

# **Identifikation von wichtigen Transkriptionsfaktoren bei der Differenzierung von T-Helferzellen mittels integrativer Netzwerkanalysen**

Der Transkriptionsfaktor IRF8 ist ein Regulator der Th1 und Treg Differenzierung

## **Dissertation**

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

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

vorgelegt von

**Manja Jargosch (M.Sc)**

am 29. September 2015







Diese Arbeit wurde vom 15.10.2010 bis zum 29.09.2015 am Deutschen Rheuma-Forschungszentrum (DRFZ) in der Arbeitsgruppe Signaltransduktion von Prof. Dr. Ria Baumgrass angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ria Baumgrass

2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am: 02.02.2016 um 14 Uhr



## Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Ria Baumgrass für die Betreuung dieser Dissertation sowie für die Möglichkeit in der Arbeitsgruppe Signaltransduktion am DRFZ in einer sehr willkommenen Atmosphäre zu promovieren. Neben vielen Einblicken in die Biologie von T-Zellen während meiner Zeit am DRFZ verdanke ich ihr einen geschärften Blick für „das Wesentliche“ bei der kritischen Rezeption von wissenschaftlichen Veröffentlichungen und Projektanträgen. Ebenfalls danken möchte ich Prof. Dr. Rupert Mutzel, dessen Bereitschaft zur Betreuung es mir ermöglicht, die Promotion an der Freien Universität Berlin anstreben zu können.

Des Weiteren möchte ich mich für die reibungslose Kooperation und Bereitstellung der *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäuse bei Dr. Carol Stocking-Harbers und Ursula Müller vom Heinrich-Pette-Institut (HPI) in Hamburg sowie für die Sequenzierung der RNA-Seq Proben bei Dr. Wei Chen vom *Berlin Institute for Medical Systems Biology* (BIMSB) am *Max Delbrück Center* (MDC) für Molekulare Medizin in Berlin bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meinen fleißigen bioinformatischen Helfern Stefan Kröger, Ulrike Klotz und Elzbieta Gralinska sowie Dr. Zhuo Fang und Yen Hoang, ohne die die Durchführung des bioinformatischen Teils dieser Dissertation nicht möglich gewesen wäre. Insbesondere Stefan Kröger möchte ich für die Auswertung der RNA-Seq Analysen sowie für die Etablierung und Durchführung der integrativen Netzwerkanalysen danken. Dankbar bin ich auch meinen Bachelor-Studentinnen Ulrike Klotz und Elzbieta Gralinska, die die Etablierung und Durchführung der integrativen Netzwerkanalysen vorgebracht haben. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Dr. Detlef Groth und Prof. Dr. Joachim Selbig von der Universität Potsdam für die reibungslose Kooperation und Betreuung der Bachelorarbeiten danken.

Dank gebührt selbstverständlich auch meinen Kollegen in der Arbeitsgruppe Signaltransduktion. Die stetige Bereitschaft, bei Problemen und Fragen mit der eigenen Meinung, Tipps und Ratschlägen zur Verfügung zu stehen, ist keine Selbstverständlichkeit, aber für kreative Prozesse unabdingbar. Einzelne durch Namensnennung hervorzuheben, scheint da nicht fair zu sein, ich möchte es jedoch trotzdem versuchen: Melanie Venzke, Christian Gabriel, Katharina Hecklau, Martin Karl, Timo Lischke, Anna Abajyan, Anna-Floriane Hennig und Anna Schorcht, vielen Dank für die gute Zusammenarbeit, ohne die die Durchführung dieser Dissertation nicht möglich gewesen wäre. Einen besonderen Dank möchte ich an dieser Stelle an Melanie Venzke aussprechen, die die Richtung dieses Projektes mit der Idee der RNA-Seq Analysen maßgeblich vorangetrieben hat.

Wissenschaft ist jedoch nicht alles. Deshalb möchte ich mich an dieser Stelle für die lustigen und kulinarischen AG-Abende, für die abwechslungsreichen Spiele-Abende mit Christian Gabriel und seiner Freundin sowie für die auspowernden Boulder-Sessions mit Timo Lischke und Anna Schorcht bedanken, die mir die Zeit der Promotion verüßt haben.

Zuletzt gilt mein besonderer Dank meinen Freunden, meinem Freund Philippe sowie seiner und meiner Familie, die mir in der schweren Zeit der Promotion den Rücken gestärkt, mich aufgemuntert und unterstützt haben. Ohne Euch hätte ich diese Dissertation nicht geschafft!



## Zusammenfassung

Datenintegration in Form von integrativen Netzwerkanalysen wurde in den letzten Jahren erfolgreich für die Beschreibung von neuen molekularbiologischen Zusammenhängen in biologischen Netzwerken eingesetzt. In dieser Arbeit diente die integrative Netzwerkanalyse als nützliches Werkzeug für die Beschreibung der Differenzierungsprozesse von T-Helfer (Th) -zellen. Diese spielen eine wichtige Rolle in der adaptiven Immunantwort, sowie in der Pathogenese von chronisch infektiösen, allergischen und autoimmunen Erkrankungen.

Die Identifikation von potenziell richtungsweisenden Transkriptionsfaktoren in der Differenzierung von T-Helferzellen war ein vorrangiges Ziel dieser Arbeit. Hierfür wurden zunächst globale Transkriptom-Analysen von T-Helferzellen vorgenommen und Subtyp-spezifisch exprimierte Transkriptionsfaktoren identifiziert. Hierzu zählen u. a. *Irf8* und *Etv6* in Th1, *Npas2* und *Asb2* in Th2 sowie *Irf8* und *Dbp* in induzierten regulatorischen T (iTreg) -Zellen. Zur Unterstützung der Auswahl an potenziellen Transkriptionsfaktoren wurde im zweiten Schritt eine integrative Netzwerkanalyse durchgeführt. Hierfür wurden verfügbare globale RNA-Seq Daten von *Stat4* bzw. *Stat6* Knockout Mausstudien sowie STAT4 bzw. STAT6 ChIP-Seq Daten mit dem generierten RNA-Seq Datensatz der T-Helferzellen integriert. Diese integrierten Daten wurden darüber hinaus in einem transkriptionellen Netzwerk um den Transkriptionsfaktor STAT4 für Th1 bzw. STAT6 für Th2 Zellen visualisiert. Es wurde gezeigt, dass dieses Vorgehen der Datenintegration ein nützliches Werkzeug zur Beschreibung von Differenzierungsprozessen in T-Helferzellen ist. Des Weiteren validierte die integrative Netzwerkanalyse IRF8 als potenziellen Weichensteller in der Th1 Differenzierung. So wurde gezeigt, dass STAT4 und STAT6 direkt an das Gen von *Irf8* binden und dessen Expression beeinflussen. Während STAT4 die Expression von *Irf8* induziert, wird sie durch STAT6 supprimiert. Zusätzlich wurde in den Th1 Zellen eine potenzielle Gen-Gen-Interaktion von *Irf8* mit dem Th1-spezifischen Zytokin *Ifng* gefunden.

Die funktionelle Charakterisierung von IRF8 in der Differenzierung von T-Helferzellen war ein weiteres Ziel dieser Arbeit. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von *Irf8* durch den T-Zellrezeptor Signalweg induziert und vermutlich Subtyp-spezifisch in Th1 und iTreg Zellen über die IFN $\gamma$ /STAT1-, IL12/STAT4-, TGF $\beta$ /SMAD3- und IL2/STAT5-Signalwege verstärkt wird. Des Weiteren wiesen *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäuse eine verringerte Frequenz an Th1-spezifischen Gedächtnis-T-Zellen (TBET<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>) und natürlichen regulatorischen T (nTreg) -Zellen auf. *In vitro* hingegen begünstigte ein IRF8-Defizit die Entstehung von TBET-, IFN $\gamma$ - und GM-CSF-produzierenden Th1 sowie FOXP3-produzierenden iTreg Zellen. Zusätzlich führte ein IRF8-Defizit in polarisierten iTreg Zellen zur Erhöhung der Proteinmenge der am TGF $\beta$ -Signalweg beteiligten Mediatoren TGF $\beta$ R2 und SMAD2/3. Die *in vitro* Beobachtungen in den IRF8-defizienten Zellen wurden mit adenoviraler Überexpression und shRNA-Knockdown von *Irf8* validiert. Anhand dieser und publizierter Ergebnisse wurde erörtert, dass IRF8 als extrinsischer Aktivator über die Modulation der Funktion von APCs agiert und die Th1- sowie Treg-Immunantwort fördert. Intrinsisch hingegen wirkt IRF8 als Gegenspieler und kontrolliert die Immunantwort der Th1 Zellen über die TBET Proteinmenge, sowie die der iTreg Zellen über den TGF $\beta$ -Signalweg. Somit ist IRF8 in den T-Zellen für eine moderate IFN $\gamma$ - sowie FOXP3-Produktion essentiell und verhindert eine überschießende Immunantwort. Die Ergebnisse in dieser Arbeit belegen, dass IRF8 ein wichtiger Regulator der T-Zelldifferenzierung ist und als potenzielles Zielgen in der Entwicklung von neuen Therapieansätzen für T-Zell-spezifische Erkrankungen fungieren könnte.





## Abstract

Within the past years data integration in terms of integrative network analysis was successfully used to describe new interrelations within biological networks on a molecular level. In this thesis the integrative network analysis was used as a tool to describe T helper (Th) cell fate decisions. T helper cells play a major role in the adaptive immune response as well as in the pathogenesis of chronic infectious, allergic and autoimmune diseases.

The identification of important regulatory hubs in T helper cell fate decisions was a primary goal of this thesis. To identify subtype-specifically expressed transcription factors a global gene expression analysis of T helper cells was conducted. Among these are *Irf8* and *Etv6* in Th1, *Npas2* and *Asb2* in Th2 as well as *Irf8* and *Dbp* in induced regulatory T (iTreg) cells. To support this selection of potential transcription factors as a second step an integrative network analysis was conducted. Therefore available global RNA-seq data of *Stat4* and *Stat6* knockout mice studies as well as STAT4 and STAT6 ChIP-seq data was integrated with the generated RNA-seq data set of T helper cells. In addition these integrated data were visualized in a gene regulatory network around the transcription factor STAT4 for Th1 and STAT6 for Th2 cells. It was shown that this approach of data integration is a useful tool for describing differentiation processes of T helper cells. Further the integrative network analysis validated IRF8 as a potential regulatory hub in Th1 cell differentiation. Thus it was shown that STAT4 and STAT6 directly bind to the gene of *Irf8* and influence its expression. While STAT4 induces the expression of *Irf8*, STAT6 suppresses the expression of *Irf8*. Also a potential gene-gene interaction of *Irf8* and the Th1 specific cytokine *Ifng* was found in Th1 cells.

The functional characterization of IRF8 in T helper cell differentiation was a further goal of this thesis. It was shown that the expression of *Irf8* is induced by the T cell receptor signaling and presumably subtype-specifically enhanced by IFN $\gamma$ /STAT1-, IL12/STAT4-, TGF $\beta$ /SMAD3- and IL2/STAT5-signaling in Th1 and Treg cells. Moreover *Irf8*<sup>-/-</sup> mice showed a decreased frequency in Th1 specific memory T cells (TBET<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>) and natural regulatory T (nTreg) cells. *In vitro* on the other hand an IRF8 deficit promoted the occurrence of TBET-, IFN $\gamma$ - and GM-CSF-producing Th1 cells as well as FOXP3-producing iTreg cells. Further an IRF8 deficit in polarized iTreg cells resulted in an increased protein level of TGF $\beta$ R2 and SMAD2/3 which serve as mediators in the TGF $\beta$  signaling pathway. These *in vitro* observations in IRF8 deficient cells were validated by adenoviral overexpression and shRNA knockdown of *Irf8*. Based on these and previously published results IRF8 was discussed as an extrinsic activator that promotes the Th1 and Treg immune response by modulating the function of APCs. Intrinsic IRF8 acts as an antagonist and controls the Th1 immune response by decreasing the TBET protein level as well as the Treg immune response by suppressing the TGF $\beta$  signaling pathway. Therefore IRF8 is essential for a moderate IFN $\gamma$  and FOXP3 production in T cells and prevents an excessive immune response. The results of this thesis prove that IRF8 acts as a potential regulator in T helper cell differentiation. Thus IRF8 can serve as a potential target in the development of novel therapeutic approaches for T cell specific diseases.



# Inhaltsverzeichnis

<b>DANKSAGUNG</b>	<b>III</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>VII</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>IX</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1 DATENINTEGRATION	1
1.2 GRUNDLAGEN DES IMMUNSYSTEMS	2
1.2.1 ANGEBORENE IMMUNANTWORT	2
1.2.2 ADAPTIVE IMMUNANTWORT	3
1.3 GRUNDLAGEN DER T-ZELLIMMUNOLOGIE	3
1.3.1 ZENTRALE UND PERIPHERE TOLERANZ	4
1.3.2 AKTIVIERUNG VON T-HELPERZELLEN	4
1.3.2.1 T-Zell-Rezeptor Signalkaskade	5
1.3.2.2 Der Co-Stimulator CD28	7
1.3.2.3 Unphysiologische Stimulation von T-Zellen mit PMA und Ionomycin	7
1.3.2.4 Inhibition der T-Zell-Rezeptor Signalkaskade	8
1.3.3 FUNKTION UND DIFFERENZIERUNG VON T-HELPERZELLEN IN DER PERIPHERIE	8
1.3.3.1 Th1 Zellen	9
1.3.3.2 Th2 Zellen	10
1.3.3.3 Th17 Zellen	11
1.3.3.4 Treg Zellen	12
1.4 IRF8	13
1.5 ZIELSTELLUNG	14
<b>2. ERGEBNISSE</b>	<b>15</b>
2.1 <b>TRANSKRIPТОМ-ANALYSE VON T-HELPERZELL-POPULATIONEN ZUR IDENTIFIZIERUNG VON SUBTYP-SPEZIFISCHEN TRANSKRIPTIONSFAKTOREN</b>	<b>15</b>
2.1.1 QUALITÄTSANALYSE DER POLARISIERTEN TH1, TH2 UND iTREG ZELLEN	15
2.1.2 IDENTIFIKATION VON SUBTYP-SPEZIFISCHEN TRANSKRIPTIONSFAKTOREN IN DER DIFFERENZIERUNG VON T-HELPERZELLEN	18
2.1.3 VALIDIERUNG VON DIFFERENZIELL EXPRIMIERTEN TRANSKRIPTIONSFAKTOREN	21
2.2 <b>INTEGRATIVE NETZWERKANALYSE</b>	<b>22</b>
2.2.1 STAT4-NETZWERK FÜR TH1 ZELLEN	23
2.2.2 STAT6-NETZWERK FÜR TH2 ZELLEN	26
2.2.3 VALIDIERUNG DES STAT4- UND DES STAT6-NETZWERKES	28
2.3 <b>DIE ROLLE VON IRF8 IN DER PERIPHEREN T-ZELLAKTIVIERUNG UND DIFFERENZIERUNG</b>	<b>29</b>
2.3.1 DIE EXPRESSION VON <i>IRF8</i> IST VOM TCR ABHÄNGIG	29

2.3.1.1	Die Expression von <i>Irf8</i> ist von der TCR-Stimulationszeit abhängig	29
2.3.1.2	Die Expression von <i>Irf8</i> ist von der Stärke des TCR-Stimulus abhängig	30
2.3.1.3	Die Induktion der Expression von <i>Irf8</i> wird über den AP1-Signalweg vermittelt	31
2.3.2	IMMUNOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG VON <i>IRF8</i> <sup>-/-</sup> MÄUSEN	32
2.3.2.1	Die Zellanzahl und Größe von Milz und Lymphknoten der <i>Irf8</i> <sup>-/-</sup> Mäuse sind erhöht	33
2.3.2.2	IRF8-defiziente Mäuse zeigen eine veränderte Zusammensetzung von unterschiedlichen Immunzellen	33
2.3.2.3	Ein IRF8-Defizit begünstigt <i>in vitro</i> die Entstehung von TBET <sup>+</sup> und FOXP3 <sup>+</sup> Zellen	35
2.3.2.4	Ein IRF8-Defizit begünstigt <i>in vitro</i> die Entstehung der Zytokine GM-CSF und IFN $\gamma$ unter Th1 polarisierenden Bedingungen	37
2.3.2.5	Gedächtnis-T-Zellen von <i>Irf8</i> <sup>-/-</sup> Mäusen zeigen eine veränderte Zytokinproduktion und eine verminderte Anzahl an TBET <sup>+</sup> Zellen	40
2.3.2.6	Ein IRF8-Defizit führt zur Erhöhung der Proteinnmenge der am TGF $\beta$ -Signalweg beteiligten Mediatoren TGF $\beta$ R2 und SMAD2/3	43
2.3.2.7	IRF8 zeigt keinen Einfluss auf die T-Zellproliferation aber einen anti-apoptotischen Effekt in den Gedächtnis-T-Zellen und in der Differenzierung von Th1 und iTreg Zellen	44
2.3.3	DIE ADENOVIRALE ÜBEREXPRESSION UND DER SHRNA-KNOCKDOWN VON <i>IRF8</i> VALIDIEREN DEN SUPPRESSIVEN EFFEKT VON IRF8 IN DER <i>IN VITRO</i> DIFFERENZIERUNG VON TH1 UND iTREG ZELLEN	47
2.3.3.1	Die adenovirale Transduktion, die Überexpression und der Knockdown von <i>Irf8</i> sind effizient	47
2.3.3.2	Die Überexpression von <i>Irf8</i> in naiven T-Zellen verringert die Anzahl an apoptotischen sowie TBET <sup>+</sup> , IFN $\gamma$ <sup>+</sup> und GM-CSF <sup>+</sup> Zellen unter Th1 polarisierenden Bedingungen	48
2.3.3.3	Der shRNA-Knockdown von <i>Irf8</i> in naiven T-Zellen erhöht die Anzahl an TBET <sup>+</sup> und IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen unter Th1 polarisierenden Bedingungen	50
2.3.3.4	Die Überexpression von <i>Irf8</i> in naiven T-Zellen verringert die Anzahl an FOXP3 <sup>+</sup> Zellen unter iTreg polarisierenden Bedingungen	50

### **3. DISKUSSION** **51**

<b>3.1</b>	<b>DIE INTEGRATIVE NETZWERKANALYSE IST EIN NÜTZLICHES WERKZEUG ZUR BESCHREIBUNG VON T-HELPERZELL-DIFFERENZIERUNGSPROZESSEN</b>	<b>51</b>
3.1.1	DIE MEHRHEIT DER STAT6-REGULIERTEN TRANSKRIPTIONSFAKTOREN WIRD PRÄFERENZIELL IN TH2 ZELLEN EXPRIMIERT	51
3.1.2	DIE MEHRHEIT DER STAT6- BZW. STAT4-POSITIV-REGULIERTEN TRANSKRIPTIONSFAKTOREN SIND AKTIVATOREN FÜR DIE TH2- BZW. TH1 DIFFERENZIERUNG ODER REPRESSOREN FÜR DIE DIFFERENZIERUNG DER ANDEREN T-HELPERZELL-SUBTYPEN	53
3.1.3	DIE DIFFERENZIERUNG VON TH1 UND TH2 ZELLEN VERLÄUFT PLASTISCH UND WIRD AKTIV DURCH AKTIVATOREN GESTEUERT	55
3.1.4	STAT6- UND STAT4-REGULIERTE GENE SIND ASTHMA- UND RHEUMA-RISIKOGENEN ASSOZIIERT	55
3.1.5	DIE INTEGRATIVE NETZWERKANALYSE IDENTIFIZIERT BISHER UNBEKANNTE TRANSKRIPTIONSFAKTOREN FÜR DIE DIFFERENZIERUNG VON TH1 UND TH2 ZELLEN	56
<b>3.2</b>	<b>DIE TRANSKRIPTOM- UND INTEGRATIVEN NETZWERKANALYSEN IDENTIFIZIEREN IRF8 ALS POTENZIELLEN REGULATOR DER T-ZELLDIFFERENZIERUNG</b>	<b>58</b>
3.2.1	DIE TRANSKRIPTOM-ANALYSE DER T-HELPERZELLEN IDENTIFIZIEREN FUNKTIONELL BEKANNTE UND UNBEKANNTE SUBTYP-SPEZIFISCHE TRANSKRIPTIONSFAKTOREN	58

3.2.2	DIE INTEGRATIVEN NETZWERKANALYSEN IDENTIFIZIERTEN IRF8 ALS POTENZIELLEN WEICHENSTELLER IN DER DIFFERENZIERUNG VON TH1 ZELLEN	59
<b>3.3</b>	<b>IRF8 IST EIN REGULATOR DER T-ZELLDIFFERENZIERUNG</b>	<b>60</b>
3.3.1	DIE INDUKTION DER EXPRESSION VON <i>Irf8</i> WIRD ÜBER DEN TCR SOWIE DURCH SUBTYP-SPEZIFISCHE ZYTOKINE IN T-HELPERZELLEN INDUZIERT	60
3.3.2	IRF8 FÖRDERT <i>IN VIVO</i> DIE TH1 IMMUNANTWORT ÜBER DIE MODULATION DER FUNKTION VON APCs	63
3.3.3	IRF8 IST EIN REPRESSOR FÜR DIE <i>IN VITRO</i> DIFFERENZIERUNG VON TH1 ZELLEN	64
3.3.4	IRF8 IST EIN EXTRINSISCHER AKTIVATOR UND EIN INTRINSISCHER REPRESSOR FÜR DIE INDUKTION UND DIFFERENZIERUNG VON TREG ZELLEN	67
3.3.5	IRF8 KONTROLLIERT INTRINSISCH DIE TH1- UND iTREG- IMMUNANTWORT DURCH REGULATION DES FAS-VERMITTELTEN ZELLTODS	69
<b>3.4</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNG</b>	<b>71</b>
<b>3.5</b>	<b>AUSBLICK</b>	<b>72</b>
<b>4. MATERIALEN UND METHODEN</b>		<b>75</b>
<b>4.1</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>75</b>
4.1.1	DATENSÄTZE	75
4.1.2	MAUSSTÄMME UND HALTUNGSBEDINGUNGEN	75
4.1.3	PLASMIDE UND VEKTOREN	76
4.1.4	KOMPETENTE BAKTERIEN FÜR DIE KLONIERUNG VON PLASMIDEN	76
4.1.5	OLIGONUKLEOTIDE	76
4.1.6	ENZYME UND INHIBITOREN	77
4.1.7	ANTIKÖRPER UND ZYTOKINE	78
4.1.8	MAGNETISCHE BEADS FÜR DIE ZELLSEPARATION	79
4.1.9	KITS	79
4.1.10	CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	80
4.1.11	GERÄTE	81
4.1.11	LÖSUNGEN, PUFFER UND MEDIEN	81
<b>4.2</b>	<b>MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITEN</b>	<b>82</b>
4.2.1	DNA-AUFREINIGUNG	82
4.2.1.1	Mini-Präparation von Plasmiden mit einer Größe über 10 kB	82
4.2.2	RNA-AUFREINIGUNG	82
4.2.3	cDNA-SYNTHESE	83
4.2.4	REAL-TIME PCR (qRT-PCR)	83
4.2.5	RNA-SEQUENZIERUNG	83
4.2.6	SDS-POLYACRYLGELELEKTROPHORESE (PAGE)	84
4.2.7	WESTERN BLOT	84
4.2.8	GENOTYPISIERUNG DER <i>IRF8</i> <sup>-/-</sup> MÄUSE	85
4.2.9	KLONIERUNG VON PLASMIDEN FÜR DEN ADENOVIRALEN GENTRANSFER	85
4.2.9.1	Klonierung des Transfervektors pACDC-Irf8 für die Überexpression von <i>Irf8</i>	85
4.2.9.2	Klonierung des Transfervektors pACDC-Irf8sh und pACDC-controlsh für den shRNA-Knockdown von <i>Irf8</i>	86
4.2.9.3	Klonierung von pAd-Konstrukten	88
<b>4.3</b>	<b>ZELLKULTUR</b>	<b>88</b>
4.3.1	ZELLINIEN	88
4.3.2	HERSTELLUNG UND AMPLIFIKATION VON ADENOVIRALEN ÜBERSTÄNDEN	89
4.3.3	ISOLATION UND SORTIERUNG VON T-ZELLEN AUS DER MILZ UND DEN LYMPHKNOTEN	89

4.3.3.1	Sortierung von murinen CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> T-Zellen durch magnetische Zellsortierung	90
4.3.3.2	Sortierung von murinen CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> CD45RB <sup>high</sup> T-Zellen durch FACS	90
4.3.3.3	Sortierung von murinen naiven CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> CD62L <sup>+</sup> CD44 <sup>-</sup> und Gedächtnis-T-Zellen durch FACS	90
4.3.4	BESTIMMUNG DER ZELLZAHL MIT HILFE DER NEUBAUER ZÄHLKAMMER	90
4.3.5	KURZZEITSTIMULATION VON NAIVEN T-ZELLEN UND INHIBITION DES TCR-SIGNALWEGS	90
4.3.6	BESTIMMUNG DES PROLIFERATIONSVERHALTENS MITTELS EINER CFSE-FÄRBUNG	91
4.3.7	ADENOVIRALE TRANSDUKTION VON NAIVEN T-ZELLEN	91
4.3.8	<i>IN VITRO</i> DIFFERENZIERUNG VON T-HELPERZELLEN	91
4.3.9	FICOLLISIERUNG VON <i>IN VITRO</i> DIFFERENZIIERTEN T-ZELLEN	92
4.3.10	APOPTOSE-INDUKTION IN NAIVEN UND IN <i>IN VITRO</i> DIFFERENZIIERTEN T-ZELLEN	92
<b>4.4</b>	<b>DURCHFLUSSZYTOMETRIE</b>	<b>92</b>
4.4.1	FÄRBUNG VON OBERFLÄCHENMARKERN	93
4.4.2	FÄRBUNG VON APOPTOTISCHEN ZELLEN	93
4.4.3	FÄRBUNG VON TOTEN ZELLEN	93
4.4.4	INTRAZELLULÄRE FÄRBUNG VON TRANSKRIPTIONSFAKTOREN	93
4.4.5	INTRAZELLULÄRE FÄRBUNG VON ZYTOKINEN	93
<b>4.5</b>	<b>BIOINFORMATISCHE ANALYSEN</b>	<b>94</b>
4.5.1	PROZESSIERUNG DER RNA-SEQ DATEN DER T-HELPERZELLEN	94
4.5.2	IDENTIFIKATION VON SUBTYP-SPEZIFISCHEN TRANSKRIPTIONSFAKTOREN: KONSTRUKTION EINER HEADMAP UND KINETISCHES CLUSTERING	94
4.5.3	PROZESSIERUNG UND ANALYSE VON ÖFFENTLICH VERFÜGBAREN DATEN FÜR DIE KONSTRUKTION VON GENREGULATORISCHEN NETZWERKEN	95
4.5.4	TEXTMINING RECHERCHE ZUR BESTIMMUNG VON POTENZIELLEN TH1-SPEZIFISCH-EN GEN-GEN-INTERAKTIONEN	96
4.5.5	KONSTRUKTION DER GENREGULATORISCHEN NETZWERKE	96
4.5.6	LITERATURRECHERCHE ZU DEN STAT4- UND STAT6-GEBUNDENEN UND REGULIERTEN GENEN	97
4.5.7	PRÄFERENZIELLE GENEXPRESSION DER STAT4- UND STAT6-REGULIERTEN GENE	97
4.5.8	ANALYSE ZU DEN ASTHMA- UND RA- ASSOZIIERTEN RISIKOGENEN UNTER DEN STAT4- UND STAT6-REGULIERTEN GENEN	97
4.5.9	<i>IN SILICO</i> ANALYSE ZUR IDENTIFIKATION VON POTENZIELLEN TRANSKRIPTIONSFAKTOR-BINDESTELLEN IM PROMOTOR VON <i>IRF8</i>	98
4.5.10	KONSTRUKTION EINES 3D-PLOTS AUS DURCHFLUSSZYTOMETRISCHEN DATEN	98
<b>ANHANG</b>		<b>XV</b>
<b>LITERATUR</b>		<b>XXIII</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>		<b>XXXIX</b>
<b>PUBLIKATIONEN</b>		<b>XLIII</b>
<b>LEBENS LAUF</b>		<b>XLV</b>
<b>EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG</b>		<b>XLVII</b>







# 1. Einleitung

Die Entwicklung der Microarray Technologie und der *next-generation sequencing* (NGS) Methode transformierte in den letzten Jahrzehnten die heutige Biologie (Schuster, 2008). Tausende Hochdurchsatzstudien mit vielfältigen Forschungsschwerpunkten resultierten in einer Explosion von heterogenen „*omics*“ Daten. Öffentliche Online-Datenbanken wie GEO für Microarray und NGS Daten (Edgar et al., 2002), TRANSFAC für Transkriptionsfaktoren und ihre DNA-Bindungsstellen (Wingender et al., 1996) oder transSMART für klinische und translationale Forschung (Athey et al., 2013) ermöglichen einen langfristigen Zugriff auf bestehende Daten. Die verfügbaren „*omics*“ Daten ermutigen Wissenschaftler zur Wiederverwendung dieser Daten – gegebenenfalls auch in einem anderen Kontext. Jedoch stammen diese Daten von verschiedenen technologischen Plattformen und unterscheiden sich somit in ihrem Datenformat. Dies stellt große Herausforderungen im Bezug auf die uniforme Prozessierung und integrale Analyse dieser Daten dar. Zu diesem Zweck ist die Etablierung von umfassenden Datenintegrationsansätzen eine dringende Notwendigkeit.

## 1.1 Datenintegration

Die Datenintegration ermöglicht die Nutzung verschiedener „*omics*“ Datensätze von vielfältigen Analysemethoden sowie mit unterschiedlichen Datenformaten und biologischen Aussagen wie z. B. Genexpressionsdaten (Microarray Daten oder RNA-Sequenzierungs (RNA-Seq) -daten), Chromatin-Immunopräzipitations (ChIP) -Sequenzierungs (ChIP-Seq) -daten, Massenspektrometriedaten, genomweite Genotypisierungsdaten von *single-nucleotide* Polymorphismen (SNP) und Daten von Genom-weiten Assoziationsstudien (GWAS). Zahlreiche Reviews und generelle Kommentare von Wissenschaftlern postulieren die Integration von „*omics*“ Daten mit klinischen Daten, um verschiedene Biomarker für Krankheiten und Kandidatengene für therapeutische Behandlungen zu identifizieren und somit die Medikamentenentwicklung effizienter zu gestalten (Searls, 2005; Slater et al., 2008; Bielekova et al., 2014; Subramanian et al., 2015).

Folglich fand die Datenintegration in letzter Zeit eine umfangreiche Anwendung in der biomedizinischen Forschung. Zum Beispiel erleichterte die Datenintegration die funktionale und strukturelle Analyse von Genen für umfangreiche Netzwerkanalysen. Kürzlich zeigten Subramanian und seine Kollegen das Potenzial der Datenintegration und Netzwerkanalyse in der Biologie des Immunsystems. So wurden z. B. Genexpressionsdaten und Transkriptionsfaktor-Bindemotive für die Aufklärung des transkriptionellen Netzwerkes in Makrophagen verwendet (Ramsey et al., 2008; Litvak et al., 2012). Des Weiteren führte die Integration von genomweiten mRNA Expressionsdaten mit Perturbationsdaten von z. B. RNAi Knockdown Methoden zur Identifizierung von nützlichen Interventionen in Infektionsprozessen (Konig et al., 2010). Außerdem zeigten Ciofani und seine Kollegen das Potenzial der Datenintegration für die Konstruktion eines regulatorischen Netzwerkes für die Differenzierung von Th17 Zellen. Durch Integration von multiplen Transkriptionsfaktor-ChIP-Seq Daten mit RNA-Seq Daten von Transkriptionsfaktor-defizienten T-Zellen und Transkriptomdaten vom Immunzellen gelang es ihnen, das transkriptionelle regulatorische Netzwerk von Th17 Zellen zu beschreiben (Ciofani et al., 2012). Mit diesem integrativen Ansatz wurden BATF und IRF4 als Schlüsselaktivatoren und FOXL2 als

Modulator der Th17 Zell-Differenzierung identifiziert. Diese Beispiele verdeutlichen, dass die Integration von Daten ein nützliches Werkzeug für die Beschreibung von biologischen Systemen ist und als Ausgangspunkt zur Identifizierung von Kandidatengenomen für therapeutische Behandlungen dienen kann.

In dieser Arbeit diente die Datenintegration als nützliches Werkzeug für die Beschreibung der Differenzierungsprozesse von T-Helfer (Th) -zellen. T-Helferzellen gehören zu den T-Zellen und sind an der zellvermittelten adaptiven Immunantwort beteiligt. Das Verständnis der Differenzierung von T-Helferzellen ist von besonderer Bedeutung, da Dysbalancen in der Immunantwort von T-Helferzellen mit der Pathogenese und Progression von verschiedenen immun-vermittelten Krankheiten assoziiert sind (Romagnani, 1996). Die Identifikation von wichtigen weichenstellenden Transkriptionsfaktoren in der T-Helferzell-Differenzierung war ein vorrangiges Ziel dieser Arbeit. Hierfür wurden globale vergleichende Genexpressionsanalysen von T-Helferzellen vorgenommen und diese mit verschiedenen globalen Genexpressions- und DNA-bindenden Datensätzen integriert. In den Analysen kristallisierte sich der Transkriptionsfaktor IRF8 als möglicher Weichensteller für Differenzierung der T-Helferzell-Subtypen Th1 und induzierte regulatorische T-Zellen (iTreg) heraus. Im zweiten Teil der Arbeit stand die funktionelle Charakterisierung von IRF8 in der Differenzierung von Th1 und iTreg Zellen im Fokus.

## 1.2 Grundlagen des Immunsystems

Das Immunsystem unterstützt den Organismus bei der Abwehr von Krankheitserregern wie Viren, Bakterien und Parasiten sowie vor Fremdstoffen und toxischen Substanzen. Es unterscheidet zwischen eigenen und fremden Substanzen und dient damit der Erhaltung der individuellen Integrität. Das komplexe Immunsystem der Wirbeltiere ist aus zellulären und humoralen Komponenten sowie aus lymphatischen Organen zusammengesetzt. Zum zellulären Immunsystem gehören spezialisierte Immunzellen, die entweder frei beweglich oder ortständig in den verschiedenen Geweben vorkommen. Hierzu zählen u. a. T- und B-Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten und natürliche Killerzellen. Das humorale Immunsystem basiert hingegen auf Plasmaproteinen wie Antikörpern, Komplementfaktoren und Interleukinen (IL). Die Reaktion des Immunsystems auf Antigene wird als Immunantwort bezeichnet. Das Immunsystem der Wirbeltiere verfügt über zwei generelle Abwehrstrategien, der angeborenen und der adaptiven Immunantwort, die sich nach ihrem Entwicklungszeitpunkt unterscheiden.

### 1.2.1 Angeborene Immunantwort

Die angeborene Immunantwort wird auch als unspezifische Immunantwort bezeichnet, da sie nicht antigenspezifisch ist. Sie beginnt in den ersten Stunden nach der Infektion und dient der Eindämmung des Erregers. Die Haut bzw. Schleimhaut stellt dabei mit ihrer mechanischen Barriere und ihrem schwach sauren pH-Wert die erste Hürde für das Pathogen dar. Des Weiteren umfasst die angeborene Antwort die rezeptorvermittelte Phagozytose durch Fresszellen (u. a. Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen), das Erkennen und Abtöten von abnormalen Zellen (z. B. Tumorzellen und Virus-infizierte Zellen) durch natürliche Killerzellen sowie die Destruktion der Fremdzellen durch humorale Komponenten wie antibakterielle und antivirale Substanzen (u. a. Komplementsystem, Interferone und Lysozyme). Die angeborene Immunantwort wird durch konservierte Strukturen auf den Pathogenen (z.

B. Lipopolysaccharide) induziert und führt zur Ausschüttung von entzündungsvermittelnden (inflammatorischen) Stoffen: den Zytokinen. Hierfür besitzen die Zellen spezialisierte Rezeptoren (z. B. TLR: Toll-*like* Rezeptoren) auf ihrer Oberfläche. Über die Antigen-Präsentation und Chemotaxis der ausgeschütteten Zytokine interagiert die angeborene mit der adaptiven Immunantwort, indem weitere Effektorzellen angelockt werden sowie die Differenzierung zu Effektorzellen eingeleitet und somit die adaptive Immunantwort modelliert wird. Bei Erstkontakt mit einem Antigen stellt sie aufgrund der verzögerten Antikörperproduktion der adaptiven Immunantwort die initiale Komponente der Immunantwort dar (Murphy, 2012).

### 1.2.2 Adaptive Immunantwort

Die adaptive Immunantwort ist gezielt gegen spezifische Antigene ausgerichtet und führt somit zur spezifischen Bekämpfung von Krankheitserregern. Folglich wird sie auch als spezifische Immunantwort bezeichnet. Im Vergleich zur angeborenen Immunantwort ist sie ein langsamer Prozess. Sie wird durch die initiale Präsentation der Antigene (Teil der angeborenen Immunantwort) eingeleitet und durch die erworbene zelluläre (T- und B-Zellen) sowie humorale (Antikörper produziert von B-Zellen und Plasmazellen) Immunantwort ausgeübt. Die initiale Antigenerkennung über spezialisierte B-Zell- bzw. T-Zell-Rezeptoren (Antigenrezeptoren) führt zur Aktivierung und Differenzierung der B- und T-Zellen zu Effektorzellen. Hierbei sind die Antigenrezeptoren nur für ein einziges Epitop des Antigens spezifisch. Die Spezifität der Rezeptoren entsteht in erster Linie durch somatische Rekombination von Gensegmenten während der Lymphozytenreifung (Pancer and Cooper, 2006; Murphy, 2012).

Die Entstehung von Effektorzellen nach Antigenkontakt dauert ungefähr 4 Tage. Die im Knochenmark gereiften B-Zellen differenzieren zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen. Die Antikörper werden von den Plasmazellen ins Blut sekretiert und beseitigen die spezifischen Erreger. Die Beseitigung von intrazellulären Pathogenen erfolgt hingegen durch zytotoxische T-Zellen und T-Helferzellen, die nach Antigenkontakt aus T-Vorläuferzellen differenzieren.

Eine der wichtigsten Eigenschaften der adaptiven Immunantwort ist die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses. Nach der erfolgreichen Bekämpfung des Erregers bleibt ein Teil der aktivierten B- und T-Zellen als Gedächtnis-T-Zellen erhalten und ermöglicht nach erneutem Kontakt mit dem jeweiligen Antigen eine schnellere und effektivere Immunantwort (Sekundärreaktion).

## 1.3 Grundlagen der T-Zellimmunologie

Die Vorläuferzellen von T-Zellen ( $CD3^+CD4^-CD8^-$ ) stammen aus dem Knochenmark und werden aus hämatopoetischen Stammzellen gebildet. Diese gelangen über das Blut in den Thymus, wo die Reifung und Selektion der T-Zellen stattfindet. T-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche spezifische Antigenrezeptoren, die T-Zellrezeptoren (TCR) sowie CD3-Rezeptoren (Murphy, 2012). Während der Reifung und Proliferation im Thymus entstehen zytotoxische  $CD8^+$  T-Zellen und  $CD4^+$  T-Helferzellen, die sich durch die Expression des CD8- bzw. CD4-Co-Rezeptors unterscheiden (Ellmeier et al., 1999).

Zytotoxische T-Zellen vermitteln in erster Linie die Zerstörung von Zellen, die mit Viren oder anderen intrazellulären Pathogen befallen sind. Hierfür produzieren sie die Proteine Perforin sowie Granzym und

induzieren darüber die Apoptose der infizierten Zellen. Die T-Helferzellen hingegen weisen vielfältige unterstützende Funktionen auf. So spielen sie eine Rolle bei der Aktivierung von Makrophagen (Th1 Zellen), bei der Aktivierung von Antikörper-produzierenden B-Zellen bzw. Plasmazellen (Th2 Zellen), bei der Bekämpfung von intra- (Th1 Zellen) und extrazellulären (Th2 und Th17 Zellen) Parasiten, bei der Entstehung von chronischen Entzündungen (Th17 Zellen) und bei der Regulation der Immunantwort (Treg Zellen). Dies geschieht hauptsächlich über die Produktion von Effektorzytokinen, die der intrazellulären Kommunikation dienen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich die CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen näher betrachtet.

### 1.3.1 Zentrale und periphere Toleranz

Neben der Immunantwort ist auch die Immuntoleranz ein wichtiger Mechanismus in einem funktionierenden Immunsystem. Besteht eine Immuntoleranz, sind die spezifischen T-Zellen nicht in der Lage, ein oder mehrere Antigene zu erkennen und mit einer Immunantwort auf sie zu reagieren. Die Immuntoleranz ist eine wichtige Eigenschaft des Immunsystems, da sie die Ausbildung von Antikörpern gegenüber Antigenen des eigenen Organismus (Selbst-Antigene) verhindert. Damit wirkt sie der Entstehung von Autoimmunerkrankungen entgegen. Die Immuntoleranz ist keine angeborene Eigenschaft. Sie wird während der Lymphozytenreifung sowohl im Thymus (zentrale Toleranz) als auch in der Peripherie (periphere Toleranz) erworben (Murphy, 2012).

Die zentrale Toleranz findet während der Reifung der T-Lymphozyten im Thymus statt. Hierbei unterziehen sich die gereiften T-Lymphozyten einer negativen Selektion, der sogenannten klonalen Deletion. Die Reifung der T-Vorläuferzellen und die anschließende positive Selektion bringt CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen hervor, die entweder mit einer hohen Affinität ein spezifisches Antigen über den Haupt-Histokompatibilitätskomplex (MHC: *major histocompatibility complex*) II (im Fall der CD4<sup>+</sup> T-Zellen) oder den MHC-I (im Fall der CD8<sup>+</sup> T-Zellen) erkennen. Im Zuge der zentralen Toleranz werden im Anschluss alle T-Lymphozyten deletiert, die mit einer hohen Affinität ein Selbst-Antigen erkennen. Somit wird eine Autoaggression und damit verbunden die Entstehung von Autoimmunerkrankungen verhindert (Murphy, 2012).

Die periphere Toleranz findet in den sekundären lymphatischen Organen statt und wird durch verschiedene Mechanismen ausgeübt. Hierzu zählen u. a. die Anergie, der FAS-vermittelte Zelltod und die Zytokin-vermittelte Suppression. Die Anergie findet statt, wenn eine naive T-Zelle in der Peripherie ein Antigen ohne ein zusätzliches, co-stimulatorisches Signal bindet. Sie führt zur Inaktivierung der Zelle und bei einer erneuten Aktivierung kann es zum aktivierungsbedingten Zelltod kommen (Schwartz, 1996). Ein weiterer Toleranzmechanismus findet statt, wenn eine T-Zelle einen langanhaltenden Stimulus über den T-Zellrezeptor erfährt. Hierbei wird die Fas-vermittelte Apoptose der T-Zelle eingeleitet, um z. B. eine überschießende Immunantwort zu verhindern oder autoreaktive Zellen abzuschalten (Singer and Abbas, 1994). Außerdem leisten regulatorische T-Zellen (s. 1.3.3.4 Treg Zellen) einen entscheidenden Beitrag zur peripheren Toleranz. Sie supprimieren die Immunreaktionen durch Ausschüttung von Zytokinen (u. a. TGFβ) (Sakaguchi et al., 2006).

### 1.3.2 Aktivierung von T-Helferzellen

Nach der Entwicklung und Selektion der T-Lymphozyten im Thymus wandern die naiven T-Zellen in die Peripherie und zirkulieren kontinuierlich über den Blutkreislauf durch die sekundären lymphatischen

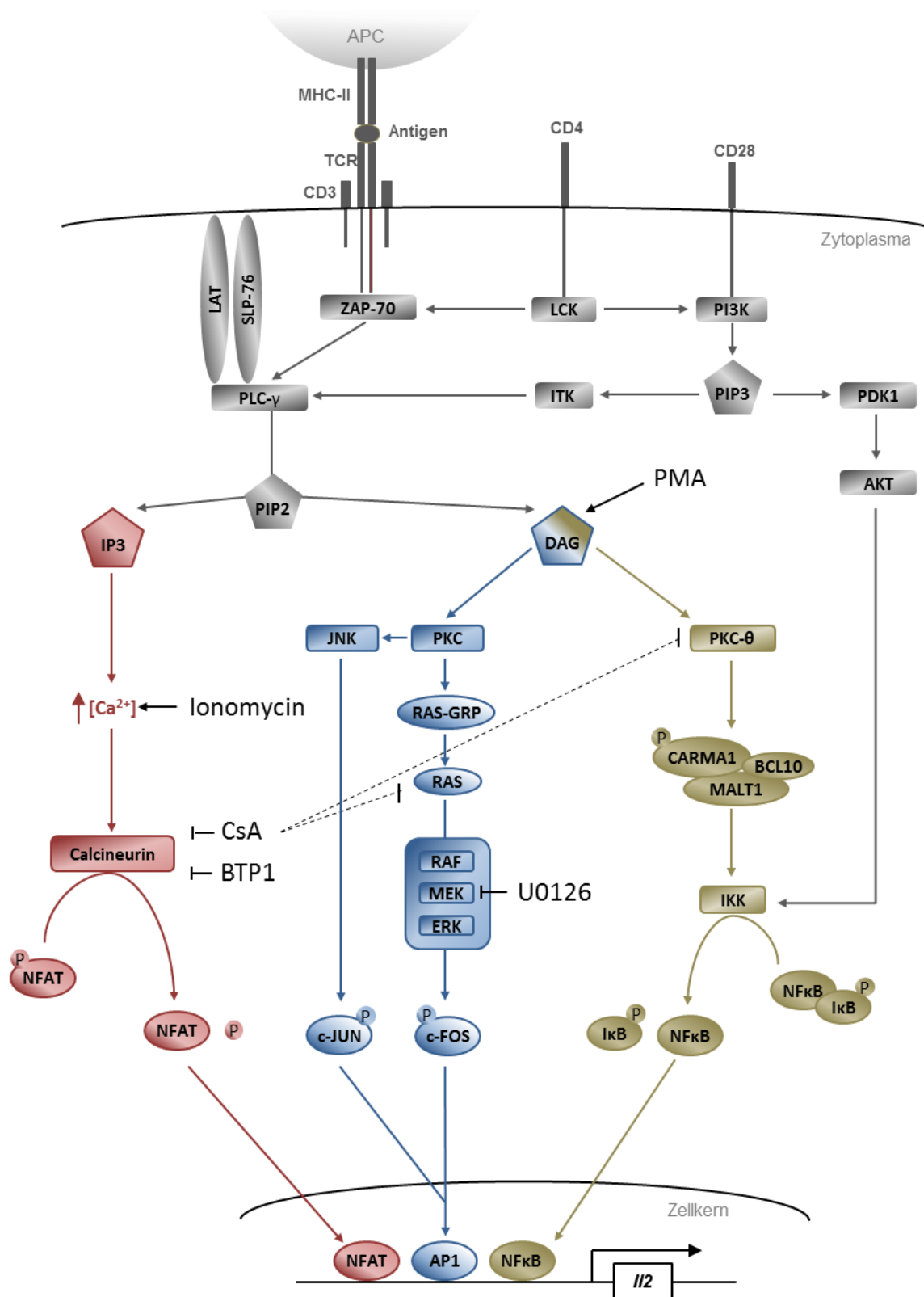
Organe. Eine Zelle wird als naiv bezeichnet, wenn sie noch keinen Antigenkontakt hatte. Erst der Kontakt mit einem Antigen gibt der naiven T-Zelle das Signal zur Proliferation und Differenzierung in eine Effektor-T-Zelle. Die körperfremden oder körpereigenen Antigene im Falle einer Autoimmunerkrankung werden von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) über den MHC-Peptid-Komplex auf ihrer Oberfläche präsentiert. Die spezifische Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen erfolgt über den MHC-II/Peptid-Komplex und die der CD8<sup>+</sup> T-Zellen hingegen über den MHC-I/ Peptid-Komplex. Für die Bindung des MHC/Peptid-Komplexes und die Erkennung des Antigens exprimieren die T-Zellen T-Zellrezeptoren auf ihrer Oberfläche. Der T-Zellrezeptor liegt als Heterodimer vor und bildet zusammen mit CD3 einen T-Zellrezeptor Komplex. Zur kompletten Aktivierung benötigt die T-Zelle zusätzlich noch ein co-stimulatorisches Signal, welches z. B. durch die Mitglieder der B7-Familie von der Antigen-präsentierenden Zelle vermittelt und durch die Familie der CD28-Rezeptoren auf der T-Zelloberfläche empfangen wird.

### 1.3.2.1 T-Zell-Rezeptor Signalkaskade

Die Aktivierung einer naiven T-Helferzelle erfolgt nach Antigenerkennung des MHC-II/Peptid-Komplexes über die hoch variablen, extrazellulären Antigen-bindenden Ketten des T-Zellrezeptors. Diese weisen eine hohe Spezifität für das Antigen auf, jedoch besitzen sie keine intrinsische Signalfunktion. Für die Weiterleitung des T-Zellrezeptorsignals sind die zytoplasmatischen Ketten des T-Zell- und des CD3-Rezeptors essentiell, die spezifische Sequenzmotive aufweisen: die ITAMs (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*). Die Erkennung des Antigens auf der extrazellulären Seite führt zur Initiierung des Signalweges über die Tyrosin-Phosphorylierung der ITAMs durch die Tyrosin-Kinase LCK (*lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*) auf der zytoplasmatischen Seite (Iwashima et al., 1994). LCK ist konstitutiv mit der zytoplasmatischen Domäne des CD4 Rezeptors assoziiert. Die Phosphorylierung führt zur Rekrutierung und Aktivierung der Tyrosin-Kinase ZAP-70 (*zeta-chain (TCR) associated protein kinase*). ZAP-70 ist mit den zytoplasmatischen Ketten des T-Zellrezeptors assoziiert und aktiviert das Schlüsselsignalprotein Phospholipase C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) über die Bindung von Adapterproteinen wie LAT (*linker of activated T cells*) und SLP-76 (Chan et al., 1995). Die Aktivierung von PLC- $\gamma$  leitet über drei verschiedene Sekundärbotenstoffe drei unabhängige Signalwege ein. Hierfür spaltet PLC- $\gamma$  Phosphatidylinositolbiphosphat (PIP<sub>2</sub>) in Diacylglycerin (DAG) und Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) (Jordan et al., 2003) (s. Abbildung 1).

Der erste Signalweg führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) und wird durch IP<sub>3</sub> eingeleitet. Die Entstehung von IP<sub>3</sub> führt zur Erhöhung des Calciumspiegels in der Zelle durch Öffnung von Calciumkanälen. Das einströmende Ca<sup>2+</sup> bindet an Calmodulin und bewirkt die Bindung von Calcineurin über eine Konformationsänderung von Calmodulin. Dies führt zur Aktivierung von Calcineurin. Calcineurin aktiviert schließlich NFAT über Dephosphorylierung (Crabtree and Olson, 2002).

Der zweite Signalweg wird über DAG eingeleitet und führt über die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) zur Aktivierung von AP1 (*adaptor-related protein complex 1*). Die PKC aktiviert das Protein RAS-GRP, welches über die Aktivierung von RAS die MAP-Kinase-Kaskade aus drei hintereinander geschalteten MAP-Kinasen (RAF, MEK und ERK) einleitet. Die Aktivierung der letzten MAP-Kinase ERK führt zur Aktivierung der Transkription von *Fos* (kodiert für c-FOS). Des Weiteren aktiviert die PKC die Jun-Kinase (JNK). Die JNK phosphoryliert und aktiviert den Transkriptionsfaktor c-JUN, der konstitutiv im Zytoplasma vorhanden ist. C-FOS und c-JUN translozieren in den Kern, dimerisieren und formen zusammen den Transkriptionsfaktor AP1 (Johnson and Lapadat, 2002).



**Abbildung 1: Vereinfachte schematische Darstellung des T-Zellrezeptor Signalwegs.** Die naive T-Zelle wird über den T-Zellrezeptor (TCR) nach Antigenerkennung über den MHC-II/Peptid-Komplex von der Antigen-präsentierenden Zelle (APC) aktiviert. Die Signalweiterleitung über verschiedene Kinasen führt zur Aktivierung von PLC- $\gamma$ , die wiederum drei unabhängige Signalwege induziert und zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT, AP1 und NF $\kappa$ B führt. Diese drei Transkriptionsfaktoren induzieren nach Translokation in den Kern die Transkription von Zielgenen wie z. B. *IL2* und leiten somit die Proliferation und Differenzierung einer Effektor-T-Zelle ein. Zusätzlich führt der aktivierende Co-Rezeptor CD28 über die Aktivierung von PI3K und die Generierung des Sekundärbotenstoffs PIP3 zur Verstärkung des T-Zellrezeptor Signalwegs. In Schwarz sind die Angriffspunkte der unphysiologischen Stimulatoren PMA und Ionomycin sowie der Inhibitoren CsA, BTP1 und U0126 des T-Zellrezeptor-Signalwegs dargestellt.

Der dritte Signalweg wird über die Aktivierung der Proteinkinase C- $\theta$  (PKC- $\theta$ ) durch DAG eingeleitet und führt zur Aktivierung von NF $\kappa$ B (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1*). Die PKC- $\theta$  phosphoryliert das Protein CARMA1 (*caspase recruitment domain family, member 1*) und bildet zusammen mit BCL10 (*B-cell CLL/lymphoma 10*) und MALT1 (*mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1*) einen Proteinkomplex, der die I $\kappa$ B-Kinase (IKK) aktiviert. Die IKK phosphoryliert I $\kappa$ B (*inhibitor of  $\kappa$ B*), einem Inhibitor von NF $\kappa$ B, und sorgt somit für die Freisetzung und anschließende Translokation von NF $\kappa$ B in den Zellkern (Vallabhapurapu and Karin, 2009).

Die durch den T-Zellrezeptor Signalweg aktivierten Transkriptionsfaktoren NFAT, AP1 und NF $\kappa$ B induzieren im Zellkern die Transkription von Zielgenen wie z. B. *IL2*. Somit ist die T-Zellrezeptor Signalkaskade essentiell für die Aktivierung von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen und leitet die Proliferation und Differenzierung einer Effektor-T-Zelle ein.

### 1.3.2.2 Der Co-Stimulator CD28

Für die vollständige Aktivierung von T-Helferzellen sind neben den T-Zellrezeptor-Stimulus weitere co-stimulatorische Signale essentiell. Das durch die T-Zellrezeptor-Bindung entstehende Signal wird hierbei durch die simultane Bindung an Co-Rezeptoren wie z. B. CD28, CTLA4 und ICOS verstärkt. Die Co-Rezeptoren sind u. a. für die Spezifität des T-Zellrezeptors sowie für eine anhaltende Bindung zwischen T-Zelle und APC zuständig. Des Weiteren übermitteln die Co-Rezeptoren Proliferations-, Differenzierungs- und Überlebenssignale.

Das Oberflächenmolekül CD28 ist der am genauesten charakterisierte Co-Rezeptor auf naiven T-Zellen. CD28 bindet die co-stimulatorischen Liganden B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), die auf der Oberfläche von APCs exprimiert werden. Bei einer Ligandenbindung wird CD28 durch die CD4-assoziierte LCK Kinase phosphoryliert (s. Abbildung 1). Die Phosphorylierung von CD28 führt zur Aktivierung der PI3-Kinase (PI3K), die Phosphatidylinositoltriphosphat (PIP3) generiert. Ein Effekt von PIP3 ist die Rekrutierung und Aktivierung der zytoplasmatischen Tyrosin-Kinase ITK, welche PLC- $\gamma$  aktivieren kann. Somit verstärkt das co-stimulatorische Signal CD28 den T-Zellrezeptor-Signalweg. Ein weiterer Effekt von PIP3 ist die Rekrutierung und Aktivierung der Proteinkinase AKT über PDK1. Die Kinase AKT fördert schließlich über den mTORC1-Komplex die Proliferation und das Überleben von T-Zellen (Murphy, 2012). Somit weist der Co-Stimulator CD28 vielseitige Aufgaben auf. Neben einem Überlebenssignal und der Proliferation von T-Zellen stabilisiert CD28 mRNAs, amplifiziert die T-Zell-Rezeptor-Signalkaskade und fördert die Zytokinproduktion (Acuto and Michel, 2003).

CD28 zählt wie ICOS zu den aktivierenden Co-Rezeptoren. Außerdem existieren noch inhibitorische Co-Rezeptoren wie CTLA4 und PD1, die den Signalweg inhibieren und u. a. Apoptose induzieren können (Murphy, 2012).

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

*In vitro* kann die Aktivierung und Differenzierung von naiven T-Zellen physiologisch über CD3 und CD28 Antikörper oder unphysiologisch über die Substanzen Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und Ionomycin induziert werden. PMA und Ionomycin greifen in die T-Zellrezeptor-Signalkaskade ein (s. Abbildung 1). PMA ist ein Phorbol-Ester, der direkt die PKC- $\theta$  und damit verbunden NF $\kappa$ B akti-

viert (Jorgensen et al., 2005). Ionomycin ist ein Ionophor, das einen massiven Calciumeinstrom und somit über Calcineurin die Aktivierung von NFAT bewirkt (Chatila et al., 1989).

Die unphysiologische Stimulation von T-Zellen mit PMA und Ionomycin ist im Vergleich zur physiologischen Stimulation sehr viel stärker. Sie wurde in dieser Arbeit vorrangig für die Re-stimulation von *in vitro* kultivierten Zellen verwendet, um die Zytokinproduktion anzuregen.

#### 1.3.2.4 Inhibition der T-Zell-Rezeptor Signalkaskade

Um die Induktion eines T-Zellrezeptor-abhängigen Proteins zu analysieren, können niedermolekulare Inhibitoren verwendet werden (s. Abbildung 1). Hierzu zählen u. a. Cyclosporin A (CsA), BTP1 und U0126. CsA ist ein Immunsuppressiva und wird aus den norwegischen Schlauchpilzen *Tolypocladium inflatum* und *Cylindrocarpon lucidum* isoliert. BTP1 und U0126 hingegen werden synthetisch hergestellt. CsA und BTP1 blockieren das Enzym Calcineurin und somit die Dephosphorylierung und Aktivierung von NFAT. Für CsA ist jedoch bekannt, dass es bereits bei geringen Konzentrationen (ab 1 nM) nicht nur die NFAT-Aktivierung inhibiert sondern auch die Aktivierung von NF $\kappa$ B und AP1 (Liu et al., 1991; McCaffrey et al., 1994; Frischbutter et al., 2011). BTP1 hingegen ist gering konzentriert (bis 500 nM) ein spezifischer Inhibitor der NFAT-Aktivierung (Frischbutter et al., 2012). Der Inhibitor U0126 blockiert die Aktivierung der Transkription von *Fos* über die Inhibition der MEK-Kinasen (Duncia et al., 1998) und damit indirekt die Aktivierung von AP1. Für den NF $\kappa$ B-Signalweg ist bisher kein spezifischer Inhibitor bekannt.

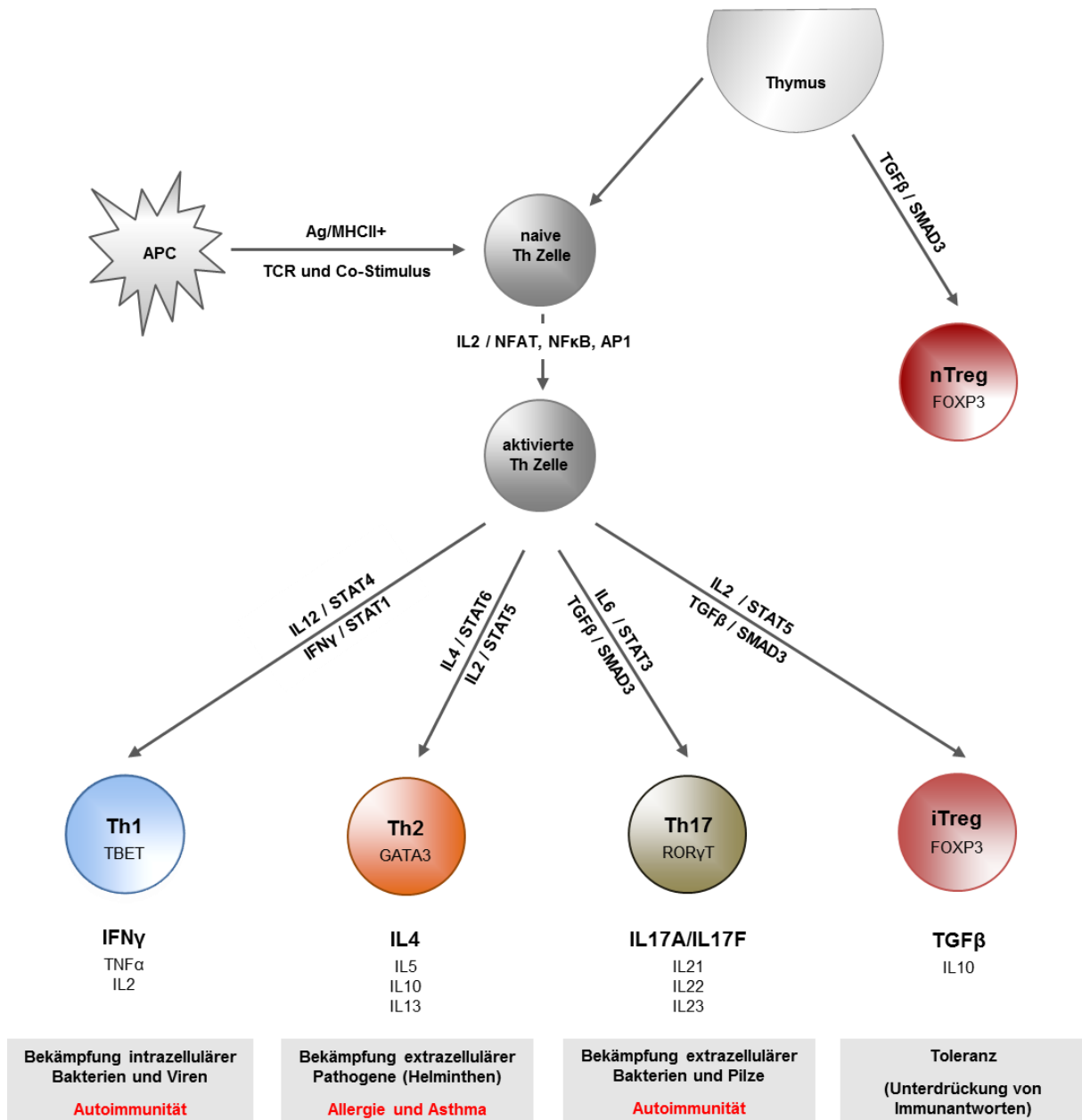
### 1.3.3 Funktion und Differenzierung von T-Helferzellen in der Peripherie

Nach der Aktivierung über den T-Zellrezeptor Signalweg wird die Differenzierung der naiven CD4<sup>+</sup> T-Zelle zu einer Effektor-T-Zelle eingeleitet. In der Peripherie werden 4 funktionell unterscheidbare Hauptpopulationen unterschieden: Th1, Th2, Th17 und regulatorische T (Treg) Zellen. Die Treg Zellen werden wiederum nach ihrem Entstehungsort in natürliche Treg (nTreg) und induzierte Treg (iTreg) Zellen unterschieden. Die nTregs differenzieren im Thymus, während die iTregs in der Peripherie nach Antigenkontakt induziert werden. Darüber hinaus wurden in den letzten Jahren viele weitere Subpopulationen wie die folliculären T-Helferzellen (Tfh) (Breitfeld et al., 2000) oder die Th9 Zellen (Dardalhon et al., 2008) charakterisiert. T-Helferzellen spielen eine zentrale Rolle in der Regulation von adaptiven Immunantworten gegen verschiedene infektiöse Erreger. Dafür produziert jeder T-Helferzell-Subtyp ein einzigartiges Set von Zytokinen (Zhou et al., 2009). Eine Fehlregulation in der Aktivierung und Differenzierung von T-Helferzellen kann jedoch zu verschiedenen immunvermittelten Krankheiten und Autoimmunerkrankungen führen (Romagnani, 1996). Deshalb ist die Forschung auf dem Gebiet der T-Zellregulation von besonderem Interesse.

Die Stärke des T-Zellrezeptor Signals, beeinflusst von der Affinität des erkannten Antigens sowie der Zugänglichkeit der co-stimulatorischen Signale, spielt eine entscheidende Rolle, zu welchem T-Helferzell-Subtyp eine naive T-Helferzelle differenziert. Ein starker Stimulus begünstigt die Entstehung von Th1 und Th17 Zellen sowie von nTreg Zellen im Thymus, wohingegen ein schwacher Stimulus die Entstehung von Th2 und iTreg Zellen fördert (Constant and Bottomly, 1997; Vahedi et al., 2013). Primär wird die Entscheidung des Differenzierungswegs von T-Helferzellen jedoch durch die Anwesenheit eines Subtyp-spezifischen Zytokinmilieus kontrolliert. Diese Subtyp-spezifischen Zytokine induzieren die Expression von Transkriptionsfaktoren, u. a. STAT-Proteine (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) und Mastertranskriptionsfaktoren, die die Differenzierung sowie die Prolife-



ration eines Subtyps maßgeblich beeinflussen (Zhu and Paul, 2010b). Eine Übersicht der 4 Hauptpopulationen von T-Helferzellen einschließlich ihrer Funktionen, exprimierten Mastertranskriptionsfaktoren und produzierten Zytokine sowie der für die Differenzierung essentiellen Zytokine und STAT-/SMAD-Proteine ist in Abbildung 2 zusammengefasst dargestellt.



**Abbildung 2: Funktion und Differenzierung von T-Helferzell-Subtypen.** Die Aktivierung des T-Zellrezeptor (TCR) Signalwegs durch Erkennung des Antigens (Ag), welches von Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) über den Haupt-Histon-Kompatibilitätskomplex MHCII den T-Zellen präsentiert wird, induziert die Differenzierung der naiven T-Helferzellen zu den Effektor-T-Zellen Th1, Th2, Th17 und iTreg in der Peripherie. Die Entwicklung der nTregs erfolgt nicht in der Peripherie, sondern im Thymus. Jeder T-Helferzell-Subtyp ist durch die Expression eines spezifischen Mastertranskriptionsfaktors und durch die Produktion von Subtyp-spezifischer Zytokine charakterisiert. Des Weiteren wird die Differenzierung durch spezifische Zytokine induziert und über STAT- und SMAD-Proteine reguliert. Die T-Helferzell-Subtypen unterscheiden sich in ihrer Funktion der Immunantwort. Dysbalancen in der Immunantwort können zur Autoimmunität sowie zu Allergien und Asthma führen.

### 1.3.3.1 Th1 Zellen

Th1 Zellen spielen eine wichtige Rolle in der zellvermittelten Immunität und der Bekämpfung von

intrazellulären Bakterien und Viren. Sie produzieren die inflammatorischen Zytokine  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$  sowie IL2 und aktivieren dadurch Makrophagen, natürliche Killerzellen und zytotoxische T-Zellen, die die infizierten Zellen vernichten. Eine Dysregulation der Th1-Antwort führt häufig zu immunopathologischen und organspezifischen Autoimmunerkrankungen wie Typ1 Diabetes und Rheumatischer Arthritis (RA). So wird z. B. die autoimmunbedingte RA mit einer Infiltration von Th1 Zellen assoziiert (Dolhain et al., 1996).

Die Differenzierung einer Th1 Zelle kann durch einen starken T-Zellrezeptor Stimulus und durch die Zytokine IL12 und  $\text{IFN}\gamma$  induziert werden, deren Rezeptoren durch post-transkriptionelle Modifikation die Transkriptionsfaktoren STAT4 und STAT1 aktivieren. Die Aktivierung von STAT1 durch den  $\text{IFN}\gamma$  Rezeptor führt zur Induktion der Expression von *Tbx21* (kodiert für TBET), dem Mastertranskriptionsfaktor der Th1 Zellen. TBET bindet schließlich an dem Promotor von *Ifng* und *Il12rb2* (kodiert für die  $\beta 2$  Kette des IL12 Rezeptors) und aktiviert deren Expressionen. Somit wird die initiale Differenzierung vorrangig durch den  $\text{IFN}\gamma$ /STAT1 Signalweg beeinflusst, während zu einem späteren Zeitpunkt die Differenzierung über den IL12/STAT4 Signalweg an Bedeutung gewinnt (Afkarian et al., 2002). Mullen und seine Kollegen zeigten, dass der IL12/STAT4 Signalweg zum einen das Überleben und die Proliferation von Th1-Zellen fördert und zum anderen als Transaktivator die Synthese von  $\text{IFN}\gamma$  verstärkt (Mullen et al., 2001). Studien über TBET- als auch IL12- und STAT4-defiziente Mäuse belegen die essentielle Rolle von TBET, IL12 und STAT4 in der Differenzierung von Th1 Zellen, da sie eine verminderte bzw. gestörte Th1-Antwort zeigen (Magram et al., 1996; Szabo et al., 2002).

Experimente zeigen, dass für die  $\text{IFN}\gamma$  Produktion der Th1 Zellen außerdem ein drittes Zytokinsignal, welches durch die Kinase Jak3 und durch STAT5 vermittelt wird, essentiell ist. Shi und seine Kollegen dokumentierten, dass Jak3 die epigenetische Modifikation und die Chromatinstruktur des *Ifng* Locus während der Th1 Differenzierung reguliert und somit essentiell für die  $\text{IFN}\gamma$  Produktion ist (Shi et al., 2008).

In den letzten Jahren wurden außerdem weitere Transkriptionsfaktoren identifiziert, die die Th1 Differenzierung beeinflussen. Für EGR1 und EGR2 wurde gezeigt, dass sie durch direkte Bindung die Expression von *Tbx21* induzieren (Shin et al., 2009; Du et al., 2014). Zugleich reguliert EGR2 die Differenzierung von Th17 Zellen durch Inhibierung der BATF Aktivierung negativ (Miao et al., 2013). Neben TBET wird EOMES als Hauptregulator der  $\text{IFN}\gamma$  Produktion diskutiert (Intlekofer et al., 2008). Des Weiteren ist bekannt, dass RUNX3 und HLX mit TBET kooperieren und dadurch die Produktion von  $\text{IFN}\gamma$  fördern und gleichzeitig die Produktion von IL4 reprimieren (Zhu and Paul, 2010b). Für IRF1 und NFATC3 wurde dokumentiert, dass sie die Produktion der Th1 Zytokine verstärken und die der Th2 Zytokine unterdrücken (Elser et al., 2002; Rengarajan et al., 2002; Chen et al., 2003c; Zhang et al., 2012). BCL6 hingegen ist in der Lage, die Expression von *Ifng* zu reprimieren. BCL6 wird in der späten Phase der Th1 Differenzierung durch TBET zum *Ifng* Locus rekrutiert, um eine zu hohe Expression von *Ifng* zu verhindern, da diese zu Autoimmunerkrankungen führen kann (Oestreich et al., 2011).

### 1.3.3.2 Th2 Zellen

Th2 Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Bekämpfung von extrazellulären Pathogenen wie Bakterien und Helminthen. Sie unterstützen die humorale Immunantwort, indem sie die Antikörperproduktion von B-Zellen anregen (Kopf et al., 1993). Hierfür sezernieren sie das Zytokin IL4. Außerdem produzieren Th2 Zellen eine Reihe anderer Zytokine wie z. B. IL5, IL10 sowie IL13 und unterstützen somit u. a. die alternative Aktivierung von Makrophagen und die Rekrutierung von Eosinophilen (Coffman et

al., 1989; Gordon, 2003). Eine unkontrollierte Th2-Entwicklung kann zu atopischen und allergischen Symptomen sowie zu Asthma führen. So wird z. B. eine Infiltration von Th2 Zellen mit allergischem Asthma assoziiert (Kay, 2001).

Die Differenzierung einer Th2 Zelle kann durch einen schwachen T-Zellrezeptor Stimulus und durch die Zytokine IL4 und IL2 induziert werden. Das Zytokin IL4 initiiert über den IL4 Rezeptor die Th2 Differenzierung durch Aktivierung von STAT6. STAT6 wiederum induziert die Expression von *Gata3*, dem Mastertranskriptionsfaktor der Th2 Zellen. GATA3 fördert schließlich die Differenzierung von Th2 Zellen durch Beeinflussung der *Il4* Genaktivität, durch Stimulation des Wachstums und durch Suppression der Th1 Differenzierung über die Inhibition der RUNX3-vermittelten IFN $\gamma$  Produktion (Zhu et al., 2006). Des Weiteren belegen *in vivo* Versuche, dass STAT6 für die Generation von Th2-spezifischen Gedächtnis-T-Zellen essentiell ist (Finkelman et al., 2000).

IL4-defiziente Mäuse können nur noch eine stark verringerte Anzahl an Th2 Zellen produzieren (Kopf et al., 1993) wohingegen STAT6-defiziente Mäuse keine Th2 Differenzierung aufweisen (Kaplan et al., 1996; Shimoda et al., 1996). Jedoch belegen *in vivo* Versuche auch eine IL4- und STAT6-unabhängige *Gata3* Expression und eine damit verbundene Induktion von Th2 Zellen über den IL2/STAT5 Signalweg (Liao et al., 2008). So begünstigt ein schwacher T-Zellrezeptor Stimulus die Aktivierung von STAT5 über das Zytokin IL2. STAT5 bindet an den *Il4* und *Il4ra* Locus und führt zur frühen Produktion von IL4. Dann bindet IL4 an den IL4-Rezeptor und kontrolliert schließlich über den oben beschriebenen IL4/STAT6 Signalweg die *Gata3* Expression und die IL4 Produktion. So entsteht ein positiver Feed-back-Loop der kontinuierlichen IL4 Produktion und der Erhaltung des Th2-Phenotyps.

Neben dem Mastertranskriptionsfaktor GATA3 wurden außerdem weitere Transkriptionsfaktoren beschrieben, die die Expression von *Gata3* und die Produktion der Th2-spezifischen Zytokine und somit die Th2 Differenzierung beeinflussen. So sind z. B. NF $\kappa$ B und DEC2 wichtig für die Expression von *Gata3* (Gorelik et al., 2002; Yang et al., 2009), MAF führt zur Transaktivierung des *Il4* Promotors (Kwon et al., 2014) und SATB1 sowie NFIL3 regulieren die Th2 Zytokinexpression (Ribeiro de Almeida et al., 2009; Kashiwada et al., 2011). Des Weiteren ist GFI1 für das Wachstum von Th2 Zellen wichtig und wird durch IL4/STAT6 induziert. Gleichzeitig unterdrückt GFI1 die Differenzierung von Th1, Th17 und iTreg Zellen (Zhu and Paul, 2010b).

