

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG EPPENDORF

Institut für Immunologie des Zentrums für Diagnostik

Institutsleiter: Prof. Dr. med. Bernhard Fleischer

Die Regulation von CD8⁺ T-Zellen durch den Transkriptionsfaktor Interferon Regulatory Factor 4 (IRF4)

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Kristina Broder
aus Odessa, Ukraine

Hamburg 2016

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 01.02.2017**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. H.-W. Mittrücker

Prüfungsausschuss, zweite Gutachterin: Prof. Dr. G. Tiegs

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1 Einführung.....	6
1.2 T-Zellen.....	7
1.3 CD8 ⁺ T-Zellen.....	7
1.4 CD8 ⁺ T-Zellantwort	8
1.5 Periphere CD8 ⁺ T-Zellreifung.....	9
1.6 CD8 ⁺ T-Zelldifferenzierung.....	10
1.7 Die IRF-Familie	11
1.8 IRF4.....	11
1.9 Klinische Bedeutung von IRF4	13
1.10 <i>Listeria monocytogenes</i>	13
1.11 Infektion durch <i>Listeria monocytogenes</i>	14
2. Fragestellung.....	17
3. Material und Methoden.....	18
3.1 Materialien	18
3.1.1. Puffer und Medien.....	18
3.1.2 Feinchemikalien und Reagenzien.....	19
3.1.3 Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	19
3.1.4 Bakterienstämme	22
3.1.5 Mausstämmen.....	22
3.1.6 Besondere Geräte und Materialien.....	23
3.1.7 Software	23
3.2 Methoden.....	24
3.2.1 Tiexperimentelles Arbeiten.....	24
3.2.2 Genetische Typisierung von Mäusen	24
3.2.3 Listerieninfektion	24
3.2.4 Isolation von Leukozyten aus der Milz	25
3.2.4.1 Organentnahme	25
3.2.4.2 Milzzellisolation.....	25
3.2.4.3 Zellzahlbestimmung	25
3.2.5 Antikörperfärbung von Zellsuspensionen	26
3.2.5.1 Extrazelluläre Färbung	26
3.2.5.2 Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen.....	26

3.2.5.3 Intrazellulärer Zytokinnachweis.....	27
3.2.5.4 Färbung von Transkriptionsfaktoren.....	27
3.2.6 Stimulation von Zellen <i>in vitro</i>	28
3.2.7 Anreicherung von CD8 ⁺ T-Zellen.....	28
3.2.8 Kompetetiver Zelltransfer -----	29
3.2.9 Durchflusszytometrie	30
3.2.10 Statistik.....	32
4. Ergebnisse.....	33
4.1 Untersuchung der IRF4-Expression nach Stimulation von CD8 ⁺ T-Zellen, CD4 ⁺ T-Zellen und CD19 ⁺ B-Zellen.....	33
4.2 Analyse der IRF4-Expression in CD8 ⁺ T-Zellen in Abhängigkeit von der TZR- Stimulation.....	38
4.3.1 Expression von Transkriptionsfaktoren bei TZR-Stimulation unterschiedlicher Stärke; Untersuchung von Peptidvarianten.....	47
4.3.2 Expression von Transkriptionsfaktoren von CD8 ⁺ T-Zellen nach einer vier- tägigen TZR-Stimulation.....	54
4.4 Einfluss von Entzündungszytokinen auf die Expression von Transkriptions- faktoren.....	60
4.5 Modulation der Entzündung - Untersuchung des Einflusses von STAT3 auf die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren.....	68
4.6 CD8 ⁺ T-Zell Transfer – Validierung der <i>in vitro</i> Ergebnisse <i>in vivo</i>	77
5. Diskussion.....	85
5.1 Regulation der Expression von IRF4 in CD8 ⁺ T-Zellen.....	85
5.2 Die Rolle von IRF4 in der Aktivierung von CD8 ⁺ T-Zellen.....	88
5.3 Auswirkungen des Fehlens von IRF4 auf CD8 ⁺ T-Zellen	89
5.4 Ausblick.....	93
6. Zusammenfassung.....	95
7. Abstract.....	96

I. Abbildungsverzeichnis.....	97
II. Tabellenverzeichnis.....	99
III. Abkürzungsverzeichnis.....	100
IV. Literaturverzeichnis	103
V. Danksagung.....	114
VI. Eidesstattliche Erklärung.....	115

1. Einleitung

1.1 Einführung

Das Immunsystem ist ein fester Bestandteil des menschlichen und tierischen Organismus, dessen Aufgabe es ist, zwischen fremden und eigenen Strukturen zu unterscheiden. Dies dient einem zielgerichteten Schutz vor Infektionen durch Pathogene. Hierbei kann man zwischen zwei grundsätzlichen Arten unterscheiden, wie diese Aufgabe erfüllt werden kann – der angeborenen und der erworbenen, adaptiven Abwehr. Bei einer Infektion greift zunächst die angeborene Immunabwehr ein, wobei die Zellen des angeborenen Immunsystems durch Mustererkennungsrezeptoren, die gegen hoch konservierte mikrobielle Bestandteile gerichtet sind, Pathogene erkennen. Ein Beispiel hierfür sind Makrophagen. Sie exprimieren neben zahlreichen anderen Rezeptoren den *Toll-like Rezeptor 4*, TLR-4. Im Komplex mit MD-2 und CD14, akzessorischen Proteinen und einer Dimerisation von TLR-4 können Lipopolysaccharide (LPS), die ein Bestandteil der Zellwand Gram negativer Bakterien sind, erkannt werden. Dadurch werden die Makrophagen aktiviert. Dabei setzen sie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) frei, welches eine lokale Entzündungsreaktion induziert, in deren Verlauf die Pathogene dann beseitigt werden {Bode *et al.* 2012}.

Um der Destruktion durch die Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems nicht ausgeliefert zu sein, haben einige Pathogene, wie das Bakterium *Listeria monocytogenes*, Möglichkeiten entwickelt, sich in ihrem Wirtsorganismus intrazellulär vor der Erkennung durch diese Rezeptoren zu verbergen.

Zellen der adaptiven Immunabwehr, B- und T-Zellen, sind in der Lage, durch somatische Rekombination eine Vielzahl an unterschiedlichen Rezeptoren zu generieren. Aus einer großen Anzahl an Zellen mit unterschiedlichen Spezifitäten wird bei der Konfrontation mit einem Pathogen eine Abwehrzelle mit passenden Rezeptoren aktiviert und setzt sich im Infektionsverlauf durch. So können die Pathogene zum Beispiel durch hochspezifische Antikörper markiert und dann durch das Komplementsystem oder durch Phagozyten gezielt zerstört werden. Durch diese „Adaptation“ an den Erreger ist die erworbene Immunabwehr in der Lage sowohl die angeborenen Abwehrmechanismen zu koordinieren als auch die Zerstörung von Pathogenen zu gewährleisten.

Um einer Infektion mit intrazellulären Erregern zu begegnen und diese zu überwinden sind $CD8^+$ T-Zellen von entscheidender Bedeutung. Durch spezifische Eigenschaften, auf die im Folgenden näher eingegangen wird, sind diese Zellen in der Lage, infizierte Zellen zu erkennen und zu zerstören.

1.2 T-Zellen

T-Zellen sind eine Unterart der Lymphozyten. Die Vorläufer von T-Zellen entstehen im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen. Nachdem sich die Vorläuferzellen ausgebildet haben, vollziehen sie ihren weiteren Reifeprozess im primären lymphatischen Organ, dem Thymus. Dort findet eine somatische Rekombination statt, in Folge derer es zu der Ausbildung des T-Zellrezeptors (TZR) kommt.

Im Thymus erfolgt zunächst die positive und danach die negative Selektion der T-Zellen. Die positive Selektion dient der Auswahl von Zellen mit ausreichend hoher Affinität für Antigen präsentierende Komplexe, die MHC-Moleküle (*major histocompatibility complex*). Danach erfolgt die negative Selektion, bei der Zellen, die körpereigene Antigene erkennen und potentiell autoimmune Reaktionen auslösen könnten, erkannt und durch induzierte Apoptose beseitigt werden. Nach dem Abschluss dieses Reifungsprozesses verlassen die entstandenen naiven T-Zellen den Thymus und wandern zunächst in die sekundären lymphatischen Organe, in Milz und periphere Lymphknoten. Dort findet eine Aktivierung dieser Zellen statt. Dieses erfolgt durch Präsentation von Pathogenen durch professionelle Antigen präsentierende Zellen (APZ) {Murphy *et al.* 2011}.

1.3 $CD8^+$ T-Zellen

$CD8^+$ T-Zellen sind Zellen, die Peptide im Komplex mit MHC I erkennen. Dabei stabilisiert das $CD8$ -Dimer die Bindung des TZR an den MHC I-Peptid-Komplex. MHC I-Moleküle werden auf allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert und präsentieren Antigene, die im Zytosol der Zelle lokalisiert sind. Die primäre Aktivierung von naiven $CD8^+$ T-Zellen erfolgt durch APZ, in diesem Fall hauptsächlich dendritische Zellen. Dendritische Zellen sind in der Lage extrazelluläre Antigene zu internalisieren und sie anschließend auf der Zelloberfläche im Komplex mit ihrem MHC I-Rezeptor zu präsentieren. Während der primären Aktivierung benötigt die $CD8^+$ T-Zelle neben dem TZR-Signal weitere Kosignale, unter anderem $CD28$,

für eine vollständige Aktivierung. Diese Signale und Kosignale führen zur Proliferation und Differenzierung zu funktionalen Effektorzellen. Im Gegensatz zu naiven CD8⁺ T-Zellen sind diese CD8⁺ Effektor-T-Zellen sehr viel weniger von Kosignalen abhängig. Bei einem erneuten Kontakt der CD8⁺ T-Zelle mit ihrem entsprechenden Antigen findet dann eine direkte Aktivierung statt und sie kann auf das Antigen adäquat reagieren {Murphy *et al.* 2011}.

1.4 CD8⁺ T-Zellantwort

Die CD8⁺ T-Zellantwort wird über den TZR gesteuert. Dieser Rezeptor ist ein Heterodimer, welcher aus einer α - und einer β -Kette besteht und mit CD3-Proteinen assoziiert ist. Bei Aktivierung der Zelle führt das TZR-Signal zu einer Phosphorylierung von Tyrosinresten in den ITAM Motiven (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) zytoplasmatischer Domänen der CD3-Ketten im TZR/CD3-Komplex. Dadurch können ZAP70-Tyrosinkinasen an CD3 binden, was zu einer Aktivierung der Phospholipase C- γ führt. In Folge dessen kommt es zu einer Spaltung von Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat (PIP2) in die *second messenger* Diacylglycerol (DAG) und Inositol-Trisphosphat (IP3). DAG aktiviert den MAPK/Erk Signalweg, was unter anderem die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B verursacht. IP3 bewirkt einen Ca²⁺-Ausstrom aus dem glatten endoplasmatischen Retikulum, was einen Einstrom von extrazellulärem Ca²⁺ in die Zelle zur Folge hat. Kalmodulin (Ca²⁺/CaM), woran dieses Kalzium bindet, aktiviert dann die Phosphatase Kalzineurin, welche unter Einbindung des Transkriptionsfaktors NFAT die Transkription des IL-2-Gens fördert.

So wird ein spezifisches Transkriptionsprogramm induziert, welches CD8⁺ T-Zellen zur Proliferation und erhöhten Produktion von Effektorproteinen wie Zytokinen anregt. Während der primären Aktivierung durch dendritische Zellen differenzieren sich CD8⁺ T-Zellen zu zytolytischen Effektorzellen. Diese Zellen können im Körper frei migrieren, bis sie erneut mit ihrem Antigen konfrontiert werden. Dieser Kontakt führt dann zu einer Aktivierung der CD8⁺ T-Zelle und zu einer Eliminierung von infizierten Zellen. Hierfür stehen ihnen zahlreiche Mechanismen zur Verfügung. Zum einen verfügen CD8⁺ T-Zellen über Granula, die unterschiedliche Granzyme sowie Perforine enthalten. Der Inhalt dieser Granula wird nach der Erkennung der Zielzelle durch Effektorzellen in den unmittelbaren Kontaktbereich beider Zellen freigesetzt. Granzyme sind Moleküle, die in körpereigenen Zielzellen durch Caspasenaktivierung die Apoptose oder den kontrollierten Untergang der Zelle auslösen.

Perforine sind zytolytische Proteine, die sich nach der Degranulation in die Zellmembran der Zielzelle einfügen und Poren darin bilden, was zu einer Zerstörung der Zielzelle führt. Zusätzlich können diese Poren als Zugangsstellen für Granzyme zu ihren Zielmolekülen fungieren. Außerdem können $CD8^+$ T-Zellen zahlreiche proinflammatorische Zytokine produzieren, was zu einer Aktivierung sowie Rekrutierung von weiteren Immunzellen und damit einer Verstärkung der Immunantwort führen kann {Wong *et al.* 2003, Murphy *et al.* 2011}.

1.5 Periphere $CD8^+$ T-Zellreifung

Nach einer primären Aktivierung können $CD8^+$ T-Zellen verschiedene Differenzierungswege einschlagen. Dieser Vorgang wird von Transkriptionsfaktoren gesteuert. Die verschiedenen Differenzierungsstadien können durch die Expression bestimmter Effektor- sowie Oberflächenmoleküle charakterisiert werden. Zunächst findet bei Antigen-Rezeptor-Kontakt eine Stimulation des TZR der $CD8^+$ T-Zellen statt. Dadurch erfolgt ihre Aktivierung. Gleichzeitig wird durch kostimulatorische Signale der APZ und inflammatorische Signale des Umfeldes eine Differenzierung der aktivierten $CD8^+$ T-Zellen in Effektor- oder Gedächtniszellen angeregt. Die entsprechenden Interaktionen finden unter anderem zwischen CD28 auf T-Zellen und CD80 sowie CD86 auf professionellen APZ statt. Andere Moleküle sind 4-1BB und dessen Ligand sowie CD27 und CD70. Die inflammatorischen Signale werden hauptsächlich durch Zytokine vermittelt. Diese sind Moleküle wie Typ I Interferone (IFN- α und IFN- β), Interleukine wie IL-1, IL-18, IL-12 sowie IFN- γ . Je nach Zytokinmilieu wird die Differenzierung der $CD8^+$ T-Zellen in eine bestimmte Richtung angeregt. Durch Typ I Interferone und IL-12 wird eine Reifung zu Effektorzellen gefördert {Kaech *et al.* 2012}.

Zu Beginn der T-Zellantwort, zum Beispiel während einer Infektion, findet die Aktivierung der $CD8^+$ T-Zellen in Gegenwart von inflammatorischen Zytokinen statt. Die $CD8^+$ T-Zellen proliferieren und differenzieren sich hauptsächlich zu Effektorzellen, die durch die Expression des NK-Rezeptors KLRG1 (*killer cell lectin-like receptor G1*) gekennzeichnet sind. Allerdings lassen sich in dieser Population bereits Gedächtniszellvorläufer nachweisen. Diese können durch die Expression von Bcl-2, CD27 und CD127, der α -Untereinheit des IL-7-Rezeptors, und einer fehlenden Expression von KLRG1 identifiziert werden. Durch die Wirkung der Zytokine IL-7 und IL-15 überleben diese Zellen auch nach Klärung der Infektion

und entwickeln sich zu langlebigen Gedächtniszellen. CD8⁺ T-Gedächtniszellen können in Effektorgedächtniszellen und zentrale Gedächtniszellen unterteilt werden. Man kann diese Zellarten über die Oberflächenexpression von CD44, CCR7 und CD62L voneinander abgrenzen. Zentrale Gedächtniszellen produzieren IL-2, haben Proliferationspotential und tragen CD44, CCR7 und CD62L auf ihrer Zelloberfläche. Effektorgedächtniszellen haben ein höheres Zytotoxizitätspotential und exprimieren CD44, aber kein CD62L oder CCR7 auf ihrer Oberfläche. Zentrale Gedächtniszellen finden sich vorwiegend in sekundären Lymphgeweben, während Effektorgedächtniszellen periphere Gewebe patrouillieren {Obar *et al.* 2011}.

Bei einer chronischen Infektion des Organismus, die durch die CD8⁺ T-Zellantwort nicht eliminiert werden kann (wie zum Beispiel bestimmte Stämme des LCMV, *Lymphocytic Choriomeningitis Virus*, im Mausmodell), können CD8⁺ T-Zellen in einen Zustand der Erschöpfung übergehen, die sogenannte Exhaustion. Sie sind dann außer durch eine deutlich verminderte Zytotoxizität durch die Expression inhibitorischer Rezeptoren wie CD244, LAG-3 (*lymphocyte activation gene 3*) und PD-1 (*programmed death 1*) gekennzeichnet. Außerdem ist eine geringere Produktion von Zytokinen wie TNF- α , IFN- γ und IL-2 ein Merkmal dieses Differenzierungszustands {Schieter und Greenberg 2014}.

1.6 CD8⁺ T-Zelldifferenzierung

CD8⁺ T-Zellen können zu Effektorzellen differenzieren, die besonders effizient dazu in der Lage sind, intrazelluläre Erreger zu eliminieren. Ein Teil der CD8⁺ T-Zellen reift auch zu Gedächtniszellen, die bei einem erneuten Kontakt mit einem Pathogen zu einer deutlich effizienteren Antwort führen. Die Differenzierungsrichtung wird durch das Umfeld der T-Zellen beeinflusst. Auf molekularer Ebene sind verschiedene Transkriptionsfaktoren für die Differenzierung verantwortlich. Entzündungszytokine, wie zum Beispiel IL-12, unterstützen die Reifung zu Effektorzellen. Auf der Seite der Transkriptionsfaktoren ist eine Differenzierung zu Effektorzellen mit einer hohen Tbet- (*T-box transcription factor Tbx21*) Expression und die Reifung zu Gedächtniszellen mit einer verstärkten Eomesodermin- (Eomes; *T-box brain protein 2*) Expression assoziiert.

Sowohl Tbet als auch Eomes gehören zur Gruppe der T-Box Transkriptionsfaktoren. Diese Proteinfamilie besitzt als charakteristisches Merkmal eine homologe T-Box-DNA-

Bindedomäne. An der frühen CD8⁺ T-Zell-Differenzierung sind beide Transkriptionsfaktoren beteiligt. Abhängig von Signalen aus dem Umfeld der T-Zelle dominiert dann einer der beiden Faktoren. Im Fall von Tbet ist es die TZR-Aktivierung, die durch IL-12 zusätzlich verstärkt wird. Eomes wird hingegen durch das IL-12 und den mTOR-Signalweg (*mammalian activator of rapamycin*) im Zusammenspiel mit dem Transkriptionsfaktor FOXO1 gehemmt. Dagegen wird die Transkription von Eomes durch IL-2, IL-4 und IL-15 gefördert. Außerdem sind IL-2- und IL-15-Signale für das langfristige Überleben von CD8⁺ T-Zellen von entscheidender Bedeutung, was für Gedächtniszellen eine große Rolle spielt {Williams *et al.* 2007, Obar *et al.* 2011, Wiesel *et al.* 2012}.

1.7 Die IRF-Familie

IRF, oder *Interferon Regulatory Factors*, sind eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die vielfältige Signalwege steuern. Vor allem bei viralen, bakteriellen und IFN-induzierten Signalkaskaden spielen sie als Mediatoren eine erhebliche Rolle. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass vor allem die Immunantwort, die Regulation des Zellwachstums, die Apoptose und der Schutz des Organismus vor Viren zu ihren Funktionen zählen. Bislang sind neun Mitglieder der IRF-Familie beschrieben. Alle IRF weisen eine ähnliche molekulare Struktur auf. Sie enthalten eine konservierte N-terminale DNS-Bindungsdomäne, die aus etwa 120 Aminosäuren aufgebaut ist, und eine DNS-Sequenz, die sogenannte ICS (*interferon consensus sequence*) spezifisch bindet. Dieses Sequenzmotiv befindet sich in zum Beispiel Promotoren und Enhancern von Interferon-induzierten Genen. Die verschiedenen IRF-Proteine unterscheiden sich im C-terminalen Bereich, welcher unter anderem für ihre Funktion, Regulation und Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren eine Rolle spielt {Xu *et al.* 2012}.

1.8 IRF4

IRF4 oder MUM1 (*multiple myeloma oncogene 1*) ist ein IRF, welches in Zellen des Immunsystems exprimiert wird. Seine Expression wird durch unterschiedliche Signalwege angeregt. Durch eine TZR-Stimulation kann in T-Zellen eine starke IRF4-Expression induziert werden. IRF4 bindet an seine ICS (*interferon consensus sequence*), ist aber nicht imstande, die Zelldifferenzierung und – aktivierung dadurch alleine anzuregen. Das Protein benötigt Kooperationspartner, mit denen es Komplexe bilden und die Transkription der

entsprechenden Zielgene induzieren kann. Während IRF4 in B-Zellen und dendritischen Zellen mit Transkriptionsfaktoren der Ets-Familie (*E twenty six*) im Rahmen der Bindung an EICE-Motive (*Ets-IRF composite elements*) der DNS kooperiert, sind bei T-Zellen Proteine der AP-1-Familie entsprechende Bindungspartner. Mitglieder dieser Familie bilden Komplexe aus BATF (*B cell activating transcription partner*) und Jun, die als Heterodimere mit IRF4 interagieren und gemeinsam an die DNS binden können {Murphy *et al.* 2013}. Die entsprechenden DNS-Motive werden als AICE (*AP-1-IRF composite elements*) bezeichnet. IRF4 bindet somit gemeinsam mit kooperierenden Transkriptionsfaktoren an seine DNS-Bindungsdomäne und steuert dadurch die Aktivierung der Expression verschiedener Gene. Hierdurch ist dieser Transkriptionsfaktor in der Lage, die Differenzierung unterschiedlicher Immunzellen zu steuern {Glasmacher *et al.* 2012, Ciofani *et al.* 2012}.

In der angeborenen Immunabwehr wird unter anderem die Differenzierung von dendritischen Zellen durch IRF4 gesteuert. {Akbari *et al.* 2014} In der adaptiven Abwehr sind die meisten Zellarten durch IRF4-Expression während ihrer Reifung gekennzeichnet. Bei den CD4⁺ T-Helferzellen ist IRF4 für zum Beispiel unabdingbar für die Differenzierung zu TH17-Zellen, IRF4-defiziente Mäuse sind durch ein komplettes Fehlen von TH17-Zellen gekennzeichnet {Huber *et al.* 2013}. Ohne IRF4 ist zudem die Spezialisierung zu regulatorischen T-Zellen oder Treg nicht möglich. Diese Zellen verhindern eine Immunpathogenese durch überschießende Reaktion des Organismus gegen Krankheitserreger und sie unterdrücken autoreaktive Immunantworten. Bei B-Zellen ist IRF4 sowohl für den Klassenwechsel als auch die Differenzierung zu Plasmazellen und die Antikörpersekretion verantwortlich. IRF4 supprimiert hierbei den Transkriptionsfaktor BCL-6 (*B-cell lymphoma 6*), welches die Keimzentrumsreaktion entscheidend beeinflusst und Langlebigkeit von B-Zellen und ihre Differenzierung zu Gedächtniszellen fördert, und stimuliert die BLIMP- (*B lymphocyte-induced maturation protein*) Expression, die für eine erfolgreiche Plasmazellentwicklung erforderlich ist {Bollig *et al.* 2012}.

In CD8⁺ T-Zellen fördert IRF4 die Differenzierung zu Effektor – oder Killerzellen und supprimiert die Gedächtniszellbildung dieser Zellpopulation {Raczowski *et al.* 2013}. Zusammengefasst ist der Transkriptionsfaktor IRF4 ein Schlüsselmolekül bei der Ausbildung einer effektiven Immunantwort vor allem der adaptiven Abwehr.

1.9 Klinische Bedeutung von IRF4

Wie bereits beschrieben ist IRF4 ein Transkriptionsfaktor, der für die Immunabwehr unerlässlich ist. Außerdem ist er ein wichtiges Signalmolekül für einige Malignome – wie das Multiple Myelom, wo eine entsprechende Antikörperanfärbbarkeit teilweise als Diagnosekriterium eingesetzt wird {Shaffer *et al.* 2008; Wang *et al.* 2014}. Neuere Forschungsergebnisse haben außerdem gezeigt, dass im Gegensatz zu der bisherigen Annahme, dass IRF4 Expression auf Zellen des Immunsystems beschränkt ist, dieser Transkriptionsfaktor in anderen Körpergeweben exprimiert wird. Auch in diesen Geweben ist die Funktion von IRF4 nur teilweise geklärt. Es gibt Hinweise, dass IRF4 an der Regulation des Adipozyten- und Kardiozytenstoffwechsels sowie an neuronalen Abbauprozessen beteiligt ist {Eguchi *et al.* 2011, Jiang *et al.* 2013, Guo *et al.* 2014}. Ein besseres Verständnis der Funktion von IRF4 in diesen Zellen könnte neuen Einblick in die Funktionsweise von Geweben und des menschlichen Organismus geben. Man könnte außerdem möglicherweise neue Ansatzpunkte für die Behandlung von Krankheiten, die im Zusammenhang mit den von IRF4 gesteuerten Vorgängen stehen, gewinnen.

1.10 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes (*Lm*) ist ein stäbchenförmiges grampositives Bakterium, welches sich während einer Infektion fakultativ intrazellulär vermehrt. In der Natur ist es als Saprophyt vor allem im verrotteten pflanzlichen Material beheimatet, was seine hauptsächliche Nährquelle darstellt. Eine Ansteckung mit Listerien ist in der Regel mit durch Erde oder Staub kontaminierten Lebens- und Futtermitteln in Verbindung zu setzen. Wiederkäuer infizieren sich häufig über Silage. Deswegen ist *Lm* durch diesen Wirt in Rohmilch und den daraus hergestellten Produkten wie Käse enthalten, wo es bei Kühlschranktemperaturen um 4°C ohne Probleme überlebt. Es verursacht bei immunkompetenten Wirten eine selbstlimitierende Enteritis. Bei Immunsupprimierten kann es jedoch Meningitiden, Sepsis und Enzephalitiden verursachen. Schwangere, vor allem im dritten Trimenon, sind durch eine mögliche transplazentare Infektion des Fötus, die zum septischen Abort der Frucht aber auch zu schweren Folgeschäden des Neugeborenen führen kann, gefährdet. Vor allem während der ersten sechs bis acht Lebenswochen sind Säuglinge wegen einer mangelnden Abwehrfähigkeit gegenüber diesem Keim gefährdet {Low *et al.* 1997, Pamer 2004, Lamont *et al.* 2011, Mateus *et al.* 2013}.

1.11 Infektion durch *Listeria monocytogenes*

Als intrazellulärer Erreger hat *Lm* zahlreiche Mechanismen entwickelt, um vor der Immunantwort seines Wirtes besonders effizient geschützt zu sein. Es exprimiert sowohl lösliche als auch oberflächengebundene Proteine, durch die das Bakterium in der Lage ist, seine Zielzellen zu infiltrieren, deren phagozytischen Vakuolen zu entkommen, sich in der Wirtszelle frei zu bewegen und zu vermehren.

Zunächst gelangt *Lm* als Nahrungskeim in den Gastrointestinaltrakt. Dort infiziert es die Epithelzellen durch das Zusammenspiel zwischen seinem Oberflächenmolekül Internalin A (InlA) und dem körpereigenen epitheliale Cadherin, E-Cadherin. Nach dem Passieren der protektiven Darmepithelschicht gelangen die Listerien in die Blutbahn, wodurch sie zu Organen wie Leber und Milz transportiert werden. Dort wird *Lm* von gewebsständigen Makrophagen phagozytiert. {Pamer *et al.* 2004}. Durch Listeriolysin O oder *LLO*, einen Virulenzfaktor, der Phagosomenmembranen zerstört, und verschiedene Phospholipasen können die Listerien dem Phagosom entkommen. Durch die polare Expression von ActA (*actin-assembly-inducing protein*) wird eine Mobilität innerhalb der Wirtszelle ermöglicht. ActA verursacht die Polymerisation von Actin. Hierdurch werden Listerien zu intrazellulärer Bewegung in ihrer Wirtszelle befähigt. So kann das Bakterium das Zytosol der Makrophagen als Medium für die Vermehrung nutzen. Die Actin-Polymerisation führt auch zu Ausstülpungen der Zellmembran in Nachbarzellen. Durch Listeriolysin O und Phospholipasen kann sich das Listerium aus der Ausstülpung befreien und befindet sich dann im Zytoplasma der Nachbarzelle {Gaillard *et al.* 1991, Pamer *et al.* 2004, Hamon *et al.* 2006, Lambrechts *et al.* 2008}. Durch diese Art der Ausbreitung innerhalb des Wirtes, ohne das Zellinnere jemals zu verlassen, ist eine humorale Immunantwort weitgehend unwirksam für eine Elimination des Erregers.

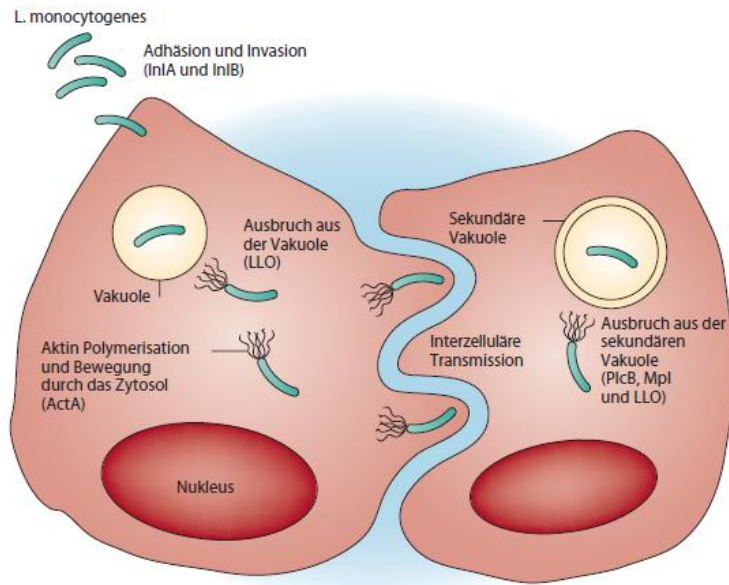


Abbildung 1: Schema der Infektion mit *Listeria monocytogenes*

Zunächst gelang das Bakterium mit den Oberflächenproteinen Internalin A und B (InlA und InlB) in eine Vakuole eingeschlossen ins Zellinnere, wo dann durch das Hämolysin LLO das Bakterium freigesetzt wird und sich durch die Expression von ActA eine Beweglichkeit im Zytosol ermöglicht. In Zellverbänden kann sich das Bakterium so von Zelle zu Zelle fortbewegen und somit weitere Wirtszellen infizieren. { *Pamer et al.* 2004 } und mit freundlicher Genehmigung von Kira Heesch { *Heesch et al.* 2013 }

Bei der Infektion mit Listerien gibt es entscheidende Differenzen zwischen Mensch und Maus. Das Zielorganverteilungsmuster variiert erheblich. Die primären Zielorgane der Maus sind Milz und Leber, während beim Mensch eher der Hirnstamm und das Liquorabflusssystem betroffen sind. Außerdem unterscheiden sich die Infektionsmodi der beiden Spezies. Da die Maus ein anderes E-Catherin als der Mensch aufweist, kann sie schlechter oral mit *Lm* infiziert werden, da das Bakterium bei ihr kaum in das Darmepithel eindringen kann. Deshalb infiziert man Mäuse in der Regel intravenös oder intraperitoneal. Die Zielorgane der Bakterien, Milz und Leber, verändern sich hierbei nicht { *Shi et al.* 2011 }. *Post infectionem (p.i.)* ist dann in beiden Organen eine vergleichbare Kinetik zu beobachten. Bei einer Primärinfektion findet zunächst eine massive Bakterienreplikation statt, die etwa bis Tag 2 *p.i.* zu einer deutlichen Bakterienlast im Organ führt. Dann kommt es zu einer Plateauphase mit einer stabilen Bakterienzahl. Die Immunantwort des Wirtes in dieser frühen Phase wird durch das angeborene Immunsystem getragen. Dabei sind zunächst Makrophagen, inflammatorische Monozyten und Granulozyten von entscheidender Bedeutung. Diese Antwort wird durch NK-Zellen (natürliche Killerzellen) unterstützt { *Horowitz et al.* 2011 }.

Durch diese unspezifischen Abwehrzellen wird die Replikation von *Listeria monocytogenes* begrenzt. Parallel dazu findet die primäre Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen statt und ab etwa Tag 5 *p.i.* sind größere Mengen Listerien-spezifischer T-Zellen nachweisbar. Zwischen Tag 5 und Tag 10 nach dem Infektionsbeginn findet bei einer suffizienten T-Zellantwort eine vollständige Eliminierung der Listerien aus der Maus statt. Bei einer Sekundärreaktion des Immunsystems nach einer erneuten Infektion mit demselben Erreger ist durch das Vorhandensein spezifischer Gedächtniszellen die Immunantwort effizienter. Die Eliminierung des Antigens ist nach bereits zwei bis drei Tagen abgeschlossen, wobei der Höhepunkt der T-Zellantwort hierbei erst nach etwa fünf Tagen (also nach dem weitgehenden Klären des Erregers) erreicht wird und danach wieder absinkt {Pamer 2004}.

2. Fragestellung

Der Transkriptionsfaktor IRF4 spielt eine Schlüsselrolle bei der Differenzierung von Effektor CD8⁺ T-Zellen und wird über den T-Zellrezeptor in diesen Zellen induziert. Zu Beginn der Arbeit war aber unklar, in welchem Umfang TZR-Signale die IRF4-Expression steuern, und ob die Expression durch andere Faktoren, wie zum Beispiel Entzündungszytokine beeinflusst wird. Das zentrale Ziel dieser Arbeit war daher die Charakterisierung der IRF4-induzierenden Faktoren in CD8⁺ T-Zellen. Zur Analyse der IRF4-Expression in Abhängigkeit des TZR-Signals sollte ein *in vitro*-Modell verwendet werden, in dem CD8⁺ T-Zellen mit einem einheitlichen Ovalbumin-spezifischen TZR durch Ovalbuminpeptide stimuliert werden. Die Stärke des TZR-Signals sollte hierbei durch verschiedene Konzentrationen des Ovalbuminpeptids sowie durch Peptidderivate variiert werden. Der Einfluss von Zytokinen sollte durch eine Zugabe von Zytokinen untersucht werden. Zusätzlich zu IRF4 sollten auch weitere Transkriptionsfaktoren, die in der Differenzierung von CD8⁺ T-Zellen eine Rolle spielen, analysiert werden. Hierfür standen auch IRF4-defiziente Mäuse zur Verfügung, die eine Evaluation der Funktion von IRF4 in der Regulation dieser Faktoren erlaubten. Schließlich sollte ein Teil der Ergebnisse aus den *in vitro*-Experimenten *in vivo* in einem *Listeria monocytogenes*-Infektionsmodell der Maus bestätigt werden. Das Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen wie CD8⁺ T-Zellen durch IRF4 im Rahmen einer akuten Infektion reguliert werden, und welchen Einfluss extrinsische Faktoren auf die IRF4-Expression haben. Insgesamt sollte diese Arbeit zu einem besseren Verständnis der IRF4-Regulation in CD8⁺ T-Zellen führen.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Puffer und Medien

PBS (phosphatgepufferte Salzlösung)		Sigma (Steinheim)
Erythrozytenlysepuffer	8,25 g NH ₄ Cl 1,0 g KHCO ₃ 0,037 g EDTA auf 1 l Aqua destillata	
RPMI komplett	RPMI 1640 (500 ml) 5% FCS 2 mM L-Glutamin 50 µg/ml Gentamycin 50 µM β-Mercaptoethanol	Gibco (Karlsruhe)
TSB-Agar	15 g Tryptic Soy Broth 10 g Bacto Agar auf 500 ml Aqua destillata	
FoxP3 Fixierungs- und Permeabilisationskonzentrat und Puffer (kommerziell erhältliches Set)		eBioscience (San Diego)/ Biolegend (San Diego)
Saponinpuffer	0,1% BSA 0,3% Saponin auf 1 l PBS	

3.1.2 Feinchemikalien und Reagenzien

anti-PE Microbeads	Miltenyi (Bergisch-Gladbach)
β -2-Mercaptoethanol; <i>1000 \times verdünnt</i>	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Serva (Heidelberg)
Brefeldin A (BFA)	Sigma (Steinheim)
EasySep™ Mouse CD8 ⁺ T-Cell Isolation Kit	Stemcell Technologies (Grenoble)
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA (Paschingen)
Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set	eBioscience (San Diego)
Gentamycin	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe)
L-Glutamin	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe)
Ionomycin Kalzium Salz;	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe)
Lipopolysaccharid (LPS) von <i>Escheria coli</i>	Sigma (Steinheim)
Fixable Viability Dye eFluor 780	eBioscience
Monensin;	eBioscience
OVA Peptid – SIINFEKL	} IPT Peptide Technologies GmbH (Berlin); <i>Aliquots mit der Konzentration 10⁻³ M</i>
OVA Peptid – SIIQFEKL	
OVA Peptid – SIIVFEKL	
Maus-Interleukin – 2 (IL-2)	Roche (Basel)
Humanes IL-2/ Proleukin	Novartis (Basel)
Maus IL-12	BioLegend (San Diego)
Maus IFN- α	Max-Planck Institut für Infektionsbiologie (Berlin)
Natives Rattenserum (NRS)	Jackson Immuno Research (Baltimore)
Phorbol-Myristat-Acetat (PMA);	Sigma (Steinheim)
Pacific Orange Succinimidyl Ester	Invitrogen (Karlsruhe)
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth (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).

