catalytic core and amino acid residues proximal to the lysine. *Cell Div* *5*, 19.
- Saha, B., Jyothi Prasanna, S., Chandrasekar, B., and Nandi, D. (2009). Gene modulation and immunoregulatory roles of interferon gamma. *Cytokine* *50*, 1-14.
- Sakaguchi, S., Ono, M., Setoguchi, R., Yagi, H., Hori, S., Fehervari, Z., Shimizu, J., Takahashi, T., and Nomura, T. (2006). Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* *212*, 8-27.
- Seki, Y., Inoue, H., Nagata, N., Hayashi, K., Fukuyama, S., Matsumoto, K., Komine, O., Hamano, S., Himeno, K., Inagaki-Ohara, K., *et al.* (2003). SOCS-3 regulates onset and maintenance of T(H)2-mediated allergic responses. *Nat Med* *9*, 1047-1054.
- Sekimata, M., Perez-Melgosa, M., Miller, S.A., Weinmann, A.S., Sabo, P.J., Sandstrom, R., Dorschner, M.O., Stamatoyannopoulos, J.A., and Wilson, C.B. (2009). CCCTC-binding factor and the transcription

factor T-bet orchestrate T helper 1 cell-specific structure and function at the interferon-gamma locus. *Immunity* 31, 551-564.

Shi, M., Lin, T.H., Appell, K.C., and Berg, L.J. (2008). Janus-kinase-3-dependent signals induce chromatin remodeling at the *Ifng* locus during T helper 1 cell differentiation. *Immunity* 28, 763-773.

Shi, Y., and Massague, J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113, 685-700.

Shin, H.J., Lee, J.B., Park, S.H., Chang, J., and Lee, C.W. (2009). T-bet expression is regulated by EGR1-mediated signaling in activated T cells. *Clin Immunol* 131, 385-394.

Stockinger, B., and Veldhoen, M. (2007). Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol* 19, 281-286.

Sun, C.M., Hall, J.A., Blank, R.B., Bouladoux, N., Oukka, M., Mora, J.R., and Belkaid, Y. (2007). Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med* 204, 1775-1785.

Sung, J.L., Lin, J.T., and Gorham, J.D. (2003). CD28 co-stimulation regulates the effect of transforming growth factor-beta1 on the proliferation of naive CD4+ T cells. *Int Immunopharmacol* 3, 233-245.

Swain, S.L., Weinberg, A.D., English, M., and Huston, G. (1990). IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol* 145, 3796-3806.

Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., and Glimcher, L.H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100, 655-669.

Szabo, S.J., Sullivan, B.M., Stemmann, C., Satoskar, A.R., Sleckman, B.P., and Glimcher, L.H. (2002). Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science* 295, 338-342.

Takeda, K., Noguchi, K., Shi, W., Tanaka, T., Matsumoto, M., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Akira, S. (1997). Targeted disruption of the mouse *Stat3* gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3801-3804.

Takimoto, T., Wakabayashi, Y., Sekiya, T., Inoue, N., Morita, R., Ichiyama, K., Takahashi, R., Asakawa, M., Muto, G., Mori, T., *et al.* (2010). Smad2 and Smad3 are redundantly essential for the TGF-beta-mediated regulation of regulatory T plasticity and Th1 development. *J Immunol* 185, 842-855.

Tischner, D., Wieggers, G.J., Fiegl, H., Drach, M., and Villunger, A. (2012). Mutual antagonism of TGF-beta and Interleukin-2 in cell survival and lineage commitment of induced regulatory T cells. *Cell Death Differ.*

Tone, Y., Furuuchi, K., Kojima, Y., Tykocinski, M.L., Greene, M.I., and Tone, M. (2008). Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat Immunol* 9, 194-202.

Townsend, J.M., Fallon, G.P., Matthews, J.D., Smith, P., Jolin, E.H., and McKenzie, N.A. (2000). IL-9-deficient mice establish fundamental roles for IL-9 in pulmonary mastocytosis and goblet cell hyperplasia but not T cell development. *Immunity* 13, 573-583.

