

Funktionelle Charakterisierung IRF4-gesteuerter Transkriptionsfaktorkomplexe in Th9-Zellen

Dissertation

Zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Sarah Dietzen
geboren am 21. Oktober 1989 in Frankfurt a.M.

Mainz, 2019

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 15.10.2019

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|------------|
| Abbildungsverzeichnis | I |
| Tabellenverzeichnis | II |
| Abkürzungsverzeichnis | III |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 T-Zellaktivierung und Th-Effektorzellen | 2 |
| 1.2 T-Helferzellen Typ 9 (Th9-Zellen) | 4 |
| 1.2.1 Differenzierung von Th9-Zellen | 4 |
| 1.2.2 Funktionen von Th9-Zellen | 5 |
| 1.3 Interleukin-9 (IL-9) | 7 |
| 1.4 Interferon regulierender Faktor 4 (IRF4) | 9 |
| 1.5 Methoden zur Analyse von Protein-DNA- und Protein-Protein-Interaktionen | 11 |
| 1.6 <i>In vivo</i> Biotinylierung | 12 |
| 2 Zielsetzung der Arbeit | 14 |
| 3 Material und Methoden | 15 |
| 3.1 Verbrauchsmaterialien | 15 |
| 3.2 Geräte und Hilfsmittel | 15 |
| 3.3 Chemikalien, Reagenzien und Medienzusätze | 17 |
| 3.3.1 Standardchemikalien | 17 |
| 3.3.2 Reagenzien und Medienzusätze | 17 |
| 3.4 Lösungen, Puffer und Zellkulturmedien | 18 |
| 3.4.1 Lösungen und Puffer | 18 |
| 3.4.2 Zellkulturmedien | 24 |
| 3.5 Zytokine und Stimulantien | 25 |
| 3.6 Antikörper | 26 |
| 3.7 Oligonukleotide („Primer“) und Plasmide | 26 |
| 3.7.1 Primer zur Typisierung der verwendeten Mausstämme | 26 |
| 3.7.2 Primer zum Nachweis von präzipitierter DNA mittels qRT-PCR | 26 |
| 3.7.3 Plasmide zur Durchführung eines Reporterassays | 27 |
| 3.7.4 <i>Irf4</i> ^{BirA-ES} -BAC | 27 |
| 3.8 Kits | 28 |
| 3.9 Tiere | 28 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.10 | Zellkultur | 29 |
| 3.10.1 | Waschen von Zellen und Probenmaterial | 29 |
| 3.10.2 | Bestimmung der Lebendzellzahl | 29 |
| 3.10.3 | Präparation, Differenzierung und Kultivierung von Knochenmarksmastzellen | 29 |
| 3.10.4 | <i>In vitro</i> Stimulation von Mastzellen | 30 |
| 3.10.5 | Präparation von Milzzellen | 30 |
| 3.10.6 | Isolation naiver CD4 ⁺ T-Zellen | 30 |
| 3.10.7 | <i>Ex vivo</i> Differenzierung und Kultivierung von T-Helferzellen Typ 9 | 32 |
| 3.11 | Transfektion von Mastzellen | 32 |
| 3.12 | Reportergenassay | 33 |
| 3.13 | Methoden zur Analyse von Proteinen | 34 |
| 3.13.1 | Herstellung von Kompletzell- und Kernlysaten | 34 |
| 3.13.2 | Proteinbestimmung | 36 |
| 3.13.3 | SDS-PAGE und Western Blot | 36 |
| 3.13.4 | Biotin-vermittelte Interaktompräzipitation (IntP) | 38 |
| 3.13.5 | Massenspektrometrie | 40 |
| 3.14 | Methoden zur Analyse von Nukleinsäuren | 43 |
| 3.14.1 | Biotin-vermittelte Chromatin-Immunpräzipitation (bioChIP) | 43 |
| 3.14.2 | Agarose-Gelelektrophorese | 46 |
| 3.14.3 | Quantitative Realtime-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) | 47 |
| 3.14.4 | Next Generation Sequencing (NGS) | 48 |
| 4 | Ergebnisse | 50 |
| 4.1 | <i>In vivo</i> Biotinylierung von IRF4 | 50 |
| 4.1.1 | Biotinyliertes IRF4 bindet und transaktiviert den <i>Il9</i> -Promotor | 50 |
| 4.1.2 | Generierung der transgenen Mauslinie <i>Irf4</i> ^{Bio} | 52 |
| 4.1.3 | Nachweis von <i>in vivo</i> biotinyliertem IRF4 in Zellen einer <i>Irf4</i> ^{Bio} -Maus | 54 |
| 4.2 | Etablierung einer Biotin-vermittelten IRF4-Interaktompräzipitation (IRF4-IntP) | 55 |
| 4.2.1 | Optimierung der Bindeeffizienz verschiedener <i>SA-Beads</i> in Abhängigkeit unterschiedlicher Puffersysteme | 56 |
| 4.2.2 | Reduktion von unspezifisch gebundenen Proteinen | 57 |
| 4.3 | Durchführung einer Biotin-vermittelten IRF4-Interaktompräzipitation | 66 |
| 4.3.1 | Identifizierung von IRF4-interagierenden Proteinen | 67 |
| 4.3.2 | Netzwerkanalyse von IRF4-interagierenden Proteinen | 68 |
| 4.4 | Biotin-vermittelte Chromatin-Immunpräzipitation („bioChIP“) | 71 |
| 4.4.1 | Optimierung der Fragmentierung von fixiertem Chromatin | 71 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 4.4.2 | Überprüfung der Biotin-vermittelten Chromatin-Immunpräzipitation | 73 |
| 4.5 | Identifizierung von IRF4-Bindestellen in Th9-Zellen | 76 |
| 4.5.1 | Genomweite Analyse IRF4-gebundener Gene | 76 |
| 4.5.2 | Funktionelle Analyse IRF4-gebundener Gene | 77 |
| 5 | Diskussion | 82 |
| 5.1 | Biotinylierung | 83 |
| 5.2 | Das IRF4-Interaktom | 85 |
| 5.3 | IRF4-regulierte Gene | 92 |
| 5.4 | Fazit und Ausblick | 96 |
| 6 | Zusammenfassung | 98 |
| 7 | Abstract | 99 |
| 8 | Literaturverzeichnis | 100 |
| 9 | Anlage | 110 |
| | Danksagung | 113 |
| | Curriculum Vitae | 114 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Abb. 1-1: Th-Effektorzellen | 2 |
| Abb. 1-2: Physiologische und pathophysiologische Funktionen von Th9-Zellen | 6 |
| Abb. 1-3: Schematische Darstellung der transkriptionellen Regulation am <i>Il9</i> -Gen | 8 |
| Abb. 1-4: Schematische Darstellung der IRF-Struktur am Beispiel von IRF4 | 10 |
| Abb. 1-5: Schematische Darstellung der Biotinübertragungsreaktion durch die BirA-Ligase | 13 |
| Abb. 3-1: BirA-Erkennungssequenz (BirA-ES) | 27 |
| Abb. 3-2: Schematische Darstellung einer Biotin-vermittelten Interaktompräzipitation (IntP) | 38 |
| Abb. 3-3: Schematische Darstellung einer Biotin-vermittelten Chromatin-Immünpräzipitation (bioChIP) | 44 |
| Abb. 4-1: Biotinyliertes IRF4 bindet und transaktiviert den <i>Il9</i> -Promotor | 51 |
| Abb. 4-2: Schematische Darstellung der Generierung des <i>Irf4</i> ^{BirA-ES} -BAC | 53 |
| Abb. 4-3: Nachweis von <i>in vivo</i> biotinyliertem IRF4 in BMMC und Th9-Zellen einer <i>Irf4</i> ^{Bio} -Maus | 54 |
| Abb. 4-4: Vergleich der Bindeeffizienz von Dynabeads™ T1 und M-280 | 57 |
| Abb. 4-5: Test verschiedener Waschpuffer zur Durchführung einer Biotin-vermittelten IRF4-Interaktompräzipitation (IntP) | 59 |
| Abb. 4-6: Die Herstellung von Kernlysaten führt zur Reduktion von endogen biotinylierten Proteinen | 61 |
| Abb. 4-7: Keine Anreicherung von IRF4 aus <i>Irf4</i> ^{Bio} -Th9-Kernextrakten | 62 |
| Abb. 4-8: Vergleich von RIPA-Waschpuffern mit unterschiedlichem SDS-Gehalt | 64 |
| Abb. 4-9: Schema des optimierten Protokolls zur IRF4-IntP | 66 |
| Abb. 4-10: Spezifische Anreicherung von nukleärem IRF4 aus <i>Irf4</i> ^{Bio} -Th9-Kernextrakten | 67 |
| Abb. 4-11: Identifizierung von IRF4-interagierenden Proteinen | 68 |
| Abb. 4-12: IRF4-Interaktom | 69 |
| Abb. 4-13: IRF4-interagierende Proteine für weiterführende Interaktom-Analysen | 70 |
| Abb. 4-14: Fragmentierung von Chromatin zur Durchführung einer bioChIP | 72 |
| Abb. 4-15: Kontrolle der bioChIP auf Proteinebene mittels Western Blot | 73 |
| Abb. 4-16: Identifizierung von IRF4-Bindestellen im Genom von Th9-Zellen | 76 |
| Abb. 4-17: Signalweganalyse von IRF4-gebundenen Genen | 77 |
| Abb. 4-18: IRF4 bindet das <i>Il9</i> -Gen an vier verschiedenen Positionen | 78 |
| Abb. 9-1: Anlage 1 – Ausschnitt der Vektorsequenz des BAC RP23-206G12 | 110 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Tabelle 3-1: Bezugsliste der Verbrauchsmaterialien | 15 |
| Tabelle 3-2: Bezugsliste der Geräte und Hilfsmittel | 15 |
| Tabelle 3-3: Bezugsliste der Reagenzien und Medienzusätze | 17 |
| Tabelle 3-4: Bezugsliste der Zytokine und Stimulantien | 25 |
| Tabelle 3-5: Antikörper zur Differenzierung von Th9-Zellen | 26 |
| Tabelle 3-6: Antikörper für Western Blot | 26 |
| Tabelle 3-7: Bezugsliste der verwendeten Kits | 28 |
| Tabelle 3-8: Reaktionsansatz für eine Transfektion mit nachfolgendem Western Blot | 33 |
| Tabelle 3-9: Reaktionsansatz für eine Transfektion mit nachfolgendem Reporterassay | 33 |
| Tabelle 3-10: Herstellung von Zelllysaten | 35 |
| Tabelle 3-11: Reaktionsansatz für eine qRT-PCR | 47 |
| Tabelle 3-12: PCR-Programm für eine qRT-PCR | 48 |
| Tabelle 3-13: Software zur NGS-Datenanalyse | 49 |
| Tabelle 4-1: Genontologie (GO) des IRF4-Interaktoms | 70 |
| Tabelle 4-2: Kontrolle der bioChIP auf DNA-Ebene mittels qRT-PCR | 74 |
| Tabelle 4-3: Literatur bezogene Analyse von IRF4-gebundenen Genen | 79 |
| Tabelle 9-1: Anlage 2 – Liste der mittels einer IRF4-Interaktompräzipitation (IntP) isolierten Proteine | 111 |
| Tabelle 9-2: Anlage 3 – Genontologie (GO) des Proteinhintergrunds nach einer Biotin-vermittelten IRF4-Interaktompräzipitation (IntP) | 112 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------|---|
| A | Ampere |
| Acetyl-CoA | Acetyl-Coenzym A |
| AICE | AP-1-IRF zusammengesetzte Elemente (<i>AP1-IRF composite elements</i>) |
| AP-1 | Aktivatorprotein-1 |
| AS | Aminosäure(n) |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| AMP | Adenosinmonophosphat |
| BAC | künstliches Chromosom (<i>Bacterial artificial chromosome</i>) |
| BATF | <i>Basic leucine zipper transcription factor, ATF-like</i> |
| bioChIP | Biotin-vermittelte Chromatin-Immunpräzipitation |
| bioChIP-Seq | Biotin-vermittelte Chromatin-Immunpräzipitation DNA-Sequenzierung |
| BirA | Biotin-Protein-Ligase BirA |
| BirA-ES | BirA-Erkennungssequenz |
| BLIMP-1 | B Lymphozyt-induziertes Reifeprotein-1 (<i>B lymphocyte-induced maturation protein-1</i>) |
| BMMC | Knochenmarksmastzellen (<i>bone marrow-derived mast cells</i>) |
| bp | Basenpaare |
| BPL | Biotin-Protein-Ligase |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| ca. | circa |
| CCL20 | CC-Chemokin Ligand 20 |
| CD | <i>Cluster of differentiation</i> |
| ChIP | Chromatin-Immunpräzipitation |
| ChIP-Seq | Chromatin-Immunpräzipitation DNA-Sequenzierung |
| CMV | Cytomegalovirus |
| CNS | konservierte nicht-kodierende Sequenz (<i>conserved non-coding sequence</i>) |
| DC | Dendritische Zelle (<i>Dendritic cell</i>) |
| DDA | Datenabhängigen Akquisition (<i>data dependent acquisition</i>) |
| DIA | Datenunabhängige Akquisition (<i>data independent acquisition</i>) |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>) |
| DTT | 1,4-Dithiothreitol |
| EAE | Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis |
| EICE | ETS-IRF zusammengesetzte Elemente (<i>ETS-IRF composite elements</i>) |
| ESI | Elektrospray-Ionisation |
| EZH2 | <i>Enhancer of zeste homolog 2</i> |
| F | Farad |
| FA | Formaldehyd |

| | |
|--------------|--|
| FcεRI | hoch affiner IgE-Rezeptor I |
| FCS | fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>) |
| FDR | Falscherkennungsrate (<i>false discovery rate</i>) |
| for | vorwärts (<i>forward</i>) |
| Foxo1 | <i>Forkhead box O1</i> |
| Foxp3 | <i>Forkhead box P3</i> |
| FYN | Proto-Onkogene Tyrosin-Proteinkinase Fyn |
| g | Gramm oder Schwerebeschleunigung |
| GATA-3 | GATA-Bindeprotein-3 |
| GFP | grün fluoreszierendes Protein |
| GO | Genontologie |
| h | Stunde(n) (<i>hour</i>) |
| HRP | Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>) |
| IAD | IRF-assoziierte Domäne |
| ICSAT | Interferon Konsensussequenz-bindendes Protein aktivierter T-Zellen |
| IFN-α/β/γ | Interferon-alpha/beta/gamma |
| IKZF1/3 | Ikaros-Zink-Finger-Protein 1/3 |
| IL | Interleukin |
| ILC2 | <i>Innate lymphoid cells 2</i> |
| IL-XR | Interleukin-X-Rezeptor |
| ILF2 | Interleukin <i>Enhancer</i> -Bindefaktor 2 |
| IMDM | Iscove`s Medium (<i>Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium</i>) |
| IMS | Ionenmobilitätsspektrometrie |
| IntP | Interaktompräzipitation |
| IRF4/8 | Interferon regulierender Faktor 4/8 |
| IRF4-BirA-ES | IRF4 mit anhängender BirA-Ligase-Erkennungssequenz |
| ISRE | Interferon-stimuliertes Antwortelement (<i>interferon-stimulated response element</i>) |
| JAK2/3 | Januskinase 2/3 |
| K | Lysin* |
| kb | kilobasenpaare |
| Kd | Dissoziationskonstante |
| kDa | Kilodalton |
| KL-MZF | Kit-Ligand-Mastzellfütter |
| l | Liter |
| LCK | Lymphozyt-spezifischen Protein Tyrosinkinase |
| LCMV | Lymphozytärer Choriomeningitis Virus |
| LSIRF | Lymphoid-spezifischer Interferon regulierender Faktor |

* Abkürzung nach einer Empfehlung der IUPAC-Nomenklaturkommission (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)

| | |
|----------|--|
| M | Molar |
| m | Meter oder Milli(-Einheit) oder murin |
| MACS | Magnet-aktivierte-Zell-Sortierung (<i>magnetic activated cell sorting</i>) |
| MBP | Myelin-Basisches Protein |
| MEA | Mastzell-wachstumsfördernde Aktivität (<i>mast cell growth-enhancing activity</i>) |
| MEM | Minimal Essential Medium |
| MHC | Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>) |
| min | Minute(n) |
| MS/MS | Tandem-Massenspektrometrie |
| MUM1 | Multiplles Myelom Onkogen 1 |
| n | nano(-Einheit) |
| n.b. | nicht bestimmbar |
| NCS | Nicht-kodierende Sequenz (<i>non-coding sequence</i>) |
| NFAT | <i>Nuclear factor of activated T-cells</i> |
| NF-κB | <i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i> |
| NFKB2 | Nukleärer Faktor NF-κB p100 Untereinheit |
| NF-45 | Nukleärer Faktor 45 (siehe auch ILF2) |
| NGS | <i>Next Generation Sequencing</i> |
| OVA | Ovalbumin |
| pcDNA | Plasmid-Cytomegalovirus-DNA Vektor (Leervektor) |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PBS | Phosphat gepufferte Salzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>) |
| PIC | Proteinaseinhibitor Cocktail |
| PIP | PU.1-Interaktionspartner |
| Prdm-1 | PR Domäne Zinkfinger Protein-1 |
| pRL-TK | Renilla Luciferase Thymidinkinase Vektor |
| Prom. | Promotor |
| PVDF | Polyvinylidendifluorid |
| qRT-PCR | quantitative Realtime-Polymerase-Kettenreaktion |
| RecA | Rekombinase A |
| rev | revers |
| RLU | Relative Lichteinheit (<i>relative light unit</i>) |
| ROCK2 | <i>Rho-associated protein kinase 2</i> |
| RORγT | RAR-verwandter-Rezeptor-γ-T |
| rpsl/neo | Streptomycin/Neomycin-Resistenz-Kassette |
| s | Sekunde(n) |
| SA | Streptavidin |
| SA-Beads | Streptavidin beschichtete Kügelchen |
| SacB | Levansucrase (Markergen) |
| SA-HRP | Streptavidin-gekoppelte Meerrettichperoxidase |
| SDS | Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>) |

| | |
|----------------|--|
| SDS-PAGE | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| s.o./s.u. | siehe oben/siehe unten |
| STAT5/6 | <i>Signal transducer and activator of transcription 5/6</i> |
| T-bet | T-box-exprimiert-in-T-Zellen |
| TBS | Tris-gepufferte Salzlösung (<i>Tris-buffered saline</i>) |
| TBS-T | Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween (<i>Tris-buffered saline with Tween</i>) |
| TCGFIII | T-Zell-Wachstumsfaktor III (<i>T-cell growth factor III</i>) |
| TGF-β | Transformierender Wachstumsfaktor-beta (<i>Transforming growth factor-beta</i>) |
| TGF-βR | Transformierender Wachstumsfaktor-beta-Rezeptor |
| Th-Zelle | T-Helferzelle |
| ThX-Zelle | T-Helferzelle Typ X |
| TM | Testmedium |
| Tnfsf4 | Tumornekrosefaktor (Ligand) Superfamilie, Mitglied 4 |
| TOF-MS | Flugzeitmassenspektrometer (<i>Time-of-flight mass spectrometer</i>) |
| Treg | regulatorische T-Zelle |
| TSS | Transkriptionsstartpunkt / transkriptioneller Start (<i>transcription start site</i>) |
| TZR | T-Zell Rezeptor (<i>T-cell receptor</i>) |
| UPLC | Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-System (<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>) |
| V | Volt |
| vgl. | vergleiche |
| W [†] | Tryptophan |
| WT | Wildtyp |
| ZAP70 | Zeta-Ketten-assoziierte Proteinkinase 70 (<i>Zeta-chain-associated protein kinase 70</i>) |
| z.B. | zum Beispiel |
| ZICE | Zinkfinger-IRF zusammengesetztes Element (<i>zink finger-IRF composite element</i>) |
| ZTL | Zytotoxische T-Lymphozyten |
| μ | Mikro(-Einheit) |
| μm | Mikrometer |
| °C | Grad Celsius |
| % | Prozent |
| % (v/v) | Volumenprozent |
| % (w/v) | Massenprozent |

[†] Abkürzung nach einer Empfehlung der IUPAC-Nomenklaturkommission (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)

1 Einleitung

Eine immunologische Reaktion des Körpers auf Infektionen durch Pathogene kann in eine angeborene und eine adaptive Immunantwort unterteilt werden. Die angeborene Immunantwort ist unmittelbar und verteidigt den Körper gegen eine große Spanne von Pathogenen. Die adaptive Immunantwort entwickelt sich langsamer. Sie ist langlebig und richtet sich spezifisch gegen bestimmte Pathogene. Ebenfalls charakteristisch für die adaptive Immunabwehr ist die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses, welches den Körper vor einer Reinfektion des Pathogens schützt. Beide Immunantworten beruhen auf der Aktivität von weißen Blutzellen, den Leukozyten. Diese Zellen entwickeln sich aus hämatopoetischen Stammzellen, welche sich im Knochenmark entwickeln.¹ Eine Sorte von Immunzellen, die eine Schlüsselrolle in der Funktion des adaptiven Immunsystems einnehmen sind T-Zellen.

T-Zellen lassen sich aufgrund ihrer immunologischen Eigenschaften in zwei verschiedene Klassen einteilen: CD8⁺ T-Zellen (*cluster of differentiation*, CD), die unter anderem Virus-infizierte Zellen erkennen und töten, sowie CD4⁺ T-Zellen, die durch die Bildung von Subpopulationen ein breites Repertoire an Effektorfunktionen aufweisen. Für die vorliegende Arbeit sind speziell die CD4⁺ Zellen von besonderer Bedeutung. Nach ihrer Entstehung im Knochenmark entwickeln sich T-Zellen im Thymus. Hier findet ein zweiteiliger Selektionsprozess statt, in dessen Verlauf der spezifische T-Zell-Rezeptor (TZR) generiert wird. Dieser Rezeptor ist für jede T-Zelle individuell. Der Selektionsprozess gewährleistet einerseits, dass eine möglichst hohe biologische Diversität an T-Zellen geschaffen wird, sodass potenziell jeder in den Körper eindringender Erreger erkannt werden kann. Andererseits soll die Entstehung autoreaktiver T-Zellen verhindert werden. Nach der Entwicklung im Thymus gelangen die T-Zellen in die Blutbahn von wo aus sie schließlich in lymphatisches Gewebe migrieren. Um sich an der adaptiven Immunantwort zu beteiligen, müssen diese naiven T-Zellen auf ihr spezifisches Antigen treffen, welches ihnen in Form von Peptiden durch einen Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC) auf einer Antigen-präsentierenden Zelle präsentiert wird. Zusammen mit weiteren co-stimulatorischen Signalen bekommen sie dadurch das Zeichen zur Proliferation und Differenzierung in sogenannte T-Effektorzellen. Diese Entwicklung wird als T-Zellaktivierung bezeichnet.^{1,2}

1.1 T-Zellaktivierung und Th-Effektorzellen

Die T-Zellaktivierung erfolgt durch Interaktion einer naiven T-Zelle mit einer Antigen-präsentierenden Zelle. Eine solche Antigen-präsentierende Zelle stellt z.B. die Dendritische Zelle (*Dendritic cell*, DC) dar.^{3,4} Bei Kontakt einer DC z.B. mit einem Krankheitserreger, wird dieser phagozytiert und verdaut. Peptidfragmente des Erregers werden dabei prozessiert und auf der Oberfläche der DC in Komplex mit einem MHC-Molekül präsentiert.⁵ Oftmals findet der Kontakt der DC mit einem Krankheitserreger in peripheren Geweben, wie Haut oder Lunge statt.⁶ Da T-Zellen hingegen überwiegend in Blut und Lymphsystem zirkulieren,⁷ migriert eine DC nach Antigenaufnahme ebenfalls in sekundäres Lymphgewebe, wie z.B. die Lymphknoten. Hier erfolgt die Interaktion zwischen aktivierter, Antigen-präsentierender DC und der naiven T-Zelle.² CD8⁺ T-Zellen erkennen ihr spezifisches Antigen in Kombination mit MHC-I, während CD4⁺ T-Zellen Peptide in Komplex mit MHC-II erkennen⁸ (siehe Abbildung 1-1).

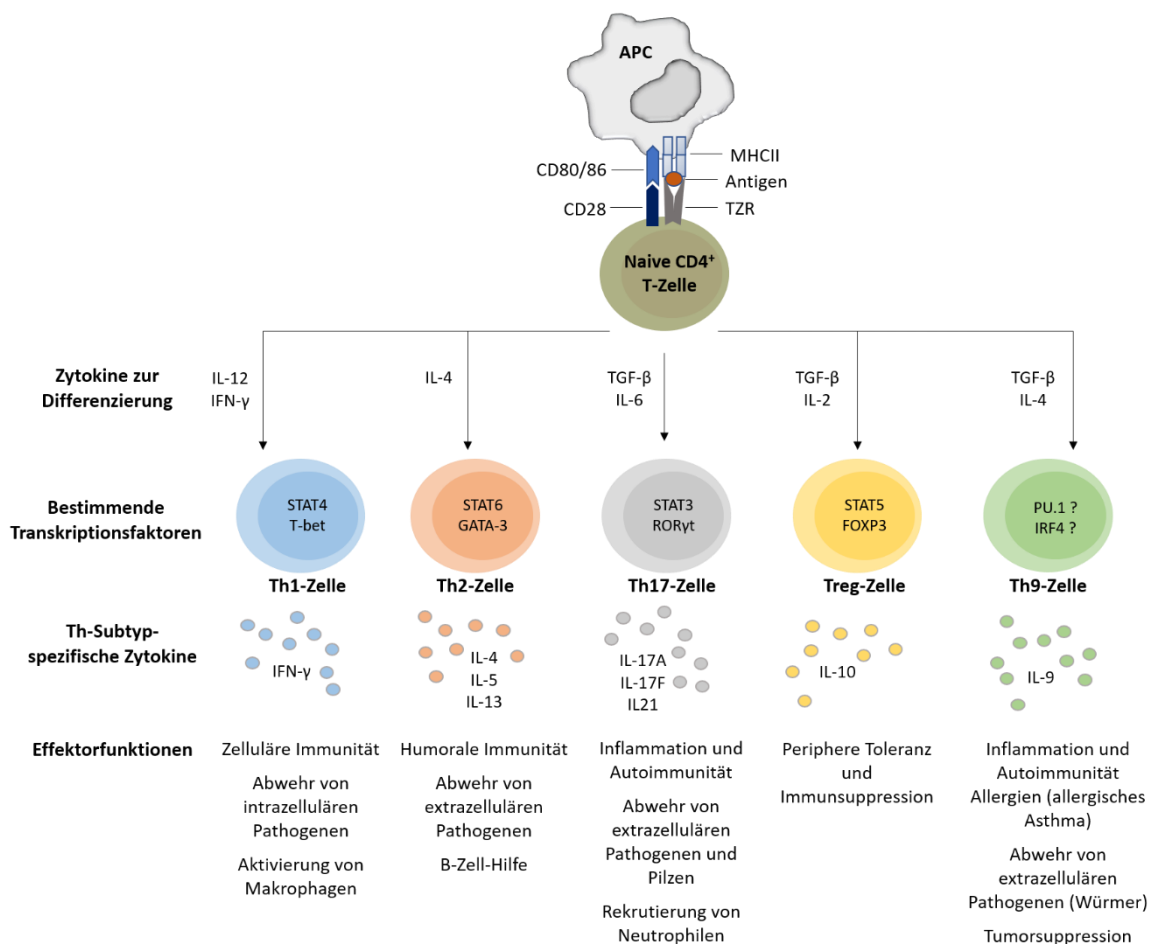


Abbildung 1-1: Th-Effektorzellen

Die Abbildung stellt schematisch die Differenzierung von Th-Subpopulationen aus einer naiven CD4⁺ T-Zelle dar. Von oben nach unten zeigt die Abbildung die für die Differenzierung wichtigsten Zytokine sowie differenzierungsbestimmende Transkriptionsfaktoren und die jeweils Th-Subtyp-spezifischen Zytokine. Die charakteristischen Eigenschaften der verschiedenen Th-Zellen sind als Effektorfunktionen zusammengefasst.

Die Ausbildung dieses engen Zellkontakts (auch als immunologische Synapse bezeichnet)⁹, geschieht über verschiedene Signale und resultiert in der Aktivierung der T-Zelle. Für die vollständige Aktivierung einer naiven T-Zelle sind zwei Signale erforderlich. Das erste Aktivierungssignal liefert die Bindung des CD3-assoziierten TZR an den Peptid:MHC-Komplex.⁵ Eine signalgebende Bindung erfolgt jedoch nur, wenn ein individueller TZR das für ihn spezifische Peptid, gebunden an MHC, erkennt. Erreicht diese Bindung eine ausreichend hohe Avidität, entscheidet ein zweites co-stimulatorisches Signal über die vollständige Aktivierung der T-Zelle: CD80 und CD86, die von der aktivierten DC exprimiert werden, interagieren mit CD28, welches sich auf der Oberfläche der T-Zelle befindet.^{5,10} Ein drittes, wichtiges Signal für die Differenzierung in eine bestimmte T-Effektorzelle liefert die Zusammensetzung des Zytokin-Milieus, das bereits durch den Kontakt der DC mit dem Pathogen beeinflusst wird.^{11,12} Nach ihrer Aktivierung beginnt die T-Zelle zu proliferieren und ihrerseits ebenfalls Zytokine zu produzieren.² Die Zusammensetzung der Zytokine ist spezifisch für die jeweilige Effektorzellpopulation.¹³ So können CD4⁺ T-Zellen z.B. zu Interferon- γ (IFN- γ)-produzierenden T-Helfer (Th)-Typ1 (Th1)-Zellen, zu Interleukin-4 (IL-4)-, IL-5- und IL-13-produzierenden Th2-Zellen oder zu Th17-Zellen differenzieren, deren typische Zytokine IL-17, IL-21 und IL-22 sind.^{14,15} Zudem können jedem Zelltyp bestimmte immunologische Funktionen und Transkriptionsfaktoren zugeordnet werden. T-box-exprimiert-in-T-Zellen (T-bet)-positive Th1-Zellen¹⁶ spielen eine wichtige Rolle bei der Abwehr intrazellulärer Pathogene sowie der Aktivierung von Makrophagen.¹⁵ Th2-Zellen, deren Entwicklung von der Expression des GATA-Bindeprotein-3 (GATA-3) abhängt,^{17,18} nehmen Einfluss auf die Antikörperproduktion von B-Zellen und sind bei der Abwehr von extrazellulären Parasiten wie Würmern beteiligt;¹⁵ wohingegen Th17-Zellen bei der Abwehr von extrazellulären Bakterien und Pilzen wichtig sind.¹⁵ Th17-Zellen exprimieren charakteristisch den Transkriptionsfaktor RAR-verwandter-Rezeptor- γ -T (ROR γ T).^{15,19} Regulatorische T-Zellen (Tregs), die ebenfalls aus naiven CD4⁺ T-Zellen differenzieren können, werden durch die Expression ihres Haupttranskriptionsfaktors *Forkhead box P3* (Foxp3) gesteuert²⁰ und sezernieren charakteristisch das Zytokin IL-10.²¹ Sie besitzen im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Pathogen-abwehrenden Th-Effektorzellen immunregulierende, suppressive Eigenschaften.^{20,22} Dies ist notwendig, um fatale Überreaktionen des Immunsystems z.B. gegen kommensale Mikroorganismen, oder körpereigene Zellen zu vermeiden.²² Unkontrollierte Reaktionen der verschiedenen Th-Zellpopulationen können Autoimmunerkrankungen wie Multiple Sklerose²³, Arthritis²⁴, Diabetes²⁵ oder Asthma²⁶ hervorrufen. Die Abbildung 1-1 zeigt zusammenfassend Th-Effektorzellen mit ihren differenzierungsbestimmenden Transkriptionsfaktoren und charakteristischen Merkmalen.

Für die Entstehung von Asthma bronchiale, einer chronischen Entzündung der Atemwege, wurden ursprünglich Th2-Zellen verantwortlich gemacht. Grund dafür war, dass Zellen, die Th2-typische Zytokine wie IL4, IL-5 und IL-13 produzieren, in der Lunge von Asthmatikern akkumulieren.^{27,28} Heute ist bekannt, dass eine weitere CD4⁺ Subpopulation von Th-Zellen existiert, die durch eine überdurchschnittliche Produktion von IL-9 an der Symptomatik von Asthma beteiligt ist: Th9-Zellen.²⁹

1.2 T-Helferzellen Typ 9 (Th9-Zellen)

Bereits 1994 beschrieben Schmitt et al. eine Population von CD4⁺ Th-Zellen, die nach Stimulation durch anti-CD3 und anti-CD28 in Anwesenheit von IL-4 und Transformierendem Wachstumsfaktor-beta (*Transforming growth factor-beta*, TGF- β) große Mengen an IL-9 produziert. Experimente mit *Il2*-defizienten Mäusen zeigten, dass IL-2 essentiell für die IL-9-Produktion ist und eine Zugabe von IFN- γ den IL-9-fördernden Effekt von IL-4 inhibieren kann.³⁰ Erst über 10 Jahre später definierten Veldhoen et al.³¹ und Dardalhon et al.³² diese Zellpopulation aufgrund ihres Th-Subtyp-spezifischen Zytokins IL-9 als Th9-Zellen.

1.2.1 Differenzierung von Th9-Zellen

TGF- β initiiert normalerweise die Transkription von *Foxp3* und stellt damit das Schlüsselzytokin in der Entwicklung von peripheren Tregs dar.³³ In Anwesenheit von IL-4 wird die Expression von *Foxp3* jedoch unterdrückt,³² wodurch es zur Phosphorylierung von SMAD3 kommt, welches daraufhin kerngängig wird und zusammen mit weiteren Faktoren (siehe Kapitel 1.3) den *Il9*-Promotor transaktiviert.³⁴ Außerdem induziert TGF- β die Expression des Transkriptionsfaktors PU.1.³⁵ Chang et al. konnten mithilfe von Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) nachweisen, dass PU.1 ebenfalls den *Il9*-Promotor bindet. Ferner konnten sie zeigen, dass *Sfpi1*⁺-defiziente naive CD4⁺ Zellen, die unter Th9-differenzierenden Bedingungen kultiviert werden, eine signifikant reduzierte IL-9-Produktion und stattdessen ein verstärktes Th2-typisches Zytokinprofil aufweisen. Die ektopische Expression von PU.1 führte wiederum zu einer Steigerung der IL-9-Produktion.^{35,36} Bemerkenswert ist auch die Tatsache, dass sich Th9-Zellen TGF- β -abhängig aus bereits differenzierten Th2-Zellen entwickeln können.³¹ Weitere Transkriptionsfaktoren, die für die Differenzierung von Th9-Zellen wichtig sind, sind *Signal transducer and activator of transcription 6* (STAT6), GATA-3 und Interferon regulierender Faktor 4 (IRF4). STAT6 bildet die Hauptsignalkomponente im IL-4-abhängigen Signalweg ausgehend des IL-4-Rezeptors (IL-4R) und ist für die *in vitro* Differenzierung von Th9-

[†] *Sfpi1* codiert für PU.1

Zellen unabdingbar.³⁷ Auch STAT6 kann durch eine gezielte Bindung die Aktivität des *IL9*-Promotors steigern.³⁸ Außerdem ist IL-4-abhängiges STAT6 für die Suppression von TGF- β -induziertem Foxp3 (s.o.) verantwortlich und verhindert die Expression des Th1-induzierenden Transkriptionsfaktors T-bet.³⁷ Somit spielt IL-4 via STAT6 eine entscheidende Rolle bei der Induktion des Th9-bestimmenden Entwicklungsprogramms, indem die Differenzierung anderer T-Helferzell-Subtypen blockiert und die IL-9-Produktion gefördert wird. Nach der T-Zell-spezifischen Aktivierung führt die Phosphorylierung von STAT6 zur Transkription von *Gata3* und *Irf4* – beides wichtige Differenzierungsfaktoren in der Entwicklung von Th9- und Th2-Zellen.^{39,40} Die Rolle von GATA-3 in Th9-Zellen konnte bislang noch nicht hinreichend geklärt werden und wird zum Teil kontrovers diskutiert. Es wird vermutet, dass die Stärke der Expression von GATA-3 den Unterschied bei der Entwicklung einzelner Th-Subtypen verantwortlich ist.⁴¹ Weiterhin wurde beschrieben, dass eine Notch-abhängige Signalweiterleitung die Transkription von *Gata3* auch in Abwesenheit von STAT6 regulieren kann.^{42,43} Die Transkription von *Irf4* kann sowohl durch STAT6 als auch durch eine Signalweiterleitung ausgehend des TZR reguliert werden.^{37,44} Ferner kann die Transkription von *Irf4* durch einen IL-2/STAT5-abhängigen Signalweg gelenkt werden. Gomez-Rodriguez et al. beobachteten, dass IL-2 die Expression von IRF4 nach schwacher TZR-Stimulation positiv beeinflusst. Außerdem bindet IL-2-abhängig phosphoryliertes STAT5 einen konservierten Bereich Strang-aufwärts des ersten Exons von *Irf4*.⁴⁵ IRF4 wiederum bindet und transaktiviert den *IL9*-Promotor und ist für die Differenzierung von Th9-Zellen essenziell.³⁹ Neuste Studien bringen einen weiteren Transkriptionsfaktor ins Spiel: *Forkhead box O1* (Foxo1). Dieser bindet und transaktiviert in Th9-Zellen sowohl den *IL9*-Promotor als auch den *Irf4*-Promotor.^{46,47} Die Inhibition von Foxo1 führt zur Reduktion von IL-9 und stattdessen zur Expression von IL-17 und IFN- γ . Außerdem konnte durch die Inhibition von Foxo1 eine signifikante Verbesserung von allergischem Asthma erzielt werden.^{46,47} Co-stimulatorische Signale können ebenfalls Einfluss auf die IL-9-Produktion haben. Neben CD28 kann OX40 (entspricht CD134) die IL-9-Produktion in Th9 Zellen beeinflussen.^{48,41} Xiao et al. konnten zeigen, dass OX40 die Differenzierung von Th9-Zellen fördert, während es die Entwicklung von Tregs und Th17-Zellen hemmt.⁴⁹ Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Entwicklung von Th9-Zellen durch ein komplexes Netzwerk aus miteinander wechselwirkender Transkriptionsfaktoren und Zytokinen bestimmt wird, welches bei einer Änderung einzelner Faktoren zur Differenzierung anderer Th-Subtypen führt.

1.2.2 Funktionen von Th9-Zellen

Neben dem Subtyp-spezifischen Zytokin IL-9 produzieren Th9-Zellen relativ große Mengen an IL-10. Während IL-9 von Beginn an exprimiert wird und an Tag 3 der Differenzierung eine Spitze in der

Anreicherung im Kulturmedium zeigt, reichert sich IL-10 sukzessiv an. Durch eine Restimulation kann die Produktion von IL-9 und IL-10 noch gesteigert werden.⁵⁰ Weitere Zytokine, die von Th9-Zellen produziert werden, sind IL-17, IL-21 und IL-22.⁵¹

Th9-Zellen spielen vor allem durch die Produktion von IL-9 eine Rolle sowohl in der protektiven Immunität als auch bei der Entstehung von immunpathologischen Krankheiten (siehe Abbildung 1-2).

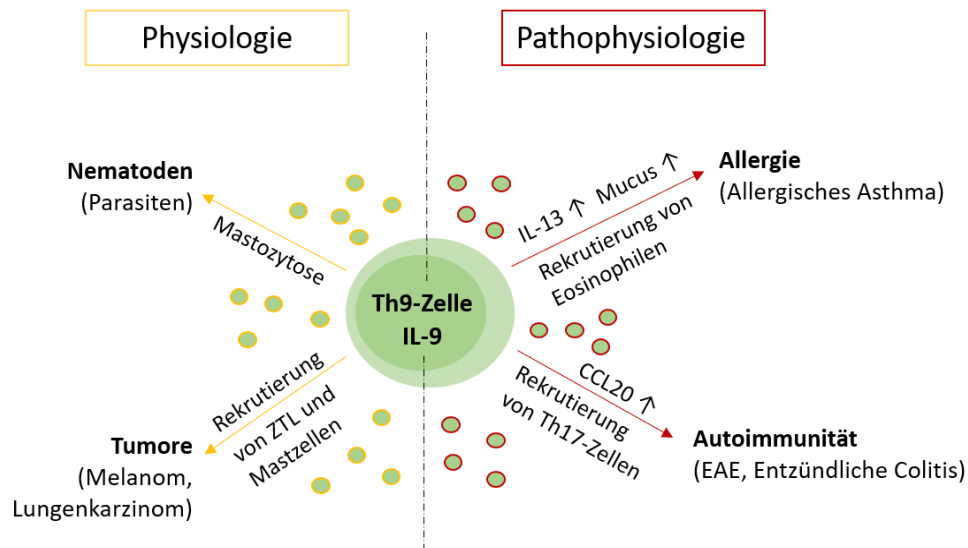


Abbildung 1-2: Physiologische und pathophysiologische Funktionen von Th9-Zellen

Th9-Zellen produzieren IL-9 und sind sowohl an der protektiven Immunität als auch an der Entstehung von immunpathologischen Krankheiten beteiligt. Sie spielen durch die Rekrutierung von Mastzellen eine Rolle bei der Abwehr von Nematoden^{31,52} und mobilisieren zytotoxische T-Lymphozyten (ZTL) zur Bekämpfung von Tumorzellen.^{53,54} Bei allergischem Asthma sind sie an der Induktion von IL-13 und Mucus beteiligt und rekrutieren Eosinophile ins Lungengewebe.^{55,56} Bei Autoimmunerkrankungen bewirken sie durch die Induktion des Chemokins CCL20 (CC-Chemokin Ligand 20) die Rekrutierung von Th17-Zellen ins zentrale Nervensystem.⁵⁷

Veldhoen et al. beobachteten im murinen Infektionsmodell, verursacht durch einen parasitären Befall mit *Trichuris muris*, dass Mäuse, die einen dominant-negativen TGF- β -Rezeptor unter der Kontrolle des *Cd4*-Promotors exprimieren (so dass CD4⁺ Zellen nicht auf TGF- β reagieren können), eine verringerte IL-9-Produktion aufweisen. Gleichzeitig zeigten diese Tiere einen stärkeren Wurmbefall als wildtypische Tiere. Beide Effekte konnten auf die beeinträchtigte Differenzierung von Th9-Zellen zurückgeführt werden.³¹ Heute weiß man, dass durch die Ausschüttung von IL-9 die Aktivierung von mucosalen Mastzellen erfolgt. Diese sezernieren Mediatoren, die zu einer verstärkten Mucusproduktion, der Einwanderung von Eosinophilen und einer Hyperkontraktion des Darmmuskulgewebes führen, welches das Ausscheiden der Parasiten begünstigt.^{52,58} Auch an chronischen Entzündungen des Darms und des Nervensystems sind Th9-Zellen beteiligt. Im Mausmodell konnte demonstriert werden, dass sowohl *Il9*-defiziente T-Zellen als auch die

Neutralisierung von IL-9 zur Verbesserung einer entzündlichen Colitis führen.⁵⁹ Ferner induziert IL-9 die Expression des CC-Chemokin Liganden 20 (CCL20) auf Astrozyten, wodurch Th17-Zellen ins zentrale Nervensystem rekrutiert werden.⁵⁷ Außerdem wurde gezeigt, dass TZR-transgene Th9-Zellen, die das Myelin-Basische Protein (MBP) spezifisch erkennen, für die Induktion einer Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE)[§] verantwortlich sind. Jedoch unterscheidet sich der von Th9-Zellen hervorgerufene Phänotyp der Pathogenese von den durch Th1- oder Th17-Zellen induzierten Phänotypen.⁵¹ Mittlerweile ist auch die Beteiligung von Th9-Zellen an allergischen Reaktionen – vor allem an der Entstehung von allergischem Asthma gut untersucht. T-Zell-defiziente Mäuse, in die Ovalbumin (OVA)-spezifische Th9-Zellen transferiert wurden, zeigen nach OVA-Exposition starke asthmatische Symptome wie eine Überempfindlichkeit der Atemwege, erhöhtes Auftreten von Eosinophilen im Lungengewebe sowie eine vermehrte Mucusproduktion. Die Ursache konnte ebenfalls auf Th9-spezifisches IL-9 zurückgeführt werden.³⁹ Noch nicht allzu lange ist bekannt, dass Th9-Zellen in der Tumor-Immunologie ebenfalls eine Rolle spielen. Sowohl in Mausmodellen zu schwarzem Hautkrebs (Melanom) als auch beim Lungenkarzinom wurde gezeigt, dass die Neutralisation von IL-9 zu einem verstärkten Tumorwachstum führt und Th9-Zellen in diesem Fall eine protektive Funktion ausüben. Dies beruht auf der IL-9-abhängigen Aktivierung und Rekrutierung von Mastzellen ins Melanom-, bzw. zytotoxischen T-Lymphozyten (ZTL) ins Lungenkarzinomgewebe.^{53,54}

1.3 Interleukin-9 (IL-9)

IL-9 wurde Ende der 1980er Jahre erstmals kloniert und aufgrund seines Proteingewichts von ca. 32 – 39 kDa als P40 bezeichnet. Unabhängig davon wurde IL-9 etwa gleichzeitig als T-Zell-Wachstumsfaktor III (*T-cell growth factor* III, TCGF III) beschrieben. Später stellte sich heraus, dass P40, TCGF III sowie ein Faktor für Mastzell-wachstumsfördernde Aktivität (*mast cell growth-enhancing activity*, MEA) dasselbe Protein darstellen.⁶⁰⁻⁶² Aufgrund der Wirkung sowohl auf lymphoide als auch auf myeloide Zellen wurde es in Interleukin-9 umbenannt.⁶³ IL-9 ist ein multifunktionales 144 Aminosäuren (AS) langes Glykoprotein und wird in der Maus vom *IL9*-Gen auf Chromosom 13 kodiert. Das humane *IL9*-Gen hingegen liegt auf Chromosom 5.⁶⁴ Da in der vorliegende Arbeit ausschließlich mit Zellen aus der Maus gearbeitet wurde, bezieht sich die folgende Charakterisierung auf murines IL-9. Neben Th9-Zellen gehören auch Th17-Zellen⁶⁵, *Innate lymphoid cells 2* (ILC2)⁵² und Mastzellen⁶⁶ zu den IL-9-Produzenten. Die pleiotrope Wirkung von IL-9 wurde bereits in Abschnitt 1.2.2 am Beispiel von Th9-Zellen beschrieben (siehe auch Abbildung 1-2).

[§] EAE: murines Modell für Multiple Sklerose

Bisher konnten drei konservierte nicht-kodierende Sequenzen (*conserved non-coding sequences*, CNS) nahe dem *Il9*-Lokus in T-Zellen identifiziert werden. CNS1 stellt die Promotorregion dar, CNS0 liegt aufwärts und CNS2 abwärts des transkriptionellen Starts (*transcription start site*, TSS) von *Il9*⁴¹ (siehe Abbildung 1-3 A). Speziell bei Th9-Zellen liegt verglichen mit naiven T-Zellen und anderen Th-Subtypen eine besonders hohe Acetylierung um den *Il9*-Promotor vor.³⁶ Somit ist dieser Bereich offen zugänglich für die Bindung verschiedener Transkriptionsfaktoren. Die Abbildung 1-3 B zeigt Faktoren, die, ausgehend einer durch TGF- β - und IL-4-, sowie TZR-vermittelten Signalweiterleitung, den *Il9*-Promotor binden.

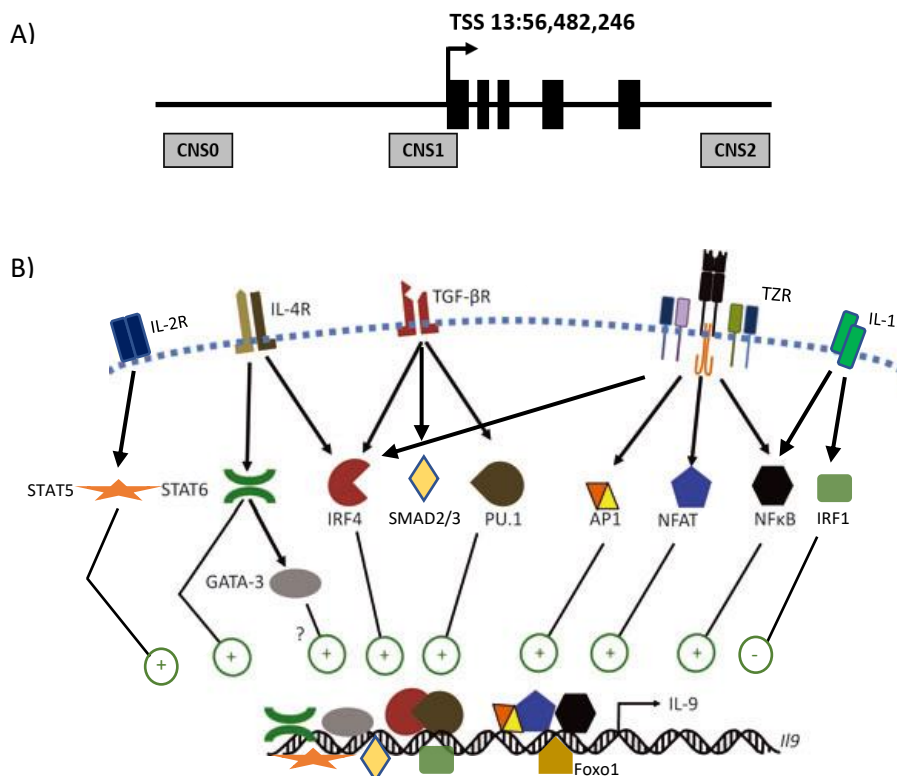


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der transkriptionellen Regulation am *Il9*-Gen

A) Schematische Darstellung der Intron-Exon-Struktur des *Il9*-Gens auf dem murinen Chromosom 13. CNS: konservierte nicht-kodierende Sequenz (*conserved non-coding sequence*); TSS: Transkriptionsstart. Die Abbildung basiert auf einer Graphik von M. H. Kaplan.⁴¹ B) Abhängig des jeweiligen Zytokin-Rezeptor-vermittelten Signalwegs (TZR, IL-2-Rezeptor (IL-2R), IL-4-Rezeptor (IL-4R), TGF- β -Rezeptor (TGF- β R) und IL-1-Rezeptor (IL-1R)), binden verschiedene Transkriptionsfaktoren an den *Il9*-Promotor. Sie können positiv oder negativ auf die Transkription von *Il9* wirken (siehe Text). Die Abbildung wurde der Publikation von M. Stassen et al.⁶⁷ entnommen und verändert.