3.1.3 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Fluorochrom-markierten Antikörper

Spezifität	Klon	Fluorochrom	Hersteller
CD8 α	53-6.7	PerCP	BioLegend (San Diego)
CD8 α	53-6.7	APC	BioLegend (San Diego)
CD8 α	53-6.7	FITC	BD (Heidelberg)
CD8 α	53-6.7	PeCy7	BioLegend (San Diego)
CD8 α	Ly-2	V450	BD (Heidelberg)
CD4	RM4-5	Alexa Fluor 700	BioLegend (San Diego)
CD4	RM4-5	PerCp	BioLegend (San Diego)
CD19	1D3	FITC	eBioscience (San Diego)
CD11b	M1/70	PerCP	BioLegend (San Diego)
CD90.1	HIS51	V450	eBioscience (San Diego)
CD90.2	53-2.1	PerCP	BioLegend (San Diego)
TCR-V α 2	B20.1	FITC	BD (Heidelberg)
γ/δ TCR	GL3	Brilliant Violett 421	eBioscience (San Diego)
CD25	PC 61.5	APC	eBioscience (San Diego)
CD25	PC 61.5	PE	BioLegend (San Diego)
CD62L	Mel 14	APC-Cy7	BioLegend (San Diego)
CD44	IM7	APC	eBioscience (San Diego)
IL-2	JES6-5H4	V450	BD (Heidelberg)
Granzym B	16G6	PE	eBioscience (San Diego)
Interferon γ	XMG1.2	Alexa Fluor 647	eBioscience (San Diego)
IL-10	JES5-16E3	PE	eBioscience (San Diego)
BCL-6	BCL-DWN	PE	eBioscience (San Diego)
Batf	MBM7C7	PE	eBioscience (San Diego)
Eomes	Dan 11mag	Alexa Fluor 647	eBioscience (San Diego)
Eomes	Dan 11mag	eFluor 660	eBioscience (San Diego)
Tbet	eBio4B10	eFluor 660	eBioscience (San Diego)
IRF4	3E4	PE	eBioscience (San Diego)

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten unkonjugierten Antikörper

Spezifität	Klon	Hersteller
CD3ε	145.2C11	BioLegend (San Diego)
CD28	37.51	BioLegend (San Diego)
CD16/ CD32	2.4G2	BioXCell, Institut für Immunologie, UKE

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Isotypkontrollen

Spezifität	Klon	Fluorochrom	Hersteller
<i>hu</i> CD45R	HI100	PE (<i>IRF4</i>)	eBioscience (San Diego)
IgG1κ	R3-34	PE (<i>IRF4</i>)	BD (Heidelberg)
<i>hu</i> CD25	M-A251	PE (<i>BATF;BCL-6</i>)	BD (Heidelberg)
<i>hu</i> pERK 1/2	20A	Alexa Fluor 647 (<i>Tbet</i>)	BD (Heidelberg)
<i>hu</i> FoxP3	PCH101	APC (<i>Eomes</i>)	eBioscience (San Diego)
IgG2α,κ	BR2a	APC (<i>Eomes</i>)	eBioscience (San Diego)
<i>hu</i> CD197	3D12	APC (<i>CD25</i>)	BD (Heidelberg)

3.1.4 Bakterienstämme

Listeria monocytogenes, Stamm EGD (LmEGD), bereitgestellt von Professor Stefan H. E. Kaufmann, Max-Planck Institut für Infektionsbiologie, Berlin

Listeria monocytogenes, Stamm (LmOVA), rekombinant für Ovalbumin, bereitgestellt von Professor H. Shen, Philadelphia; {Foulds *et al.* JI 2002}

3.1.5 Mäusestämme

C57BL/6J Jackson, Bar Harbour

OT-1 rückgekreuzt auf C57BL/6, bereitgestellt durch das Max-Planck Institut für Infektionsbiologie (Berlin) {Hogquist K., Jameson S., Heath W., Cell 1994}

B6.Pl-Thy1a/CyJ Jackson, Bar Harbour

IRF4^{-/-} rückgekreuzt auf C57BL/6 {Mittrücker *et al.* Science 1997}

IRF4^{-/-} × OT-1 Institut für Immunologie (UKE, Hamburg)

IL-6^{-/-} Zur Verfügung gestellt von Professor Gisa Tiegs und Dr. Annette Erhardt, Institut für experimentelle Immunologie und Hepatologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg {Kopf *et al.* Nature 1994}

CD4 Cre⁺ × STAT3^{flox/flox} Zur Verfügung gestellt von Privatdozent Dr. med. Oliver Steinmetz, Zentrum für Innere Medizin, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg {Akira S. Oncogene 2000}

3.1.6 Besondere Geräte und Materialien

BD FACS Canto II

BD (Heidelberg)

Bei den Geräten für Bakterienkultur und Lymphozytenaufreinigung handelt es sich um Standardlaborausstattung. Standardlabormaterialien, (z.B. Reaktionsröhrchen, Petrischalen und Pipettenspitzen), stammen von den Firmen Sarstedt (Numbrecht), Greiner (Frickenhausen), Nunc (Langenselbold), BD (Heidelberg) und Eppendorf (Hamburg).

3.1.7 Software

FACS Diva Software

BD (Heidelberg, Deutschland)

GraphPad Prism Version 4.0 und 5.0

GraphPad Software (La Jolla, USA)

Adobe Illustrator CS5

Adobe (San Jose, USA)

FlowJo Software

Tree Star (Ashland, USA)

3.2 Methoden

3.2.1 Tierexperimentelles Arbeiten

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden in Tierversuchen Infektionen und Zelltransfer mittels intraperitonealer und intravenöser Injektionen, sowie die Tötung von Versuchsmäusen mit anschließender Organentnahme zu wissenschaftlichen Zwecken durchgeführt.

Die Aufzucht und Haltung, die intravenöse oder intraperitoneale Injektion sowie die Tötung der Mäuse erfolgten unter Einhaltung des deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG). Eine Ausnahmegenehmigung zur Durchführung der genannten Eingriffe und Behandlungen wurde zuvor durch die Hamburger Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz (Fachabteilung Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen) erteilt.

3.2.2 Genetische Typisierung von Mäusen

Der IRF4-defiziente Genotyp wurde mittels PCR (Polymerasen-Kettenreaktion) kontrolliert, die Untersuchung, ob eine Transgenität des TZR der OT-I-Mäuse sicher vorlag, erfolgte mittels durchflusszytometrischer Analyse durch einen Antikörper gegen den V α 2-TZR.

3.2.3 Listerieninfektion

Die benutzten Listerienstämme standen als Aliquots mit bekannten Konzentrationen bei -80°C zur Verfügung. Sie wurden mit sterilem PBS bis zur benötigten Endkonzentration verdünnt und den Mäusen in einem Volumen von jeweils 200 μL PBS entweder intraperitoneal oder intravenös in eine Schwanzvene injiziert. Je nach Listerienstamm wurden verschiedene Inokula verwendet. Bei LmEGD waren es 1×10^4 Bakterien im injizierten Endvolumen, bei LmOVA 1×10^5 Bakterien.

Die Infektionsdosis des LmEGD Stammes entsprach der LD₅₀ (= Dosis, bei der 50% der Mäuse im Laufe der Infektion sterben) dieses Bakterienstammes. Der LmOVA Stamm war weniger virulent und wurde daher in einer höheren Konzentration verwendet. Die Dosis von 1×10^5 Bakterien lag um etwa den Faktor 10 unter der LD₅₀ (Erfahrungswerte der Arbeitsgruppe von Professor Mittrücker).

3.2.4 Isolation von Leukozyten aus der Milz

3.2.4.1 Organentnahme

Um die Organentnahme durchzuführen wurde das Versuchstier zunächst mit einem Gasgemisch aus 80% CO₂ und 20% O₂, betäubt und direkt im Anschluss mit reinem CO₂ getötet. Anschließend wurde zur Sicherstellung des Todes ein Genickbruch durchgeführt. Hiernach wurde das Fell der Maus mit 70% Ethanol desinfiziert, die Milz wurde vollständig ohne Mesenterium entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung in 5 mL eiskaltem sterilen PBS aufbewahrt.

3.2.4.2 Milzzellisolation

Die Milz wurde in einer Petrischale mittels eines geriffelten Spritzenstempels durch ein Sieb mit 0.2 mm Maschenbreite gequetscht und in 10 mL PBS resuspendiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 250×g. Nach dem Abgießen des Überstandes wurde das Pellet für 3 Minuten bei Raumtemperatur mit Erythrozytenlysepuffer inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Zellyse mittels eiskaltem PBS gestoppt. Die erhaltene Suspension wurde dann über ein Zellsieb mit einer Maschenbreite von 70 µm in ein Plastikröhrchen überführt und erneut mit derselben Einstellung zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Sediment in 5 mL PBS resuspendiert und es erfolgte eine Auszählung der erhaltenen Zellen.

3.2.4.3 Zellzahlbestimmung

Die Berechnung der Zellzahl erfolgte durch den Einsatz einer Neubauer Zählkammer. Zunächst wurden 10 µl Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau (welches zuvor 1:10 mit PBS verdünnt worden war) verdünnt. Hierdurch wurden tote Zellen blau angefärbt, da Trypan Blau von Zellen mit defekter Zellmembran bereits innerhalb weniger Sekunden aufgenommen wird. Die weiteren Schritte wurden dann zügig durchgeführt, da bei längerem Einwirken des Farbstoffes auf die Zellsuspension sich auch vitale Zellen verfärben. Anschließend wurden 10 µl der Lösung auf die Zählkammer aufgetragen und die lebenden Leukozyten unter einem Lichtmikroskop gezählt. Für die Berechnung der Gesamtzellzahl diente folgende Formel:

$$\text{Zellzahl} = \text{Mittelwert der Quadranten} \times 10 (\text{Verdünnungsfaktor}) \times 10^4 (\text{Kammerfaktor}) \\ \times \text{Volumen der Gesamtzellsuspension}$$

3.2.5 Antikörperfärbung von Zellsuspensionen

3.2.5.1 Extrazelluläre Färbung

Zunächst wurden Milzzellen mit Rattenserum (RS) und einem unkonjugierten Fc-Rezeptor-blockierenden Antikörper (blockiert CD16 und CD32) für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Schritt sollte die unspezifische Bindung von Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern verhindern und somit falsch positive Signale bei der Durchflusszytometrie unterbinden.

Danach wurden den Zellen Fluorochrom-gekoppelte Antikörper gegen Oberflächenmarker zugegeben, die Zellen wurden 20 Minuten lang im Dunkeln bei 4° C inkubiert und mit PBS bei 250 × g gewaschen. (Mit „Waschen“ wird im Folgenden das Auffüllen der Zellsuspension mit PBS-Puffer bezeichnet, wonach eine Zentrifugation der Zellen für 5 Minuten bei 250 × g erfolgte.) Im Anschluss wurden die Zellen in 100 µL PBS aufgenommen und direkt mittels FACS gemessen.

3.2.5.2 Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen durch FACS

Zusätzlich zu den Antikörpern für Oberflächenmoleküle wurden der Zellsuspension jeweils die fixierbaren Farbstoffe Pacific Orange Succinimidyl Ester oder AlexaFluor750 Succinimidyl Ester beigelegt. Die Funktionsweise dieser Todfarbstoffe beruhte auf erhöhter Permeabilität der Zellmembran toter Zellen. Hierdurch können diese Moleküle in die Zelle eindringen und an Proteine des Zytoplasmas binden, was eine Färbung der toten Zellen im entsprechenden Wellenbereich zur Folge hat. Bei lebenden Zellen beschränkte sich die Bindung der Ester auf Oberflächenmoleküle der Zellmembran, was eine wesentlich schwächere Färbung zur Folge hatte. Hierdurch kann sehr gut zwischen vitalen und toten Zellen unterschieden werden. Der Vorteil dieser Moleküle ist ihre Fixierbarkeit – man kann nach der extrazellulären eine intrazelluläre Färbung durchführen, ohne das Signal nachträglich durch die Permeabilisierung der Zellmembran beim Färben zu verfälschen {Lischke *et al.* 2013}.

3.2.5.3 Intrazellulärer Zytokinnachweis

Zunächst wurden nach der Herstellung einer Einzelzellsuspension aus einer Milz $2 - 5 \times 10^5$ Zellen in 100 μL PBS aufgenommen, dann wurden der Suspension 900 μL RPMI und 5 μL (entspricht einer Konzentration von 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$) PMA sowie 1 μL (entspricht einer Konzentration von 1 μM) Ionomycin hinzugeben. Nach einer zweistündigen Inkubation im CO_2 Brutschrank bei 37°C wurden der Suspension 1 μL (entspricht einer Konzentration von 1 μM) Monensin zugegeben, wonach eine vierstündige Inkubation wiederum bei 37°C erfolgte. Das Beenden der Inkubation erfolgte durch das Waschen mit eiskaltem PBS. Hiernach wurde eine extrazelluläre Färbung, wie bereits beschrieben, durchgeführt. Im Anschluss wurde die Zellsuspension zunächst mit 200 μL 2% PFA 5 Minuten lang im Dunkeln bei 4°C inkubiert, dann mit PBS mit 2% BSA gewaschen.

Dann wurden ein Fc-Block (RS) sowie 20 μL Saponinpuffer pro Probe zu den Zellen gegeben und es folgte eine fünfminütige Inkubation bei 4°C . Anschließend wurden Antikörper, die gegen IL-10 und IFN- γ gerichtet waren, in Saponinpuffer hinzugegeben. Nach 20 Minuten Inkubationszeit bei 4°C unter Lichtausschluss wurden die Zellen gewaschen und abschließend für die Messung in 100 μL PBS aufgenommen.

3.2.5.4 Färbung von Transkriptionsfaktoren

Die intranukleäre Antikörperfärbung wurde direkt nach der extrazellulären Färbung mit dem kommerziellen Factor-Staining-Buffer-Set der Firma eBioscience durchgeführt. Im ersten Schritt erfolgte die Inkubation mit einer Fixations- und Permeabilisationslösung. Hierfür wurden das Fixations-/ Permeabilisationskonzentrat mit dem Fixations-/ Permeabilisationsdiluent in einem Verhältnis eins zu vier vermischt und 200 μL zu den Zellen gegeben. Die entstandene Suspension wurde gemischt. Nach einer halben Stunde Inkubation bei 4°C im Dunkeln wurden die Zellen mit PBS mit 0,2% BSA gewaschen. Hiernach wurde jeweils 1 mL Permeabilisierungspuffer hinzugefügt und die Suspension damit erneut gewaschen.

Dann wurden die gewünschten Antikörper in jeweils 50 μL Permeabilisationspuffer zum Zellpellet hinzugegeben, das Pellet resuspendiert und 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Danach wurde die Suspension mit 1 mL eBioscience Permeabilisierungspuffer gewaschen und der Überstand verworfen. Anschließend erfolgte für die durchflusszytometrische Messung eine Resuspension des Pellets in eiskaltem PBS. (modifiziert nach dem Protokoll der Firma eBioscience).

3.2.6 Stimulationen *in vitro*

Um zu beurteilen, in wieweit die Transkriptionsfaktorexpression bei Lymphozyten durch verschiedene Stimuli induzierbar war, wurden die Milzzellen mit unterschiedlichen Substanzen inkubiert und im Anschluss einer Antikörperfärbung sowie einer durchflusszytometrischen Analyse unterzogen. Die Zellen wurden hierbei mit spezifischen Peptiden oder Zytokinen und dem standardisierten Komplettmedium für unterschiedliche Zeiträume bei 37°C im CO₂ Brutschrank inkubiert. Nach dem Beenden der Stimulation wurde das Medium von den Zellen gewaschen und es wurde eine Antikörperfärbung durchgeführt.

3.2.7 Anreicherung von CD8⁺ T- Zellen

Die Herstellung einer Zellsuspension aus isolierten CD8⁺ T-Zellen erfolgte mit einem kommerziell erhältlichen Kit, dem *EasySep™ Mouse CD8⁺ T Cell Isolation Kit*. Die Anreicherung erfolgte durch eine negative Selektion der CD8⁺ T-Zellen. Das Prinzip dieser Methode beruhte auf einer Antikörperbindung an unerwünschte Zellen einer Gesamtsuspension sowie deren Entfernung aus der Suspension durch magnetische Partikel. Zunächst wurden Milzzellen ohne vorrausgehende Erythrozytenlyse in einer Konzentration von 1×10^8 Zellen pro mL in PBS und 2 % FKS aufgenommen. Danach wurden der entstandenen Suspension 25 µL/ml RS und 50 µL/ml „CD8⁺ Enrichment Cocktail“ zugefügt und das Gemisch wurde 15 Minuten lang bei 4°C inkubiert. Der Cocktail bestand aus einer Reihe von in PBS aufgenommenen biotinylierten monoklonalen Antikörpern gegen Oberflächenmarker muriner hämatopoetischer Zellen wie z.B. CD4 oder CD11b. Hiernach wurden 100 µL/ml „Biotin Selection Cocktail“ hinzu gegeben und es erfolgte eine wiederholte Inkubation für 15 Minuten bei 4°C. Dieser Cocktail bestand aus in PBS aufgenommenen sogenannten TAK, tetrameren Antikörperkomplexen. Diese bestanden aus jeweils einem monoklonalen murinen IgG₁ Antikörper, der gegen Biotin gerichtet war und einem monoklonalen murinen IgG₁ Antikörper, der gegen Dextran gerichtet war. Beide Antikörper wurden durch zwei monoklonale Rattenantikörper, die gegen murines IgG₁ gerichtet waren, verbunden.

Als letzter Protokollschritt wurden der Zellsuspension 100 µL/ml „D2 Magnetic Particles“ hinzugefügt und es fand eine fünfminütige Inkubation bei 4°C statt. Die „Magnetic Particles“ waren in TRIS-Puffer (Trometamol) suspendierte Eisen-Dextran Komplexe.

Durch die Bindung der TAK an diese Partikel sollte die negative Selektion von CD8⁺ T-Zellen erfolgen. Die so behandelte Zellsuspension wurde im Anschluss mit PBS und 2% FKS auf 2.5 mL aufgefüllt und das Reaktionsgefäß wurde in einen Magneten überführt und 5 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert.

Dann wurde die Zellsuspension mit einer fließenden Bewegung in ein neues Gefäß überführt. Die isolierten CD8⁺ T-Zellen waren somit im neuen Gefäß, während die restlichen Zellen entweder am Gefäßboden oder an den Wänden hafteten. Die Effizienz der Anreicherung isolierter Zellen wurde mit Durchflusszytometrie bestimmt.

Das Verhältnis von CD8⁺ T-Zellen in der neu entstandenen Zellsuspension im Vergleich zu der Messung bei einer Milz ohne Selektion war deutlich erhöht. Während die durchschnittliche CD8⁺ T-Zellzahl einer Milz zwischen 8 – 15 % aller Lymphozyten betrug, enthielt die angereicherte Suspension zwischen 85 – 95 % CD8⁺ T-Zellen.

3.2.8 Kompetitiver Zelltransfer

Für die Beurteilung der Gen-defizienten T-Zellfunktion unabhängig vom Genotyp anderer hämatopoetischer und nicht-hämatopoetischer Zellen wurde ein Transfermodell verwendet. Hierbei wurden CD8⁺ T-Zellen aus einer Mauslinie mit einem transgenen T-Zellrezeptor gereinigt und in eine Empfängermaus injiziert. Bei den Donortieren handelt es sich um OT1-Mäuse, die transgen für einen MHC Klasse-I restringierten T-Zellrezeptor mit einer Spezifität für das Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ waren {Hogquist *et al.* 1994, Barnden *et al.* 1998}. Als Konsequenz werden diese CD8⁺ T-Zellen in einer Infektion mit rekombinanten Lm, die das Surrogatantigen Ovalbumin tragen (LmOVA), aktiviert. Durch Verwendung von IRF4-defizienten OT-1-Mäusen als Donoren, kann gezielt die Funktion von IRF4 in CD8⁺ T-Zellen in einem ansonsten normalen Umfeld analysiert werden. Ein Kotransfer von Wildtyp- und IRF4-defizienten OT1-Zellen in denselben Empfänger erlaubt den direkten Vergleich von Wildtyp und defizienten CD8⁺ T-Zellen.

Zur Unterscheidung der verschiedenen T-Zellpopulationen wurde das CD90-Antigen verwendet, für das zwei Allele vorliegen, die durch monoklonale Antikörper spezifisch anfärbbar sind. Die einzelnen Mauslinien wurden vom C57BL/6 Hintergrund (CD90.2) auf den CD90.1-kongen Hintergrund gekreuzt. In den hier durchgeführten Experimenten waren

die Wildtyp-Donoren CD90.1⁺ CD90.2⁺, die IRF4-defizienten Donoren CD90.1⁻ CD90.2⁺ und die Rezipienten CD90.1⁺ CD90.2⁻.

Die CD8⁺ T-Zellen wurden nach der Aufreinigung in steriles PBS aufgenommen und mittels Durchflusszytometrie der Anteil an Va2⁺ T-Zellrezeptortransgenen CD8⁺ T-Zellen bestimmt. Die Donorzellen wurden so gemischt, dass ein T-Zellverhältnis von 1:1 vorlag. Danach wurden die Zellen auf die gewünschte Konzentration eingestellt und in 200 µL intravenös in Empfängermäuse injiziert. In einem Teil der Experimente wurden auch ungereinigte Milzzellen so gemischt, dass die Va2⁺ CD8⁺ T-Zellen im Verhältnis 1:1 vorlagen. Dieses Vorgehen war möglich da in diesen Experimenten nur relativ geringe T-Zellzahlen transferiert wurden. Auch die zusätzlich transferierten Zellen lagen daher in Relation zu den entsprechenden Zellen des Empfängers nur in einem sehr niedrigen Verhältnis vor, so dass sie einen zu vernachlässigenden Einfluss auf die Immunantwort der Empfängermäuse haben sollten.

In den Transferexperimenten wurden Empfängertiere mit LmOVA i.p. infiziert und 4-5 Stunden später wurden die gereinigten T-Zellen i.v. injiziert.

3.2.9 Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrie oder FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) ist besonders gut dafür geeignet, Zellarten voneinander zu unterscheiden und gemäß ihrer Eigenschaften zu sortieren. Außerdem erlaubt die Methode den Nachweis der Expression verschiedenster Transkriptionsfaktoren oder Zytokine.

Das Sortieren der Zellen erfolgt auf der Grundlage ihrer Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften. Bereits ohne Anfärbung können Zellen anhand ihrer Größe und Granularität unterschieden werden. Dies erfolgt über das Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) und das Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC). Um weitere Zelleigenschaften zu ermitteln, ist jedoch eine Färbung der Zellen mit Fluorochromen erforderlich. Deswegen wurden die Zellen vor der Messung nach den bereits beschriebenen Protokollen extrazellulären, intrazellulär bzw. intranukleären gefärbt.

Die Anfärbung erfolgte mit Antikörpern gegen zellspezifische Antigene, an die Fluorochrome gekoppelt waren. Fluorochrome sind entweder niedermolekulare Verbindungen oder Proteine,

die Licht einer definierten Wellenlänge emittieren können, wenn sie mit Licht angeregt werden.

Diese Lichtemissionen für individuelle Zellen werden durch Detektoren ermittelt. Anschließend können zur Analyse die Signale im Computer als zweidimensionale Punktwolken dargestellt werden, wobei jeder Punkt einem Ereignis bzw. einer Zelle entspricht. Die Punktwolken können dann mittels so genannter *gates*, Ausschnitten aus den Gesamtpopulationen, weiter analysiert werden.

Man kann so zum einen die relativen Anteile der zu untersuchenden Populationen durch ausgewählte spezifische Marker, zum anderen aber auch die mittlere Fluoreszenzintensität, kurz MFI darstellen. So gelingt es, Zellen zu charakterisieren, die bestimmte Moleküle auf ihrer Oberfläche oder in ihrem Kern tragen. Die während der Isolierung der Zellen aus den Organen ermittelten Gesamtzellzahlen ermöglichen eine Bestimmung der absoluten Zellzahlen nach dem Abschluss der Messung.

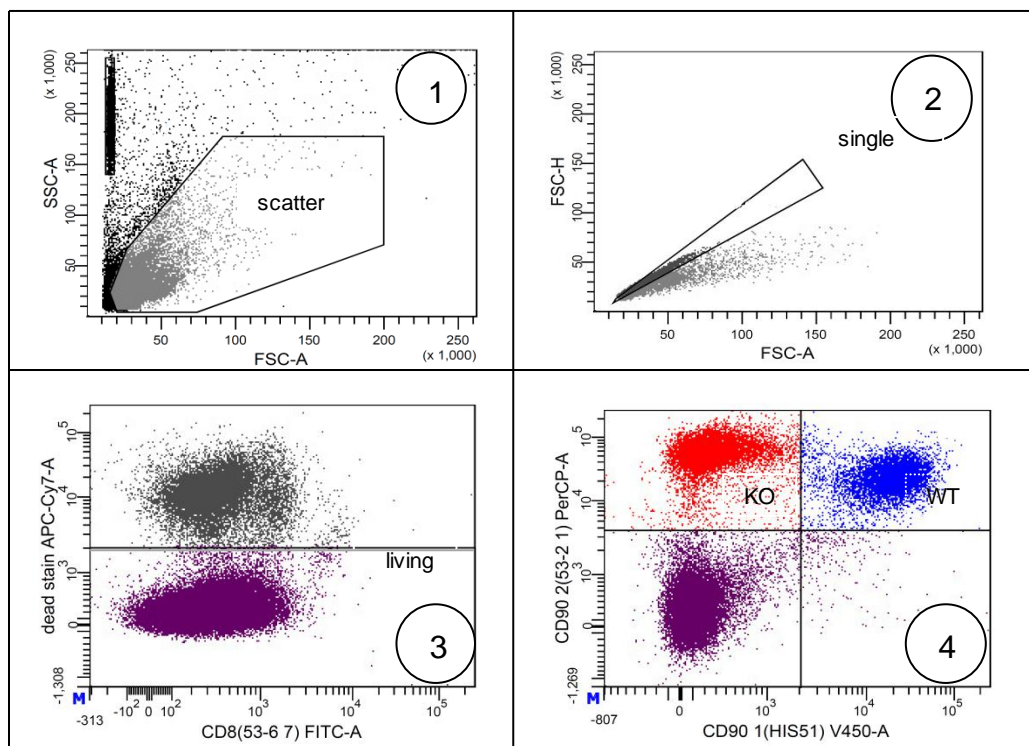


Abbildung 2: Beispiel für eine verwendete Gatingstrategie

Für (1) wurde eine Unterteilung nach Zellgröße und Granularität vorgenommen – das Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter*, FSC) korreliert hierbei mit der Größe der Zellen und das Seitwärtsstreulicht (*Side Scatter*, SSC) mit deren Granularität. Oben links im Diagramm finden sich „beads“, standardisierte mit PE Farbstoff beschichtete Partikel, die in einem Teil der Experimente zur Zellzahlbestimmung verwendet wurden. Als

nächster Schritt (2) wurden Zellaggregate oder Dubletten ausgegrenzt. Danach erfolgte in (3) eine Trennung der vitalen von den toten Zellen via Totzellfarbstoff. Im Schritt (4) wurden die vitalen Zellen weiter klassifiziert. In diesem Fall wurden Wildtyp- und IRF4-defiziente T-Zellen durch eine Färbung von Oberflächenmolekülen voneinander abgegrenzt. Wildtypzellen (WT) haben sowohl CD90.1 als auch CD90.2 auf ihrer Oberfläche, während IRF4-defiziente (KO) Zellen nur CD90.2 haben. Bis Schritt (3) war die Gatingstrategie stets identisch um eine Untersuchung vitaler Zellen zu gewährleisten.

In einem Teil der Versuche wurde den Zellen vor der Analyse eine definierte Zahl an *PE beads* zugesetzt. Diese bestehen aus Mikrosphären aus Polymethylmethacrylat mit einer Größe von 6 µm und einem Fluorochrom. Durch das Ansaugen der Probe wurden die *beads* zusammen mit den Zielzellen aufgenommen und man konnte im Nachhinein die absolute Zellzahl berechnen, indem man ein Verhältnis zwischen den eingesetzten und tatsächlich gemessenen *beads* bildete.

3.2.10 Statistik

Bei den *in vitro*-Experimenten wurden je nach Experiment drei oder mehr Versuchswiederholungen in eine Gruppe zusammengefasst. Dabei wurden pro Experiment jeweils Doppelwerte bestimmt. Bei der Analyse wurde ein *unpaired t-Test* durchgeführt. Bei den *in vivo*-Experimenten wurden pro Versuch Gruppen von jeweils drei Tieren gebildet und die gleiche Anzahl von Werten von mindestens zwei Gruppen miteinander verglichen. Die Auswertung dieser Daten erfolgte zunächst mit einem One way anova und die Ergebnisse wurden dann durch einen *unpaired t-Test* weiter klassifiziert.

Als signifikant galt ein p-Wert von kleiner als 0.05. * entspricht $p < 0,05$, ** bedeutet $p < 0,01$ und *** entspricht $p < 0,001$. Die Diagramme und Statistiken wurden mit dem Programm GraphPad Prism erstellt und die Abbildungen daraus mittels Adobe Illustrator oder Microsoft Excel erstellt.

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchung der IRF4-Expression nach Stimulation von CD8⁺ T-Zellen, CD4⁺ T-Zellen und CD19⁺ B-Zellen

IRF4 wird in Zellen des Immunsystems abhängig vom Grad der Aktivierung und Differenzierung exprimiert. In einer ersten Serie von Experimenten wurde getestet, in welchem Umfang IRF4 durch einen TZR-Stimulus in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen induziert wird. Als ein zusätzlicher Stimulus wurde LPS verwendet um Entzündungssignale zu imitieren. Für die Stimulation wurden Milzzellen eingesetzt, das heißt, dass neben CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen auch dendritische Zellen, Makrophagen und CD19⁺ B-Zellen in der Kultur waren. Diese Zellen reagierten auf LPS mit einer Aktivierung sowie Freisetzung von Entzündungszytokinen. Nach Aktivierung der zu untersuchenden Zellen wurde die Expression der Transkriptionsfaktoren IRF4, Eomesodermin (Eomes) und Tbet untersucht.

Bei der Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen zu TH1-Zellen und CD8⁺ T-Zellen zu Effektorbeziehungsweise Memory-Zellen spielen die Transkriptionsfaktoren Tbet und Eomes eine entscheidende Rolle. In CD4⁺ T-Zellen ist Tbet für die Differenzierung zu TH1-Zellen notwendig. Nach Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen werden zunächst sowohl Eomes als auch Tbet induziert. Tbet ist dann höher in Effektorzellen als in Memoryzellen exprimiert, während Memoryzellen mehr Eomes als Effektorzellen exprimieren {Intlekofer *et al.* 2005}.

Milzzellen einer C57BL/6 Maus (Wildtyp) wurden im Komplettmedium für insgesamt zwei Tage inkubiert. Dem Medium wurden entweder anti-CD3 monoklonale Mausantikörper (mAk) für eine T-Zellstimulierung oder LPS als Entzündungsmediator, oder eine Kombination beider Substanzen zugegeben. Als Kontrolle dienten Zellen, die nur in Komplettmedium inkubiert wurden. Nach zwei Tagen Inkubationszeit wurden die Zellen extrazellulär mit Antikörpern gefärbt. Eine zusätzliche intrazelluläre Färbung diente der Untersuchung der Expression der Transkriptionsfaktoren IRF4, Eomes und Tbet. Die Analyse der mit unterschiedlichen Stimuli behandelten Zellen erfolgte mittels FACS. Für eine Negativkontrolle der Zellfärbung wurden Isotypkontrollen für die Antikörper der entsprechenden Färbungen eingesetzt. An ihnen orientieren sich die Quadrantengrenzen der folgenden Abbildungen.

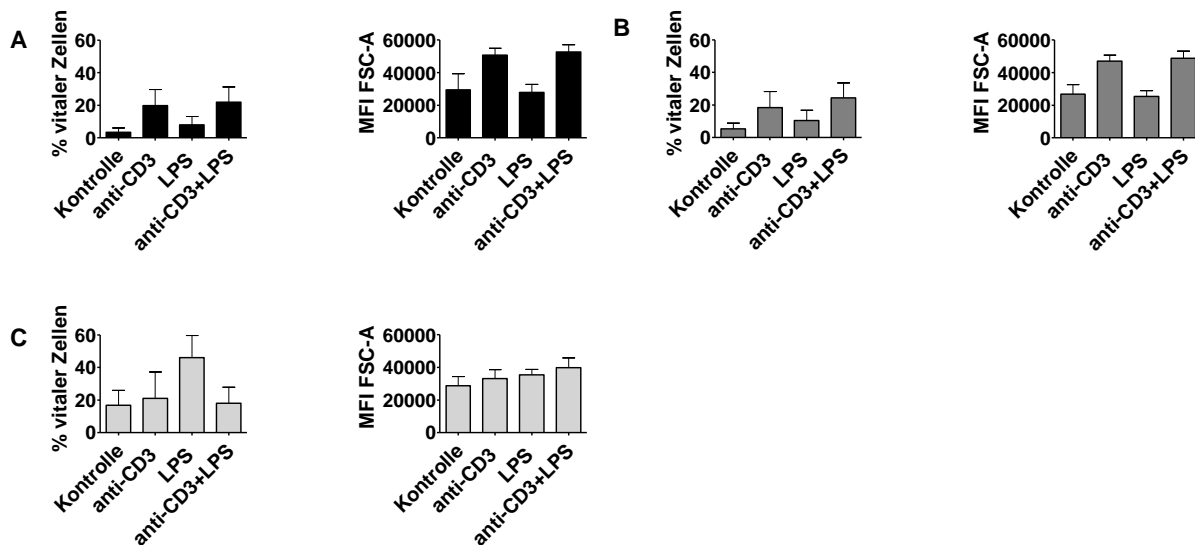


Abbildung 3: Untersuchung von Lymphozytenpopulationen nach *in vitro* Stimulation

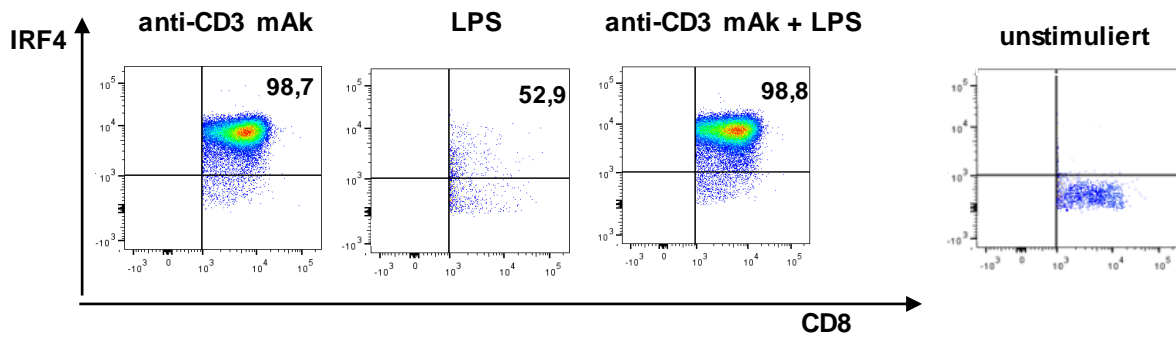
Aus der Milz einer C57BL/6 Maus wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt und es wurden jeweils 5×10^5 Zellen mit 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti-CD3 mAk, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS, oder beiden Substanzen in Komplettmedium zwei Tage lang inkubiert. CD8^+ T-Zellen, CD4^+ T-Zellen und CD19^+ B-Zellen wurden durch Antikörperfärbung identifiziert und anhand ihres Anteils an den Gesamtzellen und ihrer Größe charakterisiert. Als Maß der Zellgröße wurde die Mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) im *forward scatter* bei der FACS Messung verwendet. Als Kontrolle wurde die Messung an nur im Komplettmedium inkubierten Milzzellen vorgenommen. (A) zeigt CD8^+ T-Zellen, (B) CD4^+ T-Zellen und (C) CD19^+ B-Zellen.

Die hier gezeigten Daten entstammen einem Beispielerperiment aus einer Gruppe von insgesamt drei durchgeführten Experimenten. Dabei wurde pro Experiment Zellen einer Maus in Doppelwerten untersucht. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM dar.

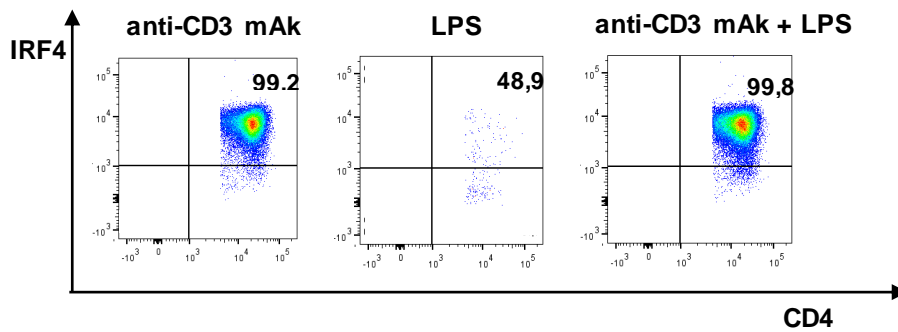
In der nicht stimulierten Milzzellsuspension lagen die Anteile der untersuchten Zellpopulationen bei etwa 5-8% CD8^+ T-Zellen, 6-10% CD4^+ T-Zellen und 12-15% CD19^+ B-Zellen. Wie in Abbildung 3 dargestellt, vergrößerte sich beim Einsatz vom anti-CD3 mAk-Stimulus, wie erwartet, der entsprechende Anteil der T-Zellen, während er bei den CD19^+ B-Zellen etwa gleich blieb. Beim Einsatz von LPS dagegen unterschied sich der Anteil der T-Zellpopulationen nur marginal von der Kontrolle, während der B-Zellanteil viel größer wurde. Die Kombination beider Substanzen bewirkte keine große Änderung im Vergleich zum alleinigen Einsatz von anti-CD3 mAk-Stimulus.