Ulloa, L., Doody, J., and Massague, J. (1999). Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signaling by the interferon-gamma/STAT pathway. *Nature* 397, 710-713.

Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M., and Stockinger, B. (2006). TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24, 179-189.

Venuprasad, K., Huang, H., Harada, Y., Elly, C., Subramaniam, M., Spelsberg, T., Su, J., and Liu, Y.C. (2008). The E3 ubiquitin ligase Itch regulates expression of transcription factor Foxp3 and airway inflammation by enhancing the function of transcription factor TIEG1. *Nat Immunol* 9, 245-253.

- Vermeire, K., Heremans, H., Vandeputte, M., Huang, S., Billiau, A., and Matthys, P. (1997). Accelerated collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice. *J Immunol* *158*, 5507-5513.
- Wakabayashi, Y., Tamiya, T., Takada, I., Fukaya, T., Sugiyama, Y., Inoue, N., Kimura, A., Morita, R., Kashiwagi, I., Takimoto, T., *et al.* (2011). Histone 3 lysine 9 (H3K9) methyltransferase recruitment to the interleukin-2 (IL-2) promoter is a mechanism of suppression of IL-2 transcription by the transforming growth factor-beta-Smad pathway. *J Biol Chem* *286*, 35456-35465.
- Wan, Y.Y., Leon, R.P., Marks, R., Cham, C.M., Schaack, J., Gajewski, T.F., and DeGregori, J. (2000). Transgenic expression of the coxsackie/adenovirus receptor enables adenoviral-mediated gene delivery in naive T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 13784-13789.
- Wei, G., Wei, L., Zhu, J., Zang, C., Hu-Li, J., Yao, Z., Cui, K., Kanno, Y., Roh, T.Y., Watford, W.T., *et al.* (2009). Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4+ T cells. *Immunity* *30*, 155-167.
- Wei, L., Laurence, A., Elias, K.M., and O'Shea, J.J. (2007). IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner. *J Biol Chem* *282*, 34605-34610.
- Williams, L.M., and Rudensky, A.Y. (2007). Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat Immunol* *8*, 277-284.
- Wirnsberger, G., Mair, F., and Klein, L. (2009). Regulatory T cell differentiation of thymocytes does not require a dedicated antigen-presenting cell but is under T cell-intrinsic developmental control. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 10278-10283.
- Wotton, D., Knoepfler, P.S., Laherty, C.D., Eisenman, R.N., and Massague, J. (2001). The Smad transcriptional corepressor TGIF recruits mSin3. *Cell Growth Differ* *12*, 457-463.
- Wotton, D., Lo, R.S., Lee, S., and Massague, J. (1999a). A Smad transcriptional corepressor. *Cell* *97*, 29-39.
- Wotton, D., Lo, R.S., Swaby, L.A., and Massague, J. (1999b). Multiple modes of repression by the Smad transcriptional corepressor TGIF. *J Biol Chem* *274*, 37105-37110.
- Xia, G., Shah, M., and Luo, X. (2009). Prevention of allograft rejection by amplification of Foxp3(+)CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Transl Res* *153*, 60-70.
- Xu, L., Kitani, A., Stuelten, C., McGrady, G., Fuss, I., and Strober, W. (2010). Positive and negative transcriptional regulation of the Foxp3 gene is mediated by access and binding of the Smad3 protein to enhancer I. *Immunity* *33*, 313-325.
- Yang, Y., Xu, J., Niu, Y., Bromberg, J.S., and Ding, Y. (2008). T-bet and eomesodermin play critical roles in directing T cell differentiation to Th1 versus Th17. *J Immunol* *181*, 8700-8710.
- Yuan, J.S., Reed, A., Chen, F., and Stewart, C.N., Jr. (2006). Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* *7*, 85.
- Zaiss, D.M., Yang, L., Shah, P.R., Kobie, J.J., Urban, J.F., and Mosmann, T.R. (2006). Amphiregulin, a TH2 cytokine enhancing resistance to nematodes. *Science* *314*, 1746.
- Zhang, H., Li, N., Tang, Y., Wu, W., Zhang, Q., and Yu, Z. (2009). Negative functional interaction of retinoic acid and TGF-beta signaling mediated by TG-interacting factor during chondrogenesis. *Cell Physiol Biochem* *23*, 157-164.
- Zhang, J. (2007). Yin and yang interplay of IFN-gamma in inflammation and autoimmune disease. *J Clin Invest* *117*, 871-873.
- Zhang, Y., Liu, T., Meyer, C.A., Eeckhoute, J., Johnson, D.S., Bernstein, B.E., Nusbaum, C., Myers, R.M., Brown, M., Li, W., *et al.* (2008). Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol* *9*, R137.