Die Bindung von IL-4 an den IL-4R führt zur Aktivierung von STAT6,³⁷ welches wahrscheinlich GATA-3-abhängig zur positiven Regulierung des *Il9*-Gens beiträgt.⁶⁷ Durch eine Aktivierung des TZR wandern *Nuclear factor of activated T-cells* (NFAT)-Transkriptionsfaktoren und *Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B) in den Zellkern, wo sie die Transkription des *Il9*-Gens fördern.⁶⁷ Außerdem wird die Expression von Aktivatorprotein-1 (AP-1)-Komplexen

und IRF4 induziert, die den Promotorbereich binden.^{68,69} Von IRF4 ist bekannt, dass der Transkriptionsfaktor in Komplex mit PU.1 an DNA bindet.^{70,71} PU.1 wird durch den TGF- β -Rezeptor (TGF- β R) induziert und ist für die IL-9-Produktion in Th9-Zellen essenziell.³⁶ Weiterhin wurden SMAD-Proteine beschrieben, die in Kooperation mit IRF4 und in Abhängigkeit von TGF- β den *IL9*-Promotor positiv regulieren.^{72,73} Erst kürzlich wurde gezeigt, dass ein weiterer Transkriptionsfaktor namens Foxo1 den *IL9*-Promotor in Th9-, Th17- und Tregs ebenfalls bindet und transaktiviert. Fast zeitgleich demonstrierten Malik et al. und Buttrick et al., dass die Inhibition oder der Verlust von Foxo1 zur signifikanten Reduktion von IL-9 führt.^{46,47} Als negativer Regulator der IL-9-Produktion wurde IRF1 beschrieben. IRF1 tritt mit IRF4 in Konkurrenz, indem es zwar dieselben Regionen im *IL9*-Lokus bindet aber gegensätzliche Modifikationen am Chromatin bewirkt, wodurch die Transkription von *IL9* verhindert wird.⁷⁴

Neben IL-4 und TGF- β haben weitere Zytokine Auswirkungen auf die Transkription von *IL9*. Während IL-2 STAT5-abhängig die Expression von IL-9 fördert, wirkt IFN- γ hemmend.^{30,45} IL-25 wiederum verstärkt die IL-9-Produktion von Th9-Zellen.⁷⁵ Schmitt et al. konnten zeigen, dass auch IL-1 eine IL-9-aktivierende, co-stimulatorische Wirkung bei T-Zellen hat.⁷⁶ Auch bei Mastzellen wirkt sich eine Stimulation durch IL-1 positiv auf die IL-9-Expression aus,⁷⁷ indem NF- κ B aktiviert wird.⁷⁸ Ein Unterschied bei der Regulation von *IL9* zwischen T-Zellen und Mastzellen liegt in der Funktion von GATA-Proteinen. Bei Mastzellen wurde der Transkriptionsfaktor GATA-1 als wichtiger *IL9*-Gen-regulierender Faktor beschrieben.⁷⁹ Im Gegensatz dazu wird dieser bei T-Zellen nicht exprimiert und es wird vermutet, dass hier GATA-3 die Funktion von GATA-1 übernimmt.⁶⁷ Grundsätzlich sind bereits viele Details über die *IL9*-Regulation bekannt. Speziell die Interaktion der verschiedenen Transkriptionsfaktoren, die für die Th9-Differenzierung eine entscheidende Rolle spielt, ist jedoch weiter unklar.

1.4 Interferon regulierender Faktor 4 (IRF4)

Die Familie der Interferon-regulierenden Faktoren (IRF) spielt in der Entwicklung von Immunzellen eine bedeutende Rolle und besteht bei Säugern aus neun Transkriptionsfaktoren.⁸⁰ IRF werden ausschließlich von hämatopoetischen Zellen, darunter B- und T-Lymphozyten sowie DCs, Makrophagen und Mastzellen exprimiert.^{81,82} Wie sich vom Namen ableiten lässt, wurden sie erstmals in ihrer Funktion beschrieben Typ I Interferone (IFN- α und - β) zu regulieren.⁸³ Alle IRF-Transkriptionsfaktoren besitzen eine konservierte N-terminale DNA-Bindedomäne, die spezifisch die Sequenz 5'-AAxxGAAA-3' erkennt.⁸⁴ In der C-terminalen Region liegt die IRF-assoziierte Domäne (IAD), welche Homo- und Heterodimerisierung ermöglicht.⁸² Außerdem verfügen manche IRF über

ein Kern-Lokalisationssignal sowie eine auto-inhibitorische Repressionsdomäne⁸⁵ (siehe Abbildung 1-4).



Abbildung 1-4: Schematische Darstellung der IRF-Struktur am Beispiel von IRF4

Braun: DNA-Bindedomäne mit 5 konservierten Tryptophanresten (W), hellgrün: regulatorische Domäne, Grün: Kern-Lokalisationssignal, Blau: IRF-assoziierte Domäne (IAD), Gelb: Repressionsdomäne

IRF4 hat aufgrund unabhängiger Klonierungsexperimente auch die Abkürzungen PIP (PU.1-Interaktionspartner), MUM1 (Multiples Myelom Onkogen 1), LSIRF (Lymphoid-spezifischer IRF) und ICSAT (Interferon Konsensussequenz-bindendes Protein aktivierter T-Zellen).⁸⁶⁻⁸⁹ Es ist ein 450 AS großes Protein und wird vom *Irf4*-Gen auf dem murinen Chromosom 13 exprimiert.^{**}

In T-Zellen wird die IRF4-Expression durch eine Stimulation über den TZR induziert^{89,90} und spielt sowohl bei CD8⁺ als auch bei CD4⁺ T-Zellen eine wichtige Rolle bei der Differenzierung und Proliferation.⁹¹ Entsprechend bleibt bei *Irf4*-defizienten Tieren nach Infektion mit dem Lymphozytärem Choriomeningitis Virus (LCMV) die Immunantwort von ZTL aus.⁹¹ Bei CD4⁺ T-Zellen wird IRF4 von Th1-, Th2-, Th9-, Th17- und Treg-Zellen exprimiert.⁴⁴ Die Rolle von IRF4 in Th1-Zellen ist noch unklar.⁴⁴ In Th2-Zellen aktiviert IRF4 zusammen mit NFATc2 den *Il4*-Promotor⁹² und ist wichtig für die GATA-3-Expression.⁹³ In Th17-Zellen wurde IRF4 als wichtiger Faktor bei der Zytokinexpression beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass IRF4 durch die Kinase *Rho-associated protein kinase 2* (ROCK2) phosphoryliert wird⁹⁴ und anschließend in den Kern wandert, wo er zusammen mit *Basic leucine zipper transcription factor, ATF-like* (BATF)-JUN Heterodimeren die Expression von IL-17 und IL-21 fördert.^{94,95} Außerdem wurde eine Interaktion von IRF4 mit RORγT beschrieben, die bei der Entwicklung von Th17-Zellen eine Rolle spielt.⁹⁶ Entsprechend ist die Th17-Zelldifferenzierung bei *Irf4*-defizienten Tieren gehemmt, wodurch diese Tiere keine EAE entwickeln.⁹⁷ Weiterhin ist bei *Irf4*-defizienten Mäusen trotz zum Teil sogar erhöhten Zahlen an Treg-Zellen das Auftreten von Th2-assoziierten Autoimmunerkrankungen zu beobachten.⁹⁸ Zurückzuführen ist dieser Phänotyp auf eingeschränkte Effektorfunktionen von Tregs, die bei Wildtyp (WT)-Tieren durch IRF4-Foxp3-Komplexe gesteuert werden und normalerweise die Suppression der Th2-Aktivität regulieren.^{98,99} 2010 wurde IRF4 als essenzieller Transkriptionsfaktor zur Differenzierung von Th9-Zellen beschrieben.³⁹ Neben der Tatsache, dass IRF4 den *Il9*-Promotor bindet und transaktiviert, konnten Staudt et al. zeigen, dass *Irf4*-defiziente Tiere aufgrund einer

^{**} <https://www.uniprot.org/uniprot/Q64287> (27.2.19)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=16364> (27.2.19)

gestörten Th9-Entwicklung im Vergleich zu WT-Tieren kein allergisches Asthma entwickeln.³⁹ Versuche mit BATF-defizienten Mäusen ergaben ähnliche Ergebnisse in Bezug auf die Asthma-Symptomatik.¹⁰⁰ Hier konnte gezeigt werden, dass eine Interaktion von IRF4 mit BATF durch Bindung an den *IL9*-Promotor ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Th9-Differenzierung spielt.^{95,100} Weiterhin konnten IRF4-Komplexe mit IRF8 und PU.1 identifiziert werden, die an der Entwicklung von Th9-Zellen beteiligt sind.¹⁰¹ Auch in Makrophagen wurde IRF4 als Interaktionspartner von PU.1 bei der positiven Regulation der IL-1 β -Expression beschrieben.¹⁰² Bei DCs beeinflusst der Transkriptionsfaktor die Ausprägung von Th2-Antworten¹⁰³ und in Mastzellen ist IRF4 an der Transkription des *IL9*-Gens beteiligt.⁸¹ In B-Zellen wiederum nimmt IRF4 Einfluss auf die Produktion von Antikörpern und deren Klassenwechsel.^{91,104} Die Vielfältigkeit der individuellen Funktionen von IRF4 in den verschiedenen Zell- und Subpopulationen legt nahe, dass der Transkriptionsfaktor in Abhängigkeit seiner Interaktionspartner zur Entstehung von Diversität beiträgt. Die Entwicklung von Methoden, die zum besseren Verständnis der wechselwirkenden Faktoren während der T-Zelldifferenzierung beitragen, ist deshalb von großer Bedeutung.

1.5 Methoden zur Analyse von Protein-DNA- und Protein-Protein-Interaktionen

Für die Analyse von Protein-DNA- und Protein-Protein-Interaktionen stehen verschiedene Techniken zur Verfügung. Eine Methode stellt die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) dar. Hierbei kann die Bindung von DNA-bindenden Proteinen (z.B. Transkriptionsfaktoren) an bestimmte Genbereiche genomweit und *in vivo* untersucht werden. Dazu werden Protein und DNA zunächst fixiert. Anschließend wird das Chromatin fragmentiert und die Protein-DNA-Komplexe mithilfe spezifischer Antikörper präzipitiert. Nach dem Auflösen der Fixierung folgt die Reinigung und Sequenzierung der isolierten DNA (ChIP-Seq).¹⁰⁵ Zur Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Proteinen (z.B. Transkriptionsfaktorkomplexe) gibt es ebenfalls verschiedene Ansätze: darunter Co-Immunpräzipitationen und sogenannte Protein-„Pull-downs“ (im Folgenden als Interaktompräzipitationen (IntP) bezeichnet). Bei der Co-Immunpräzipitation werden wie bei der ChIP-Methode spezifische Antikörper genutzt, um ein bestimmtes Protein mit interagierenden Faktoren aus komplexen Zelllysaten zu isolieren. Für die Durchführung einer IntP wird das zu untersuchende Protein normalerweise *in vitro* mit einer Markierung (z.B. „FLAG-Tag“) versehen und anschließend durch Bindung an einen Affinitätsligand isoliert.¹⁰⁶ In Kombination mit massenspektrometrischen Analysen liefern vor allem IntP zuverlässige Informationen über physiologische Wechselwirkungen zwischen Proteinen.^{107,108} Für all diese Methoden ist eine Affinitätsreinigung der zu untersuchenden Protein-Protein-, bzw. Protein-DNA-Komplexe zwingend

erforderlich, um eindeutige Ergebnisse in der Massenspektrometrie zu erhalten. Ein Ansatz hierzu bietet die im Folgenden beschriebene Affinitätsreinigung mittels Streptavidin nach vorausgegangener *in vivo* Biotinylierung des zu untersuchenden Proteins.

In der vorliegenden Arbeit sollen Biotin-vermittelte Affinitätsreinigungen von *in vivo* biotinyliertem IRF4 etabliert werden. Anstelle von Antikörpern wird Streptavidin genutzt, um den biotinylierten Transkriptionsfaktor – in Komplex mit gebundener DNA („bioChIP“) oder interagierenden Proteinen (Biotin-vermittelte IntP) – zu isolieren. Zu diesem Zweck wurde eine transgene Mauslinie generiert, die ubiquitär die *in vivo* Biotinylierung von IRF4 ermöglicht (siehe Kapitel 1.6 und Abschnitt 4.1.2). Ein großer Vorteil von Biotin-vermittelten Affinitätsreinigungen liegt in der äußerst starken und spezifischen Bindung von Biotin an Streptavidin. Dadurch erübrigt sich die Notwendigkeit von Antikörpern und es können sehr stringente Waschbedingungen gewählt werden, die zur Reduktion unspezifischer Bindungen beitragen.^{105,109} Außerdem ist man nicht auf die Verfügbarkeit von Antikörpern in für ChIP-geeigneter Qualität („ChIP-grade“) angewiesen, die das zu untersuchende Protein auch noch nach einer Behandlung mit Formaldehyd spezifisch binden müssen.¹¹⁰ Zudem existieren wenig endogen biotinylierte Proteine, wodurch Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen (wie sie oft bei Antikörpern zu finden sind) vermieden werden.^{105,108} Eine Einschränkung der Biotin-vermittelten Affinitätsreinigung liegt in der zeitaufwendigen Generierung von Zell- oder Mauslinien, die zur *in vivo* Biotinylierung eines bestimmten Proteins fähig sind. Außerdem besteht bei einer ektopische Überexpression eines Transkriptionsfaktors immer die Gefahr, dass dieser unspezifische Bindungen eingeht und daher zu falsch-positiven Ergebnissen führt.¹⁰⁵ Trotzdem lässt sich festhalten, dass die Biotin-vermittelte Affinitätsreinigung eine äußerst effiziente Methode zur simultanen Analyse von Protein *und* DNA unter physiologischen Bedingungen darstellt.

1.6 *In vivo* Biotinylierung

Biotin, auch unter dem Synonym Vitamin H bekannt, ist ein für alle Lebensformen essenzielles Koenzym. Es wird von Pflanzen, manchen Bakterien sowie einigen Pilzen produziert und wird biologisch aktiv, sobald es kovalent an bestimmte Biotin-abhängige Proteine bindet.¹¹¹ Die Übertragung von Biotin erfolgt durch eine hoch konservierte Biotin-Protein-Ligase (BPL, auch als Biotin-Holoenzym-Synthetase bezeichnet). Ein solches Enzym ist die BirA-Ligase aus *Escherichia coli*.^{111,112} Die BirA-Ligase modifiziert Proteine posttranslational, indem sie spezifisch einen Lysinrest (K) innerhalb einer bestimmten Peptid-Sequenz erkennt, an das sie Biotin koppelt.¹¹¹ Diese Reaktion verläuft in zwei Schritten, ist Adenosintriphosphat (ATP)-abhängig und hoch spezifisch. Zuerst wird eine aktivierte Zwischenform aus Biotin und ATP gebildet. Anschließend bildet sich eine kovalente Amid-Bindung zwischen der Carboxylgruppe des Biotins und der

Aminogruppe des Lysins.^{111,112} Die Abbildung 1-5 zeigt schematisch die enzymatische Reaktion der BirA-Ligase.

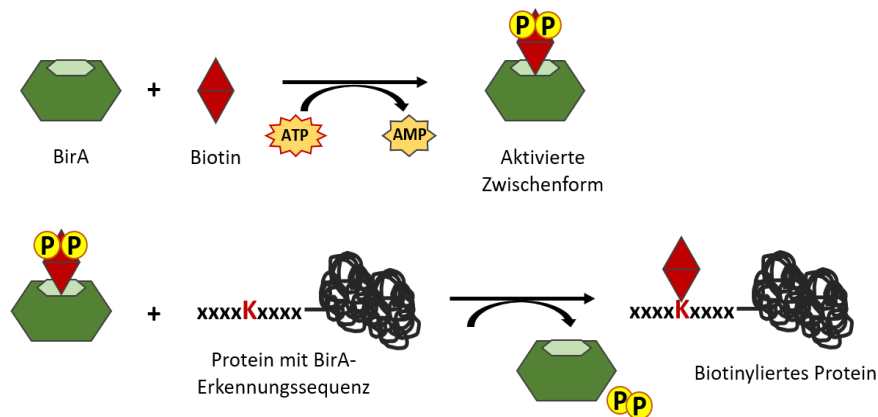


Abbildung 1-5: Schematische Darstellung der Biotinübertragungsreaktion durch die BirA-Ligase

Die Biotin-Ligase BirA überträgt in einer zweischrittigen Reaktion Biotin auf Proteine. Zuerst wird eine aktivierte Zwischenform aus Biotin und Adenosintriphosphat (ATP) gebildet. Anschließend überträgt die BirA-Ligase Biotin auf ein bestimmtes Lysin (K) in einer dem Protein anhängenden und für die BirA spezifischen Erkennungssequenz. AMP = Adenosinmonophosphat; P = Phosphat.

Biotin hat eine bemerkenswert starke Affinität zu Streptavidin ($K_d \approx 10^{-15} \text{ M}$),¹¹³ und zählt damit zu den stärksten nicht-kovalenten Wechselwirkungen in der Biologie.¹¹⁴ Diese Eigenschaft kann man sich für Affinitätsreinigungen zu Nutze machen. Ein interessanter Ansatz besteht darin, einem bestimmten Protein die Erkennungssequenz der BirA-Ligase (BirA-ES) anzuhängen. Wird in Zellen das modifizierte Protein gemeinsam mit der BirA-Ligase co-exprimiert, so führt dies zur *in vivo* Biotinylierung des markierten Proteins. Dieses kann anschließend durch die Bindung an Streptavidin isoliert werden.^{105,113}

2 Zielsetzung der Arbeit

Bereits 2010 konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass T-Helferzellen (Th) Typ 9 (Th9)-Zellen durch die Produktion ihres Subtyp-spezifischen Zytokins Interleukin-9 (IL-9) an der Pathogenese von Asthma beteiligt sind. Interferon regulierender Faktor 4 (IRF4), ein Transkriptionsfaktor, der für die Differenzierung von Th9-Zellen als essenziell beschrieben wurde, bindet und transaktiviert den *Il9*-Promotor. Entsprechend zeigen *Irf4*-defiziente Tiere im Vergleich zu Wildtyp-Tieren eine geringere IL-9-Produktion und entwickeln deutlich mildere Symptome bei allergischem Asthma.³⁹

Ziel dieser Arbeit ist die funktionelle Charakterisierung von IRF4 sowohl auf Protein- als auch auf DNA-Ebene.

Zu diesem Zweck soll eine Mauslinie generiert werden, die IRF4 aufgrund einer transgenen Mutation ubiquitär und konstitutiv *in vivo* biotinyliert. Anschließend können Zellen dieser transgenen Linie dazu genutzt werden, Biotin-vermittelte Affinitätsreinigungen zu etablieren. Hierbei kann IRF4 im Komplex mit interagierenden Proteinen durch Streptavidin aus Zellextrakten isoliert werden. Eine anschließende Analyse per Western Blot und Massenspektrometrie soll Aufschluss über das IRF4-Interaktom in Th9-Zellen geben. Gleichzeitig kann mithilfe einer Biotin-vermittelten Chromatin-Immunpräzipitation („bioChIP“), in der die Präzipitation über Streptavidin erfolgt, IRF4-gebundene DNA isoliert werden. Eine nachfolgende Sequenzierung der präzipitierten und gereinigten DNA wird zur genomweiten Identifizierung IRF4-gebundener Genen führen.

Die „bioChIP“-gestützte Analyse der transgenen Zielzellen führt somit zur Identifizierung von IRF4-regulierten Genen, wobei gleichzeitig die Identität der assoziierten Proteine des IRF4-Interaktoms über eine Biotin-vermittelte IRF4-Interaktompräzipitation (IRF4-IntP) geklärt wird.

3 Material und Methoden

3.1 Verbrauchsmaterialien

Alle Verbrauchsmaterialien wurden steril bezogen.

Tabelle 3-1: Bezugsliste der Verbrauchsmaterialien

| Verbrauchsmaterial | Hersteller |
|--|--|
| Elektroporationsküvette 4 mm | Bio-Rad (München, Deutschland) |
| High Sensitivity DNA Chips | Agilent Technologies (Santa Clara, USA) |
| Kanülen (0,55x25 mm; 0,8x40 mm) | BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland) |
| Kryoröhrchen | Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) |
| LS-Separationssäulen | Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach, Deutschland) |
| Luminometer Reagenzgefäße | Turner Designs (Sunnyvale, USA) |
| Objektträger | Diagonal (Münster, Deutschland) |
| Optisch ultraklare Klebefolie | Axon Labortechnik (Kaiserslautern, Deutschland) |
| Pasteurpipetten | VWR International (Darmstadt, Deutschland) |
| PCR Mikroplatte | Corning Inc. (New York, USA) |
| Petrischalen | Greiner (Frickenhausen, Deutschland) |
| Pipettenspitzen (10 µl; 100 µl; 1000 µl) | Starlab (Hamburg, Deutschland) |
| Protein LoBind Reaktionsgefäße (1,5 ml) | Eppendorf (Hamburg, Deutschland) |
| PVDF Membran Immobilion®-P, 0,45 µm | Millipore (Billerica, USA) |
| Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml) | Greiner (Frickenhausen, Deutschland) |
| Reaktionsgefäße (15 ml; 50 ml) | Greiner (Frickenhausen, Deutschland) |
| Sep-Pak tC18 96-well µElution Platte | Waters (Milford, USA) |
| Serologische Pipetten (10 ml, 5 ml) | Nerbe Puls (Winsen/Luhe, Deutschland) |
| Spritzen (1ml) | B. Braun (Melsungen, Deutschland) |
| Spritzen (10ml) | BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland) |
| TPX Reaktionsgefäße (1,5 ml) | Diagenode (Seraing, Belgien) |
| Whatman Papier | Whatman (München, Deutschland) |
| Zellkulturplatte (96-Well, 24-Well) | Greiner (Frickenhausen, Deutschland) |
| Zellsieb (40 µm) | Greiner (Frickenhausen, Deutschland) |

3.2 Geräte und Hilfsmittel

Tabelle 3-2: Bezugsliste der Geräte und Hilfsmittel

| Gerät/Hilfsmittel | Hersteller |
|---------------------------------|--|
| 6-Tube-Magnetic Separation Rack | Cell Signaling Technology (Danvers, USA) |
| 2100 Bioanalyzer® | Agilent Technologies (Santa Clara, USA) |
| BioPhotometer Plus | Eppendorf (Hamburg, Deutschland) |
| Bioruptor® Plus | Diagenode (Seraing, Belgien) |
| CO2 Inkubator | Sanyo (München, Deutschland) |

| | |
|--|---|
| Feinwaage | Sartorius (Göttingen, Deutschland) |
| Gefrierschrank/-truhe (-20 °C, -70 °C) | Liebherr (Biberach an der Riß, Deutschland) |
| Gefriertrocknungsanlage GT2 | Heraeus (Hanau, Deutschland) |
| Gel Dokumentationssystem Chemi Doc XRS | Bio-Rad (München, Deutschland) |
| Gel Dokumentationssystem Gel Doc XR | Bio-Rad (München, Deutschland) |
| Genepulser II | Bio-Rad (München, Deutschland) |
| GENios Mikrotiterplattenleser | Tecan Group AG (Männedorf, Schweiz) |
| Heizblock | HLC (Eschborn, Deutschland) |
| HiSeq2500 | Illumina (Eindhoven, Niederlande) |
| Inkubations-Wasserbad | Memmert (Schwabach, Deutschland) |
| Kühlschrank | Liebherr (Biberach an der Riß, Deutschland) |
| Luminometer TD-20/20 | Turner Designs (Sunnyvale, USA) |
| Massenspektrometer Synapt G2-S | Waters (Milford, USA) |
| Mikroskop, ID03 | Zeiss (Oberkochen, Deutschland) |
| Mikroskop, Axio Vert.A1 | Zeiss (Oberkochen, Deutschland) |
| NanoAcquity UPLC System | Waters (Milford, USA) |
| Netzteil, EPS 3500 XL | Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden) |
| Neubauerzählkammer | Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| PAGE-Equipment (1D-PAGE) Mini Protean® | Bio-Rad (München, Deutschland) |
| pH-Meter, CG 840 | Schott (Mainz, Deutschland) |
| Pipetboy comfort | Integra Biosciences (Fernwald, Deutschland) |
| Pipetten (10 ml, 5 ml) | Hirschmann (Eberstadt, Deutschland) |
| Pipetten: BioPette Plus (1-10 µl; 10-100 µl; 20-200 µl; 100-1000 µl) | Axon Labortechnik (Kaiserslautern, Deutschland) |
| Präparierbesteck | Hammacher (Solingen, Deutschland) |
| qRT-PCR Cycler (Step One Plus) | Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland) |
| QuadroMACS™ Separator | Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach, Deutschland) |
| Qubit® 2.0 Fluorometer | Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland) |
| Rotator | IKA (Staufen, Deutschland) |
| Schwenkinkubator DRS-12 | NeoLab (Heidelberg, Deutschland) |
| Sterilbank (MSC Advantage) | Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland) |
| Trans-Blot® Turbo™ Transfer System | Bio-Rad (München, Deutschland) |
| Vortexer | VWR (Darmstadt, Deutschland) |
| Waage | Sartorius (Göttingen, Deutschland) |
| <u>Zentrifugen</u> | |
| Biofuge fresco | Heraeus (Hanau, Deutschland) |
| Megafuge 40R | Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland) |
| Multifuge 3L-R | Heraeus (Hanau, Deutschland) |
| Mini Centrifuge MCF-2360 | LMS Co. (Tokyo, Japan) |

3.3 Chemikalien, Reagenzien und Medienzusätze

3.3.1 Standardchemikalien

Alle Standardchemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogen. Alle Chemikalien, die zur Massenspektrometrie eingesetzt wurden, wurden in LC-MS-Grade Qualität verwendet.

3.3.2 Reagenzien und Medienzusätze

Tabelle 3-3: Bezugsliste der Reagenzien und Medienzusätze

| Reagenz | Hersteller |
|---|---|
| Bovines Serumalbumin (BSA) | PAN Biotech (Aidenbach, Deutschland) |
| Clarity™ Western ECL Blotting Substrate | Bio-Rad (München, Deutschland) |
| DMEM-Trockenpulver | PAN Biotech (Aidenbach, Deutschland) |
| DNA-Loading Dye, 6x | Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland) |
| DreamTaq Puffer, 10x | Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland) |
| DreamTaq DNA Polymerase (5U/μl) | Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland) |
| Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 | Invitrogen (Darmstadt, Deutschland) |
| Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin T1 | Invitrogen (Darmstadt, Deutschland) |
| Dynabeads™ Streptavidin M-270 | Invitrogen (Darmstadt, Deutschland) |
| Dynabeads™ Streptavidin M-280 | Invitrogen (Darmstadt, Deutschland) |
| Fetales Kälberserum (FCS) | Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) |
| Formaldehyd, 16% (w/v) | Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland) |
| GeneRuler™ 100 bp DNA-Leiter | Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland) |
| MEM Trockenpulver | PAN Biotech (Aidenbach, Deutschland) |
| Natriumpyruvat | Serva (Tübingen, Deutschland) |
| PageRuler™ Plus (10-250 kDa) | Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland) |
| Penicillin/Streptomycin | Serva (Tübingen, Deutschland) |
| Phenolrot | Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) |
| Proteinase Inhibitor Cocktail (PIC) | Roche (Mannheim, Deutschland) |
| Proteinase K (20 mg/ml) | Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) |
| QPCR Mix EvaGreen® (no Rox), 5x | Axon Labortechnik (Kaiserslautern, Deutschland) |
| RapiGest | Waters (Milford, USA) |
| RIPA-Puffer | Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland) |
| RNase A (10 mg/ml) | Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland) |
| Streptavidin-Meerrettichperoxidase (SA-HRP) | Roche (Mannheim, Deutschland) |
| Streptavidin MicroBeads | Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach, Deutschland) |
| Trypanblau | Calbiochem (Darmstadt, Deutschland) |
| Trypsin Gold MS Grade | Promega (Mannheim, Deutschland) |

3.4 Lösungen, Puffer und Zellkulturmedien

3.4.1 Lösungen und Puffer

Aminosäure-Lösung (AS-Lösung)

Reagenzien für die AS-Lösung wurden entweder von der Firma Serva (Tübingen, Deutschland) oder Sigma (Steinheim, Deutschland) bezogen.

In vollentsalztem (VE)-Wasser wurden folgende AS gelöst: 32 mM Alanin; 17 mM Asparagin; 26 mM Asparaginsäure; 58 mM Glutaminsäure; 40 mM Prolin; 114 mM Natriumpyruvat. Diese Mischung wurde 3 h auf 40 °C erhitzt. Währenddessen wurde eine zweite Lösung, bestehend aus 1 mM Biotin; 184 µM Vitamin B12 und 1 M HCl (1:2000) in VE-Wasser angesetzt. Diese zweite Lösung wurde anschließend der AS-Mischung in einem Verhältnis von 1:185 zugegeben.

Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung

Zur Probenvorbereitung für eine massenspektrometrische Analyse wurde eine 50 mM Lösung aus Ammoniumhydrogencarbonat in LC-MS-Grade Wasser angesetzt.

Blockpuffer für Western Blot

Zum Blocken der PVDF-Membran wurde eine 10%ige BSA-Stammlösung mit TBS-T (s.u.) im Verhältnis 1:1 gemischt (entspricht 5% BSA in TBS-T).

Blotpuffer

Zum Transfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran mittels Western Blot wurde Blotpuffer aus dem „Trans-Blot® Turbo™ RTA Transfer Kit“ nach Herstellerangaben angesetzt.

Bovines Serumalbumin (BSA)-Stammlösung

Es wurde eine 10%ige Lösung aus BSA in PBS (s.u.) angesetzt. Anschließend wurde die Lösung steril filtriert (0,2 µm) und bei 4 °C aufbewahrt.

ChIP-Lysepuffer

50 mM Tris; pH = 7,9

10mM EDTA; pH = 8

1% (w/v) SDS

in Nuklease-freiem Wasser

Elutionspuffer

10 mM Tris; pH = 7,9
5 mM EDTA; pH = 8
1% (w/v) SDS
300 mM NaCl

in Nuklease-freiem Wasser

Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Stammlösung

Es wurde eine 0,5 M Lösung aus EDTA in VE-Wasser angesetzt und der pH-Wert mit 10 M NaOH auf 8 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung autoklaviert und bei 4 °C aufbewahrt.

Fetales Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS)

FCS wurde zur Inaktivierung der Komplementkomponenten 45 min auf 56 °C erhitzt und anschließend bei 4 °C gelagert. Vor Verwendung wurde es in 50 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und 20 min bei 1100xg zentrifugiert. Der Überstand wurde zum Ansetzen von Zellkulturmedien verwendet.

Gey's Lysepuffer

16 mM NH₄Cl
10 mM KHCO₃
126 µM EDTA

in VE-Wasser; pH = 7,4

Glutamin-Lösung

Es wurde eine 200 mM Lösung aus Glutamin in VE-Wasser angesetzt. Die Lösung wurde anschließend steril filtriert (0,2 µm).

Großer MACS-Puffer (GM-Puffer)

0,5% (v/v) BSA-Stammlösung
5 mM EDTA
0,01% (w/v) NaN₃

in PBS (s.u.)

Harnstoffpuffer

0,1 M Tris
8 M Urea (Harnstoff)

in VE-Wasser; pH = 8,5

Hypotonischer Puffer zur Herstellung von Kernlysaten

20 mM Tris-HCl
10 mM NaCl
3 mM MgCl₂

in VE-Wasser; pH = 7,4

IP-Puffer

30 mM Tris; pH = 7,9
2 mM EDTA; pH = 8
165 mM NaCl
0,3% (w/v) SDS
1% (v/v) Triton X-100

in Nuklease-freiem Wasser

Kopplungspuffer

Zum Ansetzen von Kopplungspuffer wurde eine Lösung aus 0,1 M Na₂HPO₄ in VE-Wasser hergestellt und der pH-Wert auf 9,2 gebracht.

Mobile Phase A

0,1% (v/v) Ameisensäure
3% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO)

in LC-MS-Grade Wasser

Mobile Phase B

0,1% (v/v) Ameisensäure
3% (v/v) DMSO

in Acetonitril

Natriumpyruvat-Lösung

Es wurde eine 0,1 M Lösung aus Natriumpyruvat in VE-Wasser angesetzt. Die Lösung wurde anschließend steril filtriert (0,2 µm).

NP-40-Lösung (zur Herstellung von Kernlysaten)

Es wurde eine 10%ige Lösung aus NP-40 in VE-Wasser angesetzt.

NP-40-Puffer (zum Waschen von SA-Beads)

10 mM HEPES
250 mM KCl
1,5 mM MgCl₂
0,25 mM EDTA
0,1% (v/v) NP-40

in VE-Wasser; pH = 7,9

Penicillin/Streptomycin-Lösung

172 µM Penicillin
137 µM Streptomycin

in VE-Wasser

Phosphat gepufferte Salzlösung (*phosphate-buffered saline, PBS*)

1,4 M NaCl
0,1 M NaH₂PO₄

in VE-Wasser; pH = 7,4

PBS wurde anschließend autoklaviert.

Proteinase-Inhibitor-Cocktail (PIC)-Stammlösung (50x)

Zum Ansetzen einer 50-fach konzentrierten (50x) Stammlösung wurde eine Tablette Proteinase-Inhibitor Cocktail von Roche (Mannheim, Deutschland) in 1 ml Nuklease-freiem Wasser gelöst.

RIPA-Puffer

25 mM Tris-HCl
150 mM NaCl
1% (v/v) NP-40
1% (w/v) Natriumdeoxycholat
0.1% (w/v) SDS

in VE-Wasser; pH = 7,6

Außerdem wurden RIPA-Puffer mit 0,5%; 1%; 2% und 3% (w/v) SDS verwendet. Die Pufferzusammensetzung mit 0,1% SDS entspricht der Zusammensetzung des RIPA-Puffers der Firma Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland).

Sammelgel

| | |
|--------|--|
| 3,2 ml | VE-Wasser |
| 1,2 ml | 0,5 M Tris-HCl-Lösung (in VE-Wasser; pH = 6,8) |
| 0,5 ml | Acrylamid (40%, 1:29) |
| 50 µl | 10% (w/v) SDS-Lösung (in VE-Wasser) |
| 25 µl | 10% (w/v) APS-Lösung (in VE-Wasser) |
| 5 µl | TEMED |

Das Puffergemisch wurde direkt nach dem Ansetzen zum Aushärten in eine entsprechende Apparatur gegossen.

SDS-Ladepuffer (5-fach, (5x))

| | |
|---------|----------------|
| 40 ml | Glycerin |
| 6,8 g | Tris-Base |
| 6,6 g | Tris-HCl |
| 8 g | SDS |
| 0,06 g | EDTA |
| 0,085 g | DTT |
| 0,075 g | Bromphenolblau |
| 0,025 g | Bromphenolrot |

in 60 ml VE-Wasser

SDS-Laufpuffer

| | |
|------------|--------|
| 25 mM | Tris |
| 190 mM | Glycin |
| 0,1% (w/v) | SDS |

in VE-Wasser

Stripping Puffer

| | |
|------------|--------|
| 0,1 M | Glycin |
| 0,1% (w/v) | SDS |

in VE-Wasser; pH = 2,5

Trenngel

| | |
|--------|--|
| 4,8 ml | VE-Wasser |
| 2,5 ml | 1,5 M Tris-HCl-Lösung (in VE-Wasser; pH = 8,6) |
| 2,5 ml | Acrylamid (40%, 1:29) |
| 100 µl | 10% (w/v) SDS-Lösung (in VE-Wasser) |
| 50 µl | 10% (w/v) APS-Lösung (in VE-Wasser) |
| 10 µl | TEMED |

Das Puffergemisch wurde direkt nach dem Ansetzen zum Aushärten in eine entsprechende Apparatur gegossen.

Tris-Borsäure-EDTA (TBE)-Puffer

108 g/l Tris
55 g/l Borsäure
8,3 g/l Na-EDTA

in VE-Wasser

Tris-gepufferte Salzlösung (Tris-buffered saline, TBS)

150 ml NaCl
12,7 mM Tris

in VE-Wasser; pH = 7,4

Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween (TBS-T)

Zur Herstellung von TBS-T wurde TBS mit 1% (v/v) Tween-20 versetzt.

Trypanblau-Lösung

0,05% (w/v) Trypanblau
140 mM NaCl
10 mM NaH₂PO₄

in VE-Wasser

Trypsin-Lösung

Zum tryptischen Verdau von Proteinen wurde 1 µg/µl Trypsin in Essigsäure gelöst.

Tween-Waschpuffer für eine IRF4-Interaktompräzipitation (IRF4-IntP)

Zum Waschen von Streptavidin (SA) beschichteten Kügelchen (SA-Beads) wurde 0,1% (v/v) Tween-20 in PBS gelöst.

Waschpuffer für eine Biotin-vermittelte Chromatin Immunpräzipitation (bioChIP)

Waschpuffer 1

2% (w/v) SDS in Nuklease-freiem Wasser

Waschpuffer 2

10 mM Tris; pH = 7,9
1 mM EDTA; pH = 8
250 mM LiCl
1% (w/v) NP-40
1% (w/v) Natriumdesoxycholat

in Nuklease-freiem Wasser

Waschpuffer 3

20 mM Tris; pH = 7,9
1 mM EDTA; pH = 8
50 mM NaCl
0,1% (w/v) SDS

in Nuklease-freiem Wasser

3.4.2 Zellkulturmedien

Iscove`s Medium (*Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium, IMDM*)

DMEM Trockenpulver wurden folgende Reagenzien hinzugefügt:

44 mM NaHCO₃
12,5 mM HEPES
1:100 AS-Lösung
1:2500 58 µM Cystein-Lösung (in 0,25 M HCl)
128 µM Natrium-Selenit
1% (v/v) Penicillin/Streptomycin-Lösung
50 µM β-Mercaptoethanol

in VE-Wasser; pH = 6,9

Phenolrot wurde als pH-Indikator zugegeben und das Medium steril filtriert (0,2 µm).

Kit-Ligand-Mastzellfutter (KL-MZF)

20 U/ml murines (m) IL-3
50 U/ml mIL-4
200 ng/ml rekombinanter Kit-Ligand

in TM + 10% FCS (s.u.)

Minimal Essential Medium (MEM)

MEM Trockenpulver wurden folgende Reagenzien zugefügt

1% (v/v) Penicillin/Streptomycin-Lösung
50 µM β-Mercaptoethanol

in VE-Wasser

Phenolrot wurde als pH-Indikator zugegeben und das Medium steril filtriert (0,2 µm). Für die Präparation von Milzzellen wurde das Medium zusätzlich mit 2% (v/v) FCS versetzt.

T-Helferzelle Typ 9 (Th9-Zelle) -Differenzierungsmedium (Tag 0)

8 ng/ml TGF- β 1 (Transformierender Wachstumsfaktor-beta1)
 600 U/ml mIL-4
 10 μ g/ml anti-IL-6
 10 μ g/ml anti-IFN-gamma
 500 ng/ml mIL-2

in TM + 10% FCS (s.u.)

Tag 0 Medium wird für die Differenzierung von Th9-Zellen an Tag 0 mit naiven CD4⁺ Zellen in TM + 10% FCS im Verhältnis 1:2 verdünnt.

Th9-Kulturmedium (Tag 3)

1 ng/ml TGF- β 1 (Transformierendem Wachstumsfaktor-beta1)
 300 U/ml mIL-4
 100 U/ml Proleukin (humanes IL-2)

in TM + 10% FCS (s.u.)

Testmedium (TM) + 5% FCS und TM + 10% FCS

1% (v/v) Natriumpyruvat-Lösung
 1% (v/v) Glutamin-Lösung
 5 oder 10% (v/v) FCS

in IMDM

3.5 Zytokine und Stimulantien

Zytokine, die im eigenen Labor hergestellt wurden, wurden über eine Affinitätschromatographie aufgereinigt.

Tabelle 3-4: Bezugsliste der Zytokine und Stimulantien

| Zytokin/Reagenz zur Stimulation | Hersteller |
|---------------------------------|--|
| Ionomycin | Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) |
| murines IL-2 (mIL-2) | Eigene Herstellung: Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Mainz (Mainz, Deutschland) |
| murines IL-3 (mIL-3) | Eigene Herstellung: Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Mainz (Mainz, Deutschland) |
| murines IL-4 (mIL-4) | Eigene Herstellung: Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Mainz (Mainz, Deutschland) |
| porcines TGF- β 1 | R&D Systems (Minneapolis, USA) |
| Proleukin | Novartis Pharma GmbH (Nürnberg, Deutschland) |
| rekombinantes IL-1 β | R&D Systems (Minneapolis, USA) |
| rekombinanter Kit-Ligand | Eigene Herstellung: Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Mainz (Mainz, Deutschland) |

3.6 Antikörper

Tabelle 3-5: Antikörper zur Differenzierung von Th9-Zellen

| Antikörper | Klon | Bezogen von |
|--------------------|-----------|--|
| Anti-CD4-bio | H129.19 | Dr. H. Huber (Hautklinik der Universität Mainz); Pierres et al. ¹¹⁵ |
| Anti-CD25-bio | PC61 | TIB-222™ von ATCC (LGC Standards GmbH; Wesel, Deutschland); Lowenthal et al. ¹¹⁶ |
| Anti-CD28 | 37.51 | Dr. J.P. Allison durch Dr. G. Leclerq (Universität Gent, Belgien); Gross et al. ¹¹⁷ |
| Anti-CD3 | 145-2C11 | Dr. J. A. Bluestone (Ben May Institute, Department of Pathology, Chicago, USA); Samelson et al. ¹¹⁸ |
| Anti-IFN- γ | XMG1.2 | Dr. A. O'Garra (DNAX Research Institute, Palo Alto, USA) |
| Anti-IL-6 | D6906B4.M | Dr. J. van Snick (Ludwig Institute for Cancer, Brüssel) |

Tabelle 3-6: Antikörper für Western Blot

| Antikörper | Klon | Bezogen von |
|--------------------------|-------|--|
| Anti-IRF4 | F-4 | Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland) |
| Anti-Maus-IgG-HRP | -- | Cell Signaling Technology (Danvers, USA) |
| Anti- β -Aktin-HRP | AC-15 | Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) |

3.7 Oligonukleotide („Primer“) und Plasmide

3.7.1 Primer zur Typisierung der verwendeten Mausstämme

| | |
|-------------------|-----------------------------------|
| IRF4-bio.for: | 5' - AGAGATGCAACCTACATCCTCAC - 3' |
| IRF4-bio.rev: | 5' - GTTGATTGATCGAATTGAGGCAC - 3' |
| Rosa26-BirA.for1: | 5' - GCCAGCCAGAATTTATATGCAG - 3' |
| Rosa26-BirA.for2: | 5' - GTGTAAGTGTGGACAGAGGAG - 3' |
| Rosa26-BirA.rev: | 5' - GAACTTGATGTGTAGACCAGG - 3' |

3.7.2 Primer zum Nachweis von präzipitierter DNA mittels qRT-PCR

| | |
|------------------|----------------------------------|
| IL10 Intron.for: | 5' - AATCCGAGAAACCCACCA - 3' |
| IL10 Intron.rev: | 5' - TCCATACCAAACCCAG - 3' |
| Ezh2.for: | 5' - CTTCTCAACCCCTTCCCTAAGA - 3' |
| Ezh2.rev: | 5' - CACCTTATCCCAAAGGCAAGG - 3' |

3.7.3 Plasmide zur Durchführung eines Reporteragenassays

Leervektor (pcDNA3.1) Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)

Expressionsvektoren Das *Irf4* Gen, bzw. *Irf4* mit anhängender BirA-Erkennungssequenz, wurde unter der Kontrolle des aus *Cytomegalovirus* (CMV) stammenden Promotors in pcDNA geklont.

IL-9-Promotor-pGL3 (*I19* prom)

Die 5'-Region des murinen *I19* Gens (Core-Promotor: -610 bis +32) wurde mittels PCR amplifiziert.

Folgende Primer wurden dazu verwendet:

mIL-9-Prom.for: 5' - CCGGATCCTCAAGGCCAATGCTAGC - 3'

mIL-9-Prom.rev: 5' - GTGTAAGCTTGACGGGAGTCTGGAAGCTC - 3'

Die Sequenz wurde anschließend via DNA-Sequenzierung (Genterprise, Mainz, Deutschland) überprüft. Über die Restriktionsschnittstellen BamHI und HindIII wurde der *I19*-Core-Promotor in den Basis-Luciferase-Reportergenvektor pGL3 (Promega, Mannheim, Deutschland) kloniert.

Reporterkonstrukt für die Renilla Luciferase (pRL-TK) Promega (Mannheim, Deutschland)

3.7.4 *Irf4*^{BirA-ES}-BAC

Zur Generierung der transgenen Mauslinie *Irf4*^{BirA-ES} wurde der BAC RP23-206G12 (Chr. 13; 30.672.942 – 30.866.005) verwendet. In diesen wurde die Erkennungssequenz der BirA-Ligase (BirA-ES) über homologe Rekombination integriert. Die folgende Abbildung 3-1 zeigt die Nukleotid- und AS-Sequenz der BirA-ES. Die ausführliche Nukleotidsequenz ist in Abbildung 9-1 dargestellt (siehe Kapitel 9 Anlage).

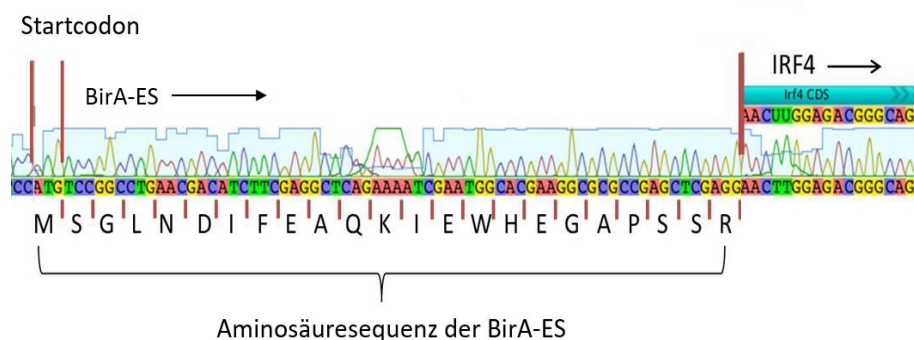


Abbildung 3-1: BirA-Erkennungssequenz (BirA-ES)

Die Abbildung zeigt die Erkennungssequenz der BirA-Ligase (BirA-ES). Die Nukleotid-Sequenz ist in bunt dargestellt, die entsprechende AS-Sequenz darunter in schwarz. Das ursprüngliche Startcodon der *Irf4* codierenden Sequenz (CDS) fehlt in der Vektorsequenz.

3.8 Kits

Tabelle 3-7: Bezugsliste der verwendeten Kits

| Kit | Hersteller |
|---------------------------------------|---|
| 660 nm Protein Assay Kit | Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland) |
| μMACS FactorFinder Kit | Milteneyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland) |
| Dual-Luciferase® Reporter Assay | Promega (Mannheim Deutschland) |
| NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit | Illumina (Eindhoven, Niederlande) |
| QIAquick PCR Purification Kit | Qiagen (Hilden, Deutschland) |
| Qubit® dsDNA HS Assay Kit | Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland) |
| Trans-Blot® Turbo™ RTA Transfer Kit | Bio-Rad (München, Deutschland) |

3.9 Tiere

Alle Tiere waren zum Zeitpunkt der Organentnahme zwischen 6 und 16 Wochen alt und wurden in der pathogenfreien Tierhaltungseinrichtung des „Translational Animal Research Center“ (TARC) auf dem Gelände der Universitätsmedizin Mainz gezüchtet und unter einem künstlichen 12 h Tag-Nacht-Rhythmus gehalten.

BirA-transgene Mäuse, die die bakterielle Biotin-Protein-Ligase *BirA* als *Knock-in* im *Rosa26* Genlocus exprimieren,¹¹³ wurden auf einem C57BL/6-Hintergrund gezüchtet und von Dr. S. Klein-Heßling (Marburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt. In Anlehnung an die Publikation von Kim et al.¹⁰⁵ und in Zusammenarbeit mit der Firma Cyagen US Inc. (Santa Clara, CA, USA) wurde die Mauslinie *Irf4*^{BirA-ES} generiert. Alle Tiere dieser Linie exprimieren ein Fusionsprotein aus IRF4 und der für die Biotinligase *BirA* spezifischen Erkennungssequenz (siehe Abbildung 3-1) unter der Kontrolle des endogenen *Irf4*-Promotors. Die entsprechende Nukleotidsequenz, die zur Erstellung des Genetisch Veränderten Organismus (GVO) in den BAC RP23-206G12 integriert wurde, findet sich in Abbildung 9-1 (siehe Kapitel 9 Anlage). Mäuse dieser *Irf4*^{BirA-ES}-Linie wurden mit den oben genannten *BirA*-exprimierenden Mäusen gekreuzt. Alle Nachkommen dieser Kreuzung exprimieren konstitutiv und ubiquitär N-terminal-biotinyliertes IRF4 und werden im Folgenden mit „*Irf4*^{Bio}“ bezeichnet. *BirA*-exprimierende Geschwistertiere derselben Zucht, an die das Transgen zur Expression des Fusionsproteins nicht weitervererbt wurde, werden nachfolgend als Wildtyp (WT^(*BirA*)) bezeichnet. Alle Mäuse wurden mithilfe spezifischer Primer (siehe Abschnitt 3.7.1) über PCR typisiert.