Die Untersuchung der Zellgröße ergab ein entsprechendes Ergebnis – wie erwartet wurden T-Zellen bei einer CD3-Stimulation größer, also zu Blasten transformiert.

CD8⁺ T-Zellen nach Stimulation



CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation



CD19⁺ B-Zellen nach Stimulation

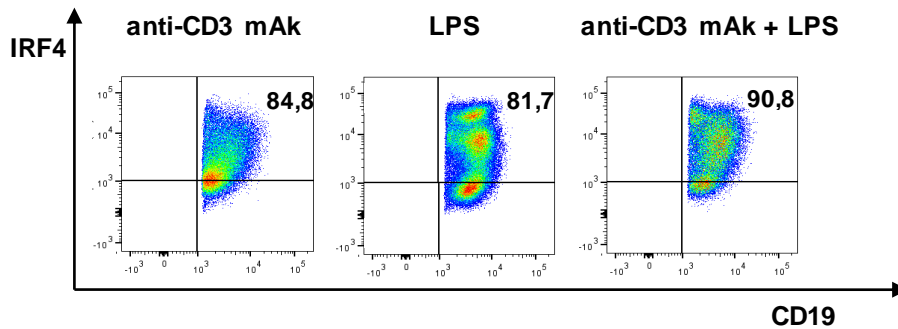


Abbildung 4: IRF4-Expression in Abhängigkeit vom eingesetzten Zellstimulus

Milzzellen einer C57BL/6 Maus wurden mit anti-CD3 mAk, LPS oder beiden Substanzen stimuliert, nach Ablauf einer zweitägigen Inkubation gefärbt und ihre IRF4-Expression wurde untersucht. Es sind jeweils nur CD8⁺ T-Zellen, CD4⁺ T-Zellen und CD19⁺ B-Zellen dargestellt. Die jeweiligen Quadrantengrenzen wurden anhand einer Isotypkontrolle festgelegt. Zudem ist eine Beispielabbildung für unstimulierte CD8⁺ T-Zellen dargestellt. Es wurden beispielhaft die Dotplots eines Experiments aus einer Gruppe von insgesamt drei in Doppelwerten durchgeführten Experimenten gezeigt.

In Abbildung 4, bei der Untersuchung vitaler Zellen hinsichtlich ihrer IRF4-Expression, wurde deutlich, dass Stimulation mit anti-CD3 mAk eine starke Expression von IRF4 in T-Zellen verursachte, bei Zugabe von LPS war allein bei B-Zellen eine nennenswerte IRF4-Induktion zu verzeichnen, und bei der Kombination beider Stimuli war die IRF4-Expression im Vergleich zum anti-CD3 mAk nur marginal erhöht.

Bei der Betrachtung der Expression der Transkriptionsfaktoren Tbet und Eomes wurde deutlich, dass bei einer direkten TZR-Stimulation ihre Expression in den CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen deutlich induziert wurde. In den CD19⁺ B-Zellen vergrößerte sich die Expression von IRF4 bei reiner TZR-Stimulation zwar, was jedoch wahrscheinlich auf eine Kostimulation der B-Zellen durch T-Zellen in der Zellsuspension zurückzuführen ist. Desweiteren ließ sich feststellen, dass die CD19⁺ B-Zellen im Gegensatz zu den T-Zellen kaum Eomes exprimierten.

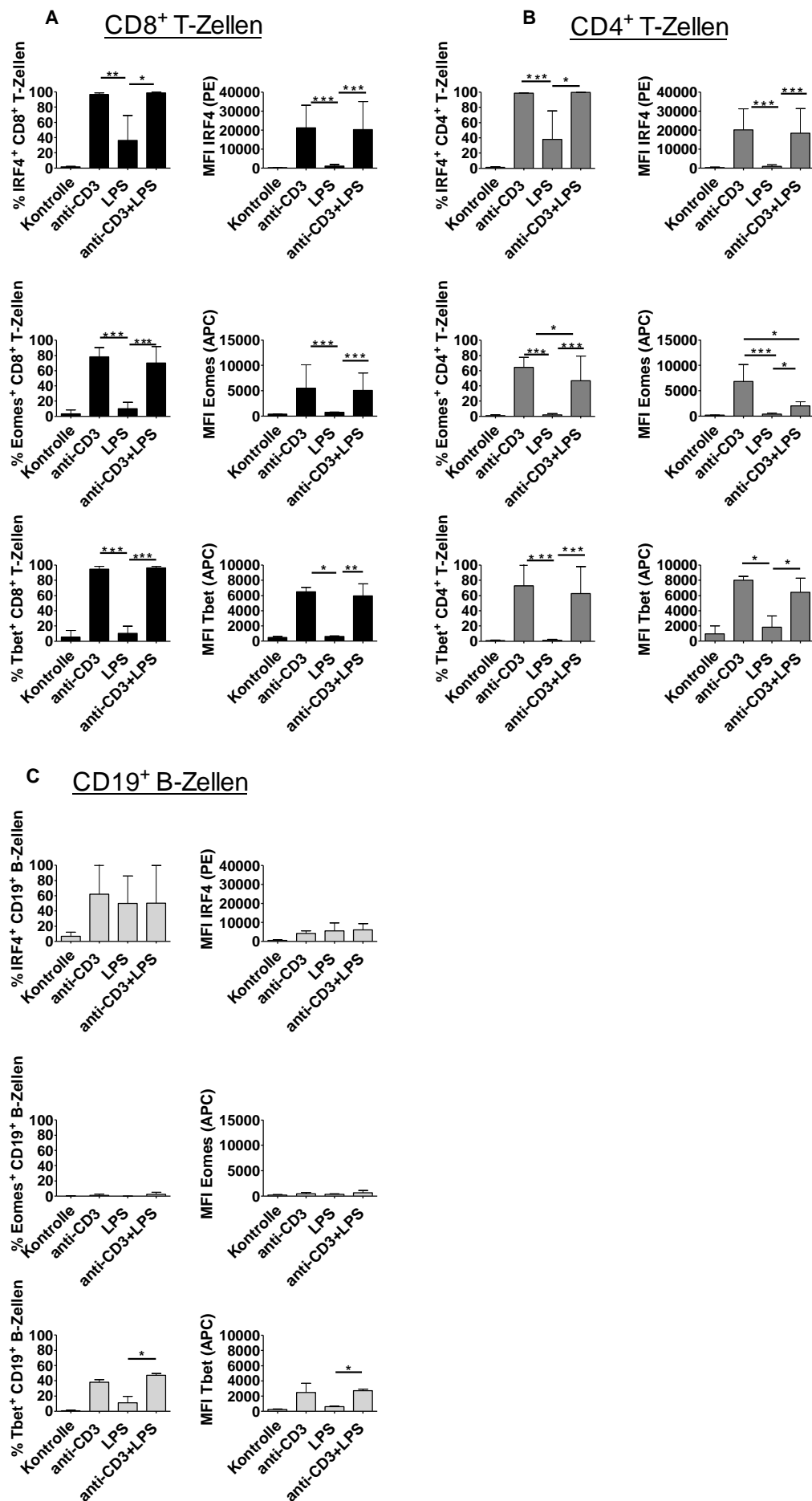


Abbildung 5: *Vergleich der Expression von IRF4, Eomes und Tbet in CD8⁺ T-Zellen, CD4⁺ T-Zellen und CD19⁺ B-Zellen*

Es ist ein Vergleich der Expression von IRF4, Eomes und Tbet in CD8⁺ T-Zellen, CD4⁺ T-Zellen und CD19⁺ B-Zellen in Form von Balkendiagrammen dargestellt. Die linke Grafik zeigt dabei den Anteil der Transkriptionsfaktor-positiven Zellen aus der Gesamtpopulation dieser Zellen. Die rechte Grafik zeigt die MFI des entsprechenden Transkriptionsfaktors dieser Zellen. Als Kontrolle wurden Zellen verwendet, die zwei Tage lang ohne Stimulus inkubiert wurden. (A) ist dabei die Darstellung von CD8⁺ T-Zellen, (B) zeigt CD4⁺ T-Zellen und (C) CD19⁺ B-Zellen.

Einbezogen wurden die jeweiligen Doppelwerte aus insgesamt drei Versuchen. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM dar. Es wurden jeweils die stimulierten Zellen miteinander verglichen.

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

Zusammengefasst wurde nachgewiesen, dass die IRF4-Expression in T-Zellen von einer TZR-Stimulation abhängig war und dass ein entzündlicher Reiz sich bestenfalls modulierend auswirkte. Außerdem konnte man feststellen, dass stimulierte Zellen im Vergleich zur unstimulierten Kontrollzellgruppe deutlich mehr IRF4 exprimierten.

Da der Fokus dieser Arbeit auf der Steuerung der Expression und den Wirkungen von IRF4 in CD8⁺ T-Zellen liegen sollte, wurden in den nächsten Experimenten die CD4⁺ T-Zellen und CD19⁺ B-Zellen nicht mehr in die Untersuchungen mit einbezogen.

4.2 Analyse der IRF4-Expression in CD8⁺ T-Zellen in Abhängigkeit von der TZR-Stimulation

In publizierten Vorarbeiten wurde beschrieben, dass die Stärke der IRF4-Expression in CD8⁺ T-Zellen von der Stärke der T-Zellrezeptorstimulation abhängt {Raczkowski *et al.* 2013}. In einer ersten Serie von Experimenten sollte dieses Ergebnis überprüft und auf andere Transkriptionsfaktoren ausgeweitet werden. Für diese Analysen wurden Milzzellen einer TZR-transgenen Maus (OT-1 Maus) verwendet, in der alle CD8⁺ T-Zellen spezifisch das Ovalbumin-Peptid₂₅₇₋₂₆₄ (Aminosäuresequenz: SIINFEKL) im Kontext mit MHC Klasse I erkennen. Diese Maus stand auf einem Wildtyp und einem IRF4^{-/-} Hintergrund zur Verfügung. Wildtypzellen konnten anhand der Oberflächenmoleküle CD90.1⁺ und CD90.2⁺ identifiziert werden, während die IRF4^{-/-} Zellen nur CD90.2⁺ waren.

Zunächst wurden die Milzen der OT-1-transgenen Mäuse und IRF4^{-/-} OT-1-transgenen Mäuse jeweils zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet und in einem Verhältnis von 1:1 in ein Kompletmedium überführt. Danach wurde der Suspension OVA₂₅₇₋₂₆₄ in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt. Die Konzentrationen lagen dabei zwischen 10⁻⁶ und 10⁻¹² M. Die Zellsuspension wurde im Anschluss in einem CO₂-Brutschrank bei 37°C inkubiert, mit Antikörpern gefärbt und es wurde eine durchflusszytometrische Untersuchung der CD8⁺ T-Zellen der Suspension durchgeführt. Dabei wurden lebende singuläre Milzzellen betrachtet, die mit einer „lebend/tot“-Färbung von toten Zellen abgegrenzt werden konnten. Die Zielmoleküle waren die Transkriptionsfaktoren IRF4 sowie Eomes und Tbet.

Zunächst wurde die Frequenz der vitalen CD8⁺ T-Zellen nach der Inkubation im Vergleich zwischen Wildtyp und IRF4^{-/-} betrachtet.

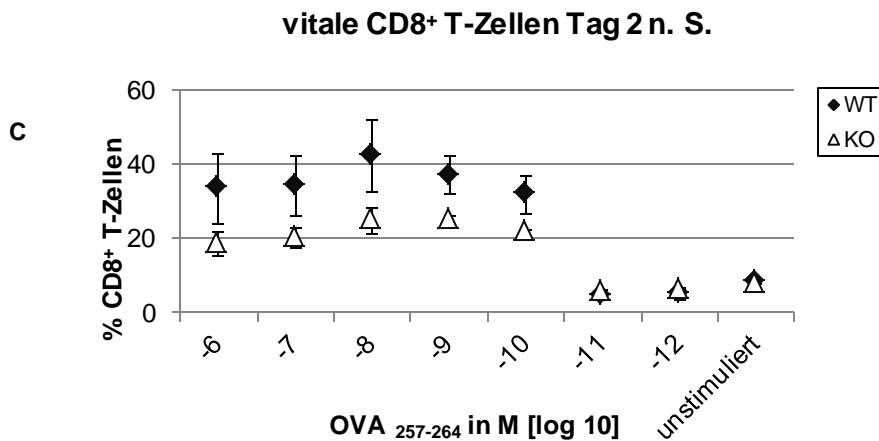
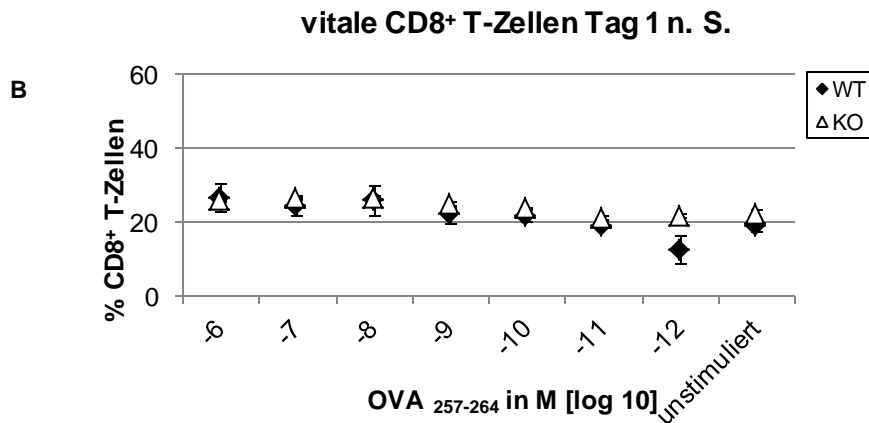
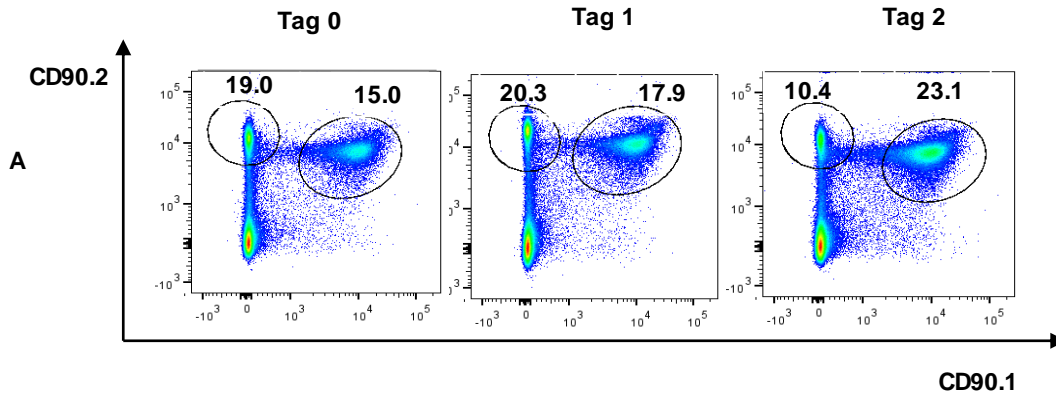


Abbildung 6: Anteil der CD8⁺ T-Zellen; Vergleich zwischen WT und IRF4^{-/-}

Jeweils 2.5×10^5 Milzzellen einer WT und einer IRF4^{-/-} OT-1 Maus wurden gemischt und mit unterschiedlichen Konzentrationen des Peptids OVA₂₅₇₋₂₆₄ kultiviert. Nach 1 und 2 Tagen wurden die Zellen gefärbt und gemessen. Abbildung (A) zeigt den Vergleich zwischen WT und IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen als Dotplot an den Tagen 0, 1 und 2 nach Stimulation. OT-1-WT CD8⁺ T-Zellen sind CD90.1⁺ CD90.2⁺, während die OT-1-IRF4^{-/-} Zellen CD90.1⁻ CD90.2⁺ sind. So sind links in der Abbildung die KO-Zellen zu erkennen und rechts die WT-Zellen. Da CD90.1 und CD90.2 nur auf den T-Zellen vorhanden ist, findet sich auch eine CD90.1⁻CD90.2⁺ Population (links unten). In den Abbildungen (B) und (C) wird der relative Anteil vitaler CD8⁺ T-Zellen dargestellt, (B) zeigt den ersten Tag der Inkubation und (C) den zweiten Tag. Als Kontrolle wurden nicht stimulierte Milzzellen inkubiert und

mitgefärbt. Die Werte in (B) und (C) wurden anhand der $CD8^+ CD90.1^+ CD90.2^+$ Wildtypzellen und der $CD8^+ CD90.1^- CD90.2^+$ IRF4^{-/-} Zellen berechnet.

Die Abbildung (A) zeigt repräsentative Dotplots eines Experiments aus einer Gruppe von insgesamt drei Experimenten. Dabei wurden pro Experiment Zellen jeweils einer Maus in Doppelwerten untersucht. Für die graphische Auswertung der Abbildungen (B) und (C) wurden die Ergebnisse aller drei Versuche berücksichtigt. n.S.= nach Stimulation; WT= OT-1-transgene Maus; KO= IRF4^{-/-} OT-1-transgene Maus

Der Anteil der $CD8^+$ T-Zellen änderte sich, wie Abbildung 6 zeigte, abhängig von der Stimulation. Am Tag eins waren die Anteile der $CD8^+$ T-Zellen für Wildtyp und IRF4^{-/-} etwa gleich. Am Tag zwei jedoch war ein deutlicher Unterschied zwischen den Zellen erkennbar. Der Anteil an Wildtypzellen nahm bis zu einer Peptidkonzentration von 10^{-9} M zu, was auf eine Proliferation schließen lassen könnte. Der Anteil an IRF4^{-/-} Zellen vergrößerte sich dagegen nicht.

Diese Beobachtung bedeutete, dass IRF4 eine wichtige Rolle für das Überleben und wahrscheinlich auch die Proliferation von $CD8^+$ T-Zellen spielte. Es war außerdem auffällig, dass der Anteil an Wildtypzellen nicht proportional zur Peptidkonzentration und somit zur Stimulationsstärke anstieg. Bis zu einer Peptidkonzentration von 10^{-10} M war der Anteil der Wildtyp-T-Zellen stabil. Bei niedrigeren Konzentrationen sank der Anteil drastisch ab und nur noch ein geringer Anteil der Zellen war vital. Dieses galt vor allem für den zweiten Tag der Inkubation.

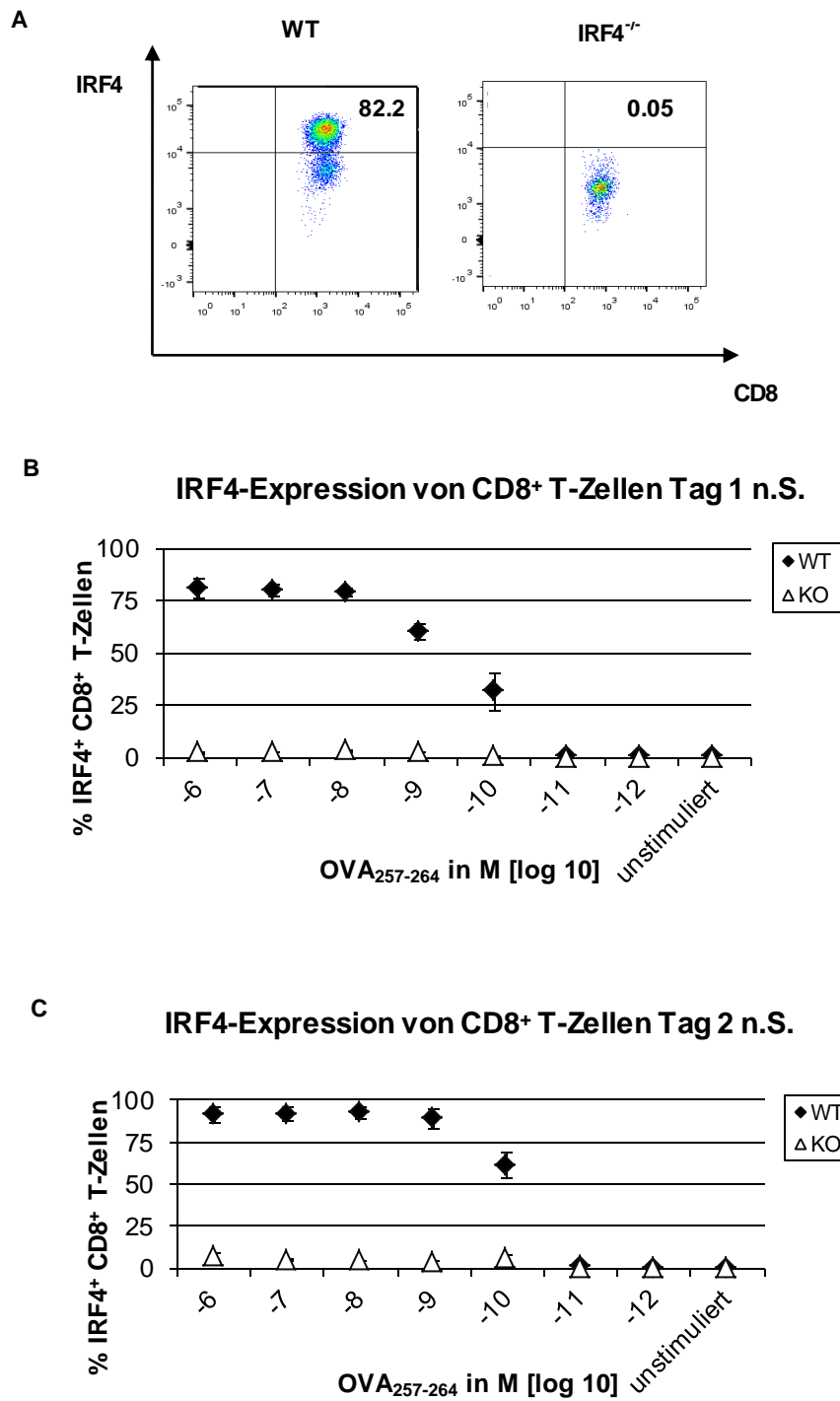


Abbildung 7: IRF4-Expression von CD8⁺ T-Zellen an Tag 1 und 2 bei Stimulation

Die Zellen wurden wie in Abbildung 6 mit OVA₂₅₇₋₂₆₄ stimuliert. An Tag 1 und 2 wurde die Expression von IRF4 durch eine Antikörperfärbung bestimmt. Abbildung (A) zeigt die IRF4 Expression von WT und IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen beispielhaft für Tag 2 bei 10⁻⁶ M des OVA₂₅₇₋₂₆₄ Peptids. In den Abbildungen (B) und (C) ist der Anteil der IRF4-positiven Zellen aus der Gesamtpopulation der vitalen CD8⁺ T-Zellen dargestellt. (B) zeigt den ersten Tag und (C) den zweiten Tag der Inkubation. Als Kontrolle wurden Zellen ohne Stimulus inkubiert.

n.S.= nach Stimulation; WT= OT1-transgene Maus; KO= IRF4^{-/-} OT1-transgene Maus

Bei der Untersuchung der IRF4-positiven Zellen in Kultur mit dem unterschiedlich konzentrierten Peptid (Abbildung 7) sah man, dass IRF4 an Tag zwei im Vergleich zu Tag eins stärker exprimiert wurde – die Expressionsrate der CD8⁺ T-Zellen stieg von 75% auf über 90%. Außerdem war IRF4 unabhängig von der Konzentration des stimulierenden Peptids bis 10⁻⁸ M an Tag 1 und 10⁻⁹ M an Tag 2 auf demselben hohen Niveau exprimiert. Erst wenn die Peptidkonzentrationen unterhalb dieser Schwellenwerte lagen, war eine deutliche Abnahme in der Expressionsstärke vorhanden.

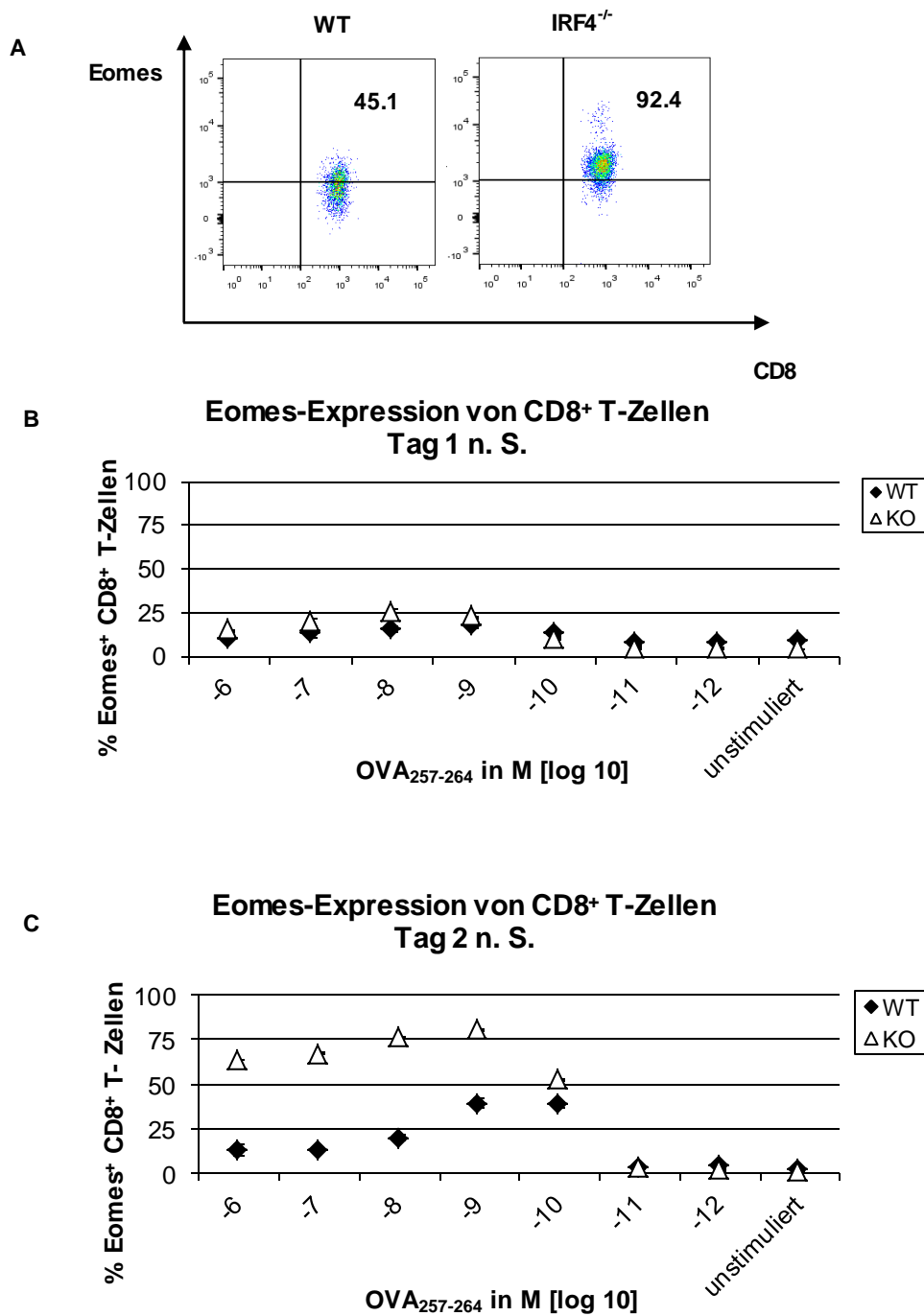


Abbildung 8: *Eomes-Expression von CD8⁺ T-Zellen an Tag 1 und 2 der Stimulation*

Nach einer Inkubation mit OVA₂₅₇₋₂₆₄ Peptid wie in Abbildung 6 wurden CD8⁺ T-Zellen mit anti-Eomes mAk gefärbt. Abbildung (A) zeigt die Eomes-Expression von WT und IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen beispielhaft anhand eines Experiments an Tag 2 bei 10⁻⁶ M des OVA₂₅₇₋₂₆₄ Peptids. In den Abbildungen (B) und (C) ist der Anteil der Eomes-positiven CD8⁺ T-Zellen aus der Gesamtpopulation aller CD8⁺ T-Zellen nach der Inkubation dargestellt. (B) zeigt den ersten Tag und (C) den zweiten Tag der Inkubation. Als Kontrolle wurden Zellen ohne Stimulus inkubiert.

n.S.= nach Stimulation; WT= OT1-transgene Maus; KO= IRF4^{-/-} OT1-transgene Maus

An Tag 1 der Stimulation (Abbildung 8B) war die Expression von Eomes bei Wildtyp und IRF4^{-/-} Zellen nahezu identisch und jeweils 15-2% der T-Zellen waren Eomes⁺. An Tag zwei jedoch exprimierten die Wildtypzellen deutlich weniger Eomes als die IRF4-defizienten Zellen, von denen jetzt bis zu 80% Eomes⁺ waren (Abbildung 8C). Außerdem nahm bei den Wildtypzellen die Eomes-Expression bei absteigender Peptidkonzentration bis zur 10⁻⁹ M Peptidkonzentration zu. Sie näherte sich dabei bei niedrigen OVA-Konzentrationen dem Expressionsniveau der IRF4^{-/-} Zellen an. Diese Beobachtung zeigte, dass Eomes ebenso wie IRF4 von der Stimulierung des TZR der CD8⁺ T-Zellen abhängig war. Der Anstieg der Expression bei niedrigen Peptidkonzentrationen bei den Wildtypzellen deutete darauf hin, dass Eomes möglicherweise eine geringere TZR-Signalstärke für die optimale Expression benötigt.

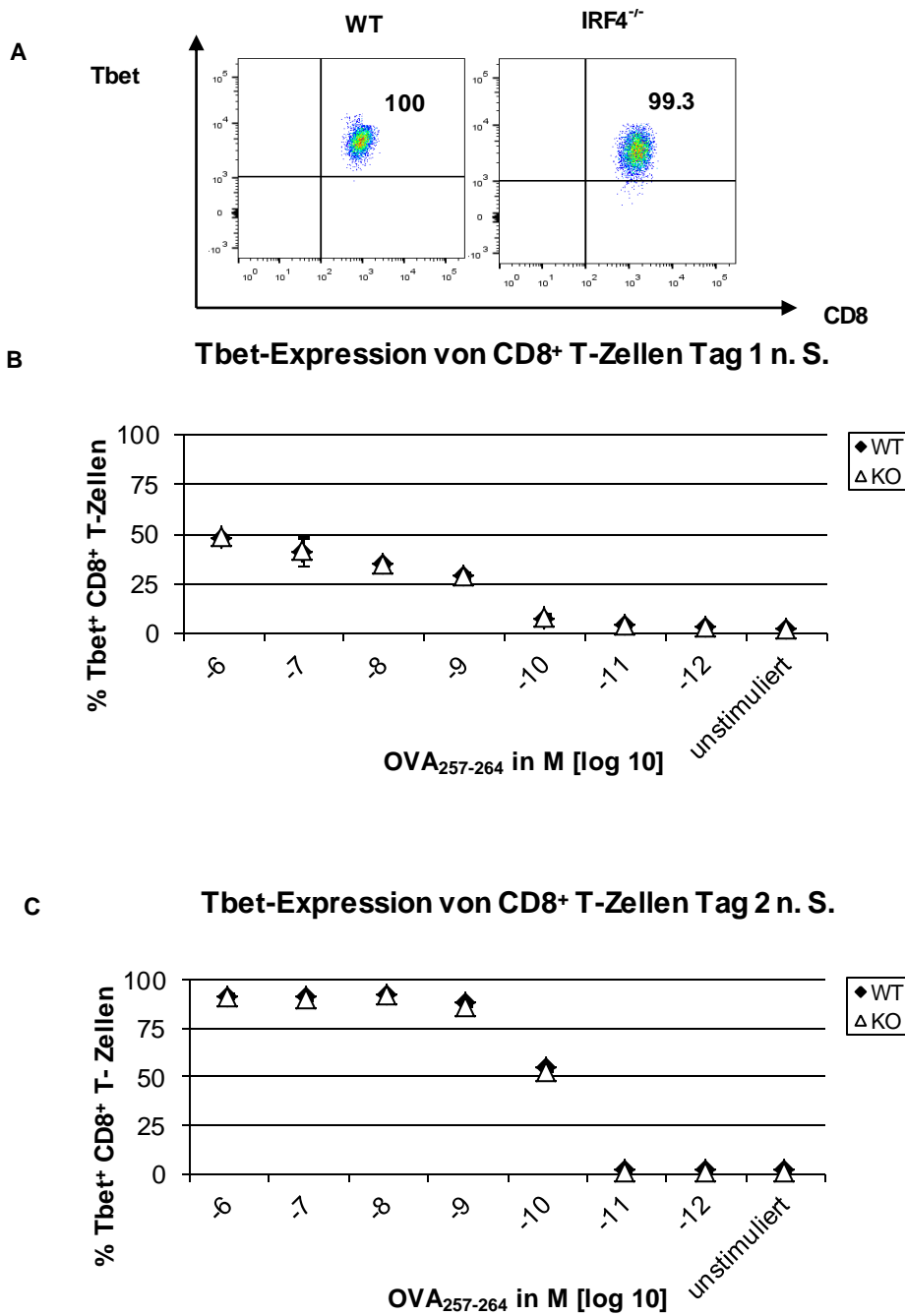


Abbildung 9: Tbet-Expression von CD8⁺ T-Zellen an Tag 1 und 2 der Stimulation

Nach einer Inkubation mit OVA₂₅₇₋₂₆₄ Peptid wie in Abbildung 6 wurden CD8⁺ T-Zellen mit anti-Tbet mAk gefärbt. Abbildung (A) zeigt die Tbet-Expression von WT und IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen beispielhaft anhand eines Experiments an Tag 2 bei 10⁻⁶ M des OVA₂₅₇₋₂₆₄ Peptids. In den Abbildungen (B) und (C) ist der Anteil der Tbet-positiven CD8⁺ T-Zellen aus der Gesamtpopulation aller CD8⁺ T-Zellen nach der Inkubation dargestellt. (B) zeigt den ersten Tag und (C) den zweiten Tag der Inkubation. Als Kontrolle wurden Zellen ohne Stimulus inkubiert.

n.S.= nach Stimulation; WT= OT1-transgene Maus; KO= IRF4^{-/-} OT1-transgene Maus

Wie in Abbildung 9 gezeigt, war das Expressionsprofil von Tbet ähnlich dem von IRF4. An Tag eins lag die Expression bei maximal 50% und stieg an Tag zwei beinahe auf 100% an. Zwischen Wildtyp- und KO-Zellen war kein Unterschied in der Expressionsstärke feststellbar. An Tag eins bestand eine stufenweise Abnahme der Tbet-Expression parallel zur Abnahme der Peptidkonzentration. Dieser Zusammenhang war an Tag zwei nicht mehr gegeben. Die Expression blieb bis zur Peptidkonzentration von 10^{-9} molar auf demselben hohen Niveau und nahm dann drastisch ab. Das ähnliche Expressionsprofil von IRF4 und Tbet könnte auf einen Zusammenhang in der Regulation beider Transkriptionsfaktoren schließen lassen.

Zusammenfassend ließ sich sagen, dass sowohl die Tbet- als auch die IRF4-Expression bei einer spezifischen TZR-Stimulierung ein sehr ähnliches Muster ergab. Eine starke Stimulation des TZR verursachte eine starke Expression der Transkriptionsfaktoren. Eomes dagegen wurde von WT-Zellen nur bei schwacher TZR-Stimulierung stark exprimiert. Im Gegensatz dazu exprimierten $IRF4^{-/-}$ $CD8^{+}$ T-Zellen auch bei hohen Peptidkonzentrationen Eomes stark.

4.3.1 Expression von Transkriptionsfaktoren bei TZR-Stimulation unterschiedlicher Stärke; Untersuchung von Peptidvarianten

In der vorherigen Serie von Experimenten wurde das für $CD8^{+}$ T-Zellen von OT1-Mäusen hochaffine Peptid SIINFEKL in verschiedenen Konzentrationen verwendet. In einer normalen Immunantwort ist die T-Zellantwort aber polyklonal und es werden auch T-Zellen aktiviert, deren T-Zellrezeptor eine niedrigere Affinität zum Peptid hat. Da OT1-T-Zellen einen monoklonalen T-Zellrezeptor haben wurden niedrigaffinere Interaktionen durch die Verwendung von Varianten des SIINFEKL erreicht. Aus Vorarbeiten war bekannt, dass insbesondere die Aminosäure Asparagin (N) für die Erkennung durch den OT1 T-Zellrezeptor wichtig ist, und dass der Austausch des Asparagins durch Glutamin (Q) zu einer etwas niedrigeren Affinität und der Austausch durch Valin (V) zu einer deutlich erniedrigten Affinität führen. Diese Veränderungen in der Affinität führen dann auch zu einer entsprechend reduzierten Fähigkeit die OT1 T-Zellen zu stimulieren. Die Peptidvarianten SIIQFEKL und SIIVFEKL wurden auch in Konzentrationen zwischen 10^{-6} und 10^{-12} M

verwendet. Durch diese Experimente sollte herausgefunden werden, ob die Qualität des TZR-Signals eine Rolle bei der Expression von IRF4 und anderen Transkriptionsfaktoren spielt.