### 1.3.3.3 Th17 Zellen

Th17 Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Abwehr von extrazellulären Bakterien und Pilzen z. B. durch die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten (Stockinger and Veldhoen, 2007). Hierfür produzieren sie das Zytokin IL17, sekretieren aber auch noch eine Reihe anderer Zytokine wie z. B. IL21, IL22, IL23 und TNF $\alpha$ . Des Weiteren werden Th17 Zellen mit der Entstehung von chronischen Entzündungen wie der Hautkrankheit Psoriasis (Harden et al., 2015) und mit Autoimmunerkrankungen wie der Rheumatischen Arthritis oder Multiplen Sklerose in Verbindung gebracht (Tzartos et al., 2008).

Neben einem starken T-Zellrezeptor Stimulus sind 3 Schritte essentiell für die Differenzierung von Th17 Zellen: IL6 und TGF $\beta$  induzieren die Differenzierung, IL21 amplifiziert und IL23 stabilisiert die Th17 Antwort (Yamane and Paul, 2013). Die Zytokine TGF $\beta$  und IL6 führen zusammen über die Aktivierung von STAT3 zur Induktion der Expression von *Il23r* (IL23-Rezeptor) und *Rorc* (kodiert für den Mastertranskriptionsfaktors ROR $\gamma$ T) (Mangan et al., 2006; Veldhoen et al., 2006). ROR $\gamma$ T wiederum induziert die Produktion von IL17A, IL17F und IL21 (Ivanov et al., 2006) und supprimiert die *Foxp3* Expression in iTreg Zellen (Burgler et al., 2010). Die IL21 Produktion ist von der IL6-

abhängigen STAT3 Aktivierung abhängig. IL21 kooperiert mit TGF $\beta$  und führt zur Amplifikation der IL17 Produktion. IL21 und IL23 können auch STAT3 aktivieren und spielen daher eine wichtige Rolle als positiver Feed-back-Loop in der Differenzierung von Th17 Zellen. Der IL23/STAT3 Signalweg spielt in der späten Phase der Th17 Differenzierung eine wichtige Rolle. So ist IL23 für das Wachstum und den Erhalt der Effektorfunktion essentiell.

Weitere wichtige Transkriptionsfaktoren in der Differenzierung von Th17 Zellen sind u. a. BATF (Schraml et al., 2009), RUNX3 (Zhang et al., 2008a) und CMAF (Tanaka et al., 2014), da sie essentiell für die optimale Induktion der Expression von *Rorc* sind. Außerdem beeinflusst BATF die Produktion von IL17 über die Bindung an den *Il17a-Il17f* Locus positiv. Auf der anderen Seite wurden ETV6 und IRF8 als Repressoren der Th17 Differenzierung beschrieben (Ciofani et al., 2012).

Ein weiterer negativer Regulator der Th17 Differenzierung ist das Zytokin IL2, welches STAT5 aktiviert. STAT5 konkurriert mit STAT3 um Bindestellen im *Il17a-Il17f* Locus und inhibiert dadurch die Funktion von STAT3 und damit die Differenzierung von Th17 Zellen (Laurence et al., 2007). Des Weiteren wirkt auch TGF $\beta$  in Abwesenheit von IL6 hemmend auf die Entwicklung von Th17 Zellen und fördert gemeinsam mit IL2 die iTreg Differenzierung (Davidson et al., 2007).

#### 1.3.3.4 Treg Zellen

In der Peripherie unterscheidet man verschiedene Arten von Treg Zellen. Die bekanntesten sind die im Thymus gereiften natürlichen Tregs (nTregs) und die in der Peripherie induzierten Tregs (iTregs). Darüber hinaus wurden noch T<sub>H3</sub> und T<sub>R1</sub> regulatorische T-Zellen beschrieben, die jedoch in dieser Arbeit nicht weiter betrachtet wurden. Treg Zellen unterdrücken die Aktivierung des Immunsystems und regulieren dadurch die Selbsttoleranz. Somit verhindern sie im gesunden Organismus die Entstehung von Autoimmunerkrankungen (Sakaguchi et al., 2006). Charakteristisch für Treg Zellen ist die Expression des Oberflächenmarkers CD25 (IL2-Rezeptor- $\alpha$ ) und des Mastertranskriptionsfaktors FOXP3 (Hori et al., 2003). Die Expression von *Foxp3* ist für den Erhalt der suppressiven Aktivität der Effektorzellen essentiell (Williams and Rudensky, 2007). So zeigen FOXP3-defiziente Mäuse (*scurfy* Mäuse) einen massiven Ausbruch von letalen Autoimmunerkrankungen. Des Weiteren sezernieren Treg Zellen die Zytokine TGF $\beta$  und IL10. Die Ausschüttung von IL10 hemmt Makrophagen sowie die Differenzierung von Th1 Zellen, wohingegen TGF $\beta$  die Proliferation von B- und T-Zellen unterdrückt. So wurde über TGF $\beta$  berichtet, dass es die Differenzierung der Th1 und Th2 Zellen durch Verringerung der Expression von *Tbx21* und *Gata3* inhibiert (Gorelik et al., 2000; Gorelik et al., 2002).

Für die Entwicklung von nTreg Zellen im Thymus sowie für deren Homöostase und Funktion ist TGF $\beta$  essentiell (Liu et al., 2008). In der Peripherie wird die Differenzierung von iTreg Zellen neben einem schwachen T-Zellrezeptor Stimulus durch die Zytokine TGF $\beta$  und IL2 induziert (Chen et al., 2003b). Die Aktivierung von SMAD3 über den TGF $\beta$  Signalweg induziert die Expression von *Foxp3* durch Kooperation von SMAD3 mit NFAT, CREL, RUNX und CREB am *Foxp3* Promotor (Ruan et al., 2009). Des Weiteren wird die *Foxp3* Expression über den IL2/STAT5 Signalweg gefördert (Burchill et al., 2007).

Es ist bekannt, dass viele weitere Transkriptionsfaktoren an dem Promoter des *Foxp3* Gens binden und deren Expression beeinflussen. Hierzu gehören u. a. RUNX1 (Rudra et al., 2009), EOS (Pan et al., 2009), TIEG1 (Venuprasad et al., 2008) und FOXO Proteine (Ouyang et al., 2010), die die *Foxp3* Expression positiv beeinflussen und somit die repressive Aktivität der Treg Zellen unterstützen. Des Weiteren wurden STAT3 (Laurence et al., 2012) und SATB1 (Grzanka et al., 2013) als negative Regulatoren

der *Foxp3* Expression beschrieben. Und über HIF1 $\alpha$  wurde berichtet, dass er die iTreg Differenzierung durch einen glykolytischen Shift inhibiert (Palazon et al., 2014).

## 1.4 IRF8

Die Regulation der T-Helferzell-Differenzierung wird neben den Subtyp-spezifischen Zytokinen, STAT-Proteinen und Mastertranskriptionsfaktoren von einem komplexen Netzwerk aus weiteren Transkriptionsfaktoren beeinflusst. Hierzu zählen u. a. die Transkriptionsfaktoren der IRF (*Interferone regulatory factors*) -Familie. Proteine dieser Familie besitzen eine konservierte N-terminale DNA-Bindedomäne und eine C-terminale regulatorische Domäne, die Protein-Protein Interaktionen ermöglicht. Die DNA-Bindedomäne weist ein ISR-Element (ISRE: *IFN-stimulated response element*) auf, welches die Bindung des Transkriptionsfaktors an Promotorregionen von Genen zulässt, die durch die Typ I Interferone IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  reguliert werden. Bisher wurden 10 verschiedene IRFs (IRF1 bis IRF10) identifiziert, die diverse Funktionen in der transkriptionellen Regulation von zellulären Antworten aufweisen und wichtige Akteure in der Kontrolle der T-Zelldifferenzierung sind (Zhang et al., 2012).

Der Transkriptionsfaktor IRF8 (*Interferon regulatory factor 8*) ist ein 50 kDa großes Protein und gehört zur Familie der IRFs. IRF8 wird in B-Zellen, aktivierten T-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert (Nelson et al., 1996). Anders als die anderen Mitglieder der IRF-Familie wird IRF8 nicht durch die Typ I Interferone IFN $\alpha$  und IFN $\beta$ , sondern hauptsächlich durch IFN $\gamma$  induziert (Driggers et al., 1990). Durch Bindung an ISR-Elementen in den Promotorregionen von IFN-abhängigen Genen induziert IRF8 die Transkription von Zielgenen und reguliert somit die Immunantwort auf verschiedene Weise. IRF8 wurde bisher als transkriptioneller Aktivator oder Repressor in Abhängigkeit seines Interaktionspartners beschrieben (Wang and Morse, 2009) und ist als Tumorsuppressor in verschiedenen hämatopoetischen Krankheiten bekannt (Tamura et al., 2008). Es wurde berichtet, dass IRF8-defiziente Mäuse neben einer verstärkten Anfälligkeit gegenüber viralen und bakteriellen Infektionen (Giese et al., 1997; Scharon-Kersten et al., 1997) eine chronische myeloische Leukämie (CML) entwickeln, die mit einer starken Vermehrung von Leukozyten im Blut assoziiert wird (Holtschke et al., 1996). Des Weiteren weisen Patienten mit einem CML-Syndrom ein Verlust des *Irf8* Transkripts auf (Schmidt et al., 1998). Dies zeigt, dass IRF8 ein wichtiger Regulator der myeloiden Zelldifferenzierung ist. Außerdem übernimmt IRF8 eine wichtige Rolle in der Reifung von Makrophagen und in der Entwicklung von B-Zellen (Tamura et al., 2000; Tamura et al., 2008). Zusätzlich wurde gezeigt, dass IRF8 ein Regulator der T-Helferzell-Differenzierung ist und z. B. die Immunantwort intrinsisch als Suppressor in Th17 Zellen beeinflusst (Ouyang et al., 2011) oder die Th1-Immunantwort indirekt über Modulation der Funktion von APCs reguliert (Wu et al., 1999; Tamura et al., 2000; Aliberti et al., 2003; Tsujimura et al., 2003). Des Weiteren wird IRF8 mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie der Multiplen Sklerose (Yoshida et al., 2014) und der Rheumatischen Arthritis assoziiert (Okada et al., 2014).

In den in dieser Arbeit durchgeführten Transkriptom-Analysen und integrativen Netzwerkanalysen kristallisierte sich u. a. der Transkriptionsfaktor IRF8 als möglicher Weichensteller für die Th1-Differenzierung heraus. Somit stand im zweiten Teil dieser Arbeit die Analyse der Rolle von IRF8 in der peripheren T-Zellaktivierung und Differenzierung von T-Helferzellen im Vordergrund.

## 1.5 Zielstellung

Die Aktivierung und nachfolgende Differenzierung von T-Helferzellen sind entscheidende Prozesse einer funktionierenden adaptiven Immunantwort. Eine Fehlregulation dieser Prozesse kann zu Autoimmunerkrankungen und Allergien führen. Neue Ansätze zur Behandlung derartiger Erkrankungen setzen ein besseres Verständnis der T-Zellregulation voraus. Die T-Zellregulation unterliegt einem komplexen Netzwerk aus verschiedenen Transkriptionsfaktoren. Diese Transkriptionsfaktoren bestimmen die Richtung der Differenzierung von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen in proinflammatorische Th1, Th2 und Th17 oder anti-inflammatorische iTreg Zellen. Die erforderliche Zusammensetzung und Menge der jeweiligen Transkriptionsfaktoren, die diese verschiedenen Richtungen der Differenzierung bestimmen, sind bislang weitestgehend unbekannt. Mithilfe globaler Transkriptom-Analysen von T-Helferzellen und einer anschließenden integrativen Netzwerkanalyse sollten Transkriptionsfaktoren, die eine weichenstellende Rolle in der Differenzierung von T-Helferzellen spielen, identifiziert und im Anschluss hinsichtlich ihrer Funktion charakterisiert werden.

Zu diesem Zweck sollten in dieser Arbeit folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Welche Transkriptionsfaktoren werden durch den Zytokin-spezifischen Stimulus in *in vitro* polarisierten Th1, Th2 und iTreg Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Stimulation (5, 12, 24 und 48 h) differenziell exprimiert und spielen somit eine vielversprechende Rolle in der peripheren Aktivierung und Differenzierung dieses Subtyps?
2. Ist die integrative Netzwerkanalyse von publizierten globalen Genexpressions- und DNA-bindenden Daten aus polarisierten Th1 und Th2 Zellen ein nützliches Werkzeug zur Beschreibung von Differenzierungsprozessen in T-Helferzellen?
3. Kann die integrative Netzwerkanalyse die Daten der Transkriptom-Analysen der T-Helferzellen ergänzen und somit potenzielle Weichensteller in der T-Helferzell-Differenzierung validieren?
4. Ist die Induktion der *Irf8* Expression von der Zeit und Stärke des T-Zellrezeptor-Signals abhängig und über welchen T-Zellrezeptor-Signalweg wird *Irf8* primär induziert?
5. Welchen Einfluss hat ein IRF8-Defizit in *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäusen auf die periphere Aktivierung und Differenzierung von T-Helferzellen und Gedächtnis-T-Zellen?
6. Hat IRF8 einen Effekt auf die Proliferation oder Apoptose von T-Helferzellen und Gedächtnis-T-Zellen?
7. Können die möglicherweise analysierten Effekte in den IRF8-defizienten Mäusen auf die periphere Aktivierung und Differenzierung von T-Helferzellen durch adenovirale Überexpression und shRNA-Knockdown von *Irf8* validiert werden?

## 2. Ergebnisse

### 2.1 Transkriptom-Analyse von T-Helferzell-Populationen zur Identifizierung von Subtyp-spezifischen Transkriptionsfaktoren

Die Entwicklung neuer Hochdurchsatztechniken wie dem *next-generation Sequencing* oder der DNA-Microarrays erlaubten in den letzten Jahren die Charakterisierung des mRNA Expressionsprofils von T-Helferzellen. Im Gegensatz zur Transkriptom-Analyse in dieser Arbeit, sind die meisten Untersuchungen auf ausdifferenzierte Zellen und deren Erhaltung fokussiert. Die Dynamik dieser Differenzierungsprozesse, die zur ausdifferenzierten Zelle führen, wurde noch nicht im Detail analysiert. Versuche von van den Ham zeigten, dass die festlegende Polarisationsphase, die Entscheidung zu welchem Subtyp eine naive Zelle differenziert, bereits in der frühen Phase der Differenzierung stattfindet (van den Ham et al., 2013). Aufgrund dieser Fakten wurde der Fokus in den Transkriptom-Analysen auf die initiale T-Helferzell-Differenzierung gelegt.

Für die Identifikation von potenziell richtungsweisenden Transkriptionsfaktoren für die initiale T-Helferzell-Differenzierung wurden vergleichende RNA-Seq Analysen von naiven T-Helferzellen und polarisierten Th0, Th1, Th2 und iTreg Zellen zu frühen Zeitpunkten der Stimulation durchgeführt. Zum Zeitpunkt der Planung der RNA-Seq Analysen erschien eine Publikation von Yosef und seinen Kollegen, in der das regulatorische Netzwerk von murinen Th17 Zellen zu frühen Zeitpunkten der Differenzierung (0,5 h bis 72 h) mittels Microarray-Daten im Vergleich zu Th0 Zellen analysiert wurde (Yosef et al., 2013). Diese Untersuchungen identifizierten 39 Transkriptionsfaktoren, die die Differenzierung von Th17 Zellen regulieren. Aufgrund dieser vorhandenen Daten wurden keine weiteren Analysen von Th17 Zellen mittels RNA-Seq Experimenten durchgeführt.

Für die RNA-Seq Analysen wurden naive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD45RB<sup>high</sup> Zellen für 5 und 12 Stunden sowie für 1 und 2 Tage unter den jeweiligen Subtyp-spezifischen Polarisationsbedingungen kultiviert und im Anschluss von den lebenden Zellen die mRNA extrahiert. Die mit dem TrueSeq Stranded mRNA Kit präparierte Bibliothek wurde schließlich am Illumina HiSeq Sequenzierer im *Scientific Genomics Platform* Labor von Dr. Wei Chen am *Berlin Institute for Medical Systems Biology* (BIMSB) analysiert.

#### 2.1.1 Qualitätsanalyse der polarisierten Th1, Th2 und iTreg Zellen

Die Proben der polarisierten T-Helferzellen und die RNA-Seq Ergebnisse wurden anhand der Expressionen der jeweiligen Subtyp-spezifischen Mastertranskriptionsfaktoren, *Stat*- und *Smad*-Gene sowie der produzierten Zytokine auf ihre Qualität hin überprüft.

Um einen ersten Eindruck über die Reinheit der polarisierten Proben zu bekommen, wurden die TBET-, GATA3- und FOXP3-Produzenten von den 1- und 2-Tages-Kulturen sowie zur Kontrolle von einer entsprechenden 5-Tages-Kultur direkt nach der Kultivierung der Zellen am Durchflusszytometer bestimmt. Die Anzahl der Produzenten ist der Tabelle 1 zu entnehmen. Die Th1, Th2 und iTreg Kulturen zeigten im Polarisationscheck am fünften Tag eine Reinheit von  $\geq 90\%$  und höher. Diese Daten sprechen für erfolgreiche Polarisationskulturen. Von den Th0 Zellen wurde ebenfalls die Polarisations-

tion überprüft. Am fünften Tag waren die Zellen zu 91 % rein, d. h. sie produzierten weder den Mastertranskriptionsfaktor TBET noch GATA3, jedoch zu 9 % FOXP3 (Daten nicht gezeigt).

**Tabelle 1: Polarisationskontrolle der Differenzierungskulturen für die RNA-Seq Analysen.** Es wurden die TBET-, GATA3- und FOXP3-Produzenten von den 1-, 2- und 5-Tages-Kulturen mittels intrazellulärer Transkriptionsfaktorfärbung am Durchflusszytometer bestimmt.

	Th1 Zellen TBET-Produzenten [%]	Th2 Zellen GATA3-Produzenten [%]	iTreg Zellen FOXP3-Produzenten [%]
<b>1-Tages-Kultur</b>	10	19	22
<b>2-Tages-Kultur</b>	61	85	79
<b>5-Tages-Kultur</b>	98	97	90

Die Genexpressionswerte der RNA-Seq Proben von den Subtyp-spezifischen Transkriptionsfaktoren und Zytokinen bestätigten ebenfalls, dass die Polarisationskulturen qualitativ waren (siehe Abbildung 3).

In den Th1 Zellen wurde der Mastertranskriptionsfaktor *Tbx21* bereits 24 h nach Stimulation mit einem FPKM-Wert von 2.900 im Vergleich zu den anderen Subtypen differenziell hochreguliert. Des Weiteren stieg die Genexpression des Transkriptionsfaktors *Stat1* bereits 5 h und des Transkriptionsfaktors *Stat4* 24 h nach Stimulation in den Th1 Zellen differenziell an. Das Th1-Zytokin IFN $\gamma$  wird über den IFN $\gamma$ /STAT1-Signalweg induziert und wurde bereits als ein frühes Zytokin in der Th1 Differenzierung beschrieben (Sander et al., 1995; Gett and Hodgkin, 1998). Damit übereinstimmend zeigte das Gen für *Ifng* bereits 5 h nach Stimulation mit einem FPKM-Wert von 780 eine differenzielle Expressionssteigerung in den Th1 Zellen. Das Th1-Zytokin *Il12* wurde hingegen auch 48 h nach der Stimulation noch nicht differenziell exprimiert (Daten nicht gezeigt).

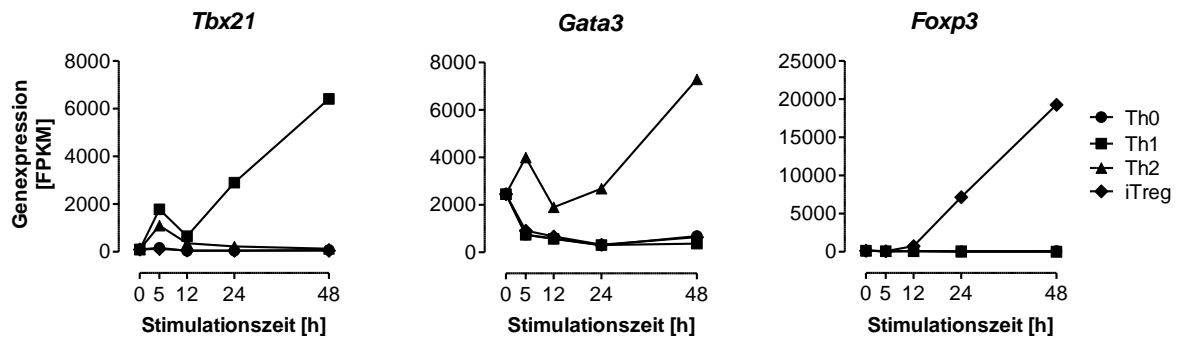
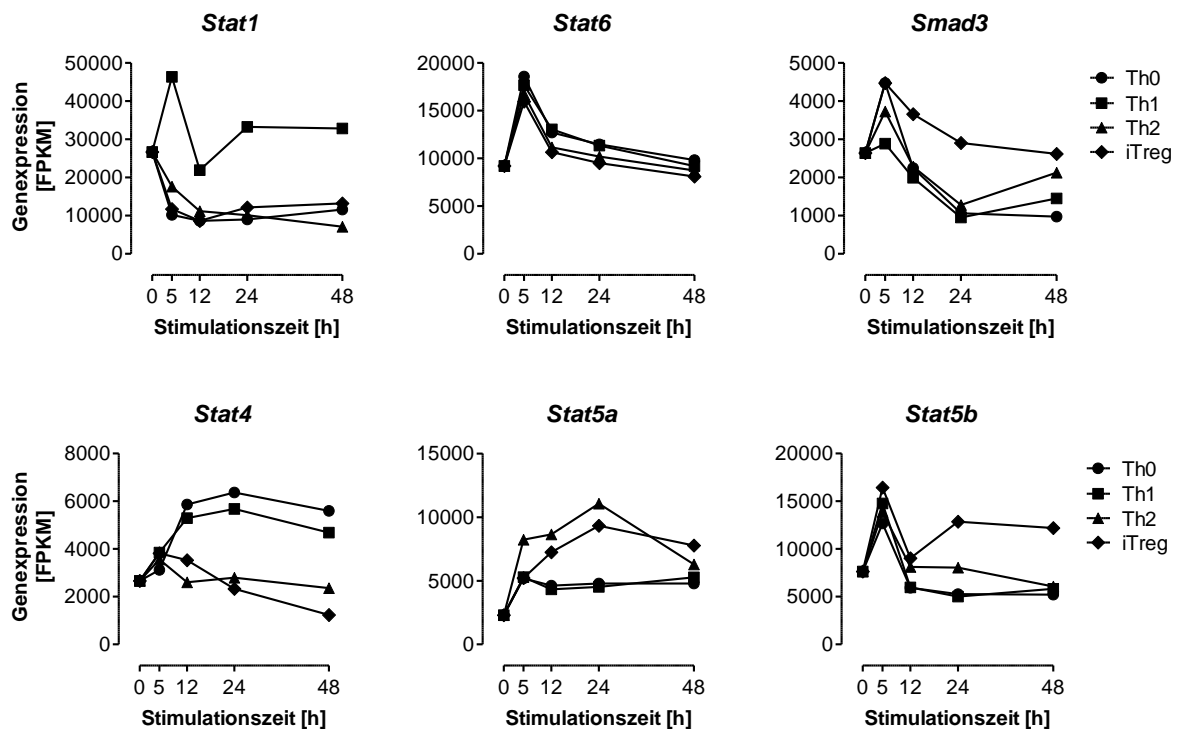
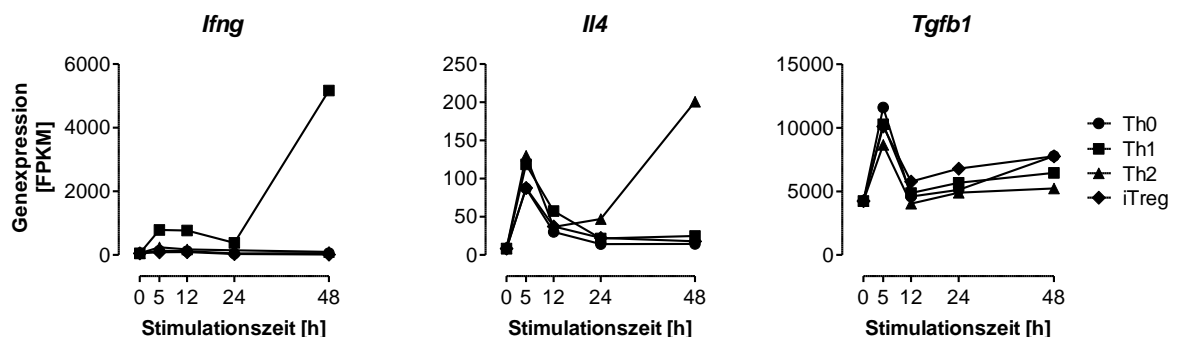
In den Th2 Zellen wurde der Mastertranskriptionsfaktor *Gata3* nach Stimulation hochreguliert und zeigte bereits 5 h nach Stimulation eine differenzielle Expression gegenüber den anderen Subtypen. Die Genexpression des Th2-Zytokins *Il4* stieg 24 h nach Stimulation differenziell an und erreichte 48 h nach Stimulation einen Expressionswert von 200. Die Th2-Zytokine *Il5* und *Il13* waren in der frühen Phase nicht differenziell exprimiert (Daten nicht gezeigt). Der für die Polarisation von Th2 Zellen notwendige Transkriptionsfaktor *Stat6* wurde ebenfalls in der frühen Phase nicht differenziell exprimiert. Neben den IL4/STAT6- ist auch der IL2/STAT5-Signalweg für die Differenzierung von Th2 Zellen essentiell. Der IL2/STAT5 Signalweg spielt aber auch eine Rolle in der iTreg Differenzierung. Somit war der Transkriptionsfaktor *Stat5* (*Stat5a* und *Stat5b*) in den Th2 und iTreg Zellen gegenüber den Th1 und Th0 Zellen 24 h nach Stimulation differenziell hochreguliert.

In den iTreg Zellen wurde der charakteristische Mastertranskriptionsfaktor *Foxp3* bereits 24 h nach Stimulation differenziell hochreguliert und erreichte am zweiten Tag ein Expressionsmaximum von 19.000. Das iTreg-Zytokin *Tgfb1* zeigte in der frühen Differenzierungsphase noch keine differenzielle Expression. Der Transkriptionsfaktor *Smad3*, der für den TGF $\beta$ -Signalweg wichtig ist, wurde jedoch 12 bis 24 h nach Stimulation in den iTreg Zellen differenziell hochreguliert.

Die Genexpressions- und Durchflusszytometrie-Daten der RNA-Seq Proben belegen, dass die Polarisationskulturen qualitativ in Ordnung waren und somit für die Analyse nach differenziell exprimierten Transkriptionsfaktoren in der Differenzierung von T-Helferzellen verwendet werden können.



## a) Die Th-Subtyp-spezifischen Mastertranskriptionsfaktoren sind differenziell exprimiert

b) Die Th-Subtyp-spezifischen Transkriptionsfaktoren *Stat1*, *Stat4*, *Stat5* und *Smad3* sind differenziell exprimiertc) Die Th-Subtyp-spezifischen Zytokine *Ifng* und *Il4* sind differenziell exprimiert

**Abbildung 3: Qualitätsanalyse der RNA-Seq Proben von den Th0, Th1, Th2 und iTreg Zellen.** Dargestellt wurden die Genexpressionswerte (FPKM-Werte) aus dem RNA-Seq Experiment in Abhängigkeit von der Stimulationszeit für die Subtyp-spezifischen a) Mastertranskriptionsfaktoren, b) *Stat/Smad* Transkriptionsfaktoren und c) Zytokine. Im Vergleich zu den jeweils anderen Subtypen wurden in den Th1 Zellen *Tbx21*, *Stat1*, *Stat4* und *Ifng*, in den Th2 Zellen *Gata3*, *Stat5* und *Il4* und in den iTreg Zellen *Foxp3*, *Stat5* und *Smad3* differenziell hochreguliert.

## 2.1.2 Identifikation von Subtyp-spezifischen Transkriptionsfaktoren in der Differenzierung von T-Helferzellen

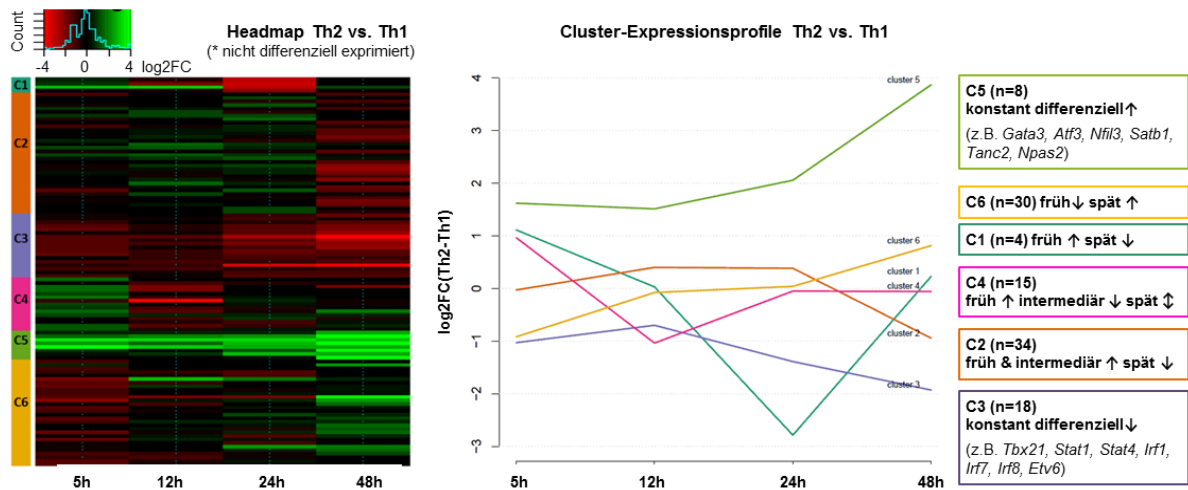
Die Aktivierung einer naiven T-Zelle wird durch die Stimulation des T-Zellrezeptors eingeleitet. Dies führt zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP1, NFAT und NF $\kappa$ B, die wiederum die Expression von *Il2* und somit die Differenzierung zu Effektor-T-Zellen fördern. Die Entscheidung, zu welchem T-Helferzell-Subtyp eine naive T-Zelle differenziert, wird jedoch primär durch die Anwesenheit eines Subtyp-spezifischen Zytokinmilieus kontrolliert. Diese Subtyp-spezifischen Zytokine induzieren die Expression von verschiedenen Subtyp-spezifischen Transkriptionsfaktoren, u. a. STAT-Proteine und Mastertranskriptionsfaktoren, die für das Differenzierungsprogramm eines T-Helferzell-Subtyps notwendig sind. Die Identifikation von Transkriptionsfaktoren, die durch den Subtyp-spezifischen Zytokinstimulus differenziell induziert wurden und somit potenzielle, richtungsweisende Transkriptionsfaktoren für die Differenzierung von T-Helferzellen sein könnten, stand im Fokus dieser Transkriptom-Analysen.

In der RNA-Seq Analyse der T-Helferzellen wurden 22140 Transkripte sequenziert. Davon kodieren 687 Transkripte für Transkriptionsfaktoren. Im Vergleich zu den naiven Zellen wurden in den Th1 Zellen insgesamt 254, in den Th2 Zellen 300 und in den iTreg Zellen 269 Transkriptionsfaktor-Transkripte über den Zeitraum von 5 bis 48 Stunden differenziell exprimiert (Daten nicht gezeigt). Somit wurde eine differenzielle Expression von ca. 40 % der für Transkriptionsfaktor-Transkripte durch den T-Zell-Rezeptor- und Zytokin-Stimulus induziert. Für die Identifikation der Transkriptionsfaktoren, deren differenzielle Expression nur durch den Subtyp-spezifischen Zytokin-Stimulus induziert wird, wurden zusätzlich alle differenziell exprimierten Transkripte zwischen den Th2 und Th1 (a), iTreg und Th1 (b) sowie iTreg und Th2 (c) Zellen bestimmt und nach Transkriptionsfaktoren gefiltert (s. Abbildung 4). Insgesamt wurden zwischen den Th2 und Th1 Zellen sowie den iTreg und Th1 Zellen 109 differenziell exprimierte Transkriptionsfaktor-Transkripte identifiziert. Der Vergleich der Transkriptome von iTreg und Th2 Zellen offenbarte sogar 169 differenziell exprimierte Transkriptionsfaktor-Transkripte. Von besonderem Interesse sind Transkriptionsfaktoren, die konstant hoch- bzw. runterreguliert werden und somit ein ähnliches Expressionsprofil wie die Mastertranskriptionsfaktoren aufweisen. Hierfür wurden die differenziell exprimierten Transkriptionsfaktor-Transkripte anhand der Ähnlichkeit ihres kinetischen Expressionsprofils in 6 Cluster eingeteilt: (a) konstant differenziell hochreguliert, (b) konstant hochreguliert, (c) früh hoch- und spät runterreguliert, (d) früh runter- und spät hochreguliert, (e) konstant runterreguliert und (f) konstant differenziell runterreguliert. Für die weiteren Analysen wurden nur die Transkripte berücksichtigt, die konstant hoch- bzw. runterreguliert wurden (Th2-Th1: C3/C5; iTreg-Th1: C1/C2/C4/C6; iTreg-Th2: C3/C4/C5/C6).

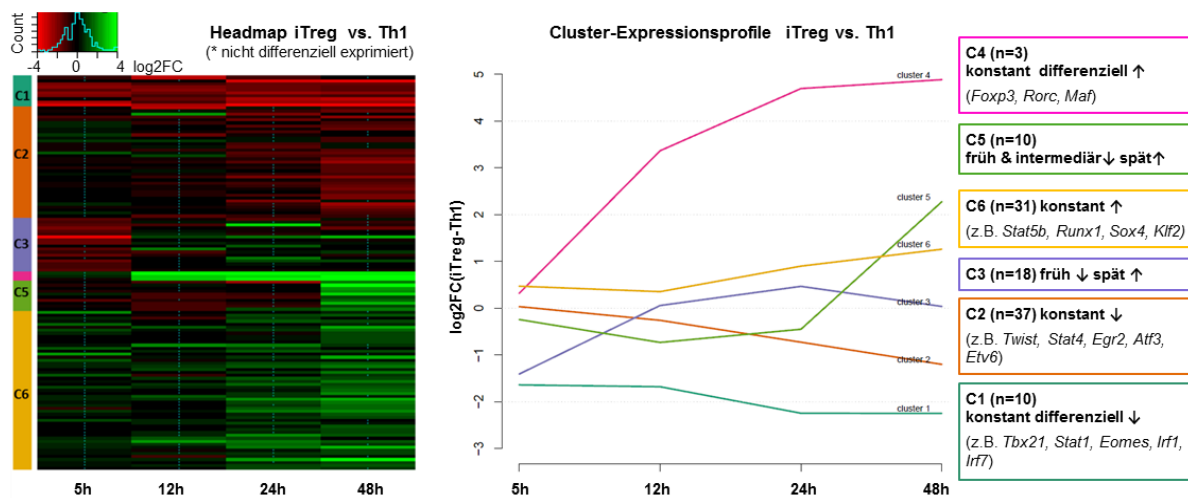
Im Vergleich zwischen den Th2 und Th1 Zellen wurden 8 Transkriptionsfaktor-Transkripte über den Zeitraum von 5 bis 48 Stunden konstant differenziell hochreguliert (z. B. *Gata3*, *Atf3*, *Nfil3*, *Satb1*, *Tanc2* und *Npas2*) und sind somit möglicherweise für die Differenzierung von Th2 Zellen essentiell. Demgegenüber wurden 18 Transkriptionsfaktor-Transkripte konstant differenziell runterreguliert (z. B. *Tbx21*, *Stat1*, *Stat4*, *Irf1*, *Irf7*, *Irf8* und *Etv6*) und agieren vermutlich entscheidend in der Differenzierung von Th1 Zellen (s. Abbildung 4a und Tabelle 25 im Anhang).

Zwischen den iTreg und Th1 Zellen wurden 3 Transkriptionsfaktor-Transkripte (*Foxp3*, *Rorc* und *Maf*) über den Zeitraum von 5 bis 48 Stunden konstant differenziell und 31 (z. B. *Stat5b*, *Runx1*, *Sox4*, *Dbp* und *Klf2*) konstant hochreguliert und spielen somit vermutlich eine entscheidende Rolle in der

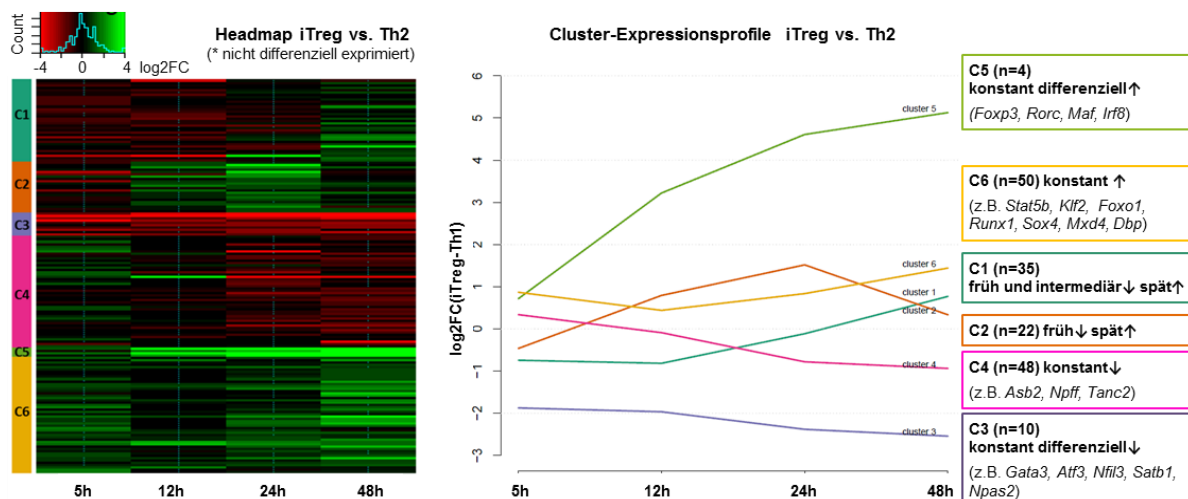
## a) Differenziell exprimierte Transkriptionsfaktor-Transkripte zwischen Th2 und Th1 Zellen



## b) Differenziell exprimierte Transkriptionsfaktor-Transkripte zwischen iTreg und Th1 Zellen



## c) Differenziell exprimierte Transkriptionsfaktor-Transkripte zwischen iTreg und Th2 Zellen

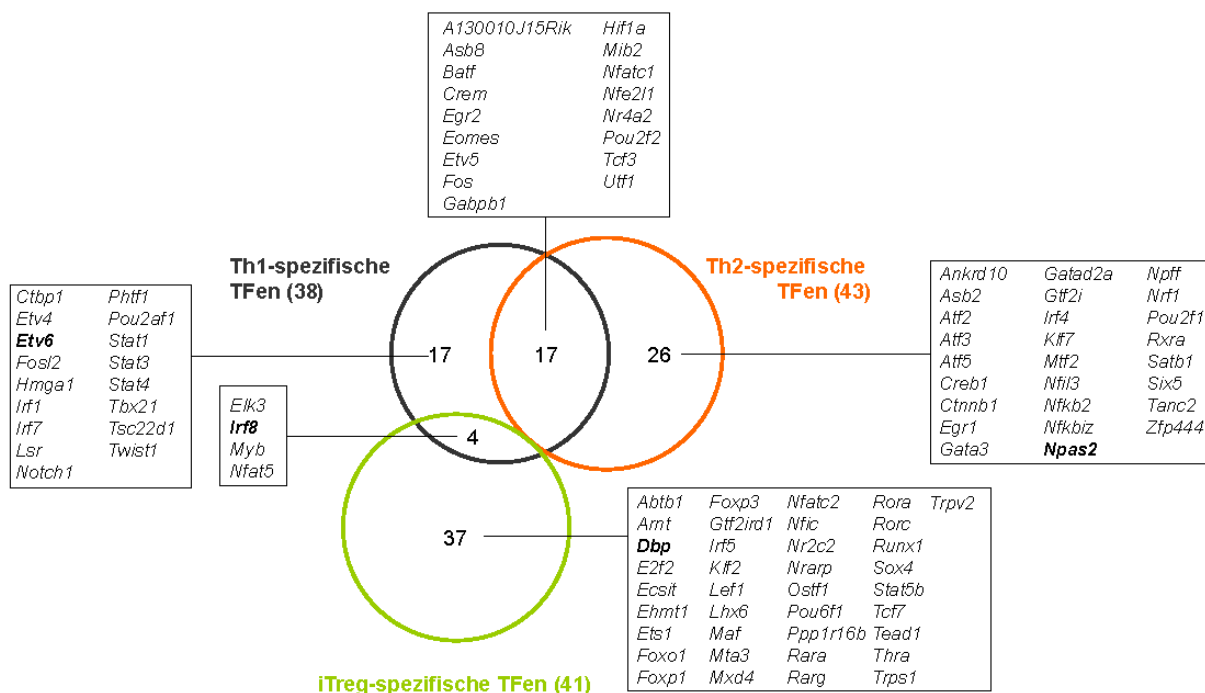


**Abbildung 4: Identifikation von Subtyp-spezifischen Transkriptionsfaktor-Transkripten in Th1, Th2 und iTreg Zellen.** Für jeden Zeitpunkt wurden die differenziell exprimierten Transkripte ( $|\log_2FC| > 1$ ,  $p$ -Wert  $< 0,05$ ) zwischen Th2 und Th1 (a), iTreg und Th1 (b) sowie iTreg und Th2 (c) bestimmt, nach Transkriptionsfaktoren gefiltert und in einer Headmap dargestellt (links) (rot = runterreguliert, grün = hochreguliert, schwarz = unverändert, \* = nicht differenziell exprimiert). Zusätzlich wurden die differenziell exprimierten Transkriptionsfaktor-Transkripte anhand der Ähnlichkeiten ihrer kinetischen Expressionsprofile in 6 Cluster eingeteilt (rechts). Die Anzahl der Transkriptionsfaktor-Transkripte eines Clusters sowie stellvertretende Transkripte für die konstant hoch- bzw. runterregulierten Cluster sind rechts aufgelistet. Die Analysen wurden von Stefan Kröger durchgeführt.

Differenzierung von iTreg Zellen. Demgegenüber wurden 10 Transkriptionsfaktor-Transkripte (z. B. *Tbx21*, *Stat1*, *Eomes*, *Irf1* und *Irf7*) konstant differenziell und 37 (z. B. *Twist1*, *Stat4*, *Egr2*, *Atf3* und *Etv6*) konstant runterreguliert und sind somit wiederum essentiell für die Differenzierung von Th1 Zellen (s. Abbildung 4b und Tabelle 26 im Anhang).

Im letzten Vergleich zwischen den iTreg und Th2 Zellen wurden 4 Transkriptionsfaktor-Transkripte (*Foxp3*, *Rorc*, *Maf* und *Irf8*) über den Zeitraum von 5 bis 48 Stunden konstant differenziell und 50 (z. B. *Stat5b*, *Runx1*, *Sox4*, *Klf2*, *Foxo1*, *Mdx* und *Dbp*) konstant hochreguliert. Dieser Vergleich validierte die zuvor identifizierten Transkriptionsfaktor-Transkripte, die vermutlich eine entscheidende Rolle in der Differenzierung von iTreg Zellen spielen. Des Weiteren wurden 10 Transkriptionsfaktor-Transkripte (z. B. *Gata3*, *Atf3*, *Nfil3*, *Satb1* und *Npas2*) konstant differenziell und 48 (z. B. *Asb2*, *Npff* und *Tanc2*) konstant runterreguliert. Diese Transkriptionsfaktor-Transkripte sind somit wiederum essentiell für die Differenzierung von Th2 Zellen (s. Abbildung 4c und Tabelle 27 im Anhang).

Insgesamt wurden mit dem Vergleich der Transkriptome 38 Th1-spezifische, 43 Th2-spezifische und 41 iTreg-spezifische Transkriptionsfaktoren identifiziert, deren Expressionen gegenüber einem oder beiden anderen Subtypen differenziell erhöht waren (s. Abbildung 5). Diese Liste der Subtyp-spezifischen Transkriptionsfaktoren beinhaltet eine Gruppe von bereits beschriebenen Transkriptionsfaktoren (u. a. *Tbx21*, *Stat4*, *Eomes* und *Irf1* in Th1 Zellen; *Gata3*, *Nfil3* und *Satb1* in Th2 Zellen sowie *Foxp3*, *Runx1* und *Klf2* in iTreg Zellen), für die bereits Funktionen in der Induktion bzw. Differenzierung des jeweiligen T-Helferzell-Subtyps beschrieben wurden, sowie bisher nicht beschriebene Transkriptionsfaktoren (u. a. *Etv6*, *Irf7* und *Irf8* in Th1 Zellen; *Npas2*, *Npff*, *Asb2* und *Tanc2* in Th2 Zellen sowie *Irf8*, *Dbp* und *Mxd4* in iTreg Zellen), deren Funktionen im Zusammenhang mit der Induktion und Differenzierung des T-Helferzell-Subtyps noch ungeklärt sind. Im Folgenden wurde die differenzielle Expression einiger neu identifizierter und für den T-Helferzell-Subtyp funktionell nicht beschriebener Transkriptionsfaktoren mittels qRT-PCR Analysen validiert.

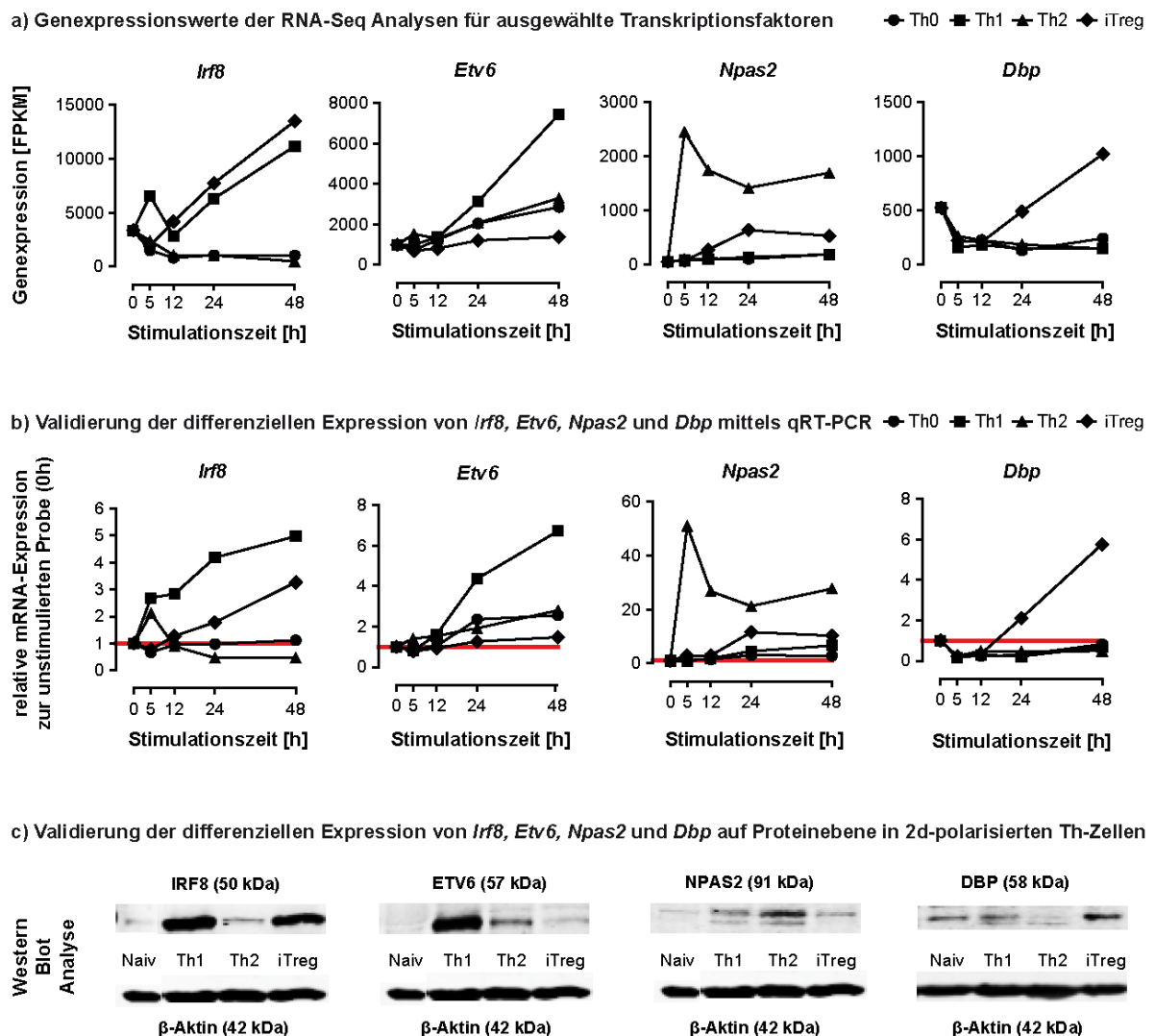


**Abbildung 5: Venn-Diagramm der identifizierten Subtyp-spezifischen Transkriptionsfaktoren in Th1, Th2 und iTreg Zellen.** Die identifizierten Transkriptionsfaktor-Transkripte aus den konstant hoch- bzw. runterregulierten Clustern aus Abbildung 4 (s. auch Tabellen 25–27 im Anhang) wurden einem Transkriptionsfaktor zugeordnet. Entsprechend der Expressionspräferenzen innerhalb der Th1, Th2 und iTreg Zellen wurden die Transkriptionsfaktoren in Th1-spezifisch (schwarz), Th2-spezifisch (orange) und iTreg-spezifisch (grün) eingeteilt.

### 2.1.3 Validierung von differenziell exprimierten Transkriptionsfaktoren

Für die Validierung differenziell exprimierter Transkriptionsfaktoren in T-Helferzellen wurde ein neuer Probensatz generiert. Hierfür wurden naive  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen aus der Milz und den Lymphknoten von BALB/cAnNCr1 Mäusen unter Th0, Th1, Th2 und iTreg polarisierenden Bedingungen für 5 bis 48 h kultiviert. Für die Analyse der mRNA-Expression erfolgte nach RNA-Präparation die Bestimmung der Genexpression mittels quantitativer RT-PCR (qRT-PCR). Für die Proteinanalysen wurden die Zellextrakte nach einer SDS-Polyacrylgelelektrophorese im Western Blot analysiert.

Für 10 ausgewählte Transkriptionsfaktoren (z. B. *Irf8*, *Etv6*, *Npas2*, *Npff*, *Mxd4* und *Dbp*) konnte auf mRNA-Ebene die differenzielle Expression validiert werden. In Abbildung 6 sind die Genexpressionswerte der RNA-Seq Analysen (a) und der validierenden qRT-PCR Analysen (b) für die Transkriptionsfaktoren *Irf8*, *Etv6*, *Npas2* und *Dbp* dargestellt. Des Weiteren wurde die differenzielle Expression von IRF8 und ETV6 in Th1, NPAS2 in Th2 sowie DBP und IRF8 in iTreg Zellen auf Proteinebene in 2-Tage-polarisierten Zellen bestätigt (Abbildung 6c).

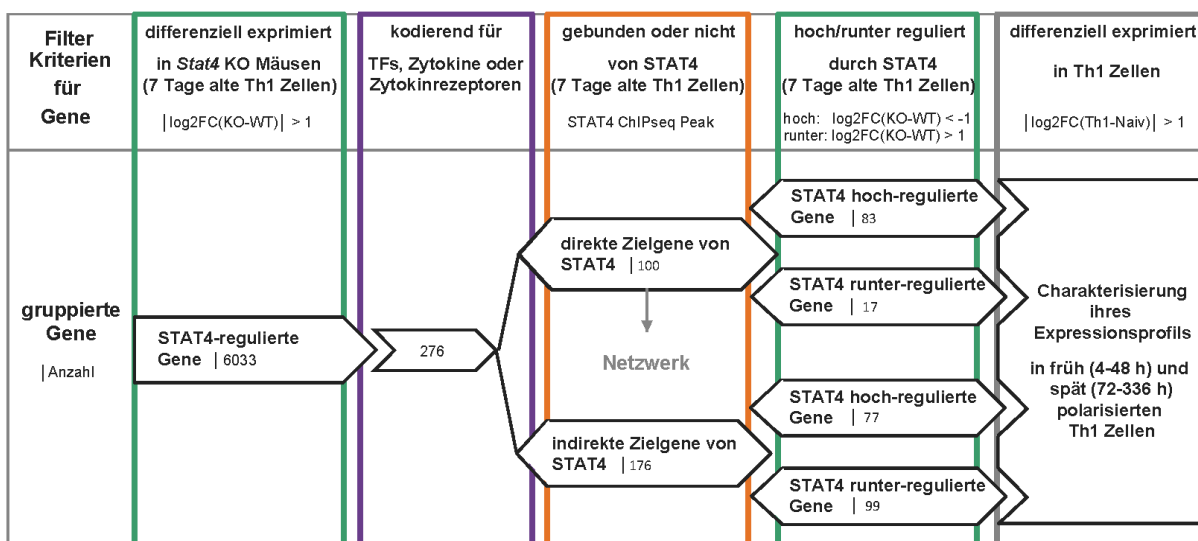


**Abbildung 6: Die RNA-Seq Analysen identifizierten u. a. *Irf8*, *Etv6*, *Npas2* und *Dbp* als differenziell exprimierte Transkriptionsfaktoren in den T-Helferzellen.** a) Genexpressionswerte der RNA-Seq Analysen. b) relative mRNA-Expression in polarisierten Th0, Th1, Th2 und iTreg Zellen bestimmt mittels qRT-PCR. Die relative mRNA Expression wurde nach der  $\Delta\Delta C_t$  Methode berechnet, auf das Housekeeping Gen *Rps18* normalisiert und in Relation zu naiven T-Zellen gesetzt (naive T-Zellen = 0h = 1 = rote Linie). c) Proteinexpression von IRF8, ETV6, NPAS2 und DBP in naiven  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen und in 2d-polarisierten Th1, Th2 und iTreg Zellen bestimmt mittels Western Blot.

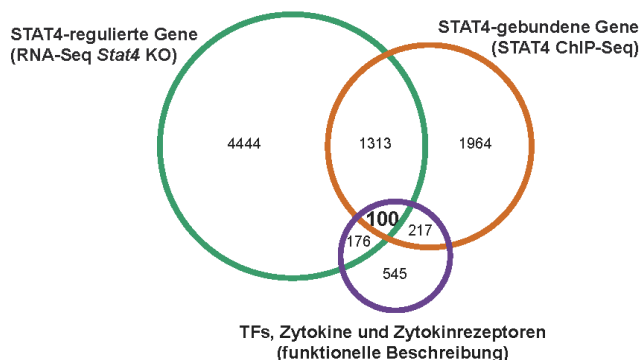
## 2.2 Integrative Netzwerkanalyse

Die Transkriptom-Analyse der T-Helferzellen ergab eine Liste von Transkriptionsfaktoren, die nach T-Zellrezeptor-Stimulation und Polarisation differenziell innerhalb eines T-Helferzell-Subtyps hochreguliert wurden und somit eine vielversprechende Rolle in der peripheren Aktivierung und Differenzierung dieses Subtyps spielen könnten. Nun stellte sich die Frage, welche dieser Transkriptionsfaktoren am vielversprechendsten sind und im Rahmen dieser Arbeit genauer funktionell und molekularbiologisch charakterisiert werden sollten. Eine integrative Netzwerkanalyse, die die Ergebnisse aus verschiedenen bereits publizierten globalen Datensätzen mit dem RNA-Seq Datensatz der T-Helferzellen kombiniert, sollte diese Auswahl unterstützen.

### a) Workflow für die Konstruktion des STAT4-Netzwerkes



### b) Venn-Diagramm der drei zugrundeliegenden Datensätze für das STAT4-Netzwerk



### c) Charakterisierung der 100 im Netzwerk dargestellten Gene anhand ihrer Expression in polarisierten Th1 Zellen

Expression	Richtung/Zeitpunkt	Anzahl an TFen	
reguliert durch und gebunden von STAT4	↑	83	
	↓	17	
und differenziell in Th1 zu Naiv	↑	früh	17
		früh + spät	14
		spät	13
	↓	früh	14
		früh + spät	3
		spät	6

**Abbildung 7: Vorgehensweise für die integrative Netzwerkanalyse zur Konstruktion des STAT4-Netzwerkes.** a) Workflow für die Konstruktion des STAT4-Netzwerkes in Th1 Zellen. In der ersten Reihe sind die Filterkriterien und die verwendeten Datensätze dargestellt. Jeder Integrationsschritt ist in einer anderen Farbe markiert. In der zweiten Reihe, unterhalb der Filterkriterien, ist die jeweilige Anzahl an Genen für jeden Integrationsschritt und für jede Gengruppe aufgelistet. b) Venn-Diagramm der drei zugrundeliegenden Datensätze für das STAT4-Netzwerk. Es wurden die differenziell exprimierten Gene in 7-Tage alten Th1 Zellen zwischen *Stat4* KO und WT Mäusen bestimmt und im Anschluss mit der Liste von STAT4-bindenden Genen in 7-Tage alten Th1 Zellen und der Liste von Transkriptionsfaktoren, Zytokinen und Zytokinrezeptoren integriert. Die fettmarkierten Gene, insgesamt 100, bildeten die Grundlage für das STAT4-Netzwerk. c) Charakterisierung der im Netzwerk dargestellten 100 STAT4-regulierten Gene anhand ihrer Expression in Abhängigkeit von STAT4 und in polarisierten Th1 Zellen (früh = 4-48 h; spät = 72-336 h; ↑ hochreguliert; ↓ runterreguliert).

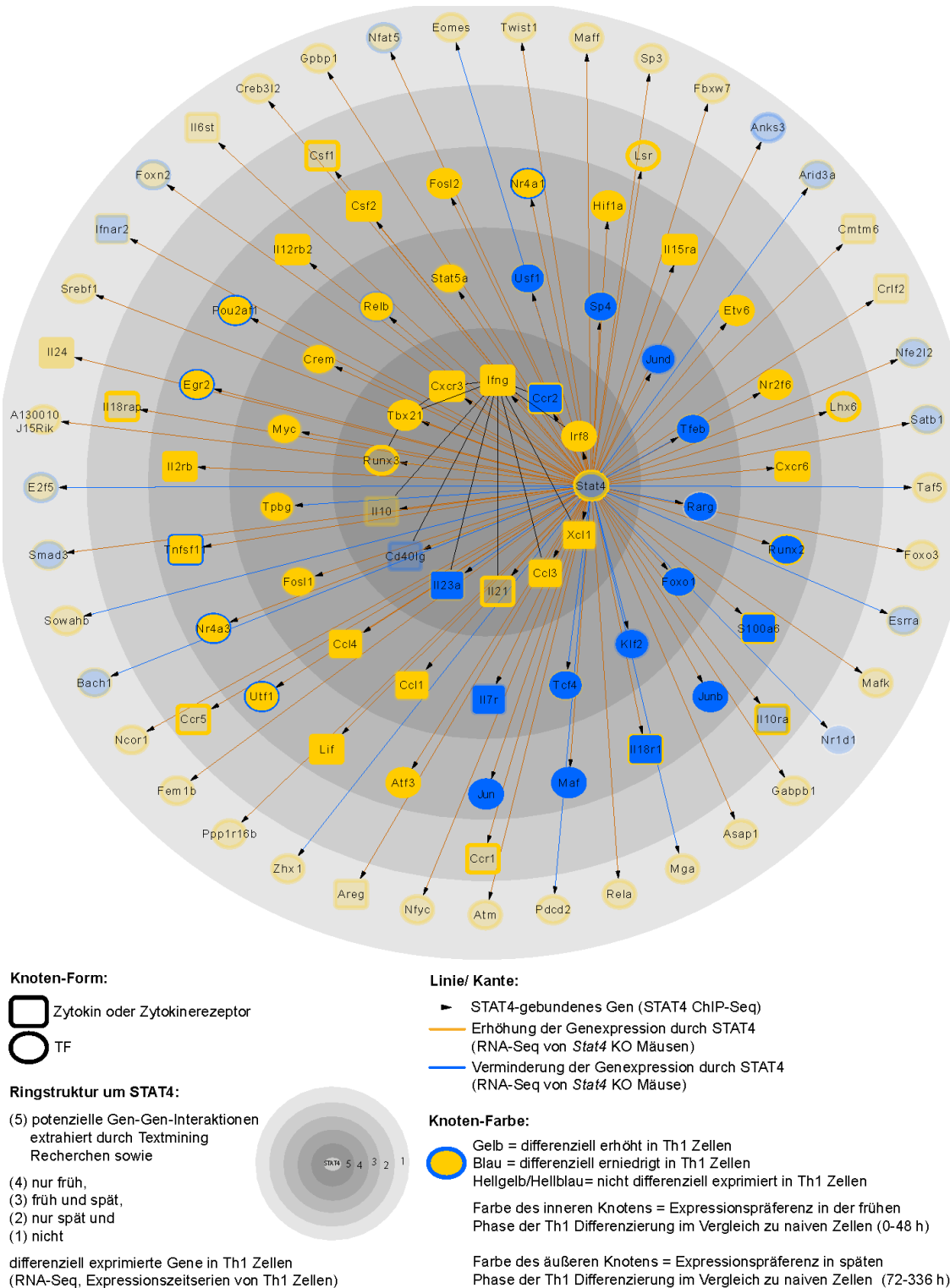
Der Schwerpunkt dieser Netzwerkanalysen wurde im Rahmen dieser Arbeit auf die Th1 und Th2 Zellen gelegt, da der Phänotyp dieser Zellen bereits im Detail studiert wurde und somit eine Vielzahl von globalen Genexpressions- und DNA-bindenden Daten zur Verfügung stand. Th1 und Th2 Zellen sind von besonderer Bedeutung, da Dysbalancen in der Immunantwort mit der Pathogenese und Progression von verschiedenen immun-vermittelten Krankheiten assoziiert sind (Romagnani, 1996). Zudem weisen die Th1 und Th2 Zellen die größten Unterschiede im Transkriptom zueinander auf, welche sich bereits früh nach der Stimulation etablieren (van den Ham et al., 2013).

Für die Differenzierung naiver T-Zellen sind zwei Typen von Transkriptionsfaktoren essentiell: die Mastertranskriptionsfaktoren und die STAT-Proteine. Die STAT-Proteine werden durch das umgebene Zytokinmilieu aktiviert und regulieren die Differenzierung maßgeblich. So wird die Polarisation von naiven Zellen zu Th1 Zellen durch den IL12/STAT4 und IFN $\gamma$ /STAT1 Signalweg und die der Th2 Zellen durch den IL4/STAT6 Signalweg vermittelt (Glimcher and Murphy, 2000). Da die STAT-Proteine eine wesentliche Rolle in der Weichenstellung der Differenzierung spielen, wurde für die Th1 Zellen ein Netzwerk um den Transkriptionsfaktor STAT4 und für die Th2 Zellen um den Transkriptionsfaktor STAT6 erstellt. Hierfür wurden vier globale Datensätze von Th1 bzw. Th2 Zellen aus Wildtyp (WT) und *Stat4* bzw. *Stat6* Knockout (KO) Mäusen integriert. Als Datengrundlage der Netzwerke diente der RNA-Seq Datensatz von *Stat4* bzw. *Stat6* KO Mäusen, der mit dem STAT4 bzw. STAT6 ChIP-Seq Datensatz integriert und nach Transkriptionsfaktoren, Zytokinen und Zytokinrezeptoren gefiltert wurde. In den Analysen kristallisierte sich der Transkriptionsfaktor IRF8 als möglicher Weichensteller für die Th1-Differenzierung heraus.

### 2.2.1 STAT4-Netzwerk für Th1 Zellen

Durch Integration von globalen Th1-spezifischen Genexpressions- und DNA-bindenden Daten mit dem RNA-Seq Datensatz der Th1 Zellen sollten Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die für die Differenzierung von Th1 Zellen essentiell sind. Das Ergebnis der Datenintegration wurde als Netzwerk um den Transkriptionsfaktor STAT4 visualisiert. Die Vorgehensweise der Datenintegration ist in Abbildung 7a schematisch dargestellt.

Im ersten Schritt wurden 6033 STAT4-regulierte Gene durch Vergleich der Genexpressionsdaten von 7-Tage alten *in vitro* differenzierten Th1 Zellen aus WT und *Stat4* KO Mäusen (grün markiert in Abbildung 7) (Vahedi et al., 2012) identifiziert. Zur besseren Übersichtlichkeit wurde das Netzwerk im zweiten Schritt nach Transkriptionsfaktoren, Zytokinen und Zytokinrezeptoren gefiltert. Hierfür wurde der Microarray Datensatz von T-Helferzellen verwendet (lila markiert in Abbildung 7) (Wei et al., 2009). In diesem Datensatz wurden 782 Transkriptionsfaktoren und 271 Zytokine und Zytokinrezeptoren beschrieben, die für die Induktion, die Differenzierung und den Erhalt von T-Helferzellen wichtig sind. Die Genexpression der verbleibenden 276 Gene kann direkt durch STAT4 bzw. indirekt über andere Transkriptionsfaktoren reguliert werden. Zur Bestimmung der direkten Zielgene von STAT4 wurde im dritten Schritt der STAT4-ChIP-Seq Datensatz analysiert (orange markiert in Abbildung 7) (Wei et al., 2010). Es wurden 3594 Gene identifiziert, die in 7-Tage alten *in vitro* differenzierten Th1 Zellen durch STAT4-gebunden werden. 1413 dieser STAT4-gebundenen Gene zeigten auch eine differenzielle Genexpression in den *Stat4* KO Mäusen, von denen 100 für einen Transkriptionsfaktor oder für ein Zytokin bzw. Zytokinrezeptor kodieren. Die Schnittmenge (s. Abbildung 7b) aus den drei zuvor genannten Datensätzen bildete die Datengrundlage des vorliegenden STAT4-Netzwerkes. Bei den 100 Genen handelt es sich um Gene, die für Transkriptionsfaktoren bzw.



**Abbildung 8: STAT4-Netzwerk in Th1 Zellen.** Das Netzwerk wurde von Stefan Kröger erstellt. Es zeigt 100 Transkriptionsfaktoren (ovaler Knoten) sowie Zytokine und Zytokinrezeptoren (rechteckiger Knoten), die direkte Zielgene von STAT4 sind. Die Farbe der Kanten gibt die Richtung an, wie STAT4 die Expression des Gens reguliert (blau = vermindert, gelb = erhöht durch STAT4). Kanten/Linien mit einer schwarzen Pfeilspitze stehen für eine direkte Bindung von STAT4 an dem Gen. Schwarze Kanten/Linien repräsentieren potenzielle Gen-Gen-Interaktionen, die in einer Textmining Recherche extrahiert wurden. Die Farbe des Knotens (blau = differenziell erniedrigt, gelb = differenziell erhöht, hellblau/hellgelb = nicht differenziell exprimiert) charakterisiert die Expression des Gens in Th1 Zellen im Vergleich zu naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Farbe des inneren Knotens = frühe Phase, Farbe des äußeren Rings = späte Phase). Die Gene sind in einer 5-Ringstruktur um den Transkriptionsfaktor STAT4 angeordnet, die für eine bessere Übersicht grau hinterlegt wurden. Ringe von außen nach innen: Gene die nicht (1), nur spät (2), früh und spät (3) oder nur früh (4) differenziell in Th1 Zellen im Vergleich zu naiven Zellen exprimiert sind. Im innersten Ring (5) sind Gene zusammengefasst, die eine potenzielle Gen-Gen-Interaktion in der Textmining Recherche zeigten.



Zytokine und Zytokinrezeptoren kodieren, die von STAT4 gebunden werden und deren Expression durch STAT4 reguliert wird. Im vierten Schritt wurden die 100 Gene des Netzwerkes hinsichtlich ihrer Expression in Th1 Zellen genauer charakterisiert. Als Datengrundlage wurden die RNA-Seq Datensätze der Th1 Zellen aus den Transkriptom-Analysen und die von Hu (Hu et al., 2013a) verwendet. Es wurden alle differenziell exprimierten Gene in Th1 Zellen im Vergleich zu naiven Zellen bestimmt. Des Weiteren wurde eine Kategorisierung in früh (4–48 h) und spät (72–336 h) differenziell exprimiert vorgenommen. Die Anzahl und die Verteilung nach dem Expressionsverhalten der differenziell exprimierten Gene in Th1 Zellen ist in Abbildung 7c zusammengefasst dargestellt. Zur Bestimmung von potenziellen Th1-spezifischen Gen-Gen-Interaktionen wurde im letzten Schritt eine Textmining Recherche durchgeführt. Insgesamt wurden ca. 22 Millionen Abstracts und Volltexte in Medline nach dem gemeinsamen Auftreten von jeweils zwei Genen oder Proteinen in einem Zusammenhang durchsucht und 12 potenzielle Gen-Gen-Interaktionen gefunden.

Das resultierende STAT4-Netzwerk ist in Abbildung 8 dargestellt und enthält folgende Informationen (gleiches gilt für STAT6 in Th2 Zellen im STAT6-Netzwerk in Abbildung 10):

1. die Richtung, in die STAT4 die Expression der Gene reguliert (Farbe der Kanten/Linien: gelb = erhöht und blau = vermindert durch STAT4),
2. ob ein Gen für ein Transkriptionsfaktor (ovaler Knoten) oder für ein Zytokin bzw. Zytokinrezeptor (rechteckiger Knoten) kodiert,
3. ob ein Gen direkt (Kante/Linie mit schwarzer Pfeilspitze) oder nicht (Kante/Linie ohne schwarzer Pfeilspitze) von STAT4 gebunden wird,
4. ob ein Gen in der frühen Phase (Farbe des inneren Knotens) oder späten Phase (Farbe des äußeren Rings/Knotens) der Th1 Differenzierung im Vergleich zu naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen differenziell exprimiert wird (gelb = differenziell erhöht, blau = differenziell erniedrigt, hellblau/hellgelb = nicht differenziell exprimiert) und
5. potenzielle Gen-Gen-Interaktionen zwischen den im Netzwerk dargestellten Genen (schwarze Kante/Linie) (nicht im STAT6-Netzwerk enthalten)

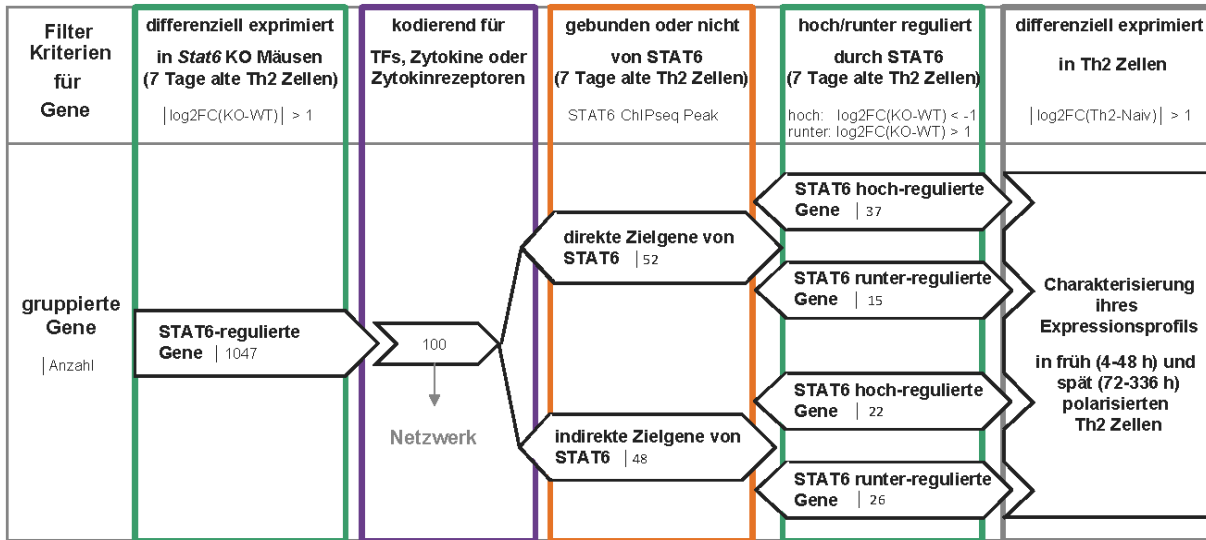
Zusätzlich sind die Gene entsprechend ihres Expressionsverhaltens in polarisierten Th1 Zellen in einer 5-Ringstruktur um den Transkriptionsfaktor STAT4 angeordnet, die für eine bessere Übersicht grau hinterlegt wurden. Die Ringe von außen nach innen beinhalten Gene, die nicht (1. Ring), nur spät (2. Ring), früh und spät (3. Ring) oder nur früh (4. Ring) differenziell in der Th1 Differenzierung im Vergleich zu naiven T-Zellen exprimiert werden. Im fünften innersten Ring sind Gene zusammengefasst, die eine potenzielle Gen-Gen-Interaktion in der Textmining Recherche zeigten (nicht im STAT6-Netzwerk vorhanden).

Zusammenfassend enthält das STAT4-Netzwerk 100 Transkriptionsfaktoren, Zytokine und Zytokinrezeptoren, die sowohl durch STAT4 reguliert als auch von STAT4 in Th1 Zellen gebunden werden. Insgesamt werden 83 Gene hoch- und 17 Gene runterreguliert durch STAT4. Die Integration der Expressionszeitserien von Th1 Zellen zeigte, dass nur 57 von den 100 Genen in polarisierten Th1 Zellen im Vergleich zu naiven Zellen differenziell exprimiert werden. Die Expression von 34 Genen wird in Th1 Zellen durch STAT6 erhöht und die von 13 Genen erniedrigt im Vergleich zu naiven T-Zellen. 10 der differenziell exprimierten Gene zeigen in der frühen und späten Phase der Differenzierung eine Expression in unterschiedlicher Richtung.