## Quellen

**Zheng, Y., Josefowicz, S., Chaudhry, A., Peng, X.P., Forbush, K., and Rudensky, A.Y. (2010). Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature* 463, 808-812.**

**Zhu, J., and Paul, W.E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 112, 1557-1569.**

## II Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
acH4	Acetyliertes Histon H4
AP-1	<i>Activator Protein-1</i>
APC	Antigen präsentierende Zelle(n)
APS	Ammoniumpersulfat
Akt	<i>thymoma viral proto-oncogene 1</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BCR	B-Zellrezeptor
C	Cytosin
CaN	Calcineurin
Casp	Caspase
CCL	<i>Chemokine (C-C motif) ligand</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CFSE	<i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>
ChIP	Chromatinimmunopräzipitation
ChIP-Seq	ChIP-Sequenzierung
CMV	Cytomegalie-Virus
CNS	konservierte nicht-kodierende DNA-Elemente
CREB	<i>cAMP responsive element binding protein</i>
CsA	Cyclosporin A
CTLA-4	<i>Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4</i>
Ct-Wert	<i>Cycle threshold</i>
CXCR	<i>C-X-C chemokine receptor type</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol - Dihydrochlorid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
E2A	Synonym für Tcf3 (Transkriptionsfaktor 3)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Erk	<i>Extracellular-signal-related kinase 1</i>
EtOH	Ethanol
FA	Formaldehyd
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
Fosll	<i>Fos-like antigen 1</i>
Foxo3	<i>Forkhead box O3</i>
Foxp3	<i>Forkhead box P3</i>
FSC	<i>Forward-scatter</i>
G	Guanin
GAS	<i>Gamma interferon activation site</i>
GATA3	<i>GATA binding protein 3</i>
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GITR	<i>Glukokortikoid-induced TNF receptor-related gene</i>
H3K4me3	Am Lys 4 dreifach methyliertes Histon H3

## Abkürzungsverzeichnis

HDAC	Histondeacetylase(n)
HEK293A	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure-Puffer
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
IBD	<i>Inflammatory bowel disease</i>
ID3	<i>inhibitor of DNA binding 3</i>
IFN	Interferon
IPEX	Immundysregulation-Polyendokrinopathie-Enteropathie-X
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
IgG	Immunglobulin G
iono	Ionomycin
IP	Immunopräzipitation
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
Itch	<i>Itchy</i>
iTreg	induzierte regulatorische T-Zelle
IVC	individuell ventilierte Käfige
IκB	Inhibitor of κB
JAK	Janus Kinase
JNK	Jun-N-terminale-kinase
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
KLF	<i>Kruppel-like factor</i>
KO	<i>Knockout</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>
MACS	magnetische Zellsortierung (Magnetic Cell Sorting)
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
mLN	mesenteriale Lymphknoten
MPI	Max Planck Institut
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
NFκB	<i>Nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NK	Natürliche Killerzelle
nTreg	natürliche regulatorische T-Zelle
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBST	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit 1% Tween
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	PhyCoerythrin
PI	Proteaseinhibitor
PI-3-K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositolbisphosphat
PKCθ	Proteinkinase Cθ
PLC-γ	Phospholipase C-γ
PMA	Phorbol-12-myristyl-13-acetat
qRT-PCR	quantitative Realtime--PCR
RAG	<i>Recombination activating gene</i>
RORγt	<i>RAR-related orphan receptor gamma</i>
RT	Raumtemperatur
S2	Sicherheitsstufe 2
SARA	<i>Smad anchor for receptor activation</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat

## Abkürzungsverzeichnis

SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Smad	<i>Sma and Mad related proteins</i>
SnoN	<i>Ski-related novel protein N</i>
SOCS	<i>suppressor of cytokine signaling</i>
SSC	<i>Sideward-scatter</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
T	Thymidin
T-bet	T-box 21
TCR	T-Zellrezeptor
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor beta</i>
TGF $\beta$ R	TGF- $\beta$ Rezeptor
TGIF	<i>TGF-<math>\beta</math>-interacting factor</i>
Th	T-Helferzelle
TIEG	<i>TGF<math>\beta</math>-inducible early gene</i>
Tm	Schmelztemperatur
TSDR	<i>Treg cell-specific demethylated region</i>
TSS	Transkriptionsstartstelle
WT	Wildtyp

### III Publikationen

#### Publikationen:

1. **TLR2-activated human langerhans cells promote Th17 polarization via IL-1beta, TGF-beta and IL-23.** Aliahmadi E, Gramlich R, Grützkau A, Hitzler M, Krüger M, Baumgrass R, Schreiner M, Wittig B, Wanner R, Peiser M. Eur J Immunol. 2009 May;39(5):1221-30.
- 2) **Methylation matters: binding of Ets-1 to the demethylated Foxp3 gene contributes to the stabilization of Foxp3 expression in regulatory T cells.** Polansky JK, Schreiber L, Thelemann C, Ludwig L, Krüger M, Baumgrass R, Cording S, Floess S, Hamann A, Huehn J. JMol Med (Berl). 2010 Oct;88(10):1029-40. Epub 2010 Jun 24.
- 3) **TGIF1 a transcriptional Co-Repressor of Foxp3 induction** (in preparation)  
Krüger et. al.

## IV Danksagung

PD Dr. Ria Baumgraß möchte ich für die die Betreuung dieser Arbeit und für Möglichkeit in dieser tollen Arbeitsgruppe am DRFZ zu promovieren. Außerdem möchte ich ihr für das breite und finanziell gesehen auch nicht günstige Methodenspektrum, das ich nutzen durfte, danken.

Herr Prof. Dr. Mutzel gilt ein großer Dank für die Begutachtung dieser Arbeit.

Einen besonderen Dank möchte ich an dieser Stelle an Astrid Menning aussprechen, die die Richtung des Projektes maßgeblich vorangetrieben hat und auch immer für Diskussionen bereit stand.

Martin Karl möchte ich für die Durchführung der Pull Downs und des Luciferase-Assays danken.

Ein Dank auch an Manja Jargosch die einige Zielgene von TGIF1 mit der shRNA untersuchte und auch an Maria Jäpel für die Etablierung der RACE-Methode.

Frau Dr. Anja Kühl möchte ich für das Scoring der Därme aus dem Colitis-Experiment danken.

Stefan Kröger und Andreas Gogol-Döring möchte ich für die bioinformatische Auswertung der Microarrays und der ChIP-Seq Daten danken.

Heidi Schliemann gilt ein besonderer Dank für die Durchführung der Microarrays mit der Affymetrix-Plattform.

Für die Zellsortierungsbetreuung möchte ich an dieser Stelle Jenny und Toralf danken.

Dr. Vigo Heissmeyer und Dr. Pamela Hoodless möchte ich für die Bereitstellung der Do-11.10-CAR und der TGIF1-KO Mäuse danken, ohne die die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Hanna Bendfeldt, Claudia Brandt, Maria Lexberg, Inka Albrecht, Astrid Menning und Stefan Frischbutter möchte ich für die lustigen Abende, die die Zeit der Promotion versüßt haben danken.

Manja Jargosch, Tobias Scheel und Helga und Norbert Venzke möchte ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit danken.

# **V Lebenslauf**

## **Curriculum vitae**

Der Lebenslauf ist aus Datenschutzgründen in der Online-Version nicht enthalten.

## **VI Eidstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unzulässige Hilfsmittel angefertigt habe. Ich habe keine als die hier angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet. Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Melanie Krüger

Berlin, den 20.03.2012