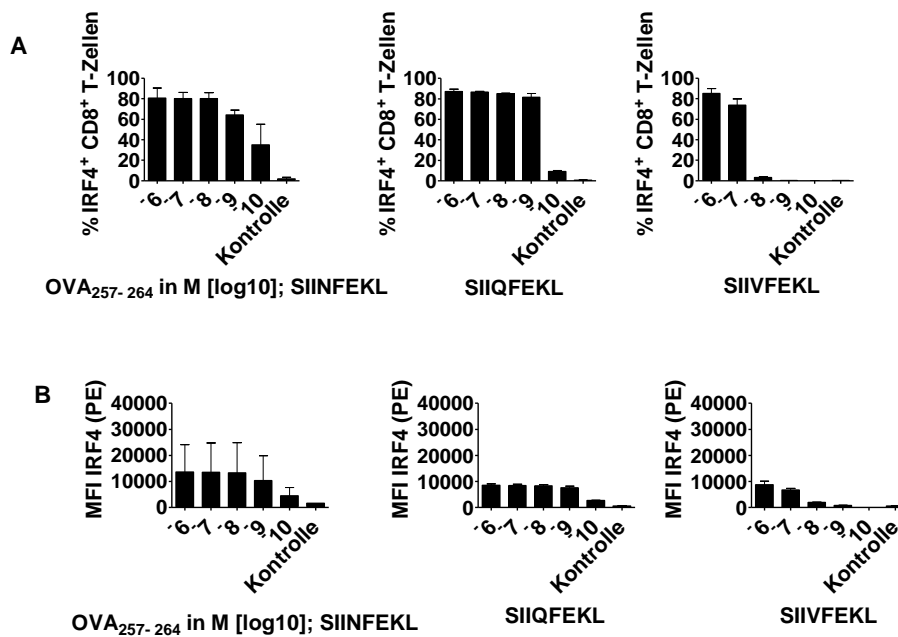


Abbildung 10: Vergleich der IRF4-Expression bei Stimulation mit unterschiedlichen Peptiden an Tag 1 der Stimulation

2.5×10⁵ Milzzellen einer WT OT1-Maus wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der Peptide SIINFEKL, SIIQFEKL und SIIVFEKL kultiviert. Danach wurden die Zellen gefärbt und gemessen. Als Kontrolle wurden Milzzellen ohne Stimulus inkubiert. Abbildung (A) zeigt den Anteil von IRF4⁺ CD8⁺ T-Zellen aller vitalen CD8⁺ T-Zellen aus der Kultur an Tag 1 der Stimulation mit jeweils unterschiedlichen Peptidkonzentrationen. Abbildung (B) zeigt die zugehörigen MFI der entsprechenden Peptidkonzentrationen. Dargestellt ist die graphische Auswertung einer Versuchsgruppe mit insgesamt drei Experimenten. Dabei wurden pro Experiment Zellen jeweils einer Maus in Doppelwerten untersucht. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte ± SEM dar. Für die Auswertung wurden die Ergebnisse aller drei Versuche berücksichtigt.

An Tag 1 der Stimulation zeigte das SIINFEKL Peptid, wie in den bereits beschriebenen Experimenten, eine deutliche Induktion von IRF4 auf einem ähnlich hohen Niveau bis zu einer Konzentration von 10⁻⁹ M und eine schwache Induktion bei 10⁻¹⁰ M. SIIQFEKL hatte ein ähnliches Expressionsmuster zur Folge. Nur im Bereich von 10⁻¹⁰ M zeigte das Peptid eine schwächere Aktivität als das Ausgangspeptid. Im Gegensatz dazu induzierte SIIVFEKL nur bei den höchsten Konzentrationen (10⁻⁶ und 10⁻⁷ M) eine IRF4 Expression. Es fiel weiterhin auf, dass SIINFEKL mit einer MFI von 12.000 für IRF4 im Vergleich zu SIIQFEKL und SIIVFEKL (MFI 9.000) eine stärkere IRF4-Expression pro Zelle verursachte.

Insgesamt wirkte das Peptid SIINFEKL am stärksten agonistisch, es induzierte die höchste IRF4-Expression und war bei sehr geringen Konzentrationen (10^{-9} - 10^{-10} M) aktiv. SIIQVEKL war nur geringfügig schwächer aktivierend, während SIIVFEKL nur bei sehr hohen Konzentrationen in der Lage war IRF4 zu induzieren (siehe Abbildung 10).

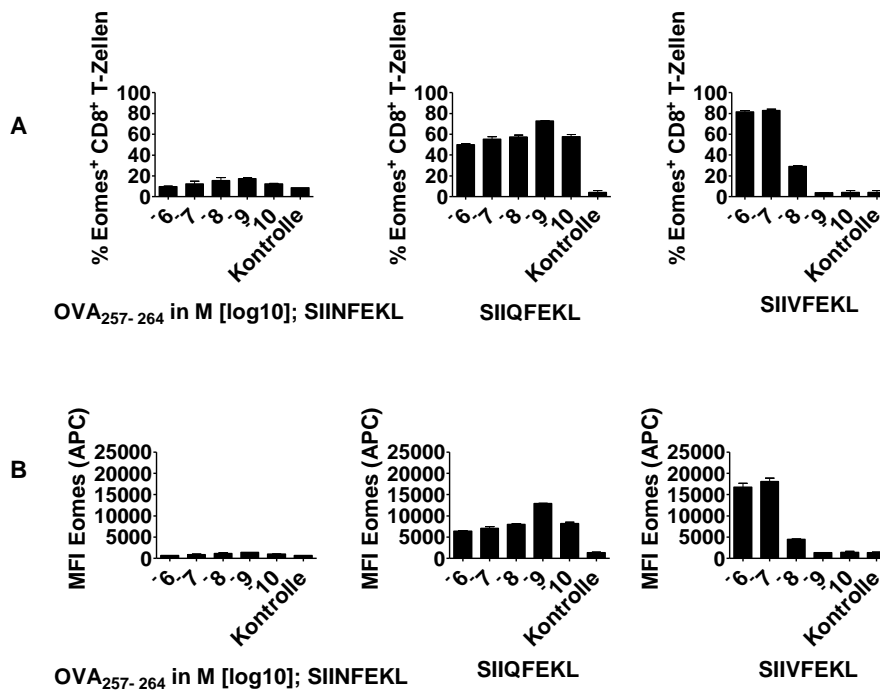


Abbildung 11: Vergleich der Eomes-Expression bei Stimulation mit unterschiedlichen Peptiden an Tag 1 der Stimulation

Nach einer Inkubation mit Peptiden, wie in Abbildung 10 beschrieben, wurden Milzzellen mit anti-Eomes mAk gefärbt. (A) zeigt den Anteil an Eomes⁺ CD8⁺ T-Zellen aller vitalen CD8⁺ T-Zellen aus der Kultur an Tag 1 der Stimulation. (B) zeigt die zugehörigen MFI. Dargestellt ist die graphische Auswertung einer Versuchsgruppe mit insgesamt drei Experimenten. Dabei wurden pro Experiment Zellen jeweils einer Maus in Doppelwerten untersucht. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM dar. Für die Auswertung wurden die Ergebnisse aller drei Versuche berücksichtigt.

Der Transkriptionsfaktor Eomes wurde an Tag 1 der Stimulation mit SIINFEKL nur von 15-20% der CD8⁺ T-Zellen exprimiert, wie in Abbildung 11 dargestellt. Auch die mittlere Expression pro Zelle war niedrig, vergleichbar mit den nicht stimulierten Kontrollzellen. SIIQFEKL induzierte eine deutlich erhöhte Eomes-Expression sowohl in Bezug auf den Anteil positiver Zellen als auch der Expressionsstärke. SIIVFEKL bewirkte sogar eine Eomes-Expression in 80% der Zellen mit einem drastischen Anstieg der mittleren Expressionsstärke.

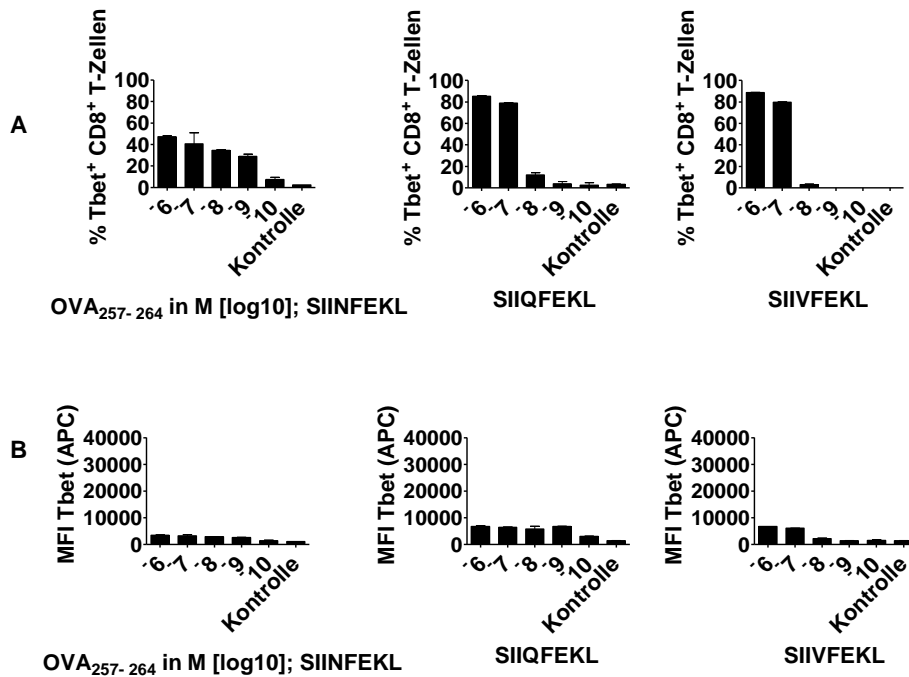


Abbildung 12: Vergleich der Tbet-Expression bei Stimulation mit unterschiedlichen Peptiden an Tag 1 nach Stimulation

Nach einer Inkubation mit Peptiden, wie in Abbildung 10 beschrieben, wurden Milzzellen mit anti-Tbet mAk gefärbt. (A) zeigt den Anteil an Tbet⁺ CD8⁺ T-Zellen aller vitalen CD8⁺ T-Zellen aus der Kultur an Tag 1 der Stimulation. (B) zeigt die zugehörigen MFI. Dargestellt ist die graphische Auswertung einer Versuchsgruppe mit insgesamt drei Experimenten. Dabei wurden pro Experiment Zellen jeweils einer Maus in Doppelwerten untersucht. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte ± SEM dar. Für die Auswertung wurden die Ergebnisse aller drei Versuche berücksichtigt.

Tbet wurde an Tag 1 von allen drei Peptiden induziert, wobei bei hohen Peptidkonzentrationen der Anteil an positiven Zellen bei den Peptiden SIQFEKL und SIIVFEKL höher war als bei SIINFEKL. Insgesamt zeigte sich in allen Zellen zu diesem Zeitpunkt aber nur eine relativ niedrige mittlere Expressionsstärke für Tbet (siehe Abbildung 12).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse für Tag 1, dass IRF4 von allen drei Peptiden induziert wurde, für SIIVFEKL aber deutlich höhere Konzentrationen notwendig waren. Die IRF4 Expression stellte sich auf ein Plateau ein, nur in den Grenzkonzentrationen der Peptide zeigten sich verminderte Expressionslevel. Im Gegensatz dazu wurde Eomes stärker durch die schwachen Agonisten induziert und hohe Eomes-Expressionslevel zeigten sich vor allem bei

niedrigen Peptidkonzentrationen. Die Expression von Tbet war sehr schwach und das Expressionsprofil etwa vergleichbar mit dem von IRF4.

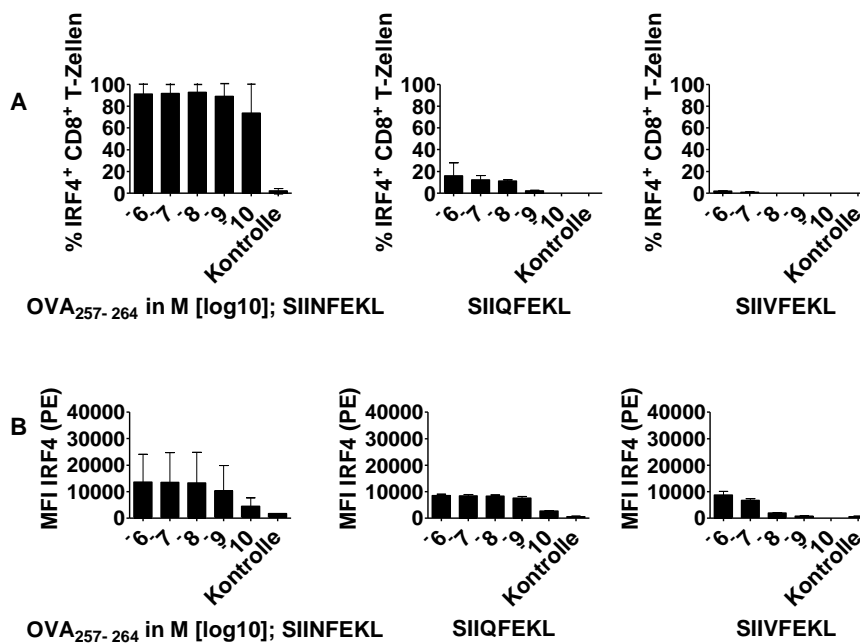


Abbildung 13: Vergleich der IRF4-Expression bei Stimulation mit unterschiedlichen Peptiden an Tag 2 der Stimulation

Nach einer Inkubation mit Peptiden, wie in Abbildung 10 beschrieben, wurden Milzzellen mit anti-IRF4 mAk gefärbt. (A) zeigt den Anteil an IRF4⁺ CD8⁺ T-Zellen aller vitalen CD8⁺ T-Zellen aus der Kultur an Tag 2 nach der Stimulation. (B) zeigt die zugehörigen MFI. Dargestellt ist die graphische Auswertung einer Versuchsgruppe mit insgesamt drei Experimenten. Dabei wurden pro Experiment Zellen jeweils einer Maus in Doppelwerten untersucht. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM dar. Für die Auswertung wurden die Ergebnisse aller drei Versuche berücksichtigt.

An Tag zwei zeigten sich zwischen den Peptiden deutliche Unterschiede in der Induktion von IRF4. Die Expression war bei Stimulation mit SIINFEKL durchgehend bis zu einer Konzentration von 10^{-10} M in mehr als 90% der CD8⁺ T-Zellen sehr hoch. SIIQFEKL induzierte eine niedrige IRF4-Expression und nur etwa 20% der CD8 T-Zellen waren positiv. Nach SIIVFEKL Stimulation konnte zu diesem Zeitpunkt nur eine sehr niedrige IRF4-Expression bei 10^{-6} und 10^{-7} M nachgewiesen werden.

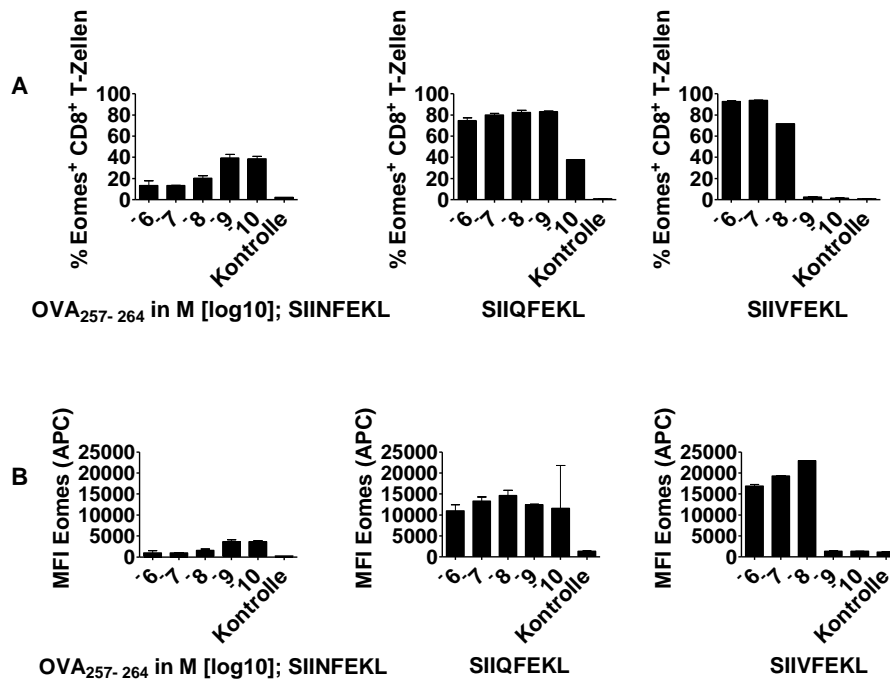


Abbildung 14: Vergleich der Eomes-Expression bei Stimulation mit unterschiedlichen Peptiden an Tag 2 der Stimulation

Nach einer Inkubation mit Peptiden, wie in Abbildung 10 beschrieben, wurden Milzzellen mit anti-Eomes mAk gefärbt. (A) zeigt den Anteil an Eomes⁺ CD8⁺ T-Zellen aller vitalen CD8⁺ T-Zellen aus der Kultur an Tag 2 nach der Stimulation. (B) zeigt die zugehörigen MFI. Dargestellt ist die graphische Auswertung einer Versuchsgruppe mit insgesamt drei Experimenten. Dabei wurden pro Experiment Zellen jeweils einer Maus in Doppelwerten untersucht. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte ± SEM dar. Für die Auswertung wurden die Ergebnisse aller drei Versuche berücksichtigt.

Bei der Untersuchung der Eomes-Expression an Tag 2, wie in Abbildung 14 gezeigt, war auffällig, dass unter SIINFEKL-Stimulation maximal 40% aller CD8⁺ T-Zellen diesen Transkriptionsfaktor exprimierten und zwar insbesondere bei niedrigen Peptidkonzentrationen ab 10⁻⁹M. Stimulation mit SIIQFEKL hatte eine starke Eomes-Expression in 70 bis 85% der Zellen zur Folge. Auch hier war eine Abhängigkeit der Expression von der Konzentration des Peptids zu erkennen – bei niedrigeren Konzentrationen nahm die Expression zu. SIIVFEKL hatte eine ähnlich starke Expression von Eomes zur Folge. Die Expression war bei hohen Peptidkonzentrationen sogar etwas höher als bei SIIQFEKL (bei über 80%) und das Maximum lag bereits bei 10⁻⁸M, was der vorher ermittelten Grenzkonzentration dieses Peptids entsprach.

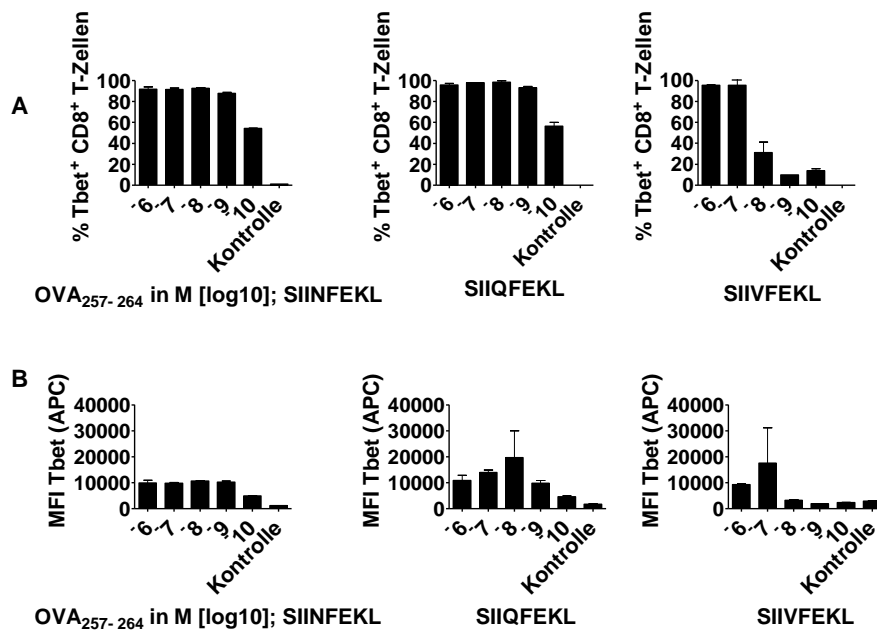


Abbildung 15: Vergleich der Tbet-Expression bei Stimulation mit unterschiedlichen Peptiden an Tag 2 der Stimulation

Nach einer Inkubation mit Peptiden, wie in Abbildung 10 beschrieben, wurden Milzzellen mit anti-Tbet mAk gefärbt. (A) zeigt den Anteil an Tbet⁺ CD8⁺ T-Zellen aller vitalen CD8⁺ T-Zellen aus der Kultur an Tag 2 nach der Stimulation. (B) zeigt die zugehörigen MFI. Dargestellt ist die graphische Auswertung einer Versuchsgruppe mit insgesamt drei Experimenten. Dabei wurden pro Experiment Zellen jeweils einer Maus in Doppelwerten untersucht. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM dar. Für die Auswertung wurden die Ergebnisse aller drei Versuche berücksichtigt.

Am zweiten Tag der Stimulation induzierten alle Peptide eine deutliche Tbet-Expression. Bei SIINFEKL und SIQFEKL waren bis zu einer Konzentration von 10^{-9} M und bei SIIVFEKL bis zu einer Konzentration von 10^{-7} M beinahe alle CD8⁺ T-Zellen Tbet-positiv. Interessanterweise zeigten die Peptide SIQFEKL und SIIVFEKL bei abnehmender Konzentration eine stärkere mittlere Expression pro Zelle.

Am zweiten Tag nach Zellstimulation der CD8⁺ T-Zellen ergaben sich zusammengefasst folgende Beobachtungen: Die Expressionsstärke von IRF4 war nach der Stimulation weitgehend unabhängig von der Peptidkonzentration und stellte sich bis zu den Grenzkonzentrationen auf ein stabiles Plateau ein. Das Expressionslevel unterschied sich aber deutlich zwischen den Peptiden. Eomes wurde mit absinkenden Konzentrationen der Peptide stärker exprimiert. Dies galt insbesondere für die schwachen Agonisten SIQFEKL und SIIVFEKL. Bei Tbet zeigte sich ein mit IRF4 vergleichbares Expressionsprofil.

In vorangegangenen Publikationen wurde ein enger Zusammenhang zwischen Eomes- und Tbet-Expression postuliert, bei dem beide Transkriptionsfaktoren zunächst gemeinsam exprimiert werden. Die Expression der Faktoren verläuft dann aber je nach Differenzierungsweg der CD8⁺ T-Zellen unterschiedlich. CD8⁺ T-Effektorzellen weisen eine hohe Tbet- und niedrige Eomes-Expression auf, während CD8⁺ Memory-Vorläuferzellen eine höhere Eomes- und niedrigere Tbet-Expression besitzen. Die hier gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl die Konzentration als auch die Qualität der Peptide diese Differenzierungswege regulieren können.

4.3.2 Expression von Transkriptionsfaktoren von CD8⁺ T-Zellen nach einer viertägigen TZR-Stimulation

CD8⁺ T-Zellen zeigten in Vorexperimenten bei Stimulation ihres TZR abhängig vom Messzeitpunkt unterschiedliche IRF4-Expressionsmuster. Im Folgenden wurde daher untersucht, welchen Einfluss eine längere Stimulationsdauer auf die Expression der Transkriptionsfaktoren IRF4, Eomes und Tbet hat. Hierfür wurden Milzzellen bei SIINFEKL und SIIVFEKL-Peptidkonzentrationen zwischen 10⁻⁶ und 10⁻¹² M vier Tage lang inkubiert, gefärbt und im Anschluss mittels FACS untersucht. Es wurden WT und IRF4^{-/-} Zellen miteinander verglichen, sowohl ihre Expression der Transkriptionsfaktoren Tbet und Eomes als auch die Wirkung von TZR-Stimulation auf ihre Zellzahlen und -größen. Bei den vorangegangenen Experimenten waren die Wildtypzellen am zweiten Tag der Stimulierung den IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen in Größe und dem Anteil vitaler Zellen überlegen. Hier sollte untersucht werden, ob durch die längere Stimulationsdauer die Unterschiede zwischen WT und KO-Zellen sich verschärfen oder eventuell aufheben würden.

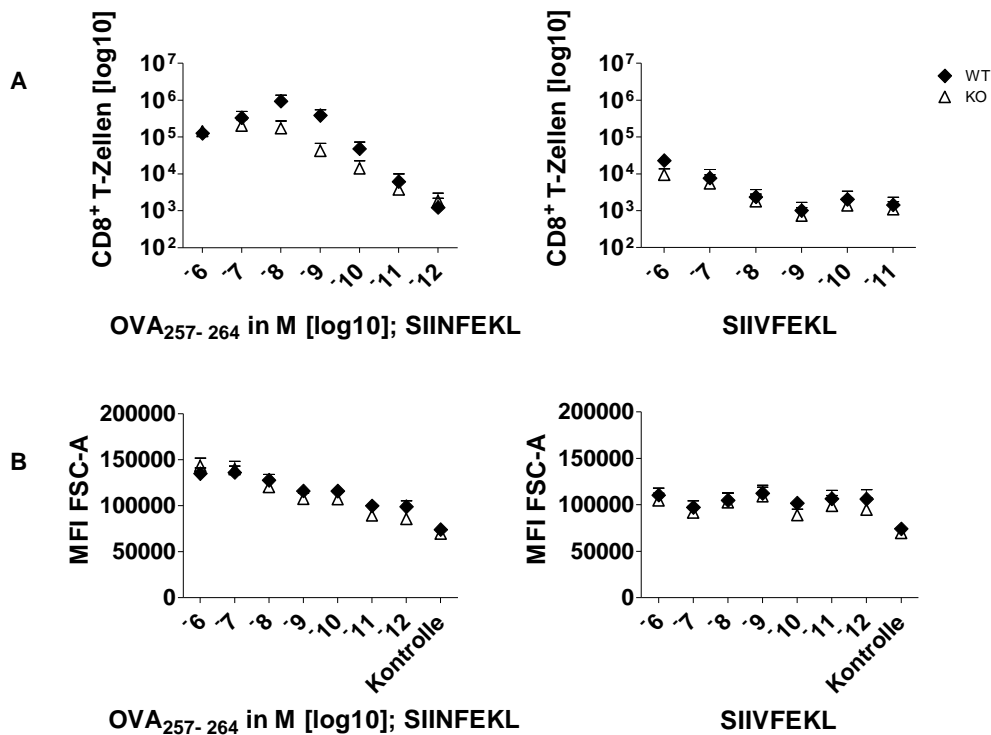


Abbildung 16: Zahl der CD8⁺ T-Zellen; Vergleich zwischen WT und IRF4^{-/-}

Jeweils 2.5×10^5 Milzzellen einer WT OT-1 und einer IRF4^{-/-} OT-1 Maus wurden gemischt und gemeinsam mit unterschiedlichen Konzentrationen der Peptide SIINFEKL oder SIIVFEKL kultiviert. Nach 4 Tagen wurden die Zellen gefärbt und gemessen. Abbildung (A) zeigt die absolute Zellzahl von WT und IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen am vierten Tag nach Stimulation. Sie wurde mit Hilfe von Beads errechnet. (B) zeigt die Zellgröße. Als Kontrolle wurden Milzzellen ohne Stimulus inkubiert und gefärbt. Die Abbildungen fassen die Ergebnisse von insgesamt drei Experimenten in Doppelwerten zusammen.

WT= OT-1-transgene Zellen; KO= IRF4^{-/-} OT-1-transgene Zellen

Bei der Betrachtung der Zellzahl der CD8⁺ T-Zellen fiel, wie in Abbildung 16 dargestellt, zunächst auf, dass nach vier Tagen Stimulation nur die Zellen, die mit SIINFEKL inkubiert wurden, in größerer Anzahl vorlagen. Diese Zellen waren auch Blasten. Nach der Stimulation mit SIIVFEKL zeigte sich nur bei der höchsten Peptidkonzentration eine gegenüber dem Hintergrund leicht erhöhte Zellzahl und die Zellen waren bei allen Peptidkonzentrationen relativ klein. Das bedeutet, nur SIINFEKL war in der Lage in diesem Assay eine deutliche Proliferation zu induzieren. Beim Einsatz von SIINFEKL war ein deutlicher Unterschied zwischen den WT und IRF4^{-/-}-Zellen zu erkennen. Die Wildtypzellen unterschieden sich von IRF4^{-/-} Zellen in ihrer Anzahl, aber auch in einem geringeren Maße in ihrer Größe. Bei der Stimulation mit SIINFEKL war ihre Zahl bei der Konzentration von 10^{-8} M am größten. Bei niedrigeren Konzentrationen fiel die Zellzahl konzentrationsabhängig ab. Die IRF4^{-/-} Zellen

zeigten ein ähnliches Muster, allerdings lagen ihre Zellzahlen außer bei 10^{-6} M immer unter denen von WT T-Zellen. Die Unterschiede in den Zellgrößen entsprachen dem Muster der Zellzahlen. Die Stimulation mit SIIVFEKL zeigte dagegen, dass ab einer Peptidkonzentration von 10^{-8} M die Zellzahlen sowohl von Wildtyp $CD8^+$ T-Zellen als auch von $IRF4^{-/-}$ $CD8^+$ T-Zellen etwa auf dem Niveau der nicht stimulierten Kontrolle waren, was auf eine nicht ausreichende Stimulierung der Zellen hindeutete (siehe Abbildung 16).

Um den Aktivierungsgrad der überlebenden $CD8^+$ T-Zellen weiter zu charakterisieren wurde eine zusätzliche extrazelluläre CD25-Färbung durchgeführt. CD25 ist die α -Kette des IL-2 Rezeptors und wird auf aktivierten Zellen hoch exprimiert {Kursar *et al.* 2002}.

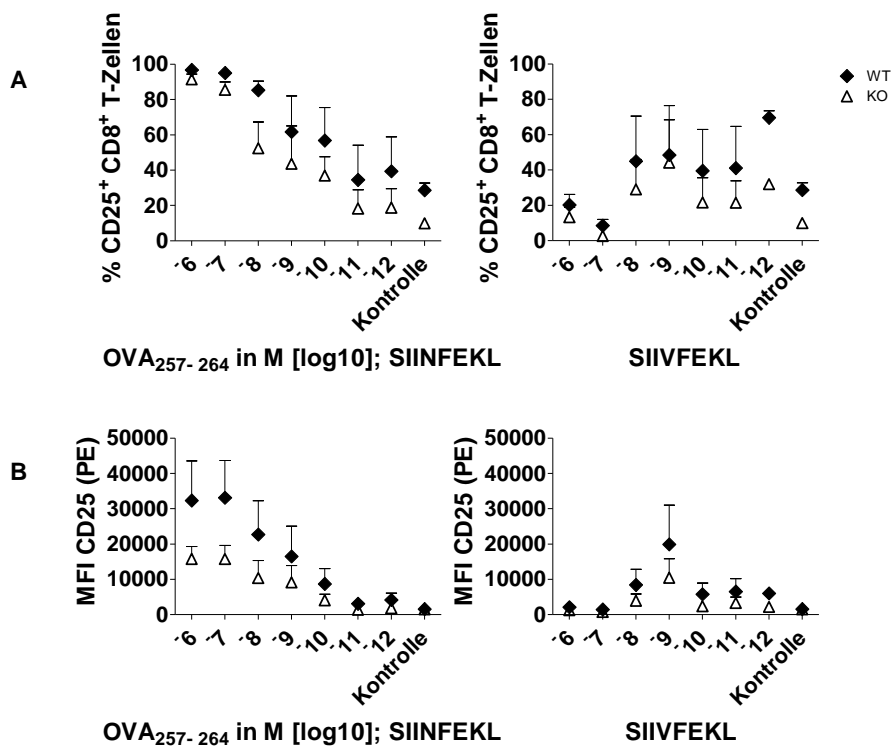


Abbildung 17: CD25-Expression von $CD8^+$ T-Zellen; Vergleich zwischen WT und $IRF4^{-/-}$

Nach einer Inkubation mit Peptiden wie in Abbildung 16 wurden Milzzellen mit anti-CD25 mAk gefärbt. (A) zeigt den Anteil an $CD25^+$ $CD8^+$ T-Zellen aller vitalen $CD8^+$ T-Zellen aus der Kultur an Tag 4 nach der Stimulation. (B) zeigt die zugehörigen MFI. Dargestellt ist die graphische Auswertung einer Versuchsgruppe mit insgesamt drei Experimenten. Dabei wurden pro Experiment Zellen jeweils einer Maus in Doppelwerten untersucht. Die Fehlerbalken stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM dar. Für die Auswertung wurden die Ergebnisse aller drei Versuche berücksichtigt.

WT= OT1-transgene Zellen; KO= $IRF4^{-/-}$ OT1-transgene Zellen

Nach Stimulation mit SIINFEKL konnte man, wie in Abbildung 17 gezeigt, sehen, dass die CD25-Expression bei abnehmenden Peptidkonzentrationen bei beiden untersuchten Populationen abfiel. Wildtypzellen zeigten eine wesentlich höhere Expression von CD25 als IRF4^{-/-} Zellen. Nach Inkubation mit SIIVFEKL war zu erkennen, dass CD25 bereits bei den höchsten Peptidkonzentrationen von 10⁻⁶ und 10⁻⁷ M nur sehr schwach exprimiert wurde. Bei niedrigeren Konzentrationen scheint zum Teil eine deutliche CD25-Expression vorzuliegen. Aufgrund der sehr niedrigen Anzahl an vitalen Zellen, die in diesen Ansätzen gemessen wurden, ist dieses Ergebnis aber nur mit Vorbehalt zu bewerten und wahrscheinlich ein Artefakt. Insgesamt spiegeln die Ergebnisse zu CD25 die Ergebnisse zur Zellgröße und Zellzahl wieder und es zeigt sich, dass ein Fehlen von IRF4 sich negativ auf die Aktivierung der Zellen auswirkt.

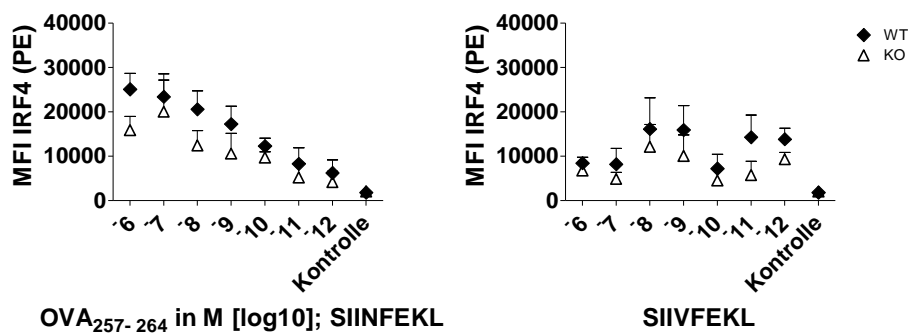


Abbildung 18: Expression von IRF4 in CD8⁺ T-Zellen

Nach einer Inkubation mit Peptiden wie in Abbildung 16 wurden Milzzellen mit anti-IRF4 mAk gefärbt. Gezeigt ist der Anteil an IRF4⁺ CD8⁺ T-Zellen aller vitalen CD8⁺ T-Zellen aus der Kultur an Tag 4 nach der Stimulation. Die Abbildung fasst Ergebnisse zur MFI aus einer Gruppe von insgesamt drei Experimenten mit jeweils einer Doppelwertbestimmung zusammen.

WT= OT1-transgene Zellen; KO= IRF4^{-/-} OT1-transgene Zellen

Nach viertägiger Inkubation war die IRF4-Expression in WT-Zellen nach Stimulation mit SIINFEKL von der Peptidkonzentration abhängig – man konnte eine stufenweise Abnahme der MFI bei abnehmender Peptidkonzentration beobachten (siehe Abbildung 18). Bei SIIVFEKL sah man dagegen ein sehr unregelmäßiges Bild, was man vorrangig auf die bereits beschriebene problematische Färbung der geringen Anzahl an vitalen Zellen bei Peptidkonzentrationen unter 10⁻⁷M zurückführen kann. Bezogen auf die WT-Zellen ergab sich, dass die IRF4 Expression deutlich von der Stärke des TZR-Signals abhing. Bei SIINFEKL sank die IRF4-Expression mit abnehmenden Peptidkonzentrationen und SIIVFEKL induzierte fast kein IRF4.

Insgesamt ist die Bewertung der in Abbildung 18 gezeigten Ergebnisse aber problematisch, weil sich bei IRF4^{-/-} T-Zellen zum Teil eine deutliche IRF4-Färbung zeigte. Die Ursache für diese deutliche Hintergrundfärbung ist zur Zeit unklar. Der Antikörper könnte zum Beispiel kreuzreaktiv mit anderen IRF sein. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass in den IRF4^{-/-} Zellen noch c-terminale Fragmente des IRF4-Proteins exprimiert und vom Antikörper erkannt werden.