3.10 Zellkultur

Alle Arbeiten mit Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

3.10.1 Waschen von Zellen und Probenmaterial

Zum Waschen von Zellen und Probenmaterial wurde die entsprechende Probe je nach Methode unter bestimmten Einstellungen zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und durch frisches Medium oder Puffer ersetzt. Mehrmaliges auf- und abpipettieren führte zur Resuspension der Probe.

3.10.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden Zellen in eine definierte Menge Kulturmedium geerntet und anschließend 1:10 oder 1:100 mit physiologischer Trypanblau-Lösung in einer 96-Well-Platte verdünnt. Da tote Zellen eine nicht mehr intakte Zellmembran aufweisen, dringt der Farbstoff in die Zelle ein und färbt diese blau. Lebende Zellen erscheinen im Lichtmikroskop farblos. Mithilfe einer Neubauer-Zählkammer kann die Zahl der lebenden Zellen bestimmt werden. Hierfür wurden 4x16 Einzelquadrate ausgezählt und der Mittelwert bestimmt. Die ermittelte Zellzahl (N) ergibt durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor (V) und dem Zählkammer-spezifischem Kammerfaktor (10^4) die genau Anzahl der lebenden Zellen pro Milliliter.

$$\text{Lebendzellzahl/ml} = N \times 10^4 \times V$$

3.10.3 Präparation, Differenzierung und Kultivierung von Knochenmarksmastzellen

Um Mastzellen aus dem Knochenmark zu isolieren, wurden 6 bis 16 Wochen alte Mäuse mit CO₂ betäubt und getötet. Femur und Tibia der Hinterbeine wurden frei präpariert und das Knochenmark unter Verwendung einer 10 ml Spritze mit aufgesetzter 0,55 x 25 mm Kanüle mit MEM heraus gespült. Die Zellen wurden resuspendiert bis eine homogene Zellsuspension vorlag und anschließend zentrifugiert (10 min bei 500xg). Erythrozyten wurden durch einen osmotischen Schock lysiert, indem das Zellpellet in Gey`s Lysepuffer aufgenommen und resuspendiert wurde. Nach genau 2 min wurde die Lyse durch Zugabe von mindestens 5 ml MEM pro Maus gestoppt. Um die Zellsuspension von restlichen Gewebe- und Knochenstückchen zu befreien, wurde sie über ein 40 µm Zellsieb gegeben. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 10 ml/Maus Kit-Ligand-Mastzellfütter (KL-MZF) aufgenommen und im Volumen von jeweils 1 ml in *wells* einer 24-Well-Platte überführt.

Die Differenzierung und Kultivierung erfolgten bei 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5% im Brutschrank. Alle zwei bis drei Tage wurde das Medium zur Hälfte durch frisches KL-MZF ersetzt und die Zellen in eine neue 24-Well-Platte überführt. Dabei bleiben adhärenente Zellen, wie Makrophagen und Fibroblasten, auf dem Boden der alten Zellkulturplatte zurück. Nach etwa vier Wochen erhält man dadurch eine mindestens 95% reine Kultur an Knochenmarksmastzellen (*bone marrow-derived mast cells*, BMMC).

3.10.4 *In vitro* Stimulation von Mastzellen

Zur Stimulation von Mastzellen wurde Ionomycin verwendet. Ionomycin funktioniert als Ionophor und simuliert *in vitro* die Aktivierung von Mastzellen über den hoch affinen IgE-Rezeptor I (FcεRI). Es verursacht einen Calcium-Influx in das Cytoplasma der Zellen, wodurch verschiedene Aktivierungsprozesse – unter anderem die Produktion von Zytokinen – in Gang gesetzt werden.¹¹⁹

Mastzellen wurden geerntet, gezählt und mit einer Dichte von 1 bis 2x10⁶ Zellen/ml KL-MZF in *wells* einer 24-Well-Platte ausgesät. Die Stimulation erfolgte mittels Ionomycin, das je nach biologischer Aktivität der verwendeten Ionomycin-Charge in einer Endkonzentration von 0,75 µM oder 1 µM zugegeben wurde. Nach einer Transfektion (siehe Kapitel 3.11) wurden die Zellen mit 0,375 µM Ionomycin stimuliert. Versuchsabhängig wurde zusätzlich IL-1β in einer Endkonzentration von 1 ng/ml zur Unterstützung der *IL9*-Transkription ins Medium gegeben.

3.10.5 Präparation von Milzzellen

Um eine Einzelzellsuspension aus der Milz zu erhalten wurden maximal zwölf Wochen alte Mäuse mit CO₂ betäubt und getötet. Anschließend wurde die Milz aus der Maus präpariert und mit dem Stempel einer 1 ml Spritze über einem 40 µm Zellsieb zerrieben. Pro Sieb wurden für diese Arbeit nicht mehr als drei Milzen aufgearbeitet. Zellsieb und Spritzenstempel wurden mit MEM + 2% FCS gespült und die Zellsuspension in einem 50 ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Danach wurden die Zellen zentrifugiert (10 min bei 600xg), zur Lyse der Erythrozyten in 500 µl/Milz Gey's Lysepuffer aufgenommen, gut resuspendiert und für 2 min inkubiert. Durch die Zugabe von mindestens 5 ml MEM + 2% FCS pro Milz wurde die Lyse abgestoppt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen zur Isolation von naiven CD4⁺ T-Zellen in 20 ml GM-Puffer aufgenommen.

3.10.6 Isolation naiver CD4⁺ T-Zellen

Die Aufreinigung naiver CD4⁺ T-Zellen erfolgte mittels Magnet-aktivierter-Zell-Sortierung (*magnetic activated cell sorting*, MACS). Hierfür wurde die aus der Milz erhaltene Einzelzellsuspension

nochmals über ein 40 µm Zellsieb gegeben, um restliche Gewebe- und Knochenstückchen zu entfernen. Anschließend wurde die Lebendzellzahl bestimmt und die Suspension auf 1×10^8 Zellen/ml eingestellt.

Zur Depletion von CD25⁺ T-Zellen wurde die Milzzellsuspension 20 min bei 4 °C mit 200 µg/ml PC61-bio Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper bindet das Antigen CD25, welches von regulatorischen T-Zellen (Tregs) exprimiert wird. Über magnetische Isolation können so im Anschluss Tregs depletiert werden. Um überschüssigen, ungebundenen Antikörper von den Zellen zu entfernen, wurden die Zellen im Folgenden zweimal mit je 10 ml GM-Puffer gewaschen. Schließlich wurde das Zellpellet wieder in GM-Puffer aufgenommen und erneut auf eine Lebendzellzahl von 1×10^8 Zellen/ml gebracht. Es folgte eine 15-minütige Inkubation der Milzzellen mit „Streptavidin MicroBeads“ der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland), die im Verhältnis 1:20 eingesetzt wurden. Die Inkubationszeit wurde dazu genutzt, pro Aufreinigung drei saubere, sterile LS-Separationssäulen (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) in einen Magneten einzuspannen und einmal mit je 5 ml GM-Puffer zu spülen. Danach erfolgte die magnetische Separation von CD25⁺ T-Zellen. Hierfür wurde die Milzzellsuspension auf 5 ml mit GM-Puffer aufgefüllt und milliliterweise auf eine der vorbereiteten Säulen gegeben. Während die Zellsuspension durch die Säule läuft, verbleiben antikörpermarkierte, durch MicroBeads magnetisierte CD25⁺ T-Zellen im Magnetfeld in der Säule, wohingegen alle unmarkierten Zellen in Lösung wieder aus der Säule heraustropfen. Der Durchfluss wurde mit einem 15 ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Um Zellverlust zu vermeiden wurde die Säule noch einmal mit 5 ml GM-Puffer gespült und der Durchfluss ebenfalls in das 15 ml Falcon überführt.

Nach der Depletion der CD25⁺ T-Zellen wurde der Durchfluss aus der ersten LS-Separationssäule zentrifugiert (10 min bei 600xg) und anschließend erneut mit GM-Puffer auf eine Lebendzellzahl von 1×10^8 Zellen/ml gebracht. Die Zellsuspension wurde 20 min bei 4 °C mit 0,5 µg/ml H-129.19-bio Antikörper inkubiert. Um abermals überschüssigen, ungebundenen Antikörper von den Zellen zu entfernen, wurden die Zellen zweimal mit je 10 ml GM-Puffer gewaschen und das Zellpellet schließlich in GM-Puffer resuspendiert. Hierbei wurde das Puffervolumen so gewählt, dass wieder eine Lebendzellzahl von 1×10^8 Zellen/ml vorlag. Es folgte eine 15-minütige Inkubation der Milzzellen mit Streptavidin MicroBeads, die nun im Verhältnis 1:40 eingesetzt wurden. Danach wurde eine zweite magnetische Separation durchgeführt, in der naive CD4⁺ T-Zellen isoliert werden. Die Aufreinigung erfolgte wie bereits oben im Abschnitt „Depletion von CD25⁺ T-Zellen“ beschrieben, zweimal über sterile LS-Separationssäulen. Im Durchfluss befanden sich dann saubere, naive CD4⁺ T-Zellen. Diese wurden gezählt, zentrifugiert (10 min bei 600xg) und mit Testmedium (TM) + 10% FCS auf eine Lebendzellzahl von 2×10^6 Zellen/ml gebracht.

3.10.7 *Ex vivo* Differenzierung und Kultivierung von T-Helferzellen Typ 9

T-Helferzellen (Th) Typ 9 (Th9-Zellen) lassen sich *ex vivo* aus naiven CD4⁺ T-Zellen der Milz differenzieren. Dazu müssen naive CD4⁺ T-Zellen zunächst *in vitro* durch eine Antikörper-vermittelte Kreuzvernetzung der T-Zell-Rezeptoren (TZR) stimuliert und in einem bestimmten Differenzierungsmedium kultiviert werden.

Für die Stimulation naiver CD4⁺ T-Zellen wurden Zellkulturplatten mit anti-CD3 (4 µg/ml) und anti-CD28 (1:500) beschichtet. Dazu wurden die beiden Antikörper in entsprechender Konzentration in Kopplungspuffer gelöst und je 500 µl dieser Antikörperlösung wurden dann in *wells* einer 24-Well-Platte pipettiert. Es folgte eine Inkubation für 60 min bei 37 °C im Brutschrank. Anschließend wurden die einzelnen *wells* zweimal mit PBS gewaschen. Dies erfolgte, indem die Antikörperlösung abgesaugt und durch ca. 500 µl PBS ersetzt wurde. Nach dem zweiten Waschschrift wurde PBS durch je 500 µl eines zweifach-konzentrierten Th9-Differenzierungsmedium ersetzt. Hiernach konnten die bereits in TM + 10% FCS auf 2x10⁶ Zellen/ml eingestellten naiven CD4⁺ T-Zellen in Volumina von ebenfalls 500 µl in die einzelnen *wells* mit vorgelegtem Th9-Differenzierungsmedium überführt und zur Stimulation 72 h bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert werden.

Zur Kultivierung von Th9-Zellen wurden diese an Tag 3 nach der Stimulation in *wells* einer frischen 24-Well-Platte überführt. Je nach Dichte der Zellen wurden sie im Verhältnis 1:1, 1:2, 1:3 oder 1:4 auf die neue Platte verteilt und das Gesamtvolumen pro *well* mit Th9-Kulturmedium wieder auf 1 ml gebracht. Eine sekundäre Stimulation (Restimulation) der Th9-Zellen erfolgte versuchsabhängig an Tag 5 oder 6 nach der ersten Stimulation in einer mit anti-CD3 (4 µg/ml) beschichteten 24-Well-Platte für 4 oder 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank.

3.11 Transfektion von Mastzellen

Die Transfektion von Mastzellen erfolgte mittels Elektroporation. Hierfür wurden Mastzellen geerntet, gezählt, einmal mit serumfreiem IMDM gewaschen und schließlich auf 5x10⁷, bzw. auf 2x10⁷ Zellen/ml IMDM eingestellt. Pro Transfektionsansatz wurden 100 µl dieser Zellsuspension zu 100 µl einer Plasmidlösung (siehe Tabelle 3-8 und Tabelle 3-9) in eine 4 mm Elektroporationsküvette gegeben. Folgende Reaktionsansätze wurden für die Transfektion verwendet:

Tabelle 3-8: Reaktionsansatz für eine Transfektion mit nachfolgendem Western Blot

| Substanz | Menge/Konzentration |
|--|---|
| BMMC (BirA-Ligase exprimierend) | 5x10 ⁶ Zellen in 100 µl IMDM |
| pcDNA oder Expressionsvektor unter der Kontrolle eines CMV-Promotors | 4 µg in 100 µl IMDM |

Tabelle 3-9: Reaktionsansatz für eine Transfektion mit nachfolgendem Reporterassay

| Substanz | Menge/Konzentration |
|--|---|
| BMMC (BirA-Ligase exprimierend) | 2x10 ⁶ Zellen in 100 µl IMDM |
| pcDNA oder Expressionsvektor unter der Kontrolle eines CMV-Promotors | 4 µg |
| <i>II9</i> -Reportergenkonstrukt (Photinus-Luciferase unter der Kontrolle des <i>II9</i> -Promotors) | 8 µg |
| pRL-TK (Renilla-Luciferase unter der Kontrolle eines Thymidinkinase-Promotors) | 300 ng |

} In 100 µl IMDM

Als Expressionsvektor wurde ein IRF4-Konstrukt unter der Kontrolle eines aus *Cytomegalovirus* (CMV) stammenden Promotors verwendet, der entweder für IRF4 mit oder ohne anhängender BirA-ES codiert. Ein Leervektor (pcDNA) diente als Kontrolle. Für das Reportergenkonstrukt wurde die *II9*-Core-Promotorsequenz vor eine aus *Photinus pyralis* stammende Luciferase-kodierende Sequenz kloniert. Als interner Standard zur Normalisierung der Transfektion wurde eine Luciferase aus *Renilla reniformis* unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven Thymidinkinase-Promotors (pRL-TK) verwendet. Die Elektroporation wurde für 30 bis 40 ms bei 290 V und 600 µF im Genepulser II der Firma Bio-Rad (München, Deutschland) durchgeführt. Direkt im Anschluss der Transfektion wurde je 1 ml 37 °C warmes KL-MZF auf die Zellen in der Küvette gegeben und diese mit dem Medium schließlich in eine 24-Well-Platte überführt. Es folgte eine Ruhepause zur Erholung der Zellen mit einer Inkubationszeit von 2 h bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank. Die Stimulation der transfizierten Zellen erfolgte jeweils mit 0,375 µM Ionomycin über Nacht.

3.12 Reporterassay

Mithilfe eines Reporterassays kann untersucht werden, welchen Einfluss ein Transkriptionsfaktor (wie z. B. IRF4) auf die Expression eines bestimmten Gens (z.B. *II9*) hat. Als „Reporter“ dient dazu eine Luciferase aus *Photinus pyralis*, die hinter die zu untersuchende Promotorregion kloniert und über Elektroporation in Zellen hineingebracht wird. Bindet in diesem Fall IRF4 an den *II9*-Promotor, wird die Photinus-Luciferase exprimiert. Nach der Zugabe eines spezifischen Substrats, wird Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert, welches messbar ist und

indirekt die Aktivität des Promotors angibt. Als interner Standard dient eine zweite Luciferase (aus *Renilla reniformis*), die ebenfalls über ein Plasmid (pRL-TK) in die Zellen gebracht wird. Durch Messung des durch die Renilla-Luciferase emittierten Lichts kann die Effizienz der Transfektion bestimmt und der Messwert der Photinus-Luciferase normiert werden.

Mastzellen wurden wie in Kapitel 3.11 beschrieben mit einer Plasmidlösung (siehe Tabelle 3-9) transfiziert, geerntet und einmal mit PBS gewaschen. Für die Durchführung des Reporterassays wurde das „Dual-Luciferase® Reporter Assay Kit“ von Promega (Mannheim, Deutschland) verwendet und nach Herstellerangaben verfahren. Die indirekte Promotoraktivität wurde in speziellen Luminometer Reagenzgefäßen und mithilfe des Luminometers (TD-20/20) der Firma Turner-Designs (Sunnyvale, USA) bestimmt. Die Messung der Lumineszenz erfolgte jeweils mit einer 2 s-Verzögerung für 10 s. Zur Berechnung der relativen Promotoraktivität wurden alle Werte auf die Aktivität der Renilla-Luciferase normiert.

3.13 Methoden zur Analyse von Proteinen

3.13.1 Herstellung von Kompletzell- und Kernlysaten

Um die Proteinzusammensetzung von Zelllysaten mittels Western Blots oder Massenspektrometrie zu untersuchen, müssen Zellen zunächst lysiert werden. Dazu wurden Zellen geerntet, dreimal mit absteigenden Volumina (10 ml – 5 ml – 1 ml) an PBS gewaschen, gezählt und mit dem letzten Waschschrift in 1,5 ml Protein LoBind Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden die Zellen entweder zum Herstellen von Kompletzelllysaten in einen entsprechenden Lysepuffer aufgenommen oder zur Isolierung der Zellkerne in einem hypotonischen Puffer inkubiert (s.u.).

Kompletzelllysate

Zur Herstellung von Kompletzelllysaten wurden folgende Lysepuffer verwendet: Harnstoffpuffer, RIPA-Puffer der Firma Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland) oder Zelllyse-Puffer (*Cell Lysis Buffer*, CLB) aus dem „µMACS FactorFinder Kit“ der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland). Alle Lysepuffer wurden vor ihrer Verwendung mit einem Proteinase Inhibitor-Cocktail (PIC; Einsatz 1:50) versetzt, um die Denaturierung der Proteine durch zelleigene Proteasen zu vermeiden. Nach dem Waschen wurden die Zellen je nach Zelltyp, -zahl und nachfolgender Analyseverfahren in einer definierten Menge (siehe Tabelle 3-10) Lysepuffer aufgenommen und resuspendiert.

Tabelle 3-10: Herstellung von Zelllysaten

| Analyse per | Zelltyp | Zellzahl | Menge Lyse-Puffer | Art Lysat |
|---|---------|---------------------|-------------------|--------------------|
| Western Blot | BMMC | 2-3x10 ⁶ | 50 µl | Komplettzelllysate |
| | Th9 | 2-3x10 ⁶ | 50 µl | |
| IRF4-IntP und Western Blot | BMMC | 1x10 ⁷ | 150 µl | |
| | Th9 | 1x10 ⁷ | 100 µl | |
| IRF4-IntP und Massenspektrometrie | Th9 | 3x10 ⁷ | 150 µl | |
| Massenspektrometrie | Th9 | 1x10 ⁷ | 100 µl | |
| Western Blot | BMMC | 4x10 ⁶ | 50 µl | Kernlysate |
| | Th9 | 5x10 ⁶ | 50 µl | |
| IRF4-IntP und Western Blot und/oder Massenspektrometrie | Th9 | 5-6x10 ⁷ | 150 µl | |

Anschließend erfolgte die Zelllyse durch eine Ultraschallbehandlung im Bioruptor (Diagenode, Liege, Belgien) bei 4 °C für 2 bis 3 Runden à 5 min (5 alternierende Zyklen von jeweils 30 s Ultraschall und 30 s Pause) mit der Einstellung „Low“. Um Zelltrümmer und DNA zu entfernen, wurden die Lysate bei 4 °C zentrifugiert (6 min, 13000xg) und der Überstand, in dem die Proteine gelöst sind, in frische 1,5 ml Protein LoBind Reaktionsgefäße überführt.

Kernlysate

Zur Herstellung von Kernlysaten wurden die mit PBS gewaschenen Zellen in 1 ml hypotonischen Puffer, der zuvor mit PIC (1:50) versetzt wurde, resuspendiert und auf Eis inkubiert. Sobald im Mikroskop ein deutliches Aufquellen der Zellen zu beobachten war (nach ca. 12 bis 15 min), wurde die Quellreaktion durch Zugabe von 50 µl einer 10%igen NP-40-Lösung gestoppt und die Suspension 10 s mithilfe eines Schüttlers mit Vortexfunktion auf höchster Stufe geschüttelt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C (10 min, 850xg) und zwei Waschschrte mit je 1 ml PBS. Schließlich wurden die Zellen in eine bestimmte Menge (siehe Tabelle 3-10) CLB, Harnstoff- oder RIPA-Puffer (vor Verwendung 1:50 mit PIC versetzt) aufgenommen und durch Ultraschallbehandlung im Bioruptor bei 4 °C für 2 Runden à 5 min (5 alternierende Zyklen von jeweils 30 s Ultraschall und 30 s Pause) mit der Einstellung „Low“, lysiert. Nach Zentrifugation der Kernextrakte bei 4 °C (7 min, 13500g) wurde der Überstand in frische 1,5 ml Protein LoBind Reaktionsgefäße überführt.

3.13.2 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung des Gesamtproteingehalts von Zellextrakten wurde das 660 nm Protein-Kit von Pierce verwendet. Jeweils 10 µl Lysat und 10 µl eines BSA-Standards (0,2 µg/µl bis 2,0 µg/µl in VE-Wasser) wurden in *wells* einer 96-Well-Flachbodenplatte gegeben. Hierzu wurden anschließend 150 µl des Pierce Proteinreagenz pipettiert. Das Reagenz bindet an die Proteine und es kommt zu einem Farbumschlag. Nach einer kurzen Inkubationszeit von ca. 5 min wurde die Absorption bei 660 nm im GENios Mikrotiterplattenleser der Firma Tecan Group AG (Männedorf, Schweiz) bestimmt und mithilfe einer Regressionsgeraden in Microsoft Excel ausgewertet.

3.13.3 SDS-PAGE und Western Blot

Zur Auftrennung und zum Nachweis von Proteinen aus Kompletzell- und Kernlysaten wurde eine diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) mit anschließendem Western Blot-Verfahren durchgeführt.

Bei der SDS-PAGE werden Proteine nach ihrer relativen Molekülmasse im elektrischen Feld über ein Polyacrylamidgel aufgetrennt. Dazu werden Proteine mit einem denaturierenden Ladepuffer, der Dithiothreitol (DTT) und Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) enthält, versetzt und aufgeköcht. Während DTT die Disulfidbrücken in der Proteinstruktur zerstört und dadurch zu einer Linearisierung aller Proteine im Lysat führt, lagert sich SDS an die linearisierten Proteine an und überdeckt deren Eigenladung mit einer negative Gesamtladung. Im elektrischen Feld werden Proteine so zur Anode gezogen. Für die vertikale Elektrophorese werden die denaturierten Proteine auf ein zweiteiliges Polyacrylamidgel aufgetragen. Der obere Teil des Gels (Sammelgel) dient dazu, dass alle Proteine vor Eintritt in das sogenannte Trenngel auf gleiche Höhe im Gel gebracht werden. Das Trenngel wirkt während der Elektrophorese wie ein Sieb, durch das die Proteine wandern. So gelangen Proteine mit kleiner Molekülmasse schneller Richtung Anode, als große Proteine. Nach erfolgter SDS-PAGE können die immer noch negativ geladenen Proteine durch die Western Blot-Methode mithilfe eines elektrischen Feldes horizontal auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran transferiert werden. Anschließend erfolgt der Nachweis eines bestimmten Proteins mithilfe eines spezifischen Antikörpers. Dieser Antikörper ist entweder bereits an eine Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt, oder wird durch Bindung eines weiteren HRP-gekoppelten Antikörpers markiert. HRP kann unter Zugabe von Wasserstoffperoxid Luminol zu 3-Aminophthalat umsetzen, welches Licht einer Wellenlänge von 425 nm emittiert.

Dieses Licht kann schließlich detektiert werden, wodurch man einen indirekten Nachweis der Proteine auf der Membran erhält.

3.13.3.1 SDS-PAGE

15 bis 40 µg Protein aus Kompletzell- und Kernlysaten wurden mit SDS-Ladepuffer (1:5) versetzt und für 6 min bei 95 °C inkubiert. Zur Herstellung des SDS-Gels wurden die unter Abschnitt 3.4.1 aufgeführten Reagenzien für Trenn- und Sammelgel jeweils in 15 ml-Reaktionsgefäßen zusammengegeben und zwischen zwei Glasplatten einer Gießapparatur gegossen. Dabei wurde in einem ersten Schritt das Trenngel gegossen, welches direkt mit ca. 1 ml Isopropanol überschichtet wurde. Nach dem Aushärten des Gels wurde das Isopropanol, welches für eine glatte Gelgrenze sorgt, wieder entfernt und das Sammelgel gegossen. Ein aufliegender Kamm diente zur Formung von Ladetaschen im Gel. Nach dem Aushärten des Gels wurde der Kamm gezogen, das Gel in einer mit SDS-Laufpuffer befüllten Kammer fixiert und mit den denaturierten Lysaten beladen. 5 µl eines molekularen Markers in der ersten Tasche des Gels wurden zur späteren Bestimmung der Molekülgröße der aufgetrennten Proteine genutzt. Die Elektrophorese der Proteine im Sammelgel erfolgte bei einer Stromstärke von 30 mA im Sammelgel und 50 mA im Trenngel. Sie wurde beendet, sobald die Lauffront des Ladepuffers am unteren Ende des Gels angekommen war.

3.13.3.2 Western Blot

Der Proteintransfer wurde nach dem sogenannten *Semi-dry* Verfahren mit dem „Trans-Blot® Turbo™ Transfersystem“ der Firma Bio-Rad (München, Deutschland) durchgeführt. Drei Lagen Whatman Filterpapier wurden mit Blotpuffer getränkt und auf die Anode gelegt. Darauf wurde eine zuvor in Methanol ca. 2 min inkubierte 0,45 µm PVDF Membran, gefolgt vom SDS Gel und weiteren drei mit Blotpuffer getränkten Whatman Papieren gestapelt. Die Katode wurde obenauf gelegt, das System verschlossen und unter Standardeinstellungen bei 1 A für 30 min gestartet. Anschließend wurde die Membran bei Raumtemperatur mit Blockpuffer inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen vorzubeugen. Nach einer Stunde wurde die Membran dreimal je 5 min mit TBS-T gewaschen und schließlich mit dem primären Antikörper (anti-IRF4, 1:500 in 10 ml TBS-T) über Nacht bei 4 °C auf dem Schwenkinkubator inkubiert. Es folgte erneut ein dreimaliger Waschschrift für je 5 min in TBS-T, bevor die Membran mit dem HRP-gekoppelten sekundären Antikörper (anti-Maus-HRP, 1:2000 in 10 ml TBS-T) eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Schließlich wurde die Membran jeweils 5 min zweimal mit TBS-T und zweimal mit TBS gewaschen. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte nach Zugabe der ECL-Substratlösung auf die Membran mit dem Gel Dokumentationssystem Chemi Doc XRS der Firma Bio-Rad (München, Deutschland) über eine Kamera. Anschließend wurden die Aufnahmen mithilfe der

Computerprogramme QuantityOne (Version 4.4.0; Bio-Rad, München, Deutschland) und ImageLab4 (Version 4.0.1; Bio-Rad, München, Deutschland) ausgewertet. Für den Nachweis der Biotinylierung wurde HRP-gekoppeltes Streptavidin (1:1000 in 10 ml TBS-T), das auf derselben Membran inkubiert wurde, auf der zuvor die IRF4-Färbung durchgeführt wurde, verwendet. Um die bereits gebundenen Antikörper von der Membran zu entfernen, wurde diese 45 min in Stripping Puffer inkubiert. Hiernach wurde die Membran erneut mit Blockpuffer abgesättigt (s.o.), gewaschen und maximal eine Stunde mit Streptavidin-HRP inkubiert. Die Detektion und Auswertung der Membran erfolgte wie bereits oben beschrieben. Eine Aktin-Färbung diente als Ladekontrolle. Hierfür war eine halbe Stunde Inkubation mit dem HRP-gekoppeltem β -Aktin Antikörper (1:25000 in 10 ml TBS-T) ausreichend.

3.13.4 Biotin-vermittelte Interaktompräzipitation (IntP)

Zur Isolierung von IRF4 und dessen Interaktionspartner wurde in der vorliegenden Arbeit eine Biotin-vermittelte IntP etabliert. Eine transgene Expression von IRF4 führt zur *in vivo* Biotinylierung des Transkriptionsfaktors. Dieser kann anschließend zusammen mit interagierenden Proteinen über Streptavidin aus den Zelllysaten isoliert werden (siehe Abbildung 3-2).

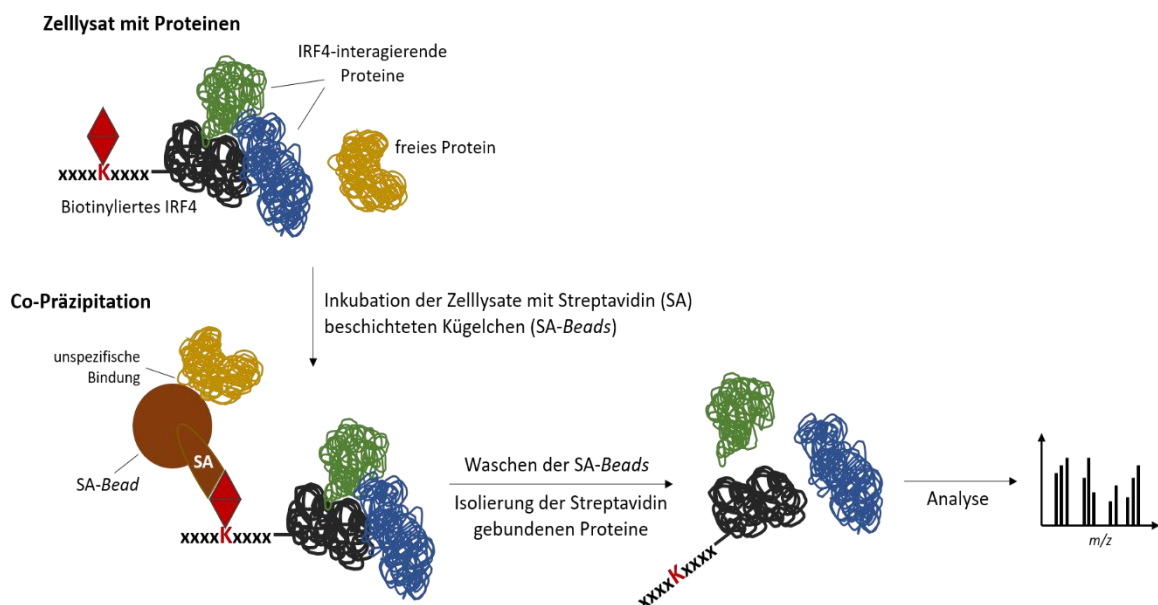


Abbildung 3-2: Schematische Darstellung einer Biotin-vermittelten Interaktompräzipitation (IntP)

Biotinyliertes IRF4 bindet zusammen mit IRF4-interagierenden Proteinen an Streptavidin (SA) beschichtete Kügelchen (SA-Beads), die mit dem Zelllysat inkubiert werden. Durch mehrere Waschschritte wird unspezifisch gebundenes Protein von den SA-Beads entfernt. Anschließend können die spezifisch gebundenen Proteine isoliert und z.B. via Massenspektrometrie analysiert werden.

Während der Etablierung des Protokolls zur IRF4-IntP wurden mehrere Bedingungen getestet. Die Durchführung der verschiedenen Optimierungsschritte wird im Folgenden detailliert beschrieben.

Der jeweilige Versuchsaufbau, der für die in Kapitel 4 dargestellten Ergebnisse gewählt wurde, ist in der entsprechenden Bildunterschrift genannt.

Stimulierte Mastzellen oder restimulierte Th9-Zellen wurden geerntet und gezählt. Sowohl Kompletzelllysate als auch Kernlysate aus unterschiedlichen Zellzahlen und Lysepuffern wurden für die Etablierung der Biotin-vermittelten IRF4-IntP verwendet. Die Vorgehensweise zur Herstellung der Lysate wurde bereits unter Abschnitt 3.13.1 beschrieben. Alle Mengenangaben bezüglich Zellen und Puffer sind in Tabelle 3-10 gelistet. Für die in Kapitel 4.3 final ausgewerteten Ergebnisse wurden Kernlysate aus 5×10^7 Zellen in 150 μl CLB („ μMACS FactorFinder Kit“, Milteneyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) verwendet. Ebenso wurden verschiedene Streptavidin (SA) beschichtete Kügelchen (*SA-Beads*) verglichen (siehe Abschnitt 4.2.1). Für die finale Durchführung der Biotin-vermittelten IRF4-IntP mit Th9-Zellen wurden die Dynabeads™ Streptavidin M-280 der Firma Invitrogen (Darmstadt, Deutschland) eingesetzt.

Zum Äquilibrieren der *SA-Beads* wurden pro Probe je 50 μl *SA-Beads* in frische 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben und auf einem Magnet inkubiert. Nach ca. 2 min sammelten sich die *Beads* am Magnet. Der Überstand wurde abgezogen und die *Beads* anschließend in 150 μl eines 1:2-Gemischs aus CLB und Bindepuffer aus dem „ μMACS FactorFinder Kit“, das zuvor mit PIC (1:50) versetzt wurde, aufgenommen und resuspendiert. Es folgte eine 5 bis 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur unter ständigem Invertieren auf einem Rotator. Schließlich wurde das CLB-Bindepuffer-Gemisch mithilfe des Magneten wieder von den *SA-Beads* getrennt und durch 200 bis 300 μl Bindepuffer^{††}, der zuvor mit PIC (1:50) versetzt wurde, ersetzt. Anschließend wurden die in Bindepuffer gelösten *SA-Beads* mit den Kernextrakten in 1,5 ml Protein LoBind Reaktionsgefäßen gemischt und gut resuspendiert. Für die Durchführung der IntP wurden jeder Probe zusätzlich x μl einer *Binding Enhancer*-Lösung (Einsatz 1:1000), bestehend aus 750 mM MgCl_2 und 300 mM ZnCl_2 , zugegeben. Diese Lösung soll bei der Bindung von Proteinkomplexen unterstützend wirken. Hiernach erfolgte die Inkubation der *SA-Beads* mit den Lysaten unter ständigem Invertieren auf dem Rotator. Während der Etablierung des Protokolls wurde die Inkubationszeit von 4 h bei Raumtemperatur auf über Nacht bei 4 °C verlängert. Nach der Inkubation wurden die *SA-Beads* zweimal je 5 min auf dem Rotator mit 1 ml eines Waschpuffers gewaschen. Dazu wurden während der Etablierung des Protokolls zur Biotin-vermittelten IntP verschiedene Puffersysteme (RIPA-Puffer, NP-40-Puffer, 0,1% (w/v) Tween in PBS und Waschpuffer aus dem „ μMACS FactorFinder Kit“), sowie unterschiedliche Konzentrationen an SDS im RIPA-Puffer getestet (siehe Abschnitt

^{††} Die Menge des Bindepuffers, der auf die *SA-Beads* gegeben wird, richtet sich nach dem Volumen des für die IntP eingesetzten Lysates. Für Lysate mit einem Volumen von 100 μl wurden 200 μl Bindepuffer verwendet, für Lysate mit einem Volumen von 150 μl wurden 300 μl Bindepuffer auf die *Beads* gegeben.

4.2.2.1 und 4.2.2.3). Zur Kontrolle der Waschpuffereffizienz dienten je 40 µl der einzelnen Überstände (Waschfraktionen), die mithilfe von SDS-PAGE und Westernblot analysiert wurden. Für die in der vorliegenden Arbeit final durchgeführte IntP wurde pro Probe 1 ml RIPA-Puffer mit 0,5% (w/v) SDS zum Waschen der *SA-Beads* verwendet. Abschließend wurden die Proben zweimal jeweils 5 min mit PBS unter Zuhilfenahme des Rotators gewaschen und abschließend nochmals in 1 ml PBS resuspendiert. Hiernach wurde der Überstand mithilfe des Magnets vollständig von den *Beads* entfernt.

Für eine Untersuchung der isolierten Proteine mittels Western Blots wurden die *SA-Beads* anschließend pro Probe in 50 µl eines Gemischs aus 5x SDS-Ladepuffer und VE-Wasser (Verhältnis 1:1) gelöst und 6 min bei 95 °C inkubiert. Sofort danach erfolgte mithilfe des Magnets die Abnahme des Überstands, in dem sich die isolierten Proteine befinden. Dieses Präzipitat konnte im Anschluss ohne weitere Probenvorbereitung für eine SDS-PAGE verwendet werden. Für eine Analyse der isolierten Proteine per Massenspektrometrie wurden die *SA-Beads* bis zur weiteren Bearbeitung bei -70 °C eingefroren.

3.13.5 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist eine Analysetechnik zur Bestimmung der Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum.¹²⁰ Seit der Entwicklung schonender Ionisierungsverfahren (s.u.) in den 1980er Jahren, die es ermöglichen große Biomoleküle, wie Peptide oder Proteine, intakt in die Gasphase zu überführen, hat sich die Massenspektrometrie zu einer der wichtigsten Methoden in der Proteomforschung entwickelt. Ein Massenspektrometer besteht aus drei Komponenten: einer Ionenquelle, einem Analysator, in dem die zu analysierenden Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) aufgetrennt werden und einem Detektor. In dem für diese Arbeit eingesetzten Massenspektrometer findet eine Elektrospray-Ionisation statt (ESI). Bei der ESI werden gelöste Ionen schonend desolvatisiert und in einem elektrischen Feld in die Gasphase überführt. Zur Analyse von komplexen Proben wird der ESI eine chromatographische Auftrennung der Probe vorgeschaltet. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-System (*Ultra Performance Liquid Chromatography*, UPLC) an die ESI-Quelle gekoppelt und die Peptide wurden über eine C₁₈-Säule mittels Umkehrphasenchromatographie entsprechend ihrer Hydrophobizität aufgetrennt. Zur anschließenden massenspektrometrischen Analyse wurde in der vorliegenden Arbeit ein Quadrupol-Flugzeitmassenspektrometer (*Time-of-flight mass spectrometer*, TOF-MS) eingesetzt. Durch ein Hintereinanderschalten von zwei oder mehreren Masseanalysatoren (in einem Massenspektrometer), kann die sogenannte Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) durchgeführt werden. Diese wird vor allem in der Proteinanalytik

zur Aufklärung der Peptidsequenz eingesetzt. Bei der MS/MS werden intakte Ionen (Vorläuferionen) zunächst im Quadrupol selektiert und analysiert. Im Anschluss findet durch den Beschuss mit inerten Gasmolekülen eine Fragmentation der selektierten Vorläuferionen statt, welche bei den Proteinen zur Spaltung der Peptidbindungen führt. Die resultierenden Fragmentationen werden im Flugzeitanalysator massenspektrometrisch charakterisiert. In der vorliegenden Arbeit wurden die Daten bei der massenspektrometrischen Analyse mithilfe der sogenannten HDMS^E-Methode^{121,122} aufgenommen. Dabei handelt es sich um eine datenunabhängige Akquisitionsmethode (*data independent acquisition*, DIA). Im Gegensatz zur datenabhängigen Akquisition (*data dependent acquisition*, DDA), werden hier (unabhängig von den spezifischen Charakteristiken der Ionen) Ionenspektren von allen detektierbaren Vorläuferionen generiert. Die Zuordnung der Fragmentationen zu den Vorläuferionen erfolgt über das chromatographische Profil. Durch Kombination der DIA mit der sogenannten Ionenmobilitätsspektrometrie (IMS) kann die Zahl der identifizierten Peptide und Proteine nochmals drastisch gesteigert werden.¹²¹ Dies beruht auf einer Separation der Ionen aufgrund ihrer Mobilität in einem Puffergas, die wiederum von Masse, Ladung Größe und Konformation der Ionen abhängt. Hierdurch wird bei der anschließenden Datenanalyse eine verbesserte Zuordnung der verschiedenen Spektren ermöglicht, wodurch man – vor allem in Zusammenhang mit der vorgeschalteten Chromatographie – ergänzende Informationen über die zu analysierende Probe gewinnt. Zur Quantifizierung der Peptide und Proteine wurde eine Signalintensitäts-basierte, markierungsfreie Proteinquantifizierung durchgeführt. Diese hat gegenüber einer Markierungsbasierten Methode (z.B. Markierung durch Isotope) den Vorteil, dass die Probenvorbereitung etwas kostengünstiger und weniger arbeitsintensiv ist. Zudem können mehrere Bedingungen miteinander verglichen werden. Die Quantifizierung wird durch einen Vergleich der Signale korrespondierender Peptide ermöglicht, wodurch die relativen Mengenverhältnisse eines Proteins innerhalb eines oder mehrerer Proteome abgeschätzt werden können. Die Prozessierung der Rohdaten sowie die Datenbankanalyse zur Identifikation der Peptide und Proteine erfolgte mithilfe einer kommerziellen Software (Protein Lynx Global Server, „PLGS“). Die anschließende Proteinquantifizierung wurde mit dem ISOQant Softwarepaket durchgeführt.^{121–123} Hierfür wurde die sogenannte Top3-Methode benutzt, bei der die Proteinabundanz über die durchschnittliche Signalintensität der drei meist abundanten Peptide des jeweiligen Proteins berechnet wird.^{124,125}

Alle Arbeiten hinsichtlich der Probenvorbereitung für die massenspektrometrische Analyse mit anschließender Prozessierung der Rohdaten zur analytischen Identifikation der Proteine wurden in Kooperation mit der Core Facility für Massenspektrometrie der Universitätsmedizin Mainz unter der Leitung von Prof. Dr. S. Tenzer – insbesondere in Zusammenarbeit mit Dr. U. Distler und R. Spohrer – durchgeführt.

3.13.5.1 Probenvorbereitung

Zur Vorbereitung für die massenspektrometrische Analyse, der über die IRF4-IntP isolierten Proteine, wurden die Proben tryptisch verdaut. Hierbei spaltet die Endopeptidase Trypsin denaturierte Proteine mit hoher Spezifität am C-Terminus, jeweils an den AS Arginin und Lysin. Nach einer Biotin-vermittelten IntP (siehe Abschnitt 3.13.4) wurden die Protein-beladenen SA-*Beads* in 50 µl einer Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung aufgenommen. Für den Proteinverdau mithilfe von Trypsin wurde ein zweitägiges In-Lösung-Verdau-Protokoll durchgeführt. Zur besseren Löslichkeit der Proteine wurde jeder Probe ein Zehntel des Volumens an 1%igem RapiGest zugegeben und die Proben für 15 min bei 80 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit DTT (Endkonzentration: 8 mM) und Indol-3-Essigsäure (Endkonzentration: 15 mM)^{**} versetzt und mit 1 µl einer Trypsin-Lösung bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde der pH-Wert mit 1 M HCl auf einen pH-Wert ≤ 3 gebracht, die Proben nochmals 10 min bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C zentrifugiert (30 min, 16000xg). Der Überstand wurde in *wells* einer Sep-Pak tC18-Platte gegeben. Durch einen zweimaligen Waschschrift mit je 80% (v/v) Trifluoressigsäure (in LC-MS-Grade Wasser) und anschließender Vakuumelution in 50 µl 80% (v/v) Acetonitril (in LC-MS-Grade Wasser), welches mit 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure versetzt wurde, erfolgte abschließend eine Entsalzung der Proben. Hiernach wurden die gelösten Proteine in 1,5 ml LoBind Reaktionsgefäße überführt, gefriergetrocknet und pro Probe in 20 µl 0,1% Ameisensäure (in LC-MS-Grade Wasser) aufgenommen.

3.13.5.2 UPLC und Massenspektrometrie

Nach dem tryptischen Verdau der Proben, wurden diese mittels eines nanoAcquity UPLC Systems der Firma Waters (Milford, USA) chromatographisch aufgetrennt. Für die Trennung der Peptide wurde eine analytische C₁₈-Umkehrphasen-Trennsäule (HSS-T3) der Firma Waters mit den Dimensionen 1,8 µm, 75 µm x 250 mm eingesetzt. Die Proben wurden direkt auf die Säule gegeben. Das Injektionsvolumen betrug zwischen 0,5 µl bis max. 2 µl. Als mobile Phase A diente Wasser, das mit Ameisensäure und DMSO versetzt wurde und als mobile Phase B Acetonitril, in welches Ameisensäure und DMSO gegeben wurde. Die chromatographische Auftrennung der Peptide erfolgte über einen Gradienten, bei dem die Konzentration der mobilen Phase B von 5% auf 40% über 90 min mit einer Flussrate von 300 nl/min anstieg. Hiernach wurde die Trennsäule mit 90% mobiler Phase B bei einer Flussrate von 600 nl/min 5 min gewaschen und anschließend re-äquilibriert. Die Gesamtmesszeit betrug 115 min.

^{**} DTT und Indol-3-Essigsäure wurden zuvor ebenfalls in einer Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung gelöst.

Die massenspektrometrische Analyse erfolgte auf einem Massenspektrometer (Synapt G2-S) der Firma Waters und wurde im Positiv-Ionen-Modus durchgeführt. Die Datenakquisition erfolgte mittels HDMS^F einer DIA-Methode.^{121,122} Pro Probe wurden jeweils technische Triplikate gemessen.

3.13.5.3 Datenanalyse

Zur Auswertung der massenspektrometrischen Daten wurden die Programme PLGS (Version 3.0.2) von Waters (Milford, USA) und das Softwarepaket ISOQuant¹²¹ verwendet. Mithilfe von PLGS erfolgte die Rohdatenprozessierung einschließlich der Lockmassenkorrektur sowie die datenbankbasierte Peptid- und Proteinidentifikation anhand der UniProtKB/SwissProt Datenbank für die Spezies *Mus musculus*. Die Datenbanksuche wurde auf tryptische Peptide mit maximal bis zu zwei verfehlten Schnittstellen beschränkt. Dabei wurden die Carbamidomethylierung von Cystein als fixe und die Oxidation von Methionin als variable Modifikationen berücksichtigt. Die mittels PLGS-Prozessierung generierten Daten wurden anschließend durch ISOQuant in eine MySQL-Datenbank zur markierungsfreien quantitativen Analyse importiert. Proteine, für die zwei oder mehr Peptididentifikationen vorlagen, wurden mithilfe der Top3-Methode (s.o.) quantifiziert. Eine Netzwerkanalyse erfolgte mithilfe der Software „STRING“ (Version 11.0; <https://string-db.org>; Szklarczyk et al.¹²⁶) nach Standardeinstellungen.

3.14 Methoden zur Analyse von Nukleinsäuren

3.14.1 Biotin-vermittelte Chromatin-Immunpräzipitation (bioChIP)

Eine Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) dient zur Untersuchung von Protein-DNA-Interaktionen. Hierzu werden Proteine und DNA fixiert. Nach einer Fragmentierung des Chromatins kann mithilfe eines spezifischen Antikörpers ein bestimmtes Protein (z.B. Transkriptionsfaktor) in Komplex mit der gebundenen DNA isoliert (präzipitiert) werden. In der vorliegenden Arbeit wurde eine sogenannte „bioChIP“ etabliert, um die DNA-Bindung von *in vivo* biotinyliertem IRF4 genomweit zu untersuchen. Anstelle eines spezifischen Antikörpers erfolgt die Präzipitation des biotinylierten Transkriptionsfaktors über Streptavidin (siehe Abbildung 3-3).

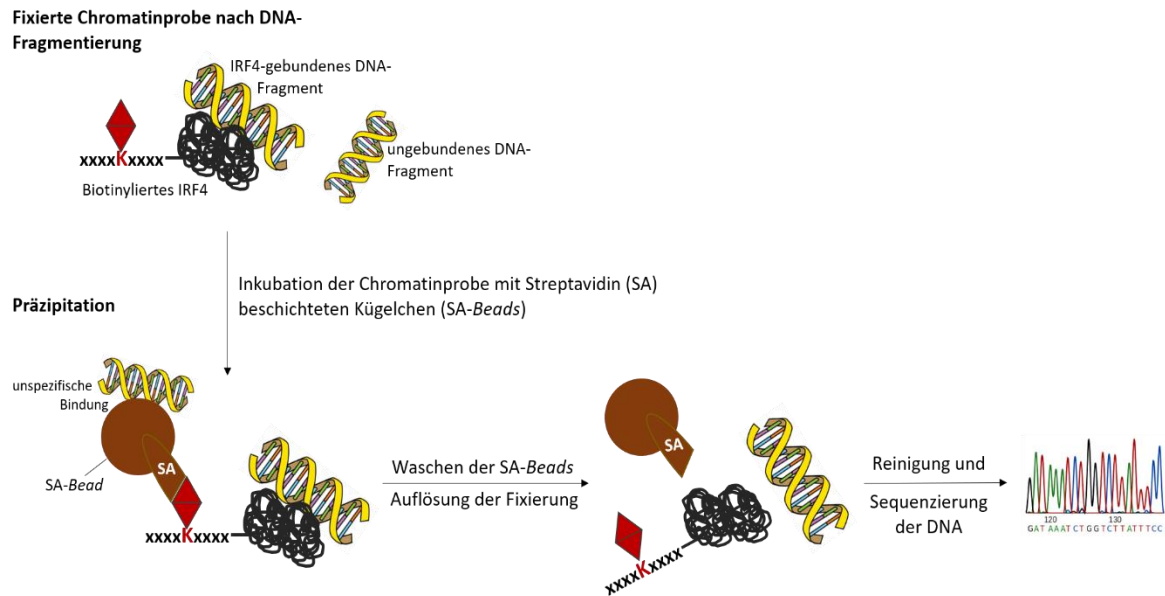


Abbildung 3-3: Schematische Darstellung einer Biotin-vermittelten Chromatin-Immünpräzipitation (bioChIP)

Nach einer Fixierung mit Formaldehyd werden Zellen lysiert und das Chromatin fragmentiert. Anschließend wird die Chromatinprobe mit Streptavidin (SA) beschichtete Kügelchen (SA-Beads) inkubiert. Biotinyliertes IRF4 bindet im Komplex mit gebundener DNA an die SA-Beads. Durch mehrere Waschschrirte wird unspezifisch gebundene DNA von den SA-Beads entfernt. Nach der Auflösung der Fixierung kann die spezifisch isolierte DNA gereinigt und mittels PCR oder Sequenzierung analysiert werden.

Das hier etablierte Protokoll zur Durchführung einer bioChIP wurde in Anlehnung an die Publikationen von Kim et al.¹⁰⁵ und nach einer Protokollvorlage von Soutoglou und Talianidis¹²⁷, sowie in Kooperation mit Dr. S. Klein-Heßling und S. Giampaolo der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. E. Serfling (Pathologisches Institut der Universität Würzburg, Deutschland) erarbeitet.

Im Folgenden wird die optimierte Durchführung einer bioChIP mit Th9-Zellen beschrieben. Zur Etablierung des Protokolls wurden auch Experimente mit Mastzellen durchgeführt. Vom Th9-spezifischen Protokoll abweichende Arbeitsschritte während der Optimierungsversuche mit Mastzellen finden sich in den Bildunterschriften der jeweiligen Ergebnisse.

3.14.1.1 Fixierung

Differenzierte und mit anti-CD3 restimierte Th9-Zellen wurden geerntet, gezählt und auf $1,2 \times 10^7$ Zellen/ml in TM + 5% FCS eingestellt. Anschließend wurde 1 ml dieser Suspension in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und mit TM + 5% FCS auf ein Gesamtvolumen von 5 ml gebracht. Die Fixierung des Chromatins erfolgte durch Zugabe von 1% (w/v) einer 16%igen Formaldehydlösung. Nach genau 7 min wurde die Reaktion mit 125 mM Glycin gestoppt und die Zellen 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach wurden die Zellen zentrifugiert (10 min bei 600xg), zweimal mit je 10 ml PBS gewaschen und in 1 ml PBS aufgenommen. Im Anschluss wurde die Zellsuspension

in frische 1,5 ml TPX-Reaktionsgefäße überführt und bei 4 °C zentrifugiert (5 min, 1500xg). Schließlich erfolgte die Abnahme des überständigen PBS und das Einfrieren des Zellpellets bei -70 °C bis zur Durchführung der Präzipitation.

3.14.1.2 Fragmentierung des Chromatins

Zur Fragmentierung des Chromatins wurden die bereits fixierten Zellen auf Eis aufgetaut, das Zellpellt mittels Erschütterung aufgelockert und in 520 µl eines ChIP-Lysepuffers, der zuvor mit PIC (1:50) versetzt wurde, aufgenommen. Es folgte eine Inkubation für mindestens 30 min auf Eis. Die Resuspension der Zellen erfolgte mithilfe einer 1 ml Spritze mit aufgesetzter 21G-Kanüle (0,8 x 40 mm) durch sechsmaliges Aufziehen und Ausspritzen der Suspension in das auf Eis stehende 1,5 ml TPX-Reaktionsgefäß. Anschließend wurden die Zellen kurz mithilfe eines Schüttlers mit Vortexfunktion geschüttelt und mittels Ultraschalls im Bioruptor lysiert. Die Ultraschallbehandlung wurde für 6 Runden à 10 min (10 alternierende Zyklen von jeweils 30 s Ultraschall und 30 s Pause) bei 4 °C mit der Einstellung „High“ durchgeführt. Hiernach wurde das Lysat bei 4°C zentrifugiert (15 min, 17000xg) und der Überstand in frische 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Danach wurde die Konzentration des Chromatins mithilfe eines Photometers bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Für eine bioChIP mit mehr als einer Probe, wurden die jeweils höher konzentrierten Proben mit ChIP-Lysepuffer (+ PIC, 1:50) an die niedrigste Konzentration angepasst, sodass jede Probe die gleiche Chromatinkonzentration aufweist (ca. 1 – 1,7 µg/µl).

3.14.1.3 Präzipitation

Zur Biotin-vermittelten Präzipitation von IRF4 mittels Streptavidin wurden die Dynabeads™ Streptavidin M-280 der Firma Invitrogen (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Um diese zu äquilibrieren wurden pro Probe je 800 µl IP-Puffer und 200 µl ChIP-Lysepuffer in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt und 50 µl der SA-Beads hinzugegeben. Es folgte eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur unter ständigem Invertieren auf einem Rotator. Währenddessen wurden 200 µl der zuvor auf ca. 1 – 1,7 µg/µl eingestellten Chromatinprobe mit 800 µl IP-Puffer, der bereits mit PIC (1:50) versetzt wurde, gemischt. 50 µl dieses Chromatin-IP-Puffer-Gemischs wurden für die spätere Kontrolle des in der Probe enthaltenen IRF4 (Protein-Einsatz (Protein-Input)) abgenommen und bei -20 °C eingefroren. Weitere 20 µl wurden für eine spätere Analyse der für die bioChIP eingesetzten DNA bei -20 °C eingefroren (DNA-Einsatz (DNA-Input)). Nach der 10-minütigen Inkubation der SA-Beads wurden diese mithilfe eines Magneten vom Überstand getrennt und mit der Chromatinprobe gemischt. Anschließend folgte eine Inkubation für 4 h bei Raumtemperatur und schließlich über Nacht bei 4 °C unter ständigem Invertieren auf einem Rotator. Am nächsten Tag erfolgten mehrere Waschschrte, um unspezifisch gebundenes

Chromatin von den *SA-Beads* zu entfernen. Hierfür wurde erneut der Überstand mithilfe eines Magneten von den *Beads* abgetrennt und durch 1 ml IP-Puffer ersetzt. Nach 30 min Inkubation unter ständigem Invertieren erfolgten drei weitere Waschschriffe für je zweimal 30 min mit den bioChIP-Waschpuffern 1, 2, und 3 auf dem Rotator. Für jeden Waschschriff wurden frische 1,5 ml Reaktionsgefäße verwendet und Proben der Überstände für spätere Kontrollen bei -20 °C eingefroren. Um anschließend das Chromatin von den *SA-Beads* zu eluieren, wurden diese in 200 µl Elutionspuffer, der zusätzlich mit 200 mM NaCl versetzt wurde, aufgenommen. Gleichzeitig wurden 180 µl des Elutionspuffers (plus 200 mM NaCl) zu den am Anfang abgenommenen 20 µl *DNA-Input* (s.o.) gegeben. Es folgte die Zugabe von 1 µl RNaseA pro Probe und eine einstündige Inkubation bei 37 °C im Wasserbad. Zur Auflösung der Fixierung wurden die Proben anschließend jeweils mit 1,5 µl Proteinase K versetzt, eine weitere Stunde bei 42 °C im Wasserbad und schließlich über Nacht bei 65 °C unter ständigem Schütteln inkubiert.

3.14.1.4 Reinigung der DNA

Die Reinigung der präzipitierten DNA erfolgte mithilfe des „QIAquick PCR Purification Kit“ der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland). Dazu wurde die präzipitierte DNA (im Überstand der *SA-Beads*) zusammen mit den *Beads* auf die Säulchen gegeben und nach Herstellerangaben verfahren. Anschließend wurde die gereinigte DNA in 18 µl Nuklease-freies Wasser aufgenommen.

3.14.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Größenbestimmung von fragmentierter DNA wurde eine horizontale Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierzu wurde ein Gel aus 1,5% (w/v) Agarose in 150 ml TBE-Puffer hergestellt, mit 4,5 µl Ethidiumbromid (Farbstoff, der sich in die DNA-Struktur einlagert) versetzt und in eine entsprechende Gießapparatur mit einem Kamm zur Taschenausformung gegossen. Nach dem Aushärten wurde der Kamm gezogen und das Gel in eine mit TBE-Puffer gefüllte Kammer gelegt. Jeweils 6 µl DNA-Probe wurden mit 6x DNA-Ladepuffer gefärbt und in die Geltaschen gegeben. Aufgrund ihrer negativen Ladung wandert DNA im elektrischen Feld, wobei größere Fragmente schneller zur Anode gelangen als kleinere. Die Trennung erfolgte ca. 20 min lang bei 150 V. Als molekularer Standard wurde ein 100 bp-Marker der Firma Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Zur Auswertung wurde das Gel im Dokumentationssystem Gel Doc XR der Firma Bio-Rad (München, Deutschland) fotografiert und die Aufnahme mithilfe der Software QuantityOne (Version 4.4.0; Bio-Rad) bearbeitet.

3.14.3 Quantitative Realtime-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung (Amplifikation) von DNA. Hierfür wird die DNA in einem ersten Schritt temperaturabhängig in Einzelstränge getrennt (Denaturierung). Anschließend kommt es zur Primerhybridisierung (*Annealing*), bei der bestimmte Oligonukleotide, sogenannte „Primer“, spezifisch an den Einzelstrang binden. Während der Elongation wird der jeweils gegenläufige DNA-Strang durch eine Polymerase synthetisiert. Die Wiederholung der unterschiedlichen Zyklen führt zur exponentiellen Amplifikation des durch die Primer flankierten DNA-Bereichs. Mithilfe einer quantitativen Realtime (qRT)-PCR, bei der sich ein fluoreszierender Farbstoff an die neu generierte Doppelstrang-DNA anlagert, kann die DNA-Menge zweier Proben aufgrund einer Proportionalität miteinander verglichen werden: Je stärker das Fluoreszenzsignal, desto größer die Menge an amplifizierter DNA. Hierüber und über die Zykluswiederholung, in der das Signal erstmals eindeutig messbar ist, kann auf die relative DNA-Menge einer Probe rückgeschlossen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Durchführung einer qRT-PCR zum spezifischen Nachweis der Anreicherung von IRF4-gebundener DNA, die über die in Abschnitt 3.14.1 beschriebene bioChIP-Methode präzipitiert wurde. Folgender Reaktionsansatz wurde in *wells* einer PCR Mikroplatte pipettiert:

Tabelle 3-11: Reaktionsansatz für eine qRT-PCR

| Substanz | Menge [μ l] |
|---|------------------|
| DNA | 2,0 |
| Primer-Mix (for. und rev.; 5 pmol/ μ l) | 1 |
| 5x QPCR Mix EvaGreen (no Rox) | 4 |
| Nuklease-freies Wasser | 13 |
| Gesamtvolumen | 20 |

Zur Amplifikation der DNA wurde der qRT-PCR Cycler Step One Plus der Firma Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland) und das in Tabelle 3-12 beschriebene PCR-Programm verwendet.

Tabelle 3-12: PCR-Programm für eine qRT-PCR

| Zyklus-Schritt | Temperatur [°C] | Dauer | Wiederholung |
|---|-----------------|-----------|--------------|
| Präinkubation | 50 | | |
| Aktivierung der Taq DNA-Polymerase | 95 | 15 min | |
| Denaturierung | 95 | 30 s | 40x |
| <i>Annealing</i> (Primerhybridisierung) | 57 | 30 s | |
| Elongation | 72 | 1 min | |
| Denaturierung | 95 | 1 min | |
| Temperatur-Reduktion um 0,5 °C | 95 -> 65 | Alle 10 s | 60x |

Für die Berechnung der spezifischen Anreicherung von IRF4-gebundener DNA, wurden die mittels qRT-PCR generierten Daten in die folgende Formel eingesetzt:

Betrag der Anreicherung =

$$\text{Off-Target } \Delta C(t) \text{ (DNA-Input vs. Präzipitierte DNA)} - \text{Target } \Delta C(t) \text{ (DNA-Input vs. Präzipitierte DNA)}$$

3.14.4 Next Generation Sequencing (NGS)

Zur Analyse der IRF4-Bindestellen im Genom von murinen Th9-Zellen wurde die über die bioChIP präzipitierte DNA mittels *Next Generation Sequencing* (NGS) sequenziert. Dazu wurde die isolierte DNA mehrerer bioChIP-Ansätze vereinigt, um die zur Generierung der DNA-Library notwendige DNA-Menge zu erreichen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mithilfe des „Qubit® dsDNA HS Assay Kits“ im Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific; Darmstadt, Deutschland). Zur Erstellung der DNA-Library wurden 500 pg der präzipitierten DNA eingesetzt und das „NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit“ von Illumina (Eindhoven, Niederlande) verwendet. Es wurde nach Herstellerangaben verfahren, wobei die PCR-Amplifikation durch 15 Zyklen erfolgte. Anschließend erfolgte die Bestimmung der durchschnittlichen Größe und Qualität der fertigen *Library* mithilfe des „High Sensitivity DNA Chips“ (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) im Bioanalyzer. Die DNA-Konzentration wurde zusätzlich im Qubit® 2.0 Fluorometer (s.o.) gemessen. Anhand der durchschnittlichen Basenpaarlänge und der aus Qubit und Bioanalyzer gemittelten Konzentration wurde die einzusetzende DNA-Menge bestimmt, auf 10 nM eingestellt und zur Sequenzierung gegeben. Diese wurde im Institut für Molekulargenetik der Johannes Gutenberg-Universität (Mainz, Deutschland) durchgeführt. Die „50nt *single read*“-Sequenzierung erfolgte auf einem HiSeq2500 (Illumina) mithilfe des „HiSeq® Rapid SR SBS Kit v2“ (50 Zyklen). Zur *Cluster*-Generierung wurden das „HiSeq® Rapid SR Cluster Kit v2“ sowie eine „Rapid SR v2 Flow cell“ von Illumina verwendet.

Die bioinformatische Auswertung der durch NGS generierten Daten erfolgte in Kooperation mit Dr. M. Klein (Institut für Immunologie der Universitätsmedizin Mainz). Folgende Programme und Softwarepakete wurden zur Datenanalyse genutzt:

Tabelle 3-13: Software zur NGS-Datenanalyse

| Software | Version | Hersteller |
|--|---------|---|
| CLC Genomics Work Bench (<i>Peak</i> ^{§§} -Analyse) | 12.0 | Qiagen (Hilden, Deutschland) |
| EaSeq (<i>Peak</i> -Analyse) | -- | http://easeq.net Lerdrup et al. ¹²⁸ |
| GREAT (GO-Analysen) | 3.0.0 | http://great.stanford.edu McLean et al. ¹²⁹ |
| MEME Suite (DREME: Motiv-Analyse) | 5.0.5 | http://meme-suite.org Bailey et al. ¹³⁰ und Bailey ¹³¹ |

Die Kartierung der DNA erfolgte gegen das murine Genom (mm10). Für die *Peak*^{§§}-Detektion und die Analysen mittels „GREAT“ und „MEME Suite“ wurden die jeweiligen Programm-StandardEinstellungen verwendet.

^{§§} Der Begriff „*Peak*“ (engl. Spitze) leitet sich aus der Darstellung von NGS-Daten ab. Durch die Kartierung vieler gleicher DNA-Fragmente gegen eine Referenzsequenz entsteht an bestimmten Bereichen eine Fragment-Anhäufung, wodurch bei der graphischen Darstellung eine Spitze zu sehen ist.

Bei der Auswertung von ChIP-Seq-Daten bedeutet „*Peak*“ somit die präzipitationsbedingte Anreicherung bestimmter DNA-Bereiche. In der vorliegenden Arbeit zeigen die *Peaks* bei der ChIP-Seq-Datenanalyse eine IRF4-DNA-Bindung an.

4 Ergebnisse

4.1 *In vivo* Biotinylierung von IRF4

Gemäß der in Kapitel 2 dargestellten Zielsetzung sollen Methoden zur transkriptionellen Charakterisierung von IRF4 etabliert werden. Die Besonderheit dieser Arbeit liegt darin, dass hierzu Affinitätsreinigungen genutzt werden, die auf einer *in vivo* Biotinylierung des Transkriptionsfaktors beruhen. Biotinyliertes IRF4 soll über Streptavidin (SA) aus Zellextrakten isoliert werden, um anschließend die Analyse von Protein-Protein- und Protein-DNA-Interaktionen via Massenspektrometrie und Sequenzierung zu ermöglichen. Zu diesem Zweck wurde die Mauslinie *Irf4^{Bio}* generiert, die ubiquitär *in vivo* biotinyliertes IRF4 exprimiert. Vor der Generierung dieses transgenen Mausstamms musste zunächst die Transaktivierung von biotinyliertem IRF4 in der Zelle untersucht werden, um sicherzustellen, dass diese nicht von der des wildtypischen, nicht-biotinylierten IRF4 abweicht.

4.1.1 Biotinyliertes IRF4 bindet und transaktiviert den *IL9*-Promotor

In zuvor publizierten Arbeiten mit Th9-Zellen und Mastzellen wurde bereits gezeigt, dass IRF4 den murinen *Interleukin-9 (IL9)*-Promotor bindet und aktiviert.^{39,81} Im Hinblick auf die Generierung der transgenen Mauslinie *Irf4^{Bio}* musste deshalb zunächst geprüft werden, ob biotinyliertes IRF4 diese Funktion weiterhin erfüllt. Zu diesem Zweck wurde ein Reporterassay (siehe Kapitel 3.12) mit Mastzellen durchgeführt. Mastzellen sind aufgrund ihrer Eigenschaften hierfür besser geeignet, als andere Immunzellen. Sie sind leicht in großen Mengen zu kultivieren und die für einen Reporterassay notwendige Transfektionseffizienz ist deutlich höher als z.B. bei T-Zellen. Für die Durchführung des Reporterassays wurden Mastzellen (BMMC) aus dem Knochenmark von Biotinligase BirA-exprimierenden Mäusen isoliert und differenziert (siehe Abschnitt 3.10.3). Diese BirA-exprimierende BMMC wurden anschließend mittels Elektroporation mit einem Expressionsvektor, der für IRF4 mit anhängender BirA-Ligase-Erkennungssequenz (IRF4-BirA-ES) codiert, sowie einem *IL9*-Reporterkonstrukt, bei dem der *IL9-Core*-Promotor vor eine Luciferase-kodierende Sequenz kloniert wurde, transfiziert. Als Kontrolle diente die Transfektion der Zellen mit einem Expressionsvektor, der für IRF4 ohne die anhängende BirA-ES codiert oder einem korrespondierenden Leervektor (pcDNA). Zur internen Kontrolle wurden die Mastzellen zusätzlich mit einem weiteren Luciferase-Konstrukt (*Renilla* Luciferase, pRL-TK) transfiziert, um später die Messwerte in Bezug auf die Transfektionseffizienz normieren zu können. Außerdem wurde die

Biotinylierung von IRF4 mittels Western Blots (siehe Abschnitt 3.13.3) in Kompletzelllysaten überprüft. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-1 dargestellt.

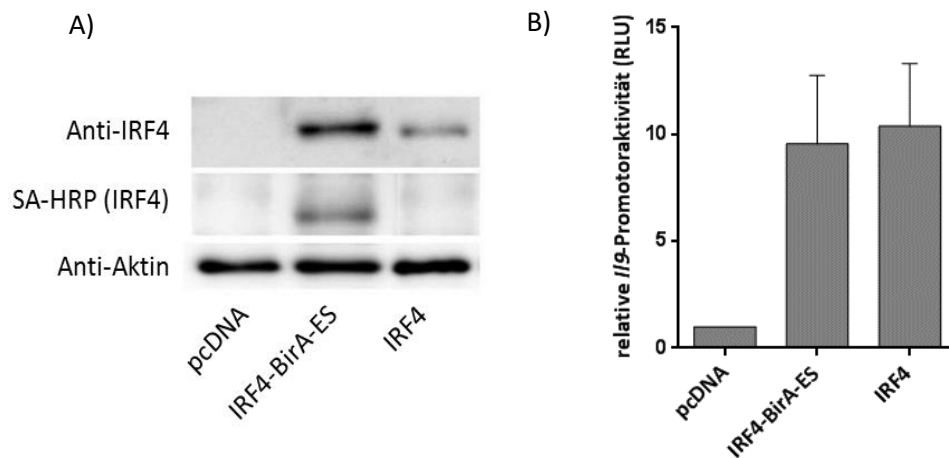


Abbildung 4-1: Biotinyliertes IRF4 bindet und transaktiviert den //9-Promotor

Je 2×10^6 *ex vivo* differenzierte BirA-exprimierende BMMC wurden mittels Elektroporation mit 4 μ g eines Expressionsvektors, der für IRF4 mit anhängender BirA-Ligase-Erkennungssequenz (IRF4-BirA-ES) codiert, bzw. zur Kontrolle mit einem korrespondierenden Leervektor (pcDNA) oder einem Expressionsvektor, der für IRF4 ohne die anhängende BirA-ES codiert, transfiziert. A) 2 h nach der Transfektion wurden die Mastzellen 24 h mit 0,375 μ M Ionomycin stimuliert und anschließend mit Harnstoffpuffer im Bioruptor lysiert. Nach einer elektrophoretischen Trennung der Proteine mittels SDS-PAGE erfolgte der Nachweis der Proteine im Western Blot mittels spezifischer Antikörper und SA-HRP. B) Zur Bestimmung der relativen Promotoraktivität wurden die Mastzellen zusätzlich mit 8 μ g eines //9-Reportergenkonstrukts sowie 300 ng Luciferase aus *Renilla reniformis* unter der Kontrolle des Thymidinkinase-Promotors transfiziert. 24 h nach der Stimulation der Zellen mit 0,375 μ M Ionomycin wurden die Zellen mit „passive lysis buffer“ lysiert und die Luciferaseaktivität mithilfe des „Dual-Luciferase® Reporter Assay Kits“ von Promega (Mannheim) bestimmt. Alle Messwerte wurden auf die *Renilla* Luciferase-Aktivität normiert und die Messwerte ausgehend einer Transfektion der Zellen mit pcDNA gleich 1 gesetzt. Gezeigt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten (\pm Standardabweichung).

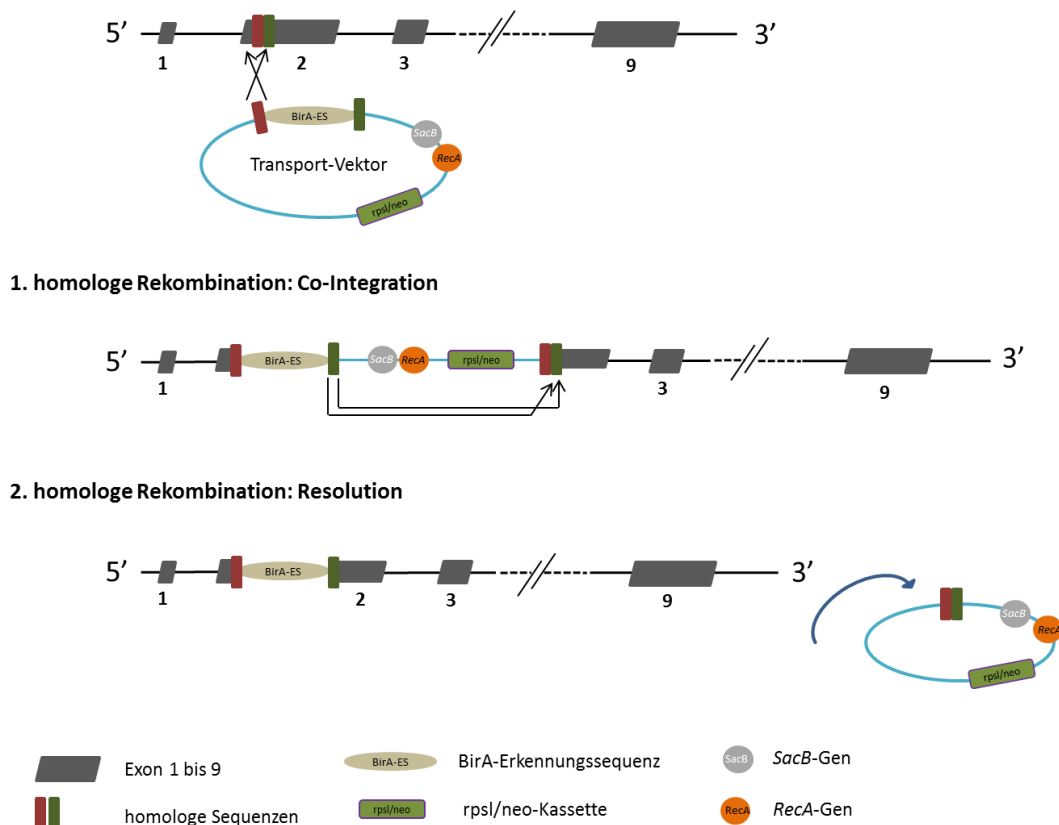
Wie im Western Blot in Abbildung 4-1 A zu sehen ist, tritt bei Mastzellen, die mit dem für IRF4-BirA-ES codierenden Expressionsvektor transfiziert wurden, durch Streptavidin-Meerrettichperoxidase (*streptavidin-horseradish peroxidase*, SA-HRP) eine spezifische Proteinbande auf. Diese Bande liegt auf gleicher Höhe wie die IRF4-Proteinbande und bleibt bei den Zellen, die mit pcDNA oder dem Expressionsvektor, der für IRF4 ohne die anhängende BirA-ES codiert, transfiziert wurden, aus. Dies beweist, dass IRF4-BirA-ES exprimierende Mastzellen, *in vivo* biotinyliertes IRF4 exprimieren.

Die im Reportergenassay (Abbildung 4-1 B) gemessene Luciferase-Aktivität, angegeben in einer relativen Lichteinheit (*relative light unit*, RLU), stellt ein indirektes Maß der Promotoraktivität dar. Bei den Mastzellen, die zusätzlich zum //9-Reportergenkonstrukt mit pcDNA transfiziert wurden, gibt die RLU den Normalzustand des //9-Promotors an. Transfiziert man die Mastzellen anstelle von pcDNA mit einem Expressionsvektor, der für einen Transkriptionsfaktor codiert, kann dessen

Einfluss auf den Promotor untersucht werden. Ein Vergleich der RLU von Zellen, die jeweils mit einem der beiden Expressionsvektoren (codierend für IRF4-BirA-ES oder IRF4 ohne BirA-ES) transfiziert wurden, zeigt, dass die gemessene RLU, welche der *I19*-Promotoraktivität entspricht, gleich hoch ist. Dies bedeutet, dass biotinyliertes IRF4 und nicht-biotinyliertes IRF4 den *I19*-Promotor in gleichem Ausmaß transaktivieren und die Biotinylierung demnach keine Auswirkung auf die Funktionalität des Transkriptionsfaktors hat. Auf Grundlage dieser Versuchsergebnisse konnte der transgene Mausstamm *Irf4*^{Bio} generiert werden.

4.1.2 Generierung der transgenen Mauslinie *Irf4*^{Bio}

Zur Generierung der neuen Mauslinie *Irf4*^{Bio} erfolgte eine Kreuzung von zwei verschiedenen Mausstämmen. Bei Ersterem handelt es sich um einen transgenen Mausstamm (*Irf4*^{BirA-ES}), in den ein künstliches Chromosom (*bacterial artificial chromosome*, BAC) integriert wurde. Die Generierung des BAC und Aufzucht des GVO übernahm die Firma Cyagen US Inc. (Santa Clara, USA). Hierzu wurde in einem ersten Schritt die Erkennungssequenz für die BirA-Ligase (BirA-ES) in einen Transportvektor kloniert (siehe Abbildung 4-2). Diese wird von zuvor über PCR generierte Sequenzen flankiert, die homolog zur Sequenz eines BAC sind, welches das Chromosom 13 mit dem *Irf4*-Gen enthält. Anschließend wurde das Transportkonstrukt zusammen mit einer Rekombinase (RecA) in Bakterien eingebracht, die bereits das BAC in seiner Ursprungsconfiguration enthalten. Durch homologe Rekombination erfolgt so im 5'-Bereich des zweiten Exons im *Irf4*-Gen eine RecA-vermittelte Integration (Co-Integration) des Transportvektors in das BAC. Da in den Transportvektor eine sogenannte rpsL/neo-Kassette integriert ist, weisen alle Bakterien, in denen eine erfolgreiche Integration stattgefunden hat, hiernach eine zusätzliche Antibiotikum-Resistenz auf. Durch eine zweite homologe Rekombination (Resolution) wurde überflüssige Transportvektor-Sequenz wieder aus dem BAC „heraus rekombiniert“. Übrig bleibt schließlich nur noch die Sequenz des *Irf4*-Gens mit anhängender BirA-ES. Bei der Resolution gehen zusätzliche Selektionsmarkergene (z.B. SacB) des BAC ebenfalls verloren. Dadurch können nur noch Bakterien überleben, in denen auch die zweite homologe Rekombination erfolgreich stattgefunden hat.¹³² Dieses Prinzip der negativen und positiven Selektion über Resistenz- und Markergene ermöglicht die selektive Kultivierung von Bakterien, die das neu geschaffene BAC-Transgen (im Folgenden als „*Irf4*^{BirA-ES}-BAC“ bezeichnet) tragen.

BAC RP23-206G12 mit wildtypischem *Irf4*-Allel**Abbildung 4-2: Schematische Darstellung der Generierung des *Irf4*^{BirA-ES}-BAC**

Die Erkennungssequenz der BirA-Ligase (BirA-ES), die von homologen Sequenzen flankiert wird, wurde in einen Transportvektor kloniert. Die homologen Sequenzen entsprechen der Sequenz eines BAC (RP23-206G12), welches das Chromosom 13 mit dem *Irf4*-Gen enthält. Anschließend wurde der Transportvektor in Bakterien eingebracht, wodurch es zu einer RecA-vermittelten homologen Rekombination im 5'-Bereich des zweiten Exons im *Irf4*-Gen zu einer Integration (Co-Integration) des Transportvektors in das BAC kommt. Bakterien, bei denen die Co-Integration erfolgreich stattgefunden hat, weisen durch die Expression einer auf dem Transportvektor enthaltenen *rpsl/neo*-Kassette eine zusätzliche Antibiotikum-Resistenz auf. Durch eine zweite homologe Rekombination (Resolution) wird überflüssige Transportvektor-Sequenz wieder aus dem BAC „heraus rekombiniert“. Übrig bleibt die Sequenz des *Irf4*-Gens mit anhängender BirA-ES. Die schematische Darstellung basiert auf einer Abbildung von N. Heintz.¹³²

Das aus Bakterien isolierte *Irf4*^{BirA-ES}-BAC wurde von Cyagen US Inc. in murine Blastozysten injiziert, wodurch eine zufällige Integration in das Mausgenom erfolgte. Alle nach einer Verpflanzung der Blastozysten in Leihmütter geborenen Tiere sind sogenannte Chimäre und können mittels Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) unter Verwendung spezifischer Primer auf die Integration des Transgens getestet werden.

Mäuse dieser neu generierten transgenen Linie *Irf4*^{BirA-ES} wurden mit homozygot *BirA*-exprimierenden Mäusen gekreuzt. Alle Nachkommen dieser Kreuzung, an die das *Irf4*^{BirA-ES}-BAC-Transgen vererbt wurde, exprimieren ubiquitär IRF4 mit anhängender BirA-ES, wodurch es posttranskriptionell *in vivo* zu einer BirA-Ligase-vermittelten Biotinylierung des Transkriptionsfaktors IRF4 kommt.

4.1.3 Nachweis von *in vivo* biotinyliertem IRF4 in Zellen einer *Irf4*^{Bio}-Maus

Um zu prüfen, ob die *in vivo* Biotinylierung von IRF4 in Immunzellen der neu generierten Mauslinie *Irf4*^{Bio} funktioniert, wurde die Biotinylierung beispielhaft in Mastzellen und Th9-Zellen, die gemäß der Abschnitte 3.10.3 und 3.10.5 - 3.10.7 aus dem Knochenmark, bzw. der Milz einer *Irf4*^{Bio}-Maus isoliert und differenziert wurden, mittels Western Blots (siehe Abschnitt 3.13.3) untersucht. Als Kontrolle dienten entsprechend Zellen aus *BirA*-transgenen Geschwistertieren derselben Zucht, bei denen keine Integration des *Irf4*^{BirA-ES}-BAC-Transgens ins Genom erfolgte und die deshalb ausschließlich nicht-biotinyliertes IRF4 exprimieren. Diese Tiere werden im Folgenden mit WT^(BirA) bezeichnet. In Vorbereitung für die Western Blot-Analyse wurden die Zellen (re)stimuliert und anschließend durch Ultraschall in Harnstoffpuffer lysiert (siehe Abschnitt 3.13.1).

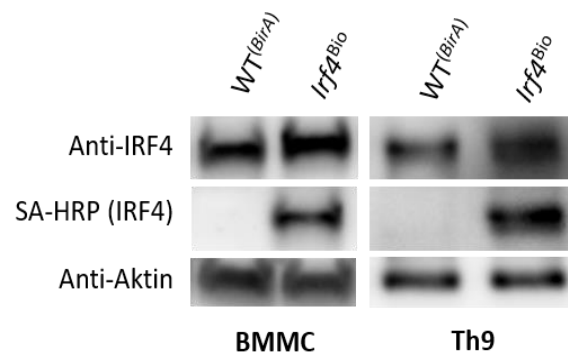


Abbildung 4-3: Nachweis von *in vivo* biotinyliertem IRF4 in BMMC und Th9-Zellen einer *Irf4*^{Bio}-Maus

Je 3×10^6 BMMC und Th9-Zellen wurden aus dem Knochenmark, bzw. der Milz von *Irf4*^{Bio}-Mäusen isoliert und *ex vivo* differenziert. Als Kontrolle dienten Zellen aus *BirA*-transgenen Geschwistertieren derselben Zucht, die negativ auf die Integration des *Irf4*^{BirA-ES}-BAC getestet wurden (WT^(BirA)). BMMC wurden 24 h mit $0,75 \mu\text{M}$ Ionomycin stimuliert und Th9-Zellen an Tag 6 vier Stunden mit $4 \mu\text{g/ml}$ anti-CD3 restimuliert. Anschließend wurden die Zellen in Harnstoffpuffer mittels Ultraschalls im Bioruptor lysiert und $15 \mu\text{g}$ Protein der Komplettzelllysate über SDS-PAGE aufgetrennt. Ein Nachweis der Proteine erfolgte im Western Blot mittels spezifischer Antikörper und SA-HRP.

Aus der anti-IRF4-Antikörperfärbung des in Abbildung 4-3 gezeigten Western Blots geht hervor, dass BMMC und Th9-Zellen sowohl aus *Irf4*^{Bio}-Mäusen als auch aus WT^(BirA)-Mäusen den Transkriptionsfaktor IRF4 erwartungsgemäß exprimieren. Nach erneuter Inkubation derselben Membran mit SA-HRP und anschließender Substratreaktion treten Proteinbanden nur noch in den Komplettzelllysaten einer *Irf4*^{Bio}-Maus auf. Diese liegen auf gleicher Höhe der zuvor gefärbten IRF4-Proteinbanden. Das Ergebnis des Western Blots bestätigt die *in vivo* Biotinylierung von IRF4 in Zellen einer *Irf4*^{Bio}-Maus. Weitere Kontrollversuche diesbezüglich werden für die im Folgenden gezeigten Versuchsergebnisse nicht nochmal explizit aufgeführt.

4.2 Etablierung einer Biotin-vermittelten IRF4-Interaktompräzipitation (IRF4-IntP)

Eines der Hauptziele dieser Arbeit bestand darin, eine Biotin-vermittelte IntP für IRF4 zu etablieren, um Interaktionspartner selbigen Transkriptionsfaktors zu identifizieren. Die hier angewandte IntP-Strategie wurde bereits von Kim et al.¹⁰⁵ und Rudra et al.¹³³ eingesetzt, um Multiproteinkomplexe in embryonalen Mausstammzellen, bzw. Foxp3-assoziierte Proteine in immortalisierten T-Zelllinien zu untersuchen. Kern dieser Methode ist, dass das zu analysierende Protein (z.B. Transkriptionsfaktor, hier IRF4) in einer Enzym-abhängigen Reaktion *in vivo* biotinyliert und anschließend durch eine Bindung an Streptavidin aus Zell- oder Kernextrakten isoliert wird. Interaktionspartner, die zum Zeitpunkt der IntP mit IRF4 im Transkriptionsfaktorkomplex interagieren, werden dadurch mitisoliert und können im Anschluss mithilfe massenspektrometrischer Analyseverfahren identifiziert werden. Um die Biotinylierung von IRF4 *in vivo* zu ermöglichen, wurde die in Abschnitt 4.1.2 beschriebene Mauslinie *Irf4*^{Bio} generiert. Ein großer Vorteil der Biotin-vermittelten IntP besteht darin, dass keine spezifischen Antikörper zur Isolierung des Proteins benötigt werden. Die Bindung von Streptavidin und Biotin zählt zu den stärksten nicht-kovalenten Wechselwirkungen in der Biologie,¹¹⁴ wodurch stringente Waschschritte bei der Durchführung der IntP möglich sind. Trotzdem müssen Waschbedingungen gewählt werden, bei denen die IRF4-interagierenden Proteine weiterhin im Komplex bleiben. In der Literatur sind bereits einige Proteine als Interaktionspartner von IRF4 beschrieben (siehe Einleitung, Kapitel 1.4). Da IRF4 eine essenzielle Rolle während der Th9-Differenzierung spielt³⁹ und Th9-Zellen im Zusammenhang mit inflammatorischen Reaktionen des Immunsystems stehen, ist die Aufklärung des transkriptionellen Netzwerks um IRF4 von zentraler Bedeutung, um sowohl die protektiven, als auch die pathogenen Effekte von Th9-Zellen zu verstehen.

Zur Etablierung der Biotin-vermittelten IRF4-IntP wurden verschiedene experimentelle Bedingungen getestet. So wurde zunächst geprüft, welche Streptavidin (SA) beschichteten Kügelchen (*SA-Beads*) und welche Lysepuffer sich am besten zur Isolierung von *in vivo* biotinyliertem IRF4 eignen. Ein weiterer Test bestand darin, zu prüfen, welcher Puffer die besten Resultate beim Waschen der *Beads* erzielt. Die folgenden Abschnitte 4.2.1 und 4.2.2 beschreiben die Ergebnisse der einzelnen Optimierungsschritte.

4.2.1 Optimierung der Bindeeffizienz verschiedener SA-Beads in Abhängigkeit unterschiedlicher Puffersysteme

Zur Isolierung von biotinylierten Proteinen stehen mehrere, kommerzielle SA-Beads zur Verfügung. Um zu prüfen, welches Produkt für die Isolierung von *in vivo* biotinyliertem IRF4 am besten geeignet ist, wurden verschiedene SA-Beads der Firma Invitrogen, Thermo Fisher Scientific (Darmstadt) verglichen. In einem Vorversuch wurden die Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 und T1, sowie die Dynabeads™ Streptavidin M-270 und M-280 auf ihre Spezifität in der Proteinbindung getestet. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Dynabeads™ T1 und M-280 (im Folgenden als T1- und M-280-Beads bezeichnet) die geringste unspezifische Hintergrundbindung aufweisen (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden diese beiden SA-Beads in der Biotin-vermittelten IRF4-IntP eingesetzt und gegeneinander getestet.

Gleichzeitig wurde geprüft, mit welchem Puffersystem zur Zelllyse und anschließenden Inkubation der Beads eine möglichst effektive Bindung von *in vivo* biotinyliertem IRF4 erzielt werden kann. In den Test wurden ein Harnstoffpuffer (Zusammensetzung siehe Abschnitt 3.4.1), ein RIPA-Puffer der Firma Thermo Fisher Scientific (Darmstadt) und ein Zelllyse-Puffer (*Cell Lysis Buffer*, CLB) aus dem „µMACS FactorFinder Kit“ der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach) einbezogen. Für die anfänglichen Testversuche und den im Folgenden dargestellten Vergleich der SA-Beads in verschiedenen Puffersystemen wurde eine große Menge an Zellmaterial benötigt. Aus diesem Grund wurde der Test mit Mastzellen durchgeführt, die in großen Mengen vergleichsweise einfach zu kultivieren sind. Stimulierte Mastzellen (siehe Abschnitt 3.10.3 und 3.10.4), die *in vivo* biotinyliertes IRF4 exprimieren, wurden in den oben genannten Puffern gemäß Abschnitt 3.13.1 komplett lysiert. Danach wurden T1- und M-280-Beads mit den verschiedenen Zellextrakten inkubiert und eine IRF4-IntP (Abschnitt 3.13.4) durchgeführt. Die isolierten Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt (siehe Abschnitt 3.13.3.1), IRF4 im Western Blot (siehe Abschnitt 3.13.3.2) analysiert und die Menge des durch die SA-Beads gebundenen biotinylierten IRF4 anhand der relativen Intensität der Proteinbanden bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-4 dargestellt.

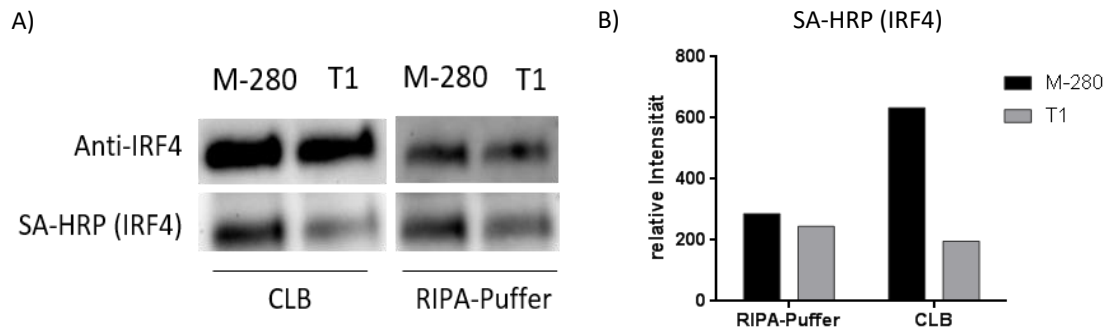


Abbildung 4-4: Vergleich der Bindeeffizienz von Dynabeads™ T1 und M-280

Jeweils 1×10^7 biotinyliertes IRF4 exprimierende BMDC wurden 48 h mit $0,75 \mu\text{M}$ Ionomycin und IL-1 β stimuliert und anschließend mit RIPA-Puffer (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt) oder Zellyse-Puffer (CLB) aus dem „ μ MACS FactorFinder Kit“ der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach) mittels Ultraschalls im Bioruptor lysiert. Hiernach wurden je $50 \mu\text{l}$ der Dynabeads™ T1 oder M-280 mit den verschiedenen Komplettzelllysaten in RIPA-Puffer, bzw. CLB vier Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurden die SA-Beads pro Probe dreimal mit je 1 ml RIPA-Puffer der Firma Thermo Fisher Scientific und zweimal mit je 1 ml PBS gewaschen und die gebundenen Proteine durch Aufkochen in $50 \mu\text{l}$ SDS-Ladepuffer von den SA-Beads eluiert. A) Die isolierten Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mithilfe von anti-IRF4 und SA-HRP im Western Blot analysiert. B) Mithilfe des Computerprogramms „ImageLab4“ (Version 4.0.1) von Bio-Rad (München) wurde die Intensität der Proteinbanden auf der Membran quantitativ bestimmt.

Es konnte gezeigt werden, dass unabhängig des zur Zellyse eingesetzten Puffers (CLB oder RIPA-Puffer) mithilfe der M-280-Beads eine größere Menge biotinyliertes IRF4 aus den Zelllysaten isoliert werden konnte als unter Verwendung der T1-Beads (siehe Abbildung 4-4 A und B). Bei Inkubation der SA-Beads mit Komplettzelllysaten, die in Harnstoffpuffer hergestellt wurden, konnte weder mit den M-280-Beads noch mit den T1-Beads für weitere Analysen ausreichend Protein über die IRF4-IntP isoliert werden (Daten nicht gezeigt). Vergleicht man die Ergebnisse der IRF4-IntP, die jeweils unter Verwendung der M-280-Beads entweder in RIPA-Puffer oder in CLB generiert wurden, wird deutlich, dass die SA-Beads eine höhere Affinität zu *in vivo* biotinyliertem IRF4 zeigen, wenn sie mit Lysaten aus CLB aus dem „ μ MACS FactorFinder Kit“ inkubiert werden. Die Kombination aus M-280-Beads und CLB erzielte bei der Biotin-vermittelten IRF4-IntP bei einer Ausgangsmenge von 1×10^7 Zellen die besten Ergebnisse zur effizienten Isolierung von IRF4 aus Komplettzelllysaten.

4.2.2 Reduktion von unspezifisch gebundenen Proteinen

4.2.2.1 Vergleich verschiedener Waschpuffer

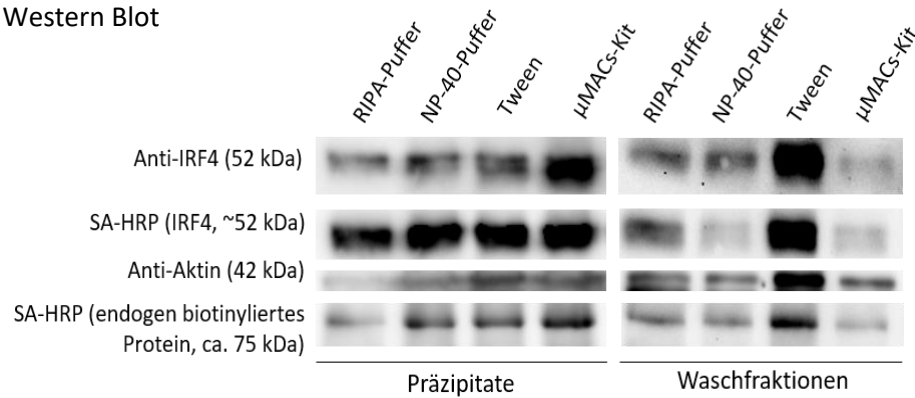
Nachdem die M-280-Beads als die am bestgeeigneten SA-Beads für die IRF4-IntP definiert werden konnten, liegt ein weiterer wichtiger Schritt in der Optimierung der Waschbedingungen. Dies ist notwendig, da es während der Inkubation der SA-Beads mit den Zellextrakten zu einer

unspezifischen Bindung von verschiedenen Proteinen kommen kann. Ziel der Optimierung ist, dass einerseits möglichst viele unspezifisch gebundene Proteine (z.B. Aktin) von den *SA-Beads* entfernt werden und andererseits spezifisch gebundenes biotinyliertes IRF4 mit seinen Interaktionspartnern an den *SA-Beads* verbleibt. Um herauszufinden, welcher Puffer am besten zum Waschen der mit Protein beladenen *M-280-Beads* geeignet ist, wurde eine Auswahl verschiedener Puffersysteme für die IRF4-IntP getestet:

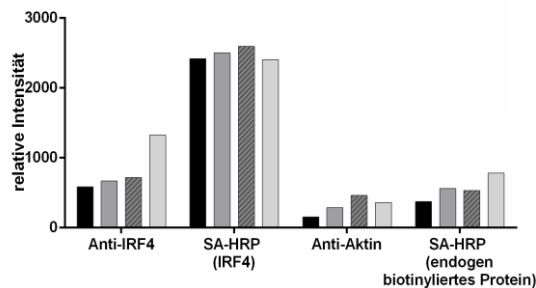
- RIPA-Puffer (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt)
- NP-40-Puffer (aus Rudra et al.¹³³)
- 0,1% Tween in PBS
- Waschpuffer LS und HS aus dem „µMACS FactorFinder Kit“ (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)

Nach den ersten IntP-Versuchen mit Mastzellen und dem darüber erlangten Wissen über einzusetzende Zellzahlen wurde im Hinblick auf die finalen Experimente zur Charakterisierung von IRF4-Transkriptionsfaktorkomplexen in Th9-Zellen für die Durchführung des Waschpuffervergleichs ein Kompletzelllysat aus restimulierten Th9-Zellen von *Irf4^{Bio}*-Mäusen hergestellt (siehe Abschnitt 3.10.7 und 3.13.1). Es wurde eine IRF4-IntP durchgeführt (siehe Abschnitt 3.13.4), wobei die *M-280-Beads* nach der Inkubation mit dem Lysat zu gleichen Teilen aufgeteilt und mit den oben genannten Puffern gewaschen wurden. Die Analyse der isolierten Proteine (Präzipitate), sowie der Proteine aus den einzelnen Waschschrinen (Waschfraktionen) erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot (siehe Kapitel 3.13.3). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-5 dargestellt.

A) Western Blot



B) Präzipitate



C) Waschfraktionen

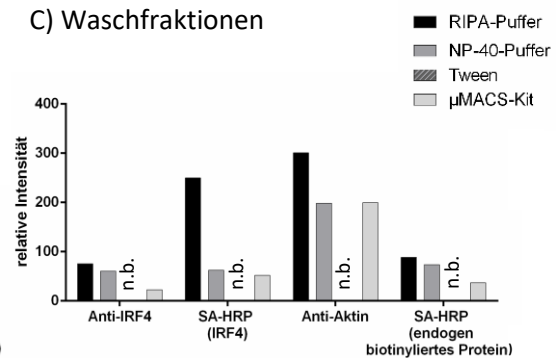


Abbildung 4-5: Test verschiedener Waschpuffer zur Durchführung einer Biotin-vermittelten IRF4-Interaktompräzipitation (IntP)

4×10^7 Th9-Zellen aus Milzen von *Irf4*^{Bio}-Mäusen wurden an Tag 6 vier Stunden mit 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-CD3 restimuliert und in 400 μl CLB mittels Ultraschalls im Bioruptor lysiert. Anschließend wurde eine IRF4-IntP durchgeführt, wobei die M-280-Beads nach der Über-Nacht-Inkubation (4 °C) mit dem Lysat zu gleichen Teilen aufgeteilt wurden. Zum Waschen der SA-Beads wurden folgende Puffer verwendet: RIPA-Puffer (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt), NP-40-Puffer (Rudra et al.¹³³), 0,1% Tween in PBS und die Waschpuffer LS und HS aus dem „ μ MACS FactorFinder Kit“ (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach). Nach dem Waschen wurden die gebundenen Proteine durch Aufkochen in 50 μl SDS-Ladepuffer von den SA-Beads eluiert. A) Die über die IntP isolierten Proteine (Präzipitate) sowie die Proteine im Überstand nach dem ersten Waschschrift (Waschfraktionen) wurden im Anschluss über eine SDS-PAGE aufgetrennt und mithilfe spezifischer Antikörper und SA-HRP im Western Blot analysiert. Die quantitative Bestimmung der Proteinbanden-Intensität erfolgte mithilfe des Computerprogramms „ImageLab4“ (Version 4.0.1) von Bio-Rad (München). B) Relative Intensität der Proteinbanden von isolierten Proteinen. C) Relative Intensität der Proteinbanden von Proteinen in den Waschfraktionen. n.b. = nicht bestimmbar.

Wie anhand des Western Blots in Abbildung 4-5 A und der Intensität der Proteinbanden in Abbildung 4-5 B zu sehen ist, ist die Gesamtmenge an isoliertem IRF4 (biotinyliertes und nicht-biotinyliertes IRF4) in der Probe, die mit den Puffern des μ MACS-Kits gewaschen wurde, am höchsten. Der Anteil an biotinyliertem IRF4 unterscheidet sich zwischen den einzelnen Proben jedoch kaum. Vergleicht man die Menge an isoliertem Aktin, fällt auf, dass bei der Probe, die mit RIPA-Puffer gewaschen wurde, am wenigsten Aktin von den SA-Beads eluiert wurde.

Wie in Kapitel 1.5 bereits erwähnt, existieren auch endogen biotinylierte Proteine (bei Säugetieren sind vier endogen biotinylierte Proteine bekannt¹³⁴ (hier beispielhaft zu sehen: ein ca. 75 kDa schweres Protein), siehe auch Kapitel 5.1 der Diskussion). Diese werden während der IRF4-IntP ebenfalls von den *SA-Beads* spezifisch gebunden und mitisoliert. Aus diesem Grund wurden die Präzipitations-Proben ebenfalls auf das Vorhandensein von endogen biotinylierten Proteinen untersucht. Beim Vergleich der Präzipitate aus den verschiedenen Proben zeigte sich, dass die Isolierung eines ca. 75 kDa schweren endogen biotinylierten Proteins am stärksten reduziert wird, wenn RIPA-Puffer zum Waschen der *SA-Beads* verwendet wird.

Die Analyse der Proteinmengen in den Überständen der einzelnen Waschfraktionen (siehe Abbildung 4-5 A und C) zeigt beinahe eine umgekehrte Korrelation zu den Proteinmengen der eluierten Proteine. Aufgrund einer Reaktion von Tween-20 mit der ECL-Substratlösung^{***} (siehe Abschnitt 3.13.3.2) konnten die Waschfraktionen der Proben, die mit 0,1% Tween gewaschen wurden, nicht quantitativ ausgewertet werden. Trotzdem zeigt das Ergebnis deutlich, dass die verschiedenen Waschpuffer (unspezifisch gebundene) Proteine mit unterschiedlicher Stringenz von den *SA-Beads* abwaschen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich von den getesteten Puffern der RIPA-Puffer am besten zum Waschen der *SA-Beads* eignet. Die Menge an biotinyliertem IRF4, welches spezifisch mittels der IRF4-IntP isoliert wird, ist vergleichbar mit der IRF4-Ausbeute nach Durchführung einer IntP unter den anderen Waschbedingungen. Dennoch wird unspezifisch gebundenes Protein (wie Aktin) vergleichsweise gut von den *Beads* abgewaschen und die Isolierung von endogen biotinylierten Proteinen reduziert.

4.2.2.2 Reduktion der Isolierung von endogen biotinylierten Proteinen

Trotz der optimierten Bedingungen zur Steigerung der Bindeeffizienz von *SA-Beads* zu biotinyliertem IRF4 in Kombination mit stringenten Waschschrritten kann nicht verhindert werden, dass neben IRF4 auch die endogen biotinylierten Proteine über die Biotin-vermittelte IntP isoliert werden. Aus Vorversuchen mit Mastzellen war bekannt, dass sich die Menge an endogen biotinylierten Proteinen durch die Herstellung von Kernextrakten verringern lässt (siehe Abbildung 4-6). Um die IntP-Strategie im Hinblick auf eine spezifische Isolierung von biotinyliertem IRF4 und dessen Interaktionspartnern weiter zu verbessern, wurde das Verhältnis von kernspezifischem IRF4

*** ECL-Substratlösung = Chemilumineszenz-Substrat zur Detektion von HRP-Konjugaten;
<http://www.merckmillipore.com/DE/de/life-science-research/protein-detection-quantification/western-blotting/protocols/q9ib.qB.710AAAFBRP0RRkww,nav> (03.04.2019)

zu den endogenen biotinylierten Proteinen auch in Th9-Zellen untersucht und mit dem Verhältnis in Th9-Komplettzelllysaten verglichen.

Für den Vergleich wurde jeweils ein Teil der zuvor stimulierten Zellen (siehe Abschnitt 3.10.3 - 3.10.7) geerntet und wie im Abschnitt 3.13.1 beschrieben vollständig lysiert. Von den übrigen Zellen wurden zunächst die Kerne isoliert und im Anschluss ebenfalls lysiert (siehe Abschnitt 3.13.1). Bei der Untersuchung der Th9-Zellen wurde die gleiche Proteinmenge eingesetzt, die sich schon in den Vorversuchen mit Mastzellen für den Nachweis von kernspezifischem IRF4 als optimal erwiesen hatte. Die Analyse der Proteine in den Komplettzelllysaten sowie den Kernextrakten erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließender SA-HRP-Färbung im Western Blot (siehe Kapitel 3.13.3). Das Ergebnis ist in Abbildung 4-6 dargestellt.

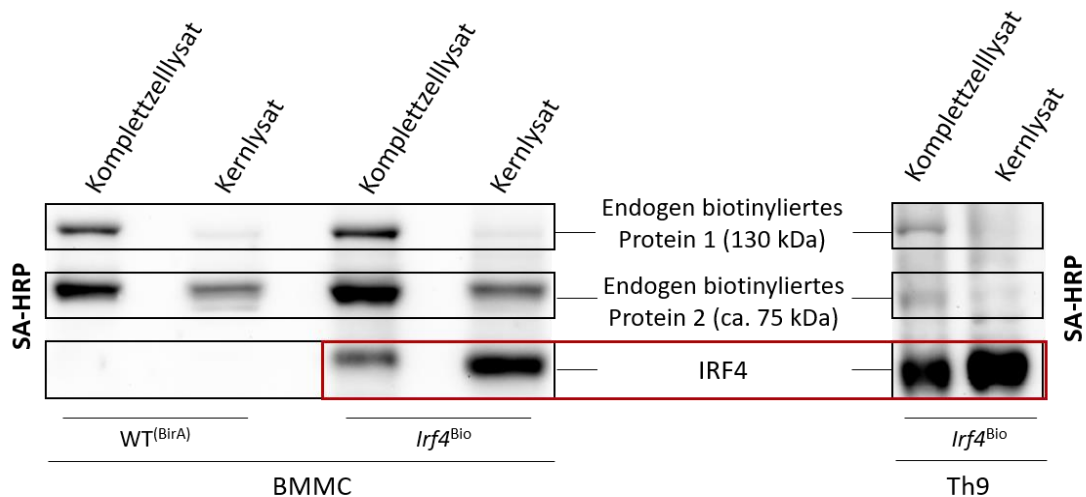


Abbildung 4-6: Die Herstellung von Kernlysaten führt zur Reduktion von endogen biotinylierten Proteinen

BMMC und Th9-Zellen wurden aus dem Knochenmark, bzw. der Milz von *Irf4*^{Bio}-Mäusen und WT^(BirA)-Mäusen isoliert und *ex vivo* differenziert. BMMC wurden 24 h mit 1 μ M Ionomycin stimuliert. Th9-Zellen wurden an Tag 6 vier Stunden mit 4 μ g/ml anti-CD3 restimuliert. Jeweils 3×10^6 BMMC und Th9-Zellen wurden anschließend zur Herstellung von Komplettzelllysaten genutzt. Zur Herstellung von Kernlysaten wurden 4×10^6 BMMC und 5×10^6 Th9-Zellen verwendet. Pro Lysat wurden 30 μ g Protein über SDS-PAGE aufgetrennt. Ein Nachweis der biotinylierten Proteine erfolgte im Western Blot mittels SA-HRP.

Wie der Abbildung 4-6 zu entnehmen ist, sind sowohl bei Mastzellen als auch bei Th9-Zellen zwei deutliche Banden nach SA-HRP-Färbung im Western Blot zu sehen (hier: 130 kDa und ca. 75 kDa), welche auf endogen biotinylierte Proteine zurückzuführen sind. Diese wirken aufgrund ihrer Expressionsstärke bei einer Biotin-vermittelten IRF4-IntP störend. Durch eine Isolierung und anschließende Lyse der Zellkerne kann in beiden Zelltypen die Menge des 130 kDa schweren endogen biotinylierten Proteins sehr stark reduziert werden, in Th9-Zellen gilt dies ebenfalls für das ca. 75 kDa schwere endogen biotinylierte Protein. Verglichen mit Mastzellen, liegt bei Th9-Zellen bereits in Komplettzelllysaten ein für die Biotin-vermittelte IntP günstigeres Mengenverhältnis von

kernspezifischem IRF4 zu den endogenen biotinylierten Proteinen vor. Trotzdem kann auch hier durch eine Isolierung der Zellkerne eine Anreicherung von IRF4 im Verhältnis zum Gesamtproteingehalt im Lysat (siehe rote Markierung in Abbildung 4-6) erzielt werden.

Aufgrund dieses Ergebnisses ist zu erwarten, dass die Verwendung von Kernlysaten als Ausgangsmaterial für eine IRF4-IntP zu einer effektiven IRF4-Isolierung führt. Um die Effektivität zu prüfen, wurde eine IRF4-IntP aus Kernextrakten (siehe Abschnitt 3.13.1 und 3.13.4) durchgeführt.

Als Ausgangsmaterial für die Kernextrakte dienten *ex vivo* differenzierte und restimulierte Th9-Zellen (siehe Abschnitt 3.10.7) aus Milzen von *Irf4*^{Bio-}, und WT^(BirA)-Mäusen. Ausgehend der vorherigen Etablierungsschritte wurde die IRF4-IntP mit M-280-Beads durchgeführt und RIPA-Puffer der Firma Thermo Fisher Scientific (Darmstadt) als Waschpuffer eingesetzt. Anschließend wurden die isolierten Proteine einer massenspektrometrischen Analyse (siehe Kapitel 3.13.5) unterzogen. Die folgende Abbildung 4-7 zeigt das Ergebnis der IRF4-Isolierung.

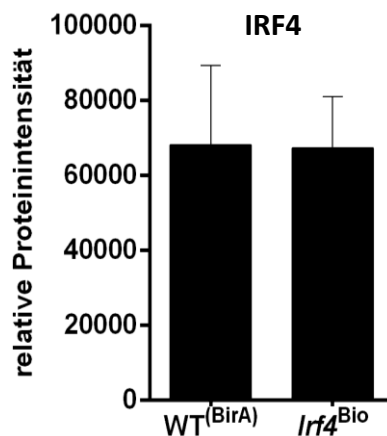


Abbildung 4-7: Keine Anreicherung von IRF4 aus *Irf4*^{Bio-}-Th9-Kernextrakten

Je 5×10^7 Th9-Zellen aus der Milz von *Irf4*^{Bio-}- und WT^(BirA)-Mäusen wurden *ex vivo* differenziert und an Tag 6 vier Stunden mit $4 \mu\text{g/ml}$ anti-CD3 restimuliert. Anschließend wurden die Zellkerne mithilfe von hypotonischem Puffer isoliert und in CLB mittels Ultraschalls im Bioruptor lysiert. Über eine Biotin-vermittelte IRF4-IntP, bei der M-280-Beads über Nacht bei 4°C inkubiert und RIPA-Puffer der Firma Thermo Fisher Scientific (Darmstadt) als Waschpuffer eingesetzt wurden, wurden Proteine isoliert und anschließend massenspektrometrisch untersucht. Die Graphik zeigt die relativ gemessene Intensität an IRF4. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten (\pm Standardabweichung).

Entgegen den Erwartungen ergab die Datenanalyse der Massenspektrometrie, dass mithilfe der Biotin-vermittelten IntP keine spezifische Anreicherung von IRF4 erfolgte. Sowohl aus einem *Irf4*^{Bio-}-Th9-Kernlysate als auch aus einem WT^(BirA)-Th9-Kernlysate, in dem der Transkriptionsfaktor nicht-biotinyliert vorliegt, wurde IRF4 isoliert (siehe Abbildung 4-7).

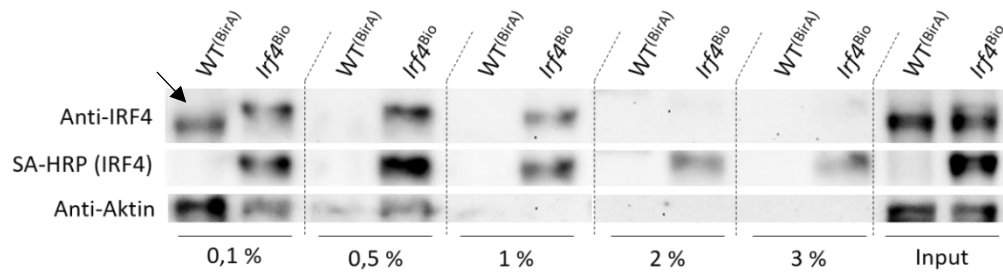
4.2.2.3 Anpassung der Stringenz des RIPA-Puffers

Eine IRF4-negative IntP-Probe ausgehend von Kernextrakten mit nicht-biotinyliertem IRF4 ist für die massenspektrometrische Analyse zwingend erforderlich, um unspezifisch isolierte (falsch-positive) Proteine bei der Ergebnisauswertung ausschließen zu können. Die in Abschnitt 4.2.2.2 beobachtete Isolierung von nicht-biotinyliertem IRF4 aus Th9-Kernextrakten einer WT^(BirA)-Maus kann sich aus einer noch zu niedrigen Stringenz der Waschbedingungen ergeben. Aus diesem Grund wurden die Waschbedingungen anhand von steigenden SDS-Konzentrationen im RIPA-Puffer weiter angepasst.

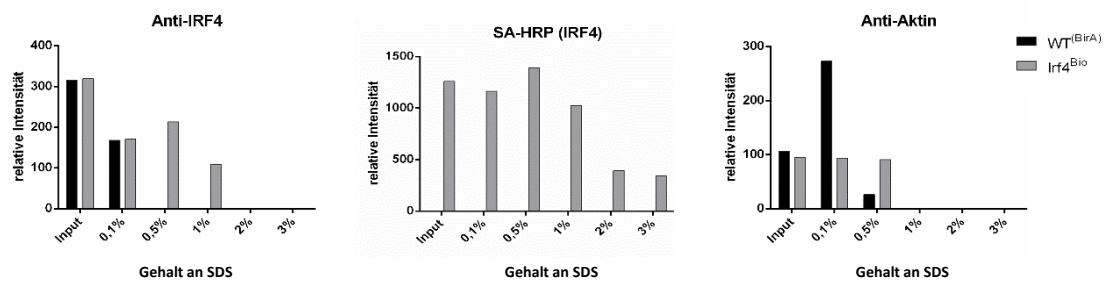
Zur Titration der SDS-Konzentration im RIPA-Puffer wurde eine Biotin-vermittelte IRF4-IntP (siehe Abschnitt 3.13.4) mit Kernlysaten (siehe Abschnitt 3.13.1) aus restimulierten Th9-Zellen aus den Milzen von *Irf4*^{Bio}- Mäusen und WT^(BirA)-Mäusen (siehe Abschnitt 3.10.7) durchgeführt. Während der IntP wurden die einzelnen Proben mit verschiedenen RIPA-Puffern, die unterschiedliche Konzentrationen an SDS (0,1% bis 3% (w/v) SDS) aufwiesen,⁺⁺⁺ gewaschen. Die Analyse der via IntP isolierten Proteine (Präzipitate) sowie der von den SA-*Beads* abgewaschenen Proteine in den einzelnen Waschfraktionen erfolgte nach einer SDS-PAGE mithilfe eines spezifischen IRF4-Antikörpers und SA-HRP im Western Blot (siehe Kapitel 3.13.3). Die Abbildung 4-8 zeigt das Ergebnis des Western Blots.

⁺⁺⁺ Die hier zur SDS-Titration getesteten RIPA-Puffer entsprechen (abgesehen von den unterschiedlichen SDS-Konzentration) der Rezeptur des RIPA-Puffers von Thermo Fischer Scientific, der für die zuvor gezeigten Versuche verwendet wurde.

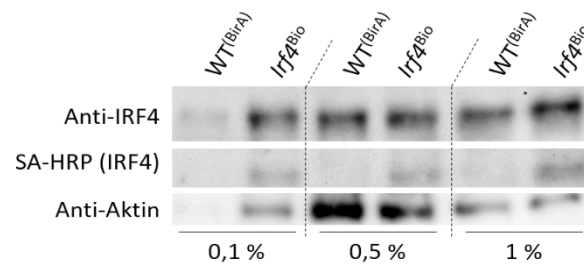
A) Präzipitate: Western Blot



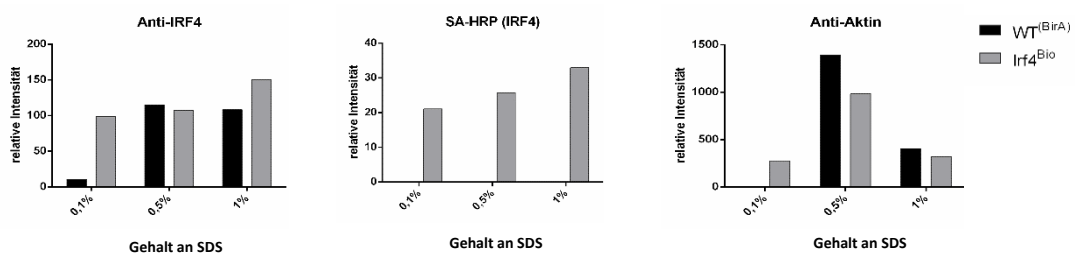
B) Präzipitate: relative Intensität der Antikörperfärbung (Proteinbande)



C) Waschfraktionen: Western Blot



D) Waschfraktionen: relative Intensität der Antikörperfärbung (Proteinbande)

**Abbildung 4-8: Vergleich von RIPA-Waschpuffern mit unterschiedlichem SDS-Gehalt**

Je 3×10^7 Th9-Zellen aus Milzen einer *Irf4*^{Bio}-Maus wurden an Tag 6 vier Stunden mit $4 \mu\text{g/ml}$ anti-CD3 restimuliert. Die Zellkerne wurden mithilfe von hypotonischem Puffer isoliert und in CLB mittels Ultraschallbehandlung im Bioruptor lysiert. Anschließend erfolgte die Durchführung einer IRF4-IntP unter Verwendung von M-280-Beads, die über Nacht bei 4°C inkubiert wurden. Zum Waschen der Beads wurden RIPA-Puffer mit Konzentrationen von 0,1% bis 3% (w/v) SDS verwendet. Die Analyse der über die IntP isolierten Proteine (Präzipitate, siehe A und B), sowie der Proteine in den einzelnen Waschfraktionen (C und D) erfolgte über SDS-PAGE und Western Blot. Der Pfeil in A) markiert unspezifisch isoliertes, nicht-biotinyliertes IRF4. Die quantitative Bestimmung der Proteinbanden-Intensität erfolgte jeweils mithilfe des Computerprogramms „ImageLab4“ (Version 4.0.1) von Bio-Rad (München).

Wie der Abbildung 4-8 A und B zu entnehmen ist, wurde bei einer Waschpufferkonzentration von 0,1% SDS im RIPA-Puffer nicht-biotinyliertes IRF4 aus WT^(BirA)-Th9-Kernextrakten über die Biotin-vermittelte IntP isoliert (siehe Pfeil in Abbildung 4-8 A). Daraus geht hervor, dass eine Konzentration von 0,1% (w/v) SDS im RIPA-Puffer nicht ausreicht, um unspezifisch gebundenes IRF4 von den SA-Beads abzuwaschen. Eine Erhöhung der SDS-Konzentration auf 0,5% (w/v) SDS führte in der Negativkontrolle (WT^(BirA)) zu einer so starken Reduktion von IRF4, dass es im Western Blot nicht mehr sichtbar war, wohingegen IRF4 aus *Irf4*^{Bio}-Th9-Kernextrakten weiterhin nachweislich über die IRF4-IntP isoliert werden konnte. Gleichzeitig konnte die Menge an mitisolierendem Aktin reduziert werden. Dies spiegelt sich auch in der Analyse der Waschfraktionen wider (siehe Abbildung 4-8 C und D), deren Proteingehalt weitestgehend mit dem der Präzipitate korreliert. Ab einer Konzentration von 1% (w/v) SDS waren unspezifisch gebundene Proteine wie Aktin weder in den Präzipitaten von WT^(BirA)- noch von *Irf4*^{Bio}-Th9-Kernlysaten detektierbar. Jedoch sinkt ab dieser Waschpufferstringenz auch die Menge des spezifisch isolierten, biotinylierten IRF4, weshalb ab 1% (w/v) SDS im Waschpuffer die Mitisolierung von IRF4-interagierenden Proteinen zunehmend unwahrscheinlicher wird. Zusammenfassend ergibt dieser Versuch, dass 0,5% (w/v) SDS im RIPA-Puffer am besten geeignet sind, um unspezifisch bindende Proteine (wie z.B. Aktin oder nicht-biotinyliertes IRF4) von den SA-Beads zu entfernen, während spezifisch gebundene Proteine (wie z.B. biotinyliertes IRF4 und IRF4-interagierende Proteine) an den Beads verbleiben.

4.3 Durchführung einer Biotin-vermittelten IRF4-Interaktompräzipitation

Nach der in Kapitel 4.2 beschriebenen Etablierung lässt sich das Protokoll zur Isolierung von biotinyliertem IRF4 und den interagierenden Proteinen über Streptavidin aus Th9-Zellen wie folgt zusammenfassen (siehe auch Abbildung 4-9):

Aus 5×10^7 *ex vivo* differenzierten und restimulierten Th9-Zellen wurden die Kerne isoliert, um einerseits endogen biotinylierte Proteine zu reduzieren und andererseits die Menge an IRF4 im Verhältnis zum Gesamtprotein zu steigern. Zur Lyse wird CLB verwendet, da dieser die höchste spezifische Bindung der M-280-Beads an biotinyliertes IRF4 ermöglichte. Optimale Waschbedingungen werden mithilfe eines RIPA-Puffers mit 0,5% (w/v) SDS erreicht. Nach der IntP erfolgt der Verdau der isolierten Proteine direkt auf den SA-Beads („on-Bead“ Verdau). Eine anschließende massenspektrometrische Analyse ermöglicht die Identifizierung der isolierten Proteine (IRF4-Interaktom).

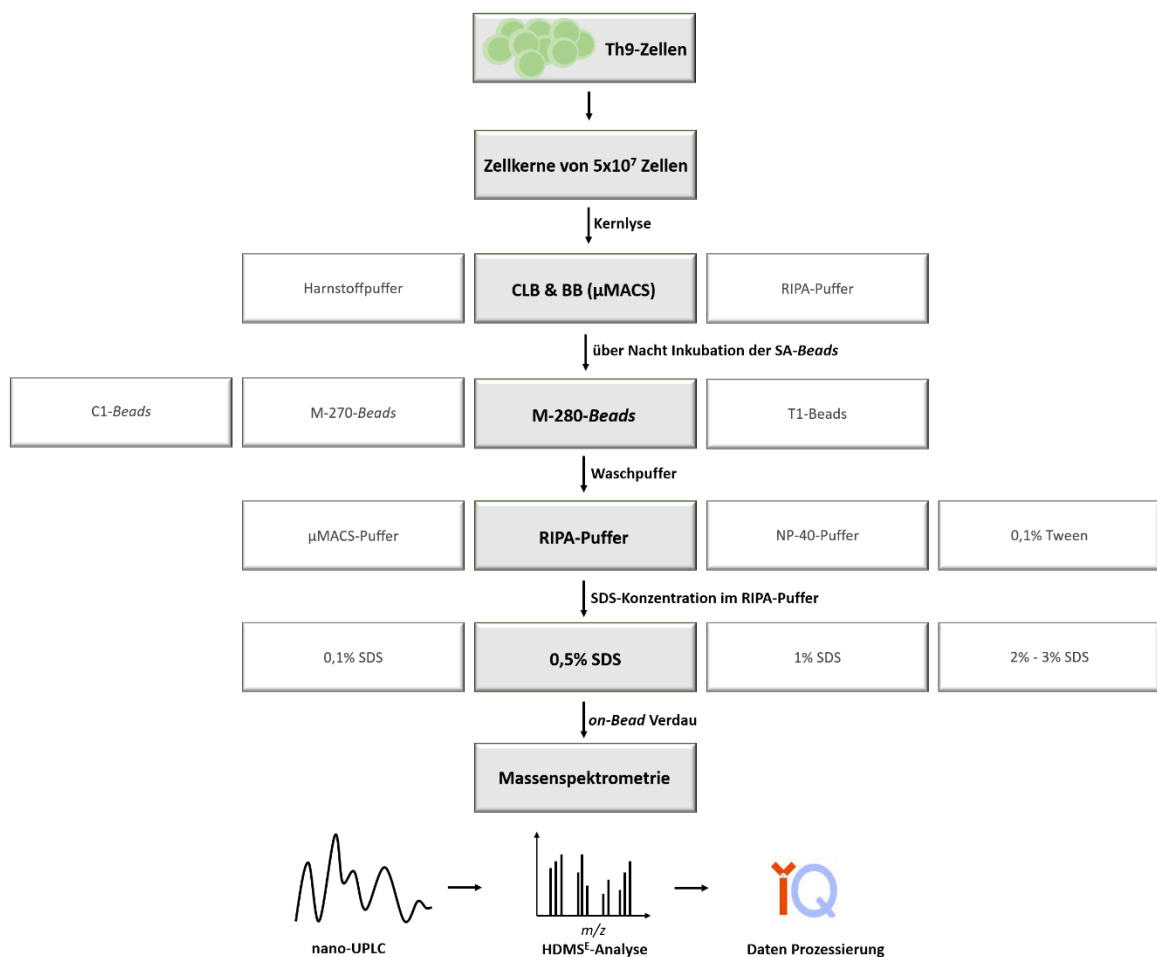


Abbildung 4-9: Schema des optimierten Protokolls zur IRF4-IntP

Das Flussdiagramm zeigt die einzelnen Schritte zur Durchführung einer Biotin-vermittelten IRF4-IntP. Die optimierten Bedingungen sind grau hinterlegt.

4.3.1 Identifizierung von IRF4-interagierenden Proteinen

Zur Analyse des IRF4-Interaktoms wurde eine Biotin-vermittelte IRF4-IntP aus Th9-Kernlysaten einer *Irf4*^{Bio}-Maus durchgeführt (siehe Abschnitt 3.13.4 und Abbildung 4-9). Als Negativkontrolle diente eine IRF4-IntP aus Th9-Kernlysaten einer WT^(BirA)-Maus. Um ein Maß für die Anreicherung von kernspezifischem IRF4 nach erfolgter IRF4-IntP zu erhalten, wurde IRF4 ebenfalls in Th9-Komplettzelllysaten analysiert. Die Analyse der Proteine erfolgte mittels Massenspektrometrie (siehe Kapitel 3.13.5). Das Ergebnis der massenspektrometrischen Untersuchung ist in Abbildung 4-10 gezeigt:

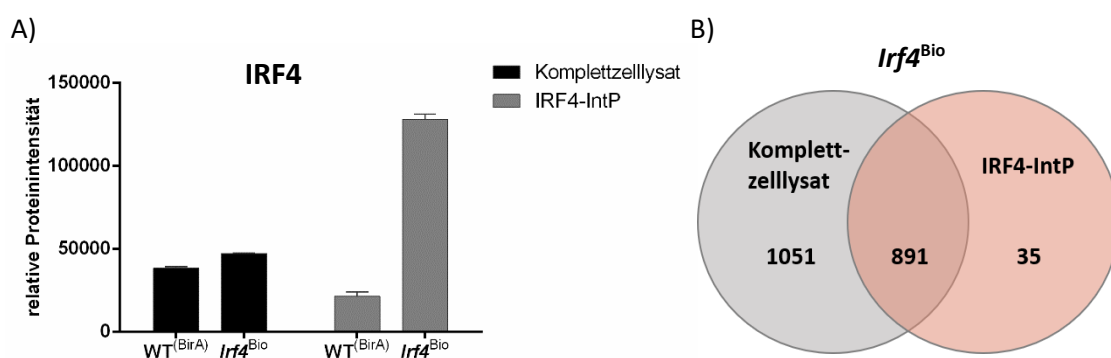


Abbildung 4-10: Spezifische Anreicherung von nukleärem IRF4 aus *Irf4*^{Bio}-Th9-Kernextrakten

Ex vivo differenzierte und an Tag 6 mit 4 µg/ml anti-CD3 vier Stunden restimulierte Th9-Zellen aus der Milz einer *Irf4*^{Bio}-Maus wurden zur Herstellung von Komplettzell- (1×10^7 Zellen) und Kernlysaten (5×10^7 Zellen) in CLB genutzt. Als Negativkontrollen dienten entsprechend Lysate aus Th9-Zellen einer WT^(BirA)-Maus. Die Kernlysate dienten jeweils als Ausgangsmaterial für eine Biotin-vermittelte IRF4-IntP nach optimierten Bedingungen. Die Proteine der Komplettzelllysate sowie die über die IntP isolierten Proteine wurden einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen. A) Quantitativer Vergleich von detektiertem IRF4 aus Komplettzell- und Kernlysaten. Die Graphik zeigt die relativ gemessene Intensität an IRF4. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert von drei technischen Replikaten (\pm Standardabweichung) B) Anzahl der detektierten Proteine im Gesamtproteom von *Irf4*^{Bio}-Th9-Zellen und der über die IntP isolierten Proteine.

Wie der massenspektrometrischen Auswertung in Abbildung 4-10 A zu entnehmen ist, konnte biotinyliertes IRF4 mithilfe einer Biotin-vermittelten IntP angereichert und spezifisch aus *Irf4*^{Bio}-Th9-Kernextrakten isoliert werden. Insgesamt wurden 1942 verschiedene Proteine im Gesamtproteom von *Irf4*^{Bio}-Th9-Zellen identifiziert (siehe Abbildung 4-10 B). Im Vergleich hierzu konnten 926 verschiedene Proteine über eine IRF4-IntP aus *Irf4*^{Bio}-Th9-Kernextrakten isoliert und identifiziert werden.

Als nächstes wurden die über die IRF4-IntP isolierten Proteine aus *Irf4*^{Bio}-Th9-Kernextrakten im Vergleich zur Negativkontrolle genauer analysiert. Die Auswertung ist in Abbildung 4-11 zu sehen.

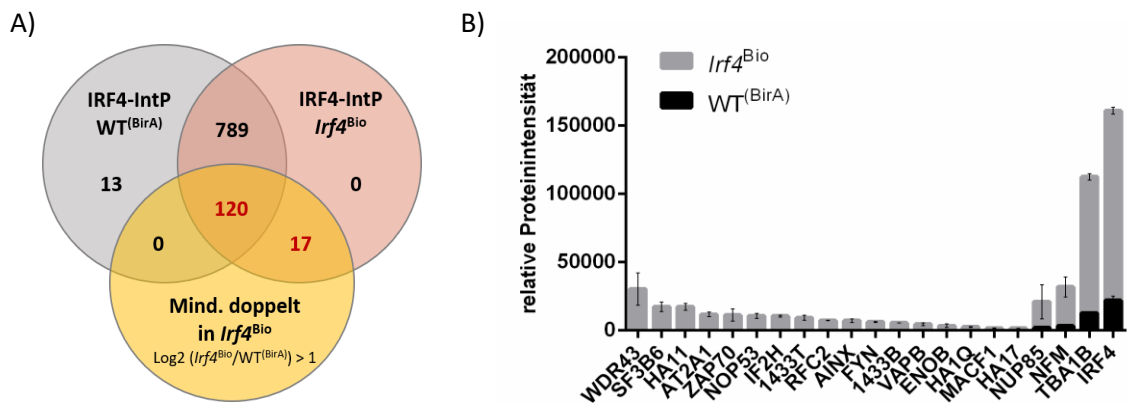


Abbildung 4-11: Identifizierung von IRF4-interagierenden Proteinen

Aus 5×10^7 Zellen *ex vivo* differenzierte und an Tag 6 mit $4 \mu\text{g/ml}$ anti-CD3 vier Stunden restimulierte Th9-Zellen aus der Milz einer *Irf4*^{Bio}-Maus wurden die Kerne isoliert und in CLB lysiert. Als Negativkontrolle diente entsprechend ein Kernextrakt aus Th9-Zellen einer WT^(BirA)-Maus. Anschließend wurde eine Biotin-vermittelte IRF4-IntP nach optimierten Bedingungen durchgeführt und die jeweils isolierten Proteine einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen. A) Anzahl der detektierten Proteine. B) Auflistung von über die Biotin-vermittelte IRF4-IntP isolierten Proteinen nach ihrem Abundanz-Verhältnis. Die Graphik zeigt die relativ gemessene Intensität von 17 Proteinen, die nur im Kernlysat aus *Irf4*^{Bio}-Th9-Zellen identifiziert wurden, sowie die relativ gemessene Intensität von vier Proteinen, die stark über den IRF4-IntP aus Th9-angereichert wurden. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert von drei technischen Replikaten (\pm Standardabweichung).

137 der insgesamt 926 über die IRF4-IntP isolierten Proteine weisen eine mindestens doppelte Abundanz im Vergleich zur Negativkontrolle auf. Darunter wurden 17 Proteine nur in Kernlysaten aus *Irf4*^{Bio}-Th9-Zellen identifiziert (siehe Abbildung 4-11 A und B).

4.3.2 Netzwerkanalyse von IRF4-interagierenden Proteinen

Zur Identifizierung von IRF4-Interaktionspartnern wurde eine Netzwerkanalyse mithilfe des „STRING“-Algorithmus (<https://string-db.org>; Szklarczyk et al.¹²⁶) durchgeführt. Das Programm dient dazu, Protein-Protein-Interaktionen anhand von bereits veröffentlichten Daten sowie rechengestützter Vorhersagen darzustellen. Ziel dabei ist es, ein Netzwerk zu erstellen, welches direkte (physische) sowie indirekte (funktionale) Proteininteraktionen anzeigt.¹²⁶ Für das in Abbildung 4-12 gezeigte Protein-Netzwerk wurden die 137 Proteine analysiert, die wie in Abschnitt 3.13.4 beschrieben über eine Biotin-vermittelte IRF4-IntP aus *Irf4*^{Bio}-Th9-Kernlysaten isoliert wurden.

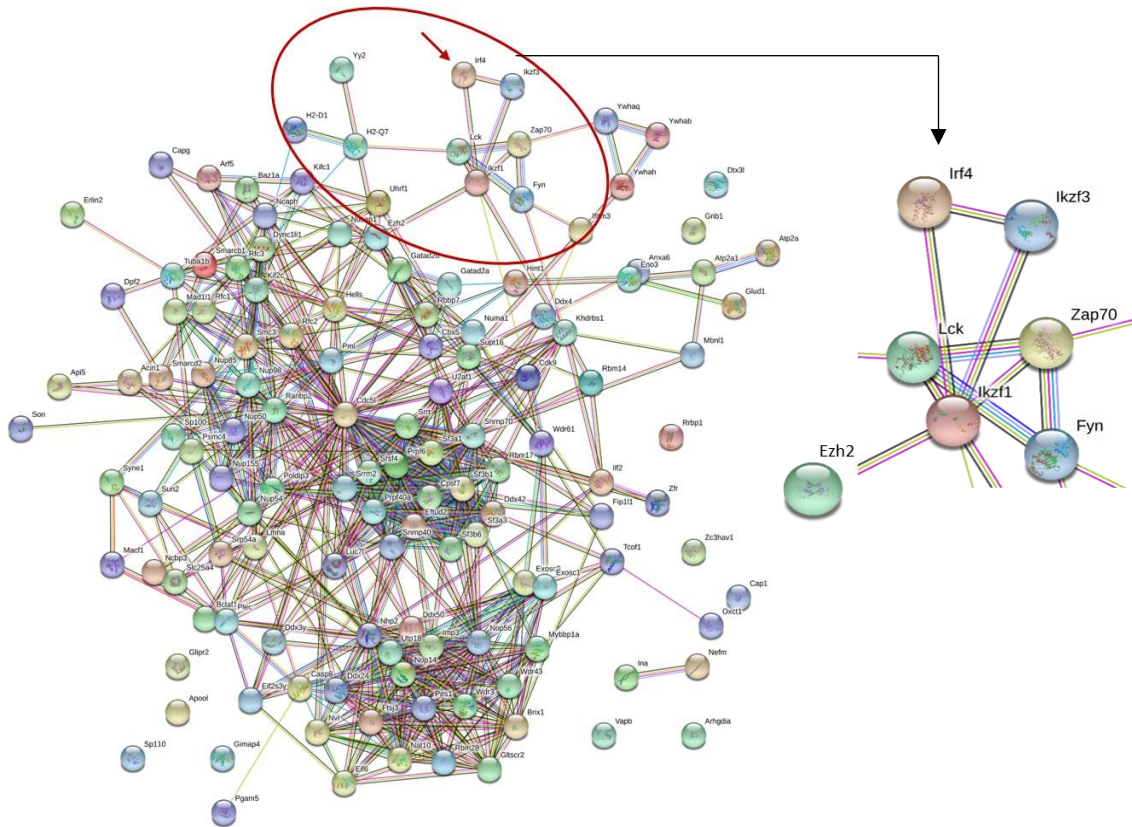


Abbildung 4-12: IRF4-Interaktom

137 Proteine, die über die IRF4-IntP aus *Irf4*^{Bio}-Th9-Zellen isoliert ($\text{Log}_2(Irf4^{\text{Bio}}/WT^{\text{BirA}}) > 1$) und mittels Massenspektrometrie identifiziert werden konnten, wurden mithilfe der Software „STRING“ (Version 11.0; <https://string-db.org>; Szklarczyk et al.¹²⁶) analysiert. Das Programm stellt bereits bekannte sowie computerbasiert vorhergesagte Interaktionen von Proteinen in einem Netzwerk dar. Roter Pfeil: IRF4, Kreismarkierung: Proteine, die im Zusammenhang mit Prozessen des Immunsystems stehen. Eine Liste der dargestellten 137 Proteine findet sich in Tabelle 9-1 der Anlage.

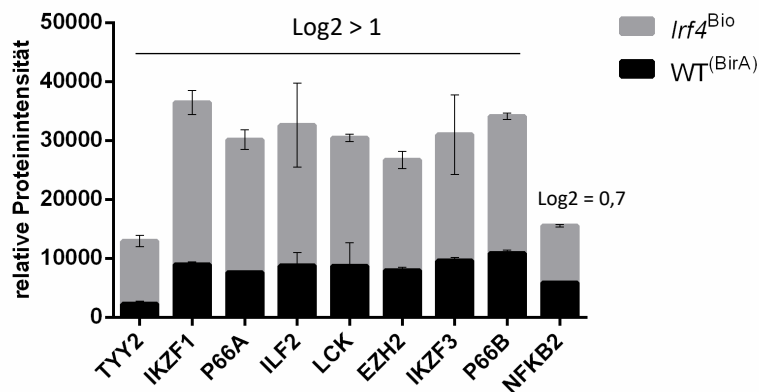
Mithilfe des „STRING“-Algorithmus konnte ein komplexes Netzwerk aus Proteinen erstellt werden (Abbildung 4-12). IRF4 (roter Pfeil) befindet sich am Rand einer Protein-Gruppe, die sich vor allem aus Proteinen zusammensetzt, die im Zusammenhang mit Prozessen des Immunsystems stehen (siehe rote Kreismarkierung). Weiter beschreibt das Netzwerk direkte Interaktionen von IRF4 mit Proteinen der Ikaros-Zink-Finger-Proteinfamilie (IKZF1 und IKZF3), die wiederum mit Proteinen wie *Enhancer of zeste homolog 2* (EZH2) und Zeta-Ketten-assoziierte Proteinkinase 70 (*Zeta-chain-associated protein kinase 70*, ZAP70) in Verbindung stehen. Eine Genontologie (GO)-Analyse (siehe Tabelle 4-1 unten) des Programms zeigt, dass 107 der analysierten 137 Proteine Zellkern-Proteine sind und bestätigt somit die Effizienz der IntP-Methode. Bis auf wenige Proteine (19) konnten alle Proteine entweder mit einer Funktion zur Bindung von Nukleinsäuren oder Proteinen in Verbindung gebracht werden, wobei letzteres knapp überwiegt. Außerdem sind nach der GO-Analyse 43 Proteine an der Regulation der Transkription beteiligt.

Tabelle 4-1: Genontologie (GO) des IRF4-Interaktoms

Mithilfe der Software „STRING“ (Version 11.0; <https://string-db.org>; Szklarczyk et al.¹²⁶) wurde eine GO-Analyse von 137 Proteinen, die über die IRF4-IntP aus *Irf4*^{Bio}-Th9-Zellen isoliert ($\text{Log}_2(Irf4^{\text{Bio}}/WT^{\text{BirA}}) > 1$) und mittels Massenspektrometrie identifiziert werden konnten, durchgeführt. FDR = Falscherkennungsrate (*false discovery rate*; gibt die Wahrscheinlichkeit falsch-positiver Vorhersagen an)

| Genontologie (GO) | Anzahl Proteine | FDR |
|--------------------------------|-----------------|----------------------|
| Zelluläres Kompartiment | | |
| Zellkern | 107 | 6,24e ⁻³⁴ |
| Zellorganelle | 128 | 4,31e ⁻³⁰ |
| Nukleolus | 34 | 1,17e ⁻¹⁶ |
| Molekulare Funktion | | |
| RNA Bindung | 50 | 1,85e ⁻²⁹ |
| Protein Bindung | 71 | 4,36e ⁻⁷ |
| DNA Bindung | 23 | 0,0088 |
| Biologischer Prozess | | |
| Genexpression | 71 | 7,76e ⁻²⁴ |
| Regulation der Genexpression | 60 | 6,89e ⁻¹² |
| Regulation der Transkription | 43 | 1,02e ⁻⁶ |

Ausgewählte Proteine, die durch eine Biotin-vermittelte IRF4-IntP spezifisch isoliert und mittels Massenspektrometrie identifiziert werden konnten, sind in der folgenden Abbildung 4-13 gezeigt.

**Abbildung 4-13: IRF4-interagierende Proteine für weiterführende Interaktom-Analysen**

Die Graphik zeigt eine Auswahl der über die IRF4-IntP isolierten Proteinen, die für weiterführende Analysen des IRF4-Interaktoms interessant sind. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert von drei technischen Replikaten (\pm Standardabweichung).

Die in Abbildung 4-13 gezeigten Proteine bieten aufgrund der aktuellen Literatur interessante Ansätze für weiterführende experimentelle Analysen zum IRF4-Interaktom und werden in Kapitel 5.2 der Diskussion eingehend erörtert.

4.4 Biotin-vermittelte Chromatin-Immunpräzipitation („bioChIP“)

Eine Standardmethode der molekularen Immunologie stellt die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) dar. Diese Methode wird zur Untersuchung von Protein-DNA-Interaktionen verwendet. Hierfür werden Protein und DNA zu einem definierten Zeitpunkt fixiert und das Chromatin anschließend mittels Ultraschalls fragmentiert. Mithilfe von spezifischen Antikörpern können die Proteine im Komplex mit der gebundenen DNA isoliert (immunpräzipitiert) werden. Nach dem Auflösen der Fixierung (durch eine Degradierung der Proteine) folgt die Reinigung der präzipitierten DNA. Die Anwendung analytischer Methoden wie PCR (Primer-vermittelt, lokusweit) und Sequenzierung (ChIP-Seq, genomweit) hilft bei der Identifizierung von Genregionen, die von dem untersuchten Protein (z.B. Transkriptionsfaktor) gebunden werden. Eine Beschränkung dieser Methode liegt in der Verfügbarkeit von zur Präzipitation erforderlichen Antikörpern. Zum einen stehen nicht für jedes Protein kommerzielle Antikörper in für ChIP-geeigneter Qualität („ChIP-grade“) zur Verfügung; zum anderen ist möglich, dass eine geringe Spezifität einzelner Antikörper zu Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen führt. Außerdem kann das Antikörper-spezifische Epitop durch die Fixierung mit Formaldehyd für den Antikörper unzugänglich oder durch die Ultraschallbehandlung zur Fragmentierung der DNA zerstört werden. Um diese Problematik zu umgehen, wurde in der vorliegenden Arbeit zur genomweiten Identifikation von IRF4-regulierten Genen in Th9-Zellen auf Grundlage der Publikationen von Kim et al.¹⁰⁵ und nach einer Protokoll-Vorlage von Soutoglou und Talianidis¹²⁷ eine sogenannte „bioChIP“ für IRF4 etabliert. Anstelle von spezifischen Antikörpern soll Streptavidin zur Präzipitation von *in vivo* biotinyliertem IRF4 genutzt werden. Die folgenden zwei Abschnitte 4.4.1 und 4.4.2 beschreiben die Etablierung und Verifizierung des Protokolls zur Biotin-vermittelten Präzipitation von IRF4-gebundener DNA.

4.4.1 Optimierung der Fragmentierung von fixiertem Chromatin

Für die Präzipitation von IRF4-gebundenem Chromatin mit einer anschließenden Sequenzierung der gereinigten DNA („bioChIP-Seq“) muss fixiertes Chromatin zunächst auf eine durchschnittliche Länge von 200 bis 400 Basenpaaren (bp) gebracht werden. Die Effizienz der Fixierung sowie die Fragmentierung des Chromatins variiert von Zelltyp zu Zelltyp und in Abhängigkeit des zur Lyse verwendeten Puffers in Kombination mit den entsprechenden Einstellungen bei der Ultraschallbehandlung. In vorausgegangenen Etablierungsversuchen mit Mastzellen wurden bereits verschiedene Bedingungen bezüglich Lysepuffer, Fixierdauer und Formaldehyd (FA)-Konzentration, sowie unterschiedlich lange Ultraschallbehandlungen getestet. Die Abbildung 4-14 A (siehe unten) zeigt die Fragmentierung von Chromatin aus Mastzellen, die 7 min mit 1% FA behandelt und anschließend in ChIP-Lysepuffer mittels Ultraschalls stufenweise im Bioruptor lysiert

wurden. Eine optimale Größe des Chromatins von durchschnittlich ca. 250 bp wurde erst nach 6 Runden à 10 min im Bioruptor erreicht. Die Verwendung anderer Lysepuffer führte trotz verschiedener Ansätze bezüglich Fixierdauer und -konzentration an FA sowie unterschiedlich lange Ultraschallbehandlungen zu keiner vergleichbar effizienten Fragmentierung des Chromatins (Daten nicht gezeigt). Um die Bedingungen für Chromatin aus Th9-Zellen zu prüfen, wurden Th9-Zellen gemäß Abschnitt 3.10.7 differenziert, restimuliert, geerntet und mit 1% FA 7 min fixiert (siehe Abschnitt 3.14.1.1). Anschließend wurden die Zellen wie in Abschnitt 3.14.1.2 beschrieben im Bioruptor behandelt, die Fixierung mittels Proteinase K wieder gelöst und die Fragmentgröße der nach Abschnitt 3.14.1.4 gereinigten DNA mithilfe einer Agarose-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.14.2) überprüft. Das Ergebnis ist in Abbildung 4-14 B dargestellt.

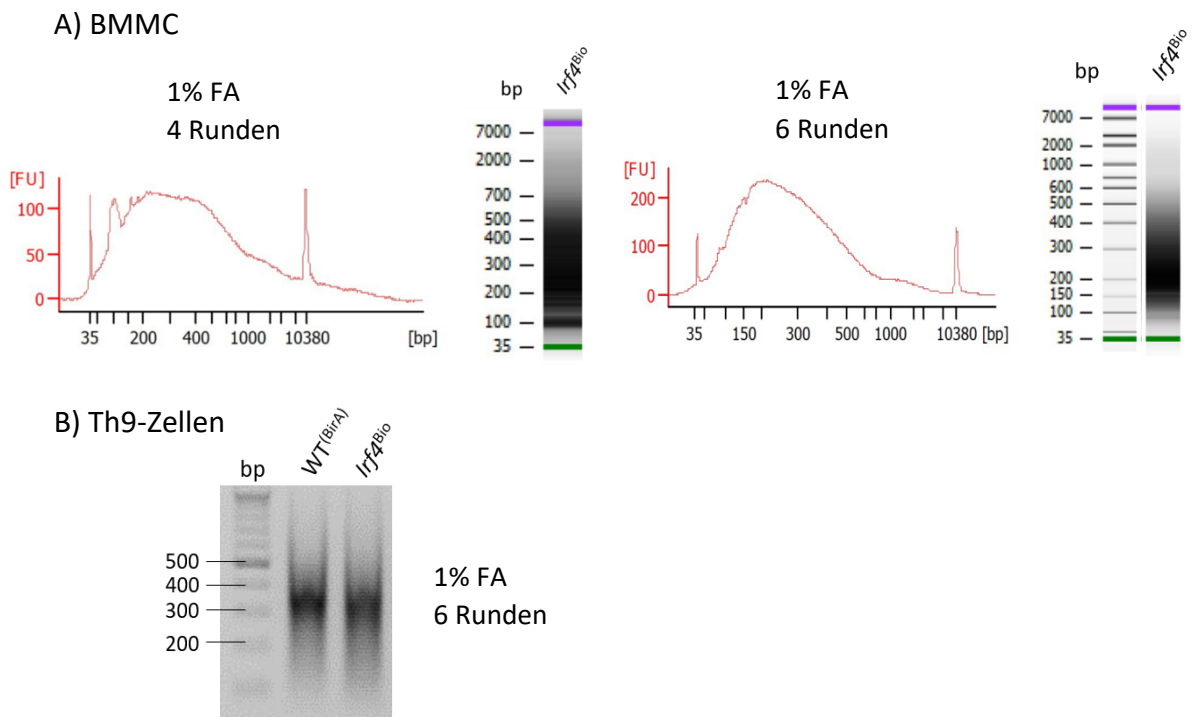


Abbildung 4-14: Fragmentierung von Chromatin zur Durchführung einer bioChIP

A) 8×10^6 BMMC wurden aus Knochenmark einer *Irf4*^{Bio}-Maus differenziert und 24 h mit 1 μ M Ionomycin stimuliert. Die Fixierung erfolgte 7 min mit 1% Formaldehyd (FA) in 5 ml Kit-Ligand-Mastzellfutter. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, in 520 μ l ChIP-Lysepuffer aufgenommen und 4, bzw. 6 Runden à 10 min (10 alternierende Zyklen von jeweils 30 s Ultraschall und 30 s Pause) mit der Einstellung „High“ im Bioruptor lysiert. Nach der Lyse wurden die fixierten Proteine mithilfe von Proteinase K degradiert und die gereinigte DNA im Bioanalyser untersucht. Die Abbildung links zeigt die Fragmentierung nach 4 Runden im Bioruptor, die Abbildung rechts nach 6 Runden. B) $1,2 \times 10^7$ *ex vivo* differenzierte Th9-Zellen aus der Milz einer *Irf4*^{Bio}-Maus sowie einer WT^(BirA)-Maus wurden an Tag 5 24 h mit 4 μ g/ml anti-CD3 restimuliert. Die Fixierung erfolgte mit 1% FA in 5 ml TM + 5% FCS. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, in 520 μ l ChIP-Lysepuffer aufgenommen und 6 Runden à 10 min (10 alternierende Zyklen von jeweils 30 s Ultraschall und 30 s Pause) mit der Einstellung „High“ im Bioruptor lysiert. Nach der Lyse wurden die fixierten Proteine mithilfe von Proteinase K degradiert und die Fragmentgröße der gereinigten DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Wie die Agarose-Gelelektrophorese in Abbildung 4-14 B zeigt, ist auch bei Chromatin aus Th9-Zellen eine Fixierdauer von 7 min mit 1% FA und eine anschließende Lyse in CHIP-Lysepuffer geeignet, um mittels Ultraschallbehandlung eine optimale Fragmentierung des Chromatins zu erreichen. Die durchschnittliche Größe betrug nach 6 Runden einer Ultraschallbehandlung im Bioruptor ca. 300 bp.

4.4.2 Überprüfung der Biotin-vermittelten Chromatin-Immunpräzipitation

Nach der Biotin-vermittelten Chromatin-Immunpräzipitation wurde im Hinblick auf die folgende Sequenzierung überprüft, ob IRF4-gebundenes Chromatin präzipitiert werden konnte. Die Kontrollen diesbezüglich erfolgten auf Protein- und DNA-Ebene.

Während der Durchführung der bioChIP (siehe Kapitel 3.14.1) ausgehend von Chromatin aus Th9-Zellen wurde eine Protein-Einsatz (*Input*)-Kontrolle (siehe Abschnitt 3.14.1.3) genommen. Diese Probe soll zum Nachweis des am Chromatin fixierten *in vivo* biotinylierten IRF4 dienen. Außerdem wurden nach der Inkubation der Chromatinproben mit den *SA-Beads* die jeweiligen Überstände aufbewahrt, um anschließend indirekt kontrollieren zu können, wie viel des ursprünglich in der Probe enthaltenen biotinylierten IRF4 von den *Beads* gebunden wurde. Die in den Kontrollproben enthaltenen Proteine wurden jeweils über SDS-PAGE aufgetrennt im Western Blot mithilfe von spezifischen Antikörpern und SA-HRP analysiert (siehe Kapitel 3.13.3). Die Abbildung 4-15 zeigt das Ergebnis des Western Blots.

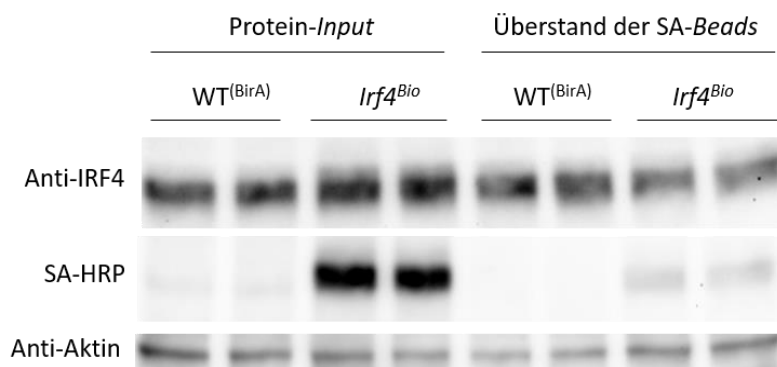


Abbildung 4-15: Kontrolle der bioChIP auf Proteinebene mittels Western Blot

Je $1,2 \times 10^7$ Th9-Zellen wurden aus der Milz einer WT^(BirA)-Maus, bzw. einer Irf4^{Bio}-Maus isoliert, *ex vivo* differenziert und an Tag 5 24 h mit 4 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD3 restimuliert. Anschließend wurde eine bioChIP durchgeführt. Zum Nachweis des an das Chromatin fixierte *in vivo* biotinylierte IRF4 wurden von jeder Chromatinprobe 50 μl abgenommen (Protein-Einsatz (*Input*)). Außerdem wurden nach der Inkubation der Chromatinproben mit den *SA-Beads* je 50 μl der *Beads*-Überstände aufbewahrt. Die Proteine in den Kontrollproben wurden anschließend über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels spezifischer Antikörper und SA-HRP im Western Blot analysiert. Gezeigt sind zwei biologische Replikate aus drei unabhängigen Versuchen mit gleichem Ergebnis.

Die Anti-IRF4- und Anti-Aktin-Antikörperfärbungen des Western Blots in Abbildung 4-15 zeigen, dass der Proteingehalt in allen zur Präzipitation eingesetzten Proben erwartungsgemäß gleich groß ist (vgl. Protein-*Input*). Die Analyse der Überstände zeigt, dass nach der Inkubation der SA-*Beads* mit den Chromatin-Proben kaum noch biotinyliertes IRF4 im Überstand vorliegt. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass das biotinylierte IRF4 überwiegend von den *Beads* gebunden wurde. Proteine wie Aktin und nicht-biotinyliertes IRF4 werden nicht durch Streptavidin präzipitiert und verbleiben im Überstand. Die Durchführung der bioChIP sollte also zur spezifischen Präzipitation von IRF4-gebundener DNA führen.

Dies kann mithilfe einer qRT-PCR (siehe Abschnitt 3.14.3) und der Verwendung von spezifischen Primern überprüft werden. Vergleichende CHIP-Seq-Analysen von Lee et al. ergaben, dass zwei konservierte IRF4-Bindestellen im *Il10*-Gen von T-Zellen liegen¹³⁵. Hiernach wurden Primer generiert, die an ein regulatorisches Element ca. 9,1 kb strangaufwärts des Transkriptionsstarts (*transcription start site*, TSS) von *Il10* binden. Diese wurden für die „Target-PCR“ eingesetzt, um zu prüfen, ob das *Il10*-regulatorische Element mithilfe der IRF4-spezifischen bioChIP aus Th9-Zellen isoliert werden konnte. Als Negativkontrolle („Off-Target-PCR“) diente die Durchführung einer qRT-PCR mit Primern, die an eine Sequenz ca. 11 kb strangaufwärts des *Ezh2*-Gens binden, in dem keine Bindung von IRF4 zu erwarten war. Tabelle 4-2 zeigt die gemessenen C(t)-Werte der Target- und Off-Target-PCR mit DNA, die durch die bioChIP mittels *in vivo* biotinyliertem IRF4 und Streptavidin gemäß Kapitel 3.14.1 präzipitiert wurde. Als interne Positivkontrolle diente die Durchführung der beiden PCRs mit gereinigter DNA aus der DNA-Einsatz (*Input*)-Kontrolle (siehe Abschnitt 3.14.1.3).

Tabelle 4-2: Kontrolle der bioChIP auf DNA-Ebene mittels qRT-PCR

1,2x10⁷ Th9-Zellen wurden aus der Milz einer *Irf4*^{Bio}-Maus isoliert, *ex vivo* differenziert und an Tag 5 24 h mit 4 µg/ml anti-CD3 restimuliert. Als Kontrolle dienten entsprechend Th9-Zellen aus der Milz einer WT^(BirA)-Maus. Vor der Präzipitation wurden jeder Chromatinprobe 20 µl zur Kontrolle des in den Proben enthaltenen DNA-Gehalts (DNA-Einsatz (*Input*)) entnommen und die Fixierung von Protein und DNA mittels Proteinase K über Nacht gelöst. Nach erfolgter bioChIP wurden sowohl die gereinigten Präzipitationsproben als auch die gereinigten DNA-*Input*-Kontrollen mittels qRT-PCR unter Verwendung spezifischer Primer untersucht. Primer der Target-PCR binden an ein regulatorisches Element im *Il10*-Gen, an das bereits eine Bindung von IRF4 gezeigt wurde¹³⁵ und demnach als Positivkontrolle für eine erfolgreiche Präzipitation von IRF4-gebundener DNA dient. Primer der Off-Target-PCR binden an einen DNA-Bereich aufwärts des *Ezh2*-Gens, in dem keine Bindung von IRF4 zu erwarten ist. Gezeigt sind die mittels qRT-PCR gemessenen C(t)-Werte aus einem von drei unabhängigen Versuchen mit gleichem Ergebnis.

| DNA-Input | | Präzipitierte DNA | | DNA-Input | | Präzipitierte DNA | |
|--|----------------------------|----------------------|----------------------------|--|----------------------------|----------------------|----------------------------|
| WT ^(BirA) | <i>Irf4</i> ^{Bio} | WT ^(BirA) | <i>Irf4</i> ^{Bio} | WT ^(BirA) | <i>Irf4</i> ^{Bio} | WT ^(BirA) | <i>Irf4</i> ^{Bio} |
| 24,95 | 24,38 | 34,03 | 27,95 | 24,61 | 24,44 | 33,94 | 33,53 |
| Target-PCR (<i>Il10</i>-Primer) | | | | Off-Target-PCR (<i>Ezh2</i>-Primer) | | | |

Aus den in Tabelle 4-2 gezeigten C(t)-Werten geht hervor, dass der DNA-Gehalt der ursprünglich zur bioChIP eingesetzten Chromatinproben gleich hoch war (vgl. *DNA-Input*). Gleichzeitig beweist ein Vergleich der C(t)-Werte der beiden Präzipitationsproben ($WT^{(BirA)}$ und $Irf4^{Bio}$) in der Target-PCR die spezifische Anreicherung von IRF4-gebundener DNA ausgehend von Chromatin aus Th9-Zellen einer $Irf4^{Bio}$ -Maus (siehe rote Markierung: C(t) 34,03 < C(t) 27,95). In der Off-Target-PCR ist erwartungsgemäß in keiner Probe eine DNA-Anreicherung zu erkennen.

Beruhend auf dem zugrunde liegenden Prinzip einer qRT-PCR (siehe Abschnitt 3.14.3) kann der genaue Betrag der DNA-Anreicherung anhand der gemessenen C(t)-Werte wie folgt berechnet werden:

$$\begin{aligned} & \text{Betrag der Anreicherung} = \\ & \text{Off-Target } \Delta C(t) \text{ (DNA-Input vs. Präzipitierte DNA)} - \text{Target } \Delta C(t) \text{ (DNA-Input vs. Präzipitierte DNA)} \\ \Rightarrow & \quad WT^{(BirA)} \quad \Delta C(t) = (24,61 \text{ vs. } 33,94) - (24,95 \text{ vs. } 34,03) \\ & \quad \quad \quad = 9,33 - 9,08 = 0,25 \\ & \quad \quad \quad \rightarrow 2^{0,25} = 1,19 \\ \Rightarrow & \quad Irf4^{Bio} \quad \Delta C(t) = (24,44 \text{ vs. } 33,53) - (24,38 \text{ vs. } 27,95) \\ & \quad \quad \quad = 9,09 - 3,57 = 5,52 \\ & \quad \quad \quad \rightarrow 2^{5,52} = 45,9 \end{aligned}$$

Δ Anreicherung
 $WT^{(BirA)}$ vs. $Irf4^{Bio}$

$$\Delta (1,19 \text{ vs. } 45,9) = 44,71$$

Die Berechnung ergibt, dass die Anreicherung am *Il10*-regulatorischen Element einen Faktor von 44,71 beträgt, wenn präzipitierte DNA aus Th9-Zellen einer $Irf4^{Bio}$ -Maus zur PCR eingesetzt wird (im Vergleich zu präzipitierter DNA aus $WT^{(BirA)}$ -Th9-Zellen). Dies beweist, dass die hier etablierte IRF4-spezifische bioChIP erfolgreich durchgeführt werden konnte.

4.5 Identifizierung von IRF4-Bindestellen in Th9-Zellen

4.5.1 Genomweite Analyse IRF4-gebundener Gene

Zur genomweiten Identifizierung von IRF4-Bindestellen und damit potenziell IRF4-regulierten Genen in Th9-Zellen wurde die mittels bioChIP präzipitierte DNA aus Zellen einer *Irf4*^{Bio}-Maus mithilfe von *Next Generation Sequencing* (NGS, siehe Abschnitt 3.14.4) untersucht. Als Negativkontrolle diente entsprechend DNA, die aus Th9-Zellen einer WT^(BirA)-Maus präzipitiert wurde. Anhand einer *Peak-Analyse* (siehe Abschnitt 3.14.4) konnten die IRF4-Bindungen identifiziert werden. Außerdem wurde eine *Motiv-Analyse* (siehe Abschnitt 3.14.4) durchgeführt, bei welcher die Sequenzbereiche aller mittels Sequenzierung detektierter DNA-Fragmente auf eine relative Anreicherung von kurzen, lückenlosen DNA-Bindemotiven von Transkriptionsfaktoren hin untersucht werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-16 dargestellt.

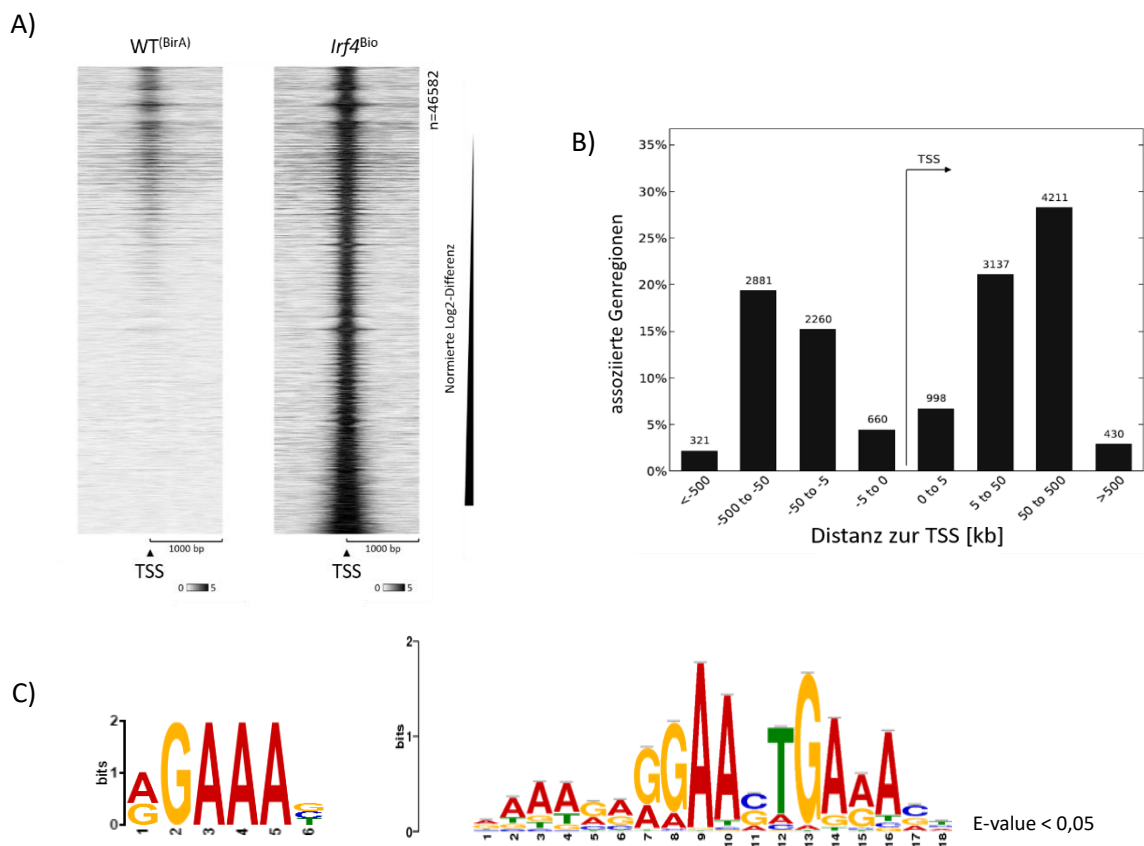


Abbildung 4-16: Identifizierung von IRF4-Bindestellen im Genom von Th9-Zellen

Es wurde eine bioChIP mit Chromatin aus $1,2 \times 10^7$ *ex vivo* differenzierten und an Tag 5 24 h mit 4 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD3 restimulierten Th9-Zellen aus der Milz einer *Irf4*^{Bio}-Maus durchgeführt. Anschließend wurde die präzipitierte DNA gereinigt, eine DNA-*Library* mithilfe des „NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit“ von Illumina (Eindhoven) erstellt und diese im HiSeq2500 (Illumina; Eindhoven) sequenziert. Als Kontrolle dienen entsprechend Th9-Zellen aus der Milz einer WT^(BirA)-Maus.

Dichte, desto dunkler die Färbung. Zur Erstellung der TSS-Graphik wurde die Software „EaSeq“ (<http://easeq.net>; Lerdrup et al.¹²⁸) genutzt und die *Peaks* nach der normierten Log₂-Differenz sortiert. B) Die Graphik zeigt die Distanz der präzipitierten Genregionen zu ihren entsprechenden TSS. Die Graphik wurde mithilfe des „GREAT“-Algorithmus erstellt (Version 3.0.0; <http://great.stanford.edu>; McLean et al.¹²⁹). C) Motiv-Analyse. Gezeigt ist ein mithilfe des „MEME Suite“-Algorithmus „DREME“ (Version 5.0.5; <http://meme-suite.org>; T. L. Bailey¹³¹) identifiziertes Bindemotiv. Links: kurze Sequenz, Rechts: lange Sequenz.

Je nach zugrunde liegendem Algorithmus konnten zwischen 8.026 (CLC, $p \leq 0,05$), bzw. 11.735 ($p \leq 0,1$) und 46.582 (EaSeq, $p \leq 0,1$) Bindestellen von IRF4 im Th9-Zell-Genom identifiziert werden. Eine Analyse zur Verteilung der präzipitierten Genregionen ergab, dass etwa 11% der Bindestellen in unmittelbarer Nähe (bis 5 kb) der TSS liegen. Der Großteil der Bindestellen (ca. 48%) liegt 50 bis 500 kb von den TSS der jeweils assoziierten Genregionen entfernt, wobei die höchste Dichte zwischen 0 und 50 kb Entfernung von den TSS zu finden ist (siehe Abbildung 4-16 A und B). Weiterhin bestätigt eine Motiv-Analyse mithilfe des „MEME Suite“-Algorithmus „DREME“ (<http://meme-suite.org>; T. L. Bailey¹³¹) das Vorhandensein bestimmter Bindemotive. Die in Abbildung 4-16 C) abgebildete Sequenz zeigt das charakteristische IRF4-Hauptbindemotiv (G/AGAAAC/G).

4.5.2 Funktionelle Analyse IRF4-gebundener Gene

Um die Bindestellen von IRF4 funktionell zu charakterisieren wurde eine Signalweganalyse durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 4-17 dargestellt.

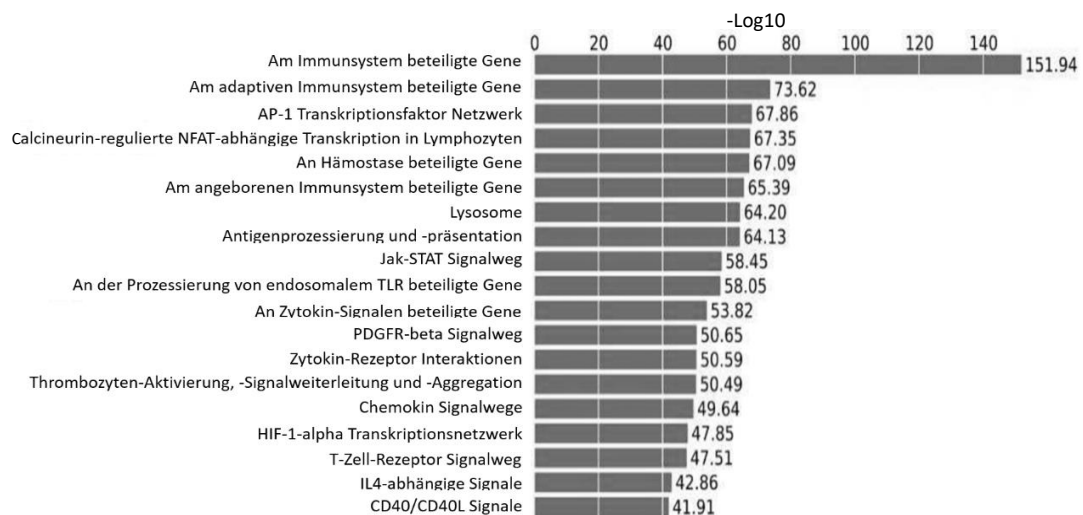


Abbildung 4-17: Signalweganalyse von IRF4-gebundenen Genen

Es wurde eine bioChIP mit Chromatin aus $1,2 \times 10^7$ *ex vivo* differenzierten und an Tag 5 24 h mit 4 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD3 restimulierten Th9-Zellen aus der Milz einer *Irf4*^{Bio}-Maus durchgeführt. Anschließend wurde die präzipitierte DNA gereinigt, eine DNA-Library mithilfe des „NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit“ von Illumina (Eindhoven) erstellt und diese im HiSeq2500 (Illumina; Eindhoven) sequenziert. Als Kontrolle dienten entsprechend Th9-Zellen aus der Milz einer WT^(BirA)-Maus. Ausgehend von den über die IRF4-bioChIP-Seq generierten NGS-Daten wurde eine Genontologie (GO)-Analyse mithilfe des „GREAT“-Algorithmus (Version 3.0.0; <http://great.stanford.edu>; McLean et al.¹²⁹) durchgeführt.

Die Signalweganalyse bestätigt die Qualität der durchgeführten bioChIP ausgehend von *in vivo* biotinyliertem IRF4. Es wurden hauptsächlich Bindestellen von IRF4 und DNA präzipitiert, die für Gene, die am Immunsystem beteiligt sind, codieren. Außerdem verdeutlicht die Analyse, dass IRF4 stark an der Regulation von Transkriptionsfaktor- sowie Zytokin/Chemokin-(Rezeptor)-Signalwegen beteiligt ist.

Aufgrund der Tatsache, dass IRF4 den *Il9*-Promotor transaktiviert³⁹, wurde als nächstes die Bindung von IRF4 am *Il9*-Gen untersucht. Abbildung 4-18 zeigt das Ergebnis der über NGS generierten bioChIP-Seq-Daten.

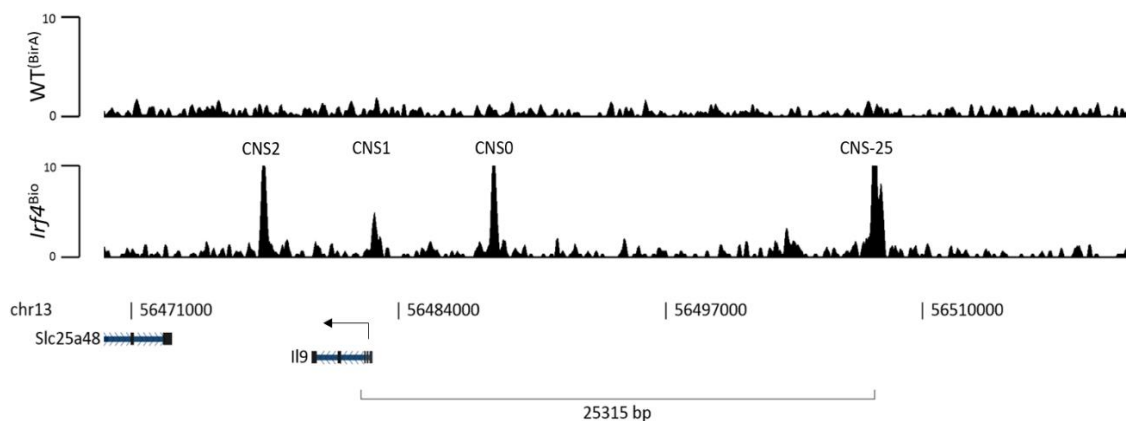


Abbildung 4-18: IRF4 bindet das *Il9*-Gen an vier verschiedenen Positionen

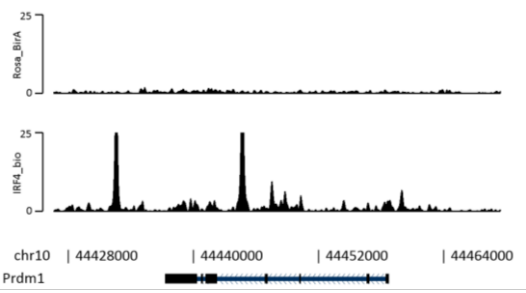
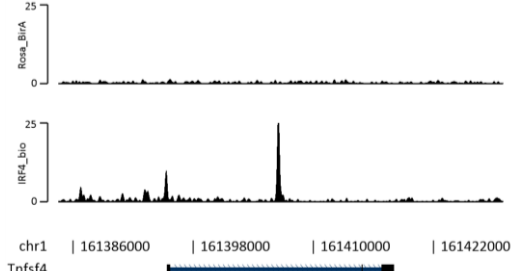
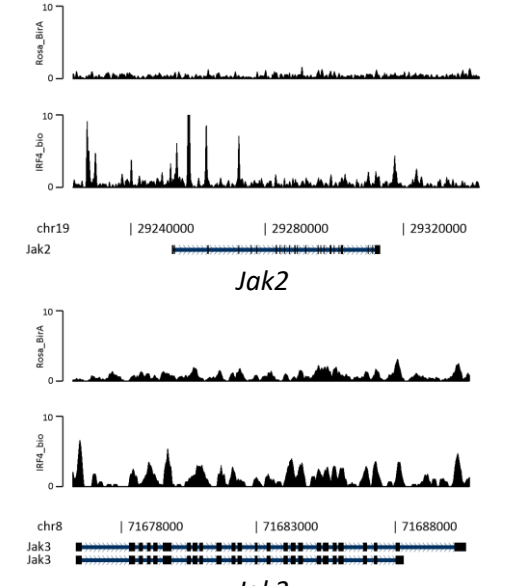
Es wurde eine bioChIP mit Chromatin aus $1,2 \times 10^7$ *ex vivo* differenzierten und an Tag 5 24 h mit 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-CD3 restimulierten Th9-Zellen aus der Milz einer *Irf4*^{Bio}-Maus durchgeführt. Anschließend wurde die DNA gereinigt und mittels eines HiSeq2500 (Illumina; Eindhoven) untersucht. Als Kontrolle dienten entsprechend Th9-Zellen aus der Milz einer WT^(BirA)-Maus. Die bioinformatische Auswertung der präzipitierten DNA erfolgte mithilfe der Software „EaSeq“ (<http://easeq.net>; Lerdrup et al.¹²⁸). Dargestellt ist die Sequenz um das *Il9*-Gen. CNS = konservierte nicht-kodierende Sequenz (*conserved non-coding sequence*)

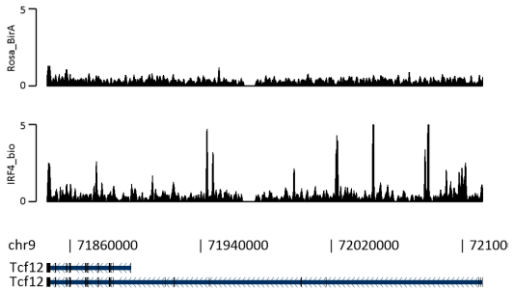
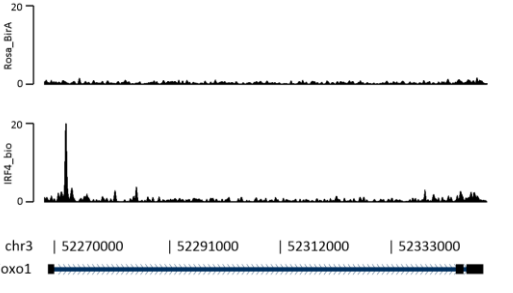
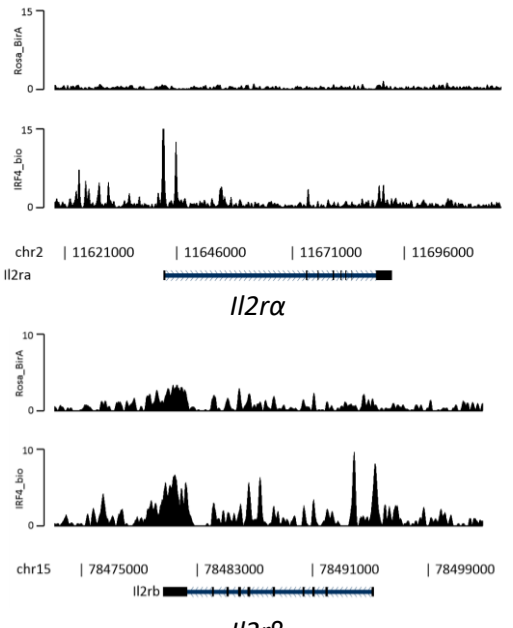
Wie aus der *Peak*-Analyse (siehe Abschnitt 3.14.4) in Abbildung 4-18 hervorgeht, bindet IRF4 in der *Il9*-Genregion an vier verschiedenen Bereichen an die DNA. Neben der bereits beschriebenen Bindung am *Il9*-Promotor (konservierte nicht-kodierende Sequenz 1, *conserved non-coding sequence 1*, CNS1) sind zwei eindeutige Bindestellen jeweils auf- und abwärts der TSS zu erkennen (CNS0 und CNS2). Eine weitere Bindestelle befindet sich ca. 25 kb aufwärts der TSS von *Il9*. In diesem Bereich wurde erst kürzlich von Koh et al. eine konservierte *Enhancer*-Region (CNS-25), die die IL-9-Expression reguliert, beschrieben.¹³⁶

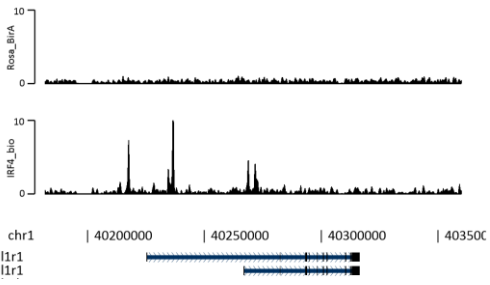
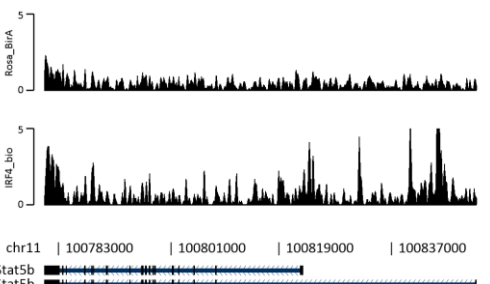
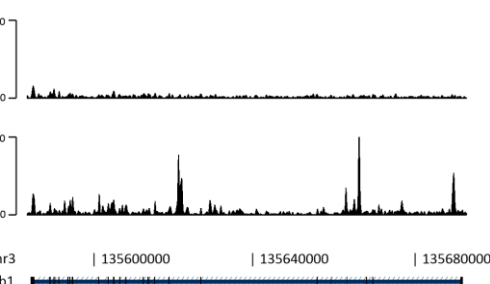
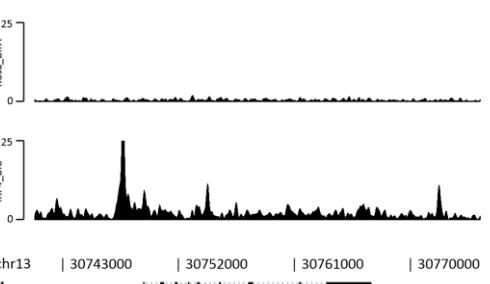
Eine detaillierte Untersuchung der mittels bioChIP und NGS identifizierten Gene soll zur transkriptionellen Charakterisierung von IRF4 in Th9-Zellen beitragen. Die Tabelle 4-3 zeigt eine Liste von Genen, die sich bei der bioChIP-Daten-Auswertung durch eine besonders starke Anreicherung an präzipitierter DNA (entspricht besonders hohen *Peaks*) auszeichnen. Aufgrund der bestehenden Literatur erscheinen diese für weitere experimentelle Analysen geeignet zu sein.

Tabelle 4-3: Literatur bezogene Analyse von IRF4-gebundenen Genen

Via IRF4-bioChIP präzipitierte DNA wurde mittels HiSeq2500 (Illumina; Eindhoven) untersucht. Die bioinformatische Auswertung erfolgte mithilfe der Softwareprogramme „EaSeq“ (<http://easeq.net>; Lerdrup et al.¹²⁸) und CLC Genomics Work Bench“ (Qiagen; Hilden). Die Tabelle zeigt eine Liste von Genen, bei denen eine besonders starke Anreicherung an präzipitierter DNA detektiert wurde und die aufgrund der bestehenden Literatur eine transkriptionelle Regulation durch die Bindung von IRF4 zu erwarten ist.

| Gen | Th9-/IL-9-assozierte Funktion | Literatur |
|--|--|---|
| <p style="text-align: center;"><i>Prdm-1</i> (BLIMP-1)</p>  <p>chr10 44428000 44440000 44452000 44464000 Prdm1</p> | <p>BLIMP-1 nimmt Einfluss auf die IL-9-Produktion und die Differenzierung von Th9-Zellen.</p> <p>IRF4-abhängiges BLIMP-1 aktiviert in Tregs <i>Il10</i>.</p> | <p>Benevides et al.¹³⁷ 2019</p> <p>Cretney et al.¹³⁸ 2011</p> |
| <p style="text-align: center;"><i>Tnfsf4</i> (OX40-Ligand)</p>  <p>chr1 161386000 161398000 161410000 161422000 Tnfsf4</p> | <p>OX40-Ligation führt zur Induktion von Th9-Zellen und unterdrückt die Entwicklung von Tregs und Th17-Zellen.</p> | <p>Xiao et al.⁴⁹ 2012</p> |
| <p style="text-align: center;"><i>Jak2/Jak3</i></p>  <p>chr19 29240000 29280000 29320000 Jak2</p> <p>chr8 71678000 71683000 71688000 Jak3 Jak3</p> | <p>JAK-STAT-Signalweg bei Th2-abhängigem Asthma.</p> <p>JAK3 und STAT5 sind für die IL-2-abhängige IL-9-Expression wichtig.</p> | <p>Pernis und Rothman¹³⁹ 2002</p> <p>Liao et al.¹⁴⁰ 2014</p> |

| | | |
|---|---|--|
| <p style="text-align: center;"><i>Tcf12</i> (HEB)</p>  <p>chr9 71860000 71940000 72020000 72100000</p> <p><i>Tcf12</i></p> <p><i>Tcf12</i></p> | <p>HEB aktiviert FOXO1.</p> <p>(FOXO1 determiniert die Th9-Differenzierung und bindet den <i>Il9</i>-Promotor.)</p> | <p>Welinder et al.¹⁴¹ 2011</p> <p>Malik et al.⁴⁶ 2017</p> <p>Buttrick et al.⁴⁷ 2018</p> |
| <p style="text-align: center;"><i>Foxo1</i></p>  <p>chr3 52270000 52291000 52312000 52333000</p> <p><i>Foxo1</i></p> <p><i>Foxo1</i></p> | <p>FOXO1 determiniert die Th9-Differenzierung und bindet den <i>Il9</i>-Promotor.</p> | <p>Malik et al.⁴⁶ 2017</p> <p>Buttrick et al.⁴⁷ 2018</p> |
| <p style="text-align: center;"><i>Il2rα/β</i></p>  <p>chr2 11621000 11646000 11671000 11696000</p> <p><i>Il2ra</i></p> <p style="text-align: center;"><i>Il2rα</i></p> <p>chr15 78475000 78483000 78491000 78499000</p> <p><i>Il2rb</i></p> <p style="text-align: center;"><i>Il2rβ</i></p> | <p>Die IL-9-Produktion ist abhängig von IL-2.</p> | <p>Schmitt et al.³⁰ 1994</p> |

| | | |
|---|--|---|
| <p style="text-align: center;"><i>Il1r1</i></p>  <p>chr1 40200000 40250000 40300000 40350000</p> <p><i>Il1r1</i> <i>Il1r1</i></p> | <p>Eine Signalweiterleitung ausgehend des IL-1-Rezeptor 1 führt zur Translokation von NF-κB in den Zellkern und verstärkt die IL-9-Produktion.</p> <p>IL-1 verstärkt die IL-9-Expression von T-Zellen.</p> | <p>Stassen et al.⁶⁷ 2012</p> <p>Schmitt et al.⁷⁶ 1991</p> |
| <p style="text-align: center;"><i>Stat5b</i></p>  <p>chr11 100783000 100801000 100819000 100837000</p> <p><i>Stat5b</i> <i>Stat5b</i> <i>Stat5b</i></p> | <p>STAT5 ist für die IL-2-abhängige IL-9-Expression wichtig und bindet an den <i>Il9</i>-Promotor.</p> | <p>Liao et al.¹⁴⁰ 2014</p> |
| <p style="text-align: center;"><i>Nfkb1</i></p>  <p>chr3 135600000 135640000 135680000</p> <p><i>Nfkb1</i></p> | <p>NF-κB wandert in den Zellkern und verstärkt die IL-9-Produktion.</p> <p>NF-κB interagiert mit IRF4. (siehe Abbildung 4-13 und Kapitel 5.2)</p> | <p>Stassen et al.⁶⁷ 2012</p> |
| <p style="text-align: center;"><i>Irf4</i></p>  <p>chr13 30743000 30752000 30761000 30770000</p> <p><i>Irf4</i></p> | <p>IRF4 ist für die Differenzierung von Th9-Zellen essenziell und transaktiviert den <i>Il9</i>-Promotor.</p> | <p>Staudt et al.³⁹ 2010</p> |

Der potenzielle Einfluss der IRF4-Bindung auf die Regulation der in Tabelle 4-3 gezeigten Gene wird in Kapitel 5 eingehend diskutiert. Weiterführende experimentelle Versuchsansätze können zur Aufklärung des durch IRF4 regulierten Gennetzwerks in T-Zellen beitragen.

5 Diskussion

Naive CD4⁺ T-Zellen entwickeln sich unter verschiedenen Differenzierungsbedingungen zu unterschiedlichen T-Helferzellpopulationen (Th-Zellpopulationen). So führt die T-Zell-Rezeptor (TZR)-Stimulation naiver T-Zellen in Anwesenheit von Zytokinen wie Transformierender Wachstumsfaktor-beta (*Transforming growth factor-beta*, TGF- β) und Interleukin-4 (IL-4) zur Differenzierung von Th9-Zellen.³⁰ Eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des jeweiligen T-Zell-Subtyps spielen die Th-Subtyp-spezifischen Transkriptionsfaktoren. Während für regulatorische T-Zellen (Tregs), Th1-, Th2- und Th17-Zellen ein solcher Transkriptionsfaktor eindeutig definiert werden konnte, bleibt er für Th9-Zellen bislang ungeklärt. PU.1 und Interferon regulierender Faktor 4 (IRF4) wurden als essenziell für die Differenzierung von Th9-Zellen beschrieben^{36,39} und werden daher als Kandidaten für einen solchen Haupttranskriptionsfaktor diskutiert. IRF4 spielt jedoch bei der Entwicklung von Th17-Zellen und Tregs, die in ihrer immunologischen Funktion nicht unterschiedlicher sein könnten, ebenfalls eine bedeutende Rolle⁴⁴. Mittlerweile ist bekannt, dass sogar ausdifferenzierte Th-Zellen ihren Phänotyp nachträglich noch wechseln können, um bestimmte Immunreaktionen anzupassen. So können unter bestimmten Bedingungen Th2-Zellen Th1-typische Funktionen übernehmen, indem sie neben ihrem Subtyp-spezifischen Zytokin IL-4, Interferon- γ (IFN- γ) produzieren.¹⁴² Eine ähnliche Plastizität im Sinne der Th-Zelldifferenzierung zeigen Th9-Zellen. Lingnau et al. zeigten, dass auch Th9-Zellen in einen IFN- γ -produzierenden Phänotyp übergehen können.¹⁴³ Zudem können Th9-Zellen aus bereits differenzierten Th2-Zellen hervorgehen.³¹

Diese Beobachtungen legen nahe, dass neben dem differenzierungsbestimmenden Zytokin-Milieu und den entsprechenden Th-Subtyp-spezifischen Transkriptionsfaktoren weitere Faktoren für die CD4⁺ T-Zell-Plastizität von großer Bedeutung sind. Erst kürzlich beschrieben Huber und Lohoff⁴⁴ eine Modell-Hypothese, welche den T-Zell-Entwicklungsstatus mit verschiedenen Funktionen von IRF4 verknüpft. Das Modell unterscheidet vier verschiedene Phasen des Differenzierungsprozesses, wobei IRF4 eine zentrale Rolle spielt. Die erste Phase besteht in der initialen T-Zell-Aktivierung, die abhängig von der Stärke des TZR-Signals zur Bildung von IRF4-*Basic leucine zipper transcription factor*, *ATF-like* (BATF)-Komplexen führt. Hierdurch wird die Öffnung des Chromatins ermöglicht, wodurch in Phase 2 Zytokin-gesteuert *Signal transducer and activator of transcription* (STAT)- oder SMAD-Proteine ebenfalls an die IRF4-BATF-Komplexe binden und so die Expression von differenzierungsbestimmenden, Th-Subtyp-spezifischen Transkriptionsfaktoren induzieren. Diese wiederum können anschließend in einer Art positiven Rückkopplung die Expression von IRF4 weiter antreiben und allein oder zusammen mit IRF4 die Transkription von weiteren Subtyp-spezifischen

Genen steuern („Spezifikationsphase“).¹⁴⁴ In der terminalen Differenzierungsphase regulieren IRF4-IRF4-Homodimere möglicherweise die Expression von zelltypischen Effektorproteinen. Gemäß dieses 4-Phasen-Modells scheint die individuelle, differenzierungsbestimmende Funktion von IRF4 bei der Regulation von Th-Subtyp-spezifischen Genen eine Kombination aus IRF4-Konzentration, dem Aktivierungsgrad der T-Zelle und der Verfügbarkeit von bestimmten Interaktionspartnern sowie der dadurch entstehenden Vielfalt an spezifischen Bindemotiven zu sein.⁴⁴

Hieraus wird deutlich, dass trotz intensiver immunologischer Forschung die zentrale Rolle von IRF4 während der Entwicklung und in der Funktion von Th9-Zellen sowie weiterer Th-Zellen noch nicht vollständig geklärt ist. Die Analyse der IRF4-gesteuerten transkriptionellen Regulation soll zum besseren Verständnis der protektiven und pathophysiologischen Funktionen von Th9-Zellen beitragen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher Methoden etabliert und angewandt, die zur Charakterisierung von IRF4-gesteuerten Transkriptionsfaktorkomplexen beitragen.

5.1 Biotinylierung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Biotin-vermittelten Affinitätsreinigungen. Die prokaryotische Biotin-Protein-Ligase BirA, die hier zur *in vivo* Biotinylierung des Transkriptionsfaktors genutzt wurde, wird von *Escherichia coli* exprimiert.¹⁴⁵ Dort katalysiert sie die posttranslationale Biotinylierung der Acetyl-Coenzym A (CoA)-Carboxylase.¹¹¹ Mitte der 90er Jahre wurden auch Primärstrukturen von eukaryotischen Biotin-Protein-Ligasen (BPL) identifiziert. Diese unterscheiden sich hauptsächlich anhand ihrer Größe von den BPL prokaryotischer Organismen (Bakterien < Pflanzen < Säuger) und besitzen keine DNA-bindende Untereinheit, die zur Regulation der Biotinsynthese dient.¹⁴⁶ Heute weiß man, dass pro Organismus jeweils nur eine BPL exprimiert wird, die zur Biotinylierung von mehreren Biotin-abhängigen Enzymen fähig ist.¹¹¹ Jene sind vor allem an essenziellen Carboxylierungs- und Decarboxylierungsreaktionen des Stoffwechsels beteiligt¹⁴⁷ und spielen eine Schlüsselrolle in der Gluconeogenese, Lipogenese, dem Aminosäuremetabolismus sowie der Energietransduktion.¹¹¹ Bei Säugern sind insgesamt vier biotinylierte Proteine bekannt: Acetyl-CoA-Carboxylase (220 kDa), Pyruvat-Carboxylase (130 kDa), Methylcrotonoyl-CoA-Carboxylase (75 kDa) und Propionyl-CoA-Carboxylase (72 kDa).^{134,148,149} Diese endogen biotinylierten Proteine werden an späterer Stelle nochmal explizit diskutiert.

Wie bei allen BPL ist auch die Reaktion der prokaryotischen BirA konserviert und hoch spezifisch. Die Biotinylierung findet an einem bestimmten Lysinrest statt, der sich in einer ebenfalls stark konservierten Erkennungssequenz – meist am C-Terminus des Biotin-abhängigen Enzyms – befindet.¹⁴⁷ Anhand von Peptid-Libraries konnten Schatz et al.¹⁵⁰ eine 13 Aminosäure (AS) lange

Konsensus-Sequenz identifizieren, die von der BirA spezifisch erkannt und biotinyliert wird. Die in der vorliegenden Arbeit am IRF4 fusionierte Erkennungssequenz entspricht einer Länge von 23 AS, wobei die AS-Sequenz, die Schatz et al. als Konsensus-Sequenz identifizierten, darin enthalten ist. Barat und Wu¹⁵¹ erläutern die Vorteile einer solch kurzen artifiziellen Erkennungssequenz wie folgt: Zum einen ist eine Beeinträchtigung der Struktur und damit auch der funktionalen Eigenschaften des Fusionsproteins unwahrscheinlich. Zum anderen können diese kurzen Sequenzen nicht durch endogene BPL erkannt und biotinyliert werden.¹⁵¹ Beide Tatsachen konnten im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden (s.u.). Sowohl die 23 AS lange Erkennungssequenz zur Produktion des Fusionsproteins als auch das BirA-codierende Gen können mittels Transfektion oder genetischer Modifikation in das Erbgut von Zelllinien oder Organismen eingebracht und im Anschluss ektopisch von diesen produziert werden.

Um die *in vivo* Biotinylierung von IRF4 zu ermöglichen, wurde die Mauslinie *Irf4*^{Bio} generiert. Hierzu erfolgte die Kreuzung einer *BirA*-transgenen Maus mit einer Maus, die IRF4 mit der anhängenden, für die BirA-Ligase spezifischen Erkennungssequenz (BirA-ES) exprimiert. Da das BirA-codierende Gen hinter einen konstitutiv aktiven Promotor (Rosa26) geschaltet wurde und das IRF4-BirA-ES-Konstrukt in Abhängigkeit des physiologischen IRF4-Promotors exprimiert wird, erfolgt eine ubiquitäre und konstitutive Biotinylierung von IRF4 in allen IRF4-exprimierenden Zellen (siehe Abbildung 4-3). Obwohl die Generierung eines transgenen Mausstammes im Vergleich zur Etablierung von Zelllinien relativ zeitaufwändig ist, bietet diese Methode einige Vorteile. Zum einen besteht keine Limitierung in der Zellzahl, wie sie z.B. bei einer Transfektion versuchsbedingt vorliegt. Zum anderen kann das biotinylierte Protein zu jedem beliebigen Zeitpunkt während der Entwicklung einzelner Zellen oder des ganzen Organismus und unter verschiedenen Bedingungen in seiner physiologischen Umgebung untersucht werden. Niers et al. konnten mithilfe von bildgebender fluoreszenzbasierter Tomographie biotinylierte Oberflächenrezeptoren von Mäusen sogar *in vivo* beobachten.¹³⁴

De Boer et al., die Biotin-vermittelte Interaktompäzipitationen (IntP) und Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP) anhand von GATA-1 durchführten, zeigten, dass die Biotinylierung weder die Protein-interagierenden noch die DNA-bindenden Eigenschaften sowie die intranukleäre Verteilung des biotinylierten Proteins verändert.¹⁵² Viens et al. kamen mit ihren Studien zu demselben Ergebnis; merken jedoch an, dass die Möglichkeit einer Artefaktbildung nicht kategorisch für jedes Protein ausgeschlossen werden kann.¹⁵³ Daher wurde mithilfe eines Reporterassays für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente geprüft, ob IRF4 nach der Biotinylierung seine funktionale Eigenschaft beibehält, am *IRF4*-Promotor zu binden und diesen zu transaktivieren. Das Ergebnis des Reporterassays bestätigte, dass biotinyliertes IRF4, im

Vergleich zu nicht-biotinyliertem IRF4 den *Irf4*-Promotor gleichermaßen transaktiviert (siehe Abbildung 4-1 B) und die Biotinylierung somit die Funktionalität von IRF4 nicht ändert.

Das exakte Ausmaß der Biotinylierung wurde in der vorliegenden Arbeit nicht bestimmt. Viens et al. demonstrierten eine 100%ige Biotinylierungseffizienz eines Zielproteins (hier: grün fluoreszierendes Protein, GFP), wenn bei der Transfektion von HeLa-Zellen Vektorkonstrukte verwendet wurden, die zur simultanen Transkription der BirA-Ligase und GFP mit anhängender BirA-ES führen.¹⁵³ Sie folgerten, dass dieser Effekt auf der physischen Nähe von Enzym und Zielprotein beruht („*cis*-Biotinylierung“). Eine Co-Expression der BirA-Ligase und des mit der BirA-ES versehenen Zielproteins ausgehend von zwei verschiedenen Promotoren („*trans*-Biotinylierung“) führte zu keiner 100%ige Biotinylierungseffizienz.¹⁵³ Da es sich hierbei um Daten handelt, die aus einem Transfektionsexperiment stammen, können diese nur schwer auf die hier vorliegende Situation übertragen werden und geben lediglich einen Hinweis auf die Biotinylierungseffizienz der BirA in Zellen der *Irf4*^{Bio}-Maus. Aufgrund des sehr deutlichen Nachweises der Biotinylierung von IRF4 in allen hier durchgeführten Western Blots kann allerdings von einer hohen Effizienz ausgegangen werden.

5.2 Das IRF4-Interaktom

Ein effektiver Ansatz zur Untersuchung von Protein-Interaktionen stellt die sogenannte „*Pulldown*“-Methode (hier: Interaktompräzipitation (IntP)) dar. Dabei wird das zu untersuchende Protein mit einer Art Markierung (hier: Biotin) versehen, wonach das so entstandene Fusionsprotein durch die Bindung an einen Affinitätsligand angereichert werden kann.¹⁰⁶ Die Notwendigkeit von spezifischen Antikörpern, wie sie z.B. bei Co-Immunpräzipitationen besteht, entfällt. In der vorliegenden Arbeit wurde *in vivo* biotinyliertes IRF4 (entspricht Fusionsprotein) über den Affinitätsligand Streptavidin isoliert und untersucht.

Forschungsgruppen wie die von A. Y. Rudensky¹³³, J. Strouboulis¹⁵² und J. Wang¹⁰⁵ etablierten bereits Protokolle zu Biotin-vermittelten IntP und wandten diese erfolgreich an. Während der ersten Versuche zur Durchführung einer Biotin-vermittelten IntP zur Isolierung von *in vivo* biotinyliertem IRF4 in Komplex mit interagierenden Proteinen wurde schnell deutlich, dass die zur Verfügung stehenden Protokolle zur Analyse eines bestimmten Transkriptionsfaktors individuell angepasst und optimiert werden müssen. Kim et al.¹⁰⁵ verwendeten z.B. DynabeadsTM T1 (T1-*Beads*), um Proteininteraktionen in embryonischen Mausstammzellen zu untersuchen, wohingegen de Boer et al.¹⁵² und Rudra et al.¹³³ DynabeadsTM M-280 (M-280-*Beads*) zur Isolierung von biotinyliertem GATA-1, bzw. FOXP3 einsetzten. Für die in dieser Arbeit durchgeführte IRF4-IntP

erwiesen sich bei einem direkten Vergleich der T-1- und M-280-*Beads* letztere als am besten geeignet, um biotinyliertes IRF4 zu binden – insbesondere wenn der Zellyse-Puffer CLB (*cell lysis buffer*) zur Herstellung der Zellysate verwendet wurde (anstatt RIPA-Puffer, siehe Abbildung 4-4). Auch die Inkubationszeit der mit Streptavidin (SA) beschichteten Kügelchen (*SA-Beads*) mit den Lysaten spielt laut Kim et al. bei der Optimierung der Bindeeffizienz eine Rolle.¹⁰⁵ So konnte diese für IRF4 nochmals gesteigert werden, indem die M-280-*Beads* anstatt vier Stunden bei Raumtemperatur, über Nacht bei 4 °C inkubiert wurden. Dieser erste, kurze Optimierungsschritt macht deutlich, wie komplex die Etablierung eines solch vielschrittigen Protokolls wie das zur IRF4-IntP ist. Die einzelnen Faktoren, die zum Gelingen des Experiments beitragen, können nicht berechnet oder vorausgesagt werden und müssen alle einzeln experimentell bestimmt und dem zu untersuchenden Protein individuell angepasst werden.

Ein weiterer, wichtiger Optimierungsschritt lag im Test der Waschbedingungen, um Proteine, die unspezifisch an Streptavidin binden, nach der Inkubation mit den Zellysaten wieder von den *SA-Beads* zu entfernen. Aufgrund der außerordentlich starken Bindung von Biotin und Streptavidin können während einer Biotin-vermittelten IntP Waschlösung mit einer vergleichsweise hohen Stringenz verwendet werden.¹⁰⁵ In der Literatur finden sich zahlreiche Vorschläge für Pufferzusammensetzungen, die je nach verwendetem Detergens, dessen Konzentration oder der eingesetzten Häufigkeit in ihrer Stringenz variieren. Obwohl sich z.B. ein NP-40-Puffer bei Arbeiten von Rudra et al.¹³³ als praktikabel erwies, um unspezifische Proteinbindungen zu reduzieren, führte dieser in der hier versuchten IRF4-IntP nicht zum gewünschten Ergebnis (siehe Abbildung 4-5) und zeigt damit abermals die Komplexität der Protokolletablierung. Trotz der Verwendung eines stringenten Waschlösungspuffers kann nicht verhindert werden, dass auch endogen biotinylierte Proteine, die von jeder Zelle natürlich produziert werden (siehe oben), an die *SA-Beads* binden und bei der Isolierung von *in vivo* biotinyliertem IRF4 störend wirken.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zahlreiche Western Blots mit Extrakten von Mastzellen, Th9- und Milzzellen analysiert. Bei Lysaten aus reinen Mastzell- und Th9-Zell-Kulturen sind mithilfe einer SA-HRP-Färbung zwei Proteinbanden auf Höhe der Markerbanden von 130 kDa und ca. 75 kDa zu sehen (siehe Abbildung 4-6). Diese beiden endogen biotinylierten Proteine wurden hier nicht weiter untersucht – anhand der oben beschriebenen Literatur müsste es sich aber um die Proteine Pyruvat-Carboxylase (130 kDa), Methylcrotonoyl-CoA-Carboxylase (75 kDa) und/oder Propionyl-CoA-Carboxylase (72 kDa) handeln. Bei Komplettzellysaten aus Milzzellen waren weitere Banden entsprechend einer Molekülmasse von ca. 250 kDa, 50 kDa und kleiner zu sehen (Daten nicht gezeigt). Bei dem schwersten Protein (entspricht der 250 kDa Bande) könnte es sich um Acetyl-CoA-Carboxylase handeln. Die übrigen Proteinbanden können anhand der Literatur keinem bestimmten

Protein zugeordnet werden. Möglicherweise sind die Proteinbanden auf degradierte Proteinfragmente zurückzuführen.

Um eine Möglichkeit zur Reduktion der Bindung von endogen biotinylierten Proteinen an Streptavidin zu finden, wurde das Verhältnis von nukleärem IRF4 zu den endogen biotinylierten Proteinen weiter analysiert. Durch die Herstellung von Kernlysaten konnten die endogen biotinylierten Proteine sehr stark reduziert werden (siehe Abbildung 4-6). Sollte es sich bei den endogenen Proteinen tatsächlich um Pyruvat-Carboxylase, Methylcrotonoyl-CoA-Carboxylase und Propionyl-CoA-Carboxylase handeln, gehören diese zu den mitochondrialen Proteinen und wurden folglich bei der Isolierung der Zellkerne mit dem cytosolischen Überstand von den nukleären Proteinen abgetrennt.

Ein weiterer Vorteil beim Einsatz von Kernextrakten für die IntP ergab sich daraus, dass sich das Verhältnis IRF4/endogen biotinylierte Proteine sowie IRF4/Gesamtprotein deutlich zugunsten von IRF4 verschob (siehe Abbildung 4-6). Möglicherweise war dies jedoch der Grund, warum entgegen den Erwartungen bei einer ersten massenspektrometrischen Analyse auch nicht-biotinyliertes IRF4 durch die Biotin-vermittelte IntP isoliert wurde (siehe Abbildung 4-7): Aufgrund des IRF4-Überschusses in der Probe kommt es vermehrt zu einer unspezifischen Bindung von nicht-biotinyliertem IRF4 an die *SA-Beads*, wodurch die zuvor bereits angepassten Waschbedingungen nicht mehr ausreichend sind. Eine Konzentrationserhöhung von 0,1% auf 0,5% SDS im RIPA-Puffer verstärkte die Waschpufferstringenz nochmals, sodass kein nicht-biotinyliertes IRF4 mehr durch die IntP eluiert wurde. Kim et al. schreiben in ihrer Publikation, dass Waschpuffer mit einer Konzentration von bis zu 2% SDS eingesetzt werden können, ohne dass die Bindung von Biotin zu Streptavidin gestört wird.¹⁰⁵ Roux et al. waschen ihre Proben nach der Inkubation der *SA-Beads* ebenfalls mit einem 2% SDS enthaltenden Puffer und können später ausreichend Protein für eine massenspektrometrische Analyse eluieren.¹⁵⁴ Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte IRF4-IntP war eine Inkubation der Proben mit RIPA-Waschpuffern ab einer Konzentration von 1% SDS zu stringent. Unter diesen Bedingungen wurde selbst biotinyliertes IRF4 wieder von den *SA-Beads* abgewaschen (siehe Abbildung 4-8). Außerdem muss bedacht werden, dass bei zu stringenten Waschbedingungen nicht mehr garantiert werden kann, dass die IRF4-interagierenden Faktoren weiterhin im Transkriptionsfaktorkomplex bleiben.

Nach der Protokolloptimierung konnte eine Biotin-vermittelte IRF4-IntP erfolgreich durchgeführt werden. Insgesamt 926 verschiedene Proteine wurden aus *Irf4*^{Bio}-Th9-Kernextrakten über Streptavidin isoliert und mittels Massenspektrometrie identifiziert; 137 davon mit einer mindestens doppelten Abundanz in *Irf4*^{Bio}-Th9-Kernextrakten (verglichen mit WT^(BirA)-Th9-Kernextrakten), wonach diese höchst wahrscheinlich spezifische IRF4-Interaktionspartner sind.

Zum Vergleich: Rudra et al., die ein ähnliches Protokoll anwandten, isolierten 361^{***} FOXP3-interagierende Proteine über eine Biotin-vermittelte IntP aus immortalisierten T-Zellen.¹³³

Trotz der spezifischen Bindung von Streptavidin und Biotin wurden insgesamt 922 Proteine auch aus WT^(BirA)-Th9-Kernextrakten isoliert. Diese doch recht hohe Zahl entsteht wahrscheinlich durch die Bindung der bereits diskutierten endogen biotinylierten Proteine (s.o.) und deren interagierenden Proteine. In der Tat konnte z.B. Pyruvat-Carboxylase nach der IRF4-IntP sowohl in WT^(BirA)- als auch *Irf4*^{Bio}-Proben eindeutig detektiert werden (Daten nicht gezeigt). De Boer et al.¹⁵² untersuchten diesen Proteinhintergrund in ihren Biotin-vermittelten IntP-Versuchen. Sie identifizierten darunter hauptsächlich biotinylierte Carboxylasen und zahlreiche nukleäre Proteine, die an der mRNA-Prozessierung beteiligt sind, sowie Spleißfaktoren und ribosomale Proteine. Diese drei Proteinklassen machten insgesamt mehr als 80% des Proteinhintergrunds aus.¹⁵² Eine Analyse des Proteinhintergrunds nach erfolgter IRF4-IntP ergibt, dass auch hier die Top-5-Gruppen nach einer Genontologie (GO)-Analyse aus Proteinen des Spleißosoms und Ribosoms, Proteinen, die am RNA-Transport und Kohlenstoffmetabolismus sowie an der Proteinprozessierung im Endoplasmatischen Retikulum beteiligt sind, bestehen (siehe Anlage: Tabelle 9-2). Nichtsdestotrotz ist die Anzahl der unspezifisch gebundenen Proteine bei einer Biotin-vermittelten IntP nach wie vor niedriger als bei einer Co-Immünpräzipitation mithilfe von Antikörpern – wie Rudra et al. bei einem Vergleich der beiden Methoden feststellten.¹³³

Mithilfe des „STRING“-Algorithmus konnte ein Proteinnetzwerk zur Darstellung von Interaktionen der mittels IRF4-IntP isolierten Proteine erstellt werden (siehe Abbildung 4-12). Dieses zeigt Verbindungen von IRF4 zu den Proteinen IKZF1 (Ikaros) und IKZF3 (Aiolos). Die beiden Transkriptionsfaktoren gehören zur Ikaros-Zink-Finger-Proteinfamilie und sind zentrale transkriptionelle Regulatoren der Lymphopoese.^{155,156} Eine direkte Interaktion der Proteine mit IRF4 wurde im Zusammenhang mit Th9-Zellen noch nicht beschrieben. Aufgrund der hier erbrachten Ergebnisse (IRF4-IntP) und der Tatsache, dass alle drei Transkriptionsfaktoren sowohl DNA- als auch proteinbindende Domänen aufweisen,^{85,157,158} könnte diese jedoch eine Rolle bei der transkriptionellen Regulierung von IRF4 spielen, die in Th9-Zellen bislang nicht weiter untersucht wurde. Hinweise auf eine Wechselwirkung der Proteine in anderen Zelltypen findet man zudem in humanen Studien zur Wirkweise des immunmodulierenden Wirkstoffs Lenalidomid, welcher zur Behandlung von Multiplen Myelomen eingesetzt wird und eine IKZF1-IRF4-MYC-Axe in den Fokus der Untersuchungen rückt.¹⁵⁹ Krönke et al. beschreiben dabei eine Wechselwirkung von *IKZF1/IKZF3* und *IRF4*, wonach *IKZF1* und *IKZF3* die Transkription von *IRF4* aktivieren.¹⁶⁰

^{***} Die mittels der FOXP3-IntP isolierten Proteine waren in der entsprechenden Negativkontrolle nicht, oder nur gering enthalten.

Möglicherweise besteht eine ähnliche Verbindung in Th9-Zellen, wobei es durch eine Komplexbildung der Proteine zu einer gegenseitigen Transkriptionskontrolle kommt. (Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch Bindestellen von IRF4 im Ikaros-Gen identifiziert (Daten nicht gezeigt), die auf eine wechselseitige Regulation hindeuten, welche jedoch nicht näher analysiert wurde.) Die genauen Auswirkungen der IRF4-IKZF-Komplexbildung auf die Th9-Differentierung oder -Effektorfunktion müssen demzufolge weiter untersucht werden. Darüber hinaus wurde die Bedeutung von IKZF1 und IKZF3 als IL-2-Repressoren mehrfach beschrieben.^{161–164} In Bezug auf die hier durchgeführten Versuche mit Th9-Zellen lässt sich die IL-2-Repressorfunktion von IKZF1/3 nur schwer erklären, da IL-2 die IL-9-Produktion fördert.³⁰ Ochiai et al. stellten bei Versuchen mit Plasmazellen fest, dass IRF4 im Komplex mit IKZF1 abhängig von der DNA-Bindestelle sowohl als Repressor, als auch als Aktivator wirken kann – letzteres, wenn PU.1 in den Komplex integriert ist.¹⁶⁵ Da PU.1 ebenfalls ein wichtiger Transkriptionsfaktor während der Th9-Entwicklung darstellt (siehe Abschnitt 1.2.1) und PU.1-IRF4-Interaktionen bereits bewiesen wurden,⁷¹ könnten weiterführende Versuche bezüglich des hier über die Biotin-vermittelte IRF4-IntP identifizierten IKZF(1/3)/IRF4-Transkriptionsfaktorkomplex zur Aufklärung der IL-2-Regulation in Th9-Zellen beitragen.

Wie die hier identifizierten IRF4-Interaktionspartner *Enhancer of zeste homolog 2* (EZH2) und Zeta-Ketten-assoziierte Proteinkinase 70 (*Zeta-chain-associated protein kinase 70*, ZAP70) (die wiederum mit der Lymphozyt-spezifischen Protein Tyrosinkinase (LCK) und der Proto-Onkogenen Tyrosin-Proteinkinase Fyn in Verbindung steht), welche in dem mittels STRING-Algorithmus erstellten Proteinnetzwerk Verbindungen zu IKZF1 aufweisen, in Th9-Zellen mit IRF4 in Beziehung stehen, kann mithilfe der aktuellen Literatur nur spekuliert werden. Wang et al.⁷³ fanden bei ihren Analysen zur TGF- β -abhängigen IL-9-Expression in Th9-Zellen heraus, dass EZH2 in Abwesenheit von SMAD-Proteinen den *IL9*-Lokus bindet und die IL-9-Produktion reduziert. Durch eine Inhibition von EZH2 konnte die IL-9-Produktion von *Smad*-defizienten Zellen wieder gesteigert werden. Sie kamen zu dem Schluss, dass eine SMAD-EZH2-Interaktion zur Verdrängung von EZH2 am *IL9*-Gen und somit zur IL-9-Expression führt.⁷³ Wie in Kapitel 1.3 beschrieben, sind TGF- β -abhängige Wechselwirkungen von IRF4 und SMAD-Proteinen am *IL9*-Promotor bereits bekannt und werden auch im 4-Phasen-Model (s.o.) diskutiert. Die hier erbrachten Ergebnisse weisen deshalb darauf hin, dass die IL-9-Expression in Th9-Zellen durch einen größeren, aus IRF4/SMAD/EZH2-bestehenden Komplex reguliert wird.

ZAP70, LCK und FYN sind Kaskaden-ähnlich an der Signaltransduktion des TZR beteiligt.^{166,167} Über den TZR werden FYN und LCK aktiviert, die anschließend ZAP70 phosphorylieren und aktivieren.¹⁶⁷ ZAP70, eigentlich als zytoplasmatisches Protein bekannt, konnte in T-Zellen auch im Zellkern nachgewiesen werden¹⁶⁷ und ist an Kernrezeptor-gesteuerten Transaktivierungsprozessen

beteiligt.¹⁶⁸ Inwiefern dabei eine Interaktion mit IRF4 eine Rolle spielt, kann anhand der bestehenden Literatur nicht weiter begründet werden. In Bezug auf FYN stellen Ueda et al.¹⁶⁹ eine interessante Theorie auf. Sie beschreiben in ihren Studien zur differentiellen Entwicklung von Tregs und Th17-Zellen, dass FYN die reziproke Differenzierung dieser beiden Zelltypen möglicherweise durch eine zeitabhängige Regulation der RAR-verwandter-Rezeptor- γ -T (ROR γ T)- und FOXP3-Expression steuert. Außerdem stellten sie fest, dass die IRF4-Expression von *Fyn*-defizienten Th17-Zellen nach 48 Stunden unter Th17-differenzierenden Bedingungen im Vergleich zu Wildtyp (WT)-Zellen reduziert war.¹⁶⁹ Da Tregs und Th17-Zellen, genau wie Th9-Zellen unter dem Einfluss von IRF4 und TGF- β differenzieren,^{44,170} ist es denkbar, dass auch in Th9-Zellen eine differenzierungsbestimmende transkriptionelle Regulation durch FYN vorkommt, die sich entweder auf die IRF4-Expression oder die IRF4-Transkriptionsfaktorkomplex-Bildung auswirkt.

Bei der Analyse der isolierten Proteine im Hinblick auf die funktionelle Charakterisierung von IRF4-Transkriptionsfaktorkomplexen fielen die Transkriptionsfaktoren TYY2 (auch YY2) und Interleukin *Enhancer*-Bindefaktor 2 (ILF2) auf. Außerdem konnten transkriptionelle Repressoren wie P66A und P66B identifiziert werden (siehe Abbildung 4-13). Eine YY2-IRF4-Interaktion wurde in Th9-Zellen bisher noch nicht beschrieben. Jedoch stellt der Transkriptionsfaktor YY1, welcher paralog zu YY2 ist,¹⁷¹ einen essenziellen, positiven Regulator der Th2-Differenzierung dar, interagiert dabei direkt mit GATA-3 und verringert OVA-induziertes Asthma im Mausmodell.¹⁷² Weiterhin demonstrierten Chen et al.¹⁷³, dass YY1 und YY2 die Transkription bestimmter Gen-Sets gegensätzlich regulieren. Speziell am *IL4*-Promotor konnte gezeigt werden, dass dieser durch YY1 aktiviert wird, während YY2 eine inhibierende Wirkung auf den *IL4*-Promotor ausübt.¹⁷⁴ Aufgrund der Tatsache, dass sich Th9-Zellen TGF- β -abhängig aus bereits differenzierten Th2-Zellen – deren Th-Subtyp-spezifisches Zytokin unter anderem IL-4 ist – entwickeln können,³¹ lässt sich ausgehend dieser Studien und den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen die Hypothese aufstellen, dass YY2 in Anwesenheit von IRF4 die Differenzierung oder Effektorfunktion von Th2-Zellen unterdrückt und anstelle dessen eine Th9-Antwort induziert. Diese Hypothese bedarf jedoch ausführlicher Untersuchungen und kann anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht weiter belegt werden.

ILF2, auch bekannt als Nukleärer Faktor 45 (NF-45), ist eine Untereinheit des *Nuclear factor of activated T-cells* (NFAT)-Komplexes.^{175,176} In Th2-Zellen wurde NFATc2 als IRF4-Interaktionspartner beschrieben, indem der Transkriptionsfaktorkomplex die IL-4-Produktion vorantreibt⁹² und durch Bindung an ein regulatorisches Element an der IL-10-Expression beteiligt ist.¹³⁵ In der hier durchgeführten bioChIP (siehe Kapitel 4.4 und 4.5) konnte mittels qRT-PCR auch in Th9-Zellen eine Bindung von IRF4 in diesem von Lee et al.¹³⁵ publizierten regulatorischen Element nachgewiesen werden (siehe Tabelle 4-2). Ausgehend von den im Rahmen dieser Arbeit generierten Ergebnissen

ist eine Komplexbildung von NFATc2 und IRF4 auch in Th9-Zellen am *IL10*-regulatorischen Element zu erwarten. In Bezug auf die *IL9*-Regulation ist die Sachlage noch unklar obwohl bereits NFATc2-Bindestellen am *IL9*-Promotor eindeutig nachgewiesen werden konnten.^{177,178} Während Jash et al.¹⁷⁸ demonstrierten, dass *Nfatc2*-defiziente Th9-Zellen eine verringerte IL-9-Produktion aufweisen, konnte meine Arbeitsgruppe das Gegenteil beweisen, wohingegen in Mastzellen wiederum eine IL-9-fördernde Wirkung zu beobachten war (nicht publizierte Daten). Wie genau sich die Interaktion von IRF4 und NFAT letztendlich auf die IL-9-Produktion in Th9-Zellen auswirkt, kann nur durch weiterführende experimentelle Versuche geklärt werden.

P66A und P66B (auch Gatad2a und Gatad2b) sind jeweils direkt an der MBD2-abhängigen transkriptionellen Repression beteiligt⁵⁵⁵. MBD2 zeichnet sich dadurch aus, dass es über posttranskriptionelle Histonmodifikationen die Chromatinstruktur an Promotorregionen verändert, wodurch es die Expression der entsprechenden Genregionen reguliert.¹⁷⁹ Hinweise auf eine IRF4-MBD2-Interaktion in anderen Th-Zell-Subtypen liefern Ergebnisse von Jia et al.¹⁷⁹, die in ihren Versuchen zeigten, dass MBD2 und IRF4 additiv ihre regulatorische Wirkung in Bezug auf eine Th17-Differenzierung oder deren IL-17-Produktion verstärken, bzw. verlieren. Eine IRF4-abhängige MBD2-Wirkung über P66A und P66B würde auch zur Theorie passen, dass IRF4 in Abhängigkeit seiner interagierenden Proteine als Aktivator oder Repressor agieren kann (s.o.). Außerdem wird die Rolle von MBD2 in der Pathogenese von Asthma, bzw. Atemwegsentzündungen diskutiert.^{179,180} Auch Th9-Zellen sind maßgeblich an der Entstehung von Asthma beteiligt³⁹ (siehe Abschnitt 1.2.2). Aufgrund der hier erzielten Ergebnisse könnten weiterführende Untersuchungen diesbezüglich daher zu einem besseren Verständnis der Rolle von Th9-Zellen in der Pathogenese von chronischen Atemwegserkrankungen beitragen.

Es konnten keine weiteren bereits bestätigten IRF4-interagierende Transkriptionsfaktoren wie z.B. BATF mittels der hier durchgeführten Biotin-vermittelten IRF4-IntP isoliert werden. Lediglich NFKB2 (auch Nukleärer Faktor NF-κB p100 Untereinheit) konnte mit einem $\text{Log}_2(\text{Irf4}^{\text{Bio}}/\text{WT}^{\text{BirA}})$ -Verhältnis von 0,7 detektiert werden (siehe Abbildung 4-13). NF-κB p100 stellt eine Untereinheit des NF-κB-Komplexes dar^{****}. Ähnlich wie NFAT ist auch dieser zusammen mit IRF4 an der *IL9*-Transkription in Th9-Zellen beteiligt (siehe Kapitel 1.3). Rudra et al.¹³³ hatten in ihren Versuchen zur Identifizierung von FOXP3-Interaktionspartnern ebenfalls das Problem, dass sie einige der bereits bekannten interagierenden Proteine nicht mithilfe einer Biotin-vermittelten IntP isolieren konnten. Sie vermuten, dass verschiedene Einflüsse von außen, wie z.B. die Stimulation durch den TZR, eine gewisse Dynamik der Proteinkomplexzusammensetzung bedingen.¹³³ Ein weiterer

⁵⁵⁵ <https://www.uniprot.org/uniprot/Q8VHR5> und <https://www.uniprot.org/uniprot/Q8CHY6> (08.05.2019)

^{****} <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9WTK5> (08.05.2019)

Erklärungsversuch liegt darin, dass Transkriptionsfaktoren im Allgemeinen eher gering abundant in Zellen vorliegen und deshalb eine Quantifizierung erschweren.¹⁸¹ Außerdem muss beachtet werden, dass auch der Zeitpunkt, an dem die jeweilige Protein-Interaktion untersucht wird, eine bedeutende Rolle spielt. Wie aus dem 4-Phasen-Modell von Huber und Lohoff⁴⁴ hervorgeht, werden die einzelnen Differenzierungsstufen maßgeblich durch einen Wechsel der interagierenden Proteine bestimmt. In der vorliegenden Arbeit wurde mit bereits ausdifferenzierten, restimulierten Th9-Zellen gearbeitet.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die hier etablierte Biotin-vermittelte IRF4-IntP zur Identifizierung von IRF4-interagierenden Proteinen erfolgreich durchgeführt werden konnte. Dies spiegelt sich auch an der abschließenden GO-Analyse der 137 IRF4-Interaktionspartner wider (siehe Tabelle 4-1). Ca. 30% dieser detektierten Proteine sind an einer Regulation der Transkription beteiligt. Rudra et al.¹³³ kamen in ihren Versuchen auf das gleiche Verhältnis.

5.3 IRF4-regulierte Gene

Eine Biotin-vermittelte Chromatin-Immunpräzipitation (bioChIP) beruht wie die Biotin-vermittelte IntP auf der *in vivo* Biotinylierung von IRF4 und dessen Bindung an Streptavidin. Im Gegensatz zur IntP werden bei der bioChIP nicht die jeweils interagierenden Proteine mitisoliert, sondern IRF4-gebundene DNA. Nach einer Reinigung der DNA, kann diese sequenziert und analysiert werden.

Nach einer Anpassung der Chromatin-Fixierung und -Fragmentierung konnte die bioChIP zur Untersuchung von IRF4-gebundenen Genregionen in Th9-Zellen erfolgreich durchgeführt und via qRT-PCR bestätigt werden. Lee et al. zeigten in Versuchen mit T-Zellen, dass IRF4 an ein regulatorisches Element im *IL10*-Gen bindet.¹³⁵ Da IL-10 neben IL-9 ein weiteres Subtyp-spezifisches Zytokin von Th9-Zellen darstellt,⁵⁰ wurden Primer für die von Lee et al. veröffentlichte Sequenz generiert, um die bioChIP-vermittelte Anreicherung von IRF4-gebundener DNA zu bestimmen. Im Vergleich zur Negativkontrolle konnte ein Faktor von 44,71 ermittelt und damit sowohl die erfolgreiche Durchführung der IRF4-spezifischen bioChIP, also auch die Bindung von IRF4 an das *IL10*-regulatorische Element in Th9-Zellen bestätigt werden (siehe Abschnitt 4.4.2 und Tabelle 4-2).

Die *Peak*-Analyse der Sequenzierung ergab, dass abhängig des verwendeten Algorithmus und der angegebenen Detektionsgrenze zwischen 8.026 und 46.582 IRF4-Bindestellen im Genom von Th9-Zellen detektiert werden konnten (siehe Abschnitt 4.5.1). Carrascosa et al.⁷⁴ kamen mit einer herkömmlichen IRF4-Antikörper-basierten CHIP des Th9-Genoms auf eine Anzahl von etwa 24.500

Bindestellen^{****}. Eine Analyse zur Verteilung der hier mittels bioChIP detektierten *Peaks* ergab, dass 11% der IRF4-Bindestellen in einem Bereich von 0 bis 5 kb strangauf- oder abwärts des transkriptionellen Starts (*transcription start site*, TSS) der entsprechenden Genregionen liegen (siehe Abbildung 4-16 B). Promotorelemente können bis zu einigen 100 bp von der jeweiligen TSS entfernt sein.¹⁸² Carrascosa et al. definierten in ihren Analysen eine Grenze bei ± 500 bp um die TSS.⁷⁴ Dies zeigt, dass IRF4 in Th9-Zellen nicht nur am *IL9*-Promotor, sondern genomweit eine Rolle bei der direkten transkriptionellen Regulation an Promotorregionen spielt. IRF4-Bindestellen, die von der TSS weiter entfernt liegen, können auf regulatorische Elemente, z.B. *Enhancer*, zurückgeführt werden. Diese können deutlich weitere Entfernungen zur TSS aufweisen, wie am Beispiel der erst kürzlich publizierten *Enhancer*-Region des *IL9*-Gens¹³⁶ zu sehen ist (s.u.).

Eines der Hauptbindemotive, das bei der Analyse der hier generierten bioChIP-Daten gefunden wurde, entspricht erwartungsgemäß der charakteristischen Bindesequenz von IRF4 (siehe Abbildung 4-16 C). IRF4 hat verglichen mit anderen Mitgliedern der IRF-Transkriptionsfaktorfamilie eine etwas weniger starke Affinität zur charakteristischen Konsensusbindesequenz, die auch als Interferon-stimuliertes Antwortelement (*interferon-stimulated response element*, ISRE) bezeichnet wird.⁷⁴ So interagiert IRF4 eher kooperativ mit anderen Transkriptionsfaktoren an zusammengesetzten regulatorischen Elementen.⁷⁴ In Verbindung mit BATF bindet IRF4 bevorzugt an AP-1-IRF zusammengesetzte Elemente (AP1-IRF *composite elements*, AICE)^{95,183} und in Komplex mit Proteinen der ETS-Familie (z.B. PU.1) an ETS-IRF zusammengesetzte Elemente (ETS-IRF *composite elements*, EICE).^{71,184} Durch die Bindung dieser Motive vermittelt IRF4 eine transkriptionelle Aktivierung.¹⁶⁵ Vor kurzem wurde bei Experimenten mit Plasmazellen ein weiteres Bindemotiv identifiziert, wodurch IRF4 eine Herabregulation der Transkription bewirkt: das sogenannte Zinkfinger-IRF zusammengesetzte Element (zink finger-IRF *composite element*, ZICE), an das IRF4 zusammen mit Ikaros bindet.¹⁶⁵ Mithilfe der im Rahmen dieser Arbeit etablierten Biotin-vermittelten IRF4-IntP konnte Ikaros als Interaktionspartner von IRF4 bestätigt werden (s.o.). Außerdem weist der Transkriptionsfaktor ein sehr ähnliches Hauptbindemotiv wie IRF4 auf (Ikaros: AGGAA¹⁸⁵; IRF4: G/AGAAAC/G), weshalb eine Bindung an ähnliche Genbereiche wahrscheinlich ist. Dies verdeutlicht nochmals die transkriptionelle Relevanz von IRF4, indem der Transkriptionsfaktor als Aktivator, aber auch als Repressor wirken kann. Zudem bekräftigen diese Daten die Annahme des 4-Phasen-Modells⁴⁴ (s.o.), dass IRF4 seine individuelle Funktion in Abhängigkeit der Interaktionspartner und der dadurch entstehenden Vielfalt an spezifischen Bindemotiven variieren kann.

^{****} Bestimmung der IRF4-Bindestellen durch MACS2 (*sharp peak calling algorithm*)

Eine Signalweganalyse zeigte, dass IRF4 vor allem an Gene bindet, die am adaptiven Immunsystem beteiligt sind. Dabei steuert IRF4 primär Gene, die bei der Regulation von weiteren Transkriptionsfaktoren und Zytokin-(Rezeptor)-Signalwegen eine Rolle spielen (Abbildung 4-17). So scheint IRF4 z.B. einen großen Einfluss auf Signalwege wie den des IL-2-Rezeptors oder auf den Januskinase (JAK)-STAT-Signalweg zu haben, die beide im weiteren Verlauf des Kapitels noch genauer diskutiert werden (s.u.).

Bei der funktionellen Analyse der *IL9*-Regulation wurden vier eindeutige IRF4-Bindestellen im *IL9*-Gen detektiert (siehe Abbildung 4-18). Neben den bereits mehrfach publizierten Bindestellen in CNS0, CNS1 und CNS2^{41,74} konnte eine weitere Bindung ca. 25 kb strangaufwärts des *IL9*-Promotors identifiziert werden. Koh et al.¹³⁶ beschrieben diese Sequenz ebenfalls und definierten sie als konservierte *Enhancer*-Region CNS-25, die in verschiedenen Zelltypen Einfluss auf die *IL9*-Regulation nimmt. Bei ihren Untersuchungen stellten sie fest, dass eine Deletion dieser Sequenz zur Reduktion der IL-9-Produktion in Th9-Zellen führte, wohingegen in Th2-Zellen ein Anstieg der IL-9-Expression zu beobachten war. Daraus folgerten sie, dass ein noch unbekannter Th2-spezifischer Transkriptionsfaktor die *IL9*-Transkription durch eine aktive Inhibition der *Enhancer*-Funktion in Th2-Zellen unterdrückt.¹³⁶ Des Weiteren diskutieren Koh et al., dass die *Enhancer*-Region in Th9-Zellen von mehreren Transkriptionsfaktoren gebunden wird, wodurch eine kooperative Funktion der verschiedenen Transkriptionsfaktoren wahrscheinlich ist. Sie begründen diese Theorie mit der Beobachtung, dass in Abwesenheit von IRF4 und STAT6 eine Reduktion weiterer Transkriptionsfaktorbindungen an der Sequenz eintrat.¹³⁶ In Bezug auf die Analyse der Wechselwirkung von IRF4 zu interagierenden Proteinen stellt die Region CNS-25 daher einen interessanten Anhaltspunkt für weitere Untersuchungen dar – auch im Hinblick auf die unterschiedliche *IL9*-Regulation in Th2- und Th9-Zellen. Zudem nimmt die *Enhancer*-Region Einfluss auf die typische Symptomatik von Asthmaerkrankungen,¹³⁶ da die Deletion von CNS-25 zu einer verringerten Schleimproduktion sowie verringerten Hyperreaktivität der Atemwege im Vergleich zu Wildtyptieren führt. Somit könnte ein besseres Verständnis der transkriptionellen Regulation der CNS-25-abhängigen IL-9 Expression durch IRF4 ebenfalls zu einem besseren Verständnis der Asthma-Pathogenese beitragen.

Aufgrund der bestehenden Literatur bieten außer dem *IL9*-Lokus weitere Gene interessante Ansätze für eine detaillierte Untersuchung bezüglich der IRF4-gesteuerten transkriptionellen Regulation (siehe Tabelle 4-3). Eines dieser Gene mit herausragenden IRF4-Bindestellen ist PR Domäne Zinkfinger Protein-1 (*Prdm-1*). *Prdm-1* codiert für B Lymphozyt-induziertes Reifeprotein-1 (*B lymphocyte-induced maturation protein-1*, BLIMP-1) – ein transkriptioneller Repressor, der eine Schlüsselrolle in der terminalen Differenzierung verschiedener T-Zell-Subtypen spielt.¹³⁷ Erst

kürzlich publizierten Benevides et al.¹³⁷, dass BLIMP-1 die Differenzierung von Th9-Zellen reguliert, indem es sich negativ auf die IL-9-Produktion auswirkt. Die Deletion von Blimp-1 führte zur verstärkten Atemwegsentzündung, die durch eine Neutralisierung von IL-9 wieder reduziert werden konnte.¹³⁷ In B-Zellen wurde bereits eine Bindung von IRF4 an *Prdm-1* mittels ChIP demonstriert, die sich aktivierend auf die Genexpression auswirkt.¹⁸⁶ Martins und Calame¹⁸⁷ diskutieren die Rolle von IRF4 in Bezug auf die *Prdm-1*-Regulation. Sie vermuten, dass schon geringe Veränderungen des Aktivierungszustandes oder des Entwicklungsstatus der Zelle die Verfügbarkeit von IRF4 und dessen Interaktionspartnern beeinflussen und dadurch eine unterschiedliche Regulation der Genexpression bewirken.¹⁸⁷ Für die Interpretation der hier erzielten bio-ChIP Ergebnisse ist demnach entscheidend, ob IRF4 am *Prdm-1*-Gen in Th9-Zellen als Aktivator oder Repressor fungiert. Aufgrund der Tatsache, dass BLIMP-1 eine Reduktion der IL-9-Produktion bewirkt (s.o.), ist eine Repressorfunktion an dieser Stelle naheliegend, bedarf allerdings weiterer Untersuchungen. Interessant wäre deshalb z.B. die Analyse der IRF4-interagierenden Proteine am *Prdm-1*-Promotor. Erwähnenswert ist zudem, dass IRF4-abhängiges BLIMP-1 in Tregs für die IL-10-Produktion notwendig ist.¹³⁸ Da Th9-Zellen ebenfalls IL-10 produzieren,⁵⁰ dürfte auch hier die Regulation von *Prdm-1* durch IRF4 eine Rolle spielen. Abschließend bleibt zu sagen, dass *Prdm-1* ein durchaus sehr interessantes Gen darstellt, um den Einfluss von IRF4 auf die Differenzierung verschiedener Th-Zell-Subtypen und die Effektorfunktion von Th9-Zellen weiter zu untersuchen. Es scheint als würde ein empfindliches Gleichgewicht aus BLIMP-1 und IRF4 entscheidend sein.

Weitere Bindestellen von IRF4 in Th9-Zellen wurden mithilfe der hier durchgeführten bioChIP in Genen wie Tumornekrosefaktor (Ligand) Superfamilie, Mitglied 4 (*Tnfrsf4*; ist OX40-Ligand) und *Jak2/Jak3* erkannt. Eine OX40-Ligation führt zur Induktion von Th9-Zellen und Th9-abhängigen Atemwegsentzündungen, während es die Entwicklung von Tregs und Th17-Zellen unterdrückt.⁴⁹ Die *Peak*-Analyse zeigt eine Bindung von IRF4 an der TSS der *Tnfrsf4*-Sequenz, was für eine direkte Regulation am Promotor spricht und die Bedeutung von IRF4 als Th9-determinierendem Faktor nochmals hervorhebt. Die Rolle von Januskinasen wurde bereits im Zusammenhang mit dem JAK-STAT-Signalweg bei Th2-Zellen in Asthma beschrieben:¹³⁹ IL-4, als Th2-typisches Zytokin, stimuliert JAK1 und JAK3, die STAT6 aktivieren.¹³⁹ STAT6 als wichtiger Transkriptionsfaktor der Differenzierung induziert die Transkription von *Irf4* in Th9-Zellen.³⁷ Außerdem ist bekannt, dass eine IL-9-Rezeptor-Bindung zur Phosphorylierung von JAK1 und JAK3 führt, die dann STAT1/3 und STAT5-abhängig die Transkription IL-9-induzierter Gene regulieren.¹⁸⁸ Die hier erzielten Ergebnisse deuten also auf eine Th2-ähnliche Regulation des JAK-STAT-Signalwegs hin, mit der Abweichung, dass diese bei Th9-Zellen IRF4- und IL-9-gesteuert ist.

Weiterhin bindet IRF4 an das Transkriptionsfaktor 12 (*Tcf12*)-Gen, das für TCF12 (auch HEB genannt) codiert – ein Aktivator der *Forkhead box O1* (*Foxo1*)-Expression in lymphoiden Vorläuferzellen.¹⁴¹ FOXO1 wurde erst kürzlich als determinierender Transkriptionsfaktor der Th9-Differenzierung beschrieben und spielt eine Rolle in allergischem Asthma.^{46,47} Über die bioChIP konnte in dieser Arbeit eine deutliche Bindestelle von IRF4 im *Foxo1*-Gen identifiziert werden, wobei Buttrick et al.⁴⁷ auf Grundlage von *in silico* Analysen auch den umgekehrten Fall (FOXO1 bindet an *Irf4*) prognostiziert. Somit bekräftigen die hier generierten Ergebnisse die wichtige Rolle von FOXO1 in Th9-Zellen, indem es IRF4-abhängig auf mehrfachem Wege transkriptionell reguliert wird und Teil einer positiven Rückkopplungsschleife ist. In Bezug auf die Pathogenese von Asthma wäre es durchaus interessant zu prüfen, inwieweit sich die einzelnen Faktoren dieser Verkettung bei einem Ausfall einer Komponente gegenseitig kompensieren oder regulieren.

Die hier identifizierte Bindung von IRF4 in oder nahe der TSS von Rezeptor-codierenden Genen wie IL-2-Rezeptor- α/β (*Il2ra/\beta*) und IL-1-Rezeptor I (*Il1rl*) weist auf eine IRF4-gesteuerte Aufrechterhaltung der Effektorfunktionen von bereits differenzierten Th9-Zellen hin. So beeinflusst die IL-2-Rezeptorbindung über STAT5 positiv die Expression von IRF4 und dadurch die Produktion von IL-9.^{30,45} Auch am *Stat5b*-Gen wurden Bindungen von IRF4 erkannt. IL-1 signalisiert über den IL1RI NF- κ B-abhängig ebenfalls die Produktion von IL-9,^{67,78} wobei die Daten der *Peak*-Analyse auch eine Bindung von IRF4 am *Nfkb1*-Gen zeigen. Die hier generierten Daten verdeutlichen, dass IRF4 durch die Regulation von Genen wie *Il2ra/\beta* und *Il1rl*, sowie *Stat5b* und *Nfkb1* seine eigene Transkription weiter vorantreibt und die transkriptionelle Funktion am *Il9*-Promotor zusätzlich verstärkt, indem es z.B. auch die Transkription eigener Interaktionspartner reguliert. Für das zahlreiche Auftreten von positiven Rückkopplungsmechanismen spricht auch, dass IRF4 sogar im Bereich der eigenen TSS bindet.

5.4 Fazit und Ausblick

Abschließend lässt sich festhalten, dass die *in vivo* Biotinylierung von IRF4 und der daraus entstehenden Möglichkeit zur Durchführung von Biotin-vermittelten Affinitätsreinigungen wie IntP und bioChIP einen großen Vorteil gegenüber herkömmlichen Antikörper-vermittelten Methoden darstellt. Die Biotin-Streptavidin-Bindung ist hoch spezifisch und ermöglicht stringente Waschbedingungen, wodurch die Wahrscheinlichkeit falsch-positiver Ergebnisse reduziert wird. Die Charakterisierung der IRF4-Transkriptionsfaktorkomplexe kann durch die Anwendung der Biotin-vermittelten Affinitätsreinigungen proteom- sowie genomweit erfolgen und ist nicht auf bestimmte Genbereiche oder einzelne Protein-Interaktionen beschränkt. Durch die Verwendung einer

transgenen Mauslinie, welche die *in vivo* Biotinylierung von IRF4 ermöglicht, können solche Analysen unter physiologischen Bedingungen durchgeführt werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen, dass das transkriptionelle Netzwerk um IRF4 herum aus einem komplexen Geflecht von untereinander wechselwirkender und sich selbst regulierender Faktoren besteht. Mehrere sich selbst verstärkende Reaktionen oder Rückkopplungsschleifen zeichnen sich ab – wie am Beispiel der oben erläuterten gegenseitigen Wechselwirkungen von IRF4 und Ikaros; IRF4, HEB und FOXO1; IRF4 und NF- κ B oder auch der Rolle von IRF4 im IL-2-Signalweg zu beobachten ist. Zudem kann IRF4 je nach Interaktionspartner oder DNA-Bindestelle als transkriptioneller Aktivator oder Repressor fungieren.

Mithilfe einer proteom- und genomweiten Analyse sowie der aktuellen Literatur konnten einige IRF4-Interaktionen und Genbindungen identifiziert, bzw. herausgearbeitet werden, die für weitere Analysen bezüglich der Differenzierung und Funktion von Th9-Zellen prädestiniert sind. So scheint z.B. die unterschiedliche Regulation des *Ii4*-Promotors oder *Ii9-Enhancers* Einfluss auf die ungleiche Cytokin-Produktion von Th2- und Th9-Zellen zu haben. Nun bietet es sich an, diese Regionen mithilfe von Transkriptom-Daten, Reporterassays, Knockout/Inhibitor-Experimenten oder Oligopeptidpräzipitationen weiter zu analysieren. Letztere können ebenfalls Biotin-vermittelt durchgeführt werden. Ähnlich wie in dem von Chodosh und Buratowski¹⁸⁹ publizierten Protokoll, können über eine biotinylierte Oligonukleotid-Sonde DNA-bindende Proteine oder Proteinkomplexe mithilfe von Streptavidin isoliert und anschließend analysiert werden. Im Hinblick auf die Charakterisierung der IRF4-gesteuerten Transkription könnte so die Situation am *Ii9*- oder *Ii10*-Promotor bezüglich aktivierender oder reprimierender IRF4-Protein-Interaktionen untersucht werden. Gleiches gilt für das *Prdm-1*-Gen.

Die Kombination von Interaktom-Daten, bioChIP-Seq-Daten und Transkriptom-Daten („Multiomics“) bildet eine außerordentlich potente Basis zur Identifizierung von Kandidatengen und den daraus resultierenden Proteinen, deren Funktion bezüglich der Th-Zelldifferenzierung in weiterführenden *in vitro* - und *in vivo*-Studien detailliert analysiert werden kann. Letztendlich werden solche Studien zur Modulation der molekularen Aktivität des IRF4-Interaktoms die Entwicklung neuer Strategien ermöglichen, die potenziell für immuntherapeutische Maßnahmen (z.B. bei allergischen Atemwegsentzündungen oder Tumorerkrankungen) eingesetzt werden können.

6 Zusammenfassung

IRF4 ist ein Transkriptionsfaktor, der für die Differenzierung von Th9-Zellen essenziell ist und durch Bindung an den *IL9*-Promotor die Produktion des Th9-typischen Zytokins IL-9 aktiviert. Da IL-9 die Entstehung allergischer Erkrankungen begünstigen kann, entwickeln *Irf4*-defiziente Tiere im Vergleich zu Wildtyp-Tieren aufgrund einer geringeren IL-9-Expression deutlich schwächere Symptome bei allergischem Asthma.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Biotin-vermittelte Affinitätsreinigungen etabliert und angewandt, um IRF4 im Hinblick auf seine transkriptionelle Funktion zu untersuchen. Hierfür wurde eigens eine Mauslinie generiert, die ubiquitär die *in vivo* Biotinylierung von IRF4 ermöglicht. Der Vorteil dieser Methoden gegenüber herkömmlichen Immunpräzipitationen besteht darin, dass Streptavidin anstelle von spezifischen Antikörpern zur Isolation des biotinylierten IRF4 in Komplex mit interagierenden Proteinen oder gebundener DNA genutzt werden kann. Im Anschluss an eine Biotin-vermittelte IRF4-Interaktompräzipitation wurden die isolierten Proteine via Western Blot und Massenspektrometrie analysiert. Dabei konnten 137 IRF4-interagierende Proteine identifiziert werden, von denen ein Großteil an der transkriptionellen Regulation von Genen des Immunsystems beteiligt ist. Mithilfe einer Literatur-basierten Datenanalyse wurden IRF4-Interaktionspartner wie IKZF1/3, EZH2 und TYY2 identifiziert, die für weitere Untersuchungen zur Charakterisierung von IRF4-gesteuerten Transkriptionsfaktorkomplexen von hohem Interesse sind. Durch eine Biotin-vermittelte Chromatin-Immunpräzipitation („bioChIP“) mit anschließender Sequenzierung erfolgte eine genomweite Identifizierung von IRF4-Bindestellen in Th9-Zellen. Die Ergebnisse zeigten, dass IRF4 nicht nur am *IL9*-Promotor eine regulatorische Rolle spielt, sondern durch die Bindung an den Transkriptionsstartpunkt verschiedener Gene des adaptiven Immunsystems sehr wahrscheinlich auch Einfluss auf deren Expression nimmt. Auch hier rückte eine Literatur-basierte Datenanalyse mehrere Gene wie z.B. *Prdm-1*, *Foxo1* und Gene des JAK-STAT-Signalwegs in den Fokus für weiterführende, experimentelle Untersuchungen zur IRF4-regulierten Transkription.

Es zeichnet sich ein komplexes, IRF4-gesteuertes transkriptionsregulatorisches Netzwerk ab, in dem IRF4 – in Abhängigkeit seiner Interaktionspartner sowie der jeweils spezifischen DNA-Bindestellen – sowohl als Aktivator als auch Repressor agieren kann. Außerdem scheinen mehrere sich selbst regulierende Reaktionen und verstärkende Rückkopplungsschleifen zu existieren. Abschließend bleibt zu sagen, dass IRF4 nicht nur für die Differenzierung und IL-9-Produktion von Th9-Zellen eine Rolle spielt, sondern an zahlreichen Reaktionen des Immunsystems beteiligt ist. Zukünftige Studien zur Modulation der IRF4-gesteuerten Transkription ermöglichen die Entwicklung neuer Strategien, die potenziell für immuntherapeutische Maßnahmen (z.B. bei Asthma) eingesetzt werden können.