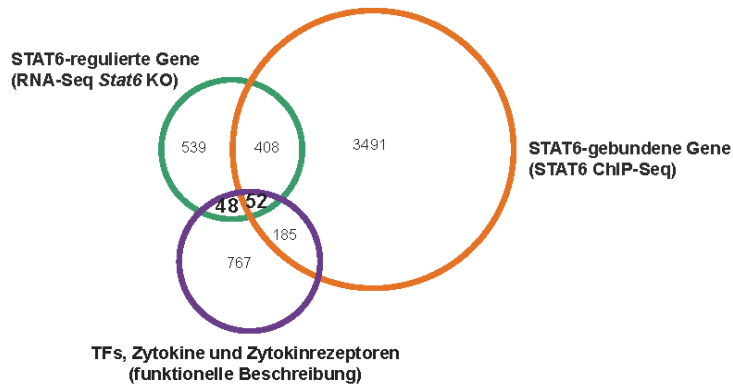
## 2.2.2 STAT6-Netzwerk für Th2 Zellen

In analoger Weise (s. Abbildung 9a) zum STAT4-Netzwerk wurde ebenfalls ein Netzwerk für Th2 Zellen mit dem Transkriptionsfaktor STAT6 im Mittelpunkt konstruiert (s. Abbildung 10). Der STAT6 ChIP-Seq Datensatz (orange markiert in Abbildung 9) (Wei et al., 2010) wurde wiederum mit dem RNA-Seq Datensatz (grün markiert in Abbildung 9) (Vahedi et al., 2012) von *Stat6* KO und WT Mäusen integriert und nach Transkriptionsfaktoren, Zytokine und Zytokinrezeptoren gefiltert (lila markiert in Abbildung 9). Aus dieser Analyse ergaben sich 52 Transkriptionsfaktoren und Zytokine/Zytokinrezeptoren, die sowohl in den 7-Tage alten *in vitro* differenzierten Th2 Zellen von *Stat6* KO Mäusen

### a) Workflow für die Konstruktion des STAT6-Netzwerkes



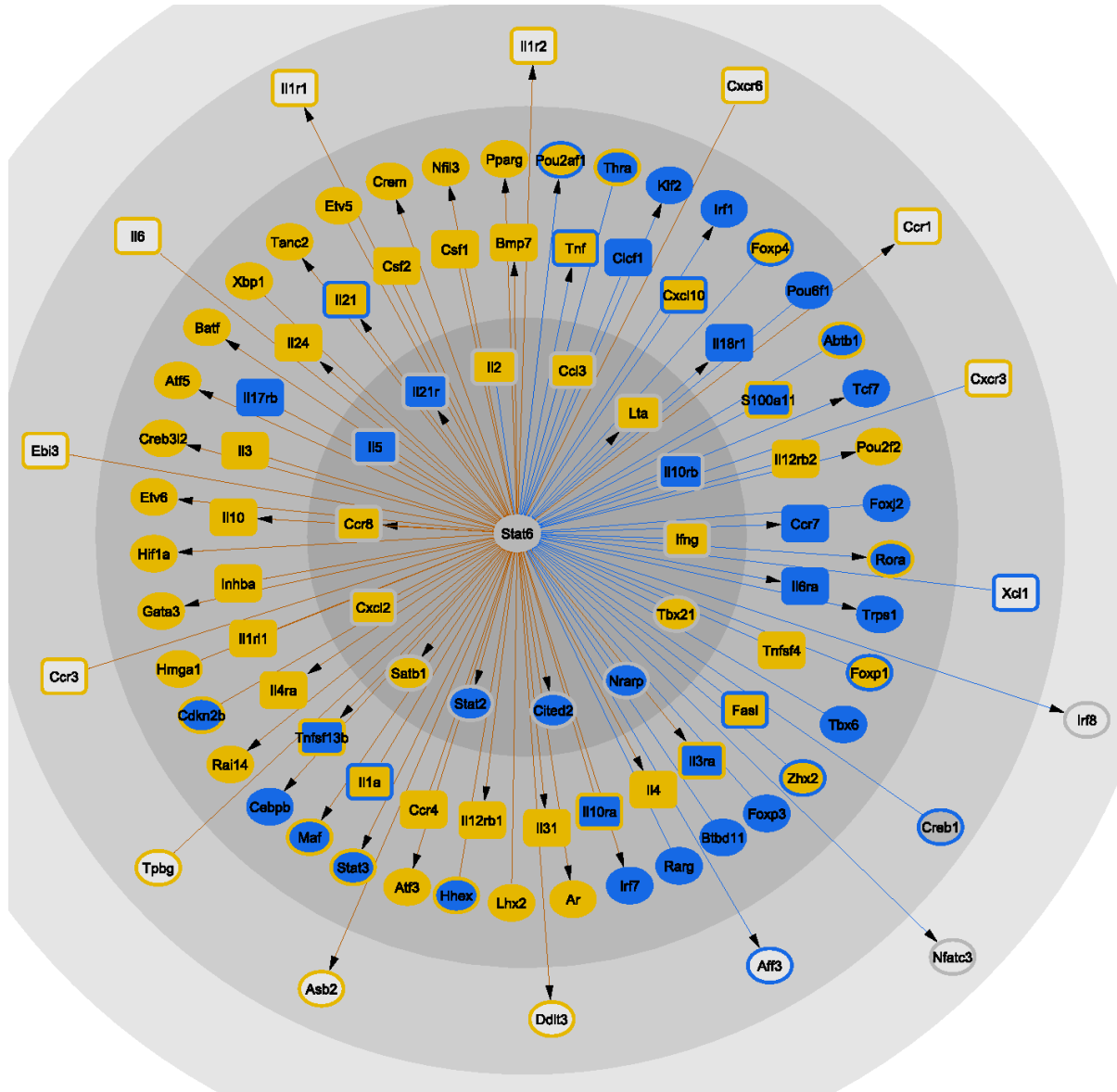
### b) Venn-Diagramm der drei zugrundeliegenden Datensätze für das STAT6-Netzwerk



### c) Charakterisierung der 100 im Netzwerk dargestellten Gene anhand ihrer Expression in polarisierten Th2 Zellen

Expression	Richtung/Zeitpunkt	Anzahl an TFen	
reguliert durch STAT6	↑	37	
	↓	15	
reguliert durch und gebunden von STAT6	↑	23	
	↓	25	
und differenziell in Th2 zu Naiv	↑	früh	17
		früh + spät	33
		spät	22
	↓	früh	17
		früh + spät	17
		spät	13

**Abbildung 9: Vorgehensweise für die integrative Netzwerkanalyse zur Konstruktion des STAT6-Netzwerkes.** A) Workflow für die Konstruktion des STAT6-Netzwerkes in Th2 Zellen. In der ersten Reihe sind die Filterkriterien und die verwendeten Datensätze dargestellt. Jeder Integrationsschritt ist in einer anderen Farbe markiert. In der zweiten Reihe, unterhalb der Filterkriterien, ist die jeweilige Anzahl an Genen für jeden Integrationsschritt und für jede Gengruppe aufgelistet. B) Venn-Diagramm der drei zugrundeliegenden Datensätze für das STAT6-Netzwerk. Es wurden die differenziell exprimierten Gene in 7-Tage alten Th2 Zellen zwischen *Stat6* KO und WT Mäusen bestimmt und im Anschluss mit der Liste von STAT6-bindenden Genen in 7-Tage alten Th2 Zellen und der Liste von Transkriptionsfaktoren, Zytokinen und Zytokinrezeptoren integriert. Die fettmarkierten Gene, insgesamt 100, bildeten die Grundlage für das STAT6-Netzwerk. C) Charakterisierung der 100 STAT6-regulierten und im Netzwerk dargestellten Gene anhand ihrer Expression in Abhängigkeit von STAT6 und in polarisierten Th2 Zellen (früh = 4-48 h; spät = 72-336 h; ↑ hochreguliert; ↓ runterreguliert).



**Kante/ Linie:**

- ▶ STAT6-gebundenes Gen (STAT6 ChIP-Seq)
- Erhöhung der Genexpression durch STAT6 (RNA-Seq von *Stat6* KO Mäusen)
- Verminderung der Genexpression durch STAT6 (RNA-Seq von *Stat6* KO Mäuse)

**Ringstruktur um STAT6:**

- (4) nur früh,
- (3) früh und spät,
- (2) nur spät und
- (1) nicht

differenziell exprimierte Gene in Th2 Zellen (RNA-Seq, Expressionszeitserien von Th2 Zellen)



**Knoten-Form:**

- Zytokin oder Zytokinrezeptor
- TF

**Knoten-Farbe:**

- Gelb = differenziell erhöht in Th2 Zellen
- Blau = differenziell erniedrigt in Th2 Zellen
- Weiß/Grau = nicht differenziell exprimiert in Th2 Zellen
- Farbe des inneren Knotens = Expressionspräferenz in der frühen Phase der Th2 Differenzierung im Vergleich zu naiven Zellen (0-48 h)
- Farbe des äußeren Knotens = Expressionspräferenz in späten Phase der Th2 Differenzierung im Vergleich zu naiven Zellen (72-336 h)

**Abbildung 10: STAT6–Netzwerk in Th2 Zellen.** Das Netzwerk wurde von Elzbieta Gralinska erstellt. Es zeigt Transkriptionsfaktoren (ovaler Knoten) sowie Zytokine und Zytokinrezeptoren (rechteckiger Knoten), die indirekte (48) oder direkte (52) Zielgene von STAT6 sind. Die Farbe der Kanten/Linien gibt die Richtung an, wie STAT6 die Expression des Gens reguliert (blau = vermindert, gelb = erhöht durch STAT6). Kanten/Linien mit einer schwarzen Pfeilspitze stehen für eine direkte Bindung von STAT6 an dem Gen. Die Farbe des Knotens (blau = differenziell erniedrigt, gelb = differenziell erhöht, grau = nicht differenziell exprimiert) charakterisiert die Expression des Gens in Th2 Zellen im Vergleich zu naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Farbe des inneren Knotens = frühe Phase, Farbe des äußeren Rings = späte Phase). Die Gene sind in einer 4-Ringstruktur um den Transkriptionsfaktor STAT6 angeordnet, die für eine bessere Übersicht grau hinterlegt wurden. Ringe von außen nach innen: Gene die nicht (1), nur spät (2), früh und spät (3) oder nur früh (4) differenziell in Th2 Zellen im Vergleich zu naiven Zellen exprimiert sind.

differenziell exprimiert waren als auch eine direkte Bindung von STAT6 in der STAT6 ChIP-Seq zeigten. Weitere 48 Transkriptionsfaktoren, Zytokine und Zytokinrezeptoren waren in den *Stat6* KO Mäusen differenziell exprimiert, zeigten aber keinen Peak in der STAT6 ChIP-Seq. Diese 100 direkt und indirekt STAT6-regulierten Gene bildeten die Datengrundlage für das STAT6-Netzwerk in Th2 Zellen (s. Abbildung 9b). Abschließend wurde wiederum eine Charakterisierung dieser 100 Gene hinsichtlich ihrer Expression in der frühen (0–48 h) und späten (72–336 h) Phase der Differenzierung von Th2 Zellen im Vergleich zu naiven Zellen durchgeführt. Die Anzahl und die Verteilung nach dem Expressionsverhalten der differenziell exprimierten Gene in Th2 Zellen ist in Abbildung 9c zusammengefasst dargestellt. Eine Textmining Recherche zur Bestimmung von potenziellen spezifischen Gen-Gen-Interaktionen wurde für die Th2-Zellen nicht vorgenommen.

Zusammenfassend enthält das STAT6-Netzwerk 100 Transkriptionsfaktoren, Zytokine und Zytokinrezeptoren, die durch STAT6 reguliert (48 Gene) und zusätzlich von STAT6 in Th2 Zellen gebunden (52 Gene) werden. Insgesamt werden 60 Gene hoch- und 40 Gene runterreguliert durch STAT6. Die Integration der Expressionszeitserien von Th2 Zellen zeigte, dass 98 von den 100 Genen auch in polarisierten Th2 Zellen im Vergleich zu naiven Zellen differenziell exprimiert werden. Die Expression von 52 Genen wird erhöht und die von 26 Genen erniedrigt im Vergleich zu naiven T-Zellen. 21 der differenziell exprimierten Gene zeigen in der frühen und späten Phase der Differenzierung eine Expression in unterschiedlicher Richtung.

### 2.2.3 Validierung des STAT4- und des STAT6-Netzwerkes

Die erste Auswertung des STAT6-Netzwerkes zeigte, dass das Netzwerk wichtige Gene für die Th2 Differenzierung wie den Master Transkriptionsfaktor *Gata3*, die Th2-spezifischen Oberflächenrezeptoren *Ccr3*, *Ccr4* und *Ccr8* sowie die Zytokine *Il4* und *Il6* enthält und diese durch STAT6 positiv reguliert werden (Bonecchi et al., 1998; D'Ambrosio et al., 1998; Yamane and Paul, 2013). Zusätzlich sind im Netzwerk die Mastertranskriptionsfaktoren anderer T-Helferzell-Subtypen repräsentiert und durch STAT6 negativ reguliert wie *Foxp3* für iTreg Zellen, *Tbx21* für Th1 Zellen und *Rorg* (auch *Rorc* genannt) für Th17 Zellen (Yamane and Paul, 2013). Ähnliches gilt für das STAT4-Netzwerk. Im STAT4-Netzwerk werden wichtige bereits beschriebene Th1-spezifische Gene wie der Mastertranskriptionsfaktor von Th1-Zellen *Tbx21*, das produzierte Zytokin *Il6* und die Oberflächenrezeptoren *Cxcr3*, *Il12rb2* und *Il18rap* positiv durch STAT4 reguliert (Yamane and Paul, 2013). Dies spricht für die Richtigkeit der erstellten Netzwerke. Eine spezifische Analyse hinsichtlich der Expressionspräferenz der Gene in T-Helferzellen sowie der funktionellen Bekanntheit der identifizierten Transkriptionsfaktoren zur Identifizierung von neuen richtungsweisenden Transkriptionsfaktoren für die T-Helferzell-Differenzierung wurde im Diskussionsteil vorgenommen.

In den Netzwerkanalysen kristallisierte sich der Transkriptionsfaktor IRF8 als möglicher Weichensteller für die Th1-Differenzierung heraus. Auffällig war, dass *Irf8* in Th1 Zellen durch STAT4 hoch- und in Th2 Zellen durch STAT6 runterreguliert wird. Sowohl STAT4 als auch STAT6 zeigten eine direkte Bindung an *Irf8* in den ChIP-Seq Daten. Des Weiteren zeigten die Netzwerkanalysen, dass *Irf8* in den Th1 Zellen in der frühen und späten Phase der Differenzierung im Vergleich zu naiven Zellen differenziell hochreguliert wird. Im Gegensatz dazu wird die Expression von *Irf8* in Th2 Zellen runterreguliert (2.1 Transkriptom-Analysen). Zusätzlich wurde in den Th1 Zellen eine potenzielle Gen-Gen-

Interaktion von *Irf8* mit dem Th1-spezifischen Zytokin *Ifng* in den Textminig Recherchen gefunden. Diese Beobachtungen sprechen für eine Rolle von IRF8 in der peripheren T-Zellaktivierung und Differenzierung von Th1 Zellen, welche im Folgenden genauer analysiert wurde.

## 2.3 Die Rolle von IRF8 in der peripheren T-Zellaktivierung und Differenzierung

IRF8 ist ein DNA-spezifischer Transkriptionsfaktor, der der Familie der IRFs angehört und als Aktivator oder Repressor in Abhängigkeit seines Interaktionspartners agieren kann (Wang and Morse, 2009). *Irf8* wird in B-Zellen, aktivierten T-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert (Nelson et al., 1996) und reguliert die Immunantwort auf verschiedene Weise. Zum Beispiel reguliert IRF8 durch Komplexion mit PU.1 in B-Zellen negativ die Differenzierung zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen (Carotta et al., 2014). Außerdem fördert er die Th1 Immunantwort über die Differenzierung von myeloiden und dendritischen Zellen: So ist IRF8 essentiell für die Bildung von IL12- und IFN $\gamma$ -produzierenden CD8 $\alpha^+$  dendritischen Zellen (Aliberti et al., 2003; Tsujimura et al., 2003) sowie für die Entstehung und Reifung von IL12-produzierenden (Wu et al., 1999; Tamura et al., 2000) und IL18-produzierenden (Kim et al., 1999) Makrophagen. Eine intrinsische Funktion von IRF8 in der Differenzierung von T-Zellen wurde bisher nur für die Th17 Zellen gezeigt (Ouyang et al., 2011). Im Folgenden sollte die Funktion von IRF8 in der peripheren T-Zellaktivierung und Differenzierung von Th1, Th2 und iTreg Zellen genauer untersucht werden.

### 2.3.1 Die Expression von *Irf8* ist vom TCR abhängig

Die Aktivierung einer naiven CD4 $^+$  T-Zelle in der Peripherie über den T-Zellrezeptor in Kombination mit einem spezifischen Zytokinmilieu ist der initiale Schritt für die Differenzierung von T-Helferzellen. Mithilfe der Transkriptom-Analysen konnte bereits ein Einfluss des T-Zellrezeptor-Stimulus auf die *Irf8* Expression dokumentiert werden (s. 2.1). Außerdem zeigten Nelson und seine Kollegen bereits 1996, dass *Irf8* nur in aktivierten T-Zellen exprimiert wird (Nelson et al., 1996). Für die funktionelle Charakterisierung von IRF8 sollte zunächst der Einfluss des T-Zellrezeptor-Stimulus auf die *Irf8* Expression mithilfe von Protein- und mRNA-Analysen genauer untersucht werden.

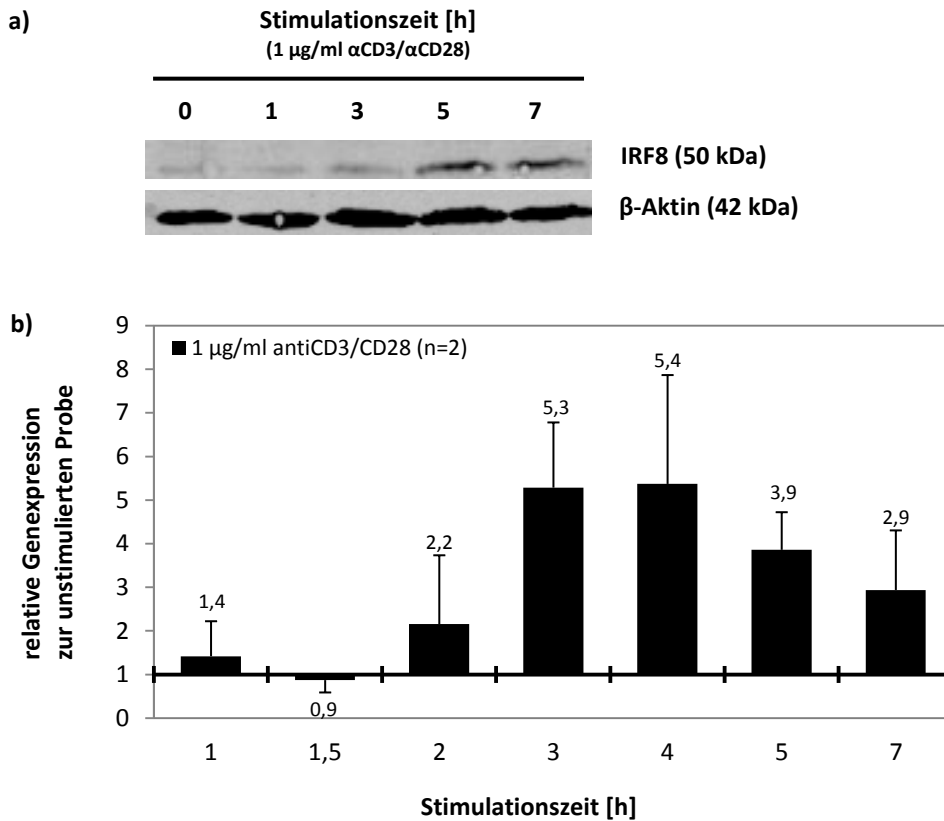
#### 2.3.1.1 Die Expression von *Irf8* ist von der TCR-Stimulationszeit abhängig

In den Transkriptom-Analysen wurde bereits gezeigt, dass die Expression von *Irf8* in Th1 und iTreg Zellen im Vergleich zu naiven T-Zellen zwei Tage nach der Stimulation signifikant hochreguliert ist (s. Abbildung 6). Im Folgenden sollte nun überprüft werden, wie sich die Expression von *Irf8* in der frühen Phase der T-Zellrezeptor-Stimulation verhält. Hierfür wurden naive CD4 $^+$ CD25 $^-$  T-Zellen mit  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 für null bis sieben Stunden stimuliert und im Anschluss die *Irf8* Expression mithilfe einer qRT-PCR und die Proteinmenge im Western Blot bestimmt (s. Abbildung 11).

Die mRNA-Expression von *Irf8* erreichte ihren Höhepunkt nach einer Stimulationszeit von 4 h und stieg um den Faktor 5,4 im Vergleich zur unstimulierten Probe (s. Abbildung 11b). Nach längerer Stimulationszeit nahm die Expression von *Irf8* wieder ab. Die Proteinmenge von IRF8 stieg 5 h nach Stimulation im Vergleich zu den naiven T-Zellen signifikant an und blieb bis 7 h nach der Stimulation

konstant (s. Abbildung 11a). Eine Abnahme der Proteinmenge von IRF8 wie im Fall der mRNA Expression von *Irf8* wurde nicht analysiert, da keine längere Stimulationskinetik durchgeführt wurde.

Die Untersuchungen zeigten, dass *Irf8* in CD4<sup>+</sup> T-Zellen schwach basal exprimiert ist und nach T-Zellrezeptor-Stimulation hochreguliert wird.



**Abbildung 11: Die Expression von *Irf8* in naiven T-Zellen ist von der Stimulationszeit abhängig.** Naive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen aus der Milz und den Lymphknoten von BALB/cAnNCrl wurden mit 1 µg/ml αCD3 und αCD28 für 0 bis 7 Stunden stimuliert. a) Western Blot Analysen der Zellysate. Als interne Kontrolle diente β-Aktin (n = 3). b) mRNA Expression von *Irf8*. Die RNA der Zellysate wurde mittels qRT-PCR analysiert. Die Expression wurde auf die interne Kontrolle *Rps18* normalisiert und ins Verhältnis zur unstimulierten naiven Probe mittels der ΔΔct-Methode gesetzt (n = 2).

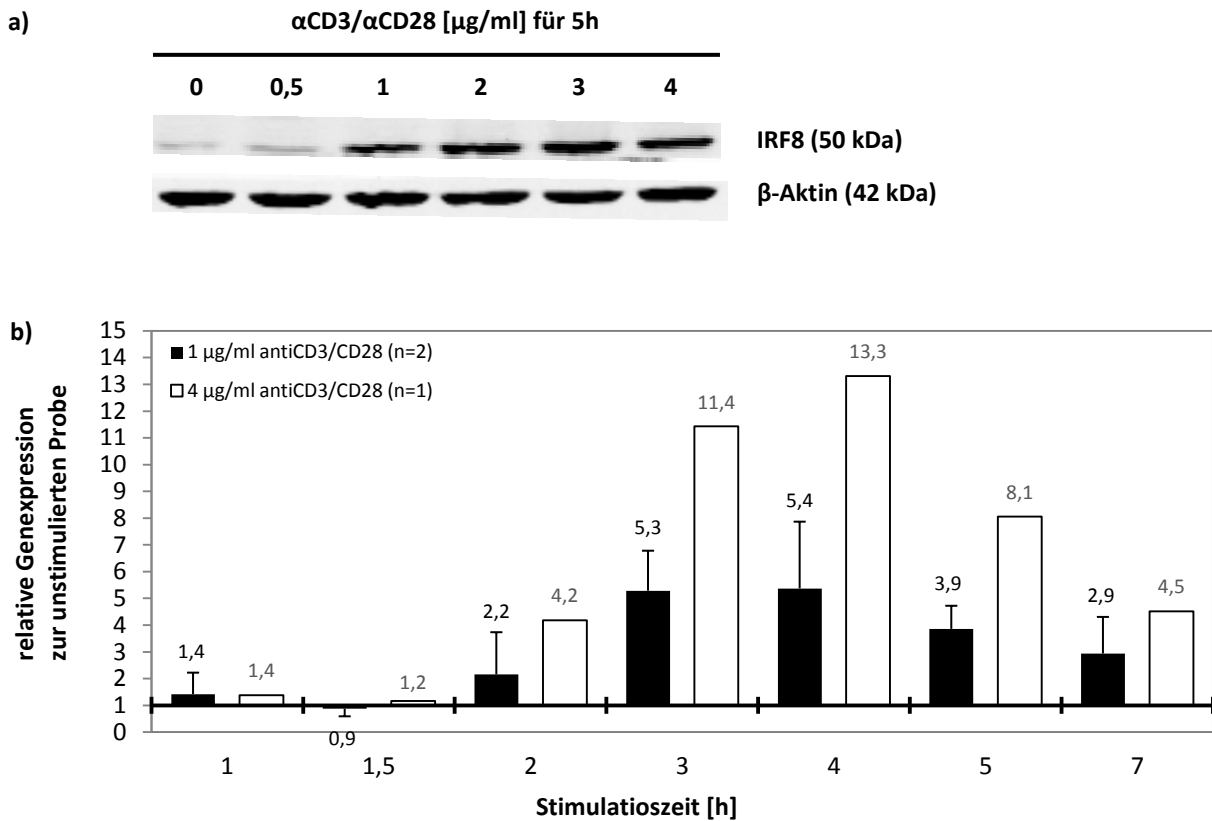
### 2.3.1.2 Die Expression von *Irf8* ist von der Stärke des TCR-Stimulus abhängig

Für die Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen ist neben der Stimulationszeit auch die Stärke des T-Zellrezeptor-Stimulus entscheidend. Zur Überprüfung der Abhängigkeit der *Irf8* Expression von der Stimulationsstärke wurden naive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen für 5 h mit verschiedenen Konzentrationen an CD3- und CD28-Antikörpern stimuliert und wiederum die Proteinmengen und mRNA-Expressionen analysiert (s. Abbildung 12).

Auf Proteinebene konnte eine Abhängigkeit der Menge von IRF8 von der Stimulationsstärke dokumentiert werden (s. Abbildung 12a). Ab einer Konzentration von 1 µg/ml αCD3/αCD28 erhöhte sich die Menge von IRF8 im Vergleich zur unstimulierten Probe signifikant. Eine Stimulationsstärke über 2 µg/ml führte zu keiner signifikanten Erhöhung der Proteinmenge von IRF8. Auf mRNA-Ebene konnte die Stimulationsabhängigkeit der *Irf8* Expression bestätigt werden. Bei einer Stimulation mit

4  $\mu\text{g/ml}$   $\alpha\text{CD3}/\alpha\text{CD28}$  exprimierten die Zellen im Durchschnitt ca. doppelt so viel *Irf8* wie bei einer Stimulation mit 1  $\mu\text{g/ml}$   $\alpha\text{CD3}/\alpha\text{CD28}$  (s. Abbildung 12b).

Es wurde gezeigt, dass die Expression von *Irf8* sowohl von der Stimulationszeit als auch von der Stimulationsstärke abhängig ist.



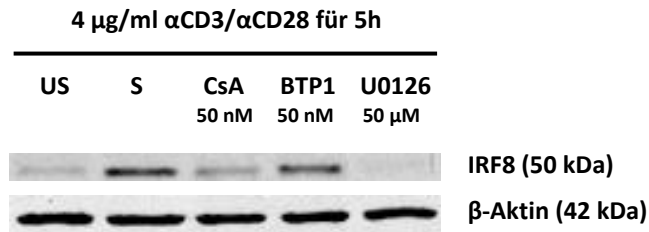
**Abbildung 12: Die Expression von *Irf8* steigt mit zunehmender Stärke des TCR-Stimulus.** Naive  $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$  T-Zellen aus der Milz und den Lymphknoten von BALB/cAnNCrI wurden mit den angegebenen Konzentrationen von  $\alpha\text{CD3}/\alpha\text{CD28}$  stimuliert. a) Western Blot Analysen der Zellysate 5 h nach Stimulation. Als interne Kontrolle diente  $\beta$ -Aktin ( $n = 2$ ). b) mRNA Expression von *Irf8*. Die Zellen wurden für 0 bis 7 h mit 1 oder 4  $\mu\text{g/ml}$   $\alpha\text{CD3}/\alpha\text{CD28}$  stimuliert. Die RNA der Zellysate wurde mittels qRT-PCR analysiert. Die Expression wurde auf die interne Kontrolle *Rps18* normalisiert und ins Verhältnis zur unstimulierten naiven Probe mittels der  $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode gesetzt ( $n = 2$ ).

### 2.3.1.3 Die Induktion der Expression von *Irf8* wird über den AP1-Signalweg vermittelt

Die Aktivierung einer Zelle über den T-Zellrezeptor-Stimulus führt über drei unabhängige Signalwege zur Aktivierung und damit verbundenen Kerntranslokation der Transkriptionsfaktoren NFAT, NF $\kappa$ B und AP1. Diese Transkriptionsfaktoren beeinflussen die Expression von *Irf8* sowie von anderen Zielgenen und damit die Differenzierung von T-Zellen zu Effektorzellen über die Expression der Subtypspezifischen Mastertranskriptionsfaktoren (Murphy, 2012). Im Folgenden sollte geklärt werden, über welchen T-Zellrezeptor-Signalweg die Induktion der Expression von *Irf8* verläuft. Hierfür wurden naive  $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$  T-Zellen mit den niedermolekularen Inhibitoren CsA, BTP1 oder U0126 inkubiert und im Anschluss für 5 h mit  $\alpha\text{CD3}/\alpha\text{CD28}$  stimuliert. Der Effekt dieser Inhibitoren im T-Zellrezeptor-Signalweg auf den Proteingehalt von IRF8 wurde im Western Blot analysiert.

CsA und BTP1 blockieren beide das Enzym Calcineurin und somit die Dephosphorylierung und Aktivierung von NFAT. Für CsA ist jedoch bekannt, dass es bereits bei geringen Konzentrationen (ab 1 nM)

nicht nur die NFAT-Aktivierung in T-Zellen inhibiert sondern auch die Aktivierung von NF $\kappa$ B und AP1 (Liu et al., 1991; McCaffrey et al., 1994; Frischbutter et al., 2011). Für BTP1 hingegen wurde gezeigt, dass es bei geringen Konzentration (bis 500 nM) spezifisch die NFAT-Aktivierung in T-Zellen inhibiert (Frischbutter et al., 2012). Der Inhibitor U0126 blockiert die Aktivierung der Transkription von *Fos* über die Inhibition der MEK-Kinasen (Duncia et al., 1998) und damit indirekt die Aktivierung von AP1.



**Abbildung 13: Die Proteinmenge von IRF8 wird durch CsA und U0126 signifikant verringert.** Naive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen aus der Milz und den Lymphknoten von BALB/cAnNCrl wurden mit den angegebenen Konzentrationen von CsA, BTP1 und U0126 für 20 min inkubiert und im Anschluss für 5 h mit 4  $\mu$ g/ml  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 stimuliert. Der Effekt dieser Inhibitoren auf die Proteinmenge von IRF8 wurde im Western Blot bestimmt (n = 3). US = unstimuliert; S = stimuliert.

BTP1 zeigte bei einer Konzentration von 50 nM keinen signifikanten Einfluss auf die Proteinmenge von IRF8. Die Inhibitoren CsA (50 nM) und U0126 (50  $\mu$ M) hingegen verringerten die Proteinmenge von IRF8 signifikant, wobei der Effekt von dem spezifischen Inhibitor des AP1-Signalwegs U0126 am stärksten war (s. Abbildung 13). Daraus ist zu schlussfolgern, dass die Induktion der Expression von *Irf8* über den AP1-Signalweg verläuft. Die Induktion der Expression von *Irf8* über den NF $\kappa$ B- und NFAT-Signalweg kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Die Prüfung, ob die Induktion der *Irf8* Expression von dem NF $\kappa$ B-Signalweg abhängig ist, gestaltete sich aufgrund des Fehlens eines spezifischen NF $\kappa$ B Inhibitors schwierig. Eine *in silico* Analyse des *Irf8* Promotors nach potenziellen Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren AP1, NF $\kappa$ B und NFAT sollte darüber Aufschluss geben. Der Promotorbereich wurde mit 2 kB vor dem Transkriptionsstart definiert. Für die *in silico* Analysen wurden zwei verschiedene Programme verwendet: rVista und MatInspector. Mit rVista wurden jeweils 3 potenzielle Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren AP1 und NF $\kappa$ B im *Irf8* Promotor vorhergesagt. MatInspector hingegen gab sogar 5 potenzielle Bindestellen für NF $\kappa$ B gegenüber 3 für AP1 an (s. Tabelle 2). Für NFAT hingegen wurde jeweils eine potenzielle Bindestelle hervorgesagt. Dies lässt vermuten, dass auch der NF $\kappa$ B- und NFAT-Signalweg eine Rolle in der Induktion der Expression von *Irf8* spielen.

**Tabelle 2: *In silico* Analyse des *Irf8* Promotors nach potenziellen Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren AP1, NF $\kappa$ B und NFAT.** Für die Analysen wurden rVista und MatInspector verwendet. Der Promotorbereich wurde auf 2 kB vor dem Transkriptionsstart von *Irf8* definiert.

		rVista	MatInspector
<b>potenzielle</b>	<b>AP1</b>	3x	3x
<b>Bindestellen im</b>	<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	3x	5x
<b>Promotor von <i>Irf8</i></b>	<b>NFAT</b>	1x	1x

### 2.3.2 Immunologische Charakterisierung von *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäusen

In vorherigen Versuchen wurde gezeigt, dass IRF8 in CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation hochreguliert wird. Des Weiteren wurde ein differenzieller Anstieg der Genexpression von *Irf8* in Th1 und iTreg Zel-



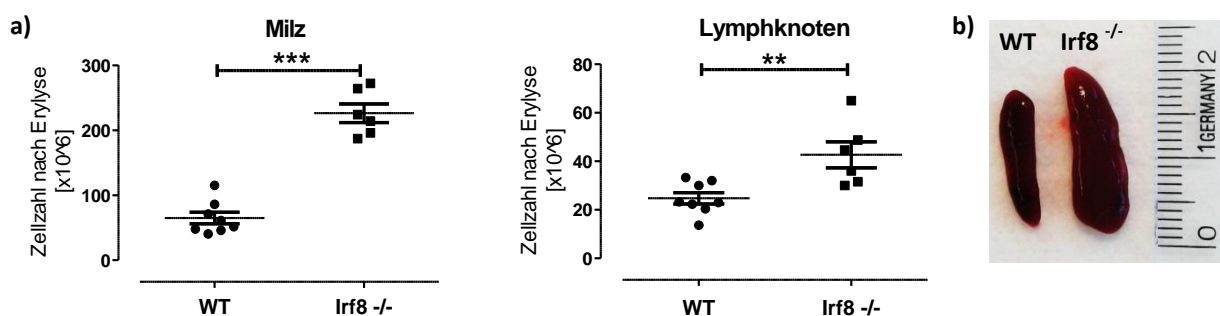
len gegenüber Th0 und Th2 Zellen dokumentiert. In den integrativen Netzwerkanalysen wurde außerdem ein positiver Zusammenhang zwischen STAT4 und *Irf8* dargestellt. Diese Befunde ließen vermuten, dass IRF8 eine Rolle in der Differenzierung von Th1 und iTreg Zellen spielen könnte. Für die Überprüfung dieser Hypothese wurden im Rahmen einer Kooperation mit Carol Stocking-Harbers vom Heinrich-Pette-Institut in Hamburg *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäuse verwendet.

Die *Irf8*<sup>-/-</sup> Maus wurde von Holtschke und seinen Kollegen durch Insertion eines Neomycin-Resistenzgens in das zweite Exon, welches den Hauptteil der DNA-Bindedomäne des Gens umfasst, generiert (Holtschke et al., 1996). Mit dieser Insertion wurde ein zusätzlicher Stopcodon ca. 120 bp nach dem Transkriptionsstart eingefügt, der das Protein-Leseraster unterbricht und zu einem verkürzten, funktionsunfähigen IRF8 Protein von ca. 4,5 kDa führt.

Die *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen zwei prominente Phänotypen. Neben einer verstärkten Anfälligkeit gegenüber viralen und bakteriellen Infektionen (Giese et al., 1997; Scharon-Kersten et al., 1997) und einer damit verbundenen Beeinträchtigung der IFN $\gamma$ -Produktion weisen *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäuse zusätzlich eine Deregulation in der Hämatopoese auf (Holtschke et al., 1996). Diese Deregulation wird durch eine verstärkte Proliferation von myeloiden, monozytischen und lymphoiden Vorläuferzellen und der Entwicklung eines chronischen myeloiden Leukämie-ähnlichen Syndroms charakterisiert.

### 2.3.2.1 Die Zellanzahl und Größe von Milz und Lymphknoten der *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäuse sind erhöht

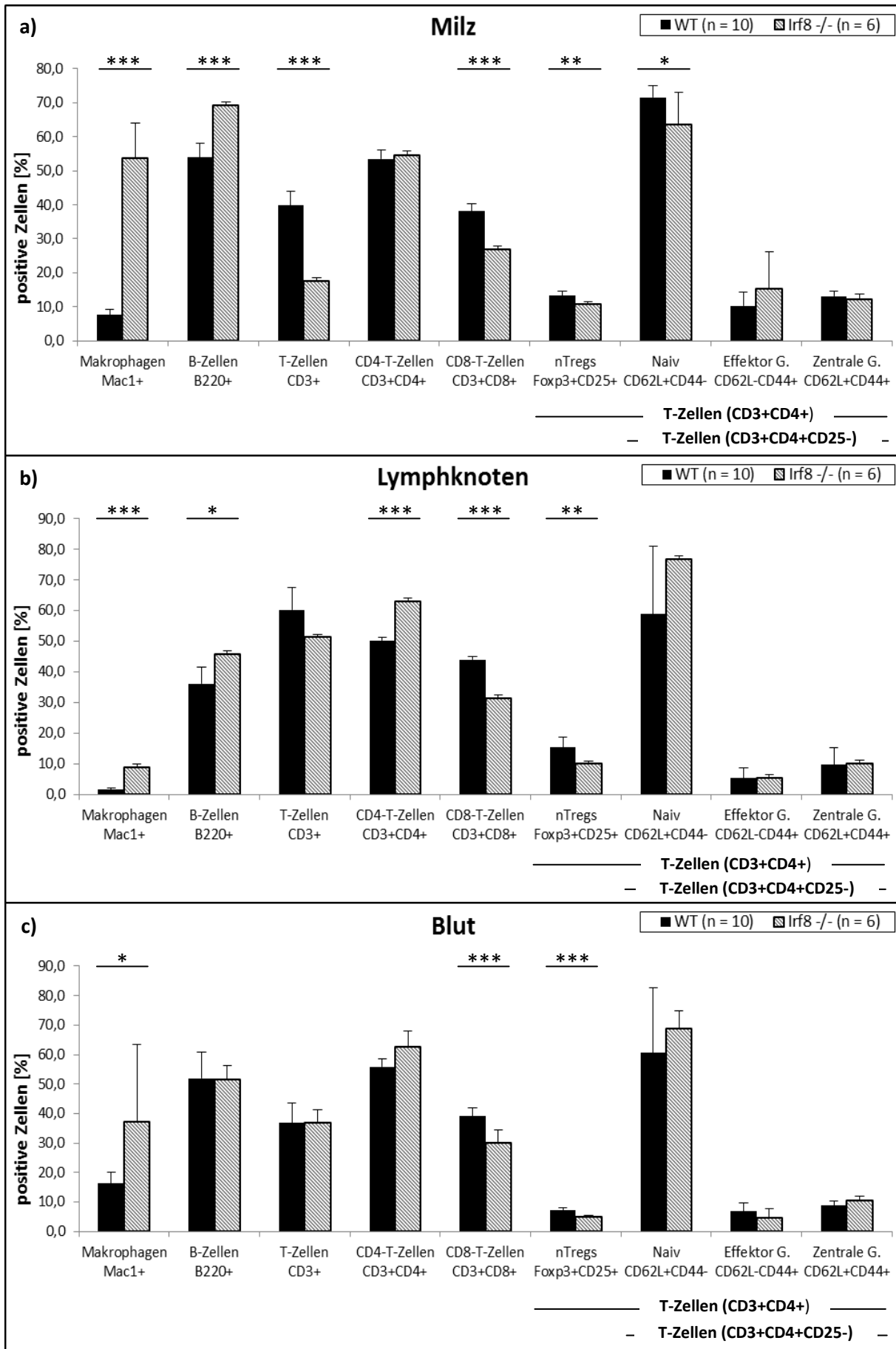
Einhergehend mit der verstärkten Proliferation von Immunzellen weisen *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäuse eine Splenomegalie und eine Lymphadenopathie auf (Holtschke et al., 1996). Dementsprechend wurde eine deutliche Erhöhung der Größe und der totalen Zellanzahl der Milzen und Lymphknoten von *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäusen gegenüber denen der WT Mäuse (C57Bl6/J) dokumentiert (s. Abbildung 14). Die Milzen von 10 bis 12 Wochen alten *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäusen waren ca. 3–4mal und die Lymphknoten ca. 2–3mal so groß. Die Zellzahlen der Milzen von *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäusen waren um den Faktor 3 und die der Lymphknoten um den Faktor 2 signifikant erhöht. Dieser Effekt stieg mit zunehmendem Alter der Mäuse an.



**Abbildung 14: Die Zellularität und Größe der Milz und der Lymphknoten von *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäusen sind erhöht.** Es wurden 10 bis 12 Wochen alte *Irf8*<sup>-/-</sup> (n = 6) und WT (n = 10) Mäuse untersucht. a) Gesamtzellzahl der Milz und der Lymphknoten nach Erylyse. Es wurde ein t-Test durchgeführt mit P < 0,05 (\*), P < 0,01 (\*\*) und P < 0,001 (\*\*\*). b) Milz-Morphologie von 10 Wochen alten WT und *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäusen.

### 2.3.2.2 IRF8-defiziente Mäuse zeigen eine veränderte Zusammensetzung von unterschiedlichen Immunzellen

Holtschke und seine Kollegen haben bereits 1996 beschrieben, dass die Hämatopoese in *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäusen dereguliert ist und die Mäuse ein verändertes Verhältnis von Immunzellen in der Milz, in den Lymphknoten und im Blut aufweisen: die Frequenzen von Granulozyten und Makrophagen sind deutlich er-



**Abbildung 15: Immunzell-Charakterisierung von *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäusen.** Es wurde eine durchflusszytometrische Analyse von Einzelzellsuspensionen aus der Milz (a), den Lymphknoten (b) und dem Blut (c) von *Irf8*<sup>-/-</sup> (n = 6) und WT (n = 10) Mäusen nach Färbung mit spezifischen fluoreszenzgekoppelten Antikörpern durchgeführt. Als statistischer Test diente der t-Test mit P < 0,05 (\*), P < 0,01 (\*\*) und P < 0,001 (\*\*\*). G = Gedächtnis-T-Zellen.

höht und die von B-Zellen und T-Zellen (CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>) verringert (Holtschke et al., 1996). Im Rahmen dieser Arbeit sollte zusätzlich eine Aussage über die Frequenzen von verschiedenen CD4<sup>+</sup> Zellsubtypen getroffen werden. Hierfür wurden Einzelzellsuspensionen aus der Milz, den Lymphknoten und dem Blut von *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäusen und WT Mäusen mithilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Zur Charakterisierung von naiven (CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>), effektorischen (CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>) und zentralen (CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>) Gedächtnis T-Zellen wurden auf den Zellen die Oberflächenmarker CD3, CD4, CD44, CD62L und CD25 angefärbt. Zur Bestimmung der Frequenz von nTregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>) wurde zusätzlich eine intrazelluläre Färbung des Mastertranskriptionsfaktors FOXP3 vorgenommen. Des Weiteren wurde der Anteil von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, B-Zellen (B220<sup>+</sup>) und Makrophagen (MAC1<sup>+</sup>) nochmals analysiert (s. Abbildung 15).

Wie in den Arbeiten von Holtschke und seinen Kollegen wurde ebenfalls ein stark signifikanter Anstieg in der Frequenz von Makrophagen (MAC1<sup>+</sup>) in allen drei Organen der *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäuse gegenüber den WT Mäusen dokumentiert. Außerdem zeigten die *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäuse ein vermindertes T/B-Zellverhältnis in der Milz und in den Lymphknoten. Die Frequenz der CD3<sup>+</sup> T-Zellen war in der Milz und in den Lymphknoten erniedrigt und die der B220<sup>+</sup> B-Zellen erhöht. Damit war das Verhältnis von T- zu B-Zellen in der Milz um den Faktor 3 und in den Lymphknoten um den Faktor 1,5 verringert. Des Weiteren war die Frequenz der CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen in den Lymphknoten der *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäuse signifikant erhöht und die der zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in allen drei Organen signifikant erniedrigt. Das Verhältnis von CD4<sup>+</sup> zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen war somit um den Faktor 1,5 erhöht.

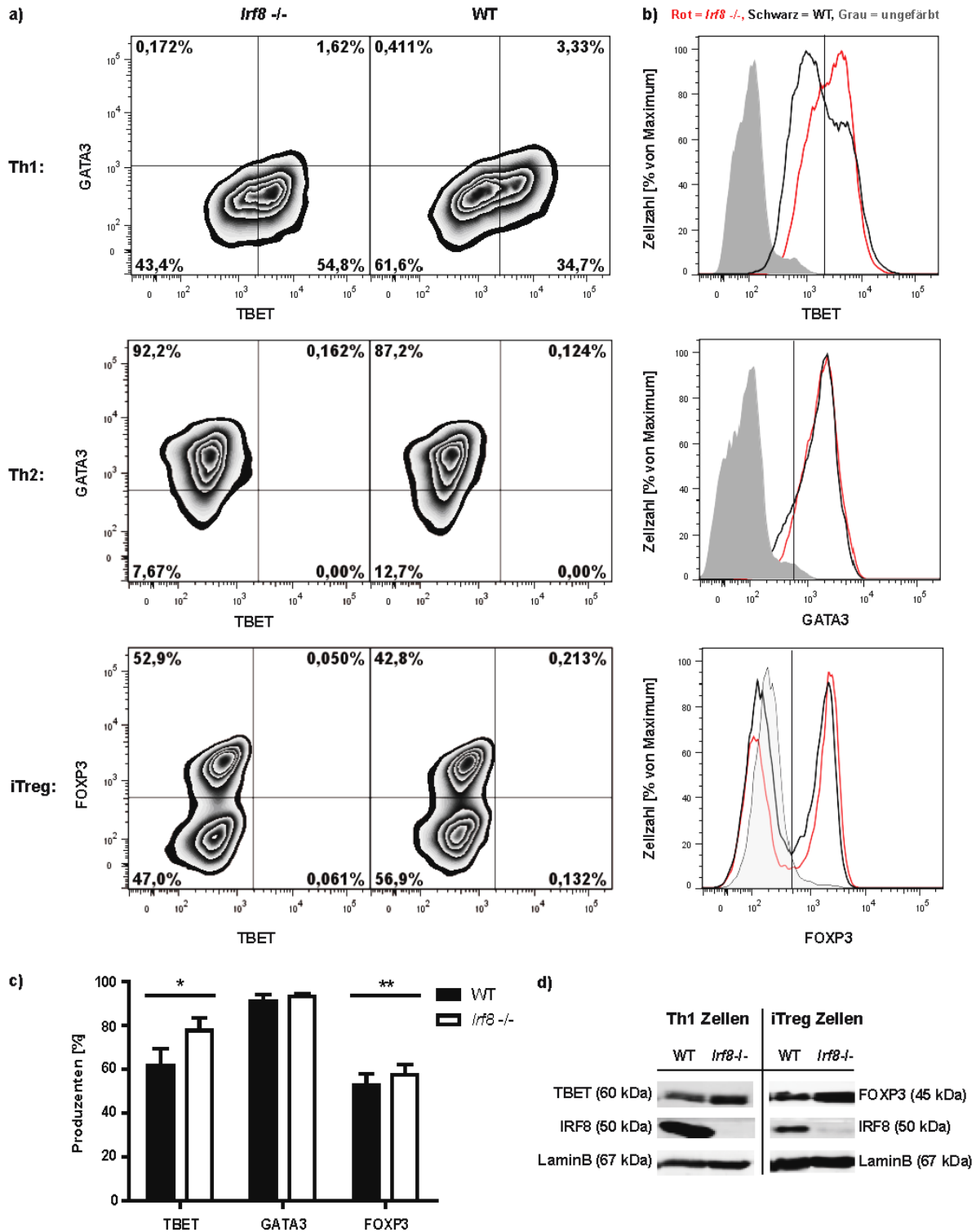
Die Frequenz der nTregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>) war in allen drei Organen der *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäuse signifikant erniedrigt. Am stärksten war dieser Effekt jedoch in den Lymphknoten ersichtlich. Dem gegenüberstehend war die Frequenz der naiven Zellen (CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>) in den Lymphknoten leicht erhöht, in der Milz jedoch leicht verringert. Somit war das Verhältnis von naiven Zellen zu den nTregs um den Faktor 1,4 erhöht. Die Frequenzen der zentralen (CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>) und effektorischen (CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>) Gedächtnis-T-Zellen waren nicht signifikant verändert, jedoch konnte eine tendenzielle Erhöhung der Frequenz der effektorischen Gedächtnis-T-Zellen in den Milzen der *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäuse dokumentiert werden.

Aufgrund der Splenomegalie und der Lymphadenopathie waren die Gesamtzellzahlen aller untersuchten Zell-Typen in den *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäusen gegenüber denen der WT Mäuse signifikant erhöht (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend wurde in den immunologischen Untersuchungen der *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäuse eine tendenzielle Erhöhung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber den CD8<sup>+</sup> T-Zellen dokumentiert. Des Weiteren wurden innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellsubtypen eine Verringerung der natürlichen regulatorischen T-Zellen und eine tendenzielle Erhöhung der naiven T-Zellen gezeigt. Im Folgenden wurde nun untersucht, ob ein IRF8-Defizit neben diesen immunologischen Veränderungen auch einen intrinsischen Effekt auf die Differenzierung von T-Helferzellen aufweist.

### 2.3.2.3 Ein IRF8-Defizit begünstigt *in vitro* die Entstehung von TBET<sup>+</sup> und FOXP3<sup>+</sup> Zellen

Ouyang und seine Kollegen entdeckten bereits 2011 eine intrinsische Funktion von IRF8 auf die Differenzierung von Th17 Zellen (Ouyang et al., 2011). *In vitro* und *in vivo* zeigten sie für IRF8 eine suppressive Rolle in der Regulation der Th17 Zellantwort. Allerdings dokumentierten sie in *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäusen keine Veränderung in der Differenzierung von Th1, Th2 und iTreg Zellen gemessen an den Subtypspezifischen Zytokinen IFN $\gamma$  und IL4 sowie den Mastertranskriptionsfaktor FOXP3 für iTreg Zellen.



**Abbildung 16: Ein IRF8-Defizit begünstigt *in vitro* die Entstehung von TBET<sup>+</sup> und FOXP3<sup>+</sup> Zellen.** Naive T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>) aus den Lymphknoten und der Milz von *Irf8*<sup>-/-</sup> und WT Mäusen wurden für 5 d unter suboptimalen Th1, Th2 und iTreg polarisierenden Bedingungen *in vitro* kultiviert und im Anschluss die TBET-, GATA3- und FOXP3-Produzenten durchflusszytometrisch bestimmt. Die Zellen wurden auf CD4<sup>+</sup> und lebend gated. a) Density-Plot der TBET-, GATA3- und FOXP3-Frequenzen in Th1, Th2 und iTreg Zellen eines stellvertretenden Experiments. b) Histogramm der Fluoreszenz-Intensitäten der TBET-, GATA3- und FOXP3-Expressionen in Th1, Th2 und iTreg Zellen eines stellvertretenden Experiments (Rot = *Irf8*<sup>-/-</sup>, Schwarz = WT und Grau = ungefärbt). c) Mittelwert der TBET- (n=3), GATA3- (n=3) und FOXP3-Produzenten (n=6) aus unabhängigen Experimenten in Th1, Th2 und iTreg Zellen. Als statistischer Test diente der t-Test mit P < 0,05 (\*), P < 0,01 (\*\*) und P < 0,001 (\*\*\*). d) Western Blot Analyse der 5 d kultivierten Th1 und iTreg Zellen. Es wurden 500.000 Zellen pro Probe analysiert.

Die vorliegenden integrativen Netzwerkanalysen und globalen Transkriptom-Analysen von T-Helferzellen sprechen jedoch für eine Funktion von IRF8 in der Differenzierung von Th1 und iTreg Zellen. Deshalb wurde im Folgenden der Effekt eines IRF8-Defizits auf die Proteinexpression der Mastertranskriptionsfaktoren TBET, GATA3 und FOXP3 in fünf Tagen *in vitro* kultivierten Th1, Th2 und iTreg Zellen untersucht. Hierfür wurden naive T-Zellen ( $CD4^+CD25^-CD62L^+CD44^-$ ) aus der Milz und den Lymphknoten von *Irf8*<sup>-/-</sup> und WT Mäusen isoliert und für fünf Tage *in vitro* unter den jeweiligen Subtyp-spezifischen polarisierenden Bedingungen kultiviert. Um einen möglichen Effekt des IRF8-Defizits bei der Differenzierung der IRF8-defizienten Zellen dokumentieren zu können, wurden suboptimale Kulturbedingungen gewählt; d. h. ein geringer T-Zellrezeptor-Stimulus und zusätzlich im Fall der iTreg-Polarisation eine geringe TGFβ-Konzentration. Am fünften Tag der Differenzierung wurden die Frequenzen der TBET-, GATA3- und FOXP3-Produzenten nach intrazellulärer Färbung am Durchflusszytometer bestimmt.

Die naiven T-Zellen von *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten eine begünstigte TBET-Induktion unter Th1 sowie FOXP3-Induktion unter iTreg polarisierenden Bedingungen im Vergleich zu den WT Mäusen. Auf die GATA3-Produzenten konnte hingegen kein Effekt unter Th2-polarisierenden Bedingungen in den *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäusen dokumentiert werden. Unter Th1-polarisierenden Bedingungen stieg die Anzahl der TBET-Produzenten von 35 % in den WT-Zellen auf 55 % in den IRF8-defizienten Zellen und unter iTreg-polarisierenden Bedingungen stieg die Anzahl der FOXP3-Produzenten von 43 % in den WT-Zellen auf 53 % in den IRF8-defizienten Zellen (s. Abbildung 16a). Dieser Effekt wurde für Th1 Zellen in drei und für iTreg Zellen in sechs unabhängigen Versuchen validiert. Mit einer Wahrscheinlichkeit von  $p = 0,0361$  war die Anzahl an TBET-Produzenten in den IRF8-defizienten Zellen im Vergleich zu den WT-Zellen signifikant höher. Der Anstieg der FOXP3-Produzenten in den IRF8-defizienten Mäusen erwies sich ebenfalls als signifikant mit einer Wahrscheinlichkeit von  $p = 0,0052$  (s. Abbildung 16c). Neben dem Anstieg der Produzenten bewies eine Western Blot Analyse außerdem die Erhöhung der absoluten Proteinmenge von TBET in Th1 Zellen und FOXP3 in iTreg Zellen (s. Abbildung 16d). Die Histogramme der Fluoreszenzintensitäten der TBET- und FOXP3-Proteinexpressionen zeigten jedoch, dass die Menge an TBET bzw. FOXP3 pro Zelle unverändert war (s. Abbildung 16b).

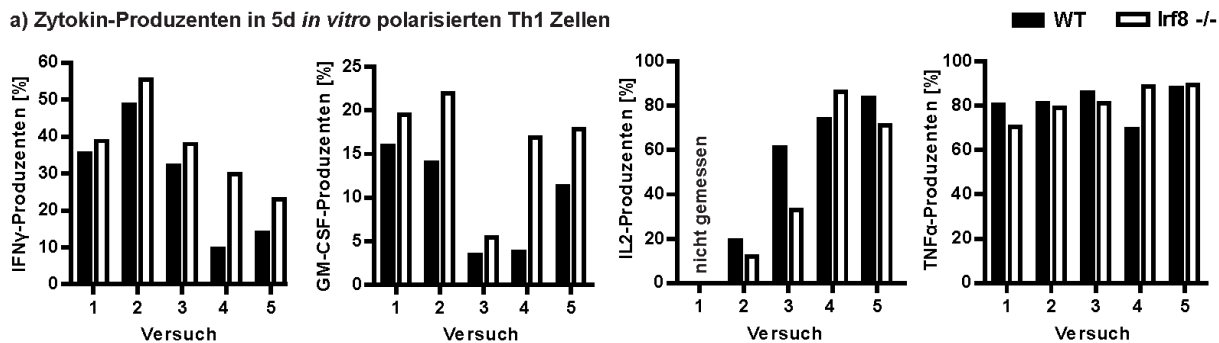
#### **2.3.2.4 Ein IRF8-Defizit begünstigt *in vitro* die Entstehung der Zytokine GM-CSF und IFNγ unter Th1 polarisierenden Bedingungen**

Die naiven T-Zellen von *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten eine verstärkte Differenzierung zu Th1 und iTreg Zellen im Vergleich zu den WT Mäusen. Zusätzlich zu den Transkriptionsfaktoren sollte nun geklärt werden, ob das Fehlen von IRF8 auch einen Effekt auf die Zytokinproduktion von TNFα, IL2, GM-CSF und IFNγ hat. Hierfür wurden wiederum fünf Tage *in vitro* kultivierte Th1 und iTreg Zellen nach Re-Stimulation intrazellulär gefärbt und die Frequenzen der Produzenten am Durchflusszytometer bestimmt. Insgesamt wurden fünf unabhängige Experimente durchgeführt.

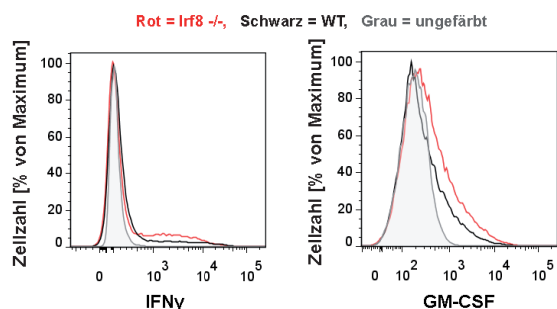
In den Th1 Zellen begünstigte ein IRF8-Defizit die Entstehung von IFNγ- und GM-CSF-Produzenten. Die Anzahl an den Produzenten variierte in den jeweiligen unabhängigen Versuchen stark, jedoch wiesen die IRF8-defizienten Zellen immer eine erhöhte Frequenz an IFNγ- und an GM-CSF-Produzenten gegenüber den WT-Zellen auf (s. Abbildung 17a). Im Durchschnitt stieg die Anzahl der GM-CSF-Produzenten von 9 % in den WT-Zellen auf 16 % in den IRF8-defizienten Th1 Zellen und die der IFNγ-Produzenten von 28 % auf 37 %. Der Anstieg der GM-CSF-Produzenten in den Th1 Zellen von *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäusen erwies sich mit einer Wahrscheinlichkeit von  $p = 0,0262$  und der der IFNγ-Produzenten mit  $p = 0,0180$  als signifikant (s. Abbildung 17d). Die Histogramme der Fluoreszenzinten-

sitäten der GM-CSF- und  $\text{IFN}\gamma$ -Expressionen zeigten, dass dabei die Menge an GM-CSF bzw.  $\text{IFN}\gamma$  pro Zelle unverändert war (s. Abbildung 17b). Neben den Zytokinen  $\text{IFN}\gamma$  und GM-CSF wurden auch die Frequenzen der IL2- und  $\text{TNF}\alpha$ -Produzenten bestimmt, die sowohl in Th1 (s. Abbildung 17a) als auch in iTreg Zellen (s. Abbildung 17c) vorhanden waren. Jedoch konnte kein eindeutiger Effekt in den  $\text{Irf8}^{-/-}$  Mäusen auf die Produktion von IL2 und  $\text{TNF}\alpha$  in den Th1 und iTreg Zellen dokumentiert werden, da zum Teil entgegengesetzte Ergebnisse erzielt wurden. So führte z. B. ein IRF8-Defizit in den Th1 Zellen in 3 von 4 unabhängigen Versuchen zu einer Verminderung der IL2-Produzenten.

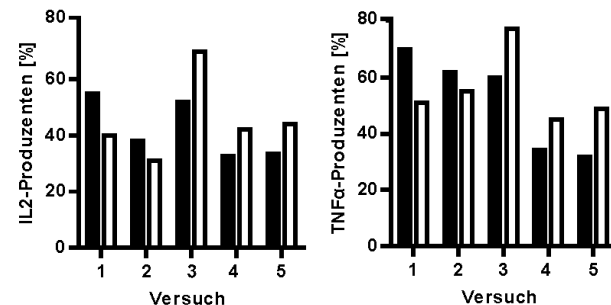
#### a) Zytokin-Produzenten in 5d *in vitro* polarisierten Th1 Zellen



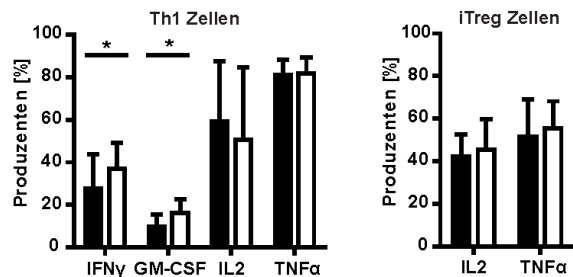
#### b) Histogramm der Fluoreszenz-Intensitäten in Th1 Zellen



#### c) Zytokin-Produzenten in 5d *in vitro* polarisierten iTreg Zellen



#### d) Mittelwerte der Zytokin-Produzenten

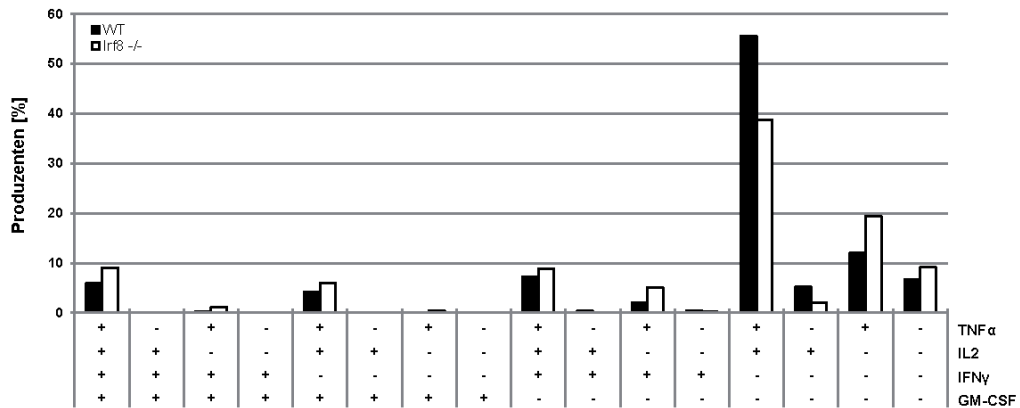


**Abbildung 17: Ein IRF8-Defizit begünstigt *in vitro* die Entstehung von GM-CSF- und  $\text{IFN}\gamma$ -Produzenten in polarisierten Th1 Zellen.** Naive T-Zellen ( $\text{CD4}^+\text{CD25}^-\text{CD62L}^+\text{CD44}^-$ ) aus den Lymphknoten und der Milz von  $\text{Irf8}^{-/-}$  und WT Mäusen wurden für 5 d unter Th1 und iTreg polarisierenden Bedingungen *in vitro* kultiviert und im Anschluss die GM-CSF-,  $\text{IFN}\gamma$ -, IL2- und  $\text{TNF}\alpha$ -Produzenten nach einer 5-stündigen Re-Stimulation mit PMA/Ionomycin/Brefeldin A durchflusszytometrisch bestimmt. Die Zellen wurden auf  $\text{CD4}^+$  und lebend gated. a) Frequenzen der Zytokin-Produzenten in Th1 Zellen von jeweils 5 unabhängigen Experimenten. b) Histogramm der Fluoreszenz-Intensitäten der GM-CSF- und  $\text{IFN}\gamma$ -Expressionen in Th1 Zellen. Eines stellvertretenden Experiments (Rot =  $\text{Irf8}^{-/-}$ , Schwarz = WT und Grau = ungefärbt). c) Frequenzen der Zytokin-Produzenten IL2 und  $\text{TNF}\alpha$  in iTreg Zellen. D) Mittelwert der Frequenzen ( $n=5$ ) der  $\text{IFN}\gamma$ -, GM-CSF-, IL2- und  $\text{TNF}\alpha$ -Produzenten aus unabhängigen Experimenten in Th1 und iTreg Zellen. Als statistischer Test diente der t-Test mit  $P < 0,05$  (\*),  $P < 0,01$  (\*\*) und  $P < 0,001$  (\*\*\*)

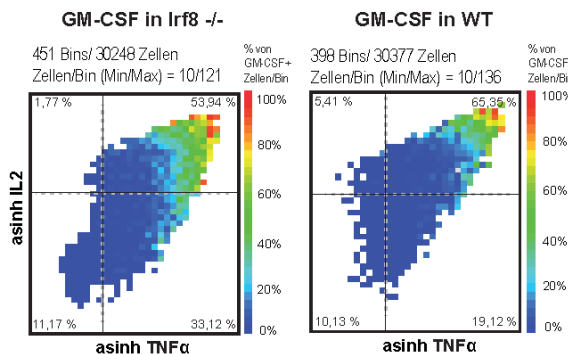
Zur Untersuchung möglicher Korrelationen zwischen den Zytokin-Produzenten IL2,  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IFN}\gamma$  und GM-CSF wurde im nächsten Schritt eine Boolean-Analyse der *in vitro* differenzierten Th1 Zellen eines

stellvertretenen Experiments durchgeführt (s. Abbildung 18a). Hierfür wurden die Frequenzen aller Einzel-, Doppel-, Dreifach- und Vierfach-Zytokinproduzenten in den IRF8-defizienten Zellen und in den WT-Zellen mithilfe der FlowJo Software bestimmt. Die Analyse zeigte eine deutliche Abnahme der TNF $\alpha$ <sup>+</sup>IL2<sup>+</sup> Doppelproduzenten in den IRF8-defizienten Th1 Zellen (38 %) im Vergleich zu den WT-Zellen (55 %). Dies ging einher mit einer Zunahme der Vierfach- und Dreifach-Zytokinproduzenten in den IRF8-defizienten Zellen, die wie bereits gezeigt, signifikant mehr IFN $\gamma$  und GM-CSF produzierten (s. Abbildung 17d). Jedoch zeigten die IRF8-defizienten Th1 Zellen auch eine Zunahme der TNF $\alpha$ -Einzelproduzenten und der Nicht-Zytokinproduzenten.

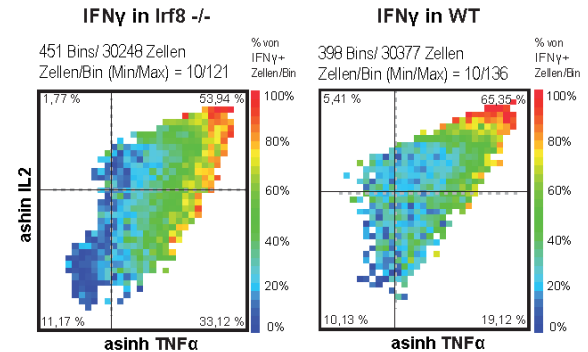
a) Boolean-Analyse der unterschiedlichen Subpopulationen der Zytokin-Produzenten TNF $\alpha$ , IL2, IFN $\gamma$  und GM-CSF in *in vitro* polarisierten Th1 Zellen



b) 3D Plot: Frequenz der GM-CSF-Produzenten in Abhängigkeit von TNF $\alpha$  und IL2 in *in vitro* polarisierten Th1 Zellen



c) 3D Plot: Frequenz der IFN $\gamma$ -Produzenten in Abhängigkeit von TNF $\alpha$  und IL2 in *in vitro* polarisierten Th1 Zellen



**Abbildung 18: Die Anzahl der GM-CSF-Produzenten in polarisierten Th1 Zellen korreliert positiv mit den IFN $\gamma$ -, IL2- und TNF $\alpha$ -Produzenten.** Naive T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>) aus den Lymphknoten und der Milz von *Irf8*<sup>-/-</sup> und WT Mäusen wurden für 5 d unter Th1 polarisierenden Bedingungen *in vitro* kultiviert und im Anschluss die GM-CSF-, IFN $\gamma$ -, IL2- und TNF $\alpha$ -Produzenten nach einer 5-stündigen Re-Stimulation mit PMA/Ionomycin/Brefeldin A durchflusszytometrisch bestimmt. Die Zellen wurden auf CD4<sup>+</sup> und lebend gated. a) Boolean-Analyse der TNF $\alpha$ , IL2, IFN $\gamma$  und GM-CSF Subpopulationen eines stellvertretenden Experiments. b) Abhängigkeit der GM-CSF-Frequenzen von den TNF $\alpha$ - und IL2-Produzenten im 3D-Plot. Die Konstruktion der 3D-Plots erfolgte von Yen Hoang mit der R Software. Die FACS Daten aus (a) wurden asinh transformiert und die TNF $\alpha$ - (x-Achse) und IL2- (y-Achse) produzierenden Zellen in Bins eingeteilt. Im 3D-Plot repräsentiert ein Bin die mittlere Frequenz an GM-CSF<sup>+</sup> Zellen innerhalb dieses Bins und ist entsprechend gefärbt. c) Abhängigkeit der IFN $\gamma$ -Frequenzen von den TNF $\alpha$ - und IL2-Produzenten. Die 3D-Plots wurden in analoger Weise, wie in (b) dargestellt, erstellt.

Des Weiteren zeigte die Boolean-Analyse, dass die Frequenz der GM-CSF-Produzenten positiv mit den TNF $\alpha$ - und IL2-produzierenden Zellen korrelieren muss, da die Hauptpopulationen der GM-CSF-Produzenten TNF $\alpha$ <sup>+</sup> und IL2<sup>+</sup> waren. Eine Korrelation von GM-CSF zu IFN $\gamma$  konnte aus der Boolean-Analyse nicht abgelesen werden. Es existierten sowohl GM-CSF<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> als auch GM-CSF<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>-</sup> Sub-

populationen. Die Tatsache, dass die Anzahl der TNF $\alpha$ - und IL2-Produzenten in den IRF8-defizienten Zellen und in den WT-Zellen unverändert war, lässt jedoch vermuten, dass die Zunahme der GM-CSF-Produzenten im direkten Zusammenhang mit der Zunahme der IFN $\gamma$ -Produzenten stehen könnte. Um dies zu klären, wurde eine 3D-Plot Analyse vorgenommen.

Hierfür wurden die TNF $\alpha$ - und IL2-produzierenden Zellen, die in den IRF8-defizienten Zellen und in den WT-Zellen unverändert waren, in Bins eingeteilt und in Abhängigkeit zu den Frequenzen von GM-CSF (s. Abbildung 18b) oder IFN $\gamma$  (s. Abbildung 18c) dargestellt. Ein Bin repräsentierte dann schließlich in der dritten Dimension die mittlere Frequenz an GM-CSF<sup>+</sup> oder IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen innerhalb dieses Bins. Der 3D Plot validierte, dass die Anzahl der GM-CSF-Produzenten von der Frequenz der IL2- und TNF $\alpha$ -Produzenten sowohl in den IRF8-defizienten Zellen als auch in den WT-Zellen positiv abhängig war. Des Weiteren zeigte er eine positive Korrelation der GM-CSF-Produzenten mit den IFN $\gamma$ -Produzenten in den IRF8-defizienten Zellen und in den WT-Zellen. So wiesen die IL2<sup>+</sup>TNF $\alpha$ <sup>+</sup> Doppelproduzenten die höchsten Frequenz-Werte sowohl für GM-CSF als auch für IFN $\gamma$  auf. Zusätzlich zeigten die IRF8-defizienten Zellen im Vergleich zu den WT-Zellen eine erhöhte IL2<sup>+</sup>TNF $\alpha$ <sup>+</sup> Subpopulation, die verstärkt IFN $\gamma$  produzierte (s. Abbildung 18c).

Zusammenfassend zeigten die Transkriptionsfaktor- und Zytokin-Analysen, dass ein IRF8-Defizit in *in vitro* polarisierten Th1 Zellen die Entstehung von TBET<sup>+</sup>, IFN $\gamma$ <sup>+</sup> und GM-CSF<sup>+</sup> Zellen unter Th1 polarisierenden Bedingungen begünstigt. 3D-Plot Analysen zeigten, dass der Anstieg der GM-CSF-Produzenten in den *in vitro* polarisierten Th1 Zellen der IRF8-defizienten Zellen vermutlich hauptsächlich durch die Zunahme der IFN $\gamma$ -Produzenten bedingt ist. Somit könnte IRF8 möglicherweise eine intrinsische Funktion bei der Suppression der Th1 Differenzierung aufweisen.

### 2.3.2.5 Gedächtnis-T-Zellen von *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäusen zeigen eine veränderte Zytokinproduktion und eine verminderte Anzahl an TBET<sup>+</sup> Zellen

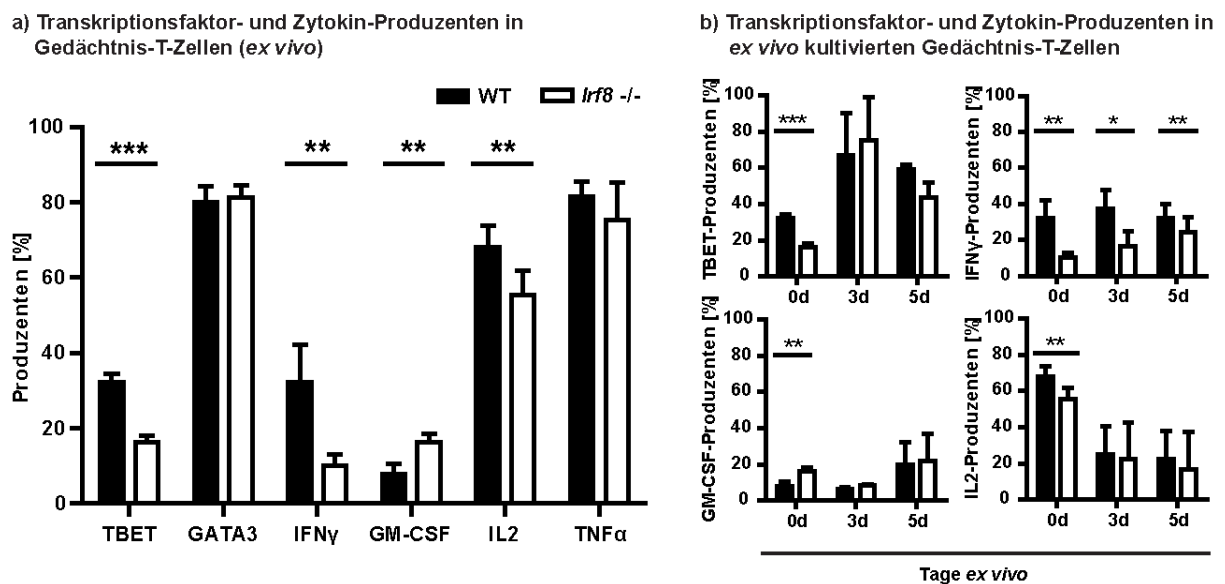
Im Folgenden sollte nun der *in vivo* Effekt eines IRF8-Defizits auf die Gedächtnis-T-Zellen analysiert werden. Hierfür wurden zentrale (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>) und effektorische (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>) Gedächtnis-T-Zellen aus der Milz und den Lymphknoten von *Irf8*<sup>-/-</sup> und WT Mäusen isoliert und *ex vivo* die Frequenzen der Transkriptionsfaktoren TBET und GATA3 sowie der Zytokine IFN $\gamma$ , GM-CSF, IL2 und TNF $\alpha$  nach intrazellulärer Färbung am Durchflusszytometer bestimmt.