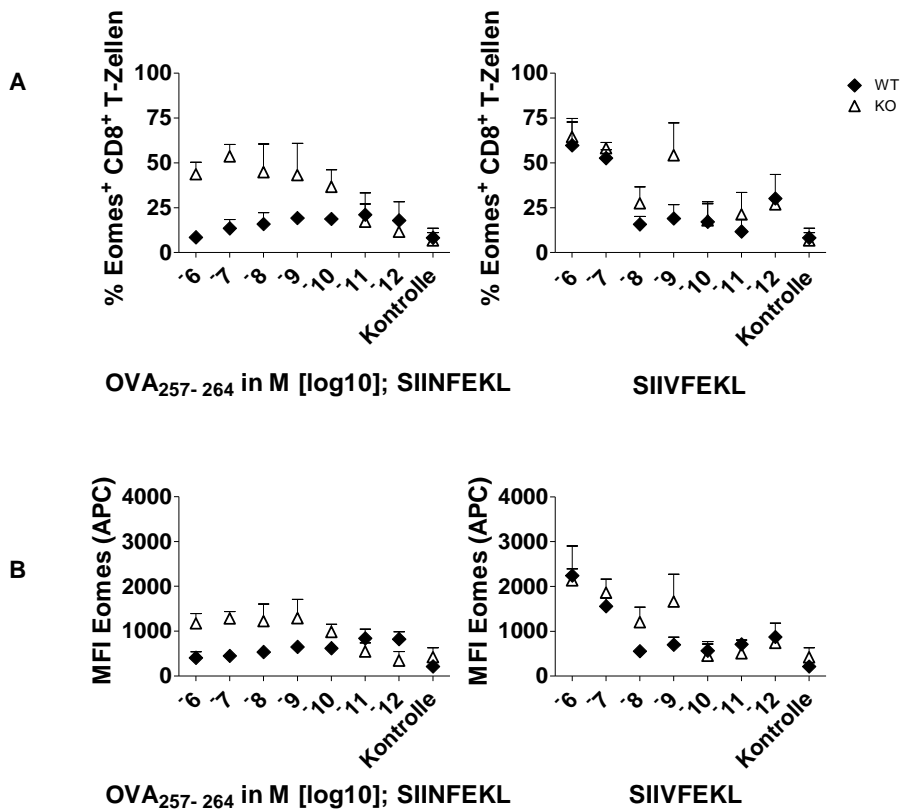


Abbildung 19: Eomes-Expression von CD8⁺ T-Zellen; Vergleich zwischen WT und IRF4^{-/-}

Nach einer Inkubation mit Peptiden wie in Abbildung 16 wurden Milzzellen mit anti-Eomes mAk gefärbt. Abbildung (A) zeigt den Anteil von Eomes⁺ WT und IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen aller vitalen CD8⁺ T-Zellen am vierten Tag nach Stimulation. (B) zeigt die MFI. Als Kontrolle wurden nicht stimulierte Milzzellen inkubiert und mitgefärbt. Die Abbildung fasst Ergebnisse zur MFI aus einer Gruppe von insgesamt drei Experimenten mit jeweils einer Doppelwertbestimmung zusammen.

WT= OT1-transgene Zellen; KO= IRF4^{-/-} OT1-transgene Zellen

Die Expression von Eomes ähnelte nach vier Tagen der Expression nach zwei Tagen. Die WT-Zellen exprimierten bei hohen Peptidkonzentrationen des SIINFEKL wenig Eomes. Erst bei niedrigen Konzentrationen stieg ihre Eomes-Expression. IRF4^{-/-} Zellen dagegen exprimierten Eomes auch bei hohen SIINFEKL-Konzentrationen sehr stark und die Expressionsrate fiel bei niedrigen Peptidkonzentrationen ab.

Die Stimulation mit SIIVFEKL führte zu einer sehr hohen Eomes-Expression in beiden Zellpopulationen und nahm in beiden Populationen bei 10^{-7} M ab, wie in Abbildung 19 gezeigt. Die Ergebnisse bei Konzentrationen unter 10^{-7} M sind, wie bereits beschrieben, kritisch zu bewerten.

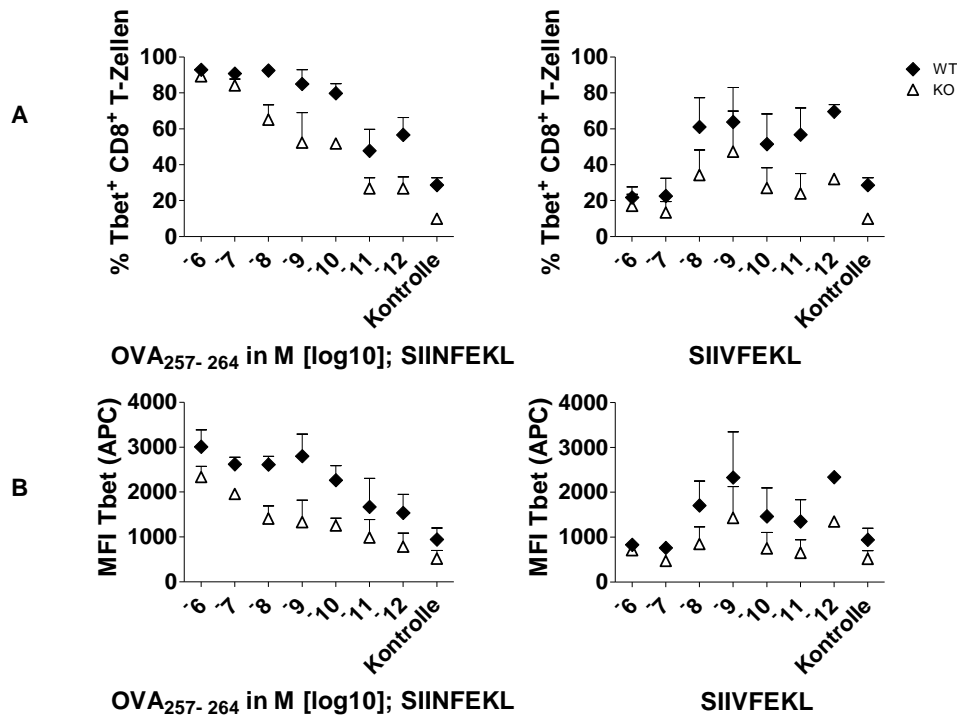


Abbildung 20: Tbet-Expression von CD8⁺ T-Zellen; Vergleich zwischen WT und IRF4^{-/-}

Nach einer Inkubation mit Peptiden wie in Abbildung 16 wurden Milzzellen mit anti-Tbet mAk gefärbt. Abbildung (A) zeigt den Anteil von Tbet⁺ WT und IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen aller vitalen CD8⁺ T-Zellen am vierten Tag nach Stimulation. (B) zeigt die MFI. Als Kontrolle wurden nicht stimulierte Milzzellen inkubiert und mitgefärbt. Die Abbildung fasst Ergebnisse zur MFI aus einer Gruppe von insgesamt drei Experimenten mit jeweils einer Doppelwertbestimmung zusammen.

WT= OT1-transgene Zellen; KO= IRF4^{-/-} OT1-transgene Zellen

Die Tbet-Expression an Tag vier unterschied sich im Vergleich zwischen Wildtyp und IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen deutlich von der Tbet-Expression an Tag zwei. Die WT-Zellen exprimierten bei Peptidkonzentrationen des SIINFEKL bis etwa 10^{-10} M Tbet auf einem sehr hohen Niveau. Erst ab einer Konzentration unter 10^{-10} M sank die Tbet-Expression. IRF4^{-/-} Zellen dagegen exprimierten Tbet bereits bei 10^{-6} M geringer als WT-Zellen. Der Unterschied wurde dann bei absinkenden Peptidkonzentrationen noch größer. Die Stimulation mit 10^{-6} M und 10^{-7} M SIIVFEKL führte in beiden T-Zellpopulationen nur zu einer niedrigen Tbet-Expression an Tag vier (siehe Abbildung 20).

Zusammengefasst konnte man nach dieser Reihe von Experimenten Folgendes feststellen: Die IRF4-Expression war TZR-abhängig und hierbei sowohl von der Signalstärke des TZR-Stimulus als auch von der Dauer der Stimulation. Die Expression nahm mit zunehmender Dauer der Stimulation zu und erreichte an Tag zwei ein Maximum. An den Tagen eins und vier zeigte sich eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit für das stark agonistische Peptid SIINFEKL. Passend dazu induzierte das schwache Peptid auch bei hohen Konzentrationen nur wenig IRF4. Wie bereits beschrieben sind die Ergebnisse zur IRF4-Expression aufgrund der Hintergrundfärbung des Antikörpers jedoch vorsichtig zu bewerten.

Die Eomes-Expression war ebenfalls abhängig von der TZR-Stimulation. Allerdings war hier der Zusammenhang komplexer. Bei hohen Peptidkonzentrationen und somit einer starken TZR-Aktivierung war die Expression von Eomes vergleichsweise niedriger als bei niedrigeren Konzentrationen. Vor allem bei Schwellenkonzentrationen, die gerade noch zu einer T-Zellaktivierung führten, war die Eomes-Expression besonders hoch. Passend dazu induzierte das schwache Peptid SIIVFEKL eine sehr hohe Eomes-Expression. Dieser Zusammenhang galt vorrangig für Wildtypzellen. Die Untersuchung der IRF4^{-/-} Zellen ergab im Gegensatz dazu eine durchgehend höhere Eomes-Expression bereits bei hohen Peptidkonzentrationen. Lediglich bei den Schwellenkonzentrationen hatten Wildtypzellen und KO-Zellen eine vergleichbare Expression von Eomes.

Die Expression von Tbet hatte ein ähnliches Muster wie die IRF4-Expression – die Tbet-Expression korrelierte gut mit der Peptidkonzentration. Wildtypzellen exprimierten Tbet wesentlich stärker als IRF4^{-/-} T-Zellen.

4.4 Einfluss von Entzündungszytokinen auf die Expression von Transkriptionsfaktoren

Im folgenden Abschnitt sollte untersucht werden, ob Entzündungszytokine in Verbindung mit einer TZR-Stimulation der CD8⁺ T-Zellen eine Änderung der Expressionsmuster von IRF4, Eomes und Tbet bewirken. An Entzündungszytokinen wurden dabei Interleukin-12 (IL-12) und Interferon- α (IFN- α) verwendet. Zusätzlich wurde getestet, ob Interleukin-2 (IL-2) die Expression der Transkriptionsfaktoren moduliert.

IL-2 wird nach Aktivierung durch T-Zellen ausgeschüttet und bindet an den IL-2-Rezeptor, der hauptsächlich von T-Zellen exprimiert wird. Durch die Bindung an den Rezeptor wird eine Signalkaskade ausgelöst, die in CD8⁺ T-Zellen zur Proliferation führt und die Differenzierung zu Effektorzellen begünstigt {Gaffen und Liu 2004}. IL-12 wird hauptsächlich durch Dendritische Zellen, Monozyten und Makrophagen ausgeschüttet. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen zu TH1-Zellen und unterstützt die Reifung von CD8⁺ T-Zellen zu zytotoxischen Effektorzellen bei der Bekämpfung von vor allem intrazellulären Erregern {Liao *et al.* 2011}. IFN- α ist ein Typ I Interferon und wird in einer Vielzahl von Zellen, unter anderem in B- und T-Zellen gebildet. Ähnlich wie IL-12 unterstützt IFN- α die Differenzierung von zytotoxischen CD8⁺ T-Effektorzellen {Kolumam *et al.* 2005, Huber und Farrar 2011, Tough 2012}. IL-12 und IFN- α fördern daher die CD8⁺ T-Zellantwort bei einer Infektion des Organismus mit Viren und bakteriellen Pathogenen.

Aus Milzen von WT und IRF4^{-/-} Mäusen wurden isolierte CD8⁺ T-Zellen in Komplettmedium mit anti-CD3 mAk und anti-CD28 mAk aktiviert. Zusätzlich wurden den Zellen jeweils IL-2, IL-12 oder IFN- α zugegeben. Im Anschluss wurden die Zellsuspensionen in einem CO₂-Brutschrank bei 37°C inkubiert. An Tagen eins und zwei wurden die Zellen mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Die Zielmoleküle waren die Transkriptionsfaktoren IRF4 sowie Eomes und Tbet. Zusätzlich wurde eine Färbung mit anti-CD25 mAk durchgeführt, um den Aktivierungsgrad der CD8⁺ T-Zellen besser beurteilen zu können.

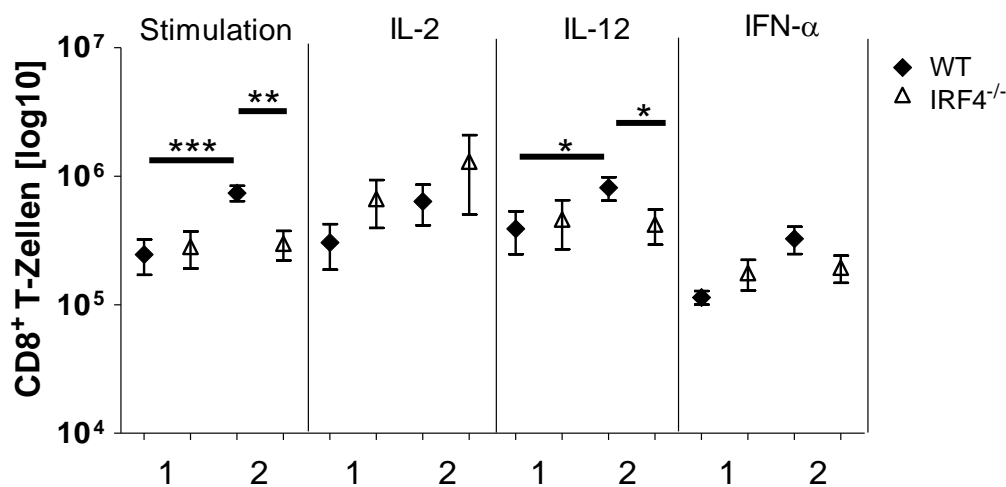


Abbildung 21: Untersuchung von Zellzahlen nach Stimulation

Aus den Milzen jeweils einer OT1-transgenen Wildtypmaus und einer OT1-transgenen IRF4^{-/-} Maus wurden CD8⁺ T-Zellen angereichert. 1×10⁵ Wildtyp- oder IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen wurden mit 1 µg/mL anti-CD3 mAk und 1 µg/mL anti-CD28 mAk stimuliert. Zusätzlich wurde einem Teil der Zellen 1 µg/mL IL-2, 0,5 µg/mL IL-12 oder 1 µg/mL IFN-α zugegeben. Die Zellen wurden anschließend für ein oder zwei Tage in Komplettmedium inkubiert. Anschließend wurden CD8⁺ T-Zellen mittels Durchflusszytometrie charakterisiert. Mit Hilfe von *count beads* wurden absolute Zellzahlen berechnet. Die Abbildung zeigt die Zahl der CD8⁺ T-Zellen an den Tagen 1 und 2. Stimulation bedeutet, dass die Zellen nur mit anti-CD3 und anti-CD28 mAk inkubiert wurden. Die hier gezeigten Daten entstammen einem Beispielerperiment aus einer Gruppe von insgesamt drei durchgeführten Experimenten. Dabei wurden pro Experiment Zellen einer Maus in Doppelwerten untersucht. Es wurden jeweils WT und IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen an Tag 1 und 2 nach der Stimulation miteinander verglichen. Die Symbole stellen die arithmetischen Mittelwerte ± SEM dar. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

Wie in Abbildung 21 dargestellt, zeigten sich an Tag 1 einer Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 mAk keine Unterschiede in der Zellzahl zwischen WT und IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen. IL-2 hatte keinen Einfluss auf die Zellzahl. IL-2 führte zu einer höheren Zellzahl der IRF4^{-/-} T-Zellen und IFN-α resultierte in einer verminderten Zellzahl bei beiden Genotypen. An Tag 2 ergab sich ein differenzierteres Bild. Die Anzahl der Wildtyp CD8⁺ T-Zellen war bei allen Stimulationsansätzen bis auf IL-2 größer als die der IRF4^{-/-} T-Zellen. IL-2 führte zu einer stärkeren Anreicherung von IRF4^{-/-} T-Zellen. Wie an Tag 1 reduzierte IFN-α die Zellzahlen beider Zellpopulationen. IL-12 führte zu keiner Veränderung gegenüber der Stimulation ohne Zytokine.

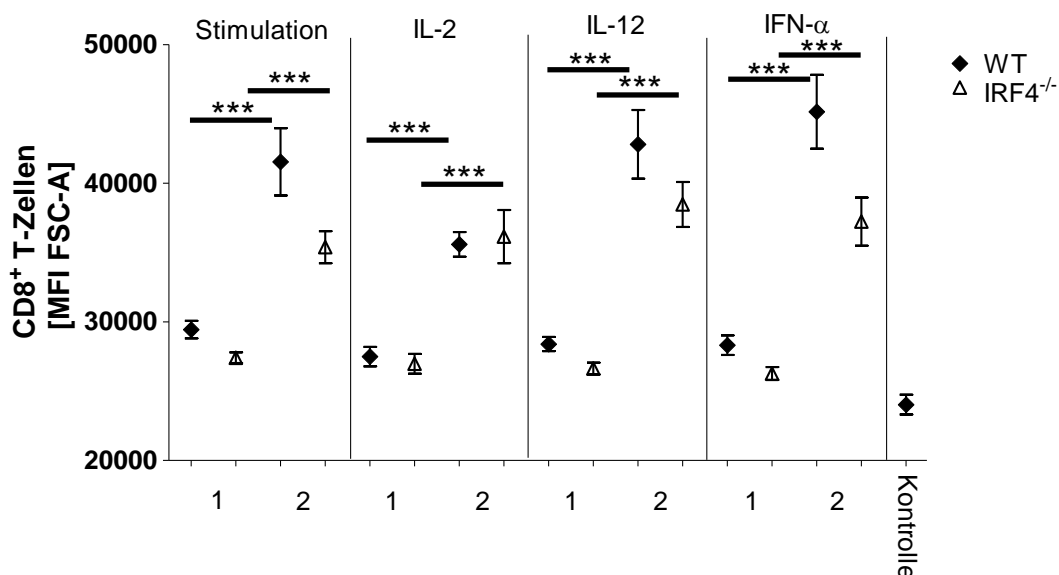


Abbildung 22: Untersuchung von Zellgrößen nach Stimulation

Die Zellen wurden, wie in Abbildung 21 beschrieben, stimuliert und in Hinblick auf ihre Größe charakterisiert. Als Maß der Zellgröße wurde die Mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) im *forward scatter* bei der FACS Messung verwendet. Als Kontrolle wurde die Messung an ohne Stimulus inkubierten CD8⁺ T-Zellen verwendet. Die Abbildung zeigt die Zellgröße der CD8⁺ T-Zellen an den Tagen 1 und 2. TZR-Stimulation bedeutet, dass die Zellen nur mit anti-CD3 und anti-CD28 mAk inkubiert wurden. Die hier gezeigten Daten entstammen einem Beispielerperiment aus einer Gruppe von insgesamt drei durchgeführten Experimenten. Dabei wurden pro Experiment Zellen einer Maus in Doppelwerten untersucht. Es wurden jeweils WT und IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen an Tag 1 und 2 nach der Stimulation miteinander verglichen. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM dar. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

Bereits an Tag eins nach Stimulation ergab sich im Vergleich zu unstimulierten T-Zellen eine Zunahme der Zellgröße, die bei WT T-Zellen deutlich größer war als bei IRF4^{-/-} T-Zellen. An Tag zwei waren die Größenzunahme aber auch die Unterschiede sehr viel ausgeprägter. Dieses traf auf alle Ansätze bis auf den Ansatz mit IL-2 zu. Auch bei IFN- α war eine ausgeprägte Blastenbildung vorhanden, obwohl die Zellzahl deutlich verringert war. Interessanterweise führte IL-2 zu einer verminderten Größenzunahme, aber nur bei den Wildtyp CD8⁺ T-Zellen (siehe Abbildung 22).

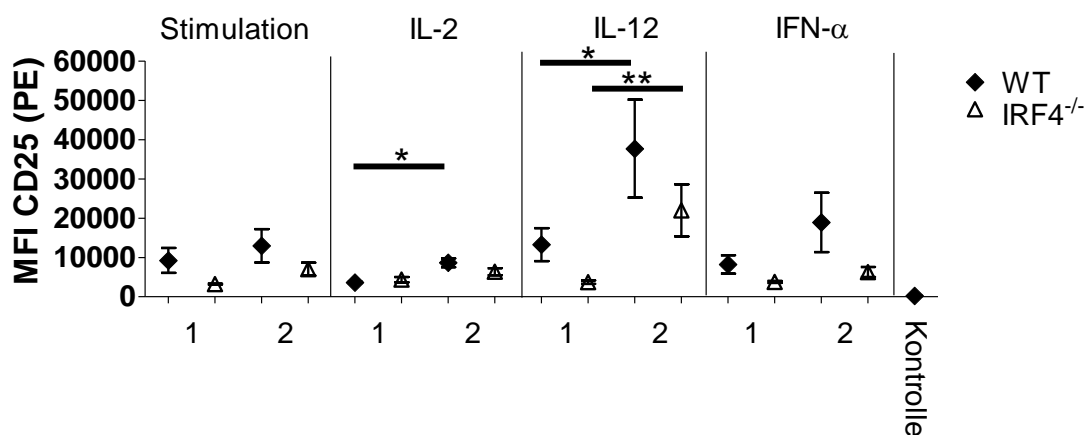


Abbildung 23: CD25-Expression nach Stimulation

Die Zellen wurden, wie in Abbildung 21 beschrieben, stimuliert und in Hinblick auf ihre CD25-Expression charakterisiert. Als Maß der Expression wurde die Mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) des CD25 bei der FACS Messung verwendet. Gezeigt ist die graphische Auswertung. TZR-Stimulation bedeutet, dass die Zellen nur mit anti-CD3 und anti-CD28 mAk inkubiert wurden. Die hier gezeigten Daten entstammen einem Beispielerperiment aus einer Gruppe von insgesamt drei durchgeführten Experimenten. Dabei wurden pro Experiment Zellen einer Maus in Doppelwerten untersucht. Es wurden jeweils WT und IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen an Tag 1 und 2 nach der Stimulation miteinander verglichen. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM dar. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

Die TZR-Stimulation induzierte in den Wildtyp CD8⁺ T-Zellen vor allem an Tag zwei eine signifikante CD25-Expression. Die IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen exprimierten im Gegensatz dazu nur wenig CD25. IL-12 hatte keinen Einfluss auf das Expressionsprofil. Ähnlich wie bei Blastenbildung verstärkte IFN- α in WT und IRF4^{-/-} T-Zellen die CD25-Expression. IL-12 verstärkte wie erwartet die CD25-Expression im Vergleich zur alleinigen TZR-Stimulation, vor allem bei den Wildtypzellen. Interessanterweise war nach Zugabe von IL-2 die CD25-Expression in allen Zellen reduziert, wie in Abbildung 23 gezeigt. Es konnte hier aber nicht ausgeschlossen werden, dass das IL-2 mit der Bindung des Antikörpers an CD25 interferieren könnte.

Insgesamt bestätigen die Ergebnisse, dass IRF4^{-/-} T-Zellen schwächer als Wildtypzellen aktiviert werden. Die Zugabe von IL-12 hatte bei IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen nur einen geringen Expressionsanstieg von CD25 zur Folge, IFN- α führte in beiden Populationen zu einer geringeren Zellzahl, diese Zellen hatten aber in Bezug auf Größe und CD25-Expression einen aktiviereren Phänotyp. IL-2 hatte in diesem Ansatz nur eine geringe Wirkung, außer auf WT T-Zellen an Tag 2, wo sogar eine leichte Hemmung der Aktivierung festzustellen war.

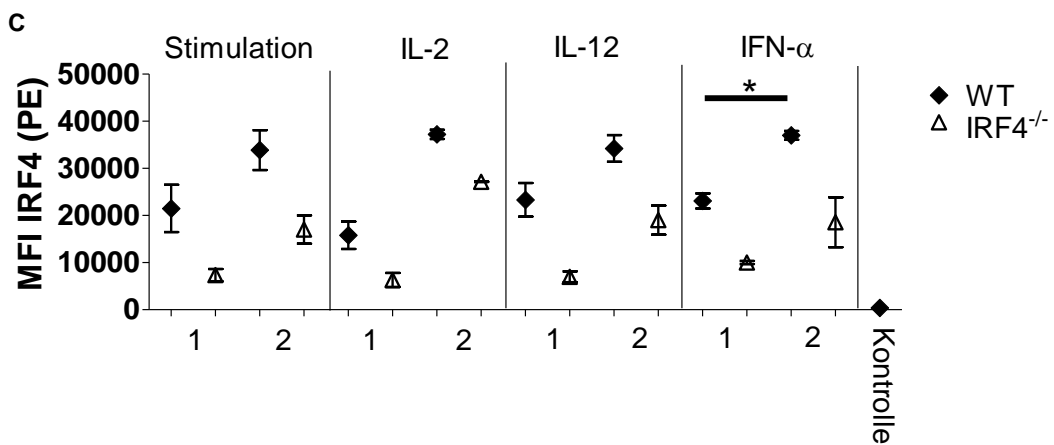
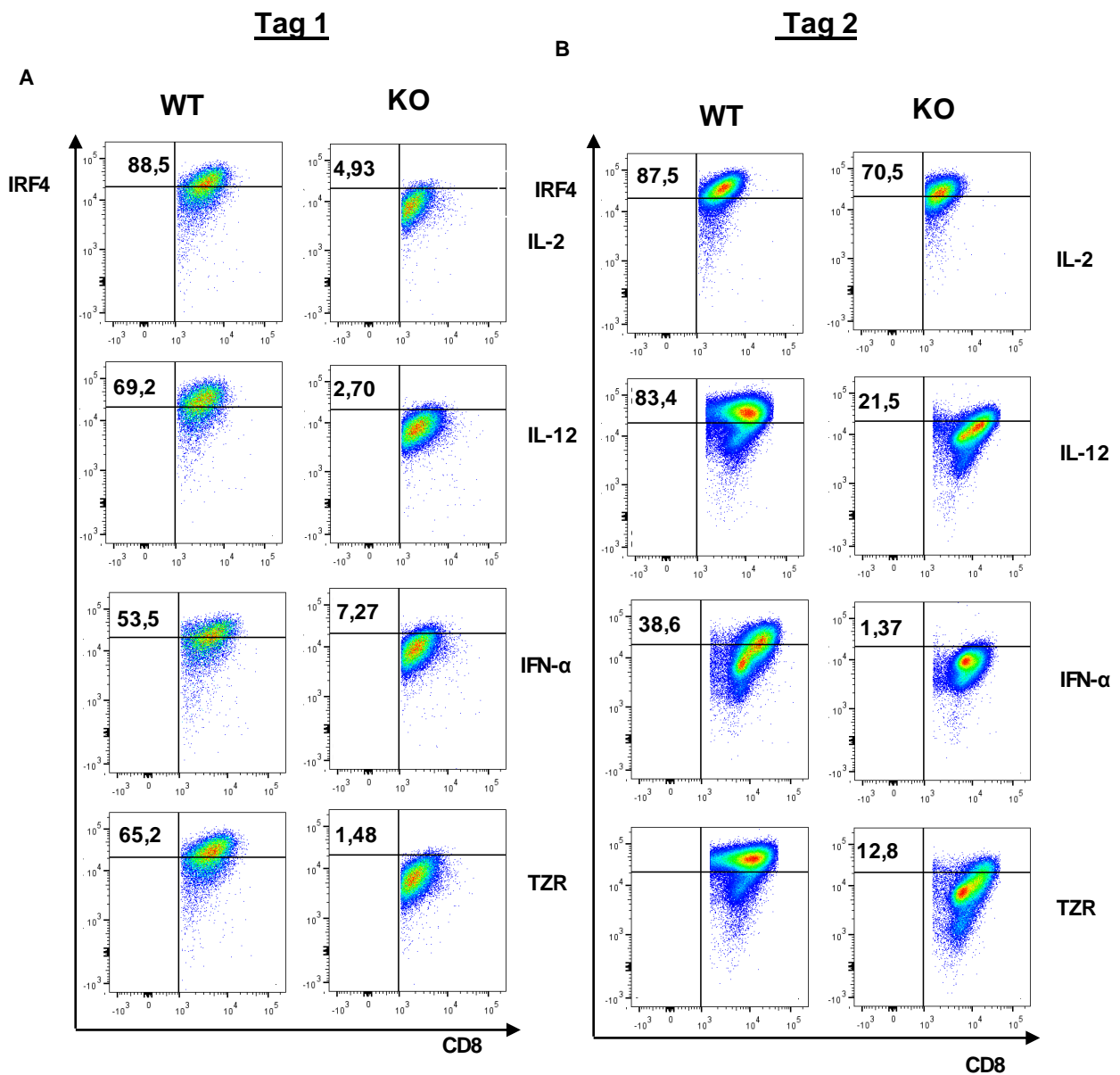


Abbildung 24: IRF4-Expression nach Stimulation

Die Zellen wurden, wie in Abbildung 21 beschrieben, stimuliert und in Hinblick auf ihre IRF4-Expression charakterisiert. Als Maß der Expression wurde die Mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) des IRF4 bei der FACS Messung verwendet. Abbildung (A) zeigt die IRF4-Expression der CD8⁺ T-Zellen beispielhaft anhand eines Experiments an Tag eins, (B) zeigt den zweiten Tag nach Stimulation und (C) zeigt die graphische Auswertung. TZR-Stimulation bedeutet, dass die Zellen nur mit anti-CD3 und anti-CD28 mAk inkubiert wurden. Die hier gezeigten Daten entstammen einem Beispiexperiment aus einer Gruppe von insgesamt drei durchgeführten Experimenten. Dabei wurden pro Experiment Zellen einer Maus in Doppelwerten untersucht. Es wurden jeweils WT und IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen an Tag 1 und 2 nach der Stimulation miteinander verglichen. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte ± SEM dar. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

Die Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 mAk führte in WT CD8⁺ T-Zellen an Tag eins und vor allem an Tag zwei zu einer deutlichen Erhöhung der IRF4-Expression gegenüber den IRF4^{-/-} T-Zellen. Auch hier war eine sehr hohe Hintergrundfärbung in den IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen sichtbar. Die Zugabe von Zytokinen hatte nur einen marginalen Einfluss auf die IRF4 Expression. Nur bei Zugabe von IL-2 war an Tag 1 eine niedrigere Expression nachweisbar (siehe Abbildung 24).

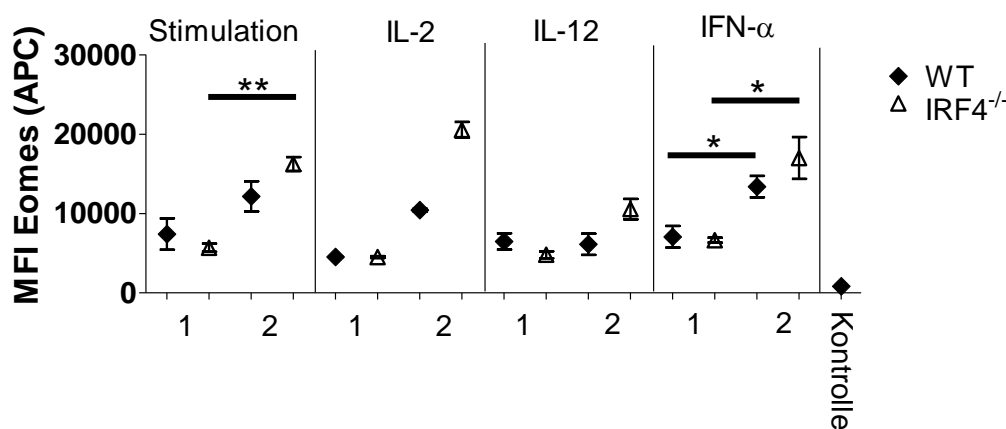


Abbildung 25: Eomes-Expression nach Stimulation

Die Zellen wurden, wie in Abbildung 21 beschrieben, stimuliert und in Hinblick auf ihre Eomes-Expression charakterisiert. Als Maß der Expression wurde die Mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) des Eomes bei der FACS Messung verwendet. Gezeigt ist die graphische Auswertung. TZR-Stimulation bedeutet, dass die Zellen nur mit anti-CD3 und anti-CD28 mAk inkubiert wurden. Die hier gezeigten Daten entstammen einem Beispiexperiment aus einer Gruppe von insgesamt drei durchgeführten Experimenten. Dabei wurden pro Experiment Zellen einer Maus in Doppelwerten untersucht. Es wurden jeweils WT und IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen an Tag 1 und 2 nach der Stimulation miteinander verglichen. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte ± SEM dar. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

Die Expression von Eomes war, wie in Abbildung 25 dargestellt, am ersten Tag nach der Stimulation geringer als am zweiten Tag. Außerdem exprimierten die Wildtyp CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu den IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen weniger Eomes. Die Stimulation mit IL-2 führte bei der IRF4^{-/-} Zellpopulation an Tag 2 zu einer erhöhten Eomes-Expression gegenüber dem Ansatz ohne Zytokine. Im Gegensatz dazu dämpfte IL-12 in beiden untersuchten Populationen die Expression, sodass der Anstieg von Tag 1 nach Tag 2 nur bei den IRF4^{-/-} Zellen, und das marginal, zu erkennen war. Die Stimulierung mit IFN- α ergab keine Veränderung gegenüber der Stimulation ohne Zytokine.

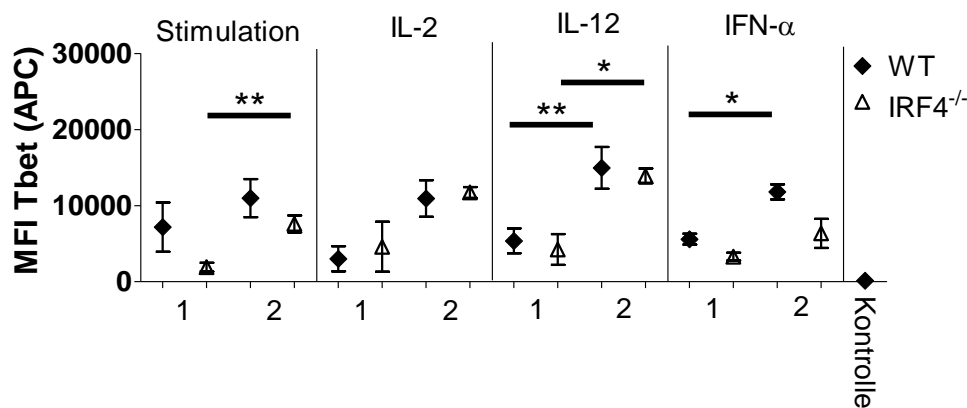


Abbildung 26: Tbet-Expression nach Stimulation

Die Zellen wurden, wie in Abbildung 21 beschrieben, stimuliert und in Hinblick auf ihre Tbet-Expression charakterisiert. Als Maß der Expression wurde die Mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) des Tbet bei der FACS Messung verwendet. Gezeigt ist die graphische Auswertung. TZR-Stimulation bedeutet, dass die Zellen nur mit anti-CD3 und anti-CD28 mAk inkubiert wurden. Die hier gezeigten Daten entstammen einem Beispielerperiment aus einer Gruppe von insgesamt drei durchgeführten Experimenten. Dabei wurden pro Experiment Zellen einer Maus in Doppelwerten untersucht. Es wurden jeweils WT und IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen an Tag 1 und 2 nach der Stimulation miteinander verglichen. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM dar. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

In WT CD8⁺ T-Zellen führte die Stimulation zu einer erhöhten Tbet-Expression. Im Gegensatz zu Eomes war in den IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen eine niedrigere Tbet-Expression nachweisbar. IFN- α hatte nur geringe Auswirkungen auf das Tbet-Expressionsprofil in beiden Populationen. IL-12 hingegen steigerte die Tbet-Expression in WT und IRF4^{-/-} T-Zellen. IL-2 führte in den WT T-Zellen zu einer leichten Abnahme und in den IRF4^{-/-} T-Zellen zu einer Zunahme der Tbet-Expression, wie in Abbildung 26 gezeigt.

Insgesamt zeigten unsere Daten, dass IL-12 und IL-2 sowohl die Eomes- als auch die Tbet-Expression modulieren. Passend zu einer Funktion als Entzündungszytokin steigerte IL-12 die Tbet-Expression und hemmte die Eomes-Expression. Die IL-12 Wirkung reichte aber nicht aus um die veränderte Expression dieser Faktoren in IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen auszugleichen. IFN- α hatte in diesem Ansatz nur eine marginale Wirkung auf die Expressionsprofile von Tbet und Eomes. IL-2 hatte auf WT und IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen verschiedene Wirkungen. In WT-Zellen war die Eomes-Expression leicht vermindert. In IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen steigerte IL-2 sowohl die Eomes- als auch die Tbet-Expression.

Zusammengefasst konnte durch die Stimulation von CD8⁺ T-Zellen mit einem TZR-Stimulus in Kombination mit Entzündungszytokinen festgestellt werden, dass die IRF4-Expression durch diese nur marginal moduliert wurde. Die Transkriptionsfaktoren Eomes und Tbet wurden durch IL-12 und IL-2, nicht aber durch IFN- α in ihrer Expression beeinflusst. IFN- α hatte aber einen Einfluss auf die Blastenbildung und die Expression des Aktivierungsmarkers CD25. Die Wirkungen von IL-12 und IFN- α waren bei der Untersuchung von WT und IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen vergleichbar.

