

***Interferon Regulatory Factor 4* ist ein
Schlüsselregulator der Differenzierung von
peripheren CD8 T-Zellen**

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften
des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften,
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Friederike Raczkowski (Raczak)
aus Hamburg

Hamburg, 2013

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. H.-W. MITTRÜCKER
Weitere Gutachterin der Dissertation:
Frau Priv.-Doz. Dr. M. BRELOER
Tag der Disputation: 14. Juni 2013

Hamburg, den 23. Mai 2013



Professor Dr. C. Lohr
Vorsitzender des
Fach-Promotionsausschusses Biologie

Erstgutachter: Prof. Dr. Hans-Willi Mittrücker
Univeristätsklinikum Eppendorf
Institut für Immunologie

Zweitgutachterin: PD. Dr. Minka Breloer
Bernhard-Nocht Institut für Tropenmedizin
Arbeitsgruppe Helminthen-Immunologie

Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor IRF4 (*Interferon Regulatory Factor 4*) gilt als zentraler Regulator der B-Zell- und T-Helferzellendifferenzierung. Erste Hinweise auf eine Funktion von IRF4 in CD8 T-Zellen lieferte die Beobachtung, dass CD8 T-Zellen aus IRF4-defizienten Mäusen keine funktionale Antwort gegen mit Lymphozytären Choriomeningitis Virus infizierte Zellen ausbilden können. Auf Grund dieser Vorarbeiten wurde die Hypothese aufgestellt, dass IRF4 ebenfalls ein Schlüsselregulator der Differenzierung von CD8 T-Zellen und somit aller adaptiven Immunzellen ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass IRF4-defiziente CD8 T-Zellen eine Listerieninfektion im Gegensatz zu Kontrollzellen nur eingeschränkt klären konnten. Dieser Defekt beruhte sowohl auf Problemen bei der Generierung einer substantiellen Population spezifischer CD8 T-Zellen, als auch auf eingeschränkten Effektorfunktionen dieser Zellen. Ein abweichender Phänotyp der IRF4-defizienten CD8 T-Zellen deutete auf eine Differenzierung zu zentralen Gedächtniszellen oder deren Vorläufern hin. Die Analyse der Langlebigkeit von spezifischen IRF4-defizienten CD8 T-Zellen und ihrer Effektormechanismen im Rahmen einer Sekundärinfektion zeigten aber deutliche Nachteile gegenüber den Kontrollzellen. Die Untersuchung der Expression verschiedener die Effektor- und Gedächtniszellendifferenzierung beeinflussender Transkriptionsfaktoren ergab eine deutliche Abweichung der Expression dieser Faktoren in IRF4-defizienten CD8 T-Zellen. Diese Ergebnisse zeigten, dass IRF4 sowohl zur Generierung funktionaler CD8 T-Effektor- als auch CD8 T-Gedächtniszellen unabdingbar war. Auf molekularer Ebene wurde die IRF4-Expression durch den T-Zell-rezeptor induziert und konnte durch IL-12 amplifiziert werden. IRF4 hatte dann einen positiven Effekt auf die Expression der die Entwicklung terminaler CD8 T-Effektorzellen unterstützenden Transkriptionsfaktoren BLIMP1, ID2 und T-Bet. Im Gegensatz dazu hemmte IRF4 die Induktion der Transkriptionsfaktoren BCL-6 und EOMES, welche die Gedächtnisformierung fördern.

Zusammenfassend steuert IRF4 das gesamte Programm der peripheren CD8 T-Zell-differenzierung. IRF4 kann auf Grund dieser Erkenntnisse als einer der zentralen Regulatoren der Differenzierung aller adaptiven Immunzellen angesehen werden. In einem allen adaptiven Immunzellen gemeinsamen Mechanismus hat IRF4 eine essentielle Rolle in der Steuerung der Effektor- bzw. Plasmazellreifung und der Gedächtniszellentwicklung.

Abstract

The transcription factor IRF4 (Interferon Regulatory Factor 4) is a central regulator of B- and T-cell differentiation. First evidence for a role of IRF4 in CD8 T cells is given by the observation that CD8 T cells of IRF4-deficient mice are not capable to establish an effective response to lymphocytic choriomeningitis virus-infected cells. Consequently, it was hypothesized that IRF4 is also a key regulator for CD8 T-cell differentiation and therefore for differentiation of all adaptive immune cells.

Results of this thesis demonstrate that in contrast to CD8 T cells from control mice IRF4-deficient T cells fail to clear a listeria infection. This defect was due to impaired generation of a substantial population of listeria-specific CD8 T cells as well as limited acquisition of effector functions by these cells. Characterization of the phenotype indicated that IRF4-deficient CD8 T cells instead differentiated into central memory T cells or their precursors. However, analysis of longevity of specific IRF4-deficient CD8 T cells and of effector functions of these cells during a secondary response revealed substantial defects in comparison to control cells. The investigation of the expression of different transcription factors controlling effector and memory cell differentiation revealed alterations in the abundance of these factors. Taken together, the results imply that IRF4 is essential for the formation of functional effector as well as memory CD8 T cells. On molecular level, IRF4-expression was induced by the T-cell receptor and amplified by IL-12. IRF4 promoted the expression of transcription factors supporting the generation of terminal effector CD8 T cells such as BLIMP1, ID2 and T-Bet. In contrast, the induction of the transcription factors BCL-6 and EOMES, supporting memory formation, was inhibited by IRF4.

In conclusion, IRF4 controls the entire program of peripheral CD8 T-cell differentiation. IRF4 can be considered as one of the central regulators of adaptive immune cell differentiation and has an essential role in the common process of all adaptive immune cells to control effector and plasma cell maturation and memory cell development.

Inhaltverzeichnis

Zusammenfassung	3
Abstract	4
Inhaltsverzeichnis	5
1. Einleitung	9
1.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	9
1.2 CD8 T-Zellen	11
1.2.1 Die CD8 T-Zellantwort gegen <i>Listeria monocytogenes</i>	13
1.2.2 Regulation der CD8 T-Zelldifferenzierung	14
1.3 Der Transkriptionsfaktor IRF4	20
1.3.1 Die IRF-Familie und das Immunsystem	20
1.3.2 IRF4	20
1.4 Fragestellung	24
2. Material und Methoden	25
2. 1 Materialien	25
2.1.1 Feinchemikalien und sonstige Reagenzien	25
2.1.2 Puffer und Medien	27
2.1.3 Antikörper	28
2.1.4 Bakterienstämme	29
2.1.5 Mäusestämme	29
2.1.6 Geräte und Materialien	30
2.1.7 Software	30
2.2 Methoden	31
2.2.1 Listerieninfektion	31
2.2.2 Organentnahme	31
2.2.3 Isolierung von Milzzellen	31
2.2.4 Isolierung von Leberleukozyten	32
2.2.5 Isolierung von Zellen aus den Lymphknoten	32
2.2.6 Isolierung von Zellen aus dem Knochenmark	32
2.2.7 Bestimmung der Zellzahl	33
2.2.8 Isolierung von OT-I/OT-II T-Zellen aus der Milz	33

2.2.9 Transfer von OT-I bzw. OT-II T-Zellen	34
2.2.10 Bestimmung der Bakterienlast	35
2.2.11 <i>in vitro</i> -Restimulation von OT-I T-Zellen bzw. CD8 T-Zellen	35
2.2.12 <i>in vitro</i> -Stimulation von OT-I T-Zellen bzw. CD8 T-Zellen	36
2.2.13 Extrazelluläre Antikörperfärbung	36
2.2.14 Intrazelluläre Antikörperfärbung	37
2.2.15 Intranukleäre Antikörperfärbung	38
2.2.16 Dextramerfärbung	38
2.2.17 Bestimmung der Proliferation mit CFSE	38
2.2.18 Bestimmung der Proliferation mit BrdU	39
2.2.19 Bestimmung der Apoptose mit Annexin V	40
2.2.20 Bestimmung der Apoptose mit FLICA	40
2.2.21 <i>in vivo</i> -Zytotoxizitäts-Test	41
2.2.22 Durchflusszytometrie (<i>fluorescence activated cell sorting</i> , FACS)	42
2.2.23 Sortierung von Zellen mittels Durchflusszytometrie	43
2.2.24 RNA-Isolierung	43
2.2.25 DNA-Chip Analyse	44
2.2.26 Statistik	44
3. Ergebnisteil	46
3.1 Fragestellung	46
3.2 Teil 1 – Die Rolle von IRF4 für die primäre CD8 T-Zellantwort	47
3.2.1 IRF4 ist für eine effiziente Klärung der Listerieninfektion durch CD8 T-Zellen obligat	47
3.2.2 Die Ausbildung antigenerkennender und funktionaler CD8 T-Effektorzellen ist IRF4-abhängig	49
3.2.3 IRF4-defiziente CD8 T-Zellen zeigen auch während der akuten Infektion Merkmale von naiven und Gedächtniszellen	52
3.2.4 IRF4-defiziente CD8 T-Zellen zeigten gegenüber Wildtypkontrollen eine verminderte Anreicherung in infizierten Geweben	55
3.2.5 Die IRF4-Defizienz führt nicht zu vermehrter Apoptose der CD8 T-Zellen	57

3.2.6 IRF4 ermöglicht eine andauernde Proliferation der CD8 T-Zellen	59
3.2.7 Die eingeschränkte Proliferation IRF4-defizienter CD8 T-Zellen lässt sich nicht durch „Exhaustion“ erklären	61
3.2.8 IRF4 ermöglicht die Differenzierung zu Zytokin-produzierenden CD8 T-Zellen	62
3.2.9 Die Zytotoxizität von CD8 T-Zellen ist IRF4-abhängig	64
3.2.10 IRF4-defiziente CD8 T-Zellen weisen einen deutlich veränderten Oberflächenphänotyp auf und ähneln auch in der Effektorphase naiven oder Gedächtniszellen	66
3.3 Teil 2 – Die Rolle von IRF4 für das CD8 T-Zellvermittelte immunologische Gedächtnis und die sekundäre CD8 T-Zellantwort	70
3.3.1 Die Langlebigkeit von CD8 T-Zellen ist IRF4-abhängig	70
3.3.2 Die Analyse der gesamten CD8 T-Zellpopulationen erlaubt keine Rückschlüsse auf die Rolle von IRF4 in der Differenzierung von Gedächtniszellen	71
3.3.3 Auch im Langzeittransfer sind die IRF4-defizienten CD8 T-Zellen deutlich benachteiligt	73
3.3.4 Nach Sekundärinfektion sind weniger IRF4-defiziente CD8 T-Zellen als Kontrollzellen in den infizierten Geweben	75
3.3.5 CD8 T-Zellen benötigen IRF4 auch für die Zytokinproduktion und Proliferation im Rahmen der Sekundärinfektion	77
3.4 Teil 3 - Expression von IRF4 und potentiell von IRF4 abhängigen Proteinen	79
3.4.1 Im Rahmen der CD8 T-Zellantwort wird die IRF4-Expression in CD8 T-Zellen induziert	79
3.4.1 Die IRF4-Expression wird durch IL-12 beeinflusst und hat Auswirkungen auf die Induktion von T-Bet und EOMES	81
3.4.2 IRF4 reguliert die Expression verschiedener für die CD8 T-Zelldifferenzierung entscheidender Transkriptionsfaktoren	83

4. Diskussion	85
4.1 IRF4 reguliert die Differenzierung zu terminalen CD8 T-Effektorzellen	85
4.3 IRF4 ist zur Generierung funktionaler Gedächtniszellen unabdingbar	88
4.4 IRF4 als Schlüsselregulator der CD8 T-Zelldifferenzierung	89
6. Anhang	94
6.1 Abkürzungsverzeichnis	94
6.2 Abbildungsverzeichnis	97
6.3 Literaturverzeichnis	99
6.4 Publikationen	110
6.5 Eidstattliche Versicherung	111
Danksagung	112

1. Einleitung

Eine zentrale Aufgabe des Immunsystems ist der Schutz gegen in den Körper eindringende Pathogene. Dem Immunsystem stehen hierzu verschiedene Mechanismen zur Verfügung. Bestimmte Pathogene vermehren sich intrazellulär und sind aufgrund dieser Lebensweise durch das Immunsystem nur schwer zu bekämpfen. Die Kontrolle dieser Pathogene ist durch zytotoxische CD8 T-Zellen gewährleistet. CD8 T-Zellen töten infizierte Zellen. Dies verhindert einerseits direkt die Vermehrung von Pathogenen, z.B. im Fall von Viren, oder macht durch Freisetzen der Pathogene (Bakterien, Protozoen) diese für Phagozyten zugänglich. Ein gut etabliertes Modell zur Untersuchung der CD8 T-Zellantwort in Mäusen ist die Infektion mit dem intrazellulären Bakterium *Listeria monocytogenes*. In der vorliegenden Arbeit sollte die Relevanz des Transkriptionsfaktors IRF4 für die CD8 T-Zellantwort und Differenzierung in diesem Infektionsmodell analysiert werden.

1.1 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes (*Lm*) ist ein stäbchenförmiges, gram-positives Bakterium. Der als Saprophyt ubiquitär in der Umwelt vorkommende Erreger befällt Säugetiere. Die Ansteckung erfolgt meist über mit Staub und Erde kontaminierte Lebens- und Futtermittel. Für Wiederkäuer wird insbesondere Silage mit zu hohem pH-Wert und daraus resultierender unzureichender Vergärung zur Gefahr. Für Menschen stellen auch sekundär mit dem Keim kontaminierte Lebensmittel tierischen Ursprungs, wie Rohmilch und Käse, eine wichtige Infektionsquelle dar. Eine direkte Übertragung zwischen infizierten Personen oder Tieren ist ungewöhnlich. Bei immunsupprimierten Personen können lebensbedrohliche Erkrankungen ausgelöst werden, aber auch bei gesunden Menschen können hohe Dosen des Bakteriums zu ernsthaften Erkrankungen führen. Primäre Zielorgane des Keims sind nach dem Magen-Darmtrakt, Milz und Leber. Häufig kommt es zu schweren Komplikationen durch eine Enzephalitis. Außerdem sind Schwangere eine Risikogruppe, da das Bakterium plazentagängig ist. Die Infektion führt zu Aborten, Totgeburten und bei noch geborenen Kindern zu Listeriosis infantiseptica. Diese Kinder haben sich entweder vor der Geburt oder während des Geburtsvorgangs infiziert und leiden unter Sepsis, Meningitis und Pneumonie. Bei Ziegen, Schafen und Rindern verursacht *Lm* ebenfalls zentralnervöse Erkrankungen und Fehlgeburten. Auf

Grund des breiten Wirtsspektrums eignen sich Listerien gut für Infektionsstudien im Mausmodell { Low *et al.* 1997, Pamer 2004, Lamont *et al.* 2011}.

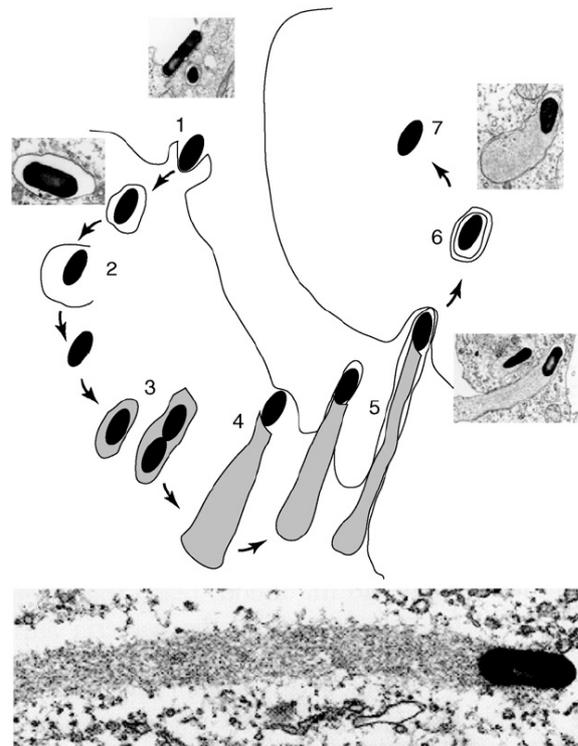


Abbildung 1.1 Lebenszyklus des Bakteriums *Listeria monocytogenes*

(1) Bakterienoberflächenmoleküle wie Internalin A und B binden an Rezeptoren der Wirtszelle wie E-Cadherin oder Met. Diese Interaktion führt zunächst zu einer Deformation der Zellmembran und zu Aktinrearrangements, anschließend zur Internalisation der Listerien. (2) Das Bakterium verlässt die Vakuole durch Lyse der Membran mit Hilfe von Phospholipasen, einer Metalloprotease und Listeriolysin O. (3) Das Bakterium vermehrt sich im Zytosol und beginnt die zelluläre Aktinmaschinerie zu nutzen. (4) Durch polarisierte Aktinpolymerisation bildet sich ein Aktinschweif mit dem sich Listerien im Zytosol fortbewegen und Ausstülpungen in der Zellmembran bilden können. (5) Die durch Aktinpolymerisation entstandenen Ausstülpungen können eine Einstülpung in die angrenzende Zelle bilden. (6) In der angrenzenden Zelle wird eine sekundäre Vakuole abgeschnürt. Die Listerie ist in die nächste Zelle gelangt ohne den Intrazellulärraum zu verlassen. (7) Das Bakterium verlässt die sekundäre Vakuole mit Hilfe der zuvor beschriebenen Mechanismen.

nach {Lambrechts *et al.* 2008}

Normalerweise werden die fakultativ anaerob lebenden Bakterien über den Magen-Darmtrakt aufgenommen. Mit Hilfe des Oberflächenmoleküls Internalin A (InlA) dringen Listerien in die Epithelzellen des Darms ein. Aus der Darmmukosa können die Bakterien über den Blutkreislauf in tiefere Gewebe disseminieren. Wichtige Zielorgane sind Milz und Leber in der Maus, im Menschen zusätzlich das Gehirn. In Leber und Milz werden die Listerien mit Hilfe von Internalin B (InlB) in die Phagosomen der Makrophagen aufgenommen. Bei Ansäuerung des Phagosoms wird das porenbildende Listeriolysin O (LLO) aktiviert. LLO, eine Metalloprotease, und verschiedene Phospholipasen führen zum Abbau der Phagosomenmembran und erlauben es den Listerien ins Zytosol zu gelangen. Im Zytosol kann sich *Lm* dann vor dem Immunsystem relativ geschützt

vermehren. Das Bakterium exprimiert polar die Aktinpolymerase ActA, die eine Aktinpolymerisation verursacht und es den Bakterien erlaubt sich im Zytosol fortzubewegen. Diese Bewegung kann zu Ausstülpungen der Zellmembran führen an deren Spitze sich die Listerien befinden. Diese Zellfortsätze können eine Einstülpung in angrenzende Zellen bilden. Nach Abschnürung entsteht eine sekundäre Vakuole, aus der sich das Bakterium durch die bereits beschriebenen Mechanismen befreien kann. Über diesen Weg können Listerien sich innerhalb eines Gewebes ausbreiten ohne sich in den extrazellulären Raum zu begeben (Abbildung 1.1) {Pamer 2004, Lambrechts *et al.* 2008}.

Für die Untersuchung der T-Zellantwort im Mausmodell wird eine subletale Listeriendosis intravenös oder intraperitoneal injiziert, da Mäuse eine Mutation im E-Cadherin aufweisen, die eine effiziente Aufnahme des Bakteriums über den Darm verhindert. Auch bei dieser Infektionsroute sind die primären Zielorgane Milz und Leber. In der ersten Phase der Infektion begrenzen Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Granulozyten, inflammatorische Monozyten und NK-Zellen zunächst die Replikation und sorgen für die initiale Kontrolle der Bakterien. Die endgültige Klärung der Listerien erfolgt dann durch CD8 T- und Th1-Zellen (T-Helferzellen Typ 1). Aufgrund der intrazellulären Lebensweise und Ausbreitung spielt die humorale Immunantwort nur eine untergeordnete Rolle {Pamer 2004, Hamon *et al.* 2006}.

1.2 CD8 T-Zellen

CD8 T-Zellen gehören zu den T-Lymphozyten. Vorläufer der T-Zellen entstehen im Knochenmark und wandern in den Thymus um dort zu reifen. Im Thymus wird durch somatische Rekombination der T-Zellrezeptor (TZR) ausgebildet. Dieser ermöglicht die Erkennung körperfremder Antigene. Die Antigene, kurzkettige Peptide, werden durch antigenpräsentierende Zellen (APC) im Komplex mit MHC-Molekülen präsentiert (MHC *major histocompatibility complex*). T-Zellen, die einen gegen körpereigene Antigene gerichteten TZR aufweisen, werden negativ selektiert. Eine positive Selektion stellt sicher, dass der TZR eine ausreichende Affinität zu MHC-Molekülen aufweist. Nach diesen Selektionsprozessen verlassen die neu entstandenen T-Zellen den Thymus und zirkulieren im Körper. Der TZR, im Fall von zytotoxischen CD8 T-Zellen ein $\alpha\beta$ -Heterodimer, ist mit CD3-Proteinen assoziiert, die bei Aktivierung des TZR Signale in das Zellinnere weiterleiten. Ein Teil der CD3-Proteine verfügt über ITAM-Motive

(*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*). Nach Aktivierung des TZR erfolgt die Phosphorylierung der ITAMs und die ZAP70-Tyrosinkinase kann an diese CD3-Proteine binden. Dies führt zur Aktivierung der Phospholipase C- γ , was letztendlich zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren wie NF κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*), NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*) und AP-1 (*activator protein-1*) führt, die dann eine spezifische Gentranskription induzieren.

CD8 T-Lymphozyten erkennen Peptid im Komplex mit MHC I, wobei das CD8-Dimer die Bindung des TZR an MHC I unterstützt. Das CD4-Molekül verstärkt im Gegensatz dazu die Interaktion zwischen MHC II und TZR der CD4 T-Zellen. Auch in der Art des Antigens unterscheiden sich CD4 und CD8 T-Zellen. Während in MHC II extrazelluläre Antigene präsentiert werden, zeigt MHC I Antigene aus dem Zytosol der Zelle. Eine Ausnahme bildet die so genannte Kreuzpräsentation durch Dendritische Zellen, bei der extrazelluläre Antigene zunächst in die Zelle aufgenommen werden um dann ebenfalls in MHC I-Molekülen präsentiert zu werden. Während MHC I-Moleküle auf allen Zellen des Körpers präsent sind, weisen im Regelfall nur professionelle APC, wie dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen, MHC II-Moleküle auf.

Für eine effektive CD8 T-Zellantwort ist eine primäre Aktivierung der naiven CD8 T-Zelle durch eine professionelle APC, im Regelfall eine dendritische Zelle, in einem sekundären lymphatischen Gewebe notwendig. Die Erkennung von Antigen zusammen mit von der DC aber auch vom Umfeld zur Verfügung gestellten Kosignalen führt zur umfassenden Aktivierung der CD8 T-Zelle. Folgen sind die Proliferation und die Differenzierung zu zytotoxischen Effektorzellen. Diese Zellen verlassen die lymphatischen Gewebe und zirkulieren durch den Körper. Bei Erkennung ihres Antigens können sie nun auch ohne Kosignale aktiviert werden. Auf diese Aktivierung reagiert die CD8 T-Zelle jetzt mit verschiedenen Effektormechanismen. Die CD8 T-Zelle entleert den Inhalt ihrer zytotoxischen Granula, die vor allem Perforin und Granzyme enthalten, in die Kontaktzone zur Zielzelle. Perforine bilden eine Pore durch die Granzyme in die Zielzelle eindringen können. Sowohl die Porenbildung als auch die Aktivierung von Caspasen durch Granzyme lösen in den Zielzellen den programmierten Zelltod, die Apoptose, aus. Eine weitere wichtige Effektorfunktion von CD8 T-Zellen ist die Sekretion verschiedener Zytokine, wie zum Beispiel Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interferon- γ (IFN- γ). Diese proinflammatorischen Zytokine induzieren u.a. viruzide und bakterizide Mechanismen in Makrophagen {Murphy *et al.* 2008}.

1.2.1 Die CD8 T-Zellantwort gegen *Listeria monocytogenes*

Die Klärung einer primären Listerieninfektion erfolgt durch CD4 und CD8 T-Zellen, die Listerien aus den infizierten Zellen freisetzen und über Zytokine Phagozyten aktivieren. Die effektive Kontrolle von Listerien in einer Sekundärinfektion beruht dann überwiegend auf CD8 T-Zellen. Die T-Zellantwort auf die akute Infektion verläuft in drei entscheidenden Phasen: der klonalen Expansion, der Kontraktion der T-Zellpopulation und der Gedächtnisphase, mit stabilen langlebigen CD8 T-Gedächtniszellen.

Klassisch MHC Ia abhängige CD8 T-Lymphozyten spielen eine entscheidende Rolle bei der Klärung der Listerieninfektion (Abbildung 1.2). Bei der MHC I-vermittelten Präsentation werden verschiedene durch die Listerien in das Zytosol sekretierte Proteine im Proteasom degradiert und mit einem Peptid-Transporter, dem TAP (*transporter associated with antigen processing*), in das endoplasmatische Retikulum (ER) transloziert. Die Peptide binden im ER an MHC I-Moleküle und werden an die Zelloberfläche exportiert. Ein Beispiel für ein so präsentiertes Protein ist der Virulenzfaktor Listeriolysin (LLO).

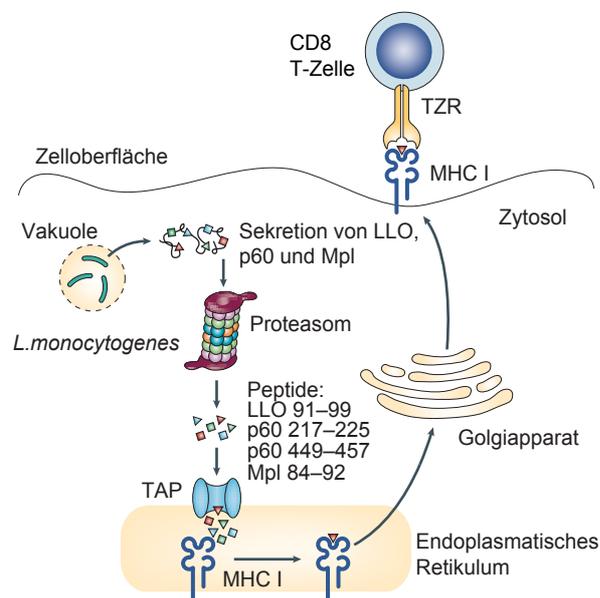


Abbildung 1.2 MHC I-abhängige Präsentation von Listerienpeptiden

Durch Listerien in das Zytosol sekretierte Proteine werden im Proteasom degradiert. Die entstandenen Peptide werden durch den TAP-Transporter in das Endoplasmatische Retikulum transloziert, wo sie an MHC I-Proteine binden. Nach dem Export an die Zelloberfläche werden die an MHC I gebundenen Peptide CD8 T-Zellen präsentiert.

modifiziert nach {Pamer 2004}

Für die Kontrolle der Listerien bedienen sich CD8 T-Zellen sowohl der zytotoxischen Aktivität, die zu einer Freisetzung der Listerien in den Extrazellulärraum führt, als auch der Sekretion von TNF- α und IFN- γ , die in Makrophagen bakterizide Mechanismen induzieren.

Nach einer primären Infektion bilden sich, abhängig von CD4 T-Zellhilfe, CD8 T-Gedächtniszellen, so stehen im Fall der Sekundärinfektion sofort deutlich mehr spezifische CD8 T-Lymphozyten zur Verfügung. Diese Gedächtniszellen besitzen im Allgemeinen auch eine relativ hohe Affinität für das Antigen und zumindest ein Teil dieser Zellen ist bei Reaktivierung weniger von Kosignalen abhängig. Insgesamt ist so eine schnelle und effektive Kontrolle der erneuten Listerieninfektion möglich. {Wong *et al.* 2003, Pamer 2004, Murphy *et al.* 2008}.

1.2.2 Regulation der CD8 T-Zelldifferenzierung

Die Differenzierung von naiven CD8 T-Zellen in verschiedene Effektor- und Gedächtnisstadien wird durch Transkriptionsfaktoren reguliert. Die verschiedenen Differenzierungsstadien sind auch durch die Expression bestimmter Oberflächen- und Effektormoleküle charakterisiert {Kaech *et al.* 2012}.

Die Aktivierung von CD8 T-Zellen setzt eine Stimulation über den T-Zellrezeptor voraus. Die Differenzierung zu Effektor- und Gedächtniszellen wird dann aber durch weitere Signale gesteuert. Hierzu zählen kostimulatorische Moleküle der APC und Signale aus dem inflammatorischen Umfeld. Wichtige kostimulatorische Signale liefern neben der CD28 - CD80/CD86 Interaktion, die Interaktionen von CD27 mit CD70, 4-1BB mit dem 4-1BB-Liganden, ICOS mit dem ICOS-Liganden und CD40 mit CD154. Die proinflammatorischen Signale aus der Umgebung werden hauptsächlich durch Zytokine wie Typ I IFN (IFN- α und IFN- β), IFN- γ , Interleukin-2 (IL-2), IL-12 und IL-27 geliefert. Insbesondere Typ I IFN und IL-12 fördern die Reifung von CD8 T-Effektorzellen {Williams *et al.* 2007, Murphy *et al.* 2008, Obar *et al.* 2011, Wiesel *et al.* 2012}.

Die frühe Phase der T-Zellantwort ist durch eine hohe Proliferationsrate und eine Differenzierung zu CD8 T-Effektorzellen gekennzeichnet. Eine kleine Population der CD8 T-Effektorzellen gehört zu den Gedächtnisvorläufern, die eine hohe Expression der Interleukin-7-Rezeptor- α -Untereinheit (CD127), von CD27 und von Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) zeigen. KLRG1 (*killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1*) wird

hingegen nicht von diesen Vorläuferzellen exprimiert. Terminale Effektorzellen tragen im Gegensatz dazu viel KLRG1 und wenig CD127 auf ihrer Oberfläche {Voehringer *et al.* 2001, Kaech *et al.* 2003, Joshi *et al.* 2007, Kaech *et al.* 2012}. Diese Einteilung gilt jedoch nicht uneingeschränkt und insbesondere während einer Sekundärinfektion können sich viele langlebige KLRG1-CD127 doppelpositive CD8 T-Zellen ansammeln {Masopust *et al.* 2006}. Das Expressionsprofil dieser Oberflächenmoleküle erleichtert jedoch die Feststellung des Gedächtnispotentials von CD8 T-Zellen während primärer Infektionen. Die Differenzierung zu Effektor- oder Gedächtniszellen kann durch Modulation der oben beschriebenen Signale beeinflusst werden. So fördert eine Listerieninfektion durch IFN- γ , Typ I IFN und IL-12 die Differenzierung zu Effektorzellen, während eine IFN- γ - oder IL-12-Defizienz die Entstehung von CD127 hochpositiven Gedächtnisvorläufern induziert {Badovinac *et al.* 2004, Pearce *et al.* 2007, Cui *et al.* 2009, Keppler *et al.* 2009, Kaech *et al.* 2012, Keppler *et al.* 2012}.

CD8 T-Gedächtniszellen benötigen zum Überleben der Kontraktionsphase und zum anschließenden Erhalt der Gedächtnisfunktion Zytokine wie IL-7 und IL-15 {Surh *et al.* 2008}. Man unterscheidet zwei Gruppen von T-Gedächtniszellen, zum Einen zentrale CD8 T-Gedächtniszellen (T_{CM}) und zum Anderen CD8 T-Effektorgedächtniszellen (T_{EM}). Zur Unterscheidung dieser Populationen bieten sich die Moleküle CD44 und CD62L an. Zentrale Gedächtniszellen sind für beide Moleküle positiv, während Effektorgedächtniszellen nur CD44 exprimieren. Die zentralen Gedächtniszellen haben das größere proliferative Potential und produzieren IL-2, während Effektorgedächtniszellen im Gegensatz zu zentralen Gedächtniszellen konstitutiv Effektorfunktionen wie die Zytotoxizität aufweisen {Sallusto *et al.* 1999, Jameson *et al.* 2009}.

Bei chronischem Antigenkontakt, der in Mäusen zum Beispiel durch Infektion mit bestimmten Stämmen des Lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV) untersucht werden kann, können die CD8 T-Zellen in den Zustand der „Exhaustion“, eine Art Erschöpfungszustand, geraten. Diese Zellen produzieren weniger IL-2, TNF- α und IFN- γ und haben eine reduzierte Zytotoxizität. Dieser Zustand scheint weniger durch die fortwährende Exposition von IL-7 und IL-15 begründet zu sein, als durch andauernde Antigenpräsenz. Die funktionalen Defekte gehen einher mit der Expression verschiedener inhibitorischer Rezeptoren wie PD-1 (*programmed death 1*), LAG-3 (*lymphocyte activation gene 3*) und CD244 {Zajac *et al.* 1998, Wherry 2011}.

Die Balance zwischen CD8 T-Effektor- und Gedächtniszellen wird durch verschiedene Paare von Transkriptionsfaktoren gesteuert (Abbildung 1.3).

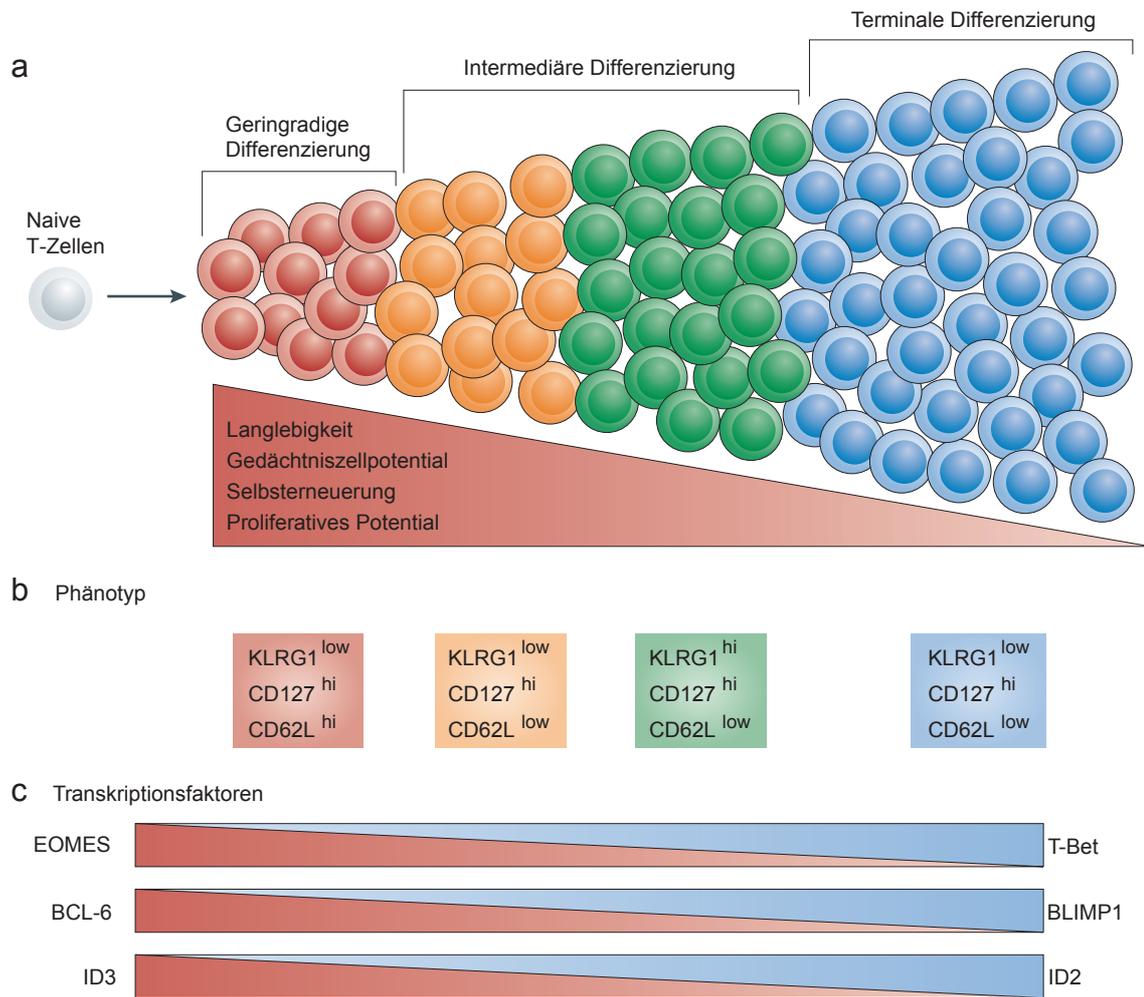


Abbildung 1.3 Die reziproke Aktivität von Transkriptionsfaktoren kontrolliert die CD8 T-Effektor- und Gedächtniszellendifferenzierung

(a) In diesem Modell differenzieren naive T-Zellen durch unterschiedliche Signale zu verschiedenen CD8 T-Effektor- und Gedächtnisstadien. An einer Seite des Kontinuums befinden sich Zellen mit größerem Gedächtnispotential, Langlebigkeit und proliferativen Potential, an der anderen Seite terminal differenzierte T-Effektorzellen. Zwischen diesen Extremen finden sich intermediäre Differenzierungsstadien. (b) Die Differenzierungsstadien sind durch die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle wie KLRG1, CD127 und CD62L charakterisiert. low = niedrige Expressionsstärke, hi (high) = hohe Expressionsstärke (c) Die transkriptionalen Programme, die die terminale Effektorzellendifferenzierung und das Gedächtniszellpotential steuern, basieren auf der konkurrierenden Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren. Wenn die Expression und/oder Aktivität von T-Bet, BLIMP1 und ID2 während einer Infektion ein gewisses Level übersteigt reifen die CD8 T-Zellen zu terminal differenzierten Effektorzellen. Diese Faktoren konkurrieren und interagieren mit einem entgegen gesetzten Satz von Transkriptionsfaktoren, nämlich EOMES, BCL-6 und ID3, die der terminalen Differenzierung entgegenwirken und den Erwerb von Gedächtniszelleigenschaften ermöglichen.

modifiziert nach {Kaech *et.al.* 2012}

Drei Paare von Transkriptionsfaktoren stehen dabei in besonderem Fokus: T-Bet (*T-Box transcription factor Tbx21*) und EOMES (Eomesodermin), BLIMP1 (*B lymphocyte*

activation protein 1) und BCL-6 (*B cell lymphoma 6*), ID2 (*Inhibitor of DNA binding 2*) und ID3 (*Inhibitor of DNA binding 3*) {Kaech *et al.* 2012}.

Die T-Box Transkriptionsfaktoren T-Bet und EOMES haben eine entscheidende Rolle für die CD8 T-Effektor- und Gedächtniszellentwicklung. T-Box Transkriptionsfaktoren zeichnen sich durch ihre homologe T-Box DNA-Bindedomäne aus. Durch partiell redundante Aktivität kooperieren T-Bet und EOMES in der frühen Phase der CD8 T-Zell-differenzierung zu zytotoxischen T-Lymphozyten in der Induktion von IFN- γ , Granzym B, Perforin und CXCR3. Die T-Bet-Expression wird abhängig von der TZR-Aktivierung induziert und durch IL-12 und den mTOR-Signaltransduktionsweg (*mammalian activator of rapamycin*) in CD8 T-Effektorzellen amplifiziert. EOMES wird später als T-Bet abhängig vom Transkriptionsfaktor RUNX3 exprimiert. IL-2 fördert die EOMES-Expression, während IL-12 und mTOR sie, abhängig vom Transkriptionsfaktor FOXO1, hemmen. In Gedächtniszellen kooperieren T-Bet und EOMES um die Gedächtnis-homöostase aufrecht zu erhalten. Hierzu induzieren sie die Expression der β -Untereinheit des IL-2 Rezeptors (CD122), die Signale durch IL-15 vermittelt und somit die homöostatische Proliferation der Gedächtniszellen ermöglicht. Maus CD8 T-Zellen ohne T-Bet können sich nicht zu KLRG1 hochpositiven terminalen Effektorzellen entwickeln, während EOMES-defiziente CD8 T-Zellen zwar effizient CD127 positive Gedächtnisvorläufer bilden, sich aber nicht zu zentralen Gedächtniszellen weiterentwickeln können. Obwohl die beiden Transkriptionsfaktoren kooperieren ist ihre Expression reziprok. T-Bet wird am stärksten in frühen Effektorzellen exprimiert. Im Laufe der Gedächtnis-formation wird die Expression schwächer. EOMES ist zwar bereits durch IL-2 in frühen CD8 T-Effektorzellen exprimiert, die Expression steigt im Laufe der Gedächtnisentwicklung jedoch immer weiter an. Das Gleichgewicht zwischen T-Bet und EOMES steuert so abhängig von Zytokinen und weiteren teilweise noch nicht abschließend verstandenen Faktoren die Differenzierung zu Effektor- und Gedächtniszellen {Intlekofer *et al.* 2005, Takemoto *et al.* 2006, Intlekofer *et al.* 2007, Joshi *et al.* 2007, Cruz-Guilloty *et al.* 2009, Pipkin *et al.* 2010, Rao *et al.* 2010, Joshi *et al.* 2011, Rao *et al.* 2012}.

Die antagonistischen Transkriptionsfaktoren BLIMP1 und BCL-6 sind genetische Schalter für die B- und T-Zelldifferenzierung. Die Expression des Repressors BLIMP1 wird in CD8 T-Zellen durch IL-2, IL-12 und IL-21 induziert. BLIMP1 fördert die Entwicklung KLRG1 hochpositiver zytotoxischer Effektorzellen und die Produktion von

Zytokinen wie IFN- γ und von Granzym B. Korrelierend zu diesem Befund wird BLIMP1 am stärksten in terminalen Effektorzellen exprimiert. Während der Gedächtnisformation schwächt sich die Expression immer weiter ab und ist am schwächsten in zentralen CD8 T-Gedächtniszellen. Analysen in Mäusen mit BLIMP1-defizienten CD8 T-Zellen bestätigen, dass BLIMP1 essentiell für die Funktion von Effektorzellen ist, sie zeigen, dass BLIMP1 die Differenzierung zu Gedächtniszellen unterdrückt. Im Rahmen von LCMV Infektionen entwickeln Tiere mit BLIMP1-defizienten CD8 T-Zellen größere Anteile von CD62L-CD127 doppelpositiven Gedächtniszellen und ihren Vorläufern. Trotzdem sind die Unterschiede zwischen den Wildtyp und BLIMP1-defizienten Zellen später nur noch marginal, wahrscheinlich da die BLIMP1-Expression im Verlauf der Gedächtnisformierung ohnehin schwächer wird. BCL-6 akkumuliert in den CD8 T-Zellen im Verlauf der Differenzierung zu CD8 T-Gedächtniszellen und ist dann für die Entstehung reifer zentraler, selbsterneuernder Gedächtniszellen unabdingbar. Die BCL-6-Expression wird vermutlich durch IL-10 und IL-21 STAT-3-abhängig erhalten und auch verstärkt. Neue Daten konnten auch eine direkte Proteininteraktion von T-Bet und BCL-6 in CD4 T-Zellen zeigen, die eine Repression der jeweiligen Zielgene des anderen Transkriptionsfaktors bewirken könnte. Diese Komplexbildung ist wahrscheinlich von der intrazellulären T-Bet- bzw. BLIMP1-Konzentration abhängig. Vermutlich können diese Faktoren nur unabhängig voneinander agieren wenn jeweils eine bestimmte Grenzkonzentration überwunden wird. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die Komplexität des Transkriptom, dass die Effektor- und Gedächtniszellformierung ermöglicht {Ichii *et al.* 2002, Ichii *et al.* 2004, Rutishauser *et al.* 2009, Crotty *et al.* 2010, Kalia *et al.* 2010, Pipkin *et al.* 2010, Cui *et al.* 2011, Oestreich *et al.* 2011, Oestreich *et al.* 2012}.

ID2 und ID3 wirken Großteils durch Inhibition der DNA-Bindungsaktivität von E-Protein Transkriptionsfaktoren, die eine kanonische Sequenz, die E-Box erkennen. Beide Transkriptionsfaktoren werden in CD8 T-Effektorzellen exprimiert, wobei ID2 für das Überleben der Zellen beim Übergang von naiven zu Effektorzellen verantwortlich zu sein scheint und die Entstehung terminaler Effektorzellen fördert. ID3 ermöglicht hingegen die Entstehung von Gedächtniszellen und führt bei Überexpression zum Überleben von CD8 T-Effektorzellen, die normalerweise in der Kontraktionsphase sterben. Die erhöhte ID3-Expression führt zusätzlich zum Erwerb eines

Gedächtnisphänotyps. BLIMP1 ist ein direkter Repressor der ID3-Expression, so ist die ID3-Expression am höchsten in Gedächtniszellen, während in terminalen KLRG1-positiven Effektorzellen die ID2-Expression vergleichsweise vorherrscht. ID2 induziert die Expression pro- und anti-apoptotischer Proteine, ID3 vermittelt hingegen die Expression von DNA- und Genom-stabilisierenden Proteinen. Das heißt, dass ID2 und ID3, trotz ihrer gemeinsamen Fähigkeit E-Proteine zu binden, die Differenzierung der CD8 T-Zellen in unterschiedlicher Weise beeinflussen {Cannarile *et al.* 2006, Ji *et al.* 2011, Yang *et al.* 2011}.

Der JAK-STAT-Signalweg (JAK, Januskinase; STAT, *Signal transducer and activator of transcription*) ist ein zentraler Signalweg, der in CD8 T-Zellen der Vermittlung von Zytokinsignalen dient. In Säugetieren sind sieben STAT-Transkriptionsfaktoren bekannt. Zytokinrezeptoren benutzen meist einen dominanten STAT-Signalweg, es können aber auch zusätzliche STATs aktiviert werden. Die STAT-Aktivität kann durch verschiedene Mechanismen, wie zum Beispiel die Expressionsstärke der Zytokinrezeptoren oder der STAT-Proteine selbst reguliert werden. Zusätzlich werden JAK-STAT Signalwege durch inhibierende SOCS-Proteine (*suppressor of cytokine signalling*) reguliert. STAT1 und STAT4 werden durch Typ I IFN in CD8 T-Effektorzellen aktiviert, wobei vermutlich die STAT1-dominierte Antwort mit der Zeit IL-12-vermittelt in eine STAT4 dominierte Antwort übergeht. STAT5A, STAT5B und die aus ihnen gebildeten Tetramere, die z.B. durch den IL-2R aktiviert werden, sind essentiell für die reguläre Genexpression und Funktion Virus-spezifischer CD8 T-Zellen während der LCMV-Infektion. STAT3-defiziente LCMV-spezifische CD8 T-Zellen können nicht zu selbsterneuernden Gedächtniszellen differenzieren, sondern behalten einen terminalen Effektorzelltyp. STAT3 ist nötig um die SOCS3-, BCL-6-, EOMES-, CD127- und CD62L-Expression aufrecht zu erhalten. Das niedrige SOCS3-Level führt auch zu einer Überempfindlichkeit gegen IL-12. Eine Studie mit humanen CD8 T-Gedächtniszellen aus Patienten mit Hyper-IgE-Syndrom, die eine dominant-negative STAT3-Form tragen, zeigt eine ähnliche Funktion von STAT3 für die Differenzierung von humanen CD8 T-Gedächtniszellen. Es ist jedoch noch nicht abschließend geklärt, ob auch für die STAT-Proteine, vergleichbar zu den zuvor besprochenen Transkriptionsfaktoren, entgegengesetzte Paare gebildet werden können {Leonard *et al.* 1998, Nguyen *et al.* 2002, Gil *et al.* 2006, Palmer *et al.* 2009, Cui *et al.* 2011, Siegel *et al.* 2011, Kaech *et al.* 2012, Lin *et al.* 2012}.

1.3 Der Transkriptionsfaktor IRF4

1.3.1 Die IRF-Familie und das Immunsystem

Bisher wurden neun Mitglieder der Interferon-regulierende-Faktoren (IRF)-Familie in Säugetieren identifiziert. Für die meisten dieser Transkriptionsfaktoren ist eine Wirkung im Rahmen von Immunantworten bekannt. Zunächst als transkriptionale Regulatoren für Typ-I-Interferone beschrieben, zeigte sich nach und nach, dass die IRF weit komplexere Aufgaben bei angeborenen und adaptiven Immunantworten übernehmen.

Die IRF haben eine gemeinsame N-terminale DNA-Bindungsdomäne von etwa 120 Aminosäuren. Sie formt ein Helix-Loop-Helix-Motiv das an ein *IFN-stimulated response element* (ISRE) der DNA bindet. Außer IRF1 und IRF2 tragen alle IRF eine C-terminale IRF-Assoziations-Domäne 1 (IAD1). Diese dient der Bildung von Homo- und Heterodimeren, entweder mit anderen IRF oder auch mit Mitgliedern anderer Transkriptionsfaktorfamilien. Die Dimerisierung ist ein wichtiges Element in der Steuerung der DNA-Bindung {Tamura *et al.* 2008, Xu *et al.* 2012}.

1.3.2 IRF4

IRF4 ist ein Transkriptionsfaktor der exklusiv in Immunzellen vorkommt. Die Expression kann in T-Zellen durch PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat)-Stimulation oder TZR-Quervernetzung induziert werden. IRF4 kann abhängig von seinen Bindungspartnern an der DNA entweder als Aktivator oder Repressor der Genexpression dienen. Die Differenzierung verschiedener Zellen des adaptiven Immunsystems, wie B-Zellen, verschiedener CD4 T-Helferzellpopulationen und CD8 T-Zellen, ist IRF4-abhängig. Weiterhin beeinflusst IRF4 auch die Reifung von Zellen des angeborenen Immunsystems, zum Beispiel von dendritischen Zellen, und die Ausbildung von Effektormechanismen in diesen Zellen {Matsuyama *et al.* 1995, Xu *et al.* 2012}.

Bei B-Zellen ist der Transkriptionsfaktor mitverantwortlich für den Klassenwechsel und die Differenzierung zu Plasmazellen. IRF4 ist auch direkt an der Antikörpersekretion beteiligt. In B-Zellen unterdrückt IRF4 die BCL-6-Expression, die für die Keimzentrumsreaktion essentiell ist, und fördert die zur Plasmazelldifferenzierung nötige BLIMP1-Expression. Das Transkriptionsfaktorenpaar BCL-6-BLIMP1 zeigt hier

eine ähnliche Funktion wie die für CD8 T-Effektor- und Gedächtniszellen beschriebene {Mittrücker *et al.* 1997, Klein *et al.* 2006, Sciammas *et al.* 2006, Klein *et al.* 2008}.

Die Differenzierung von CD4 T-Zellen zu verschiedenen T-Helferzellpopulationen wird ebenfalls durch IRF4 beeinflusst. Unter Einfluss von IL-4 steigt die Expression des Transkriptionsfaktors GATA-3, der für die Differenzierung von CD4 T-Zellen zu Helferzellen des Typs Th2 entscheidend ist. Th2-Zellen sind für die Immunantwort gegen Parasiten, aber auch für die Entstehung von Allergien entscheidend. In IRF4-defizienten CD4 T-Zellen wird das GATA-3-Level nicht hochreguliert. Die Entstehung von Th2-Zellen ist in IRF4-defizienten Mäusen inhibiert {Lohoff *et al.* 2002, Murphy *et al.* 2008}.

Eine weitere Gruppe der durch IRF4 beeinflussten T-Helferzellen sind die Th17-Zellen. Th17-Zellen zeichnen sich durch die Produktion der Zytokine IL-17A, IL-17F und IL-22 aus und spielen eine Rolle in der Immunantwort gegen extrazelluläre Pathogene. Sie sind aber auch an der Entstehung verschiedener Autoimmunerkrankungen beteiligt. IRF4 ist essentiell für die Differenzierung von Th17-Zellen, als Folge zeigen IRF4-defiziente Mäuse einen milden Verlauf in von Th17-Zellen abhängigen Autoimmunmodellen {Brüstle *et al.* 2007, Huber *et al.* 2008, Murphy *et al.* 2008, Biswas *et al.* 2010, Hemdan *et al.* 2010, Lech *et al.* 2011, Mudter *et al.* 2011, Huber *et al.* 2013}.

Das Zytokin IL-9 ist wichtig für die Funktion von Mastzellen und die dieses Zytokin produzierenden Th9-Zellen sind für eine Vielzahl der Asthma-Symptome verantwortlich. IRF4-defiziente Mäuse können keine Th9-Zellen bilden und entwickeln keine schweren Symptome in Asthmodellen {Soroosh *et al.* 2009, Staudt *et al.* 2010}.

Eine besondere Subpopulation der CD4 T-Zellen sind die regulatorischen T-Zellen (Treg). Diese Zellen unterdrücken überschießende Immunantworten und verhindern die Entstehung von Autoimmunität. Der Schlüsseltranskriptionsfaktor der Treg-Zellen ist Foxp3 (Forkhead-Box-Protein 3). Die Foxp3-Expression scheint in IRF4-defizienten Treg-Zellen fehlreguliert zu sein. Weiterhin kann aus Treg-Nukleärlysaten IRF4 mit Foxp3 kopräzipitiert werden, ein Hinweis dafür, dass die beiden Transkriptionsfaktoren direkt interagieren. IRF4-defiziente Treg-Zellen können kein BLIMP1 exprimieren und somit nicht zu Effektor-Tregs differenzieren. Die Transkription weiterer Effektormoleküle, wie zum Beispiel IL-10 und Granzym B, ist in IRF4-defizienten Tregs reduziert

{Brüstle *et al.* 2007, Zheng *et al.* 2007, Huber *et al.* 2008, Murphy *et al.* 2008, Zheng *et al.* 2009, Cretney *et al.* 2011}.

Für CD8 T-Zellen sind bislang nur wenige Ergebnisse zu IRF4 publiziert. Bekannt ist, dass IRF4-defiziente CD8 T-Zellen aus LCMV-infizierten Mäusen keine zytolytische Aktivität gegenüber Zielzellen zeigen. Es kann daher auch für diese Lymphozyten eine entscheidende Rolle von IRF4 für die Differenzierung angenommen werden {Mittrücker *et al.* 1997}.

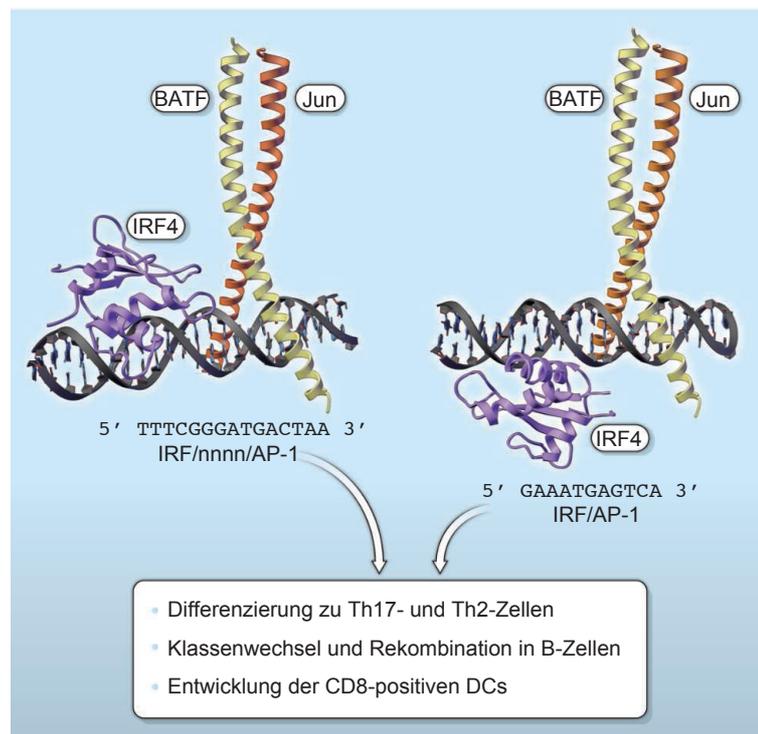


Abbildung 1.4 Die Kooperation von IRF4 und AP-1-Transkriptionsfaktoren

In diesem Modell ist der Komplex aus BATF, Jun und IRF4 gezeigt. Das Modell wurde mit Hilfe der AICE-Motive des Ctl4- (4 Basenpaare Abstand, links) und des Bcl11b-Gens (0 Basenpaare Abstand, rechts) erstellt. Die Resultate der Kooperation sind unten aufgeführt. DC = dendritische Zelle

modifiziert nach {Martinez *et.al.* 2012}

In B-Zellen und dendritischen Zellen kooperiert IRF4 mit Transkriptionsfaktoren der Ets-Familie (*E-twenty six*) im Rahmen der Bindung an EICE-Motive (*Ets-IRF composite elements*) der DNA. Die Bildung dieser Komplexe ist in T-Zellen unwahrscheinlich, da nur sehr geringe Level von Ets-Proteinen vorhanden sind. Da IRF4 alleine nur mit relativ geringer Affinität an die DNA bindet wurde nach Bindungspartnern in T-Zellen geforscht. Präzipitationsanalysen (ChiP-Seq) ergaben als Bindungspartner Mitglieder der AP-1-Familie. Die durch diese Komplexe gebundenen DNA-Motive werden als AICE (*AP-1-IRF composite elements*) bezeichnet. Die Mitglieder der AP-1-Familie bilden BATF

(*B cell activating transcription factor*)-Jun-Heterodimere, die dann wiederum mit IRF4 kooperieren. In diesem Komplex ist die Bindung von IRF4 an die DNA deutlich stärker (Abbildung 1.4). Im Fall von Th17-Zellen bindet dieser Komplex schon nach TZR-Stimulation an AICE-Motive. Hierin unterscheidet sich die Bindung von anderen Th17-typischen Transkriptionsfaktoren, die in ihrer Wirkung auf Th17-polarisierende Zytokine angewiesen sind. Aufgrund dieser Eigenschaft wurde für den Komplex aus IRF4 und BATF eine Pionierfunktion postuliert, d.h. die Bindung des Komplexes ermöglicht erst die nachfolgende Anlagerung von linienspezifischen Transkriptionsfaktoren {Ciofani *et al.* 2012, Glasmacher *et al.* 2012, Li *et al.* 2012, Martinez *et al.* 2012}.

Zusammengenommen deuten diese Studien auf eine Funktion von IRF4 als eine Art Schlüsselregulator für Zellen des adaptiven Immunsystems hin. Dabei wird seine Bindung an die DNA nicht nur durch die exklusive Induktion in Immunzellen, sondern auch durch die Kooperation mit anderen Transkriptionsfaktoren reguliert.

1.4 Fragestellung

Der Transkriptionsfaktor IRF4 ist ein Schlüsselregulator für die Differenzierung von B-Zellen und verschiedenen CD4 T-Helferzellpopulationen. Analysen in IRF4-defizienten Mäusen ergaben erste Hinweise auf eine Funktion von IRF4 für CD8 T-Zellen. Nach einer Infektion mit LCMV zeigten IRF4-defiziente Mäuse keine funktionale CD8 T-Zellantwort gegen Virus-infizierte Zellen. Die zugrundeliegenden Mechanismen dieser eingeschränkten CD8 T-Zellantwort waren zu Beginn der Arbeit aber unklar.

Aus diesen Hinweisen ergab sich die Hypothese, dass IRF4 auch ein Regulator der Differenzierung von CD8 T-Zellen ist. Daraus würde folgen, dass IRF4 eine Schlüssel-funktion für alle Typen von adaptiven Immunzellen hat.

Zur Analyse dieser Hypothese sollten in dieser Arbeit verschiedene experimentelle Ansätze verfolgt werden. Listerieninfektionen werden durch CD8 T-Zellen geklärt, deshalb sollte die CD8 T-Zellantwort in einem Mausmodell der Listerieninfektion untersucht werden. Mit Hilfe dieses Modells sollte die CD8 T-Zellantwort in Wildtyp und IRF4-defizienten Mäusen verglichen werden. Weiterhin sollte ein T-Zelltransfermodell mit der Listerieninfektion kombiniert werden. Diese Strategie sollte die ausschließliche Analyse der intrinsischen Bedeutung von IRF4 für die CD8 T-Zelldifferenzierung und -funktion ermöglichen. In diesen Experimenten sollte eine phänotypische und funktionale Charakterisierung der IRF4-defizienten CD8 T-Zellen im Vergleich zu Wildtypkontrollzellen durchgeführt werden. Eine *in vitro*-Stimulation von CD8 T-Zellen sollte zur Aufklärung der durch IRF4 ausgelösten Mechanismen beitragen. Von der Analyse des Transkriptoms von Wildtyp und IRF4-defizienten CD8 T-Zellen wurden weitere Hinweise erwartet.

Das zentrale Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung der Funktion von IRF4 in CD8 T-Zellen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Feinchemikalien und sonstige Reagenzien

Annexin V – Alexa Fluor 647	BioLegend (San Diego)
AlexaFluor-750 Succinimidyl Ester	invitrogen (Karlsruhe)
Anti-FITC Microbeads	Miltenyi (Bergisch-Gladbach)
Ampicillin	Roche (Grenzach-Whylen)
APC BrdU Flow Kit	BD Bioscience (Heidelberg)
APC SIINFEKL-MHC I Dextramer	Immudex (Kopenhagen)
β -2-Mercaptoethanol (1000x für Zellkultur)	GIBCO invitrogen (Karlsruhe)
Bacto Agar	BD Bioscience (Heidelberg)
BD Facs Lysing Solution	BD Bioscience (Heidelberg)
Brefeldin A (BFA)	Sigma (Steinheim)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Serva (Heidelberg)
Carbenicillin	Roche (Grenzach-Whylen)
Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester (CFDA-SE)	Invitrogen (Karlsruhe)
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Merck (Darmstadt)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma (Steinheim)
EasySep™ Mouse CD8 ⁺ T Cell Isolation Kit	Stemcell Technologies (Grenoble)
FAM-FLICA™ Poly Caspase Assay Kit	ImmunoChemistry Technologies (Bloomington)
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA (Paschingen)
Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set	eBioscience (San Diego)

Gentamycin (1000x für Zellkultur)	GIBCO invitrogen (Karlsruhe)
Glutamin (100x für Zellkultur)	GIBCO invitrogen (Karlsruhe)
Ionomycin	GIBCO invitrogen (Karlsruhe)
LD-Säulen	Miltenyi (Bergisch-Gladbach)
Normales Rattenserum (NRS)	Jackson Immuno Research (Baltimore)
Pacific Orange Succinimidyl Ester	Invitrogen (Karlsruhe)
Percoll Separating Solution	Biochrom AG (Berlin)
Phorbol-Myristat-Acetat (PMA)	Sigma (Steinheim)
RNeasy MinElute Kit	Quiagen (Hilden)
RPMI (Roswell Park Memorial Institut) 1640	GIBCO invitrogen (Karlsruhe)
Saponin	Sigma (Steinheim)
Streptomycin	Sigma (Steinheim)
TRIzol® Reagent	Invitrogen (Karlsruhe)
Trypan blau	Biochrom AG (Berlin)
Tryptic Soy Broth (TSB)	BD (Heidelberg)

Alle Standardchemikalien stammen von Serva (Heidelberg), Sigma (Steinheim), Merck (Darmstadt) oder Carl Roth (Karlsruhe).

2.1.2 Puffer und Medien

Annexin-Färbepuffer in Aqua destillata (1,4 M NaCl, 25mM CaCl₂, 1% NaN₃, 0,1 M HEPES, pH 7,4)

Erythrozytenlysepuffer (8,25 g NH₄Cl, 1,0 g KHCO₃, 0,037 g EDTA auf 1000 ml Aqua destillata)

PBS (phosphate buffered saline), Sigma (Steinheim)

RPMI komplett (RPMI 1640, 5% FCS, 2 mM Glutamin, 50 µg/ml Gentamycin, 50 µM β2-Mercaptoethanol)

Saponinpuffer in PBS (0,1% BSA, 0,3% Saponin)

TSB-Medium (30 g TSB, auf 1000 ml Aqua destillata, für Agar-Platten wird 2% Bacto Agar hinzugefügt)

2.1.3 Antikörper

Spezifität	Klon	Fluorochrom	Firma
CD3ε	145-2C11	APC-Cy7	BioLegend (San Diego)
CD3ε	eBio500A2	eFlour450	eBioscience (San Diego)
CD3ε	145-2C11	APC	BioLegend (San Diego)
CD3ε	145-2C11	ohne	BioLegend (San Diego)
CD8α	53-6.7	PE-Cy7	BioLegend (San Diego)
CD8α	53-6.7	PE	BioLegend (San Diego)
CD8α	53-6.7	APC	BioLegend (San Diego)
CD8α	53-6.7	V450	BD (Heidelberg)
CD8α	53-6.7	FITC	BD (Heidelberg)
CD90.1	HIS51	eFluor450	eBioscience (San Diego)
CD90.1	HIS51	FITC	eBioscience (San Diego)
CD90.1	HIS51	PE	eBioscience (San Diego)
CD90.2	53-2.1	PerCP	Serotec (Boston)
Vα2-TZR	B20.1	PE	eBioscience (San Diego)
CD44	IM7	PE	BD (Heidelberg)
CD62L	MEL-14	APC	eBioscience (San Diego)
CD62L	MEL-14	APC-Cy7	BioLegend (San Diego)
CD69	H1-2F3	FITC	BD (Heidelberg)
CD127	A7R34	PE	BioLegend (San Diego)
KLRG1	2F1	FITC	BioLegend (San Diego)
CD25	PC61.5	APC	eBioscience (San Diego)
CTLA4	UC10-4F10-11	PE	BD (Heidelberg)
LAG-3	C9B7W	APC	BioLegend (San Diego)
PD-1	J43	PE	eBioscience (San Diego)
Ly6C	AL-21	FITC	BD (Heidelberg)
CXCR3	CXCR3-173	APC	eBioscience (San Diego)
CD244	2B4	RPE	BD (Heidelberg)
NKG2D	CX5	APC	eBioscience (San Diego)
CD27	LG.3A10	APC	BioLegend (San Diego)
Granzym B	GB12	PE	Molecular Probes (Carlsbad)
TNF-α	MP6-XT22	PE	BD (Heidelberg)

Spezifität	Klon	Fluorochrom	Firma
TNF- α	MP6-XT22	PE-Cy7	BD (Heidelberg)
IFN- γ	XMG1.2	Alexa Fluor 647	eBioscience (San Diego)
IL-2	JES6-5H4	FITC	eBioscience (San Diego)
Bcl-2	10C4	FITC	eBioscience (San Diego)
IRF4	3E4	PE	eBioscience (San Diego)
T-Bet	eBio4B10	eFluor660	eBioscience (San Diego)
EOMES	Dan11mag	Alexa Fluor 647	eBioscience (San Diego)
CD11b	M1/70	FITC	BD (Heidelberg)
CD19	1D3	FITC	eBioscience (San Diego)
F4/80	BM8	FITC	BioLegend (San Diego)
MHC II	OX-6	FITC	Serotec (Boston)
CD4	RM4-5	FITC	BioLegend (San Diego)
CD28	37.51	ohne	BioLegend (San Diego)
CD16/CD23	2.4G2	ohne	Intitut für Immunologie (UKE, Hamburg)

2.1.4 Bakterienstämme

<i>Listeria monocytogenes</i>	bereitgestellt durch Dr. Shen (Philadelphia)
Stamm OVA (<i>LmOVA</i>)	{Foulds <i>et al.</i> 2002}

2.1.5 Mausstämme

C57Bl/6LJ	Jackson, Bar Harbour
B6.Pl-Thy1a/CyJ	Jackson, Bar Harbour
RAG1ko	Jackson, Bar Harbour
OT-I	{Hogquist <i>et al.</i> 1994} rückgekreuzt auf C57BL/6, bereitgestellt durch das MPI Infektionsbiologie (Berlin)
OT-I \times B6.PL-Thy1a/CyJ	Institut für Immunologie (UKE, Hamburg)

IRF4ko	{Mittrücker <i>et al.</i> 1997} rückgekreuzt auf C57BL/6, bereitgestellt durch Dr. Magdalena Huber (Marburg)
IRF4ko × OT-I	Institut für Immunologie (UKE, Hamburg)
OT-II	{Barnden <i>et al.</i> 1998} bereitgestellt durch Dr. Magdalena Huber (Marburg)

Der IRF4-defiziente Genotyp wurde mittels PCR (Polymerase-Kettenreaktion) kontrolliert, die TZR-transgen-Kontrolle der OT-I-Mäuse erfolgte mittels durchflusszytometrischer Analyse mit einem Antikörper gegen den V α 2-TZR. Die Mäuse wurden in der zentralen Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gezüchtet. Alle Tierversuche wurden nach den Vorgaben des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

2.1.6 Geräte und Materialien

BD FACS Canto II	BD (Heidelberg)
BD FACS Aria	BD (Heidelberg)

Bei den Geräten für Bakterienkultur und Lymphozytenaufreinigung handelt es sich um Standardlaborausrüstung. Die Standardlabormaterialien (z.B. Plastikpipetten, Reaktionsröhrchen und Petrischalen) stammen von den Firmen Sarstedt (Nümbrecht), Greiner (Frickhausen), Nunc (Langenselbold), BD (Heidelberg) und Eppendorf (Hamburg).

2.1.7 Software

FACS Diva Software	BD (Heidelberg)
FlowJo Software	Tree Star (Ashland)
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc. (La Jolla)
Adobe Illustrator	Adobe (San José)

2.2 Methoden

2.2.1 Listerieninfektion

Es lagen *LmOVA*-Aliquots von bekannter Konzentration bei -80°C vor. Diese Aliquots wurden auf die gewünschte Konzentration verdünnt und in einem Volumen von $200\ \mu\text{L}$ PBS intraperitoneal in die Mäuse injiziert. Im Regelfall erhielten die Mäuse 1×10^5 Listerien.

2.2.2 Organentnahme

Für die Gewinnung von Zellen wurden die Mäuse mit 80% CO_2 und 20% O_2 narkotisiert und anschließend mit 100% CO_2 getötet. Zur Sicherheit wurde ein Genickbruch an den Mäusen durchgeführt. Das Fell und die Haut wurden mit 70% Ethanol desinfiziert und ein Hautschnitt durchgeführt. Das Peritoneum wurde eröffnet und im Fall einer Blutentnahme, das Blut mit einer heparinisierten Nadel direkt aus dem Herzen entnommen. (In einigen Experimenten wurde das Blut auch der lebenden Maus direkt aus der Schwanzvene entnommen.) Dann wurden Milz und Leber entnommen, wobei die Leber vor Entnahme durch die Pfortader mit PBS perfundiert wurde. Nach Entnahme des inguinalen Lymphknotens wurde ein Oberschenkelknochen präpariert. Die Organe wurden nach der Entnahme bis zur weiteren Aufreinigung in PBS auf Eis aufbewahrt.

Sollten die Zellen in eine andere Maus transferiert werden oder die Bakterienlast bestimmt werden, erfolgte die Entnahme steril. Wenn die Organe durchflusszytometrisch untersucht werden sollten, konnte die Organentnahme unsteril erfolgen {Kursar *et al.* 2002, Minges Wols *et al.* 2008}.

2.2.3 Isolierung von Milzzellen

Die mechanische Zerkleinerung der Milz erfolgte, indem die Milz mit Hilfe des Stempels einer Spritze durch ein Metallsieb gedrückt wurde. Das Sieb wurde mit $10\ \text{mL}$ PBS gespült und die Zellsuspension bei $250 \times g$ für $5\ \text{min}$ zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde das Zellpellet in $3\ \text{mL}$ Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und bei Raumtemperatur für $3\ \text{min}$ inkubiert. Im Gegensatz zu den Erythrozyten bleiben die übrigen Zellen unbeschädigt. Die Lyse wurde durch starke Verdünnung mit PBS gestoppt und die Zellsuspension über ein $70\ \mu\text{m}$ Zellsieb gegeben,

um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Es erfolgte, nach Bestimmung der Zellzahl, erneut eine Zentrifugation bei $250 \times g$ für 5 min. Der Überstand wurde verworfen {Kursar *et al.* 2002}.

2.2.4 Isolierung von Leberleukozyten

Die mechanische Zerkleinerung der Leber erfolgte, indem die Milz mit Hilfe des Stempels einer Spritze durch ein Metallsieb gedrückt wurde. Das Sieb wurde mit 25 mL PBS gespült und die Zellsuspension, nachdem sie über ein $70 \mu\text{M}$ Zellsieb gegeben wurde, bei $250 \times g$ für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und es erfolgte eine Dichtegradientenzentrifugation mit Percoll. Das Zellpellet wurde in 5 mL 40% Percolllösung aufgenommen und die Zellsuspension auf 3 mL 70% Percolllösung geschichtet. Der erhaltene Gradient wurde bei $560 \times g$ für 15 min ohne Bremse zentrifugiert. Die obere Phase mit Hepatozyten wurde verworfen und die Interphase des Gradienten mit den Leberleukozyten in einen Überschuss von PBS überführt und bei $250 \times g$ für 5 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes erfolgte die Erythrozytenlyse und die Bestimmung der Zellzahl analog der Milzaufreinigung {Kursar *et al.* 2002, Luttmann *et al.* 2009}.

2.2.5 Isolierung von Zellen aus den Lymphknoten

Die mechanische Zerkleinerung der Lymphknoten erfolgte, indem die Lymphknoten mit Hilfe des Stempels einer Spritze durch ein Metallsieb gedrückt wurde. Das Sieb wurde mit 10 mL PBS gespült, die Zellsuspension über ein $70 \mu\text{M}$ Zellsieb gegeben und bei $250 \times g$ für 5 min zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde und das Zellpellet in 5 mL PBS aufgenommen wurde, erfolgte, nach Bestimmung der Zellzahl, erneut eine Zentrifugation bei $250 \times g$ für 5 min. Der Überstand wurde verworfen {Kursar *et al.* 2002}.

2.2.6 Isolierung von Zellen aus dem Knochenmark

Von den Oberschenkelknochen wurden die Gelenke entfernt. Anschließend wurde das Knochenmark mit Hilfe einer Kanüle mit PBS aus dem Knochen gespült. Nach gründlicher Durchmischung wurde die Suspension über ein $70 \mu\text{M}$ Zellsieb gegeben und bei $250 \times g$ für 5 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überschusses erfolgten die Erythrozytenlyse und die Bestimmung der Zellzahl analog der Milzaufreinigung {Minges Wols *et al.* 2008}.

2.2.7 Bestimmung der Zellzahl

Die Konzentration der Zellen einer Zellsuspension kann mit Hilfe einer Neubauerzählkammer bestimmt werden. 10 μL der Zellsuspension wurden in 90 μL Trypanblau verdünnt und in die Zählkammer pipettiert. In mindestens zwei der vier großen Quadrate wurden die Lymphozyten gezählt und anschließend der Mittelwert (MW) berechnet. Die Bestimmung der Zellzahl X pro mL erfolgte nach folgender Formel: $X = \text{MW} \times 10^4 \times \text{Verdünnung}$ {Luttmann *et al.* 2009}.

2.2.8 Isolierung von OT-I/OT-II T-Zellen aus der Milz

Entweder wurden die Milzzellen wie zuvor beschrieben gereinigt und die OT-I T-Zellen mit Hilfe von Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern über eine Säule negativ selektiert, oder die OT-I T-Zellen bzw. CD8 T-Zellen wurden direkt nach Herstellung einer Zellsuspension mit dem kommerziell erhältlichen EasySep™ Mouse CD8⁺ T Cell Isolation Kit isoliert. OT-II T-Zellen wurden wie OT-I T-Zellen negativ über eine Säule selektiert.

Der zugrundeliegende Mechanismus der negativen Selektion über eine Säule ist die Entfernung unberührter erwünschter Zellen. Zu diesem Zweck werden die unerwünschten Zellen mit FITC-gekoppelten Antikörpern markiert und anschließend an mit Antikörpern gegen FITC beschichteten Microbeads gebunden. Die Zellen können dann über die magnetischen Partikel mit einem Magneten aus der Zellsuspension entfernt werden. Die nach dem Standardprotokoll steril gereinigten Milzzellen wurden in 500 μL PBS für 20 min mit FITC-gekoppelten Antikörpern bei 4°C inkubiert. Für die OT-I T-Zellaufreinigung wurden FITC-gekoppelte Antikörper gegen CD11b, CD19, F4/80, MHC II und CD4 verwendet. Im Fall der Aufreinigung von OT-II T-Zellen wurde der Antikörper gegen CD4 gegen einen FITC-gekoppelten Antikörper gegen CD8 ersetzt. Sollten OT-I T-Zellen reisoliert werden wurde ein FITC-gekoppelter Antikörper gegen CD90.1 hinzugefügt. Nach der Antikörperfärbung wurde PBS im Überschuss hinzugefügt und die Zellsuspension bei 250 \times g für 5 min zentrifugiert, der Überschuss wurde verworfen und die Zellen wurden in 80 μL PBS mit 0,2% BSA pro 10⁷ Zellen resuspendiert. Daraufhin wurden 20 μL gegen FITC gerichtete Microbeads pro 10⁷ Zellen hinzugefügt und die Zellsuspension wurde 15 min inkubiert. Anschließend wurde PBS mit 0,2% BSA im Überschuss hinzugefügt und die Suspension bei 250 \times g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500 μL PBS mit 0,2% BSA resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf eine äquilibrierte

Depletionssäule, in einem Magneten befindliche Säule, gegeben und zweimal mit 1 mL PBS mit 0,2% BSA nachgespült. Im Durchfluss befanden sich die gewünschten Zellen, während die unerwünschten Zellen auf der magnetischen Säule verblieben. Die Effizienz der Aufreinigung und die Zellzahl wurden bestimmt und die gewünschte Zellkonzentration wurde eingestellt (modifiziert nach dem Protokoll der Firma Miltenyi) {Horgan *et al.* 2009}

Das zweite verwendete System, das EasySep™ Mouse CD8⁺ T Cell Isolation Kit, bedient sich ebenfalls magnetischen Partikeln. In diesem Fall binden Biotin-gekoppelte Antikörper die unerwünschten Zellen. Dann binden Streptavidin-gekoppelte magnetische Partikel an das Biotin. Die unerwünschten Zellen werden mit Hilfe eines Magneten aus der Zellsuspension entfernt. Die Milzzellen wurden wie zuvor beschrieben aufgereinigt, wobei auf die Erythrozytenlyse verzichtet wurde. Die Zellen einer Milz wurden in 500 µL PBS mit 2% FCS aufgenommen und 25 µL normales Rattenserum (NRS) hinzugefügt. Dann wurden 25 µL *T-cell enrichment cocktail* hinzugegeben und die Suspension 15 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde 50 µL *Biotin selection cocktail* hinzugegeben und erneut 15 min bei 4°C inkubiert. Im letzten Schritt wurden 50 µL *D2 magnetic particles* hinzugefügt und 5 min bei 4°C inkubiert. Die Zellsuspension wurde mit PBS mit 2% FCS auf 2,5 mL aufgefüllt und vorsichtig durchmischt. Dann wurde das Reaktionsgefäß in einen Magneten überführt und verblieb dort 5 min. Das Reaktionsgefäß wurde mit einer Bewegung in ein neues Gefäß ausgegossen, wobei es im Magneten blieb. Nach 2-3 sec Verweilen über dem neuen Gefäß waren die unerwünschten Zellen im alten Reaktionsgefäß verblieben, während sich die gewünschten OT-I T-Zellen im neuen Reaktionsgefäß befanden. Die Effizienz der Aufreinigung und die Zellzahl wurden bestimmt und die gewünschte Konzentration eingestellt (modifiziert nach dem Protokoll der Firma Stemcell technologies).

2.2.9 Transfer von OT-I bzw. OT-II T-Zellen

In einem Teil der Experimente wurden Transfermodelle eingesetzt. Hierfür wurden verschiedene Mauslinien mit transgenem T-Zellrezeptor eingesetzt. Die OT-I T-Zellen sind CD8 T-Zellen, die das OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid erkennen und somit Teile des Ovalbumins, welches der *LmOVA*-Stamm als Surrogatantigen trägt. Die OT-II T-Zellen sind CD4 T-Zellen und erkennen wie OT-I T-Zellen ein spezifisches Ovalbuminpeptid des *LmOVA*-Stamms. Die Zellen wurden nach der Aufreinigung in PBS aufgenommen, auf die

gewünschte Konzentration eingestellt und in 200 μ L intravenös in Empfängermäuse injiziert {Hogquist *et al.* 1994, Barnden *et al.* 1998}.

Die Unterscheidung der Wildtyp und IRF4-defizienten OT-I T-Zellen im Transfermodell und auch die Unterscheidung von Zellen der Empfängermäuse, sowie von OT-II T-Zellen erfolgte mit Hilfe des CD90-Antigens. Folgend wird die Unterscheidung beispielhaft für das kompetitive Transfermodell in Wildtypmäuse beschrieben: Wildtyp und IRF4-defiziente OT-I CD8 T-Zellen wurden zu gleichen Anteilen gemischt (je 20.000) und in *LmOVA*-infizierte Wildtypempfängermäuse injiziert. Die Wildtypspendertiere waren CD90.1⁺CD90.2⁺, die IRF4-defizienten Spendertiere CD90.1⁻CD90.2⁺ und die Empfängertiere waren CD90.1⁺CD90.2⁻. Die Zellen wurden mit Hilfe des Durchflusszytometers unterschieden und das Mischverhältnis vor dem Transfer überprüft.

2.2.10 Bestimmung der Bakterienlast

Zur Bestimmung der Bakterienlast wurden die Organe nach der Entnahme in sterile Plastikbeutel mit 1 mL PBS mit 0,05% Triton-X100 überführt und zerquetscht bis eine möglichst homogene Suspension entstand. Das Detergenz Triton-X100 führte zur Zerstörung der Zellmembranen, so dass alle Listerien erfasst werden konnten, auch wenn sich mehrere Bakterien in einer Zelle befanden. Anschließend wurde die Suspension in 10-fach Schritten in PBS bis 1:1000 verdünnt und die Verdünnungen auf TSB-Agarplatten steril ausplattiert. Nach 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank wurden die Kolonien gezählt und die Gesamtzahl der Listerien pro Organ (CFU = *colony forming units*) berechnet {Kursar *et al.* 2002}.

2.2.11 *in vitro*-Restimulation von OT-I T-Zellen bzw. CD8 T-Zellen

In dieser Arbeit wurden OT-I T-Zellen bzw. CD8 T-Zellen nach Entnahme aus infizierten Mäusen zur Analyse der Zytokinproduktion restimuliert. Die Inkubation mit dem OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid ermöglichte die spezifische Stimulation antigenspezifischer CD8 T-Zellen über den TZR. Maximal 2×10^6 Lymphozyten aus der Milz, beziehungsweise möglichst viele Lymphozyten aus der Leber wurden in 1 mL RPMI komplett mit 10^{-6} M OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid oder ohne Peptid inkubiert. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurde pro Ansatz 10 μ g Brefeldin A zugegeben. Brefeldin A zerstört den Golgi-Apparat, wodurch neu synthetisierte Proteine wie Zytokine nicht mehr

sekretiert werden und sich anreichern. Nach Entnahme aus der Kultur erfolgte die durchflusszytometrische Analyse {Kursar *et al.* 2002, Heiss *et al.* 2008}.

2.2.12 *in vitro*-Stimulation von OT-I T-Zellen bzw. CD8 T-Zellen

Naive OT-I T-Zellen wurden direkt in der Milzzellsuspension oder naive CD8 T-Zellen nach CD8 T-Zell-spezifischer Aufreinigung zur Analyse der Expression von Transkriptionsfaktoren stimuliert.

In einem Experiment wurden OT-I T-Zellen analog zur Restimulation für verschiedene Zeitspannen mit OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid stimuliert. Allerdings erfolgte keine Hinzugabe von Brefeldin A. Nach Entnahme aus der Kultur erfolgte die durchflusszytometrische Analyse.

In einem Experiment wurden 200.000 Wildtyp CD8 T-Zellen und 200.000 IRF4-defiziente CD8 T-Zellen in 1 mL RPMI komplett in zuvor mit 2 µg/mL Antikörper gegen CD3ε beschichtete Kulturschalen gegeben. Außerdem wurde 1 µg/mL Antikörper gegen CD28 und 50 U/mL IL-2 hinzugegeben. Im Gegensatz zur Stimulation mit OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid erfolgte eine TZR-Stimulation durch den Antikörper gegen CD3ε und durch Korezeptor-Stimulation durch den Antikörper gegen CD28. Das mitogene IL-2 fördert die Proliferation der T-Zellen noch weiter. In diesem Versuch wurden in einem Teil der Ansätze 10 ng/mL IL-12 hinzugegeben um dessen Einfluss auf die Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren zu untersuchen. Nach zweitägiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert {Joshi *et al.* 2007, Huber *et al.* 2013}.

2.2.13 Extrazelluläre Antikörperfärbung

Bevor die spezifische Antikörperfärbung erfolgen kann erfolgt ein Block gegen unspezifische Antikörperbindungen durch die Fc-Rezeptoren oder die Zelloberfläche allgemein. Zu maximal 2×10^6 Lymphozyten in 100 µL PBS wurden 1 µL normales Rattenserum (NRS) und 1,8 µg Fc-Block in 50 µL PBS gegeben. NRS enthält pro mL etwa 10 mg Antikörper und sättigt dadurch unspezifische Antikörperbindungsstellen ab. Der Fc-Block (Antikörper gegen CD16 und CD32) bindet spezifisch an die Fc-Rezeptoren CD16 und CD32 und verhindert, dass diese den Fc-Teil der Fluorochrom-gekoppelten Antikörper binden und in der Folge falsch positive Signale entstehen. Dieser Ansatz wird 5 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die für jede Analyse passend gewählten

Fluorochrom-gekoppelten Antikörper in 50 μL PBS hinzugegeben und die Suspension 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die zu verwendende Konzentration der Antikörper wurde zuvor austitriert. Dann wurde PBS im Überschuss hinzugegeben, bei 250 \times g für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Bei der Analyse von Blut wurde abweichend 500 μL eines kommerziellen Erythrozytenlysepuffers (BD FACS Lysing Solution) hinzugefügt, 3 min inkubiert und erst dann PBS hinzugegeben und zentrifugiert. Die Zellen konnten nun durchflusszytometrisch analysiert werden. In einem Teil der Experimente wurde direkt vor der Messung der in die DNA interkalierende Farbstoff DAPI zur Markierung toter Zellen hinzugegeben. In Ansätzen, die nach der extrazellulären Färbung fixiert werden sollten, wurden die fixierbaren Farbstoffe Pacific Orange oder AlexaFluor-750 Succinimidyl Ester hinzugefügt. Auf Grund der erhöhten Permeabilität der Zellmembran toter Zellen dringen die Farbstoffe in die Zelle ein und binden an zytoplasmatische Proteine. Die Zellmembran lebender Zellen kann nicht durchdrungen werden, es werden daher nur Oberflächenproteine gebunden was zu einer deutlich niedrigeren Anfärbung der Zellen führt {Mittrücker *et al.* 2001, Luttmann *et al.* 2009, Lischke *et al.* 2013}.

2.2.14 Intrazelluläre Antikörperfärbung

Zytokine und intrazelluläre Moleküle wurden mittels intrazellulärer Antikörperfärbung detektiert. Diese erfolgte im Anschluss an die reguläre extrazelluläre Antikörperfärbung. Vor der intrazellulären Antikörperfärbung mussten die Zellen fixiert und die Zellmembran permeabilisiert werden. Alle Schritte erfolgten in Dunkelheit. Die Zellen wurden nach der extrazellulären Antikörperfärbung in 200 μL PBS mit 2% Paraformaldehyd (PFA) suspendiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde PBS mit 0,2% BSA im Überschuss hinzugefügt, die Zellsuspension bei 250 \times g für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Durch PFA erfolgt durch Quervernetzung von Proteinen eine Fixierung der Zellen. Zum Zellpellet wurden 50 μL Saponinpuffer mit 1 μL normales NRS gegeben und die Suspension wurde 5 min bei 4°C inkubiert, Anschließend wurden die Fluorochrom-gekoppelten Antikörper gegen die zu analysierenden intrazellulären Proteine in 50 μL Saponinpuffer hinzugefügt und 15 min bei 4°C inkubiert. Das Detergenz Saponin machte die Zellmembran für die Antikörper durchgängig. Es wurde ein Überschuss von PBS hinzugegeben und erneut bei 250 \times g für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen konnten nun durchflusszytometrisch analysiert werden {Mittrücker *et al.* 2001, Heiss *et al.* 2008}.

2.2.15 Intranukleäre Antikörperfärbung

Zur Bestimmung der intrazellulären Konzentration von Transkriptionsfaktoren musste eine intranukleäre Antikörperfärbung erfolgen. Diese wurde im Anschluss an die reguläre extrazelluläre Antikörperfärbung in Dunkelheit mit Puffern der Firma eBioscience durchgeführt (Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set). Zunächst wurde 1 Teil eBioscience Fixation/Permeabilization Concentrate zu drei Teilen eBioscience Fixation/Permeabilization Diluent gegeben. Die Zellen wurden in 200 μ L der so erhaltenen frischen Fixierungs- und Permeabilisierungslösung suspendiert. Nach einer halben Stunde bei 4°C wurde PBS mit 0,2% BSA im Überschuss hinzugefügt, die Zellsuspension bei 250 \times g für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. 200 μ L eBioscience Permeabilisierungspuffer wurden hinzugefügt, erneut bei 250 \times g für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die gewünschten Antikörper wurden in 200 μ L eBioscience Permeabilisierungspuffer hinzugefügt und nach Resuspension des Zellpellets 20 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde 1 mL eBioscience Permeabilisierungspuffer hinzugefügt, bei 250 \times g für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen konnten nun durchflusszytometrisch analysiert werden (modifiziert nach dem Protokoll der Firma eBioscience).

2.2.16 Dextramerfärbung

Zu maximal 2×10^6 aufgereinigten Zellen in 100 μ L PBS mit 0,2% BSA wurde 5 μ L APC SIINFEKL-MHC I Dextramerlösung gegeben. Das Peptid SIINFEKL entspricht dem OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid. Nach fünfminütiger Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur erfolgte die reguläre extrazelluläre Antikörperfärbung. Die Dextramere binden an CD8 T-Zellen, die für das OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid spezifisch sind, und ermöglichen somit deren Detektion (modifiziert nach dem Protokoll der Firma Immudex).

2.2.17 Bestimmung der Proliferation mit CFSE

In einigen Experimenten wurden die OT-I T-Zellen vor dem Transfer mit CFSE (Carboxyfluoreszein-Succinimidyl Ester) markiert. Hierzu wurde zu den zu transferierenden Zellen 1 μ M CFDA-SE (Carboxyfluoreszein-Diacetat-Succinimidyl Ester) gegeben. Dieses ist leicht membrangängig. Nach der Diffusion in die Zelle wird das CFDA-SE durch eine Esterase zu CFSE gespalten. Der fluoreszierende Stoff ist nun nicht mehr membrangängig und wird bei jeder Division gleichmäßig auf die Tochterzellen

verteilt. Dies bedeutet eine Halbierung der Fluoreszenzintensität pro Zellteilung. Nach dreiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde PBS in großem Überschuss hinzugegeben, die Suspension bei $250 \times g$ für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen in PBS aufgenommen und in die Empfängermause transferiert. Bei Analyse der transferierten OT-I T-Zellen aus den Organen der Empfängermause erlaubte die Abnahme der CFSE-Intensität eine Aussage über die Proliferation {Lyons 2000, Kursar *et al.* 2005}.

2.2.18 Bestimmung der Proliferation mit BrdU

In einigen Versuchen wurde ein chemisches Analogon des Nukleosids Thymidin, BrdU (Bromdesoxyuridin), zur Analyse der Proliferation verwendet. Dieses wird in die Zelle aufgenommen und in der S-Phase der sich teilenden Zelle in die DNA eingebaut. So können Zellen, die seit BrdU-Gabe proliferiert und BrdU in die DNA eingebaut hatten, bestimmt werden. Für diesen Zweck wurde das APC BrdU Flow Kit der Firma BD Bioscience verwendet. An Tag vier nach Transfer wurde den Mäusen 1 mg BrdU intraperitoneal injiziert. An Tag fünf wurden die Milzzellen gereinigt. Alle weiteren Schritte erfolgten in Dunkelheit. Nach der regulären extrazellulären Antikörperfärbung wurde 1 mL PBS mit 3% FCS hinzugefügt, bei $250 \times g$ für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 100 μ L BD Cytofix/Cytoperm-Puffer resuspendiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Hinzufügen von 1 mL BD Perm/Wash-Puffer, wurde bei $250 \times g$ für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 100 μ L BD Cytoperm Plus-Puffer resuspendiert, 10 min bei 4°C inkubiert, dann erneut 1 mL BD Perm/Wash-Puffer hinzugefügt, bei $250 \times g$ für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend erfolgte eine Resuspension des Zellpellets in 100 μ L BD Cytofix/Cytoperm-Puffer und eine fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Nach Hinzufügen von 1 mL BD Perm/Wash-Puffer wurde bei $250 \times g$ für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 100 μ L DNase (300 μ g/mL) resuspendiert, 1h bei 37°C inkubiert, 1 mL BD Perm/Wash-Puffer hinzugefügt, dann 5 min bei $250 \times g$ zentrifugiert und der Überstand verworfen. Schließlich wurde das Zellpellet in 50 μ L BD Perm/Wash-Puffer mit 1 μ L APC-gekoppeltem Antikörper gegen BrdU resuspendiert und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Hinzufügen von 1 mL BD Perm/Wash-Puffer, dann fünfminütiger bei $250 \times g$ Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes konnten die Zellen durchflusszytometrisch analysiert werden. Dieses

Protokoll ermöglichte durch fixierende, permeabilisierende und DNA-denaturierende Schritte die Markierung von BrdU direkt in der DNA (modifiziert nach dem Protokoll des Herstellers BD Biosciences) {Schittek *et al.* 1991}.

2.2.19 Bestimmung der Apoptose mit Annexin V

Apoptotische Zellen transferieren Phosphatidylserin von der zytosolischen Seite der Zellmembran auf die extrazelluläre Seite der Membran. Das Protein Annexin V bindet Ca²⁺-abhängig an Phosphatidylserin. Diese Eigenschaft macht Annexin V zu einem nützlichen Werkzeug der Apoptose-Analyse. Vor der Annexin-Färbung wurden die Zellen in einem Überschuss des Ca²⁺-haltigen Annexin-Färbepuffers aufgenommen, bei 250 × g für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Annexin-Färbung selbst ist eine reguläre Antikörperfärbung unter Zugabe von Fluorochrom-gekoppelten Annexin V zu den Antikörpern, allerdings wird das PBS im Verlauf der gesamten Färbung durch den Annexin-Färbepuffer ersetzt {Van Engeland *et al.* 1998, Heiss 2011}.

2.2.20 Bestimmung der Apoptose mit FLICA

Die als FLICA (*fluorescent labeled inhibitor of caspases*) bezeichneten Fluorochrom-gekoppelten Caspaseinhibitoren können als Werkzeug zur Apoptosedetektion genutzt werden. Diese kurzen Peptide können leicht die Zellmembran durchdringen und dort irreversibel an die katalytischen Zentren aktivierter Caspasen binden. Da die Aktivierung von Caspasen ein entscheidendes apoptotisches Ereignis ist können FLICA-positive Zellen als apoptotisch identifiziert werden. Zur Analyse der Apoptose mit FLICA wurde das FAM-FLICA™ Poly Caspase Assay Kit der Firma ImmunoChemistry Technologies verwendet. Nach der regulären extrazellulären Antikörperfärbung wurden Zellen in 300 µL PBS resuspendiert, 10 µL dreißigfach konzentrierte FLICA-Lösung hinzugefügt und die Suspension durch Schwenken gemischt. Während der einstündigen Inkubation bei 37°C wurde das Reaktionsgefäß jeweils nach 20 min geschwenkt. Anschließend wurden 2 mL des Waschpuffers hinzugefügt, bei 250 × g für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dann konnte die Messung am Durchflusszytometer unter Hinzugabe von DAPI erfolgen (modifiziert nach dem Protokoll der Firma ImmunoChemistry Technologies) {Smolewski *et al.* 2002}.

2.2.21 *in vivo*-Zytotoxizitäts-Test

Die Zytotoxizität von CD8 T-Zellen wurde mit Hilfe eines *in vivo*-Zytotoxizitätstest analysiert. Hierzu wurde eine Gruppe Empfängermäuse mit 10^6 Wildtyp und eine zweite Gruppe mit 10^6 IRF4-defizienten OT-I T-Zellen transferiert und mit *LmOVA* infiziert. Am Tag fünf wurden die OT-I T-Zellen reisoliert und jeweils eine Million der CD8 T-Zellen in neue Empfängertiere transferiert. Eine dritte Gruppe, die Kontrollgruppe, erhielt keine Zellen. Am nächsten Tag wurden den Empfängermäusen 3×10^6 mit OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid (Zielzellen) und 3×10^6 mit dem irrelevanten Peptid LCMV gp₃₃₋₄₁ beladene (Kontrollzellen) und mit unterschiedlichen CFSE-Konzentrationen markierte Milzzellen injiziert. Nach vier Stunden wurden die Milzzellen isoliert und die Zellzahlen der OT-I T-Zellen, sowie die Zahl der verbliebenen Ziel- und Kontrollzellen bestimmt. Anhand der Reduktion der Zielzellen im Verhältnis zu den Kontrollzellen wurde die spezifische Zytotoxizität nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ Zytotoxizität} = 100 - \left(\frac{\% \text{OVA}_{257-264}\text{-Zellen in OT-I Rezipienten} / \text{LCMV gp}_{33-41}\text{-Zellen in OT-I Rezipienten}}{\text{OVA}_{257-264}\text{-Zellen in Kontrollmäusen} / \text{LCMV gp}_{33-41}\text{-Zellen in Kontrollmäusen}} \times 100 \right).$$

Ziel- und Kontrollzellen wurden wie folgt hergestellt. Nach Isolierung der Milzzellen aus einer naiven Maus wurden diese in 15 mL RPMI komplett aufgenommen und in zweimal 7,5 mL Zellsuspension aufgeteilt. Die erste Suspension wurde mit 10^{-6} M OVA₂₅₇₋₂₆₄, die zweite Suspension mit 10^{-6} M LCMV gp₃₃₋₄₁ für 1h bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation bei $250 \times g$ für 5 min und Verwerfen des Überstandes wurden die Zellpellets in 2 mL PBS mit 0,2% BSA aufgenommen. Die mit OVA₂₅₇₋₂₆₄-beladenen Zellen wurden mit 5 µM, die mit LCMV gp₃₃₋₄₁-beladenen Zellen mit 0,5 µM CFSE für 15 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert und anschließend PBS mit 0,2% BSA im Überschuss hinzugefügt. Nach Zentrifugation bei $250 \times g$ für 5 min und Verwerfen des Überstandes, wurde PBS im Überschuss hinzugefügt und erneut bei $250 \times g$ für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen zu gleichen Anteilen gemischt. Vor der intravenösen Injektion von 6×10^6 Peptid-beladenen und CFSE-markierten Milzzellen in 200 µL PBS wurde das Mischverhältnis im Durchflusszytometer überprüft {Lischke *et al.* 2013}.

2.2.22 Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting, FACS*)

Zellen, die mittels Durchflusszytometer analysiert werden sollen, werden zunächst mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Hierbei kann es sich um Fluorochrom-gekoppelte Antikörper oder andere fluoreszierende Stoffe handeln. In dieser Arbeit wurden zum Beispiel lebend-tot-Farbstoffe und CFSE verwendet. Größe und Granularität der Zellen können unabhängig von der Fluoreszenzmarkierung untersucht werden. Die Zellsuspension wird im Durchflusszytometer durch eine dünne Kapillare gezwungen, was zu einem Einzelzellstrom führt. Jede Zelle wird in diesem Strom einzeln mit verschiedenen Lasern angeregt, was zu einer Streuung des Lichts und zu einer Fluoreszenz der gebundenen Farbstoffe führt. Nach dem Passieren verschiedener Filter und Spiegel, detektieren *Photomultiplier tubes* diese Streuung des Lichts und die Emissionen der fluoreszierenden Farbstoffe. Die gemessenen Signale werden dann durch den Computer zweidimensional in Punktwolken dargestellt, in denen jeder Punkt eine Zelle symbolisiert. Diese Darstellung ermöglicht eine quantitative und qualitative Analyse von Zellen bzw. Zellpopulationen. Das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter, FSC*) und Seitwärtsstreulicht (*side scatter, SSC*) geben Aufschluss über Größe und Granularität der Zellen. Je nach Versuchsziel wurden Fluorochrom-gekoppelte Antikörper eingesetzt, die die interessierenden Zellbestandteile binden und markieren. Die Intensität der verschiedenen Fluorochrome erlaubt dann eine Aussage über die Expression des jeweiligen Zellbestandteils. Die Analyse der im Durchflusszytometer gemessenen Daten erfolgte über mehrere Schritte. Zunächst wurden die Lymphozyten anhand von FSC und SSC identifiziert. Eine Analyse der beiden FSC-Parameter FSC-area und FSC-height ermöglichte den Ausschluss von Zelldoubletten. Anschließend wurden noch tote Zellen über die lebend-tot-Färbung ausgeschlossen. Danach wurden die Zellen von Interesse, in dieser Arbeit meist CD8 oder OT-I T-Zellen, in den zweidimensionalen Punktwolken eingegrenzt und auf die jeweils zu untersuchende Eigenschaft charakterisiert. Hierzu wurde der für die untersuchte Eigenschaft positive Anteil (in %) oder die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) bestimmt. Mit Hilfe der während Isolierung der Zellen aus den Organen ermittelten Gesamtzellzahlen konnten die absoluten Zellzahlen bestimmt werden. Aus Gründen der Durchführbarkeit wurden in dieser Arbeit die relativen Werte für die Quantifizierung gewählt {Murphy *et al.* 2008, Luttmann *et al.* 2009}.

Die gefärbten Zellen wurden in dieser Arbeit mit dem BD FACS Canto II analysiert. Die Messung wurde mit dem Programm BD FACS Diva durchgeführt, die Auswertung der Daten und Darstellung der Punktwolken (hier als Höhenlinien mit Ausreißern) oder Histogramme erfolgte dann mit dem Programm FlowJo. Aus diesen Darstellungen wurden dann die Abbildungen mit dem Programm Adobe Illustrator erstellt.

2.2.23 Sortierung von Zellen mittels Durchflusszytometrie

In einem Experiment wurde das Durchflusszytometer BD FACS Aria verwendet, das die mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markierten Zellen nicht nur misst, sondern diese auch gemäß der Eingrenzung in den zweidimensionalen Punktwolken in verschiedene Gefäße sortiert. Diese Möglichkeit gibt der Durchflusszytometrie auch ihre englische Bezeichnung *fluorescence activated cell sorting* (FACS). Dieser Teil der Arbeit wurde am Bernhard-Nocht-Institut (Hamburg) in Kooperation mit Claudia Sander-Jülch und PD Dr. Thomas Jacobs durchgeführt {Murphy *et al.* 2008}.

2.2.24 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte nach der Sortierung von Wildtyp und IRF4-defizienten OT-I T-Zellen aus einem kompetitiven Transfer in RAG1-defiziente Mäuse mittels Durchflusszytometer (siehe Kapitel 2.2.23). Zunächst wurde eine RNA-Isolierung mit Hilfe von TRIzol durchgeführt. Das Zellpellet wurde gründlich in 500 μ L TRIzol resuspendiert. Diese monophasische Lösung enthält Phenol, Guanidiniumthiocyanat und andere Komponenten. Das Guanidiniumthiocyanat lysiert die Zellen und inaktiviert RNasen und andere Enzyme. In Phenol lösen sich DNA und Proteine. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 100 μ L Chloroform hinzugefügt und die Lösung gut gemischt. Nach 3 min bei Raumtemperatur erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 12.000 \times g. Es bildeten sich drei Phasen. Die obere wässrige Phase mit der RNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 250 μ L Isopropanol hinzugefügt. Nach zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde 10 min bei 4°C und 12.000 \times g zentrifugiert und der Überstand verworfen. 500 μ L 75% Ethanol wurden zum Pellet gegeben, das Reaktionsgefäß einige Male gewendet, 5 min bei 4°C und 7.500 \times g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 100 μ L RNase-freiem Wasser gelöst. Anschließend erfolgte zur Optimierung der Reinheit eine weitere Reinigung mit dem Qiagen RNeasy MinElute Kit. Dazu wurden 350 μ L RLT-Puffer zum Pellet hinzugefügt und gut gemischt. Es wurden 100% Ethanol hinzugefügt und gut

gemischt. Dann wurde die gesamte Probe auf die RNeasy MinElute spin Säule gegeben. Nach 30 sec Zentrifugation bei $8.000 \times g$ wurde der Durchfluss verworfen und die Zentrifugation wiederholt. Der Durchfluss wurde erneut verworfen. Dann wurden 500 μL RPE-Puffer auf die Säule gegeben, die Zentrifugation wiederholt und der Durchfluss erneut verworfen. Nachdem 500 μL 80% Ethanol auf die Säule gegeben wurden, wurde zunächst 2 min, dann 5 min bei $8.000 \times g$ zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. 14 μL RNase freies Wasser wurde auf die Säule gegeben, eine Minute inkubiert und anschließend 1 min bei $12.000 \times g$ zentrifugiert. Im Durchfluss (ca. 12 μL) befand sich die isolierte RNA (Protokolle modifiziert nach den Herstellerprotokollen) {Chomcynski *et al.* 1987}. Die RNA wurde zur weiteren Analyse an unsere Kooperationspartner Dr. Hans-Joachim Mollenkopf und Karin Hahnke (Max-Plank-Institut für Infektionsbiologie, Berlin) verschickt. In einem Experiment wurde die RNA-Isolierung durch Kristin Klätschke von der Core Facility Micro-Array-Analytik (Institut für Klinische Chemie, UKE, Hamburg) durchgeführt.

2.2.25 DNA-Chip Analyse

Unsere Kooperationspartner Dr. Hans-Joachim Mollenkopf und Karin Hahnke (Max-Plank-Institut für Infektionsbiologie, Berlin) führten mit der aus sortierten OT-I T-Zellen isolierten RNA eine DNA-Chip Analyse ("Micro array" Analyse) durch. Das Prinzip ist im Ergebnisteil in Kapitel 3.4.2 erklärt. Diese Analyse diente der Gewinnung eines Expressionsprofils der mRNA der Zellen. Das tabellarische Expressionsprofil wurde im Rahmen dieser Arbeit genutzt um Aussagen über die Expression von Transkriptionsfaktoren treffen zu können.

2.2.26 Statistik

In den Experimenten wurden Gruppen von drei bis fünf Tieren gebildet und die Werte von mindestens zwei Gruppen miteinander verglichen. In *in vitro*-Versuchen bildeten jeweils zwei Werte eine Gruppe. Sollten mehr als zwei Gruppen analysiert werden wurden die Daten mit einem One-way Anova mit anschließendem Bonferroni Multiple post hoc Test auf Signifikanz getestet. Wurden nur zwei Gruppen verglichen erfolgte die Analyse mit dem Students t-Test. Wenn keine Gausverteilung angenommen werden konnte, dies ist z.B. beim Vergleich von Listerientitern der Fall, wurde bei mehr als zwei Gruppen der Kruskal-Wallis Test, bei zwei Gruppen der Mann-Whitney Test

angewendet. Als signifikant galt dabei ein p-Wert von kleiner 0,05. * bedeutet $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.

Die Diagramme und Statistiken wurden mit dem Programm GraphPad Prism erstellt und daraus die Abbildungen mit Hilfe des Programms Adobe Illustrator angefertigt.

3. Ergebnisteil

3.1 Fragestellung

Der Transkriptionsfaktor IRF4 spielt bei der Differenzierung verschiedener Immunzellen eine wichtige Rolle. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass IRF4 für die Entwicklung von Plasmazellen und verschiedenen T-Helferzellpopulationen essentiell ist. Es wurde zudem eine direkte Korrelation zwischen T-Zellrezeptor-Aktivierung und IRF4-Expression bewiesen {Matsuyama *et al.* 1995, Xu *et al.* 2012}.

Erste Hinweise auf eine Beteiligung von IRF4 an der Ausbildung von CD8 T-Zellantworten ergaben sich aus der Beobachtung, dass IRF4-defiziente Mäuse eine deutlich verminderte Immunantwort und abgeschwächte Zytotoxizität gegen das Lymphozytäre Choriomeningitis Virus zeigen. Es ist bekannt, dass in diesen Prozessen CD8 T-Zellen die zentrale Rolle spielen {Mittrücker *et al.* 1997}.

Schließlich ergaben Experimente unserer Kooperationspartner Josephine Ritter und Dr. Magdalena Huber (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Marburg), dass IRF4-defiziente Mäuse nicht in der Lage waren Listerien des Stamms *LmEGD* aus dem Organismus zu klären (Abbildung 3.1). Die initiale Kontrolle von Listerien erfolgt durch das angeborene Immunsystem. Für die anschließende Klärung der Listerien sind jedoch T-Zellen und insbesondere CD8 T-Zellen essentiell. Auf Grund dieser Beobachtungen sollte in diesem Projekt die Rolle von IRF4 in der Aktivierung und Differenzierung von zytotoxischen CD8 T-Zellen charakterisiert werden.

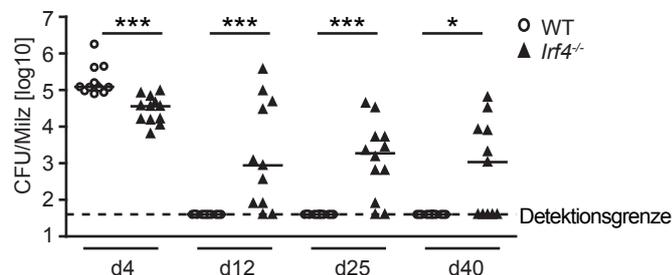


Abbildung 3.1 Listerienlast in der Milz von Wildtyp und IRF4-defizienten Mäusen

C57BL/6 Wildtyp und IRF4-defiziente Mäuse wurden mit 2×10^4 *LmEGD* infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Bakterienlast in der Milz mittels serieller Titration bestimmt. Beispielhaft ist ein Experiment von zwei konsistenten Experimenten dargestellt. Der Graph gibt Werte für individuell analysierte Tiere und den Median wieder. CFU = colony forming units *p < 0,05, ***p < 0,001, Daten von Josephine Ritter und Dr. Magdalena Huber (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Universität Marburg)

3.2 Teil 1 – Die Rolle von IRF4 für die primäre CD8 T-Zellantwort

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte die primäre Antwort von IRF4-defizienten CD8 T-Zellen analysiert werden.

3.2.1 IRF4 ist für eine effiziente Klärung der Listerieninfektion durch CD8 T-Zellen obligat

In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass die IRF4-Defizienz zu einer eingeschränkten Klärung von *LmEGD*-Infektionen führt. Zur Analyse der CD8 T-Zellantwort sollte eine Infektion mit dem weniger virulenten, Ovalbumin exprimierenden Listerienstamm *LmOVA* durchgeführt werden. In einem ersten Experiment sollte daher die Suszeptibilität von Wildtyp- und IRF4-defizienten Mäusen gegenüber *LmOVA* untersucht werden. An Tag acht nach Infektion wurde die Bakterienlast in der Milz mittels serieller Titration bestimmt (Abbildung 3.2a). Die Wildtypkontrollen zeigten eine vollständige Klärung der Listerien, während in den Milzen der IRF4-defizienten Mäuse noch Listerien nachgewiesen werden konnten. Das heißt, dass auch für den weniger virulenten Stamm *LmOVA*, wie für den Wildtypstamm *LmEGD*, eine eingeschränkte Klärung durch die IRF4-defizienten Mäuse vorlag {Foulds *et al.* 2002}.

Um die CD8 T-Zellantwort zu analysieren wurden aus den infizierten Mäusen Milz- und Leberlymphozyten isoliert und mit Fluorochrom-markierten Antikörpern gegen CD3 ϵ und CD8 α mittels Durchflusszytometrie die Anzahl der CD8 T-Zellen bestimmt (Abbildung 3.2b). Diese Zellzahlen wurden mit denen nicht infizierter Mäuse verglichen. Normalerweise ist im Verlauf der Listerieninfektion eine deutliche Expansion der CD8 T-Zellpopulation zu beobachten {Pamer *et al.* 2004}. In den naiven Wildtyp und IRF4-defizienten Mäusen konnten keine signifikanten Unterschiede der Zahlen von CD8 T-Zellen pro Organ festgestellt werden. Nach der Infektion expandierte die CD8 T-Zellpopulation in den Wildtyptieren stark. Im Gegensatz dazu blieb die CD8 T-Zellzahl in den IRF4-defizienten Mäusen nahezu konstant und war an Tag acht signifikant geringer als in den Wildtypmäusen. IRF4 hatte also einen starken Einfluss auf die Zunahme der CD8 T-Zellzahlen.

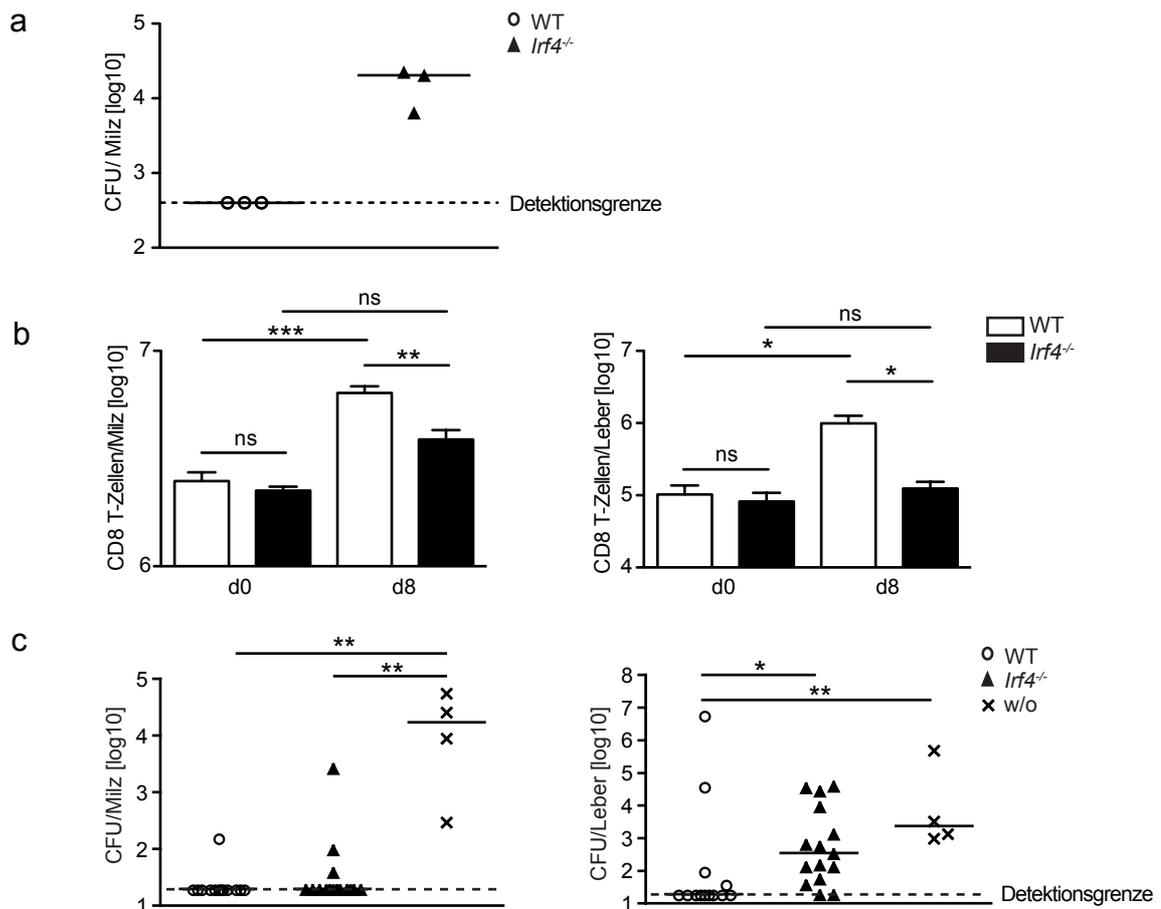


Abbildung 3.2 Listerienlast und CD8 T-Zellzahlen nach *LmOVA*-Infektion in Wildtyp und IRF4-defizienten Mäusen und die Abhängigkeit der Listerienklärung von CD8 T-Zellen und IRF4

(a) + (b) C57BL/6 Wildtyp und IRF4-defiziente Mäuse wurden mit 1×10^5 *LmOVA* infiziert. Beispielphaft ist ein Experiment von zwei konsistenten Experimenten dargestellt. (a) An Tag acht *p.i.* wurde die Bakterienlast in der Milz mittels serieller Titration bestimmt. Der Graph gibt Werte für individuell analysierte Tiere und den Median wieder. (b) Die Lymphozyten aus Milzen und Lebern von naiven und infizierten Mäusen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten durchflusszytometrisch analysiert und die Zahl der CD8 T-Zellen bestimmt. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM ($n=3$) dar. (c) RAG1-defiziente Mäuse (C57BL/6) wurden mit 1×10^5 *LmOVA* infiziert. Eine Gruppe erhielt $2,5 \times 10^5$ Wildtyp OT-I T-Zellen (WT), eine Gruppe $2,5 \times 10^5$ IRF4-defizienten OT-I T-Zellen (*IRF4*^{-/-}) und eine Kontrollgruppe erhielt keine Zellen (w/o) transferiert. An Tag fünf nach Infektion und Transfer wurde die Bakterienlast in den Empfängermäusen mittels serieller Titration bestimmt. Dargestellt sind die kombinierten Ergebnisse zweier Versuche. Der Graph gibt Werte für individuell analysierte Tiere und den Median wieder. CFU = colony forming units *p.i.* = post Infektion * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Um zu beweisen, dass der Defekt in der Klärung der *LmOVA*-Infektion auf den IRF4-defizienten CD8 T-Zellen beruhte wurde ein T-Zelltransfermodell in RAG1 (*recombination activation gene 1*)-defiziente Mäuse entwickelt. RAG1-defizienten Mäusen fehlt das *Rag1*-Gen, dies kodiert für ein Protein, welches eine katalytische Komponente des RAG-Komplexes ist. Dieser Multiprotein-Komplex vermittelt DNA-Doppelstrangbrüche im Rahmen der Rekombination der B- und T-Zellrezeptoren. Deshalb können B- und T-Zellrezeptoren in RAG1-defizienten Mäusen nicht ausgeprägt werden, daraus folgt eine B- und T-Zelldefizienz. Eine Gruppe von *LmOVA*-infizierten RAG1-defizienten Mäusen wurde mit Wildtyp OT-I CD8 T-Zellen, eine weitere Gruppe

mit IRF4-defizienten OT-I CD8 T-Zellen transferiert und eine dritte Gruppe wurde nur infiziert. Die OT-I CD8 T-Zellen wurden aus einem Mausstamm isoliert in dem nahezu alle T-Zellen CD8 T-Zellen sind und den transgenen OT-I T-Zellrezeptor aufweisen. Der OT-I T-Zellrezeptor erkennt das OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid und reagiert somit auf Teile des Ovalbumins, welches der *LmOVA*-Stamm als Surrogatantigen trägt. Die Klärung der Bakterieninfektion in RAG1-defizienten Mäusen sollte nur auf den transferierten OT-I CD8 T-Zellen beruhen, da keine adaptive endogene Antwort ausgebildet werden kann {Hogquist *et al.* 1994, Murphy *et al.* 2008}.

An Tag fünf nach Transfer wurden die Bakterienlasten in den Milzen und Lebern der RAG1-defizienten Mäuse mittels serieller Titration bestimmt (Abbildung 3.2c). Die Mäuse, die keine transgenen T-Zellen erhalten hatten, zeigten einen starken Bakterienbefall in beiden Organen, während die mit Wildtyp OT-I CD8 T-Zellen transferierten Mäuse eine nahezu vollständige Klärung der Listerieninfektion aufwiesen. In den Milzen war kein signifikanter Unterschied zwischen den Wildtyp und IRF4-defizienten OT-I CD8 T-Zellen transferierten Mäusen festzustellen. In der Leber hingegen, konnte ein signifikanter Unterschied beobachtet werden. Die mit IRF4-defizienten OT-I CD8 T-Zellen injizierten RAG1-defizienten Mäuse hatten einen ähnlich starken Bakterienbefall der Leber wie nicht transferierte Mäuse. Dies bedeutet eine eingeschränkte Klärung der Infektion durch IRF4-defiziente CD8 T-Zellen.

Zusammengenommen konnte festgestellt werden, dass IRF4-defiziente Mäuse stark eingeschränkt in ihrer Fähigkeit zur Klärung der *LmOVA*-Infektion waren und dieser Defekt größtenteils auf den CD8 T-Zellen beruhte.

3.2.2 Die Ausbildung antigenerkennender und funktionaler CD8 T-Effektorzellen ist IRF4-abhängig

Da die IRF4-defizienten Mäuse eine eingeschränkte Expansion der CD8 T-Zellpopulation und fehlerhafte Bakterienklärung zeigten, konnte auf eine beeinträchtigte CD8 T-Zellantwort geschlossen werden. Um zu analysieren, ob bei den IRF4-defizienten Mäusen auch funktionale Defekte der CD8 T-Zellen vorlagen wurde als Nächstes die Anzahl der antigenerkennenden Zellen und die der Zellen, die eine Expression von Effektormolekülen wie Zytokine und zytotoxische Moleküle aufwiesen, untersucht.

Milz-, Leber- und Knochenmarkslymphozyten wurden an Tag zwölf *p.i.* (post Infektion) isoliert und mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen CD3 ϵ und CD8 α markiert. Anschließend wurden die Zellen mit OVA₂₅₇₋₂₆₄-Dextrameren angefärbt. Diese MHC I-Multimere bestehen aus mehreren MHC I-Molekülen (H-2k^b), die mit OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid beladen sind. Die MHC I-Moleküle sind ihrerseits wieder an ein Dextran gebunden welches Fluorochrom-gekoppelt ist. Die OVA₂₅₇₋₂₆₄-beladenen MHC I-Moleküle des Dextramers binden an die im Rahmen der *Lm*OVA-Infektion entstandenen OVA₂₅₇₋₂₆₄-spezifischen CD8 T-Zellen. Dieser Ovalbumin-exprimierende Stamm wurde verwendet, da die verfügbaren Wildtypstämme keine starken immundominanten Peptide für die verwendete C57BL/6-Mauslinie besitzen. CD8 T-Zellen, die Dextramere gebunden haben, können im Durchflusszytometer als antigenerkennende T-Zellen identifiziert werden. An Tag zwölf *p.i.* zeigten je nach analysiertem Organ ein bis fünf Prozent der Wildtyp CD8 T-Zellen eine Dextramerbindung (Abbildung 3.3a). Die IRF4-defizienten Mäuse hatten im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen deutlich reduzierte Anteile von unter einem Prozent dieser antigenspezifischen CD8 T-Zellen. Auch bei Berechnung der Zahl der antigenerkennenden CD8 T-Zellen pro Organ war dieser Unterschied deutlich erkennbar {Davis *et al.* 2011}.

Anschließend sollte die Fähigkeit der IRF4-defizienten CD8 T-Zellen Effektormoleküle zu produzieren untersucht werden. Milz- und Leberlymphozyten von Wildtyp und IRF4-defizienten Mäusen wurden an Tag zwölf *p.i.* für vier Stunden mit dem Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ stimuliert, um die Produktion von IFN- γ (Interferon- γ) und TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) zu analysieren. Beide Zytokine aktivieren Makrophagen und sind essentielle Zytokine der Immunantwort gegen *L. monocytogenes* {Pamer *et al.* 2004}.

Zur Blockade der Proteinsekretion wurde nach einer halben Stunde Stimulation das Zellgift Brefeldin A hinzugefügt. Brefeldin A blockiert vermutlich GTP-Austauschfaktoren, die für die Aktivierung einer GTPase namens Arf1 verantwortlich sind. Arf1 ist für die Bildung von Transport-Vesikeln zwischen Endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat verantwortlich. Durch die Blockade des Proteintransports in der Zelle führt Brefeldin A zur Anreicherung der produzierten Proteine in der Zelle, selbst wenn es sich um normalerweise sezernierte Proteine handelt. Dies macht eine Analyse dieser Proteine im Durchflusszytometer möglich {Casanova 2007}.

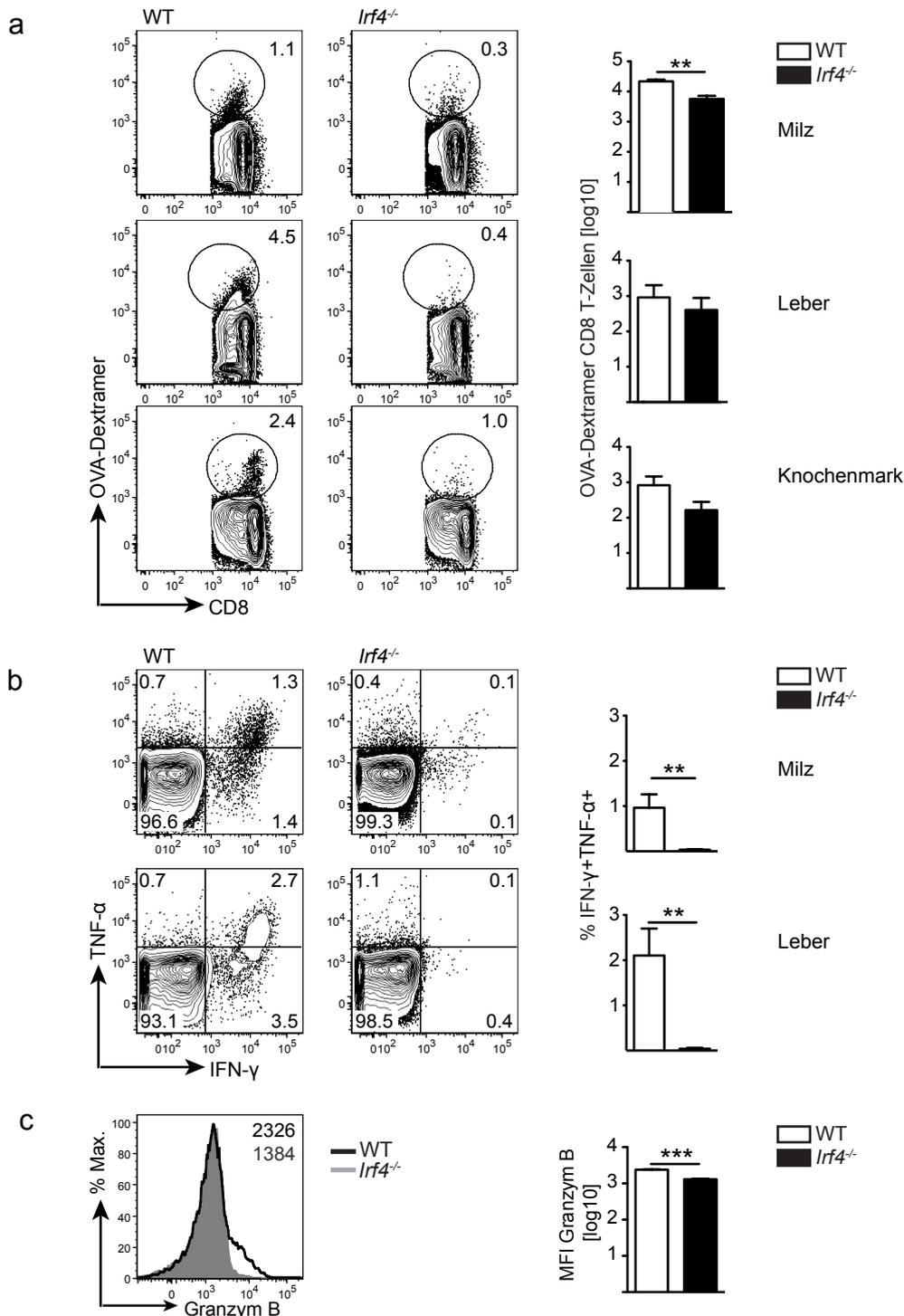


Abbildung 3.3 Untersuchung der Ausbildung funktionaler und antigenerkennender CD8 T-Zellen nach *LmOVA*-Infektion in Wildtyp und IRF4-defizienten Mäusen

(a) - (c) C57BL/6 Wildtyp und IRF4-defiziente Mäuse wurden mit 1×10^5 *LmOVA* infiziert. Nach der Infektion wurden die Lymphozyten aus verschiedenen Organen der infizierten Mäuse durchflusszytometrisch analysiert. Beispielhaft ist ein Experiment von zwei konsistenten Experimenten dargestellt. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 3$) in Prozent oder mittlerer Fluoreszenzintensität (MFI) der CD8 T-Zellen dar. (a) Am Tag zwölf *p.i.* wurde der Anteil (in Prozent) und die Zahl der Dextramer-positiven CD8 T-Zellen in Milz, Leber und Knochenmark bestimmt. (b) Am Tag zwölf *p.i.* wurde der Anteil IFN- γ - und TNF- α -positiver Zellen der CD8 T-Zellen nach vierstündiger Restimulation in Milz und Leber bestimmt. In den Quadranten sind die prozentualen Anteile positiver Zellen angegeben. (c) Am Tag acht *p.i.* wurde die mittlere Fluoreszenzintensität von Granzym B der CD8 T-Zellen bestimmt. Im Histogramm ist die mittlere Fluoreszenzintensität für Granzym B angegeben. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Nach vier Stunden Stimulation wurden die Zellen zunächst mit Fluorochromgekoppelten Antikörpern gegen CD3 ϵ und CD8 α markiert und anschließend fixiert. Die Fixation ermöglichte eine intrazelluläre Färbung der Zytokine IFN- γ und TNF- α , welche dann im Durchflusszytometer gemessen wurden (Abbildung 3.3b). Die Wildtyp CD8 T-Zellen zeigten Anteile von einem Prozent IFN- γ und TNF- α doppelpositiven CD8 T-Zellen in der Milz, beziehungsweise zwei Prozent in der Leber. Der Anteil der IFN- γ und TNF- α produzierenden Zellen unter den IRF4-defizienten CD8 T-Zellen war deutlich niedriger, er war nur etwas höher als bei den nicht stimulierten Kontrollen.

Direkt nach Reinigung der CD8 T-Zellen, sollte der Anteil der Zellen, die Granzym B produzieren, bestimmt werden. Granzym B ist ein Bestandteil zytotoxischer Granula von CD8 T-Zellen, die der gezielten Tötung von Zielzellen dienen. Diese Analyse wurde an Tag acht nach Infektion durchgeführt, da Granzym B an Tag zwölf der Infektion nicht mehr nachweisbar war (nicht gezeigt). Milzzellen wurden mit Fluorochrom-markierten Antikörpern gegen CD3 ϵ und CD8 α gefärbt und anschließend fixiert. Dann wurde Granzym B intrazellulär mit Hilfe eines Fluorochrom-gekoppelten Antikörpers markiert und die Zellen im Durchflusszytometer gemessen (Abbildung 3.3c). Ungefähr zwölf Prozent der Wildtyp CD8 T-Zellen produzierten Granzym B. Im Gegensatz dazu konnten fast keine IRF4-defizienten Granzym B-positiven CD8 T-Zellen nachgewiesen werden {Murphy *et al.* 2008}.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass IRF4-defiziente Mäuse stark eingeschränkt in ihrer Fähigkeit waren funktionale, antigenerkennende CD8 T-Zellen zu generieren. Das heißt, die Reifung potenter CD8 T-Effektorzellen ist IRF4-abhängig.

3.2.3 IRF4-defiziente CD8 T-Zellen zeigen auch während der akuten Infektion Merkmale von naiven und Gedächtniszellen

Naive, Effektor- und CD8 T-Gedächtniszellen sind durch die Oberflächenexpression verschiedener Moleküle gekennzeichnet. Um die Differenzierung der IRF4-defizienten CD8 T-Zellen zu charakterisieren wurde die Expression einer Auswahl dieser Moleküle analysiert.

Milzzellen wurden vor der Infektion und an Tag acht nach *LmOVA*-Infektion aus Wildtyp- und IRF4-defizienten Mäusen isoliert. Die CD8 T-Zellen wurden mit Fluorochrom-markierten Antikörpern gegen CD3 ϵ und CD8 α identifiziert. Die

Oberflächenmoleküle CD44, CD62L, Ly6C, KLRG1, CD127, und CD27 wurden mittels Durchflusszytometrie gemessen (Abbildung 3.4).

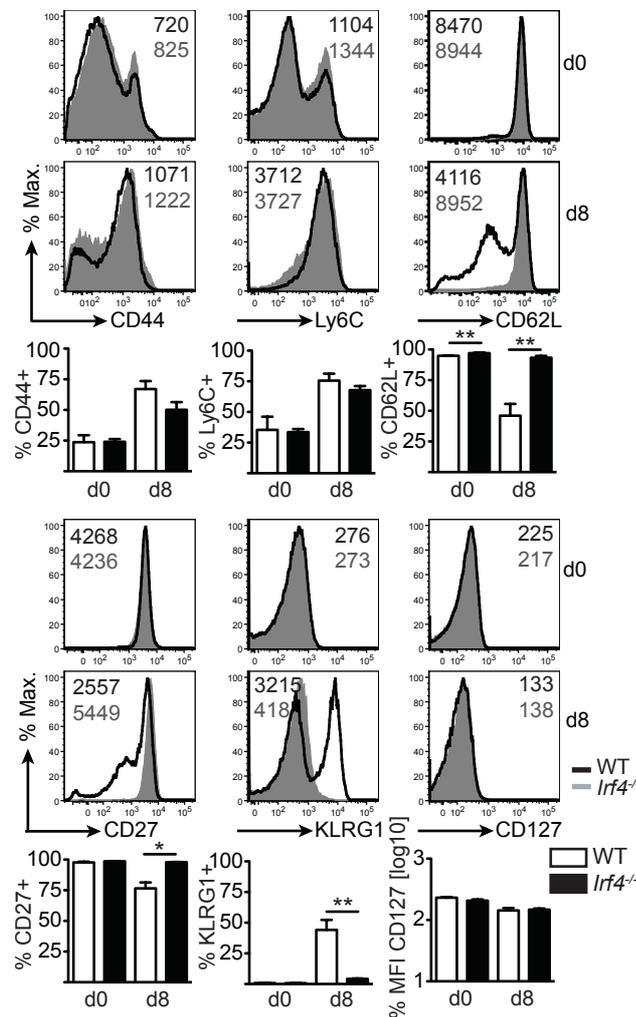


Abbildung 3.4 Untersuchung des Phänotyps von CD8 T-Zellen nach *LmOVA*-Infektion in Wildtyp und IRF4-defizienten Mäusen

C57BL/6 Wildtyp und IRF4-defiziente Mäuse wurden mit 1×10^5 *LmOVA* infiziert. Vor der Infektion und an Tag acht *p.i* wurde die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle auf den CD8 T-Zellen der Milz durchflusszytometrisch analysiert. Beispielfähig ist ein Experiment von zwei konsistenten Experimenten dargestellt. In den Histogrammen ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der jeweiligen Oberflächenmoleküle angegeben. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 3$) in Prozent der CD8 T-Zellen bzw. die mittlere Fluoreszenzintensität (CD127) dar. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

CD44 und Ly6C werden auf aktivierten Effektor- und Gedächtniszellen exprimiert. Das Adhäsionsmolekül CD44 vermittelt Zell-Zellinteraktionen und Migrationsprozesse. Ly6C ist an der CD8 T-Zellzytotoxizität und an der Gewebsverteilung von T-Zellen beteiligt {Johnson *et al.* 1993, Jaakkola *et al.* 2003, Murphy *et al.* 2008}. Wildtyp- und IRF4-defiziente CD8 T-Zellen hatten in naiven Mäusen eine geringe CD44- und Ly6C-Expression. Die CD8 T-Zellen der infizierten Mäuse beider Gruppen zeigten eine deutliche Hochregulation der Moleküle im Vergleich zu den naiven Kontrollen. Der Anteil der CD44- bzw. Ly6C-exprimierenden IRF4-defizienten CD8 T-Zellen war

geringfügig niedriger als bei den Wildtyp-Zellen. Dies deutet darauf hin, dass grundsätzlich eine Aktivierung der IRF4-defizienten zytotoxischen T-Zellen stattgefunden hatte.

CD62L oder L-Selektin ist an der Migration von T-Zellen in sekundäre Lymphgewebe beteiligt und wird auf naiven CD8 T-Zellen und zentralen CD8 T-Gedächtniszellen exprimiert. Bei Aktivierung von CD8 T-Zellen erfolgt eine Herunterregulation von CD62L. CD8 T-Effektorzellen und Effektorgedächtniszellen tragen daher kein CD62L auf ihrer Oberfläche {Williams *et al.* 2007, Murphy *et al.* 2008}. Vor der Infektion waren die meisten CD8 T-Zellen in Wildtyp- und IRF4-defizienten Mäusen CD62L-positiv. Der Anteil der CD62L-exprimierenden CD8 T-Zellen war in Wildtyp-Mäusen etwas niedriger als in IRF4-defizienten Mäusen. Während nach der Infektion der Anteil der CD62L-positiven CD8 T-Zellen in der Wildtyp-Gruppe wie erwartet deutlich abnahm, blieb der Anteil bei den IRF4-defizienten CD8 T-Zellen nahezu konstant. Dieser Befund widerspricht einer regulären Aktivierung.

CD27 ist ein Mitglied der TNF-Rezeptorsuperfamilie mit einer Cosignalfunktion für T-Zellen und wird auf naiven CD8 T-Zellen exprimiert. Bei Aktivierung erfolgt eine rapide Herunterregulation vergleichbar zu CD62L {Williams *et al.* 2007}. Wildtyp- und IRF4-defiziente CD8 T-Zellen zeigten vor Infektion eine starke Expression von CD27. Auf einem Teil der Wildtyp CD8 T-Zellen sank die Expression nach *LmOVA*-Infektion deutlich. Wie bei CD62L erfolgte bei den IRF4-defizienten CD8 T-Zellen jedoch keine Herunterregulation von CD27.

CD8 T-Zellen, die den NK (natürliche Killerzell)-Zellrezeptor KLRG1 exprimieren, gehören zur Gruppe der kurzlebigen, hochaktivierten Effektorzellen. Die Expression dieses Oberflächenmoleküls ist daher in der akuten Phase der Infektion auf einer Subpopulation der CD8 T-Zellen zu erwarten {Voehringer *et al.* 2001, Kaech *et al.* 2012}. Bei den nicht infizierten Wildtyp und IRF4-defizienten CD8 T-Zellen war nur eine geringe KLRG1-Expression zu messen. Von den Wildtyp CD8 T-Zellen exprimierte nach Infektion ein substantieller Anteil KLRG1. Im Gegensatz dazu unterblieb die Hochregulation von KLRG1 bei den IRF4-defizienten CD8 T-Zellen nahezu komplett.

Die α -Untereinheit des IL-7-Rezeptors CD127 findet sich auf der Oberfläche naiver CD8 T-Zellen und von CD8 T-Gedächtniszellen. IL-7 ist ein Überlebensfaktor für diese CD8 T-Zellen. Auf CD8 T-Effektorzellen wird CD127 herunterreguliert {Murphy *et al.*

2008, Kaech *et al.* 2012}. Vor der Infektion zeigten die Wildtyp CD8 T-Zellen eine niedrige CD127-Expression. Die IRF4-defizienten CD8 T-Zellen hatten eine ähnliche CD127-Expression. Nach Infektion wurde das Oberflächenmolekül auf beiden T-Zellgruppen vergleichbar herunterreguliert. Auf Basis der Expression von CD127 konnte kein Unterschied zwischen Wildtyp und IRF4-defizienten CD8 T-Zellen festgestellt werden.

Auf der Grundlage der aufgeführten Daten konnte festgestellt werden, dass in IRF4-defizienten Mäusen eine Aktivierung der CD8 T-Zellen stattfand, die CD8 T-Zellen aber ein deutlich verändertes Expressionsprofil von Oberflächenproteinen zeigten. Die IRF4-defizienten CD8 T-Zellen ähnelten während der Infektion im Phänotyp mehr naiven oder Gedächtniszellen als Effektorzellen.

3.2.4 IRF4-defiziente CD8 T-Zellen zeigten gegenüber Wildtypkontrollen eine verminderte Anreicherung in infizierten Geweben

Um die Funktion von IRF4 für CD8 T-Zellen zu analysieren bedient sich der nächste Teil dieser Arbeit eines T-Zelltransfermodells. Dieses bietet den Vorteil, dass die Wildtyp und IRF4-defizienten CD8 T-Zellen erstens in gesunder Umgebung miteinander verglichen werden können und dass zweitens die Zellen unabhängig von ihrem Aktivierungszustand identifiziert werden können. Zusätzlich ermöglicht der kompetitive Transfer der CD8 T-Zellen in dieselbe Maus den direkten Vergleich in derselben Probe. Für den Transfer wurden die zuvor beschriebenen OT-I CD8 T-Zellen verwendet. Bei diesen Zellen ist sichergestellt, dass sie alle das gleiche, dem *LmOVA* entstammende Antigen erkennen und somit eine Aktivierung stattfinden sollte.

Wildtyp und IRF4-defiziente OT-I CD8 T-Zellen wurden zu gleichen Anteilen gemischt und in *LmOVA*-infizierte Wildtypempfängermäuse injiziert. Die verschiedenen Zellpopulationen konnten mit Hilfe des Zelloberflächenmoleküls CD90, für welches zwei Allele existieren, unterschieden werden. Die Wildtypspendertiere waren CD90.1⁺CD90.2⁺, die IRF4-defizienten Spendertiere CD90.1⁻CD90.2⁺ und die Empfängertiere waren CD90.1⁺CD90.2⁻. Diese Oberflächenmoleküle ermöglichen eine Anfärbung mit Fluorochrom-markierten Antikörpern und eine durchflusszytometrische Analyse, wie beispielhaft in Abbildung 3.5a gezeigt.

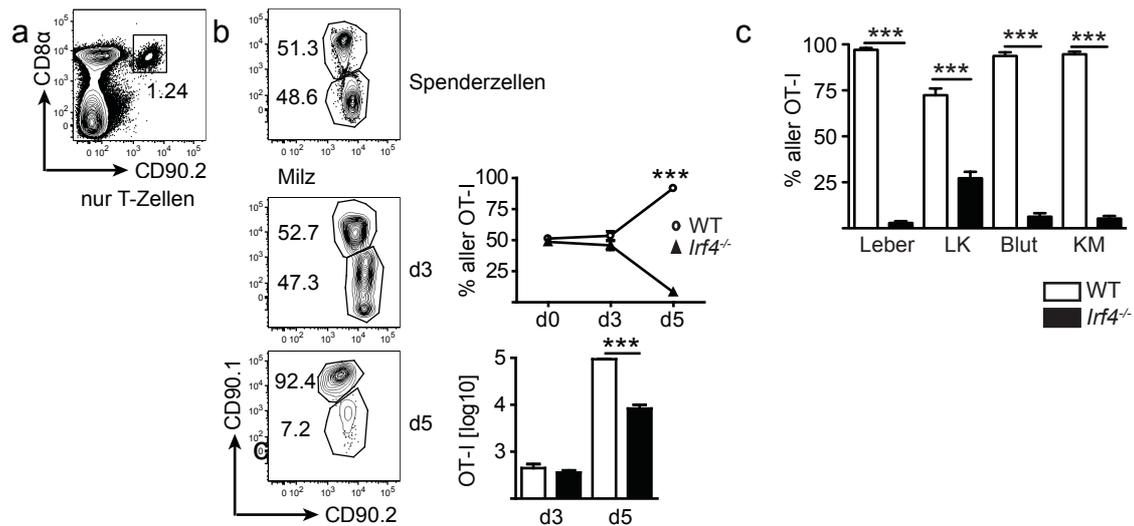


Abbildung 3.5 Untersuchung der Verteilung von Wildtyp und IRF4-defizienten CD8 T-Zellen in einem kompetitiven Transfermodell

(a) - (c) Je 20.000 Wildtyp und IRF4-defiziente OT-I CD8 T-Zellen aus transgenen C57BL/6 Mäusen wurden gemischt und in mit 1×10^5 *LmOVA* infizierte kongene C57BL/6 Empfängermäuse injiziert. Die verschiedenen Zellpopulationen konnten mit Hilfe des Zelloberflächenmoleküls CD90, für welches zwei Allele existieren, unterschieden werden. Die Wildtypspendertiere waren CD90.1⁺CD90.2⁺, die IRF4-defizienten Spendertiere CD90.1⁺CD90.2⁻ und die Empfängertiere waren CD90.1⁺CD90.2⁺. Nach der Infektion wurden die Lymphozyten aus verschiedenen Organen der Empfängermäuse durchflusszytometrisch analysiert. Beispielpflichtig ist ein Experiment von zwei konsistenten Experimenten dargestellt. Die Balken und Punkte stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 3$) dar. (a) An Tag fünf *p.i.* wurde der Anteil (in Prozent) der OT-I T-Zellen an allen CD8 T-Zellen in den Organen bestimmt (hier Milz). (b) Vor Infektion und zu den angegebenen Zeitpunkten *p.i.* wurde der Anteil (in Prozent) und die Zahl der Wildtyp und IRF4-defizienten OT-I T-Zellen in der Milz der Empfängermäuse bestimmt. (c) An Tag fünf *p.i.* wurde der Anteil (in Prozent) der OT-I T-Zellen in den angegebenen Organen bestimmt. LK = Lymphknoten, KM = Knochenmark, *** $p < 0,001$

An Tag drei und fünf nach Transfer wurden die Lymphozyten aus der Milz, an Tag fünf außerdem noch die Lymphozyten aus Leber, Blut, Lymphknoten und Knochenmark isoliert. Die Wildtyp und IRF4-defizienten OT-I CD8 T-Zellen wurden mittels Fluorochrom-markierter Antikörper gegen CD3 ϵ , CD8 α , CD90.1 und CD90.2 definiert. Das Verhältnis von Wildtyp und IRF4-defizienten OT-I CD8 T-Zellen wurde in den Organen bestimmt und mit dem Mischverhältnis der injizierten Zellen verglichen (Abbildung 3.5b und 3.5c). Während das Verhältnis der Zellen zueinander an Tag drei immer noch annähernd 1:1 war, hatte sich dies an Tag fünf drastisch geändert. In allen Organen war ein Verhältnis der Wildtyp zu IRF4-defizienten Zellen von mindestens 10:1 erkennbar, lediglich in den Lymphknoten war das Verhältnis 4:1. An Tag drei fanden sich in der Milz ungefähr fünfhundert Wildtyp und fünfhundert IRF4-defiziente OT-I CD8 T-Zellen, an Tag fünf hatte sich die Zahl der Wildtyp OT-I CD8 T-Zellen drastisch auf ungefähr hunderttausend erhöht. Von den IRF4-defizienten OT-I CD8 T-Zellen wurden jedoch nur etwa zehntausend Zellen gefunden.

Insgesamt konnte für beide transferierten T-Zellpopulationen eine Reaktion auf die *LmOVA* Infektion nachgewiesen werden. Beide Populationen expandierten deutlich. An Tag fünf waren die IRF4-defizienten OT-I CD8 T-Zellen aber erheblich benachteiligt. Dieser Defekt schien nicht auf einem veränderten Migrationsverhalten zu beruhen, da sich in keinem analysierten Organ überdurchschnittlich viele IRF4-defiziente OT-I CD8 T-Zellen fanden.

3.2.5 Die IRF4-Defizienz führt nicht zu vermehrter Apoptose der CD8 T-Zellen

Der Nachteil der IRF4-defizienten OT-I CD8 T-Zellen könnte auf zwei Mechanismen beruhen. Die Zellen könnten vermehrt apoptotisch werden, das heißt den geregelten Zelltod durchlaufen, oder ihre Fähigkeit zu proliferieren könnte reduziert sein.

In einer ersten Serie von Experimenten sollte die Apoptose untersucht werden. Hierzu wurden Zellen wie zuvor beschrieben transferiert, an Tag fünf nach Transfer analysiert und die OT-I CD8 T-Zellpopulationen mit Hilfe von Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern identifiziert.

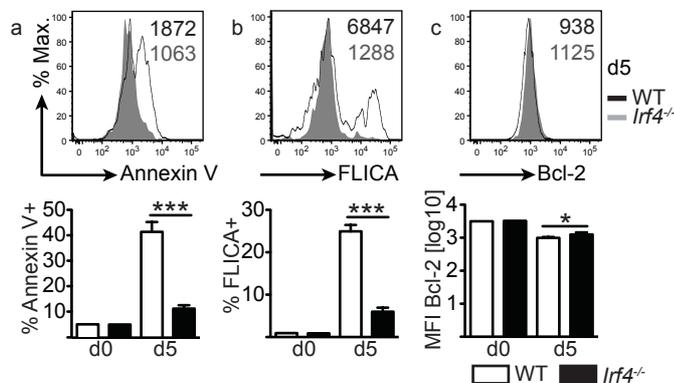


Abbildung 3.6 Untersuchung der Apoptose von Wildtyp und IRF4-defizienten CD8 T-Zellen

(a) - (c) Je 20.000 Wildtyp und IRF4-defiziente OT-I CD8 T-Zellen aus transgenen C57BL/6 Mäusen wurden zu gleichen Anteilen gemischt und in mit 1×10^5 *LmOVA* infizierte kongene C57BL/6 Empfängermäuse injiziert. An Tag fünf *p.i.* wurden die Lymphozyten aus der Milz der Empfängermäuse durchflusszytometrisch analysiert. Beispielhaft ist ein Experiment von zwei konsistenten Experimenten dargestellt. Die Graphen stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 3$) in Prozent oder mittlerer Fluoreszenzintensität (MFI) der OT-I T-Zellen dar. In den Histogrammen ist die mittlere Fluoreszenzintensität angegeben. (a) Annexin V-Färbung der OT-I T-Zellen. (b) FLICA-Färbung der OT-I T-Zellen. (c) Bcl-2-Färbung der OT-I T-Zellen. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$

Zunächst wurden die Zellen in einem Ca^{2+} -haltigen Puffer mit Fluorochrom-gekoppeltem Annexin V markiert. Das Protein Annexin V bindet Ca^{2+} -abhängig an Phosphatidylserin. Diese Eigenschaft macht Annexin V zu einem nützlichen Werkzeug

zur Apoptose-Analyse, da apoptotische Zellen ihr Phosphatidylserin von der zytosolischen Seite der Zellmembran auf die extrazelluläre Seite der Membran transferieren {Van Engeland *et al.* 1998}. Zusätzlich wurden die Zellen mit einem lebend-tot-Farbstoff angefärbt (Abbildung 3.6a). Von den naiven OT-I CD8 T-Zellen zeigte nur ein geringer Anteil eine Annexin V-Bindung, wobei kein Unterschied zwischen Wildtyp und IRF4-defizienten OT-I CD8 T-Zellen festzustellen war. Vierzig Prozent der Wildtyp OT-I CD8 T-Zellen waren an Tag fünf für Phosphatidylserin positiv. Unter den IRF4-defizienten OT-I CD8 T-Zellen zeigte ein deutlich geringerer Anteil eine Bindung von Annexin V, insgesamt waren sie deutlich weniger apoptotisch als die Wildtypkontrollen.

Weiteren Aufschluss über den apoptotischen Zustand der Zellen gab die Analyse mit FLICA (*fluorescent labeled inhibitor of caspases*). Diese Caspaseinhibitoren sind kurze Fluorochrom-gekoppelte Peptide. Sie können leicht die Zellmembran durchdringen und dort irreversibel an die katalytischen Zentren aktivierter Caspasen binden. Da die Aktivierung von Caspasen ein entscheidendes apoptisches Ereignis ist können FLICA-positive Zellen als apoptotisch identifiziert werden {Smolewski *et al.* 2002}. Nach der Antikörperfärbung zur Definition der Wildtyp und IRF4-defizienten OT-I CD8 T-Zellen wurden die Zellen mit FLICA und einem lebend-tot-Farbstoff angefärbt und anschließend im Durchflusszytometer analysiert (Abbildung 3.6b). Von den Ausgangszellen war nur ein geringer Anteil FLICA-positiv, wobei kein Unterschied zwischen den Wildtypkontrollen und den IRF4-defizienten Zellen erkennbar war. Fünfundzwanzig Prozent der Wildtypkontrollzellen zeigte eine FLICA-Färbung. Wie bei der Annexin V-Analyse war ein deutlich geringerer Anteil der IRF4-defizienten T-Zellen, nur etwa sieben Prozent, apoptotisch.

Als letzte Untersuchung zum geregelten Zelltod wurde eine Analyse der Bcl-2-Expression durchgeführt. Bcl-2 ist ein Apoptose-hemmendes Molekül, das nach einer T-Zellaktivierung herunterreguliert wird {Murphy *et al.* 2008}. Nach der extrazellulären Anfärbung der OT-I CD8 T-Zellen erfolgte eine Fixierung der Zellen und eine intrazelluläre Anfärbung mit einem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper gegen Bcl-2 (Abbildung 3.6c). Die Wildtypkontrollzellen zeigten wie erwartet eine geringere Bcl-2 Expression als die Ausgangszellen. Dies war auch für die IRF4-defizienten OT-I CD8 T-Zellen festzustellen, die sich an Tag null nicht von den Wildtypkontrollen unterschieden. Die IRF4-defizienten OT-I CD8 T-Zellen wiesen an Tag fünf jedoch im

Vergleich zu den Wildtypzellen eine höhere Expression von gegen Apoptose schützendem Bcl-2 auf.

Zusammenfassend konnte keine verstärkte sondern sogar eine verminderte Apoptose der IRF4-defizienten OT-I CD8 T-Zellen, im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Dies bedeutet, dass der verringerte Anteil an IRF4-defizienten OT-I CD8 T-Zellen nicht durch vermehrte Apoptose erklärt werden konnte.

3.2.6 IRF4 ermöglicht eine andauernde Proliferation der CD8 T-Zellen

Zur weiteren Analyse des Nachteils der IRF4-defizienten gegenüber den Wildtyp OT-I CD8 T-Zellen wurde die Proliferation untersucht. Nach der Identifikation der Wildtyp und der IRF4-defizienten OT-I CD8 T-Zellen wurde die Größe der Zellen mit Hilfe des Vorwärtsstreulichts (FSC) analysiert (Abbildung 3.7a). Dieser Parameter ermöglicht die Untersuchung des Zellvolumens im Durchflusszytometer. Stark proliferierende Zellen werden größer, es kommt zur Blastenbildung. An Tag fünf nach Transfer und Infektion lag ein substantieller Anteil der Wildtyp OT-I CD8 T-Zellen als Blasten vor. Im Gegensatz dazu konnte bei den IRF4-defizienten OT-I CD8 T-Zellen nahezu keine Blastenbildung gezeigt werden, ein Hinweis auf verminderte Proliferation zu diesem Zeitpunkt.

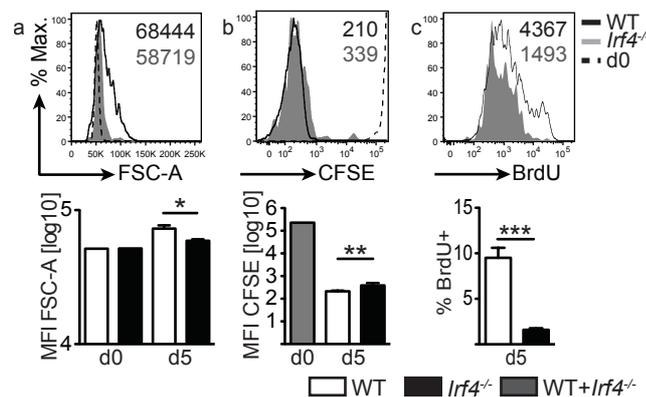


Abbildung 3.7 Untersuchung der Proliferation von Wildtyp und IRF4-defizienten CD8 T-Zellen
 (a) - (c) Je 20.000 Wildtyp und IRF4-defiziente OT-I CD8 T-Zellen aus transgenen C57BL/6 Mäusen wurden zu gleichen Anteilen gemischt und in mit 1×10^5 *LmOVA* infizierte kongene C57BL/6 Empfängermäuse injiziert. An Tag fünf *p.i.* wurden die Lymphozyten aus der Milz der Empfängermäuse durchflusszytometrisch analysiert. Beispielpflichtig ist ein Experiment von zwei konsistenten Experimenten dargestellt. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 3$) in Prozent oder mittlerer Fluoreszenzintensität (MFI) der OT-I T-Zellen dar. In den Histogrammen ist die mittlere Fluoreszenzintensität angegeben. (a) FSC-A der OT-I T-Zellen. (b) Die Zellen wurden vor dem Transfer mit $1 \mu\text{M}$ CFSE inkubiert. Das Bild zeigt die CFSE-Intensität der OT-I T-Zellen. (c) Einen Tag vor der Organentnahme wurde den Mäusen 1 mg BrdU injiziert. Das Bild zeigt die BrdU-Färbung der OT-I T-Zellen nach einem vom Hersteller definierten Färbeprotokoll. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Eine weitere Möglichkeit die Proliferation zu untersuchen ist die Markierung der Zellen mit dem fluoreszierenden Farbstoff CFSE (Carboxyfluoreszein-Succinimidyl Ester). Hierzu wurde vor dem Transfer CFDA-SE (Carboxyfluoreszein-Diacetat-Succinimidyl Ester) zu den Zellen gegeben. Dieses ist leicht membrangängig. Nach der Diffusion in die Zelle wird das CFDA-SE durch eine Esterase zu CFSE gespalten. Dieses ist nicht mehr membrangängig und wird bei jeder Division gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt. Dies bedeutet eine Halbierung der Fluoreszenzintensität pro Zellteilung {Lyons 2000}. An Tag fünf nach Transfer wurde die durchschnittliche CFSE-Intensität der OT-I CD8 T-Zellen mit Hilfe des Durchflusszytometers bestimmt (Abbildung 3.7b). Beide Populationen hatten nahezu die gesamte Fluoreszenz verloren, was bedeutet, dass die Zellen beider Populationen mindestens sechs bis sieben Teilungen durchlaufen hatten. Die IRF4-defizienten Zellen wiesen jedoch eine geringfügig höhere CFSE-Intensität auf, was auf eine etwas geringere Anzahl von Proliferationszyklen im Vergleich zu den Wildtyp Zellen hindeutet.

Da die CFSE-Intensität an Tag fünf bei beiden Populationen bereits sehr stark abgenommen hatte ist eine dezidierte Aussage über den Unterschied in der aktuellen Proliferation zu diesem Zeitpunkt nicht möglich. Um eine sicherere Aussage treffen zu können wurde ein chemisches Analogon des Nukleosids Thymidin, BrdU (Bromdesoxyuridin), verwendet. Dieses wird in die Zelle aufgenommen und in der S-Phase der sich teilenden Zelle in die DNA eingebaut {Schittek *et al.* 1991}. An Tag vier nach Transfer wurde den Mäusen BrdU intraperitoneal injiziert. An Tag fünf wurden die Milzzellen isoliert und die OT-I CD8 T-Zellen angefärbt. Anschließend wurden die Zellen fixiert und das in die DNA eingebaute BrdU mit einem spezifischen Fluorochromgekoppelten Antikörper markiert. Der prozentuale Anteil der OT-I CD8 T-Zellen, die seit BrdU-Gabe proliferiert und BrdU in die DNA eingebaut hatten, wurde durchflusszytometrisch bestimmt (Abbildung 3.7c). Ungefähr zehn Prozent der Wildtyp OT-I CD8 T-Zellen hatten BrdU in die DNA eingebaut. Von den IRF4-defizienten OT-I CD8 T-Zellen war ein signifikant geringerer Anteil, etwa zwei Prozent, BrdU-positiv. Im Gegensatz zu den Kontrollzellen proliferierten die IRF4-defizienten Zellen daher zu diesem Zeitpunkt nur noch in geringem Umfang.

Diese Befunde zeigen eindeutig, dass IRF4-defiziente OT-I CD8 T-Zellen zwar initial eine Proliferation zeigen, im Gegensatz zu den Wildtyp Kontrollen kann die Proliferation

aber nicht aufrechterhalten werden. Das heißt, IRF4 war für eine effiziente Proliferation der CD8 T-Zellen notwendig.

3.2.7 Die eingeschränkte Proliferation IRF4-defizienter CD8 T-Zellen lässt sich nicht durch „Exhaustion“ erklären

Für die verminderte Proliferation könnte das Phänomen der „Exhaustion“, also Ausgehrtheit verantwortlich sein. Exhaustion von CD8 T-Zellen wird insbesondere bei chronischen Virusinfektionen beobachtet. Dieser Zustand kann unter anderem über die Expression verschiedener Moleküle, wie PD-1, CTLA-4, CD244 und LAG-3 phänotypisch identifiziert werden. PD-1 und CTLA-4 sind Rezeptoren, die der Inhibition von T-Zellantworten dienen. LAG-3, ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie, wird mit der Regulation des Zellzyklus von T-Zellen in Verbindung gebracht. Der NK-Zellrezeptor CD244 wird auch auf CD8 T-Effektorzellen exprimiert {Kambayashi *et al.* 2001, Workman *et al.* 2004, Wherry 2011}.

An Tag fünf nach Transfer wurden die OT-I CD8 T-Zellpopulationen mit Fluorochromgekoppelten Antikörpern gegen PD-1, CTLA-4, LAG-3 und CD244 markiert und im Durchflusszytometer analysiert (Abbildung 3.8).

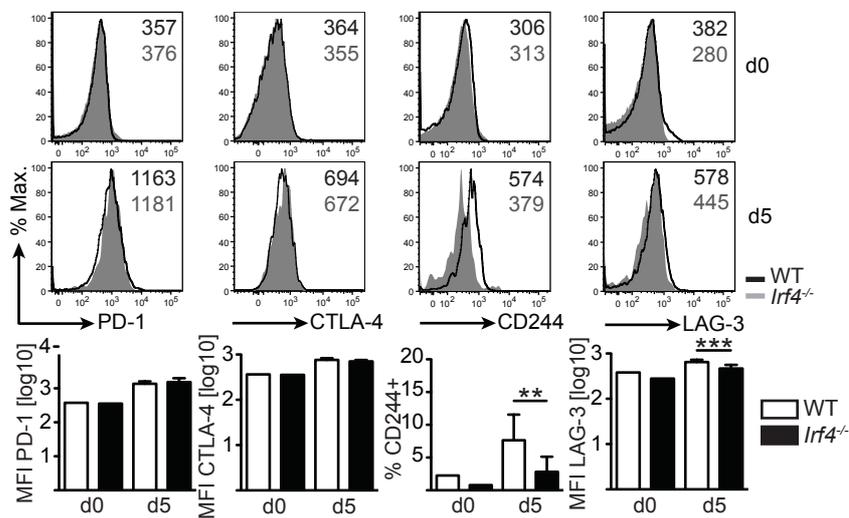


Abbildung 3.8 Untersuchung der Exhaustion von Wildtyp und IRF4-defizienten CD8 T-Zellen

Je 20.000 Wildtyp und IRF4-defiziente OT-I CD8 T-Zellen aus transgenen C57BL/6 Mäusen wurden zu gleichen Anteilen gemischt und in mit 1×10^5 *LmOVA* infizierte kongene C57BL/6 Empfängermäuse injiziert. An Tag fünf *p.i.* wurden die Lymphozyten aus der Milz aufgereinigt. Vor dem Transfer und an Tag fünf *p.i.* wurde die Expression der angegebenen Oberflächenmoleküle auf den OT-I T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Beispielhaft ist ein Experiment von zwei konsistenten Experimenten dargestellt. In den Histogrammen ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) angegeben. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 3$) in Prozent oder mittlerer Fluoreszenzintensität der OT-I T-Zellen dar. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Die PD-1-Expression nahm bei Wildtyp- und IRF4-defizienten OT-I CD8 T-Zellen gegenüber den Ausgangszellen deutlich zu. Sowohl in den naiven als auch in den aktivierten Zellen waren keine eindeutigen Unterschiede zwischen IRF4-defizienten OT-I CD8 T-Zellen und Wildtypkontrollen erkennbar. Die Expression von CTLA-4 hatte bei beiden Zellpopulationen an Tag fünf gegenüber den Ausgangszellen deutlich zugenommen. Die Expressionsstärke war zwischen IRF4-defizienten und Wildtypkontrollen vergleichbar. Die Expression von LAG-3 war an Tag fünf auf den Wildtyp OT-I CD8 T-Zellen gegenüber den Ausgangszellen etwas angestiegen. Die IRF4-defizienten OT-I CD8 T-Zellen zeigten eine geringfügig schwächere LAG-3-Expression. Die Wildtyp OT-I CD8 T-Zellen zeigten wie erwartet an Tag fünf gegenüber den Ausgangszellen eine deutliche Zunahme der CD244-Expression. Während die Ausgangszellpopulationen vergleichbare CD244-Expression aufwiesen, war die Expressionszunahme bei den IRF4-defizienten OT-I CD8 T-Zellen geringer.

Diese Befunde sprechen gegen einen für die Exhaustion typischen Phänotyp in IRF4-defizienten CD8 T-Zellen. Dies passt auch zur Beobachtung der geringeren Apoptose. Zellen im Zustand der Exhaustion weisen normalerweise eine höhere Apoptoserate auf. Allerdings zeichnet sich die Exhaustion nicht nur durch die Expression von bestimmten Oberflächenmolekülen und verstärkte Apoptose, sondern auch durch verminderte Proliferation, Zytokinproduktion und Zytotoxizität aus. Die Untersuchung dieser Eigenschaften gab weiteren Aufschluss über den Zustand der CD8 T-Zellen.

3.2.8 IRF4 ermöglicht die Differenzierung zu Zytokin-produzierenden CD8 T-Zellen

Die Analyse der Zytokinproduktion von CD8 T-Effektorzellen gibt in erster Linie Aufschluss über deren Funktionalität. Deshalb sollte die Fähigkeit zur Zytokinproduktion der IRF4-defizienten OT-I T-Zellen untersucht werden.

An Tag fünf nach Transfer und Infektion wurde die Zytokinproduktion von Wildtyp und IRF4-defizienten OT-I T-Zellen verglichen (Abbildung 3.9). Hierzu wurden die Milzzellen nach Aufreinigung wie zuvor beschrieben mit dem OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid, auf das alle OT-I T-Zellen reagieren sollten, stimuliert und anschließend fixiert. Die Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-2 (Interleukin-2) wurden mittels Fluorochrom-markierten Antikörpern gefärbt. Dann erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung der Zytokin-positiven CD8 T-Zellen.

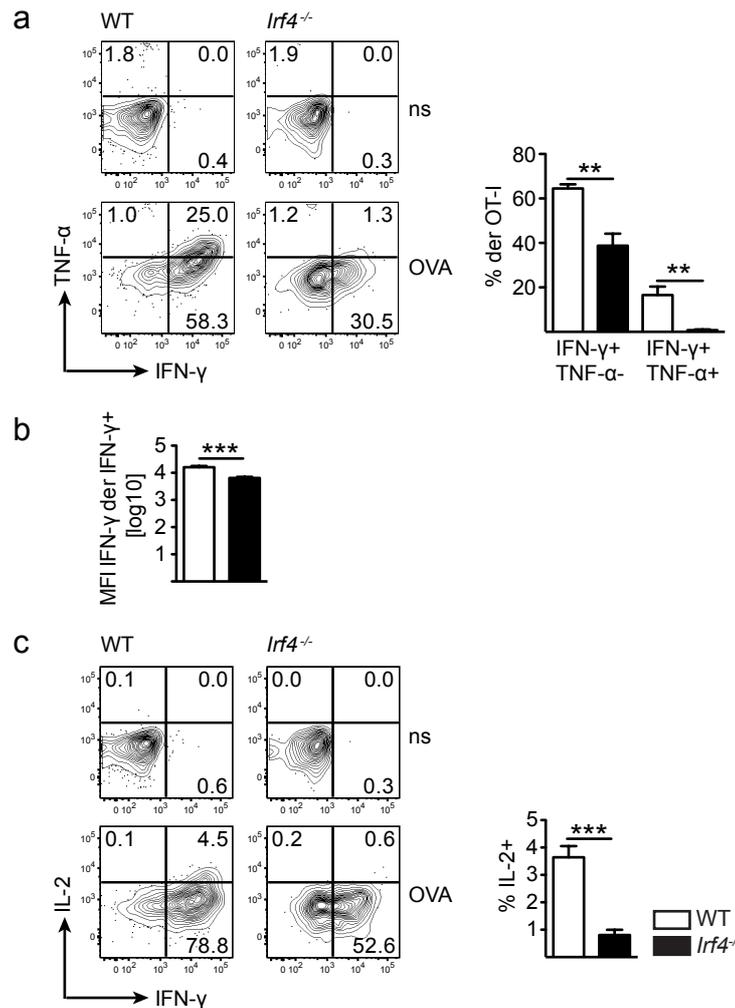


Abbildung 3.9 Untersuchung der Zytokinproduktion von Wildtyp und IRF4-defizienten CD8 T-Zellen

(a) - (c) Je 20.000 Wildtyp und IRF4-defiziente OT-I CD8 T-Zellen aus transgenen C57BL/6 Mäusen wurden zu gleichen Anteilen gemischt und in mit 1×10^5 *Lm*OVA infizierte kongene C57BL/6 Empfängermäuse injiziert. An Tag fünf *p.i.* wurden die Lymphozyten aus der Milz der Empfängermäuse nach vierstündiger Restimulation mit dem OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid durchflusszytometrisch analysiert. Beispielhaft ist ein Experiment von zwei konsistenten Experimenten dargestellt. Die Graphen stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM (n \geq 3) in Prozent oder mittlerer Fluoreszenzintensität (MFI) der OT-I T-Zellen dar. In den Quadranten sind die prozentualen Anteile positiver Zellen angegeben. (a) Anteil der IFN- γ - und TNF- α -produzierenden OT-I T-Zellen. (b) Mittlere Fluoreszenzintensität der IFN- γ -positiven OT-I T-Zellen. (c) Anteil der IFN- γ - und IL-2-produzierenden OT-I T-Zellen. ns = nicht stimuliert, *p<0,05, **p<0,01, ***p < 0,001

Zunächst erfolgte die Analyse der TNF- α - und IFN- γ -Produktion (Abbildung 3.9 a und 3.9b). Nicht-stimulierte Wildtyp und IRF4-defiziente OT-I T-Zellen zeigten nahezu keine Zytokinproduktion. Nach spezifischer Peptid-Stimulation wurden etwa zwanzig Prozent der Kontrollzellen doppelt-positiv, ungefähr fünfundsechzig Prozent nur IFN- γ positiv. Der Anteil der doppelt-positiven IRF4-defizienten OT-I T-Zellen war im Gegensatz dazu mit etwa einem Prozent sehr gering und auch die nur IFN- γ -positiven Zellen machten nur etwa vierzig Prozent aus. Insgesamt war also eine deutliche Abnahme der

Zytokinproduzenten im Vergleich zur Kontrolle feststellbar. Bei Betrachtung der Expressionsstärke der IFN- γ -positiven OT-I T-Zellen war ebenfalls eine deutliche Reduktion der Intensität der IRF4-defizienten CD8 T-Zellen gegenüber der Wildtypkontrolle erkennbar.

Anschließend wurde die Expression von IL-2 verglichen (Abbildung 3.9c). IL-2 dient der Aktivierung und Proliferation von T-Zellen, auch eine autokrine Wirkung auf die Zellen selbst wird beschrieben {Murphy *et al.* 2008, Feau *et al.* 2011}. Die unstimulierten Wildtyp und IRF4-defizienten CD8 T-Zellen produzierten kein IL-2. Etwa vier Prozent der Kontrollzellen waren nach Stimulation IL-2-positiv, von den IRF4-defizienten OT-I T-Zellen dagegen nur ca. ein Prozent.

Zusammenfassend zeigten IRF4-defiziente OT-I T-Zellen eine deutlich geringere Frequenz von Zytokinproduzenten. Dies könnte zum Einen auf den Zustand der „Exhaustion“ deuten, zum Anderen ist es ein deutlicher Hinweis darauf, dass die untersuchten Zellen nicht zu vollwertigen CD8 T-Effektorzellen ausdifferenzieren. Ein Merkmal für potente T-Effektorzellen ist ihre Polyfunktionalität, in diesem Fall ihre Fähigkeit mehrere Zytokine gleichzeitig zu produzieren {Wherry 2011}. Insbesondere diese Fähigkeit ist bei den IRF4-defizienten CD8 T-Zellen extrem eingeschränkt.

3.2.9 Die Zytotoxizität von CD8 T-Zellen ist IRF4-abhängig

Die charakteristische Eigenschaft von zytotoxischen T-Zellen ist die Produktion von zytotoxischen Molekülen, wie Granzym B, und mit Hilfe von diesen die gezielte Tötung von Zellen {Murphy *et al.* 2008}. Um die Fähigkeit der IRF4-defizienten CD8 T-Zellen zur Zelltötung zu analysieren wurden sowohl die Granzym B-Expression bestimmt als auch ein in-vivo-Zytotoxizitätstest durchgeführt.

Zunächst wurden Wildtyp und IRF4-defiziente OT-I T-Zellen an Tag fünf nach Transfer und Infektion isoliert und fixiert. Anschließend wurde die Granzym B-Expression mit Hilfe von Fluorochrom-markierten Antikörpern im Durchflusszytometer analysiert (Abbildung 3.10a). Die Ausgangszellen beider Populationen zeigten keine Granzym B-Expression. An Tag fünf exprimierten etwa siebenzig Prozent der Kontrollzellen Granzym B, von den IRF4-defizienten CD8 T-Zellen waren nur etwa fünfzehn Prozent Granzym B-positiv. Diese verminderte Granzym B-Produktion deutete auf eine verminderte Zytotoxizität hin.

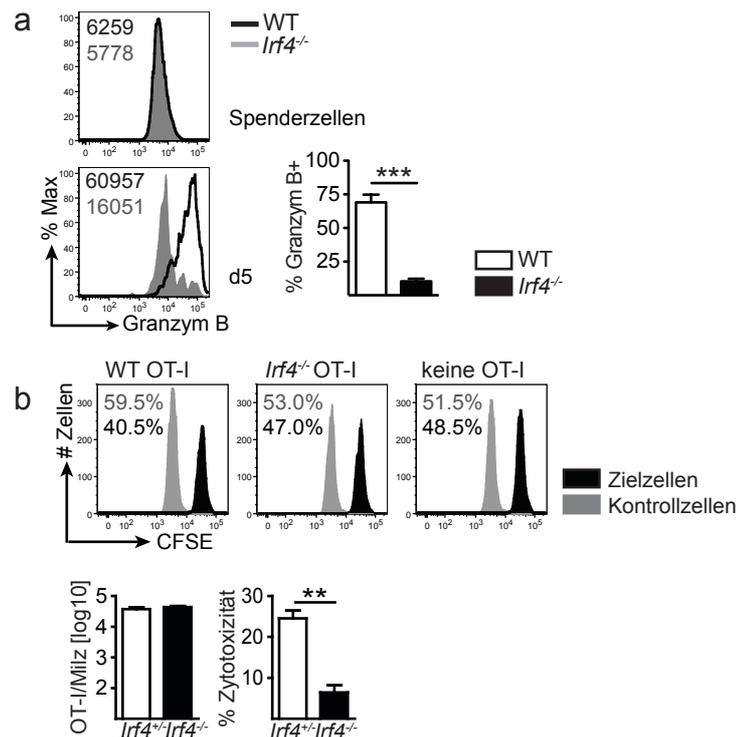


Abbildung 3.10 Untersuchung der Zytotoxizität von Wildtyp und IRF4-defizienten CD8 T-Zellen

(a) + (b) Beispielhaft ist ein Experiment von zwei konsistenten Experimenten dargestellt. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 3$) dar. (a) Je 20.000 Wildtyp und IRF4-defiziente OT-I CD8 T-Zellen aus transgenen C57BL/6 Mäusen wurden zu gleichen Anteilen gemischt und in mit 1×10^5 *LmOVA* infizierte kongene C57BL/6 Empfängermäuse injiziert. An Tag fünf *p.i.* wurden die Lymphozyten aus der Milz der Empfängermäuse durchflusszytometrisch analysiert. Die Abbildung stellt die Granzym B-Produktion der OT-I T-Zellen dar. In den Histogrammen ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) angegeben. (b) CD90.1 kongene Mäuse (C57BL/6) wurden mit 1×10^5 *LmOVA* infiziert. Eine Gruppe erhielt 10^6 heterozygote OT-I T-Zellen (WT) und eine Gruppe 10^6 IRF4-defiziente OT-I T-Zellen transferiert. An Tag fünf *p.i.* wurden die OT-I T-Zellen reisoliert und erneut transferiert. Eine Gruppe erhielt 10^6 für IRF4 heterozygote OT-I T-Zellen, eine Gruppe 10^6 IRF4-defiziente OT-I T-Zellen und eine Kontrollgruppe erhielt keine Zellen transferiert. Anschließend wurden den Empfängermäusen 3×10^6 mit OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid (Zielzellen) und 3×10^6 mit dem irrelevanten Peptid LCMV gp₃₃₋₄₁ beladene (Kontrollzellen) und mit unterschiedlichen CFSE-Konzentrationen markierte Milzzellen injiziert. Nach zwei Stunden wurden die Milzen der Empfängermäuse entnommen und die Lymphozyten durchflusszytometrisch analysiert. In den Histogrammen sind die Anteile der Ziel- und Kontrollzellen angegeben. Außerdem wurde die Zahl der OT-I T-Zellen bestimmt. Die Zytotoxizität wurde nach folgender Formel bestimmt: % Zytotoxizität = $100 - ((\% \text{OVA}_{257-264}\text{-Zellen in OT-I Rezipienten} / \text{LCMV gp}_{33-41}\text{-Zellen in OT-I Rezipienten}) / (\text{OVA}_{257-264}\text{-Zellen in Kontrollmäusen} / \text{LCMV gp}_{33-41}\text{-Zellen in Kontrollmäusen}) \times 100)$. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Die Zytotoxizität wurde mit Hilfe des *in vivo*-Zytotoxizitätstest analysiert. Hierzu wurde eine Gruppe Empfängermäuse mit Wildtyp und eine zweite Gruppe mit IRF4-defizienten OT-I T-Zellen transferiert und mit *LmOVA* infiziert. An Tag fünf wurden die OT-I T-Zellen reisoliert und jeweils eine Million der CD8 T-Zellen in neue Empfängertiere transferiert. Eine dritte Gruppe, die Kontrollgruppe, erhielt keine Zellen. Am nächsten Tag wurden diesen Mäusen Ziel- und Kontrollzellen injiziert. Hierfür wurden Milzzellen entweder mit dem OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid (Zielzellen) oder mit dem irrelevanten Peptid LCMV gp₃₃₋₄₁ (Kontrollzellen) beladen. Diese Zellpopulationen wurden dann mit unterschiedlichen

CFSE-Konzentrationen markiert, was eine Differenzierung im Durchflusszytometer ermöglichte. Nach vier Stunden wurden die Milzzellen isoliert und die Zellzahlen der OT-I T-Zellen, sowie die Zahl der verbliebenen Ziel- und Kontrollzellen bestimmt (Abbildung 3.10b). Anhand der Reduktion der Zielzellen im Verhältnis zu den Kontrollzellen wurde die spezifische Zytotoxizität nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ Zytotoxizität} = 100 - \left(\left(\frac{\% \text{OVA}_{257-264}\text{-Zellen in OT-I Rezipienten}}{\% \text{LCMV gp}_{33-41}\text{-Zellen in OT-I Rezipienten}} \right) / \left(\frac{\% \text{OVA}_{257-264}\text{-Zellen in Kontrollmäusen}}{\% \text{LCMV gp}_{33-41}\text{-Zellen in Kontrollmäusen}} \right) \times 100 \right)$$

Diese Berechnung ergab für die Rezipienten von Wildtyp OT-I T-Zellen eine deutliche Zytotoxizität mit einer Reduktion von fünfundzwanzig Prozent der OVA₂₅₇₋₂₆₄-beladenen Zielzellen. Im Gegensatz dazu zeigten die IRF4-defizienten OT-I T-Zellen eine deutlich geringere Zytotoxizität mit einer Reduktion von acht Prozent. In beiden Gruppen von Rezipienten wurden aber ähnliche Zahlen von OT-I T-Zellen gefunden, sodass eine reduzierte Zytotoxizität aufgrund einer verminderten Zellzahl ausgeschlossen werden konnte.

Zusammenfassend führt die IRF4-Defizienz zu einer deutlichen Einschränkung der Zytotoxizität der CD8 T-Zellen.

3.2.10 IRF4-defiziente CD8 T-Zellen weisen einen deutlich veränderten Oberflächenphänotyp auf und ähneln auch in der Effektorphase naiven oder Gedächtniszellen

Die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle korreliert mit der Aktivierung und verschiedenen Stadien der Differenzierung von CD8 T-Zellen. Die Expression der bereits besprochenen Moleküle CD44, Ly6C, CD62L, KLRG1, CD127 und CD27, sowie die Expression der Moleküle CD25, CXCR3, NKG2D und CD69 sollte untersucht werden, um weitere Hinweise auf den Zustand und die Entwicklung der IRF4-defizienten OT-I T-Zellen zu erhalten.

An Tag fünf nach Transfer und Infektion wurden die Milzzellen gereinigt. Wildtyp und IRF4-defiziente OT-I T-Zellen wurden mit Hilfe von Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern auf Expression der aufgezählten Moleküle im Durchflusszytometer analysiert (Abbildung 3.11).

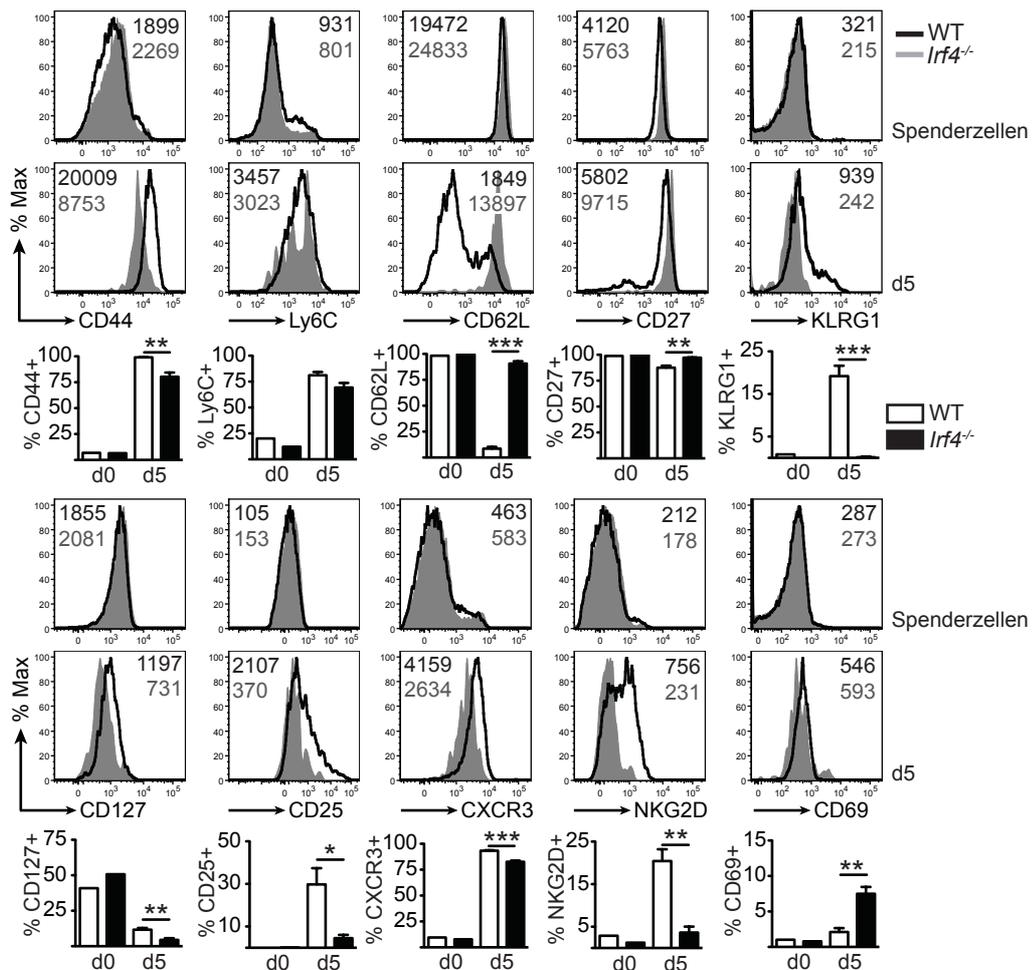


Abbildung 3.11 Untersuchung des Phänotyps von Wildtyp und IRF4-defizienten CD8 T-Zellen

Je 20.000 Wildtyp und IRF4-defiziente OT-I CD8 T-Zellen aus transgenen C57BL/6 Mäusen wurden zu gleichen Anteilen gemischt und in mit 1×10^5 *LmOVA* infizierte kongene C57BL/6 Empfängermäuse injiziert. An Tag fünf *p.i.* wurden die Lymphozyten aus der Milz aufgereinigt. Vor dem Transfer und an Tag fünf *p.i.* wurde die Expression der angegebenen Oberflächenmoleküle auf den OT-I T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Beispielhaft ist ein Experiment von zwei konsistenten Experimenten dargestellt. In den Histogrammen ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) angegeben. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 3$) in Prozent der OT-I T-Zellen dar. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

CD44 und Ly6C wurden auf den Spenderzellen in vergleichbarer Stärke exprimiert. An Tag fünf *p.i.* waren die meisten Wildtyp OT-I T-Zellen für beide Moleküle positiv, was auf eine Aktivierung der Zellen hindeutet. Im Vergleich dazu wurde ein etwas geringerer Anteil der IRF4-defizienten CD8 T-Zellen CD44- bzw. Ly6C-positiv. Zusätzlich zeigten die CD44-positiven IRF4-defizienten CD8 T-Zellen eine verminderte Expressionsstärke dieses Proteins.

CD62L und CD27 wurden auf allen naiven Spenderzellen exprimiert. Nach der Aktivierung durch die Infektion erfolgte eine deutliche Herunterregulation beider Proteine auf den Wildtypkontrollzellen, die auf den IRF4-defizienten OT-I T-Zellen nahezu komplett unterblieb.

Beide Spenderzellpopulationen waren KLRG1-negativ. An Tag fünf *p.i.* wiesen etwa zwanzig Prozent der Wildtyp OT-I T-Zellen eine KLRG1-Expression auf. Die Expression dieses NK-Zellrezeptors war auf den IRF4-defizienten CD8 T-Zellen hingegen nicht nachweisbar.

Die CD127-Expression war für naive Wildtyp und IRF4-defiziente OT-I T-Zellen vergleichbar, nach Infektion sank sie bei beiden Populationen deutlich. Bei den IRF4-defizienten CD8 T-Zellen war die Reduktion deutlicher und ein größerer Anteil war CD127-negativ.

CD25 ist die α -Untereinheit des hochaffinen IL-2-Rezeptors und wird nach Antigenstimulation exprimiert. IL-2 fördert die Proliferation und Differenzierung der T-Zelle {Williams *et al.* 2007}. Auf den nicht aktivierten Spenderzellen war kein CD25 detektierbar. An Tag fünf hatten etwa dreißig Prozent der Wildtyp OT-I T-Zellen eine CD25-Expression erworben, von den IRF4-defizienten OT-I T-Zellen hingegen weniger als zehn Prozent.

CXCR3 ist ein Chemokinrezeptor, der auf aktivierten CD8 T-Zellen exprimiert wird und das Migrationsverhalten in Infektionen beeinflusst {Groom *et al.* 2011, Kohlmeier *et al.* 2011, Kurachi *et al.* 2011}. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zeigen, dass CD4 und CD8 T-Zellen, die im Rahmen einer Listerieninfektion aktiviert werden, CXCR3 positiv werden. Bei den Spenderzellen zeigte jeweils nur ein geringer Anteil eine CXCR3 Expression. Nach der Infektion waren über neunzig Prozent der Wildtyp Zellen und etwa achtzig Prozent der IRF4-defizienten Zellen CXCR3-positiv. Die Expressionsstärke von CXCR3 war jedoch bei IRF4-defizienten OT-I T-Zellen deutlich geringer.

NKG2D ist wie KLRG1 ein NK-Zellrezeptor der auf aktivierten CD8 T-Zellen exprimiert wird und bei Bindung seiner Liganden zur Zytotoxizität der Zellen beitragen kann {Champsaur *et al.* 2010}. Wie bei KLRG1 wiesen nur sehr wenige der naiven Spenderzellen beider Populationen eine NKG2D-Expression auf. Nach Aktivierung waren etwa zwanzig Prozent der Wildtyp OT-I T-Zellen NKG2D-positiv, aber nur fünf Prozent der IRF4-defizienten CD8 T-Zellen exprimierten NKG2D.

CD69 wird bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt der CD8 T-Zellaktivierung transient auf der Zelloberfläche exprimiert {Murphy *et al.* 2008}. Wie erwartet exprimierten die Spenderzellen kein CD69. Bei den Wildtyp Kontrollzellen fand sich an Tag fünf nur ein

geringer Anteil CD69-positiver Zellen, da die Expression vermutlich schon wieder abgesunken war. Erstaunlicherweise waren hingegen etwa acht Prozent der IRF4-defizienten OT-I T-Zellen CD69-positiv.

Insgesamt ist festzustellen, dass die naiven Wildtyp und IRF4-defizienten CD8 T-Zellen einen vergleichbaren Phänotyp aufwiesen. Nach Infektion zeigten sich aber deutliche Unterschiede für beinahe jedes untersuchte Protein. Die erhöhte Expression von CD44, Ly6C und CXCR3 deutet darauf hin, dass die OT-I T-Zellen im Verlauf der Infektion aktiviert wurden. Der fehlende Verlust von CD62L und CD27 zeigte jedoch, dass diese Aktivierung entweder nicht vollständig war oder die Differenzierung der Zellen einen anderen Verlauf nahm als die von Wildtypzellen. CD127 wurde auf beiden Zellpopulationen wie erwartet nach Aktivierung schwächer exprimiert als in naiven Zellen.

Die NK-Rezeptoren KLRG1 und NKG2D, sowie das zuvor untersuchte CD244 (Kapitel 3.2.7) sollten auf CD8 T-Effektorzellen die Zytotoxizität unterstützen. Diese Moleküle fehlten auf den aktivierten IRF4-defizienten Zellen nahezu komplett, was auch mit der verminderten Zytotoxizität korreliert (Kapitel 3.2.9).

Durch die CD25-Expression werden CD8 T-Zellen sensitiv gegenüber dem mitogenen Zytokin IL-2. Die marginale CD25 Expression auf IRF4-defizienten Zellen könnte den proliferativen Nachteil dieser Zellen erklären. Überraschenderweise findet sich auf IRF4-defizienten Zellen an Tag fünf noch immer das frühe Aktivierungsmolekül CD69. Eine Erklärung wäre eine Blockade oder Verzögerung der Differenzierung dieser Zellen, die sich ja bis Tag drei vergleichbar zu den Kontrollzellen entwickelt hatten.

Das Expressionsprofil der aktivierten IRF4-defizienten CD8 T-Zellen weist insgesamt viele Merkmale naiver CD8 T-Zellen auf. Naive CD8 T-Zellen haben aber viele Überschneidungen im Phänotyp mit Gedächtniszellen. Die deutlichen Hinweise auf die Aktivierung von IRF4-defizienten T-Zellen deuten daher entweder auf eine Blockade der Differenzierung oder auf eine präferentielle Entwicklung zu Gedächtniszellen hin. Im nächsten Teil der Arbeit sollte deshalb untersucht werden ob sich die IRF4-defizienten CD8 T-Zellen zu Gedächtniszellen entwickeln können.

3.3 Teil 2 – Die Rolle von IRF4 für das CD8 T-Zellvermittelte immunologische Gedächtnis und die sekundäre CD8 T-Zellantwort

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Rolle von IRF4 für das Überleben und die Gedächtnisfunktion von CD8 T-Zellen untersucht werden.

3.3.1 Die Langlebigkeit von CD8 T-Zellen ist IRF4-abhängig

Langlebigkeit ist eine charakteristische Eigenschaft von Gedächtniszellen {Kaech *et al.* 2012}. Zunächst wurde daher mehrere Wochen nach Infektion von Wildtyp und IRF4-defizienten Mäusen die Zahl der *LmOVA*-spezifischen CD8 T-Zellen bestimmt. Dieser Parameter gibt Auskunft über die Langlebigkeit der zytotoxischen T-Zellen.

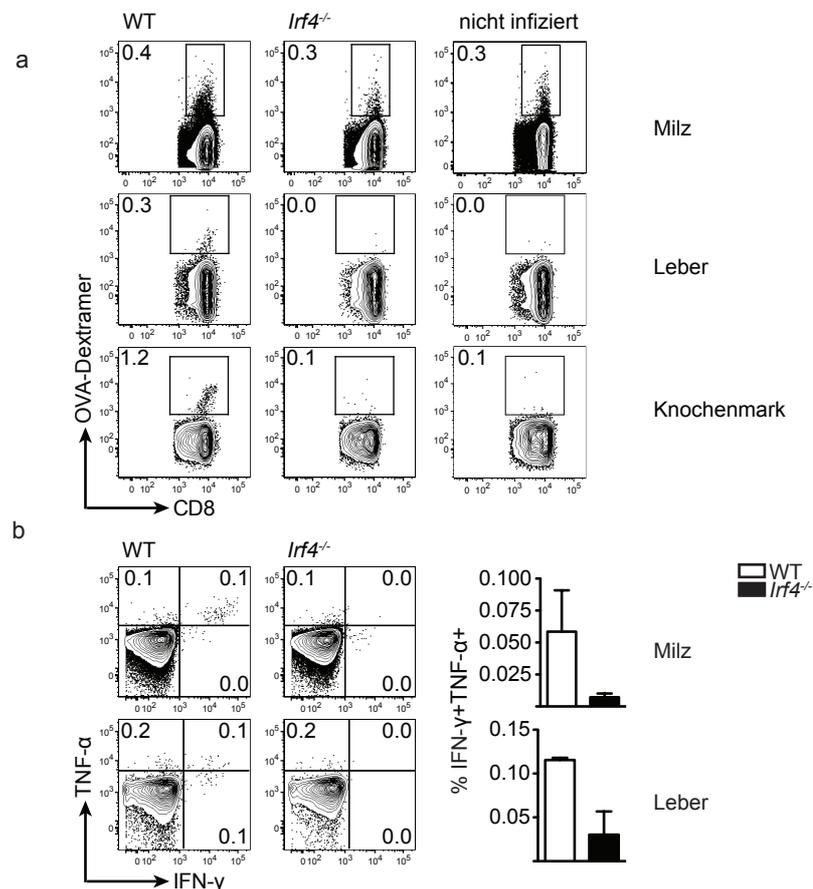


Abbildung 3.12 Untersuchung der Langlebigkeit funktionaler und antigenerkennender CD8 T-Zellen nach *LmOVA*-Infektion in Wildtyp und IRF4-defizienten Mäusen

(a) + (b) C57BL/6 Wildtyp und IRF4-defiziente Mäuse wurden mit 1×10^5 *LmOVA* infiziert. Vierzig Tage *p.i.* wurden die Lymphozyten aus verschiedenen Organen der infizierten Mäuse durchflusszytometrisch analysiert. Beispielhaft ist ein Experiment von zwei konsistenten Experimenten dargestellt. (a) Der Anteil (in Prozent) der Dextramer-positiven CD8 T-Zellen in Milz, Leber und Knochenmark wurde bestimmt. (b) Nach vierstündiger Restimulation der Lymphozyten mit OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid wurde der Anteil IFN-γ- und TNF-α-positiver Zellen der CD8 T-Zellen in Milz und Leber bestimmt. In den Quadranten sind die prozentualen Anteile positiver Zellen angegeben. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 3$) in Prozent der CD8 T-Zellen dar.

An Tag vierzig nach Infektion wurden die Lymphozyten aus Milz, Leber und Knochenmark isoliert. Die CD8 T-Zellen wurden mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert und die *Lm*OVA-spezifischen Zellen mit Hilfe von OVA₂₅₇₋₂₆₄-Dextrameren im Durchflusszytometer identifiziert (Abbildung 3.12a). Ein geringer Anteil von bis zu einem Prozent der Wildtyp CD8 T-Zellen in den untersuchten Organen war an Tag vierzig *p.i.* noch OVA₂₅₇₋₂₆₄-spezifisch, in den IRF4-defizienten Mäusen war dieser Anteil deutlich geringer und im Bereich der Dextramerfärbung in naiven Mäusen. Aufgrund der Nähe zu den Messwerten naiver Mäuse erlauben unsere Analysen keine eindeutigen Aussagen zum Vorhandensein spezifischer Gedächtniszellen in IRF4-defizienten Mäusen.

Die Milz- und Leberlymphozyten wurden wie zuvor beschrieben vier Stunden mit dem spezifischen Peptid stimuliert und anschließend nach Fixierung die Expression der Zytokine IFN- γ und TNF- α im Durchflusszytometer analysiert (Abbildung 3.12b). In Milz und Leber der Wildtyp-Mäuse waren weniger als ein Prozent der CD8 T-Zellen für beide Zytokine doppelt-positiv. Im Gegensatz dazu konnten in IRF4-defizienten Mäusen nahezu keine doppelt-positiven CD8 T-Zellen nachgewiesen werden. Dieser Befund korrelierte direkt mit den Ergebnissen der OVA₂₅₇₋₂₆₄-Dextramer-Analyse.

Zusammenfassend sprechen diese Ergebnisse gegen eine präferentielle Differenzierung der IRF4-defizienten CD8 T-Zellen zu Gedächtniszellen. Die Daten deuten eher auf eine verminderte Lebensdauer der aktivierten CD8 T-Zellen in IRF4-defizienten Mäusen hin.

3.3.2 Die Analyse der gesamten CD8 T-Zellpopulationen erlaubt keine Rückschlüsse auf die Rolle von IRF4 in der Differenzierung von Gedächtniszellen

Nach einer Listerieninfektion erholen sich Wildtypmäuse innerhalb von mehreren Wochen vollständig (siehe auch Abbildung 3.1). Auch der Phänotyp der gesamten CD8 T-Zellpopulation gleicht sich wieder dem naiven Zustand an. Nur bei einer gezielten Analyse von Listerien-spezifischen CD8 T-Zellen lässt sich ein Gedächtnisphänotyp nachweisen. Da mehrere Wochen nach Infektion in den IRF4-defizienten Mäusen fast keine spezifischen CD8 T-Zellen detektierbar waren, wurde die gesamte CD8 T-Zellpopulation der Wildtyp und IRF4-defizienten Mäuse verglichen.

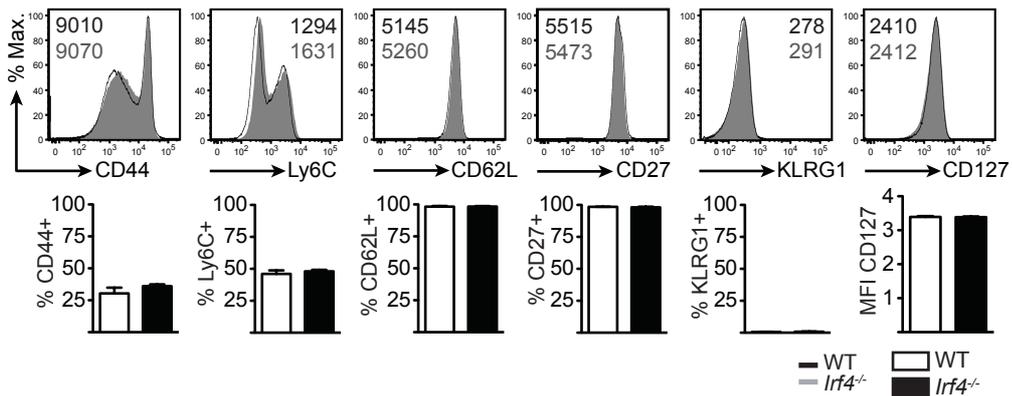


Abbildung 3.13 Untersuchung des Phänotyps CD8 T-Zellen lange nach *LmOVA*-Infektion in Wildtyp und IRF4-defizienten Mäusen

C57BL/6 Wildtyp und IRF4-defiziente Mäuse wurden mit 1×10^5 *LmOVA* infiziert. An Tag vierzig *p.i* wurde die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle auf den CD8 T-Zellen der Milz durchflusszytometrisch analysiert. Beispielhaft ist ein Experiment von zwei konsistenten Experimenten dargestellt. In den Histogrammen ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der jeweiligen Oberflächenmoleküle angegeben. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 3$) in Prozent der CD8 T-Zellen bzw. die mittlere Fluoreszenzintensität (CD127) dar.

Die Expression der Oberflächenmoleküle CD44, CD62L, Ly6C, KLRG1, CD127, und CD27 auf den CD8 T-Zellen wurde mit Hilfe von Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern im Durchflusszytometer analysiert (Abbildung 3.13). In Wildtyp und IRF4-defizienten Mäusen zeigte ein ähnlicher Anteil der Zellpopulationen eine CD44- und Ly6C-Expression, die dem Zustand in naiven Mäusen entsprach (Kapitel 3.2.3). Im Gegensatz zur akuten Infektion waren nahezu alle Zellen CD62L- und CD27-positiv. Ähnlich zu naiven Mäusen fanden sich keine KLRG1 exprimierenden CD8 T-Zellen. Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität für CD127 war im Vergleich zur akuten Infektion wieder angestiegen. Für alle untersuchten Moleküle waren jedoch keine Unterschiede zwischen Wildtyp und IRF4-defizienten CD8 T-Zellen festzustellen.

Insgesamt erlaubte die Analyse der gesamten CD8 T-Zellpopulationen keine Rückschlüsse auf eine Rolle von IRF4 in der Differenzierung von Gedächtniszellen. Da weiterhin die Anzahl der in den IRF4-defizienten Mäusen entstandenen spezifischen T-Zellen zu gering für eine phänotypische und funktionale Analyse war, wurde im Folgenden erneut auf ein T-Zelltransfermodell zurückgegriffen.

3.3.3 Auch im Langzeittransfer sind die IRF4-defizienten CD8 T-Zellen deutlich benachteiligt

Um die Unterschiede zwischen Wildtyp und IRF4-defizienten CD8 T-Gedächtniszellen untersuchen zu können sollte ein T-Zelltransfermodell verwendet werden. Leider ließen diese Langzeitversuche wegen Abstoßungsreaktionen keine Verwendung von Wildtyp Mäusen als Empfänger zu. Deshalb wurden RAG1-defiziente Mäuse verwendet, in denen auf Grund der B- und T-Zelldefizienz keine Abstoßungsreaktionen stattfinden.

Wildtyp und IRF4-defiziente OT-I T-Zellen wurden im gleichen Verhältnis gemischt und in RAG1-defiziente, *LmOVA*-infizierte Mäuse transferiert. Zusätzlich zu den OT-I T-Zellen wurden OT-II T-Zellen transferiert. Diese transgenen CD4 T-Zellen erkennen wie OT-I T-Zellen ein spezifisches Ovalbuminpeptid des *LmOVA*-Stamms und können den OT-I T-Zellen CD4 T-Zellhilfe geben. Insbesondere für eine effektive Sekundärantwort benötigen CD8 T-Zellen Hilfe durch CD4 T-Zellen {Barnden *et al.* 1998, Pamer *et al.* 2004, Williams *et al.* 2007}. Nach dem Transfer wurde den Mäusen wöchentlich Blut entnommen und das Verhältnis von Wildtyp zu IRF4-defizienten CD8 T-Zellen im Durchflusszytometer bestimmt. Nach acht Wochen wurden die Mäuse reinfiziert und die Untersuchung erneut an Tag fünf *p.i.* durchgeführt. Zusätzlich wurde in allen Blutproben die Expression von CD44 und CD62L auf den CD8 T-Zellen analysiert.

In Woche eins, der genaue Analysetag war Tag vier *p.i.*, lagen Wildtyp und IRF4-defiziente OT-I T-Zellen noch ähnlich dem Ausgangsverhältnis vor. Ab Woche zwei hatte sich das Verhältnis deutlich geändert und es waren etwa zehnmal mehr Wildtyp als IRF4-defiziente Zellen vorhanden. Dieses Verhältnis blieb bis Woche acht bestehen und verschob sich auch nach der Reinfektion nicht deutlich (Abbildung 3.14a).

Naive CD8 T-Zellen sind CD62L-positiv und CD44-negativ und zentrale Gedächtniszellen doppelpositiv für CD62L und CD44. Effektorzellen CD62L-negativ und CD44-positiv, Effektorgedächtniszellen ebenfalls CD62L-negativ und CD44-positiv {Williams 2007, Murphy *et al.* 2008, Kaech *et al.* 2012}. Wie zu erwarten, bestanden beide Spenderzellpopulationen zu über achtzig Prozent aus naiven CD8 T-Zellen (Abbildung 3.14b). Ab Woche zwei nach der Infektion waren sechzig Prozent der Wildtyp OT-I T-Zellen für CD44 positiv und für CD62L negativ und vierzig Prozent für beide Moleküle positiv. Bis Woche acht nahm der Anteil der CD62L-exprimierenden Zellen langsam wieder zu. Zu Beginn der Infektion, an Tag vier, durchliefen die Zellen eine

kurze Phase in der fast alle Zellen CD62L-CD44- doppelpositiv waren. Auch ein hoher Anteil der IRF4-defizienten OT-I T-Zellen war in Woche eins CD62L-CD44-doppelpositiv. Im Gegensatz zu den Kontrollzellen blieb dieser Phänotyp bei den IRF4-defizienten CD8 T-Zellen aber über acht Wochen nahezu unverändert. Nach der Reinfektion verloren die meisten Wildtyp OT-I T-Zellen erneut die CD62L-Expression und der Phänotyp entsprach dem vier Tage nach der Primärinfektion. Interessanterweise erwarben die IRF4-defizienten Zellen nach Reinfektion einen den Kontrollzellen vergleichbaren CD62L-negativen Phänotyp, was auf eine reguläre Differenzierung von zentralen Gedächtniszellen hin zu Effektorzellen hindeutet.

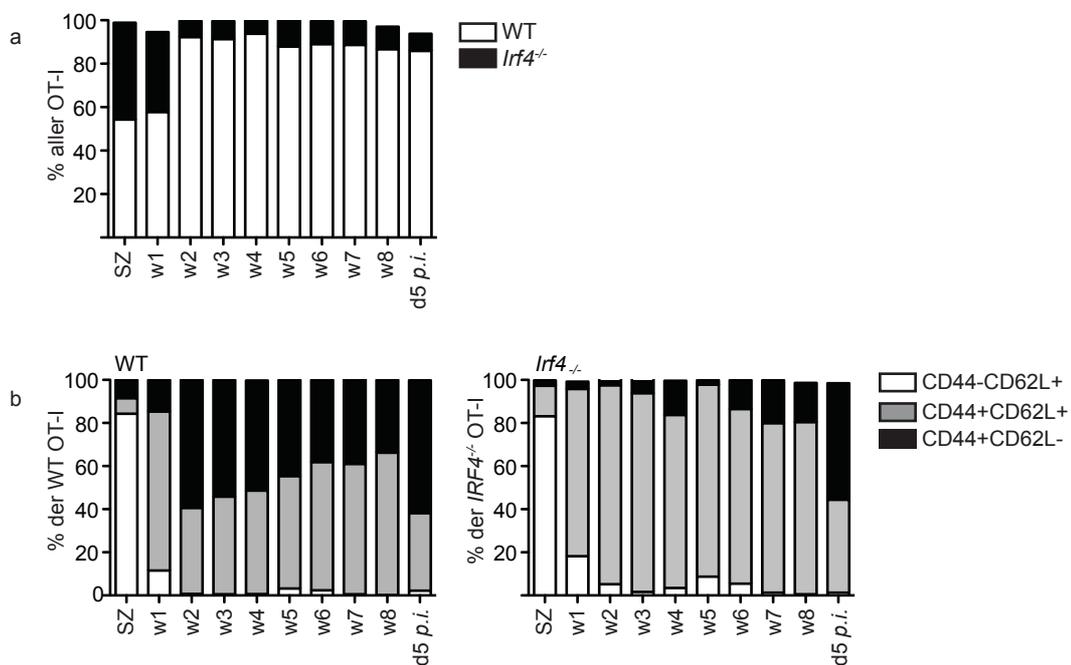


Abbildung 3.14 Langlebigkeit und Phänotyp von Wildtyp und IRF4-defizienten CD8 T-Zellen

Je 20.000 Wildtyp und IRF4-defiziente OT-I CD8 T-Zellen und Wildtyp OT-II CD4 T-Zellen aus transgenen C57BL/6 Mäusen wurden zu gleichen Anteilen gemischt und in mit 1×10^5 *LmOVA* infizierte RAG1-defiziente C57BL/6 Empfängermäuse injiziert. Acht Wochen lang wurde den Mäusen wöchentlich Blut entnommen und die Lymphozyten durchflusszytometrisch analysiert. In Woche acht wurde eine Reinfektion mit 1×10^5 *LmOVA* durchgeführt und nach fünf Tagen erneut Blut entnommen. Dargestellt sind die kombinierten Ergebnisse zweier Experimente. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 3$) in Prozent der OT-I T-Zellen dar. (a) Vor dem Transfer und zu den angegebenen Zeitpunkten wurde der Anteil der Wildtyp und IRF4-defizienten OT-I T-Zellen an allen OT-I T-Zellen bestimmt. (b) Vor dem Transfer und zu den angegebenen Zeitpunkten *p.i.* wurde die Expression der angegebenen Oberflächenmoleküle auf den OT-I T-Zellen analysiert. SZ = Spenderzellen

Diese Befunde zeigen, dass nach einer Infektion deutlich weniger langlebige IRF4-defiziente CD8 T-Zellen entstehen, diese Zellen dann aber über einen Zeitraum von acht Wochen stabil bleiben. Dies würde bedeuten, dass ein Fehlen von IRF4 zwar die Proliferation der CD8 T-Zellen hemmt, die Langlebigkeit der entstandenen Zellen aber nicht beeinträchtigt. Der geringere Anteil an IRF4-defizienten CD8 T-Zellen während der

Sekundärantwort beruht vermutlich auf dem geringeren Anteil dieser Zellen vor der Sekundärinfektion.

3.3.4 Nach Sekundärinfektion sind weniger IRF4-defiziente CD8 T-Zellen als Kontrollzellen in den infizierten Geweben

Um Primär- und Sekundärinfektion besser vergleichen zu können wurde eine zusätzliche Gruppe in das Experiment aufgenommen, in der RAG1-defiziente Mäuse zwar mit OT-I T-Zellen transferiert, aber nicht mit LmOVA infiziert wurden.

Allen Empfängermäusen wurde wie zuvor beschrieben in Woche acht nach Transfer Blut abgenommen und anschließend wurden alle Mäuse mit *LmOVA* infiziert. Für die bisher nicht infizierten Mäuse der Kontrollgruppe war diese Infektion daher einer Primärinfektion, für die andere Gruppe war die Infektion eine Sekundärinfektion. An Tag fünf *p.i.* wurde die Verteilung der Wildtyp und IRF4-defizienten CD8 T-Zellen in Blut, Milz, Leber, Lymphknoten und Knochenmark im Durchflusszytometer untersucht.

Im Vergleich zum eins-zu-eins-Verhältnis der Spenderzellen hatten die Wildtyp zu den IRF4-defizienten OT-I T-Zellen im Blut der infizierten Mäuse nach acht Wochen ein Verhältnis von etwa zehn zu eins (Abbildung 3.15a). Im Blut der nicht infizierten Mäuse war nach acht Wochen eine deutliche Population an transferierten Zellen messbar. Diese Expansion ist auf eine homöostatische Proliferation, die bei Lymphopenie beobachtet wird, zurückzuführen {Oehen *et al.* 1999}. Auch in den nichtinfizierten Mäusen hatte sich das Verhältnis von Wildtyp zu IRF4-defizienten Zellen verschoben, es war nun etwa zwei zu eins. Dies deutet darauf hin, dass auch bei einer nicht im Rahmen eines entzündlichen Prozesses induzierten Proliferation, wie der homöostatischen Proliferation, ein grundsätzlicher Nachteil für die IRF4-defizienten CD8 T-Zellen besteht.

An Tag fünf nach Infektion wurden in beiden Gruppen deutlich mehr Wildtyp als IRF4-defiziente OT-I T-Zellen in der Milz gefunden (Abbildung 3.15a und 3.15b). Auffällig war jedoch, dass in den sekundär infizierten Mäusen das bereits beschriebene Verhältnis von etwa zehn zu eins beobachtet werden konnte, während in den primär infizierten Mäusen ein Verhältnis von etwa zwei zu eins vorherrschte. Im Gegensatz dazu hatten die Zellen im Blut der primär infizierten Mäuse ebenfalls ein Verhältnis von zehn zu eins, was auf eine verstärkte Migration der IRF4-defizienten OT-I T-Zellen in die Gewebe oder

eine veränderte Proliferations- oder Sterberate dieser Zellen im Blut hindeuten könnte (Abbildung 3.15a).

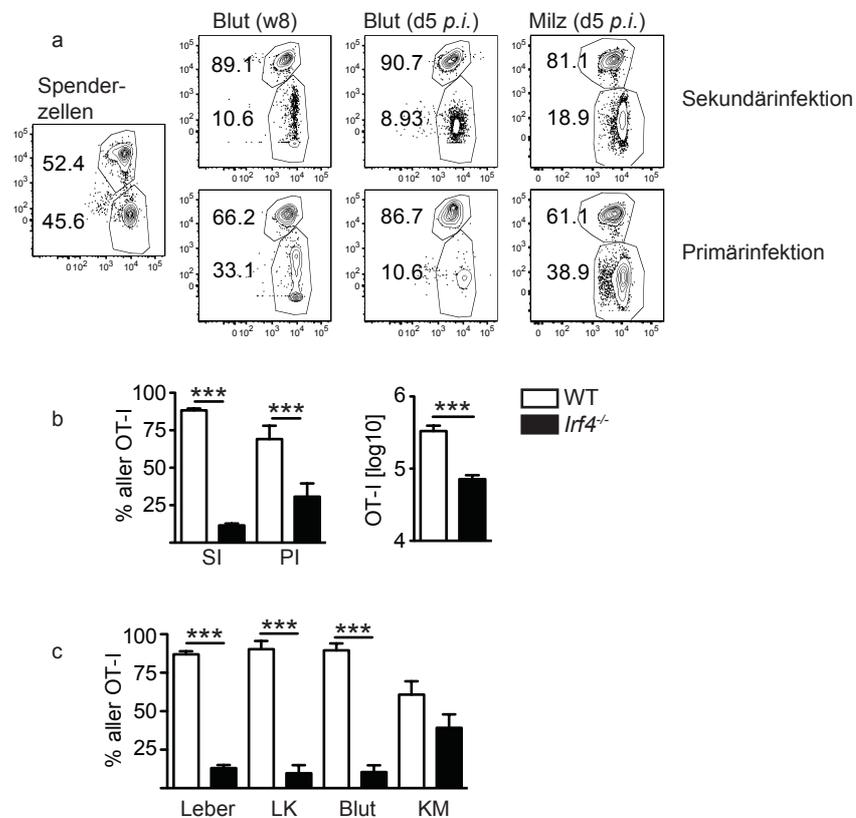


Abbildung 3.15 Verteilung von Wildtyp und IRF4-defizienten CD8 T-Zellen nach Primär- und Sekundärinfektion

Je 20.000 Wildtyp und IRF4-defiziente OT-I CD8 T-Zellen und Wildtyp OT-II CD4 T-Zellen aus transgenen C57BL/6 Mäusen wurden zu gleichen Anteilen gemischt und in mit 1×10^5 *LmOVA* infizierte oder nicht infizierte RAG1-defiziente C57BL/6 Empfängermäuse injiziert. Nach acht Wochen wurde den Mäusen Blut entnommen und die Lymphozyten durchflusszytometrisch analysiert. In Woche acht wurde eine Infektion der Empfängermäuse mit 1×10^5 *LmOVA* durchgeführt und nach fünf Tagen erneut Blut und verschiedene Organe entnommen. Die Lymphozyten wurden daraufhin durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die kombinierten Ergebnisse zweier Experimente. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 3$) dar. (a) Vor dem Transfer und zu den angegebenen Zeitpunkten wurde der Anteil (in Prozent) der Wildtyp und IRF4-defizienten OT-I T-Zellen an allen OT-I T-Zellen im Blut und der Milz der Empfängertiere bestimmt. (b) Nach Primärinfektion (PI) und Sekundärinfektion (SI) wurde der Anteil (in Prozent) und die Zellzahl (nur SI) der Wildtyp und IRF4-defizienten OT-I T-Zellen in der Milz der Empfängertiere bestimmt. (c) Nach Sekundärinfektion wurde der Anteil (in Prozent) der Wildtyp und IRF4-defizienten OT-I T-Zellen an allen OT-I T-Zellen in den angegebenen Organen der Empfängertiere bestimmt. LK = Lymphknoten, KM = Knochenmark *** $p < 0,001$

In Leber und Lymphknoten der sekundär infizierten Empfängermäuse war ebenfalls wieder das Verhältnis von zehn zu eins der Wildtyp zu IRF4-defizienten CD8 T-Zellen zu beobachten. Im Knochenmark herrschte ein Verhältnis von unter zwei zu eins (Abbildung 3.15c). Dies bedeutet, dass die IRF4-defizienten Zellen anscheinend eine größere Präferenz für eine Wanderung in das Knochenmark hatten, was typisch für zentrale Gedächtnislymphozyten wäre {Kaech *et al.* 2012}. Es könnte aber auch sein,

dass die IRF4-Defizienz lediglich zu einer verstärkten Expression von Oberflächenmolekülen führte, die eine Migration in das Knochenmark ermöglichten.

Erstaunlich war, dass sich das Verhältnis der transferierten T-Zellen bei einer Infektion acht Wochen nach dem Transfer nicht mehr dramatisch veränderte, und dies unabhängig davon war, ob kurz nach dem Transfer eine Infektion stattgefunden hatte. Eine mögliche Erklärung wäre, dass entweder als Folge der Infektion oder aufgrund der homöostatischen Proliferation nach acht Wochen eine relativ große Population an OT-I T-Zellen vorlag, so dass nicht alle Zellen durch die relativ geringe Infektionsdosis der späteren Infektion aktiviert werden konnten. Deshalb sollte die Proliferation direkt gemessen werden, sowie die Funktionalität der CD8 T-Zellen anhand der Zytokinproduktion untersucht werden.

3.3.5 CD8 T-Zellen benötigen IRF4 auch für die Zytokinproduktion und Proliferation im Rahmen der Sekundärinfektion

Da sich Gedächtniszellen nicht nur durch ihre Verteilung im Gewebe sondern auch durch ihre Eigenschaften auszeichnen wurden weitere Untersuchungen durchgeführt. Um die IRF4-defizienten CD8 T-Zellen funktional zu charakterisieren wurden sowohl nach Primär- als auch nach Sekundärinfektion Proliferation und Zytokinproduktion analysiert.

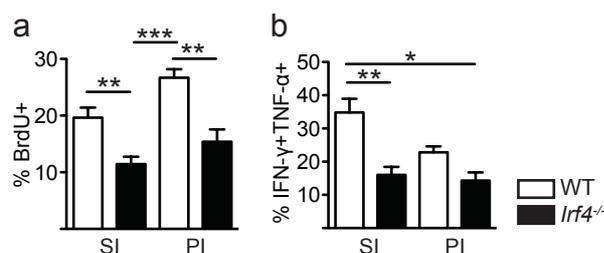


Abbildung 3.16 Proliferation und Zytokinproduktion von Wildtyp und IRF4-defizienten CD8 T-Zellen nach Primär- und Sekundärinfektion

Je 20.000 Wildtyp und IRF4-defiziente OT-I CD8 T-Zellen und Wildtyp OT-II CD4 T-Zellen aus transgenen C57BL/6 Mäusen wurden zu gleichen Anteilen gemischt und in mit 1×10^5 *LmOVA* infizierte oder nicht infizierte RAG1-defiziente C57BL/6 Empfängermäuse injiziert. In Woche acht wurde eine Infektion der Empfängermäuse mit 1×10^5 *LmOVA* durchgeführt und nach fünf Tagen die Lymphozyten der Milz durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die kombinierten Ergebnisse zweier Experimente. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 3$) in Prozent der OT-I T-Zellen dar. (a) Einen Tag vor der Organentnahme wurde den Mäusen 1 mg BrdU injiziert. Das Bild zeigt den Anteil der BrdU-positiven OT-I T-Zellen nach Primärinfektion (PI) und Sekundärinfektion (SI). Die BrdU-Färbung der OT-I T-Zellen erfolgte nach einem vom Hersteller definierten Färbeprotokoll. (b) Die Zytokinfärbung erfolgte nach vierstündiger Restimulation der Zellen mit OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid. Anteil der IFN- γ - und TNF- α -produzierenden OT-I T-Zellen. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Den RAG1-defizienten Empfängermäusen wurde an Tag vier *p.i.* BrdU injiziert, um an Tag fünf die Frequenz der proliferierten OT-I T-Zellen in der Milz zu bestimmen. Nach der Primärinfektion waren etwa fünfundzwanzig Prozent der Kontrollzellen proliferiert, von den IRF4-defizienten OT-I T-Zellen hingegen nur circa fünfzehn Prozent. Nach der Sekundärinfektion war in den Wildtypzellen der Anteil an proliferierten Zellen mit etwa zwanzig Prozent niedriger als nach der Primärinfektion. Auch für die Sekundärinfektion war eine deutliche Benachteiligung der IRF4-defizienten CD8 T-Zellen zu beobachten. Nur etwas mehr als zehn Prozent waren BrdU-positiv (Abbildung 3.16a).

Nach einer Stimulation von Milzzellen mit OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid wurde die Frequenz der IFN- γ und TNF- α doppelpositiven Zellen verglichen. Wie im Modell mit Wildtyp Empfängermäusen (Kapitel 3.2.4) konnte für die Primärinfektion eine geringere Frequenz von IFN- γ - und TNF- α -doppelpositiven OT-I T-Zellen unter IRF4-defizienten T-Zellen festgestellt werden (Abbildung 3.16b). Dieser Unterschied von etwa fünfundzwanzig zu fünfzehn Prozent war jedoch nicht signifikant, da die Werte großen Schwankungen unterlagen. Im Rahmen der Sekundärinfektion waren etwa fünfunddreißig Prozent der Wildtypzellen zytokinpositiv, deutlich mehr als im Rahmen der Primärinfektion. Im Gegensatz dazu war der Anteil der zytokinpositiven IRF4-defizienten CD8 T-Zellen mit dem der Primärinfektion vergleichbar und lag bei etwas über fünfzehn Prozent.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine IRF4-Defizienz der CD8 T-Zellen die Proliferation und Zytokinproduktion im Rahmen der Sekundärinfektion beeinträchtigt. Dies bedeutet auch, dass obgleich voraktivierte IRF4-defiziente CD8 T-Zellen phänotypisch Gedächtniszellen ähneln, sie nicht die funktionalen Eigenschaften dieser Zellen besitzen. IRF4 wird folglich sowohl für die Ausbildung einer effizienten primären als auch sekundären CD8 T-Zellantwort benötigt.

3.4 Teil 3 - Expression von IRF4 und potentiell von IRF4 abhängigen Proteinen

Im letzten Teil der vorliegenden Arbeit sollte die T-Zellrezeptor-abhängige Induktion der IRF4-Expression in CD8 T-Zellen im Rahmen der Immunantwort gegen Listerien untersucht werden. Zusätzlich sollte die IRF4-Abhängigkeit von Transkriptionsfaktoren, die eine Rolle in der CD8 T-Zelldifferenzierung spielen, analysiert werden. Schließlich sollten in einer Expressionsanalyse potentielle IRF4-Zielgene identifiziert werden. In diesen Experimenten sollten die dem veränderten CD8 T-Zellphänotyp zu Grunde liegenden Mechanismen aufgedeckt werden.

3.4.1 Im Rahmen der CD8 T-Zellantwort wird die IRF4-Expression in CD8 T-Zellen induziert

Um die IRF4-Expression zu untersuchen wurden CD8 T-Zellen entweder *in vitro* stimuliert oder *in vivo* in einem Transfermodell aktiviert. Die *in vitro*-Stimulation bietet den Vorteil, dass die Aktivierungsparameter relativ gut definiert werden können, während *in vivo* neben der direkten T-Zellrezeptorstimulation auch andere Stimuli die Expression beeinflussen können. So könnten zum Beispiel Zytokine oder andere im Rahmen der Immunantwort ausgelöste Signale ebenfalls die IRF4-Expression induzieren.

Milzzellen von OT-I Mäusen wurden in Nährmedium mit dem OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid inkubiert. Vor Inkubation, nach vier Stunden und nach zwanzig Stunden wurden Wildtyp und IRF4-defiziente OT-I T-Zellen mittels Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert und die Zellen fixiert. Anschließend wurde IRF4 intrazellulär mit einem Fluorochrom-konjugierten Antikörper gefärbt und die Expression im Durchflusszytometer analysiert (Abbildung 3.17a).

Wie erwartet zeigten die IRF4-defizienten Kontrollzellen keine IRF4-Expression, allerdings stieg die mittlere Fluoreszenzintensität von IRF4 etwas an, da sich Blasten bildeten und durch die Vergrößerung der Zellen auch die unspezifische Bindung des Antikörpers zunahm. Ohne Stimulation war nur eine leicht erhöhte mittlere Fluoreszenzintensität der Wildtyp OT-I T-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen erkennbar. Bereits nach vier Stunden zeigten die Wildtyp CD8 T-Zellen jedoch eine deutlich erhöhte mittlere Fluoreszenzintensität. Nach zwanzig Stunden war der größte Teil der Wildtypzellen deutlich IRF4-positiv. Da die Zellen mit dem T-Zellrezeptor-

spezifischen OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid stimuliert wurden, ist anzunehmen, dass die IRF4-Expression nach 4h direkt durch den T-Zellrezeptor ausgelöst wurde. Nach 20 Stunden könnten aber auch Zytokine der T-Zellen selbst oder Zytokine von anderen im Ansatz vorhandenen Zellen die IRF4 Expression fördern.

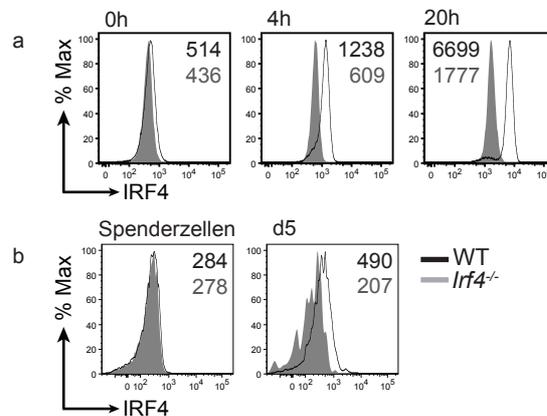


Abbildung 3.17 Untersuchung der IRF4-Expression von Wildtyp und IRF4-defizienten CD8 T-Zellen

Beispielhaft ist ein Experiment von zwei konsistenten Experimenten dargestellt. In den Histogrammen ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) angegeben. (a) 500.000 CD8 T-Zellen von Wildtyp und IRF4-defizienten OT-I Mäusen (C57BL/6) wurden mit dem OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid inkubiert. Vor Inkubation, nach vier Stunden und nach zwanzig Stunden wurden die Zellen fixiert. Anschließend wurde die IRF4-Expression durchflusszytometrisch analysiert (b) Je 20.000 Wildtyp und IRF4-defizienten OT-I CD8 T-Zellen aus transgenen C57BL/6 Mäusen wurden zu gleichen Anteilen gemischt und in mit 1×10^5 *LmOVA* infizierte kongene C57BL/6 Empfängermause injiziert. An Tag fünf *p.i.* wurden die Lymphozyten aus der Milz aufgereinigt. Vor dem Transfer und an Tag fünf *p.i.* wurde die Expression von IRF4 in den OT-I T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

Weiterhin wurde die IRF4-Expression in transferierten Wildtyp und IRF4-defizienten OT-I T-Zellen an Tag fünf nach Infektion und Transfer analysiert (siehe Kapitel 3.2.4). Nach Markierung der Wildtyp und IRF4-defizienten OT-I T-Zellen wurden die Zellen fixiert und IRF4 mit einem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper gefärbt. Die Analyse der Expression erfolgte im Durchflusszytometer (Abbildung 3.17b).

Die Wildtyp und IRF4-defizienten Spenderzellen zeigten eine ähnlich niedrige mittlere Fluoreszenzintensität. An Tag fünf nach Transfer war wie erwartet keine IRF4-Expression der IRF4-defizienten Kontrollzellen erkennbar. Im Gegensatz dazu war die IRF4-Expression in den Wildtyp OT-I T-Zellen deutlich angestiegen.

Zusammengefasst konnte sowohl eine direkte Induktion der IRF4-Expression durch T-Zellrezeptorstimulation gezeigt werden, als auch bewiesen werden, dass IRF4 in CD8 T-Zellen tatsächlich im Rahmen der Immunantwort exprimiert wird.

3.4.1 Die IRF4-Expression wird durch IL-12 beeinflusst und hat Auswirkungen auf die Induktion von T-Bet und EOMES

Kürzlich wurde gezeigt, dass IRF4 in T-Zellen mit einem Heterodimer aus BATF und weiteren AP-1 Proteinen kooperiert und so die Transkription verschiedener Proteine auslösen kann. Für BATF wurde in CD8 T-Zellen wiederum eine Interleukin-12 (IL-12) abhängige Induktion beschrieben. Außerdem finden sich Hinweise für eine Beeinflussung der mRNA-Expression des Transkriptionsfaktors T-Bet durch BATF im Rahmen der CD8 T-Zellaktivierung. Wie T-Bet ist auch der Transkriptionsfaktor Eomesodermin (EOMES) für die Entwicklung von CD8 Effektor- und Gedächtniszellen kritisch {Kuroda *et al.* 2011, Kaech *et al.* 2012, Martinez *et al.* 2012}.

Wildtyp und IRF4-defiziente CD8 T-Zellen wurden aus der Milz isoliert und im eins zu eins Verhältnis in anti-CD3 ϵ Antikörpern beschichteten Kulturschalen ausgesät. Der gegen CD3 gerichtete Antikörper ermöglichte die Aktivierung der T-Zellen. Zusätzlich wurden ein Antikörper gegen CD28 sowie IL-2 hinzugefügt um kostimulatorische Signale zur Verfügung zu stellen. In einem Ansatz wurden die Zellen zusätzlich mit IL-12 inkubiert. Nach zweitägiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen analysiert. Wildtyp und IRF4-defiziente OT-I T-Zellen konnten mit Hilfe der CD90-Allele identifiziert werden (siehe Kapitel 3.2.4). Die Zellen wurden fixiert und Färbungen mit Fluorochromgekoppelten Antikörpern gegen IRF4, T-Bet und EOMES durchgeführt. Anschließend erfolgte die Analyse im Durchflusszytometer.

Zunächst sollte der Einfluss von IL-12 auf die IRF4-Expression untersucht werden (Abbildung 3.18a). Wie erwartet war die mittlere Fluoreszenzintensität in beiden Ansätzen für IRF4-defiziente CD8 T-Zellen sehr niedrig. Im Gegensatz dazu zeigten die aktivierten Wildtypzellen eine deutlich höhere mittlere Fluoreszenzintensität für IRF4. Nach Zugabe von IL-12 nahm die Expression von IRF4 deutlich zu. Dies bedeutet, dass IL-12 und eventuell auch andere Faktoren außer der TZR-Stimulation einen fördernden Einfluss auf die IRF4-Expression hat.

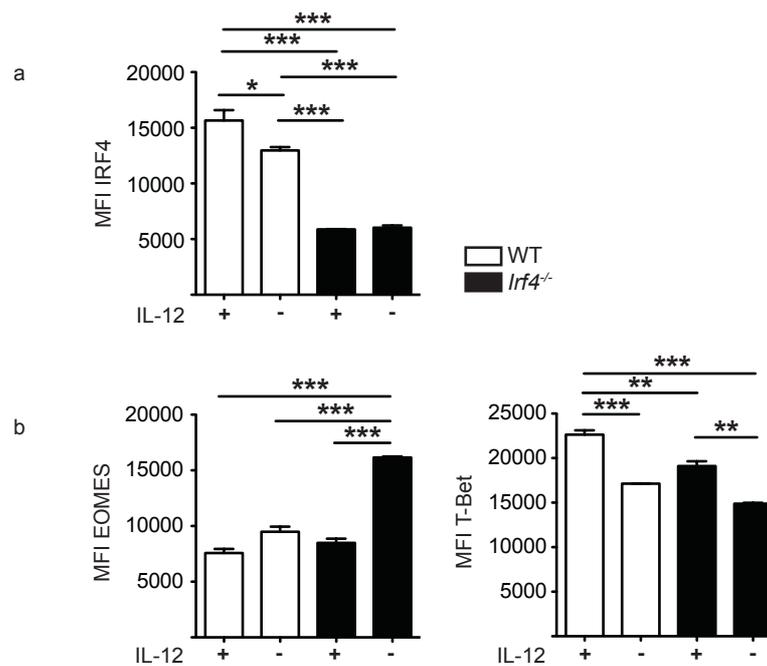


Abbildung 3.18 Untersuchung der IRF4-Expression von Wildtyp und IRF4-defizienten CD8 T-Zellen

Aus der Milz von Wildtyp und IRF4-defizienten C57BL/6-Mäusen wurden CD8 T-Zellen isoliert und im eins zu eins Verhältnis in mit anti-CD3ε Antikörpern (2 µg/mL) beschichteten Kulturschalen ausgesät. Zusätzlich wurden ein Antikörper gegen CD28 (1 µg/mL) sowie IL-2 (50 U/mL) hinzugefügt. In einem Ansatz wurden die Zellen zusätzlich mit IL-12 (10 ng/mL) inkubiert. Nach zweitägiger Inkubation wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Beispielhaft ist ein Experiment von zwei konsistenten Experimenten dargestellt. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte ± SEM (n=2) der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der CD8 T-Zellen dar. (a) Mittlere Fluoreszenzintensität von IRF4. (b) Mittlere Fluoreszenzintensität von EOMES und T-Bet. *p<0,05, **p<0,01, ***p < 0,001

Als Nächstes sollte der Einfluss von IRF4 und IL-12 auf die Expression der Transkriptionsfaktoren EOMES und T-Bet analysiert werden. Die IRF4-defizienten CD8 T-Zellen aus den Kulturen ohne IL-12-Zugabe wiesen im Gegensatz zu allen anderen Gruppen eine sehr hohe mittlere Fluoreszenzintensität für EOMES auf (Abbildung 3.18b). Die T-Bet-Expression war insgesamt relativ hoch. Nach IL-12-Zugabe stieg die T-Bet-Expression weiter an. IRF4-Defizienz der CD8 T-Zellen führte zu einer etwas niedrigeren mittleren Fluoreszenzintensität für T-Bet im Vergleich zu den jeweiligen Wildtypzellen. Zusammengefasst ist für EOMES festzustellen, dass sowohl IRF4, als auch IL-12 die Expression hemmen, aber nicht additiv wirken. Die T-Bet-Expression wird durch IRF4 und IL-12 gefördert, in diesem Fall ist eine additive Wirkung festzustellen.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass IRF4 eine Rolle in der IL-12 abhängigen Aktivierung der Expression der Transkriptionsfaktoren EOMES und T-Bet im Rahmen der CD8 T-Zellantwort spielt. Anschließend sollte die IRF4-abhängige Aktivierung dieser und weiterer Transkriptionsfaktoren auch *in vivo* bewiesen werden.

3.4.2 IRF4 reguliert die Expression verschiedener für die CD8 T-Zelldifferenzierung entscheidender Transkriptionsfaktoren

Zur Zeit werden in erster Linie drei Paare von Transkriptionsfaktoren diskutiert, die die Differenzierung von naiven CD8 T-Zellen zu Effektor- und Gedächtniszellen steuern. So ist die BLIMP1-, T-Bet- und ID2-Expression essentiell für die Reifung von Effektorzellen, während die Gedächtniszellen auf die Expression von BCL-6, EOMES und ID3 angewiesen sind. Um die Expression dieser Transkriptionsfaktoren in Abhängigkeit von IRF4 zu untersuchen wurden CD8 T-Zellen aus einem Transfer in RAG1-defiziente Mäuse gereinigt und eine Transkriptionsanalyse durchgeführt {Kaech *et al.* 2012}.

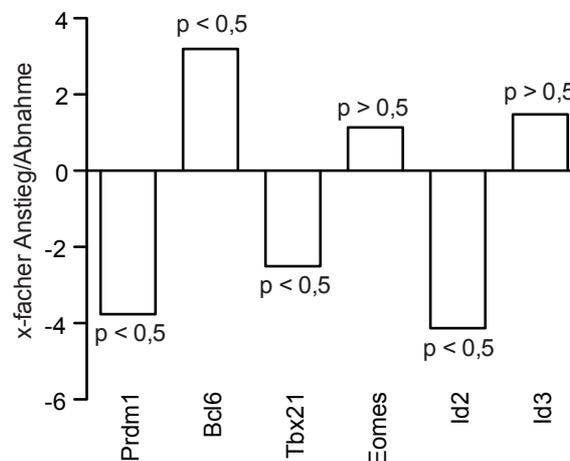


Abbildung 3.19 Untersuchung der Expression von für die Effektor- und Gedächtniszelldifferenzierung entscheidenden Transkriptionsfaktorpaaren in Wildtyp und IRF4-defizienten CD8 T-Zellen

Je 20.000 Wildtyp und IRF4-defiziente OT-I CD8 T-Zellen aus transgenen C57BL/6 Mäusen wurden zu gleichen Anteilen gemischt und in mit 1×10^5 *LmOVA* infizierte RAG1-defiziente Empfängermäuse (C57BL/6) injiziert. An Tag fünf *p.i.* wurden die OT-I T-Zellen aus der Milz mittels Durchflusszytometrie isoliert. Nach Aufreinigung der mRNA und Umschreibung in cDNA wurde das Transkriptom durch unseren Kooperationspartner mittels DNA-Chip-Technologie analysiert. Das erhaltene Expressionsprofil wurde gezielt auf die unterschiedliche Expression der interessierenden Transkriptionsfaktoren untersucht. Dargestellt sind die kombinierten Ergebnisse zweier Experimente.

Nach Transfer und Infektion wurden die Wildtyp und IRF4-defizienten CD8 T-Zellen an Tag fünf nach Transfer aus den Empfängermäusen mittels Durchflusszytometrie isoliert und die RNA gereinigt. Mit dieser mRNA wurde dann von unserem Kooperationspartnern Dr. Hans-Joachim Mollenkopf und Karin Hahnke (Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Berlin) mit einer DNA-Chip-Analyse eine globale Expressionsanalyse durchgeführt und dann das Expressionsprofil zwischen Wildtyp und IRF4-defizienten CD8 T-Zellen verglichen. Hierfür wurden zunächst die mRNA-Proben in cDNA umgeschrieben. Diese DNA-Proben wurden linear amplifiziert und mit unterschied-

lichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Dann wurden die Proben an einen DNA-Chip hybridisiert. Auf diesem Chip befanden sich Felder mit einer Bibliothek einzelsträngiger DNA-Sonden. Für jedes dieser Felder wurde die Fluoreszenzstärke ermittelt. Banden DNA-Proben der Wildtyp und IRF4-defizienten CD8 T-Zellen ergaben sich Mischfarben. Nach einer Normalisierung der Signale konnten Rückschlüsse auf differentiell exprimierte Gene gewonnen werden. Das von unseren Kooperationspartnern erhaltene Genexpressionsprofil wurde gezielt auf die unterschiedliche Expression der Transkriptionsfaktorpaare untersucht (Abbildung 3.19) {Malone *et al.* 2011}.

Prdm1, die für das Protein BLIMP1 codierende mRNA, wurde ebenso wie Tbx21 (T-Bet) und Id2 (ID2) in IRF4-defizienten CD8 T-Zellen deutlich reduziert exprimiert. Die Expression dieser Transkriptionsfaktoren ist entscheidend für die Entwicklung zu terminalen Effektorzellen. Bcl6 (BCL-6) wurde in IRF4-defizienten CD8 T-Zellen deutlich erhöht exprimiert, während die Expression von Eomes (EOMES) und Id3 (ID3) sich nicht signifikant unterschied. Diese Faktoren sind unabdingbar zur Gedächtniszellformierung. Insgesamt zeigen diese Befunde, dass IRF4-defiziente CD8 T-Zellen auf Grund ihrer reduzierten Expression von benötigten Transkriptionsfaktoren keine funktionalen Effektorzellen ausbilden können. Desweiteren ist auch die Entwicklung zu Gedächtniszellen fraglich, da die Zellen zwar verstärkt BCL-6 exprimieren aber keine veränderte Expression von ID3 und EOMES gegenüber Kontrollzellen zeigen.

4. Diskussion

Der Transkriptionsfaktor IRF4 ist als Schlüsselregulator für die Differenzierung verschiedener Zellen des adaptiven Immunsystems bekannt {Xu *et al.* 2012}. In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle von IRF4 für die Differenzierung zytotoxischer T-Zellen untersucht werden.

4.1 IRF4 reguliert die Differenzierung zu terminalen CD8 T-Effektorzellen

Die Klärung einer Listerieninfektion ist abhängig von der funktionierenden CD8 T-Zellantwort. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine eingeschränkte Eradikation von Listerien durch IRF4-defiziente Mäuse festgestellt. Um zu beweisen, dass dieser Defekt nicht auf dem IRF4-defizienten Umfeld beruhte wurden Wildtyp und IRF4-defiziente CD8 T-Zellen in infizierte Mäuse ohne Lymphozyten transferiert. Mit diesem Ansatz konnte gezeigt werden, dass die eingeschränkte Klärung zu einem großen Teil auf einem IRF4-Defekt der CD8 T-Zellen beruhte {Pamer 2004}.

Die Effizienz der CD8 T-Zellantwort basiert auf verschiedenen Mechanismen. Zunächst ist eine Expansion der Listerien-spezifischen T-Zellpopulation in der akuten Phase der Infektion unabdingbar. Dies spiegelt sich normalerweise auch in einer Zunahme der Gesamtzahl der CD8 T-Zellen wieder. In IRF4-defizienten Mäusen war eine Expansion der CD8 T-Zellpopulation nicht nachweisbar. Auch wurden in IRF4-defizienten Mäusen im Gegensatz zu den Wildtypmäusen nur sehr geringe Mengen von spezifischen CD8 T-Zellen detektiert. Um die Proliferation der Zellen direkt untersuchen zu können wurden transgene Wildtyp und IRF4-defiziente CD8 T-Zellen kompetitiv in Wildtypempfängermäuse transferiert. Diese transgenen Zellen erkannten Ovalbumin aus dem verwendeten für Ovalbumin rekombinanten Listerienstamm, waren also alle spezifische CD8 T-Zellen. Dieses Modell ermöglichte den direkten Vergleich identisch aktivierter Zellen im selben Umfeld. Nachdem für beide Populationen eine initiale Expansion stattgefunden hatte, konnten die IRF4-defizienten Zellen diese Expansion nicht aufrechterhalten. Dies beweist, dass die CD8 T-Zellen ein intrinsisches IRF4-Signal zur Expansion benötigen. Die eingeschränkte Expansion kann verschiedene Ursachen haben. Wichtige Eigenschaften von CD8 T-Zellen in der Effektorphase sind die Proliferation und die Apoptoseneigung der Zellen. Die Untersuchung der transferierten IRF4-defizienten CD8 T-Zellen zeigte im Vergleich zu den Kontrollzellen sowohl eine stark eingeschränkte Proliferation, als auch eine geringere Apoptoseneigung. Der Grund

der geringen Expansion scheint daher die reduzierte Proliferation der IRF4-defizienten CD8 T-Zellen zu sein {Hogquist *et al.* 1994, Foulds *et al.* 2002, Williams 2007}.

Verschiedene Mechanismen können die reduzierte Proliferation in Abwesenheit von IRF4 erklären. Eine Möglichkeit ist eine Exhaustion der CD8 T-Zellen. Die IRF4-defizienten CD8 T-Zellen wurden auf diesen Erschöpfungszustand hin untersucht, jedoch sprechen viele Befunde gegen diese Hypothese. Die Exhaustion geht mit der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle einher. Für die typischen Moleküle PD-1, CTLA-4 und CD244 konnte keine erhöhte Expression nachgewiesen werden. Lediglich das Molekül LAG-3 war leicht erhöht. Auch eine verstärkte Apoptoseneigung wäre typisch für die erschöpften T-Zellen, diese konnte wie zuvor besprochen nicht festgestellt werden. Insgesamt wäre die Exhaustion allerdings auch sehr untypisch für das akute Infektionsmodell der Listerieninfektion, da Zellen diesen Zustand normalerweise im Rahmen einer chronischen Infektion erwerben. Für die Untersuchung sollte daher ein chronisches Infektionsmodell, wie zum Beispiel die Infektion mit bestimmten LCMV-Stämmen, gewählt werden. Eine weitere Erklärung für die eingeschränkte Proliferation der IRF4-defizienten CD8 T-Zellen könnte die fehlende IL-2- und IL-2-Rezeptor- α (CD25)-Expression dieser Zellen sein. Die Stimulation der T-Zellproliferation durch IL-2 ist für eine optimale Expansion in der akuten Phase der Infektion unabdingbar. IL-2 kann sowohl durch CD4 T-Helferzellen als auch durch die CD8 T-Zelle selber zur Verfügung gestellt werden. Jedoch muss insbesondere im Rahmen der Sekundärantwort eine intrinsische Stimulation der CD8 T-Zelle mit IL-2 erfolgen. Dieses Phänomen würde auch die fehlende T-Zellproliferation im Transfermodell erklären, in dem IL-2 von Wildtyp CD4 T-Zellen vorhanden sein sollte {Murphy *et al.* 2008, Feau *et al.* 2011, Wherry 2011}.

Letztendlich könnte das abweichende Verhalten der IRF4-defizienten CD8 T-Zellen auf eine Blockade der generellen Differenzierung oder eine spezifische Blockade der Entwicklung zu terminalen Effektorzellen und folglich einer präferentiellen Entwicklung zu einem anderen Differenzierungsstadium hindeuten. Terminale CD8 T-Effektorzellen sind durch ihre Fähigkeit zur Produktion großer Mengen von proinflammatorischen Zytokinen und ihre Zytotoxizität gekennzeichnet. Sowohl in IRF4-defizienten Mäusen, als auch im Transfermodell konnten nach Infektion nur wenige IRF4-defiziente CD8 T-Zellen Zytokine wie IFN- γ und TNF- α und das zytotoxische Molekül Granzym B produzieren. Es konnte auch gezeigt werden, dass weniger IFN- γ pro Zelle produziert

wurde und dass die Zytotoxizität der Zellen stark eingeschränkt war. Dies bedeutet, dass die IRF4-Defizienz der CD8 T-Zellen sowohl die Zahl der generierten terminalen Effektorzellen einschränkte, als auch deren Erwerb von Effektormechanismen beeinträchtigte {Williams *et al.* 2007, Murphy *et al.* 2008, Kaech *et al.* 2012}.

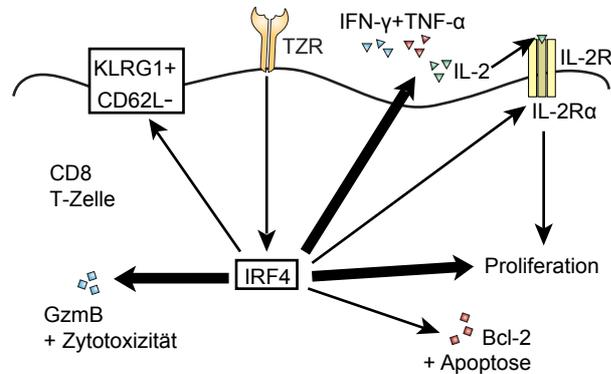


Abbildung 4.1 IRF4 steuert als Schlüsselregulator Funktionen der CD8 T-Effektorzellen

Die Untersuchung von im Rahmen einer Listerieninfektion aktivierten CD8 T-Zellen zeigte eine klare Rolle von IRF4 für die Differenzierung der Zellen zu terminalen Effektorzellen. So konnte nachgewiesen werden, dass IRF4 direkt oder indirekt für entscheidende Merkmale von Effektorzellen wie Proliferation, Apoptoseneigung, Zytotoxizität und Zytokinproduktion verantwortlich war. Auch war die Expression von für Effektorzellen typischen Oberflächenmolekülen, wie KLRG1 und CD62L, durch IRF4 beeinflusst. TZR = T-Zellrezeptor, IL-2R α = IL-2-Rezeptor- α , GzmB = Granzym B

Die verschiedenen Differenzierungsstadien von CD8 T-Zellen lassen sich mit Hilfe von verschiedenen Oberflächenmolekülen charakterisieren. Die vergleichende Analyse des Expressionsprofils IRF4-defizienter CD8 T-Zellen mit Wildtypkontrollzellen sollte Aufschluss über den Aktivierungszustand der Zellen liefern. Im naiven Zustand hatten sowohl die CD8 T-Zellen aus kompletten Mäusen, als auch die aus den TZR-transgenen Mäusen ein vergleichbares Expressionsprofil. Nach Infektion trat eine deutliche Veränderung des Expressionsprofils beider T-Zellpopulationen auf. Eine grundsätzliche Aktivierung der IRF4-defizienten CD8 T-Zellen wurde durch die verstärkte Expression der Moleküle CD44, Ly6C und CXCR3 bestätigt. Terminale Effektorzellen sollten auch eine Expression von NK-Rezeptoren wie KLRG1, NKG2D und CD244 aufweisen. CD62L und CD27 sollten hingegen deutlich reduziert sein. Für IRF4-defiziente CD8 T-Zellen konnte dieses Expressionsprofil im Gegensatz zu den Kontrollzellen nicht festgestellt werden. Die Zellen waren negativ für NK-Rezeptoren und behielten eine CD62L- und CD27-Expression bei. In diesem für die akute Phase der Infektion ungewöhnlichen Phänotyp ähneln die Zellen sowohl naiven CD8 T-Zellen, als auch Gedächtniszellen bzw. deren Vorläufern. Diese Beobachtungen beweisen, dass IRF4 als Schlüsselregulator die CD8 T-Effektorfunktionen steuert. Die Ergebnisse wurden in Abbildung 4.1 zusammen-

gefasst {Kambayashi *et al.* 2001, Williams 2007, Murphy *et al.* 2008, Champsaur *et al.* 2010, Kaech *et al.* 2012}.

4.3 IRF4 ist zur Generierung funktionaler Gedächtniszellen unabdingbar

Nach der akuten Phase der Infektion kommt es zur Kontraktion der CD8 T-Zellpopulation und zur Gedächtnisformierung. Das heißt, eine Population funktionaler, antigenspezifischer T-Gedächtniszellen hat auch nach der Eradikation des Erregers noch die Fähigkeit zu überleben. Während in Wildtypmäusen noch lange nach der Infektion spezifische und Zytokin-produzierende CD8 T-Zellen nachweisbar waren, war in den IRF4-defizienten Mäusen der Anteil dieser CD8 T-Zellen auf dem Niveau naiver Mäuse. Diese Daten sprechen gegen eine präferentielle Entwicklung von aktivierten IRF4-defizienten CD8 T-Zellen zu Gedächtniszellen, sie deuten sogar auf eine verminderte Lebensdauer der CD8 T-Zellen hin {Pamer 2004, Williams 2007, Kaech *et al.* 2012}.

Um eine Population spezifischer CD8 T-Zellen untersuchen zu können wurde auf ein T-Zelltransfermodell in Mäuse ohne Lymphozyten zurückgegriffen. Auch in diesem Modell zeigte sich eine geringere Akkumulation von IRF4-defizienten CD8 T-Zellen im Vergleich zu Wildtypzellen. Die IRF4-defiziente Population war aber über lange Zeit stabil. Im Unterschied zu den kompletten IRF4-defizienten Tieren, in denen keine Gedächtniszellen nachweisbar waren, könnten im Transfermodell sowohl das Wildtypumfeld als auch die transferierten Wildtyp CD4 und CD8 T-Zellen die für das Überleben notwendigen Signale liefern. Die Oberflächenmoleküle CD44 und CD62L ermöglichen die Unterscheidung von Effektorgedächtniszellen und zentralen Gedächtniszellen. Während Effektorgedächtniszellen nur für CD44 positiv sind, sind zentrale Gedächtniszellen doppelpositiv. Im Transfermodell hatten die meisten IRF4-defizienten CD8 T-Zellen von der Frühphase der Infektion an einen doppelpositiven Phänotyp und ähnelten demnach zentralen Gedächtniszellen. Nach Sekundärinfektion verloren IRF4-defiziente CD8 T-Zellen interessanterweise die CD62L-Expression, ein Hinweis auf die reguläre Differenzierung der Gedächtniszellen zu Effektorzellen. Trotzdem waren die Proliferation und die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen von IRF4-defizienten CD8 T-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen deutlich eingeschränkt. Insgesamt bedeuten diese Ergebnisse, dass IRF4 für die Entstehung von funktionalen CD8 T-Gedächtniszellen notwendig ist. Zusätzlich ist IRF4 während der akuten Sekundärantwort, vergleichbar zur akuten Primärantwort,

entscheidend für die Ausbildung von Effektorfunktionen der CD8 T-Zellen {Williams 2007, Kaech *et al.* 2012}.

4.4 IRF4 als Schlüsselregulator der CD8 T-Zelldifferenzierung

Der bisher potenteste in CD8 T-Zellen beschriebene Stimulus für die IRF4-Expression ist die TZR-Stimulation. Dies konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Jedoch können auch andere Signale wie z.B. proinflammatorische Zytokine die IRF4-Expression in CD8 T-Zellen beeinflussen. Für IL-21 {Josephine Ritter und Dr. Magdalena Huber, nicht veröffentlichte Beobachtungen} und IL-12 konnte eine Verstärkung der Expression nachgewiesen werden. Diese Befunde deuten auf eine Amplifikation der IRF4-Expression durch Signale im Rahmen der andauernden Infektion hin. Möglicherweise kann über diese Signale auch eine IRF4-Expression unabhängig vom TZR aufrechterhalten werden. In dem in Abbildung 4.2 dargestellten Modell sind die Auswirkung dieser Signale auf die von IRF4 abhängige Differenzierung zu terminalen Effektorzellen und Gedächtniszellen aufgeführt {Matsuyama *et al.* 1995, Xu *et al.* 2012}.

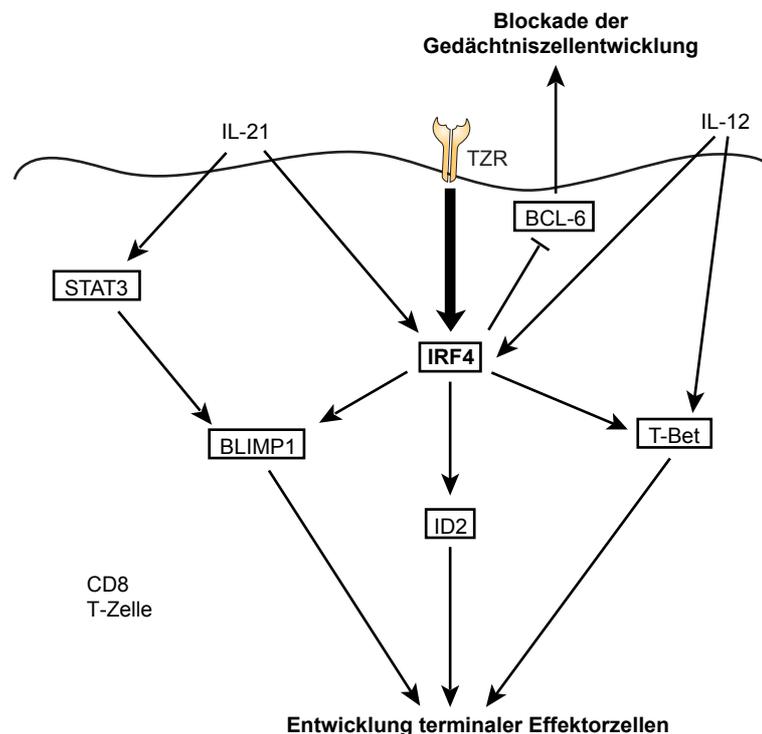


Abbildung 4.2 IRF4 steuert als Schlüsselregulator die Differenzierung von CD8 T-Zellen

Die IRF4-Expression wird durch den T-Zellrezeptor (TZR) induziert und kann durch IL-12 und IL-21 amplifiziert werden. IRF4 hat dann einen positiven Effekt auf die Expression der die Entwicklung terminaler CD8 T-Effektorzellen unterstützenden Transkriptionsfaktoren BLIMP1, ID2 und T-Bet. Im Gegensatz dazu hemmt IRF4 die Induktion des Transkriptionsfaktors BCL-6, welcher die Gedächtnisformierung unterstützt.

Verschiedene Transkriptionsfaktoren regulieren die Differenzierung zu CD8 T-Effektor- und Gedächtniszellen. Für IRF4 ist eine direkte oder indirekte Wirkung auf mehrere dieser Faktoren in B-Zellen oder T-Helferzellen bereits beschrieben. Die Untersuchung der Expression dieser auch für die CD8 T-Zelldifferenzierung entscheidenden Transkriptionsfaktoren lieferte Erklärungen für die abweichende Differenzierung IRF4-defizienter CD8 T-Zellen. So konnte in einem kompetitiven Transfermodell in Mäuse ohne Lymphozyten ein positiver Effekt von IRF4 auf die Expression der die Entwicklung terminaler Effektorzellen unterstützenden Transkriptionsfaktoren BLIMP1, ID2 und T-Bet beobachtet werden. Im Gegensatz dazu scheint IRF4 die Induktion des Transkriptionsfaktors BCL-6, welcher die Gedächtnisformierung unterstützt, zu hemmen {Kaech *et al.* 2012, Xu *et al.* 2012}.

Unveröffentlichte Daten unserer Kooperationspartner Josephine Ritter und Dr. Magdalena Huber (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Marburg) zeigen eine Induktion der BLIMP1-Expression durch IRF4 und die direkte Bindung von IRF4 an ein IL-21-Response-Element im Promotor des für BLIMP1 kodierenden *Prdm1*-Gens. Die IL-21-Signaltransduktion verläuft hauptsächlich über den STAT3-Signalweg. Die STAT3-Expression wird zwar nicht durch IRF4 beeinflusst, in T-Helferzellen wurde aber eine Kooperation von STAT3 und IRF4 am Promotor des *Prdm1*-Gens beschrieben. Daher ist auch in CD8 T-Zellen eine Kooperation der Transkriptionsfaktoren an diesem Promotor wahrscheinlich. Die entscheidende Rolle von IRF4 für die BLIMP1-Expression wird weiterhin durch die Beobachtung untermauert, dass nach einer Aktivierung im Rahmen einer Infektion der Phänotyp IRF4-defizienter CD8 T-Zellen viele Überschneidungen mit dem BLIMP1-defizienter CD8 T-Zellen aufweist. BLIMP1-defiziente CD8 T-Zellen können ebenfalls nicht zu funktionalen terminalen Effektorzellen differenzieren und exprimieren wie IRF4-defiziente CD8 T-Zellen kein KLRG1 und Granzym B. BLIMP1-defiziente CD8 T-Zellen entwickeln sich bevorzugt zu Gedächtniszellvorläufern und letztendlich zu funktional eingeschränkten Gedächtniszellen. IRF4-defiziente CD8 T-Zellen, ähneln vom Expressionsprofil ebenfalls Gedächtniszellen, bilden letztendlich jedoch auch keine voll funktionalen Gedächtniszellen. Weiterhin produzieren IRF4-defiziente CD8 T-Zellen, im Gegensatz zu BLIMP1-defizienten, nur sehr wenig IL-2. Dies deutet darauf hin, dass IRF4 weitere Mechanismen unabhängig von der BLIMP1-Expression kontrolliert {Kallies *et al.* 2009, Kwon *et al.* 2009,

Rutishauser *et al.* 2009, Kaech *et al.* 2012, Josephine Ritter und Dr. Magdalena Huber, nicht veröffentlichte Beobachtungen}.

T-Bet-defiziente CD8 T-Zellen können sich nicht zu KLRG1-positiven terminalen Effektorzellen entwickeln, hingegen wird eine Entwicklung zu Gedächtnisvorläufern gefördert. Hier zeigt sich, wie für BLIMP1-defiziente CD8 T-Zellen, eine Parallele zu IRF4-defizienten T-Zellen. Es ist bekannt, dass die T-Bet-Expression direkt durch den T-Zellrezeptor induziert und dann durch proinflammatorische Signale wie IL-12 amplifiziert wird. In dieser Arbeit wurde ein additiver Effekt von IRF4 und IL-12 auf die T-Bet-Expression beobachtet. Dies könnte darauf hindeuten, dass zumindest ein Teil der TZR-abhängigen T-Bet-Expression von IRF4 vermittelt wird. Der Einfluss von IRF4 auf die T-Bet-Expression ist ein weiterer Mechanismus über den IRF4 die Differenzierung zu terminalen Effektorzellen induziert {Intlekofer *et al.* 2007, Joshi *et al.* 2007, Kaech *et al.* 2012}.

ID2 ist ein Transkriptionsfaktor, der für das Überleben im Übergang von naiven zu CD8 T-Effektorzellen mitverantwortlich zu sein scheint und besonders stark in KLRG1-positiven terminalen Effektorzellen exprimiert wird. Dies korreliert gut mit der Beobachtung, dass IRF4 die ID2-Expression im Rahmen der Infektion positiv beeinflusst. IRF4 könnte auch über diesen Mechanismus die Entwicklung zu terminalen Effektorzellen fördern {Canarille *et al.* 2006, Yang *et al.* 2011, Kaech *et al.* 2012}.

In IRF4-defizienten CD8 T-Zellen wurde eine höhere BCL-6 Expression festgestellt, dies deutet auf eine Hemmung der Induktion dieses Transkriptionsfaktors, welcher die Gedächtnisformierung unterstützt, durch IRF4 hin. Die Hemmung kann durch verschiedene Mechanismen erklärt werden. Wahrscheinlich ist in jedem Fall eine Hemmung der BCL-6-Expression durch BLIMP1, welches von IRF4 induziert wird. Denn BLIMP1-defiziente weisen wie IRF4-defiziente CD8 T-Zellen erhöhte BCL-6-Level auf. Weiterhin findet vermutlich eine zusätzliche Hemmung durch das durch IRF4 induzierte T-Bet statt, dass mit dem verbleibenden BCL-6 Komplexe bilden kann. Eine direkte Wirkung von IRF4 auf die BCL-6 Expression ist ebenfalls möglich {Kallies *et al.* 2009, Oestreich *et al.* 2011, Kaech *et al.* 2012, Oestreich *et al.* 2012}.

In unseren Analysen konnte keine erhöhte Expression der die Gedächtnisformierung unterstützenden Gegenspieler von T-Bet und ID2, nämlich EOMES und ID3, in IRF4-defizienten CD8 T-Zellen beobachtet werden. Eine gesteigerte Expression dieser

Transkriptionsfaktoren wurde aber von unseren Kooperationspartner Josephine Ritter und Dr. Magdalena Huber (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Marburg) in einem abgewandelten Transfermodell beobachtet. Diese Analysen fanden dort nach einem Einzeltransfer von T-Zellen in Wildtypmäuse statt. Die abweichenden Ergebnisse könnten darauf zurückzuführen sein, dass eventuell eine Kompensation durch die Wildtyp CD8 T-Zellen im kompetitiven Modell stattgefunden hat. Zusätzlich könnten speziell in lymphopenischen Mäusen auftretende Mechanismen zu diesen Abweichungen führen. Für EOMES ist eine Induktion durch IL-2 und für ID3 eine Hemmung durch BLIMP1 beschrieben. Da diese Faktoren bei IRF4-Defizienz beeinflusst sind, wäre eine abweichende Expression von EOMES und ID3 eine logische Konsequenz. Zudem wurde im Rahmen dieser Arbeit in *in vitro*-Versuchen eine IRF4-abhängige Hemmung der EOMES-Expression in CD8 T-Zellen festgestellt. Trotz der in dieser Arbeit und durch unsere Kooperationspartner nachgewiesenen erhöhten Expression von die Gedächtnisformierung fördernden Transkriptionsfaktoren in IRF4-defizienten CD8 T-Zellen war keine vollständige und funktionale Gedächtnisbildung möglich. Dies deutet darauf hin, dass weitere essentielle Faktoren von IRF4 abhängig sein müssen {Pipkin *et al.* 2010, Ji *et al.* 2011, Kaech *et al.* 2012, Josephine Ritter und Dr. Magdalena Huber, nicht veröffentlichte Beobachtungen}.

Kürzlich wurde postuliert, dass die Kooperation von IRF4 mit Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie eine Art Türöffner für die Expression der für die Differenzierung adaptiver Immunzellen entscheidenden Transkriptionsfaktoren ist. So ist die Kooperation der Transkriptionsfaktoren BATF und IRF4 an AICE-Elementen ein entscheidender Schritt bei der Differenzierung von B-Zellen und T-Helferzellen. Die Kooperation der Faktoren erscheint auch im Fall von CD8 T-Zellen sehr wahrscheinlich, da BATF-defiziente CD8 T-Zellen nach Immunisierung einen sehr ähnlichen Phänotyp wie IRF4-defiziente CD8 T-Zellen aufweisen. So werden deutlich weniger BATF-defiziente spezifische CD8 T-Zellen als Wildtypkontrollzellen gebildet. Auch die Expression von Effektormolekülen, wie Granzym B und IFN- γ , und des Transkriptionsfaktors T-Bet war vergleichbar zur IRF4-Defizienz deutlich eingeschränkt {Kuroda *et al.* 2011, Ciofani *et al.* 2012, Glasmacher *et al.* 2012, Li *et al.* 2012, Martinez *et al.* 2012}.

Zusammenfassend sprechen diese Befunde eindeutig für die Rolle von IRF4 als Schlüsselregulator der CD8 T-Zelldifferenzierung. IRF4 kann auf Grund der vorliegenden Erkenntnisse als einer der zentralen Regulatoren der Differenzierung aller adaptiven

Immunzellen angesehen werden. In einem allen adaptiven Immunzellen gemeinsamen Mechanismus kann für IRF4 eine essentielle Rolle in der Steuerung der Effektor- bzw. Plasmazellreifung und Gedächtniszellentwicklung angenommen werden.

6. Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

AICE	<i>AP-1-IRF composite elements</i>
AP-1	<i>activator protein 1</i>
APC	Antigenpräsentierende Zelle
BATF	<i>B cell activating transcription factor</i>
BCL	<i>B cell lymphoma</i>
BLIMP1	<i>B lymphocyte activation protein 1</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
BrdU	Bromdesoxyuridin
CFDA-SE	Carboxyfluoreszein-Diacetat-Succinimidyl Ester
CFSE	Carboxyfluoreszein-Succinimidyl Ester
CFU	<i>colony forming units</i>
DC	dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
EICE	<i>Ets-IRF composite elements</i>
EOMES	Eomesodermin
Ets	<i>E-twenty six</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FITC	Fluorescein
FCS	Fetales Kälberserum
FLICA	<i>fluorescent labeled inhibitor of caspases</i>

FSC	forward scatter
FoxP3	Forkhead-Box Protein 3
GzmB	Granzym B
ID	<i>Inhibitor of DNA binding</i>
IAD	IRF-Assoziations-Domäne
IFN	Interferon
Inl	Internalin
IL	Interleukin
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
ISRE	<i>IFN-stimulated response element</i>
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
JAK	Januskinase
KLRG1	<i>killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1</i>
KM	Knochenmark
LAG-3	<i>lymphocyte activation gene 3</i>
LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitis Virus
LK	Lymphknoten
LLO	Listeriolysin O
<i>Lm</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
mTOR	<i>mammalian activator of rapamycin</i>
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells)</i>

NFκBκ	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NK	natürliche Killerzelle
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PD-1	<i>programmed death 1</i>
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
<i>p.i.</i>	post Infektion
PI	Primärinfektion
RAG1	<i>recombination activation gene 1</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
SI	Sekundärinfektion
SOCS	<i>supressor of cytokine signalling</i>
SSC	<i>side scatter</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
SZ	Spenderzellen
T-Bet	<i>T-Box transcription factor Tbx21</i>
Th	T-Helferzellen
T _{EM}	T-Effektorgedächtniszellen
T _{CM}	zentrale T-Gedächtniszellen
Treg	regulatorische T-Zellen
TSB	<i>tryptic soy broth</i>
TZR	T-Zellrezeptor
WT	Wildtyp

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Lebenszyklus des Bakteriums <i>Listeria monocytogenes</i>	10
Abbildung 1.2 MHC I-abhängige Präsentation von Listerienpeptiden	13
Abbildung 1.3 Die reziproke Aktivität von Transkriptionsfaktoren kontrolliert die CD8 T-Effektor- und Gedächtniszelldifferenzierung	16
Abbildung 1.4 Die Kooperation von IRF4 und AP-1-Transkriptionsfaktoren	22
Abbildung 3.1 Listerienlast in der Milz von Wildtyp und IRF4-defizienten Mäusen	46
Abbildung 3.2 Listerienlast und CD8 T-Zellzahlen nach <i>LmOVA</i> -Infektion in Wildtyp und IRF4-defizienten Mäusen und die Abhängigkeit der Listerienklärung von CD8 T-Zellen und IRF4	48
Abbildung 3.3 Untersuchung der Ausbildung funktionaler und antigenerkennender CD8 T-Zellen nach <i>LmOVA</i> -Infektion in Wildtyp und IRF4-defizienten Mäusen	51
Abbildung 3.4 Untersuchung des Phänotyps von CD8 T-Zellen nach <i>LmOVA</i> -Infektion in Wildtyp und IRF4-defizienten Mäusen	53
Abbildung 3.5 Untersuchung der Verteilung von Wildtyp und IRF4-defizienten CD8 T-Zellen in einem kompetitiven Transfermodell	56
Abbildung 3.6 Untersuchung der Apoptose von Wildtyp und IRF4-defizienten CD8 T-Zellen	57
Abbildung 3.7 Untersuchung der Proliferation von Wildtyp und IRF4-defizienten CD8 T-Zellen	59
Abbildung 3.8 Untersuchung der Exhaustion von Wildtyp und IRF4-defizienten CD8 T-Zellen	61
Abbildung 3.9 Untersuchung der Zytokinproduktion von Wildtyp und IRF4-defizienten CD8 T-Zellen	63
Abbildung 3.10 Untersuchung der Zytotoxizität von Wildtyp und IRF4-defizienten CD8 T-Zellen	65
Abbildung 3.11 Untersuchung des Phänotyps von Wildtyp und IRF4-defizienten CD8 T-Zellen	67
Abbildung 3.12 Untersuchung der Langlebigkeit funktionaler und antigenerkennender CD8 T-Zellen nach <i>LmOVA</i> -Infektion in Wildtyp und IRF4-defizienten Mäusen	70

Abbildung 3.13 Untersuchung des Phänotyps CD8 T-Zellen lange nach <i>LmOVA</i> -Infektion in Wildtyp und IRF4-defizienten Mäusen	72
Abbildung 3.14 Langlebigkeit und Phänotyp von Wildtyp und IRF4-defizienten CD8 T-Zellen	74
Abbildung 3.15 Verteilung von Wildtyp und IRF4-defizienten CD8 T-Zellen nach Primär- und Sekundärinfektion	76
Abbildung 3.16 Proliferation und Zytokinproduktion von Wildtyp und IRF4-defizienten CD8 T-Zellen nach Primär- und Sekundärinfektion	77
Abbildung 3.17 Untersuchung der IRF4-Expression von Wildtyp und IRF4-defizienten CD8 T-Zellen	80
Abbildung 3.18 Untersuchung der IRF4-Expression von Wildtyp und IRF4-defizienten CD8 T-Zellen	82
Abbildung 3.19 Untersuchung der Expression von für die Effektor- und Gedächtniszell differenzierung entscheidenden Transkriptionsfaktorpaaren in Wildtyp und IRF4-defizienten CD8 T-Zellen	83
Abbildung 4.1 IRF4 steuert als Schlüsselregulator Funktionen der CD8 T-Effektorzellen	87
Abbildung 4.2 IRF4 steuert als Schlüsselregulator die Differenzierung von CD8 T-Zellen	89

6.3 Literaturverzeichnis

Badovinac, V. P., B. B. Porter and J. T. Harty (2004). "CD8+ T cell contraction is controlled by early inflammation." Nat Immunol **5**(8): 809-817.

Barnden, M. J., J. Allison, W. R. Heath and F. R. Carbone (1998). "Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements." Immunol Cell Biol **76**(1): 34-40.

Biswas, P. S., S. Gupta, E. Chang, L. Song, R. A. Stirzaker, J. K. Liao, G. Bhagat and A. B. Pernis (2010). "Phosphorylation of IRF4 by ROCK2 regulates IL-17 and IL-21 production and the development of autoimmunity in mice." J Clin Invest **120**(9): 3280-3295.

Brustle, A., S. Heink, M. Huber, C. Rosenplanter, C. Stadelmann, P. Yu, E. Arpaia, T. W. Mak, T. Kamradt and M. Lohoff (2007). "The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4." Nat Immunol **8**(9): 958-966.

Cannarile, M. A., N. A. Lind, R. Rivera, A. D. Sheridan, K. A. Camfield, B. B. Wu, K. P. Cheung, Z. Ding and A. W. Goldrath (2006). "Transcriptional regulator Id2 mediates CD8+ T cell immunity." Nat Immunol **7**(12): 1317-1325.

Casanova, J. E. (2007). "Regulation of Arf activation: the Sec7 family of guanine nucleotide exchange factors." Traffic **8**(11): 1476-1485.

Champsaur, M. and L. L. Lanier (2010). "Effect of NKG2D ligand expression on host immune responses." Immunol Rev **235**(1): 267-285.

Ciofani, M., A. Madar, C. Galan, M. Sellars, K. Mace, F. Pauli, A. Agarwal, W. Huang, C. N. Parkurst, M. Muratet, K. M. Newberry, S. Meadows, A. Greenfield, Y. Yang, P. Jain, F. K. Kirigin, C. Birchmeier, E. F. Wagner, K. M. Murphy, R. M. Myers, R. Bonneau and D. R. Littman (2012). "A validated regulatory network for Th17 cell specification." Cell **151**(2): 289-303.

Cretney, E., A. Xin, W. Shi, M. Minnich, F. Masson, M. Miasari, G. T. Belz, G. K. Smyth, M. Busslinger, S. L. Nutt and A. Kallies (2011). "The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells." Nat Immunol **12**(4): 304-311.

- Crotty, S., R. J. Johnston and S. P. Schoenberger (2010). "Effectors and memories: Bcl-6 and Blimp-1 in T and B lymphocyte differentiation." Nat Immunol **11**(2): 114-120.
- Cruz-Guilloty, F., M. E. Pipkin, I. M. Djuretic, D. Levanon, J. Lotem, M. G. Lichtenheld, Y. Groner and A. Rao (2009). "Runx3 and T-box proteins cooperate to establish the transcriptional program of effector CTLs." J Exp Med **206**(1): 51-59.
- Cui, W., N. S. Joshi, A. Jiang and S. M. Kaech (2009). "Effects of Signal 3 during CD8 T cell priming: Bystander production of IL-12 enhances effector T cell expansion but promotes terminal differentiation." Vaccine **27**(15): 2177-2187.
- Cui, W., Y. Liu, J. S. Weinstein, J. Craft and S. M. Kaech (2011). "An interleukin-21-interleukin-10-STAT3 pathway is critical for functional maturation of memory CD8+ T cells." Immunity **35**(5): 792-805.
- Davis, M. M., J. D. Altman and E. W. Newell (2011). "Interrogating the repertoire: broadening the scope of peptide-MHC multimer analysis." Nat Rev Immunol **11**(8): 551-558.
- Feau, S., R. Arens, S. Togher and S. P. Schoenberger (2011). "Autocrine IL-2 is required for secondary population expansion of CD8(+) memory T cells." Nat Immunol **12**(9): 908-913.
- Foulds, K. E., L. A. Zenewicz, D. J. Shedlock, J. Jiang, A. E. Troy and H. Shen (2002). "Cutting edge: CD4 and CD8 T cells are intrinsically different in their proliferative responses." J Immunol **168**(4): 1528-1532.
- Gil, M. P., R. Salomon, J. Louten and C. A. Biron (2006). "Modulation of STAT1 protein levels: a mechanism shaping CD8 T-cell responses in vivo." Blood **107**(3): 987-993.
- Glasmacher, E., S. Agrawal, A. B. Chang, T. L. Murphy, W. Zeng, B. Vander Lugt, A. A. Khan, M. Ciofani, C. J. Spooner, S. Rutz, J. Hackney, R. Nurieva, C. R. Escalante, W. Ouyang, D. R. Littman, K. M. Murphy and H. Singh (2012). "A genomic regulatory element that directs assembly and function of immune-specific AP-1-IRF complexes." Science **338**(6109): 975-980.
- Groom, J. R. and A. D. Luster (2011). "CXCR3 in T cell function." Exp Cell Res **317**(5): 620-631.

Hamon, M., H. Bierne and P. Cossart (2006). "Listeria monocytogenes: a multifaceted model." Nat Rev Microbiol **4**(6): 423-434.

Heiss, K., N. Janner, B. Mahnss, V. Schumacher, F. Koch-Nolte, F. Haag and H. W. Mittrucker (2008). "High sensitivity of intestinal CD8+ T cells to nucleotides indicates P2X7 as a regulator for intestinal T cell responses." J Immunol **181**(6): 3861-3869.

Hemdan, N. Y., G. Birkenmeier, G. Wichmann, A. M. Abu El-Saad, T. Krieger, K. Conrad and U. Sack (2010). "Interleukin-17-producing T helper cells in autoimmunity." Autoimmun Rev **9**(11): 785-792.

Hogquist, K. A., S. C. Jameson, W. R. Heath, J. L. Howard, M. J. Bevan and F. R. Carbone (1994). "T cell receptor antagonist peptides induce positive selection." Cell **76**(1): 17-27.

Horgan, K., S. Shaw and M. Boirivant (2009). "Immunomagnetic purification of T cell subpopulations." Curr Protoc Immunol **Chapter 7**: Unit7 4.

Huber, M., A. Brustle, K. Reinhard, A. Guralnik, G. Walter, A. Mahiny, E. von Low and M. Lohoff (2008). "IRF4 is essential for IL-21-mediated induction, amplification, and stabilization of the Th17 phenotype." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(52): 20846-20851.

Huber, M., S. Heink, A. Pagenstecher, K. Reinhard, J. Ritter, A. Visekruna, A. Guralnik, N. Bollig, K. Jeltsch, C. Heinemann, E. Wittmann, T. Buch, O. Prazeres da Costa, A. Brustle, D. Brenner, T. W. Mak, H. W. Mittrucker, B. Tackenberg, T. Kamradt and M. Lohoff (2013). "IL-17A secretion by CD8+ T cells supports Th17-mediated autoimmune encephalomyelitis." J Clin Invest **123**(1): 247-260.

Ichii, H., A. Sakamoto, M. Hatano, S. Okada, H. Toyama, S. Taki, M. Arima, Y. Kuroda and T. Tokuhisa (2002). "Role for Bcl-6 in the generation and maintenance of memory CD8+ T cells." Nat Immunol **3**(6): 558-563.

Ichii, H., A. Sakamoto, Y. Kuroda and T. Tokuhisa (2004). "Bcl6 acts as an amplifier for the generation and proliferative capacity of central memory CD8+ T cells." J Immunol **173**(2): 883-891.

Intlekofer, A. M., N. Takemoto, C. Kao, A. Banerjee, F. Schambach, J. K. Northrop, H. Shen, E. J. Wherry and S. L. Reiner (2007). "Requirement for T-bet in the aberrant differentiation of unhelped memory CD8+ T cells." J Exp Med **204**(9): 2015-2021.

Intlekofer, A. M., N. Takemoto, E. J. Wherry, S. A. Longworth, J. T. Northrup, V. R. Palanivel, A. C. Mullen, C. R. Gasink, S. M. Kaech, J. D. Miller, L. Gapin, K. Ryan, A. P. Russ, T. Lindsten, J. S. Orange, A. W. Goldrath, R. Ahmed and S. L. Reiner (2005). "Effector and memory CD8⁺ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin." Nat Immunol **6**(12): 1236-1244.

Jaakkola, I., M. Merinen, S. Jalkanen and A. Hanninen (2003). "Ly6C induces clustering of LFA-1 (CD11a/CD18) and is involved in subtype-specific adhesion of CD8 T cells." J Immunol **170**(3): 1283-1290.

Jameson, S. C. and D. Masopust (2009). "Diversity in T cell memory: an embarrassment of riches." Immunity **31**(6): 859-871.

Ji, Y., Z. Pos, M. Rao, C. A. Klebanoff, Z. Yu, M. Sukumar, R. N. Reger, D. C. Palmer, Z. A. Borman, P. Muranski, E. Wang, D. S. Schrumpp, F. M. Marincola, N. P. Restifo and L. Gattinoni (2011). "Repression of the DNA-binding inhibitor Id3 by Blimp-1 limits the formation of memory CD8⁺ T cells." Nat Immunol **12**(12): 1230-1237.

Johnson, R., D. W. Lancki and F. W. Fitch (1993). "Accessory molecules involved in antigen-mediated cytotoxicity and lymphokine production by cytotoxic T lymphocyte subsets. I. Identification of functions for the T cell surface molecules Ly-6C and Thy-1." J Immunol **151**(6): 2986-2999.

Joshi, N. S., W. Cui, A. Chandele, H. K. Lee, D. R. Urso, J. Hagman, L. Gapin and S. M. Kaech (2007). "Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8⁽⁺⁾ T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor." Immunity **27**(2): 281-295.

Joshi, N. S., W. Cui, C. X. Dominguez, J. H. Chen, T. W. Hand and S. M. Kaech (2011). "Increased numbers of preexisting memory CD8 T cells and decreased T-bet expression can restrain terminal differentiation of secondary effector and memory CD8 T cells." J Immunol **187**(8): 4068-4076.

Kaech, S. M. and W. Cui (2012). "Transcriptional control of effector and memory CD8⁺ T cell differentiation." Nat Rev Immunol **12**(11): 749-761.

Kaech, S. M., J. T. Tan, E. J. Wherry, B. T. Konieczny, C. D. Surh and R. Ahmed (2003). "Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells." Nat Immunol **4**(12): 1191-1198.

Kalia, V., S. Sarkar, S. Subramaniam, W. N. Haining, K. A. Smith and R. Ahmed (2010). "Prolonged interleukin-2/Ralpha expression on virus-specific CD8+ T cells favors terminal-effector differentiation in vivo." Immunity **32**(1): 91-103.

Kallies, A., A. Xin, G. T. Belz and S. L. Nutt (2009). "Blimp-1 transcription factor is required for the differentiation of effector CD8(+) T cells and memory responses." Immunity **31**(2): 283-295.

Kambayashi, T., E. Assarsson, B. J. Chambers and H. G. Ljunggren (2001). "Cutting edge: Regulation of CD8(+) T cell proliferation by 2B4/CD48 interactions." J Immunol **167**(12): 6706-6710.

Keppler, S. J., K. Rosenits, T. Koegl, S. Vucikuja and P. Aichele (2012). "Signal 3 cytokines as modulators of primary immune responses during infections: the interplay of type I IFN and IL-12 in CD8 T cell responses." PLoS One **7**(7): e40865.

Keppler, S. J., K. Theil, S. Vucikuja and P. Aichele (2009). "Effector T-cell differentiation during viral and bacterial infections: Role of direct IL-12 signals for cell fate decision of CD8(+) T cells." Eur J Immunol **39**(7): 1774-1783.

Klein, U., S. Casola, G. Cattoretti, Q. Shen, M. Lia, T. Mo, T. Ludwig, K. Rajewsky and R. Dalla-Favera (2006). "Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination." Nat Immunol **7**(7): 773-782.

Klein, U. and R. Dalla-Favera (2008). "Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy." Nat Rev Immunol **8**(1): 22-33.

Kohlmeier, J. E., W. W. Reiley, G. Perona-Wright, M. L. Freeman, E. J. Yager, L. M. Connor, E. L. Brincks, T. Cookenham, A. D. Roberts, C. E. Burkum, S. Sell, G. M. Winslow, M. A. Blackman, M. Mohrs and D. L. Woodland (2011). "Inflammatory chemokine receptors regulate CD8(+) T cell contraction and memory generation following infection." J Exp Med **208**(8): 1621-1634.

Kurachi, M., J. Kurachi, F. Suenaga, T. Tsukui, J. Abe, S. Ueha, M. Tomura, K. Sugihara, S. Takamura, K. Kakimi and K. Matsushima (2011). "Chemokine receptor CXCR3 facilitates CD8(+) T cell differentiation into short-lived effector cells leading to memory degeneration." J Exp Med **208**(8): 1605-1620.

Kuroda, S., M. Yamazaki, M. Abe, K. Sakimura, H. Takayanagi and Y. Iwai (2011). "Basic leucine zipper transcription factor, ATF-like (BATF) regulates epigenetically and energetically effector CD8 T-cell differentiation via Sirt1 expression." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(36): 14885-14889.

Kursar, M., K. Bonhagen, A. Kohler, T. Kamradt, S. H. Kaufmann and H. W. Mittrucker (2002). "Organ-specific CD4+ T cell response during *Listeria monocytogenes* infection." J Immunol **168**(12): 6382-6387.

Kursar, M., U. E. Hopken, M. Koch, A. Kohler, M. Lipp, S. H. Kaufmann and H. W. Mittrucker (2005). "Differential requirements for the chemokine receptor CCR7 in T cell activation during *Listeria monocytogenes* infection." J Exp Med **201**(9): 1447-1457.

Kwon, H., D. Thierry-Mieg, J. Thierry-Mieg, H. P. Kim, J. Oh, C. Tunyaplin, S. Carotta, C. E. Donovan, M. L. Goldman, P. Tailor, K. Ozato, D. E. Levy, S. L. Nutt, K. Calame and W. J. Leonard (2009). "Analysis of interleukin-21-induced Prdm1 gene regulation reveals functional cooperation of STAT3 and IRF4 transcription factors." Immunity **31**(6): 941-952.

Lambrechts, A., K. Gevaert, P. Cossart, J. Vandekerckhove and M. Van Troys (2008). "Listeria comet tails: the actin-based motility machinery at work." Trends Cell Biol **18**(5): 220-227.

Lamont, R. F., J. Sobel, S. Mazaki-Tovi, J. P. Kusanovic, E. Vaisbuch, S. K. Kim, N. Uldbjerg and R. Romero (2011). "Listeriosis in human pregnancy: a systematic review." J Perinat Med **39**(3): 227-236.

Lech, M., M. Weidenbusch, O. P. Kulkarni, M. Ryu, M. N. Darisipudi, H. E. Susanti, H. W. Mittruecker, T. W. Mak and H. J. Anders (2011). "IRF4 deficiency abrogates lupus nephritis despite enhancing systemic cytokine production." J Am Soc Nephrol **22**(8): 1443-1452.

Leonard, W. J. and J. J. O'Shea (1998). "Jaks and STATs: biological implications." Annu Rev Immunol **16**: 293-322.

Li, P., R. Spolski, W. Liao, L. Wang, T. L. Murphy, K. M. Murphy and W. J. Leonard (2012). "BATF-JUN is critical for IRF4-mediated transcription in T cells." Nature **490**(7421): 543-546.

Lin, J. X., P. Li, D. Liu, H. T. Jin, J. He, M. Ata Ur Rasheed, Y. Rochman, L. Wang, K. Cui, C. Liu, B. L. Kelsall, R. Ahmed and W. J. Leonard (2012). "Critical Role of STAT5 transcription factor tetramerization for cytokine responses and normal immune function." Immunity **36**(4): 586-599.

Lischke, T., V. Schumacher, J. Wesolowski, R. Hurwitz, F. Haag, F. Koch-Nolte and H. W. Mittrucker (2013). "CD8beta ADP-ribosylation affects CD8 T-cell function." Eur J Immunol.

Lohoff, M., H. W. Mittrucker, S. Pechtl, S. Bischof, F. Sommer, S. Kock, D. A. Ferrick, G. S. Duncan, A. Gessner and T. W. Mak (2002). "Dysregulated T helper cell differentiation in the absence of interferon regulatory factor 4." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(18): 11808-11812.

Low, J. C. and W. Donachie (1997). "A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis." Vet J **153**(1): 9-29.

Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M., Myrtek, D. (2009). Der Experimentator Immunologie, 3. Auflage, Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag: 58ff., 77ff., 229

Lyons, A. B. (2000). "Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution." J Immunol Methods **243**(1-2): 147-154.

Malone, J. H. and B. Oliver (2011). "Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome." BMC Biol **9**: 34.

Martinez, G. J. and A. Rao (2012). "Immunology. Cooperative transcription factor complexes in control." Science **338**(6109): 891-892.

Masopust, D., S. J. Ha, V. Vezys and R. Ahmed (2006). "Stimulation history dictates memory CD8 T cell phenotype: implications for prime-boost vaccination." J Immunol **177**(2): 831-839.

Matsuyama, T., A. Grossman, H. W. Mittrucker, D. P. Siderovski, F. Kiefer, T. Kawakami, C. D. Richardson, T. Taniguchi, S. K. Yoshinaga and T. W. Mak (1995). "Molecular cloning of LSIRF, a lymphoid-specific member of the interferon regulatory factor family that binds the interferon-stimulated response element (ISRE)." Nucleic Acids Res **23**(12): 2127-2136.

- Minges Wols, H. A. and P. L. Witte (2008). "Plasma cell purification from murine bone marrow using a two-step isolation approach." J Immunol Methods **329**(1-2): 219-224.
- Mittrucker, H. W., M. Kursar, A. Kohler, R. Hurwitz and S. H. Kaufmann (2001). "Role of CD28 for the generation and expansion of antigen-specific CD8(+) T lymphocytes during infection with *Listeria monocytogenes*." J Immunol **167**(10): 5620-5627.
- Mittrucker, H. W., T. Matsuyama, A. Grossman, T. M. Kundig, J. Potter, A. Shahinian, A. Wakeham, B. Patterson, P. S. Ohashi and T. W. Mak (1997). "Requirement for the transcription factor LSIRF/IRF4 for mature B and T lymphocyte function." Science **275**(5299): 540-543.
- Mudter, J., J. Yu, C. Zufferey, A. Brustle, S. Wirtz, B. Weigmann, A. Hoffman, M. Schenk, P. R. Galle, H. A. Lehr, C. Mueller, M. Lohoff and M. F. Neurath (2011). "IRF4 regulates IL-17A promoter activity and controls ROR γ -dependent Th17 colitis in vivo." Inflamm Bowel Dis **17**(6): 1343-1358.
- Murphy, K., Travers, P. Walport, M. (2008). Janeway's Immunobiology, 7. Auflage, New York, Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.: 111ff., 219ff., 323ff., 497ff., 735ff.
- Nguyen, K. B., W. T. Watford, R. Salomon, S. R. Hofmann, G. C. Pien, A. Morinobu, M. Gadina, J. J. O'Shea and C. A. Biron (2002). "Critical role for STAT4 activation by type 1 interferons in the interferon-gamma response to viral infection." Science **297**(5589): 2063-2066.
- Obar, J. J., E. R. Jellison, B. S. Sheridan, D. A. Blair, Q. M. Pham, J. M. Zickovich and L. Lefrancois (2011). "Pathogen-induced inflammatory environment controls effector and memory CD8+ T cell differentiation." J Immunol **187**(10): 4967-4978.
- Oehen, S. and K. Brduscha-Riem (1999). "Naive cytotoxic T lymphocytes spontaneously acquire effector function in lymphocytopenic recipients: A pitfall for T cell memory studies?" Eur J Immunol **29**(2): 608-614.
- Oestreich, K. J., A. C. Huang and A. S. Weinmann (2011). "The lineage-defining factors T-bet and Bcl-6 collaborate to regulate Th1 gene expression patterns." J Exp Med **208**(5): 1001-1013.

- Oestreich, K. J., S. E. Mohn and A. S. Weinmann (2012). "Molecular mechanisms that control the expression and activity of Bcl-6 in TH1 cells to regulate flexibility with a TFH-like gene profile." Nat Immunol **13**(4): 405-411.
- Palmer, D. C. and N. P. Restifo (2009). "Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in T cell differentiation, maturation, and function." Trends Immunol **30**(12): 592-602.
- Pamer, E. G. (2004). "Immune responses to *Listeria monocytogenes*." Nat Rev Immunol **4**(10): 812-823.
- Pearce, E. L. and H. Shen (2007). "Generation of CD8 T cell memory is regulated by IL-12." J Immunol **179**(4): 2074-2081.
- Pipkin, M. E., J. A. Sacks, F. Cruz-Guilloty, M. G. Lichtenheld, M. J. Bevan and A. Rao (2010). "Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells." Immunity **32**(1): 79-90.
- Rao, R. R., Q. Li, M. R. Gubbels Bupp and P. A. Shrikant (2012). "Transcription factor Foxo1 represses T-bet-mediated effector functions and promotes memory CD8(+) T cell differentiation." Immunity **36**(3): 374-387.
- Rao, R. R., Q. Li, K. Odunsi and P. A. Shrikant (2010). "The mTOR kinase determines effector versus memory CD8+ T cell fate by regulating the expression of transcription factors T-bet and Eomesodermin." Immunity **32**(1): 67-78.
- Rutishauser, R. L., G. A. Martins, S. Kalachikov, A. Chandele, I. A. Parish, E. Meffre, J. Jacob, K. Calame and S. M. Kaech (2009). "Transcriptional repressor Blimp-1 promotes CD8(+) T cell terminal differentiation and represses the acquisition of central memory T cell properties." Immunity **31**(2): 296-308.
- Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp and A. Lanzavecchia (1999). "Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions." Nature **401**(6754): 708-712.
- Schittek, B., K. Rajewsky and I. Forster (1991). "Dividing cells in bone marrow and spleen incorporate bromodeoxyuridine with high efficiency." Eur J Immunol **21**(1): 235-238.

Sciammas, R., A. L. Shaffer, J. H. Schatz, H. Zhao, L. M. Staudt and H. Singh (2006). "Graded expression of interferon regulatory factor-4 coordinates isotype switching with plasma cell differentiation." *Immunity* **25**(2): 225-236.

Siegel, A. M., J. Heimall, A. F. Freeman, A. P. Hsu, E. Brittain, J. M. Brenchley, D. C. Douek, G. H. Fahle, J. I. Cohen, S. M. Holland and J. D. Milner (2011). "A critical role for STAT3 transcription factor signaling in the development and maintenance of human T cell memory." *Immunity* **35**(5): 806-818.

Smolewski, P., J. Grabarek, H. D. Halicka and Z. Darzynkiewicz (2002). "Assay of caspase activation in situ combined with probing plasma membrane integrity to detect three distinct stages of apoptosis." *J Immunol Methods* **265**(1-2): 111-121.

Soroosh, P. and T. A. Doherty (2009). "Th9 and allergic disease." *Immunology* **127**(4): 450-458.

Staudt, V., E. Bothur, M. Klein, K. Lingnau, S. Reuter, N. Grebe, B. Gerlitzki, M. Hoffmann, A. Ulges, C. Taube, N. Dehzad, M. Becker, M. Stassen, A. Steinborn, M. Lohoff, H. Schild, E. Schmitt and T. Bopp (2010). "Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells." *Immunity* **33**(2): 192-202.

Surh, C. D. and J. Sprent (2008). "Homeostasis of naive and memory T cells." *Immunity* **29**(6): 848-862.

Takemoto, N., A. M. Intlekofer, J. T. Northrup, E. J. Wherry and S. L. Reiner (2006). "Cutting Edge: IL-12 inversely regulates T-bet and eomesodermin expression during pathogen-induced CD8⁺ T cell differentiation." *J Immunol* **177**(11): 7515-7519.

Tamura, T., H. Yanai, D. Savitsky and T. Taniguchi (2008). "The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis." *Annu Rev Immunol* **26**: 535-584.

van Engeland, M., L. J. Nieland, F. C. Ramaekers, B. Schutte and C. P. Reutelingsperger (1998). "Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure." *Cytometry* **31**(1): 1-9.

Voehringer, D., C. Blaser, P. Brawand, D. H. Raulet, T. Hanke and H. Pircher (2001). "Viral infections induce abundant numbers of senescent CD8 T cells." *J Immunol* **167**(9): 4838-4843.

- Wherry, E. J. (2011). "T cell exhaustion." Nat Immunol **12**(6): 492-499.
- Wiesel, M., J. Crouse, G. Bedenikovic, A. Sutherland, N. Joller and A. Oxenius (2012). "Type-I IFN drives the differentiation of short-lived effector CD8+ T cells in vivo." Eur J Immunol **42**(2): 320-329.
- Williams, M. A. and M. J. Bevan (2007). "Effector and memory CTL differentiation." Annu Rev Immunol **25**: 171-192.
- Workman, C. J., L. S. Cauley, I. J. Kim, M. A. Blackman, D. L. Woodland and D. A. Vignali (2004). "Lymphocyte activation gene-3 (CD223) regulates the size of the expanding T cell population following antigen activation in vivo." J Immunol **172**(9): 5450-5455.
- Xu, W. D., H. F. Pan, D. Q. Ye and Y. Xu (2012). "Targeting IRF4 in autoimmune diseases." Autoimmun Rev **11**(12): 918-924.
- Yang, C. Y., J. A. Best, J. Knell, E. Yang, A. D. Sheridan, A. K. Jesionek, H. S. Li, R. R. Rivera, K. C. Lind, L. M. D'Cruz, S. S. Watowich, C. Murre and A. W. Goldrath (2011). "The transcriptional regulators Id2 and Id3 control the formation of distinct memory CD8+ T cell subsets." Nat Immunol **12**(12): 1221-1229.
- Zajac, A. J., J. N. Blattman, K. Murali-Krishna, D. J. Sourdive, M. Suresh, J. D. Altman and R. Ahmed (1998). "Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function." J Exp Med **188**(12): 2205-2213.
- Zheng, Y., A. Chaudhry, A. Kas, P. de Roos, J. M. Kim, T. T. Chu, L. Corcoran, P. Treuting, U. Klein and A. Y. Rudensky (2009). "Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses." Nature **458**(7236): 351-356.
- Zheng, Y., S. Z. Josefowicz, A. Kas, T. T. Chu, M. A. Gavin and A. Y. Rudensky (2007). "Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells." Nature **445**(7130): 936-940.

6.4 Publikationsverzeichnis

Während der Promotion wurden folgende Artikel veröffentlicht:

Herda, S., F. Raczkowski, H. W. Mittrucker, G. Willimsky, K. Gerlach, A. A. Kuhl, T. Breiderhoff, T. E. Willnow, B. Dorken, U. E. Hopken and A. Rehm (2012). "The sorting receptor Sortilin exhibits a dual function in exocytic trafficking of interferon-gamma and granzyme A in T cells." Immunity **37**(5): 854-866.

Raczkowski, F.*, J. Ritter*, K. Heesch, V. Schumacher, L. Höcker, H. Raifer, M. Klein, T. Bopp, H. Harb, D. A. Kesper, P. I. Pfefferle, M. Grusdat, P. A. Lang, H.-W. Mittrücker and M. Huber (2013). „The transcription factor Interferon Regulatory Factor 4 controls peripheral CD8 T cell Differentiation.“ Zum Zeitpunkt des Drucks bei PNAS zur Veröffentlichung akzeptiert * gleicher Beitrag (contributed equally)

Während der Promotion wurden folgende Beiträge auf Kongressen präsentiert:

Vorträge:

Raczkowski, F., K. Heiss, V. Schumacher, H.-W. Mittrücker „The role of the ectoenzyme CD39 in T cell responses to *Listeria monocytogenes*.“ 14. Symposium “Infektion und Immunabwehr“, Rothenfels 2010

Raczkowski, F., K. Heiss, V. Schumacher, K. Heesch, H.-W. Mittrücker „The role of the ectoenzyme CD39 in the T-cell response against *Listeria monocytogenes*.“ 40. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Leipzig 2010

Poster:

Raczkowski, F., K. Heiss, V. Schumacher, K. Heesch, H.-W. Mittrücker, „The role of the ectoenzyme CD39 in the T-cell response against *Listeria monocytogenes*.“ 40. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Leipzig 2010

Raczkowski, F., K. Heiss, V. Schumacher, K. Heesch, H.-W. Mittrücker „CD39 plays opposite roles in innate and adaptive response to *Listeria monocytogenes*.“ 41. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Riccione 2011

6.5 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den 15.04.2013

Danksagung

Ich danke zu allererst meinem Doktorvater Professor Hans-Willi Mittrücker, für sein immer offenes Ohr und die außergewöhnlich gute Betreuung. Er war stets bereit zu diskutieren und hatte viele Anregungen zu den Experimenten. Immer wieder wurde so die wissenschaftliche Neugier geweckt. Außerdem bedanke ich mich natürlich für das unermüdliche Korrekturlesen.

Ich möchte allen Kollegen vom Institut für Immunologie und besonders den Mitgliedern der AG Mittrücker für die wie selbstverständlich angebotene Hilfe, die Diskussionen und natürlich die schöne Zeit am Institut danken.

Insbesondere möchte ich Valéa für die praktische Hilfe, die Anleitung und die vielen guten Unterhaltungen danken.

Ich danke unseren Kooperationspartnern Josephine Ritter und Dr. Magdalena Huber (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Marburg) für die Bereitstellung der IRF4-defizienten Mäuse, den Meinungsaustausch und das gleichberechtigte Teilen aller Versuchsergebnisse.

Ich möchte Dr. Hans-Joachim Mollenkopf und Karin Hahnke (Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Berlin) für die Durchführung des Micro-Array, Kristin Klätschke (Core Facility Micro-Array-Analytik, Institut für Klinische Chemie, UKE, Hamburg) für die Anleitung zur bzw. Durchführung der RNA-Isolierung und Claudia Sander-Jülch und PD Dr. Thomas Jacobs (Bernhard-Nocht-Institut, Hamburg) für die Möglichkeit zur Sortierung von Zellen danken.

Kira danke ich für die viele Zeit die sie geopfert hat um bei meinen Experimenten zu helfen, die Diskussion und das Korrekturlesen. Ich freue mich, dass wir richtige Freundinnen geworden sind!

Ich möchte meiner ganzen Familie und Timo danken, die mich immer unterstützen und mir ermöglichen jedes Ziel zu erreichen, dass ich mir stecke.