Die Gedächtnis-T-Zellen von *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäusen wiesen eine verringerte Anzahl an TBET<sup>+</sup> Zellen sowie eine veränderte Zytokinproduktion auf (s. Abbildung 19a). In drei unabhängigen Analysen wurde eine signifikante ( $p < 0,001$ ) Verringerung der Frequenz an TBET-Produzenten von 32 % in den WT-Zellen auf 16 % in den IRF8-defizienten Zellen dokumentiert. Dagegen blieb die Anzahl an GATA3<sup>+</sup> Zellen unverändert. Des Weiteren war die Zytokinproduktion von IFN $\gamma$ , GM-CSF und IL2 in den Gedächtnis-T-Zellen von *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäusen gegenüber der in den WT Mäusen in fünf unabhängigen Analysen signifikant verändert. Die Frequenz der IFN $\gamma$ -Produzenten verringerte sich signifikant ( $p = 0,0035$ ) von 32 % in den WT-Zellen auf 10 % in den IRF8-defizienten Zellen und die der IL2-Produzenten von 68 % in den WT-Zellen auf 55 % in den IRF8-defizienten Zellen ( $p = 0,0027$ ). Dem gegenüber war die Frequenz an GM-CSF-Produzenten in den *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäusen mit im Durchschnitt 16 % signifikant erhöht ( $p = 0,0078$ ) im Vergleich zu 8 % in den WT Mäusen. Die Gedächtnis-T-Zellen von *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten keine signifikante Veränderung in der Frequenz der TNF $\alpha$ -Produzenten.

Zusammenfassend scheint ein IRF8-Defizit *in vivo* die Entstehung von Th1-spezifischen (TBET<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>) Gedächtnis-T-Zellen zu verringern. Dieser Befund steht im Widerspruch mit den *in*



*in vitro* erzielten Daten in den Th1 Zellen, in denen ein IRF8-Defizit die Entstehung von TBET<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen begünstigt (s. Abbildung 16 und Abbildung 17). Im Folgenden wurde untersucht, wie sich die Frequenzen an TBET<sup>-</sup>, IFN $\gamma$ <sup>-</sup>, GM-CSF<sup>-</sup> und IL2<sup>-</sup>Produzenten in den Gedächtnis-T-Zellen nach *ex vivo* Kultivierung verhalten. Hierfür wurden die gleichen Gedächtnis-T-Zellen aus der vorherigen Analyse mit  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 stimuliert und für 5 Tage in Anwesenheit von IL2 und IL7 *ex vivo* kultiviert. 3 und 5 Tage nach der *ex vivo* Kultivierung wurden wiederum die Frequenzen der TBET<sup>-</sup>, IFN $\gamma$ <sup>-</sup>, GM-CSF<sup>-</sup> und IL2<sup>-</sup>Produzenten durchflusszytometrisch bestimmt (s. Abbildung 19b). Auffallend war, dass sich die Frequenz der IFN $\gamma$ -Produzenten in den *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäusen über den Zeitraum der *ex vivo* Kultivierung allmählich der Frequenz in den WT Mäusen, die weitestgehend konstant blieb, annäherte. Außerdem wiesen die IRF8-defizienten Zellen 3 und 5 Tage nach *ex vivo* Kultivierung keinen signifikanten Unterschied mehr in der Frequenz der TBET-produzierenden Zellen auf, auch wenn die Frequenz in den *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäusen gegenüber den WT Mäusen noch erhöht war. Der *in vivo* Effekt auf die IL2-Produzenten in den Gedächtnis-T-Zellen tritt nach *ex vivo* Kultivierung ebenfalls nicht mehr auf. Und der Anstieg der GM-CSF-Produzenten in den Gedächtnis-T-Zellen der *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäuse erwies sich 5 Tage nach *ex vivo* Kultivierung nicht mehr als signifikant. Diese Befunde lassen vermuten, dass die Effekte eines IRF8-Defizits in den Gedächtnis-T-Zellen extrinsisch z. B. durch die Umgebung von APCs und dendritischen Zellen bedingt sein könnten.



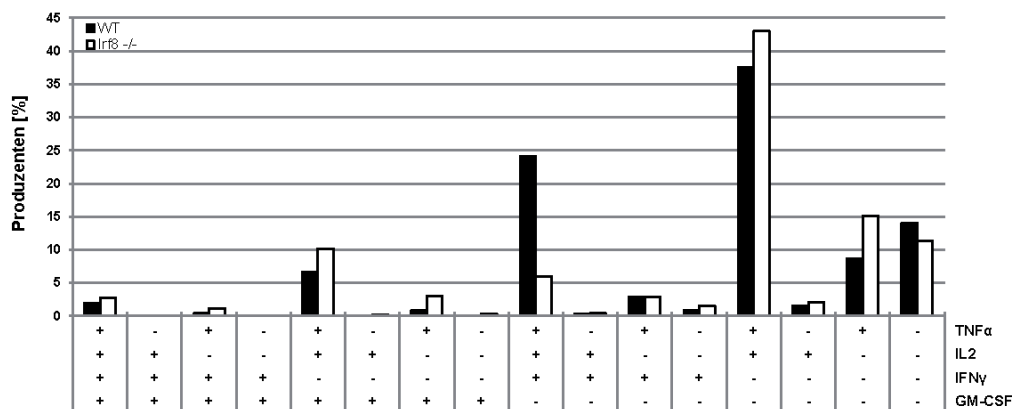
**Abbildung 19: Ein IRF8-Defizit verringert *in vivo* die Entstehung von TBET<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen und verändert deren Zytokinproduktion.** Es wurden die Frequenzen der TBET<sup>-</sup>, GATA3<sup>-</sup>, IFN $\gamma$ <sup>-</sup>, GM-CSF<sup>-</sup>, IL2<sup>-</sup> und TNF $\alpha$ -Produzenten *ex vivo* von effektorischen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>) und zentralen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>) Gedächtnis-T-Zellen aus den Lymphknoten und der Milz von *Irf8*<sup>-/-</sup> und WT Mäusen nach einer 5-stündigen Re-Stimulation mit PMA/Ionomycin/Brefeldin A durchflusszytometrisch bestimmt. Die Zellen wurden auf CD4<sup>+</sup> und lebend gated. a) Mittelwert der Frequenzen der TBET<sup>-</sup> (n=3), GATA3<sup>-</sup> (n=3), IFN $\gamma$ <sup>-</sup> (n=5), GM-CSF<sup>-</sup> (n=5), IL2<sup>-</sup> (n=5) und TNF $\alpha$ -Produzenten (n=5) aus unabhängigen Experimenten in *ex vivo* Gedächtnis-T-Zellen. Als statistischer Test diente der t-Test mit P < 0,05 (\*), P < 0,01 (\*\*) und P < 0,001 (\*\*\*). b) Transkriptionsfaktor- und Zytokin-Produzenten in *ex vivo* kultivierten Gedächtnis-T-Zellen. Die isolierten Gedächtnis-T-Zellen aus (a) wurden *ex vivo* über 5 d kultiviert und den *in vivo* Bedingungen entwöhnt. 3 d und 5 d nach Kultivierung wurden die Frequenzen der TBET<sup>-</sup>, IFN $\gamma$ <sup>-</sup>, GM-CSF<sup>-</sup> und IL2<sup>-</sup>Produzenten erneut durchflusszytometrisch bestimmt.

Eine Boolean-Analyse der einzelnen Zytokin-Subpopulationen in den *ex vivo* analysierten Gedächtnis-T-Zellen eines stellvertretenden Experiments (s. Abbildung 20a) zeigte, dass die Population der TNF $\alpha$ <sup>+</sup>IL2<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>GM-CSF<sup>-</sup> Produzenten in den *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäusen mit 5 % gegenüber den WT-Mäusen

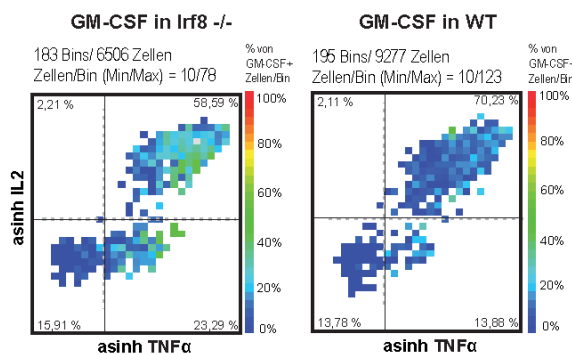
mit 24 % deutlich verringert war. Dies ging einher mit einer Erhöhung der TNF $\alpha$ <sup>+</sup>IL2<sup>+</sup> Doppelproduzenten und der TNF $\alpha$ <sup>+</sup> Einzelproduzenten. Die Tatsache, dass die Mehrheit der IFN $\gamma$ -Produzenten auch TNF $\alpha$  und IL2 positiv war, könnte für eine positive Korrelation der Anzahl an IFN $\gamma$ -Produzenten mit TNF $\alpha$  und IL2 sprechen.

Des Weiteren zeigte die Boolean-Analyse, dass die Anzahl der GM-CSF-Produzenten positiv mit den TNF $\alpha$ - und IL2-produzierenden Zellen korrelieren könnte, da die Hauptpopulationen der GM-CSF-Produzenten TNF $\alpha$ <sup>+</sup> und IL2<sup>+</sup> waren. Jedoch zeichnete sich in den IRF8-defizienten Zellen zusätzlich eine TNF $\alpha$ <sup>+</sup>IL2<sup>-</sup> Subpopulation ab, die im Vergleich zu den WT-Zellen vermehrt GM-CSF produzierte. Dies spricht dafür, dass die Anzahl der GM-CSF-Produzenten nicht zu 100 % mit den IL2-Produzenten in den *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäusen korrelierte. Zusätzlich lassen die Ergebnisse der Boolean-Analyse vermuten, dass die GM-CSF-Produzenten nicht mit den IFN $\gamma$ -Produzenten korrelierten, da die Hauptpopulation der GM-CSF-Produzenten IFN $\gamma$  negativ waren. Die Konstruktion eines 3D-Plots, in dem wiederum die Frequenzen für GM-CSF (s. Abbildung 20b) oder IFN $\gamma$  (s. Abbildung 20c) in der

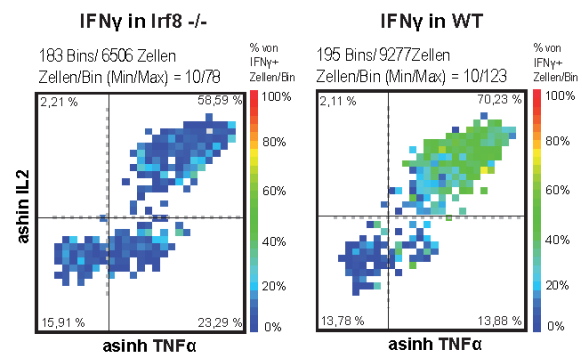
a) Boolean-Analyse der unterschiedlichen Subpopulationen der Zytokin-Produzenten TNF $\alpha$ , IL2, IFN $\gamma$  und GM-CSF in *in vitro* Gedächtnis-T-Zellen (*ex vivo*)



b) 3D Plot: Frequenz der GM-CSF-Produzenten in Abhängigkeit von TNF $\alpha$  und IL2 in Gedächtnis-T-Zellen (*ex vivo*)



c) 3D Plot: Frequenz der IFN $\gamma$ -Produzenten in Abhängigkeit von TNF $\alpha$  und IL2 in Gedächtnis-T-Zellen (*ex vivo*)



**Abbildung 20: Die Anzahl der GM-CSF-Produzenten in den Gedächtnis-T-Zellen korreliert mit den TNF $\alpha$ - und IL2-Produzenten.** Es wurden die Frequenzen der IFN $\gamma$ -, GM-CSF-, IL2- und TNF $\alpha$ -Produzenten *ex vivo* von effektorischen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>) und zentralen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>) Gedächtnis-T-Zellen aus den Lymphknoten und der Milz von *Irf8*<sup>-/-</sup> und WT Mäusen nach einer 5-stündigen Re-Stimulation mit PMA/Ionomycin/Brefeldin A durchflusszytometrisch bestimmt. Die Zellen wurden auf CD4<sup>+</sup> und lebend gated. a) Boolean-Analyse der TNF $\alpha$ , IL2, IFN $\gamma$  und GM-CSF Subpopulationen eines stellvertretenden Experiments. b) Abhängigkeit der GM-CSF-Frequenzen von den TNF $\alpha$ - und IL2-Produzenten im 3D-Plot. Die Konstruktion der 3D-Plots erfolgte von Yen Hoang mit der R Software. Die FACS Daten aus (a) wurden asinh transformiert und die TNF $\alpha$ - (x-Achse) und IL2- (y-Achse) produzierenden Zellen in Bins eingeteilt. Im 3D-Plot repräsentiert ein Bin die mittlere Frequenz an GM-CSF<sup>+</sup> Zellen innerhalb dieses Bins und ist entsprechend gefärbt. c) Abhängigkeit der IFN $\gamma$ -Frequenzen von den TNF $\alpha$ - und IL2-Produzenten. Die 3D-Plots wurden in analoger Weise, wie in (b) dargestellt, erstellt.

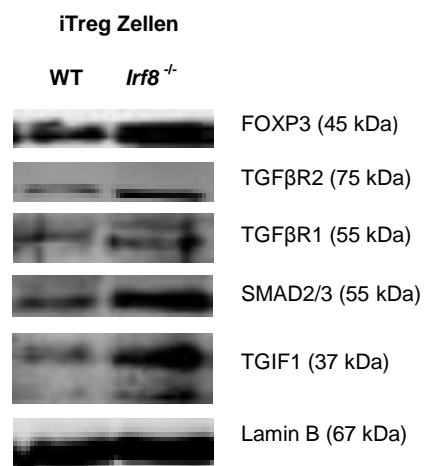
dritten Dimension in Abhängigkeit der IL2- und TNF $\alpha$ -Produzenten dargestellt wurde, sollte diese Hypothese überprüfen.

Der 3D-Plot zeigte, dass die Frequenz der GM-CSF<sup>+</sup> Zellen in den WT-Zellen positiv mit den TNF $\alpha$ -IL2- und IFN $\gamma$ -Produzenten korrelierte, wie es bereits in den Th1 Zellen gezeigt wurde. In den IRF8-defizienten Gedächtnis-T-Zellen korrelierte die Frequenz der GM-CSF<sup>+</sup> Zellen ebenfalls positiv mit den TNF $\alpha$ -Produzenten, jedoch nur zu ca. 70 % mit den IL2-Produzenten und nicht mit den IFN $\gamma$ -Produzenten. Aufgrund der geringen Frequenzen von GM-CSF in den WT-Zellen (9,2 %) und von IFN $\gamma$  in den IRF8-defizienten Zellen (8,5 %) lieferte der 3D-Plot jedoch keine eindeutige Aussage bezüglich der Abhängigkeit der GM-CSF-Frequenzen von den IL2- und IFN $\gamma$ -Produzenten.

Zusammenfassend weisen die Gedächtnis-T-Zellen der *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäuse weniger TBET-, IFN $\gamma$ - und IL2-Produzenten aber mehr GM-CSF-Produzenten im Vergleich zu den WT Mäusen auf. Diese Unterschiede verringern sich jedoch nach *ex vivo* Kultivierung. 3D-Plot Analysen zeigten, dass die GM-CSF- und IFN $\gamma$ -Frequenzen in den IRF8-defizienten Gedächtnis-T-Zellen wahrscheinlich nicht miteinander korrelieren. Damit könnte der Anstieg der GM-CSF-Produzenten in den Gedächtnis-T-Zellen der *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäuse vermutlich durch die Abnahme der IFN $\gamma$ -Produzenten bedingt sein.

### 2.3.2.6 Ein IRF8-Defizit führt zur Erhöhung der Proteinmenge der am TGF $\beta$ -Signalweg beteiligten Mediatoren TGF $\beta$ 2 und SMAD2/3

In vorangegangenen Versuchen wurde für IRF8 ein suppressiver Effekt auf die Entstehung von FOXP3<sup>+</sup> Zellen unter iTreg polarisierenden Bedingungen gezeigt. Die Expression von *Foxp3* und die Entstehung von iTreg Zellen in der Peripherie wird maßgeblich über das Vorhandensein des Zytokins TGF $\beta$  und den TGF $\beta$ -Signalweg beeinflusst (Murphy, 2012). Hierbei bindet TGF $\beta$  an den konstitutiv aktiven TGF $\beta$ 2, welcher im Anschluss den TGF $\beta$ 1 durch Phosphorylierung aktiviert. Der phosphorylierte TGF $\beta$ 1 gibt schließlich das Signal durch Phosphorylierung des Proteins SMAD2/3 weiter. Das phosphorylierte SMAD2/3 komplexiert im Anschluss mit SMAD4, transloziert in den Zellkern und aktiviert dort die Transkription von TGF $\beta$ -abhängigen Genen. TGIF1 übernimmt im TGF $\beta$ -Signalweg die Aufgabe eines Repressors und verhindert durch Bindung des SMAD2/3-SMAD4-Komplexes die Genexpression der TGF $\beta$ -abhängigen Gene (Wotton et al., 1999).



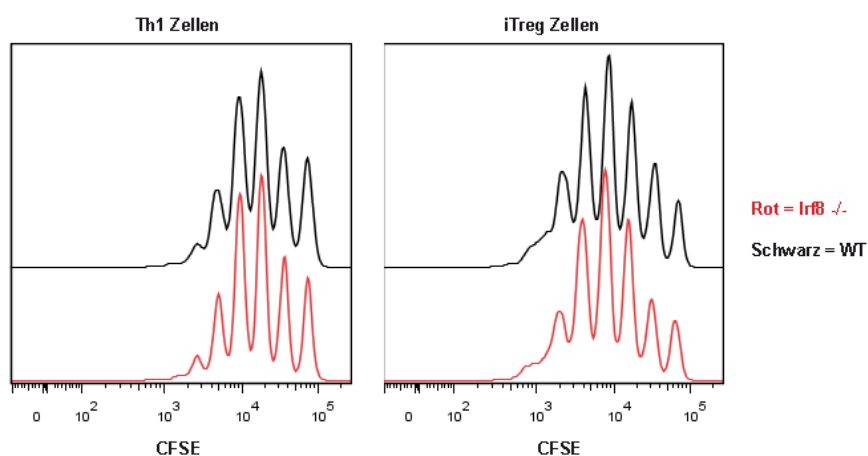
**Abbildung 21: Ein IRF8-Defizit führt zur Erhöhung der Proteinmenge der am TGF $\beta$ -Signalweg beteiligten Mediatoren TGF $\beta$ 2 und SMAD2/3.** Western Blot Analyse von 5 d *in vitro* polarisierten iTreg Zellen aus den Lymphknoten und der Milz von *Irf8*<sup>-/-</sup> und WT Mäusen. Die *in vitro* differenzierten iTreg Zellen wurden zuvor ficollisiert. Es wurden 500.000 Zellen pro Probe analysiert.

Im Folgenden sollte nun untersucht werden, ob IRF8 neben den suppressiven Effekt auf die Entstehung von FOXP3<sup>+</sup> Zellen auch einen inhibitorischen Effekt auf den TGFβ-Signalweg in der *in vitro* Differenzierung von iTreg Zellen aufweist. Hierfür wurden wiederum naive T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>) aus der Milz und den Lymphknoten von *Irf8*<sup>-/-</sup> und WT Mäusen isoliert und für fünf Tage *in vitro* unter iTreg polarisierenden Bedingungen kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen ficollisiert und die Proteinmenge von FOXP3, TGFβR2, TGFβR1, SMAD2/3 und TGIF1 im Western Blot analysiert (s. Abbildung 21).

Die Western Blot Analyse zeigte, dass in IRF8-defizienten Zellen die Proteinmenge von TGFβR2 und SMAD2/3 gegenüber den WT-Zellen erhöht ist. Auf die Proteinmenge von TGFβR1 konnte kein signifikanter Effekt dokumentiert werden. Jedoch führte ein IRF8-Defizit auch zu einer Erhöhung der Proteinmenge von TGIF1, der als Repressor des TGFβ-Signalweges beschrieben wurde (Doktorarbeit von Melanie Krüger, nicht publiziert). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Zunahme der FOXP3<sup>+</sup> Zellen in den IRF8-defizienten Zellen durch einen verstärkten TGFβ-Signalweg bedingt ist.

### 2.3.2.7 IRF8 zeigt keinen Einfluss auf die T-Zellproliferation aber einen anti-apoptotischen Effekt in den Gedächtnis-T-Zellen und in der Differenzierung von Th1 und iTreg Zellen

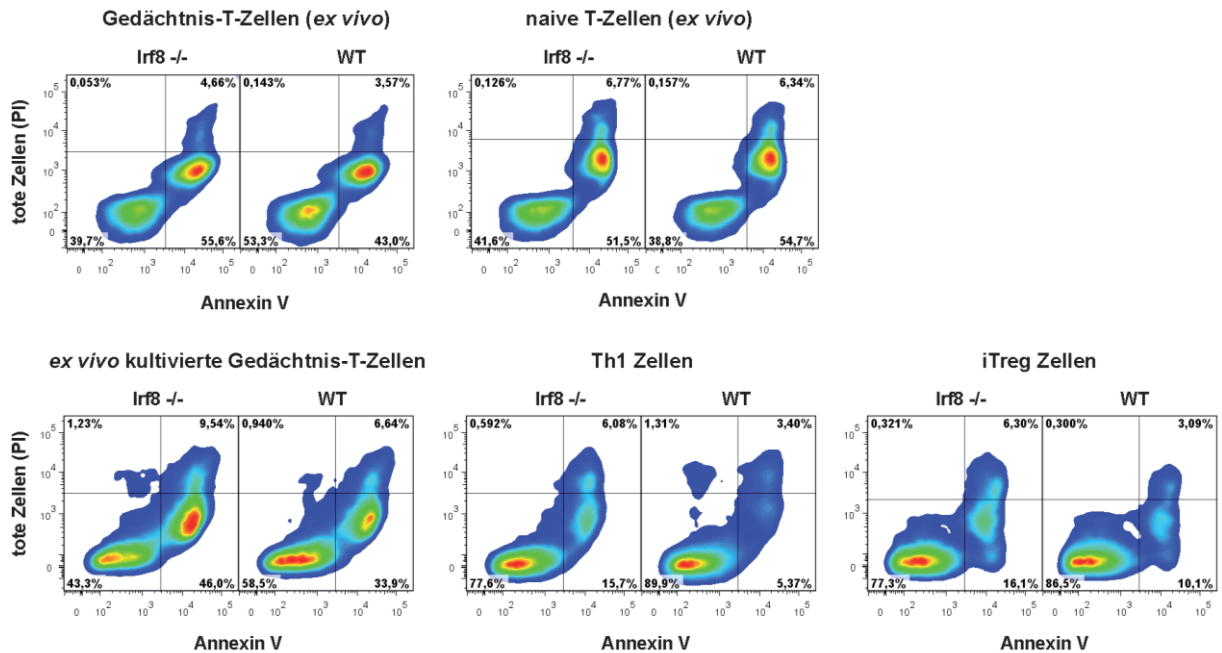
Die *in vitro* Effekte eines IRF8-Defizits – eine begünstigte Th1-Polarisation und die Erhöhung von FOXP3<sup>+</sup> Zellen unter iTreg polarisierenden Bedingungen – sowie die verminderte Anzahl von Th1-spezifischen TBET<sup>+</sup>IFNγ<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen in den *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäusen könnte durch ein verändertes Proliferations- oder Apoptoseverhalten bedingt sein. In myeloiden Zellen wurde bereits beschrieben, dass ein IRF8-Defizit *in vivo* die spontane Apoptose verringert (Paschall et al., 2015). Des Weiteren wurde gezeigt, dass IRF8 einen positiven Effekt auf die FAS-vermittelte Apoptose in myeloiden Zellen durch Regulation der Expression von *Bcl2l1* (kodiert für BCL-XL), *Bax* und *Cflar* (kodiert für Flip) hat (Gabriele et al., 1999; Yang et al., 2011; Hu et al., 2013b). Zudem beschrieben Sung und seine Kollegen einen positiven Effekt von IRF8 auf die Proliferation der humanen promyoblastischen Leukämie-Zelllinie HL-60 (Sung et al., 2011). Im Folgenden sollte nun der Einfluss von IRF8 auf die Apoptose und Proliferation von T-Zellen untersucht werden. Hierfür wurden wiederum naive T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>) unter Th1 und iTreg polarisierenden Bedingungen *in vitro* für 5 Tage kultiviert.



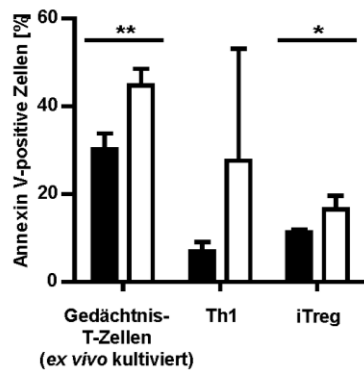
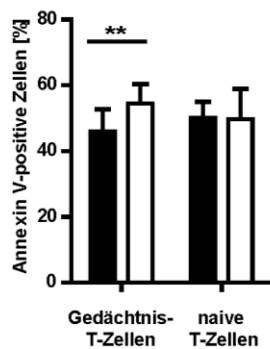
**Abbildung 22: IRF8 zeigt keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten von *in vitro* differenzierten Th1 und iTreg Zellen.** Naive T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>) aus den Lymphknoten und der Milz von *Irf8*<sup>-/-</sup> und WT Mäusen wurden mit CFSE gefärbt und für 5 d unter Th1 und iTreg polarisierenden Bedingungen *in vitro* kultiviert. Die CFSE-positiven Zellen wurden durchflusszytometrisch bestimmt und auf CD4<sup>+</sup> und lebend gated.

Mithilfe einer CFSE-Färbung wurde das Proliferationsverhalten der polarisierten Th1 und iTreg Zellen am Durchflusszytometer analysiert. Zwischen den IRF8-defizienten Zellen und den WT-Zellen wurde kein Unterschied im Proliferationsverhalten sowohl unter Th1 als auch unter iTreg polarisierenden Bedingungen dokumentiert (s. Abbildung 22).

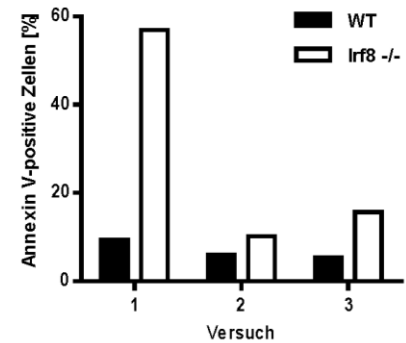
a) Density-Plot der apoptotischen und toten Zellen in naiven T-Zellen, Gedächtnis-T-Zellen sowie in *in vitro* kultivierten Th1 und iTreg Zellen nach Apoptose-Induktion



b) Mittelwerte der apoptotischen Zellen in naiven T-Zellen, Gedächtnis-T-Zellen sowie in *in vitro* kultivierten Th1 und iTreg Zellen nach Apoptose-Induktion



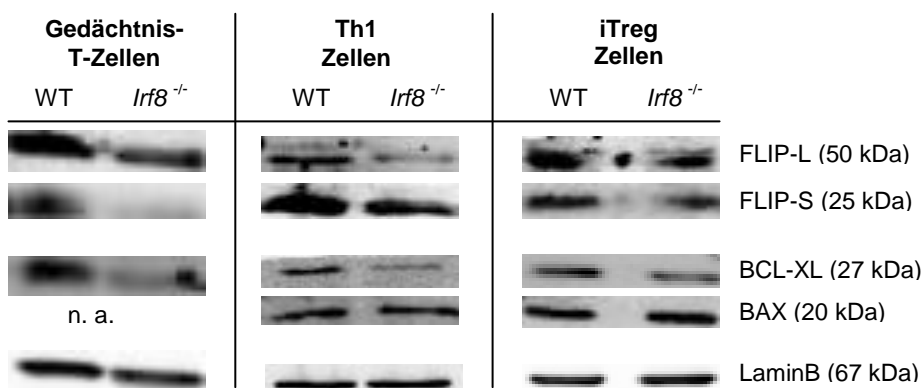
c) Apoptotische Zellen in *in vitro* polarisierten Th1 Zellen nach Apoptose-Induktion



**Abbildung 23: IRF8 zeigt eine anti-apoptotische Wirkung in Gedächtnis-T-Zellen sowie in *in vitro* polarisierten Th1 und iTreg Zellen.** In naiven T-Zellen, Gedächtnis-T-Zellen sowie 5 d polarisierten Th1 und iTreg Zellen aus den Lymphknoten und der Milz von *Irf8*<sup>-/-</sup> und WT Mäusen wurde für 20 h mit anti-FAS (Th1-Zellen) oder MTX (naive, iTreg und Gedächtnis-T-Zellen) die Apoptose induziert. Die *ex vivo* kultivierten Gedächtnis-T-Zellen und die *in vitro* differenzierten Th1 und iTreg Zellen wurden zuvor ficollisiert. Nach der Apoptose-Induktion wurde die Anzahl der apoptotischen Zellen mittels einer Annexin V Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. Die toten Zellen wurden mit Propidiumiodid angefärbt. a) Density-Plots der apoptotischen und toten Zellen nach Apoptose-Induktion eines stellvertretenden Experimentes. b) Mittelwerte der apoptotischen Zellen in naiven und Gedächtnis-T-Zellen (n=4) sowie in *ex vivo* kultivierten Gedächtnis-T-Zellen und in *in vitro* polarisierten Th1 und iTreg Zellen (n=3) aus unabhängigen Experimenten. Die Zellen wurden auf lebend gated. Als statistischer Test diente der t-Test mit P < 0,05 (\*), P < 0,01 (\*\*) und P < 0,001 (\*\*\*). c) Prozent apoptotischer Zellen in *in vitro* polarisierten Th1 Zellen nach Apoptose-Induktion in den jeweiligen unabhängigen Versuchen. Die Zellen wurden auf lebend gated.

Für die Analyse des Apoptoseverhaltens wurden die *in vitro* polarisierten Th1 und iTreg Zellen sowie *ex vivo* kultivierte Gedächtnis-T-Zellen am fünften Tag der Kultivierung ficollisiert und die lebenden Zellen extrahiert. Im Anschluss wurde die Apoptose in den Th1 Zellen mit anti-FAS und in den iTreg und Gedächtnis-T-Zellen mit Methotrexat (MTX) für 20 h induziert. MTX ist ein zytotoxisches Medikament, welches in der Krebstherapie eingesetzt wird und die FAS-vermittelte Apoptose bei Tumorzellen auslöst (Friesen et al., 1996). Zusätzlich zu den *in vitro* differenzierten Zellen wurde die Apoptose in Gedächtnis-T-Zellen und naiven T-Zellen mit MTX *ex vivo* induziert. Nach der Apoptose-Induktion wurde die Anzahl der apoptotischen Zellen mittels einer Annexin V Färbung durchflusszytometrisch bestimmt.

IRF8 zeigte einen anti-apoptotischen Effekt in den *in vivo* und *ex vivo* kultivierten Gedächtnis-T-Zellen sowie in den polarisierten Th1 und iTreg Zellen. In den naiven T-Zellen der IRF8-defizienten Zellen konnte kein Effekt auf die Apoptose dokumentiert werden (s. Abbildung 23). Die Anzahl der direkt *ex vivo* detektierten apoptotischen Gedächtnis-T-Zellen (Annexin V<sup>+</sup> und lebend) stieg von 43 % in den WT-Zellen auf 55 % in den IRF8-defizienten Zellen (s. Abbildung 23a). In vier unabhängigen Versuchen erwies sich dieser Anstieg als signifikant ( $p = 0,0093$ ) (s. Abbildung 23b). Nach *ex vivo* Kultivierung dieser Gedächtnis-T-Zellen für 5 Tage blieb dieser Effekt erhalten. In den polarisierten Th1 Zellen der IRF8-defizienten Zellen wurde ebenfalls ein Anstieg der apoptotischen Zellen von 5 % auf 15 % im Vergleich zu den WT-Zellen dokumentiert. Die Anzahl der apoptotischen Zellen in den Th1 Zellen variierte in den jeweiligen unabhängigen Versuchen stark, jedoch wiesen die IRF8-defizienten Zellen immer eine erhöhte Frequenz an Annexin V<sup>+</sup> Zellen auf (s. Abbildung 23c). Außerdem stieg die Anzahl der apoptotischen Zellen in den polarisierten iTreg Zellen signifikant ( $p = 0,0465$ ) von 10 % in den WT-Zellen auf 16 % in den IRF8-defizienten Zellen an.



**Abbildung 24: Ein IRF8-Defizit verringert die Proteinmenge der anti-apoptotischen Proteine FLIP und BCL-XL.** Western Blot Analyse der Gedächtnis-T-Zellen sowie von 5 d *in vitro* polarisierten Th1 und iTreg Zellen aus den Lymphknoten und der Milz von *Irf8*<sup>-/-</sup> und WT Mäusen. Die *in vitro* differenzierten Th1 und iTreg Zellen wurden zuvor ficollisiert. Es wurden 500.000 Zellen pro Probe analysiert. n. a. = nicht analysiert.

Die Analyse der Apoptose-Induktion zeigte, dass IRF8 einen anti-proliferativen Effekt in T-Zellen aufweist im Gegensatz zu dem bereits dokumentierten pro-apoptotischen Effekt in den myeloiden Zellen (Paschall et al., 2015). Im Folgenden wurde nun der Effekt von IRF8 auf die FAS-vermittelten Apoptose-Proteine BAX (pro-apoptotisch), BCL-XL (anti-apoptotisch) und FLIP (anti-apoptotisch) in 5 Tage polarisierten iTreg Zellen im Western Blot analysiert (s. Abbildung 24). Die IRF8-defizienten Zellen wiesen eine verringerte Proteinmenge der anti-apoptotischen Proteine FLIP (FLIP-L und FLIP-S) und BCL-XL sowohl in den Gedächtnis-T-Zellen als auch in den 5 Tage *in vitro* differenzierten Th1

und iTreg Zellen gegenüber den WT-Zellen auf. Auf das pro-apoptotische Protein BAX wurde kein signifikanter Effekt dokumentiert.

Die immunologische Charakterisierung der *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäuse zeigte, dass IRF8 eine suppressive Rolle in der peripheren Differenzierung von Th1 und iTreg Zellen spielt, die möglicherweise durch ein verändertes Apoptoseverhalten verursacht sein könnte. Ein IRF8-Defizit führte in den *in vitro* polarisierten Th1 Zellen zur Erhöhung der TBET<sup>+</sup>, IFN $\gamma$ <sup>+</sup> und GM-CSF<sup>+</sup> Zellen sowie zu einem Anstieg der apoptotischen Zellen über den FAS-vermittelten Signalweg. In iTreg Zellen führte ein IRF8-Defizit zur Erhöhung von FOXP3<sup>+</sup> Zellen einhergehend mit einer Erhöhung der Proteinmenge der am TGF $\beta$ -Signalweg beteiligten Mediatoren TGF $\beta$ R2 und SMAD2/3. Des Weiteren stieg die Anzahl an apoptotischen Zellen in *in vitro* polarisierten iTreg Zellen. Im nächsten Schritt sollte dieser dokumentierte suppressive Effekt mithilfe einer adenoviralen Überexpression bzw. eines shRNA-Knockdowns von *Irf8* in polarisierten Th1 und iTreg Zellen validiert werden.

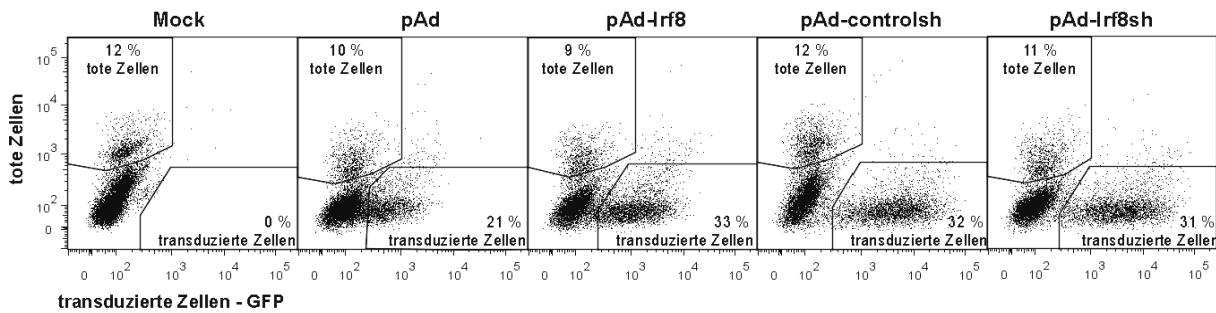
### **2.3.3 Die adenovirale Überexpression und der shRNA-Knockdown von *Irf8* validieren den suppressiven Effekt von IRF8 in der *in vitro* Differenzierung von Th1 und iTreg Zellen**

Die Perturbation der Expression eines Proteins ist eine unerlässliche Methode, um funktionelle Aspekte dieses Proteins zu prüfen. Die Perturbation der Proteinexpression in primären T-Zellen bringt jedoch verschiedene Probleme mit sich. Zum einen kann sie häufig zur Voraktivierung der naiven T-Zellen führen, was die Untersuchung von initialen Differenzierungsvorgängen erschwert. Zum anderen ist die Erzielung von hohen Transduktions- bzw. Transfektionseffizienzen schwierig. Die Verwendung des adenoviral-vermittelten Systems bringt den Vorteil mit sich, dass die primären T-Zellen nicht voraktiviert werden müssen wie z. B. beim Retrovirus. Durch Verwendung von CAR-Mäusen, die auf den T-Zellen den adenoviralen CAR Rezeptor exprimieren, kann zudem die Transduktionseffizienz gesteigert werden.

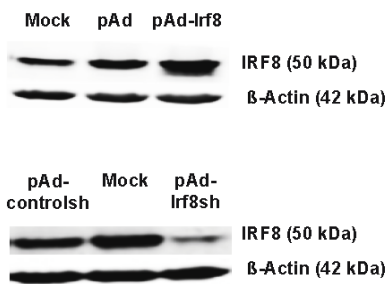
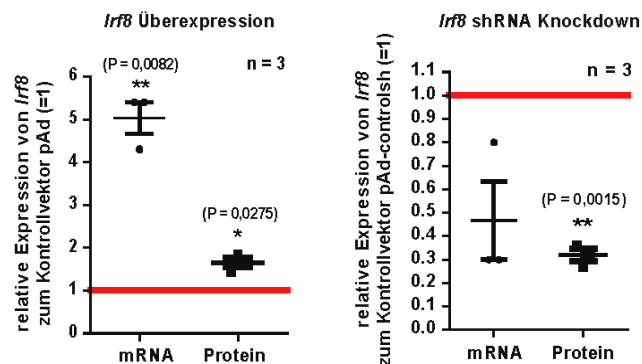
Im Folgenden wurde der Effekt von IRF8 auf die *in vitro* Differenzierung von Th1 und iTreg Zellen nach adenoviraler Überexpression und shRNA-Knockdown von *Irf8* untersucht. Hierfür wurden naive T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) aus den Lymphknoten und der Milz von DO11.10CAR Mäusen mit adenoviralem Überstand für eine Stunde transduziert und im Anschluss *in vitro* für 3 bzw. 5 Tage unter Th1 und iTreg polarisierenden Bedingungen kultiviert.

#### **2.3.3.1 Die adenovirale Transduktion, die Überexpression und der Knockdown von *Irf8* sind effizient**

Die Transduktionseffizienz wurde mittels Durchflusszytometrie am dritten Tag nach der Transduktion bestimmt. Es wurden Transduktionseffizienzen zwischen 20 bis 33 % erreicht (s. Abbildung 25a). Die Vitalität der Zellen wurde nicht durch die Transduktion beeinflusst. Sowohl in der untransduzierten Probe (Mock) als auch in den transduzierten Proben waren nur ca. 10 % der Zellen tot. Für die adenovirale Überexpression von *Irf8* wurde auf mRNA Ebene eine Erhöhung der Expression von *Irf8* um den Faktor 5 und auf Proteinebene um den Faktor 1,5 erzielt. Der adenovirale Knockdown von *Irf8* war mit ca. 50 % auf mRNA-Ebene und 70 % auf Proteinebene sehr effizient (s. Abbildung 25b und Abbildung 25c).

a) Transduktionseffizienz der adenoviralen Überexpression und des shRNA Knockdowns von *Irf8*

## b) Proteinexpression von IRF8 nach adenoviraler Überexpression und shRNA Knockdown

c) Effizienz der adenoviralen Überexpression und des shRNA Knockdowns von *Irf8* auf mRNA und Protein Ebene

**Abbildung 25: Die adenovirale Transduktion sowie die Überexpression und der Knockdown von *Irf8* sind effizient.** Naive T-Zellen ( $CD4^+CD25^-$ ) aus den Lymphknoten und der Milz von DO11.10CAR Mäusen wurden mit adenoviralem Überstand für eine Stunde transduziert und im Anschluss *in vitro* für 3 Tage unter Th1 polarisierenden Bedingungen kultiviert. a) Transduktionseffizienz des adenoviralen Transfers. Die Anzahl der GFP<sup>+</sup> und toten Zellen der transduzierten Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die toten Zellen wurden mit Propidiumiodid angefärbt. b) Proteinexpression von IRF8 nach Überexpression und Knockdown. Western Blot Analyse der transduzierten Zelllysate eines stellvertretenden Experiments. Es wurden 400.000 Zellen pro Probe aufgetragen. c) Effizienz der Überexpression und des Knockdowns von *Irf8* auf mRNA und Protein Ebene. Es wurde die relative Expression von *Irf8* nach Überexpression und nach Knockdown im Vergleich zum Leervektor in 3 unabhängigen Experimenten bestimmt. Die Proteinexpression wurde mittels Western Blot Analyse der Zelllysate und anschließender Quantifizierung mit der Odyssey Software bestimmt. Für die mRNA-Analyse wurde die RNA von den transduzierten Zellen präpariert und die mRNA-Expression mittels einer qRT-PCR analysiert. Die relative mRNA Expression wurde nach der  $\Delta\Delta Ct$  Methode berechnet, auf das Housekeeping Gen *Rps18* normalisiert und in Relation zu den mit Kontrollvektor behandelten Zellen gesetzt (Kontrollvektor = 1 = rote Linie). Als statistischer Test diente der t-Test mit  $P < 0,05$  (\*),  $P < 0,01$  (\*\*) und  $P < 0,001$  (\*\*\*)

### 2.3.3.2 Die Überexpression von *Irf8* in naiven T-Zellen verringert die Anzahl an apoptotischen sowie TBET<sup>+</sup>, IFN $\gamma$ <sup>+</sup> und GM-CSF<sup>+</sup> Zellen unter Th1 polarisierenden Bedingungen

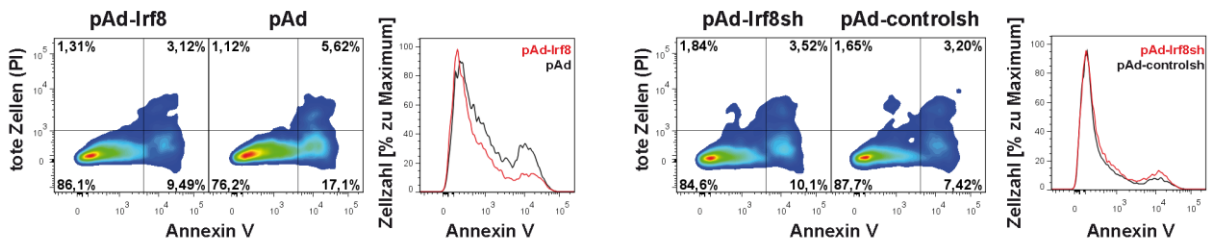
Nach der adenoviralen Transduktion von *Irf8* wurden die naiven T-Zellen unter suboptimalen Th1-polarisierenden Bedingungen (geringer T-Zellrezeptor-Stimulus) kultiviert. Im Anschluss wurde der Effekt der Überexpression auf die Anzahl der apoptotischen Zellen, auf den Transkriptionsfaktor TBET und auf die Zytokine IFN $\gamma$  und GM-CSF durchflusszytometrisch analysiert (s. Abbildung 26 links).

Die Frequenz an apoptotischen Zellen fiel 5 Tage nach Überexpression (pAd-Irf8) von 17 % auf 9 % im Vergleich zum Leervektor (pAd) (s. Abbildung 26a). Außerdem verringerte die Überexpression von *Irf8* die Entstehung von TBET<sup>+</sup>, IFN $\gamma$ <sup>+</sup> und GM-CSF<sup>+</sup> Zellen im Vergleich zum Leervektor. Die Frequenz an TBET<sup>+</sup> Zellen sank von 55 auf 50 % (Abbildung 26b), die Frequenz an IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen von 62 auf 50 %

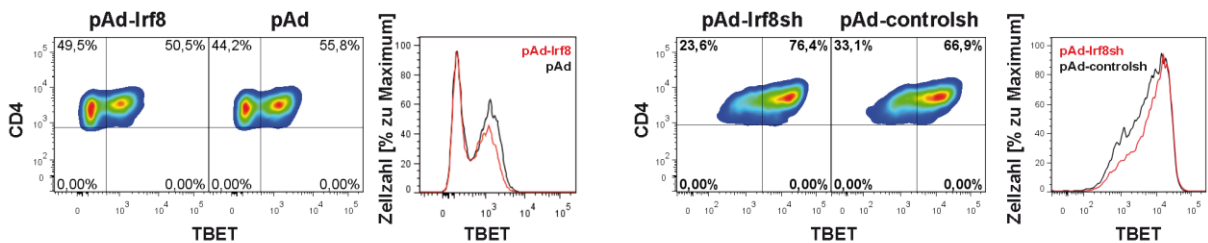


(s. Abbildung 26c) und die Frequenz an GM-CSF<sup>+</sup> Zellen von 23 auf 8 % (s. Abbildung 26d). Ein Density-Plot der GM-CSF und IFN $\gamma$  Frequenzen zeigte hauptsächlich eine Abnahme der GM-CSF<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Doppelproduzenten nach Überexpression und belegte somit eine positive Korrelation von GM-CSF und IFN $\gamma$ . Neben dem Anstieg der Produzenten bewies eine Western Blot Analyse außerdem die Erhöhung der absoluten Proteinmenge von TBET in Th1 Zellen (Daten nicht gezeigt). Die Histogramme der Fluoreszenzintensitäten der TBET-, IFN $\gamma$  und GM-CSF-Expressionen belegten jedoch, dass die Menge pro Zelle unverändert war.

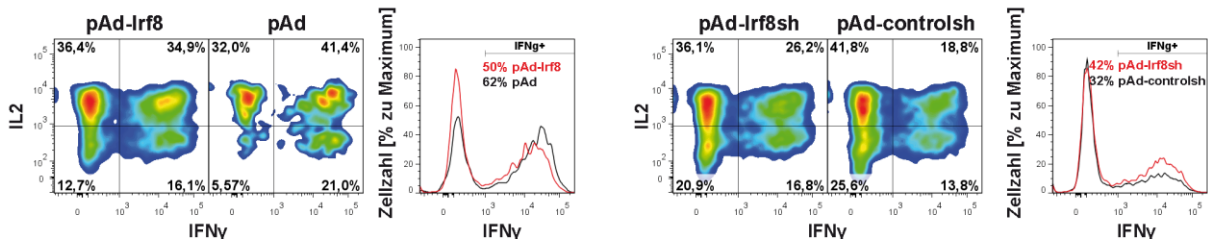
#### a) Anzahl der apoptotischen und toten Zellen 5d nach adenoviraler Transduktion und Th1 Polarisation



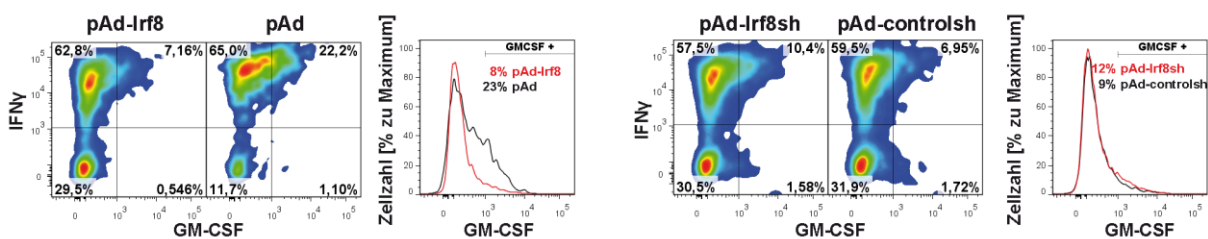
#### b) Frequenz der TBET<sup>+</sup> Zellen 3d nach adenoviraler Transduktion und Th1 Polarisation



#### c) Frequenz der IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen 3d nach adenoviraler Transduktion und Th1 Polarisation



#### d) Frequenz der GM-CSF<sup>+</sup> Zellen 5d nach adenoviraler Transduktion und Th1 Polarisation



**Abbildung 26: Die adenovirale Überexpression und der shRNA-Knockdown von *Irf8* validieren den suppressiven Effekt von IRF8 auf die in *in vitro* Differenzierung von Th1 Zellen.** Naive T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) aus den Lymphknoten und der Milz von DO11.10CAR Mäusen wurden mit adenoviralem Überstand für eine Stunde transduziert und im Anschluss *in vitro* für 5 Tage unter suboptimalen Th1 polarisierenden Bedingungen kultiviert. Die Zellen wurden 3 d oder 5 d nach der Th1 Polarisation durchflusszytometrisch analysiert und auf transduzierte (GFP<sup>+</sup>), CD4<sup>+</sup> und lebende Zellen gated. a) Anzahl der apoptotischen und toten Zellen nach dem adenoviralen Gentransfer. 5 d nach Kultivierung wurden die apoptotischen Zellen mit einer Annexin V und die toten Zellen mit einer Propidiumiodid Färbung bestimmt. b) Frequenz der TBET<sup>+</sup> Zellen 3 d nach dem adenoviralen Gentransfer und der Th1 Polarisation. c) Frequenz der IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen 3 d nach dem adenoviralen Gentransfer und der Th1 Polarisation. d) Frequenz der GM-CSF<sup>+</sup> Zellen 5 d nach dem adenoviralen Gentransfer und der Th1 Polarisation.

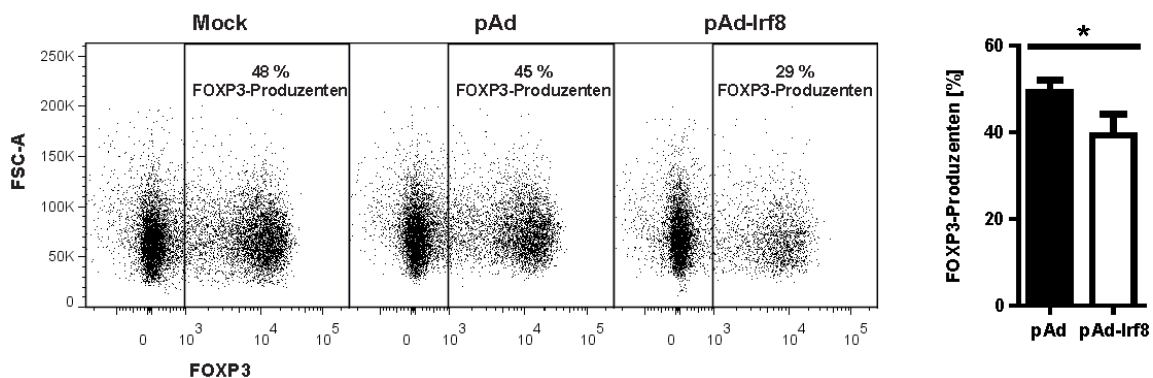
### 2.3.3.3 Der shRNA-Knockdown von *Irf8* in naiven T-Zellen erhöht die Anzahl an TBET<sup>+</sup> und IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen unter Th1 polarisierenden Bedingungen

Neben der Überexpression von *Irf8* wurde außerdem der Effekt eines Knockdowns von *Irf8* auf die Anzahl der apoptotischen Zellen, auf den Transkriptionsfaktor TBET und auf die Zytokine IFN $\gamma$  und GM-CSF durchflusszytometrisch analysiert (s. Abbildung 26 rechts). Der shRNA-Knockdown von *Irf8* (pAd-Irf8sh) begünstigte die Entstehung von TBET<sup>+</sup> und IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen im Vergleich zur control shRNA (pAd-controlsh). Die Frequenz an TBET<sup>+</sup> Zellen stieg von 70 auf 76 % (s. Abbildung 26b) und die Frequenz an IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen von 32 auf 42 % (s. Abbildung 26c). Tendenziell wurde außerdem ein Anstieg der GM-CSF<sup>+</sup> Zellen und der apoptotischen Zellen dokumentiert.

Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse des adenoviralen Gentransfers den suppressiven Effekt von IRF8 in der *in vitro* Differenzierung von Th1 Zellen. Sowohl in den polarisierten Th1 Zellen der *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäuse als auch in den mit *Irf8* shRNA adenoviral-transfizierten Th1 Zellen wurde ein Anstieg der TBET<sup>+</sup>, IFN $\gamma$ <sup>+</sup> und GM-CSF<sup>+</sup> sowie der apoptotischen Zellen dokumentiert. Hingegen führte eine Überexpression von *Irf8* zum entgegengesetzten Effekt; die Zellen wiesen eine verminderte Anzahl an TBET<sup>-</sup>, IFN $\gamma$ <sup>-</sup> und GM-CSF-Produzenten sowie weniger apoptotische Zellen auf.

### 2.3.3.4 Die Überexpression von *Irf8* in naiven T-Zellen verringert die Anzahl an FOXP3<sup>+</sup> Zellen unter iTreg polarisierenden Bedingungen

Abschließend wurde der Effekt einer Überexpression von *Irf8* auf die Frequenz von FOXP3<sup>+</sup> Zellen analysiert. Hierfür wurden die mit *Irf8* adenoviral-transduzierten Zellen für 3 Tage unter suboptimalen iTreg polarisierenden Bedingungen (geringer T-Zellrezeptor-Stimulus und geringe Konzentration an TGF $\beta$ ) kultiviert. Nach intrazellulärer Färbung wurde die Frequenz der FOXP3-Produzenten durchflusszytometrisch bestimmt. Die Überexpression von *Irf8* (pAd-Irf8) führte zur Verminderung der FOXP3<sup>+</sup> Zellen von 45 auf 29 % im Vergleich zum Leervektor (pAd) (s. Abbildung 27). In drei unabhängigen Versuchen erwies sich dieser Effekt als signifikant ( $p = 0,0407$ ).



**Abbildung 27: Die Überexpression von *Irf8* verringert die Frequenz an FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen unter iTreg polarisierenden Bedingungen.** Naive T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) aus den Lymphknoten und der Milz von DO11.10CAR Mäusen wurden mit adenoviralem Überstand für eine Stunde transduziert und im Anschluss *in vitro* für 3 Tage unter iTreg polarisierenden Bedingungen kultiviert. Die Frequenz der FOXP3<sup>+</sup> Zellen wurde nach intrazellulärer Färbung durchflusszytometrisch bestimmt (n=3). Die Zellen wurden auf transduzierte (GFP<sup>+</sup>), CD4<sup>+</sup> und lebende Zellen gated. Als statistischer Test diente der t-Test mit  $P < 0,05$  (\*),  $P < 0,01$  (\*\*) und  $P < 0,001$  (\*\*\*).

Abschließend ist festzuhalten, dass IRF8 einen signifikanten Einfluss auf die *in vitro* und *in vivo* Differenzierung von Th1 und Treg Zellen ausübt. Jedoch scheinen die *in vitro* und *in vivo* Effekte entgegengesetzt zu sein.

## 3. Diskussion

### 3.1 Die integrative Netzwerkanalyse ist ein nützliches Werkzeug zur Beschreibung von T-Helferzell-Differenzierungsprozessen

In den letzten Jahren stieg der Einsatz von integrativen Netzwerkanalysen in der Biologie mit unterschiedlichen Anwendungsbereichen (Subramanian et al., 2015). Dies zeigte, dass die Datenintegration ein nützliches Werkzeug für die Beschreibung von neuen komplexen biologischen Mechanismen ist. In dieser Arbeit diente die integrative Netzwerkanalyse für ein besseres Verständnis der Th1 und Th2 Differenzierung, die mit der Pathogenese von verschiedenen immun-vermittelten Krankheiten assoziiert sind (Romagnani, 1996). Für die Identifizierung von weichenstellenden Transkriptionsfaktoren in der Differenzierung von Th1 und Th2 Zellen wurde der generierte Transkriptom-Datensatz der T-Helferzellen mit publizierten globalen Genexpressions- und DNA-bindenden Datensätzen von Th1 und Th2 Zellen aus WT und *Stat4* bzw. *Stat6* KO Mäusen integriert. Als Ergebnis der integrativen Netzwerkanalyse wurde ein Netzwerk um den Transkriptionsfaktor STAT4 für Th1 Zellen und STAT6 für Th2 Zellen konstruiert, welche in der Differenzierung von Th1 und Th2 Zellen eine zentrale Rolle spielen (Yamane and Paul, 2013).

Die erste Auswertung zeigte, dass die Netzwerke wichtige Gene für die Subtyp-spezifische Differenzierung wie die Master Transkriptionsfaktoren, Subtyp-spezifische Oberflächenrezeptoren sowie Zytokine enthalten und diese positiv durch STAT6 bzw. STAT4 reguliert werden. Zusätzlich sind im Netzwerk die Mastertranskriptionsfaktoren anderer T-Helferzell-Subpopulationen repräsentiert und negativ durch STAT6 reguliert. Dies spricht für die Richtigkeit der erstellten Netzwerke.

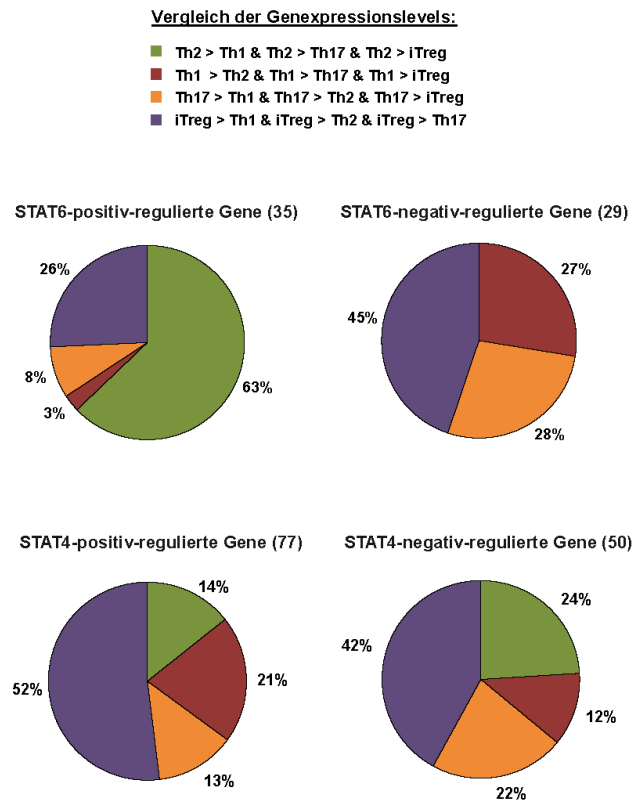
Für die Validierung der Netzwerke wurde des Weiteren eine spezifische Analyse der STAT4- und STAT6-regulierten Gene hinsichtlich der Expressionspräferenz in T-Helferzellen sowie der Bekanntheit der identifizierten Transkriptionsfaktoren zur Identifizierung von neuen richtungsweisenden Transkriptionsfaktoren für die T-Helferzell-Differenzierung vorgenommen.

#### 3.1.1 Die Mehrheit der STAT6-regulierten Transkriptionsfaktoren wird präferenziell in Th2 Zellen exprimiert

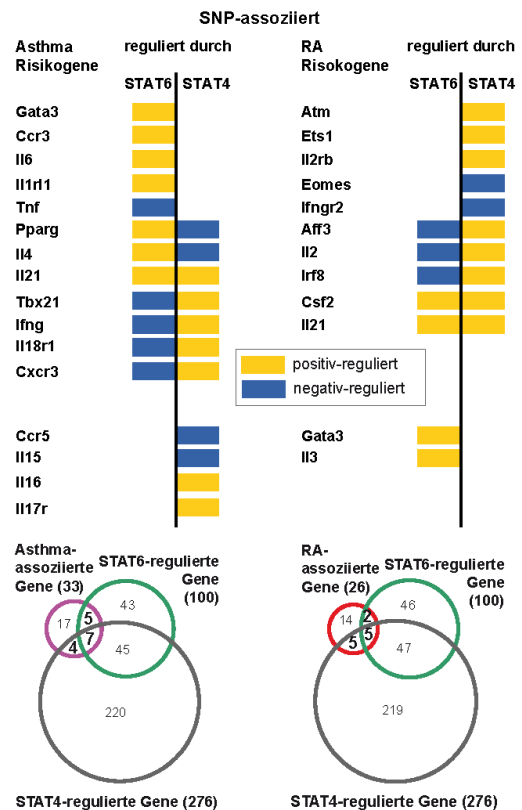
Für die Validierung der Th2-Spezifität des STAT6-Netzwerkes und der Th1-Spezifität des STAT4-Netzwerkes wurde die präferenzielle Genexpression in T-Helferzellen der 100 STAT6-regulierten sowie der 276 STAT4-regulierten Transkriptionsfaktoren, Zytokine und Zytokinrezeptoren studiert. Die Vermutung liegt nahe, dass STAT6- bzw. STAT4-positiv-regulierte Gene eine höhere Expressionspräferenz in Th2 bzw. Th1 Zellen haben im Vergleich zu den STAT6- bzw. STAT4-negativ-regulierten Genen. Um dies zu überprüfen, wurden die Genexpressionslevels für die identifizierten STAT6- und STAT4-regulierten Gene in 10-Tagen *in vitro* differenzierten Th1, Th2, Th17 und iTreg Zellen (Wei et al., 2009) verglichen. Die Analyse ergab 64 STAT6-regulierte und 127 STAT4-regulierte Gene, die präferenziell in einem T-Helferzell-Subtyp exprimiert werden (s. Abbildung 28a). Nach ihrer Expressionspräferenz wurden die Gene in Th1- (rot in Abbildung 28a), Th2- (grün), Th17- (gelb) und

iTreg-Subtyp-spezifisch (lila) exprimierte Gene eingeteilt und nach STAT6- (35) bzw. STAT4-positiv-regulierte (77) und STAT6- (29) bzw. STAT4-negativ-regulierte Gene (50) unterschieden.

a) Expressionspräferenz von Th-Zell-Subtyp-spezifischen Genen in den STAT6- oder STAT4-regulierten Genen



b) STAT6- und STAT4-regulierte Gene sind mit Asthma- und RA-Risikogenen assoziiert



**Abbildung 28: STAT6-positiv-regulierte Gene sind für den Th2 Phänotyp spezifisch und STAT6 sowie STAT4-regulierte Gene sind mit Th2-spezifischen bzw. Th1-spezifischen Erkrankungen assoziiert.**

a) Expressionspräferenz von T-Helferzell-Subtyp-spezifischen Genen in den STAT6- oder STAT4-regulierten Genen. Das Genexpressionslevel der 100 STAT6- und 276 STAT4-regulierten Gene wurde in 10-Tagen *in vitro* differenzierten Th1, Th2, Th17 und iTreg Zellen verglichen. Gene, die eine Präferenz für Th2 Zellen haben (Th2 > Th1 und Th2 > Th17 und Th2 > iTreg), wurden 1,4-mal ( $\log_2FC > 0,5$ ) mehr in Th2 Zellen als in Th1, Th17 und iTreg Zellen exprimiert. Gene, die eine Präferenz für Th1 (Th1 > Th2 und Th1 > Th17 und Th1 > iTreg), Th17 (Th17 > Th1 und Th17 > Th2 und Th17 > iTreg) und iTreg (iTreg > Th1 und iTreg > Th2 und iTreg > Th17) Zellen haben, wurden in analoger Weise selektiert. 64 der 100 STAT6- und 127 der 276 STAT4-regulierten Gene erfüllten diese Kriterien und wurden im Kreisdiagramm dargestellt und nach STAT6- bzw. STAT4-positiv- und STAT6- bzw. STAT4-negativ-regulierten Genen unterschieden. b) STAT6- und STAT4-regulierte Gene sind mit Asthma- und Rheuma-Risikogenen assoziiert. Unten: Schnittmenge der STAT6- und STAT4-regulierten Gene mit SNP-assoziierten Asthma- bzw. Rheuma-Risikogenen, die für Transkriptionsfaktoren, Zytokine oder Zytokinrezeptoren kodieren. Oben: Asthma- (links) bzw. Rheuma-Risikogene (rechts) in den STAT6-regulierten Genen in Th2 Zellen oder in den STAT4-regulierten Genen in Th1 Zellen und deren Regulation der Expression durch STAT6 oder STAT4 (gelb = positiv-reguliert; blau = negativ-reguliert).

Wie das Kreisdiagramm in Abbildung 28a zeigt, wird mit 63 % die Mehrheit der STAT6-positiv-regulierten Gene präferenziell in Th2 Zellen exprimiert. Außerdem befinden sich in den STAT6-negativ-regulierten Genen keine Th2-Subtyp-spezifisch exprimierten Gene. Zu der Differenzierung der Th2 Zellen scheint die iTreg Differenzierung in größter Konkurrenz zu stehen. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass sowohl die Differenzierung der Th2 als auch die iTreg Zellen durch einen sub-optimalen T-Zellrezeptor-Stimulus begünstigt werden (Zhu and Paul, 2008; Oliveira et al., 2011). Mit 26 % sind von den STAT6-positiv-regulierten Genen relativ viele Gene iTreg-Subtyp-spezifisch ex-

primiert. Jedoch ist auf der anderen Seite von den STAT6-negativ-regulierten Genen die Mehrheit der Gene iTreg-Subtyp-spezifisch.

Für die Th1 Zellen ergibt sich nicht so ein klares Bild. Von den STAT4-positiv-regulierten Genen ist mit 52 % die Mehrheit der Gene iTreg-Subtyp-spezifisch. Wohingegen nur 21 % der Gene von den STAT4-positiv-regulierten Genen auch Th1-Subtyp-spezifisch sind. Jedoch sind wiederum mit 42 % die meisten Gene von den STAT4-negativ-regulierten Genen iTreg-Subtyp-spezifisch. Und mit 12 % befinden sich in den STAT4-negativ-regulierten Genen am wenigsten Th1-Subtyp-spezifisch exprimierte Gene.

Diese erste Beobachtung validiert die Th2-Spezifität des STAT6-Netzwerkes und zeigt, dass Th2-spezifische Gene durch STAT6 hochreguliert werden im Gegensatz zur Herunterregulierung von Genen, die mit der Th1, Th17 oder iTreg Differenzierung assoziiert werden. Für das STAT4-Netzwerk in den Th1 Zellen konnte solch eine Spezifität nicht dokumentiert werden. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass der Transkriptionsfaktor STAT1 neben STAT4 eine entscheidende Rolle in der Induktion der Th1 Differenzierung spielt und bei der Analyse nicht berücksichtigt wurde.

### **3.1.2 Die Mehrheit der STAT6- bzw. STAT4-positiv-regulierten Transkriptionsfaktoren sind Aktivatoren für die Th2- bzw. Th1 Differenzierung oder Repressoren für die Differenzierung der anderen T-Helferzell-Subtypen**

Es ist allgemein bekannt, dass für die Erreichung eines vollständigen Differenzierungsprozesses ein komplexes Netzwerk aus Transkriptionsfaktoren erforderlich ist und dass diese Transkriptionsfaktoren als Aktivatoren oder als Repressoren agieren können (Novershtern et al., 2011). Für die Identifizierung von weichenstellenden Transkriptionsfaktoren in der Differenzierung von Th1 bzw. Th2 Zellen wurde im nächsten Schritt die Funktion der STAT6- und STAT4-regulierten Transkriptionsfaktoren studiert. Hierfür wurden die 100 STAT6- und die 276 STAT4-regulierten Gene nach Transkriptionsfaktoren gefiltert und eine Literaturrecherche bezüglich der Funktion dieser Transkriptionsfaktoren in Differenzierungsprozessen durchgeführt. Der Fokus lag hierbei auf den Genen, die eine direkte Bindung von STAT4 in Th1 Zellen (62) bzw. von STAT6 in Th2 Zellen (32) zeigten. Die jeweilige Funktion der Transkriptionsfaktoren in Differenzierungsprozessen ist in Tabelle 28 (s. Anhang) für die STAT6-gebundenen und STAT6-regulierten sowie in Tabelle 29 (s. Anhang) für die STAT4-gebundenen und STAT4-regulierten Gene zusammengefasst dargestellt. In Abhängigkeit der Funktion im Differenzierungsprozess wurden die Transkriptionsfaktoren in 3 Gruppen eingeteilt: (1) assoziiert mit der Differenzierung von Th1 (für STAT4-regulierte) bzw. Th2 Zellen (für STAT6-regulierte), (2) assoziiert mit der Differenzierung anderer T-Helferzell-Subtypen und (3) nicht assoziiert mit der Differenzierung von T-Helferzellen. Im STAT6-Netzwerk sind 6 Transkriptionsfaktoren mit der Differenzierung von Th2 Zellen assoziiert, während im STAT4-Netzwerk 11 Transkriptionsfaktoren mit der Differenzierung von Th1 Zellen verbunden sind. Insgesamt wurden 15 Transkriptionsfaktoren im STAT6- und 22 im STAT4-Netzwerk identifiziert, die nicht im direkten Zusammenhang mit der Differenzierung ihres Subtyps aber mit der anderer T-Helferzell-Subtypen stehen. Außerdem wurden 11 STAT6- und 29 STAT4-regulierte Transkriptionsfaktoren identifiziert, für die noch keine Funktion in der Differenzierung von T-Helferzellen beschrieben wurde (s. 3.1.5). Die erste Auswertung der Literaturrecherche zeigte, dass die Mehrheit der STAT6- bzw. STAT4-positiv-regulierten Transkriptionsfaktoren Aktivatoren für die Th2 bzw. Th1 Differenzierung oder Repressoren für die Differenzierung der jeweils anderen T-Helferzell-Subtypen und somit Th2- bzw. Th1-spezifisch sind.

Das STAT6-Netzwerk deklariert 6 Transkriptionsfaktoren, die als Aktivatoren der Th2 Differenzierung agieren und positiv durch STAT6 reguliert werden: *Gata3*, *Atf3*, *Satb1*, *Nfil3*, *Maf* und *Pparg*. Für *Atf3* und *Satb1* wurde gezeigt, dass deren Expression durch IL4 induziert wird (Chen et al., 2003c; Ahlfors et al., 2010). Zusätzlich koordiniert SATB1 die Differenzierung von Th2 Zellen durch Erhöhung der Expression von *Gata3* (Notani et al., 2010). Des Weiteren erhöhen SATB1, NFIL3, MAF und PPARG die Expression des Th2-spezifischen Zytokins *Il4* (Ribeiro de Almeida et al., 2009; Kashiwada et al., 2011; Lai et al., 2012; da Rocha Junior et al., 2013; Kwon et al., 2014). Neben dem positiven Effekt auf die Th2 Differenzierung unterdrückt NFIL3 zusätzlich die Entstehung von Th17 Zellen durch direktes Binden des *Rorc* Promotors (Yu et al., 2013). PPARG agiert auch als Repressor für die Th17 und Th1 Differenzierung durch Verringerung der IFN $\gamma$ -Produktion in Splenozyten (da Rocha Junior et al., 2013). Weitere identifizierte STAT6-positiv-regulierte Repressoren für die Differenzierung von Th1, Th17 und iTreg Zellen sind z. B. *Ar*, *Stat3*, *Hif1a* und *Etv6*. Während AR die Differenzierung von Th1 Zellen und den IL12-Signalweg durch Hochregulierung von *Ptpn1* inhibiert (Kissick et al., 2014), führt die Aktivierung von STAT3 und HIF1 $\alpha$  zur Verminderung der iTreg Differenzierung (Laurence et al., 2012; Palazon et al., 2014). Des Weiteren ist ETV6 als Repressor der Th17 Zellen bekannt (Ciofani et al., 2012).

Im STAT4-Netzwerk sind 10 Transkriptionsfaktoren enthalten, die als Aktivatoren in der Th1 Differenzierung agieren (z. B. *Tbx21*, *Egr2*, *Atf3*, *Twist1*, *Irf8* und *Runx3*). Während EGR2 wichtig für die *Tbx21* Expression ist (Du et al., 2014), verstärkt ATF3 die Aktivität des *Il1g* Promotors durch Komplektion mit JUN (Filen et al., 2010) und RUNX3 die IFN $\gamma$ -Produktion (Zhu and Paul, 2010b). TWIST1 hingegen inhibiert die IFN $\gamma$ -Produktion (Pham et al., 2012), fördert aber gleichzeitig das Überleben von Th1 Zellen (Haftmann et al., 2015). Für IRF8 ist bekannt, dass er die Entstehung von Th1 Zellen durch Modulation der Funktion von APCs unterstützt (Zhang et al., 2012) und die Differenzierung von Th17 Zellen reprimiert (Ouyang et al., 2011). Des Weiteren sind EGR2 durch Inhibierung der BATF-Aktivierung (Miao et al., 2013) und TWIST1 (Pham et al., 2013) als Repressoren für Th17 Zellen bekannt, während RUNX3 (Zhu and Paul, 2010b) und RELA (Casolaro et al., 1995) die Expression des Th2-spezifischen Zytokins *Il4* reprimieren. Weitere identifizierte STAT4-positiv-regulierte Repressoren für die Differenzierung von Th17 und iTreg Zellen sind z. B. *Etv6*, *Nr2f6*, *Srebf1*, *Foxo1*, *Satb1* und *Sp3*. Während ETV6 (Ciofani et al., 2012), NR2F6 (Hermann-Kleiter et al., 2008), FOXO1 (Wu et al., 2013) und SREBF1 (Cui et al., 2011) als Th17-Repressoren beschrieben wurden, reprimieren SATB1 (Grzanka et al., 2013) und SP3 (Eckerstorfer et al., 2010) die Expression von *Foxp3* und somit die iTreg Differenzierung.

Eine weitere Schlussfolgerung der Literaturrecherche ist, dass die Mehrheit der STAT6- bzw. STAT4-negativ-regulierten Transkriptionsfaktoren als Aktivatoren für die Differenzierung der jeweils anderen T-Helferzell-Subtypen agieren. So wird die Expression z. B. von *Irf1*, *Irf8*, *Nfatc3*, *Pou2af1* und *Klf2* in Th2 Zellen durch STAT6 negativ-reguliert. NFATC3 (Rengarajan et al., 2002; Chen et al., 2003a), IRF1 und IRF8 (Zhang et al., 2012) verstärken die Differenzierung von Th1 Zellen, POU2AF1 (Yosef et al., 2013) und RORA (Yi et al., 2012) fördern die Th17 Differenzierung und KLF2 ist wichtig für die Generation von iTreg Zellen (Pabbisetty et al., 2014). Im Gegensatz zu den Th2 Zellen werden in den Th1 Zellen weitaus weniger Transkriptionsfaktoren durch STAT4 herunterreguliert (z. B. *Nr1d1*, *Rarg* und *Klf2*). Während NR1D1 die Entstehung von Th17 Zellen fördert (Yu et al., 2013), sind KLF2 und RARG (Wei et al., 2009) für die Differenzierung von iTreg Zellen essentiell.

Die Literaturrecherche validiert die Aussagekraft der Netzwerke und manifestiert die Th2-Spezifität für das STAT6 und die Th1-Spezifität für das STAT4 Netzwerk.

### 3.1.3 Die Differenzierung von Th1 und Th2 Zellen verläuft plastisch und wird aktiv durch Aktivatoren gesteuert

Die Literaturrecherche offenbarte, dass die Induktion der Th1 bzw. Th2 Differenzierung hauptsächlich durch Aktivatoren (s. 3.1.2) moduliert und nicht prinzipiell durch Repressoren unterdrückt wird. So existieren im STAT4-Netzwerk keine Repressoren für die Th1 Differenzierung, die aktiv durch STAT4 herunterreguliert werden. Im STAT6-Netzwerk wurden lediglich IRF1 (Elser et al., 2002) und NFATC3 (Rengarajan et al., 2002; Chen et al., 2003a) als Repressoren für das Th2-Zytokin *Il4* in den STAT6-negativ-regulierten Transkriptionsfaktoren identifiziert.

Trotz der aktiven Induktion und Differenzierung von T-Helferzellen ist bekannt, dass die T-Helferzell-Subtypen plastisch bleiben und die Möglichkeit bewahren, auf spontane Veränderungen im Organismus zu reagieren und sich in einen anderen Subtyp umzuwandeln bzw. Subtyp-unspezifische Zytokine zu produzieren und einen Mischphänotyp anzunehmen (Zhou et al., 2009; O'Shea and Paul, 2010; Zhu and Paul, 2010a). Die Vermutung liegt nahe, dass die Plastizität der Th1 und Th2 Zellen zum einen durch Regulation der Expression von Repressoren, die die Differenzierung der jeweils anderen T-Helferzell-Subtypen reprimieren, aufrechterhalten werden kann. Diese STAT6 bzw. STAT4-positiv-regulierten Repressoren wurden bereits im Detail unter 3.1.2 beschrieben. Zum anderen scheint es so, dass die Plastizität durch die Expression von Aktivatoren, die die Differenzierung der jeweils anderen T-Helferzell-Subtypen fördern, bewahrt werden kann. So wird z. B. die Expression der Th1-Aktivatoren *Irf7* (Honda et al., 2005; Lohoff and Mak, 2005) und *Stat2* (Farrar et al., 2000) sowie der Th17-Aktivatoren *Batf* (Schraml et al., 2009; Ciofani et al., 2012), *Stat3* (Zhu and Paul, 2010b), *Hif1a* (Palazon et al., 2014) und *Crem* (Koga et al., 2014) durch STAT6 in den Th2 Zellen erhöht. In den Th1 Zellen wird hingegen die Expression der Th17-Aktivatoren *Usf1* (Ratajewski et al., 2012), *Smad3* (Zhu and Paul, 2010b) und *Hif1a* (Palazon et al., 2014) sowie der iTreg-Aktivatoren *Nfat5* (Li et al., 2014) und *Smad3* (Zhu and Paul, 2010b) durch STAT4 hochreguliert. Außerdem erhöht STAT4 in den Th1 Zellen die Expression des Transkriptionsfaktors *Nfe2l2*, der die Produktion der Zytokine IL4, IL5 sowie IL13 induziert und somit ein Th2-Aktivator ist (Rockwell et al., 2012). Für die Aufrechterhaltung der Plastizität der Th1 Zellen spricht außerdem, dass STAT4 die Expression des Transkriptionsfaktor *Fosl2*, der als Regulator der T-Helferzell-Plastizität bekannt ist (Ciofani et al., 2012), hochreguliert.

Zusätzlich zeigte die Analyse der Expressionspräferenzen der STAT6-positiv-regulierten Gene, dass die Mehrheit der Gene in Th2 Zellen differenziell hochreguliert wird. Für Th1 Zellen konnte solch ein Zusammenhang nicht dokumentiert werden. Dies lässt vermuten, dass die Differenzierung der Th1 Zellen nach dem T-Zellrezeptor-Stimulus als Grundprogramm abläuft und die der Th2 Zellen aktiv gesteuert wird z. B. über das vorherrschende Zytokin-Milieu. Experimentelle Befunde sprechen ebenfalls dafür, da naive T-Zellen auch ohne Vorhandensein des spezifischen Th1-Zytokin-Milieus nur unter T-Zellrezeptor-Stimulation zu Th1 Zellen differenzieren, während die Differenzierung der Th2 Zellen IL4 erfordert.

### 3.1.4 STAT6- und STAT4-regulierte Gene sind Asthma- und Rheuma-Risikogenen assoziiert

Die Literaturrecherche manifestiert, dass das hier beschriebene Vorgehen der integrativen Netzwerkanalyse ein nützliches Werkzeug zur Beschreibung von biologischen Prozessen ist. Nun stellte sich die Frage, ob die integrative Datenanalyse auch eine diagnostische Aussagekraft durch Identifikation von

krankheitsassoziierten Genen liefern kann. Es ist bekannt, dass hyper-aktivierte CD4<sup>+</sup> T Zellen wesentlich zu der Pathogenese von verschiedenen Allergien und Autoimmunerkrankungen einschließlich Asthma und Rheumatischer Arthritis (RA) beitragen. Allergisches Asthma wird insbesondere mit einer Infiltration von Th2 Zellen in der Lunge assoziiert, wohingegen RA mit einer Infiltration von Th1 Zellen in den Gelenke verbunden wird (Dolhain et al., 1996; Kay, 2001). Basierend auf dieser Tatsache würde man eine Anreicherung von Asthma-Risikogenen in den STAT6-regulierten und von RA-Risikogenen in den STAT4-regulierten Genen vermuten. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden die STAT6- und STAT4-regulierten Gene mit publizierten Asthma- und RA-Risikogenen integriert (Abbildung 28b).

In den vergangenen Jahren wurden verschiedene krankheitsassoziierte Gene mittels genomweiter SNP-Assoziationsstudien entdeckt. Renkonen und seine Kollegen veröffentlichten eine Liste mit 125 Asthma-assoziierten Genen (Renkonen et al., 2010) und Okada und seine Kollegen identifizierten 98 Kandidaten-Gene, die mit RA assoziiert werden (Okada et al., 2014). Um die Verteilung der Asthma- und RA-Risikogene in den STAT6- und STAT4-regulierten Genen zu analysieren, wurden die Risikogene wiederum nach Transkriptionsfaktoren, Zytokinen und Zytokinrezeptoren gefiltert (Microarray Daten von den T-Helferzellen) (Wei et al., 2009). Im Anschluss wurden die resultierenden 33 Asthma- (magenta markiert in Abbildung 28b) und 26 RA-Risikogene (rot markiert) mit den 100 STAT6-regulierten (grün markiert) und den 276 STAT4-regulierten Genen (grau markiert) verglichen.

Die Analyse zeigte, dass 12 von den 100 STAT6-regulierten Genen in den Th2 Zellen mit Asthma assoziiert sind. 7 sind positiv und 5 negativ durch STAT6 reguliert. Die STAT6-positiv-regulierten Asthma-Risikogene (*Gata3*, *Ccr3*, *Il6*, *Il4*, *Il21*, *Il1rl1* und *Pparg*) sind hauptsächlich Th2-Subtyp-spezifisch und werden präferenziell in Th2 Zellen exprimiert (Microarray Daten von den T-Helferzellen) (Wei et al., 2009). Im Gegensatz dazu sind die STAT6-negativ-regulierten Asthma-Risikogene (*Tbx21*, *Ifng*, *Tnf*, *Il18r1* und *Cxcr3*) Th1-Subtyp-spezifisch. Entgegen den Erwartungen befanden sich unter den STAT4-regulierten Genen in den Th1 Zellen auch 11 Asthma-Risikogene. Jedoch wiesen diese Gene in den meisten Fällen eine entgegengesetzte Regulation der Expression durch STAT4 im Vergleich zu STAT6 auf. Ähnliches gilt für das STAT4 Netzwerk, in dem insgesamt 10 (z. B. *Irf8*, *Aif3*, *Eomes*, *Ifngr2* und *Csf2*) von 276 STAT4-regulierten Genen in den Th1 Zellen mit RA-assoziiert sind.

Diese Beobachtung validiert wiederum die Spezifität der Netzwerke und bestätigt, dass die Netzwerke sowohl Gene enthalten, die für die Differenzierung von Th2 (im Falle des STAT6-Netzwerkes) bzw. von Th1 Zellen (im Falle des STAT4 Netzwerkes) essentiell sind und durch STAT6 bzw. STAT4 positiv reguliert werden, als auch Gene, die für die Differenzierung eines anderen T-Helferzell-Subtyps relevant sind und deren Expression durch STAT6 bzw. STAT4 negativ reguliert wird.

### 3.1.5 Die integrative Netzwerkanalyse identifiziert bisher unbekannte Transkriptionsfaktoren für die Differenzierung von Th1 und Th2 Zellen

Ein vorrangiges Ziel der integrativen Datenanalyse war die Identifizierung von wichtigen weichenstellenden Transkriptionsfaktoren in der Differenzierung von Th1 und Th2 Zellen, um ein besseres Verständnis über die Differenzierung von T-Helferzellen zu erlangen. Neben bereits bekannten Transkriptionsfaktoren wurden für die Th2 Zellen im STAT6 Netzwerk 11 und für die Th1 Zellen im STAT4 Netzwerk 29 Transkriptionsfaktoren mithilfe der Literaturrecherche identifiziert, für die bisher noch keine Funktion in der Differenzierung von T-Helferzellen beschrieben wurde (s. Tabelle 28 und Tabel-



le 29 im Anhang). In den Th2 Zellen werden von den 11 Transkriptionsfaktoren 8 positiv (z. B. *Att5*, *Creb3l2*, *Asb2* und *Ddit3*) und 3 negativ (*Aff3*, *Pou2f2* und *Trps1*) durch STAT6 reguliert. Von den 29 Transkriptionsfaktoren in den Th1 Zellen werden 20 positiv (z. B. *Creb3l2*, *Utf1*, *Lhx6*, *Fbxw7*, *Gabpb1* und *Runx2*) und 9 negativ (z. B. *Arida*, *Bach1* und *Mga*) durch STAT4 reguliert.

Die STAT6- bzw. STAT4-positiv-regulierten Transkriptionsfaktoren sind von besonderem Interesse, da sie hauptsächlich als Aktivatoren in Th2 bzw. Th1 Zellen oder als Repressoren in den jeweils anderen T-Helferzell-Subtypen agieren und somit eine entscheidende Rolle in der Differenzierung von Th2 bzw. Th1 Zellen spielen (s. 3.1.2). Einige der identifizierten positiv-regulierten Transkriptionsfaktoren wurden bereits in Differenzierungsprozessen von anderen Zelltypen beschrieben. So spielt z. B. ATF5 als transkriptioneller Aktivator eine Rolle in der Differenzierung von Adipozyten (Zhao et al., 2014), CREB3L2 von Chondrozyten (Imamura et al., 2014; Saito et al., 2014) und UTF1 von Stammzellen (Mouallif et al., 2014). Des Weiteren wurde für LHX6 eine Funktion in der Differenzierung von neuronalen und lymphoiden Zellen im Nervensystem beschrieben (Jung et al., 2011). Außerdem wurden die Transkriptionsfaktoren FBXW7 (Onoyama et al., 2007) und GABPB1 (Zhang et al., 2008b) bereits im Zusammenhang mit dem T-Zellzyklus und der Regulation des T-Zellwachstums gebracht.

Für die Differenzierung von Th2 Zellen könnte ASB2 eine entscheidende Rolle als Aktivator spielen. ASB2 wurde bereits als Wachstumsinhibitor in myeloiden Leukämie-Zellen beschrieben (Guibal et al., 2002). Außerdem fördert ASB2 die Ubiquitinierung von NOTCH Zielgenen wie E2A (Nie et al., 2011), der bereits in humanen T Zellen als positiver Genregulator von *Gata3* beschrieben wurde (Gregoire and Romeo, 1999). Zudem belegten die Transkriptom-Analysen einen differenziellen Anstieg der Expression von *Asb2* in der frühen Phase der Th2 Differenzierung. Auf der anderen Seite könnten AFF3 und MGA eine entscheidende Rolle in der Differenzierung von Th1 Zellen spielen. AFF3 wurde bereits mit der Th1-vermittelten Krankheit RA assoziiert (Tan et al., 2010) und wird durch STAT6 negativ reguliert. MGA wird ebenfalls durch STAT6 negativ reguliert und wurde bereits als Regulator der Expression von *T-box* Genen, wozu auch *Tbx21* gehört, beschrieben (Hurlin et al., 1999).

Die integrative Netzwerkanalyse lieferte eine Liste von potenziellen Transkriptionsfaktoren, die bisher noch nicht mit der Differenzierung von T-Helferzellen in Verbindung gebracht wurden. Ein anschließendes Screening dieser Transkriptionsfaktoren hinsichtlich ihrer Funktion in der Differenzierung von T-Helferzellen muss klären, ob diese Transkriptionsfaktoren als Weichensteller agieren können.

Die Ergebnisse der integrativen Netzwerkanalyse zeigen, dass eine umfangreiche Integration von globalen Datensätzen, die unterschiedlich bezüglich ihrer (1) Quellen, (2) Formate, (3) verwendeten Analyseverfahren sowie (4) grundlegenden Aussagen sind, ein nützliches Werkzeug für die Beschreibung von neuen Zusammenhängen in komplexen biologischen Prozessen ist und als Ausgangslage für die Erforschung von neuen molekularbiologischen Grundlagen dienen kann.

## 3.2 Die Transkriptom- und integrativen Netzwerkanalysen identifizieren IRF8 als potenziellen Regulator der T-Zelldifferenzierung

Für die Identifikation von Subtyp-spezifischen und somit weichenstellenden Transkriptionsfaktoren in der Differenzierung von T-Helferzellen wurden zusätzlich zu den integrativen Netzwerkanalysen Transkriptom-Analysen der T-Helferzell-Populationen Th1, Th2, iTreg und Th0 Zellen durchgeführt.

### 3.2.1 Die Transkriptom-Analyse der T-Helferzellen identifizieren funktionell bekannte und unbekannte Subtyp-spezifische Transkriptionsfaktoren

Im Fokus dieser Transkriptom-Analyse stand die Identifikation von Transkriptionsfaktoren, die durch den Subtyp-spezifischen Zytokinstimulus differenziell in einem T-Helferzell-Subtyp induziert werden und somit potenzielle, richtungsweisende Transkriptionsfaktoren für die Differenzierung von T-Helferzellen sein könnten. Für die Identifikation dieser Transkriptionsfaktoren bietet sich eigentlich der Vergleich von aktivierten Th0 Zellen, die nur den T-Zellrezeptor-Stimulus erhalten haben, zu einem differenzierten T-Helferzell-Subtyp (Th1, Th2 oder iTreg), die zusätzlich zum T-Zellrezeptor-Stimulus auch einen spezifischen Zytokinstimulus erhalten haben, an. Jedoch zeigten Simeoni und seine Kollegen vor kurzem anhand von Transkriptom-Analysen, dass die Th0 Zellen als ein eigenständiger Subtyp angesehen werden müssen und nicht als aktivierter, undifferenzierter bzw. unpolarisierter Subtyp (Simeoni et al., 2015). Deshalb wurde in dieser Arbeit ein direkter Vergleich der Subtypen Th1, Th2 und iTreg Zellen vorgenommen. In diesem Vergleich rechnen sich die durch den T-Zellrezeptor induzierten Transkriptionsfaktoren raus, da die Polarisation dieser Subtypen in Anwesenheit eines gleich starken T-Zellrezeptor-Stimulus verlief. Der Vergleich der Transkriptome identifizierte 38 Th1-spezifische, 43 Th2-spezifische und 41 iTreg-spezifische Transkriptionsfaktoren, die in der frühen Differenzierungsphase von 5 bis 48 Stunden eine Expressionspräferenz für den jeweiligen Subtypen zeigten (s. Abbildung 5). Diese Liste an Subtyp-spezifischen Transkriptionsfaktoren beinhaltete sowohl funktionell bekannte als auch unbekannte Transkriptionsfaktoren in der Differenzierung von T-Helferzellen.

Zu den identifizierten funktionell bekannten Transkriptionsfaktoren in der Differenzierung von Th1 Zellen zählen u. a. *Tbx21*, *Stat4*, *Eomes* und *Irf1*, deren Funktionen bereits ausführlich in der Einleitung (s. 1.3.3.1) erläutert wurden. Sie zählen zu den Hauptregulatoren der IFN $\gamma$ -Produktion und werden demzufolge in Th1 Zellen im Vergleich zu Th2 und iTreg Zellen differenziell exprimiert. *Gata3*, *Nfil3*, *Satb1* und *Irf4* hingegen gehören u. a. zu den funktionell bekannten Transkriptionsfaktoren in der Differenzierung von Th2 Zellen. Neben dem Mastertranskriptionsfaktor GATA3 beeinflussen auch NFIL3 und SATB1 die IL4-Produktion (Ribeiro de Almeida et al., 2009; Kashiwada et al., 2011) wie bereits unter 1.3.3.2 beschrieben wurde. Für IRF4 wurde gezeigt, dass er die Expression von *Gata3* und *Il4* sowie des transkriptionellen Repressors *Gfi1* induziert und somit die Th2 Differenzierung fördert (Zhu et al., 2002; Shinnakasu et al., 2008). Die identifizierten funktionell bekannten Transkriptionsfaktoren wie z. B. *Foxp3*, *Stat5b*, *Foxo1* und *Runx1* fördern wiederum die Differenzierung von iTreg Zellen (s. 1.3.3.4). So beeinflussen STAT5, FOXO1 und RUNX1 die Expression des Mastertranskriptionsfaktors *Foxp3* positiv und unterstützen somit die repressive Aktivität der Treg Zellen (Burchill et al., 2007; Rudra et al., 2009; Ouyang et al., 2010).

Zu den funktionell unbekanntem Transkriptionsfaktoren in der Differenzierung des jeweiligen T-Helferzell-Subtyps gehören u. a. *Irf7*, *Irf8* und *Etv6* (Th1 Zellen), *Npas2*, *Asb2*, *Tanc2* und *Npff* (Th2 Zellen) sowie *Irf8*, *Dbp*, *Sox4*, *Nrarp* und *Mxd4* (iTreg Zellen).

Die Expression der Th2-spezifischen Transkriptionsfaktoren *Asb2* und *Tanc2* ist auch in ausdifferenzierten (10-Tage polarisierten) Th2 Zellen im Vergleich zu den anderen T-Helferzell-Subtypen stark erhöht (Wei et al., 2009). Zudem wurde im Bereich des *Asb2* Gens eine differenziell erhöhte Anzahl an H3K4me3 in Th2 Zellen gefunden, was für einen aktiven Promotor spricht (Wei et al., 2009; Vahedi et al., 2013). Dies deutet darauf hin, dass ASB2 und TANC2 sowohl für die Differenzierung als auch die Erhaltung des Th2-Subtyps essentiell sein könnten. *Npas2* und *Npff* hingegen werden in ausdifferenzierten Th2 Zellen nicht differenziell exprimiert (Wei et al., 2009) und sind somit wahrscheinlich nur für die frühe Differenzierung der Th2 Zellen essentiell. NPFF wurde außerdem bereits mit der Proliferation von T-Zellen in Verbindung gebracht (Lecron et al., 1992; Minault et al., 1995). Und NPAS2 enthält ROR *response element sites* und ist somit in der Lage, die Expression von ROR $\gamma$  and ROR Zielgene zu beeinflussen. So interagiert z. B. NPAS2 mit PROX1 in der Leber und verringert die Expression von ROR $\gamma$  and ROR Zielgenen (Takeda and Jetten, 2013). Dies deutet auf eine inhibitorische Rolle in der Differenzierung von Th17 Zellen hin.

Die identifizierten iTreg-spezifischen Transkriptionsfaktoren *Irf8* und *Nrarp* spielen vermutlich eine Rolle in der Differenzierung und Erhaltung des iTreg-Subtypes, da sie auch in ausdifferenzierten iTreg Zellen hoch differenziell exprimiert werden und im Bereich der Gene eine differenziell erhöhte Anzahl an H3K4me3 in iTreg Zellen detektiert wurde (Wei et al., 2009). *Dbp* und *Mxd4* hingegen zeigen eine differenzielle Expression in nTregs (Wei et al., 2009). Zudem vermittelt MXD4 das Überleben von T-Zellen (Vasilevsky et al., 2011). Für den Transkriptionsfaktor SOX4 wurde gezeigt, dass er durch TGF $\beta$  induziert wird und die Expression von *Gata3* negativ reguliert (Kuwahara et al., 2012). Somit scheint er als Th2-Inhibitor eine essentielle Rolle in der Differenzierung von Treg und vermutlich auch Th17 Zellen zu spielen, da *Sox4* in ausdifferenzierten Th17 und nTreg Zellen differenziell exprimiert wird (Wei et al., 2009).

Die identifizierten Th1-spezifischen Transkriptionsfaktoren *Irf8*, *Irf7* und *Etv6* werden in ausdifferenzierten Th1 Zellen nicht differenziell exprimiert (Wei et al., 2009). Somit scheinen sie nur für die frühe Differenzierungsphase von Th1 Zellen essentiell zu sein. In ausdifferenzierten T-Zellen wird *Irf8* in iTreg, *Irf7* in nTreg und *Etv6* in Th17 Zellen differenziell exprimiert. ETV6 wurde bereits als Suppressor in Th17 Zellen beschrieben (Ciofani et al., 2012). IRF8 und IRF7 scheinen hingegen eine Rolle in der Immunantwort auf virale Erreger und somit vermutlich auch in der Th1-Antwort zu spielen. Während IRF7 die Immunantwort durch Induktion von Typ I Interferonen reguliert (Honda et al., 2005; Edwards et al., 2015), fördert IRF8 direkt die Th1-Immunantwort durch Modulation der Funktion von APCs (Wu et al., 1999; Tamura et al., 2000; Aliberti et al., 2003; Tsujimura et al., 2003). Eine intrinsische Funktion von IRF8 in Th1 Zellen wurde bisher hingegen noch nicht gezeigt.

In dieser Arbeit wurde die differenzielle Expression von *Irf8* und *Etv6* in Th1 Zellen, *Npas2* in Th2 Zellen und *Irf8* und *Dbp* in iTreg Zellen überprüft und konnte auf mRNA- und Proteinebene validiert werden.

### 3.2.2 Die integrativen Netzwerkanalysen identifizierten IRF8 als potenziellen Weichensteller in der Differenzierung von Th1 Zellen

Die Transkriptom-Analysen dieser Arbeit identifizierten eine Liste von Subtyp-spezifischen Transkriptionsfaktoren in der Differenzierung von T-Helferzellen. In den im Anschluss durchgeführten integrativen Netzwerkanalysen kristallisierte sich insbesondere IRF8 als möglicher Weichensteller für die

Th1 Differenzierung heraus. Auffallend war, dass *Irf8* in Th1 Zellen durch STAT4 hoch- sowie in Th2 Zellen durch STAT6 runterreguliert wurde und sowohl STAT4 als auch STAT6 eine direkte Bindung an *Irf8* in den ChIP-Seq Daten zeigten. Zusätzlich wurde in den Th1 Zellen eine potenzielle Gen-Gen-Interaktion von *Irf8* mit dem Th1-spezifischen Zytokin *Ifng* in der Textmining Recherche gefunden. Außerdem wurde gezeigt, dass IRF8 mit der Th1-vermittelten Immunkrankheit Rheumatische Arthritis assoziiert ist. Diese Beobachtungen sprechen für eine intrinsische Rolle von IRF8 in der peripheren T-Zellaktivierung und Differenzierung von Th1 Zellen.

Zusätzlich zu IRF8 bestätigten die integrativen Netzwerkanalysen auch die Th1-Subtyp-Spezifität von ETV6 und die Th2-Subtyp-Spezifität von ASB2. Das STAT4-Netzwerk zeigte, dass STAT4 direkt an das Gen von *Etv6* bindet und dessen Expression positiv reguliert (s. Abbildung 8). In Th2 Zellen hingegen bindet STAT6 direkt an das Gen von *Asb2* und reguliert dessen Expression ebenfalls positiv (s. Abbildung 10). Eine ausführliche funktionelle Analyse von ETV6 und ASB2 in der Differenzierung von T-Helferzellen konnte im Rahmen dieser Arbeit leider nicht durchgeführt werden, da keine Knockout-Mäuse zur Verfügung standen. Jedoch konnte mithilfe eines shRNA-Knockdowns von *Etv6* gezeigt werden, dass ETV6 ein positiver Regulator der Th1-Differenzierung ist. So führte der Knockdown von *Etv6* zur signifikanten Senkung der Proteinmenge von TBET in Th1 Zellen (Daten nicht gezeigt).

### 3.3 IRF8 ist ein Regulator der T-Zelldifferenzierung

IRF8 wurde bereits als kritischer Modulator in der Differenzierung von myeloiden Zellen wie Monozyten und Granulozyten beschrieben und zeigte dabei einen Einfluss auf das Wachstum sowie das Überleben von Immunzellen (Tamura et al., 2000; Paschall et al., 2015). Zudem reguliert IRF8 die Entwicklung und Funktion von dendritischen Zellen sowie Makrophagen und übt dabei eine regulatorische Funktion auf die angeborene Immunantwort aus (Kim et al., 1999; Wu et al., 1999; Tamura et al., 2000; Wang et al., 2000; Aliberti et al., 2003; Tsujimura et al., 2003). Die in dieser Arbeit durchgeführten Transkriptom- und integrativen Netzwerkanalysen von T-Helferzellen sprechen zusätzlich für eine intrinsische Rolle von IRF8 in der peripheren T-Zellaktivierung und Differenzierung von Th1 und iTreg Zellen, die durch die molekularbiologischen Analysen in dieser Arbeit bestätigt wurde.

#### 3.3.1 Die Induktion der Expression von *Irf8* wird über den TCR sowie durch Subtyp-spezifische Zytokine in T-Helferzellen induziert

Nelson und seine Kollegen zeigten, dass *Irf8* in aktivierten, jedoch nicht in naiven T-Zellen exprimiert und durch den T-Zellrezeptor Signalweg induziert wird. Außerdem bewiesen sie, dass eine Aktivierung von T-Zellen über den Co-Stimulator CD28 allein kein *Irf8* induziert (Nelson et al., 1996). In dieser Arbeit wurde zudem gezeigt, dass die Expression von *Irf8* über den T-Zellrezeptor-Stimulus induziert wird und von der Zeit sowie Stärke des Stimulus abhängig ist. Die Stärke und Dauer des Stimulus ( $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28) korrelierte positiv mit der Induktion der Transkript- und Proteinmenge von IRF8.

Nun stellte sich die Frage, über welchen Signalweg die Expression von *Irf8* nach T-Zellrezeptor Stimulation induziert wird. Die Behandlung von naiven T-Zellen mit niedermolekularen Inhibitoren des T-Zellrezeptor Signalwegs und anschließender Kurzzeit-Stimulation der Zellen mit  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 zeigte, dass *Irf8* durch den AP1-Signalweg nach T-Zellrezeptor-Stimulation induziert wird. So senkte der spe-

zifische Inhibitor des AP1 Signalwegs U0126 (Duncia et al., 1998) die Proteinmenge von IRF8 auf ein nicht detektierbares Level. Ouyang und seine Kollegen dokumentierten ebenfalls, dass ERK-, JNK- und p38-Inhibitoren die Proteinmenge von IRF8 in Kurzzeit-stimulierten T-Zellen senken (Ouyang et al., 2011). Diese Befunde validieren, dass die Expression von *Irf8* über den AP1-Signalweg induziert wird.

Die Induktion der Expression von *Irf8* über den NF $\kappa$ B- und NFAT-Signalweg kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, da die Behandlung von T-Zellen mit dem Inhibitor CsA ebenfalls zur signifikanten Abnahme der IRF8-Proteinmenge führte. CsA wurde als nicht spezifischer Inhibitor beschrieben, der neben der Inhibition der NFAT-Aktivierung auch die Aktivierung von NF $\kappa$ B und AP1 beeinflusst (Liu et al., 1991; McCaffrey et al., 1994; Frischbutter et al., 2011).

Aufgrund des Fehlens eines spezifischen NF $\kappa$ B Inhibitors, konnte die Abhängigkeit des NF $\kappa$ B-Signalwegs in der Induktion der IRF8-Proteinmenge nicht direkt analysiert werden. Eine *in silico* Analyse des *Irf8* Promoters identifizierte jedoch gehäufte potenzielle NF $\kappa$ B Bindestellen im Promotorbereich (2 kB vor dem Transkriptionsstart) von *Irf8*. Zudem identifizierten Kanno und seine Kollegen ebenfalls eine potenzielle NF $\kappa$ B Bindestelle im regulatorischen Element des *Irf8* Gens (Kanno et al., 1993). Dies lässt vermuten, dass auch der NF $\kappa$ B-Signalweg eine Rolle in der Induktion der Expression von *Irf8* spielen könnte.

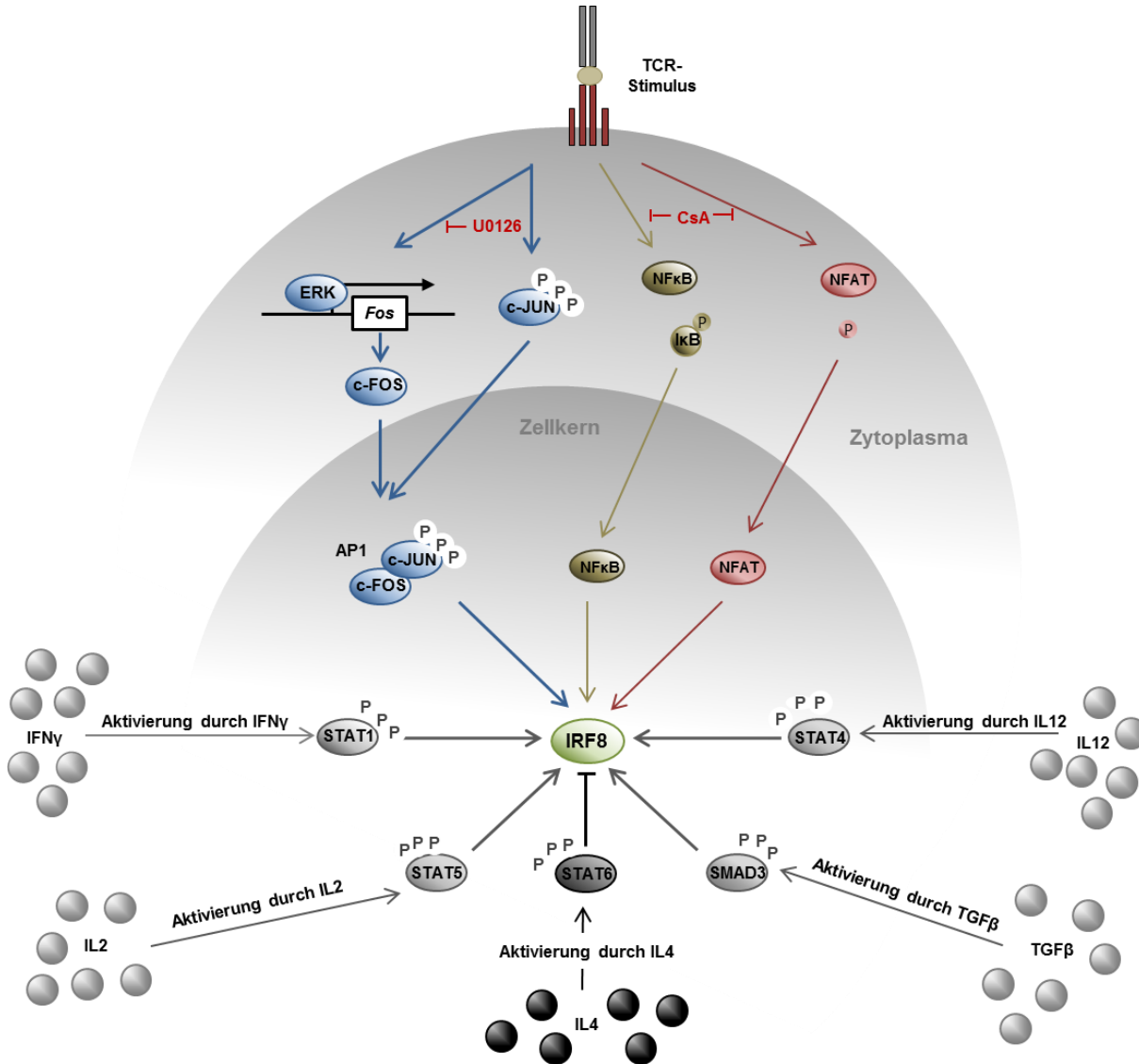
Die Abhängigkeit der *Irf8* Induktion vom NFAT-Signalweg wurde mit dem spezifischen NFAT-Inhibitor BTP1 (Frischbutter et al., 2012) in dieser Arbeit analysiert. Bei einer Konzentration von 50 nM BTP1 wurde kein signifikanter Einfluss auf die Proteinmenge von IRF8 dokumentiert. Dies spricht eigentlich dafür, dass der NFAT-Signalweg nicht an der Induktion der *Irf8* Expression beteiligt ist. Jedoch könnte die Konzentration von 50 nM des BTP1 Inhibitors zu gering gewesen sein. Um eine Abhängigkeit von den Transkriptionsfaktor NFAT ausschließen zu können, müsste der Effekt höherer Konzentrationen von BTP1 auf die Proteinnengen von IRF8 und (p)NFAT analysiert werden.

Die Transkriptom-Analysen der T-Helferzellen belegen zusätzlich, dass die Induktion von *Irf8* nicht nur über den T-Zellrezeptor Signalweg erfolgt, sondern auch durch die Subtyp-spezifischen Zytokine induziert werden muss. So stieg die Expression von *Irf8* signifikant in 48 h-polarisierten Th1 sowie iTreg Zellen im Vergleich zu Th0 Zellen, die nur den spezifischen T-Zellrezeptor Stimulus erhielten. Wohingegen die Expression von *Irf8* in 48 h-polarisierten Th2 Zellen gegenüber der in Th0 Zellen leicht verringert war. Dies lässt vermuten, dass die Expression von *Irf8* initial über den T-Zellrezeptor Signalweg erfolgt und über Subtyp-spezifische Zytokine durch die Induktion von STAT- und SMAD-Proteinen reguliert wird (s. Abbildung 29).

Die integrativen Netzwerkanalysen unterstützen die Hypothese der Induktion der Expression von *Irf8* über den IL12/STAT4-Signalweg, da STAT4 direkt an *Irf8* bindet und dessen Transkription positiv beeinflusst (s. Abbildung 6). Des Weiteren wird durch das STAT6-Netzwerk validiert, dass die Expression von *Irf8* über den IL4/STAT6-Signalweg negativ beeinflusst werden muss, da STAT6 direkt an *Irf8* bindet und dessen Transkription negativ beeinflusst (s. Abbildung 10).

Zusätzlich zeigten Driggers und seine Kollegen, dass *Irf8* hauptsächlich durch IFN $\gamma$  und nicht über die Typ I Interferone IFN $\alpha$  und IFN $\beta$ , wie es für die anderen Mitglieder der IRF-Familie typisch ist, induziert wird (Driggers et al., 1990). Die Kenntnis, dass IFN $\gamma$  über Tyrosin-Phosphorylierung STAT1 aktiviert (Darnell et al., 1994) und aktiviertes STAT1 an pIR-Elementen (pIRE: *palindromic IFN $\gamma$ -responsive element*) im Promotor von *Irf8* binden kann (Sims et al., 1993), zeigt, dass die Induktion von

*Irf8* über den IFN $\gamma$ /STAT1-Signalweg reguliert wird. Diese Tatsache wird durch Analysen der Expression von *Irf8* in *Ifng*<sup>-/-</sup> Mäusen bestätigt. So war die Induktion der Proteinmenge von IRF8 in IFN $\gamma$ -defizienten T-Zellen signifikant verringert. Dieser Effekt wurde auf das Fehlen von aktiviertem STAT1 in den *Ifng*<sup>-/-</sup> Mäusen zurückgeführt (Nelson et al., 1996). Die Tatsache, dass IFN $\gamma$ -defiziente T-Zellen nach T-Zellrezeptor Stimulation noch eine verringerte Menge an IRF8 Protein produzieren, bestätigt, dass IRF8 zusätzlich über weitere Signalwege induziert wird.



**Abbildung 29: Modell zur Induktion von *Irf8* in T-Zellen.** *Irf8* wird initial über den AP1- und vermutlich auch den NFκB- und NFAT-Signalweg nach T-Zellrezeptor-Stimulation induziert. Des Weiteren wird die Induktion von *Irf8* durch ein Th-Subtyp-spezifisches Zytokinmilieu über den IFN $\gamma$ /STAT1- sowie IL12/STAT4-Signalweg in Th1 Zellen und über den TGF $\beta$ /SMAD3- sowie IL2/STAT5-Signalweg in iTreg Zellen positiv reguliert. Zusätzlich führt die Aktivierung von STAT6 durch IL4 zur Verringerung der Induktion von *Irf8* in Th2 Zellen.

Die differenzielle Expression von *Irf8* in iTreg Zellen lässt zudem vermuten, dass *Irf8* auch über den TGF $\beta$ /SMAD3- und IL2/STAT5-Signalweg induziert wird. Für die Induktion der *Irf8* Expression durch TGF $\beta$  spricht, dass Ouyang und seine Kollegen die Expression von *Irf8* allein durch TGF $\beta$  in Abwesenheit eines T-Zellrezeptor-Stimulus induzieren konnten (Ouyang et al., 2011). Zudem wurde bereits gezeigt, dass *Irf8* während der Differenzierung von dendritischen Zellen durch TGF $\beta$  induziert wird (Ju et al., 2007). Die Rolle von IL2 in der Induktion von *Irf8* über den Transkriptionsfaktor

STAT5 wurde bisher nicht beschrieben. Jedoch liegt die Vermutung nahe, dass IL2 einen additiven Effekt in der Induktion von *Irf8* ausübt, da *Irf8* in iTreg Zellen im Vergleich zu nTreg Zellen signifikant hochreguliert ist (Wei et al., 2009). Während für die Entwicklung von nTreg Zellen nur TGF $\beta$  erforderlich ist (Liu et al., 2008), benötigt die Differenzierung von iTreg Zellen in der Peripherie TGF $\beta$  und IL2 (Chen et al., 2003b).

### 3.3.2 IRF8 fördert *in vivo* die Th1 Immunantwort über die Modulation der Funktion von APCs

Zahlreiche *in vivo* Versuche mit *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten, dass der Transkriptionsfaktor IRF8 die antiviral induzierte Th1 Immunantwort fördert und somit in der Abwehr von intrazellulären Bakterien und Viren (z. B. Listerien, *Yersinia enterocolitica*, Influenza A und Vaccinia Virus) eine essentielle Rolle spielt (Holtschke et al., 1996; Fehr et al., 1997; Giese et al., 1997; Scharton-Kersten et al., 1997). Des Weiteren weisen *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäuse eine reduzierte Expression von MHC-II Molekülen und somit möglicherweise eine verminderte Th1 Antwort auf (Yoshida et al., 2014). Dieser positive Effekt von IRF8 auf die Th1 Immunantwort wurde auch in dieser Arbeit mit einer Verminderung der Frequenz von Th1-spezifischen Gedächtnis-T-Zellen (TBET<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>) in den *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen dokumentiert. So wiesen die Gedächtnis-T-Zellen von *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäusen eine signifikante Verringerung in den TBET-, IFN $\gamma$ - und IL2-Produzenten auf, wobei die Frequenz an GATA3-Produzenten und damit an Th2-spezifischen Gedächtnis-T-Zellen unverändert blieb. Jedoch zeigte die immunologische Charakterisierung von *Irf8*<sup>-/-</sup> und WT Mäusen keine signifikanten Veränderungen in den Frequenzen der effektorischen und zentralen Gedächtnis-T-Zellen aus der Milz, den Lymphknoten und dem Blut. Dies spricht für eine Verschiebung der Immunantwort in den Gedächtnis-T-Zellen, die jedoch in dieser Arbeit nicht belegt werden konnte. Dennoch zeigten *in vivo* Versuche einen IgG Klassenwechsel von IgG2a (Th1-Antwort) zu IgG1 (Th2 Antwort) in *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen nach Influenza A Infektion (Giese et al., 1997). IgG2a wird vorrangig durch IFN $\gamma$  und IgG1 durch IL4 induziert (Snapper and Paul, 1987). Dies bestätigt, dass *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäuse eine verringerte Th1 und in manchen Fällen gleichzeitig eine erhöhte Th2 Immunantwort aufweisen.

Im experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis (EAE) Modell wurde ebenfalls der positive Effekt von IRF8 auf die Th1 Immunantwort bestätigt. EAE ist ein Mausmodell für die Multiple Sklerose. Durch Injektion von verschiedenen Proteinen wird eine inflammatorische Erkrankung des zentralen Nervensystems induziert, die durch eine Th1 und Th17 Immunantwort bedingt ist (Kroenke et al., 2008; Axtell et al., 2010). Yoshida und seine Kollegen zeigten, dass *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäuse resistent gegenüber der Entwicklung von EAE sind (Yoshida et al., 2014). Folglich weisen *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäuse eine verminderte Th1 und Th17 Antwort auf. Dieser Effekt ist jedoch auf die Expression von *Irf8* in den APCs zurückzuführen und nicht auf die in den T-Zellen. Mäuse mit einer spezifischen Deletion von *Irf8* in den T-Zellen erkrankten ebenso wie die WT Mäuse an EAE. Dies zeigt, dass die positiven Effekte von IRF8 auf die gesteigerte Th1 Immunantwort vorrangig über die Funktion der APCs modelliert werden.

In dieser Arbeit bestätigte eine *ex vivo* Kultivierung der Gedächtnis-T-Zellen aus *Irf8*<sup>-/-</sup> und WT Mäusen, dass der Effekt von IRF8 auf die Th1 Immunantwort durch APCs bedingt ist. Hierfür wurden die isolierten Gedächtnis-T-Zellen zur Entwöhnung von den APCs *ex vivo* mit  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 stimuliert und für 5 Tage in der Anwesenheit von IL2 und IL7 *ex vivo* kultiviert. Nach der *ex vivo* Kultivierung glich sich die Frequenz der IFN $\gamma$ -Produzenten in den IRF8-defizienten Zellen mit ca. 24 % denen der WT-Zellen mit ca. 30 % an. Vor der *ex vivo* Kultivierung hingegen wiesen die IRF8-defizienten Zel-

len mit 10 % signifikant weniger IFN $\gamma$ -Produzenten als die WT-Zellen mit ca. 30 % auf. Außerdem wurde nach *ex vivo* Kultivierung kein signifikanter Unterschied mehr in den Frequenzen der TBET-, IL2- und GM-CSF-Produzenten dokumentiert. Des Weiteren wurde bereits in verschiedenen Arbeiten gezeigt, dass IRF8 für die Entwicklung von IL12- und IFN $\gamma$ -produzierenden CD8 $\alpha^+$  dendritischen Zellen (Aliberti et al., 2003; Tsujimura et al., 2003) und für die Entwicklung und Reifung von IL12- (Wu et al., 1999; Tamura et al., 2000; Wang et al., 2000) sowie IL18-produzierenden (Kim et al., 1999) Makrophagen essentiell ist. Diese IL12-, IFN $\gamma$ - und IL18-produzierenden dendritischen Zellen und Makrophagen fördern die Differenzierung von Th1 Zellen und die Produktion von IFN $\gamma$ . Diese Befunde bestätigen, dass die dokumentierten Effekte in den Gedächtnis-T-Zellen von *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäusen durch die APCs bedingt sind und IRF8 somit die Th1 Immunantwort positiv über die Differenzierung von myeloiden und dendritischen Zellen beeinflusst.

Interessant ist, dass die Gedächtnis-T-Zellen von *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäusen eine signifikant höhere Frequenz an GM-CSF-Produzenten aufwiesen. Der Wachstumsfaktor GM-CSF ist wichtig für die Differenzierung von Granulozyten sowie Makrophagen (Hamilton and Anderson, 2004). Eine Deregulation in der Proteinexpression von GM-CSF wird mit autoimmunen Entzündungsreaktionen assoziiert, wie sie z. B. bei der Multiplen Sklerose und der Rheumatischen Arthritis vorkommen (Okada et al., 2014; Yoshida et al., 2014). Ebenso wird der Transkriptionsfaktor IRF8 mit Multiple Sklerose und Rheumatischer Arthritis assoziiert. Paschall und seine Kollegen dokumentierten ebenfalls einen Anstieg der GM-CSF-Produzenten in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen von *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäusen und zeigten eine deutliche Reduktion der GM-CSF Population nach retroviraler Überexpression von *Irf8* (Paschall et al., 2015). Dies spricht dafür, dass IRF8 die Expression von *Csf2* (kodiert für GM-CSF) in T-Zellen supprimiert und somit auch eine positive Rolle in der Kontrolle der Entstehung von autoimmunen Entzündungsreaktionen ausüben kann. Jedoch ist dies kontrovers zu der Beobachtung, dass IRF8 die Induktion der Th1 Immunantwort fördert, da eine erhöhte Th1 Antwort mit Autoimmunerkrankungen assoziiert wird.

Die erhöhte Zytokinexpression von GM-CSF erklärt auch die signifikant verstärkte Myeloproliferation in den *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäusen, die in dieser und anderen Arbeiten dokumentiert wurde (Holtschke et al., 1996; Tamura et al., 2000; Paschall et al., 2015). Die Myeloproliferation ist durch eine verstärkte Proliferation von myeloiden und monozytischen Vorläuferzellen und der Entwicklung eines chronisch myeloiden Leukämie-ähnlichen Syndroms charakterisiert (Holtschke et al., 1996). Johnson und seine Kollegen zeigten bereits 1989, dass eine Überexpression von *Csf2* eine Myeloproliferation in Mäusen auslösen kann, indem er *Csf2* retroviral transduzierte Knochenmarkzellen in Mäuse transplantierte (Johnson et al., 1989). Somit scheint IRF8 die Expression von kritischen Wachstumsgenen negativ zu regulieren, wie bereits am Beispiel von GM-CSF dokumentiert wurde (Paschall et al., 2015).

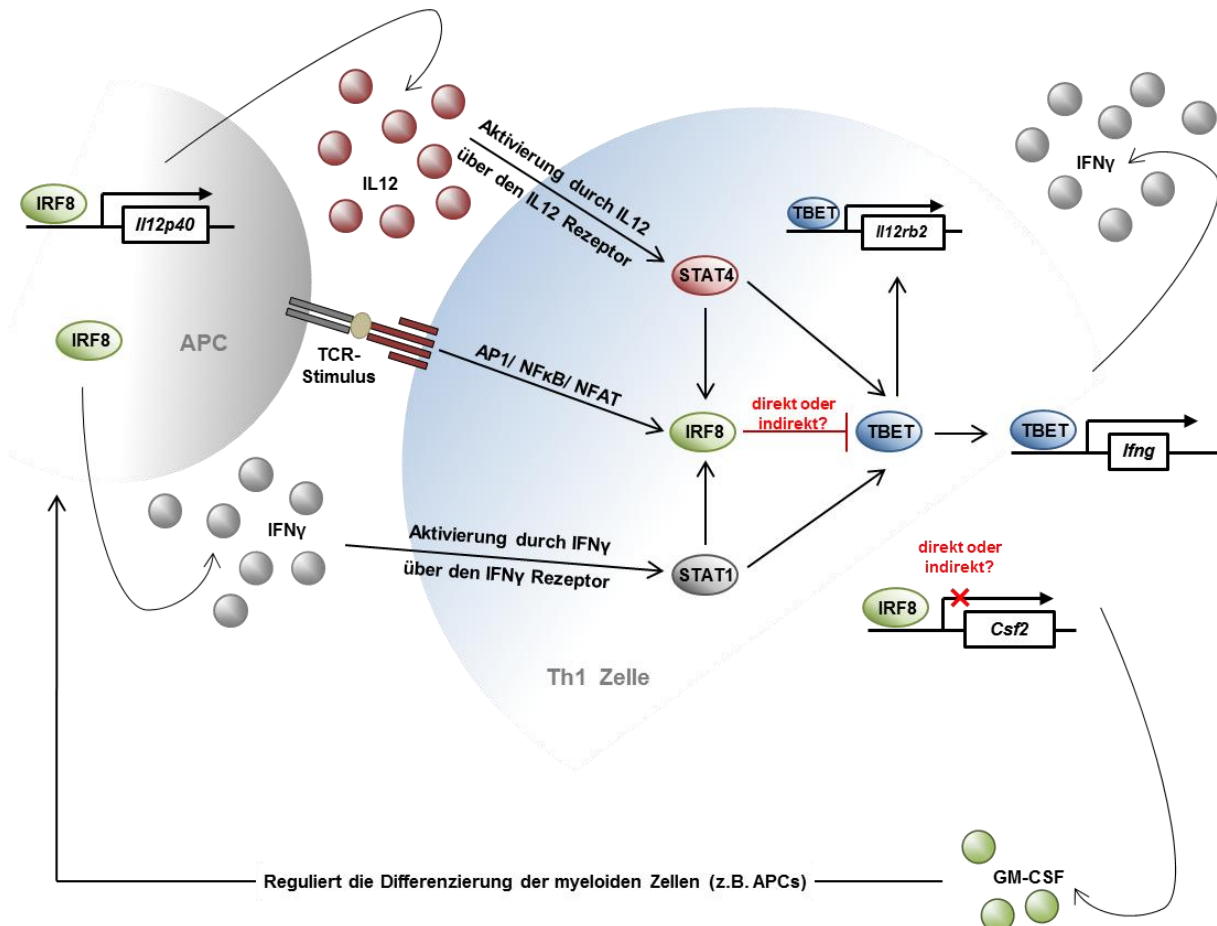
Die Ergebnisse dieser Arbeit sowie die publizierten Arbeiten zeigen, dass IRF8 *in vivo* eine wesentliche Rolle in der Th1 Immunantwort spielt. Durch Modulation der Funktion von APCs übt IRF8 eine extrinsische Funktion aus und induziert ein Zytokinmilieu, welches die Differenzierung von Th1 Zellen fördert. Außerdem reguliert IRF8 das Wachstum der myeloiden Zellen durch Repression von GM-CSF in T-Zellen und verhindert somit eine Myeloproliferation (s. Abbildung 30).

### 3.3.3 IRF8 ist ein Repressor für die *in vitro* Differenzierung von Th1 Zellen

Die *in vitro* Analysen von IRF8-defizienten Zellen zeigten, dass IRF8 auch einen intrinsischen Effekt in der Differenzierung von Th1 Zellen ausübt. Dieser Effekt ist jedoch entgegengesetzt zu den dokumen-



tierten *in vivo* Effekten, die vorrangig über die APCs modelliert werden. Unter suboptimalen Th1-polarisierenden Bedingungen begünstigte ein IRF8-Defizit *in vitro* die Entstehung von TBET-, IFN $\gamma$ - und GM-CSF-Produzenten. Durch den adenoviralen shRNA-Knockdown von *Irf8* wurden die Effekte auf die TBET- und IFN $\gamma$ -Produzenten in *in vitro* polarisierten Th1 Zellen validiert. Dem gegenüber führte die adenovirale Überexpression von *Irf8* zur Verringerung der TBET-, IFN $\gamma$ - und GM-CSF-Produzenten in *in vitro* polarisierten Th1 Zellen. Somit scheint IRF8 in Th1-Zellen eine intrinsische Repressor-Funktion zu übernehmen.



**Abbildung 30: Modell zur Rolle von IRF8 in der Differenzierung von Th1 Zellen.** Die Differenzierung einer naiven T-Zelle zu einer Th1 Zelle erfolgt nach T-Zellrezeptor-Stimulation über den IFN $\gamma$ /STAT1 Signalweg und zu einem späteren Zeitpunkt über den IL12/STAT4 Signalweg. Dies führt zur Expression des Mastertranskriptionsfaktors TBET, der an den Promotor von *Ifng* bindet und dessen Expression induziert. Der Transkriptionsfaktor IRF8 begünstigt extrinsisch die Differenzierung von Th1 Zellen, indem er die Entwicklung von IL12- und IFN $\gamma$ -produzierenden APCs fördert. Unter anderem bindet IRF8 direkt an den Promotor von *Il12p40*, eine Untereinheit des Zytokins IL12 (IL12p70 = IL12p40 + IL12p35), und induziert dessen Expression. Das von den APCs produzierte Zytokinmilieu fördert schließlich die Differenzierung von TBET und IFN $\gamma$ -produzierenden Th1 Zellen. Auf der anderen Seite agiert IRF8 in der Th1 Zelle als intrinsischer Repressor und kontrolliert somit die Th1 Immunantwort. *Irf8* wird nach T-Zellrezeptor-Stimulation über AP1, NF $\kappa$ B und NFAT sowie über die IFN $\gamma$ /STAT1 und IL12/STAT4 Signalwege induziert. Zum einen inhibiert IRF8 den Mastertranskriptionsfaktor TBET auf direktem oder indirektem Weg eventuell durch Komplexion mit anderen IRF-Proteinen wie z. B. IRF2. Somit ist IRF8 für eine moderate Induktion von IFN $\gamma$  essentiell. Zum anderen reprimiert IRF8 die Expression von *Csf2* (codiert für GM-CSF) und kontrolliert damit über die Menge von GM-CSF die Differenzierung und Entwicklung von IL12- und IFN $\gamma$ -produzierenden APCs.

Für eine intrinsische Funktion von IRF8 in Th1 Zellen sprechen verschiedene Beobachtungen. Zum einen zeigten die Transkriptom- und Western Blot-Analysen, dass *Irf8* in *in vitro* polarisierten Th1 Zellen im Vergleich zu Th0 und Th2 Zellen differenziell exprimiert wird. Die differenzielle Expression von

*Irf8* in Th1 Zellen wurde auch in verschiedenen publizierten Genexpressionsanalysen bestätigt (Hu et al., 2013a; Lee et al., 2015). Zum anderen wurde berichtet, dass *Irf8* durch das Th1-spezifische Zytokin IFN $\gamma$  über den Transkriptionsfaktor STAT1 induziert wird (Driggers et al., 1990) (s. 3.2.1). Zusätzlich wird *Irf8* vermutlich durch das ebenfalls Th1-spezifische Zytokin IL12 über den Transkriptionsfaktor STAT4 induziert. Hierfür spricht, dass die Expression von *Irf8* in *Stat4*<sup>-/-</sup> Mäusen signifikant verringert ist (Vahedi et al., 2012) und STAT4 direkt an *Irf8* bindet (Wei et al., 2010) (s. Abbildung 8).

Es ist bekannt, dass IRF8 mit IRF1 oder IRF2 komplexieren (Sharf et al., 1995) und die Genexpression von Zielgenen reprimieren kann (Paschall et al., 2015). IRF1 und IRF2 spielen eine wichtige Rolle in der Differenzierung von Th1 Zellen. Während IRF1 in der antiviralen Antwort auf Interferone involviert ist und somit die Th1 Immunantwort fördert, antagonisiert IRF2 die IRF1-vermittelten transkriptionellen Aktivierungen und inhibiert somit die Differenzierung von Th1 Zellen (Zhang et al., 2012). Unter dieser Annahme könnten IRF8 und IRF2 komplexieren, zusammen als Protein-Komplex an ISR-Elementen binden und somit die Genexpression von Zielgenen reprimieren, die wichtig für die Differenzierung von Th1 Zellen sind wie z. B. *Tbx21*. Diese Annahme würde den in dieser Arbeit dokumentierten reprimierenden Effekt von IRF8 auf die TBET-Produzenten in *in vitro* polarisierten Th1 Zellen erklären. Da TBET an den Promotor von *Irfg* bindet und dessen Expression aktiviert, würde dies folglich auch den reprimierenden Effekt von IRF8 auf die IFN $\gamma$ -Produzenten begründen.

Ouyang und seine Kollegen beschrieben bereits für IRF8 eine intrinsische Funktion als Repressor in der *in vivo* und *in vitro* Differenzierung von Th17 Zellen (Ouyang et al., 2011). Sie zeigten, dass IRF8 mit dem Mastertranskriptionsfaktor der Th17 Zellen, ROR $\gamma$ T, interagiert und die Transkription von IL17 reprimiert. Im Rahmen dieser Analysen untersuchten sie zusätzlich die Funktion von IRF8 in der Differenzierung von Th1 Zellen. Entgegen der Beobachtungen in dieser Arbeit dokumentierten sie keinen Einfluss von IRF8 auf die IFN $\gamma$ -Produzenten. Jedoch löste der Transfer von IRF8-defizienten Zellen in RAG KO Mäusen, die keine B- und T-Zellen aufweisen, eine verstärkte Colitis im Vergleich zu den WT-Zellen aus. Die Colitis ist eine inflammatorische Entzündung des Colons (Dickdarm), die durch eine Th17 und Th1 Immunantwort ausgelöst wird (Feng et al., 2011). Die durch die IRF8-defizienten Zellen induzierte Colitis wurde allerdings vorrangig mit einer Anreicherung von IL17- und nicht von IFN $\gamma$ -produzierenden CD4<sup>+</sup> Zellen assoziiert.

Wie bereits zuvor erwähnt, wurde IRF8 als Repressor von GM-CSF in CD4<sup>+</sup> T-Zellen beschrieben (Paschall et al., 2015). Diese Repressor-Funktion übt IRF8 auch in Th1 Zellen aus, da ein IRF8-Defizit in *in vitro* polarisierten Th1 Zellen zur signifikanten Erhöhung der GM-CSF Produzenten führte. Des Weiteren zeigten die 3D-Plot Analysen, dass der Anstieg der GM-CSF-Produzenten in den *in vitro* polarisierten Th1 Zellen positiv mit der Frequenz der IFN $\gamma$ -Produzenten korrelierte. Zusammen mit der Beobachtung, dass *in vitro* polarisierte IRF8-defiziente Th1 Zellen erhöhte Produzenten an GM-CSF und IFN $\gamma$  aufwiesen, spricht dies wiederum dafür, dass IRF8 sowohl die Proteinexpression von GM-CSF als auch von IFN $\gamma$  reprimiert und somit intrinsisch die Th1 Differenzierung supprimiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sowie die von anderen publizierten Daten zeigen, dass die Expression von *Irf8* spezifisch in Th1 Zellen induziert wird. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit eine intrinsische Funktion von IRF8 als Repressor in der *in vitro* Differenzierung von Th1 Zellen dokumentiert. Während IRF8 extrinsisch über Modulation der Funktion der APCs die Th1 Differenzierung fördert, supprimiert IRF8 diese intrinsisch und ist für eine moderate Induktion von IFN $\gamma$  wichtig (s. Abbildung 30). Somit scheint die intrinsische Funktion von IRF8 in den Th1 Zellen ein Gegenspieler zu der extrinsischen Funktion in den APCs zu sein. Dies lässt zudem vermuten, dass die extrinsischen und intrinsischen

Effekte von IRF8 zeitlich nacheinander stattfinden. Zu Beginn einer Infektion fördert IRF8 die Th1 Immunantwort, während IRF8 zu einem späteren Zeitpunkt die Differenzierung von Th1 Zellen supprimiert.

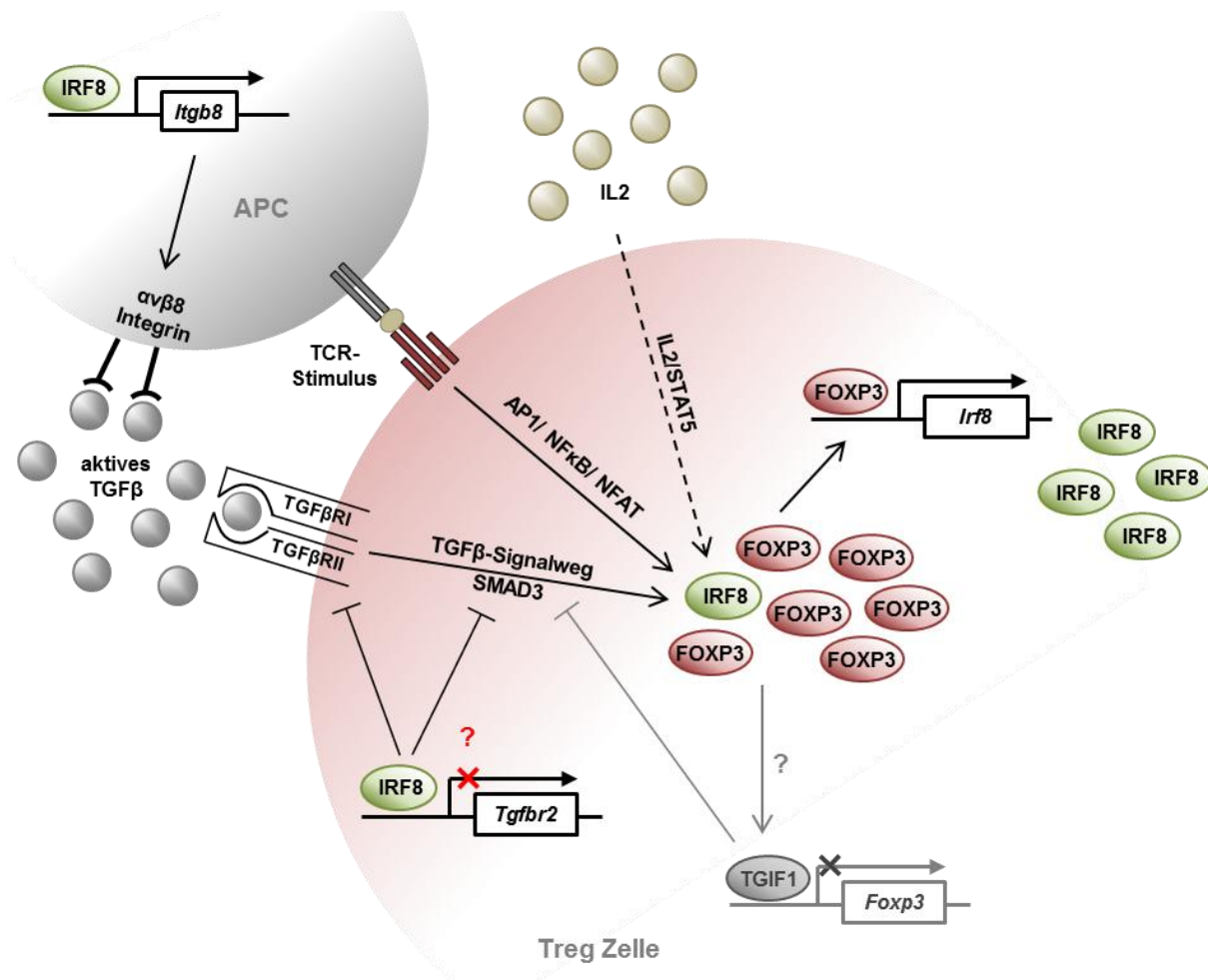
### 3.3.4 IRF8 ist ein extrinsischer Aktivator und ein intrinsischer Repressor für die Induktion und Differenzierung von Treg Zellen

Die Analysen der *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten wie im Fall der Th1 Zellen ebenfalls einen intrinsischen sowie suppressiven Effekt von IRF8 auf die Differenzierung von iTreg Zellen. So sprechen die Transkriptom-Analysen der T-Helferzellen für eine intrinsische Funktion von IRF8 in der Differenzierung von Treg Zellen, da ein Anstieg des *Irf8* Transkripts in 2-Tage polarisierten iTreg Zellen dokumentiert wurde. Die Microarray Analysen von Wei und seinen Kollegen belegten ebenfalls eine hoch signifikante differenzielle Expression von *Irf8* in 10-Tage polarisierten iTreg Zellen im Vergleich zu naiven, Th1, Th2, Th17 und nTreg Zellen (Wei et al., 2009). Dies lässt vermuten, dass *Irf8* sowohl durch TGFβ als auch durch den IL2/STAT5 Signalweg in iTreg Zellen induziert wird (s. 3.3.1).

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass IRF8 einen suppressiven Effekt auf die Differenzierung von iTreg Zellen ausübt. So begünstigte ein IRF8-Defizit die Entstehung von FOXP3-Produzenten in *in vitro* polarisierten iTreg Zellen. Gegenätzlich führte die Überexpression von *Irf8* zur Verringerung der FOXP3-Produzenten. Ouyang und seine Kollegen analysierten ebenfalls die Funktion von IRF8 in der Differenzierung von Treg Zellen. Jedoch konnten sie keinen Effekt von IRF8 auf die FOXP3-Produzenten in *in vitro* polarisierten iTreg Zellen dokumentieren (Ouyang et al., 2011). Im Gegensatz zu den iTreg-Polarisationen in dieser Arbeit verwendeten sie jedoch kein IL2, welches für die Expression von FOXP3 essentiell ist (Burchill et al., 2007) und vermutlich auch für die optimale Induktion von *Irf8* (s. o.). Dies könnte möglicherweise ein Grund für die unterschiedlichen Resultate sein. Für einen suppressiven Effekt von IRF8 in der Entstehung von Treg Zellen spricht allerdings eine Anreicherung von FOXP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen nach Transfer von IRF8-defizienten Zellen in RAG KO Mäuse im Vergleich zu den WT-Zellen (Ouyang et al., 2011).

Nun stellte sich die Frage, ob der suppressive Effekt von IRF8 auf die FOXP3 Expression direkt oder indirekt bedingt ist. Lee und seine Kollegen zeigten, dass FOXP3 die Expression von *Irf8* induziert, IRF8 selber jedoch nicht an den Promotor von *Foxp3* binden kann und die Expression von *Foxp3* nicht direkt beeinflusst (Lee et al., 2015). Somit muss IRF8 die Expression von *Foxp3* und damit die Entstehung von Treg Zellen auf einem anderen Weg beeinflussen. Die Western Blot Analysen lassen vermuten, dass IRF8 ein Modulator des TGFβ Signalwegs ist und somit die Entstehung von Treg Zellen inhibiert. Im Vergleich zu den WT-Zellen zeigten die Western Blot Analysen in *in vitro* polarisierten, IRF8-defizienten iTreg Zellen einen Anstieg des Proteingehaltes von TGFβR2 und des SMAD2/3 Komplexes, die wichtige Mediatoren des TGFβ Signalwegs sind. TGFβ ist sowohl für die Entwicklung von nTreg Zellen im Thymus (Liu et al., 2008) als auch für die Differenzierung von iTreg Zellen in der Peripherie essentiell (Chen et al., 2003b), da die Aktivierung von SMAD3 über den TGFβ Signalweg die Expression von FOXP3 induziert (Ruan et al., 2009). Gleichzeitig wurde jedoch auch ein Anstieg der Proteinmenge von TGIF1 in den IRF8-defizienten iTreg Zellen im Vergleich zu den WT-Zellen dokumentiert. TGIF1 wurde als Repressor des TGFβ-Signalweges und der *Foxp3* Expression beschrieben (Doktorarbeit Melanie Krüger, nicht publiziert). In dieser Arbeit wurde zudem gezeigt, dass TGIF1-defiziente iTreg Zellen weniger IRF8 Protein herstellen. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass TGIF1 durch die begünstigte Differenzierung von FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen in IRF8-defizienten iTreg

Zellen aktiviert wurde und somit als Gegenspieler den TGF $\beta$  Signalweg sowie die *Foxp3* Expression kontrolliert.



**Abbildung 31: Modell zur Rolle von IRF8 in der Differenzierung von Treg Zellen.** Die Differenzierung einer naiven T-Zelle zu einer Treg Zelle erfolgt nach T-Zellrezeptor (TCR) Stimulation über den TGF $\beta$ /SMAD3-Signalweg und im Fall der iTreg Zellen zusätzlich über den IL2/STAT5-Signalweg. In den APCs induziert IRF8 die Expression des Gens *Itgb8*, welches für das Integrin  $\alpha\beta 8$  kodiert. Das Integrin  $\alpha\beta 8$  ist auf der Oberfläche der APCs lokalisiert und setzt biologisch aktives TGF $\beta$  in die APC-T-Zell Kontaktstelle frei. Das aktive TGF $\beta$  führt schließlich zur erhöhten *Foxp3* Induktion über einen verstärkten TGF $\beta$  Signalweg in der Treg Zelle. Somit agiert IRF8 als extrinsischer Aktivator der Treg Differenzierung. FOXP3 wiederum kann an den Promotor von *Irf8* binden und dessen Expression induzieren. Des Weiteren wird *Irf8* ebenfalls nach T-Zellrezeptor Stimulation über den TGF $\beta$ /SMAD3- und vermutlich auch über den IL2/STAT5-Signalweg in iTreg Zellen induziert. IRF8 in der Treg Zelle führt zur Verringerung des TGF $\beta$ -Signalwegs durch Verminderung der TGF $\beta$ RII Proteinmenge. Damit kontrolliert IRF8 die *Foxp3* Expression in Treg Zellen und agiert als intrinsischer Repressor. Zusätzlich wird vermutlich TGIF1 durch eine hohe *Foxp3* Expression aktiviert und agiert wie IRF8 als Repressor von *Foxp3* sowie des TGF $\beta$  Signalwegs.

Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigten, dass der suppressive Effekt von IRF8 auf die FOXP3 Proteinexpression wahrscheinlich durch eine verminderte Proteinmenge an TGF $\beta$ RII und folglich durch einen reduzierten TGF $\beta$  Signalweg bedingt ist, der sich in einer verminderten Proteinmenge an aktiviertem SMAD2/3 äußert. Entgegen den Vermutungen zeigten Sung und seine Kollegen in der humanen myeloischen Leukämie Zelllinie HL-60, die kein endogenes IRF8 produziert, dass eine Überexpression von *Irf8* die Expression der TGF $\beta$ -Rezeptoren und somit den TGF $\beta$ -Signalweg induziert (Sung et al., 2011). Krebszelllinien verhalten sich jedoch anders als Primärzellen und exprimieren andere Mengen und Zusammensetzungen von Transkriptionsfaktoren. Dieses widersprüchliche Ergebnis spricht für eine

zellspezifische Regulierung von IRF8 in Treg Zellen. Des Weiteren belegen mehrere Experimente eine Verbindung des TGF $\beta$ -Signalwegs mit den Transkriptionsfaktoren der IRF-Familie. So deckte ein *Irf*-*Smad* Alignment eine konservierte Transaktivator-Domäne im *Irf8* Gen auf, die ebenfalls in *Smad4* vorhanden ist (Eroshkin and Mushegian, 1999).

Neueste Ergebnisse deuten neben der Funktion als Repressor auf die Differenzierung von iTreg Zellen auf eine weitere Funktion von IRF8 in iTreg Zellen hin. So kontrolliert IRF8 die Th1-spezifische regulatorische T-Zell Funktion. Lee und seine Kollegen zeigten, dass IRF8 die Expression von *Cxcr3* in polarisierten iTreg Zellen indirekt induziert sowie für die Rekrutierung von CXCR3<sup>+</sup> Treg Zellen zu Entzündungsorten essentiell ist und somit die Th1 Immunantwort über die Verminderung der *Irfg* Expression supprimiert. Zusätzlich dokumentierten Lee und seine Kollegen, dass IRF8 in polarisierten iTreg Zellen die Th2- (*Il4*, *Il5* und *Il13*) sowie Th17- (*Il17a* und *Il21*) spezifische regulatorische T-Zell Funktion unterdrückt (Lee et al., 2015).

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse sprechen für eine intrinsische Funktion von IRF8 als Repressor in der Differenzierung von iTreg Zellen. *In vivo* hingegen wiesen die *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäuse signifikant weniger FOXP3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg Zellen in der Milz, in den Lymphknoten und im Blut auf (s. Abbildung 15). Dies ging einher mit einer tendenziellen Zunahme der naiven T-Zellen in den Lymphknoten und im Blut. Nun stellte sich die Frage, ob dieser positive Effekt von IRF8 auf die Entstehung von Treg Zellen *in vivo* ebenfalls extrinsisch wie im Fall der Th1 Zellen bedingt ist. Es ist bekannt, dass APCs auf ihrer Oberfläche das  $\alpha\beta$ 8 Integrin Molekül (*Itgb8*) exprimieren, welches biologisch aktives TGF $\beta$  in die APC-T-Zell Kontaktstelle freisetzt. Damit fördert das Integrin die Aufnahme von aktiven TGF $\beta$  in naive T-Zellen und begünstigt somit die Induktion von Treg und Th17 Zellen (Melton et al., 2010). Des Weiteren wurde beschrieben, dass IRF8 an dieser Integrin-abhängigen Aktivierung beteiligt ist und die Transkription von *Itgb8* (kodierendes Gen für das  $\alpha\beta$ 8 Integrin) durch Bindung am IRS-Element im Promoter induziert (Yoshida et al., 2014). Zudem wurde gezeigt, dass die Expression von *Itgb8* in Makrophagen und dendritischen Zellen von *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen signifikant verringert ist. Diese Ergebnisse sprechen für eine extrinsische Funktion von IRF8 in der Entstehung von Treg Zellen, die durch aktiviertes TGF $\beta$  induziert wird.

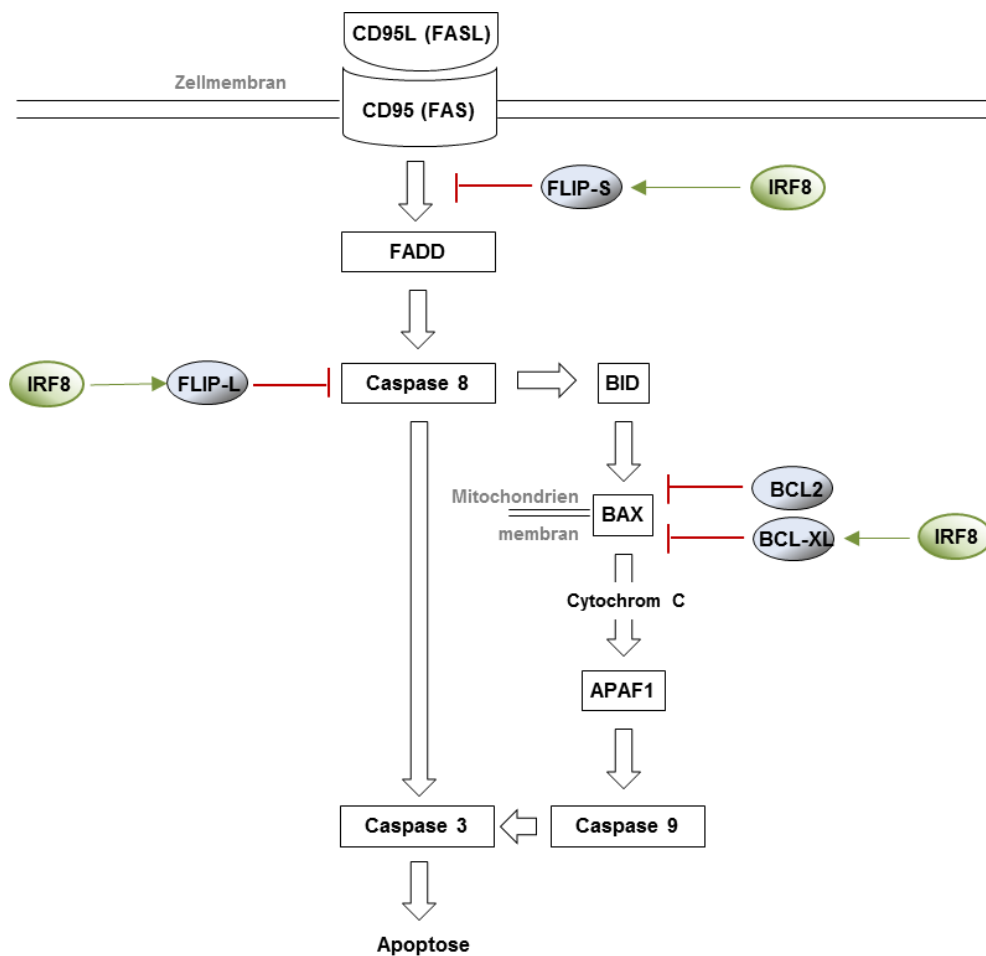
Somit weist IRF8 ebenfalls wie in der Th1 Differenzierung in der Differenzierung von Treg Zellen eine extrinsische Aktivator Funktion in APCs und eine intrinsische Repressor Funktion direkt in Treg-Zellen auf, die vermutlich ebenfalls zeitlich nacheinander stattfinden (s. Abbildung 31).

### 3.3.5 IRF8 kontrolliert intrinsisch die Th1- und iTreg- Immunantwort durch Regulation des FAS-vermittelten Zelltods

Die bisher beschriebenen Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass IRF8 intrinsisch als Repressor in der Differenzierung von Th1 und iTreg Zellen agiert. Die Vermutung liegt nah, dass IRF8 somit auch einen Einfluss auf das Apoptose- oder Proliferationsverhalten von T-Zellen ausübt. Diese Vermutung wird mit der Beobachtung bestätigt, dass *Irf8* meist bei humanen Krebspatienten und in Tumor-tragenden Mäusen gering exprimiert ist (Stewart et al., 2009). Zusätzlich wurde IRF8 bereits als Tumorsuppressor beschrieben (Tamura et al., 2008).

Insbesondere in den myeloiden Zellen wurde ein suppressiver Effekt von IRF8 auf das Proliferationsverhalten im Detail studiert. So wurde gezeigt, dass IRF8 verschiedene Schlüsselgene des Zellwachstums in myeloiden Zellen kontrolliert (Tamura et al., 2008). Zum Beispiel induziert IRF8 direkt die Expression

von *Prdm1* sowie *Etv3*, die für BLIMP1 kodieren. BLIMP1 wiederum ist ein Repressor von *Myc* und kann somit das Zellwachstum inhibieren (Tamura et al., 2003). Sung und seine Kollegen hingegen dokumentierten einen positiven Effekt von IRF8 auf die Proliferation der humanen promyoblastischen Leukämie-Zelllinie HL-60 (Sung et al., 2011). Diese Beobachtungen zeigen, dass IRF8 eine Rolle in der Regulation der Proliferation von myeloiden Zellen übernimmt. Mit dem Wissen, dass Interferone die Proliferation von hämatopoetischen Zellen regulieren (Hwang et al., 1995) und IRF8 intrinsisch die Entstehung von IFN $\gamma$ -Produzenten in Th1 Zellen vermindert, könnte IRF8 einen anti-proliferativen Effekt in *in vitro* polarisierten T-Zellen aufweisen. Jedoch konnte im Rahmen dieser Arbeit kein signifikanter Effekt auf das Proliferationsverhalten in T-Zellen dokumentiert werden. Hingegen zeigte IRF8 einen anti-apoptotischen Effekt in T-Zellen.



**Abbildung 32: Modell zur Rolle von IRF8 in der FAS-vermittelten Apoptose von T-Zellen.** Die FAS-vermittelte Apoptose wird über den CD95-Rezeptor (FAS-Rezeptor) nach Liganden Bindung (CD95L bzw. FASL) über die Ausbildung eines zyttoplasmatischen Signaltransduktionskomplexes (DISC), bestehend aus dem Adapter Protein FADD und der Caspase 8, induziert. Die Caspase 8 wiederum aktiviert über BID und BAX die Apoptose-Signalkaskade in Mitochondrien und führt über die Ausbildung eines DISC, bestehend aus APAF1 und der Caspase 9, zur Aktivierung von Caspase 9. Schließlich aktivieren die Initiator Caspasen 8 und 9 Downstream-Caspasen, die den apoptotischen Zelltod exekutieren. Inhibitoren können diesen Signalweg auf der Ebene der Aktivatoren (BCL2, BCL-XL), der Adapter (FLIP-S, BCL2, BCL-XL) oder der Caspasen (FLIP-L) inhibieren (Krammer, 2000). Der Transkriptionsfaktor IRF8 reguliert in T-Zellen die FAS-vermittelte Apoptose durch Aktivierung der anti-apoptotischen Proteine FLIP-S und FLIP-L sowie BCL-XL.

Ein IRF8-Defizit führte in *in vitro* polarisierten Th1 und iTreg Zellen sowie in *ex vivo* Gedächtnis-T-Zellen nach Induktion der FAS-vermittelten Apoptose zur Erhöhung der Frequenz an apoptotischen Zellen. Gleichzeitig wurde nach Überexpression von *Irf8* eine verringerte Apoptose in *in vitro* polari-

sierten Th1 Zellen dokumentiert. Zudem konnte gezeigt werden, dass IRF8 die Proteinmenge der anti-apoptotischen Proteine FLIP (FLIP-L und FLIP-S) und BCL-XL positiv reguliert. Dies beweist, dass IRF8 einen anti-apoptotischen Effekt über den FAS-vermittelten Zelltod in T-Zellen ausübt (s. Abbildung 32). In myeloiden Zellen hingegen wurde in verschiedenen Arbeiten ein pro-apoptotischer Effekt von IRF8 dokumentiert, der ebenfalls über die FAS-vermittelte Apoptose induziert wird. So reprimiert IRF8 in myeloiden Zellen direkt die Expression der anti-apoptotischen Proteine *CFLAR* (kodiert für FLIP), *Bcl2l1* (kodiert für Bcl-XL) sowie *Bcl2* (Glimcher and Murphy, 2000; Burchert et al., 2004; Hu et al., 2013b) und aktiviert den Apoptose-Aktivator *Bax* (Yang et al., 2011; Hu et al., 2013b). Zudem wurde gezeigt, dass ein IRF8-Defizit *in vivo* die spontane Apoptose von myeloiden Zellen verringert (Paschall et al., 2015) und damit zur dokumentierten Myeloproliferation in *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäusen beiträgt. Der anti-apoptotische Effekt in T-Zellen und der pro-apoptotische Effekt in myeloiden Zellen von IRF8 bestätigt wiederum die entgegengesetzte Wirkung von IRF8 in T-Zellen und in APCs, wie sie bereits in der Differenzierung von Th1 und Treg Zellen diskutiert wurde.

Die FAS-vermittelte Apoptose ist in T-Zellen wie auch in myeloiden Zellen ein Toleranzmechanismus, der den Zellumsatz kontrolliert und somit eine überschießende Immunantwort verhindert (Singer and Abbas, 1994; Sinha et al., 2011). Durch den in dieser Arbeit dokumentierten intrinsischen anti-apoptotischen Effekt fördert IRF8 prinzipiell die Th1- bzw. iTreg-Immunantwort und kontrolliert somit selbst seine intrinsische Repressor-Funktion. So wirkt IRF8 zwar supprimierend auf die Entstehung von TBET<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Th1 Zellen sowie FOXP3<sup>+</sup> iTreg Zellen, senkt jedoch gleichzeitig das Apoptoseverhalten und damit den Zellumsatz von Th1 und iTreg Zellen.

### 3.4 Schlussfolgerung

Eine Fehlregulation in der Differenzierung von T-Helferzellen führt zu veränderten Immunantworten und somit zur Ausbildung von verschiedenen chronisch infektiösen, allergischen und autoimmunen Erkrankungen. Die Entwicklung von neuen Therapieansätzen zur Behandlung solcher Erkrankungen ist ein vorrangiges Ziel der T-Zell-Forschung und setzt ein besseres Verständnis der T-Zellregulation voraus. Mithilfe globaler Transkriptom-Analysen von T-Helferzellen und einer anschließenden integrativen Netzwerkanalyse wurde der Transkriptionsfaktor IRF8 als potenzieller Weichensteller der Th1 und iTreg Differenzierung identifiziert. IRF8 scheint eine wichtige Rolle in der T-Zelldifferenzierung zu übernehmen. So ist IRF8 bereits bekannt als Tumorsuppressor (Tamura et al., 2008) und wird mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie der Multiplen Sklerose (Yoshida et al., 2014) und der Rheumatischen Arthritis assoziiert (Okada et al., 2014). Aus diesem Grund wurde die Rolle von IRF8 in der Differenzierung von T-Zellen in dieser Arbeit eingehend untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von *Irf8* Subtyp-spezifisch in Th1 und iTreg Zellen induziert wird und IRF8 somit vermutlich eine intrinsische Funktion in der Differenzierung aufweist. Erstaunlicher Weise zeigte IRF8 einen supprimierenden Effekt in der *in vitro* Differenzierung von Th1 und iTreg Zellen. *In vivo* hingegen agierte IRF8 als Aktivator und führte zur verminderten Anzahl an Th1-spezifischen Gedächtnis-T-Zellen und nTregs in *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu den WT Mäusen. In dieser Arbeit konnte erörtert werden, dass IRF8 als extrinsischer Aktivator über die Modulation der Funktion von APCs agiert und die Th1- sowie Treg-Immunantwort fördert. Intrinsisch hingegen wirkt IRF8 als Gegenspieler und kontrolliert die Immunantwort der Th1 Zellen über die TBET Proteinmenge sowie die der iTreg Zel-

len über den TGF $\beta$ -Signalweg. Somit ist IRF8 in den T-Zellen für eine moderate IFN $\gamma$ - sowie FOXP3-Produktion essentiell und verhindert eine überschießende Immunantwort. Die gegensätzlichen extrinsischen und intrinsischen Effekte von IRF8 finden vermutlich zeitlich nacheinander statt. Zu Beginn einer Infektion fördert IRF8 die Th1 oder Treg Immunantwort, während IRF8 zu einem späteren Zeitpunkt, wenn kein direkter Kontakt mehr zu den APCs vorliegt, die Differenzierung von Th1 oder Treg Zellen supprimiert. Dieser kinetische Effekt wird vermutlich über die Menge von Subtyp-spezifischen Transkriptionsfaktoren und Zytokinen (z. B. TBET und IFN $\gamma$  in Th1 Zellen oder FOXP3 in Treg Zellen) kontrolliert. Die Ergebnisse in dieser Arbeit belegen, dass IRF8 ein wichtiger Regulator der T-Zelldifferenzierung ist und als Zielgen in der Entwicklung von neuen Therapieansätzen für T-Zell-spezifische Erkrankungen fungieren könnte.

### 3.5 Ausblick

In dieser Arbeit wurde erörtert, dass IRF8 extrinsisch durch Modulation der Funktion von APCs eine Aktivator-Funktion und intrinsisch in Th1 und iTreg Zellen eine Repressor-Funktion auf die Differenzierung von Th1 und Treg Zellen ausübt. Zur Klärung dieser Hypothese sollen Ko-Kulturexperimente von APCs und naiven T-Zellen unter Th1- und iTreg-polarisierenden Bedingungen durchgeführt werden. Zusätzlich soll die intrinsische Repressor Funktion von IRF8 in Th1 und iTreg Zellen durch Verwendung von T-Zell-spezifischen IRF8-defizienten Mäusen bestätigt werden.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass IRF8 *in vitro* die Entstehung von TBET-, IFN $\gamma$ - und GM-CSF-produzierenden Th1 sowie FOXP3-produzierenden iTreg Zellen intrinsisch supprimiert. Es wurde vermutet, dass IRF8 die Th1-Immunantwort über die *Tbx21* Expression sowie die der iTreg Zellen über den TGF $\beta$ -Signalweg kontrolliert. In weiterführenden Experimenten soll die molekularbiologische Wirkungsweise von IRF8 in Th1 und iTreg Zellen genauer analysiert und folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Wie reguliert IRF8 intrinsisch die IFN $\gamma$ -Produktion in Th1 Zellen?
2. Bindet IRF8 direkt an *Tbx21* und beeinflusst somit die Proteinmenge von TBET und damit die Entstehung von Th1 Zellen?
3. Wie reguliert IRF8 intrinsisch die Entstehung von FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen?
4. Bindet IRF8 direkt an das Gen für den *Tgfr2* und beeinflusst somit den TGF $\beta$ -Signalweg und damit die Entstehung von iTreg Zellen?
5. Bindet IRF8 an *Smad3* und unterbindet dessen Aktivierung?
6. Beeinflusst IRF8 die TGF $\beta$ -Produktion in iTreg Zellen?
7. Bindet IRF8 direkt an die anti-apoptotischen Proteine *Cflar* (kodiert für *FLIP*) und *Bcl211* (kodiert für *BCL-XL*) und beeinflusst somit die FAS-vermittelte Apoptose in T-Zellen?

Es ist bekannt, dass IRF8 in T-Zellen mit Interaktionspartnern (z. B. Transkriptionsfaktoren der AP1- oder IRF-Familie) komplexiert und so als transkriptioneller Aktivator oder Repressor agiert. Mithilfe von IRF8 ChIP-qRT-PCR Experimenten sollen potenzielle Interaktionspartner von IRF8 identifiziert werden. Hierfür muss ein geeigneter IRF8 Antikörper gefunden sowie geeignete Kontrollregionen in



Th1 und iTreg Zellen identifiziert werden. Zusätzlich sollen weitere transkriptionelle Zielgene von IRF8 mithilfe von RNA-Seq oder Microarray Analysen durch Verwendung von *Irf8*<sup>-/-</sup> und WT Mäusen in Th1 und iTreg Zellen identifiziert werden.

Des Weiteren zeigten die Transkriptom- und integrativen Netzwerkanalysen, dass die Expression von *Etv6* in Th1 Zellen und von *Asb2* in Th2 Zellen Subtyp-spezifisch induziert wird. Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass ETV6 einen positiven Effekt auf die Entstehung von TBET<sup>+</sup> Th1 Zellen ausübt. Aufgrund dieser Befunde soll eine ausführliche funktionelle Analyse von ETV6 und ASB2 in der Differenzierung von T-Helferzellen durchgeführt werden.

Zusätzlich bieten die Transkriptom- und integrativen Netzwerkanalysen mit der Identifizierung von weiteren potenziell richtungsweisenden Transkriptionsfaktoren zahlreiche Ausgangspunkte für neue Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der T-Helferzellendifferenzierung.



## 4. Materialien und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Datensätze

Für die Datenintegration wurden folgende veröffentlichte RNA-Seq, Microarray und ChIP-Seq Datensätze verwendet. Die entsprechenden GEO Zugangsnummern und Referenzen sind in Tabelle 3 aufgelistet.

**Tabelle 3: Für die Datenintegration verwendete RNA-Seq, Microarray und ChIP-Seq Datensätze**

Th Subtyp	Kulturbedingungen	GEO Zugangsnummer	Publikation
<b>RNA-Seq</b>			
<b>Th1 WT und STAT4 KO</b>	naive CD4 <sup>+</sup> T-Zellen wurden unter Th1 Kulturbedingungen für 7-Tage <i>in vitro</i> differenziert und mit $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 + IL12 für 2 h restimuliert	GSE40463 (WT GSM994535; STAT4 KO GSM994536)	(Vahedi et al., 2012)
<b>Th2 WT und STAT6 KO</b>	naive CD4 <sup>+</sup> T-Zellen wurden unter Th2 Kulturbedingungen für 7-Tage <i>in vitro</i> differenziert und mit $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 + IL4 für 2 h restimuliert	GSE40463 (WT GSM994539; STAT6 KO GSM994540)	(Vahedi et al., 2012)
<b>naive, Th1, Th2, Th17, iTreg</b>	naive CD4 <sup>+</sup> T-Zellen wurden <i>in vitro</i> unter Th1, Th2, Th17 und iTreg Kulturbedingungen für 4, 8, 12, 24, 48, 72, 168 und 336 h stimuliert	GSE48138	(Hu et al., 2013a)
<b>Microarray</b>			
<b>Th1, Th2, Th17, iTreg</b>	naive CD4 <sup>+</sup> T-Zellen wurden <i>in vitro</i> für 10 Tage unter Th1, Th2, Th17 und iTreg Kulturbedingungen stimuliert	GSE14308	(Wei et al., 2009)
<b>ChIP-Seq</b>			
<b>STAT4 ChIP-Seq Th1</b>	naive CD4 <sup>+</sup> T-Zellen wurden unter Th1 Kulturbedingungen für 7-Tage <i>in vitro</i> differenziert und mit $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 + IL12 für 2 h restimuliert	GSE22105 (WT GSM550303; STAT4 KO GSM550304)	(Wei et al., 2010)
<b>STAT6 ChIP-Seq Th2</b>	naive CD4 <sup>+</sup> T-Zellen wurden unter Th2 Kulturbedingungen für 7-Tage <i>in vitro</i> differenziert und mit $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 + IL4 für 2 h restimuliert	GSE22105 (WT GSM550311; STAT6 KO GSM550312)	(Wei et al., 2010)

#### 4.1.2 Mäusestämme und Haltungsbedingungen

Die Versuchstiere (s. Tabelle 4) wurden in IVCs (individuell belüftete Käfige) gehalten. Die Käfige im Regalsystem sind geschlossen und werden mit Luft, die durch ein HEPA-Filter gefiltert wird, versorgt. Die Tiere wurden in einem 12 h Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten.

**Tabelle 4: Verwendete Mausstämme**

Mausstamm	Firma/ Zulieferer
BALB/cAnNCrI	Charles River
DO11.10CAR (BALB/cAnNCrI Hintergrund)	Labor von Vigo Heissmeyer (München)
C57BL/6J	Labor von Carol Stocking-Harbers (HPI, Hamburg)
<i>Irf8</i> <sup>-/-</sup> (C57BL/6J Hintergrund)	Labor von Carol Stocking-Harbers (HPI, Hamburg)

### 4.1.3 Plasmide und Vektoren

Die verwendeten und in dieser Arbeit konstruierten Vektoren/Plasmide sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

**Tabelle 5: Verwendete und in dieser Arbeit konstruierte Vektoren/Plasmide.**

Vektor/Plasmid	Firma/ Zulieferer
pACDC (modifiziert)	DRFZ
pACDC-Irf8	Genexpress
pQCXIX (modifiziert)	DRFZ
pAd/PL-DEST	Invitrogen/ Life Technologies
pAd-Irf8sh	eigens kloniert
pAd-controlsh	eigens kloniert

### 4.1.4 Kompetente Bakterien für die Klonierung von Plasmiden

Es wurden *E.coli* kompetente Zellen, die eigens im DRFZ hergestellt werden, und *One Shot ccdB Survival 2 T1* chemisch kompetente Zellen von Invitrogen verwendet.

### 4.1.5 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide (s. Tabelle 6, Tabelle 7 und Tabelle 8) wurden von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin) synthetisiert. Die Oligonukleotide wurden durch eine Sephadex Gelfiltration aufgereinigt und lyophilisiert geliefert. Die shRNA-Oligonukleotide wurden aufgrund ihrer Länge HPLC aufgereinigt.

**Tabelle 6: shRNA-Oligonukleotide für den adenoviralen Gentransfer.** Die ds shRNA Oligonukleotide wurden über die HpaI und SalI Schnittstelle in den pACDCsh Vektor inseriert. Schwarz = sense Strang der Zielsequenz des Gens, rot = Mismatch im 3'-Terminus des sense Strangs zur Verhinderung der Re-Hybridisierung, grau = anti-sense Strang der Zielsequenz des Gens (siRNA-Sequenz), lila = Loop-Sequenz, orange = Addition eines T's zur Rekonstruktion der -1 Position im U6 Promotor, blau = Poly T zur Beendigung der Transkription, grün = Überhänge für die SalI Schnittstelle.

Oligoname	Sequenz
Irf8 sh1 sense	5'-TGGACATTTCTGAGCCATAC <b>CTTCAAGAGAA</b> TATGGCTCAGAAATGTCC <b>TTTTTTC</b> -3'
Irf8 sh1 anti-sense	3'- <b>ACCTGTA</b> AAGACTCGGTAT <b>GAAGTTCTCT</b> TATACCGAGTCTTTACAGG <b>AAAAA</b> AGAGCT-5'
control sh sense	5'-TGT <b>TATTCGCGCGAATAACGTCTTCAAGAGAA</b> ACGTTATTCGCGCGAATAAC <b>TTTTTTC</b> -3'
control sh anti-sense	5'- <b>ACAATAAGCGCGCTTATTGCAG</b> AAGTTCTCTTTGCAATAAGCGCGCTTATTG <b>AAAAA</b> AGAGCT-3'

**Tabelle 7: Oligonukleotide für die Sequenzierung**

Oligoname	Sequenz (5'-3')	T <sub>m</sub> [°C]
Primer mU6	GACTTGTGGGAGAAGCTCGG	59,5
pAd for	GACTTTGACCGTTTACGTGGAGAC	58,0
pAd rev	CCTTAAGCCACGCCACACATTTTC	58,0

**Tabelle 8: Oligonukleotide für die real-time PCR**

Oligoname	Sequenz (5'-3')	PCR-Produkt [bp]	T <sub>m</sub> des PCR-Produktes [°C]
mRPS18 F	TTGGATACACCCACAGTTCG	187	86,5-87
mRPS18 R	AGGATGTGAAGGATGGGAAG		
mIrf8 F	TGCTTTCCGACGGCCGACAC	123	87,5
mIrf8 R	CCGCTTACGAACACGCCCT		
mEtv6 F	TTTCTTTAAGGCCCATTTGAGAG	158	82,0
mEtv6 R	AGAGCATTCGAGATTTCCCTCTG		
mNpas2 F	CCCCCTCCCAGAATTCCTA	151	78,0
mNpas2 R	GAGGGGCTAGGCACATTGTT		
mDbp F	CTCGCCCACTTGGTACAGAA	164	85,0
mDbp R	GGGGGTTCAACCAGTCAGTT		

#### 4.1.6 Enzyme und Inhibitoren

Die in der Arbeit verwendeten Enzyme sind in Tabelle 9 und Inhibitoren in Tabelle 10 zusammengefasst.

**Tabelle 9: Verwendete Enzyme**

Enzym	Firma
Superscript II RT	Invitrogen/ Life Technologies
Rnase Out	Invitrogen/ Life Technologies
Proteinase K	Roche oder Invitrogen / Life Technolo-
GenTherm DNA-Polymerase	Rapidozym
T4 Polynukleotid Kinase	Fermentas Life Sciences
Fast AP Thermosensitive Alkaline Phosphatase	Fermentas Life Sciences
T4 Ligase	Fermentas Life Sciences
LR Clonase II Enzym Mix	Invitrogen/ Life Technologies
Sall Restriktionsenzym	Fermentas Life Sciences
HpaI Restriktionsenzym	Fermentas Life Sciences
PacI Restriktionsenzym	New England Biolabs

**Tabelle 10: Verwendete Inhibitoren**

Inhibitoren	Firma
CsA	AWD (Dresden)
BTP1	synthetisiert wie in der Literatur beschrieben (Yonetoku et al., 2006; Obermayer et al., 2011)
U0126	Biomol

### 4.1.7 Antikörper und Zytokine

Alle verwendeten Antikörper und Zytokine für die Western Blot-Analysen sind in Tabelle 11, für die *in vitro* Kultivierung von T-Zellen in Tabelle 12 sowie für die FACS-Analysen und Zell-Separation in Tabelle 13 zusammengefasst.

**Tabelle 11: Antikörper für Western Blot-Analysen.** Die Antikörper wurden in einer Antikörperlösung aus Blockierungspuffer (Odyssey) und PBST (1:1) verdünnt.

Antikörper	Klon	Hersteller	Verdünnung
Maus-anti-Mensch/Maus $\beta$ -Aktin	C-4	Santa Cruz	1:10.000
Ziege-anti-Mensch/Maus Lamin B	M-20	Santa Cruz	1:200
Maus-anti-Mensch/Maus IRF8	GW4CML3	eBioscience	1:500
Maus-anti-Mensch/Maus/Ratte TBET	eBio39D	eBioscience	1:250
Ratte-anti-Maus/Ratte FOXP3	FJK-16a	eBioscience	1:250
Kaninchen-anti-Maus/Ratte/Mensch NPAS2	H-270	Santa Cruz	1:400
Kaninchen-anti-Maus/Ratte/Mensch DBP	H-300	Santa Cruz	1:400
Ziege-anti-Mensch/Maus/Ratte TEL (ETV6)	N-19	Santa Cruz	1:600
Kaninchen-anti-Mensch/Maus TGIF	H-172	Santa Cruz	1:250
Ziege-anti-Mensch/Maus/Ratte SMAD2/3	N-19	Santa Cruz	1:250
Kaninchen-anti-Mensch/Maus/Ratte TGF $\beta$ RII	L-21	Santa Cruz	1:1.000
Kaninchen-anti-Mensch/Maus/Ratte TGF $\beta$ RI	H-100	Santa Cruz	1:500
Maus-anti-Mensch/Maus/Ratte BCL-XL	2H12	eBioscience	1:250
Maus-anti-Mensch/Maus/Ratte/Affe BAX	6A7	eBioscience	1:500
Ratte-anti-Mensch/Maus FLIP (DAVE-2)	Dave-2	AdipoGen	1:2.000
IRDye 680LT Ziege anti Maus IgG	polyklonal	LI-COR Biosciences	1:10.000
IRDye 680LT Ziege anti Kaninchen IgG	polyklonal	LI-COR Biosciences	1:10.000
Alexa Fluor 680 Esel anti Ziege IgG	polyklonal	Moleculare Probes	1:10.000
Alexa Fluor 680 Ziege anti Ratte IgG	polyklonal	Moleculare Probes	1:10.000
IRDye 800CW Ziege anti Maus IgG	polyklonal	LI-COR Biosciences	1:10.000
IRDye 800CW Ziege anti Kaninchen IgG	polyklonal	LI-COR Biosciences	1:10.000
IRDye 800CW Esel anti Ziege IgG	polyklonal	LI-COR Biosciences	1:10.000
IRDye 800 Ziege anti Ratte IgG	polyklonal	Rockland	1:10.000

**Tabelle 12: Antikörper und Zytokine für die *in vitro* Differenzierung von T-Zellen**

Antikörper/ Zytokin	Klon	Hersteller
anti-Maus CD3	145-2C11	eBioscience und DRFZ
anti-Maus CD28	37.51	eBioscience und DRFZ
anti-Maus CD3	KT3	DRFZ
anti-Maus IL12	C17.8	DRFZ
anti-Maus IFN $\gamma$	AN18.17.24	DRFZ
anti-Maus IL4	11B11.2	DRFZ
Maus IL2	rekombinant	R&D Systems
Maus IL4	rekombinant	R&D Systems
Maus IL6	rekombinant	R&D Systems
Maus IL7	rekombinant	R&D Systems
Maus IL12	rekombinant	R&D Systems
Maus IL23	rekombinant	R&D Systems
TGF $\beta$	porcine	R&D Systems
anti-Maus CD95 (FAS)	Jo2	BD

**Tabelle 13: Antikörper für FACS-Analysen und Zell-Separationen**

Antikörper	Fluorophor	Klon	Hersteller	Verdünnung/Konzentration
Ratte-anti-Maus B220	- , PE	RA3.6B2	DRFZ	1:100/ 8 µg/ml
Ratte-anti-Maus CD8	- , PO	53-6.7	DRFZ	1:200/ 4 µg/ml
Ratte-anti-Maus MAC-1	- , PE	M1/70.15.11	DRFZ	1:400/ 4 µg/ml
anti-Maus Fcγ Rezeptor	-	2.4G2	DRFZ	20 µg/ml
anti-Maus CD3	FITC	17A2	eBioscience	1:200
anti-Maus CD4	FITC, PB, PO, APC	GK1.5	DRFZ	1:200 bis 1:1.000
anti-Maus CD62L	PECy7	MEL-14	BD	1:300
anti-Maus CD44	FITC, PB	IM7	DRFZ	1:200
anti-Maus CD25	APC	PC61.5	eBioscience	1:250
anti-Maus CD45RB	PE	C363.16A	eBioscience	1:500
anti-Maus/Mensch TBET	PE, BV421	4B10	eBioscience	1:100
anti-Maus/Mensch GATA3	eFluor660	TWAI	eBioscience	1:100
anti-Maus/Mensch RORγT	PE	AFKJS-9	eBioscience	1:80
anti-Maus/Ratte FOXP3	PECy7	FJK-16s	eBioscience	1:100
anti-Maus IL2	APC	JES6-5H4	BD	1:100
anti-Maus IFNγ	PECy7	XMG1.2	BD	1:400
anti-Maus GM-CSF	PE	MP1-22E9	BioLegend	1:100
anti-Maus TNFα	PerCP-Cy5.5	MP6-XT22	BioLegend	1:400
anti-Maus AnnexinV	APC	-	eBioscience	1:20

#### 4.1.8 Magnetische Beads für die Zellseparation

Die Separation von naiven und Gedächtnis-T-Zellen erfolgte mithilfe von Microbeads, die in Tabelle 14 zusammengefasst sind.

**Tabelle 14: Für die Sortierung von Zellen verwendete Microbeads**

Microbeads	Verdünnung	Hersteller
anti-APC-Microbeads	1:10	Miltenyi Biotec
anti-FITC Microbeads	1:10	Miltenyi Biotec
anti-Maus-CD4 (L3T4) Microbeads	1:10	Miltenyi Biotec
Ziege-anti-Ratte-IgG Microbeads	1:5	Miltenyi Biotec

#### 4.1.9 Kits

Die in Tabelle 15 aufgeführten Kits wurden in dieser Arbeit verwendet.

**Tabelle 15: Verwendete Kits und deren Hersteller**

Kit	Hersteller
FOXP3 Staining Puffer Set	eBioscience
Annexin V Apoptose Detection Kit – APC	eBioscience
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen
BigDye Terminator v1.1 Sequencing Standard Kit	Applied Biosystems
Vira Power Adenoviral Gateway Expression Kit	Invitrogen

Kit	Hersteller
Rneasy Mini (Plus) Kit	Qiagen
TrueSeq Stranded mRNA Kit	Illumina
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel
NucleoBond Xtra Midi Plus EF	Macherey-Nagel
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
MinElute PCR Purification Kit	Qiagen

#### 4.1.10 Chemikalien und Reagenzien

Sofern in Tabelle 16 nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien und Reagenzien von Roth, Merck oder Sigma-Aldrich bezogen.

**Tabelle 16: Bezogene Chemikalien sowie Reagenzien und deren Hersteller**

Chemikalie	Hersteller
Odyssey Blocking Buffer	LiCor Biosciences
dNTPs	Invitrogen/ Life Technologies
GeneRuler™ DNA Ladder	Fermentas Life Sciences
Cyclosporin A	MPI für Enzymologie
Inomycin	Merck oder SIGMA-ALDRICH Chemie
Brefeldin A	SIGMA-ALDRICH Chemie
Lymphozyten Separationsmedium Pancoll Mouse	PAN Biotech
LE Agarose	Biozym
CFSE (10 mM Stammlösung in DMSO)	eBioscience
APS	BioRad
BSA	PAA Laboratories
Methotrexat (MTX)	SIGMA-ALDRICH Chemie
Ampicilin	GIBCO Lifetechnologies
Kanamycin	GIBCO Lifetechnologies
Streptomycin (10.000 µg/ml)	GIBCO Lifetechnologies
Penicillin (10.000 Units/ml)	GIBCO Lifetechnologies
β- Mercaptoethanol (50 mM)	GIBCO Lifetechnologies
Opti-MEM I Reduced Serum Medium	GIBCO Lifetechnologies
Lipofectamin 2000 Transfektionsreagenz	Invitrogen/ Life Technologies
Pacific Orange (PO) Succinimidyl Ester	Molecular Probes
Propidiumiodid	eBioscience
Formaldehyd	Thermo Scientific Pierc
Oligo (dT)12-18	Invitrogen/ Life Technologies
Odyssey Two-Color Protein Molecular Weight Marker	LiCor Biosciences
0,4 % Trypan Blau	SIGMA-ALDRICH Chemie
TEMED	SIGMA-ALDRICH Chemie
PEG 4000	Thermo Scientific



### 4.1.11 Geräte

Alle in dieser Arbeit verwendeten Laborgeräte sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

**Tabelle 17: Verwendete Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
AutoMACS Cell Separator	Miltenyi Biotec
API PRISM 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
DNA-Gelapparatur	Peqlab Biotechnologie GmbH
LSR Fortessa	BD Biosciences
Fluoreszenzmikroskop	Leica
Heizblock Thermomixer Kompakt	Eppendorf
Heraeus BIOFUGE fresco	Thermo, Waltham
HiSeq Sequencer	Illumina
Inkubatoren	Thermo, Waltham
Lichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss
LiCor imaging Scanner	Licor Biosciences
MACS Separator	Miltenyi biotec
Megafuge 1.0 R	Thermo, Waltham
Minigel-Twin Apparatur (SDS-PAGE)	Whatman Biometra
MPX Blotter	LiCor Biosciences
Multi MACS Separator	Miltenyi Biotec
Multifuge 3 S-R	Thermo, Waltham
MultiMACS M96 Separator	Miltenyi Biotec
Nanodrop 1.0	Thermo Fischer Scientific
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH &Co. KG
Odyssey Infrared Imaging System	LiCor Biosciences
PCR-Gerät	MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler
Qubit Fluorometer	Invitrogen
Spannungsquelle Power Pac HC	Bio-Rad
Stab- Wasserbadsonifikator	Bandelin
Sterilbänke	Heraeus
Stratagene Mx3005P	Agilent Technologies
Tank-Blot WB-Apparatur	BioRad
Zellsorter Arial II	BD Biosciences
AutoMACS Cell Separator	Miltenyi Biotec
Bioanalyser	Agilent

### 4.1.11 Lösungen, Puffer und Medien

Die Zusammensetzungen der verwendeten wässrigen Lösungen und Puffer sind in den entsprechenden Methoden-Abschnitten angegeben.

## 4.2 Molekularbiologische Arbeiten

### 4.2.1 DNA-Aufreinigung

Die Aufreinigung von DNA-Produkten aus dem Gel erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit und die von PCR-Produkten und Enzymreaktionen in Lösungen mit dem MiniElute PCR Purifikation Kit von Qiagen.

Die Aufreinigung von Plasmiden erfolgte nach Herstellerangaben für Mini-Präparationen mit dem NucleoSpin Plasmid oder für Medi-Präparationen mit dem NucleoBond Xtra Midi Plus EF von Macherey-Nagel.

Des Weiteren erfolgte die Mini-Präparation von Plasmiden mit einer Größe über 10 kB mit einem eigenen Puffersystem und einer anschließenden Phenol:Chloroform:Isoamyl Fällung im Verhältnis 25:24:1 (SIGMA) (s. 4.2.1.1).

#### 4.2.1.1 Mini-Präparation von Plasmiden mit einer Größe über 10 kB

Das Bakterienpellet wurde in 150 µl Puffer 1 durch auf- und ab-pipettieren resuspendiert. Danach wurden die Zellen durch Zugabe von 150 µl Puffer 2 lysiert, durch Invertieren gemixt und für 5 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden 150 µl Puffer 3 dazu pipettiert, wiederum durch Invertieren gemixt und 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Suspension bei 13.000 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 450 µl Phenol:Chloroform:Isoamyl (25:24:1) durch Invertieren gefällt. Im Anschluss wurde die Suspension erneut zentrifugiert und die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Diese wurde zuerst mit 95 %igen Ethanol (10 min bei 4 °C zentrifugiert) und danach mit 70 %igen Ethanol (2 min bei RT zentrifugiert) gewaschen. Das DNA Pellet wurde bei RT getrocknet und in Puffer 4 resuspendiert. Die Zusammensetzungen der Puffer sind in Tabelle 18 aufgelistet.

**Tabelle 18: Zusammensetzung der verwendeten Puffer für die Aufreinigung von Plasmiden über 10 kb**

Puffer 1	Puffer 2	Puffer 3	Puffer 4
25 mM Tris-HCl (pH 8,0)	0,2 M NaOH	5 M KOAc	10 mM Tris-HCl
10 mM EDTA	1 % SDS		1 mM EDTA
50 mM Glucose		autoklaviert und	20 µg/ml Rnase A
autoklaviert und bei 4 °C gelagert	immer frisch angesetzt	bei 4 °C gelagert	bei -20 °C gelagert

### 4.2.2 RNA-Aufreinigung

Für die Extraktion von Total-RNA wurde das Rneasy Mini oder Rneasy Mini Plus Kit von Qiagen verwendet. Die Isolierung erfolgte nach Herstellerangaben. Die Zellen wurden mit Qiagen Shredder Säulen homogenisiert. Im Fall der RNA-Sequenzierungsproben wurde die genomische DNA durch einen Zentrifugationsschritt auf den gDNA Eliminator Säulen eliminiert. Die RNA wurde in Nuklease-freiem Wasser eluiert.

### 4.2.3 cDNA-Synthese

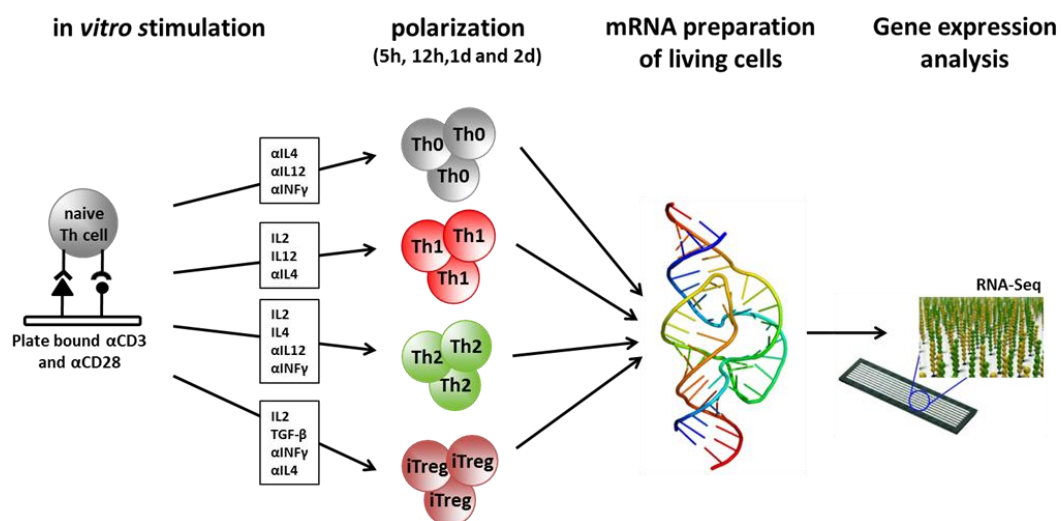
Die Umschreibung von RNA in cDNA erfolgte mit der Superscript II RT von Invitrogen nach Herstellerangaben. Es wurden Oligo(dT)12-18 Primer und 5x FS Puffer verwendet. Für die Synthese wurden zwischen 100 ng und 1 µg RNA eingesetzt.

### 4.2.4 Real-time PCR (qRT-PCR)

Für die Real-time PCR wurde das QuantiTect SYBR Green PCR Kit von Qiagen verwendet. Die PCR erfolgte nach Herstellerangaben. Es wurden Primer mit einer Schmelztemperatur von 60 °C verwendet (s. 4.1.5, Tabelle 8). Als Template diente 1 µl cDNA. Die Analyse erfolgte in Duplikaten. Die relative mRNA Expression wurde nach der  $\Delta\Delta C_t$  Methode berechnet und auf das Housekeeping Gen *Rps18* normalisiert.

### 4.2.5 RNA-Sequenzierung

Aus den Milzen und Lymphknoten von BALB/cAnNCrl Mäusen wurden naive  $CD4^+CD25^-CD45RB^{high}$  T-Zellen präpariert und mit 1 µg/ml  $\alpha CD3/\alpha CD28$  (eBioscience) unter Th0, Th1, Th2 und iTreg polarisierenden Kulturbedingungen (s. 4.3.8) für 5, 12, 24 und 48 Stunden stimuliert. Die Kulturbedingungen sind in Tabelle 24 zusammengefasst. Die kultivierten Zellen wurden auf lebende Zellen mithilfe einer Propidiumiodid Färbung sortiert und direkt im Anschluss die RNA mit dem Rneasy Mini Plus Kit (Qiagen) und einem DNA Eliminationsschritt präpariert. Die Konzentration der gewonnenen RNA wurde mit dem Qubit und dem dazugehörigen RNA-Kit bestimmt und die Qualität im Bioanalyser auf einen RNA-Chip überprüft. Zum Schluss wurden von jeweils 2 bis 3 µg RNA die Bibliothek nach Protokoll mit dem TrueSeq Stranded mRNA Kit (Illumina) präpariert und die Proben am HiSeq Sequenzierer von Illumina im *Scientific Genomics Platform* Labor von Dr. Wei Chen am *Berlin Institute for Medical Systems Biology* (BIMSB) des *Max Delbrück Center for Molecular Medicine* (MDC) sequenziert. Die experimentelle Übersicht zur Probenpräparation ist in Abbildung 33 zusammengefasst dargestellt.



**Abbildung 33: Experimentelle Übersicht zur Probenpräparation für die RNA-Seq Analysen.** Naive T-Zellen ( $CD4^+CD25^-CD45RB^{high}$ ) wurden mit  $\alpha CD3/\alpha CD28$  (ü. N. an Zellkulturgefäß gebunden) stimuliert und in der Anwesenheit von den jeweiligen Subtyp-spezifischen Zytokinen in Richtung Th0, Th1, Th2 oder iTreg für 5, 12, 24 und 48 h polarisiert. Nach der Polarisation wurden die lebenden Zellen durchflusszytometrisch sortiert und direkt im Anschluss die RNA präpariert.

### 4.2.6 SDS-Polyacrylelektrophorese (PAGE)

Das Zellpellet wurde in 2x Laemmli-Puffer resuspendiert (10  $\mu$ l/1x 10<sup>6</sup> Zellen) und für 10 s mechanisch mit einem Ultraschallstab und für 1 min im Ultraschallbad aufgeschlossen. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 95 °C aufgekocht und in einem 10 % igen Gel (s. Tabelle 19) in einer Minigel Twin Apparatur in 1x Laufpuffer (Whatman Biometra) aufgetrennt (15 min 60 V, 15 min 90 V und 90 min 130 V). Als Größenstandard wurde der Odyssey Two-Color Protein Molecular Weight Marker von LI-COR verwendet.

**Tabelle 19: Zusammensetzung der Puffer für die SDS-PAGE (links) und Zusammensetzung eines 10 %igen SDS-Gels (rechts).**

Puffer	Zusammensetzung	1x Gel	Trenngel	Sammelgel
Laemmli Puffer (6x)	350 mM Tris	dest. Wasser [ml]	2,85	1,42
	9,3 % DTT	AA/Bis [ml]	1,15	0,42
	10 % SDS	Trenngelpuffer [ml]	1,75	-
	50 % Glycerin	Sammelgelpuffer [ml]	-	0,62
	0,3 % Trypan Blau	10 % SDS [ $\mu$ l]	70	25
Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,5 M Tris-HCl	APS [ $\mu$ l]	32,5	12,5
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	0,5 M Tris-HCl	Temed [ $\mu$ l]	3,5	2,5
APS	0,01 % Ammoniumpersulfat			
Laufpuffer (10x)	3,03 % Tris			
	14,4 % Glycin			
	1 % SDS			

### 4.2.7 Western Blot

Der Transfer der Proteine aus dem SDS-Gel auf eine Nitrocellulose Blotting Membran (GE Healthcare Life Sciences) erfolgte in einer Tank-Blot-Apparatur mit 1x Blotpuffer für 1 Stunde bei 300 mA und 4 °C. Hierfür wurde das Gel und die Membran in einem Sandwich aus Schwämmen und Filterpapieren eingebettet: 1. Schwamm, 2. Filterpapier, 3. Gel, 4. Membran, 5. Filterpapier und 6. Schwamm. Um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu vermeiden, wurde die Membran im Anschluss in Blockierungspuffer für eine Stunde inkubiert. Die Inkubation mit den primären Antikörpern in einer Antikörperlösung aus PBS und PBST erfolgte bei 4 °C ü. N.. Nach dreimaligem Waschen mit PBST wurde die Membran mit dem entsprechenden Sekundäntikörper für 45 min bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBST wurde die Membran in PBS gelagert und die Proteine mit dem LiCor Imaging Scanner detektiert. Alle Inkubations- und Waschritte erfolgten auf dem Schüttler. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Die Zusammensetzungen der Puffer für den Western Blot sind in Tabelle 20 aufgelistet.

**Tabelle 20: Zusammensetzungen der Puffer für den Western Blot.**

Puffer	Zusammensetzung
Blotpuffer (pH 8,1-8,4)	0,2 % Tris
	0,9 % Glycin
	20 % Methanol
Blockierungspuffer	50 % Odyssey Blocking Puffer
	50 % PBS
Waschpuffer (PBST)	PBS
	0,1 % Tween 20
Antikörperlösung	50 % Odyssey Blocking Puffer
	50 % PBST

## 4.2.8 Genotypisierung der *Irf8*<sup>-/-</sup> Mäuse

Zunächst wurde den 4–8 Wochen alten Tieren ein Stück aus dem Ohr mit einem Ohrstanzer entfernt und diese in 500 µl Lyse-Puffer (Zusammensetzung s. Tabelle 21) ü. N. bei 55 °C in einem Schüttelinkubator inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Haare und Knochen durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für 10 min entfernt und der Überstand mit einem Volumen eiskalten Isopropanol invertiert. Die Fällung der DNA erfolgte bei 13.000 rpm und 4 °C für 10 min. Mit 70 %igem Ethanol 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. Die verwendeten Primer sowie die Zusammensetzung und die Bedingungen der PCR sind in Tabelle 22 aufgelistet.

**Tabelle 21: Zusammensetzung des Lyse-Puffers für die Lyse von Ohrstanzen.**

Puffer	Zusammensetzung
Lyse-Puffer (pH 8,5)	100 mM Tris-HCl
	5 mM EDTA
	0,2 % SDS
	200 mM NaCl
	100 µg/ml Proteinase K

**Tabelle 22: Zusammensetzung der Genotypisierungs-PCR (links) sowie die PCR-Bedingungen (mitig) und die verwendeten Primer und erwarteten PCR-Produkte (rechts).**

PCR	V [µl]	PCR-Bedingungen	Primer	Sequenz
DNA	100 ng	94 °C 30 s	1	CAT GGC ACT GGT CCA GAT GTC TTC C
Polymerase Puffer	1,0	55 °C 30 s	2	CTT CCA GGG GAT ACG GAA CAT GGT C
dNTPs (10 µM)	1,0	72 °C 60 s	3	CGA AGG AGC AAA GCT GCT ATT GGC C
Taq Polymerase	0,5			Primer 1+2 amplifizieren das WT-Allel ca. 250 bp
Primer 1	1,0	35 Zyklen		Primer 1+3 amplifizieren die Deletion ca. 450 bp
Primer 2 oder 3	1,0			
Wasser	add 10,0			

## 4.2.9 Klonierung von Plasmiden für den adenoviralen Gentransfer

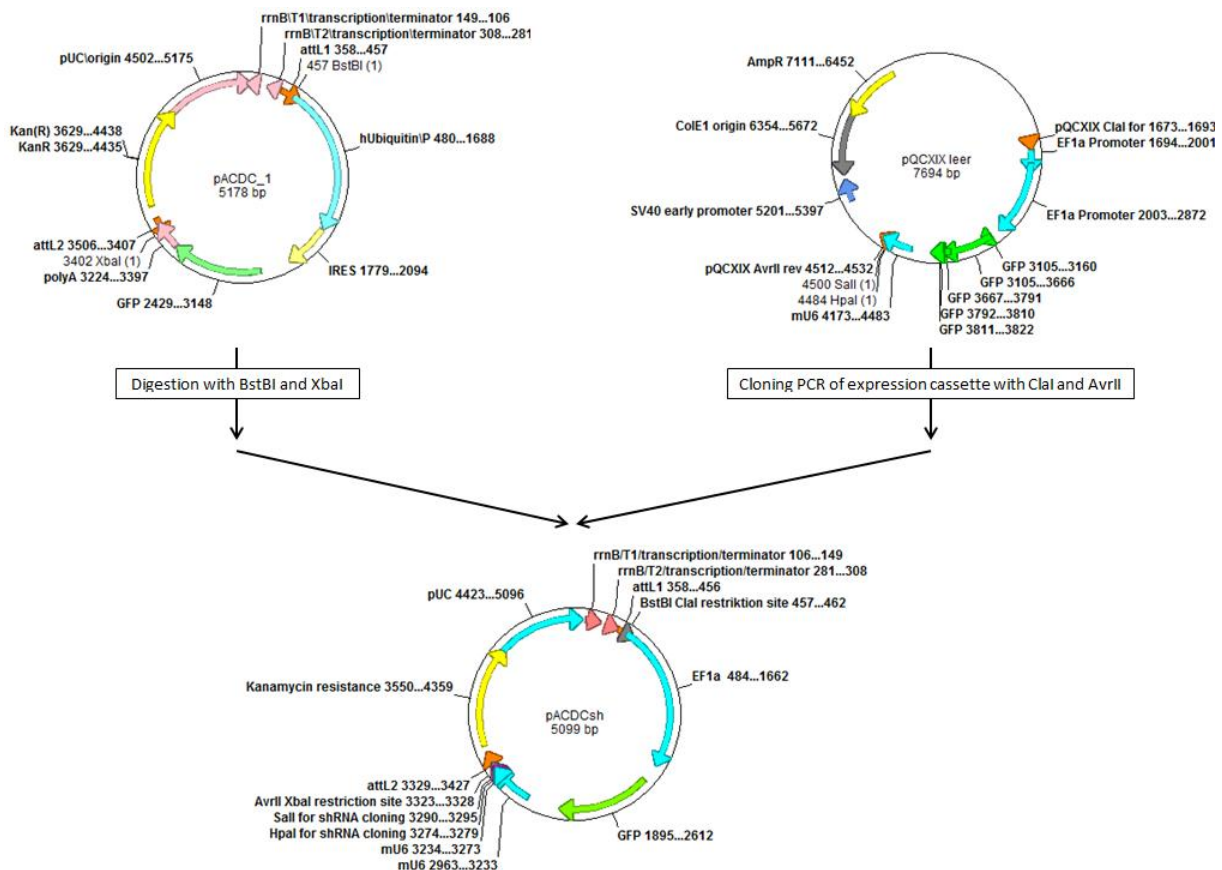
Für den adenoviralen Gentransfer wurde der adenovirale Vektor pAd/PL-DEST von Invitrogen verwendet. Die Klonierung der Expressionskassette erfolgte über den Transfervektor pACDC für die Überexpression bzw. pACDCsh für den shRNA-Knockdown.

### 4.2.9.1 Klonierung des Transfervektors pACDC-Irf8 für die Überexpression von *Irf8*

Für die Überexpression wurde die cDNA von *Irf8* in den Ausgangsvektor pACDC (Vektorkarte s. Abbildung 34 oben links) über die BglII Schnittstelle inseriert. Das *Irf8*-Oligo mit den entsprechenden Sequenzüberhängen für die BglII Schnittstelle wurde synthetisch hergestellt. Die Klonierungsarbeiten wurden von der Firma Genexpress vorgenommen. Der pACDC Vektor exprimiert das zu überexprimierende Gen über einen Ubiquitin-Promotor als Fusionsprotein über eine IRES mit GFP.

#### 4.2.9.2 Klonierung des Transfervektors pACDC-Irf8sh und pACDC-controlsh für den shRNA-Knockdown von *Irf8*

Für den adenoviral-vermittelten shRNA-Knockdown wurde der Ausgangsvektor pACDC modifiziert, da die shRNA nicht als Fusionsprotein wirksam ist. Hierfür wurde die Expressionskassette mit der des retroviralen Vektors pQCXIX, der für die Expression von shRNA optimiert ist, ersetzt. Diese Klonierungsarbeiten wurden wiederum von der Firma Genexpress durchgeführt. Das Vorgehen und die verwendeten Enzyme sind in Abbildung 34 dargestellt. Der pACDCsh Vektor exprimiert die shRNA über einen murinen U6 Promotor. Die shRNA wird über die HpaI und SalI Schnittstellen inseriert. Des Weiteren exprimiert der pACDCsh Vektor GFP über einen EF1a Promotor.



**Abbildung 34: Vorgehen für die Generation des pACDCsh Vektors.** Die Expressionskassette des pACDC Vektors (oben links) wurde mit der Expressionskassette des pQCXIX Vektors (oben rechts) ersetzt. Hierfür wurden der pACDC Vektor mit BstBI und XbaI und der pQCXIX Vektor mit ClaI und AvrII geschnitten. Die Ligation der Expressionskassette von pQCXIX und des Rückgrats des pACDC Vektors zum shRNA Expressionsvektor pACDCsh (unten mittig) erfolgte über die Isoschizomeren Enzyme BstBI und ClaI sowie AvrII und XbaI.

#### Design der shRNA Oligonukleotide für den pACDCsh Vektor am Beispiel der *Irf8* shRNA

Zuerst wurde eine geeignete siRNA Sequenz für das jeweilige Zielgen mithilfe der freierwerblichen Software siRNA at Whitehead (<http://sirna.wi.mit.edu/home.php>) ausgewählt. Für die siRNA wurden folgende 3 Kriterien verfolgt:

1. beginnt mit G evtl. auch A für eine U6-Promotor Aktivität,
2. 5'/3' Stabilität > 0 und
3. nur im ORF lokalisiert (eine Bindung im UTR ist unerwünscht, da hier auch viele Proteine binden, die die Bindung der siRNA beeinflussen könnten)

Nach Auswahl der geeigneten siRNA Sequenz wurde das shRNA Oligo-Design nach folgenden Schritten durchgeführt:

1. Sense Strang des Zielgens (*Irf8*):  
5'-GGACATTTCTGAGCCATAT-3'
2. Erschaffung eines Mismatches am 3'-Terminus des sense Strangs:  
5'-GGACATTTCTGAGCCATAC-3'
3. Addition eines T's am 5'-Terminus des sense Strangs zur Rekonstruktion von -1 im U6 Promotor:  
5'-TGGACATTTCTGAGCCATAC-3'
4. Addition einer Loop-Sequenz:  
5'-TGGACATTTCTGAGCCATACCTTCAAGAGA-3'
5. Anti-sense Strang des Zielgens (*Irf8*):  
5'-ATATGGCTCAGAAATGTCC
6. Addition des anti-sense Strang und 6 T's an den sense Strang:  
5'-TGGACATTTCTGAGCCATACCTTCAAGAGAAATATGGCTCAGAAATGTCCTTTTTT-3'
7. Kreiere anti-sense Strang:  
3'-ACCTGTAAAGACTCGGTATGAAGTTCTCTTATACCGAGTCTTTACAGGAAAAAGAGCT-5'
8. Addition der Restriktionsenzym-Überhänge für SalI  
5'-TGGACATTTCTGAGCCATACCTTCAAGAGAAATATGGCTCAGAAATGTCCTTTTTTC-3'  
3'-ACCTGTAAAGACTCGGTATGAAGTTCTCTTATACCGAGTCTTTACAGGAAAAAGAGCT-5'

Die ds shRNA wurde über die HpaI Schnittstelle, die ein stumpfes Ende generiert, sowie die SalI Schnittstelle in den pACDCsh Vektor inseriert.

### Hybridisierung und 5' Phosphorylierung der ds shRNA

Für die Insertion der ds shRNA in den pACDCsh Vektor mussten zunächst die sense und anti-sense Stränge der shRNA Oligonukleotide (gelöst zu 200 µM in Wasser) hybridisiert werden. Hierfür wurden die Oligonukleotide zu 50 µM in 20 µl 1x Oligo-Annealing-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,1M NaCl, pH 8,0) für 4 min auf 95 °C erhitzt und dann bei RT für 30 min langsam abgekühlt. Im Anschluss erfolgte eine 5'Phosphorylierung der generierten ds shRNA mit der T4 Polynukleotid Kinase (PNK) in Anwesenheit von ATP nach Herstellerangaben.

### Restriktion und Dephosphorylierung des pACDCsh Vektors

Im nächsten Schritt wurde der pACDCsh Vektor nach Herstellerangaben mit den FastDigest Enzymen SalI sowie HpaI geschnitten und simultan mit Fast AP Thermosensitive Alkaline Phosphatase dephosphoryliert. Im Anschluss wurde der linearisierte Vektor über eine Gelelektrophorese mit dem Qiagen Gel Extraction Kit aufgereinigt und in EB-Puffer eluiert.

### Ligation von pACDCsh mit ds shRNA, Transformation und Plasmid-Aufreinigung

50 ng des linearisierten pACDCsh Vektors wurden im molaren Verhältnis 1:2 mit 5'phosphorylierter ds shRNA mit der T4 Ligase in Anwesenheit von 5 % PEG 4000 für 1 Stunde bei 22 °C nach Herstellerangaben ligiert. Im Anschluss wurden *E.coli* kompetente Zellen mit dem Ligationsansatz durch einen

Hitzeschock transformiert und positive Klone über die Ampicillin-Resistenz auf LB-Platten (100 µg/ml Ampicillin) selektiert. Die DNA der Klone wurde dann mit dem NucleoSpin Plasmid Kit aufgereinigt und positive Klone mit einem Kontrollverdau mit Sall identifiziert (Verlust der Sall Schnittstelle nach erfolgreicher Klonierung).

### Sequenzierung der pACDCsh Klone

Die Sequenzierung der Insertion der ds shRNA erfolgte mit BigDye am API PRISM 310 Genetic Analyzer in Anwesenheit eines U6 Promotor-bindenden Primers nach folgendem Protokoll (Tabelle 23):

**Tabelle 23: Protokoll für die Sequenzierungs-PCR mit BigDye.**

PCR	V [µl]	PCR-Bedingungen
Plasmid	300 ng	96 °C 25 s
Primer mU6	0,5	50 °C 15 s
5x Sequenzierungspuffer	2,0	60 °C 2 min
Wasser	add 9,0	
Initiale Denaturierung bei 95 °C für 5 min		40 Zyklen
BigDye	1,0	alle Temperaturschritte mit 1 °C/s Zu- oder Abnahme

Von den positiven Klonen wurde eine Medi-Präparation mit dem NucleoBond Xtra Midi Plus EF vorgenommen und Glycerolstocks hergestellt (800 µl Bakterienkultur + 200 µl Glycerin).

#### 4.2.9.3 Klonierung von pAd-Konstrukten

Die Ligation der Expressionskassette aus dem pACDC in den pAd/PL-DEST Vektor erfolgte über eine Rekombinase-Reaktion nach Herstellerangaben im molaren Verhältnis von 1:5 (110 ng pACDC (ca. 5100 bp) und 150 ng pAd/PL-DEST (ca. 34864 bp)). Der sequenzierte Vektor wurde mit dem NucleoBond Xtra Midi Plus EF Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt und anschließend mit dem Enzym PacI linearisiert. Der linearisierte Vektor wurde schließlich für die Virusproduktion eingesetzt (s. 4.3.2).

## 4.3 Zellkultur

Das Arbeiten mit den Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilbank. Alle Zentrifugationsschritte mit lebenden Zellen erfolgten sofern nicht anders angegeben bei 400 x g für 8 min. Die Kultivierung aller Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> der Firma Heraeus. Das Medium für die Kultivierung von Zellen stammte von der Firma GIBCO Lifetechnologies (DMEM + GlutaMAX oder RPMI 1649 + GlutaMAX) und wurde sofern nicht anders angegeben mit 10 % FKS, 100 µg/ml Streptomycin, 100 Units/ml Penicillin sowie 50 µM β-Mercaptoethanol versetzt.

### 4.3.1 Zelllinien

Für die Gewinnung und Amplifikation von adenoviralen Überstand wurde der Fibroblastenstamm HEK 293-A verwendet (Invitrogen). Diese Zelllinie exprimiert das Protein E1, das für die Replikation des Virus nötig ist. Des Weiteren besitzt diese Zelllinie eine veränderte Morphologie, die das Detektie-



ren der Adenovirus-typischen Plaques erleichtert. Die HEK 293-A Zellen wurden nach Herstellerangaben in DMEM-Kulturmedium kultiviert.

### 4.3.2 Herstellung und Amplifikation von adenoviralen Überständen

Die Virenproduktion erfolgte mit dem speziellen Fibroblastenstamm HEK 293A. Am Vortag wurden im 6-Well-Format  $5 \times 10^5$  HEK 293-A Zellen in 2 ml DMEM Medium ausplattiert. Die Transfektion erfolgte bei einer Konfluenz von ca. 70 % der Zellen. Hierfür wurde das Medium der HEK 293-A Zellen mit frischem DMEM-Medium ohne Antibiotikum ersetzt und die Zellen nochmals für 30 min im Brutschrank inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurde der Transfektionsmix vorbereitet. 1 µg PacI verdautes und aufgereinigtes Plasmid wurde mit 250 µl Opti-MEM I Reduced Serum Medium gemixt. Außerdem wurden 3 µl Lipofectamin 2000 Transfektionsreagenz mit 250 µl Opti-MEM I Reduced Serum Medium gemixt und für 5 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden der Plasmid- und der Lipofectamin-Mix vereinigt und weitere 20 min bei RT inkubiert. Schließlich wurden die 500 µl Transfektionsmix tropfenweise auf die HEK 293-A Zellen gegeben und diese bis zur Entstehung eines cytopathischen Effekts kultiviert. Ein Tag nach der Transfektion wurde das Medium mit frischem antibiotikahaltigen DMEM-Medium ersetzt. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die HEK 293-A Zellen in 10 cm Gewebekulturschalen umgesetzt. Jeden zweiten bis dritten Tag wurde das Medium gewechselt, bis ein deutlicher cytopathischer Effekt erkennbar war. Dann wurde der virale Überstand gewonnen. Hierfür wurden die Zellen geerntet und durch dreimaliges Einfrieren bei  $-80^\circ\text{C}$  und Auftauen bei  $37^\circ\text{C}$  aufgebrochen. Im Anschluss wurden die Zellen bei 2000 xg und RT für 15 min zentrifugiert. Der gewonnene virale Überstand wurde steril filtriert ( $0,45\ \mu\text{m}$ ) und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

Für die Amplifikation des viralen Überstandes wurden HEK 293-A Zellen mit dem gewonnenen viralen Überstand transduziert. Hierfür wurden  $5 \times 10^6$  HEK 293-A Zellen in 10 cm Gewebekulturschalen am Vortag in DMEM-Medium ausplattiert. Für die Transduktion wurden 500 µl Virusüberstand auf die Zellen getropft und bis zur Entstehung des cytopathischen Effekts kultiviert. Im Anschluss wurde wiederum der virale Überstand wie oben beschrieben gewonnen.

### 4.3.3 Isolation und Sortierung von T-Zellen aus der Milz und den Lymphknoten

Es wurden die T-Zellen aus der Milz und den Lymphknoten (oberflächliche Hals-, achsiale, mesenteriale, inguinale, lumbare, kaudale, renale und brachiale) präpariert. Hierfür wurden diese aus der zuvor mit Genickbruch getöteten Maus entnommen und in PBS/BSA eine Einzelzellsuspension mithilfe eines feinporigen Metallsiebes (ca.  $200\ \mu\text{m}$  Durchmesser) hergestellt und bei 1200 rpm und RT zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Erythrozyten aus der Milz mit einer Erythrozytenlyse entfernt. Hierfür wurde das Zellpellet in 1 ml Erythrozytenlysepuffer (155 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 mM  $\text{KHCO}_3$ , 100 µM EDTA, pH  $\sim 7,2$ ) pro Milz resuspendiert, durch ein  $70\ \mu\text{m}$  Nylonsieb gefiltert und im Anschluss direkt in PBS/BSA gewaschen (mindestens 1:5 verdünnt). In den weiteren Schritten wurde das Zellpellet immer in 0,5 ml PBS/BSA pro Milz resuspendiert. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern, wurde die Zelllösung mit 20 µg/ml anti-Maus Fcγ Rezeptor versetzt und dann mit den entsprechenden Antikörpern zur Separation der naiven T-Zellen gefärbt. Alle Inkubationsschritte erfolgten bei  $4^\circ\text{C}$ .

#### 4.3.3.1 Sortierung von murinen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen durch magnetische Zellsortierung

Als erstes wurden die CD25<sup>+</sup> T-Zellen depletiert. Hierfür wurden die Zellen für 10 min bei 4 °C mit anti-Maus CD25 APC (1:250) gefärbt, im Anschluss gewaschen und mit anti-APC-Microbeads (1:10) für 15 min inkubiert. Nach Vereinzeln der Zellen durch einen Separationsfilter erfolgte die magnetische Depletion am AutoMACS mit dem Programm depletes. Anschließend wurden die CD25<sup>-</sup> Zellen gewaschen und mit anti-Maus-CD4-Microbeads für 15 min inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Zellen wiederum magnetisch am AutoMACS mit dem Programm posseld2 separiert. Die Zellen wiesen eine Reinheit von über 95 % auf.

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

Die naiven CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD45RB<sup>high</sup> T-Zellen wurden am Zellsorter Arial II nach spezifischer Oberflächenfärbung sortiert. Zunächst wurden CD4<sup>+</sup> Zellen angereichert. Hierfür wurden die Zellen für 15 min mit anti-FITC Microbeads (1:10) inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die CD4<sup>+</sup> Zellen über LS-Handsäulen von Milltenyi nach Herstellerangaben magnetisch separiert. Im Anschluss wurden die CD4<sup>+</sup> Zellen mit anti-Maus CD4, anti-Maus CD25 und anti-Maus CD45RB für 10 min gefärbt. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD45RB<sup>high</sup> T-Zellen am Zellsorter sortiert. Die Zellen wiesen eine Reinheit von über 99 % auf.

#### 4.3.3.3 Sortierung von murinen naiven CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup> und Gedächtnis-T-Zellen durch FACS

Die naiven T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>) und die Gedächtnis-T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>) wurden am Zellsorter Arial II nach spezifischer Oberflächenfärbung sortiert. Zunächst wurden CD8<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>Mac1<sup>-</sup> Zellen angereichert. Hierfür wurden die Zellen mit Ratte-anti-Maus B220 (8 µg/ml), Ratte-anti-Maus CD8 (4 µg/ml) und Ratte-anti-Maus MAC-1 (4 µg/ml) für 10 min inkubiert und im Anschluss über LS-Handsäulen von Milltenyi nach Herstellerangaben magnetisch separiert. Die Negativfraktion wurde dann mit anti-CD4, anti-CD25, anti-CD62L und anti-CD44 für 10 min gefärbt (ca. 50 Millionen Zellen pro ml) und die naiven und Gedächtnis-T-Zellen am Zellsorter sortiert. Die Zellen wiesen eine Reinheit von über 99 % auf.

#### 4.3.4 Bestimmung der Zellzahl mithilfe der Neubauer Zählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die jeweilige Zellsuspension entsprechend verdünnt und zur Bestimmung der toten Zellen mit Trypanblau gefärbt. Es wurde die Zellanzahl mithilfe der Neubauer Zählkammer unter dem Lichtmikroskop bestimmt und die Zellzahl nach folgender Formel berechnet:

$$A = B \times 10^4 \times VF \times V \quad \text{mit} \quad \begin{array}{l} A = \text{Zellzahl je ml} \\ B = \text{Mittelwert der Zellanzahl der gezählten Großquadrate} \\ V = \text{Gesamtvolumen der Zellsuspension} \\ VF = \text{Verdünnungsfaktor} \end{array}$$

#### 4.3.5 Kurzzeitstimulation von naiven T-Zellen und Inhibition des TCR-Signalwegs

Um die Abhängigkeit der Expression von *Irf8* vom T-Zellrezeptor-Signalweg zu analysieren, wurden naive T-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen (0 bis 4 µg/ml) und Stimulationszeiten (0 bis

7 h) mit  $\alpha$ CD3 und  $\alpha$ CD28 (ü. N. an Kulturplatten gebunden) in RPMI-Medium mit 10 ng/ml IL2 Kurzzeit stimuliert. In einigen Experimenten wurden die Zellen vor der Stimulation mit Inhibitoren behandelt, die spezifisch einen bestimmten Teil des T-Zellrezeptor –Signalweges blockieren. Hierfür wurden naive T-Zellen in RPMI-Medium (plus 10 ng/ml IL2) für 20 min mit den Inhibitoren CsA (50 nM), BTP1 (50 nM) oder U0126 (50  $\mu$ M) bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und im Anschluss wie oben beschrieben stimuliert. Nach der Stimulation wurden die Zellen geerntet und in 2x Laemmli-Puffer für die Western Blot Analyse resuspendiert.

#### 4.3.6 Bestimmung des Proliferationsverhaltens mittels einer CFSE-Färbung

Das Proliferationsverhalten von T-Zellen wurde mittels einer CFSE-Färbung am Durchflusszytometer analysiert. Der Farbstoff CFDA-SE (Carboxylfluorescein N-succinimidyl Ester) diffundiert in die Zellen, wird in CFSE Derivate gespalten und verbleibt in der Zelle. Da CFSE gleichmäßig an die Tochterzellen weitergegeben wird und sich somit mit jeder Teilung verdünnt, lassen sich am Durchflusszytometer die einzelnen Proliferationspopulationen anhand der abnehmenden Farbstoffmenge pro Zelle unterscheiden. Für die CFSE-Färbung wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, dann zu  $1 \times 10^7$  Zellen/ml in PBS resuspendiert und mit 5  $\mu$ M CFSE für 2 min bei RT gefärbt. Anschließend wurden die Zellen mit RPMI-Medium gewaschen und in Kultur genommen.

#### 4.3.7 Adenovirale Transduktion von naiven T-Zellen

Für die adenovirale Überexpression oder den shRNA-Knockdown wurden naive T-Zellen vor der *in vitro* Differenzierung mit adenoviralem Überstand transduziert. Die Transduktion erfolgte im 12-Well-Format in einem Volumen von 2,5 ml mit je  $4 \times 10^6$  Zellen pro Well oder im 24-Well-Format in einem Volumen von 1 ml mit je  $2 \times 10^6$  Zellen pro Well. Für die Transduktion wurden die naiven T-Zellen in DMEM-Medium mit 5 mM HEPES, 10 ng/ml IL2 und 700  $\mu$ l (12-Well) bzw. 300  $\mu$ l (24-Well) Virusüberstand für 1 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Das entsprechende Volumen am Virusüberstand wurde zuvor austitriert. Im Anschluss wurden die Zellen in RPMI-Medium gewaschen und *in vitro* unter Th1 und iTreg polarisierenden Bedingungen kultiviert (s. 4.3.8).

#### 4.3.8 *In vitro* Differenzierung von T-Helferzellen

Die Kultivierung von primären T-Zellen erfolgte im 48-Well-Format in RPMI-Medium. Die separierten naiven T-Zellen wurden mit 1  $\mu$ g/ml  $\alpha$ CD3 und 2  $\mu$ g/ml  $\alpha$ CD28, welche ü. N. in PBS an die Zellkulturplatte gekoppelt wurden, sowie in der Anwesenheit des Subtyp-spezifischen Zytokin-Stimulus und blockierenden Antikörpern polarisiert. Nach einer Kultivierung von 3 Tagen wurden die Zellen vom Stimulus genommen, 1:1 gesplittet und mit frischem Medium plus IL2 (nur für Th0, Th1, Th2, und iTreg) und IL7 (nur für Gedächtnis-T-Zellen) aufgefüllt. Die Polarisationsbedingungen für die Differenzierung von T-Helferzellen sind in Tabelle 24 zusammengefasst.

**Tabelle 24: Polarisationsbedingungen für die *in vitro* Differenzierung von T-Helferzellen.**

Zytokin/Antikörper	Konzentration [ng/ml]					Gedächtnis-T-Zellen
	Th0	Th1	Th2	iTreg	Th17	
Maus IL2	10	10	10	10	-	10
Maus IL4	-	-	30	-	-	-
Maus IL6	-	-	-	-	20	-
Maus IL7	-	-	-	-	-	7
Maus IL12	-	10	-	-	-	-
Maus IL23	-	-	-	-	20	-
TGFβ	-	-	-	0,7-2	1	-
anti-Maus IL4	10.000	10.000	-	10.000	10.000	-
anti-Maus IL12	10.000	-	10.000	-	-	-
anti-Maus IFNγ	10.000	-	10.000	10.000	10.000	-

#### 4.3.9 Ficollisierung von *in vitro* differenzierten T-Zellen

Die *in vitro* differenzierten T-Zellen wurden geerntet und die lebenden Zellen mit der Pancoll Mouse Lösung von PAN Biotech extrahiert. Hierfür wurden 3 ml Pancoll Mouse Lösung mit den zuvor geernteten Zellen sehr vorsichtig in einem Falcon überschichtet und bei 2000 rpm für 20 min bei RT und ohne Bremse zentrifugiert. Aufgrund der geringeren Dichte sammeln sich die toten Zellen am Boden des Falcons. Die lebenden Zellen befinden sich hingegen an der Interphase zwischen Pancoll Mouse Lösung und Zellsuspension. Die lebenden Zellen wurden sehr vorsichtig abgenommen und zweimal je nach Verwendung mit RPMI oder PBS gewaschen.

#### 4.3.10 Apoptose-Induktion in naiven und in *in vitro* differenzierten T-Zellen

Die Apoptose-Induktion erfolgte mit anti-FAS (Th1 Zellen) oder Methotrexat (MTX) (naive, iTreg und Gedächtnis-T-Zellen). MTX ist ein zytotoxisches Medikament, welches in der Krebstherapie eingesetzt wird und die FAS-vermittelte Apoptose bei Tumorzellen auslöst (Friesen et al., 1996). *In vitro* differenzierte Zellen wurden zuvor ficollisiert und die lebenden Zellen extrahiert. Es wurden je 0,5 x 10<sup>6</sup> Zellen pro 48 Well mit 1 μM MTX oder 1 μM anti-Fas in RPMI-Medium in Anwesenheit von 10 ng/ml IL2 und im Fall der Gedächtnis-T-Zellen zusätzlich mit 10 ng/ml IL7 für 20 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet, in PBS gewaschen und die apoptotischen Zellen mittels einer Annexin V Färbung durchflusszytometrisch bestimmt.

### 4.4 Durchflusszytometrie

Alle verwendeten Antikörper für die Oberflächen- und Intrazellulär-Färbungen sind in Abschnitt 4.1.7 in Tabelle 13 zusammengefasst. Alle Zentrifugationsschritte (Waschschritte) erfolgten bei 400 x g und 4 °C für 5 min. Alle Durchflusszytometrie-Messungen wurden an einem LSR Fortessa durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der Software FlowJo 7.6.5.

#### 4.4.1 Färbung von Oberflächenmarkern

Die zu analysierenden Zellen wurden in PBS gewaschen und dann in 100 µl PBS mit den entsprechenden Antikörpern für 20 min bei 4 °C im Dunkeln gefärbt. Anschließend wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen, in PBS/BSA aufgenommen und am Durchflusszytometer analysiert. Sofern auch Transkriptionsfaktoren oder Zytokine in der zu analysierenden Probe angefärbt wurden, erfolgte die Färbung von Oberflächenmarkern nach Fixierung gleichzeitig mit den anderen Antikörpern.

#### 4.4.2 Färbung von apoptotischen Zellen

Die Färbung der apoptotischen Zellen erfolgte mit dem Annexin V Apoptose Detection Kit APC von eBioscience in 100 µl 1x Annexin V Puffer nach Herstellerangaben. Zuvor wurden die CD4<sup>+</sup> Zellen in einer Oberflächenfärbung angefärbt (s. 4.4.1). Nach der Annexin V Färbung wurden die toten Zellen mit Propidiumiodid gefärbt (s. 4.4.3) und direkt im Anschluss die Anzahl der apoptotischen Zellen am Durchflusszytometer bestimmt.

#### 4.4.3 Färbung von toten Zellen

Für nicht fixierte Zellen wurden die toten Zellen mit Propidiumiodid (1:100) direkt vor der durchflusszytometrischen Messung angefärbt.

Um zwischen lebenden und toten Zellen auch nach der Fixierung zu diskriminieren, wurden die Zellen vor der Fixierung mit einem Pacific Orange (PO) Succinimidyl Ester gefärbt. Dieser Ester ist chemisch reaktiv und penetriert die zerstörte Zellmembran von toten Zellen. Im Zytoplasma reagiert der aktive Ester mit freien Aminogruppen zu einem stabilen, fluoreszierenden Produkt und verbleibt im Zytoplasma (Perfetto et al., 2006). Für die Färbung wurden die Zellen in 100 µl PBS aufgenommen und für 20 min mit 1 µg/ml PO Succinimidyl Ester bei RT im Dunkeln gefärbt. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen fixiert.

#### 4.4.4 Intrazelluläre Färbung von Transkriptionsfaktoren

Die Fixierung und Färbung von Transkriptionsfaktoren und Oberflächenmarkern erfolgte mit dem Foxp3-Staining Buffer Set von eBioscience. Die Zellen wurden mit 500 µl Fixierungs-/Permeabilisierungslösung ( $\frac{1}{4}$  Fixierkonzentrat und  $\frac{3}{4}$  Fixierdiluent) für eine halbe Stunde bei 4 °C im Dunkeln fixiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 1 ml 1x Permeabilisierungspuffer gewaschen und mit den entsprechenden Antikörpern in 100 µl 1x Permeabilisierungspuffer für eine halbe Stunde bei 4 °C im Dunkeln gefärbt. Nach einem erneuten Waschschrift mit PBS/BSA wurden die Zellen am Durchflusszytometer in PBS/BSA analysiert.

#### 4.4.5 Intrazelluläre Färbung von Zytokinen

Für die Analyse der Zytokin-Produzenten wurden die Zellen vor der Fixierung mit PMA und Ionomycin für 5 Stunden restimuliert (nicht physiologische Stimulation). Des Weiteren wurde die Zytokin-Sekretion durch Zugabe von Brefeldin A gehemmt. Brefeldin A verhindert den Transport von Vesikeln vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat (Klausner et al., 1992).

Die Fixierung der Zellen erfolgte mit 500  $\mu$ l Formaldehyd (4 %) für 30 min bei RT im Dunkeln. Im Anschluss wurden die Zellen mit Saponin (0,5 % in PBS) gewaschen und für 5 min erneut in Saponin inkubiert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 100  $\mu$ l Saponin mit den entsprechenden Antikörpern für 30 min bei RT im Dunkeln gefärbt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS/BSA gewaschen und in PBS/BSA am Durchflusszytometer analysiert.

## 4.5 Bioinformatische Analysen

### 4.5.1 Prozessierung der RNA-Seq Daten der T-Helferzellen

Die Prozessierung der RNA-Seq Daten wurde von Stefan Kröger durchgeführt. Nach einer Qualitätskontrolle der extrahierten sequenzierten Reads mittels FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) wurden die Reads durch Verwendung des Solexa Trimming Tools (Cox et al., 2010) getrimmt. Im Anschluss wurden die getrimmten sequenzierten Reads mit tophat2 (Kim et al., 2013) gemappt und eine Indexerstellung sowie Sortierung mit Samtools (Li et al., 2009) vorgenommen. Zur Berechnung der FPKM (*Fragments Per Kilobase Of Exon Per Million Fragments Mapped*) -Werte wurden HTSeq (Anders et al., 2015) und das Referenzgenom für Maus Version mm10 verwendet. Im letzten Schritt wurde die Normalisierung und Berechnung der differentiellen Expression für jedes Gen mit DESeq (Anders and Huber, 2010) durchgeführt. Gene, die einen  $\log_2FC$  größer 1 bzw. kleiner -1 und einen p-Wert kleiner 0,05 aufwiesen, wurden als differentiell exprimiert deklariert.

### 4.5.2 Identifikation von Subtyp-spezifischen Transkriptionsfaktoren: Konstruktion einer Headmap und kinetisches Clustering

Die Berechnung der differentiell exprimierten Gene, die Erstellung der Headmaps und das kinetische Clustering wurden von Stefan Kröger durchgeführt. Zur Identifizierung von Subtyp-spezifischen Transkriptionsfaktoren wurden die differentiell exprimierten Gene/Transkripte zwischen Th2 und Th1, iTreg und Th1 sowie iTreg und Th2, wie unter 4.5.1 beschrieben, zu jedem Zeitpunkt (5 bis 48 Stunden) bestimmt und nach Transkriptionsfaktoren gefiltert. Die Expressionsprofile der verbleibenden differentiell exprimierten Transkriptionsfaktor-Transkripte wurden in einer Headmap für jeden Vergleich visualisiert und entsprechend ihres kinetischen Expressionsprofils in Cluster eingeteilt. Die Einteilung der Cluster erfolgte anhand der Ähnlichkeit der Expressionsprofile. Für die Einteilung wurde der K-means Clustering Algorithmus verwendet, wobei  $k=6$  initial festgelegt wurde. Sowohl in den Heatmaps als auch in den zugehörigen Spagettiplots wurden die Cluster farblich markiert. Die Cluster können in den folgenden Expressionsgruppen eingeteilt werden: (a) konstant differentiell hochreguliert, (b) konstant hochreguliert, (c) früh hoch- und spät runterreguliert, (d) früh runter- und spät hochreguliert, (e) konstant runterreguliert und (f) konstant differentiell runterreguliert. Für die weiteren Analysen wurden nur die Transkripte berücksichtigt, die konstant hoch- bzw. runterreguliert wurden (Th2-Th1: C3 und C5; iTreg-Th1: C1, C2, C4 und C6; iTreg-Th2: C3, C4, C5 und C6).

Die identifizierten über den Zeitraum von 5 bis 48 Stunden konstant hoch- bzw. runterregulierten Transkriptionsfaktor-Transkripte zwischen den Th2 und Th1 (Cluster C3 und C5), iTreg und Th1 (Cluster C1, C2, C4 und C6) sowie iTreg und Th2 Zellen (Cluster C3, C4, C5 und C6) wurden einem

Transkriptionsfaktor zugeordnet und in Th1-spezifisch, Th2-spezifisch und iTreg-spezifisch eingeteilt. Aufgrund dessen, dass zuvor immer nur zwei Subtypen miteinander verglichen wurden, konnten sich gegebenenfalls falsch positive Subtyp-spezifische Transkriptionsfaktoren innerhalb der Subtyp-Gruppen befinden. Deshalb wurde, sofern ein Transkriptionsfaktor in 2 Subtypen vorhanden war, die differenzielle Expression ( $\log_2FC > 1$ ) dieses Transkriptionsfaktors innerhalb dieser beiden Subtypen nochmals überprüft. Wenn eine differenzielle Expression vorlag, wurde der Transkriptionsfaktor aus der entsprechend anderen Subtyp-Gruppe entfernt.

### 4.5.3 Prozessierung und Analyse von öffentlich verfügbaren Daten für die Konstruktion von genregulatorischen Netzwerken

Die Prozessierung und die Analyse der öffentlich verfügbaren Daten wurden von Stefan Kröger, Elzbieta Gralinska und Dr. Zhuo Fang durchgeführt.

Für die integrative Netzwerkanalyse wurden publizierte RNA-Seq (Vahedi et al., 2012; Hu et al., 2013a), Microarray (Wei et al., 2009) und ChIP-Seq (Wei et al., 2010) Datensätze verwendet (s. 4.1.1, Tabelle 3). Außerdem wurde der eigens generierte RNA-Seq Datensatz der Th1 und Th2 Zellen integriert. Das analytische Vorgehen der Datenintegration wurde in den Ergebnissen genauer beschrieben (s. 2.2 Integrative Netzwerkanalyse). Die verwendeten Daten wurden wie folgt prozessiert und analysiert:

Das initiale Netzwerk basierte auf den *Stat6* bzw. *Stat4* KO RNA-Seq Experimenten von Vahedi et al. (GSE40463: GSM994535, GSM994536, GSM994539, GSM994540). Für die Identifizierung der differenziell exprimierten (STAT6- bzw. STAT4-regulierten) Gene zwischen KO und WT wurden die veröffentlichten normalisierten FPKM-Werte verwendet. Die gering exprimierten Gene (normalisierter FPKM-Wert kleiner 1) wurden entfernt. Die differenzielle Genexpression wurde mit einem absoluten  $\log_2FC(KO-WT)$  größer bzw. kleiner 1 definiert. Im Fall der identifizierten STAT4-regulierten Gene wurde zusätzlich ein p-Wert kleiner 0,05 vorausgesetzt.

Zusätzlich wurden die Rohdaten der STAT6 bzw. STAT4 ChIP-Seq Experimente von Wei et al., 2010 (GSE22105: GSM550303; GSM550304, GSM550311 und GSM550312) integriert. Die Reads wurden mit dem Burrow-Wheeler Aligner (Li and Durbin, 2009) auf das Mausgenom mm9 aliniert. Wie in Wei et al. beschrieben, wurden die in den KO- und WT-Zellen gleichzeitig vorhandenen ChIP-Seq Peaks von den Daten entfernt. Mit der CisGenome (Ji et al., 2008) Peak Detektionssoftware wurden schließlich die alinierten Reads einem spezifischen Transkriptionsfaktor zugeordnet.

Die identifizierten STAT6- bzw. STAT4-regulierten und gebundenen Gene wurden im Anschluss nach Transkriptionsfaktoren, Zytokinen und Zytokinrezeptoren gefiltert. Hierfür wurde das Microarray Experiment (GSE14308) von Wei et al., 2009 verwendet. In diesem Datensatz wurden 782 Transkriptionsfaktoren und 271 Zytokine und Zytokinrezeptoren beschrieben, die für die Induktion, die Differenzierung und den Erhalt von T-Helferzellen wichtig sind. Diesen gelisteten Transkriptionsfaktoren, Zytokinen und Zytokinrezeptoren wurden Ensembl Gene Ids mithilfe des R Paketes biomaRt (Durinck et al., 2009) zugeordnet.

Basierend auf den Rohdaten wurde das RNA-Seq Experiment GSE48138 von Hu et al., 2013 reanalysiert, um eine maximale Kompatibilität mit dem eigens generierten RNA-Seq Datensatz zu gewährleisten. Hierfür wurden die Rohdaten exakt wie die eigens generierten RNA-Seq Daten durch Verwendung von Tophat2, Samtools, Htseq und DESeq prozessiert und die Normalisierung und Be-

rechnung der differenziell exprimierten Gene in Th1 bzw. Th2 Zellen im Vergleich zu naiven Zellen für jedes Gen mit DESeq durchgeführt (s. 4.5.1). Anhand der Hu und der eigens generierten RNA-Seq Ergebnisse wurde zum Schluss eine Kategorisierung der Gene in früh (4–48 h) und spät (72–336 h) differenziell exprimiert vorgenommen. Sofern ein gegensätzliches Ergebnis in dem von Hu und dem selbst generierten RNA-Seq Datensatz bzw. zwischen den verschiedenen Zeitpunkten vorlag, wurde das Gen als nicht differenziell exprimiert angesehen.

#### 4.5.4 Textmining Recherche zur Bestimmung von potenziellen Th1-spezifischen Gen-Gen-Interaktionen

Zur Bestimmung von potenziellen Th1-spezifischen Gen-Gen-Interaktionen wurde von Stefan Kröger eine Textmining Recherche durchgeführt. Insgesamt wurden ca. 22 Millionen Abstracts und Volltexte in Medline auf das gemeinsame Auftreten von jeweils zwei Genen oder Proteinen in einem Zusammenhang durchsucht. Hierfür wurden die Texte indiziert, um auf die enthaltenen Proteine und Gene sowie ihre Häufigkeit und eventuellen Relationen zwischen verschiedenen Proteinen effizient zugreifen zu können. Gene/Proteine wurden mittels Named Entity Recognition (NER) in Texten erkannt und ihre Häufigkeit sowie die Stelle ihres Auftretens (Satz) gespeichert. Anhand dieser Informationen wurden Protein-Protein-Interaktionen (PPI) identifiziert, indem analysiert wurde, welche Entitäten gleichzeitig auftraten und wie diese erkannt wurden. Die Ermittlung von Anfrage-spezifischen Genen sowie Interaktionen wurde mit statistischen Tests auf Signifikanz überprüft. Nach der Erkennung wurden die gefundenen Gene und Proteine auf Ensembl und Entrez Gene Identifier abgebildet.

Um Interaktionen mit mindestens einem bekannten (vorgegebenen) Gen zu extrahieren, wurde die Menge der Relationen auf solche, die das Zielgen enthalten, beschränkt. Dazu wurden Anfragen erzeugt, die das entsprechende Gen oder mehrere Gene beschreiben. Um potenzielle Interaktoren zu einer Auswahl von Th1-spezifischen Genen zu identifizieren, wurden die folgenden Anfragen formuliert: <“*t helper cell subtype 1*“ OR „*Th1*“ OR „*T helper cell 1*“ OR „*T helper 1*“ > oder <“*signal transducer and activator of transcription 4*“ OR „*Stat4*“ OR „*ENTREZ:20849*“ >.

#### 4.5.5 Konstruktion der genregulatorischen Netzwerke

Das STAT4-Netzwerk wurde von Stefan Kröger und das STAT6-Netzwerk von Elzbieta Gralinska (Masterarbeit von Elzbieta Gralinska, unveröffentlicht) konstruiert. Hierfür wurden die prozessierten Daten aus 4.5.1, 4.5.3 und 4.5.4 in einer großen Konnektivitätsmatrix integriert, welche das gesamte Netzwerk beschreibt und mit der Cytoscape Visualisierungs- und Integrationssoftware (<http://www.cytoscape.org/>) visualisiert. Das initiale STAT6-Netzwerk basierte auf STAT6 und 100 STAT6-regulierten Transkriptionsfaktoren, Zytokinen und Zytokinrezeptoren, die in den *Stat6* KO RNA-Seq Experimenten differenziell exprimiert wurden. Das initiale STAT4-Netzwerk basierte auf STAT4 und 100 STAT4-regulierten sowie STAT4-gebundenen Genen, die ebenfalls für Transkriptionsfaktoren, Zytokine und Zytokinrezeptoren kodieren und in den *Stat4* KO RNA-Seq Experimenten differenziell exprimiert wurden.

Im Anschluss wurden die Gene mit STAT6 bzw. STAT4 entsprechend ihrer Expression in Abhängigkeit von STAT6 bzw. STAT4 mit Kanten/Linien verbunden. Die Farbe der Kanten zeigt an, wie STAT6 bzw. STAT4 die Genexpression des Gens beeinflusst. Gelbe Kanten stehen für eine differenzielle Erhöhung ( $\log_2\text{FC}(\text{KO-WT}) < -1$ ) und blaue Kanten für eine differenzielle Verminderung



( $\log_2\text{FC}(\text{KO-WT}) > 1$ ) der Genexpression durch STAT6 bzw. STAT4. Zusätzlich wurden die Kanten mit einer Pfeilspitze versehen, sofern eine direkte Bindung in den STAT6 bzw. STAT4 ChIP-Seq Experimenten an dem jeweiligen Gen nachgewiesen wurde. Des Weiteren wurden die STAT6- bzw. STAT4-regulierten Gene mit den Informationen aus den RNA-Seq Ergebnissen ergänzt und mithilfe der Knotenfarbe visualisiert. Die Farbe des Knotens zeigt an, dass dieses Gen in der frühen (Farbe des inneren Knotens) oder späten (Farbe des äußeren Knotens/Rings) Phase im Vergleich zu naiven Zellen differenziell hoch- (gelb) bzw. runter- (blau) reguliert wird. Im Fall des STAT4-Netzwerkes wurden zum Schluss die gefundenen potenziellen Gen-Gen-Interaktionen mit schwarzen Kanten visualisiert.

#### **4.5.6 Literaturrecherche zu den STAT4- und STAT6-gebundenen und -regulierten Genen**

Die Literaturrecherche zu den 62 STAT4- und 32 STAT6-regulierten und -gebundenen Transkriptionsfaktoren wurde in PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) im Juni 2015 mit den Suchbegriffen <NAME\_OF\_TF> AND (“t cell” OR “differentiation”) durchgeführt. Die erhaltenen Listen wurden manuell gesichtet und die Tabelle 28 und Tabelle 29 (s. Anhang) generiert, die die Hauptfunktion jedes Transkriptionsfaktors beschreibt. In Abhängigkeit der beschreibenden Hauptfunktion des Transkriptionsfaktors erfolgte die Einteilung in 3 Gruppen: (1) assoziiert mit der Differenzierung von Th1 (für STAT4) bzw. Th2 (für STAT6) Zellen, (2) assoziiert mit der Differenzierung der jeweils anderen T-Helferzell-Subtypen und (3) nicht assoziiert mit der Differenzierung von T-Helferzellen.

#### **4.5.7 Präferenzielle Genexpression der STAT4- und STAT6-regulierten Gene**

Es wurde die präferenzielle Genexpression in T-Helferzellen der 100 STAT6- sowie der 276 STAT4-regulierten Transkriptionsfaktoren, Zytokine und Zytokinrezeptoren studiert. Hierfür wurden die Expressionswerte des publizierten Microarray Datensatzes (Wei et al., 2009) der 10-Tage alten T-Helferzell-Subtypen Th1, Th2, Th17 und iTreg verwendet. Innerhalb der 100 STAT6- und der 276 STAT4-regulierten Gene wurden alle Gene durch Berechnung des  $\log_2\text{FC}$  zwischen den einzelnen T-Helferzell-Subtypen identifiziert, die nur in einem Subtyp präferenziell exprimiert werden. Der Schwellenwert für ein differenziell exprimiertes Gen wurde auf ein  $\log_2\text{FC}$  größer bzw. gleich 0,5 (1,4-mal höher) gesetzt. So ist z. B. ein Gen Th2-Subtyp-spezifisch, wenn die Expression des Gens in Th2 Zellen 1,4-mal höher gegenüber der Expression in Th1, Th17 und iTreg Zellen ist. Th2-Subtyp-spezifische Gene wurden der Kategorie “Th2 > Th1 und Th2 > Th17 und Th2 > iTreg” zugeteilt. Th1- (Th1 > Th2 und Th1 > Th17 und Th1 > iTreg), Th17- (Th17 > Th1 und Th17 > Th2 und Th17 > iTreg) und iTreg-Subtyp-spezifische Gene (iTreg > Th1 und iTreg > Th2 und iTreg > Th17) wurden in analoger Weise bestimmt.

#### **4.5.8 Analyse zu den Asthma- und RA- assoziierten Risikogenen unter den STAT4- und STAT6-regulierten Genen**

Die Liste der 125 Asthma- (Renkonen et al., 2010) und der 98 RA-Risikogene (Okada et al., 2014) wurde nach Transkriptionsfaktoren, Zytokinen und Zytokinrezeptoren (Wei et al., 2009) gefiltert. Die verbleibenden 33 Asthma- bzw. 26 RA-Risikogene wurden mit den 100 STAT6- und 276 STAT4-

regulierten Genen verglichen. Die Schnittmenge dieser drei Datensätze wurde mit dem Venn Analyse Tool (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) analysiert.

#### **4.5.9 *In silico* Analyse zur Identifikation von potenziellen Transkriptionsfaktor-Bindestellen im Promotor von *Irf8***

Die *in silico* Analyse des *Irf8* Promoters nach Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren NFAT, AP1 (AP1R und AP1F) und NF $\kappa$ B wurde mit rVista (<http://genome.lbl.gov/vista/rvista/submit.shtml>) und der freierwerblichen Genomatix Software MatInspector durchgeführt. Der Promotorbereich wurde mit 2 kB vor dem Transkriptionsstart definiert.

#### **4.5.10 Konstruktion eines 3D-Plots aus durchflusszytometrischen Daten**

Die 3D-Plots wurden von Yen Hoang, wie von Bendfeldt und Kollegen beschrieben (Bendfeldt et al., 2012), erstellt. Hierfür wurden die Durchflusszytometrie-Daten mit der Software FlowJo 7.6.5 kompensiert und auf CD4<sup>+</sup> und lebende Zellen gated. Im Anschluss wurde jede Probe als csv Datei exportiert und die 3D-Plots in R bioconductor konstruiert. Hierfür wurden die Daten asinh transformiert. Dann wurde die Frequenz von TNF $\alpha$  (x-Achse) in Bins eingeteilt und jeder Bin einer entsprechenden Frequenz von IL2 (y-Achse) zugeteilt. Die Frequenz von IL2 wurde dann erneut in Bins eingeteilt. Schließlich wurde die Mittelwerte der Frequenzen für GM-CSF oder IFN $\gamma$  für jeden zweidimensionalen Bin kalkuliert und bildlich in einem Farb-Code dargestellt.

## Anhang

**Tabelle 25: Differenziell exprimierte Transkriptionsfaktoren zwischen Th2 und Th1 Zellen.** Aufgelistet sind nur die Transkriptionsfaktor-Cluster, die über den Zeitraum von 5 bis 48 Stunden konstant hoch- bzw. runterreguliert sind. Runterregulierte Transkriptionsfaktoren sind vermutlich spezifisch für Th1 und hochreguliert für Th2 Zellen.

Cluster und Funktion	Transkript	log <sub>2</sub> FC(Th2-Th1)			
		5h	12h	24h	48h
<b>konstant differenziell runterreguliert (Th1-spezifisch)</b>	3 Foxp1_NM_001197321	-0,42	-0,50	-1,05	-0,42
	3 Myb_NM_001198914	-0,87	-0,24	-0,57	-1,41
	3 Stat1_NM_001205313	-1,40	-0,64	-1,49	-1,91
	3 Stat1_NM_001205314	-1,55	-0,66	-1,45	-1,98
	3 Irf7_NM_001252601	-0,41	-0,44	-1,29	-2,45
	3 Irf8_NM_008320	-1,44	-1,30	-2,54	-4,31
	3 Irf1_NM_008390	-1,40	-0,72	-1,47	-2,65
	3 Stat1_NM_009283	-1,35	-1,02	-1,77	-2,20
	3 Tsc22d1_NM_009366	-1,48	-0,43	-1,18	-2,28
	3 Myb_NM_010848	-1,45	-0,91	-1,58	-1,29
	3 Pou2af1_NM_011136	-1,60	-0,95	-1,36	-1,40
	3 Stat4_NM_011487	-0,12	-0,99	-1,02	-0,96
	3 Elk3_NM_013508	-1,23	-1,05	-0,89	-1,34
	3 Etv6_NM_007961	0,52	-0,05	-0,57	-1,14
	3 Tbx21_NM_019507	-0,68	-0,76	-3,28	-5,05
	3 Nfat5_NM_133957	-1,18	-1,22	-0,55	-0,94
	3 Stat3_NM_213659	-0,46	-0,47	-1,07	-1,24
3 Stat3_NM_213660	-1,16	-0,30	-1,45	-1,32	
<b>konstant differenziell hochreguliert (Th2-spezifisch)</b>	5 Satb1_NM_001163630	0,69	0,67	0,65	2,58
	5 Satb1_NM_001163631	1,57	2,09	2,38	7,34
	5 Atf3_NM_007498	3,59	3,27	3,47	2,79
	5 Gata3_NM_008091	2,29	1,69	2,80	4,01
	5 Npas2_NM_008719	3,83	3,25	2,55	2,58
	5 Satb1_NM_009122	0,77	0,16	1,48	5,35
	5 Nfil3_NM_017373	0,31	0,83	2,77	2,55
5 Tanc2_NM_181071	-0,09	0,14	0,36	3,77	

**Tabelle 26: Differenziell exprimierte Transkriptionsfaktoren zwischen iTreg und Th1 Zellen.** Aufgelistet sind nur die Transkriptionsfaktor-Cluster, die über den Zeitraum von 5 bis 48 Stunden konstant hoch- bzw. runterreguliert sind. Runterregulierte Transkriptionsfaktoren sind vermutlich spezifisch für Th1 und hochreguliert für iTreg Zellen.

Cluster und Funktion	Transkript	log <sub>2</sub> FC(iTreg-Th1)			
		5h	12h	24h	48h
<b>konstant differenziell runterreguliert (Th1-spezifisch)</b>	1 Nfe2l1_NM_001130451"	-0,97	-2,98	-1,02	-0,15
	1 Asb8_NM_001170710	0,02	0,02	-3,45	-3,69
	1 Stat1_NM_001205313	-1,87	-1,19	-1,55	-1,55
	1 Stat1_NM_001205314	-2,10	-1,99	-1,57	-1,39
	1 Irf7_NM_001252601	-1,43	-2,16	-1,64	-1,32
	1 Irf1_NM_008390	-2,08	-1,70	-2,25	-2,03
	1 Stat1_NM_009283	-1,90	-1,21	-1,34	-1,18
	1 Eomes_NM_010136	-0,15	-1,61	-2,65	-2,95
	1 Irf7_NM_016850	-2,58	-1,25	-2,32	-2,39
	1 Tbx21_NM_019507	-3,34	-2,71	-4,65	-5,82
	<b>konstant runterreguliert (Th1-spezifisch)</b>	2 Zscan21_NM_001044703	-0,19	-2,82	0,33
2 Crem_NM_001110855		-0,50	0,37	-0,95	-1,65
2 Nfe2l1_NM_001130452		0,01	2,40	-1,76	0,24
2 Nr4a2_NM_001139509		-1,06	-1,07	-0,61	-2,01
2 A130010J15Rik_NM_001160360		-0,65	-0,26	-1,53	-0,37
2 Phtf1_NM_001163469		0,54	-0,88	0,14	-1,15
2 Pou2f2_NM_001163554		0,65	0,02	-1,26	-1,49
2 Nfatc1_NM_001164109	0,26	0,13	-0,31	-1,58	

Cluster und Funktion	Transkript	log2FC(iTreg-Th1)			
		5h	12h	24h	48h
	2 Tcf3_NM_001164152	0,32	-0,42	-1,17	-0,17
	2 Tcf3_NM_001164153	0,75	-1,67	-0,38	-0,08
	2 Lsr_NM_001164184	0,28	-2,07	0,26	-1,07
	2 Hmga1_NM_001166539	0,79	0,84	0,41	-1,05
	2 Hmga1_NM_001166541	-0,39	0,05	-1,02	0,37
	2 Ctbp1_NM_001198859	-0,33	0,35	-1,29	0,29
	2 Irf7_NM_001252600	-0,34	-0,95	-0,56	-1,49
	2 Mib2_NM_001256108	1,35	0,43	-1,29	-1,52
	2 Gabpb1_NM_001271467	0,08	1,24	-1,19	-1,01
	2 Atf3_NM_007498	-0,43	-0,50	-0,72	-1,97
	2 Etv6_NM_007961	-0,42	-0,67	-1,25	-2,28
	2 Fosl2_NM_008037	0,25	0,05	-0,33	-1,41
	2 Notch1_NM_008714	-0,60	-0,46	-0,74	-1,40
	2 Etv4_NM_008815	0,06	0,27	-0,09	-1,43
	2 Tsc22d1_NM_009366	0,39	-0,40	-0,87	-1,02
	2 Utf1_NM_009482	0,18	-0,83	-1,82	-2,03
	2 Egr2_NM_010118	-0,01	-0,06	-0,29	-1,06
	2 Fos_NM_010234	-0,44	-0,99	-1,14	-1,42
	2 Hif1a_NM_010431	-0,31	-0,33	-0,79	-1,55
	2 Pou2af1_NM_011136	0,04	-0,43	-0,43	-1,78
	2 Pou2f2_NM_011138	0,21	-0,59	-0,20	-1,44
	2 Stat4_NM_011487	0,02	-0,59	-1,25	-1,80
	2 Twist1_NM_011658	0,00	0,00	-0,06	-1,85
	2 Ctbp1_NM_013502	-0,18	-0,15	-1,88	0,39
	2 Nr4a2_NM_013613	0,71	-0,04	-0,98	-2,26
	2 Batf_NM_016767	-0,28	-0,45	-0,50	-2,00
	2 Etv5_NM_023794	-0,20	0,20	-0,28	-1,38
	2 A130010J15Rik_NM_181048	0,73	0,00	-0,09	-1,02
	2 Gabpb1_NM_207669	0,00	-1,40	-0,98	-0,78
<b>konstant differenziell hochreguliert (iTreg-spezifisch)</b>	4 Maf_NM_001025577	0,77	3,86	4,36	3,65
	4 Rorc_NM_011281	0,66	3,01	3,46	3,79
	4 Foxp3_NM_054039	-0,48	3,23	6,26	7,22
<b>konstant hochreguliert (iTreg-spezifisch)</b>	6 Ehmt1_NM_001012518	2,05	0,06	-0,18	0,61
	6 Ets1_NM_001038642	0,18	-0,36	1,06	1,35
	6 Zhx1_NM_001042438	0,50	-1,04	0,87	0,10
	6 Rarg_NM_001042727	0,33	0,17	1,28	1,06
	6 Zscan21_NM_001044704	1,63	-0,06	0,00	0,65
	6 Zscan21_NM_001044705	-0,32	1,33	0,58	2,62
	6 Gtf2ird1_NM_001081465	1,01	0,42	0,82	1,68
	6 Gtf2ird1_NM_001081466	0,71	0,00	-0,42	1,03
	6 Gtf2ird1_NM_001081469	-0,11	0,00	0,28	1,15
	6 Lhx6_NM_001083126	0,00	0,00	0,35	1,23
	6 Lhx6_NM_001083127	0,00	0,04	0,06	1,08
	6 Runx1_NM_001111023	0,35	2,14	1,85	0,97
	6 Gatad2a_NM_001113345	1,40	0,00	0,77	-0,06
	6 Stat5b_NM_001113563	0,23	0,67	1,41	1,12
	6 Phtf1_NM_001163468	2,28	0,01	-0,02	0,30
	6 Satb1_NM_001163630	-0,33	0,34	0,94	2,64
	6 Nrf1_NM_001164230	1,30	-0,27	0,43	0,25
	6 Mta3_NM_001171053	0,60	0,73	1,21	1,37
	6 Rara_NM_001176528	0,61	0,99	1,31	1,75
	6 Rara_NM_001177302	0,06	1,11	-0,14	0,65
	6 Foxp1_NM_001197321	0,48	0,14	0,94	1,82
	6 Ecsit_NM_001253898	1,43	-0,79	-0,04	0,94
	6 Arntl_NM_007489	-0,06	0,80	1,45	1,20
	6 Klf2_NM_008452	0,40	-0,11	0,78	1,77
	6 Npas2_NM_008719	-0,04	0,94	1,55	1,11
	6 Rara_NM_009024	1,19	0,63	0,54	1,49
	6 Sox4_NM_009238	0,35	0,19	0,38	1,74
	6 Vdr_NM_009504	-0,03	0,14	0,87	2,12
	6 Runx1_NM_009821	0,51	1,44	0,95	0,66
	6 Pou6f1_NM_010127	0,65	0,84	2,04	2,67
	6 Tsc22d3_NM_010286	0,41	-0,17	1,09	1,96

**Tabelle 27: Differenziell exprimierte Transkriptionsfaktoren zwischen iTreg und Th2 Zellen.** Aufgelistet sind nur die Transkriptionsfaktor-Cluster, die über den Zeitraum von 5 bis 48 Stunden konstant hoch- bzw. runterreguliert sind. Runterregulierte Transkriptionsfaktoren sind vermutlich spezifisch für Th2 und hochreguliert für iTreg Zellen.

Cluster und Funktion	Transkript	log2FC(iTreg-Th2)			
		5h	12h	24h	48h
<b>konstant differenziell runterreguliert (Th2-spezifisch)</b>	3 Satb1_NM_001163631	-1,67	-3,31	-4,74	-5,35
	3 Atf3_NM_007498	-4,02	-3,76	-4,19	-4,77
	3 Gata3_NM_008091	-2,01	-1,43	-2,73	-3,34
	3 Npas2_NM_008719	-3,87	-2,31	-1,00	-1,47
	3 Satb1_NM_009122	-0,76	-1,32	-2,14	-2,38
	3 Eomes_NM_010136	-0,23	-2,05	-2,19	-2,06
	3 Batf_NM_016767	-1,07	-0,97	-1,22	-2,09
	3 Irf7_NM_016850	-2,34	-1,86	-2,07	-0,24
	3 Nfil3_NM_017373	-0,12	-0,66	-2,16	-2,94
3 Tbx21_NM_019507	-2,66	-1,95	-1,36	-0,77	
<b>konstant runterreguliert (Th2-spezifisch)</b>	4 Creb1_NM_001037726	0,53	0,22	0,45	-1,00
	4 Gtf2i_NM_001080747	0,00	-0,02	0,00	-1,10
	4 Gtf2i_NM_001080749	1,32	-0,06	0,23	-0,09
	4 Crem_NM_001110855	-0,45	-0,14	-1,81	-0,98
	4 Crem_NM_001110857	1,16	0,00	-0,40	-0,12
	4 Gatad2a_NM_001113345	1,28	0,00	0,22	-0,37
	4 Nfe2l1_NM_001130452	1,97	-0,38	-3,59	-0,47
	4 Nfkbiz_NM_001159395	-0,52	0,96	-0,19	-1,64
	4 A130010J15Rik_NM_001160360	-0,36	-0,34	-1,38	-0,33
	4 Pou2f2_NM_001163554	0,66	-0,33	-1,26	-1,73
	4 Pou2f2_NM_001163555	0,11	-0,71	0,10	-1,06
	4 Pou2f2_NM_001163556	0,90	-0,17	-1,01	-0,93
	4 Nfatc1_NM_001164109	0,19	0,56	0,62	-1,04
	4 Tcf3_NM_001164149	1,04	-0,38	-0,61	-0,21
	4 Tcf3_NM_001164152	0,01	-0,07	-1,09	-0,57
	4 Tcf3_NM_001164153	1,34	-1,47	-2,06	0,03
	4 Nrf1_NM_001164230	1,30	0,29	-0,33	0,26
	4 Asb8_NM_001170710	0,85	4,01	-4,01	-3,26
	4 Nfkb2_NM_001177370	0,03	0,10	-1,07	0,22
	4 Mtf2_NM_001253879	0,45	0,00	-1,27	-0,63
	4 Mib2_NM_001256108	1,31	0,00	-1,71	-0,08
	4 Ctnnb1_NM_007614	0,03	0,00	-1,01	0,12
	4 Egr1_NM_007913	-0,13	-0,34	-0,48	-1,35
	4 Etv6_NM_007961	-0,94	-0,63	-0,68	-1,14
	4 Utf1_NM_009482	-0,16	-0,18	-2,19	-1,51
	4 Atf2_NM_009715	-0,28	-0,56	-1,15	-0,51
	4 Egr2_NM_010118	-0,24	-0,17	-0,56	-1,30
	4 Fos_NM_010234	0,03	-1,01	-1,02	-1,60
	4 Hif1a_NM_010431	-0,74	-0,09	-0,06	-1,05
	4 Nrf1_NM_010938	0,05	-0,32	-0,53	-1,01
	4 Pou2f1_NM_011137	1,23	0,33	-0,28	-0,42
	4 Pou2f2_NM_011138	1,20	-0,53	0,04	-1,26
	4 Rxra_NM_011305	0,21	0,01	-0,59	-1,20
	4 Six5_NM_011383	0,02	-0,14	-0,54	-1,33
	4 Tcf3_NM_011548	0,74	-0,14	-1,22	-0,70
	4 Zscan21_NM_011757	1,23	-0,19	-0,97	-1,72
	4 Nr4a2_NM_013613	0,40	0,30	-1,57	-0,43
	4 Irf4_NM_013674	-0,59	0,19	-0,01	-1,30
	4 Npff_NM_018787	0,11	-0,39	-2,35	-2,18
	4 Nfkb2_NM_019408	-0,36	-1,13	-0,62	-1,00
	4 Asb2_NM_023049	0,09	0,10	-0,52	-1,75
	4 Etv5_NM_023794	-0,02	-0,02	-0,11	-1,07
	4 Zfp444_NM_028316	-0,06	-0,44	-1,06	-0,14
4 Atf5_NM_030693	0,30	-1,02	-0,15	-0,29	
4 Klf7_NM_033563	1,06	0,19	0,23	-0,14	
4 Tanc2_NM_181071	0,16	-0,20	-0,18	-3,78	
4 Gabpb1_NM_207669	-1,27	-0,01	0,00	-1,35	
4 Ankrd10_NR_030780	1,09	0,06	0,30	-0,43	

Cluster und Funktion		Transkript	log2FC(iTreg-Th2)			
			5h	12h	24h	48h
<b>konstant differenziell hochreguliert (iTreg-spezifisch)</b>	5	Maf_NM_001025577	1,33	4,79	5,18	4,51
	5	Irf8_NM_008320	-0,29	1,84	2,85	4,58
	5	Rorc_NM_011281	1,56	3,85	4,15	3,76
	5	Foxp3_NM_054039	0,27	2,40	6,26	7,65
<b>konstant hochreguliert (iTreg-spezifisch)</b>	6	Rarg_NM_001042727	1,41	0,04	1,06	1,23
	6	Zscan21_NM_001044704	-0,02	1,89	0,00	2,47
	6	Tshz1_NM_001081300	1,05	0,46	0,32	0,34
	6	Gtf2ird1_NM_001081462	0,49	0,00	0,46	1,04
	6	Gtf2ird1_NM_001081465	1,20	1,06	1,50	0,84
	6	Gtf2ird1_NM_001081466	0,66	0,00	0,35	1,03
	6	Gtf2ird1_NM_001081469	0,14	-2,11	0,59	1,12
	6	Lhx6_NM_001083126	0,00	2,16	0,35	1,23
	6	Stat5b_NM_001113563	0,39	0,17	0,69	1,02
	6	Ppp1r16b_NM_001159662	1,15	0,18	1,00	1,18
	6	Tead1_NM_001166585	0,00	0,01	0,13	2,46
	6	Mta3_NM_001171053	1,11	0,84	0,90	1,40
	6	Rara_NM_001176528	1,05	1,02	1,43	1,89
	6	Foxp1_NM_001197321	0,90	0,64	1,99	2,24
	6	Myb_NM_001198914	0,62	0,08	-0,14	1,44
	6	Foxp3_NM_001199348	-0,27	0,00	-0,16	3,23
	6	Klf2_NM_008452	0,78	-0,13	0,47	2,37
	6	Nfic_NM_008688	1,43	0,21	0,17	0,25
	6	Rara_NM_009024	0,61	0,91	1,05	1,84
	6	Sox4_NM_009238	0,14	0,41	0,13	2,01
	6	Tcf7_NM_009331	1,40	0,10	0,31	0,58
	6	Tsc22d1_NM_009366	1,87	0,03	0,32	1,26
	6	Vdr_NM_009504	-0,19	0,19	0,91	1,92
	6	Zscan2_NM_009553	1,38	0,30	0,32	0,95
	6	Arnt_NM_009709	0,36	0,04	1,02	0,47
	6	Pou6f1_NM_010127	1,52	1,09	2,12	3,64
	6	Tsc22d3_NM_010286	0,81	-0,23	0,88	2,46
	6	Lef1_NM_010703	0,89	0,06	1,71	2,39
	6	Mxd4_NM_010753	1,39	-0,05	1,51	2,89
	6	Myb_NM_010848	0,99	-0,08	1,25	1,53
	6	Nfatc2_NM_010899	1,76	-0,08	0,34	0,22
	6	Pou2af1_NM_011136	1,64	0,52	0,93	-0,39
	6	Rarg_NM_011244	0,56	0,76	1,32	1,28
	6	Nr2c2_NM_011630	1,00	0,27	0,97	0,72
	6	Trpv2_NM_011706	0,95	0,54	1,02	0,59
	6	Irf5_NM_012057	0,39	0,65	1,13	2,01
	6	Elk3_NM_013508	1,87	2,50	1,97	1,58
	6	Rora_NM_013646	1,52	2,89	2,07	1,63
	6	Dbp_NM_016974	-0,07	0,02	1,44	2,87
	6	Ostf1_NM_017375	0,74	0,33	0,70	1,36
	6	Nfat5_NM_018823	0,34	-0,34	1,07	0,71
	6	Foxo1_NM_019739	1,01	0,42	0,64	0,93
	6	Gtf2ird1_NM_020331	1,04	0,00	0,60	1,42
	6	Nrarp_NM_025980	0,88	0,83	1,93	3,11
	6	Abtb1_NM_030251	0,85	-0,05	0,46	1,18
	6	Trps1_NM_032000	0,18	0,80	0,78	1,07
6	Mta3_NM_054082	0,62	0,50	1,18	1,48	
6	Nfat5_NM_133957	1,12	1,80	0,45	0,47	
6	E2f2_NM_177733	1,95	0,20	-0,49	0,43	
6	Thra_NM_178060	1,85	0,24	0,71	0,73	

**Tabelle 28: Funktion der 32 STAT6-bindenden und STAT6-regulierten Gene in Th2 Zellen, die für einen Transkriptionsfaktor kodieren.** Ergebnisse der Literaturrecherche, die von 2000–2015 im Kontext mit „Differenzierung“ und „T Zellen“ publiziert wurden. N.diff = nicht differenziell exprimiert.

STAT6-gebundene und STAT6-regulierte Gene	Regulation der Genexpression				Beschriebene Funktion in der Literatur	
	durch STAT6	in Th2 Zellen		Subtyp		
		früh	spät			
assoziiert mit der Differenzierung von Th2 Zellen	Gata3	positiv	↑	↑	Th2	Master-TF der Th2 Zellen (Yamane and Paul, 2013)
	Atf3	positiv	↑	↑	Th2, Th1	induziert durch IL4 und reguliert von Stat6 (Chen et al., 2003c)
	Satb1	positiv	n.diff	↑	Th2	induziert durch IL-4 (Ahlfors et al., 2010) und reguliert Th2 Zytokin-Expression (Ribeiro de Almeida et al., 2009)
	Nfil3	positiv	↑	↑	Th2, Th17	reguliert Th2 Zytokin-Milieu: ↑ IL4, ↓ IL13 und IL5 (Kashiwada et al., 2011) und inhibiert Th17 Differenzierung (Yu et al., 2013)
	Maf	positiv	↑	↓	Th2, Th17	reguliert positiv die IL4 Expression (Kwon et al., 2014) und induziert Th17 Differenzierung via RORγt (Tanaka et al., 2014)
	Pparg	positiv	↑	↑	Th2, Th1, Th17, iTreg	verstärkt die Produktion von Th2- und iTreg-spezifischen Zytokinen und verringert die IFNγ-Produktion und Differenzierung (da Rocha Junior et al., 2013)
assoziiert mit der Differenzierung anderer Th-Subtypen	Ar	positiv	↑	↑	Th1	inhibiert IL12 Signalweg und Th1 Differenzierung durch Hochregulation von Ptpn1 (Kissick et al., 2014)
	Irf7	positiv	↓	↓	Th1	amplifiziert die anti-virale Th1 Antwort durch Induktion der Expression von Typ I IFN kodierenden Genen (Honda et al., 2005; Lohoff and Mak, 2005)
	Stat2	positiv	n.diff	↓	Th1	vermittelt Typ IFN I-Signalweg und induziert Stat4 Aktivierung und Th1 Differenzierung (Farrar et al., 2000)
	Stat3	positiv	↑	↓	Th2, Th17, iTreg	induziert Th17 (Zhu and Paul, 2010b), fördert (Stritesky et al., 2011) und inhibiert iTreg Differenzierung (Laurence et al., 2012)
	Crem	positiv	↑	↑	Th17	reduziert Aktivierung des AKT/mTOR Pathway und verstärkt die Th17 Differenzierung (Koga et al., 2014)
	Etv6	positiv	↑	↑	Th17	Repressor in der Th17 Differenzierung (Ciofani et al., 2012)
	Hif1a	positiv	↑	↑	Th17, iTreg	unterstützt Th17 und inhibiert iTreg Differenzierung durch ein glykolytischen Shift (Palazon et al., 2014)
	Batf	positiv	↑	↑	Th17, Th9, Tfh	kontrolliert Th17 Differenzierung (Schrml et al., 2009; Ciofani et al., 2012), Tfh (Liu et al., 2013) und Th9 Zellen (Jabeen et al., 2013)
	Irf1	negative	↓	↓	Th1, Th2	induziert Th1 Differenzierung (Zhang et al., 2012) und unterdrückt IL4 als Antwort auf IFNγ (Elser et al., 2002)
	Nfatc3	negative	n.diff	-	Th1, Th2	verstärkt Th1 Zytokine IFNγ und TNFα, unterdrückt Th2 Zytokine IL4 und IL5 in Th2 Zellen (Rengarajan et al., 2002; Chen et al., 2003a)
	Tcf7	negative	↓	↓	Th1, Th2, Th17	induziert Gata3 (Yu et al., 2009) und inhibiert IFNγ und IL17 (Ma et al., 2011), herunterreguliert durch IL4/Stat6 und präferenziell exprimiert in Th1 Zellen (Lund et al., 2005)
	Pou2af1	negative	↓	↑	Th1, Th17	reguliert die Balance zwischen Th1 und Th2 (Brunner et al., 2007) und fördert die Th17 Differenzierung (Yosef et al., 2013)
	Irf8	negative	-	n.diff	Th1, Th17	fördert die Th1 Differenzierung durch Modulation der Funktion der APCs (Zhang et al., 2012) und reprimiert Th17 Differenzierung (Ouyang et al., 2011)
	Rora	negative	↑	↓	Th17	Hochreguliert in Th17 Zellen (Yi et al., 2012)
	Klf2	negative	↓	↓	Th1, iTreg	erhöht IL2 (Wu and Lingrel, 2005) und Ccr5 (Richardson et al., 2012) Expression und ist für die iTreg Differenzierung wichtig (Pabbisetty et al., 2014)
	Asb2	positiv	↑	n.diff		inhibiert Wachstum und verstärkt Kommitment in myeloiden Leukämie-Zellen (Guibal et al., 2002)
	Atf5	positiv	↑	↑		Adipozyten-Differenzierung (Zhao et al., 2014) und Oligodendrozyten-Differenzierung (Mason et al., 2005)

STAT6-gebundene und STAT6-regulierte Gene	Regulation der Genexpression				Beschriebene Funktion in der Literatur	
	durch STAT6	in Th2 Zellen		Subtyp		
		früh	spät			
<b>bisher nicht assoziiert mit der Differenzierung von Th-Zellen</b>	Cebpb	positiv	↓	↓		fördert Differenzierung von Epithelzellen (Liu et al., 2014), Chondrozyten (Ushijima et al., 2014) und Keratinozyten (Rozenberg et al., 2013)
	Cited2	positiv	n.diff	↓		Erhaltung der hämatopoetischen Homöostase während der Embryogenese (Chen et al., 2007)
	Creb3l2	positiv	↑	↑		Chondrozyten- Differenzierung (Imamura et al., 2014; Saito et al., 2014)
	Ddit3	positiv	↑	n.diff		kontrolliert Wachstum und Differenzierung von verschiedenen Zelllinien in der Inflammations- und Stressantwort (Chumakov et al., 2007)
	Rai14	positiv	↑	↑		porcine Adipozyten- Differenzierung (Hudson et al., 2015)
	Tanc2	positiv	↑	↑		reguliert erregende Synapsen (Han et al., 2010)
	Aff3	negative	↓	n.diff		Lymphoide Entwicklung und Onkogenese (Hinks et al., 2010; Tan et al., 2010)
	Pou2f2	negative	↑	↑		B-Zell- Differenzierung und vermittelt physikalische Interaktion mit T Zellen (Karnowski et al., 2012; Corcoran et al., 2014)
	Trps1	negative	↓	↓		Differenzierung und Proliferation von Chondrozyten (Wuelling et al., 2009)

**Tabelle 29: Funktion der 62 STAT4-bindenden und STAT4-regulierten Gene in Th1 Zellen, die für einen Transkriptionsfaktor kodieren.** Ergebnisse der Literaturrecherche, die von 2000–2015 im Kontext mit „Differenzierung“ und „T Zellen“ publiziert wurden. N.diff = nicht differenziell exprimiert.

STAT4-gebundene und STAT4-regulierte Gene	Regulation der Genexpression				Beschriebene Funktion in der Literatur	
	durch STAT4	in Th1 Zellen		Subtyp		
		früh	spät			
<b>assoziiert mit der Differenzierung von Th1 Zellen</b>	Tbx21	positiv	↑	↑	Th1	Master TF der Th1 Zellen (Yamane and Paul, 2013)
	Atf3	positiv	↑	↑	Th1, Th2	verstärkt Th1 Differenzierung durch Komplexion mit Jun und aktiviert IFN $\gamma$ Promotor (Filen et al., 2010)
	Crem	positiv	↑	↑	Th1, Th17	kontrolliert IL2 und IL17a Expression (Hedrich et al., 2012), reduziert die Aktivierung des AKT/mTOR Pathways (Koga et al., 2014)
	Egr2	positiv	↑	↓	Th1, Th17	wichtig für Tbx21 Expression (Du et al., 2014), reguliert negativ Th17 Differenzierung durch Inhibierung der Batf Aktivierung (Miao et al., 2013)
	Twist1	positiv	↑	↑	Th1, Th17, Tfh	inhibiert IFN $\gamma$ Produktion (Pham et al., 2012), fördert Th1 Zellüberleben (Haftmann et al., 2015), limitiert Th17 und Tfh Zellentwicklung (Pham et al., 2013)
	Irf8	positiv	↑	↑	Th1, Th17	Fördert Th1 Differenzierung durch Modulation der Funktion der APCs (Zhang et al., 2012) und reprimiert Th17 Differenzierung (Ouyang et al., 2011)
	Pou2af1	positiv	↑	↓	Th1, Th17	reguliert Balance zwischen Th1 und Th2 Immunität (Brunner et al., 2007), fördert Th17 Differenzierung durch Blockierung der IL2-Expression (Yosef et al., 2013)
	Runx3	positiv	n.diff	↑	Th1, Th2	kooperiert mit Tbet und fördert IFN $\gamma$ - sowie reprimiert IL4-Produzenten (Zhu and Paul, 2010b)
	Rela (p65)	positiv	n.diff	n.diff	Th1, Th17, Th2, Th	Mediator des TCR Signalwegs, fördert Th1 (Corn et al., 2003) und Th17 (Ruan et al., 2011) Differenzierung und inhibiert IL4-Expression (Casolaro et al., 1995)
	Relb	positiv	↑	↓	Th1, Th17	Mediator des TCR Signalwegs, essentiell für Th1 und Th17 (Yang et al., 2010) Differenzierung und, erhöht IFN $\gamma$ -Produzenten sowie Tbet und Stat4 Expression (Corn et al., 2005)
	Eomes	negative	n.diff	n.diff	Th1, Th2	involviert in IFN $\gamma$ Produktion und wird durch IL4 induziert (Tofukuji et al., 2012)



STAT4-gebundene und STAT4-regulierte Gene	Regulation der Genexpression			Beschriebene Funktion in der Literatur		
	durch STAT4	in Th1 Zellen				
		früh	spät	Subtyp		
assoziiert mit der Differenzierung anderer Th-Subtypen	Etv6	positiv	↑	↑	Th17	Repressor für die Th17 Differenzierung (Ciofani et al., 2012)
	Nr2f6	positiv	↑	↑	Th17	Repressor für die Th17 Differenzierung (Hermann-Kleiter et al., 2008)
	Foxo1	positiv	↓	n.diff	Th17, Tfh	unterdrückt Th17 (Wu et al., 2013) und Tfh Differenzierung (Stone et al., 2015), schützt T-Zellen vor Apoptose (Oh et al., 2011)
	Sreb1	positiv	↑	n.diff	Th17	unterdrückt Th17 Differenzierung (Cui et al., 2011)
	Usf1	positiv	↓	n.diff	Th17	inTh17 Zellen hochreguliert, unverzichtbar für Transkription von RORγt (Ratajewski et al., 2012)
	Hif1a	positiv	↑	↑	Th17, iTreg	unterstützt Th17 und inhibiert iTreg Differenzierung durch glykolytischen Shift (Palazon et al., 2014)
	Nfat5	positiv	↑	n.diff	iTreg	wichtig für iTreg Differenzierung (Li et al., 2014)
	Satb1	positiv	↓	n.diff	iTreg, Th2	inhibiert Foxp3-Expression (Grzanka et al., 2013), reguliert Th2 Zytokin- und Gata3-Expression (Ribeiro de Almeida et al., 2009)
	Sp3	positiv	n.diff	n.diff	iTreg	reguliert Promotoraktivität von Foxp3 negativ (Eckerstorfer et al., 2010)
	Nfe2l2	positiv	↓	n.diff	Th2, Th1	unterdrückt IFNγ-Produktion durch Induktion der Produktion der Th2-Zytokinen IL4, IL5 und IL13 (Rockwell et al., 2012)
	Smad3	positiv	↓	n.diff	Th17, iTreg, Th1	verstärkt RORγt- und Foxp3-Expression, inhibiert Th1 Differenzierung (Zhu and Paul, 2010b; Michalek et al., 2011)
	Nr1d1	negative	↓	n.diff	Th17	wichtig für Th17 Differenzierung (Yu et al., 2013)
	Klf2	negative	↓	↓	iTreg	wichtig für iTreg Differenzierung (Pabbisetty et al., 2014)
	Rarg	negative	↓	↓	iTreg	differenziell exprimiert in iTreg Zellen (Wei et al., 2009)
	Esrra	negative	↓	n.diff	Teff	transkriptioneller Regulator des Metabolismus und der Proliferation von Teff (Michalek et al., 2011)
	Jun	positiv	↓	↓	Th	Mediator des TCR Signalwegs (Hatzi et al., 2015)
	Junb	positiv	↓	↓	Th, Th2	Mediator des TCR Signalwegs (Hatzi et al., 2015), induziert IL4-Expression (Zhu and Paul, 2010b)
	Maf	positiv	↓	↓	Th, Th2, Th17	aktiviert durch TCR, fördert IL4-Expression (Kwon et al., 2014) und Th17 Differenzierung (Tanaka et al., 2014)
	Nr4a1	positiv	↑	↓	Th, iTreg Treg	aktiviert durch TCR, involviert in Apoptose (Matuszyk, 2009) und Proliferation (Cunningham et al., 2006), kontrolliert Foxp3-Expression (Bandukwala and Rao, 2013)
	Nr4a3	positiv	↑	↓		
Fosl2	positiv	↑	↑	Th	Regulator der Th-Plastizität (Ciofani et al., 2012)	
Stat5a	positiv	↑	n.diff	Th	kontrolliert Th1, Th2 sowie iTreg und inhibiert Th17 Differenzierung (Kagami et al., 2001; Liao et al., 2011)	
bisher nicht assoziiert mit der Differenzierung von Th-Zellen	A13001 OJ15Rik	positiv	n.diff	n.diff		
	Anks3	positiv	↓	↓		vermittelt Nierenfunktionen durch Interaktion mit Anks6 (Leetola et al., 2014)
	Creb3l2	positiv	n.diff	↑		Chondrozyten Differenzierung (Imamura et al., 2014; Saito et al., 2014)
	Fbxw7	positiv	n.diff	n.diff		reguliert Zellzyklus in T-Zellen (Onoyama et al., 2007) und NFκB Aktivität (Fukushima et al., 2012)
	Fem1b	positiv	↑	n.diff		Pro-apoptisches Protein, interagiert mit Fas, TNFR1 und Apaf1 (Subauste et al., 2010)
	Fosl1	positiv	↑	n.diff		Migration von Endothelzellen (Evellin et al., 2013), Osteoclasten-Differenzierung (Matsuo et al., 2000)
	Foxn2	positiv	n.diff	↓		Embryonalentwicklung (Tribioli et al., 2002)
	Gabpb1	positiv	↑	n.diff		reguliert T-Zell-Wachstum (Zhang et al., 2008b), spezifischer hämatopoetischen Stammzellregulator (Yu et al., 2012)
	Gbp1	positiv	n.diff	n.diff		spielt eine Rolle in der Entstehung von Arteriosklerose (Bijnens et al., 2003)
	Lhx6	positiv	n.diff	↑		Differenzierung von neuronalen und lymphoiden Zellen

STAT4-gebundene und STAT4-regulierte Gene	Regulation der Genexpression			Beschriebene Funktion in der Literatur	
	durch STAT4	in Th1 Zellen			
		früh	spät	Subtyp	
					im zentralen Nervensystem (Jung et al., 2011)
Lsr	positiv	↑	↑		Abbau von Triglycerin-reichen Lipoproteinen im Blut und ist runterreguliert in EAE Model (Sohet et al., 2015)
Maff	positiv	n.diff	n.diff		beteiligt an Entwicklung, Differenzierung, Hämatopoese und Stressantwort (Moran et al., 2002), Erythrozyten- (Igarashi et al., 1995) und Keratinozyten-Differenzierung (Motohashi et al., 2004)
Mafk	positiv	n.diff	n.diff		
Myc	positiv	↑	↑		spielt eine Rolle in der Zell-Zyklus-Progression und Apoptose
Ncor1	positiv	n.diff	n.diff		mit Pi-3K Kaskade assoziiert
Nfyc	positiv	n.diff	n.diff		mit Metabolismus assoziiert
Ppp1r16b	positiv	↑	n.diff		fördert Proliferation, Zellüberleben und Angiogenese in Endothelzellen (Obeidat et al., 2014)
Runx2	positiv	↓	↑		CD8-T-Zell-Entwicklung (Hu et al., 2013a) und Chondrozyten-Differenzierung (Mikasa et al., 2011)
Sp4	positiv	n.diff	n.diff		Neuronale Morphogenese (Lalonde et al., 2014)
Utf1	positiv	↑	↓		Stammzelldifferenzierung (Mouallif et al., 2014)
Arida3a	negative	↓	↑		B-Zell-Differenzierung (Webb et al., 1998)
Bach1	negative	↓	n.diff		reguliert die Generation von APCs (So et al., 2012) und fördert B-Zell-Entwicklung (Itoh-Nakadai et al., 2014)
E2f5	negative	n.diff	↓		Zellproliferation (Muller et al., 1997)
Mga	negative	n.diff	n.diff		Reguliert die Expression von T-box und MAX Zielgenen (Hurlin et al., 1999)
Pdcd2	negative	n.diff	n.diff		reguliert hämatopoetische Entwicklung (Kramer et al., 2013)
Taf5	negative	↑	n.diff		involviert in Spermatogenese (Metcalf and Wassarman, 2007)
Tcf4	negative	↓	↑		involviert in $\beta$ -Catenin/Tcf4 Signaling, induziert regulatorische DC und regulatorische T-Zell Phenotypen (Hong et al., 2015)
Tpbp	negative	↑	n.diff		Involviert in Zell-Adhäsion, ES-Zell-Differenzierung (Barrow et al., 2005)
Zhx1	negative	n.diff	n.diff		Transkriptionaler Repressor, durch IL2 induziert (Shou et al., 2004)

## Literatur

- Acuto, O., and Michel, F. (2003). CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol* 3, 939-951. doi: 10.1038/nri1248.
- 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. doi: 10.1038/ni794.
- Ahlfors, H., Limaye, A., Elo, L.L., Tuomela, S., Burute, M., Gottimukkala, K.V., Notani, D., Rasool, O., Galande, S., and Lahesmaa, R. (2010). SATB1 dictates expression of multiple genes including IL-5 involved in human T helper cell differentiation. *Blood* 116, 1443-1453. doi: 10.1182/blood-2009-11-252205.
- Aliberti, J., Schulz, O., Pennington, D.J., Tsujimura, H., Reis E Sousa, C., Ozato, K., and Sher, A. (2003). Essential role for ICSBP in the in vivo development of murine CD8alpha + dendritic cells. *Blood* 101, 305-310. doi: 10.1182/blood-2002-04-1088.
- Anders, S., and Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* 11, R106. doi: 10.1186/gb-2010-11-10-r106.
- Anders, S., Pyl, P.T., and Huber, W. (2015). HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 31, 166-169. doi: 10.1093/bioinformatics/btu638.
- Athey, B.D., Braxenthaler, M., Haas, M., and Guo, Y. (2013). tranSMART: An Open Source and Community-Driven Informatics and Data Sharing Platform for Clinical and Translational Research. *AMIA Jt Summits Transl Sci Proc* 2013, 6-8.
- Axtell, R.C., De Jong, B.A., Boniface, K., Van Der Voort, L.F., Bhat, R., De Sarno, P., Naves, R., Han, M., Zhong, F., Castellanos, J.G., Mair, R., Christakos, A., Kolkowitz, I., Katz, L., Killestein, J., Polman, C.H., De Waal Malefyt, R., Steinman, L., and Raman, C. (2010). T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon-beta in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis. *Nat Med* 16, 406-412. doi: 10.1038/nm.2110.
- Bandukwala, H.S., and Rao, A. (2013). 'Nurr'ishing Treg cells: Nr4a transcription factors control Foxp3 expression. *Nat Immunol* 14, 201-203. doi: 10.1038/ni.2546.
- Barrow, K.M., Ward, C.M., Rutter, J., Ali, S., and Stern, P.L. (2005). Embryonic expression of murine 5T4 oncofoetal antigen is associated with morphogenetic events at implantation and in developing epithelia. *Dev Dyn* 233, 1535-1545. doi: 10.1002/dvdy.20482.
- Bendfeldt, H., Benary, M., Scheel, T., Steinbrink, K., Radbruch, A., Herzelt, H., and Baumgrass, R. (2012). IL-2 Expression in Activated Human Memory FOXP3(+) Cells Critically Depends on the Cellular Levels of FOXP3 as Well as of Four Transcription Factors of T Cell Activation. *Front Immunol* 3, 264. doi: 10.3389/fimmu.2012.00264.
- Bielekova, B., Vodovotz, Y., An, G., and Hallenbeck, J. (2014). How implementation of systems biology into clinical trials accelerates understanding of diseases. *Front Neurol* 5, 102. doi: 10.3389/fneur.2014.00102.
- Bijnens, A.P., Gils, A., Jutten, B., Faber, B.C., Heeneman, S., Kitslaar, P.J., Tordoir, J.H., De Vries, C.J., Kroon, A.A., Daemen, M.J., and Cleutjens, K.B. (2003). Vasculin, a novel vascular protein differentially expressed in human atherogenesis. *Blood* 102, 2803-2810. doi: 10.1182/blood-2003-01-0306.
- Bonecchi, R., Bianchi, G., Bordignon, P.P., D'ambrosio, D., Lang, R., Borsatti, A., Sozzani, S., Allavena, P., Gray, P.A., Mantovani, A., and Sinigaglia, F. (1998). Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* 187, 129-134.
- 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.
- Brunner, C., Sindrilari, A., Girkontaite, I., Fischer, K.D., Sunderkotter, C., and Wirth, T. (2007). BOB.1/OBF.1 controls the balance of TH1 and TH2 immune responses. *EMBO J* 26, 3191-3202. doi: 10.1038/sj.emboj.7601742.

- Burchert, A., Cai, D., Hofbauer, L.C., Samuelsson, M.K., Slater, E.P., Duyster, J., Ritter, M., Hochhaus, A., Muller, R., Eilers, M., Schmidt, M., and Neubauer, A. (2004). Interferon consensus sequence binding protein (ICSBP; IRF-8) antagonizes BCR/ABL and down-regulates bcl-2. *Blood* 103, 3480-3489. doi: 10.1182/blood-2003-08-2970.
- Burchill, M.A., Yang, J., Vogtenhuber, C., Blazar, B.R., and Farrar, M.A. (2007). IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 178, 280-290.
- Burgler, S., Mantel, P.Y., Bassin, C., Ouaked, N., Akdis, C.A., and Schmidt-Weber, C.B. (2010). RORC2 is involved in T cell polarization through interaction with the FOXP3 promoter. *J Immunol* 184, 6161-6169. doi: 10.4049/jimmunol.0903243.
- Carotta, S., Willis, S.N., Hasbold, J., Inouye, M., Pang, S.H., Emslie, D., Light, A., Chopin, M., Shi, W., Wang, H., Morse, H.C., 3rd, Tarlinton, D.M., Corcoran, L.M., Hodgkin, P.D., and Nutt, S.L. (2014). The transcription factors IRF8 and PU.1 negatively regulate plasma cell differentiation. *J Exp Med* 211, 2169-2181. doi: 10.1084/jem.20140425.
- Casolaro, V., Georas, S.N., Song, Z., Zubkoff, I.D., Abdulkadir, S.A., Thanos, D., and Ono, S.J. (1995). Inhibition of NF-AT-dependent transcription by NF-kappa B: implications for differential gene expression in T helper cell subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11623-11627.
- Chan, A.C., Dalton, M., Johnson, R., Kong, G.H., Wang, T., Thoma, R., and Kurosaki, T. (1995). Activation of ZAP-70 kinase activity by phosphorylation of tyrosine 493 is required for lymphocyte antigen receptor function. *EMBO J* 14, 2499-2508.
- Chatila, T., Silverman, L., Miller, R., and Geha, R. (1989). Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin. *J Immunol* 143, 1283-1289.
- Chen, J., Amasaki, Y., Kamogawa, Y., Nagoya, M., Arai, N., Arai, K., and Miyatake, S. (2003a). Role of NFATx (NFAT4/NFATc3) in expression of immunoregulatory genes in murine peripheral CD4+ T cells. *J Immunol* 170, 3109-3117.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., Mcgrady, G., and Wahl, S.M. (2003b). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198, 1875-1886. doi: 10.1084/jem.20030152.
- Chen, Y., Haviernik, P., Bunting, K.D., and Yang, Y.C. (2007). Cited2 is required for normal hematopoiesis in the murine fetal liver. *Blood* 110, 2889-2898. doi: 10.1182/blood-2007-01-066316.
- Chen, Z., Lund, R., Aittokallio, T., Kosonen, M., Nevalainen, O., and Lahesmaa, R. (2003c). Identification of novel IL-4/Stat6-regulated genes in T lymphocytes. *J Immunol* 171, 3627-3635.
- Chumakov, A.M., Silla, A., Williamson, E.A., and Koeffler, H.P. (2007). Modulation of DNA binding properties of CCAAT/enhancer binding protein epsilon by heterodimer formation and interactions with NFkappaB pathway. *Blood* 109, 4209-4219. doi: 10.1182/blood-2005-09-031963.
- Ciofani, M., Madar, A., Galan, C., Sellars, M., Mace, K., Pauli, F., Agarwal, A., Huang, W., Parkurst, C.N., Muratet, M., Newberry, K.M., Meadows, S., Greenfield, A., Yang, Y., Jain, P., Kirigin, F.K., Birchmeier, C., Wagner, E.F., Murphy, K.M., Myers, R.M., Bonneau, R., and Littman, D.R. (2012). A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell* 151, 289-303. doi: 10.1016/j.cell.2012.09.016.
- 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.
- Constant, S.L., and Bottomly, K. (1997). Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol* 15, 297-322. doi: 10.1146/annurev.immunol.15.1.297.
- Corcoran, L., Emslie, D., Kratina, T., Shi, W., Hirsch, S., Taubenheim, N., and Chevrier, S. (2014). Oct2 and Obf1 as Facilitators of B:T Cell Collaboration during a Humoral Immune Response. *Front Immunol* 5, 108. doi: 10.3389/fimmu.2014.00108.
- Corn, R.A., Aronica, M.A., Zhang, F., Tong, Y., Stanley, S.A., Kim, S.R., Stephenson, L., Enerson, B., Mccarthy, S., Mora, A., and Boothby, M. (2003). T cell-intrinsic requirement for NF-kappa B induction in postdifferentiation IFN-gamma production and clonal expansion in a Th1 response. *J Immunol* 171, 1816-1824.
- Corn, R.A., Hunter, C., Liou, H.C., Siebenlist, U., and Boothby, M.R. (2005). Opposing roles for RelB and Bcl-3 in regulation of T-box expressed in T cells, GATA-3, and Th effector differentiation. *J Immunol* 175, 2102-2110.

- Cox, M.P., Peterson, D.A., and Biggs, P.J. (2010). SolexaQA: At-a-glance quality assessment of Illumina second-generation sequencing data. *BMC Bioinformatics* 11, 485. doi: 10.1186/1471-2105-11-485.
- Crabtree, G.R., and Olson, E.N. (2002). NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* 109 Suppl, S67-79.
- Cui, G., Qin, X., Wu, L., Zhang, Y., Sheng, X., Yu, Q., Sheng, H., Xi, B., Zhang, J.Z., and Zang, Y.Q. (2011). Liver X receptor (LXR) mediates negative regulation of mouse and human Th17 differentiation. *J Clin Invest* 121, 658-670. doi: 10.1172/JCI42974.
- Cunningham, N.R., Artim, S.C., Fornadel, C.M., Sellars, M.C., Edmonson, S.G., Scott, G., Albino, F., Mathur, A., and Punt, J.A. (2006). Immature CD4+CD8+ thymocytes and mature T cells regulate Nur77 distinctly in response to TCR stimulation. *J Immunol* 177, 6660-6666.
- D'ambrosio, D., Iellem, A., Bonecchi, R., Mazzeo, D., Sozzani, S., Mantovani, A., and Sinigaglia, F. (1998). Selective up-regulation of chemokine receptors CCR4 and CCR8 upon activation of polarized human type 2 Th cells. *J Immunol* 161, 5111-5115.
- Da Rocha Junior, L.F., Rego, M.J., Cavalcanti, M.B., Pereira, M.C., Pitta, M.G., De Oliveira, P.S., Goncalves, S.M., Duarte, A.L., De Lima Mdo, C., Pitta Ida, R., and Pitta, M.G. (2013). Synthesis of a novel thiazolidinedione and evaluation of its modulatory effect on IFN- gamma , IL-6, IL-17A, and IL-22 production in PBMCs from rheumatoid arthritis patients. *Biomed Res Int* 2013, 926060. doi: 10.1155/2013/926060.
- Dardalhon, V., Awasthi, A., Kwon, H., Galileos, G., Gao, W., Sobel, R.A., Mitsdoerffer, M., Strom, T.B., Elyaman, W., Ho, I.C., Khoury, S., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2008). IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol* 9, 1347-1355. doi: 10.1038/ni.1677.
- Darnell, J.E., Jr., Kerr, I.M., and Stark, G.R. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264, 1415-1421.
- 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+ T regulatory cells. *J Immunol* 178, 4022-4026.
- Dolhain, R.J., Van Der Heiden, A.N., Ter Haar, N.T., Breedveld, F.C., and Miltenburg, A.M. (1996). Shift toward T lymphocytes with a T helper 1 cytokine-secretion profile in the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 39, 1961-1969.
- Driggers, P.H., Ennist, D.L., Gleason, S.L., Mak, W.H., Marks, M.S., Levi, B.Z., Flanagan, J.R., Appella, E., and Ozato, K. (1990). An interferon gamma-regulated protein that binds the interferon-inducible enhancer element of major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 3743-3747.
- Du, N., Kwon, H., Li, P., West, E.E., Oh, J., Liao, W., Yu, Z., Ren, M., and Leonard, W.J. (2014). EGR2 is critical for peripheral naive T-cell differentiation and the T-cell response to influenza. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 16484-16489. doi: 10.1073/pnas.1417215111.
- Duncia, J.V., Santella, J.B., 3rd, Higley, C.A., Pitts, W.J., Wityak, J., Fietze, W.E., Rankin, F.W., Sun, J.H., Earl, R.A., Tabaka, A.C., Teleha, C.A., Blom, K.F., Favata, M.F., Manos, E.J., Daulerio, A.J., Stradley, D.A., Horiuchi, K., Copeland, R.A., Scherle, P.A., Trzaskos, J.M., Magolda, R.L., Trainor, G.L., Wexler, R.R., Hobbs, F.W., and Olson, R.E. (1998). MEK inhibitors: the chemistry and biological activity of U0126, its analogs, and cyclization products. *Bioorg Med Chem Lett* 8, 2839-2844.
- Durinck, S., Spellman, P.T., Birney, E., and Huber, W. (2009). Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. *Nat Protoc* 4, 1184-1191. doi: 10.1038/nprot.2009.97.
- Eckerstorfer, P., Novy, M., Burgstaller-Muehlbacher, S., Paster, W., Schiller, H.B., Mayer, H., and Stockinger, H. (2010). Proximal human FOXP3 promoter transactivated by NF-kappaB and negatively controlled by feedback loop and SP3. *Mol Immunol* 47, 2094-2102. doi: 10.1016/j.molimm.2010.04.002.
- Edgar, R., Domrachev, M., and Lash, A.E. (2002). Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res* 30, 207-210.
- Edwards, C.L., Best, S.E., Gun, S.Y., Claser, C., James, K.R., De Oca, M.M., Sebina, I., Rivera Fde, L., Amante, F.H., Hertzog, P.J., Engwerda, C.R., Renia, L., and Haque, A. (2015). Spatiotemporal requirements for IRF7 in mediating type I IFN-dependent susceptibility to blood-stage Plasmodium infection. *Eur J Immunol* 45, 130-141. doi: 10.1002/eji.201444824.

- Ellmeier, W., Sawada, S., and Littman, D.R. (1999). The regulation of CD4 and CD8 coreceptor gene expression during T cell development. *Annu Rev Immunol* 17, 523-554. doi: 10.1146/annurev.immunol.17.1.523.
- Elser, B., Lohoff, M., Kock, S., Giaisi, M., Kirchhoff, S., Krammer, P.H., and Li-Weber, M. (2002). IFN-gamma represses IL-4 expression via IRF-1 and IRF-2. *Immunity* 17, 703-712.
- Eroshkin, A., and Mushegian, A. (1999). Conserved transactivation domain shared by interferon regulatory factors and Smad morphogens. *J Mol Med (Berl)* 77, 403-405.
- Evellin, S., Galvagni, F., Zippo, A., Neri, F., Orlandini, M., Incarnato, D., Dettori, D., Neubauer, S., Kessler, H., Wagner, E.F., and Oliviero, S. (2013). FOSL1 controls the assembly of endothelial cells into capillary tubes by direct repression of alphaV and beta3 integrin transcription. *Mol Cell Biol* 33, 1198-1209. doi: 10.1128/MCB.01054-12.
- Farrar, J.D., Smith, J.D., Murphy, T.L., Leung, S., Stark, G.R., and Murphy, K.M. (2000). Selective loss of type I interferon-induced STAT4 activation caused by a minisatellite insertion in mouse Stat2. *Nat Immunol* 1, 65-69. doi: 10.1038/76932.
- Fehr, T., Schoedon, G., Odermatt, B., Holtschke, T., Schneemann, M., Bachmann, M.F., Mak, T.W., Horak, I., and Zinkernagel, R.M. (1997). Crucial role of interferon consensus sequence binding protein, but neither of interferon regulatory factor 1 nor of nitric oxide synthesis for protection against murine listeriosis. *J Exp Med* 185, 921-931.
- Feng, T., Qin, H., Wang, L., Benveniste, E.N., Elson, C.O., and Cong, Y. (2011). Th17 cells induce colitis and promote Th1 cell responses through IL-17 induction of innate IL-12 and IL-23 production. *J Immunol* 186, 6313-6318. doi: 10.4049/jimmunol.1001454.
- Filen, S., Ylikoski, E., Tripathi, S., West, A., Bjorkman, M., Nystrom, J., Ahlfors, H., Coffey, E., Rao, K.V., Rasool, O., and Lahesmaa, R. (2010). Activating transcription factor 3 is a positive regulator of human IFNG gene expression. *J Immunol* 184, 4990-4999. doi: 10.4049/jimmunol.0903106.
- Finkelman, F.D., Morris, S.C., Orekhova, T., Mori, M., Donaldson, D., Reiner, S.L., Reilly, N.L., Schopf, L., and Urban, J.F., Jr. (2000). Stat6 regulation of in vivo IL-4 responses. *J Immunol* 164, 2303-2310.
- Friesen, C., Herr, I., Krammer, P.H., and Debatin, K.M. (1996). Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nat Med* 2, 574-577.
- Frischbutter, S., Gabriel, C., Bendfeldt, H., Radbruch, A., and Baumgrass, R. (2011). Dephosphorylation of Bcl-10 by calcineurin is essential for canonical NF-kappaB activation in Th cells. *Eur J Immunol* 41, 2349-2357. doi: 10.1002/eji.201041052.
- Frischbutter, S., Schultheis, K., Patzel, M., Radbruch, A., and Baumgrass, R. (2012). Evaluation of calcineurin/NFAT inhibitor selectivity in primary human Th cells using bar-coding and phospho-flow cytometry. *Cytometry A* 81, 1005-1011. doi: 10.1002/cyto.a.22204.
- Fukushima, H., Matsumoto, A., Inuzuka, H., Zhai, B., Lau, A.W., Wan, L., Gao, D., Shaik, S., Yuan, M., Gygi, S.P., Jimi, E., Asara, J.M., Nakayama, K., Nakayama, K.I., and Wei, W. (2012). SCF(Fbw7) modulates the NFkB signaling pathway by targeting NFkB2 for ubiquitination and destruction. *Cell Rep* 1, 434-443. doi: 10.1016/j.celrep.2012.04.002.
- Gabriele, L., Phung, J., Fukumoto, J., Segal, D., Wang, I.M., Giannakakou, P., Giese, N.A., Ozato, K., and Morse, H.C., 3rd (1999). Regulation of apoptosis in myeloid cells by interferon consensus sequence-binding protein. *J Exp Med* 190, 411-421.
- Gett, A.V., and Hodgkin, P.D. (1998). Cell division regulates the T cell cytokine repertoire, revealing a mechanism underlying immune class regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9488-9493.
- Giese, N.A., Gabriele, L., Doherty, T.M., Klinman, D.M., Tadesse-Heath, L., Contursi, C., Epstein, S.L., and Morse, H.C., 3rd (1997). Interferon (IFN) consensus sequence-binding protein, a transcription factor of the IFN regulatory factor family, regulates immune responses in vivo through control of interleukin 12 expression. *J Exp Med* 186, 1535-1546.
- Glimcher, L.H., and Murphy, K.M. (2000). Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev* 14, 1693-1711.
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3, 23-35. doi: 10.1038/nri978.
- 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.
- Gregoire, J.M., and Romeo, P.H. (1999). T-cell expression of the human GATA-3 gene is regulated by a non-lineage-specific silencer. *J Biol Chem* 274, 6567-6578.
- Grzanka, J., Leveson-Gower, D., Golab, K., Wang, X.J., Marek-Trzonkowska, N., Krzystyniak, A., Wardowska, A., Mills, J.M., Trzonkowski, P., and Witkowski, P. (2013). FoxP3, Helios, and SATB1: roles and relationships in regulatory T cells. *Int Immunopharmacol* 16, 343-347. doi: 10.1016/j.intimp.2013.02.004.
- Guibal, F.C., Moog-Lutz, C., Smolewski, P., Di Gioia, Y., Darzynkiewicz, Z., Lutz, P.G., and Cayre, Y.E. (2002). ASB-2 inhibits growth and promotes commitment in myeloid leukemia cells. *J Biol Chem* 277, 218-224. doi: 10.1074/jbc.M108476200.
- Haftmann, C., Stittrich, A.B., Zimmermann, J., Fang, Z., Hradilkova, K., Bardua, M., Westendorf, K., Heinz, G.A., Riedel, R., Siede, J., Lehmann, K., Weinberger, E.E., Zimmel, D., Lauer, U., Haupl, T., Sieper, J., Backhaus, M., Neumann, C., Hoffmann, U., Porstner, M., Chen, W., Grun, J.R., Baumgrass, R., Matz, M., Lohning, M., Scheffold, A., Wittmann, J., Chang, H.D., Rajewsky, N., Jack, H.M., Radbruch, A., and Mashreghi, M.F. (2015). miR-148a is upregulated by Twist1 and T-bet and promotes Th1-cell survival by regulating the proapoptotic gene Bim. *Eur J Immunol* 45, 1192-1205. doi: 10.1002/eji.201444633.
- Hamilton, J.A., and Anderson, G.P. (2004). GM-CSF Biology. *Growth Factors* 22, 225-231. doi: 10.1080/08977190412331279881.
- Han, S., Nam, J., Li, Y., Kim, S., Cho, S.H., Cho, Y.S., Choi, S.Y., Choi, J., Han, K., Kim, Y., Na, M., Kim, H., Bae, Y.C., Choi, S.Y., and Kim, E. (2010). Regulation of dendritic spines, spatial memory, and embryonic development by the TANC family of PSD-95-interacting proteins. *J Neurosci* 30, 15102-15112. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3128-10.2010.
- Harden, J.L., Krueger, J.G., and Bowcock, A.M. (2015). The immunogenetics of Psoriasis: A comprehensive review. *J Autoimmun.* doi: 10.1016/j.jaut.2015.07.008.
- Hatzi, K., Nance, J.P., Kroenke, M.A., Bothwell, M., Haddad, E.K., Melnick, A., and Crotty, S. (2015). BCL6 orchestrates Tfh cell differentiation via multiple distinct mechanisms. *J Exp Med* 212, 539-553. doi: 10.1084/jem.20141380.
- Hedrich, C.M., Crispin, J.C., Rauen, T., Ioannidis, C., Apostolidis, S.A., Lo, M.S., Kyttaris, V.C., and Tsokos, G.C. (2012). cAMP response element modulator alpha controls IL2 and IL17A expression during CD4 lineage commitment and subset distribution in lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 16606-16611. doi: 10.1073/pnas.1210129109.
- Hermann-Kleiter, N., Gruber, T., Lutz-Nicoladoni, C., Thuille, N., Fresser, F., Labi, V., Schiefermeier, N., Warnecke, M., Huber, L., Villunger, A., Eichele, G., Kaminski, S., and Baier, G. (2008). The nuclear orphan receptor NR2F6 suppresses lymphocyte activation and T helper 17-dependent autoimmunity. *Immunity* 29, 205-216. doi: 10.1016/j.immuni.2008.06.008.
- Hinks, A., Eyre, S., Ke, X., Barton, A., Martin, P., Flynn, E., Packham, J., Worthington, J., Childhood Arthritis Prospective, S., Consortium, U., Group, B.S., and Thomson, W. (2010). Association of the AFF3 gene and IL2/IL21 gene region with juvenile idiopathic arthritis. *Genes Immun* 11, 194-198. doi: 10.1038/gene.2009.105.
- Holtschke, T., Lohler, J., Kanno, Y., Fehr, T., Giese, N., Rosenbauer, F., Lou, J., Knobloch, K.P., Gabriele, L., Waring, J.F., Bachmann, M.F., Zinkernagel, R.M., Morse, H.C., 3rd, Ozato, K., and Horak, I. (1996). Immunodeficiency and chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with a targeted mutation of the ICSBP gene. *Cell* 87, 307-317.
- Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yoshida, N., and Taniguchi, T. (2005). IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 434, 772-777. doi: 10.1038/nature03464.
- Hong, Y., Manoharan, I., Suryawanshi, A., Majumdar, T., Angus-Hill, M.L., Koni, P.A., Manicassamy, B., Mellor, A.L., Munn, D.H., and Manicassamy, S. (2015). beta-catenin promotes regulatory T-cell responses in tumors by inducing vitamin A metabolism in dendritic cells. *Cancer Res* 75, 656-665. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2377.
- Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057-1061. doi: 10.1126/science.1079490.

- Hu, G., Tang, Q., Sharma, S., Yu, F., Escobar, T.M., Muljo, S.A., Zhu, J., and Zhao, K. (2013a). Expression and regulation of intergenic long noncoding RNAs during T cell development and differentiation. *Nat Immunol* 14, 1190-1198. doi: 10.1038/ni.2712.
- Hu, X., Bardhan, K., Paschall, A.V., Yang, D., Waller, J.L., Park, M.A., Nayak-Kapoor, A., Samuel, T.A., Abrams, S.I., and Liu, K. (2013b). Deregulation of apoptotic factors Bcl-xL and Bax confers apoptotic resistance to myeloid-derived suppressor cells and contributes to their persistence in cancer. *J Biol Chem* 288, 19103-19115. doi: 10.1074/jbc.M112.434530.
- Hudson, N.J., Reverter, A., Greenwood, P.L., Guo, B., Cafe, L.M., and Dalrymple, B.P. (2015). Longitudinal muscle gene expression patterns associated with differential intramuscular fat in cattle. *Animal* 9, 650-659. doi: 10.1017/S1751731114002754.
- Hurlin, P.J., Steingrimsson, E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Eisenman, R.N. (1999). Mga, a dual-specificity transcription factor that interacts with Max and contains a T-domain DNA-binding motif. *EMBO J* 18, 7019-7028. doi: 10.1093/emboj/18.24.7019.
- Hwang, S.Y., Hertzog, P.J., Holland, K.A., Sumarsono, S.H., Tymms, M.J., Hamilton, J.A., Whitty, G., Bertocello, I., and Kola, I. (1995). A null mutation in the gene encoding a type I interferon receptor component eliminates antiproliferative and antiviral responses to interferons alpha and beta and alters macrophage responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11284-11288.
- Igarashi, K., Itoh, K., Hayashi, N., Nishizawa, M., and Yamamoto, M. (1995). Conditional expression of the ubiquitous transcription factor MafK induces erythroleukemia cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7445-7449.
- Imamura, K., Maeda, S., Kawamura, I., Matsuyama, K., Shinohara, N., Yahiro, Y., Nagano, S., Setoguchi, T., Yokouchi, M., Ishidou, Y., and Komiya, S. (2014). Human immunodeficiency virus type 1 enhancer-binding protein 3 is essential for the expression of asparagine-linked glycosylation 2 in the regulation of osteoblast and chondrocyte differentiation. *J Biol Chem* 289, 9865-9879. doi: 10.1074/jbc.M113.520585.
- Intlekofer, A.M., Banerjee, A., Takemoto, N., Gordon, S.M., Dejong, C.S., Shin, H., Hunter, C.A., Wherry, E.J., Lindsten, T., and Reiner, S.L. (2008). Anomalous type 17 response to viral infection by CD8+ T cells lacking T-bet and eomesodermin. *Science* 321, 408-411. doi: 10.1126/science.1159806.
- Itoh-Nakadai, A., Hikota, R., Muto, A., Kometani, K., Watanabe-Matsui, M., Sato, Y., Kobayashi, M., Nakamura, A., Miura, Y., Yano, Y., Tashiro, S., Sun, J., Ikawa, T., Ochiai, K., Kurosaki, T., and Igarashi, K. (2014). The transcription repressors Bach2 and Bach1 promote B cell development by repressing the myeloid program. *Nat Immunol* 15, 1171-1180. doi: 10.1038/ni.3024.
- Ivanov, I., 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 ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 126, 1121-1133. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.035.
- Iwashima, M., Irving, B.A., Van Oers, N.S., Chan, A.C., and Weiss, A. (1994). Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science* 263, 1136-1139.
- Jabeen, R., Goswami, R., Awe, O., Kulkarni, A., Nguyen, E.T., Attenasio, A., Walsh, D., Olson, M.R., Kim, M.H., Tepper, R.S., Sun, J., Kim, C.H., Taparowsky, E.J., Zhou, B., and Kaplan, M.H. (2013). Th9 cell development requires a BATF-regulated transcriptional network. *J Clin Invest* 123, 4641-4653. doi: 10.1172/JCI69489.
- Ji, H., Jiang, H., Ma, W., Johnson, D.S., Myers, R.M., and Wong, W.H. (2008). An integrated software system for analyzing ChIP-chip and ChIP-seq data. *Nat Biotechnol* 26, 1293-1300. doi: 10.1038/nbt.1505.
- Johnson, G.L., and Lapadat, R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298, 1911-1912. doi: 10.1126/science.1072682.
- Johnson, G.R., Gonda, T.J., Metcalf, D., Hariharan, I.K., and Cory, S. (1989). A lethal myeloproliferative syndrome in mice transplanted with bone marrow cells infected with a retrovirus expressing granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *EMBO J* 8, 441-448.
- Jordan, M.S., Singer, A.L., and Koretzky, G.A. (2003). Adaptors as central mediators of signal transduction in immune cells. *Nat Immunol* 4, 110-116. doi: 10.1038/ni0203-110.
- Jorgensen, K., Skrede, M., Cruciani, V., Mikalsen, S.O., Slipicevic, A., and Florenes, V.A. (2005). Phorbol ester phorbol-12-myristate-13-acetate promotes anchorage-independent growth and survival of



- melanomas through MEK-independent activation of ERK1/2. *Biochem Biophys Res Commun* 329, 266-274. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.01.143.
- Ju, X.S., Ruau, D., Jantti, P., Sere, K., Becker, C., Wiercinska, E., Bartz, C., Erdmann, B., Dooley, S., and Zenke, M. (2007). Transforming growth factor beta1 up-regulates interferon regulatory factor 8 during dendritic cell development. *Eur J Immunol* 37, 1174-1183. doi: 10.1002/eji.200636504.
- Jung, S., Jeong, D., Kim, J., Yi, L., Koo, K., Lee, J., Kim, C.J., Kim, C.H., An, S., Yang, Y., Lim, J.S., Kim, K.I., and Lee, M.S. (2011). Epigenetic regulation of the potential tumor suppressor gene, hLHX6.1, in human cervical cancer. *Int J Oncol* 38, 859-869. doi: 10.3892/ijo.2011.904.
- Kagami, S., Nakajima, H., Suto, A., Hirose, K., Suzuki, K., Morita, S., Kato, I., Saito, Y., Kitamura, T., and Iwamoto, I. (2001). Stat5a regulates T helper cell differentiation by several distinct mechanisms. *Blood* 97, 2358-2365.
- Kanno, Y., Kozak, C.A., Schindler, C., Driggers, P.H., Ennist, D.L., Gleason, S.L., Darnell, J.E., Jr., and Ozato, K. (1993). The genomic structure of the murine ICSBP gene reveals the presence of the gamma interferon-responsive element, to which an ISGF3 alpha subunit (or similar) molecule binds. *Mol Cell Biol* 13, 3951-3963.
- Kaplan, M.H., Schindler, U., Smiley, S.T., and Grusby, M.J. (1996). Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity* 4, 313-319.
- Karnowski, A., Chevrier, S., Belz, G.T., Mount, A., Emslie, D., D'costa, K., Tarlinton, D.M., Kallies, A., and Corcoran, L.M. (2012). B and T cells collaborate in antiviral responses via IL-6, IL-21, and transcriptional activator and coactivator, Oct2 and OBF-1. *J Exp Med* 209, 2049-2064. doi: 10.1084/jem.20111504.
- Kashiwada, M., Cassel, S.L., Colgan, J.D., and Rothman, P.B. (2011). NFIL3/E4BP4 controls type 2 T helper cell cytokine expression. *EMBO J* 30, 2071-2082. doi: 10.1038/emboj.2011.111.
- Kay, A.B. (2001). Allergy and allergic diseases. Second of two parts. *N Engl J Med* 344, 109-113. doi: 10.1056/NEJM200101113440206.
- Kim, D., Perteza, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., and Salzberg, S.L. (2013). TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol* 14, R36. doi: 10.1186/gb-2013-14-4-r36.
- Kim, Y.M., Kang, H.S., Paik, S.G., Pyun, K.H., Anderson, K.L., Torbett, B.E., and Choi, I. (1999). Roles of IFN consensus sequence binding protein and PU.1 in regulating IL-18 gene expression. *J Immunol* 163, 2000-2007.
- Kissick, H.T., Sanda, M.G., Dunn, L.K., Pellegrini, K.L., On, S.T., Noel, J.K., and Arredouani, M.S. (2014). Androgens alter T-cell immunity by inhibiting T-helper 1 differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 9887-9892. doi: 10.1073/pnas.1402468111.
- 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.
- Koga, T., Hedrich, C.M., Mizui, M., Yoshida, N., Otomo, K., Lieberman, L.A., Rauen, T., Crispin, J.C., and Tsokos, G.C. (2014). CaMK4-dependent activation of AKT/mTOR and CREM-alpha underlies autoimmunity-associated Th17 imbalance. *J Clin Invest* 124, 2234-2245. doi: 10.1172/JCI73411.
- Konig, R., Stertz, S., Zhou, Y., Inoue, A., Hoffmann, H.H., Bhattacharyya, S., Alamares, J.G., Tscherne, D.M., Ortigoza, M.B., Liang, Y., Gao, Q., Andrews, S.E., Bandyopadhyay, S., De Jesus, P., Tu, B.P., Pache, L., Shih, C., Orth, A., Bonamy, G., Miraglia, L., Ideker, T., Garcia-Sastre, A., Young, J.A., Palese, P., Shaw, M.L., and Chanda, S.K. (2010). Human host factors required for influenza virus replication. *Nature* 463, 813-817. doi: 10.1038/nature08699.
- 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. doi: 10.1038/362245a0.
- Kramer, J., Granier, C.J., Davis, S., Piso, K., Hand, J., Rabson, A.B., and Sabaawy, H.E. (2013). PDCD2 controls hematopoietic stem cell differentiation during development. *Stem Cells Dev* 22, 58-72. doi: 10.1089/scd.2012.0074.
- Krammer, P.H. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, 789-795. doi: 10.1038/35037728.

- Kroenke, M.A., Carlson, T.J., Andjelkovic, A.V., and Segal, B.M. (2008). IL-12- and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition. *J Exp Med* 205, 1535-1541. doi: 10.1084/jem.20080159.
- Kuwahara, M., Yamashita, M., Shinoda, K., Tofukuji, S., Onodera, A., Shinnakasu, R., Motohashi, S., Hosokawa, H., Tumes, D., Iwamura, C., Lefebvre, V., and Nakayama, T. (2012). The transcription factor Sox4 is a downstream target of signaling by the cytokine TGF-beta and suppresses T(H)2 differentiation. *Nat Immunol* 13, 778-786. doi: 10.1038/ni.2362.
- Kwon, S.J., Crespo-Barreto, J., Zhang, W., Wang, T., Kim, D.S., Krensky, A., and Clayberger, C. (2014). KLF13 cooperates with c-Maf to regulate IL-4 expression in CD4+ T cells. *J Immunol* 192, 5703-5709. doi: 10.4049/jimmunol.1302830.
- Lai, C.Y., Lin, S.Y., Wu, C.K., Yeh, L.T., Sytwu, H.K., and Miaw, S.C. (2012). Tyrosine phosphorylation of c-Maf enhances the expression of IL-4 gene. *J Immunol* 189, 1545-1550. doi: 10.4049/jimmunol.1200405.
- Lalonde, J., Saia, G., and Gill, G. (2014). Store-operated calcium entry promotes the degradation of the transcription factor Sp4 in resting neurons. *Sci Signal* 7, ra51. doi: 10.1126/scisignal.2005242.
- Laurence, A., Amarnath, S., Mariotti, J., Kim, Y.C., Foley, J., Eckhaus, M., O'shea, J.J., and Fowler, D.H. (2012). STAT3 transcription factor promotes instability of nTreg cells and limits generation of iTreg cells during acute murine graft-versus-host disease. *Immunity* 37, 209-222. doi: 10.1016/j.immuni.2012.05.027.
- Laurence, A., Tato, C.M., Davidson, T.S., Kanno, Y., Chen, Z., Yao, Z., Blank, R.B., Meylan, F., Siegel, R., Hennighausen, L., Shevach, E.M., and O'shea, J. (2007). Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 26, 371-381. doi: 10.1016/j.immuni.2007.02.009.
- Lecron, J.C., Minault, M., Allard, M., Goube De Laforest, P., Gombert, J., and Simonnet, G. (1992). Modulation of human lymphocyte proliferation by FLFQQRfamide, a FMRfamide-like peptide with anti-opiate properties. *J Neuroimmunol* 38, 1-8.
- Lee, W., Kim, H.S., Baek, S.Y., and Lee, G.R. (2015). Transcription factor IRF8 controls Th1-like regulatory T-cell function. *Cell Mol Immunol*. doi: 10.1038/cmi.2015.72.
- Leettola, C.N., Knight, M.J., Cascio, D., Hoffman, S., and Bowie, J.U. (2014). Characterization of the SAM domain of the PKD-related protein ANKS6 and its interaction with ANKS3. *BMC Struct Biol* 14, 17. doi: 10.1186/1472-6807-14-17.
- Li, H., and Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754-1760. doi: 10.1093/bioinformatics/btp324.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., and Genome Project Data Processing, S. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078-2079. doi: 10.1093/bioinformatics/btp352.
- Li, W., Kong, L.B., Li, J.T., Guo, Z.Y., Xue, Q., Yang, T., Meng, Y.L., Jin, B.Q., Wen, W.H., and Yang, A.G. (2014). MiR-568 inhibits the activation and function of CD4(+) T cells and Treg cells by targeting NFAT5. *Int Immunol* 26, 269-281. doi: 10.1093/intimm/dxt065.
- Liao, W., Lin, J.X., Wang, L., Li, P., and Leonard, W.J. (2011). Modulation of cytokine receptors by IL-2 broadly regulates differentiation into helper T cell lineages. *Nat Immunol* 12, 551-559. doi: 10.1038/ni.2030.
- Liao, W., Schones, D.E., Oh, J., Cui, Y., Cui, K., Roh, T.Y., Zhao, K., and Leonard, W.J. (2008). Priming for T helper type 2 differentiation by interleukin 2-mediated induction of interleukin 4 receptor alpha-chain expression. *Nat Immunol* 9, 1288-1296. doi: 10.1038/ni.1656.
- Litvak, V., Ratushny, A.V., Lampano, A.E., Schmitz, F., Huang, A.C., Raman, A., Rust, A.G., Bergthaler, A., Aitchison, J.D., and Aderem, A. (2012). A FOXO3-IRF7 gene regulatory circuit limits inflammatory sequelae of antiviral responses. *Nature* 490, 421-425. doi: 10.1038/nature11428.
- Liu, J., Farmer, J.D., Jr., Lane, W.S., Friedman, J., Weissman, I., and Schreiber, S.L. (1991). Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66, 807-815.
- Liu, Q., Boudot, A., Ni, J., Hennessey, T., Beauparlant, S.L., Rajabi, H.N., Zahnow, C., and Ewen, M.E. (2014). Cyclin D1 and C/EBPbeta LAP1 operate in a common pathway to promote mammary epithelial cell differentiation. *Mol Cell Biol* 34, 3168-3179. doi: 10.1128/MCB.00039-14.
- Liu, X., Nurieva, R.I., and Dong, C. (2013). Transcriptional regulation of follicular T-helper (Tfh) cells. *Immunol Rev* 252, 139-145. doi: 10.1111/imr.12040.

- Liu, Y., Zhang, P., Li, J., Kulkarni, A.B., Perruche, S., and Chen, W. (2008). A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 9, 632-640. doi: 10.1038/ni.1607.
- Lohoff, M., and Mak, T.W. (2005). Roles of interferon-regulatory factors in T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 5, 125-135. doi: 10.1038/nri1552.
- Lund, R., Ahlfors, H., Kainonen, E., Laheesmaa, A.M., Dixon, C., and Laheesmaa, R. (2005). Identification of genes involved in the initiation of human Th1 or Th2 cell commitment. *Eur J Immunol* 35, 3307-3319. doi: 10.1002/eji.200526079.
- Ma, J., Wang, R., Fang, X., Ding, Y., and Sun, Z. (2011). Critical role of TCF-1 in repression of the IL-17 gene. *PLoS One* 6, e24768. doi: 10.1371/journal.pone.0024768.
- Magram, J., Connaughton, S.E., Warriar, R.R., Carvajal, D.M., Wu, C.Y., Ferrante, J., Stewart, C., Sarmiento, U., Faherty, D.A., and Gately, M.K. (1996). IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses. *Immunity* 4, 471-481.
- 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. doi: 10.1038/nature04754.
- Mason, J.L., Angelastro, J.M., Ignatova, T.N., Kukekov, V.G., Lin, G., Greene, L.A., and Goldman, J.E. (2005). ATF5 regulates the proliferation and differentiation of oligodendrocytes. *Mol Cell Neurosci* 29, 372-380. doi: 10.1016/j.mcn.2005.03.004.
- Matsuo, K., Owens, J.M., Tonko, M., Elliott, C., Chambers, T.J., and Wagner, E.F. (2000). Fos1 is a transcriptional target of c-Fos during osteoclast differentiation. *Nat Genet* 24, 184-187. doi: 10.1038/72855.
- Matuszyk, J. (2009). [The roles of orphan nuclear receptors in T-lymphocyte development in the thymus]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 63, 522-536.
- Mccaffrey, P.G., Kim, P.K., Valge-Archer, V.E., Sen, R., and Rao, A. (1994). Cyclosporin A sensitivity of the NF-kappa B site of the IL2R alpha promoter in untransformed murine T cells. *Nucleic Acids Res* 22, 2134-2142.
- Melton, A.C., Bailey-Bucktrout, S.L., Travis, M.A., Fife, B.T., Bluestone, J.A., and Sheppard, D. (2010). Expression of alphavbeta8 integrin on dendritic cells regulates Th17 cell development and experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *J Clin Invest* 120, 4436-4444. doi: 10.1172/JCI43786.
- Metcalf, C.E., and Wassarman, D.A. (2007). Nucleolar colocalization of TAF1 and testis-specific TAFs during Drosophila spermatogenesis. *Dev Dyn* 236, 2836-2843. doi: 10.1002/dvdy.21294.
- Miao, T., Raymond, M., Bhullar, P., Ghaffari, E., Symonds, A.L., Meier, U.C., Giovannoni, G., Li, S., and Wang, P. (2013). Early growth response gene-2 controls IL-17 expression and Th17 differentiation by negatively regulating Batf. *J Immunol* 190, 58-65. doi: 10.4049/jimmunol.1200868.
- Michalek, R.D., Gerriets, V.A., Nichols, A.G., Inoue, M., Kazmin, D., Chang, C.Y., Dwyer, M.A., Nelson, E.R., Pollizzi, K.N., Ilkayeva, O., Giguere, V., Zuercher, W.J., Powell, J.D., Shinohara, M.L., McDonnell, D.P., and Rathmell, J.C. (2011). Estrogen-related receptor-alpha is a metabolic regulator of effector T-cell activation and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 18348-18353. doi: 10.1073/pnas.1108856108.
- Mikasa, M., Rokutanda, S., Komori, H., Ito, K., Tsang, Y.S., Date, Y., Yoshida, C.A., and Komori, T. (2011). Regulation of Tcf7 by Runx2 in chondrocyte maturation and proliferation. *J Bone Miner Metab* 29, 291-299. doi: 10.1007/s00774-010-0222-z.
- Minault, M., Lecron, J.C., Labrousche, S., Simonnet, G., and Gombert, J. (1995). Characterization of binding sites for neuropeptide FF on T lymphocytes of the Jurkat cell line. *Peptides* 16, 105-111.
- Moran, J.A., Dahl, E.L., and Mulcahy, R.T. (2002). Differential induction of maff, mafG and mafK expression by electrophile-response-element activators. *Biochem J* 361, 371-377.
- Motohashi, H., Katsuoka, F., Engel, J.D., and Yamamoto, M. (2004). Small Maf proteins serve as transcriptional cofactors for keratinocyte differentiation in the Keap1-Nrf2 regulatory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6379-6384. doi: 10.1073/pnas.0305902101.

- Mouallif, M., Albert, A., Zeddou, M., Ennaji, M.M., Delvenne, P., and Guenin, S. (2014). Expression profile of undifferentiated cell transcription factor 1 in normal and cancerous human epithelia. *Int J Exp Pathol* 95, 251-259. doi: 10.1111/iep.12077.
- 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., and Reiner, S.L. (2001). Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science* 292, 1907-1910. doi: 10.1126/science.1059835.
- Muller, H., Moroni, M.C., Vigo, E., Petersen, B.O., Bartek, J., and Helin, K. (1997). Induction of S-phase entry by E2F transcription factors depends on their nuclear localization. *Mol Cell Biol* 17, 5508-5520.
- Murphy, K. (2012). *Janeway's Immunology*, 8 edn (Garlan Science, Taylor & Francis Group).
- Nelson, N., Kanno, Y., Hong, C., Contursi, C., Fujita, T., Fowlkes, B.J., O'connell, E., Hu-Li, J., Paul, W.E., Jankovic, D., Sher, A.F., Coligan, J.E., Thornton, A., Appella, E., Yang, Y., and Ozato, K. (1996). Expression of IFN regulatory factor family proteins in lymphocytes. Induction of Stat-1 and IFN consensus sequence binding protein expression by T cell activation. *J Immunol* 156, 3711-3720.
- Nie, L., Zhao, Y., Wu, W., Yang, Y.Z., Wang, H.C., and Sun, X.H. (2011). Notch-induced Asb2 expression promotes protein ubiquitination by forming non-canonical E3 ligase complexes. *Cell Res* 21, 754-769. doi: 10.1038/cr.2010.165.
- Notani, D., Gottimukkala, K.P., Jayani, R.S., Limaye, A.S., Damle, M.V., Mehta, S., Purbey, P.K., Joseph, J., and Galande, S. (2010). Global regulator SATB1 recruits beta-catenin and regulates T(H)2 differentiation in Wnt-dependent manner. *PLoS Biol* 8, e1000296. doi: 10.1371/journal.pbio.1000296.
- Novershtern, N., Subramanian, A., Lawton, L.N., Mak, R.H., Haining, W.N., Mcconkey, M.E., Habib, N., Yosef, N., Chang, C.Y., Shay, T., Frampton, G.M., Drake, A.C., Leskov, I., Nilsson, B., Preffer, F., Dombkowski, D., Evans, J.W., Liefeld, T., Smutko, J.S., Chen, J., Friedman, N., Young, R.A., Golub, T.R., Regev, A., and Ebert, B.L. (2011). Densely interconnected transcriptional circuits control cell states in human hematopoiesis. *Cell* 144, 296-309. doi: 10.1016/j.cell.2011.01.004.
- O'shea, J.J., and Paul, W.E. (2010). Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science* 327, 1098-1102. doi: 10.1126/science.1178334.
- Obeidat, M., Li, L., and Ballermann, B.J. (2014). TIMAP promotes angiogenesis by suppressing PTEN-mediated Akt inhibition in human glomerular endothelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 307, F623-633. doi: 10.1152/ajprenal.00070.2014.
- Obermayer, D., Glasnov, T.N., and Kappe, C.O. (2011). Microwave-assisted and continuous flow multistep synthesis of 4-(pyrazol-1-yl)carboxanilides. *J Org Chem* 76, 6657-6669. doi: 10.1021/jo2009824.
- 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. doi: 10.1084/jem.20102144.
- Oh, H.M., Yu, C.R., Golestaneh, N., Amadi-Obi, A., Lee, Y.S., Eseonu, A., Mahdi, R.M., and Egwuagu, C.E. (2011). STAT3 protein promotes T-cell survival and inhibits interleukin-2 production through up-regulation of Class O Forkhead transcription factors. *J Biol Chem* 286, 30888-30897. doi: 10.1074/jbc.M111.253500.
- Okada, Y., Wu, D., Trynka, G., Raj, T., Terao, C., Ikari, K., Kochi, Y., Ohmura, K., Suzuki, A., Yoshida, S., Graham, R.R., Manoharan, A., Ortmann, W., Bhangale, T., Denny, J.C., Carroll, R.J., Eyster, A.E., Greenberg, J.D., Kremer, J.M., Pappas, D.A., Jiang, L., Yin, J., Ye, L., Su, D.F., Yang, J., Xie, G., Keystone, E., Westra, H.J., Esko, T., Metspalu, A., Zhou, X., Gupta, N., Mirel, D., Stahl, E.A., Diogo, D., Cui, J., Liao, K., Guo, M.H., Myouzen, K., Kawaguchi, T., Coenen, M.J., Van Riel, P.L., Van De Laar, M.A., Guchelaar, H.J., Huizinga, T.W., Dieude, P., Mariette, X., Bridges, S.L., Jr., Zernakova, A., Toes, R.E., Tak, P.P., Miceli-Richard, C., Bang, S.Y., Lee, H.S., Martin, J., Gonzalez-Gay, M.A., Rodriguez-Rodriguez, L., Rantapaa-Dahlqvist, S., Arlestig, L., Choi, H.K., Kamatani, Y., Galan, P., Lathrop, M., Consortium, R., Consortium, G., Eyre, S., Bowes, J., Barton, A., De Vries, N., Moreland, L.W., Criswell, L.A., Karlson, E.W., Taniguchi, A., Yamada, R., Kubo, M., Liu, J.S., Bae, S.C., Worthington, J., Padyukov, L., Klareskog, L., Gregersen, P.K., Raychaudhuri, S., Stranger, B.E., De Jager, P.L., Franke, L., Visscher, P.M., Brown, M.A., Yamanaka, H., Mimori, T., Takahashi, A., Xu, H., Behrens, T.W., Siminovitch, K.A., Momohara, S., Matsuda, F., Yamamoto, K., and Plenge, R.M. (2014). Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature* 506, 376-381. doi: 10.1038/nature12873.
- 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. doi: 10.1002/eji.201040896.

- Onoyama, I., Tsunematsu, R., Matsumoto, A., Kimura, T., De Alboran, I.M., Nakayama, K., and Nakayama, K.I. (2007). Conditional inactivation of Fbxw7 impairs cell-cycle exit during T cell differentiation and results in lymphomatogenesis. *J Exp Med* 204, 2875-2888. doi: 10.1084/jem.20062299.
- Ouyang, W., Beckett, O., Ma, Q., Paik, J.H., Depinho, R.A., and Li, M.O. (2010). Foxo proteins cooperatively control the differentiation of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Immunol* 11, 618-627. doi: 10.1038/ni.1884.
- Ouyang, X., Zhang, R., Yang, J., Li, Q., Qin, L., Zhu, C., Liu, J., Ning, H., Shin, M.S., Gupta, M., Qi, C.F., He, J.C., Lira, S.A., Morse, H.C., 3rd, Ozato, K., Mayer, L., and Xiong, H. (2011). Transcription factor IRF8 directs a silencing programme for TH17 cell differentiation. *Nat Commun* 2, 314. doi: 10.1038/ncomms1311.
- Pabbisetty, S.K., Rabacal, W., Maseda, D., Cendron, D., Collins, P.L., Hoek, K.L., Parekh, V.V., Aune, T.M., and Sebзда, E. (2014). KLF2 is a rate-limiting transcription factor that can be targeted to enhance regulatory T-cell production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 9579-9584. doi: 10.1073/pnas.1323493111.
- Palazon, A., Goldrath, A.W., Nizet, V., and Johnson, R.S. (2014). HIF transcription factors, inflammation, and immunity. *Immunity* 41, 518-528. doi: 10.1016/j.immuni.2014.09.008.
- Pan, F., Yu, H., Dang, E.V., Barbi, J., Pan, X., Grosso, J.F., Jinasena, D., Sharma, S.M., Mccadden, E.M., Getnet, D., Drake, C.G., Liu, J.O., Ostrowski, M.C., and Pardoll, D.M. (2009). Eos mediates Foxp3-dependent gene silencing in CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. *Science* 325, 1142-1146. doi: 10.1126/science.1176077.
- Pancer, Z., and Cooper, M.D. (2006). The evolution of adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 24, 497-518. doi: 10.1146/annurev.immunol.24.021605.090542.
- Paschall, A.V., Zhang, R., Qi, C.F., Bardhan, K., Peng, L., Lu, G., Yang, J., Merad, M., MCGaha, T., Zhou, G., Mellor, A., Abrams, S.I., Morse, H.C., 3rd, Ozato, K., Xiong, H., and Liu, K. (2015). IFN regulatory factor 8 represses GM-CSF expression in T cells to affect myeloid cell lineage differentiation. *J Immunol* 194, 2369-2379. doi: 10.4049/jimmunol.1402412.
- Perfetto, S.P., Chattopadhyay, P.K., Lamoreaux, L., Nguyen, R., Ambrozak, D., Koup, R.A., and Roederer, M. (2006). Amine reactive dyes: an effective tool to discriminate live and dead cells in polychromatic flow cytometry. *J Immunol Methods* 313, 199-208. doi: 10.1016/j.jim.2006.04.007.
- Pham, D., Vincentz, J.W., Firulli, A.B., and Kaplan, M.H. (2012). Twist1 regulates Ifng expression in Th1 cells by interfering with Runx3 function. *J Immunol* 189, 832-840. doi: 10.4049/jimmunol.1200854.
- Pham, D., Walline, C.C., Hollister, K., Dent, A.L., Blum, J.S., Firulli, A.B., and Kaplan, M.H. (2013). The transcription factor Twist1 limits T helper 17 and T follicular helper cell development by repressing the gene encoding the interleukin-6 receptor alpha chain. *J Biol Chem* 288, 27423-27433. doi: 10.1074/jbc.M113.497248.
- Ramsey, S.A., Klemm, S.L., Zak, D.E., Kennedy, K.A., Thorsson, V., Li, B., Gilchrist, M., Gold, E.S., Johnson, C.D., Litvak, V., Navarro, G., Roach, J.C., Rosenberger, C.M., Rust, A.G., Yudkovsky, N., Aderem, A., and Shmulevich, I. (2008). Uncovering a macrophage transcriptional program by integrating evidence from motif scanning and expression dynamics. *PLoS Comput Biol* 4, e1000021. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000021.
- Ratajewski, M., Walczak-Drzewiecka, A., Salkowska, A., and Dastych, J. (2012). Upstream stimulating factors regulate the expression of RORgammaT in human lymphocytes. *J Immunol* 189, 3034-3042. doi: 10.4049/jimmunol.1200519.
- Rengarajan, J., Tang, B., and Glimcher, L.H. (2002). NFATc2 and NFATc3 regulate T(H)2 differentiation and modulate TCR-responsiveness of naive T(H)cells. *Nat Immunol* 3, 48-54. doi: 10.1038/ni744.
- Renkonen, J., Joenvaara, S., Parviainen, V., Mattila, P., and Renkonen, R. (2010). Network analysis of single nucleotide polymorphisms in asthma. *J Asthma Allergy* 3, 177-186. doi: 10.2147/JAA.S14459.
- Ribeiro De Almeida, C., Heath, H., Krpic, S., Dingjan, G.M., Van Hamburg, J.P., Bergen, I., Van De Nobelen, S., Sleutels, F., Grosveld, F., Galjart, N., and Hendriks, R.W. (2009). Critical role for the transcription regulator CCCTC-binding factor in the control of Th2 cytokine expression. *J Immunol* 182, 999-1010.
- Richardson, M.W., Jadlofsky, J., Didigu, C.A., Doms, R.W., and Riley, J.L. (2012). Kruppel-like factor 2 modulates CCR5 expression and susceptibility to HIV-1 infection. *J Immunol* 189, 3815-3821. doi: 10.4049/jimmunol.1201431.
- Rockwell, C.E., Zhang, M., Fields, P.E., and Klaassen, C.D. (2012). Th2 skewing by activation of Nrf2 in CD4(+) T cells. *J Immunol* 188, 1630-1637. doi: 10.4049/jimmunol.1101712.

- Romagnani, S. (1996). Th1 and Th2 in human diseases. *Clin Immunol Immunopathol* 80, 225-235.
- Rozenberg, J.M., Bhattacharya, P., Chatterjee, R., Glass, K., and Vinson, C. (2013). Combinatorial recruitment of CREB, C/EBPbeta and c-Jun determines activation of promoters upon keratinocyte differentiation. *PLoS One* 8, e78179. doi: 10.1371/journal.pone.0078179.
- 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. doi: 10.1016/j.immuni.2009.10.006.
- Ruan, Q., Kameswaran, V., Zhang, Y., Zheng, S., Sun, J., Wang, J., Devirgiliis, J., Liou, H.C., Beg, A.A., and Chen, Y.H. (2011). The Th17 immune response is controlled by the Rel-RORgamma-RORgamma T transcriptional axis. *J Exp Med* 208, 2321-2333. doi: 10.1084/jem.20110462.
- 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. doi: 10.1038/ni.1795.
- Saito, A., Kanemoto, S., Zhang, Y., Asada, R., Hino, K., and Imaizumi, K. (2014). Chondrocyte proliferation regulated by secreted luminal domain of ER stress transducer BBF2H7/CREB3L2. *Mol Cell* 53, 127-139. doi: 10.1016/j.molcel.2013.11.008.
- 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. doi: 10.1111/j.0105-2896.2006.00427.x.
- Sander, B., Skansen-Saphir, U., Damm, O., Hakansson, L., Andersson, J., and Andersson, U. (1995). Sequential production of Th1 and Th2 cytokines in response to live bacillus Calmette-Guerin. *Immunology* 86, 512-518.
- Scharton-Kersten, T., Contursi, C., Masumi, A., Sher, A., and Ozato, K. (1997). Interferon consensus sequence binding protein-deficient mice display impaired resistance to intracellular infection due to a primary defect in interleukin 12 p40 induction. *J Exp Med* 186, 1523-1534.
- Schmidt, M., Nagel, S., Proba, J., Thiede, C., Ritter, M., Waring, J.F., Rosenbauer, F., Huhn, D., Wittig, B., Horak, I., and Neubauer, A. (1998). Lack of interferon consensus sequence binding protein (ICSBP) transcripts in human myeloid leukemias. *Blood* 91, 22-29.
- Schraml, B.U., Hildner, K., Ise, W., Lee, W.L., Smith, W.A., Solomon, B., Sahota, G., Sim, J., Mukasa, R., Cemerski, S., Hatton, R.D., Stormo, G.D., Weaver, C.T., Russell, J.H., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2009). The AP-1 transcription factor Batf controls T(H)17 differentiation. *Nature* 460, 405-409. doi: 10.1038/nature08114.
- Schuster, S.C. (2008). Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nat Methods* 5, 16-18. doi: 10.1038/nmeth1156.
- Schwartz, R.H. (1996). Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism? *J Exp Med* 184, 1-8.
- Searls, D.B. (2005). Data integration: challenges for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 4, 45-58. doi: 10.1038/nrd1608.
- Sharf, R., Azriel, A., Lejbkovicz, F., Winograd, S.S., Ehrlich, R., and Levi, B.Z. (1995). Functional domain analysis of interferon consensus sequence binding protein (ICSBP) and its association with interferon regulatory factors. *J Biol Chem* 270, 13063-13069.
- 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. doi: 10.1016/j.immuni.2008.04.016.
- Shimoda, K., Van Deursen, J., Sangster, M.Y., Sarawar, S.R., Carson, R.T., Tripp, R.A., Chu, C., Quelle, F.W., Nosaka, T., Vignali, D.A., Doherty, P.C., Grosveld, G., Paul, W.E., and Ihle, J.N. (1996). Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature* 380, 630-633. doi: 10.1038/380630a0.
- 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. doi: 10.1016/j.clim.2009.02.009.
- Shinnakasu, R., Yamashita, M., Kuwahara, M., Hosokawa, H., Hasegawa, A., Motohashi, S., and Nakayama, T. (2008). Gfi1-mediated stabilization of GATA3 protein is required for Th2 cell differentiation. *J Biol Chem* 283, 28216-28225. doi: 10.1074/jbc.M804174200.

- Shou, Z., Yamada, K., Kawata, H., Yokoyama, O., and Miyamoto, K. (2004). A mechanism of induction of the mouse zinc-fingers and homeoboxes 1 (ZHX1) gene expression by interleukin-2. *Biochem Biophys Res Commun* 314, 885-890.
- Simeoni, O., Piras, V., Tomita, M., and Selvarajoo, K. (2015). Tracking global gene expression responses in T cell differentiation. *Gene* 569, 259-266. doi: 10.1016/j.gene.2015.05.061.
- Sims, S.H., Cha, Y., Romine, M.F., Gao, P.Q., Gottlieb, K., and Deisseroth, A.B. (1993). A novel interferon-inducible domain: structural and functional analysis of the human interferon regulatory factor 1 gene promoter. *Mol Cell Biol* 13, 690-702.
- Singer, G.G., and Abbas, A.K. (1994). The fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice. *Immunity* 1, 365-371.
- Sinha, P., Chornoguz, O., Clements, V.K., Artemenko, K.A., Zubarev, R.A., and Ostrand-Rosenberg, S. (2011). Myeloid-derived suppressor cells express the death receptor Fas and apoptose in response to T cell-expressed FasL. *Blood* 117, 5381-5390. doi: 10.1182/blood-2010-11-321752.
- Slater, T., Bouton, C., and Huang, E.S. (2008). Beyond data integration. *Drug Discov Today* 13, 584-589. doi: 10.1016/j.drudis.2008.01.008.
- Snapper, C.M., and Paul, W.E. (1987). Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* 236, 944-947.
- So, A.Y., Garcia-Flores, Y., Minisandram, A., Martin, A., Taganov, K., Boldin, M., and Baltimore, D. (2012). Regulation of APC development, immune response, and autoimmunity by Bach1/HO-1 pathway in mice. *Blood* 120, 2428-2437. doi: 10.1182/blood-2012-04-426247.
- Sohet, F., Lin, C., Munji, R.N., Lee, S.Y., Ruderisch, N., Soung, A., Arnold, T.D., Derugin, N., Vexler, Z.S., Yen, F.T., and Daneman, R. (2015). LSR/angulin-1 is a tricellular tight junction protein involved in blood-brain barrier formation. *J Cell Biol* 208, 703-711. doi: 10.1083/jcb.201410131.
- Stewart, T.J., Greenelch, K.M., Reid, J.E., Liewehr, D.J., Steinberg, S.M., Liu, K., and Abrams, S.I. (2009). Interferon regulatory factor-8 modulates the development of tumour-induced CD11b+Gr-1+ myeloid cells. *J Cell Mol Med* 13, 3939-3950. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00685.x.
- Stockinger, B., and Veldhoen, M. (2007). Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol* 19, 281-286. doi: 10.1016/j.coi.2007.04.005.
- Stone, E.L., Pepper, M., Katayama, C.D., Kerdiles, Y.M., Lai, C.Y., Emslie, E., Lin, Y.C., Yang, E., Goldrath, A.W., Li, M.O., Cantrell, D.A., and Hedrick, S.M. (2015). ICOS coreceptor signaling inactivates the transcription factor FOXO1 to promote Tfh cell differentiation. *Immunity* 42, 239-251. doi: 10.1016/j.immuni.2015.01.017.
- Stritesky, G.L., Muthukrishnan, R., Sehra, S., Goswami, R., Pham, D., Travers, J., Nguyen, E.T., Levy, D.E., and Kaplan, M.H. (2011). The transcription factor STAT3 is required for T helper 2 cell development. *Immunity* 34, 39-49. doi: 10.1016/j.immuni.2010.12.013.
- Subauste, M.C., Sansom, O.J., Porecha, N., Raich, N., Du, L., and Maher, J.F. (2010). Fem1b, a proapoptotic protein, mediates proteasome inhibitor-induced apoptosis of human colon cancer cells. *Mol Carcinog* 49, 105-113. doi: 10.1002/mc.20594.
- Subramanian, N., Torabi-Parizi, P., Gottschalk, R.A., Germain, R.N., and Dutta, B. (2015). Network representations of immune system complexity. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 7, 13-38. doi: 10.1002/wsbm.1288.
- Sung, J.Y., Kim, H., Kim, Y.N., Na, Y.S., and Park, B.K. (2011). Interferon consensus sequence binding protein-induced cell proliferation is mediated by TGF-beta signaling and p38 MAPK activation. *Lab Invest* 91, 1304-1313. doi: 10.1038/labinvest.2011.90.
- 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. doi: 10.1126/science.1065543.
- Takeda, Y., and Jetten, A.M. (2013). Prospero-related homeobox 1 (Prox1) functions as a novel modulator of retinoic acid-related orphan receptors alpha- and gamma-mediated transactivation. *Nucleic Acids Res* 41, 6992-7008. doi: 10.1093/nar/gkt447.

- Tamura, T., Kong, H.J., Tunyaplin, C., Tsujimura, H., Calame, K., and Ozato, K. (2003). ICSBP/IRF-8 inhibits mitogenic activity of p210 Bcr/Abl in differentiating myeloid progenitor cells. *Blood* 102, 4547-4554. doi: 10.1182/blood-2003-01-0291.
- Tamura, T., Nagamura-Inoue, T., Shmeltzer, Z., Kuwata, T., and Ozato, K. (2000). ICSBP directs bipotential myeloid progenitor cells to differentiate into mature macrophages. *Immunity* 13, 155-165.
- Tamura, T., Yanai, H., Savitsky, D., and Taniguchi, T. (2008). The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annu Rev Immunol* 26, 535-584. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090400.
- Tan, R.J., Gibbons, L.J., Potter, C., Hyrich, K.L., Morgan, A.W., Wilson, A.G., Isaacs, J.D., Braggss, and Barton, A. (2010). Investigation of rheumatoid arthritis susceptibility genes identifies association of AFF3 and CD226 variants with response to anti-tumour necrosis factor treatment. *Ann Rheum Dis* 69, 1029-1035. doi: 10.1136/ard.2009.118406.
- Tanaka, S., Suto, A., Iwamoto, T., Kashiwakuma, D., Kagami, S., Suzuki, K., Takatori, H., Tamachi, T., Hirose, K., Onodera, A., Suzuki, J., Ohara, O., Yamashita, M., Nakayama, T., and Nakajima, H. (2014). Sox5 and c-Maf cooperatively induce Th17 cell differentiation via ROR $\gamma$  induction as downstream targets of Stat3. *J Exp Med* 211, 1857-1874. doi: 10.1084/jem.20130791.
- Tofukuji, S., Kuwahara, M., Suzuki, J., Ohara, O., Nakayama, T., and Yamashita, M. (2012). Identification of a new pathway for Th1 cell development induced by cooperative stimulation with IL-4 and TGF- $\beta$ . *J Immunol* 188, 4846-4857. doi: 10.4049/jimmunol.1103799.
- Tribioli, C., Robledo, R.F., and Lufkin, T. (2002). The murine fork head gene Foxn2 is expressed in craniofacial, limb, CNS and somitic tissues during embryogenesis. *Mech Dev* 118, 161-163.
- Tsujimura, H., Tamura, T., Gongora, C., Aliberti, J., Reis E Sousa, C., Sher, A., and Ozato, K. (2003). ICSBP/IRF-8 retrovirus transduction rescues dendritic cell development in vitro. *Blood* 101, 961-969. doi: 10.1182/blood-2002-05-1327.
- Tzartos, J.S., Friese, M.A., Craner, M.J., Palace, J., Newcombe, J., Esiri, M.M., and Fugger, L. (2008). Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol* 172, 146-155. doi: 10.2353/ajpath.2008.070690.
- Ushijima, T., Okazaki, K., Tsushima, H., and Iwamoto, Y. (2014). CCAAT/enhancer-binding protein beta regulates the repression of type II collagen expression during the differentiation from proliferative to hypertrophic chondrocytes. *J Biol Chem* 289, 2852-2863. doi: 10.1074/jbc.M113.492843.
- Vahedi, G., A, C.P., Hand, T.W., Laurence, A., Kanno, Y., O'shea, J.J., and Hirahara, K. (2013). Helper T-cell identity and evolution of differential transcriptomes and epigenomes. *Immunol Rev* 252, 24-40. doi: 10.1111/imr.12037.
- Vahedi, G., Takahashi, H., Nakayamada, S., Sun, H.W., Sartorelli, V., Kanno, Y., and O'shea, J.J. (2012). STATs shape the active enhancer landscape of T cell populations. *Cell* 151, 981-993. doi: 10.1016/j.cell.2012.09.044.
- Vallabhapurapu, S., and Karin, M. (2009). Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol* 27, 693-733. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132641.
- Van Den Ham, H.J., De Waal, L., Zaaraoui-Boutahar, F., Bijl, M., Van Ijcken, W.F., Osterhaus, A.D., De Boer, R.J., and Andeweg, A.C. (2013). Early divergence of Th1 and Th2 transcriptomes involves a small core response and sets of transiently expressed genes. *Eur J Immunol* 43, 1074-1084. doi: 10.1002/eji.201242979.
- Vasilevsky, N.A., Ruby, C.E., Hurlin, P.J., and Weinberg, A.D. (2011). OX40 engagement stabilizes Mxd4 and Mnt protein levels in antigen-stimulated T cells leading to an increase in cell survival. *Eur J Immunol* 41, 1024-1034. doi: 10.1002/eji.201040449.
- Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M., and Stockinger, B. (2006). TGF $\beta$  in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24, 179-189. doi: 10.1016/j.immuni.2006.01.001.
- 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. doi: 10.1038/ni1564.
- Wang, H., and Morse, H.C., 3rd (2009). IRF8 regulates myeloid and B lymphoid lineage diversification. *Immunol Res* 43, 109-117. doi: 10.1007/s12026-008-8055-8.



- Wang, I.M., Contursi, C., Masumi, A., Ma, X., Trinchieri, G., and Ozato, K. (2000). An IFN-gamma-inducible transcription factor, IFN consensus sequence binding protein (ICSBP), stimulates IL-12 p40 expression in macrophages. *J Immunol* 165, 271-279.
- Webb, C.F., Smith, E.A., Medina, K.L., Buchanan, K.L., Smithson, G., and Dou, S. (1998). Expression of bright at two distinct stages of B lymphocyte development. *J Immunol* 160, 4747-4754.
- Wei, G., Wei, L., Zhu, J., Zang, C., Hu-Li, J., Yao, Z., Cui, K., Kanno, Y., Roh, T.Y., Watford, W.T., Schones, D.E., Peng, W., Sun, H.W., Paul, W.E., O'shea, J.J., and Zhao, K. (2009). Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4+ T cells. *Immunity* 30, 155-167. doi: 10.1016/j.immuni.2008.12.009.
- Wei, L., Vahedi, G., Sun, H.W., Watford, W.T., Takatori, H., Ramos, H.L., Takahashi, H., Liang, J., Gutierrez-Cruz, G., Zang, C., Peng, W., O'shea, J.J., and Kanno, Y. (2010). Discrete roles of STAT4 and STAT6 transcription factors in tuning epigenetic modifications and transcription during T helper cell differentiation. *Immunity* 32, 840-851. doi: 10.1016/j.immuni.2010.06.003.
- 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. doi: 10.1038/ni1437.
- Wingender, E., Dietze, P., Karas, H., and Knuppel, R. (1996). TRANSFAC: a database on transcription factors and their DNA binding sites. *Nucleic Acids Res* 24, 238-241.
- Wotton, D., Lo, R.S., Swaby, L.A., and Massague, J. (1999). Multiple modes of repression by the Smad transcriptional corepressor TGIF. *J Biol Chem* 274, 37105-37110.
- Wu, C., Yosef, N., Thalhamer, T., Zhu, C., Xiao, S., Kishi, Y., Regev, A., and Kuchroo, V.K. (2013). Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1. *Nature* 496, 513-517. doi: 10.1038/nature11984.
- Wu, C.Y., Maeda, H., Contursi, C., Ozato, K., and Seder, R.A. (1999). Differential requirement of IFN consensus sequence binding protein for the production of IL-12 and induction of Th1-type cells in response to IFN-gamma. *J Immunol* 162, 807-812.
- Wu, J., and Lingrel, J.B. (2005). Kruppel-like factor 2, a novel immediate-early transcriptional factor, regulates IL-2 expression in T lymphocyte activation. *J Immunol* 175, 3060-3066.
- Wuelling, M., Kaiser, F.J., Buelens, L.A., Braunholz, D., Shivdasani, R.A., Depping, R., and Vortkamp, A. (2009). Trps1, a regulator of chondrocyte proliferation and differentiation, interacts with the activator form of Gli3. *Dev Biol* 328, 40-53. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.01.012.
- Yamane, H., and Paul, W.E. (2013). Early signaling events that underlie fate decisions of naive CD4(+) T cells toward distinct T-helper cell subsets. *Immunol Rev* 252, 12-23. doi: 10.1111/imr.12032.
- Yang, H., Zhang, Y., Wu, M., Li, J., Zhou, W., Li, G., Li, X., Xiao, B., and Christadoss, P. (2010). Suppression of ongoing experimental autoimmune myasthenia gravis by transfer of RelB-silenced bone marrow dendritic cells is associated with a change from a T helper Th17/Th1 to a Th2 and FoxP3+ regulatory T-cell profile. *Inflamm Res* 59, 197-205. doi: 10.1007/s00011-009-0087-6.
- Yang, J., Hu, X., Zimmerman, M., Torres, C.M., Yang, D., Smith, S.B., and Liu, K. (2011). Cutting edge: IRF8 regulates Bax transcription in vivo in primary myeloid cells. *J Immunol* 187, 4426-4430. doi: 10.4049/jimmunol.1101034.
- Yang, X.O., Angkasekwinai, P., Zhu, J., Peng, J., Liu, Z., Nurieva, R., Liu, X., Chung, Y., Chang, S.H., Sun, B., and Dong, C. (2009). Requirement for the basic helix-loop-helix transcription factor Dec2 in initial TH2 lineage commitment. *Nat Immunol* 10, 1260-1266. doi: 10.1038/ni.1821.
- Yi, H., Guo, C., Yu, X., Zuo, D., and Wang, X.Y. (2012). Mouse CD11b+Gr-1+ myeloid cells can promote Th17 cell differentiation and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 189, 4295-4304. doi: 10.4049/jimmunol.1200086.
- Yonetoku, Y., Kubota, H., Okamoto, Y., Toyoshima, A., Funatsu, M., Ishikawa, J., Takeuchi, M., Ohta, M., and Tsukamoto, S. (2006). Novel potent and selective calcium-release-activated calcium (CRAC) channel inhibitors. Part 1: synthesis and inhibitory activity of 5-(1-methyl-3-trifluoromethyl-1H-pyrazol-5-yl)-2-thiophenecarboxamides. *Bioorg Med Chem* 14, 4750-4760. doi: 10.1016/j.bmc.2006.03.024.
- Yosef, N., Shalek, A.K., Gaublot, J.T., Jin, H., Lee, Y., Awasthi, A., Wu, C., Karwacz, K., Xiao, S., Jorgolli, M., Gennert, D., Satija, R., Shakya, A., Lu, D.Y., Trombetta, J.J., Pillai, M.R., Ratcliffe, P.J., Coleman, M.L.,

- Bix, M., Tantin, D., Park, H., Kuchroo, V.K., and Regev, A. (2013). Dynamic regulatory network controlling TH17 cell differentiation. *Nature* 496, 461-468. doi: 10.1038/nature11981.
- Yoshida, Y., Yoshimi, R., Yoshii, H., Kim, D., Dey, A., Xiong, H., Munasinghe, J., Yazawa, I., O'donovan, M.J., Maximova, O.A., Sharma, S., Zhu, J., Wang, H., Morse, H.C., 3rd, and Ozato, K. (2014). The transcription factor IRF8 activates integrin-mediated TGF-beta signaling and promotes neuroinflammation. *Immunity* 40, 187-198. doi: 10.1016/j.immuni.2013.11.022.
- Yu, Q., Sharma, A., Oh, S.Y., Moon, H.G., Hossain, M.Z., Salay, T.M., Leeds, K.E., Du, H., Wu, B., Waterman, M.L., Zhu, Z., and Sen, J.M. (2009). T cell factor 1 initiates the T helper type 2 fate by inducing the transcription factor GATA-3 and repressing interferon-gamma. *Nat Immunol* 10, 992-999. doi: 10.1038/ni.1762.
- Yu, S., Jing, X., Colgan, J.D., Zhao, D.M., and Xue, H.H. (2012). Targeting tetramer-forming GABPbeta isoforms impairs self-renewal of hematopoietic and leukemic stem cells. *Cell Stem Cell* 11, 207-219. doi: 10.1016/j.stem.2012.05.021.
- Yu, X., Rollins, D., Ruhn, K.A., Stubblefield, J.J., Green, C.B., Kashiwada, M., Rothman, P.B., Takahashi, J.S., and Hooper, L.V. (2013). TH17 cell differentiation is regulated by the circadian clock. *Science* 342, 727-730. doi: 10.1126/science.1243884.
- Zhang, F., Meng, G., and Strober, W. (2008a). Interactions among the transcription factors Runx1, RORgammat and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol* 9, 1297-1306. doi: 10.1038/ni.1663.
- Zhang, R., Chen, K., Peng, L., and Xiong, H. (2012). Regulation of T helper cell differentiation by interferon regulatory factor family members. *Immunol Res* 54, 169-176. doi: 10.1007/s12026-012-8328-0.
- Zhang, Y., Tuzova, M., Xiao, Z.X., Cruikshank, W.W., and Center, D.M. (2008b). Pro-IL-16 recruits histone deacetylase 3 to the Skp2 core promoter through interaction with transcription factor GABP. *J Immunol* 180, 402-408.
- Zhao, Y., Zhang, Y.D., Zhang, Y.Y., Qian, S.W., Zhang, Z.C., Li, S.F., Guo, L., Liu, Y., Wen, B., Lei, Q.Y., Tang, Q.Q., and Li, X. (2014). p300-dependent acetylation of activating transcription factor 5 enhances C/EBPbeta transactivation of C/EBPalpha during 3T3-L1 differentiation. *Mol Cell Biol* 34, 315-324. doi: 10.1128/MCB.00956-13.
- Zhou, L., Chong, M.M., and Littman, D.R. (2009). Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity* 30, 646-655. doi: 10.1016/j.immuni.2009.05.001.
- Zhu, J., Guo, L., Min, B., Watson, C.J., Hu-Li, J., Young, H.A., Tschlis, P.N., and Paul, W.E. (2002). Growth factor independent-1 induced by IL-4 regulates Th2 cell proliferation. *Immunity* 16, 733-744.
- Zhu, J., and Paul, W.E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 112, 1557-1569. doi: 10.1182/blood-2008-05-078154.
- Zhu, J., and Paul, W.E. (2010a). Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res* 20, 4-12. doi: 10.1038/cr.2009.138.
- Zhu, J., and Paul, W.E. (2010b). Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunol Rev* 238, 247-262. doi: 10.1111/j.1600-065X.2010.00951.x.
- Zhu, J., Yamane, H., Cote-Sierra, J., Guo, L., and Paul, W.E. (2006). GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Res* 16, 3-10. doi: 10.1038/sj.cr.7310002.

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
$\alpha$	anti (Antikörper)
AA/Bis	Acrylamid-Bis-Acrylamid
Ag	Antigen
Akt	<i>thymoma viral proto-oncogene 1</i>
AP1	<i>adaptor-related protein complex 1</i>
APC (Fluorophore)	Allophycocyanin
APC (Zelle)	Antigen präsentierende Zelle(n)
APS	Ammoniumpersulfat
Bax	<i>BCL2-Associated X Protein</i>
Bcl	<i>B-Cell CLL/Lymphoma protein</i>
Bcl10	<i>B-cell CLL/lymphoma 10</i>
Bcl-xL	<i>Apoptosis Regulator Bcl-X</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BTP1	<i>Bovine trophoblast protein-1</i>
BV	<i>Brilliant Violet</i>
C	Cytosin
CARMA1	<i>caspase recruitment domain family, member 11</i>
Ccr	CC-Chemokinrezeptor
CFSE	<i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>
ChIP	Chromatinimmunopräzipitation
ChIP-Seq	ChIP-Sequenzierung
CML	chronische myeloische Leukämie
CsA	Cyclosporin A
Csf2	<i>Colony Stimulating Factor 2</i>
Ctla4	<i>Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4</i>
Cxcr	<i>C-X-C chemokine receptor type</i>
Cy	Cyanine
d	Tag(e)
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerin
Dbp	<i>D Site Of Albumin Promoter (Albumin D-Box) Binding Protein</i>
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ds	Doppelstrang
DTT	Dithiothreitol
EAE	experimentelle autoimmune Encephalomyelitis
EB-Puffer	Elutionspuffer
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Erk	Extracellular-signal-related kinase1
Etv	<i>Ets Variant</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
Fas	<i>Cell Surface Death Receptor</i>
FC	Foldchange
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	<i>Fetales Kälberserum</i>
Flip	<i>CASP8 And FADD-Like Apoptosis Regulator</i>
Foxp	<i>Forkhead box protein</i>

FPKM	<i>Fragments Per Kilobase Of Exon Per Million Fragments Mapped</i>
FSC	Forward-scatter
G	Guanin
Gata3	<i>GATA binding protein 3</i>
GEO	<i>Gene Expression Omnibus</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	<i>Colony Stimulating Factor 2</i>
GWAS	Genom-weite Assoziationsstudien
h	Stunde(n)
H3K4me3	Histon H3 Lysin K4 Trimethylierung
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure-Puffer
IFN	Interferon
IgG	Immunoglobulin
IKK	I $\kappa$ B-Kinase
IL	Interleukin
IP3	Inositoltriphosphat
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
Irf	<i>Interferone regulatory factor</i>
ISRE	<i>IFN-stimulated response element</i>
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motifs</i>
iTreg	induzierte regulatorische T-Zelle
IVC	individuell ventilierte Käfige
I $\kappa$ B	<i>mucosa asso-ciated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1</i>
Jak	Janus Kinase
JNK	Jun-N-terminale-kinase
kB	Kilobasen
Klf	<i>Kruppel-like factor</i>
KO	Knockout
LAT	<i>linker of activated T cells</i>
LB-Medium	<i>lysogeny broth</i> Medium
Lck	<i>lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>
MACS	magnetische Zellsortierung ( <i>Magnetic Cell Sorting</i> )
MALT1	<i>mucosa asso-ciated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1</i>
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Haupt-Histon-Kompatibilitätskomplex
mRNA	<i>messenger</i> Ribonucleinsäure
MS	Multiple Sklerose
MTX	Methotrexat
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
NF $\kappa$ B	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1</i>
NGS	<i>next-generation sequencing</i>
Npas2	<i>Neuronal PAS Domain Protein 2</i>
nTreg	natürliche regulatorische T-Zelle
omics	Bereiche der Biologie, die auf -omics enden wie genomics, proteomics oder metabolomics
ORF	<i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PB	<i>Pacific blue</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBST	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit 1% Tween
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglycol
PerCP	Peridinin Chlorophyll
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase

PIP2	Phosphatidylinositolbisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-1,4,5-trisphosphat
pIRE	<i>palindromic IFN<math>\gamma</math>-responsive element</i>
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-12-myristyl-13-acetat
PO	<i>Pacific orange</i>
qRT-PCR	quantitative reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
RA	Rheumatische Arthritis
RNA	Ribonucleinsäure
RNA-Seq	RNA-Sequenzierung
ROR $\gamma$ t	<i>RAR-related orphan receptor gamma</i>
rpm	<i>runs per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
Rps18	<i>Ribosomal Protein S18</i>
RT	Raumtemperatur
S	stimuliert
s.	siehe
s. o.	siehe oben
SDS	Natriumdodecylsulfat
sh	<i>short hairpin</i>
shRNA	<i>short hairpin</i> Ribonucleinsäure
Smad	<i>Sma and Mad related proteins</i>
SNP	<i>single-nucleotide</i> Polymorphismen
Stat	<i>Signal Transducer And Activator Of Transcription</i>
T	Thymin
Tbx21/Tbet	<i>T-Cell-Specific T-Box Transcription Factor</i>
TCR	T-Zellrezeptor
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TE-Puffer	TRIS-EDTA-Puffer (s. Tris und EDTA)
TF	Transkriptionsfaktor
Tfh	follikulären T-Helferzelle(n)
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TGF $\beta$ R	TGF- $\beta$ Rezeptor
TGIF	<i>TGF-<math>\beta</math>-interacting factor</i>
Th	T-Helferzelle
TLR	Toll-like Rezeptor
Tm	Schmelztemperatur
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ü. N.	über Nacht
US	unstimuliert
UTR	untranslatierter Bereich ( <i>untranslated Region</i> )
WT	Wildtyp
xg	Einheit der Zentrifugalkraft
ZAP	<i>zeta-chain (TCR) associated protein kinase</i>



## Publikationen

1. **Nuclear factor of activated T cells regulates the expression of interleukin-4 in Th2 cells in an all-or-none fashion.** Köck J, Kreher S, Lehmann K, Riedel R, Bardua M, Lischke T, Jargosch M, Haftmann C, Bendfeldt H, Hatam F, Mashreghi MF, Baumgrass R, Radbruch A, Chang HD. J Biol Chem. 2014 Sep 26;289(39):26752-61. doi: 10.1074/jbc.M114.587865. Epub 2014 Jul 17.
2. **Comprehensive data integration for identification of crucial transcription factors for Th2 cell fate decision.** Jargosch M, Kroeger S, Gralinska E, Klotz U, Fang Z, Chen W, Leser U, Selbig J, Groth D, Baumgrass R. (Manuskript am 22.09.2015 bei Frontiers in Immunology eingereicht)
3. **Subtype-specific transcription factors in T helper cell fate decisions** (Manuskript in Bearbeitung)





# Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.



## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Manja Jargosch, die vorliegende Dissertation zum Thema:

„Identifikation von wichtigen Transkriptionsfaktoren in der Differenzierung von T-Helferzellen mittels integrativer Netzwerkanalysen – Der Transkriptionsfaktor IRF8 ist ein Regulator der Th1 und Treg Differenzierung“

selbstständig und ohne unzulässige Hilfsmittel angefertigt zu haben. Bei der Verfassung der Dissertation wurden keine anderen als die im Text aufgeführten Hilfsmittel verwendet. Ein Promotionsverfahren wurde zu keinem früheren Zeitpunkt an einer anderen Hochschule oder bei einem anderen Fachbereich beantragt.

Berlin, den 29.09.2015

Manja Jargosch