IL-2 bewirkte in IRF4^{-/-} Zellen sowohl eine Zunahme der Zellzahl als auch ihrer Zellgröße. Dieses könnte auf eine verminderte IL-2-Produktion durch IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen hinweisen. Um das IL-2-Defizit auszugleichen wurde bei den folgenden Zellkulturen den Zellen jeweils IL-2 zugegeben.

4.5 Modulation der Entzündung – Untersuchung des Einflusses von STAT3 auf die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren

Viele Zytokine wie zum Beispiel IL-6, LIF (*leukaemia inhibitory factor*) oder Leptin vermitteln ihre Wirkung in der Zelle über den Transkriptionsfaktor STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) {Heinrich *et al.* 1998, Park und Ahima 2014}. Für diese Arbeit ist vor allem IL-6 als entscheidender Entzündungsmodulator von Bedeutung.

Nach Interaktion von IL-6 mit seinem Rezeptor auf den Zielzellen werden Janus-Kinasen aktiviert, die dann STAT Proteine phosphorylieren. Dabei erfolgt eine Dimerisierung der STAT-Proteine mittels ihrer SH2-Domänen und eine Translokation in den Zellkern. Neben

der Signaltransduktion von verschiedenen Entzündungszytokinen vermittelt STAT3 auch die Signaltransduktion von verschiedenen Hormonen, die an der Embryonalentwicklung beteiligt sind {Kristensen *et al.* 2005}. Mäuse, die kein STAT3 während ihrer embryonalen Entwicklung bilden können, sind daher nicht lebensfähig. Um die Wirkungsweisen von STAT3 untersuchen zu können wurde ein Mausmodell mit einer konditionalen Genablation entwickelt. Man benutzt dabei das Cre-*loxP*-Rekombinationssystem. Gepaarte *loxP*-DNA-Abschnitte werden in Introns des *Stat3*-Gens eingeschleust. Dann werden durch den Einsatz von Cre-Rekombinasen DNA-Segmente, die von den *loxP*-Elementen flankiert werden, deletiert, was eine funktionelle Inaktivierung des *Stat3*-Gens zur Folge hat. Durch eine Expression von Cre unter der Kontrolle eines CD4-Promotors wird im Thymus in allen doppelt-positiven T-Zellen das *Stat3*-Gen mutiert (CD4 Cre⁺ × *Stat3*^{flox/flox} Mäuse). Als Folge haben sowohl periphere CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen kein funktionales STAT3 {Akira S. Oncogene 2000}.

Bei der folgenden Experimentgruppe wurde untersucht, in wie weit die Expression von IRF4 und von anderen Transkriptionsfaktoren in CD4 Cre⁺ × *Stat3*^{flox/flox} Mäusen, beeinflusst wurde. Es wurden insgesamt drei Mauslinien pro Experiment verglichen: CD4 Cre⁺ × *Stat3*^{flox/flox} Mäuse, IRF4^{-/-} Mäuse, und Wildtypmäuse.

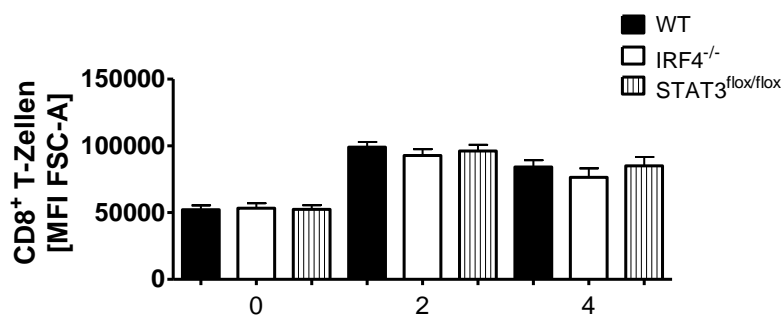


Abbildung 27: Untersuchung der Zellgröße nach Stimulation

Aus den Milzen einer Wildtypmaus, einer IRF4^{-/-} Maus und einer CD4 Cre⁺ × *Stat3*^{flox/flox} Maus wurde jeweils eine Suspension mit 5 × 10⁵ Zellen hergestellt. Die Zellen wurden dann jeweils mit 1 µg/mL anti-CD3 mAk, 1 µg/mL anti-CD28 mAk sowie 1 µg/mL IL-2 stimuliert und zwei oder vier Tage lang im Komplettmedium inkubiert. Im Anschluss wurden die CD8⁺ T-Zellen charakterisiert. Die hier gezeigten Daten entstammen einem Beispielexperiment aus einer Gruppe von insgesamt drei durchgeführten Experimenten. Dabei wurden pro Experiment Zellen einer Maus in Doppelwerten untersucht. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte ± SEM dar.

Beim Vergleich der CD8⁺ T-Zellen sah man, wie in Abbildung 27 gezeigt, dass die Wildtypzellen sowie STAT3-defizienten Zellen an Tag 4 im Durchschnitt marginal größer waren als die IRF4^{-/-} Zellen.

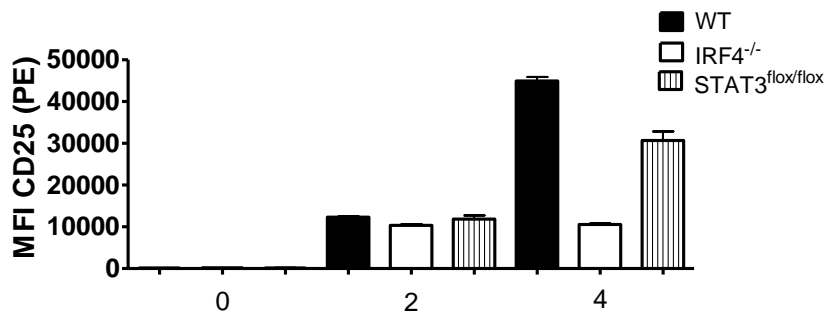


Abbildung 28: *CD25-Expression nach Stimulation*

Nach einer Stimulation wie in Abbildung 27 beschrieben, wurden Wildtyp, CD4 Cre⁺ × Stat3^{flox/flox} CD8⁺ T-Zellen in Bezug auf ihre CD25-Expression untersucht. Als Maß der Expression wurde die Mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) des CD25 bei der FACS Messung verwendet. Gezeigt ist die graphische Auswertung für unstimulierte Zellen sowie Zellen an Tag 2 und 4 nach Stimulation. Die hier gezeigten Daten entstammen einem Beispielerperiment aus einer Gruppe von insgesamt drei durchgeführten Experimenten. Dabei wurde pro Experiment Zellen einer Maus in Doppelwerten untersucht. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte ± SEM dar.

Vor der Stimulation war auf allen CD8⁺ T-Zellpopulationen kein CD25 nachweisbar. Am zweiten Tag der Stimulation exprimierten alle drei untersuchten Populationen CD25 auf einem sehr hohen Niveau. Dabei war die Expression auf Wildtypzellen und STAT3-defizienten Zellen marginal größer als die der IRF4^{-/-} Zellen. Am vierten Tag der Stimulation hatten die Wildtypzellen dann die höchste CD25-Expression, die IRF4^{-/-} Zellen exprimierten am wenigsten CD25 und die Expression der STAT3-defizienten Zellen lag dazwischen. Wenn man CD25 als Maß für die Stärke der Zellaktivierung nutzt, wurde somit deutlich, dass STAT3-defiziente CD8⁺ T-Zellen schwächer und IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen deutlich schwächer aktiviert waren als Wildtyp CD8⁺ T-Zellen (siehe Abbildung 28).

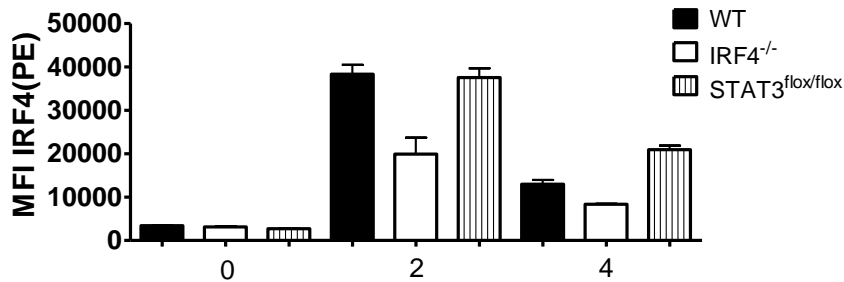


Abbildung 29: IRF4-Expression nach Stimulation

Nach einer Stimulation wie in Abbildung 27 beschrieben, wurden Wildtyp, IRF4^{-/-} und CD4 Cre⁺ × Stat3^{flox/flox} CD8⁺ T-Zellen in Bezug auf ihre IRF4-Expression untersucht. Als Maß der Expression wurde die Mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) des IRF4 bei der FACS Messung verwendet. Gezeigt ist die graphische Auswertung für unstimulierte Zellen sowie Zellen an Tag 2 und 4 nach Stimulation. Die hier gezeigten Daten entstammen einem Beispielperiment aus einer Gruppe von insgesamt drei durchgeführten Experimenten. Dabei wurden pro Experiment Zellen einer Maus in Doppelwerten untersucht. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte ± SEM dar.

Vor der Stimulation war in allen CD8⁺ T-Zellpopulationen nur eine geringe IRF4-Expression nachweisbar. Am zweiten Tag der Stimulation war eine deutliche IRF4-Expression vorhanden. Es gab aber zwischen den WT und STAT3-defizienten Zellen keinen Unterschied. Am vierten Tag der Stimulation nahm die IRF4-Expression der Wildtypzellen im Vergleich zum zweiten Tag erheblich ab. In den STAT3-defizienten Zellen war diese Abnahme aber weniger ausgeprägt, die IRF4-MFI lag bei etwa 20.000 und war ungefähr doppelt so hoch wie die IRF4-MFI der Wildtypzellen, wie aus Abbildung 29 ersichtlich ist.

Kürzlich publizierte Arbeiten konnten zeigen, dass IRF4 bei der Bindung an DNA mit dem Transkriptionsfaktor BATF (*Basic leucine zipper transcription factor, ATF-like*) kooperiert. BATF gehört zur Familie der AP-1/ATF Transkriptionsfaktoren, welche die Differenzierung von Immunzellen beeinflusst. Die Wirkungsweise erfolgt durch die Bildung von Heterodimeren mit JUNB. Das BATF-JUNB Heterodimer bindet an eine entsprechende DNA-Sequenz im Komplex mit IRF4 oder IRF8 in Immunzellen, was zu nachfolgender Transkription und in dessen Folge zur Translation einer Vielzahl von Proteinen führt {Li *et al.* 2012}. In dem nachfolgenden Experiment sollte daher untersucht werden, ob eine

Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen auch zu einer Veränderung der BATF-Expression führt und ob diese Veränderung durch STAT3 beeinflusst wird.

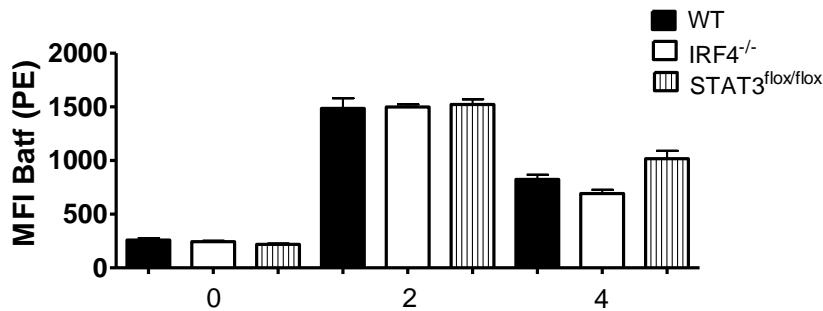


Abbildung 30: *BATF-Expression nach Stimulation*

Nach einer Stimulation wie in Abbildung 27 beschrieben, wurden Wildtyp, IRF4^{-/-} und CD4 Cre⁺ × Stat3^{flox/flox} CD8⁺ T-Zellen in Bezug auf ihre BATF-Expression untersucht. Als Maß der Expression wurde die Mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) des BATF bei der FACS Messung verwendet. Gezeigt ist die graphische Auswertung für unstimulierte Zellen sowie Zellen an Tag 2 und 4 nach Stimulation. Die hier gezeigten Daten entstammen einem Beispielerperiment aus einer Gruppe von insgesamt drei durchgeführten Experimenten. Dabei wurden pro Experiment Zellen einer Maus in Doppelwerten untersucht. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte ± SEM dar.

Wie in Abbildung 30 dargestellt, wiesen vor der Stimulation alle drei CD8⁺ T-Zellpopulationen nur eine niedrige BATF-Expression auf. Am zweiten Tag der Stimulation war eine deutliche Induktion von BATF sichtbar. Dabei exprimierten alle drei Populationen gleich stark BATF. Am vierten Tag der Stimulation sanken die Expressionslevel aller drei Populationen, allerdings waren hier Unterschiede zu erkennen. Im Vergleich zu den Wildtypzellen war die BATF-Expression der IRF4^{-/-} Zellen sichtbar geringer. STAT3-defiziente Zellen exprimierten BATF stärker als die anderen beiden Populationen.

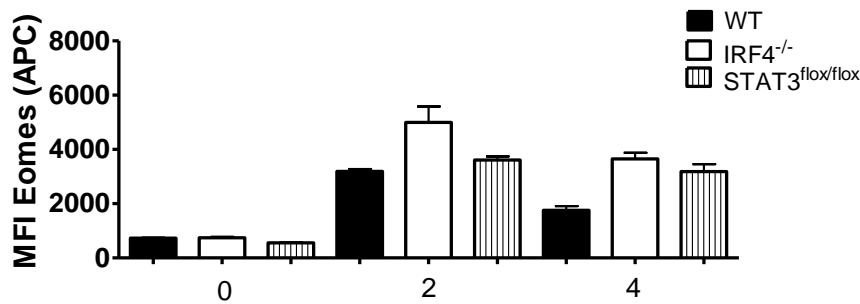


Abbildung 31: Eomes-Expression nach Stimulation

Nach einer Stimulation wie in Abbildung 27 beschrieben, wurden Wildtyp, IRF4^{-/-} und CD4 Cre⁺ × Stat3^{flox/flox} CD8⁺ T-Zellen in Bezug auf ihre Eomes-Expression untersucht. Als Maß der Expression wurde die Mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) des Eomes bei der FACS Messung verwendet. Gezeigt ist die graphische Auswertung für unstimulierte Zellen sowie Zellen an Tag 2 und 4 nach Stimulation. Die hier gezeigten Daten entstammen einem Beispiexperiment aus einer Gruppe von insgesamt drei durchgeführten Experimenten. Dabei wurden pro Experiment Zellen einer Maus in Doppelwerten untersucht. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte ± SEM dar.

Vor der Stimulation zeigten alle CD8⁺ T-Zellpopulationen, wie erwartet, nur eine geringe Eomes-Expression. Am zweiten Tag der Stimulation war die Expression bei Wildtypzellen sowie bei STAT3-defizienten Zellen ähnlich ausgeprägt und in beiden Zellpopulationen geringer als die Expression in IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen. Am vierten Tag exprimierten die Wildtypzellen das niedrigste Niveau an Eomes, die IRF4^{-/-} Zellen zeigten noch immer die höchste Expression und die Expression in STAT3-defizienten Zellen war etwas höher als in den Wildtypzellen (siehe Abbildung 31).

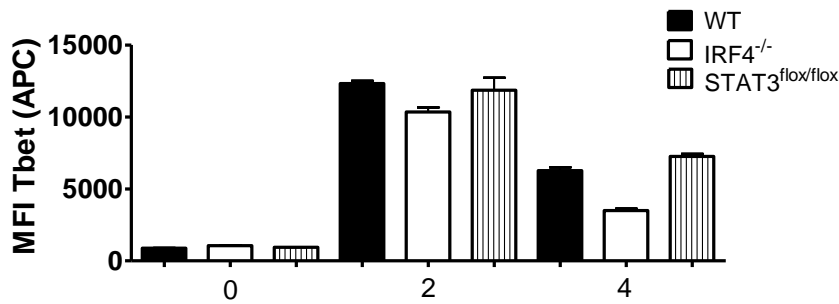


Abbildung 32: Tbet-Expression nach Stimulation

Nach einer Stimulation wie in Abbildung 27 beschrieben, wurden Wildtyp, IRF4^{-/-} und CD4 Cre⁺ × Stat3^{flox/flox} CD8⁺ T-Zellen in Bezug auf ihre Tbet-Expression untersucht. Als Maß der Expression wurde die Mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) des Tbet bei der FACS Messung verwendet. Gezeigt ist die graphische Auswertung für unstimulierte Zellen sowie Zellen an Tag 2 und 4 nach Stimulation. Die hier gezeigten Daten entstammen einem Beispielerperiment aus einer Gruppe von insgesamt drei durchgeführten Experimenten. Dabei wurde pro Experiment Zellen einer Maus in Doppelwerten untersucht. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte ± SEM dar.

An Tag 0 wurde nur wenig Tbet exprimiert. Am zweiten Tag der Stimulation war in Wildtypzellen sowie STAT3-defizienten Zellen eine deutliche Tbet-Expression sichtbar. Die Expression in IRF4-defiziente Zellen war deutlich niedriger als in den anderen Populationen. Am vierten Tag der Stimulation war das Expressionsmuster von Tbet ähnlich – allerdings war die Expression von Tbet insgesamt geringer und die Expression in STAT3-defizienten Zellen etwas höher als in den Wildtypzellen, wie in Abbildung 32 gezeigt.

Insgesamt zeigten diese Ergebnisse: STAT3 hatte einen nur geringen Einfluss auf die IRF4-Expression. Dagegen hatte es einen deutlichen Einfluss auf die Eomes-, Tbet- und CD25-Expression. Die Abwesenheit von STAT3 führte an Tag 4 der Zellkultur zu einer höheren Expression von Eomes und Tbet und einer niedrigeren CD25-Expression.

In Wildtyp CD8⁺ T-Zellen wurde BATF nach Stimulation deutlich induziert. Die Expression nahm aber an Tag 4 wieder ab. Die Abwesenheit von IRF4 hatte keinen Einfluss auf die Expression, das Fehlen von STAT3 führte aber zu einer stärkeren Expression an Tag 4, was bedeuten würde, dass STAT3 Signale zu einer Hemmung der BATF-Expression führen könnten.

Nach Aktivierung erwerben $CD8^+$ T-Zellen die Fähigkeit $IFN-\gamma$ zu produzieren. Das Typ II Interferon $IFN-\gamma$ ist von entscheidender Bedeutung für die angeborene und adaptive Immunabwehr {Kaech et al. 2012}. Ein Teil der $CD8^+$ T-Zellen ist dann zusätzlich in der Lage IL-10 zu synthetisieren. IL-10 ist eines der wichtigsten antiinflammatorischen Zytokine und die Produktion durch $CD8^+$ T-Zellen dient wahrscheinlich dazu überschüssige Immunreaktionen und immunpathologische Prozesse zu unterbinden {Riley et al. 1999}. Um die Zytokine $IFN-\gamma$ und IL-10 zu detektieren wurde am zweiten und vierten Tag der Zellkultur für 4 Stunden mit PMA und Ionomycin stimuliert. Durch die Zugabe von Monensin wurde die Sekretion der Zytokine verhindert, so dass sie nach einer intrazellulären Anfärbung mit FACS detektierbar waren.

A

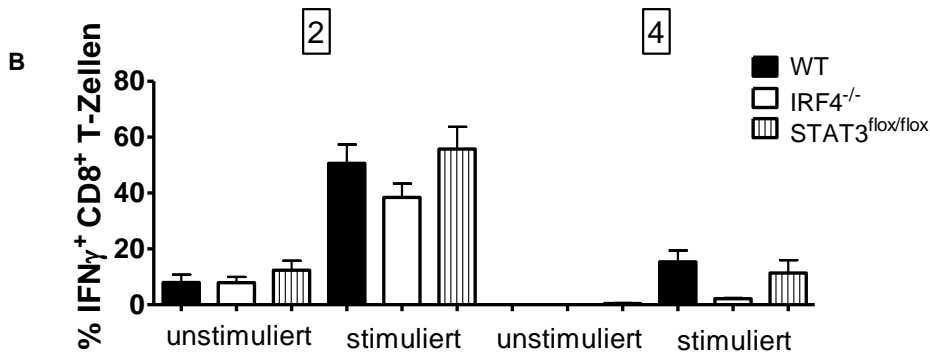
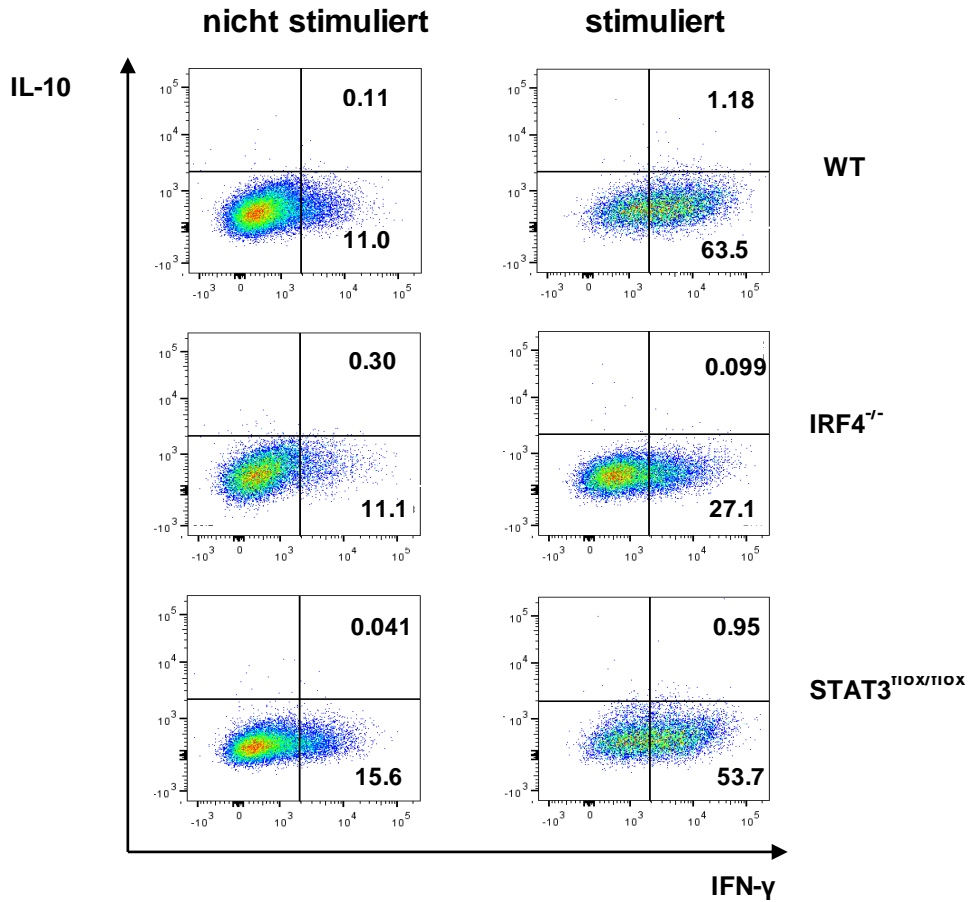


Abbildung 33: IFN- γ und IL-10 Expression in CD8⁺ T-Zellen

Zellen wurden, wie in Abbildung 27 beschrieben, mit anti-CD3 mAk und anti-CD28 mAk inkubiert. An Tag 2 und 4 wurde den Kulturen PMA, Ionomycin und Monensin (verhindert Zytokinsekretion) bzw. nur Monensin (unstimuliert) zugegeben. Nach 4h wurde die Expression von IFN- γ und IL-10 charakterisiert. (A) zeigt beispielhaft die IFN- γ und IL-10 Expression in unstimulierten und stimulierten CD8⁺ T-Zellen aus WT, IRF4^{-/-} und CD4 Cre⁺ \times Stat3^{flox/flox} Zellen. (B) fasst die Prozentwerte der IFN- γ ⁺ Zellen innerhalb der CD8⁺ T-

Zellpopulationen für Tag 2 und Tag 4 zusammen. Die in (B) gezeigten Daten repräsentieren die Werte von insgesamt drei durchgeführten Experimenten. Dabei wurden pro Experiment jeweils Zellen einer Maus in Doppelwerten untersucht. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM dar.

Am zweiten Tag der Stimulation war eine starke IFN- γ Expression bei allen drei Populationen zu erkennen. Dabei waren der Anteil der IFN- γ^+ T-Zellen sowie die Expressionsstärke pro Zelle bei STAT3-defizienten Zellen am höchsten. In der IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellpopulation waren sowohl der Anteil an positiven Zellen als auch die Expressionsstärke deutlich verringert. Die Wildtypzellen verhielten sich ähnlich wie die STAT3-defizienten Zellen. An Tag 4 zeigte sich eine deutlich verminderte IFN- γ Produktion, aber ein ähnliches Expressionsmuster in den einzelnen Populationen wie an Tag 2.

Für IL-10 konnten sowohl an Tag 2 als auch an Tag 4 unabhängig vom Genotyp in allen CD8⁺ T-Zellpopulationen nur marginale Mengen an positiven Zellen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 33).

Zusammengefasst lässt sich Folgendes sagen: Wildtypzellen hatten bei allen untersuchten Transkriptionsfaktoren ihr Expressionsmaximum an Tag 2. IRF4^{-/-} Zellen zeigten ein ähnliches Expressionsmuster, allerdings waren hier die Expressionsstärken bis auf die von BATF stets erheblich geringer als beim Wildtyp. STAT3-defiziente Zellen verhielten sich den Wildtypzellen sehr ähnlich, allerdings lag ihr Expressionsmaximum bei einzelnen Transkriptionsfaktoren teilweise erst am vierten Tag der Stimulation und nicht schon am zweiten.

4.6 CD8⁺ T-Zelltransfer – Validierung der *in vitro* Ergebnisse *in vivo*

Im letzten Abschnitt dieser Arbeit sollten die Ergebnisse der vorangegangenen *in vitro* Experimente *in vivo* validiert werden. Hierbei wurde insbesondere der Einfluss von IRF4 in CD8⁺ T-Zellen auf die Expression weiterer Transkriptionsfaktoren untersucht. Für die Analyse der Zellen *in vivo* wurde ein Zelltransfermodell verwendet. Dabei konnte man zum einen die Wildtyp- und IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen unabhängig von ihrem Aktivierungsgrad identifizieren und zum anderen konnten die Zellen in einer Wildtypumgebung direkt in derselben Maus miteinander verglichen werden.

Für den T-Zelltransfer wurden jeweils einer OT1-Wildtyp- und einer OT1-IRF4^{-/-} Maus die Milz entnommen und daraus die CD8⁺ T-Zellen isoliert. Die so gewonnenen CD8⁺ T-Zellen wurden in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und intravenös in eine Wildtypmaus injiziert. Für Analysen an Tag 3 wurden 4×10⁵ und für Analysen an Tag 5 4×10⁴ Zellen des Gemisches in die Rezipienten transferiert. Die Rezipienten waren vier Stunden vorher mit dem Listerienstamm *LmOVA* infiziert worden. Es wurden CD8⁺ T-Zellen verwendet, die durch die Oberflächenmarker CD90.1 und CD90.2 identifiziert werden konnten. Die Wildtypspendertiere waren CD90.1⁺CD90.2⁺, die IRF4-defizienten Spendertiere CD90.1⁺CD90.2⁻ und die Empfängertiere CD90.1⁺CD90.2⁻. An den Tagen drei und fünf der Infektion wurde dann die Anzahl der vorhandenen transferierten Zellen sowie deren Expression von IRF4 und anderer Transkriptionsfaktoren untersucht.

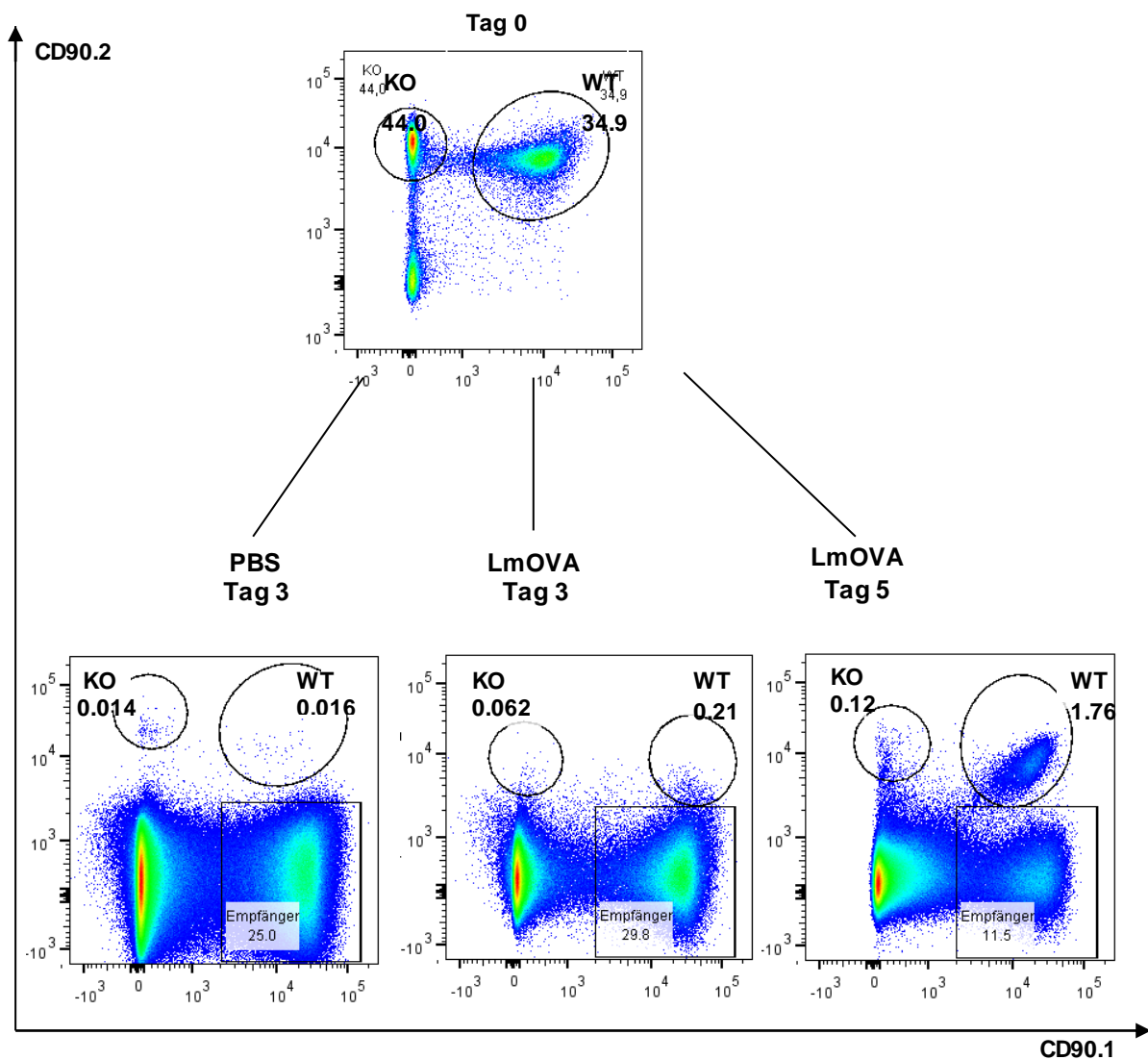


Abbildung 34: Vergleich zwischen WT und IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen im Transfermodell

Von einem 1:1 Gemisch aus WT und IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen aus OT-1-Mäusen wurden 4×10⁵ Zellen für Tag 3 und 4×10⁴ für Tag 5 in Wildtyprezipienten transferiert. Die Rezipienten wurden 4h zuvor mit *LmOVA* infiziert oder erhielten PBS (Kontrollen). Die einzelnen Populationen konnten mit den Oberflächenmarkern CD90.1 und CD90.2 identifiziert werden. Wildtypzellen waren CD90.1⁺ CD90.2⁺, IRF4^{-/-} Zellen waren CD90.1⁻ CD90.2⁺ und die Rezipienten waren CD90.1⁺ CD90.2⁻. Die Abbildung zeigt repräsentative CD90.1/CD90.2-Färbungen der gesamten Milzzellpopulationen. Tag 0 zeigt angereicherte CD8⁺ T-Zellen, an den Tagen 3 und 5 sind die gesamten Milzzellen des Rezipienten, entweder nach einer Injektion mit PBS (=Kontrolle) oder mit *LmOVA* dargestellt.

Die Untersuchung der transferierten Zellen zeigte, dass bereits am dritten Tag der Infektion die Wildtypzellen im Vergleich zu den IRF4^{-/-} Zellen einen etwas größeren Anteil bildeten. Beide Populationen waren trotz der erhöhten Anzahl an transferierten T-Zellen am dritten Tag jedoch sehr klein. Am fünften Tag der Infektion mit *LmOVA* bildeten die WT-Zellen dagegen beinahe 2% der Gesamtpopulation der CD8⁺ T-Zellen in der Empfängermaus, der Anteil der IRF4^{-/-} Zellen dagegen blieb auf einem ähnlichen Niveau wie am dritten Tag.

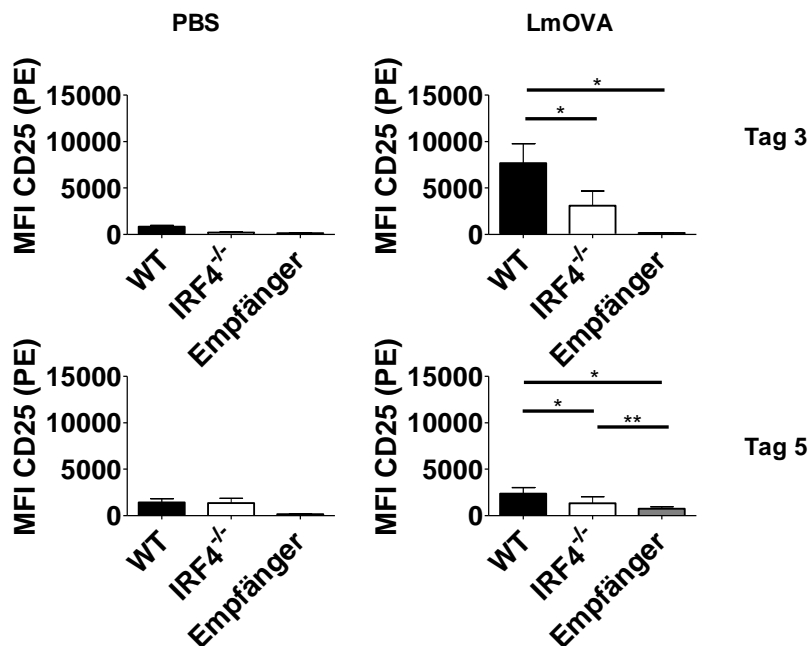


Abbildung 35: CD25-Expression in CD8⁺ T-Zellen im Transfermodell

Bei einer Durchführung des Experiments wie in Abbildung 34 zeigt die Abbildung die graphische Auswertung der MFI von CD25 jeweils im Vergleich der WT, IRF4^{-/-} und Empfängerzellen zwischen PBS und Infektion mit *LmOVA* an den Tagen 3 und 5. Pro Experiment wurden dabei drei infizierte Mäuse und eine nicht infizierte Maus als Kontrolle verwendet. Dargestellt sind Kompilationen aus insgesamt fünf Experimenten. Die Fehlerbalken stellen die arithmetischen Mittelwerte ± SEM dar. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

Am dritten Tag der Infektion war in den transferierten $CD8^+$ T-Zellen eine deutliche CD25-Expression zu erkennen. Dabei lag das Niveau der Wildtypzellen deutlich über dem der $IRF4^{-/-}$ Zellen. Am fünften Tag der Infektion war nur noch eine geringe CD25-Expression nachweisbar. Innerhalb der endogenen $CD8^+$ T-Zellen der Empfängertiere war bis Tag 5 keine deutlich CD25-positive T-Zellpopulation nachweisbar (siehe Abbildung 35). Dies liegt wahrscheinlich daran, dass die Population der durch die Infektion aktivierten $CD8^+$ T-Zellen an Tag 5 im Verhältnis zu den nicht-aktivierten Zellen noch relativ klein ist.