7 Abstract

IRF4 is a transcription factor essential for Th9-development and production of the Th9-cell specific cytokine IL-9 through transactivation of the *Il9*-promoter. IL-9 promotes the development of allergic diseases. Accordingly, it has been demonstrated that *Irf4*-deficient mice develop less symptoms of allergic asthma due to an impaired IL-9-production.

In this project, biotin-dependent affinity maturations were optimized to characterize the transcriptional role of IRF4. To do so, a mouse model was established that allows the *in vivo* biotinylation of IRF4. One major advantage of this method over conventional immunoprecipitations is the use of streptavidin instead of specific antibodies to isolate the biotinylated transcription factor together with interacting proteins or bound DNA. Following a biotin-dependent IRF4-pulldown, the isolated proteins were analyzed via Western Blot and mass spectrometry. Thereby, 137 proteins could be identified, the majority of which function in the transcriptional regulation of genes playing a role in immunity. Through a literature-base data analysis IRF4-interaction partners such as IKZF1/3, EZH2 and TYY2 could be determined, which are of great interest to further characterize IRF4-dependent transcription factor complexes. A biotin-dependent Chromatin-Immuno-precipitation (“bioChIP”) and subsequent sequencing led to the genome wide identification of IRF4-bound genes in Th9-cells. Analysis of these data showed that IRF4 not only plays a regulatory role at the *Il9*-promoter but might also impact the expression of various other genes participating in the adaptive immune system by binding the respective transcription start site (TSS). Again, a literature-based data evaluation highlighted genes like *Prdm-1*, *Foxo1* and genes of the JAK-STAT-signaling pathway for further investigation of IRF4-dependent transcription.

Combined, these results suggest a complex IRF4-regulated transcriptional network in which IRF4 – depending on its interaction partners as well as its DNA-binding site – can act as both transcriptional activator and repressor. Furthermore, several self-regulating reactions and positive feedback loops seem to exist. To conclude, IRF4 does not only play an important role in the differentiation and the IL-9-production of Th9-cells but is also involved in multiple immune reactions. Future studies concerning the modulation of the IRF4-dependent transcriptional network will allow for the development of new strategies that potentially utilize immunotherapeutic approaches (e.g. in allergic asthma).

8 Literaturverzeichnis

1. Murphy, K., Janeway Jr., C. A., Travers, P. & Walport, M. *Janeway's Immunobiology. Garland Science* **8**, (2012).
2. Sprent, J. & Surh, C. D. T CELL MEMORY. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 551–579 (2002).
3. Gerner, M. Y., Casey, K. A., Kastenmuller, W. & Germain, R. N. Dendritic cell and antigen dispersal landscapes regulate T cell immunity. *J. Exp. Med.* **214**, 3105–3122 (2017).
4. Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J. & Mortha, A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu. Rev. Immunol.* **31**, 563–604 (2013).
5. Banchereau, J. *et al.* Immunobiology of Dendritic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 767–811 (2000).
6. Kushwah, R. & Hu, J. Complexity of dendritic cell subsets and their function in the host immune system. *Immunology* **133**, 409–19 (2011).
7. Sprent, J. Circulating T and B lymphocytes of the mouse: I. Migratory properties. *Cell. Immunol.* **7**, 10–39 (1973).
8. Rabenstein, H. *et al.* Differential Kinetics of Antigen Dependency of CD4+ and CD8+ T Cells. *J. Immunol.* **192**, 3507–3517 (2014).
9. Grakoui, A. *et al.* The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* **285**, 221–7 (1999).
10. Petro, T. M., Chen, S. S. & Panther, R. B. Effect of CD80 and CD86 on T cell cytokine production. *Immunol. Invest.* **24**, 965–76 (1995).
11. Kapsenberg, M. L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 984–993 (2003).
12. Kaliński, P., Hilkens, C. M. ., Wierenga, E. A. & Kapsenberg, M. L. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol. Today* **20**, 561–567 (1999).
13. Zhu, J., Yamane, H. & Paul, W. E. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu. Rev. Immunol.* **28**, 445–89 (2010).
14. Yamane, H. & Paul, W. E. Early signaling events that underlie fate decisions of naive CD4+ T cells toward distinct T-helper cell subsets. *Immunol. Rev.* **252**, 12–23 (2013).
15. Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D. & Xia, B. CD4+ T Cells: Differentiation and Functions. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, 1–12 (2012).
16. Szabo, S. J. *et al.* A Novel Transcription Factor, T-bet, Directs Th1 Lineage Commitment. *Cell* **100**, 655–669 (2000).
17. Ebner, F. *et al.* A novel lineage transcription factor based analysis reveals differences in T helper cell subpopulation development in infected and intrauterine growth restricted (IUGR) piglets. *Dev. Comp. Immunol.* **46**, 333–340 (2014).

18. Chang, S. & Aune, T. M. Dynamic changes in histone-methylation 'marks' across the locus encoding interferon- γ during the differentiation of T helper type 2 cells. *Nat. Immunol.* **8**, 723–731 (2007).
19. Jetten, A. M. Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. *Nucl. Recept. Signal.* **7**, e003 (2009).
20. Rudensky, A. Y. Regulatory T cells and Foxp3. *Immunol. Rev.* **241**, 260–8 (2011).
21. von Boehmer, H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat. Immunol.* **6**, 338–344 (2005).
22. Josefowicz, S. Z., Lu, L.-F. & Rudensky, A. Y. Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 531–564 (2012).
23. Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, H. L. & Hafler, D. A. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J. Exp. Med.* **199**, 971–9 (2004).
24. Ehrenstein, M. R. *et al.* Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF α therapy. *J. Exp. Med.* **200**, 277–85 (2004).
25. Lindley, S. *et al.* Defective suppressor function in CD4+ CD25+ T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* **54**, 92–9 (2005).
26. Lloyd, C. M. & Hessel, E. M. Functions of T cells in asthma: more than just Th2 cells. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 838–48 (2010).
27. Webb, D. C. *et al.* Integrated signals between IL-13, IL-4, and IL-5 regulate airways hyperreactivity. *J. Immunol.* **165**, 108–13 (2000).
28. Robinson, D. S. *et al.* Predominant Th2-like Bronchoalveolar T-Lymphocyte Population in Atopic Asthma. *N. Engl. J. Med.* **326**, 298–304 (1992).
29. Koch, S., Sopel, N. & Finotto, S. Th9 and other IL-9-producing cells in allergic asthma. *Semin. Immunopathol.* **39**, 55–68 (2017).
30. Schmitt, E. *et al.* IL-9 production of naive CD4+ T cells depends on IL-2, is synergistically enhanced by a combination of TGF- β and IL-4, and is inhibited by IFN- γ . *J. Immunol.* **153**, 3989–96 (1994).
31. Veldhoen, M. *et al.* Transforming growth factor- β 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat. Immunol.* **9**, 1341–1346 (2008).
32. Dardalhon, V. *et al.* IL-4 inhibits TGF- β -induced Foxp3+ T cells and, together with TGF- β , generates IL-9+ IL-10+ Foxp3- effector T cells. *Nat. Immunol.* **9**, 1347–55 (2008).
33. Maruyama, T., Konkol, J. E., Zamarron, B. F. & Chen, W. The molecular mechanisms of Foxp3 gene regulation. *Semin. Immunol.* **23**, 418–23 (2011).
34. Elyaman, W. *et al.* Notch receptors and Smad3 signaling cooperate in the induction of interleukin-9-producing T cells. *Immunity* **36**, 623–34 (2012).
35. Kaplan, M. H., Hufford, M. M. & Olson, M. R. The development and *in vivo* function of T helper 9 cells. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 295–307 (2015).
36. Chang, H.-C. *et al.* The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nat. Immunol.* **11**, 527–34 (2010).
37. Goswami, R. *et al.* STAT6-dependent regulation of Th9 development. *J. Immunol.* **188**, 968–75 (2012).

38. Yang, X. O. *et al.* The signaling suppressor CIS controls proallergic T cell development and allergic airway inflammation. *Nat. Immunol.* **14**, 732–40 (2013).
39. Staudt, V. *et al.* Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells. *Immunity* **33**, 192–202 (2010).
40. Zhu, J. *et al.* Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in TH1-TH2 responses. *Nat. Immunol.* **5**, 1157–1165 (2004).
41. Kaplan, M. H. Th9 cells: differentiation and disease. *Immunol. Rev.* **252**, 104–15 (2013).
42. Fang, T. C. *et al.* Notch directly regulates Gata3 expression during T helper 2 cell differentiation. *Immunity* **27**, 100–10 (2007).
43. Amsen, D. *et al.* Direct regulation of Gata3 expression determines the T helper differentiation potential of Notch. *Immunity* **27**, 89 (2007).
44. Huber, M. & Lohoff, M. IRF4 at the crossroads of effector T-cell fate decision. *Eur. J. Immunol.* **44**, 1886–1895 (2014).
45. Gomez-Rodriguez, J. *et al.* Itk is required for Th9 differentiation via TCR-mediated induction of IL-2 and IRF4. *Nat. Commun.* **7**, 10857 (2016).
46. Malik, S. *et al.* Transcription factor Foxo1 is essential for IL-9 induction in T helper cells. *Nat. Commun.* **8**, 815 (2017).
47. Buttrick, T. S. *et al.* Foxo1 Promotes Th9 Cell Differentiation and Airway Allergy. *Sci. Rep.* **8**, 818 (2018).
48. Takami, M., Love, R. B. & Iwashima, M. TGF- β converts apoptotic stimuli into the signal for Th9 differentiation. *J. Immunol.* **188**, 4369–75 (2012).
49. Xiao, X. *et al.* OX40 signaling favors the induction of T(H)9 cells and airway inflammation. *Nat. Immunol.* **13**, 981–90 (2012).
50. Tan, C. *et al.* Antigen-specific Th9 cells exhibit uniqueness in their kinetics of cytokine production and short retention at the inflammatory site. *J. Immunol.* **185**, 6795–801 (2010).
51. Jäger, A., Dardalhon, V., Sobel, R. A., Bettelli, E. & Kuchroo, V. K. Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *J. Immunol.* **183**, 7169–77 (2009).
52. Licona-Limón, P. *et al.* Th9 Cells Drive Host Immunity against Gastrointestinal Worm Infection. *Immunity* **39**, 744–57 (2013).
53. Lu, Y. *et al.* Th9 cells promote antitumor immune responses *in vivo*. *J. Clin. Invest.* **122**, 4160–71 (2012).
54. Purwar, R. *et al.* Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9-producing T cells. *Nat. Med.* **18**, 1248–53 (2012).
55. Kerzerho, J. *et al.* Programmed cell death ligand 2 regulates TH9 differentiation and induction of chronic airway hyperreactivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **131**, 1048–57, 1057.e1–2 (2013).
56. Li, J. *et al.* IL-9 and Th9 cells in health and diseases-From tolerance to immunopathology. *Cytokine Growth Factor Rev.* **37**, 47–55 (2017).
57. Zhou, Y. *et al.* IL-9 Promotes Th17 Cell Migration into the Central Nervous System via CC Chemokine Ligand-20 Produced by Astrocytes. *J. Immunol.* **186**, 4415–4421 (2011).

58. Khan, W. I. *et al.* Modulation of intestinal muscle contraction by interleukin-9 (IL-9) or IL-9 neutralization: correlation with worm expulsion in murine nematode infections. *Infect. Immun.* **71**, 2430–8 (2003).
59. Gerlach, K. *et al.* TH9 cells that express the transcription factor PU.1 drive T cell-mediated colitis via IL-9 receptor signaling in intestinal epithelial cells. *Nat. Immunol.* **15**, 676–686 (2014).
60. Hültner, L. *et al.* Mast cell growth-enhancing activity (MEA) is structurally related and functionally identical to the novel mouse T cell growth factor P40/TCGFIII (interleukin 9). *Eur. J. Immunol.* **20**, 1413–1416 (1990).
61. Uyttenhove, C., Simpson, R. J. & Van Snick, J. Functional and structural characterization of P40, a mouse glycoprotein with T-cell growth factor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 6934–8 (1988).
62. Schmitt, E., Brandwijk, R. Van, Snick, J. Van, Siebold, B. & Rude, E. Tcgfiii/p40 is produced by naive murine cd4+ t cells but is not a general t cell growth factor*. *Eur. J. Immunol.* **19**, 2167–2170 (1989).
63. Goswami, R. & Kaplan, M. H. A brief history of IL-9. *J. Immunol.* **186**, 3283–8 (2011).
64. Mock, B. A. *et al.* IL9 maps to mouse chromosome 13 and human chromosome 5. *Immunogenetics* **31**, 265–70 (1990).
65. Nowak, E. C. *et al.* IL-9 as a mediator of Th17-driven inflammatory disease. *J. Exp. Med.* **206**, 1653–60 (2009).
66. Stassen, M. *et al.* Murine bone marrow-derived mast cells as potent producers of IL-9: costimulatory function of IL-10 and kit ligand in the presence of IL-1. *J. Immunol.* **164**, 5549–55 (2000).
67. Stassen, M., Schmitt, E. & Bopp, T. From interleukin-9 to T helper 9 cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1247**, 56–68 (2012).
68. Matsuyama, T. *et al.* 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 (1995).
69. Schmitt, E., Klein, M. & Bopp, T. Th9 cells, new players in adaptive immunity. *Trends Immunol.* **35**, 61–68 (2014).
70. Yee, A. A. *et al.* Cooperative interaction between the DNA-binding domains of PU.1 and IRF4. *J. Mol. Biol.* **279**, 1075–1083 (1998).
71. Escalante, C. R. *et al.* Crystal Structure of PU.1/IRF-4/DNA Ternary Complex. *Mol. Cell* **10**, 1097–1105 (2002).
72. Tamiya, T. *et al.* Smad2/3 and IRF4 play a cooperative role in IL-9-producing T cell induction. *J. Immunol.* **191**, 2360–71 (2013).
73. Wang, A. *et al.* Cutting edge: Smad2 and Smad4 regulate TGF- β -mediated IL9 gene expression via EZH2 displacement. *J. Immunol.* **191**, 4908–12 (2013).
74. Campos Carrascosa, L. *et al.* Reciprocal regulation of the IL9 locus by counteracting activities of transcription factors IRF1 and IRF4. *Nat. Commun.* **8**, 15366 (2017).
75. Angkasekwinai, P., Chang, S. H., Thapa, M., Watarai, H. & Dong, C. Regulation of IL-9 expression by IL-25 signaling. *Nat. Immunol.* **11**, 250–6 (2010).

76. Schmitt, E. *et al.* IL-1 serves as a secondary signal for IL-9 expression. *J. Immunol.* **147**, 3848–54 (1991).
77. Hültner, L. *et al.* In activated mast cells, IL-1 up-regulates the production of several Th2-related cytokines including IL-9. *J. Immunol.* **164**, 5556–63 (2000).
78. Stassen, M. *et al.* IL-9 and IL-13 production by activated mast cells is strongly enhanced in the presence of lipopolysaccharide: NF-kappa B is decisively involved in the expression of IL-9. *J. Immunol.* **166**, 4391–8 (2001).
79. Stassen, M. *et al.* p38 MAP kinase drives the expression of mast cell-derived IL-9 via activation of the transcription factor GATA-1. *Mol. Immunol.* **44**, 926–933 (2007).
80. Ikushima, H., Negishi, H. & Taniguchi, T. The IRF family transcription factors at the interface of innate and adaptive immune responses. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **78**, 105–16 (2013).
81. Klein, M. *et al.* Tick Salivary Sialostatin L Represses the Initiation of Immune Responses by Targeting IRF4-Dependent Transcription in Murine Mast Cells. *J. Immunol.* **195**, 621–31 (2015).
82. Nam, S. & Lim, J.-S. Essential role of interferon regulatory factor 4 (IRF4) in immune cell development. *Arch. Pharm. Res.* **39**, 1548–1555 (2016).
83. Miyamoto, M. *et al.* Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN- β gene regulatory elements. *Cell* **54**, 903–913 (1988).
84. Fujii, Y. *et al.* Crystal structure of an IRF-DNA complex reveals novel DNA recognition and cooperative binding to a tandem repeat of core sequences. *EMBO J.* **18**, 5028–41 (1999).
85. Lohoff, M. & Mak, T. W. Roles of interferon-regulatory factors in T-helper-cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 125–135 (2005).
86. Eisenbeis, C. F., Singh, H. & Storb, U. Pip, a novel IRF family member, is a lymphoid-specific, PU.1-dependent transcriptional activator. *Genes Dev.* **9**, 1377–87 (1995).
87. Iida, S. *et al.* Deregulation of MUM1/IRF4 by chromosomal translocation in multiple myeloma. *Nat. Genet.* **17**, 226–230 (1997).
88. Yamagata, T. *et al.* A novel interferon regulatory factor family transcription factor, ICSAT/Pip/LSIRF, that negatively regulates the activity of interferon-regulated genes. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 1283–94 (1996).
89. Matsuyama, T. *et al.* 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**, 2127–36 (1995).
90. Man, K. *et al.* The transcription factor IRF4 is essential for TCR affinity-mediated metabolic programming and clonal expansion of T cells. *Nat. Immunol.* **14**, 1155–1165 (2013).
91. Mittrücker, H. W. *et al.* Requirement for the transcription factor LSIRF/IRF4 for mature B and T lymphocyte function. *Science* **275**, 540–3 (1997).
92. Rengarajan, J. *et al.* Interferon regulatory factor 4 (IRF4) interacts with NFATc2 to modulate interleukin 4 gene expression. *J. Exp. Med.* **195**, 1003–12 (2002).
93. Lohoff, M. *et al.* Dysregulated T helper cell differentiation in the absence of interferon regulatory factor 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 11808–12 (2002).
94. Biswas, P. S. *et al.* Phosphorylation of IRF4 by ROCK2 regulates IL-17 and IL-21 production and the development of autoimmunity in mice. *J. Clin. Invest.* **120**, 3280–95 (2010).

95. Li, P. *et al.* BATF–JUN is critical for IRF4-mediated transcription in T cells. *Nature* **490**, 543–546 (2012).
96. Ouyang, X. *et al.* Transcription factor IRF8 directs a silencing programme for TH17 cell differentiation. *Nat. Commun.* **2**, 314 (2011).
97. Brüstle, A. *et al.* The development of inflammatory TH-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat. Immunol.* **8**, 958–966 (2007).
98. Zheng, Y. *et al.* Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses. *Nature* **458**, 351–6 (2009).
99. Cretney, E., Kallies, A. & Nutt, S. L. Differentiation and function of Foxp3+ effector regulatory T cells. *Trends Immunol.* **34**, 74–80 (2013).
100. Jabeen, R. *et al.* Th9 cell development requires a BATF-regulated transcriptional network. *J. Clin. Invest.* **123**, 4641–53 (2013).
101. Humblin, E. *et al.* IRF8-dependent molecular complexes control the Th9 transcriptional program. *Nat. Commun.* **8**, 2085 (2017).
102. Marecki, S., Riendeau, C. J., Liang, M. D. & Fenton, M. J. PU.1 and multiple IFN regulatory factor proteins synergize to mediate transcriptional activation of the human IL-1 beta gene. *J. Immunol.* **166**, 6829–38 (2001).
103. Gao, Y. *et al.* Control of T helper 2 responses by transcription factor IRF4-dependent dendritic cells. *Immunity* **39**, 722–32 (2013).
104. Klein, U. *et al.* Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nat. Immunol.* **7**, 773–782 (2006).
105. Kim, J., Cantor, A. B., Orkin, S. H. & Wang, J. Use of *in vivo* biotinylation to study protein-protein and protein-DNA interactions in mouse embryonic stem cells. *Nat. Protoc.* **4**, 506–17 (2009).
106. Louche, A., Salcedo, S. P. & Bigot, S. Protein–Protein Interactions: Pull-Down Assays. in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1615**, 247–255 (2017).
107. Gingras, A.-C., Gstaiger, M., Raught, B. & Aebersold, R. Analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 645–654 (2007).
108. Meyer, K. & Selbach, M. Quantitative affinity purification mass spectrometry: a versatile technology to study protein–protein interactions. *Front. Genet.* **6**, 237 (2015).
109. Smits, A. H. & Vermeulen, M. Characterizing Protein–Protein Interactions Using Mass Spectrometry: Challenges and Opportunities. *Trends Biotechnol.* **34**, 825–834 (2016).
110. He, A. & Pu, W. T. Genome-Wide Location Analysis by Pull Down of *In Vivo* Biotinylated Transcription Factors. in *Current Protocols in Molecular Biology* **Chapter 21**, Unit 21.20 (John Wiley & Sons, Inc., 2010).
111. Chapman-Smith, A. & Cronan, J. E. The enzymatic biotinylation of proteins: a post-translational modification of exceptional specificity. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 359–363 (1999).
112. Beckett, D., Kovaleva, E. & Schatz, P. J. A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation. *Protein Sci.* **8**, 921–9 (1999).
113. Driegen, S. *et al.* A generic tool for biotinylation of tagged proteins in transgenic mice. *Transgenic Res.* **14**, 477–482 (2005).

114. Chodosh, L. A. Purification of DNA-Binding Proteins Using Biotin/Streptavidin Affinity Systems. in *Current Protocols in Molecular Biology* **36**, 12.6.1-12.6.9 (John Wiley & Sons, Inc., 2001).
115. Pierres, A. *et al.* A rat anti-mouse T4 monoclonal antibody (H129.19) inhibits the proliferation of Ia-reactive T cell clones and delineates two phenotypically distinct (T4+, Lyt-2,3-, and T4-, Lyt-2,3+) subsets among anti-Ia cytolytic T cell clones. *J. Immunol.* **132**, 2775–82 (1984).
116. Lowenthal, J. W. *et al.* High and low affinity IL 2 receptors: analysis by IL 2 dissociation rate and reactivity with monoclonal anti-receptor antibody PC61. *J. Immunol.* **135**, 3988–94 (1985).
117. Gross, J. A., Callas, E. & Allison, J. P. Identification and distribution of the costimulatory receptor CD28 in the mouse. *J. Immunol.* **149**, 380–8 (1992).
118. Samelson, L. E. *et al.* T cell antigen receptor phosphorylation induced by an anti-receptor antibody. *J. Immunol.* **139**, 2708–2714 (1987).
119. Law, M. *et al.* Structural Requirements for the Inhibition of Calcium Mobilization and Mast Cell Activation by the Pyrazole Derivative BTP2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **43**, 1228 (2011).
120. Lottspeich, F. *Bioanalytik*. (Spektrum, 2012).
121. Distler, U. *et al.* Drift time-specific collision energies enable deep-coverage data-independent acquisition proteomics. *Nat. Methods* **11**, 167–170 (2014).
122. Distler, U., Kuharev, J., Navarro, P. & Tenzer, S. Label-free quantification in ion mobility-enhanced data-independent acquisition proteomics. *Nat. Protoc.* **11**, 795–812 (2016).
123. Kuharev, J., Navarro, P., Distler, U., Jahn, O. & Tenzer, S. In-depth evaluation of software tools for data-independent acquisition based label-free quantification. *Proteomics* **15**, 3140–3151 (2015).
124. Ishihama, Y. *et al.* Protein abundance profiling of the Escherichia coli cytosol. *BMC Genomics* **9**, 102 (2008).
125. Silva, J. C., Gorenstein, M. V, Li, G.-Z., Vissers, J. P. C. & Geromanos, S. J. Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition. *Mol. Cell. Proteomics* **5**, 144–56 (2006).
126. Szklarczyk, D. *et al.* STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* **47**, D607–D613 (2019).
127. Soutoglou, E. & Talianidis, I. Coordination of PIC Assembly and Chromatin Remodeling During Differentiation-Induced Gene Activation. *Science (80-.).* **295**, 1901–1904 (2002).
128. Lerdrup, M., Johansen, J. V., Agrawal-Singh, S. & Hansen, K. An interactive environment for agile analysis and visualization of CHIP-sequencing data. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **23**, 349–357 (2016).
129. McLean, C. Y. *et al.* GREAT improves functional interpretation of cis-regulatory regions. *Nat. Biotechnol.* **28**, 495–501 (2010).
130. Bailey, T. L. *et al.* MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res.* **37**, W202–W208 (2009).
131. Bailey, T. L. DREME: motif discovery in transcription factor ChIP-seq data. *Bioinformatics* **27**, 1653–1659 (2011).
132. Heintz, N. Bac to the future: The use of bac transgenic mice for neuroscience research. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 861–870 (2001).

133. Rudra, D. *et al.* Transcription factor Foxp3 and its protein partners form a complex regulatory network. *Nat. Immunol.* **13**, 1010–9 (2012).
134. Niers, J. M., Chen, J. W., Weissleder, R. & Tannous, B. A. Enhanced *in vivo* imaging of metabolically biotinylated cell surface reporters. *Anal. Chem.* **83**, 994–9 (2011).
135. Lee, C.-G. *et al.* A distal cis-regulatory element, CNS-9, controls NFAT1 and IRF4-mediated IL-10 gene activation in T helper cells. *Mol. Immunol.* **46**, 613–621 (2009).
136. Koh, B. *et al.* A conserved enhancer regulates IL9 expression in multiple lineages. *Nat. Commun.* **9**, 4803 (2018).
137. Benevides, L. *et al.* B lymphocyte-induced maturation protein 1 controls TH9 cell development, IL-9 production, and allergic inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **143**, 1119–1130.e3 (2019).
138. Cretney, E. *et al.* The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **12**, 304–311 (2011).
139. Pernis, A. B. & Rothman, P. B. JAK-STAT signaling in asthma. *J. Clin. Invest.* **109**, 1279–83 (2002).
140. Liao, W. *et al.* Opposing actions of IL-2 and IL-21 on Th9 differentiation correlate with their differential regulation of BCL6 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 3508–13 (2014).
141. Welinder, E. *et al.* The transcription factors E2A and HEB act in concert to induce the expression of FOXO1 in the common lymphoid progenitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 17402–7 (2011).
142. Hegazy, A. N. *et al.* Interferons Direct Th2 Cell Reprogramming to Generate a Stable GATA-3⁺ T-bet⁺ Cell Subset with Combined Th2 and Th1 Cell Functions. *Immunity* **32**, 116–128 (2010).
143. Lingnau, K. *et al.* IL-4 in combination with TGF-beta favors an alternative pathway of Th1 development independent of IL-12. *J. Immunol.* **161**, 4709–18 (1998).
144. Ciofani, M. *et al.* A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell* **151**, 289–303 (2012).
145. Barker, D. F. & Campbell, A. M. The *birA* gene of *Escherichia coli* encodes a biotin holoenzyme synthetase. *J. Mol. Biol.* **146**, 451–467 (1981).
146. Chapman-Smith, A. & Cronan Jr, J. E. Molecular Biology of Biotin Attachment to Proteins. *J. Nutr.* **129**, 477S–484S (1999).
147. Cronan, J. E. Biotinylation of proteins *in vivo*. A post-translational modification to label, purify, and study proteins. *J. Biol. Chem.* **265**, 10327–33 (1990).
148. Kirkeby, S., Moe, D., Bøgg-Hansen, T. C. & van Noorden, C. J. Biotin carboxylases in mitochondria and the cytosol from skeletal and cardiac muscle as detected by avidin binding. *Histochemistry* **100**, 415–21 (1993).
149. Chandler, C. S. & Ballard, F. J. Multiple biotin-containing proteins in 3T3-L1 cells. *Biochem. J.* **237**, 123–130 (1986).
150. Schatz, P. J. Use of peptide libraries to map the substrate specificity of a peptide-modifying enzyme: a 13 residue consensus peptide specifies biotinylation in *Escherichia coli*. *Biotechnol. (Nature Publ. Company)* **11**, 1138–43 (1993).
151. Barat, B. & Wu, A. M. Metabolic biotinylation of recombinant antibody by biotin ligase retained in the endoplasmic reticulum. *Biomol. Eng.* **24**, 283–91 (2007).

152. de Boer, E. *et al.* Efficient biotinylation and single-step purification of tagged transcription factors in mammalian cells and transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 7480–5 (2003).
153. Viens, A., Mechold, U., Lehrmann, H., Harel-Bellan, A. & Ogryzko, V. Use of protein biotinylation *in vivo* for chromatin immunoprecipitation. *Anal. Biochem.* **325**, 68–76 (2004).
154. Roux, K. J., Kim, D. I., Raida, M. & Burke, B. A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **196**, 801–810 (2012).
155. Winandy, S., Wu, P. & Georgopoulos, K. A dominant mutation in the Ikaros gene leads to rapid development of leukemia and lymphoma. *Cell* **83**, 289–99 (1995).
156. Georgopoulos, K., Winandy, S. & Avitahl, N. The Role of the Ikaros gene in lymphocyte development and homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 155–176 (1997).
157. Fan, Y. & Lu, D. The Ikaros family of zinc-finger proteins. *Acta Pharm. Sin. B* **6**, 513–521 (2016).
158. Payne, M. A. Zinc finger structure-function in Ikaros. *World J. Biol. Chem.* **2**, 161–6 (2011).
159. Gopalakrishnan, R. *et al.* Immunomodulatory drugs target IKZF1-IRF4-MYC axis in primary effusion lymphoma in a cereblon-dependent manner and display synergistic cytotoxicity with BRD4 inhibitors. *Oncogene* **35**, 1797–810 (2016).
160. Krönke, J., Hurst, S. N. & Ebert, B. L. Lenalidomide induces degradation of IKZF1 and IKZF3. *Oncoimmunology* **3**, e941742 (2014).
161. Gandhi, R. *et al.* Activation of the aryl hydrocarbon receptor induces human type 1 regulatory T cell-like and Foxp3(+) regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **11**, 846–53 (2010).
162. Krönke, J. *et al.* Lenalidomide causes selective degradation of IKZF1 and IKZF3 in multiple myeloma cells. *Science* **343**, 301–5 (2014).
163. Quintana, F. J. *et al.* Aiolos promotes TH17 differentiation by directly silencing IL2 expression. *Nat. Immunol.* **13**, 770–7 (2012).
164. O’Brien, S. *et al.* Ikaros imposes a barrier to CD8+ T cell differentiation by restricting autocrine IL-2 production. *J. Immunol.* **192**, 5118–29 (2014).
165. Ochiai, K. *et al.* Zinc finger-IRF composite elements bound by Ikaros/IRF4 complexes function as gene repression in plasma cell. *Blood Adv.* **2**, 883–894 (2018).
166. Palacios, E. H. & Weiss, A. Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. *Oncogene* **23**, 7990–8000 (2004).
167. Sloan-Lancaster, J. *et al.* Regulation of ZAP-70 intracellular localization: visualization with the green fluorescent protein. *J. Exp. Med.* **186**, 1713–24 (1997).
168. Ishaq, M., DeGray, G. & Natarajan, V. Evidence for the involvement of tyrosine kinase ZAP 70 in nuclear retinoid receptor-dependent transactivation in T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **280**, 34152–8 (2005).
169. Ueda, A., Zhou, L. & Stein, P. L. Fyn promotes Th17 differentiation by regulating the kinetics of ROR γ t and Foxp3 expression. *J. Immunol.* **188**, 5247–56 (2012).
170. Zheng, S. G. Regulatory T cells vs Th17: differentiation of Th17 versus Treg, are the mutually exclusive? *Am. J. Clin. Exp. Immunol.* **2**, 94–106 (2013).
171. Wu, X. *et al.* Methylation of transcription factor YY2 regulates its transcriptional activity and cell proliferation. *Cell Discov.* **3**, 17035 (2017).

172. Hwang, S. S. *et al.* Transcription factor YY1 is essential for regulation of the Th2 cytokine locus and for Th2 cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 276–81 (2013).
173. Chen, L. *et al.* Genome-wide analysis of YY2 versus YY1 target genes. *Nucleic Acids Res.* **38**, 4011–4026 (2010).
174. Lee, S. H. *et al.* Yin-Yang 1 and Yin-Yang 2 exert opposing effects on the promoter activity of interleukin 4. *Arch. Pharm. Res.* **39**, 547–554 (2016).
175. Kao, P. N. *et al.* Cloning and expression of cyclosporin A- and FK506-sensitive nuclear factor of activated T-cells: NF45 and NF90. *J. Biol. Chem.* **269**, 20691–9 (1994).
176. Corthésy, B. & Kao, P. N. Purification by DNA affinity chromatography of two polypeptides that contact the NF-AT DNA binding site in the interleukin 2 promoter. *J. Biol. Chem.* **269**, 20682–90 (1994).
177. Perumal, N. B. & Kaplan, M. H. Regulating IL9 transcription in T helper cells. *Trends Immunol.* **32**, 146–50 (2011).
178. Jash, A. *et al.* Nuclear factor of activated T cells 1 (NFAT1)-induced permissive chromatin modification facilitates nuclear factor- κ B (NF- κ B)-mediated interleukin-9 (IL-9) transactivation. *J. Biol. Chem.* **287**, 15445–57 (2012).
179. Jia, A. *et al.* MBD2 Regulates Th17 Cell Differentiation and Experimental Severe Asthma by Affecting IRF4 Expression. *Mediators Inflamm.* **2017**, 1–10 (2017).
180. Zeng, Z. *et al.* Reduced MBD2 expression enhances airway inflammation in bronchial epithelium in COPD. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* **13**, 703–715 (2018).
181. Simicevic, J. & Deplancke, B. Transcription factor proteomics-Tools, applications, and challenges. *Proteomics* **17**, 1600317 (2017).
182. Maston, G. A., Evans, S. K. & Green, M. R. Transcriptional Regulatory Elements in the Human Genome. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **7**, 29–59 (2006).
183. Glasmacher, E. *et al.* A genomic regulatory element that directs assembly and function of immune-specific AP-1-IRF complexes. *Science* **338**, 975–80 (2012).
184. Brass, A. L., Zhu, A. Q. & Singh, H. Assembly requirements of PU.1-Pip (IRF-4) activator complexes: inhibiting function *in vivo* using fused dimers. *EMBO J.* **18**, 977 (1999).
185. Yoshida, T. & Georgopoulos, K. Ikaros fingers on lymphocyte differentiation. *Int. J. Hematol.* **100**, 220–9 (2014).
186. Sciammas, R. *et al.* Graded Expression of Interferon Regulatory Factor-4 Coordinates Isotype Switching with Plasma Cell Differentiation. *Immunity* **25**, 225–236 (2006).
187. Martins, G. & Calame, K. Regulation and Functions of Blimp-1 in T and B Lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 133–169 (2008).
188. Noelle, R. J. & Nowak, E. C. Cellular sources and immune functions of interleukin-9. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 683–7 (2010).
189. Chodosh, L. A. & Buratowski, S. Purification of DNA-Binding Proteins Using Biotin/Streptavidin Affinity Systems. in *Current Protocols in Protein Science* **12**, 9.7.1-9.7.13 (John Wiley & Sons, Inc., 1998).

9 Anlage

Vektorsequenz

```

1  ACGTGA TGGTCT CTGGTT GGGTAG GCCTGG GGTTAT TCCGAG GACAAA GTAAGG GTGTCA
61  TAGAAG AAAGTC AAGAGA GTAAGC TAGGTA CCGCAA ACCTGC ATGGCA GGGACA CAGGAC
121 CTGGAC AAGGGC TAGTCC ATGTGC CAGGTC CTTTTC GCCTGG GGCAGC CAGGGC AACCTA
181 AACCCA GGAAGG GGCAAG TGTAGA AACAGT GAGGGA AAAGTG GGATGA AAGCTA CTTGGA
241 TCCAGC ACAGAG GGACGA GTGAGC AAAGTG AGCGCC CCAGCG TGGCGC AAGACT TGGGAT
301 CTGCAG AGAAGC TGTGTA GCTAGG AGCTTT CAACGG AGCGTG TTAATG TAAATG TAAATG
361 AAGAAA TTACCT AATTTT TTTAAT AAAAGA AAGAAC AGACAG GCAAAA AAAAAA GGAGGA
421 GGAGGA GGAGGA GGAGGA GGATGG TGCGCC CCAAGG GATGCT CTCTAT ACCTTC GTCAAA
481 GTACCT TCTCTT GGGGGA CTTCGG AGACTC TGGCAC TGCACC CGAGCA COTTGG CAGCCT
541 CAGAGA CTCGGG GCCTCG TGGGCA CTGCAA GAGTTT GGGACG GGGCTT CCTCCC GCCTCC
601 AAAGTG ATGCGA AGGTAG TTGCAG GGAATG TGTGTC TCTCCT CAGCGC ACAAGC CCAGGA
661 GGAGGT CCGCAC GCGTCA TGTCCG GCCTGA ACGACA TCTTCG AGGCTC AGAAAA TCGAAT
721 GGCAGG AAGGCG CGCCGA GCTCGA GGAACT TGGAGA CGGGCA GCCGGG GCTCAG AGTTCC
781 GCATGA GCGCAG TGAGCT GCGGCA ATGGGA AACTCC GACAGT GGTTGA TCGACC AGATCG
841 ACAGCG GCAAGT ACCCCG GGCTGG TGTGGG AGAACG AGGAGA AGAGCG TCTTCC GCATCC
901 CGTGGG AACACG CGGGCA AGCAGG ACTACA ATCGTG AGGAGG ACGCTG CCCTCT TCAAGG
961 TTAGCA GCATTC AGGGAT CCCTGG GCAGGG GTGGGG GTGGGG ATGGGG AATCTG AAAGCT
1021 CTGAAT GTCTGT GGCTCC CGGGCA AGGGAC TAAGAG GTGGGC TCCTGC AAGGAG GAGGCC
1081 AGAGCA TCAAGC ATTGGA CCCTGC TTAGGC AAAGTC CCCAGG AGAAGG GAAAGA GGTTCG
1141 AAACTC TCCGGG GATTGC ATACAC AAGAAA CCAGGT CCCAAT ACTGTT TGTGTG GAGGAA
1201 AGAACT TCCAGC TTCAGG GGCATC TCTGGG GGACCG AGGTTC CGTTTG CATAGC CCATTC

```

Abbildung 9-1: Anlage 1 – Ausschnitt der Vektorsequenz des BAC RP23-206G12

Die Nukleotidsequenz zeigt einen Ausschnitt des zur Generierung der Mauslinie *Irf4*^{BirA-ES} verwendeten *Irf4*^{BirA-ES}-BAC. Die homologen Arme 5' und 3' sind jeweils in blau dargestellt, die Sequenz der BirA-ES ist in pink dargestellt.

Tabelle 9-1: Anlage 2 – Liste der mittels einer IRF4-Interaktompräzipitation (IntP) isolierten Proteine

Die Tabelle zeigt 137 Proteine, die mithilfe einer Biotin-vermittelten IRF4-IntP (siehe Abschnitt 3.13.4) aus Th9-Kernextrakten einer *Irf4*^{Bio}-Maus via Massenspektrometrie (siehe Kapitel 3.13.5) identifiziert werden konnten. Als Kontrolle wurden Th9-Kernextrakte einer WT^(BirA)-Maus verwendet.

| Protein | relative Proteinintensität WT ^(BirA) | relative Proteinintensität <i>Irf4</i> ^{Bio} | Log2 | Protein | relative Proteinintensität WT ^(BirA) | Relative Proteinintensität <i>Irf4</i> ^{Bio} | Log2 |
|-------------|---|---|-------|-------------|---|---|------|
| WDR43_MOUSE | 0 | 30429 | 18,22 | LCK_MOUSE | 8685 | 21779 | 1,33 |
| SF3B6_MOUSE | 0 | 17428 | 17,41 | LMNA_MOUSE | 8729 | 21515 | 1,30 |
| HA11_MOUSE | 0 | 17392 | 17,41 | 1433F_MOUSE | 3597 | 8853 | 1,30 |
| AT2A1_MOUSE | 0 | 11812 | 16,85 | SPF45_MOUSE | 9037 | 21997 | 1,28 |
| ZAP70_MOUSE | 0 | 11255 | 16,78 | NUMA1_MOUSE | 9470 | 23006 | 1,28 |
| NOP53_MOUSE | 0 | 10684 | 16,71 | API5_MOUSE | 3158 | 7641 | 1,27 |
| IF2H_MOUSE | 0 | 10511 | 16,68 | ADT1_MOUSE | 3920 | 9486 | 1,27 |
| 1433T_MOUSE | 0 | 9260 | 16,50 | NCBP3_MOUSE | 6853 | 16534 | 1,27 |
| RFC2_MOUSE | 0 | 7248 | 16,15 | KIFC1_MOUSE | 7109 | 17040 | 1,26 |
| AINX_MOUSE | 0 | 7207 | 16,14 | REQU_MOUSE | 3788 | 9011 | 1,25 |
| FYN_MOUSE | 0 | 6201 | 15,92 | SRP54_MOUSE | 5468 | 13005 | 1,25 |
| 1433B_MOUSE | 0 | 5534 | 15,76 | U5S1_MOUSE | 29939 | 71158 | 1,25 |
| VAPB_MOUSE | 0 | 4568 | 15,48 | RFC1_MOUSE | 5380 | 12782 | 1,25 |
| ENOB_MOUSE | 0 | 3374 | 15,04 | SMRD2_MOUSE | 5902 | 13954 | 1,24 |
| HA1Q_MOUSE | 0 | 2600 | 14,67 | EZH2_MOUSE | 7951 | 18766 | 1,24 |
| MACF1_MOUSE | 0 | 1574 | 13,94 | SMC3_MOUSE | 12514 | 29258 | 1,23 |
| HA17_MOUSE | 0 | 1515 | 13,89 | RFC3_MOUSE | 6919 | 15981 | 1,21 |
| NUP85_MOUSE | 1879 | 19210 | 3,35 | SRRM2_MOUSE | 51449 | 118557 | 1,20 |
| NFM_MOUSE | 3177 | 28812 | 3,18 | KHDR1_MOUSE | 23087 | 53151 | 1,20 |
| TBA1B_MOUSE | 12758 | 99772 | 2,97 | FIP1_MOUSE | 11711 | 26696 | 1,19 |
| IRF4_MOUSE | 21834 | 139107 | 2,67 | GIMA4_MOUSE | 11782 | 26848 | 1,19 |
| SRSF4_MOUSE | 1687 | 8989 | 2,41 | PRS6B_MOUSE | 15598 | 35397 | 1,18 |
| MBNL1_MOUSE | 13558 | 66145 | 2,29 | PLEC_MOUSE | 31084 | 70384 | 1,18 |
| TYY2_MOUSE | 2262 | 10682 | 2,24 | RBP2_MOUSE | 15061 | 34016 | 1,18 |
| GDIR1_MOUSE | 14773 | 68478 | 2,21 | UHRF1_MOUSE | 15275 | 34497 | 1,18 |
| HELLS_MOUSE | 2735 | 11468 | 2,07 | WDR3_MOUSE | 8117 | 18280 | 1,17 |
| CASP8_MOUSE | 3036 | 12389 | 2,03 | EXOS9_MOUSE | 6380 | 14344 | 1,17 |
| PML_MOUSE | 8189 | 32625 | 1,99 | ACINU_MOUSE | 21449 | 48052 | 1,16 |
| CPSF7_MOUSE | 2300 | 8965 | 1,96 | IKZF3_MOUSE | 9584 | 21449 | 1,16 |
| NOP14_MOUSE | 2837 | 10630 | 1,91 | MBB1A_MOUSE | 49097 | 109866 | 1,16 |
| BRX1_MOUSE | 1896 | 6876 | 1,86 | SCOT1_MOUSE | 6909 | 15370 | 1,15 |
| RBM28_MOUSE | 3459 | 12437 | 1,85 | ZCCHV_MOUSE | 6607 | 14601 | 1,14 |
| NUP50_MOUSE | 3394 | 11938 | 1,81 | SNF5_MOUSE | 10059 | 22198 | 1,14 |
| SYNE1_MOUSE | 10489 | 36733 | 1,81 | RBBP7_MOUSE | 18819 | 41415 | 1,14 |
| CAP1_MOUSE | 6841 | 23443 | 1,78 | ERLN2_MOUSE | 5144 | 11301 | 1,14 |
| MIC27_MOUSE | 1752 | 5943 | 1,76 | ANXA6_MOUSE | 4427 | 9697 | 1,13 |
| SP110_MOUSE | 9070 | 30764 | 1,76 | DDX4_MOUSE | 9710 | 21236 | 1,13 |
| PGAM5_MOUSE | 3156 | 10443 | 1,73 | NAT10_MOUSE | 7611 | 16626 | 1,13 |
| SF3A3_MOUSE | 12689 | 41571 | 1,71 | RRBP1_MOUSE | 8022 | 17521 | 1,13 |
| DDX50_MOUSE | 1772 | 5740 | 1,70 | SF3A1_MOUSE | 12151 | 26440 | 1,12 |

| | | | | | | | |
|-------------|-------|-------|------|-------------|-------|--------|------|
| DDX3Y_MOUSE | 1158 | 3708 | 1,68 | CDK9_MOUSE | 2533 | 5498 | 1,12 |
| DDX24_MOUSE | 7445 | 23336 | 1,65 | NOP56_MOUSE | 49676 | 107582 | 1,11 |
| ARF5_MOUSE | 6357 | 19736 | 1,63 | WDR61_MOUSE | 8475 | 18283 | 1,11 |
| TPM3_MOUSE | 24849 | 76776 | 1,63 | P66B_MOUSE | 10837 | 23274 | 1,10 |
| IKZF1_MOUSE | 8977 | 27486 | 1,61 | NVL_MOUSE | 10160 | 21774 | 1,10 |
| NUP98_MOUSE | 5853 | 17788 | 1,60 | PR40A_MOUSE | 14119 | 30236 | 1,10 |
| ZFR_MOUSE | 4171 | 12649 | 1,60 | NU155_MOUSE | 16595 | 35487 | 1,10 |
| CAPG_MOUSE | 6819 | 20327 | 1,58 | SUN2_MOUSE | 8816 | 18812 | 1,09 |
| P66A_MOUSE | 7594 | 22563 | 1,57 | SP16H_MOUSE | 9069 | 19311 | 1,09 |
| DHE3_MOUSE | 6000 | 17818 | 1,57 | CND2_MOUSE | 7221 | 15320 | 1,09 |
| KIF2C_MOUSE | 3583 | 10499 | 1,55 | PRP6_MOUSE | 11560 | 24504 | 1,08 |
| PESC_MOUSE | 10341 | 29779 | 1,53 | NHP2_MOUSE | 4575 | 9695 | 1,08 |
| RU17_MOUSE | 11594 | 33204 | 1,52 | DC1L1_MOUSE | 7531 | 15944 | 1,08 |
| SON_MOUSE | 9649 | 27342 | 1,50 | MTREX_MOUSE | 9179 | 19394 | 1,08 |
| UTP18_MOUSE | 8646 | 24239 | 1,49 | IMP3_MOUSE | 12813 | 26616 | 1,05 |
| BAZ1A_MOUSE | 4980 | 13889 | 1,48 | BCLF1_MOUSE | 10768 | 22366 | 1,05 |
| PDIP3_MOUSE | 9467 | 26324 | 1,48 | LUC7L_MOUSE | 8461 | 17545 | 1,05 |
| ILF2_MOUSE | 8758 | 23863 | 1,45 | IF6_MOUSE | 24199 | 50045 | 1,05 |
| IFM3_MOUSE | 2472 | 6724 | 1,44 | AT2A3_MOUSE | 14193 | 29105 | 1,04 |
| GAPR1_MOUSE | 16844 | 45431 | 1,43 | U2AF1_MOUSE | 28153 | 57694 | 1,04 |
| DTX3L_MOUSE | 5288 | 14030 | 1,41 | HINT1_MOUSE | 32183 | 65825 | 1,03 |
| SP100_MOUSE | 5114 | 13467 | 1,40 | CDC5L_MOUSE | 14883 | 30439 | 1,03 |
| TCOF_MOUSE | 10972 | 28835 | 1,39 | SF3B1_MOUSE | 18946 | 38677 | 1,03 |
| EXOS1_MOUSE | 5416 | 14102 | 1,38 | NUP54_MOUSE | 6900 | 14032 | 1,02 |
| SPB1_MOUSE | 12062 | 31205 | 1,37 | MD1L1_MOUSE | 6709 | 13576 | 1,02 |
| CBX5_MOUSE | 5663 | 14333 | 1,34 | GBB1_MOUSE | 7768 | 15658 | 1,01 |
| NUSAP_MOUSE | 6728 | 17016 | 1,34 | RBM14_MOUSE | 36368 | 72967 | 1,00 |
| SRRT_MOUSE | 9565 | 24113 | 1,33 | DDX42_MOUSE | 5655 | 11332 | 1,00 |

Tabelle 9-2: Anlage 3 – Genontologie (GO) des Proteinintergrunds nach einer Biotin-vermittelten IRF4-Interaktompräzipitation (IntP)

Mithilfe der Software „STRING“ (Version 11.0; <https://string-db.org>; Szklarczyk et al.¹²⁶) wurde eine GO-Analyse mit Proteinen, die unspezifisch ($\text{Log}_2(\text{Irf4}^{\text{Bio}}/\text{WT}^{\text{BirA}}) < 1$) über die IRF4-IntP aus *Irf4*^{Bio}-Th9-Zellen isoliert und mittels Massenspektrometrie identifiziert werden konnten, durchgeführt. FDR = Falscherkennungsrate (*false discovery rate*; gibt die Wahrscheinlichkeit falsch-positiver Vorhersagen an)

| Genontologie (GO) | Anzahl Proteine | FDR |
|---|-----------------|---------------|
| Spleißosom | 69 | $4,99e^{-44}$ |
| Ribosom | 67 | $1,05e^{-42}$ |
| RNA Transport | 43 | $1,35e^{-17}$ |
| Kohlenhydrat Metabolismus | 31 | $1,17e^{-12}$ |
| Proteinprozessierung im Endoplasmatischen Retikulum | 33 | $5,48e^{-11}$ |

Danksagung

Curriculum Vitae