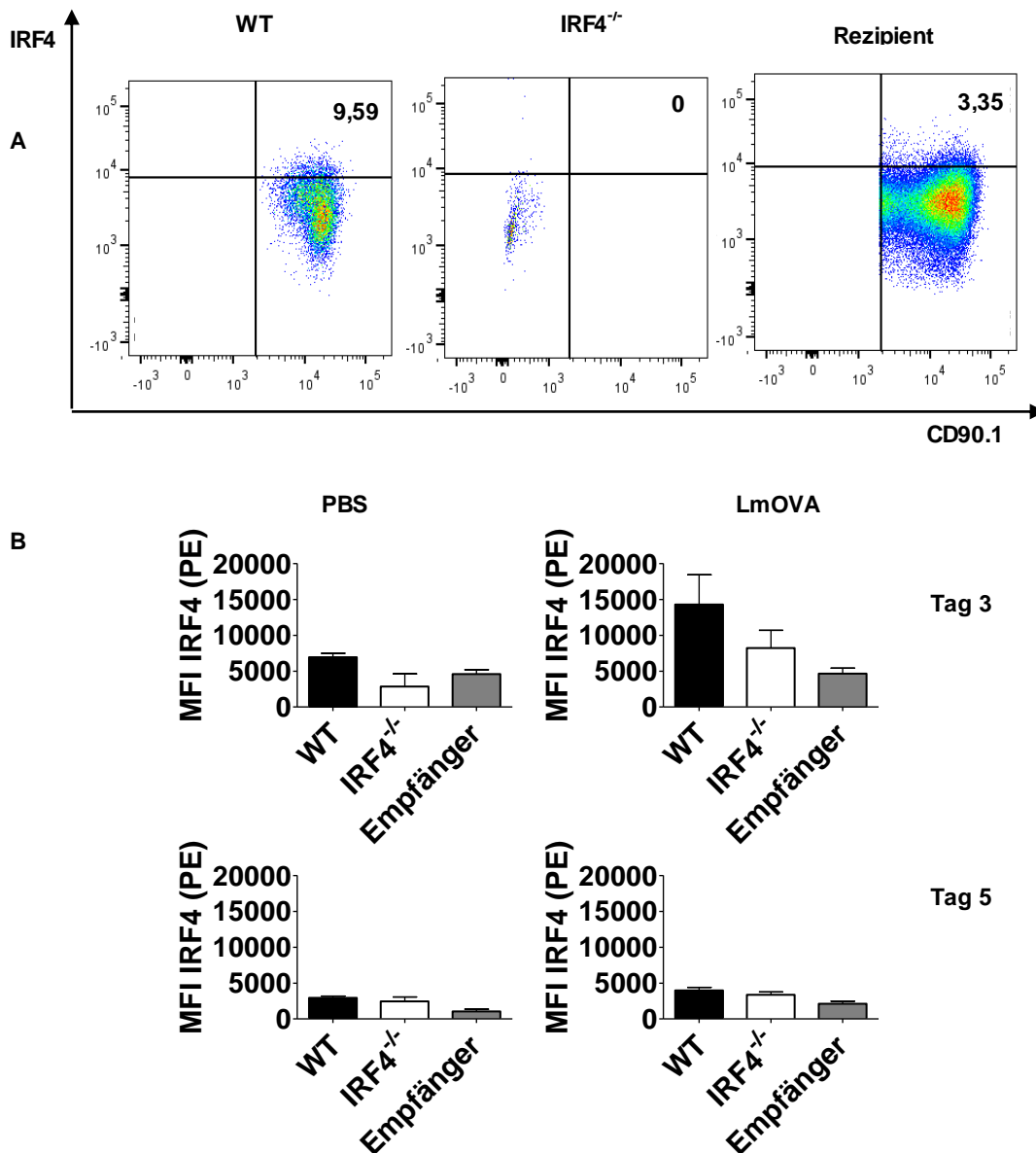


Abbildung 36: *IRF4*-Expression in $CD8^+$ T-Zellen im Transfermodell

Bei einer Durchführung des Experiments wie in Abbildung 34 zeigt Abbildung (A) repräsentative Dotplots der IRF4-Expression in WT, IRF4^{-/-} und Rezipient-CD8⁺ T-Zellen an Tag 3 der Infektion. Abbildung (B) zeigt die graphische Auswertung der MFI von IRF4 jeweils im Vergleich der WT, IRF4^{-/-} und Empfängerzellen zwischen PBS und Infektion mit LmOVA. Pro Experiment wurden dabei drei infizierte Mäuse und eine nicht infizierte Maus als Kontrolle verwendet. Dargestellt sind Kompilationen aus insgesamt fünf Experimenten. Die Fehlerbalken stellen die arithmetischen Mittelwerte ± SEM dar.

Bei der Betrachtung der IRF4-Expression war deutlich, dass das Maximum der Expression in den transferierten T-Zellen am dritten Tag der Infektion lag. Dabei exprimierten die transferierten Wildtypzellen IRF4 mit einer MFI von etwa 15.000, über dreifach stärker als die Zellen der nicht infizierten Kontrollgruppe. In den Empfängerzellen war nur eine marginale IRF4-Expression erkennbar. IRF4^{-/-} Zellen schienen ebenfalls IRF4 zu exprimieren – dieses Phänomen war bereits in vorangegangenen Experimenten beobachtet und diskutiert worden. An Tag fünf der Infektion sank die IRF4-Expression in den transferierten Wildtypzellen wieder, wie in Abbildung 36 gezeigt.

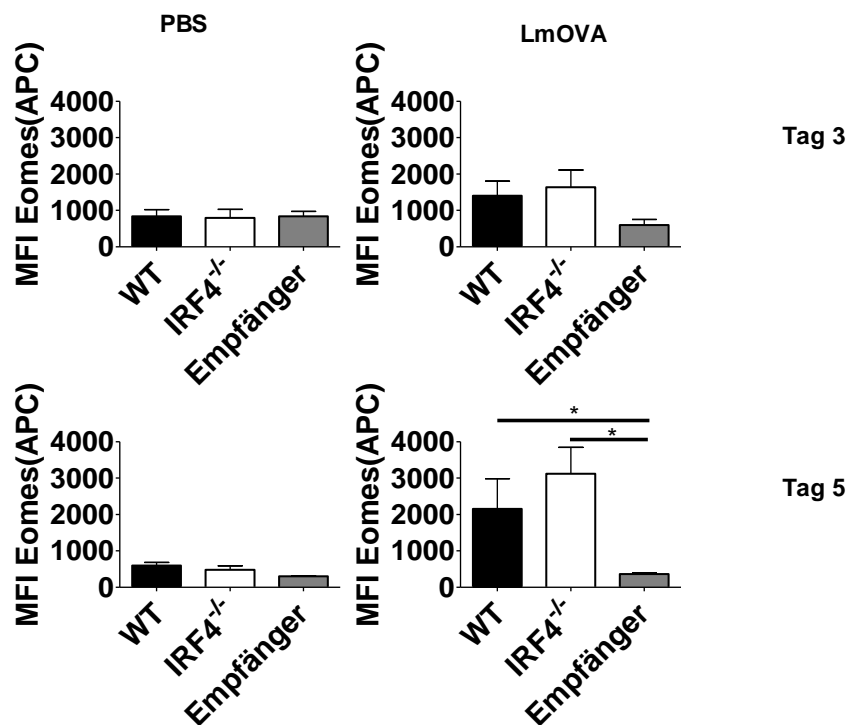


Abbildung 37: Eomes-Expression in CD8⁺ T-Zellen im Transfermodell

Bei einer Durchführung des Experiments wie in Abbildung 34 zeigt die Abbildung die graphische Auswertung der MFI von Eomes jeweils im Vergleich der WT, IRF4^{-/-} und Empfängerzellen zwischen PBS und Infektion mit LmOVA an den Tagen 3 und 5. Dargestellt sind Kompilationen aus insgesamt fünf Experimenten. Die Fehlerbalken stellen die arithmetischen Mittelwerte ± SEM dar. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

Im Vergleich zur PBS-Kontrolle war am dritten Tag der Infektion ein leichter Anstieg der Eomes-Expression vorhanden, mit einer MFI von etwa 2000. Dabei war bereits ein Unterschied zwischen Wildtyp- und IRF4^{-/-} Zellen zu erkennen – die IRF4-defizienten Zellen exprimierten etwas mehr Eomes. Am fünften Tag der Infektion waren die Expressionsraten stark angestiegen und die IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen exprimierten deutlich mehr Eomes als die Wildtypzellen. Wie in Abbildung 37 dargestellt, exprimierten die Empfängerzellen über den gesamten Infektionszeitraum hinweg nur eine geringe Menge Eomes.

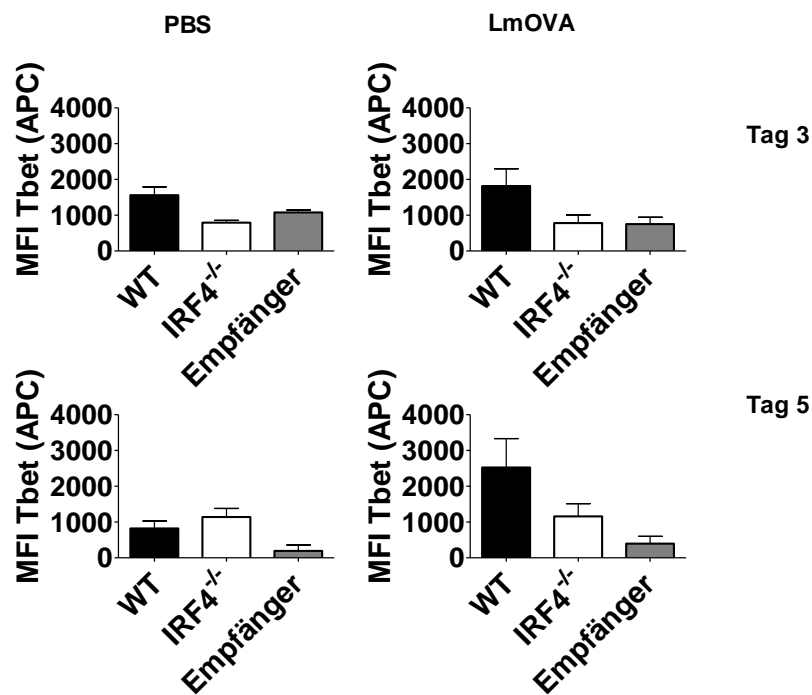


Abbildung 38: *Tbet*-Expression in CD8⁺ T-Zellen im Transfermodell

Bei einer Durchführung des Experiments wie in Abbildung 34 zeigt die Abbildung die graphische Auswertung der MFI von Tbet jeweils im Vergleich der WT, IRF4^{-/-} und Empfängerzellen zwischen PBS und Infektion mit *LmOVA* an den Tagen 3 und 5. Dargestellt sind Kompilationen aus insgesamt fünf Experimenten. Die Fehlerbalken stellen die arithmetischen Mittelwerte ± SEM dar.

Am dritten Tag der Infektion gab es nur bei Wildtypzellen einen nennenswerten Expressionsanstieg von Tbet, die IRF4^{-/-} Zellen hatten dasselbe Niveau wie die Empfängerzellen. Am fünften Tag der Expression nahmen die Expressionsraten in den transferierten Zellen deutlich zu – die Expressionsstärke der IRF4-defizienten CD8⁺ T-Zellen war aber auch hier niedriger als die der Wildtypzellen (siehe Abbildung 38).

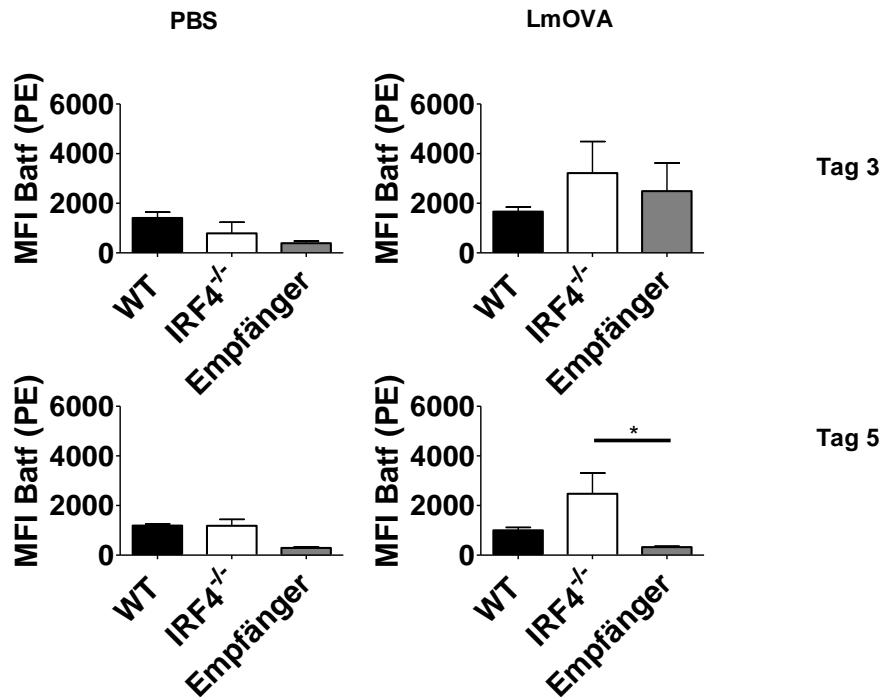


Abbildung 39: *BATF-Expression in CD8⁺ T-Zellen im Transfermodell*

Bei einer Durchführung des Experiments wie in Abbildung 34 zeigt die Abbildung die graphische Auswertung der MFI von BATF jeweils im Vergleich der WT, IRF4^{-/-} und Empfängerzellen zwischen PBS und Infektion mit *LmOVA* an den Tagen 3 und 5. Dargestellt sind Kompilationen aus insgesamt fünf Experimenten. Die Fehlerbalken stellen die arithmetischen Mittelwerte ± SEM dar. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

Am dritten Tag der Infektion war in einem Teil der Mäuse in den transferierten IRF4^{-/-} T-Zellen ein Anstieg der BATF-Expression zu erkennen. An Tag 5 war dieser Anstieg noch deutlicher ausgeprägt. Die transferierten Wildtypzellen zeigten an Tag 3 ein ähnliches Expressionslevel wie die Empfängerzellen. An Tag 5 war auch in diesen T-Zellen ein leichter Anstieg sichtbar, wie Abbildung 39 zeigt.

BCL-6 oder *B-cell lymphoma 6* ist ein Transkriptionsfaktor der überwiegend als Repressor agiert. In B-Zell-Lymphomen ist das BCL6-Gen oftmals transloziert und hypermutiert. In CD8⁺ T-Zellen antagonisiert BCL-6 die Wirkung von Blimp-1, wobei eine hohe Blimp-1 Expression mit einer Differenzierung zu kurzlebigen Effektorzellen und eine hohe BCL-6 Expression mit einer Differenzierung zu Gedächtniszellen assoziiert wird. Außerdem interagiert BCL-6 mit Tbet {Oestreich *et al.* 2011}.

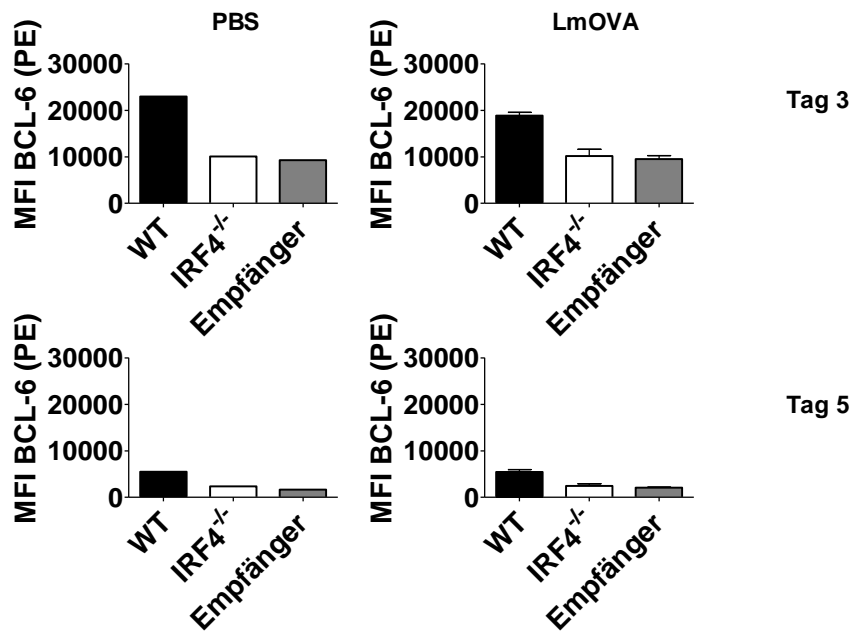


Abbildung 40: *BCL-6 Expression in CD8⁺ T-Zellen im Transfermodell*

Bei einer Durchführung des Experiments wie in Abbildung 34 zeigt die Abbildung die graphische Auswertung der MFI von BCL-6 jeweils im Vergleich der WT, IRF4^{-/-} und Empfängerzellen zwischen PBS und Infektion mit *LmOVA* an den Tagen 3 und 5. Dargestellt ist ein Experiment und eine PBS Kontrolle pro Zeitpunkt.

An Tag 3 war eine erhöhte BCL-6 Expression in den transferierten Wildtypzellen sichtbar. Am fünften Tag war die Expression wieder stark abgesunken, aber noch immer marginal höher als die der IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen und der endogenen CD8⁺ T-Zellen (siehe Abbildung 40).

Zusammenfassend bestätigen die *in vivo*-Analysen weitgehend die Ergebnisse der *in vitro*-Experimente. Die Expression von CD25, IRF4 und Tbet nahm in den transferierten Wildtypzellen während der Infektion deutlich zu. Das Maximum lag für diese Proteine bereits an Tag 3 und sank an Tag 5 wieder ab. IRF4^{-/-} T-Zellen zeigten jeweils eine verminderte Expression. Unerwarteterweise war die Expression von BCL-6 in unserer Analyse in den Wildtypzellen höher als in den IRF4^{-/-} T-Zellen. Wie in den *in vitro*-Analysen exprimierten die transferierten IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen mehr Eomes als die Wildtypzellen und auch die Expression von BATF war in den IRF4^{-/-} T-Zellen erhöht.

5. Diskussion

IRF4 spielt eine zentrale Rolle in der Regulation von T-Zellantworten. In CD8⁺ T-Zellen ist dieser Transkriptionsfaktor für die korrekte Aktivierung und die Differenzierung zu Effektor-T-Zellen entscheidend, die dann wirkungsvoll gegen infizierte oder transformierte Zellen agieren können. Zu Beginn dieses Projekts waren viele Fragen zur Regulation und Funktion von IRF4 in CD8⁺ T-Zellen offen. In dieser Arbeit wurden folgende Punkte näher analysiert: erstens, welche Faktoren die Expression von IRF4 regulieren, und zweitens, welche Konsequenz das Fehlen von IRF4 auf CD8⁺ T-Zellen, insbesondere auf die Expression von für die CD8⁺ T-Zelldifferenzierung wichtigen Transkriptionsfaktoren hat.

5.1 Regulation der Expression von IRF4 in CD8⁺ T-Zellen

Verschiedene Arbeiten konnten zeigen, dass die IRF4-Expression direkt vom TZR-Signal abhängig ist {Matsuyama *et al.* 1995, Nayar *et al.* 2012, Raczkowski *et al.* 2013, Man *et al.* 2013, Yao *et al.* 2013, Grusdat *et al.* 2014}. In dieser Arbeit wurde daher zunächst untersucht, inwiefern die Stärke der IRF4-Expression von der Stärke des TZR-Signals abhängig war. Für diese Analysen wurden CD8⁺ T-Zellen aus OT1-Mäusen verwendet, die spezifisch für das Ovalbuminpeptid SIINFEKL waren. Die Stärke der TZR-Stimulation wurde einerseits durch die Verwendung unterschiedlicher Peptidkonzentrationen (10^{-6} - 10^{-10} M) variiert. Andererseits wurden schwächer agonistische Varianten des SIINFEKL-Peptids verwendet: SIIQFEKL und SIIVFEKL. Im SIIQFEKL wird die Aminosäure Asparagin (N) durch die strukturell ähnliche Aminosäure Glutamin (Q) ausgetauscht. Im SIIVFEKL erfolgt ein Austausch des polaren Asparagins durch Valin (V), eine Aminosäure mit einer lipophilen Seitenkette, was eine stärkere Veränderung der Peptideigenschaft zur Folge hat. SIINFEKL ist demnach ein starker Agonist für den TZR, SIIQFEKL ein etwas schwächerer Agonist und SIIVFEKL ist ein schwacher Agonist {Zehn und Bevan *et al.* 2009}. WT und IRF4^{-/-} OT1 T-Zellen wurden mit diesen Peptiden in verschiedenen Konzentrationen inkubiert und an den folgenden Tagen wurde die Expression von IRF4 sowie anderen Transkriptionsfaktoren gemessen.

Die IRF4-Expression nahm an Tag 1 der Peptidstimulation deutlich zu, erreichte an Tag 2 ein Maximum und fiel dann bis Tag 4 wieder ab. Für die drei Peptide ergab sich an Tag 1 eine direkte Korrelation der IRF4-Expression zur Peptidkonzentration. Die Peptide unterschieden sich aber in der Endkonzentration, in der eine IRF4-Induktion noch nachweisbar war.

Diese Konzentrationen lagen für SIINFEKL bei etwa 10^{-10} M, für SIIQFEKL bei 10^{-9} M und für SIIVFEKL bei 10^{-8} M. An Tag 2 zeigte sich dann eine gleichmäßig starke IRF4-Expression bis zu den jeweiligen Schwellenkonzentrationen der Peptide. An den folgenden Tagen war durch die abnehmende IRF4-Expression keine klare Aussage mehr möglich. Der Transkriptionsfaktor Tbet zeigte ein mit IRF4 vergleichbares Expressionsprofil. Im Gegensatz dazu wies der Transkriptionsfaktor Eomes ein gegenläufiges Expressionsprofil auf. Nach einer Stimulation mit dem potentesten Peptid SIINFEKL nahm die Eomes-Expression zu niedrigeren Konzentrationen hin zu, mit einem Maximum bei $10^{-9} - 10^{-10}$ M. Die schwächeren Peptide, insbesondere das SIIFVEKL, führten zu einer deutlich verstärkten Eomes-Expression, die auch wieder mit abnehmender Peptidkonzentration zunahm.

Zusammengefasst ergaben sich folgende Beobachtungen: $CD8^+$ T-Zellen reagierten auf eine Stimulation mit den beiden potenteren Peptiden mit einer sehr starken Expression von IRF4 und Tbet, insbesondere bei hohen Peptidkonzentrationen. SIIVFEKL induzierte nur eine schwache IRF4-Expression, dagegen jedoch eine stärkere Eomes-Expression. Die Ergebnisse zu IRF4 bestätigen und erweitern kürzlich publizierte Ergebnisse mehrerer Arbeitsgruppen, die zeigten, dass die IRF4-Expression direkt mit der Stärke des T-Zellrezeptor-Signals korreliert {Man *et al.* 2013, Nayar *et al.* 2014}. Tbet und Eomes sind in $CD8^+$ T-Zellen an der Differenzierung von Effektor und Memory-Zellen beteiligt. Eine hohe Tbet-Expression korreliert mit der Reifung zu Effektorzellen, während eine hohe Eomes-Expression mit einer Memory-Zellentwicklung assoziiert ist {Intlekofer *et al.* 2005, Joshi *et al.* 2007, Kaech *et al.* 2012}. Anhand unserer Ergebnisse könnte man postulieren, dass eine hohe Antigenkonzentration zu Beginn einer Infektion zu einer bevorzugten Bildung von Effektorzellen führt. Nimmt die Antigenkonzentration im Verlauf der Immunantwort ab, hat dies eine höhere Eomes-Expression und dadurch eine verstärkte Memory-Zelldifferenzierung zur Folge.

In Arbeiten wie von Raczkowski *et al.* wurde die Vermutung aufgestellt, dass die Expression von IRF4 in $CD8^+$ T-Zellen durch Entzündungszytokine beeinflusst werden könnte {Raczkowski *et al.* 2013}. In der hier vorliegenden Arbeit wurde deshalb der Einfluss von IL-12 und IFN- α auf die IRF4-Expression untersucht. Zusätzlich wurde die IRF4-Expression in STAT3-defizienten $CD8^+$ T-Zellen analysiert, in denen die Wirkung verschiedener Zytokine, insbesondere von IL-6 und IL-21, blockiert ist.

Wildtyp- und IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen wurden mit anti-CD3 mAk und jeweils einem Entzündungszytokin – IL-12 oder IFN- α – zwei Tage lang inkubiert. In einer zweiten Serie von Experimenten wurden STAT3-defiziente CD8⁺ T-Zellen mit anti-CD3 mAk und zusätzlich mit anti-CD28 mAk und IL-2 stimuliert und mit entsprechend stimulierten Wildtyp- und IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen verglichen.

Das IL-12-Signal verursachte in Kombination mit dem starken TZR Stimulus durch den anti-CD3 mAk eine deutliche Expressionserhöhung von IRF4. IFN- α dagegen hatte keinen Einfluss auf IRF4, jedoch eine modulierende Wirkung auf andere untersuchte Transkriptionsfaktoren, auf die unten näher eingegangen wird. Die STAT3-Defizienz, die durch die Verwendung von Zellen einer CD4 Cre⁺ \times Stat3^{flox/flox} Maus erreicht wurde, hatte interessanterweise an den frühen Tagen der Stimulation keinen Einfluss auf die IRF4-Expression. Dafür bewirkte das Fehlen von STAT3 an Tag 4, also zu einem Zeitpunkt, an dem unter anderen Stimulationsbedingungen nur eine geringe Expression messbar war, eine deutliche IRF4-Expression. STAT-3 ist an der Signaltransduktion zahlreicher Zytokine beteiligt, darunter befinden sich proinflammatorische Zytokine wie IL-6 oder IL-21, aber auch hemmende Zytokine wie IL-10 {Wehinger *et al.* 1996, Riley *et al.* 1999}. Die erhöhte IRF4-Expression in STAT3-defizienten Zellen könnte daher an einer verminderten Wirkung von hemmenden Zytokinen liegen. Dies müsste aber in Studien, in denen die Zytokine gezielt gehemmt werden, bestätigt werden.

Insgesamt sind die Ergebnisse zur IRF4-Expression bei diesen Experimenten aber mit Vorbehalt zu bewerten. Im Verlauf des Projekts zeigte sich, dass die Antikörperfärbung von IRF4, im Vergleich etwa zur gut reproduzierenden Färbung von Tbet oder Eomes, häufig einen deutlichen Hintergrund hatte. Dieser Hintergrund zeigte sich insbesondere in den Färbungen der IRF4^{-/-} Zellen, die bei starker TZR-Stimulation in einigen Experimenten deutlich positiv waren. Dieses könnte als Ursache eine zusätzliche Bindung des Antikörpers an ein verwandtes Molekül, wie IRF8, oder an andere strukturell ähnliche Proteine in aktivierten T-Zellen haben. Weiterhin ist zu beachten, dass bei der Herstellung der defizienten Maus, aus dem IRF4-Gen nur die Exons, die für die N-terminale DNA-Bindungsdomäne kodieren, entfernt wurden {Mittrücker 1997}. Da der Antikörper ein C-terminales Epitop erkennt, könnte es sein, dass ein Restprotein, ohne die Bindungsdomäne, erkannt wird. Für eine Bestätigung der Aussagen zur IRF4-Expression wären daher zusätzliche Experimente, z.B. eine mRNA Analyse durch eine quantitative RT-PCR oder einen Western-Blot, sinnvoll.

5.2 Die Rolle von IRF4 in der Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen

Die Experimente, in denen eine Zellstimulation durch Peptide wie SIINFEKL oder durch anti-CD3 mAk durchgeführt wurde, zeigten einen Einfluss von IRF4 auf die Expression des IL-2R α (CD25) und auf die Blastentransformation der CD8⁺ T-Zellen. Bei Abwesenheit von IRF4 exprimierten CD8⁺ T-Zellen deutlich geringere Mengen an CD25, sie zeigten eine verringerte Blastentransformation und auch ihre Anzahl war im Verlauf der Stimulation stets geringer als die der Wildtypzellen. Diese Beobachtungen deckten sich weitgehend mit den publizierten Ergebnissen von Raczkowski *et al.* {Raczkowski *et al.* 2013}. Eine Erklärung wäre, dass IRF4 direkt an der Induktion von CD25 in aktivierten CD8⁺ T-Zellen beteiligt ist. Kurachi und Kollegen konnten tatsächlich nachweisen, dass IRF4 im Komplex mit BATF und JUN-Proteinen in einer regulatorischen Region des *Il2r-alpha*-Gens bindet {Kurachi *et al.* 2014}. Da die Expression von CD25 auch durch IL-2 selbst indiziert wird könnte weiterhin eine geringere IL-2 Produktion der IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen für die niedrigere CD25-Expression verantwortlich sein.

Eine mögliche Erklärung für die verringerte Blastentransformation der IRF4-defizienten CD8⁺ T-Zellen wäre der Einfluss von IRF4 auf den globalen Zellmetabolismus. In Arbeiten von Mak *et al.* oder Chang *et al.* ist beschrieben, dass Effektor T-Zellen im Gegensatz zu naiven T-Zellen oder Memory T-Zellen einen deutlich veränderten Stoffwechsel aufweisen {Mak *et al.* 2013, Chang *et al.* 2014}. Naive und Memory T-Zellen gewinnen ihre Energie überwiegend durch oxidative Phosphorylierung und Oxidation von Fettsäuren. Die Aktivierung von T-Zellen führt zu einer Umstellung des Stoffwechsels, die als auch Warburg-Effekt bezeichnet wird. Effektor T-Zellen haben eine deutlich höhere Glykolyserate, dabei handelt es sich um eine aerobe Glykolyse. Die höhere Glykolyserate ist nicht nur relevant für den Energiestoffwechsel, verbunden mit einer erhöhten Aufnahme von Glukose und Aminosäuren, ist sie auch wichtig für die Bereitstellung von Bausteinen für die Synthese von Proteinen, DNA und Membranbestandteilen. Diese Veränderungen im Stoffwechsel sind daher eine Voraussetzung für die starke Proliferation und die Produktion von Effektorproteinen, wie z.B. von Zytokinen oder zytolytischen Proteinen. Eine zentrale Rolle in der Stoffwechselkontrolle hat der mTOR-Signalweg. Die Aktivität von mTOR wird zum einen über den Energiestatus der Zelle reguliert, zum anderen führt die Stimulation der Zelle durch den TZR oder durch bestimmte Zytokine ebenfalls zu einer verstärkten mTOR-

Aktivität. mTOR aktiviert unter Anderem den Transkriptionsfaktor HIF-1 α . Dieser Faktor steuert einerseits die Expression zahlreicher Glykolyseenzyme und kann zum anderen die Expression von Molekülen wie IFN- γ oder Granzyme B begünstigen {Doedens *et al.* 2013}. Die IRF4-Expression wird direkt durch TZR-Signale aktiviert, kürzlich konnte aber gezeigt werden, dass mTOR die IRF4-Expression verstärkt {Matsuyama *et al.* 1996, Yao *et al.* 2013}. Interessanterweise kontrolliert IRF4 sowohl die Expression von HIF-1 α als auch direkt die Expression von verschiedenen Glykolyseenzymen und Glukosetransportern. IRF4 hat daher eine zentrale Stelle in der Umstellung des Stoffwechsels nach der Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen {Man *et al.* 2013, Man und Kallies 2015}. Die Induktion dieser Gene erfolgt in den meisten Fällen in Kooperation mit dem Transkriptionsfaktor BATF. Beide Faktoren werden durch die Aktivierung des TZR induziert.

Die zentrale Wirkung von IRF4 und BATF bei der Kontrolle des Metabolismus erklären die verminderte Blastentransformation in den IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen. Eine Umstellung des Stoffwechsels kann zwar über mTOR und HIF-1 α auch unabhängig von IRF4 stattfinden, für eine dauerhafte Anpassung des Stoffwechsels an den Bedarf von proliferierenden Effektorzellen ist aber wahrscheinlich die Wirkung von IRF4 und BATF essentiell. Ein solches Szenario würde auch erklären, dass IRF4^{-/-} T-Zellen zwar eine initiale Aktivierung und Proliferation zeigen, diese aber nicht aufrechterhalten können. Daher ist auch die Hypothese, dass der Mangel an funktionalen Effektorzellen in IRF4^{-/-} Mäusen an ihrer mangelnden Fähigkeit die gesteigerte Glykolyse aufrecht zu erhalten liegen könnte, schlüssig {Raczkowski *et al.* 2013, Grusdat *et al.* 2014, Man *et al.* 2013, Yao *et al.* 2013, Nayar *et al.* 2012, Nayar *et al.* 2014}.

5.3 Auswirkungen des Fehlens von IRF4 auf CD8⁺ T-Zellen

In CD8⁺ T-Zellen wurden im Rahmen dieser Arbeit neben IRF4 weitere Transkriptionsfaktoren untersucht, die für ihre Differenzierung zu Effektorzellen eine wichtige Rolle spielen. Die betrachteten Faktoren waren die T-box-Proteine Eomes und Tbet sowie BATF und BCL-6. Publierte Ergebnisse von unter anderem Grusdat *et al.* und Nayar *et al.* beschreiben ein Zusammenwirken dieser Transkriptionsfaktoren mit IRF4 {Grusdat *et al.* 2014, Nayar *et al.* 2012, Nayar *et al.* 2014}. Die Proteine interagieren entweder direkt mit IRF4 oder wirken in Kooperation mit IRF4 im Rahmen der Effektorzellendifferenzierung. Die

Expression von einem Teil dieser Transkriptionsfaktoren wird auch direkt durch IRF4 reguliert. In den Experimenten dieser Arbeit wurden die jeweiligen Expressionsmuster der Transkriptionsfaktoren in Abhängigkeit von IRF4 näher untersucht.

Eomes ist einer der entscheidenden Transkriptionsfaktoren bei der Reifung von CD8⁺ Memory T-Zellen {Intlekofer *et al.* 2005}. Die Expression von Eomes ist abhängig von einer TZR-Stimulation. In dieser Arbeit wurden Ergebnisse von Raczkowski *et al.* und anderen Autoren wie Nayar *et al.* bestätigt {Raczkowski *et al.* 2013, Nayar *et al.* 2012, Nayar *et al.* 2014}. In unseren Experimenten wurde Eomes abhängig von der TZR-Stärke exprimiert. Bei starker Stimulation z.B. durch hohe Konzentration des stark agonistischen SIINFEKL-Peptids war die Expression gering, bei abnehmender Konzentration stieg die Expression proportional an und die schwächer agonistischen Peptide (SIIQFEKL und vor allem SIIVFEKL) induzierten eine stärkere Eomes-Expression. Hierbei war auch eine zeitabhängige Komponente der Expression zu beobachten. Am Tag 1 der Stimulation korrelierte die Eomes-Expression mit der Stärke der TZR-Stimulation. Am zweiten Tag war die Expressionsstärke weitgehend unabhängig von der Peptidkonzentration. Interessanterweise hatten die IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen fast durchgängig eine stärkere Eomes-Expression als die Wildtypzellen. Selbst bei sehr starker TZR-Stimulation wurde Eomes sehr hoch exprimiert. Die Expression entsprach in etwa der Expression von Wildtypzellen bei einer sehr schwachen TZR-Stimulation, zum Beispiel bei sehr niedrigen Peptidkonzentrationen.

Eine Erklärung für das Expressionsverhalten von Eomes wäre eine partielle Hemmung seiner Expression durch IRF4. In unseren und in publizierten Daten zeigen Eomes und IRF4 unter allen getesteten Bedingungen eine negative Korrelation in aktivierten CD8⁺ T-Zellen. Bei starker IRF4-Expression ist die Eomes-Expression niedrig und vice versa. Ein Fehlen von IRF4 könnte eine verminderte Hemmung der Eomes-Expression zur Folge haben. Eine stärkere Expression von Eomes in IRF4- und BATF-defizienten CD8⁺ T-Zellen wurde auch in anderen Studien beobachtet. Interessanterweise konnte aber eine Bindung von IRF4 im *Eomes*-Gen bisher noch nicht nachgewiesen werden. Es ist daher unklar ob IRF4 die Eomes-Expression direkt hemmt {Kurachi *et al.* 2014, Man *et al.* 2013, Nayar *et al.* 2012 und 2014}. Tbet ist ein seit langem bekannter Aktivator der Effektorzellreifung in CD8⁺ T-Zellen und TH1-Zellen {Kaech und Wherry 2007, Joshi *et al.* 2007, Kaech und Cui 2012}. Unsere Untersuchungen ergaben, dass das Tbet-Expressionsmuster dem IRF4-Expressionsmuster ähnelt. Nach Inkubation mit verschiedenen Peptidkonzentrationen korrelierte die Tbet-

Expression an Tag 1 der Stimulation mit der Stimulationsstärke, an den Folgetagen jedoch entsprach die Expression einem Alles-oder-Nichts Prinzip. Bereits bei schwacher T-Zellaktivierung fand eine maximale Tbet-Expression statt. In IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen war in den *in vitro* Kulturen kein Unterschied in der Tbet-Expression im Vergleich zu den Wildtyp CD8⁺ T-Zellen vorhanden. Interessanterweise zeigten die *in vivo* Experimente jedoch eine deutliche Verminderung der Tbet-Expression in aktivierten IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen. Eine mögliche Erklärung wären Faktoren im lebenden Organismus, die in Zellkulturen fehlen. Die Analyse des Einflusses von Entzündungsmediatoren auf die Expression von IRF4 ergab eine Verstärkung der durch den TZR-induzierten Tbet-Expression durch die Zugabe von IL-12. Die Tbet-Expression stieg hierbei an, vergleichbar mit IRF4. Gegenläufig dazu sank die Eomes-Expression der CD8⁺ T-Zellen bei der Zugabe von IL-12.

Eine Aktivierung von naiven CD8⁺ T-Zellen führt zur Expression von sowohl Eomes als auch Tbet und beide Transkriptionsfaktoren sind für frühe Differenzierungsschritte notwendig. In der späteren Phase der Aktivierung korreliert aber eine hohe Tbet-Expression mit der Differenzierung zu Effektorzellen, während eine hohe Eomes-Expression mit Memoryzellen assoziiert ist {Intlekofer *et al.* 2005, Joshi *et al.* 2011}. Unsere Ergebnisse zeigen, dass ein TZR-Signal in Kooperation mit Entzündungsmediatoren wie IL-12 IRF4 induziert, welches dann wahrscheinlich die Tbet-Expression direkt aktiviert. {Intlekofer *et al.* 2007, Joshi *et al.* 2007 und 2011}. Gleichzeitig supprimiert IRF4 die Eomes-Expression, was zu einer Unterdrückung der Differenzierung zu Memory-Zellen führen könnte. Die IRF4-Expressionsstärke ist daher entscheidend für die Richtung der CD8⁺ T-Zelldifferenzierung.

Der Transkriptionsfaktor BATF ist ein Interaktionspartner von IRF4. IRF4 und BATF binden im Komplex mit einem Protein der Jun-Familie an ein definiertes DNA-Motiv - AICE (*activating protein 1 (AP-1)-IRF composite element*) - in regulatorischen Regionen von Genen {Peng *et al.* 2012, Li *et al.* 2012}. In CD8⁺ T-Zellen reguliert dieser Transkriptionsfaktorkomplex die Effektorzellreifung. Da der Komplex überwiegend in Enhancer-Regionen und nicht in den Promotoren bindet, wurde eine „Pionier-Funktion“ für den Komplex postuliert. Das bedeutet, dass der Komplex an Kontrollregionen vieler Gene bindet und mittels noch nicht vollständig geklärter Prozesse Transkriptionsvorgänge steuert {Ciofani *et al.* 2012, Kurachi *et al.* 2014, Grusdat *et al.* 2014}. In den Experimenten dieser Arbeit wurde die BATF-Expression bei IRF4-Defizienz *in vitro* und *in vivo* untersucht.

In vitro ergaben sich dabei keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen. Interessanterweise zeigte sich jedoch *in vivo* eine stärkere BATF-Expression in IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen als in den Wildtypzellen. Dies würde bedeuten, dass die BATF-Expression direkt oder indirekt über IRF4 gesteuert wird. Es stellt sich aber die Frage in welchem Umfang BATF ohne IRF4 in CD8⁺ T-Zellen aktiv ist. Ciofani *et al.* konnten für TH17-Zellen zeigen, dass IRF4 und BATF in den untersuchten Genen überwiegend kooperativ binden, was bedeuten könnte, dass BATF ohne IRF4 wahrscheinlich nicht aktiv ist {Ciofani *et al.* 2012}. Da IRF4^{-/-} und BATF^{-/-} Tiere einen ähnlichen Defekt der CD8⁺ T-Zellantwort zeigen, ist auch von einer engen Kooperation von BATF und IRF4 in CD8⁺ T-Zellen auszugehen. In B-Zellen sind Stärke und Kinetik der IRF4 Expression entscheidend für die Differenzierung der Zellen im Keimzentrum. Als Erklärung wurde postuliert, dass IRF4 abhängig vom Interaktionspartner mit verschiedenen Affinitäten an die DNA bindet. Dies bedeutet, dass bei hohen Konzentrationen von IRF4 auch Komplexe entstehen können, die niedrig affin an DNA binden {Ochiai *et al.* 2013}. Die Folge ist, dass bei einer hohen IRF4-Konzentration ein anderes Expressionsprofil als bei niedrigen Konzentrationen induziert wird. In diesem Kontext wäre es interessant zu sehen, welche Gene IRF4 zusammen mit BATF bzw. unabhängig von BATF in CD8⁺ T-Zellen reguliert. Der Transkriptionsfaktor BCL-6 treibt die Differenzierung von aktivierten CD8⁺ T-Zellen zu Memory-Zellen voran. Hierbei ist BCL-6 ein direkter Antagonist des Transkriptionsfaktors BLIMP-1, welcher die Effektorzellreifung unterstützt. In B-Zellen bewirkt BCL-6 einen Verbleib dieser Zellen in den Keimzentren von sekundären Lymphgeweben, während BLIMP-1 eine Differenzierung zu Plasmazellen begünstigt {Klein *et al.* 2006}. BLIMP-1 wird in B-Zellen direkt durch IRF4 induziert. Für CD8⁺ T-Zellen wurde durch Raczkowski *et al.* ebenfalls eine direkte Induktion von BLIMP-1 durch IRF4 nachgewiesen {Raczkowski *et al.* 2013}. IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen zeichnen sich durch eine deutlich reduziertere BLIMP-1 Expression und eine verstärkte BCL-6 Expression auf mRNA-Ebene aus. Eine veränderte BCL-6-Expression konnte von weiteren Arbeitsgruppen in IRF4-defizienten und auch in BATF-defizienten CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden {Raczkowski *et al.* 2013, Ise *et al.* 2011}. Interessanterweise sahen wir in FACS-Analysen in unseren *in vivo* Transfereperimenten aber eine reduzierte BCL-6 Expression in IRF4-defizienten CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu Wildtyp CD8⁺ T-Zellen. Der Grund für das sich widersprechende Expressionsprofil ist unklar. Eine Erklärung könnte ein Unterschied in der untersuchten Zellpopulation sein. Weiterhin ist zu bedenken, dass in den

publizierten Studien die mRNA-Expression und in unserer Studie die Proteinexpression analysiert wurde.

Die mRNA-Expression muss aber nicht mit der Proteinexpression übereinstimmen. Um eine genauere Aussage über die BCL-6 Expression treffen zu können, sollten mRNA und Proteinexpression parallel untersucht werden, eventuell sollten die FACS-Analysen durch eine alternative Methode, wie z.B. ein Western Blot, validiert werden.

5.4 Ausblick

Mit dieser Arbeit sollte erforscht werden, welche Faktoren die IRF4-Expression und in der Folge die CD8⁺ T-Zelldifferenzierung zu Effektorzellen beeinflussen. Wir konnten zeigen, dass die Expression von IRF4 durch die Stärke des TZR-Signals und durch das inflammatorische Zytokin IL-12 kontrolliert wird. IRF4 reguliert dann die Transkriptionsfaktoren Tbet, Eomes und BCL-6, die eine zentrale Rolle in der Differenzierung von CD8⁺ T-Zellen spielen. Die Ergebnisse beruhen zum größten Teil auf *in vitro*-Experimenten, ein Teil der Daten konnte aber bereits *in vivo*, im *Listeria monocytogenes*-Infektionsmodell bestätigt werden.

Aus unseren Beobachtungen ergeben sich interessante Fragen. Bislang wurden bei der Untersuchung der IRF4-Funktion hauptsächlich Mausmodelle einer akuten Infektion verwendet, wie z.B. das *Lm*-Infektionsmodell, das akute LCMV-Modell (Lymphozytäres Choriomeningitis Virus) oder das Influenza A Virus-Modell {Huber *et al.* 2013, Raczkowski *et al.* 2013, Grusdat *et al.* 2013 und Man *et al.* 2013}. Neben der Immunantwort während akuter Infektionen wäre es jedoch sehr interessant zu erforschen, welche Rolle IRF4 in der chronischen Infektion einnimmt, gerade auch im Hinblick auf die chronische TZR-Stimulation und das chronische Entzündungsumfeld, die eine kontinuierliche IRF4-Expression induzieren sollten. IRF4-defiziente Mäuse sind in der Lage, CD8⁺ T-Zellen mit einem Memory-Phänotyp zu bilden, die jedoch bislang noch nicht eingehend auf ihre Funktionalität hin untersucht wurden {Raczkowski *et al.* 2013}. Dies wäre ein Ziel für weitere IRF4-Forschung in Mausmodellen. In humanen Studien liegt der Schwerpunkt der Arbeiten zu IRF4 auf seiner Wirkung in Tumoren. IRF4 ist ein wichtiger Faktor für die Lymphomentstehung beziehungsweise ein Überlebensfaktoren dieser Zellen.

Bei der Behandlung des Plasmozytoms oder Multiplen Myeloms werden bereits Thalidomid oder Thalidomid-Derivate eingesetzt, deren Wirkung zum Teil auf einer Hemmung der IRF4-Expression beruht {Larkin 1999, Dimopoulos *et al.* 2007, Li *et al.* 2011, Zhu *et al.* 2013, Zhu *et al.* 2014}. IRF4 könnte auch für T-Zellmalignome ein potentiell Therapietarget sein. Im Gegensatz zur Wirkung von IRF4 in Lymphomen gibt es bisher kaum publizierte Daten zur Funktion von IRF4 in T-Zell-vermittelten Erkrankungen des Menschen, zum Beispiel Autoimmunerkrankungen. Ein wichtige Frage wäre hier, ob und in welchem Umfang T-Zellen in Autoimmunantworten aber auch in Antworten gegen Krankheitserreger IRF4 exprimieren, und ob das Expressionsprofil Prognosen zur Schwere und zum Verlauf der Erkrankung erlaubt.

6. Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor *Interferon Regulatory factor 4*, IRF4, nimmt eine zentrale Rolle bei der Regulation der Differenzierung von CD8⁺ T-Zellen zu Effektorzellen ein. Die Expression von IRF4 führt zu einer Induktion weiterer Transkriptionsfaktoren wie Tbet, die eine Effektorzellendifferenzierung von CD8⁺ T-Zellen vorantreiben. IRF4 wird durch eine Stimulation des T-Zellrezeptors induziert. Unklar war aber wie sich Veränderungen der Stärke des TZR-Signals auf die IRF4-Expression auswirken. Außerdem war nicht bekannt, ob auch andere extrazelluläre Faktoren wie Entzündungszytokine eine Rolle für die IRF4-Expression spielen. Aufgrund von Vorarbeiten wurde die Hypothese erstellt, dass die IRF4-Expression sowohl von der Stärke der TZR-Aktivierung als auch von einem Entzündungsmilieu abhängig ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurden in Zellkulturen Ovalbumin-spezifische Wildtyp CD8⁺ T-Zellen sowie IRF4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen mit unterschiedlichen Ovalbuminpeptiden stimuliert. Die Stärke des TZR-Signals wurde sowohl durch die Verwendung von unterschiedlichen Peptidkonzentrationen als auch den Einsatz von stark und schwach agonistischen Peptidderivaten variiert. Die Ergebnisse dieser Experimente zeigten, dass die initiale IRF4-Expression direkt mit der Stärke des TZR-Signals korrelierte. Zu späteren Zeitpunkten zeigten dann alle aktivierten CD8⁺ T-Zellen eine starke IRF4-Expression. Desweiteren fand eine Analyse des Einflusses von Zytokinen auf die IRF4-Expression in über den TZR stimulierten CD8⁺ T-Zellen statt. Hier konnten wir zeigen, dass IL-12 eine Steigerung der IRF4-Expression bewirkt. Zusätzlich zu IRF4 wurden auch die Transkriptionsfaktoren Tbet, Eomes, BATF und BCL-6 untersucht, die an der Differenzierung von CD8⁺ T-Zellen beteiligt sind. Wir konnten nachweisen, dass IRF4 und Tbet parallel exprimiert werden, während die Eomes-Expression gegenläufig zum IRF4-Expressionsprofil ist. Unsere Analysen ergaben, dass BATF und BCL-6 in IRF4-defizienten CD8⁺ T-Zellen schwächer exprimiert werden, was auf einen Defekt der Differenzierung dieser Zellen hindeutet. IRF4-defiziente Zellen zeigten außerdem eine geringere Aktivierbarkeit und eine verminderte Blastenbildung.

Zusammengefasst konnten wir Folgendes feststellen: IRF4 ist ein Transkriptionsfaktor, der einen entscheidenden Einfluss auf die Differenzierung der CD8⁺ Effektor T-Zellen hat. Seine Expression wird hauptsächlich über die Stärke des TZR-Signals gesteuert und durch inflammatorische Zytokine moduliert.

7. Abstract

The transcription factor IRF4 plays a central role for the regulation of the CD8⁺ T cell differentiation into effector cells. The expression of IRF4 enhances the induction of further transcription factors such as Tbet, which support the differentiation of effector T cells. IRF4 is induced by signals from the TCR. However, it was not known how variation of the strength of the TCR signalling can influence IRF4 expression. Furthermore, it was unclear whether other extracellular signals, such as inflammatory cytokines, control IRF4 induction. Therefore, we proposed the hypothesis that IRF4 expression depends on the strength of TCR activation as well as signals from an inflammatory milieu. For this study, we used ovalbumin specific wild type and IRF4^{-/-} CD8⁺ T cells, which were stimulated with ovalbumin-peptides. We varied the strength of the TCR signal by using different concentrations of the original peptide as well as peptide derivatives with lower agonistic potencies. Our results showed that the initial IRF4 expression directly correlates with the strength of the TCR signal. At later time points, all highly activated CD8⁺ T cells showed high IRF4 expression. In CD8⁺ T cells stimulated by the TCR, the influence of cytokines on the expression of IRF4 was analysed. In these assays, IL-12 increased the IRF4 expression. In addition to IRF4, we determined the expression of the transcription factors Tbet, Eomes, BATF and BCL-6 which play an important role during CD8⁺ T cell differentiation. We could demonstrate that there was co-expression of IRF4 and Tbet, whereas Eomes showed an inverse expression pattern. BATF and BCL-6 expression were impaired in IRF4-deficient cells pointing to a maturation defect of these cells. Finally, IRF4^{-/-} CD8⁺ T cells also showed reduced upregulation of activation markers and reduced blast transformation when compared with wild type CD8⁺ T cells.

In conclusion, the study identifies IRF4 as a transcription factor that has a crucial influence on the differentiation of CD8⁺ effector T cells. Its expression is primarily controlled by the strength of the TCR signal and is modulated by inflammatory cytokines.

I. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schema der Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i>	15
Abb. 2: Beispiel für eine verwendete Gatingstrategie.....	31
Abb. 3: Untersuchung von Lymphozytenpopulationen nach <i>in vitro</i> Stimulation	34
Abb. 4: IRF4-Expression in Abhängigkeit vom eingesetzten Stimulus.....	35
Abb. 5: Vergleich der Expression von IRF4, Eomes und Tbet in CD8 ⁺ T-Zellen, CD4 ⁺ T-Zellen und CD19 ⁺ B-Zellen.....	37
Abb. 6: Anteil der CD8 ⁺ T-Zellen; Vergleich zwischen WT und IRF4 ^{-/-}	40
Abb. 7: IRF4-Expression von CD8 ⁺ T-Zellen an Tag 1 und 2 bei Stimulation.....	42
Abb. 8: Eomes-Expression von CD8 ⁺ T-Zellen an Tag 1 und 2 bei Stimulation.....	44
Abb. 9: Tbet-Expression von CD8 ⁺ T-Zellen an Tag 1 und 2 bei Stimulation.....	46
Abb. 10: Vergleich der IRF4-Expression bei Stimulation mit unterschiedlichen Peptiden an Tag 1 nach Stimulation.....	48
Abb. 11: Vergleich der Eomes-Expression bei Stimulation mit unterschiedlichen Peptiden an Tag 1 nach Stimulation.....	49
Abb. 12: Vergleich der Tbet-Expression bei Stimulation mit unterschiedlichen Peptiden an Tag 1 nach Stimulation.....	50
Abb. 13: Vergleich der IRF4-Expression bei Stimulation mit unterschiedlichen Peptiden an Tag 2 nach Stimulation.....	51
Abb. 14: Vergleich der Eomes-Expression bei Stimulation mit unterschiedlichen Peptiden an Tag 2 nach Stimulation.....	52
Abb. 15: Vergleich der Tbet-Expression bei Stimulation mit unterschiedlichen Peptiden an Tag 2 nach Stimulation.....	53
Abb. 16: Zahl der CD8 ⁺ T-Zellen; Vergleich zwischen WT und IRF4 ^{-/-}	55
Abb. 17: CD25-Expression von CD8 ⁺ T-Zellen; Vergleich zwischen WT und IRF4 ^{-/-}	56

Abb. 18: Expression von IRF4 in CD8 ⁺ T-Zellen.....	57
Abb. 19: Eomes-Expression von CD8 ⁺ T-Zellen; Vergleich zwischen WT und IRF4 ^{-/-}	58
Abb. 20: Tbet-Expression von CD8 ⁺ T-Zellen; Vergleich zwischen WT und IRF4 ^{-/-}	59
Abb. 21: Untersuchung von Zellzahlen nach Stimulation.....	61
Abb. 22: Untersuchung von Zellgrößen nach Stimulation	62
Abb. 23: CD25-Expression nach Stimulation.....	63
Abb. 24: IRF4-Expression nach Stimulation.....	65
Abb. 25: Eomes-Expression nach Stimulation.....	66
Abb. 26: Tbet-Expression nach Stimulation	67
Abb. 27: Untersuchung der Zellgröße nach Stimulation.....	69
Abb. 28: CD25-Expression nach Stimulation.....	70
Abb. 29: IRF4-Expression nach Stimulation.....	71
Abb. 30: Batf-Expression nach Stimulation.....	72
Abb. 31: Eomes-Expression nach Stimulation.....	73
Abb. 32: Tbet-Expression nach Stimulation	74
Abb. 33: IFN- γ und IL-10 Expression in CD8 ⁺ T-Zellen	76
Abb. 34: Vergleich zwischen WT und IRF4 ^{-/-} CD8 ⁺ T-Zellen im Transfermodell.....	78
Abb. 35: CD25-Expression in CD8 ⁺ T-Zellen im Transfermodell.....	79
Abb. 36: IRF4-Expression in CD8 ⁺ T-Zellen im Transfermodell.....	80
Abb. 37: Eomes-Expression in CD8 ⁺ T-Zellen im Transfermodell.....	81
Abb. 38: Tbet-Expression in CD8 ⁺ T-Zellen im Transfermodell.....	82
Abb. 39: BATF-Expression in CD8 ⁺ T-Zellen im Transfermodell.....	83
Abb. 40: BCL-6 Expression in CD8 ⁺ T-Zellen im Transfermodell.....	84

II. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Auflistung der verwendeten Fluorochrom-markierten Antikörper.....	20
Tab. 2: Auflistung der verwendeten unkonjugierten Antikörper	21
Tab. 3: Auflistung der verwendeten Isotypkontrollen.....	21

III. Abkürzungsverzeichnis

ActA	Actin assembly-inducing protein
AICE	AP-1-IRF composite elements
AP-1	<i>activator protein 1</i>
APZ	Antigen präsentierende Zelle
BATF	B cell activating transcription factor
BCL	<i>B cell lymphoma</i>
BLIMP1	B lymphocyte activation protein 1
BSA	Bovines Serumalbumin
Cre/lox	<i>cyclization recombination/ Lox-site</i>
CFU	<i>colony forming units</i>
DZ	dendritische Zelle
EICE	<i>Ets-IRF composite elements</i>
Eomes	Eomesodermin; <i>T brain protein 2</i>
Ets	E-twenty six
FACS	fluorescence activated cell sorting
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FSC	<i>forward scatter</i>
FoxP3	<i>Forkhead-Box Protein 3</i>
ICS	<i>interferon consensus sequence</i>

IFN	Interferon
IL	Interleukin
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
ISRE	IFN-stimulated response element
KLRG-1	killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1
LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitis Virus
LK	Lymphknoten
LLO	Listeriolysin O
Lm	<i>Listeria monocytogenes</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MHC	major histocompatibility complex
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
mTOR	mammalian activator of rapamycin
MUM 1	multiple Myelom-Onkogen 1 (= IRF4)
NFκB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
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>
p.i.	post infectionem

SSC	<i>side scatter</i>
STAT	Signal transducer and activator of transcription
Tbet	T-Box transcription factor Tbx21
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TH	T-Helferzellen
Treg	regulatorische T-Zellen
TZR	Zellrezeptor
WT	Wildtyp

IV. Literaturverzeichnis

Akbari M *et al.* (2014). IRF4 in dendritic cells inhibits IL-12 production and controls Th1 immune responses against *Leishmania major*. *J Immunol.* 192: 2271-2279.

Akira S (2000). Roles of STAT3 defined by tissue-specific gene targeting. *Oncogene.* 19:2607-2611.

Bártová E *et al.* (2008). Histone Modifications and Nuclear Architecture: A Review. *J Histochem Cytochem.* 56:711-721.

Bode JG *et al.* (2012). The macrophage response towards LPS and its control through the p38MAPK–STAT3 axis. *Cellular Signalling.* 1185–1194.

Bollig N *et al.* (2012). Transcription factor IRF4 determines germinal center formation through follicular T-helper cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109: 8664–8669.

Buggert M *et al.* (2014). T-bet and Eomes are differentially linked to the exhausted phenotype of CD8+ T cells in HIV infection. *PLoS Pathog.* 10: e1004251

Callard R E *et al.* (2007). Decision-making by the immune response. *Immunol Cell Biol.* 85: 300–305

Chang JT *et al.* (2014). Molecular regulation of effector and memory T cell differentiation. *Nat Immunol.* 15:1104-1115.

Chisolm DA and Weinmann AS (2015). TCR-signaling events in cellular metabolism and specialization. *Front. Immunol.* 6 : 292

Ciofani M *et al.* (2012). A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell.* 151:289-303.

Cousens LP and Wing EJ (2000). Innate defenses in the liver during *Listeria* infection. *Immunol Rev.* 1: 150–159.

Cretney E *et al.* (2011). The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells. *Nat Immunol.* 12: 304-311.

Crotty S *et al.* (2010). Effectors and memories: Bcl-6 and Blimp-1 in T and B lymphocyte differentiation. *Nat Immunol.* 11: 114-120.

Diehl S.A. *et al.* (2008). STAT3-mediated up-regulation of BLIMP1 is coordinated with BCL6 down-regulation to control human plasma cell differentiation. *J Immunol.* 180: 4805-4815.

Dimopoulos M *et al.* (2007). Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed or refractory multiple myeloma. *N Engl J Med.* 357: 2123-2132.

Doedens AL *et al.* (2013). Hypoxia-inducible factors enhance the effector responses of CD8(+) T cells to persistent antigen. *Nat Immunol.* 14:1173-1182.

Eberharter A and Becker PB (2002). Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. *EMBO rep.* 3: 224-229.

Eguchi J *et al.* (2011). Transcriptional control of adipose lipid handling by IRF4. *Cell Metab.* 13: 249-259.

Gaffen S *et al.* (2004). Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine.* 28: 109–123.

Gaillard JL *et al.* (1991). Entry of L. monocytogenes into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from Gram-positive cocci. *Cell.* 65:1127-1141.

Gerriets V A and Rathmell J C (2012). Metabolic Pathways in T Cell Fate and Function. *Trends Immunol.* 33: 168–173.

Glasmacher E *et al.* (2012). A Genomic Regulatory Element That Directs Assembly and Function of Immune-Specific AP-1–IRF Complexes. *Science.* 338: 975-980.

Grusdat M *et al.* (2014). IRF4 and BATF are critical for CD8 T-cell function following infection with LCMV. *Cell Death Differ.* 21:1050-60.

Guo S *et al.* (2014). IRF4 is a novel mediator for neuronal survival in ischaemic stroke. *Cell Death Differ.* 21: 888–903.

Hamon M *et al.* (2006). *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nat Rev Microbiol* 4: 423-434.

Heinrich P C *et al.* (1998). Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J.* 334:297-314.

Heesch K (2013). Die Funktion des Chemokinrezeptors CXCR6 in der T-Zellantwort der Maus gegen *Listeria monocytogenes*. (publiziert unter <http://ediss.sub.uni-hamburg.de/volltexte/2013/6528/>)

Horowitz A *et al.* (2011). Activation of Natural Killer Cells during Microbial Infections. *Front Immunol.* 2: 88.

Huber J and Farrar J D (2011). Regulation of effector and memory T-cell functions by type I interferon. *Immunology.* 132: 466–474.

Huber M *et al.* (2013). IL-17A secretion by CD8⁺ T cells supports Th17-mediated autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 123: 247-260.

Huber M and Lohoff M (2013) .IRF4 provides rations for cytotoxic CD8(+) T cell soldiers. *Immunity.* 39:797-799.

Huber M and Lohoff M (2014). IRF4 at the crossroads of effector T-cell fate decision. *Eur J Immunol.* 44:1886-95.

Ichii H *et al.* (2002). Role for Bcl-6 in the generation and maintenance of memory CD8⁺ T cells. *Nat Immunol* 3: 558-563.

Ikushima H *et al.* (2013). The IRF family transcription factors at the interface of innate and adaptive immune responses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 78:105-116.

Intlekofer A.M. *et al.* (2005). Effector and memory CD8⁺ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat. Immunol.* 6: 1236–1244.

Intlekofer A M *et al.* (2007). Requirement for T-bet in the aberrant differentiation of unhelped memory CD8⁺ T cells. *J Exp Med* 204: 2015-2021.

Ise W *et al.* (2011). The transcription factor BATF controls the global regulators of class-switch recombination in both B cells and T cells. *Nat Immunol.* 12: 536-543.

Jiang DS *et al.* (2013). Role of interferon regulatory factor 4 in the regulation of pathological cardiac hypertrophy. *Hypertension.* 61:1193-1202.

Joshi N S *et al.* (2007). Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity.* 27: 281-295.

Joshi N S *et al.* (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: 4068-4076.

Kaech SM und Wherry EJ (2007). Heterogeneity and cell-fate decisions in effector and memory CD8⁺ T cell differentiation during viral infection. *Immunity.* 27: 393-405.

Kaech SM and Cui W (2012). Transcriptional control of effector and memory CD8⁺ T cell differentiation. *Nat Rev Immunol.* 12: 749–761.

Kallies A *et al.* (2009). Blimp-1 transcription factor is required for the differentiation of effector CD8(+) T cells and memory responses. *Immunity.* 31: 283-295.

Kepler S J *et al.* (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: 1774-1783.

Klein U *et al.* (2006). Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nat Immunol.* 7: 773-782.

Kolumam GA *et al.* (2005). Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *JEM.* 202: 637-650.

Kristensen DM *et al.* (2005). Cytokine signalling in embryonic stem cells. *APMIS.* 113: 756-772.

Kurachi M *et al.* (2014). The transcription factor BATF operates as an essential differentiation checkpoint in early effector CD8+ T cells. *Nat Immunol.* 15: 373-83.

Kursar M *et al.* (2002). Organ-specific CD4+ T cell response during *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol.* 168: 6382-6387.

Kuroda S *et al.* (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: 14885–14889.

Kursar M *et al.* (2002). Regulatory CD4+CD25+ T cells restrict memory CD8+ T cell responses. *J Exp Med.* 196: 1585-1592.

Kwon H *et al.* (2009). Analysis of interleukin-21-induced *Prdm1* gene regulation reveals functional cooperation of STAT3 and IRF4 transcription factors. *Immunity.* 31: 941-952.

Lambrechts A *et al.* (2008). *Listeria* comet tails: the actin-based motility machinery at work. *Trends Cell Biol.* 18: 220-227.

Lamont R F *et al.* (2011). Listeriosis in human pregnancy: a systematic review. *J Perinat Med.* 39: 227-236.

Larkin M (1999). Low-dose thalidomide seems to be effective in multiple myeloma. *Lancet*. 354: 925.

Li P *et al.* (2012). BATF-JUN is critical for IRF4-mediated transcription in T cells. *Nature*. 490: 543-546.

Li S *et al.* (2011). IMiD immunomodulatory compounds block C/EBP β translation through eIF4E down-regulation resulting in inhibition of MM. *Blood*. 117: 5157-5165.

Liao W *et al.* (2011). IL-2 Family Cytokines: New Insights into the Complex Roles of IL-2 as a Broad Regulator of T helper Cell Differentiation. *Curr Opin Immunol*. 23: 598–604.

Lischke T *et al.* (2013). CD8 β ADP-ribosylation affects CD8 T-cell function. *Eur J Immunol*. 43: 1828-1838.

Lischke T *et al.* (2014). CD38 controls the innate immune response against *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*. 81: 4091-4099.

Ling Wang *et al.* (2014). Gene Expression Profiling Identifies IRF4-Associated Molecular Signatures in Hematological Malignancies. *PLoS One*. 9: e106788.

Lohoff M *et al.* (2002). Dysregulated T helper cell differentiation in the absence of interferon regulatory factor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99: 11808-11812.

Lohoff M *et al.* (2014). Dysregulated T helper cell differentiation in the absence of interferon regulatory factor 4. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 62: 449-458.

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

MacIver NJ *et al.* (2013). Metabolic Regulation of T Lymphocytes. *Annu Rev Immunol*. 31: 259–283.

Man K *et al.* (2013). The transcription factor IRF4 is essential for TCR affinity-mediated metabolic programming and clonal expansion of T cells. *Nat Immunol.*14:1155-1165.

Man K and Kallies A (2015). Synchronizing transcriptional control of T cell metabolism and function. *Nat Rev Immunol.* 15: 574-584.

Mateus T *et al.* (2013). Listeriosis during Pregnancy: A Public Health Concern. *ISRN Obstet Gynecol.* 2013: 851712.

Matsuyama T *et al.* (1996). 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: 2127-2136.

Mittrücker HW (1997). Requirement for the transcription factor LSIRF/IRF4 for mature B and T lymphocyte function. *Science.* 275: 540-543.

Mittrücker HW *et al.* (2001). Role of CD28 for the generation and expansion of antigen-specific CD8(+) T lymphocytes during infection with *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* 167: 5620-5627.

Mittrücker HW and Kaufmann SH (2004). Mini-review: regulatory T cells and infection: suppression revisited. *Eur J Immunol.* 34: 306-312.

Mittrücker HW *et al.* (2014). Lack of microbiota reduces innate responses and enhances adaptive immunity against *Listeria monocytogenes* infection. *Eur J Immunol.* 44:1710-1715.

Murphy K *et al.* (2011). *Janeway's Immunobiology.* Garland Science, Taylor & Francis Group, New York, 8. Auflage

Murphy TL *et al.* (2013). Specificity through cooperation: BATF–IRF interactions control immune-regulatory networks. *Nat Rev Immunol.* 13: 499–509.

Nayar R *et al.* (2012). TCR signaling via Tec kinase ITK and interferon regulatory factor 4 (IRF4) regulates CD8+ T-cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:11808-11812.

Nayar R *et al.* (2014). Graded levels of IRF4 regulate CD8+ T cell differentiation and expansion, but not attrition, in response to acute virus infection. *J Immunol.* 192: 5881-5893.

Obar JJ *et al.* (2011). Pathogen-induced inflammatory environment controls effector and memory CD8+ T cell differentiation. *J Immunol.* 187: 4967–4978.

Ochiai K *et al.* (2013). Transcriptional regulation of germinal center B and plasma cell fates by dynamical control of IRF4. *Immunity.*38: 918–929.

Oestreich KJ *et al.* (2011). The lineage-defining factors T-bet and Bcl-6 collaborate to regulate Th1 gene expression patterns. *J Exp Med.* 208: 1001-1013.

Oestreich KJ *et al.* (2014). Bcl-6 directly represses the gene program of the glycolysis pathway. *Nat Immunol.* 15: 957–964.

Pamer EG (2004). Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nat Rev Immunol.* 4: 812-823.

Park HK and Ahima RS (2014). Leptin signaling. *F1000Prime Rep.* 6: 73.

Pearce E L and H Shen (2007). Generation of CD8 T cell memory is regulated by IL-12. *J Immunol.* 179: 2074-2081.

Peng L *et al.* (2012). BATF-JUN is critical for IRF4-mediated transcription in T cells. *Nature.* 490: 543–546.

Penninger JM *et al.* (1997). The interferon regulatory transcription factor IRF-1 controls positive and negative selection of CD8+ thymocytes. *Immunity.* 7: 243-254.

Prideaux S M *et al.* (2014). The Genetic Architecture of Multiple Myeloma. *Adv Hematol.* 2014: 864058.

Prlic M *et al.* (2007). Requirements for CD8 T-cell priming, memory generation and maintenance. *Curr Opin Immunol.*19: 315-319.

Raczkowski F *et al.* (2013). The transcription factor Interferon Regulatory Factor 4 is required for the generation of protective effector CD8⁺ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110: 15019-15024.

Ramsay G and Cantrell D (2015). Environmental and metabolic sensors that control T cell biology. *Front Immunol.* 6:99.

Rao RR *et al.* (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: 67-78.

Riley JK *et al.* (1999). Interleukin-10 Receptor Signaling through the JAK-STAT Pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action. *J Biol Chem.* 274: 16513-16521.

Rogatsky I *et al.* (2014). Epigenetics and the IRFs: A complex interplay in the control of immunity and autoimmunity. *Autoimmunity.* 47: 242-255.

Rutishauser R L *et al.* (2009). Transcriptional repressor Blimp-1 promotes CD8⁽⁺⁾ T cell terminal differentiation and represses the acquisition of central memory T cell properties. *Immunity.* 31: 296-308.

Schietinger A and Greenberg P D (2014). Tolerance and Exhaustion: Defining Mechanisms of T cell Dysfunction. *Trends Immunol.* 35: 51–60.

Siegel A M *et al.* (2011). A critical role for STAT3 transcription factor signaling in the development and maintenance of human T cell memory. *Immunity.* 35: 806-818.

Shaffer AL *et al.* (2008). IRF4 Addiction in Multiple Myeloma. *Nature.* 454: 226–231.

Shaffer AL *et al.* (2009). IRF4: Immunity. Malignancy! Therapy?. *Clin Cancer Res.* 15: 2954-2961.

Shi C *et al.* (2011). Ly6G⁺ Neutrophils Are Dispensable for Defense against Systemic *Listeria monocytogenes* Infection. *J Immunol.* 187: 5293-5298.

Stelekati E. *et al.* (2009). Mast cell-mediated antigen presentation regulates CD8⁺ T cell effector functions. *Immunity.* 31: 665-676.

Takemoto N *et al.* (2006). Cutting Edge: IL-12 inversely regulates T-bet and eomesodermin expression during pathogen-induced CD8⁺ T cell differentiation. *J Immunol.* 177: 7515-7519.

Tamura T *et al.* (2008). The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annu Rev Immunol.* 26: 535-584.

Tough DF (2012). Modulation of T-cell function by type I interferon. *Immunol Cell Biol.* 90: 492-497

Trautmann T *et al.* (2014). CD4⁺ T-cell help is required for effective CD8⁺ T cell-mediated resolution of acute viral hepatitis in mice. *PLoS One.* 9: e86348.

Turner AC Jr *et al.* (1994). Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell.* 77: 297-306.

Wang L *et al.* (2014). Gene Expression Profiling Identifies IRF4-Associated Molecular Signatures in Hematological Malignancies. *PLoS One.* 9: e106788.

Weake V M and Workman J L (2008). Histone Ubiquitination: Triggering Gene Activity. *Mol Cell.* 29: 653–663

Wehinger J *et al.* (1996). IL-10 induces DNA binding activity of three STAT proteins (Stat1, Stat3, and Stat5) and their distinct combinatorial assembly in the promoters of selected genes. *FEBS Lett.* 394: 365-70.

Wiesel M *et al.* (2012). Type-I IFN drives the differentiation of short-lived effector CD8⁺ T cells in vivo. *Eur J Immunol.* 42: 320-329.

Williams MA and M J Bevan (2007). Effector and memory CTL differentiation. *Annu Rev Immunol.* 25: 171-192.

Wherry E J (2011). T cell exhaustion. *Nat Immunol.* 12: 492-499.

Wong P and Pamer EG (2003). CD8 T cell responses to infectious pathogens. *Annu Rev Immunol.* 21: 29–70

Xu WD *et al.* (2012). Targeting IRF4 in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 11: 918-924.

Yao S *et al.* (2013). Interferon regulatory factor 4 sustains CD8(+) T cell expansion and effector differentiation. *Immunity.* 39: 833-845.

Zhang R *et al.* (2012). Regulation of T helper cell differentiation by interferon regulatory factor family members. *Immunol Res.* 54:169-176.

Zhang Y and Reinberg D (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.*15: 2343-2360.

Zhu YX *et al.* (2013). Molecular mechanism of action of immune-modulatory drugs thalidomide, lenalidomide and pomalidomide in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma.* 54: 683-687.

Zhu YX *et al.* (2014). Identification of cereblon-binding proteins and relationship with response and survival after IMiDs in multiple myeloma. *Blood.* 124: 536-545.

V. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinem Doktorvater, Professor Dr. Mittrücker dafür danken, dass er mich kompletten Laborneuling unter seine Fittiche genommen und mich bei jeder Phase meiner Arbeit tatkräftig unterstützt hat, sowie zum selbstständigen wissenschaftlichen Arbeiten ermuntert hat. Seine Betreuung, vor allem sein stets geduldiges Korrekturlesen trotz so mancher verbesserungswürdiger Stellen dieses Schriftstücks, war großartig.

Desweiteren gilt mein Dank der AG Mittrücker, die mir bei meiner Arbeit trotz so mancher Schwierigkeiten aktiv geholfen haben und die Geduld hatten, mir einige Dinge (FACS) auch doppelt und dreifach zu erklären. Vor allem Valéa war stets eine große Stütze für mich und ich wäre ohne sie vor allem zu Beginn meiner Arbeit sicher verzweifelt.

Privatdozent Dr. Steinmetz danke ich für die freundliche Bereitstellung der STAT3^{fllox/fllox} Mäuse. Außerdem danke ich Professor Dr. Tiegs und Dr. Erhardt für die freundliche Bereitstellung der IL-6^{-/-} Mäuse.

Bei allen Mitgliedern des Forschungslabors des Instituts für Immunologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf bedanke ich mich weiterhin für die gute Betreuung, Hilfe, die schöne Atmosphäre im Labor und insgesamt die gute Zeit, die ich im Rahmen meiner Arbeit dort verbringen durfte.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Familie, meinen Eltern und meinen Freunden, die mich während der gesamten Zeit unterstützt und zeitweise auch ausgehalten haben. Dies gilt besonders für eine gewisse Frau Sandra Kleinhans. Danke!

VI. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: