

Aus der Klinik und Poliklinik für Hämatologie und Onkologie  
(Direktor Univ.-Prof. Dr. med. Florian Heidel)  
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

**Veränderungen der Genexpression  
bei murinen CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten  
nach Verlust von Bcl11b  
auf Transkriptionsebene**

Inaugural - Dissertation  
zur

Erlangung des akademischen  
Grades

Doktor der Medizin  
(Dr. med.)

der  
Universitätsmedizin  
der  
Universität Greifswald

2021

vorgelegt von:  
Jette Maaß  
geb. am: 30. März 1996  
in: Rostock

Dekan:	Prof. Dr. Karlhans Endlich
1. Gutachter:	Prof. Dr. Christian A. Schmidt
2. Gutachterin:	Prof. Dr. Il-Kang Na
Ort, Raum:	Videokonferenz (online)
Tag der Disputation:	30.03.2022

# Inhaltsverzeichnis

<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>VII</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>X</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 CD8 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten.....	1
1.1.1 Entwicklung .....	1
1.1.2 Funktion und Eigenschaften.....	3
1.1.3 Aktivierung und Gedächtniszellbildung .....	4
1.1.4 Apoptose von T-Zellen .....	6
1.1.5 CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen in der Antitumorthherapie .....	7
1.2 Natürliche Killerzellen.....	9
1.2.1 Entwicklung .....	9
1.2.2 Funktion und Eigenschaften.....	10
1.2.3 Aktivierung .....	11
1.2.4 Adaptive Merkmale von NK-Zellen .....	13
1.2.5 NK-Zellen in der Antitumorthherapie .....	14
1.3 Bcl11b.....	15
1.3.1 Vorkommen und Struktur .....	15
1.3.2 Funktion als Transkriptionsfaktor in T-Zellen.....	16
1.3.3 Regulation der <i>Bcl11b</i> -Expression .....	19
1.3.4 Einfluss auf Apoptose und Zellzyklus.....	20
1.3.5 Einfluss auf Tumorgenese.....	21
1.4 Konditioneller Knockout von <i>Bcl11b</i> .....	22
1.5 ITNK.....	23
1.5.1 Begriffserklärung und Eigenschaften .....	23
1.5.2 Genexpressionsprofil.....	24
1.5.3 Fähigkeit zur Tumorreduktion und Potential in der Antitumorthherapie...	25
1.6 Zielstellung der Arbeit .....	26

<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>27</b>
2.1	Material .....	27
2.1.1	Geräte .....	27
2.1.2	Gebrauchsmaterialien .....	28
2.1.3	Verbrauchsmaterialien .....	28
2.1.4	Chemikalien .....	29
2.1.5	Zellkulturmedium.....	29
2.1.6	Puffer.....	30
2.1.7	Polymerasen .....	30
2.1.8	Reaktionskits.....	31
2.1.9	Primer.....	32
2.1.10	Antikörper.....	33
2.1.11	Software und Internetdatenbanken .....	33
2.2	Methodischer Aufbau der Versuchsreihe .....	34
2.3	Mäusestamm und Genotypisierung.....	35
2.4	DNA-Isolation aus Gewebebiopsien.....	35
2.5	Isolation von CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen aus Lymphknoten .....	36
2.6	Zellkultur.....	37
2.7	Knockout durch Behandlung mit 4-Hydroxytamoxifen.....	37
2.8	Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Paque .....	38
2.9	Durchflusszytometrie.....	38
2.9.1	Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität.....	38
2.9.2	Bestimmung von Zelloberflächenmarkern .....	39
2.10	Isolation der RNA .....	39
2.11	RNA-Sequenzierung .....	40
2.12	Synthese der komplementären DNA.....	40
2.13	Quantitative Polymerasekettenreaktion.....	41
2.14	Klassische Polymerasekettenreaktion.....	42
2.15	Agarose-Gelelektrophorese .....	43
2.16	Extraktion von DNA aus dem Agarosegel .....	44
2.17	Proteinisolation.....	44
2.18	Bicinchoninsäure-Assay .....	45
2.19	SDS-Page, Western Blot und Immundetektion .....	45

2.20	Statistische Analyse und Darstellung der Ergebnisse .....	47
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>48</b>
3.1	Einführung in die Versuchsgruppen .....	48
3.2	Knockout von <i>Bcl11b</i> .....	49
3.2.1	<i>Bcl11b</i> -Knockouteffizienz auf Transkriptionsebene.....	49
3.2.2	<i>Bcl11b</i> -Proteinexpression nach <i>Bcl11b</i> -Knockout.....	50
3.2.3	Pervasive Transkription stromabwärts des <i>Bcl11b</i> -Gens .....	51
3.3	Transkriptionsprogramm von <i>Bcl11b</i> -Knockoutzellen .....	53
3.3.1	RNA-Sequenzierung von <i>Bcl11b</i> -Knockoutzellen .....	53
3.3.2	T- und NK-Zell-assoziierte Genexpression im Vergleich zur Literatur ...	55
3.4	Einfluss des <i>Bcl11b</i> -Knockouts auf T- und NK-Zell-assoziierte Oberflächenmarker und Signalmoleküle .....	58
3.4.1	T-Zell-Rezeptor-Komplex und T-Zell-Differenzierungsmerkmale .....	58
3.4.2	NK-Zell-Rezeptoren und Dynamik der Merkmalsakquisition .....	60
3.4.3	Signalmoleküle .....	64
3.4.4	Effektormoleküle .....	67
3.5	Erhöhter Zelluntergang bei <i>Bcl11b</i> -Knockoutzellen .....	69
3.5.1	Reduzierte Zellvitalität in der <i>Bcl11b</i> -Knockout-Kultur .....	69
3.5.2	RNA-Expression apoptoseassoziiierter Faktoren.....	70
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>71</b>
4.1	Differentielle Genexpression in <i>Bcl11b</i> -Knockoutzellen .....	71
4.1.1	Zusammenhang von RNA-Expression und Proteinexpression.....	71
4.1.2	Transkriptionelle Unterschiede bei <i>Bcl11b</i> -Verlust in verschiedenen Stadien der T-Zell-Entwicklung .....	73
4.1.3	Beibehaltung von T-Zell-Merkmalen bei Akquisition von NK-Zell- Merkmalen .....	74
4.1.4	NK-Zell-Rezeptoren .....	75
4.1.5	Adapterproteine.....	77
4.1.6	Effektormoleküle .....	79
4.1.7	Interferon-regulierte Moleküle .....	79
4.2	<i>Bcl11b</i> -Knockout induziert pervasive Transkription.....	81

4.3	Verringerte Überlebenszeit von <i>Bcl11b</i> -Knockoutzellen .....	83
4.4	Kritische Auseinandersetzung mit den ermittelten Daten .....	85
4.5	Bedeutung der Ergebnisse und weiterführende Überlegungen.....	86
	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>89</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>90</b>
	<b>Anhang</b> .....	<b>123</b>

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Expression von Oberflächenmarkern in den Stadien der NK-Zell-Entwicklung .....	9
Tabelle 2:	Einteilung der in der Arbeit verwendeten Experimental- und Kontrollgruppen .....	48
Tabelle 3:	<i>GO Enrichment Analysis</i> von Bcl11b-regulierten Genen .....	55
Tabelle 4:	Vergleich von veröffentlichten wissenschaftlichen Arbeiten bezüglich ihrer Verfahren der Generierung Bcl11b-defizienter T-Zellen und konsekutiver Genexpressionsanalysen .....	56
Tabelle 5:	Vergleich von veröffentlichten wissenschaftlichen Arbeiten und der vorliegenden Arbeit bezüglich der Genexpression von T- und NK-Zell-assoziierten Molekülen in Bcl11b-defizienten T-Zellen und ihren Vorstufen .....	57
Tabelle 6:	Liste von Genen mit verstärkter oder verminderter RNA-Expression in <i>Bcl11b</i> -Knockoutzellen .....	123

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Aufführung der Materialtabellen im Tabellenverzeichnis verzichtet.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Hochregulation von <i>Bcl11b</i> in der frühen T-Zell-Entwicklung .....	1
Abbildung 2:	Schematische Abbildung des T-Zell-Rezeptorkomplexes .....	5
Abbildung 3:	Schematische Struktur der <i>Bcl11b</i> -Gensequenz.....	16
Abbildung 4:	RNA-Expression von <i>Bcl11b</i> in <i>Bcl11b</i> -Knockoutzellen und Kontrollgruppen .....	49
Abbildung 5:	Verhältnis der <i>Bcl11b</i> -RNA-Expression von <i>Bcl11b</i> -Knockoutzellen zur Kontrollgruppe .....	50
Abbildung 6:	<i>Bcl11b</i> -Proteinexpression in <i>Bcl11b</i> -Knockoutzellen und Kontrollgruppen.....	51
Abbildung 7:	Pervasive RNA-Transkription stromabwärts von <i>Bcl11b</i> in murinen CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen mit und ohne <i>Bcl11b</i> -Knockout.....	52
Abbildung 8:	RNA-Expression von <i>Peak 1</i> und <i>3</i> in <i>Bcl11b</i> -Knockoutzellen und Kontrollgruppen.....	53
Abbildung 9:	Verhältnis der <i>Trbc-</i> , <i>CD3e-</i> und <i>CD247</i> -RNA-Expression von <i>Bcl11b</i> -Knockoutzellen zur Kontrollgruppe.....	58
Abbildung 10:	Verhältnis der <i>Ccr7-</i> und <i>CD44</i> -RNA-Expression von <i>Bcl11b</i> -Knockoutzellen zur Kontrollgruppe.....	60
Abbildung 11:	RNA-Expression von <i>Ncr1</i> in <i>Bcl11b</i> -Knockoutzellen und Kontrollgruppen.....	61
Abbildung 12:	Verhältnis der RNA- und Proteinexpression von <i>Ncr1</i> /NKp46 von <i>Bcl11b</i> -Knockoutzellen zur Kontrollgruppe.....	62
Abbildung 13:	RNA-Expression von <i>Fcgr3</i> in <i>Bcl11b</i> -Knockoutzellen und Kontrollgruppen.....	63
Abbildung 14:	Weitere NK-Zell-Rezeptoren mit veränderter Gentranskription in <i>Bcl11b</i> -Knockoutzellen.....	65
Abbildung 15:	RNA-Expression von <i>Dap12</i> in <i>Bcl11b</i> -Knockoutzellen und Kontrollgruppen.....	65
Abbildung 16:	RNA-Expression von <i>Fcer1g</i> in <i>Bcl11b</i> -Knockoutzellen und Kontrollgruppen.....	66
Abbildung 17:	RNA-Expression von <i>CD247</i> in <i>Bcl11b</i> -Knockoutzellen und Kontrollgruppen.....	66



Abbildung 18: Verhältnis der <i>Gzmc</i> - und <i>Prf1</i> -RNA-Expression von <i>Bcl11b</i> -Knockoutzellen zur Kontrollgruppe.....	68
Abbildung 19: Zellvitalität von <i>Bcl11b</i> -Knockoutzellen und Kontrollgruppen im zeitlichen Verlauf .....	69
Abbildung 20: Verhältnis der RNA-Expression apoptosebeeinflussender Faktoren von <i>Bcl11b</i> -Knockoutzellen zur Kontrollgruppe .....	70

## Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	Aminoactinomycin D
ACAD	Activated cell autonomous death
ADCC	Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität
AICD	Activation induced cell death
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl11b	B-cell leukemia/lymphoma 11b
Bcl2	B-cell lymphoma 2
BclxL	B-cell lymphoma extra large
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CAR	Chimärer Antigenrezeptor
Ccr	CC-Motiv-Chemokinrezeptor
CLP	Common lymphoid progenitor
Coup-TF	Chicken ovalbumin upstream promotor transcription factor
Dap12	DNAX activating protein of 12 kDa
DN	Doppelt negativ (Stadium der T-Zell-Entwicklung)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
DoG	Downstream of gene containing transcript
DP	Doppelt positiv (Stadium der T-Zell-Entwicklung)
FBS	Fetal bovine serum (Fetales Kälberserum)
FCγRIII (Fcγr3)	Fcγ-Rezeptor III
FCεRIγ (Fcer1g)	Fcε-Rezeptor-I-γ-Untereinheit
IFN(-R)	Interferon(-Rezeptor)
IL(-R)	Interleukin(-Rezeptor)
ILC	Innate lymphoide Zellen
IRF	Interferon-regulatorischer Faktor
ISG	Interferon-stimuliertes Gen
ISGF3	Interferon stimulated gene factor 3
ITAM	Immunrezeptor-Tyrosin-basierte aktivierende Motive
ITIM	Immunrezeptor-Tyrosin-basierte inhibitorische Motive
ITNK	Induced T-to-natural-killer cells
LAK	Lymphokine-activated killer cells

MHC(-I/II)	Major histocompatibility complex (der Klasse I/II)
mRNA	Messenger RNA
Ncr1	Natural cytotoxicity triggering receptor 1
NKP	Natural killer precursor
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
OHT bzw. 4-OHT	Hydroxytamoxifen bzw. 4-Hydroxytamoxifen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
siRNA	Small interfering RNA
T-ALL	Akute lymphatische Leukämie der T-Zellen
TBE	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Borat-Ethylendiamin-tetraessigsäure
TBS(T)	Tris-gepufferte Salzlösung (mit Tween)
TH(1/2)-Zellen	T-Helferzellen (der Subgruppe 1/2)
TNF	Tumornekrosefaktor
Trail	Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand
TZR	T-Zell-Rezeptor
qPCR	Quantitative PCR
Wt	Wildtyp

Englische Begriffe finden kursiv hervorgehoben Verwendung, wenn keine gebräuchliche deutsche Übersetzung vorhanden ist. In Fällen, in denen es angemessen erschien, wurden englische Abkürzungen mit deutschen Begriffen beschrieben.

Entsprechend der Nomenklatur wissenschaftlicher Arbeiten wurden Gene im Vergleich zum entsprechenden Protein kursiv geschrieben (z.B. Gen *Bcl11b* und Protein Bcl11b). Humane Gen- und Proteinamen stehen im Gegensatz zum murinen Pendant in Versalschrift (z.B. BCL11B in humanen Zellen und Bcl11b in murinen Zellen).

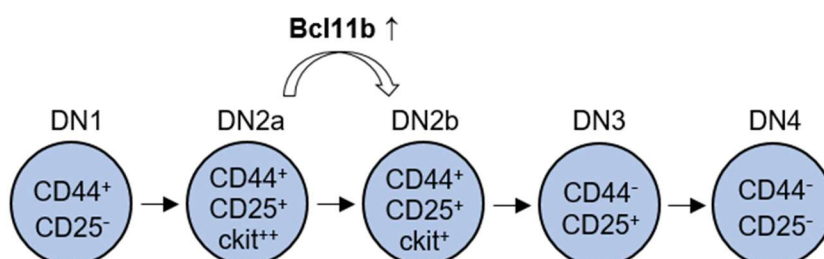
Gene wurden im Text und Abkürzungsverzeichnis nur mit vollständigem Gennamen aufgeführt, wenn dieser für den inhaltlichen Zusammenhang der Arbeit relevant war oder wenn das Gen genauer untersucht wurde. In diesen Fällen erfolgt die Erstnennung zur besseren Lesbarkeit oft erst im Diskussionsteil.

# 1 Einleitung

## 1.1 CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten

### 1.1.1 Entwicklung

Die Hämatopoese beschreibt die Entwicklung aller Arten von Blutzellen durch Zellteilung und Differenzierung, ausgehend von multipotenten CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark (Civin et al. 1984; Andrews et al. 1989). Früh erfolgt die Differenzierung in eine myeloische und eine lymphoide Zellreihe. Während Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten und Myelozyten von gemeinsamen myeloischen Vorläuferzellen abstammen, gehen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und andere Lymphozyten aus gemeinsamen lymphoiden Vorläuferzellen, den *Common lymphoid progenitors* (CLP), hervor (Kondo et al. 1997). Zur T-Zell-Entwicklung wandern lymphoide Vorstufen aus dem Knochenmark in den Thymus. Es handelt sich nicht nur um CLP, sondern auch um weniger differenzierte Vorstufen, welche noch myeloisches Potential besitzen (Bell und Bhandoola 2008). Die Migration in den Thymus wird u.a. durch die CC-Motiv-Chemokin-Rezeptoren 7 und 9 (Ccr7 und Ccr9) gesteuert (Zlotoff et al. 2010). Im Thymus angelangte frühe Vorstufen sind doppelt negative (DN) Zellen, welche weder CD8 noch CD4 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Vier Stadien doppelt negativer T-Zell-Vorstufen (DN1–4) werden auf Grundlage ihrer CD44- und CD25-Expression charakterisiert: DN1 (CD44<sup>+</sup>, CD25<sup>-</sup>), DN2 (CD44<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>), DN3 (CD44<sup>-</sup>, CD25<sup>+</sup>) und DN4 (CD44<sup>-</sup>, CD25<sup>-</sup>). (Godfrey et al. 1993) Das DN2-Stadium lässt sich in Abhängigkeit von der c-Kit-Expression in die Stadien DN2a (c-Kit<sup>++</sup>) und DN2b (c-Kit<sup>+</sup>) unterteilen (Rothenberg 2011). Der Übergang vom DN2a- zum DN2b-Stadium wird von der Hochregulation des Transkriptionsfaktors *B-cell leukemia/lymphoma 11b* (Bcl11b; siehe Abbildung 1) und dem Verlust des Potentials zur Differenzierung zu myeloischen Zellen und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) begleitet (Bell und Bhandoola 2008; Kueh et al. 2016).



**Abbildung 1: Hochregulation von Bcl11b in der frühen T-Zell-Entwicklung**

Quelle: Eigene Darstellung nach Text von Godfrey et al. 1993; Rothenberg 2011; Kueh et al. 2016

Für das Erlangen der T-Zell-Identität und die Differenzierung in T-Zell-Subgruppen ist die Hoch- oder Herunterregulation zahlreicher interagierender Transkriptionsfaktoren in verschiedenen Stadien der T-Zell-Entwicklung erforderlich. In T-Vorläuferzellen früher Stadien spielt dabei die Signaltransduktion an Notch-Rezeptoren eine entscheidende Rolle, welche durch Notch-Liganden wie Dll4 auf Thymusepithelzellen stimuliert werden (Schmitt et al. 2004). Notch-Signale fördern die Entwicklung von T-Zellen statt B-Zellen aus lymphoiden Vorläuferzellen und regulieren mehrere Kerntranskriptionsfaktoren der frühen T-Zell-Entwicklung (Han et al. 2002; Yui und Rothenberg 2014). So werden Tcf-1 und Gata3 im DN1-Stadium sowie Bcl11b im DN2a-Stadium induziert (Weber et al. 2011; Kueh et al. 2016). Gata3 ist sowohl für die Entwicklung von doppelt negativen T-Zellvorstufen als auch für die spätere Entwicklung von TH2-Zellen unerlässlich (Ting et al. 1996; Zhang et al. 1997). Um die spezifische Entwicklung von Vorläufer- zu T-Zellen einzuleiten, wird zum einen die Hochregulation des für die T-Zell-Linie spezifischen Transkriptionsfaktors Bcl11b benötigt, welcher die Transkription NK-Zell-assoziiierter Gene verwehrt und die Expression T-Zell-spezifischer Gene induziert, siehe auch Kapitel 1.3.2 (Li 2010). Zum anderen ist die Herunterregulation des Transkriptionsfaktors Pu.1 erforderlich, womit myeloisches Zellpotential unterdrückt wird (Rosenbauer et al. 2006; Longabaugh et al. 2017). Zu weiteren bedeutsamen Transkriptionsfaktoren der T-Zell-Entwicklung zählen Hes1, Runx1 und E2a-Heb (Tomita et al. 1999; Jones und Zhuang 2007; Egawa et al. 2007; Bain et al. 1997).

Im weiteren Verlauf der T-Zell-Entwicklung findet die V(D)J-Genrekombination statt, deren Ergebnis die Expression eines von T-Zelle zu T-Zelle unterschiedlichen antigenspezifischen T-Zell-Rezeptors (TZR) ist. Dieser besteht aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit. Parallel zum Übergang zum DN3-Stadium findet die Rekombination des für die  $\beta$ -Untereinheit kodierenden Gens statt, während die  $\alpha$ -Untereinheit zunächst als invarianter Vorläufer besteht (Godfrey et al. 1993). Mit Expression dieses Prä-TZR ist die Entwicklung zum Stadium doppelt positiver (DP) Zellen möglich. DP-Zellen exprimieren sowohl CD4 als auch CD8 auf ihrer Oberfläche und können auch das Gen der TZR- $\alpha$ -Untereinheit erfolgreich rekombinieren. Das Vorhandensein des funktionsfähigen TZR und seiner Korezeptoren CD4 bzw. CD8 ermöglicht die Interaktion mit antigenpräsentierenden Molekülen des *Major histocompatibility complex* (MHC) auf Thymusepithelzellen. Ist diese Interaktion vorhanden, werden die Zellen positiv selektiert. Ccr7-vermittelt gelangen sie in die Markregion des Thymus. Dort erfolgt die negative Selektion von Zellen, die zu stark auf MHC-Moleküle der

Klasse I (MHC-I) ansprechen. Während mehr als 95 % der Zellen bei den Selektionsprozessen zugrunde gehen, erreichen die verbliebenen T-Lymphozyten zentrale Toleranz. Schließlich werden aus DP-Zellen einfach positive Zellen, welche entweder CD4 oder CD8 auf der Oberfläche tragen. (Takahama 2006) Dabei wurde Thpok (Zbtb7) als hauptsächlich verantwortlicher Transkriptionsfaktor für die Entwicklung zu CD4<sup>+</sup>-T-Zellen identifiziert, während Runx1 und Runx3 die CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Entwicklung fördern (He et al. 2005; Sato et al. 2005; Setoguchi et al. 2008). Einfach positive T-Zellen können aus dem Thymus emigrieren und zwischen peripherem Blut und sekundär lymphatischen Organen rezirkulieren (Takahama 2006). Der Anteil der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen an allen peripheren Blutlymphozyten steigt bis zur Adoleszenz auf etwa 26 % (Shearer et al. 2003).

CD8<sup>+</sup>-T-Zellen vermögen verdächtige Zellen direkt zu vernichten. Ihre Funktionsweise wird im nachfolgenden Kapitel beschrieben. CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, auch T-Helferzellen (TH-Zellen) genannt, haben hingegen vorrangig indirekte Effekte auf die Immunabwehr. Sie binden mit dem TZR und ihrem Korezeptor CD4 an MHC-Moleküle der Klasse II (MHC-II). Diese sind nur auf professionell antigenpräsentierenden Zellen wie Dendritischen Zellen und Makrophagen konstitutiv exprimiert. Die Immunabwehr der T-Helferzellen basiert auf der Sekretion von Zytokinen, welche z.B. B-Zellen und Makrophagen aktivieren und Immunantworten vielfältig modulieren. In Abhängigkeit der sezernierten Zytokine werden sie in Subtypen eingeteilt, u.a. TH1-, TH2-, TH17- und regulatorische T-Zellen. (Zhu und Paul 2008)

### **1.1.2 Funktion und Eigenschaften**

CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten, auch als CD8<sup>+</sup>-T-Zellen oder zytotoxische T-Zellen bezeichnet, stellen als eine Gruppe der Leukozyten einen wichtigen Teil der Immunabwehr des Körpers dar. Sie sezernieren zytolytische und apoptoseinduzierende Substanzen zur Elimination von Zellen, welche mit Viren oder intrazellulären Bakterien befallen sind oder neoplastische Veränderungen aufzeigen (Andersen et al. 2006). Des Weiteren können CD8<sup>+</sup>-T-Zellen Hypersensitivitätsreaktionen vom Typ 4 wie die Kontaktdermatitis, Autoimmunkrankheiten wie Diabetes mellitus Typ 1 und Multiple Sklerose sowie Transplantatabstoßungen vermitteln (Strom et al. 1975; Huseby et al. 2001; Girololoni et al. 2004; Wong et al. 2007). Die Abwehrfunktion der CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten erfolgt antigenspezifisch. Sie wird durch die Exposition mit einem Antigen induziert, welches an einen antigenspezifischen TZR bindet. Nach erfolgreicher Bekämpfung von veränderten Zellen bleibt aus einem Pool von

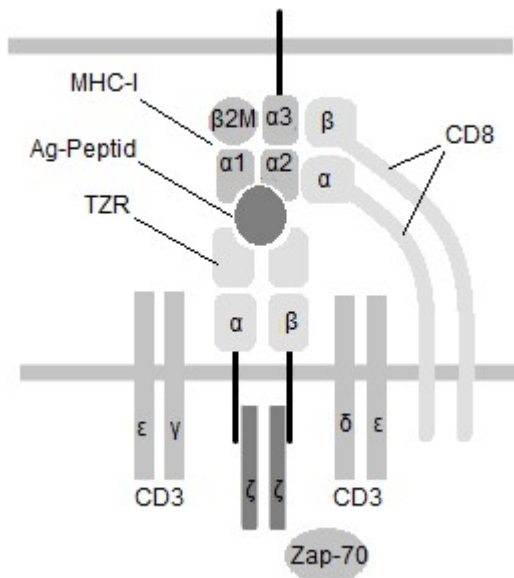
Effektorzellen ein kleiner Teil von langlebigen, antigenspezifischen Gedächtnis-T-Zellen bestehen. Dies erlaubt bei erneuter Exposition gegenüber dem entsprechenden Antigen eine schnellere und ausgeprägtere Proliferation, wodurch die Effizienz der Immunantwort gesteigert wird. Aufgrund dieser Funktionseigenschaften gehören CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten wie CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten und B-Lymphozyten, jeweils mit Ausnahmen (Bendelac et al. 2001), zum adaptiven bzw. erworbenen Immunsystem. (Andersen et al. 2006)

Zu den Haupteffektoren der CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten zählen die Exozytose von präformierten Lysosomen mit Perforinen und Granzymen, die Sekretion von Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) sowie die Expression des Fas-Liganden (Andersen et al. 2006). Perforine bilden Poren in der Zielzellmembran (Henkart et al. 1984; Podack et al. 1985). Granzyme gelangen durch die Perforinporen oder alternative Mechanismen in die Zelle und leiten mittels Caspaseaktivierung und Schädigung der Desoxyribonukleinsäure (DNA) die Apoptose ein (Darmon et al. 1995; Gu et al. 1996; Fan et al. 2003; Trambas und Griffiths 2003). Sezernierter TNF- $\alpha$  und der membrangebundene Fas-Ligand binden auf der Oberfläche der Zielzellen an sogenannte Todesrezeptoren aus der TNF- $\alpha$ -Rezeptor-Familie und initiieren dadurch den Zelltod (Guicciardi und Gores 2009). IFN- $\gamma$  verstärkt die Expression von MHC-I und Fas in der Zielzelle (Mullbacher et al. 2002; Zhou 2009).

### **1.1.3 Aktivierung und Gedächtniszellbildung**

Die Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen erfolgt über den TZR und den Korezeptor CD8, welche mit Antigenen bestückte MHC-I-Moleküle auf der Oberfläche von Zielzellen erkennen (siehe Abbildung 2). Nahezu alle Zellen des Organismus besitzen MHC-I-Moleküle. Sie können darüber intrazelluläre Proteine wie Viruspartikel oder neoplastisch veränderte körpereigene Moleküle nach proteosomaler Degradierung als Antigene auf der Zelloberfläche präsentieren. (Andersen et al. 2006) Der TZR befindet sich in einem Komplex mit dem assoziierten Molekül CD3 sowie zwei  $\zeta$ -Ketten. Die Untereinheiten des CD3-Proteins sowie die  $\zeta$ -Ketten besitzen Immunrezeptor-Tyrosin-basierte aktivierende Motive (ITAM). Bei Ligandenbindung des TZR werden die ITAMs phosphoryliert und Tyrosin-Kinasen der Src-Familie rekrutiert, darunter Zap-70 und Lck. Unter anderem über die Moleküle LAT, SLP-76 und die Phospholipase C- $\gamma$ 1 wird eine nachfolgende intrazelluläre Signalkaskade in Gang gesetzt. (Ngoenkam et al. 2018) Diese löst durch Veränderungen intrazellulärer Calciumspiegel, Änderung der Gentranskription und Zytokinproduktion eine Aktivierung der T-Zelle sowie die rasche

klonale Expansion und Differenzierung naiver CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zu Effektorzellen aus. Bei naiven Lymphozyten sind zusätzlich kostimulierende Signale wie Interleukin-2 (IL-2) und die Interaktion von CD28 mit CD80/86 zur Aktivierung der zytolytischen Funktion notwendig. Bei Effektor- oder Gedächtnis-T-Zellen ist dies nicht erforderlich. (Andersen et al. 2006) Oftmals sind CD8<sup>+</sup>-T-Zellen für eine ausreichende klonale Expansion auf die Unterstützung von CD4<sup>+</sup>-Helferzellen angewiesen (Bevan 2004).



**Abbildung 2: Schematische Abbildung des T-Zell-Rezeptorkomplexes**

Der TZR-Komplex besteht aus dem TZR mit α- und β-Untereinheit, dem assoziierten Molekül CD3 aus 2 ε-Untereinheiten, einer γ- und einer δ-Untereinheit sowie einem Homodimer aus zwei ζ-Ketten. Sowohl der TZR als auch der Korezeptor CD8 stellen die Verbindung zu dem mit Antigen (Ag) bestückten MHC-I-Molekül der Zielzelle her. Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an Andersen et al. 2008; Ngoenkam et al. 2018

Nach Bekämpfung der Aktivierungsquelle kommt es zum Untergang der meisten Effektorzellen mittels Apoptose, der sogenannten Kontraktion (siehe Kapitel 1.1.4). Aus den verbliebenen Effektorzellen gehen einerseits *Effector memory cells* mit restlicher zytotoxischer Aktivität hervor, andererseits *Central memory cells* mit größerem Proliferationspotential (Kaech und Cui 2012). *Effector memory cells* zeigen eine geringe Expression des IL-7-Rezeptors und von CCR7 bei starker Expression von KLRG1, für *Central memory cells* trifft das Gegenteil zu (Sallusto et al. 1999; Kaech et al. 2003; Joshi et al. 2007). Auf die Bildung von Effektor- und Gedächtniszellen wirken verschiedene Transkriptionsfaktoren unter gegenseitiger Beeinflussung ein. Dabei fördern T-bet, Id2 und Blimp-1 kurzlebige Effektorzellen, Eomes, Foxo1, Id3 und Bcl11b hingegen Gedächtniszellvorstufen (Joshi et al. 2007; Banerjee et al. 2010; Hess Michelini et al. 2013; Abboud et al. 2016).



Für die Entwicklung und Homöostase von Lymphozyten sind eine Reihe von Zytokinen notwendig, darunter IL-2, IL-7, IL-12, IL-15 und IL-18. Naive T-Zellen sind in ihrer Entwicklung und Homöostase in hohem Maße abhängig von IL-7. IL-2 wird im Rahmen der Aktivierung einerseits eine fördernde Wirkung auf die Proliferation von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zugewiesen, andererseits bei persistierender Stimulation eine expansionsbeschränkende Wirkung, etwa durch Beschleunigung der Apoptose von aktivierten T-Zellen. CD8<sup>+</sup>-Gedächtnis-Zellen werden in Entwicklung und Überleben vor allem von IL-15 unterstützt, in geringerem Maße auch von IL-7. (Ma et al. 2006)

#### 1.1.4 Apoptose von T-Zellen

Apoptose ist ein von der Zelle vorgesehenes Programm zum geregelten Untergang bei bestimmten äußeren oder inneren Stimuli. Allgemein unterscheidet man den extrinsischen Weg und intrinsischen Weg. Der extrinsische Weg wird durch an Todesrezeptoren bindende Liganden ausgelöst und führt über eine Aktivierungskaskade von Caspasen zur Fragmentierung von Zellbestandteilen und DNA. Der intrinsische Weg wird hingegen bei Mangel an wachstumsstimulierenden Substanzen, Zell- oder DNA-Schäden eingeleitet. Hierbei herrscht ein Übergewicht von proapoptotischen gegenüber antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie. Dieses bewirkt über eine Porenbildung in der Mitochondrienmembran durch Bax und Bak die Freisetzung von Cytochrom c und mündet über die gleichen Effektorcaspasen wie der extrinsische Weg in die Apoptose. (Löffler 2008, S. 225–227) Zu den proapoptotischen Faktoren gehören u.a. Bax, Bak, Bid und Bim, zu den antiapoptotischen Faktoren zählen vor allem Bcl2 und BclxL (Lu und Finn 2008).

Auch bei T-Zellen können extrinsische und intrinsische Mechanismen beobachtet werden. Physiologisch kommt es hier nach Expansion der T-Zellen in Folge einer Aktivierung zur Kontraktion. Diese findet bereits vor Antigendeprivation statt und scheint demnach von der Zelle selbst vorprogrammiert zu sein. (Badovinac et al. 2002) Es werden der *Activation induced cell death* (AICD) und der *Activated cell autonomous death* (ACAD) unterschieden. Beim AICD geht die wiederholte Stimulation des TZR bereits aktivierter Zellen mit der Apoptoseinduktion einher. Die Stimulation des TZR bewirkt über verschiedene Signalwege eine Hochregulation des Fas-Liganden. Dieses Mitglied der TNF-Superfamilie löst bei Bindung an den Todesrezeptor Fas die Signalkaskade zur Apoptose aus. Nach erstmaliger Aktivierung des TZR überwiegen heraufregulierte antiapoptotische Moleküle wie Flip, Bcl2 und BclxL. Im Verlauf der Zeit sinkt ihre Expression und die Inhibition der von der Fas-Bindung ausgelösten

Signalkaskade lässt nach. Durch die Abhängigkeit von der Restimulation des TZR ist der AICD vermutlich bei bleibend hoher Antigenlast, chronischen Infektionen und Autoimmunreaktionen von Bedeutung. (Brenner et al. 2008)

Die T-Zell-Kontraktion findet jedoch auch statt, wenn keine weitere Stimulation des TZR erfolgt, etwa bei abklingender Infektion mit nachlassender Antigenlast. Dabei spielt der ACAD eine Rolle. Hier führt der Mangel an wachstumsstimulierenden Substanzen zu einem Überwiegen proapoptotischer Faktoren. (Brenner et al. 2008) Bedingungen für die Formierung der Membranporen aus Bak und Bax scheinen die sinkende Expression von Bcl2 sowie die Aktivierung von Bim zu sein (Hildeman et al. 2002). Generell zeigen Effektorzellen im Vergleich zu naiven Zellen und Gedächtniszellen sinkende Level von Bcl2 bei erhöhter Expression von Todesrezeptoren und Caspasen (Grayson et al. 2000; Lu und Finn 2008). Dies lässt sich damit vereinen, dass ihre Funktion nur für eine bestimmte Dauer vorgesehen ist und bei Nachlassen der Stimulation eine schnelle Rückkehr zu einer normalen Zahl an Entzündungszellen notwendig ist.

Auch das Zytokinmilieu beeinflusst die Kontraktion. IL-2 ist zwar unabdingbar für die Aktivierung und Expansion naiver T-Zellen, sensibilisiert jedoch auch für AICD (Brenner et al. 2008). IL-7 und IL-15 antagonisieren den ACAD und stimulieren die Entwicklung von Gedächtniszellen, während sich IFN- $\gamma$  fördernd auf den Untergang der Effektorzellen auswirkt (Lu und Finn 2008).

### **1.1.5 CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in der Antitumorthherapie**

Dass das Immunsystem eine Funktion bei der Verhinderung der Tumorentwicklung besitzt, wurde spätestens durch Untersuchungen zu Langzeitüberlebenden von Organtransplantationen ersichtlich: Unter Immunsuppression traten bei den Patienten etwa 100-mal häufiger Tumore epithelialer und mesenchymaler Herkunft auf als bei der gesunden Normalbevölkerung (Penn und Starzl 1972). Das Immunsystem für die Bekämpfung bereits existierender Tumore zu nutzen, ist seit Jahrzehnten Gegenstand der Forschung. Ob monoklonale Antikörper gegen Tumorantigene, Checkpoint-Inhibitoren, die Instillation mit BCG bei Blasenkrebs oder die prophylaktische HPV-Impfung: Immuntherapie ist inzwischen als eine Säule der Tumorthherapie fest etabliert (Dougan und Dranoff 2009). Auch CD8<sup>+</sup>-T-Zellen stellen durch ihre Fähigkeit, die Lyse neoplastisch veränderter Körperzellen einzuleiten, ein attraktives Forschungsobjekt dar. Eine hohe Zahl tumorinfiltrierender CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten geht in vielen soliden Tumoren mit einer besseren Prognose einher, etwa in Karzinomen der Lunge, Brust,

Prostata, Ovarien, Haut, Nieren und Leber sowie in kolorektalen Karzinomen (Chraa et al. 2018). Dabei weisen die T-Zellen tumorspezifische Antigenrezeptoren auf (Mackensen et al. 1993; Mami-Chouaib et al. 2002). Bei etablierten Neoplasien reicht die Tumorreaktivität des Immunsystems reicht jedoch meist nicht aus, um den Tumor zu eliminieren, u.a. weil in den abnormal proliferierenden Zellen Mutationen mit Selektionsvorteil entstehen, die z.B. Veränderungen oder Verluste von MHC-Molekülen hervorrufen (Chang und Ferrone 2007). Durch derartige Escape-Mechanismen können Tumorzellen dem Immunsystem entgehen. Außerdem wirken die Sekretion immunsuppressiver Substanzen durch entartete Zellen und regulatorische T-Zellen der Tumorelimination entgegen (Dougan und Dranoff 2009). Verschiedene Strategien des adoptiven Zelltransfers sollen daher das Vorgehen von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen gegen Tumorzellen verstärken. Hierbei werden Patientenlymphozyten aus dem peripheren Blut, aus Lymphknoten oder dem Tumorgewebe entnommen, ex vivo aktiviert, expandiert und manipuliert und anschließend wieder in den Patienten injiziert (Dougan und Dranoff 2009). Eine Möglichkeit der Manipulation sind chimäre Antigen-Rezeptoren (CAR) auf der T-Zell-Oberfläche, dessen genetische Information mittels viraler Vektoren in die Zellen eingebracht wird (Levine et al. 2017). CAR bestehen aus einer Antikörper-ähnlichen antigenbindenden Domäne sowie der Aktivierungsdomäne CD3ζ. CAR der zweiten bzw. dritten Generation besitzen zusätzlich eine oder mehrere kostimulierende Domänen wie CD28. Bei Bindung des spezifischen Antigens auf Tumorzellen, etwa CD19 auf B-Zell-Neoplasien, wird der Lyseapparat der T-Zellen in Gang gesetzt. (Golubovskaya und Wu 2016) Studien zu Fällen von refraktärer oder rezidivierender akuter lymphatischer Leukämie der B-Zellen zeigen, dass durch die CAR-T-Zell-Therapie Vollremissionen bei bis zu 90 % der Patienten erreicht werden können (Brentjens et al. 2013; Davila et al. 2014; Maude et al. 2014; Maude et al. 2017). Bei fast der Hälfte der Patienten kehrt die Krankheit jedoch innerhalb eines Jahres zurück (Maude et al. 2017). Um Escape-Mechanismen des Tumors entgegenzuwirken und auch in soliden Tumoren Effekte zu erzielen, scheint z.B. die Kombination mit Checkpointinhibitoren oder monoklonalen Antikörpern gegen inhibitorische T-Zell-Rezeptoren wie PD-1 und CTLA-4 hilfreich. 2017 wurden die ersten zwei CAR-T-Zell-Therapien für bestimmte B-Zell-Neoplasien in den USA zugelassen, 2018 auch in der EU. (Leyfman 2018)

## 1.2 Natürliche Killerzellen

### 1.2.1 Entwicklung

Eine weitere Gruppe von Lymphozyten mit direkter zytotoxischer Wirkung stellen die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) dar. Die Entwicklung der NK-Zellen findet im Knochenmark statt (Kim et al. 2002). Es wurden jedoch auch NK-Zell-Vorstufen bestimmter Subgruppen in anderen Organen gefunden, etwa im Thymus, in den Lymphknoten und in der Leber (Andrews und Smyth 2010; Freud et al. 2005; Vosshenrich et al. 2006). Auch NK-Zellen entstammen den CLP (Kondo et al. 1997). Es folgen zwei Vorläuferstadien, die *Natural killer precursor* (NKP) Prä-NKP und NKP, welche noch keine linienspezifischen Marker tragen. NKP exprimieren jedoch bereits die  $\beta$ -Untereinheit des IL-2- und IL-15-Rezeptors. (Geiger und Sun 2016) In der Entwicklung von CLP zu NKP ist der Transkriptionsfaktor Nfil3 unerlässlich. Nfil3 wird in Abhängigkeit von der IL-15-Signaltransduktion induziert (Gascoyne et al. 2009). Die Deletion von Nfil3 führt zum Verlust der NK-Zell-Population, nicht aber der anderen Lymphozyten (Geiger und Sun 2016). Das nachfolgende Stadium unreifer NK-Zellen zeigt erstmals linienspezifische Marker wie die NK-Zell-Rezeptoren NK1.1 und NKp46, aber auch einen Verlust der IL-7R $\alpha$ -Kette. Reife NK-Zellen exprimieren zusätzliche linienspezifische Marker wie DX5 sowie weitere NK-Zell-Rezeptoren wie Ly49 (human: KIR), womit sie funktionelle Kompetenz erlangen und aus dem Knochenmark entlassen werden. (Geiger und Sun 2016) Eine Aufführung der NK-Entwicklungsstadien und ihrer charakteristischen Marker findet sich in Tabelle 1.

**Tabelle 1: Expression von Oberflächenmarkern in den Stadien der NK-Zell-Entwicklung**

Quelle: In Anlehnung an Text und Abbildung von Geiger und Sun (2016)

	CLP	Prä-NKP	NKP	Unreife NK	Reife NK
IL-7-Ra (CD127)	+	+	+/-	-	-
CD27	+	+	+	+	-
c-kit (CD117)	+	+/-	-	-	-
Flt-3 (CD135)	+	-	-	-	-
CD244	-	+	+	+	+
IL-15R $\beta$ (IL-2R $\beta$ )	-	-	+	+	+
NK1.1	Lin <sup>-</sup> (keine Expression linienspezifischer Marker)			+	+
NKp46				+	+
DX5 (Itga2)				-	+
CD11b (Itgam)				-	+
Ly49				-	+

Für den Übergang von unreifen zu reifen NK-Zellen werden Id2 und Ets1 benötigt. Ihr Fehlen reduziert die Zahl peripherer NK-Zellen deutlich. In dieser Phase kommen auch die Transkriptionsfaktoren T-bet, Eomes und Tox als wichtige Regulatoren hinzu. Die weitere Reifung und Homöostase wird durch Aiolos, Irf2, Foxo3 und Runx3 unterstützt. (Geiger und Sun 2016) Durch Expression inhibitorischer Rezeptoren wird die Selbsttoleranz der NK-Zellen gewährleistet (Colucci et al. 2003). Mit gewisser Ähnlichkeit zur Toleranzentwicklung im Selektionsprozess bei Thymozyten benötigen NK-Zellen die Interaktion von inhibitorischen Rezeptoren mit körpereigenen MHC-I-Molekülen, um sich zu funktionsfähigen und adäquat auf veränderte Zellen ansprechenden Killerzellen zu entwickeln (Johansson et al. 2005). Unter den reifen NK-Zellen wurden zwei Subpopulationen identifiziert, die sich in ihren Effektorfunktionen unterscheiden. Der Großteil der Zellen (90 %) zeigt eine niedrige CD56- sowie eine hohe CD16-Expression und weist durch stärkere Perforinproduktion und NK-Zell-Rezeptor-Expression eine gute zytolytische Funktion bei geringer Zytokinproduktion auf. Zellen mit hoher CD56-, aber niedriger CD16-Expression synthetisieren dagegen große Mengen von Zytokinen bei vernachlässigbarer zytolytischer Funktion. (Cooper et al. 2001) Reife NK-Zellen machen knapp 10 % der peripheren Blutlymphozyten aus (Shearer et al. 2003). Sie finden sich außerdem in der Milz, Lunge und Leber, im Uterus sowie in geringer Zahl in den Lymphknoten (Pegram et al. 2011).

### **1.2.2 Funktion und Eigenschaften**

Die NK-Zellen weisen durch ihre zytolytische und zytotoxische Wirkung zahlreiche funktionelle Gemeinsamkeiten mit CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten auf. Auch auf Transkriptionsebene stimmen NK-Zellen mit CD8<sup>+</sup>-T-Zellen mehr überein als mit anderen Leukozyten (Bezman et al. 2012). Unterschiedlich sind jedoch die vorrangige Entwicklung im Knochenmark statt im Thymus, die Art der Aktivierung sowie das Vorhandensein von Eigenschaften des angeborenen Immunsystems (neben begrenzten adaptiven Merkmalen, siehe Kapitel 1.2.4).

NK-Zellen stellen den Prototyp der Innaten lymphoiden Zellen (ILC) dar. Diese noch nicht allzu lang definierte Gruppe von Immunzellen zeigt morphologische Gemeinsamkeiten mit lymphatischen Zellen und eine hohe Zytokinproduktion, besitzt jedoch keine antigenspezifischen Rezeptoren. Basierend auf der Abhängigkeit ihrer Differenzierung von verschiedenen Transkriptionsfaktoren werden sie in drei Gruppen geteilt: ILC1 (einschließlich NK-Zellen), ILC2 und ILC3. (Kumar 2014)

Die Immunantwort der NK-Zellen richtet sich ähnlich den CD8<sup>+</sup>-T-Zellen hauptsächlich gegen virusbefallene und maligne Körperzellen (Yokoyama et al. 2004). Weiterhin wurden sie als Beteiligte bei Abstoßungsreaktionen von Knochenmarkstransplantaten erkannt (Murphy et al. 1987). Vergleichbar mit CD8<sup>+</sup>-T-Zellen wird der NK-Zell-vermittelte Zelltod über Perforine und Granzyme, die Expression von Todesrezeptorliganden wie dem Fas-Liganden und TRAIL sowie über die Produktion von Zytokinen wie IFN- $\gamma$  realisiert (Colucci et al. 2003).

Genexpressionsanalysen zeigen, dass gemeinsam exprimierte Gene von NK-Zellen und CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten für Effektormoleküle (Granzym A und B), NK-Zell-Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren (T-bet, Id2, Blimp1), Adhäsionsmoleküle und Chemokinrezeptoren kodieren. Das Expressionslevel ist jedoch im Allgemeinen in NK-Zellen deutlich höher, was mit damit einhergeht, dass NK-Zellen im Vergleich zu CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten bereits im ruhenden Zustand eine vielfach gesteigerte Ansprechbarkeit gegenüber infizierten Zellen zeigen. (Bezman et al. 2012)

### 1.2.3 Aktivierung

Die Aktivierung bzw. Hemmung der NK-Zellen erfolgt nicht wie bei CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten über antigenspezifische Rezeptoren, sondern über eine Verschiebung des Gleichgewichts der Stimulation von aktivierenden und inhibitorischen Rezeptoren auf der NK-Zell-Oberfläche (Pegram et al. 2011). Durch die Expression verschiedener Kombinationen von rasch evolvierenden Rezeptoren kommt eine Diversität und teilweise auch Virusspezifität unter der NK-Zellen zustande (McQueen und Parham 2002).

Viele NK-Zell-Rezeptor-Familien beinhalten sowohl aktivierende als auch inhibitorische Mitglieder. Sie können zumeist zwei Genkomplexen zugeordnet werden, dem Leukozyten-Rezeptor-Komplex (*leukocyte receptor complex*, LRC) auf Chromosom 7 (human Chromosom 19) sowie dem Natürlichen-Killerzell-Komplex (*natural killer cell complex*, NKC) auf Chromosom 6 (human Chromosom 12). Ersterer kodiert Rezeptoren der Superfamilie der Immunglobulin-ähnlichen Rezeptoren, dazu gehören u.a. der aktivierende Rezeptor NKp46 sowie die KIR-Rezeptoren im humanen System. Der Natürliche-Killerzell-Komplex kodiert C-Typ-Lektin-Rezeptoren. Hierzu zählen z.B. die Ly49-Rezeptorfamilie bei Mäusen (nur ein humanes Gen bekannt), die NKRP1- und NKG2A/C/E-CD94-Familie sowie der NKG2D-Rezeptor. (Kelley et al. 2005) Liganden für aktivierende Rezeptoren sind unter anderem virale Hämagglutine und MHC-I-ähnliche Moleküle wie MIC-A, MIC-B und ULBP1–4 im humanen bzw.

Rae-1 und H60 im murinen System. MHC-I-ähnliche Moleküle werden auch als Stressliganden bezeichnet, da sie von Zellen bei Stress exprimiert werden, etwa bei Virusbefall. (Groh et al. 2001) Inhibitorische Rezeptoren registrieren vor allem Selbst-MHC-I-Moleküle, nicht-klassische MHC-I-Moleküle und klassische Cadherine (Pegram et al. 2011). Geringe MHC-I-Level auf umgebenden Zellen führen durch fehlende inhibitorische Signale zur Aktivierung der NK-Zellen, bekannt als die *missing-self-theory* (Ljunggren und Karre 1990). MHC-I-Moleküle können in Viruszellen und Tumorzellen herunterreguliert sein, um dem spezifischen Immunsystem zu entgehen (Collins et al. 1998; Leone et al. 2013). Dadurch werden sie jedoch Ziel der NK-Zellen, sofern sie nicht über weitere Escape-Mechanismen gegenüber diesen verfügen.

Zusätzlich besitzen Natürliche Killerzellen die Fähigkeit zur Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC), die über den Fc $\gamma$ -Rezeptor III (CD16) vermittelt wird. Dieser erkennt den konstanten Teil von Immunglobulinen Typ G, welche auf Zelloberflächen an Antigene gebunden haben (Nimmerjahn und Ravetch 2008). Der Fc $\gamma$ -Rezeptor III gehört zu den aktivierenden Rezeptoren der NK-Zellen und repräsentiert eine der zahlreichen Verknüpfungen zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem.

Inhibitorische NK-Zell-Rezeptoren besitzen in ihrer zytoplasmatischen Domäne Immunrezeptor-Tyrosin-basierte inhibitorische Motive (ITIM), welche SH2-Domänen enthaltende Tyrosinphosphatasen binden und über diese eine Hemmung der Immunfunktion hervorrufen (Pegram et al. 2011). Aktivierende NK-Zell-Rezeptoren nutzen hingegen membranverankerte Adapterproteine mit ITAM. Bei Ligandenbindung des Rezeptors wird das ITAM des Adaptermoleküls phosphoryliert und rekrutiert die SH2-Domänen enthaltenden Tyrosinkinasen Zap-70 und Syk. Dieser Vorgang resultiert in eine Signalkaskade zur Aktivierung der Immunantwort mit Degranulation zytotoxischer Vesikel und gesteigerter Zytokinproduktion. Verschiedene NK-Zell-Rezeptoren reagieren bevorzugt mit bestimmten Adaptermolekülen (siehe Diskussion Kapitel 4.1.5). Zu ihnen gehören Dap12, das als Homodimer agiert, sowie Fc $\epsilon$ 1 $\gamma$  und die  $\zeta$ -Kette, welche Heterodimere bilden können. (Lanier und Bakker 2000)

Auch CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zeigen eine gewisse Expression von NK-Zell-Rezeptoren. Sie werden meist im Zuge der Aktivierung hochreguliert. Es wird gemutmaßt, dass aktivierende Rezeptoren in Form eines kostimulierenden Signals zur Verstärkung der Zytotoxizität führen, während inhibitorische Rezeptoren zur Dämpfung von (Auto-)Immunreaktionen beitragen oder den durch Dauerstimulation ausgelösten AICD verhindern. (McMahon und Raulet 2001; Makwana et al. 2017)

NK-Zellen sind nicht nur in ihrer Entwicklung und Expression von NK-Zell-Rezeptoren auf IL-15 angewiesen, das Interleukin ist auch für ihre Homöostase unerlässlich (Cooper et al. 2002; Ma et al. 2006). Die Halbwertszeit von in Mäuse transferierten NK-Zellen sinkt bei Fehlen von IL-15 von 7–8 Tagen auf 5–6 Stunden. Das Überleben von Gedächtnis-NK-Zellen hängt ebenfalls von IL-15 ab (Ma et al. 2006). Für die Stimulation der Zytotoxizität und Zytokinproduktion wird hingegen von Dendritischen Zellen produziertem IL-12, IL-18 und IFN- $\gamma$  eine dominierende Rolle zugewiesen (Takeda et al. 1998; Andrews et al. 2003; Andoniou et al. 2005; Sun et al. 2009b).

#### **1.2.4 Adaptive Merkmale von NK-Zellen**

Im Gegensatz zu den T-Lymphozyten und B-Lymphozyten wurden NK-Zellen über Jahrzehnte zur angeborenen Immunabwehr gezählt, unter anderem, weil sie auch ohne vorherige Sensibilisierung schnell und potent gegen infizierte Zellen vorgehen können und weil keine Bildung von Gedächtniszellen bekannt war (Sun und Lanier 2011). NK-Zellen sind nicht in der Lage, funktionsfähige  $\beta$ -Ketten-Gene zu rekombinieren und exprimieren damit keine Strukturen, die dem T- oder B-Zell-Rezeptor ähneln (Reynolds et al. 1985). Das Konzept der alleinigen Zugehörigkeit von Natürlichen Killerzellen zum angeborenen Immunsystem gerät jedoch zunehmend ins Wanken, da auch bei ihnen verschiedene Merkmale der adaptiven Immunabwehr aufgezeigt wurden. Studien zu Infektionen mit Zytomegalieviren und Hantaviren wiesen eine gewisse Virusspezifität und die Fähigkeit zur klonalen Proliferation zu Effektorzellen nach, wenn auch in begrenzterem Maße als T-Zellen (Sun und Lanier 2008; Lopez-Verges et al. 2011; Bjorkstrom et al. 2011). Sowohl das Auftreten von Sensibilisierungsreaktionen bei NK-Zellen wird durch Studien gestützt (Cudkovicz und Stimpfling 1964; O'Leary et al. 2006) als auch die Existenz von NK-Gedächtniszellen. In Untersuchungen zum adoptiven Zelltransfer mit NK-Zellen wurden langlebige Gedächtniszellen generiert, welche über Monate bestanden (Sun et al. 2009a). Nach jeder erneuten Infektion und Kontraktion blieben mehr Gedächtniszellen mit hoher Expression virusspezifischer Rezeptoren zurück, wodurch zügigere und stärkere Immunantworten folgten (Sun et al. 2010). Der Erwerb einer höheren Expression von virusspezifischen Rezeptoren wie Ly49H und NKG2C auf NK-Gedächtniszellen ähnelt der Affinitätssteigerung von T-Zell-Rezeptoren nach Exposition mit Antigenen (Sun und Lanier 2011).



### 1.2.5 NK-Zellen in der Antitumorthherapie

Schon zu Beginn ihrer Entdeckung fielen NK-Zellen dadurch auf, dass sie die Lyse von Tumorzellen initiieren (Kiessling et al. 1975). Weitere Studien bestätigten eine Rolle der NK-Zellen in der Tumorkontrolle. So ist die Infiltration von Tumorgewebe mit NK-Zellen mit einer günstigeren Prognose assoziiert, während das Fehlen von NK-Zellen zu einer erhöhten Rate von Tumoren führt (Coca et al. 1997; Smyth et al. 2001). Die zuvor genannten Mechanismen der Initiation des Untergangs von Zielzellen wurden für das Vorgehen der Killerzellen gegen Tumorzellen bestätigt (Street et al. 2001; Hashimoto et al. 1999; Takeda et al. 2002). Die Antitumoraktivität macht NK-Zellen zu potentiellen Kandidaten für den Einsatz im adoptiven Zelltransfer. Vorteilhaft gegenüber dem T-Zell-Transfer ist das direkte, antigenunabhängige Vorgehen gegen Zielzellen ohne vorherige Sensibilisierung. Für die tumorlytische Funktion der NK-Zellen sind keine spezifischen Rezeptoren gegen Tumorantigene nötig. Beim adoptiven Zelltransfer mit NK-Zellen gestaltet es sich jedoch schwierig, durch den im Vergleich zu T-Lymphozyten geringen Zellanteil im Blut ausreichend Zellen für die Kultivierung zu gewinnen und die Aktivität der NK-Zellen nach Reinfusion in den Patienten aufrechtzuerhalten (Miller et al. 2005; Li 2010). Maligne hämatologische Erkrankungen wie die akute myeloische Leukämie scheinen zum Teil auf die NK-Zell-Therapie anzusprechen (Miller et al. 2005; Romee et al. 2016). Dagegen zeigen sich bei soliden Tumoren weniger Erfolge (Parkhurst et al. 2011; Geller et al. 2011; Sakamoto et al. 2015). Als ursächlich wird eine mäßige Tumordinfiltration, eine geringe Erkennung der Tumorzellen und das Herunterfahren von zytolytischer Aktivität und Zytokinproduktion angesehen (Paul und Lal 2017). Auch hier wirken antiinflammatorische Substanzen von Tumorzellen und körpereigenen immunsuppressiven Zellen sowie weitere Immunescapemechanismen des Tumorgewebes der NK-Zell-Aktivität entgegen (Melero et al. 2014). Somit sind zusätzliche Faktoren nötig, um die Antitumoraktivität von NK-Zellen effizienter zu gestalten, etwa die Behandlung mit immunstimulierenden Zytokinen wie IL-2, IL-12, IL-15 und IL-18 (Paul und Lal 2017). Weiterhin wird die Kombination mit CAR oder Checkpointinhibitoren untersucht. Der Zusatz von monoklonalen Antikörpern gegen Moleküle auf der Tumorzelloberfläche könnte die Tumorzelllyse durch NK-Zellen via ADCC fördern. Dieser Mechanismus spielt auch bei bereits etablierten Antikörpern wie Rituximab, Cetuximab und Trastuzumab eine Rolle. (Pahl und Cerwenka 2017)

## 1.3 Bcl11b

### 1.3.1 Vorkommen und Struktur

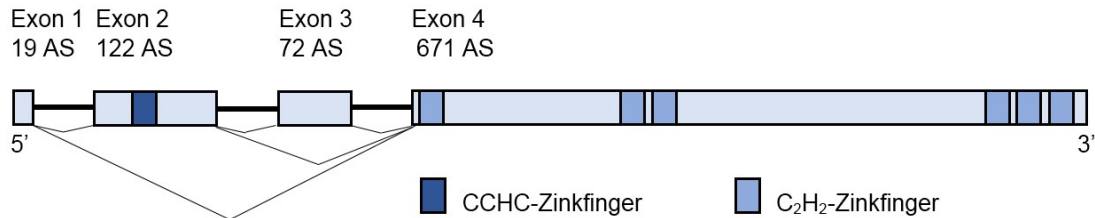
*B-cell leukemia/lymphoma 11B* (Bcl11b) wurde als bedeutender Transkriptionsfaktor für die Entwicklung mehrerer Zellarten identifiziert, darunter T-Zellen, Neurone, epidermale Zellen und Ameloblasten. Des Weiteren ist Bcl11b als Tumorsuppressorgen bekannt (Wakabayashi et al. 2003a), wobei unterschiedliche Einflüsse auf die Entwicklung und Kontrolle von Tumoren aufgezeigt wurden (siehe Kapitel 1.3.5). Ursprüngliche und inzwischen weniger gebräuchliche Bezeichnungen des Transkriptionsfaktors sind *Radiation-induced tumor suppressor gene 1* (RIT1) und *COUP-TF-interacting protein 2* (CTIP2).

Innerhalb des hämatopoetischen Systems findet sich *Bcl11b* fast ausschließlich in der T-Zell-Linie. In frühen thymischen Vorläuferzellen noch nicht detektierbar, wird seine Expression im DN2-Stadium stark induziert und bleibt in der weiteren T-Zell-Entwicklung bis zu reifen CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten hochreguliert. Erst in aktivierten, peripheren T-Zellen sinken die Expressionslevel. *Bcl11b* wird außerdem in  $\gamma\delta$ -T-Zellen, thymischen NK-Zellen und Natürlichen Killer-T-Zellen exprimiert. (Li 2010) Spätere Ribonukleinsäure(RNA)-Sequenzierungsanalysen zeigten, dass auch NK-Zellen eine etwa 5-fach geringere Expression von *Bcl11b*-Transkripten im Vergleich zu naiven CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aufweisen, die Expressionslevel von aktivierten T-Zellen liegen dazwischen. In B-Zellen, Monozyten und Granulozyten sind hingegen keine relevanten RNA-Transkripte zu vermerken. (Blood Atlas des Human Protein Atlas [Uhlén et al. 2015] nach Monaco et al. 2019)

Da Bcl11b in anderen hämatopoetischen Zelllinien zunächst nicht nachgewiesen werden konnte, lediglich geringfügig in unreifen NK-Zellen, schlug Li (2010) ihn als T-Zell-linienspezifischen Transkriptionsfaktor vor. Diese Annahme wurde dadurch revidiert, dass Forschungsgruppen Bcl11b als essentiell für die Entwicklung der ILC2 erkannten (Walker et al. 2015; Yu et al. 2015; Califano et al. 2015).

Außerhalb des hämatopoetischen Systems wurde die Funktion von Bcl11b vor allem in bestimmten Regionen des neuronalen Systems untersucht. Homozygote Knockoutmäuse, denen Bcl11b bereits von Entwicklungsbeginn an fehlt, sind nicht überlebensfähig, vermutlich aufgrund neuronaler Fehlbildungen (Wakabayashi et al. 2003b). Der Transkriptionsfaktor ist maßgeblich an der Entwicklung und Projektion kortikospinaler Motorneurone, an der Differenzierung striataler Projektionsneurone sowie an der Entwicklung und Funktion des Hippocampus beteiligt (Arlotta et al. 2005;

Arlotta et al. 2008; Simon et al. 2012; Simon et al. 2016). Des Weiteren erfüllt Bcl11b wesentliche Aufgaben bei der Zahnentwicklung, der Differenzierung des Vomeronasalorgans sowie der Keratinozytenproliferation und Barrierefunktion der Epidermis (Golonzhka et al. 2009a, Golonzhka et al. 2009b, Enomoto et al. 2011). Strukturell handelt es sich um einen C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfinger-Transkriptionsfaktor vom Krüppel-Typ (Satterwhite et al. 2001). Die aus 884 Aminosäuren bestehende Isoform a der Maus auf Chromosom 12 sowie das zehn Aminosäuren längere Analogon des Menschen auf Chromosom 14 sind auf Nukleotidebene zu 88 % identisch und bestehen aus vier Exons (siehe Abbildung 3; Satterwhite et al. 2001; Huang et al. 2012; Kominami 2012). In der Isoform b ist das dritte Exon nicht exprimiert (Wakabayashi et al. 2003a). Der nur in der Maus vorkommenden Isoform c fehlt das zweite und dritte Exon (Simon et al. 2020). Das vierte Exon stellt drei Viertel des Genprodukts und enthält sechs C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfingerdomänen, welche der Bindung an die DNA dienen (Kominami 2012). Bcl11b führt seine Funktion als Homodimer aus, für dessen Bildung das N-terminale CCHC-Zinkfingermotiv essentiell ist (Grabarczyk et al. 2018). Das Genprodukt beinhaltet des Weiteren zahlreiche Domänen zur Interaktion mit Proteinkomplexen, u.a. Histondeacetylasen (Cismasiu et al. 2005).



**Abbildung 3: Schematische Struktur der *Bcl11b*-Gensequenz**

Dargestellt sind die Exon-Sequenzen im korrekten Größenverhältnis mit Zahl der Aminosäuren (AS) des resultierenden Peptids sowie die Zinkfinger motive und Spleißvarianten. Exon 3 wird nur in Isoform a exprimiert. Der Isoform b fehlt Exon 3, der Isoform c fehlen Exon 2 und 3. Quelle: Eigene Darstellung

### 1.3.2 Funktion als Transkriptionsfaktor in T-Zellen

Bcl11b ist sowohl transkriptioneller Repressor als auch Aktivator und agiert in verschiedenen Transkriptionskomplexen an zahlreichen Genloki (Avram et al. 2002; Topark-Ngarm et al. 2006; Hosokawa et al. 2018). Ursprünglich wurde Bcl11b als Transkriptionsrepressor durch Interaktion mit dem *Chicken ovalbumin upstream promotor transcription factor* (COUP-TF) entdeckt (Avram et al. 2000). Weitere Korepressoren sind Akteure der Chromatinstrukturierung und Histondeacetylasen, beispielsweise der NuRD-Komplex, HDAC1 und HDAC2, Sirt1 und SUV39H1 (Senawong et al. 2003; Cismasiu et al. 2005; Marban et al. 2007; Cherrier et al. 2009).

Hosokawa et al. (2018) identifizierten Chd4, Mta2, Rest, Ring1b, LSD1 und Runx1 als relevante Kofaktoren in Transkriptionskomplexen. Sie scheinen zum Großteil von der Rekrutierung durch Bcl11b abhängig zu sein, da ihre DNA-Bindung bei *Bcl11b*-Knockout häufig verloren geht oder andere DNA-Motive gebunden werden (Hosokawa et al. 2018).

Erste entdeckte reprimierte Zielgene waren die für die T-Zell-Differenzierung wichtigen Transkriptionsfaktoren *Id2*, *Thpok* und *Runx3* sowie die Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren *p57Kip2*, *p21* und *p27* (Topark-Ngarm et al. 2006; Kamimura et al. 2007b; Cherrier et al. 2009; Kastner et al. 2010). Bcl11b kann jedoch auch an der Aktivierung von Genen mitwirken, so steigert es z.B. die Expression von *IL2* (Cismasiu et al. 2006). In genomweiten Analysen von *Bcl11b*-Knockoutzellen verschiedener T-Zell-Entwicklungsstadien wurden inzwischen Hunderte von Zielgenen identifiziert, darunter weitere Transkriptionsfaktoren sowie Marker der T-Zell-Linie und alternativer Zelllinien (Li 2010; Li et al. 2010; Kastner et al. 2010; Longabaugh et al. 2017; Hosokawa et al. 2018). Signalweganalysen von Kastner et al. (2010) ergaben, dass bei *Bcl11b*-Verlust die Signalwege der Moleküle Erk, NFκB, JAK/STAT und PI3K/AKT sowie Signalwege des TZR Veränderungen aufweisen.

Untersuchungen der spezifischen Deletion von *Bcl11b* im hämatologischen System zeigen, dass die T-Zell-Entwicklung in frühen DN-Stadien auf Bcl11b angewiesen ist, da der Transkriptionsfaktor Genprogramme anderer Zellarten unterdrückt und dadurch die T-Zell-Linienspezifität bewahrt (Ikawa et al. 2010; Li et al. 2010; Li 2010). Bei *Bcl11b*-Knockout arretiert die T-Zell-Entwicklung im DN2-Stadium, wobei keine ordnungsgemäße Herunterregulation des Expressionsprogramm von Vorläuferstammzellen stattfindet, hingegen eine Hochregulation von Genen von myeloischen, dendritischen und NK-Zellen (Ikawa et al. 2010; Li et al. 2010). Li (2010) stellte fest, dass Zellen bei *Bcl11b*-Verlust nicht nur in frühen DN-Stadien, sondern bis hin zu reifen Stadien Merkmale von NK-Zellen entwickeln. Diese sogenannten *Induced T-to-natural-killer cells* (ITNK, siehe Kapitel 1.5) exprimieren nicht nur Oberflächenmarker von NK-Zellen, ihr Transkriptionsprogramm zeigt auch mehr Gemeinsamkeiten mit dem von NK-Zellen als dem von CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten.

Die Bewahrung der T-Zell-Linie durch Bcl11b ist zum Teil auf die Repression der Gene *Id2* und *Zbtb16* zurückzuführen, welche die Transkriptionsfaktoren Id2 und Plzf kodieren: Im Vergleich zu alleinigem *Bcl11b*-Knockout finden sich bei doppeltem Knockout von *Bcl11b* und *Id2* weniger Zellen mit linienspezifischen Markern von NK-Zellen (NK1.1) und myeloischen Zellen (CD11c). Bei doppeltem Knockout von

*Bcl11b* und *Zbtb16* fiel eine deutlich niedrigere Zellzahl mit Expression von NK1.1, aber eine höhere Zellzahl mit Expression von CD11c als bei isoliertem *Bcl11b*-Knockout auf. *Id2* und *Plzf* fördern demzufolge den NK-Zell-Phänotyp, *Id2* auch die Differenzierung zu myeloischen Zellen. (Hosokawa et al. 2018) Schon zuvor spekulierten Fujimoto et al. (2007), dass *Id2* in T-Zellen inhibiert werden muss, da einige Zellen des DN1-Stadiums bei forcierter Expression von *Id2* NK-Zell-Identität annehmen.

Eine Art Entscheidungsrolle von *Bcl11b* bezüglich verschiedenen Zellschicksalen kann auch in anderen Lymphozytenpopulationen beobachtet werden. So dient *Bcl11b* der Aufrechterhaltung des Differenzierungsprogramms von ILC2 sowie von zwei Subgruppen von invarianten Natürlichen-Killer-T-Zellen, den iNKT1 und iNKT2, während ILC3- und iNKT17-assoziierte Gene unterdrückt werden (Califano et al. 2015; Uddin et al. 2016).

Bei Induktion der *Bcl11b*-Deletion zu späteren Zeitpunkten der T-Zell-Entwicklung fallen eine stark reduzierte Zahl von Thymozyten und eine gesteigerte Apoptosesensitivität auf (Wakabayashi et al. 2003b). Es zeigen sich ein Entwicklungs- und Proliferationsarrest im DN3-Stadium (Wakabayashi et al. 2003b; Inoue et al. 2006). *Bcl11b*-Knockout-Mäuse weisen eine eingeschränkte Rekombination der TZR- $\beta$ -Ketten-Gene auf und exprimieren den Prä-TZR zwar intrazellulär, aber nicht auf ihrer Oberfläche. Passend hierzu fanden Hosokawa et al. (2018) Bindestellen auf dem Gen der  $\beta$ -Kette des TZR (*Tcrb*). Die fehlende Prä-TZR-Signaltransduktion kann jedoch nicht alleiniger Grund für den ausbleibenden Übergang zum DN4-Stadium sein, da die Einführung von  $\alpha\beta$ -TZR-Transgenen den Entwicklungsarrest nicht kompensiert (Inoue et al. 2006). Longabaugh et al. (2017) erkannten zudem Gene des CD3-Komplexes (*CD3d*, *CD3e* und *CD3g*), welcher am TZR-Komplex beteiligt ist, als aktivierte Zielgene von *Bcl11b*.

Untersuchungen mit Deletion von *Bcl11b* jenseits der DN-Stadien zeigen, dass auch der Entwicklungsschritt von DP-Zellen zu SP-Zellen (CD8<sup>+</sup>- oder CD4<sup>+</sup>-T-Zellen) blockiert wird (Albu et al. 2007), obwohl die Expression von *Zbtb7b* (*Thpok*) und *Runx3*, den Schlüsselregulatoren der Entwicklung von CD4<sup>+</sup>- bzw. CD8<sup>+</sup>-Zellen, bei *Bcl11b*-defizienten DP-Zellen hochreguliert ist (Kastner et al. 2010; Kojo et al. 2017).

Auch in reifen T-Zellen kommen *Bcl11b* vielfältige Aufgaben zu. So wird der Transkriptionsfaktor für die Generierung von funktionsfähigen Effektorzellen, aber auch für die Gedächtniszellbildung benötigt. Bei Infektion mit Listerien, Influenzavirus oder Pockenvirus ist die klonale Proliferation, die Sekretion von Granzym B und

Perforin sowie die Zytokinproduktion von IFN- $\gamma$  und TNF in aktivierten Effektorzellen bei *Bcl11b*-Knockout reduziert (Zhang et al. 2010; Abboud et al. 2016). Einen Grund für die eingeschränkte Proliferation bei Antigenstimulation vermuten Zhang et al. (2010) in der reduzierten Genexpression des Korezeptors CD8 und der Phospholipase Cy1. Des Weiteren fördert der *Bcl11b*-Knockout trotz normaler Expressionslevel der Transkriptionsfaktoren T-bet und Eomes die Entstehung von kurzlebigen Effektorzellen (Klrg1<sup>hi</sup>, IL-7-R $\alpha$ <sup>low</sup>), während die Entwicklung von virusspezifischen Gedächtniszellen (Klrg1<sup>low</sup>, IL-7-R $\alpha$ <sup>high</sup>) eingeschränkt verläuft (Abboud et al. 2016). In TH2-Zellen moduliert *Bcl11b* die Expression TH2-assoziiierter Gene durch transkriptionelle Interaktion mit dem dafür essentiellen Transkriptionsfaktor Gata3 sowie durch aktivierende Wirkung auf den Genlokus von *Gata3* (Lorentsen et al. 2018; Fang et al. 2018).

### 1.3.3 Regulation der *Bcl11b*-Expression

Einige für die T-Zell-Differenzierung essentielle Transkriptionsfaktoren sind auch für die *Bcl11b*-Expression bedeutsam. Der *Bcl11b*-Genlokus enthält cis-regulatorische Elemente mit Bindungsstellen für Gata3, Tcf-1, Runx1 und Rbpj, das DNA-Bindeprotein des Notch-Signalwegs (Li 2010; Li et al. 2013; Kueh et al. 2016). Während Gata3 und Tcf-1 die Voraussetzung für die *Bcl11b*-Aktivierung in T-Vorläuferzellen schaffen und Notch im DN2a-Stadium die Wahrscheinlichkeit der erstmaligen Aktivierung der *Bcl11b*-Expression erhöht, spielt Runx1 eine Rolle bei der Regulation der Höhe der *Bcl11b*-Expression und ihrer Aufrechterhaltung bis zu reifen T-Zellen (Kueh et al. 2016).

Als notwendige Bedingung für die T-Zell-spezifische Expression von *Bcl11b* wurde ein 850 Kilobasen hinter dem *Bcl11b*-Gen gelegenes cis-regulatorisches Element, der *Major Peak*, identifiziert. Dieser interagiert mit der Promoterregion und Intronsequenzen von *Bcl11b*. Die Promoterregion von *Bcl11b* und der *Major Peak* weisen im DN1-Stadium hauptsächlich reprimierende Histonmethylierungen, im Zuge der Hochregulation von *Bcl11b* im DN2-Stadium vor allem aktivierende Histonmodifikationen auf. Andere hämatologische Zelllinien bewahren hingegen ihr reprimierendes Methylierungsmuster. Der *Major Peak* enthält wie *Bcl11b* Bindestellen für Tcf-1, Gata3 und Runx1, aber auch für Ikaros und Pu.1. (Li et al. 2013)

In frühen T-Zell-Stadien könnte die Expression von *Bcl11b* indirekt durch den IL-2-Rezeptor  $\beta$  (IL-2R $\beta$ ) verhindert werden. Sehr hohe Konzentrationen von IL-2, IL-7 oder

IL-15 aktivieren den IL-2R $\beta$  und führen über den JAK-STAT-Weg zur Unterdrückung des Notch-Signalwegs. Folglich wird *Bcl11b* vermindert induziert. (Li 2010) Bei Kultivierung unter einer hohen Konzentration von IL-7 arretieren Vorläuferzellen im DN2-Stadium unter Beibehaltung von myeloischem und NK-Zell-Potential. Sowohl retroviral transduziertes *Bcl11b* als auch die Reduktion der IL-7-Konzentration führen zu einer Wiederaufnahme der Entwicklung zu T-Zellen. (Ikawa et al. 2010)

Die Aktivität von Bcl11b kann auch durch posttranslationale Modifikationen eingeschränkt werden. So führen Phosphorylierungen von Bcl11b durch die Proteinkinase C oder die MAP-Kinase zu einer verminderten Rekrutierung von Korepressoren und damit zu einer verminderten Repression von Genen (Zhang et al. 2012; Dubuissez et al. 2016).

### 1.3.4 Einfluss auf Apoptose und Zellzyklus

Auch wenn die genauen Mechanismen des Einflusses von Bcl11b auf apoptotische Vorgänge nicht bekannt sind, wurden Zusammenhänge zu mehreren Molekülen gefunden, die am Zellzyklus oder an der Apoptose beteiligt sind. So reprimiert Bcl11b z.B. CdK-Inhibitoren und ist an einer Feedbackschleife von p53 beteiligt (Topark-Ngarm et al. 2006; Cherrier et al. 2009; Obata et al. 2012).

Eine gezielte Suche nach Bcl11b-regulierten, apoptoseassoziierten Genen wurde von Forschungsgruppen angestellt, welche eine verstärkte Apoptose bei Bcl11b-Verlust beobachteten (Inoue et al. 2006; Albu et al. 2007; Kamimura et al. 2007a; Grabarczyk et al. 2007; Huang et al. 2010; Huang et al. 2011; Fu et al. 2017). Dies widersprach auf den ersten Blick der anerkannten Funktion als Tumorsuppressorgen. Inoue et al. (2006) und Albu et al. (2007) bemerkten unter *Bcl11b*-Verlust eine hohe Apoptoserate in DN4- und DP-Zellen, einhergehend mit einer verminderten Expression der antiapoptotischen Bcl-Proteine Bcl2 und BclxL. In malignen T-Zellen der humanen Leukämie-/Lymphom-Zelllinien Jurkat, Hut78 und Molt-4 zeigte sich ebenfalls ein verstärkter Zelltod nach Einsatz von gegen *BCL11B* gerichteter *small interfering RNA* (siRNA). Die Apoptose wurde von der Herunterregulation von *BCLxL* und von Molekülen in der Signalkette des Wachstumsfaktors TGF $\beta$ , *SPP1* und *CREBBP*, begleitet. Weiterhin fand sich eine vermehrte Expression des in den extrinsischen Apoptoseweg eingebundenen Todesrezeptors *TRAIL* und der proapoptotischen Bcl-Moleküle *BNIP3* und *BIK*. (Grabarczyk et al. 2007; Huang et al. 2011) In nicht-malignen reifen T-Zellen konnte unter *BCL11B*-Knockdown zwar auch eine starke Herunterregulation von *BCLxL* und gering erhöhte Expression von *TRAIL* gesehen

werden, jedoch war hier keine gesteigerte Apoptose zu vermerken (Grabarczyk et al. 2007).

Auch auf Proteinebene ergaben Analysen von mit *BCL11B*-siRNA behandelten Jurkat- und Hut78-Zellen Hinweise auf sowohl extrinsische als auch intrinsische Apoptosemechanismen. Des Weiteren fanden sich erhöhte Level von Proteinen, die den G1/S-Phasen-Übergang im Zellzyklus fördern, eine erhöhte Proliferation anzeigen und eine Rolle bei der Einleitung der Apoptose spielen. (Karanam et al. 2010) Außerdem ist bei *BCL11B*-Knockdown die Phosphorylierung der Checkpointkinase Chk1 beeinträchtigt, welche normalerweise bei unvollständiger Replikation den Zellzyklus arretiert und die Reparatur einleitet. Dadurch seien die Zellen sensitiver für eine durch akkumulierte DNA-Schäden induzierte Apoptose. (Kamimura et al. 2007a) In Zusammenschau der erhöhten proliferationsfördernden Proteine und verminderten Reparaturreinleitung bei *BCL11B*-Knockdown wurde vorgeschlagen, dass *BCL11B* eine unkontrollierte Proliferation mit akkumulierenden DNA-Schäden verhindert (Kamimura et al. 2007a; Karanam et al. 2010).

### **1.3.5 Einfluss auf Tumorgenese**

Untersuchungen des Einflusses von *BCL11B* auf hämatologische Neoplasien zeigen unterschiedliche Ergebnisse. Initial wurde *Bcl11b* als Tumorsuppressorgen bekannt, da strahleninduzierte Lymphome *Loss-of-function*-Mutationen von *Bcl11b* aufweisen und die Transfektion intakter *Bcl11b*-Gene das Lymphomwachstum unterdrückt (Matsumoto et al. 1998; Wakabayashi et al. 2003a). Gutierrez et al. (2011) fanden bei 9 % von Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie der T-Zellen (T-ALL) Missense-Mutationen oder Mikrodeletionen im *BCL11B*-Gen, meist im Bereich der DNA-bindenden Zinkfinger. Weitere Fallberichte von T-ALL publizierten Punktmutationen, Translokationen, Inversionen, aber auch Überexpression von *BCL11B* (Przybylski et al. 2005; Oshiro et al. 2006; Strehl et al. 2007; Karlsson et al. 2007). Auch in lymphatischen Tumoren mit *Atm*-Defizienz, *p53*-Mutation und *Tlx1*-Überexpression sowie bei *Bcr/Abl*-Translokation der chronisch myeloischen Leukämie finden sich im murinen Modell gehäuft Mutationen von *Bcl11b*, welche für die Entwicklung von Tumoren sensibilisieren (Kamimura et al. 2007b; Nagamachi et al. 2009; Zha et al. 2010; Keersmaecker et al. 2010). Dabei zeigt *Bcl11b* Haploinsuffizienz: Bereits ein defektes Allel scheint die Lymphomentwicklung zu begünstigen (Kamimura et al. 2007b). Die Überexpression von *Bcl11b* in *TP53*-mutierten T-ALL-Zellen bewirkt eine Unterdrückung deren Wachstums (Ha et al. 2017). Als Erklärungsansätze für die



Tumorgenese bei nicht intaktem *BCL11B* kommen sowohl der mögliche Differenzierungsarrest als auch die Beeinflussung von Zellzyklus und Apoptose (siehe Kapitel 1.3.5) in Frage.

In anderen Studien wird BCL11B jedoch statt einer Funktion als Tumorsuppressor eine tumorfördernde Rolle zuteil. So zeigt sich bei Knockdown von *BCL11B* im Gegensatz zu nicht-malignen T-Zellen eine deutlich verstärkten Apoptose in malignen T-Zellen der Leukämie-/Lymphom-Zelllinien HuT78, Jurkat und Molt-4 (Grabarczyk et al. 2007; Huang et al. 2011). Eine Überexpression von *BCL11B* bei HuT78- und Jurkat-Zellen führt hingegen zum Versagen von alkylierenden Chemotherapeutika im Sinne einer Apoptoseresistenz (Grabarczyk et al. 2010). Auch in Untersuchungen von kutanen T-Zell-Lymphomen wurde ein Zusammenhang zwischen erhöhter BCL11B-Konzentration, korrelierend mit dem Stadium der Erkrankung, und einer erhöhten Apoptoseresistenz gestellt (Gu et al. 2013, Fu et al. 2017).

#### 1.4 Konditioneller Knockout von *Bcl11b*

In den Studien von Peng Li (2010), im nachfolgenden Kapitel zu ITNK genauer beschrieben, wurde zur Deletion von *Bcl11b* ein CreERT2-Loxp-Rekombinasesystem mit Induktion durch 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) verwendet. Mit diesem erfolgt die Exzision von Exon 4 des Gens, wodurch die DNA-Bindung nicht mehr möglich ist. Auf gleiche Art und Weise wurde auch die *Bcl11b<sup>flox/flox</sup>*-Mauslinie generiert, welche für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit Anwendung fand.

Das Cre-Loxp-Rekombinase-System stammt ursprünglich aus dem Bakteriophagen P1 (Sternberg und Hamilton 1981). Cre ist eine Rekombinase, deren Erkennungsstelle Loxp zwei randständige palindromische Sequenzen enthält. Das Einbringen von Loxp-Stellen vor und hinter die zu deletierende Zielsequenz nennt sich floxen (*floxed = flanked by loxp*). Zum Heraustrennen aus dem DNA-Strang binden jeweils zwei Cre-Rekombinasmoleküle an die Loxp-Stellen und führen die palindromischen Sequenzen durch Tetramerbildung zusammen. (Nagy 2000) Somit entsteht eine Ringstruktur, die den geflochten Genabschnitt enthält und zügig von der Zelle abgebaut wird (Plitz 1999).

Zur Generierung von Knockout-Mäusen wird ein Vektor mit der Zielsequenz und den Loxp-Sequenzen durch Elektroporation in embryonale Stammzellen eingebracht und dort über homologe Rekombination in das Genom integriert. Anschließend erfolgt die Injektion erfolgreich transfizierter Stammzellen in Blastozysten. Nach Überführung in die Uteri pseudoschwangerer Mäuse gebären diese chimäre Nachkommen mit

genetischen Anteilen aus den eigenen Zellen der Blastozyste und den transgenen Stammzellen. (Hall et al. 2009) Aus den Nachkommen von chimären Mäusen und Wildtyp-Mäusen werden Weibchen und Männchen ausgewählt, die heterozygot für das gefloxtete Gen sind (Genotyp *Zielgen<sup>flox/+</sup>*), und miteinander gekreuzt. Innerhalb der nächsten Generation zeigen nach den Mendelschen Regeln ein Viertel der Mäuse den homozygoten Genotyp *Zielgen<sup>flox/flox</sup>*. Durch Kreuzung mit transgenen Mäusen, welche die Cre-Rekombinase im Genom integriert haben, entstehen *Zielgen<sup>flox/flox</sup>Cre<sup>+</sup>*-Mäuse. (Li 2010)

Der Verlust von Genen in der embryonalen Entwicklung führt jedoch häufig zum prä- oder postnatalen Tod oder zu schweren Entwicklungsstörungen (Hall et al. 2009). Mit einem induzierbaren Cre-Loxp-System kann dies umgangen werden. Die genetische Information der Cre-Rekombinase wird dazu mit der genetischen Information des humanen Östrogenrezeptors (ERT2), welcher eine mutierte ligandenabhängige Domäne aufweist, ligiert. Auf Proteinebene entsteht dadurch der Cre-ERT2-Komplex. Durch synthetisch hergestelltes Tamoxifen oder 4-Hydroxytamoxifen, nicht aber durch endogenes Estrogen, erfolgt die Aktivierung des zytoplasmatischen Cre-ERT2-Komplexes und folglich die Translokation in den Zellkern. Somit kann der Knockout zu einem beliebigen Zeitpunkt *in vivo* oder *in vitro* induziert werden. Der Einbau der Cre-Rekombinase hinter einen gewebsspezifischen Promotor gewährleistet eine gewebespezifische Deletion des Zielgens. Dies beugt ausgedehnte und behindernde Funktionsstörungen in den Organismen vor. (Nagy 2000) Manche Forschungsgruppen nutzten auch andere Modelle des konditionellen Knockouts von *Bcl11b*, in denen die Cre-Rekombinase z.B. unter Kontrolle des Lck-Promoters steht (Kastner et al. 2010; Zhang et al. 2010; Abboud et al. 2016).

## 1.5 ITNK

### 1.5.1 Begriffserklärung und Eigenschaften

Peng Li (2010) demonstrierte, dass der *Bcl11b*-Verlust in murinen Thymozyten *in vitro* zur Ausbildung von NK-Zell-Merkmalen führt. Diese sogenannten Induzierten T-zu-Natürlichen-Killerzellen (engl. *Induced T-to-natural-killer cells*, ITNK) exprimieren die NK-Zell-Oberflächenmarker NKp46, NK1.1 und DX5 und sind in der Lage, Stromazellen abzutöten. Weiterhin weisen sie morphologische Ähnlichkeit mit NK-Zellen auf: Es handelt sich um größere Zellen mit deutlicheren Granula im Vergleich zu Kontroll-CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten. Die Reprogrammierung wurde nur in Zellen beobachtet, denen beide Allele von *Bcl11b* fehlen. ITNK konnten durch Induktion des

*Bcl11b*-Verlustes *in vitro* nicht nur aus DN1- und DN2-Thymozyten gewonnen werden, sondern auch aus Differenzierungsstufen, die das Potential zur Entwicklung zu anderen Lymphozytenarten eigentlich schon verloren haben: DN3-Thymozyten, DP-Thymozyten und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. Eine Reprogrammierung zu ITNK aus T-(Vorläufer-)Zellen ist somit vom DN1-Stadium an bis zu reifen T-Zellen möglich. Dies macht *Bcl11b* sowohl für die Entwicklung als auch für die Bewahrung der T-Zell-Identität unerlässlich. Myeloische Zellpotentiale und B-Zell-Potentiale konnten dagegen auch unter Kulturbedingungen, die diese Zellarten fördern, nicht reaktiviert werden, stattdessen entwickelten sich auch hier ITNK. (Li 2010)

Die  $\beta$ -Kette des TZR und sein Korezeptor CD3 wurden nicht in ITNK exprimiert, welche aus DN1-, DN2 und DN3-Zellen hervorgingen. DP-Zellen sowie reife T-Zellen zeigten jedoch weiterhin die Expression von TZR $\beta$  und CD3. Li schlussfolgerte, dass eine direkte Umprogrammierung von reifen T-Zellen zu ITNK anstelle einer vorhergehenden Reprogrammierung zu Vorläuferzellen stattfindet. (Li 2010)

Die Gewinnung von ITNK aus CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und  $\gamma\delta$ -T-Zellen gelang *in vivo* nach Tamoxifen-Behandlung von *Bcl11b*<sup>flox/flox</sup>-Mäusen, nicht aber *in vitro*. Denkbar ist, dass sich die Reprogrammierung von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zu ITNK durch die größere Ähnlichkeit ihrer Transkriptionsprogramme einfacher gestaltet. Ein *in-vivo*-Modell bestätigte die *in vitro* beobachtete bevorzugte Entwicklung zu CD8<sup>+</sup>-ITNK statt CD4<sup>+</sup>-ITNK. Die Kultivierung mit IL-2 oder IL-15 erhöhte den Anteil von ITNK und die Proliferation deutlich, so entwickelten sich mit IL-2 kultivierte DN3-Zellen nach OHT-Behandlung zu 72 % zu ITNK, ohne IL-2 nur zu 28 %. Nach zwei bis drei Wochen fanden sich zehn Mal mehr ITNK verglichen mit Kulturen ohne IL-2-Zugabe, was auf ein für NK-Zellen ungewöhnlich großes Proliferationspotential der ITNK hinweist. (Li 2010)

### 1.5.2 Genexpressionsprofil

Mittels Genexpressionsanalysen zeigte (Li 2010) deutliche Unterschiede im globalen Expressionsprofil von ITNK im Vergleich zu DN3-Thymozyten, aus denen sie gewonnen wurden. Vielmehr ähnelte das Expressionsprofil dem von konventionellen Natürlichen Killerzellen, welche mit Lymphokinen aktiviert wurden, den *Lymphokine-activated killer cells* (LAKs). Etwa 24–48 Stunden nach *Bcl11b*-Verlust ließ sich unter anderem eine Herunterregulation der T-Zell-assoziierten Gene *Bcl11b*, *Tcrb*, *CD3e*, *Notch1*, *Hes1*, *Est1*, *Gata3*, *Dtx1* und *Tcf-1* sowie eine Induktion von NK-Zell-assoziierten Genen wie *Id2*, *Nfil3*, *Il2rb*, *Zbtb32*, *Zfp105*, *Klrd1*, *Lta*, *Plcg2* und *Ifng* feststellen. Auf Proteinebene konnten die Effektormoleküle Trail, Perforin und IFN- $\gamma$

sowie NKG2A/C/E-Rezeptoren nachgewiesen werden. Inhibitorische Ly49-Rezeptoren fanden sich dagegen nur auf ITNK, welche die Umprogrammierung *in vivo* erfahren hatten. *In vivo* reprogrammierte ITNK zeigten zusätzlich eine im Vergleich zu CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten verminderte Expression von *CD8a* und eine Reduktion des für die T-Zell-Entwicklung bedeutsamen Transkriptionsfaktors *Tbx21* (T-bet) und Zytokinrezeptors *Il7ra*. (Li 2010) Hiermit wurde bestätigt, dass Bcl11b die T-Zell-Identität durch Aufrechterhaltung des T-Zell-Expressionsprogramms und Unterdrückung NK-Zell-assoziiierter Gene bewahrt.

### 1.5.3 Fähigkeit zur Tumorreduktion und Potential in der Antitumorthherapie

Li (2010) demonstrierte die Fähigkeit von ITNK zur Tumorreduktion bei drei Krebszelllinien mittels *51Cr-release Assay*. *In vitro* umprogrammierte ITNK töteten B16F10-Melanomzellen und RMA-S-Lymphomzellen, Zelllinien mit reduzierter MHC-I-Expression, effizient ab. RMA-Lymphomzellen mit normalen MHC-I-Leveln wurden jedoch nicht zerstört. Die Effizienz der Apoptoseinduktion war insgesamt etwas geringer als die von LAKs. *In vivo* umprogrammierte ITNK schalteten hingegen auch die MHC-I-exprimierenden RMA-Lymphomzellen aus und wiesen sogar eine höhere Potenz als LAK auf. *Rag2<sup>-/-</sup>Il2rg<sup>-/-</sup>*-Mäusen wurden OHT-behandelte DP-Thymozyten injiziert, die dort umprogrammieren und die Zahl von Lungenmetastasen durch zwei Wochen später injizierte B16F10-Melanomzellen auf ein Zehntel reduzierten.

Das MHC-I-unabhängige, hohe zytotoxische Potential gegenüber Tumorzelllinien *in vivo* machen die ITNK zu potentiellen Kandidaten für die Tumorthherapie. In den behandelten Mäusen zeigten sich im Beobachtungszeitraum keine Entzündungsprozesse oder sonstige gesundheitliche Beeinträchtigungen, die Empfängerzellen wurden scheinbar nicht durch die ITNK angegriffen. Neben der Selbsttoleranz wiesen die Zellen günstige Proliferations- und Homöostaseeigenschaften auf. Unter IL-2-Stimulation entwickelten ITNK ein hohes Proliferationspotential. Während LAKs nach ca. 7–10 Tagen IL-2- und IL-15-Stimulation ihre Proliferations- und zytotoxische Aktivität verlieren, proliferierten ITNK aus Splenozyten von Tamoxifen-behandelten Mäusen *in vitro* für 3 Wochen unter Beibehaltung der zytotoxischen Aktivität. Die Zahl mit OHT-behandelten *Bcl11b<sup>flox/flox</sup>*-DP-Thymozyten, die in *Rag2<sup>-/-</sup>Il2rg<sup>-/-</sup>*-Mäusen einer Proliferation untergingen, blieb mindestens drei Monate lang konstant. Die im Vergleich zu NK-Zellen längere Lebensspanne könnte laut Li eine beibehaltene T-Zell-Eigenschaft sein. (Li 2010)

## 1.6 Zielstellung der Arbeit

Die Immuntherapie hat sich als eine bedeutende Säule der Krebstherapie etabliert. Auch Strategien des adoptiven Zelltransfers von genetisch modifizierten Immunzellen sind Gegenstand der Forschung. Durch Knockout des für die T-Zell-Identität notwendigen Transkriptionsfaktors *Bcl11b* werden T-Vorläuferzellen und reife zytotoxische T-Zellen in Zellen umprogrammiert, die über Merkmale und Funktionen von Natürlichen Killerzellen verfügen. Diese *Induced T-to-natural-killer cells* (ITNK) stellen durch ihre vorteilhafte Kombination von Eigenschaften vielversprechende Kandidaten für den adoptiven Zelltransfer dar. Sie zeigen eine erstaunliche zytotoxische Aktivität gegenüber verschiedenen Tumorzelllinien und sind in der Lage, das Metastasenaufkommen von Melanomen drastisch einzudämmen. ITNK zeichnen sich durch das MHC-I-unabhängige Vorgehen gegen Tumorzellen, ein erstaunlich hohes Expansionspotential und Langlebigkeit aus. Für ihre Generierung steht eine große Zahl von reifen CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten im Knochenmark und peripheren Blut zur Verfügung. Die Kombination von Verfügbarkeit und Proliferationsstärke von T-Zellen mit antigenunabhängigem Vorgehen und aktiverem Funktionszustand der Natürlichen Killerzellen birgt somit großes Potential für den adoptiven Zelltransfer und könnte bisherige Einschränkungen des Einsatzes von T-Zellen oder Natürlichen Killerzellen überwinden.

In der Hämatologie und Onkologie der Universitätsklinik Greifswald werden ITNK aus murinen, reifen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen über konditionellen Knockout von *Bcl11b* generiert und untersucht. Die von anderen Forschungsgruppen gewonnenen Ergebnisse zur Expression von T- und NK-Zell-assoziierten Genen sowie zur Proliferation und Überlebensfähigkeit der ITNK können jedoch nicht vorbehaltlos auf die eigens entwickelten ITNK übertragen werden. Um Möglichkeiten und Bedingungen eines Einsatzes von ITNK gegen maligne Zellen beurteilen zu können, ist ein genaueres Verständnis der Reprogrammierung notwendig. Es stellen sich die Fragen, welche Merkmale von NK-Zellen angenommen und welche Merkmale von T-Zellen beibehalten werden, welche Dynamik diese Merkmale nach Induktion des Knockouts zeigen, über welche Wege der Zelltod von Zielzellen ausgelöst wird, was ihre Proliferation und Überlebensfähigkeit beeinflusst und welche Auswirkungen die Deletion des vierten Exons von *Bcl11b* auf die Transkription des verbliebenen Genanteils hat. Diesen Aspekten nähert sich die vorliegende Arbeit durch Analyse der bei *Bcl11b*-Knockout induzierten Veränderungen auf Transkriptionsebene.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Die Verwendung nicht gekennzeichnete Markennamen lässt nicht auf die freie Verfügbarkeit der Produkte schließen.

#### 2.1.1 Geräte

<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
CO <sub>2</sub> -Inkubator, Heraecell 150	Heraeus
Durchflusszytometer, FACSCalibur	BD Biosciences
Elektrophoresekammern	VWR International
Elektrophoresesystem, Mini Trans-Blot cell	Bio-Rad
Energieversorgung, Electrophoresis Power Supply	VWR
Energieversorgung, PowerPac HC Power Supply	Bio-Rad
Hybridisierungsöfen, Biometra OV3	Biometra
Laborschüttler, Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Megafuge 1.0 R	Heraeus
Metallblockthermostat	Liebisch
Mikroplattenleser, Infinite M200 NanoQuant	Tecan
Mikroskop, Motic AE31E Inverted Microscope	Motic
Mikrotiterplattenschüttler, PMS-1000	Grant Bio
Mikrowelle, Microstar MD 6459	Microstar
Mini-Zentrifuge, Galaxy mini	VWR
Sicherheitswerkbank, Herasafe HS 12	Heraeus
Thermocycler, 7500 Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Thermocycler, C1000 Thermal Cycler	Bio-Rad
Thermocycler, GeneAmp PCR Systems 2400	Applied Biosystems
Thermocycler, GeneAmp PCR Systems 9700	Applied Biosystems
Thermomixer comfort	Eppendorf
Transilluminator, ChemiDoc XRS+ System	Bio-Rad
Transilluminator, IL-350-M	Bachofer
Transilluminator, UV bench 26 Xi	Analytik Jena AG
Zentrifuge mit Vortexer	neoLab
Zentrifuge, Biofuge pico	Heraeus
Zentrifuge, Centrifuge 5415R	Eppendorf
Zentrifuge, Varifuge 3.0 RS	Heraeus

## 2.1.2 Gebrauchsmaterialien

Produktbezeichnung	Hersteller
8-Kanal-Pipette, Eppendorf Research, 8 x 30-300 µl	Eppendorf
Pipetten, Eppendorf Research 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf
Pipetten, Pipetman Classic 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Gilson
Säulenhalterung, MACS MultiStand	Miltenyi Biotec
Pipettierhilfe, pipetus	Hirschmann
Zählkammer, Neubauer	Marienfeld

## 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Produktbezeichnung	Hersteller
Elektrophoreseigel, Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Precast Gels 10 %	Bio-Rad
Entwicklungshüllen, Development Folders	Thermo Fisher Scientific
Filter, Pre-Seperation Filters (30 µm)	Miltenyi Biotec
Filterspitzen, SafeSeal SurPhob Spitzen 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Biozym
Gel-Blotting-Papiere, Whatman, 3mm	Carl Roth
Membran, Roti-PVDF, Porengröße 0,45 µm	Carl Roth
Mikrotiterplatte, Corning 96-Well UV-Transparent Microplate	Thermo Fisher Scientific
Mikrotiterplatten, MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate	Thermo Fisher Scientific
Mikrotiterplatten, PCR 96-Well TW-MT-Platte, farblos	Biozym
Mikrotiterplattenfolien, MicroAmp Optical Adhesive Film	Thermo Fisher Scientific
PCR-Streifen, Sapphire PCR 8er Streifen 0,2 ml	Greiner Bio-One
PCR-Streifen-Deckel, MicroAmp Optical 8 -Cap Strip	Thermo Fisher Scientific
Pipetten, Serologische Pipette 2 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt
Probenröhrchen 1,5 ml, farblos, steril	Biozym
Reagiergefäße 1,5 ml SafeSeal	Sarstedt
Reaktionsgefäße 3810X 1,5 ml	Eppendorf
Röhrchen, Falcon 50 ml Polypropylene Conical Tube	Thermo Fisher Scientific
Röhrchen, Leucosep 50, aseptic, mit Ficoll-Paque	Greiner Bio-One
Röhre, 15 ml, 120 x 17 mm, PP	Sarstedt
Rundbodenröhrchen, Falcon 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube	Thermo Fisher Scientific
Säulen, LS Columns	Miltenyi Biotec
Zellkulturflasche, TC-Flasche T25, Suspens., Bel.K.	Sarstedt

## 2.1.4 Chemikalien

Produktbezeichnung	Hersteller
2-Propanol (Isopropanol)	Th. Geyer
7-AAD Viability Staining Solution	Thermo Fisher Scientific
Aqua ad iniectabilia Braun	Braun
Biozym LE Argarose	Biozym
Chloroform z.A.	Th. Geyer
Coulter Flow-Count Fluorospheres	Beckman Coulter
DEPC-treated water	Thermo Fisher Scientific
dNTP Mix Applied Biosystems GeneAmp dNTP Blend (10mM)	Thermo Fisher Scientific
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS), no calcium, no magnesium	Thermo Fisher Scientific
Essigsäure (Eisessig) 100 %	Merck
Ethanol z.A.	Th. Geyer
GelPilot DNA Loading Dye, 5x	QIAGEN
GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
Glycogen from Mytilus edulis	Sigma-Aldrich
Milchpulver	Carl Roth
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
peqGreen RNA/DNA Transcript	VWR peqLab
Pierce Lane Marker Reducing Sample Buffer	Thermo Fisher Scientific
Random Primers	Promega
RNase A (20 mg/ml)	Thermo Fisher Scientific
TRIzol Reagent	Thermo Fisher Scientific
Tropix CDP-Star	Applied Biosystems
Tween 20	Carl Roth
(Z)-4-Hydroxytamoxifen	Sigma-Aldrich

## 2.1.5 Zellkulturmedium

Bezeichnung des Bestandteils	Menge	Hersteller
RPMI Medium 1640 (1X) + GlutaMAX	500 ml	Thermo Fisher Scientific
LGM-3	500 ml	Lonza
Fetal Bovine Serum	50 ml	PAN-Biotech
MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100X)	5 ml	Thermo Fisher Scientific
Sodium Pyruvate (100 mM)	5 ml	Thermo Fisher Scientific
MycoZap Prophylactic	1 ml	Lonza
Mouse IL-2	1 µl pro ml Medium	Miltenyi Biotec



## 2.1.6 Puffer

Bezeichnung und Bestandteile	Menge	Hersteller
Gelbeladungspuffer		
- Aqua ad iniectabilia Braun	500 µl	Braun
- 99 % Glycerol	500 µl	Sigma-Aldrich
- 1X TBE	50 µl	siehe unten (TBE)
- 10 % Bromphenolblau	50 µl	AppliChem
Laufpuffer		
- 10X Tris/Glycine/SDS Buffer	100 ml	Bio-Rad
- Aqua Dest	900 ml	(aus Anlage)
Stripping-Puffer		
- Aqua ad iniectabilia Braun	40 ml	Braun
- Glycin	1,5 g	Carl Roth
- 10 % SDS	1 ml	Carl Roth
- Tween 20	1 ml	Sigma-Aldrich
- 2 M HCl	Titration auf pH 2,2	Carl Roth
TBE (pH 8,3)		
- Tris	107,81 g	Carl Roth
- Borsäure	55,03 g	Sigma-Aldrich
- EDTA-Na <sub>2</sub> -Salz	7,4 g	USB Corporation
- Aqua Dest	1000 ml	(aus Anlage)
TBS (pH 7,5)		
- Tris	15,76 g	Carl Roth
- Natriumchlorid	9,0 g	Sigma-Aldrich
- Aqua Dest	1000 ml	(aus Anlage)
T-Zell-Isolationspuffer		
- Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	50 ml	Thermo Fisher Scientific
- Fetal Bovine Serum	250 µl	PAN-Biotech
Transferpuffer		
- 10X Tris/Glycin Buffer	100 ml	Bio-Rad
- Methanol	200 ml	J.T. Baker
- Aqua Dest	700 ml	(aus Anlage)

## 2.1.7 Polymerasen

Produktbezeichnung	Hersteller
EmeraldAMP Max PCR Master Mix	Clontech
Power SYBR Green PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific
SuperSript II Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific
+ 0,1 M DTT	
+ 5X First Strand Buffer	

## 2.1.8 Reaktionskits

Produktbezeichnung und verwendete Bestandteile	Hersteller
CD8a <sup>+</sup> T Cell Isolation Kit <ul style="list-style-type: none"> <li>- CD8a<sup>+</sup> T Cell Biotin-Antibody Cocktail</li> <li>- Anti-Biotin MicroBeads</li> </ul>	Miltenyi Biotec
innuPREP DNA Mini Kit <ul style="list-style-type: none"> <li>- Lysis Solution TLS</li> <li>- Proteinase K</li> <li>- Binding Solution TBS</li> <li>- Washing Solution HS</li> <li>- Washing Solution MS</li> <li>- Spin Filter</li> <li>- Receiver Tubes (2 ml)</li> <li>- Elution Tubes (1,5 ml)</li> </ul>	Analytik Jena AG
Micro BCA Protein Assay Kit <ul style="list-style-type: none"> <li>- Micro BCA Reagent A (MA)</li> <li>- Micro BCA Reagent B (MB)</li> <li>- Micro BCA Reagent C (MC)</li> <li>- Albumin Standard Ampules, 2 mg/mL</li> </ul>	Thermo Fisher Scientific
Naive CD8a <sup>+</sup> T Cell Isolation Kit <ul style="list-style-type: none"> <li>- Naive CD8a<sup>+</sup> T Cell Biotin-Antibody Cocktail</li> <li>- Anti-Biotin MicroBeads</li> <li>- CD44 MicroBeads</li> </ul>	Miltenyi Biotec
QIAquick Gel Extraction Kit <ul style="list-style-type: none"> <li>- Buffer PE</li> <li>- Buffer QB</li> <li>- Collection Tubes (2 ml)</li> <li>- QIAquick Spin Columns</li> </ul>	QIAGEN
RIPA Lysis Buffer System <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1X lysis buffer (pH 7.4 ±0.1)</li> <li>- 200mM PMSF in DMSO</li> <li>- protease inhibitor cocktail in DMSO</li> <li>- 100mM sodium orthovanadate in water</li> </ul>	Santa Cruz
T Cell Activation/Expansion Kit, mouse <ul style="list-style-type: none"> <li>- Anti-Biotin MACSiBead Particles</li> <li>- CD3ε-Biotin, mouse</li> <li>- CD28-Biotin, mouse</li> </ul>	Miltenyi Biotec

## 2.1.9 Primer

Name der zu amplifizierenden Sequenz	Sequenz des Vorwärtsprimers	Sequenz des Rückwärtsprimers
B2m	AAGTATACTCACGCCACCCA	AAGACCAGTCCTTGCTGAAG
Bcl11b Exon I–II	CCCAGAGGGAACTCATCACG	CCCAGGCCTCCACACTGTTT
Bcl11b Exon II–III	TCCAGGTCACCCCTGATGAA	GGAAACAGGGTGGGAGAACG
Bcl11b Exon II–IV	GCATCTGTCCCAAGCAGGAG	TGAAGGGCTGCTTGCATGTT
Bcl11b Exon III–IV	CGTTCTCCCACCCTGTTTCC	TGAAGGGCTGCTTGCATGTT
Bcl2	ACGAGTGGGATGCTGGAGAT	GGGTCAGATGGACCACAGGT
BclxL	TGAGTCGGATTGCAAGTTGG	AGAGTGAGCCCAGCAGAACC
Ccr7	AGGAAAACGTGCTGGTGGT	AGGCCTTAAAGTTCCGCACA
CD247	TCACTGCCTTGTTCTGAGAGTG	CAATCTCACTGTAGGCCTCCGC
CD3e	GGTGCTCCAGGATTTCTCGGAA	GCTTGGCCTTGGCCTTCCCTA
CD44	CGCTACGCAGGTGTATTCCA	GTGTGGTTGGCTGCACAGAT
Dap12	GCCTTCTGTTCTTCTGTCTCTC	GGCGACTCAGTCTCAGCAATGT
Fcer1g	TCAGCCGTGATCTTGTTCTTGC	TAGCTGCCTTTCCGACCTGG
Fcgr3	GCCAGGTCCAATCCAGCTACA	CCCTTCCAGAAACACCCGCT
Gzmc	TCAGTCCACATTCCCGTCCCT	AGCCTTGATGTTGTGAGCCCC
Ncr1	GGTGTCAGGGGGCTCAGAGT	CCCAGAGGTTGGGTGTGTCA
Peak1 Start 175	CGTCGTTGGCTACCTTGGGA	GCTGCTCTTGTCAATTGCCCC
Peak1 Start 574	CTTCCTACCACCCAGCCCTG	GAGCTGGCCCCTCTGTTGAT
Peak3 (mit Splicing)	GCTGTTTTAGTGGAGCTGGCTG	CGGGAGCTAACAAGGACAGACT
Peak3 (ohne Splicing)	AGCCTGGTCTCTAAACATCACGT	CCAGAGGCTTTTAATTTGGGGC
Prf1	CGTGTGGGGCTGGATGTGAA	TGAAGTCAAGGTGGAGTGGAGGT
RosaCre	CCATCATCGAAGCTTCACTGAAG	GGAGTTTCAATACCCGAGATCAT GC
RosaWt	CATGTCTTTAATCTACCTCGATGG	CTCTTCCCTCGTGATCTGCAACT CC
Trail	CTTGCCCAGAGGTGGAAGAC	AATGAATGCCCTTTCCGAGA
Trbc	ATCCTCGCAACCACTTCCGC	TGGTGGCAGACAAGACCCCT

Alle Primer wurden von TIB Molbiol synthetisiert.

## 2.1.10 Antikörper

Produktbezeichnung	Hersteller
Rabbit anti-Bcl11b, 300-385A	Bethyl Laboratories
2nd Antibody-AP Goat Anti-Rabbit	Applied Biosystems
Actin Antibody (H-300): sc-10731, rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology
Anti-NKp46-APC, mouse	Miltenyi Biotec
CD8-PerCP, mouse	Miltenyi Biotec
CD8a-FITC, mouse	Miltenyi Biotec
CD3e-FITC, mouse	Miltenyi Biotec
APC Rat Anti-Mouse CD4	BD Pharmingen
PE anti-mouse CD19 Antibody	BioLegend

## 2.1.11 Software und Internetdatenbanken

Bezeichnung	Hersteller/Bereitsteller	Anwendung
7500 Fast Real-Time PCR System Sequence Detection Software v2.0.1	Thermo Fisher Scientific	qPCR (Messung)
BD CellQuest Pro Software	BD Biosciences	Durchflusszytometrie (Messung)
Blast ( <a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a> )	National Center for Biotechnology Information	Vergleich von Gensequenzen
Flowing Software v2.5.1	Flowing Software (by Perttu Terho)	Durchflusszytometrie (Auswertung)
Gene ( <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene</a> )	National Center for Biotechnology Information	Suche nach Genen und Gensequenzen
GO Enrichment Analysis ( <a href="http://geneontology.org/docs/go-enrichment-analysis/">http://geneontology.org/docs/go-enrichment-analysis/</a> )	Gene Ontology	Transkriptomanalyse
i-control v1.12	Tecan	BCA-Assay (Messung)
Image Lab 4.1	Bio-Rad	Gelelektrophorese (Imaging)
Integrative Genomics Viewer 2.4	Broad Institute	RNA-Sequenzierung und Mapping
Microsoft Excel 2013	Microsoft	Datenanalyse und Diagrammerstellung
Molecular Imager Chemi Doc XRS+ (Image Lab 2.0)	Bio-Rad	Western Blot (Auswertung)
Primer3 v4.1.0 ( <a href="http://primer3.ut.ee">http://primer3.ut.ee</a> )	Whitehead Institute for Biomedical Research	Erstellung von Primersequenzen
R 3.5.2	R Foundation	Statistische Analysen

## 2.2 Methodischer Aufbau der Versuchsreihe

Für die in der Arbeit vorliegenden Analysen wurden CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten von konditionellen Knockoutmäusen verwendet. Das vierte Exon ihres *Bcl11b*-Gens, welches der DNA-Bindung dient, ist mit Loxp-Stellen versehen. Ein Teil der Mäuse besaß zusätzlich die genetische Information für die zur Exzision des Exons notwendige Cre-Rekombinase (mit Cre bezeichnet). Einige Wochen vor Versuchsbeginn erfolgte die Überprüfung des Genotyps der Mäuse (siehe Kapitel 2.3), um Cre-positive und Cre-negative Mäuse für die Untersuchungen auszuwählen. Nach ca. 12 Lebenswochen wurden aus den Lymphknoten der Mäuse CD8<sup>+</sup>-T-Zellen isoliert (siehe Kapitel 2.5) und unter Stimulation mit IL-2 und CD3 $\epsilon$ /CD28-Expansionsbeads kultiviert (siehe Kapitel 2.6). Die Zugabe von OHT initiierte den selektiven Knockout von *Bcl11b* (siehe Kapitel 2.7). Eine übersichtliche Darstellung der dadurch entstehenden Versuchsgruppen findet sich in der Einführung zum Ergebnisteil (siehe Kapitel 3.1). Nach zwei Tagen endete die Inkubation mit OHT durch Zentrifugation der Zellen und Einspeisung in neues Zellkulturmedium. Zu diesem Zeitpunkt begann die Zählung der „Tage nach OHT-Behandlung“, welche als Messzeitpunkte für die folgenden Analysen dienten. Durchflusszytometrisch erfolgte die routinemäßige Erfassung der Zellzahl, Zellvitalität und der linienspezifischen Oberflächenmarker (siehe Kapitel 2.9).

Für die Gentranskriptionsanalysen der vorliegenden Arbeit fanden insgesamt sechs Versuche mit CD8<sup>+</sup>-T-Zellen Anwendung, darunter drei Versuche mit Isolation der gesamten CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Population, einschließlich naiver, Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen, und drei Versuche mit Isolation von rein naiven CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. Die RNA wurde zu mehreren Zeitpunkten, zumeist an Tag 1, 4, 7 und 11 nach OHT-Behandlung, aus den kultivierten T-Zellen isoliert (siehe Kapitel 2.10). Für einen Versuch erfolgte die Sequenzierung der RNA-Proben (siehe Kapitel 2.11). Alle Versuche wurden in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben (siehe Kapitel 2.12). Die Expression der Messenger-RNA (mRNA) der zu untersuchenden Gene wurde für mehrere Zeitpunkte mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR) gemessen (siehe Kapitel 2.13) und für drei Versuche, jeweils bestehend aus *Bcl11b*-Knockoutgruppe und den drei Kontrollgruppen, gemittelt und dargestellt. Des Weiteren erfolgte für einen Versuch die Proteinisolation mit nachfolgender Immundetektion mittels Western Blot zum Nachweis des *Bcl11b*-Knockouts auf Proteinebene (siehe Kapitel 2.16 –2.18)

## 2.3 Mäusestamm und Genotypisierung

Für die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden Mäuse des Stamms C57BL/6N von der Zentralen Service- und Forschungseinrichtung für Versuchstiere in Greifswald zur Verfügung gestellt. Dabei handelte es sich um konditionelle Knockoutmäuse, deren Gen *Bcl11b* in beiden Allelen Loxp-Sequenzen aufwies (im Folgenden als *Bcl11b<sup>flox/flox</sup>* bezeichnet). Sowohl *Cre*-positive *Bcl11b<sup>flox/flox</sup>*-Mäuse, welche die genetische Information der *Cre*-Rekombinase besaßen, als auch *Cre*-negative *Bcl11b<sup>flox/flox</sup>*-Mäuse wurden bereitgehalten. Einige Wochen vor Versuchsbeginn erfolgte die Überprüfung des Genotyps der Mäuse, dessen erster Schritt die DNA-Isolation aus Schwanzspitzenbiopsien darstellte (siehe Kapitel 2.4). Mithilfe der klassischen PCR (siehe Kapitel 2.14) wurden das Wildtyp- und das eventuell vorhandene *Cre*-Allel vervielfältigt und durch Gelelektrophorese (siehe Kapitel 2.15) sichtbar gemacht.

## 2.4 DNA-Isolation aus Gewebebiopsien

Die Isolation von DNA aus den Schwanzspitzenbiopsien erfolgte unter Gebrauch des *innuPREP DNA Mini Kits* von Analytik Jena AG. Die Zellyse wurde durch Hinzugabe von 400 µl *Lysis solution TLS* und 25 µl Proteinase K eingeleitet. Nach kurzem Mischen auf dem Vortex-Schüttler folgte eine Inkubation auf dem Thermomixer über Nacht bei 50 °C und einer Mischfrequenz von 900 Umdrehungen/min. Es schloss sich eine einminütige Zentrifugation bei 10.000 g an. Der Überstand wurde in ein 1,5-ml-Tube überführt, mit jeweils 4 µl RNase (10 mg/ml) versetzt und ca. 15 s auf dem Vortex-Schüttler homogenisiert. Im Anschluss an eine fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur wurden 400 µl *Binding Solution TBS* hinzugefügt und mit der Probe erneut 15 s schüttelnd vermischt. Nach Überführen der Mischung in ein mit *Spin Filter* versehenes *Receiver Tube* erfolgte eine Zentrifugation bei 10.000 g für 2 min. Anschließend waren zwei Waschgänge nötig, zunächst mit 500 µl *Washing Solution HS*, dann mit 750 µl *Washing Solution MS*. Beide Waschgänge beinhalteten eine Zentrifugation für 1 min bei 10.000 g. Der *Spin Filter* wurde in ein neues *Receiver Tube* überführt und 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Es folgte das Einsetzen des *Spin Filters* in ein *Elution Tube*. 100 µl Aqua Dest wurden in die Filtermitte pipettiert. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur endete die DNA-Isolation mit einer letzten Zentrifugation für 1 min bei 6.000 g.

## 2.5 Isolation von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen aus Lymphknoten

Nach ungefähr zwölf Lebenswochen wurden den genotypisierten Mäusen die zervikalen, axillären, inguinalen und intestinalen Lymphknoten entnommen und in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) mit 0,5 % fetalem Kälberserum (FBS) aufgefangen. Die isolierten Lymphknoten wurden in einen 30-µm-Filter gegeben, mit einer Schere zerkleinert und unter Spülen mit Puffer durch den Filter in eine 15-ml-Röhre gedrückt. Es folgte eine Zentrifugation der aufgefangenen Zellsuspension bei 300 g für 5–10 min. Nach Abnahme des Überstands und Resuspension in 5 ml Puffer wurden 20 µl für spätere Markerbestimmungen im Durchflusszytometer in ein 5-ml-Rundboden-Röhrchen abgenommen. Das Röhrchen wurde mit PBS aufgefüllt. Die Abnahme weiterer 10 µl der Suspension, 1:50 verdünnt mit 3%iger Essigsäure, diente der Zellzählung. Dazu wurde eine Zählkammer mit einem Deckglas und 10 µl der verdünnten Zellsuspension versehen. Unter dem Mikroskop erfolgte die Auszählung der Zellen in zwei diagonal gegenüberliegenden Feldern und Bildung des Durchschnitts. Die Zellzahl pro ml konnte mit folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittlere Zellzahl/Feld} * \text{Zählkammerfaktor} * \text{Verdünnungsfaktor} * 1000$$

Im vorliegenden Fall betrug der Zählkammerfaktor 10 und der Verdünnungsfaktor 50. Die absolute Zellzahl war für die Berechnung der Volumina nachfolgender Reagenzien nötig. Zur Isolation von CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten fand das *CD8a<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit* bzw. *Naive CD8a<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit* von Miltenyi Biotec Anwendung. Dabei wurden die Zellen nach erneuter Zentrifugation bei 300 g für 5–10 min und Abnahme des Überstands in 40 µl Puffer pro 10<sup>7</sup> Zellen und 10 µl *CD8a<sup>+</sup> T Cell Biotin-Antibody Cocktail* pro 10<sup>7</sup> Zellen resuspendiert (für die Isolation naiver CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in *Naive CD8a<sup>+</sup> T Cell Biotin-Antibody Cocktail*). Nach Homogenisierung durch Auf- und Abpipettieren folgte eine Inkubation bei 4 °C für 5 min. Daran schloss sich die Zugabe von 30 µl Puffer pro 10<sup>7</sup> Zellen und 20 µl *Anti-Biotin MicroBeads* pro 10<sup>7</sup> Zellen an. Die Isolation von naiven T-Zellen benötigte außerdem 10 µl *CD44 MicroBeads* pro 10<sup>7</sup> Zellen. Erneut erfolgte eine Homogenisierung und Inkubation bei 4 °C für 10 min. Bei der Isolation naiver T-Zellen war an dieser Stelle ein weiterer Waschschrift mit Puffer, 10 min Zentrifugation bei 300 g, Abnahme des Überstands und Resuspension in 500 µl Puffer erforderlich.

Die magnetischen *Anti-Biotin MicroBeads* binden an die Biotin-beladenen Antikörper des Antikörper-Cocktails, welche sich gegen zellspezifische Marker aller Leukozyten mit Ausnahme der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen richten. Somit konnten im nächsten Schritt alle

Zellarten außer CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in Säulen festgehalten werden. Pro Probe wurde eine LS-Säule am Magnetständer befestigt und mit 3 ml Puffer gespült. Danach lief die Zellsuspension durch die Säule in eine 15-ml-Röhre. Im Anschluss war das dreimalige Spülen der Säule mit jeweils 3 ml Puffer notwendig, welcher in der gleichen Röhre aufgefangen wurde. Nun folgte die Zählung der erhaltenen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in der Zählkammer, eine Zentrifugation bei 300 g für 5–10 min und die Einspeisung in Zellkulturmedium (siehe Kapitel 2.6).

## 2.6 Zellkultur

Zum Start der Kultur erfolgte die Suspension der selektierten CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in Medium, wobei eine Zielkonzentration von 5 Millionen Zellen pro ml Medium angestrebt wurde. Das Medium setzte sich zu gleichen Anteilen aus den Zellkulturmedien *RPMI Medium 1640 (1X)* + *GlutaMax™* und *Lymphocyte Growth Medium-3* sowie 5 % FBS zusammen. Dem 500 ml fassenden Vorratsbehälter von RPMI wurden zuvor je 5 ml (0,5 mM) *Non-Essential Amino Acids* und *Sodium Pyruvate* hinzugesetzt, dem 500 ml fassenden Vorratsbehälter von LGM-3 1 ml (0,2 %) *Mycoplasma Elimination Reagent* (MycoZap). Pro ml Medium folgte die Zugabe von 1 µl IL-2. Außerdem wurden zu Beginn der Kultur pro einer Million T-Zellen 20 µl mit CD3ε- und CD28-Antikörpern beladene Beads aus dem *T Cell Activation/Expansion Kit* von Miltenyi Biotec hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank. Im Verlauf der Kultivierung war die Bestimmung der Zellzahl im Durchflusszytometer (siehe Kapitel 2.9.1) alle zwei bis drei Tage und dementsprechend die Zugabe von neuem Medium mit einer Zielkonzentration von 5 Millionen Zellen pro ml erforderlich. Zu denselben Zeitpunkten wurde die Kultur erneut mit IL-2 versetzt. Ein kompletter Mediumwechsel geschah alle neun Tage.

## 2.7 Knockout durch Behandlung mit 4-Hydroxytamoxifen

Nach einer Woche der Aktivierung und Expansion wurden die *Cre*-positive und die *Cre*-negative CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Kultur in jeweils zwei Kulturen aufgeteilt. Zu je einer der *Cre*-positiven und *Cre*-negativen Kultur folgte die Zugabe von 1 µl von 1 mM OHT pro ml Medium. 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) ist der aktive Metabolit des Östrogenderivats Tamoxifen und bindet an den modifizierten Östrogen-Rezeptor, an welchen die *Cre*-Rekombinase gekoppelt ist. Der *Cre*-Östrogenrezeptorkomplex transloziert daraufhin in den Zellkern, wo die Exzision von dem geflochtenen *Bcl11b*-Abschnitt durch die *Cre*-Rekombinase ausgeführt werden kann. Durch die Aufteilung der *Cre*-positiven



und der *Cre*-negativen CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Kultur und selektive Behandlung mit OHT entstanden vier Kulturen, welche in Kapitel 3.1 beschrieben werden. 48 Stunden nach der Zugabe wurde das OHT durch Zentrifugation der Zellen und Zugabe von neuem Medium wieder entfernt. Nach der OHT-Behandlung wurden etwa jeden dritten Tag 0,1 ml der Zellsuspension für die Bestimmung von Zelloberflächenmarkern mit dem Durchflusszytometer (siehe Kapitel 2.9.2) sowie 0,3 ml für die Gewinnung von TRIzol-Proben zur RNA-Isolation (siehe Kapitel 2.10) verwendet.

## 2.8 Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Paque

Die Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Paque dient zumeist der Isolation von mononukleären Zellen aus dem Blut. In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode jedoch bei einem *Bcl11b*-Knockout-Versuch an Tag 14 nach OHT-Behandlung angewandt, um vitale CD8<sup>+</sup>-T-Zellen von Zelltrümmern zu trennen. Im ersten Schritt erfolgte die Gabe der in Medium suspendierten Zellen in Leucosep-Röhren, welche das synthetisch hergestellte Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer mit dem Markennamen Ficoll-Paque enthalten. Die anschließende Zentrifugation bei 1000 g und 18 °C für 10 min unter Verzicht auf die Bremsfunktion der Zentrifuge führte zur Ansammlung von vitalen Zellen in der oberen Phase der Röhre. Diese wurden abgenommen, in eine 50-ml-Röhre überführt, mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und bei 300 g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurde eine Zellzählung und Markeranalyse mit dem Durchflusszytometer (siehe Kapitel 2.9) durchgeführt und der Waschschrift anschließend wiederholt. Es folgte die RNA-Isolation aus dem resultierenden Pellet (siehe Kapitel 2.10).

## 2.9 Durchflusszytometrie

### 2.9.1 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität

Pro Probe wurden 200 µl PBS in 5-ml-Rundboden-Röhrchen gegeben und jeweils 50 µl Zählbeads (*Flow-Count Fluorospheres*) mit einer Konzentration von 10<sup>18</sup> Beads pro µl, 5 µl CD8a-FITC und 2,5 µl 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) hinzugefügt. Nach einer Homogenisierung der Zellsuspension durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren folgte die Zugabe von 50 µl der Suspension in das Rundboden-Röhrchen. Im Anschluss an eine Homogenisierung auf dem Vortex-Schüttler wurde die Zahl der Zählbeads, der vitalen Zellen (CD8<sup>+</sup>, 7-AAD<sup>-</sup>) und der toten Zellen (CD8<sup>+</sup>, 7-AAD<sup>+</sup>) mit dem Durchflusszytometer und der *BD CellQuest Pro Software* bestimmt. Die weitere

Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der *Flowing Software v2.5.1* und *Microsoft Excel*. Mithilfe der Zählbeads ließ sich die Konzentration der Zellsuspension ermitteln:

$$\text{Zellkonzentration} = \frac{\text{Events (vitale Zellen)} \times \text{Konzentration (Zählbeads)}}{\text{Events (Zählbeads)}}$$

Bei 7-AAD handelt es sich um einen interkalierenden DNA-Farbstoff, der sich nur in Zellen mit geschädigter Zellmembran anreichert und daher abgestorbene Zellen identifizieren kann. Somit war die Ermittlung der Zellvitalität möglich, wofür folgende Formel verwendet wurde:

$$\text{Zellvitalität} = \frac{\text{Events (vitale Zellen)}}{\text{Events (vitale Zellen)} + \text{Events (tote Zellen)}}$$

### **2.9.2 Bestimmung von Zelloberflächenmarkern**

5-ml-Rundboden-Röhrchen wurden zu etwa drei Vierteln mit PBS befüllt und mit 100 µl durch Auf- und Abpipettieren homogener Zellsuspension versehen. Nach einer zehnmütigen Zentrifugation bei 300 g und Abgießen des Überstands erfolgte die Zugabe von Fluorochrom-markierten Antikörpern gegen die zu untersuchenden Oberflächenmarker. Zur Bestimmung der Reinheit zu Beginn der Zellkultur wurden CD3-FITC, CD4-APC, CD8-PerCP, CD19-PE und Anti-NKp46-APC verwendet. Zur regelmäßigen Ermittlung der NKp46-Expression im Verlauf der Kultivierung wurde Anti-NKp46-APC genutzt. Es schloss sich eine 15-minütige Dunkelinkubation bei Raumtemperatur an. Danach folgten zwei Waschschrte mit PBS, bei denen die Zentrifugation für jeweils 5 min bei 300 g erfolgte und der Überstand abgegossen wurde. Nach einer Resuspension in 150 µl PBS konnte die Messung im Durchflusszytometer beginnen.

### **2.10 Isolation der RNA**

Zur Isolation der RNA aus den T-Zellen wurden zunächst 0,3 ml der durchmischten Zellsuspension abgenommen und 5–10 min bei 500 g zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands erfolgte die Zellyse mithilfe von TRIzol. Dabei wurden für 5–10 x 10<sup>6</sup> Zellen 0,8 ml TRIzol benötigt. Mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gewährleistete eine bessere Homogenisierung. Anschließend inkubierte das Lysat für 5 min bei Raumtemperatur. Im vorliegenden Fall wurden die TRIzol-Proben an dieser Stelle bei -20° Celsius eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt weiter bearbeitet.

Den Proben wurden jeweils 0,2 ml Chloroform beigefügt. Nach kräftigem Schütteln und 3 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 12.000 g. Dabei entsteht eine Dreischichtung aus einer unteren, pinkfarbenen Phenol-Chloroform-Phase, einer milchigen Interphase, welche DNA enthält, und der oberen wässrigen Phase, welche RNA beinhaltet. Letztere wurde möglichst vollständig und ohne Verunreinigung in ein neues Tube überführt. Es folgte die Zugabe von jeweils 0,5 ml Isopropanol und 1 µl Glykogen. Die Proben wurden geschwenkt, für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 12.000 g für 10 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands erfolgten die Resuspension des RNA-haltigen Pellets mit 75%igem Ethanol und eine erneute Zentrifugation bei 7.500 g für 5 min. Im Anschluss an die Entfernung des Überstands trocknete das Pellet einige Minuten an der Luft, bis es transparent erschien. Danach wurde das Pellet in 15 µl RNase-freiem Wasser bei mehrmaligem Auf- und Abpipettieren gelöst und möglichst schnell gekühlt.

## 2.11 RNA-Sequenzierung

Die RNA-Sequenzierung misst die Anzahl der gelesenen RNA-Fragmente (Reads), die Referenzsequenzen eines Genoms zugeordnet werden können. Dies ermöglicht die Erfassung von Expressionsstärken von Genen und anderen transkribierten Regionen. Die Sequenzierung der RNA aus bereitgestellten TRIzol-Proben erfolgte durch das Institut für Humangenetik in Greifswald mittels eines NextSeq-Systems von Illumina und der Datenanalyse über R-Pakete des *Comprehensive R Archive Network*. Die Visualisierung des Datensatzes geschah mit dem *Integrative Genomics Viewer 2.4* (IGV 2.4), womit sich Lokalisation und Zahl der Transkripte sowie Spleißstellen nachvollziehen lassen. Als Referenzgenom wurde das Mausgenom mm10 gewählt. Es erfolgte die Berechnung der relativen Änderung der gemessenen Reads von Knockoutzellen gegenüber den drei Kontrollgruppen (Fold change).

## 2.12 Synthese der komplementären DNA

Jeweils 5,5 µl der RNA-Proben wurden in Kavitäten einer Mikrotiterreihe gegeben und zügig mit 0,5 µl *Random Primer* und 0,5 µl von Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTP) versetzt. Es folgte eine Inkubation bei 65 °C für 5 min im vorgewärmten Thermocycler zur Bindung der Primer, der sich die Zugabe von 2 µl *First Strand Buffer*, 1 µl Dithiothreitol und 0,5 µl *Super Script Reverse Transcriptase* zu jeder Kavität anschloss. Zur besseren Handhabbarkeit und zügigeren Bearbeitung wurden sowohl eine Mischung von *Random Primer* und dNTP als auch von *Frist Strand Buffer*,

Dithiothreitol und *Super Script Reverse Transcriptase* zuvor für alle Proben angesetzt.

Die cDNA-Synthese erfolgte im Thermocycler nach folgendem Schema:

- 15 min bei 25 °C → Inkubation
- 50 min bei 42 °C → Polymerisation
- 15 min bei 70 °C → Beenden der Reaktion (Deaktivierung der Transkriptase)
- Abkühlung auf 4 °C

Vor Weiterverarbeitung und Lagerung der cDNA bei -20 °C wurde diese 1:10 mit Aqua Dest verdünnt.

## 2.13 Quantitative Polymerasekettenreaktion

Die quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR, auch *Real Time PCR* bzw. RT-PCR) dient der Quantifizierung der mRNA-Menge von Zielgenen. Die RNA muss dafür zuvor in cDNA umgeschrieben werden. Für jedes zu testende Gen wurde ein Mastermix angesetzt:

- 9,5 µl Aqua Dest x Anzahl der Proben (+ Reserve)
- 12,5 µl *Power SYBR Green Master Mix* x Anzahl der Proben (+ Reserve)
- 0,5 µl Vorwärtsprimer x Anzahl der Proben (+ Reserve)
- 0,5 µl Rückwärtsprimer x Anzahl der Proben (+ Reserve)

Jeweils 23 µl der Mastermixe wurden in die Kavitäten einer *96-Well*-Mikrotiterplatte pipettiert. Danach erfolgte die Zugabe von jeweils 2 µl cDNA. Jede cDNA-Probe wurde dabei doppelt aufgetragen. Nach luftblasenfreiem Abkleben der Platte mit einer Folie konnte die qPCR im Echtzeit-PCR-Cycler gestartet werden. Folgendes Schema war dafür vorgesehen:

- 2 min bei 50 °C
- 10 min bei 95 °C → initiale Denaturierung
- 15 s bei 95 °C } → Schleife mit 40 Wiederholungen aus
- 1 min bei 65 °C } Denaturierung, Primeranbindung und Elongation
- 15 s bei 95 °C
- 1 min bei 60 °C
- stufenweise Erhitzung auf 95 °C (1 % pro 30 s) → Erstellung der Schmelzkurve
- 15 s bei 60 °C

Die Erstellung der Schmelzkurven für die Proben und die nicht mit DNA versetzten Kontrollen half bei der Differenzierung zwischen spezifischen und unspezifischen

Amplifikationsreaktionen. Die zum Gerät zugehörige Software 7500 Software v2.0.1 gibt u.a. für jede Probe die Zahl des Zyklus heraus, an dem der Schwellenwert der Fluoreszenzintensität erstmals überschritten wird, der sogenannte CT-Wert. Mithilfe des CT-Wertes ließ sich die relative RNA-Kopienzahl berechnen. Dazu war die Normierung auf ein möglichst konstant exprimiertes Haushaltsgen nötig, hierbei diente stets die RNA-Expression von  $\beta_2$ -Mikroglobulin (*B2m*) als Referenz. *B2m* ist als Bestandteil eines jeden MHC-I-Komplexes auf allen kernhaltigen Zellen zu finden. Die Ermittlung der relativen RNA-Kopienzahl erfolgte durch Microsoft Excel unter Verwendung folgender Formel:

$$\text{RNA-Kopienzahl} = 100.000 / 2^{(\text{CT}(\text{Zielgen}) - \text{CT}(\text{B2m}))}$$

Für alle in der Arbeit verwendeten Primer wurde durch die Erstellung von Schmelzkurven in der qPCR sowie durch den Nachweis von spezifischen PCR-Produkten der korrekten Basenpaarlänge in der Gelelektrophorese eine unspezifische Bindung ausgeschlossen.

## 2.14 Klassische Polymerasekettenreaktion

Zum einfachen Nachweis der Gentranskription wurde für jedes zu testende Gen ein Mastermix angesetzt:

- 4,75  $\mu\text{l}$  Aqua Dest x Anzahl der Proben (+ Reserve)
- 6,25  $\mu\text{l}$  *Emerald AMP Max PCR Master Mix* x Anzahl der Proben (+ Reserve)
- 0,25  $\mu\text{l}$  Vorwärtsprimer x Anzahl der Proben (+ Reserve)
- 0,25  $\mu\text{l}$  Rückwärtsprimer x Anzahl der Proben (+ Reserve)

Jeweils 11  $\mu\text{l}$  der Mastermixe wurden nun in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte pipettiert. Danach erfolgte die Zugabe von jeweils 1  $\mu\text{l}$  der cDNA-Proben. Nach Verschluss der Mikrotiterplatte konnte die PCR im Thermocycler gestartet werden. Dabei war folgendes Schema vorgesehen:

- 5 min bei 95 °C → initiale Denaturierung
  - 30 s bei 98 °C
  - 30 s bei  $x^1$  °C
  - $x^2$  min bei 72 °C
- } Schleife mit 32–35 Wiederholungen aus  
Denaturierung, Primeranbindung und Elongation
- 5 min bei 72 °C → terminale Elongation
  - Abkühlen auf 4 °C

Die Temperatur der Primeranbindung\*<sup>1</sup> richtete sich dabei nach der Schmelztemperatur des Primers und betrug im Fall der Genotypisierung 58 °C. Die Dauer der Elongation\*<sup>2</sup> der einzelnen Zyklen wurde in Abhängigkeit von der Größe des zu amplifizierenden Fragments gewählt und betrug bei der Genotypisierung 1 min.

## 2.15 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Herstellung eines 1%igen, 1,5%igen oder 2%igen Agarosegels wurden 0,5 g, 0,75 g bzw. 1 g Biozym LE Agarose in 50 ml 0,5X Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Borat-Ethylendiamin-tetraessigsäure (TBE) in der Mikrowelle vollständig aufgelöst und anschließend mit 3 µl *PeqGreen DNA/RNA Dye* versetzt. *PeqGreen* interkaliert zwischen die Basen der Nukleinsäurestränge und emittiert bei Anregung durch UV-Licht Fluoreszenzsignale. Die Agaroselösung wurde in den Gelträger gegossen und der Taschenkamm eingesetzt.

Nach Aushärtung wurde das Gel in die mit 0,5X TBE gefüllte Elektrophoresekammer eingelegt, sodass es vollständig von Puffer bedeckt ist. Es folgte die Beladung der Taschen mit Proben, Gelbeladungspuffer und Komigrationsstandard je nach Untersuchungszweck:

- Zum Nachweis von RNA nach Isolation aus TRIzol-Proben wurden 2 µl Gelbeladungspuffer mit 8 µl Aqua Dest sowie 2 µl der entsprechenden Probe versetzt und in die Taschen eines 1–1,5%igen Gels pipettiert.
- Zur Visualisierung von PCR-Produkten wurden jeweils 10 µl der amplifizierten Proben sowie 2 µl Gelbeladungspuffer in die Taschen eines 2%igen Gels gegeben. 7 µl eines Komigrationsstandards aus Fragmenten von Vielfachen von 100 Basenpaaren zur Größenbestimmung der PCR-Produkte wurden mitgeführt. Dieser wurde aus einem Teil *GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder*, zwei Teilen Gelbeladungspuffer und neun Teilen Aqua Dest angesetzt.

Die Auftrennung der mehrfach negativ geladenen Nukleinsäuren in Richtung Anode erfolgte abhängig von Größe und Ladung der Nukleinsäureprodukte bei einer angelegten Spannung von 240 Volt und einer Leistung von 30 Watt für etwa 15–25 min. Nach abgeschlossener Elektrophorese konnten die Banden im Transilluminator unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Bei erfolgreicher Isolation von RNA zeigten sich zwei abgrenzbare Banden. Beim Nachweis von PCR-Produkten wurde auf die korrekte Länge des Amplifikats geachtet. Die verwendeten Primer bestanden aus

jeweils 20 Basenpaaren. Primerdimere fanden sich daher im Bereich unterhalb der 50-Basenpaar-Markierung.

## 2.16 Extraktion von DNA aus dem Agarosegel

Die betreffende Bande wurde unter kurzzeitiger UV-Licht-Exposition aus dem Gel herausgeschnitten und in ein 1,5-ml-Tube überführt. Die Isolation der DNA erfolgte unter Zuhilfenahme der Reagenzien und Materialien des *QIAquick Gel Extraction Kit* von QIAGEN. Die herausgeschnittenen Gelstücke wurden mit je 1 ml *Buffer QG* versetzt und bei 50 °C auf dem Thermomixer schüttelnd aufgelöst. Es folgte die Zugabe von 300 µl Isopropanol und Mischung durch Schwenken der Tubes. Die Probenlösung wurde (ggf. in zwei Etappen) in die Filter der *Spin Columns* gegeben und 1 min bei 11.000 g zentrifugiert. Nach Abgießen des Filtrats erfolgte der Zusatz von 750 µl *Buffer PE* in die Filter der *Spin Columns* und eine dreiminütige Inkubation bei Raumtemperatur, gefolgt von zweimaliger Zentrifugation bei 11.000 g für erst 1 min und dann 2 min, um das gesamte Filtrat zu eliminieren. Die Filter wurden abschließend in die *Collection Tubes* eingesetzt, in welchem die DNA nach Pipettieren von 50 µl Aqua Dest in die Filtermitte und einminütiger Zentrifugation bei 11.000 g aufgefangen wurde. Die Lagerung der extrahierten DNA fand bei -20 °C statt. Zur Sequenzierung der DNA wurden die Proben an die Berliner GmbH LGC Genomics geschickt.

## 2.17 Proteinisolation

Die Gewinnung von Proteinproben erforderte in etwa 5–10 x 10<sup>6</sup> Zellen. Die kultivierten Zellen wurden zunächst bei 300 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands und Resuspension mit 10 ml PBS schloss sich eine erneute Zentrifugation unter gleichen Einstellungen an. Ein weiterer Waschschrift erfolgte mit 1 ml PBS bei 500 g und 4 °C für 10 min. Anschließend wurde das Pellet in ein 1,5-ml-Tube überführt und in Abhängigkeit von seiner Größe mit 50–200 µl Lysepuffer versetzt. Dieser wurde unter Verwendung des *RIPA Lysis Buffer System* von Santa Cruz aus 1 ml *Lysis Buffer* und jeweils 10 µl *Protease Inhibitor Cocktail*, PMSF und *Sodium Orthovanadate* angesetzt. Nach gründlichem Durchmischen auf dem Vortex-Schüttler folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis unter gelegentlichem Mischen auf dem Schüttler. Die abschließende Zentrifugation bei 10.000 g und 4 °C für 10 min ermöglichte die Auftrennung in Zelltrümmer am Boden des Tubes und einen Protein-enhaltenden Überstand, welcher abgenommen wurde. Die Protein-Proben wurden bei -80 °C gelagert und während der Nutzung in nachfolgenden Analysen auf Eis gehalten.

## 2.18 Bicinchoninsäure-Assay

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen für die nachfolgende SDS-Page erfolgte mit dem Bicinchoninsäure(BCA)-Assay unter Verwendung des *Micro BCA Protein Assay Kit* von Thermo Fisher Scientific. In eine *96-Well*-Mikrotiterplatte wurden sowohl eine Verdünnungsreihe des Albumin-Standards zur Erstellung einer Eichkurve als auch die Proben pipettiert. Die Verdünnungsreihe des Standards entstand durch sechsmalige Verdünnung des Standards 1:1 mit Aqua Dest ausgehend von einer Konzentration von 80 mg/ml. Die Verdünnungsstufen wurden mit einem Volumen von je 100 µl dreifach aufgetragen und durch eine Stufe von reinem Aqua Dest komplettiert. Es folgten von jeder Proteinprobe je 100 µl der drei Verdünnungsstufen 1:250, 1:500 und 1:1000, ebenfalls in Dreifachbestimmung. Demnach errechnete sich der Durchschnitt der Proteinkonzentration einer Probe später aus neun Probenwerten. Zu jeder Kavität wurden 100 µl einer Mischung aus 25 Teilen *Micro BCA Reagent A*, 24 Teilen *Micro BCA Reagent B* und einem Teil *Micro BCA Reagent C* gegeben. Nach einer zweistündigen Dunkelinkubation schloss sich die Messung der Absorption bei 562 nm Wellenlänge im Plattenleser an. Die Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel durch Erstellung einer Eichkurve des Albuminstandards und Ermittlung der passenden linearen Funktionsgleichung des Zusammenhangs zwischen Proteinkonzentration und Absorption. Daraus wurden die Proteinkonzentrationen der Proben nach Mittelung ihrer Dreifachbestimmungen und Berücksichtigung der Verdünnungsstufen berechnet.

## 2.19 SDS-Page, Western Blot und Immundetektion

Von jeder Probe wurden 25 µg Proteine benötigt. Das entsprechende Volumen ließ sich durch vorhergehende Bestimmung der Proteinkonzentration berechnen. Es folgte die Zugabe von 4 µl Gelbeladungspuffer (*Pierce Lane Marker Reducing Sample Buffer*) zu jeder Probe. Die Ansätze wurden mit Aqua Dest auf 15 µl aufgefüllt und kurz zentrifugiert. Die anschließende fünfminütige Inkubation auf dem Heizblock bei 95 °C diente der Denaturierung der Proteine. Währenddessen wurden die Gelkassetten in den Elektrodenstand eingesetzt. Nach Spülen der Geltaschen mit Laufpuffer erfolgte die Beladung der Taschen mit 5 µl Komigrationsstandard (*PageRuler Plus Prestained Protein Ladder*) bzw. 15 µl der Proben. Der Elektrodenstand und der Pufferbehälter wurden mit Laufpuffer aufgefüllt. Dieser bestand aus 9 Teilen Aqua Dest und 1 Teil *10X Tris/Glycine/SDS Buffer*. Die Auftrennung der Proteine geschah bei 240 Volt über einen Zeitraum von 20–30 min.



Pro Gel wurde eine PVDF-Trägermembran erst 1 min in Methanol und dann mindestens 15 min in Transferpuffer eingeweicht. Pro Gel wurden des Weiteren vier Filterpapiere in Transferpuffer getränkt. Der Transferpuffer setzte sich aus 7 Teilen Aqua Dest, 2 Teilen Methanol und 1 Teil *10X TG Buffer* zusammen. Nach Öffnen der Gelkassetten folgte das Waschen der Gele auf einem Schüttler für 15 min. Anschließend wurden zwei Filterpapiere auf der Anodenplatte des Transfersystems platziert, darauf die Trägermembran, danach das Gel und zwei weitere Filterpapiere. Dabei war auf eine luftblasenfreie Schichtung zu achten. Der Transfer erfolgte bei 0,25 A (ein Gel) bzw. 0,5 A (zwei Gele) für 30 min. Danach wurden die Membranen 10 min in Tris-gepufferter Salzlösung (TBS) auf einem Schüttler gewaschen. Es folgte eine einstündige Inkubation der Membran in Blockierlösung aus 0,5 g Milchpulver in 10 ml TBS + 0,05 % Tween20 (TBST) auf einem Schüttler bei niedriger Frequenz. Nach Abgießen der Blockierlösung schloss sich eine einstündige Inkubation mit dem Primärantikörper an, ebenfalls auf einem Schüttler bei niedriger Frequenz. Dieser wurde in einem bestimmten Verhältnis mit 10 ml Blockierlösung gemischt (Anti-Bcl11b 1:3000, Anti-Aktin 1:1500). Nach Abgießen wurden die Membranen dreimal 5 min in 10 ml TBST unter Schütteln gewaschen und dann eine Stunde mit dem Sekundärantikörper inkubiert, auch hier auf einem Schüttler bei niedriger Frequenz. Der Sekundärantikörper *Goat-Anti-Rabbit IgG* wurde 1:2000 in 10 ml TBST gelöst. Erneut folgten das Abgießen der Lösung und ein dreimaliger Waschvorgang in TBST für jeweils 5 min auf einem Schüttler. Anschließend wurden 0,5 ml *Tropix CDP Star* auf der Membran verteilt. Nach fünfminütiger Dunkelinkubation konnte die Antikörperbindung im Transilluminator sichtbar gemacht werden.

Zur Immundetektion des der Qualitätskontrolle dienenden Referenzproteins Aktin musste der zuvor gebundene Antikörper wieder entfernt werden. Für den dafür notwendigen Stripping-Puffer wurden 1,5 g Glycin unter Rühren in 40 ml Aqua Dest gelöst und mit 1 ml 10%igem SDS und 1 ml Tween versehen. Weiterhin erfolgte die Zugabe von 2-molarer Salzsäure, bis ein pH-Wert von 2,2 erreicht war. Die Membran wurde zuerst zweimal 15 min mit 15 ml Stripping-Puffer auf einem Schüttler inkubiert, dann zweimal 10 min mit PBS und zweimal 5 min mit PBS + 1 % Tween20 auf dem Schüttler gewaschen. Nun konnte die Blockierung der Membran und Immundetektion mit dem neuen Antikörper beginnen.

## 2.20 Statistische Analyse und Darstellung der Ergebnisse

Für die Analyse der Ergebnisse der qPCR fand die Statistiksoftware R 3.5.2 Anwendung. Die Normalverteilung der Werte wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test bei einem Signifikanzniveau von 5 % geprüft. Auch wenn die Werte zu einem geringen Teil keine Normalverteilung zeigten, wobei die Aussagekraft eines Normalverteilungstests bei der geringen Stichprobengröße ( $n = 3$ ) eingeschränkt ist, finden in der deskriptiven Statistik entsprechend der gängigen wissenschaftlichen Praxis die Lageparameter Mittelwert und Standardabweichung Verwendung. Abgebildete Diagramme wurden mit Microsoft Excel 2013 erstellt. Aufgrund der nicht durchgängig vorhandenen Normalverteilung erfolgte die Untersuchung eines Unterschieds zwischen den Kontrollgruppen mit dem Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrisches Verfahren für den Vergleich von zentraler Tendenzen von mehr als zwei unabhängigen Gruppen. Hierbei zeigte sich bei allen untersuchten Genen und einem Signifikanzniveau von 5 % kein Unterschied zwischen den Kontrollgruppen. Eine Signifikanzanalyse der Knockoutgruppe gegenüber den Kontrollgruppen war nicht sinnvoll möglich. Die nicht durchgängig vorhandene Normalverteilung verhinderte die Nutzung eines t-Tests und die Stichprobengröße ließ keinen zweiseitigen Rangsummentest zu.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Einführung in die Versuchsgruppen

Für die in der Arbeit vorliegenden Versuche wurden CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten von *Bcl11b<sup>flox/flox</sup>*-Mäusen kultiviert. Das vierte Exon ihres *Bcl11b*-Gens, welches der DNA-Bindung dient, ist mit Loxp-Stellen versehen. Ein Teil der Mäuse exprimiert die für die Exzision des Exons notwendige Cre-Rekombinase in Form eines Cre-Östrogenrezeptorkomplexes (mit Cre bezeichnet), der andere Teil nicht (mit Wildtyp/Wt bezeichnet). Die Cre-positive Kultur sowie die Wildtyp-Kultur wurden in jeweils zwei Kulturen aufgeteilt. Anschließend erfolgte zu jeweils einem Teil der Cre-positiven Zellen und einem Teil der Wildtyp-Zellen die Zugabe von OHT. OHT induziert die Translokation des Cre-Östrogenrezeptorkomplexes in den Zellkern und damit den Knockout durch die Cre-Rekombinase. Somit entstanden vier Kulturen: Die Experimentalgruppe *Cre<sup>+</sup>Bcl11b<sup>flox/flox</sup>* mit Zugabe von OHT (im Folgenden abgekürzt als Cre +OHT) exprimiert die Cre-Rekombinase, welche durch OHT aktiviert wurde und somit den *Bcl11b*-Knockout durch Exzision von Exon 4 realisieren konnte. Bei der Kontrollgruppe *Cre<sup>+</sup>Bcl11b<sup>flox/flox</sup>* ohne Zugabe von OHT (kurz Cre -OHT) blieb die Cre-Rekombinase durch fehlende Translokation in den Zellkern inaktiv. Die Kontrollgruppen *Cre<sup>-</sup>Bcl11b<sup>flox/flox</sup>* mit und ohne Zugabe von OHT (kurz Wt +OHT und Wt -OHT) enthielten die genetische Information zur Expression der Cre-Rekombinase nicht. Da diese Gruppen ebenfalls das gefloxtete *Bcl11b*-Gen besaßen, bezieht sich ihre verwendete Bezeichnung Wildtyp lediglich auf die nicht vorhandene Cre-Expression. Tabelle 2 stellt die Kulturgruppen und ihre Unterschiede übersichtlich dar. Nach zwei Tagen endete die Inkubation mit OHT durch Zentrifugation der Zellen und Einspeisung in frisches Zellkulturmedium. Zu diesem Zeitpunkt begann die Zählung der „Tage nach OHT-Behandlung“, welche als Messzeitpunkte für die folgenden Analysen dienten.

**Tabelle 2: Einteilung der in der Arbeit verwendeten Experimental- und Kontrollgruppen**

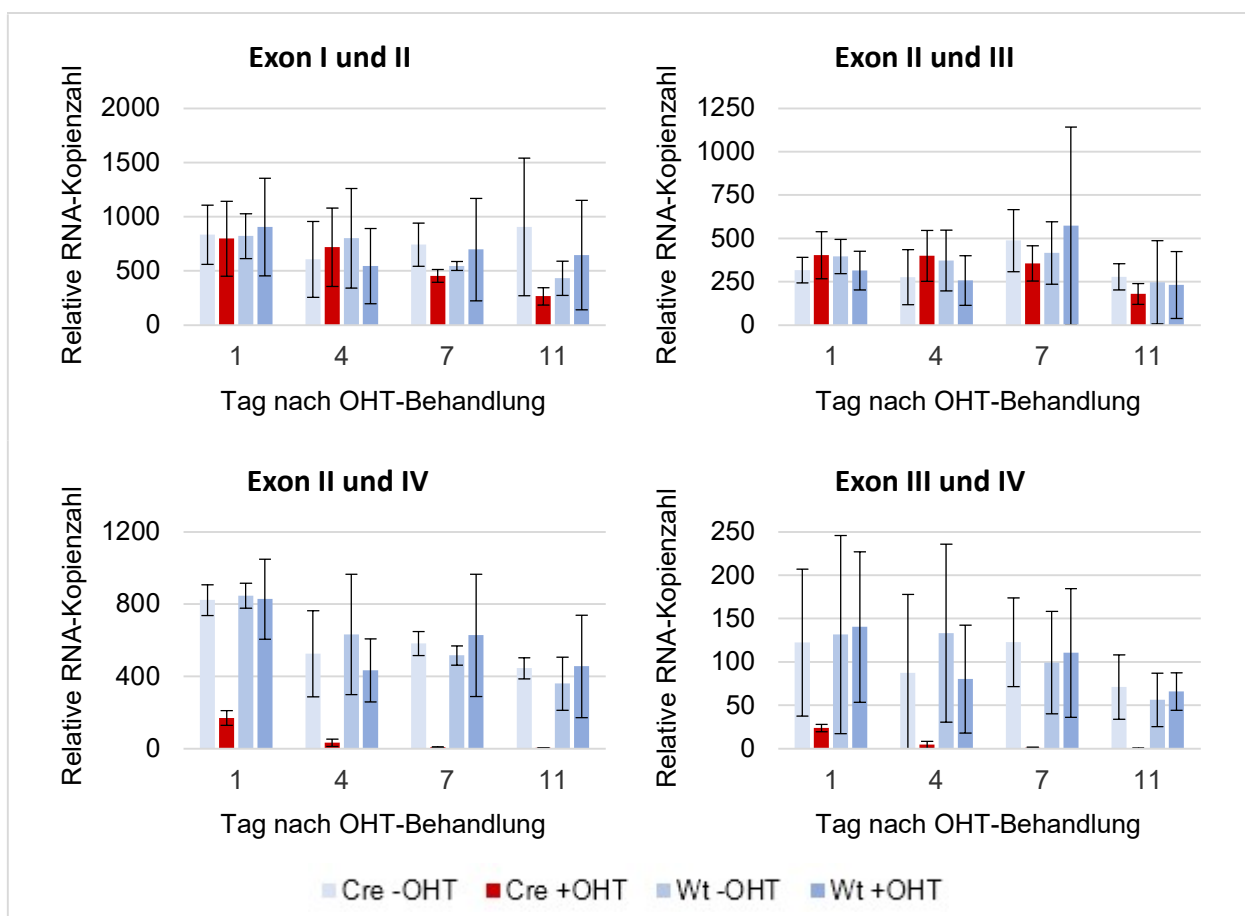
Cre = die Cre-Rekombinase exprimierend; Wt = Wildtyp (keine Cre-Rekombinase exprimierend); OHT = Hydroxytamoxifen; +OHT = Zugabe von OHT; -OHT = keine Zugabe von OHT

Kategorie	Abkürzung	Expression der Cre-Rekombinase	Zugabe von OHT	Knockout von <i>Bcl11b</i>
Knockoutgruppe	Cre +OHT	ja	ja (+OHT)	ja
Kontrollgruppe	Cre -OHT	ja	nein (-OHT)	nein
Kontrollgruppe	Wt +OHT	nein	ja (+OHT)	nein
Kontrollgruppe	Wt -OHT	nein	nein (-OHT)	nein

## 3.2 Knockout von *Bcl11b*

### 3.2.1 *Bcl11b*-Knockouteffizienz auf Transkriptionsebene

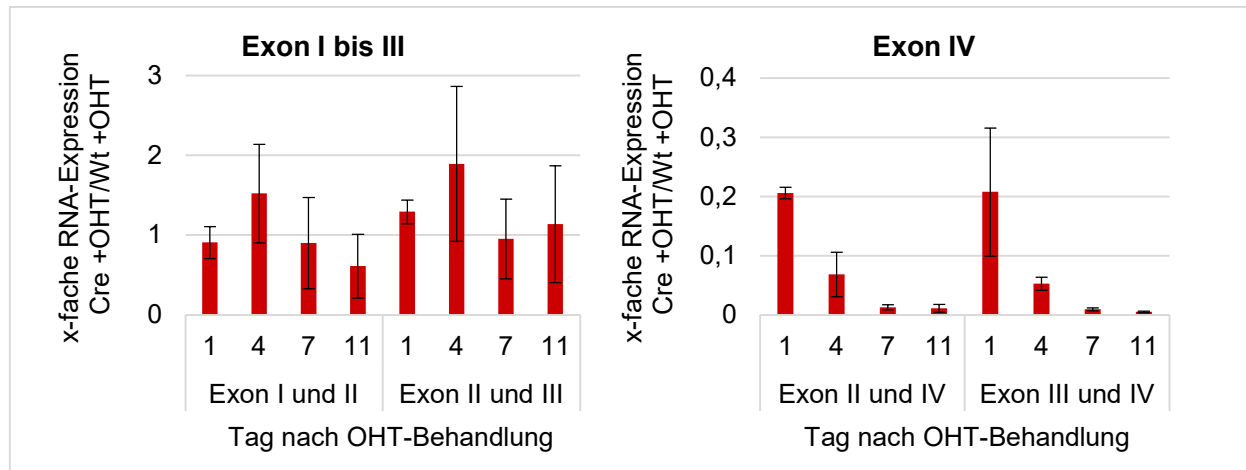
Der Knockout von *Bcl11b* wurde regulär für jeden Versuch anhand vier verschiedener Exonkombinationen auf mRNA-Ebene überprüft. Da die Cre-Rekombinase Exon 4 von *Bcl11b* entfernt, war ein Rückgang der mRNA-Expression von Primerkombinationen zu erwarten, welche Teile von Exon 4 beinhalteten. In allen Versuchen konnte der Knockout durch einen deutlichen Rückgang der mRNA-Kopienzahl von Fragmenten aus Exon 2 bis 4 sowie Exon 3 und 4 im Vergleich zu den Kontrollgruppen bestätigt werden (siehe Abbildung 4).



**Abbildung 4: RNA-Expression von *Bcl11b* in *Bcl11b*-Knockoutzellen und Kontrollgruppen**

Dargestellt ist die relative RNA-Kopienzahl (y-Achse), bezogen auf die Referenz-RNA *B2m*, von vier verschiedenen Exonkombinationen des *Bcl11b*-Gens in *Bcl11b*-Knockoutzellen (Cre +OHT) und drei Kontrollgruppen (Cre -OHT, Wt -OHT, Wt +OHT) zu vier verschiedenen Zeitpunkten (x-Achse). Die Daten stammen von drei Versuchen von murinen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, deren Kopienzahlen in Form von Mittelwert (Säulen) und Standardabweichung (Fehlerindikatoren) veranschaulicht werden. Bei einem Versuch wurden Daten an Tag 6 und 8 erhoben und gemittelt, um Werte für Tag 7 zu erhalten. qPCR. Cre = die Cre-Rekombinase exprimierend; Wt = Wildtyp (keine Cre-Rekombinase exprimierend); OHT = Hydroxytamoxifen; +OHT = Zugabe von OHT; -OHT = keine Zugabe von OHT.

Bereits an Tag 1 nach OHT-Behandlung zeigte die mRNA-Kopienzahl eine Reduktion auf durchschnittlich 20 % und sank bis Tag 4 auf unter <5 % der Kopienzahl der Kontrollgruppen (siehe Abbildung 5). Hingegen wurden Exon I bis III von *Bcl11b* nach dem Knockout weiterhin unvermindert exprimiert.

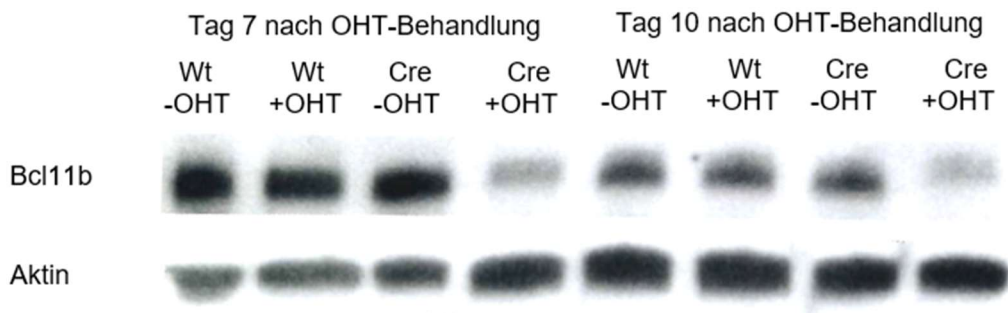


**Abbildung 5: Verhältnis der *Bcl11b*-RNA-Expression von *Bcl11b*-Knockoutzellen zur Kontrollgruppe**

Dargestellt ist der Quotient der auf *B2m* bezogenen RNA-Kopienzahl (y-Achse) von *Bcl11b*-Knockoutzellen (Cre +OHT) und einer Kontrollgruppe (Wt +OHT). Dieser wurde für RNA-Fragmente von vier Exonkombinationen zu vier Zeitpunkten nach Entnahme von OHT (x-Achse) ermittelt. Die Daten stammen von drei Versuchen mit murinen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, deren Kopienzahlen in Form von Mittelwert (Säulen) und Standardabweichung (Fehlerindikatoren) veranschaulicht werden. Bei einem Versuch wurden Daten an Tag 6 und 8 erhoben und gemittelt, um Werte für Tag 7 zu erhalten. qPCR. Cre = die Cre-Rekombinase exprimierend; Wt = Wildtyp (keine Cre-Rekombinase exprimierend); OHT = Hydroxytamoxifen; +OHT = Zugabe von OHT.

### 3.2.2 *Bcl11b*-Proteinexpression nach *Bcl11b*-Knockout

Die Bestätigung des *Bcl11b*-Verlusts auf Proteinebene wurde mittels Immundetektion durchgeführt. In Abbildung 6 ist eine deutlich verminderte Antikörperreaktion gegenüber *Bcl11b* bei Knockoutzellen im Vergleich zu den Kontrollgruppen ersichtlich. Die Exzision von Exon 4 des *Bcl11b*-Gens durch Zugabe von OHT führt demzufolge bei Bestehenbleiben der RNA-Expression von Exon 1–3 zu einem Verlust der Proteinexpression von *Bcl11b*. Das für die Versuche genutzte Knockoutmodell stellt somit eine geeignete Methode zur Untersuchung des Einflusses des *Bcl11b*-Verlusts auf den Phänotyp von murinen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen dar.

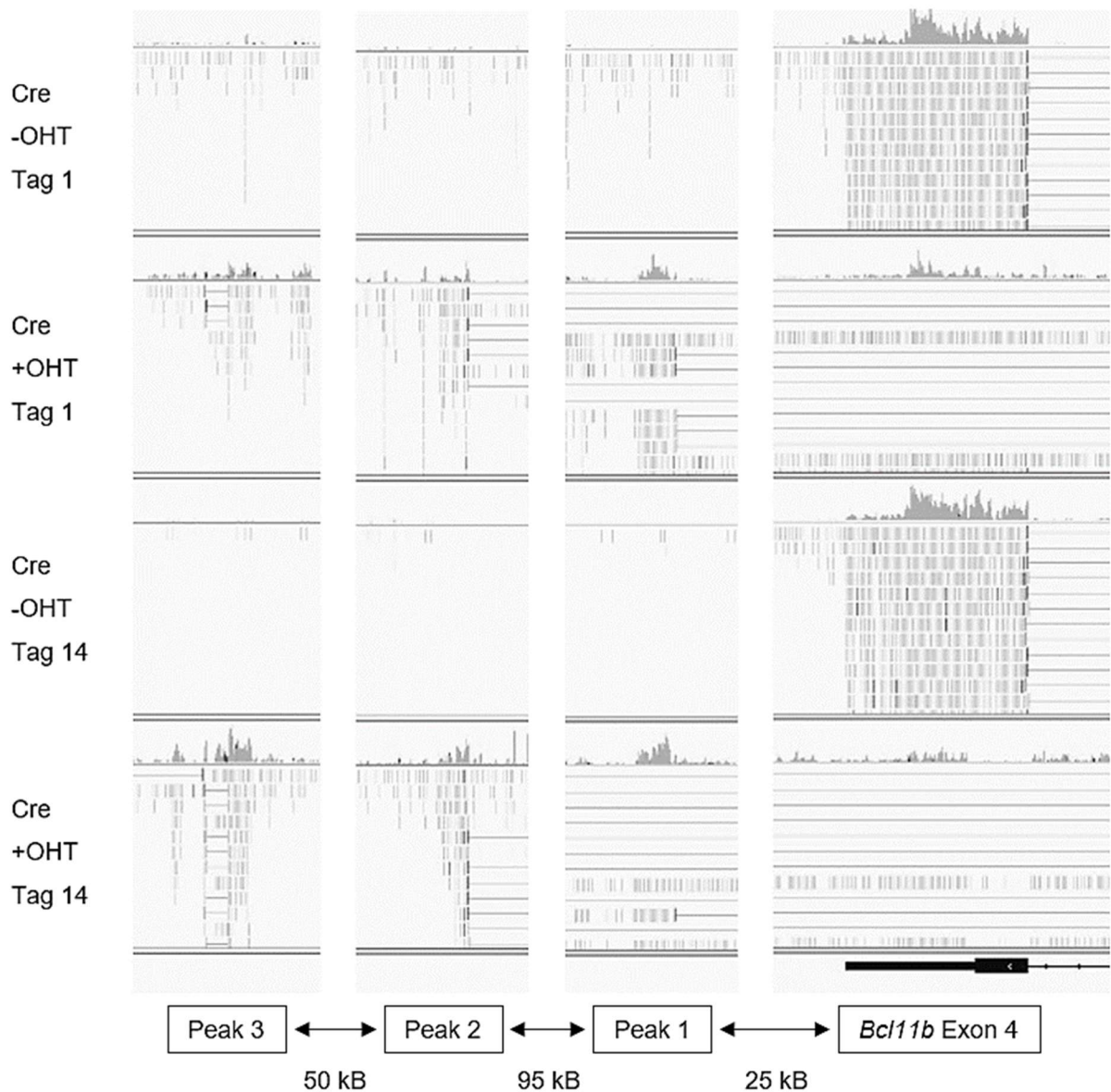


**Abbildung 6: Bcl11b-Proteinexpression in *Bcl11b*-Knockoutzellen und Kontrollgruppen**

Dargestellt ist die Proteinexpression von Bcl11b in *Bcl11b*-Knockoutzellen (Cre +OHT) und Kontrollgruppen (Cre -OHT, Wt -OHT, Wt +OHT) sieben und zehn Tage nach OHT-Behandlung mittels Antikörperreaktion nach Western Blot. Die Proben stammen von einem Einzelversuch mit murinen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. Als Referenz dient das Zytoskelettprotein Aktin. Cre = die Cre-Rekombinase exprimierend; Wt = Wildtyp (keine Cre-Rekombinase exprimierend); OHT = Hydroxytamoxifen; +OHT = Zugabe von OHT; -OHT = keine Zugabe von OHT.

### 3.2.3 Pervasive Transkription stromabwärts des *Bcl11b*-Gens

Für einen *Bcl11b*-Knockout-Versuch und seine Kontrollgruppen wurde die Sequenzierung der RNA vorgenommen. An Tag 14 nach OHT-Inkubation erfolgte zusätzlich eine Dichtegradientenzentrifugation der Kulturen mit Ficoll-Paque, um die toten von den vitalen Zellen zu trennen und die Nukleinsäure-Kontamination durch geschädigte Zellen zu minimieren. In Abbildung 7 ist ein Ausschnitt aus der RNA-Sequenzierungsanalyse zu sehen. Dieser zeigt die Transkription im Bereich von Exon 4 von *Bcl11b* und in der Region stromabwärts des Gens. Auch in der Sequenzierungsanalyse bestätigt sich der Knockout mit einer an Tag 1 nach OHT-Behandlung deutlich verminderten Transkription von Exon 4 in den *Bcl11b*-Knockoutzellen. An Tag 14 ist eine weitere Abnahme dieser Transkripte in den Knockoutzellen ersichtlich. Interessanterweise fällt in den Knockoutzellen im Vergleich zu den Kontrollgruppen eine vermehrte Transkription stromabwärts des kodierenden *Bcl11b*-Gens auf. Dabei lassen sich bereits an Tag 1 nach OHT-Behandlung drei Abschnitte mit besonders gesteigerter Transkription ausmachen, im Folgenden als „Peak 1–3“ bezeichnet. Die Transkription der Peaks ist an Tag 14 noch stärker erhöht. Peak 1 und 2 weisen Spleißkontakte mit Exon 1 und 2 von *Bcl11b* auf. Peak 3 besitzt keine Verbindung zu *Bcl11b*, besteht jedoch in sich aus zwei kleineren Peaks, welche Spleißverbindungen aufweisen. Augenscheinlich kommt es durch Fehlen von Exon 4 im *Bcl11b*-Gen statt einem Abbruch der Transkription zu einer pervasiven Transkription über den normalerweise transkribierten Bereich hinaus.

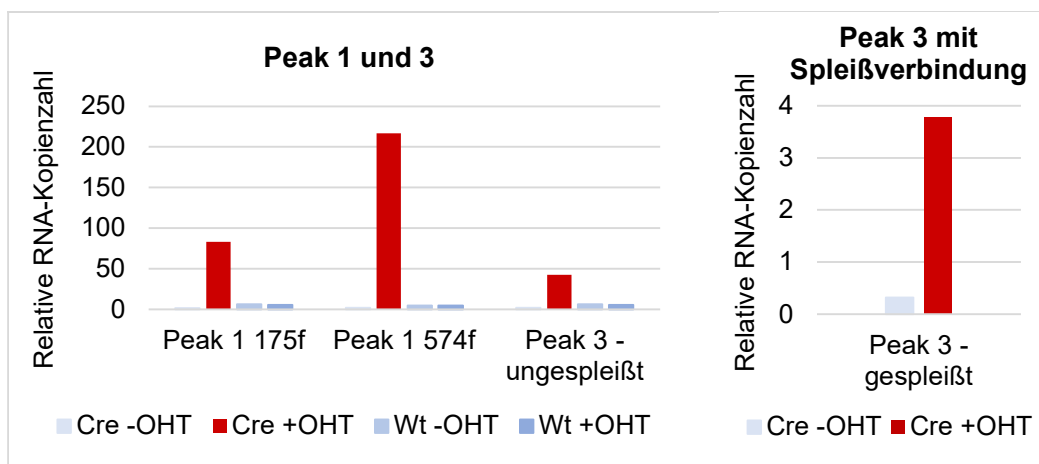


**Abbildung 7: Pervasive RNA-Transkription stromabwärts von *Bcl11b* in *Bcl11b*-Knockoutzellen und einer Kontrollgruppe**

Dargestellt ist die RNA-Transkription in *Bcl11b*-Knockoutzellen (Cre +OHT) und einer Kontrollgruppe (Cre -OHT) an Tag 1 und Tag 14 nach OHT-Behandlung. Die Daten stammen von einem Einzelversuch von murinen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. Durch die inverse Orientierung des *Bcl11b*-Gens erfolgt die Ableseung des dargestellten RNA-Strangs von rechts nach links. Rechts findet sich Exon 4 von *Bcl11b*, am unteren Bildrand als schwarzer Balken dargestellt. Die Region stromabwärts des Exons folgt in Richtung des linken Bildabschnittes. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die Abschnitte zwischen *Bcl11b* und den einzelnen Peaks unterbrochen. Die Entfernungen sind daher gesondert in Kilobasen (kB) angegeben. Graue vertikale Striche stehen für die der Referenzsequenz zugeordneten RNA-Transkripte, kumulativ dargestellt durch graue Verteilungskurven. Durchgehende graue horizontale Striche stellen Spleißkontakte zwischen den Transkripten dar. Cre = die Cre-Rekombinase exprimierend; OHT = Hydroxytamoxifen; +OHT = Zugabe von OHT; -OHT = keine Zugabe von OHT.

Um die Informationen aus der RNA-Sequenzierung zu überprüfen, wurden Primer zum Nachweis der stärker exprimierten Peaks, *Peak 1* und *Peak 3*, erstellt. Mittels qPCR konnten Transkripte in nennenswerter Kopienzahl gemessen werden. Es bestätigte sich die

gesteigerte Expression in *Bcl11b*-Knockoutzellen im Vergleich zu der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 8). In der DNA-Sequenzierung konnten die Amplifikate von drei verschiedenen Primerkombinationen aus *Peak 1* sowie ein ungespleißtes und ein gespleißtes Amplifikat aus *Peak 3* durch 100%-ige Übereinstimmung mit der annotierten Sequenz verifiziert werden. Der Nachweis des gespleißten Amplifikats von *Peak 3* minimiert zusätzlich zur Dichtegradientenzentrifugation das Risiko, dass es sich bei der erhöhten Zahl von nachgewiesenen Transkripten stromabwärts des *Bcl11b*-Gens in *Bcl11b*-Knockoutzellen um eine DNA-Kontamination durch einen größeren Anteil geschädigter Zellen handelt.



**Abbildung 8: RNA-Expression von *Peak 1* und *3* in *Bcl11b*-Knockoutzellen und Kontrollgruppen**  
 Dargestellt ist die relative RNA-Kopienzahl (y-Achse), bezogen auf die Referenz-RNA *B2m*, von *Peak 1* und *3* in *Bcl11b*-Knockoutzellen (Cre +OHT) und Kontrollgruppen (Cre -OHT, Wt -OHT, Wt +OHT). Die Daten stammen von einem Einzelversuch von murinen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. Die linke Abbildung zeigt die RNA-Kopienzahlen von zwei ungespleißten Transkripten von *Peak 1* und einem ungespleißten Transkript von *Peak 3*, die rechte Abbildung von einem gespleißten Transkript von *Peak 3*. qPCR. Cre = die Cre-Rekombinase exprimierend; Wt = Wildtyp (keine Cre-Rekombinase exprimierend); OHT = Hydroxytamoxifen; +OHT = Zugabe von OHT; -OHT = keine Zugabe von OHT.

### 3.3 Transkriptionsprogramm von *Bcl11b*-Knockoutzellen

#### 3.3.1 RNA-Sequenzierung von *Bcl11b*-Knockoutzellen

Zur Identifizierung von durch den *Bcl11b*-Knockout beeinflussten Genen wurden die Expressionsstärken von Genen und anderen transkribierten Regionen mittels RNA-Sequenzierung eines *Bcl11b*-Knockout-Versuches erfasst. Für fünf Zeitpunkte (Tag 1, 4, 7, 11 und 14 nach OHT-Behandlung) wurde aus der Anzahl der gemessenen Reads in Knockoutzellen und Kontrollgruppen jeweils die relative Änderung der Genexpression von Knockoutzellen gegenüber den drei Kontrollgruppen (Fold change) berechnet. Da es sich vorrangig um ein Screening zur Identifizierung potentiell



durch Bcl11b regulierter Gene handelt, sind die nicht mit qPCR bestätigten Aussagen von hoch- oder herunterregulierten Genen mit Vorsicht zu betrachten.

Die Auswahl Bcl11b-regulierter Gene basierte auf folgenden Kriterien:

- absolute Zahl der Reads in der Knockoutgruppe und/oder allen Kontrollgruppen >10 an Tag 1 und >20 an Tag 4, 7, 11 und 14 nach OHT-Behandlung
- Fold change  $\geq 2$  in mindestens 10 von 15 Berechnungen (Fold change zu 5 Zeitpunkten gegenüber jeweils 3 Kontrollgruppen berechnet)
- keine widersprüchliche (gegenteilige) Expression gegenüber Kontrollgruppen bei Fold change <2 an Tag 4, 7, 11 und 14 nach OHT-Behandlung (an Tag 1 waren Änderungen der Transkription noch nicht immer zu erkennen)

Auf Basis dieser Kriterien fanden sich 120 durch Bcl11b regulierte Gene, davon 51 hochregulierte und 69 herunterregulierte Gene (siehe Anhang Tabelle 6). Die regulierten Gene wurden mithilfe der *GO Enrichment Analysis* (Mi et al. 2019) von *Gene Ontology* (Ashburner et al. 2000; The Gene Ontology Consortium 2021) auf gemeinsames Auftreten in biologischen Prozessen untersucht. Fast alle Kategorien mit statistisch signifikant erhöhtem Auftreten von Bcl11b-regulierten Genen bezogen sich auf das Immunsystem oder stellten Immunfunktionen einschließende Oberbegriffe für biologische Prozesse dar. Ausgewählte Kategorien sind in Tabelle 3 dargestellt. Von den 120 Bcl11b-regulierten Genen konnten 52 dem Immunsystem zugeordnet werden, davon 27 dem angeborenen Immunsystem. Gehäuft zeigte sich eine Beteiligung an der Aktivierung, Zytotoxizität, Chemotaxis und Zelladhäsion von Leukozyten. Des Weiteren spielen zahlreiche Gene bei der Zytokinproduktion eine Rolle. Mehrere Gene wurden als interferonabhängig beschrieben, besonders von IFN- $\beta$  und IFN- $\gamma$ . Hervorzuheben durch Auftauchen in vielfältigen Kategorien der Immunfunktionen sind die Gene *Ccl5*, *CD244*, *Gbp4*, *Il-23a*, *Irf1*, *Stat1*, *Tgtp1* und *Xcl-1*. Auch verschiedene NK-Zell-Rezeptoren scheinen Bcl11b-abhängig. Diese werden in Kapitel 3.4.2 beleuchtet.

Bezüglich der molekularen Funktion fiel in der *GO Enrichment Analysis* das gehäufte Auftreten von GTPasen auf. Die IFN-regulierten GTPasen *Gbp2*, *Gm4951*, *ligp1*, *Tgtp1* und *F830016B08Rik (Ifgga4)* treten in der Sequenzierungsanalyse zusammen mit der  $\gamma$ -Untereinheit der Phospholipase C (*Plcg1*) auch als die am stärksten herunterregulierten Gene in *Bcl11b*-Knockoutzellen auf.

Zu den am deutlichsten hochregulierten Genen gehören die NK-Zell-Rezeptoren *Ncr1* und *Fcgr3 (CD16)*, das Adaptermolekül *Dap12*, das Chemokin *Xcl1*, das Aktin-

Bindeprotein *Avil* sowie *A1836003 (Ccdc184)*. Bei mehreren bedeutsamen Signalmolekülen und Oberflächenmarkern erfolgte eine Bestätigung der Genexpressionsänderung mittels qPCR (siehe Kapitel 3.4).

**Tabelle 3: GO Enrichment Analysis von Bcl11b-regulierten Genen**

Die Tabelle zeigt ausgewählte Kategorien biologischer Prozesse und molekularer Funktionen, für welche in der *GO Enrichment Analysis* ein statistisch signifikant gehäuftes Auftreten von Genen aus der Liste der 120 Bcl11b-regulierten Genen vermerkt wurde. Sowohl die Anzahl der einer Kategorie zugeordneten Gene als auch der P-Wert für die statistische Signifikanz dieses Ergebnisses sind abgebildet. Quelle: Eigene Darstellung nach Daten der *GO Enrichment Analysis* (Mi et al. 2019) von *Gene Ontology* (Ashburner et al. 2000; The Gene Ontology Consortium 2021)

<b>GO-Terminus: Biologische Prozesse</b>	<b>Anzahl</b>	<b>P-Wert</b>	<b>Beispiele</b>
Prozesse des Immunsystems	52/120	1,40E-21	
→ davon angeborene Immunantwort	27/120	5,50E-16	Irf1, Gbp2, Ifit3
Hämatopoese	11/120	4,10E-04	Klf2, Plid4, Kit
Regulation der T-Zell-Aktivierung	8/120	1,60E-04	CD244, IL-23a
→ davon CD8 <sup>+</sup> -αβ-T-Zell-Aktivierung	3/120	1,34E-04	Irf1, Xcl1
Regulation der NK-Zell-Aktivierung	5/120	4,30E-06	Tyrobp, Irf1
Regulation leukozytenvermittelter Zytotoxizität	6/120	2,46E-05	Klr1b1c, Tyrobp
Regulation der Zelladhäsion von Leukozyten	9/120	1,61E-05	CD5, CD6
Regulation der Chemotaxis	8/120	1,50E-05	Ccr111, Cxcr4
Regulation der Zytokinproduktion	17/120	3,67E-08	Gbp4, Pglyrp1
Antwort auf IFN-α	3/120	3,34E-04	Ifit1, Ifit3
Antwort auf IFN-β	16/120	5,31E-24	ligp1, Igtp
Antwort auf IFN-γ	14/120	1,04E-14	Irf8, Gbp2/4/6
Regulation des JAK-STAT-Weges	6/120	2,18E-04	Irf1, Il-23a
Apoptotischer Signalweg	10/120	1,33E-05	Spp1, Mcpt8
→ davon granzymvermittelt	5/120	1,25E-08	Gzmc, Gzmd
<b>GO-Terminus: Molekulare Funktion</b>	<b>Anzahl</b>	<b>P-Wert</b>	<b>Beispiele</b>
GTPase-Aktivität	12/120	3,16E-08	Gbp2, ligp

### 3.3.2 T- und NK-Zell-assoziierte Genexpression im Vergleich zur Literatur

Um den Einfluss von Bcl11b auf die Genexpression in T-Zellen zu prüfen, generierten zahlreiche Forschungsgruppen Bcl11b-defiziente Zellen durch konditionellen Knockout oder Knockdown mittels inhibierender RNA und führten im Anschluss Screeningmethoden wie Mikroarray-Analysen und RNA-Sequenzierungen durch. Die Untersuchungen unterscheiden sich neben der Wahl der Methode auch hinsichtlich der genutzten Zellen, etwa T-Vorläuferzellen verschiedener DN-Stadien, reife T-Zellen

oder humane Lymphom-/Leukämiezelllinien. Dadurch sind die Ergebnisse einerseits bezüglich unterschiedlich regulierten Genen eingeschränkt vergleichbar, andererseits bei Auffinden gemeinsam regulierter Gene umso aufschlussreicher. Tabelle 4 stellt ausgewählte Forschungsgruppen und ihre Verfahren dar, welche den Schwerpunkt ihrer Untersuchungen auf den Einfluss von Bcl11b auf die Expression linienspezifischer Marker legten, insbesondere die der NK- und T-Zell-Linie.

**Tabelle 4: Vergleich von veröffentlichten wissenschaftlichen Arbeiten bezüglich ihrer Verfahren der Generierung *Bcl11b*-defizienter T-Zellen und konsekutiver Genexpressionsanalysen**

Quelle: Eigene Darstellung nach Daten der in linker Tabellenspalte genannten Autoren

	<b>T-Zellstadium bei <i>Bcl11b</i>-Verlust</b>	<b>Knockout-/Knockdown-methode</b>	<b>Analyse-methode</b>
Li et al. (2010)	DN1, DN2a/b	CreErt2-Loxp-System (retroviral transduzierte Cre-Rekombinase)	qPCR, FACS
Ha et al. (2017)	DN1, DN2a/b (humane Zellen)	Bcl11b-shRNA-Lentivirus	RNA-Seq
Longabaugh et al. (2017)	DN2, DN3	CreErt2-Loxp-System (retroviral transduzierte Cre-Rekombinase oder Cre-transgene Mäuse)	RNA-Seq
Kastner et al. (2010)	DP	CreCD4-Loxp-System (Cre-transgene Mäuse)	Mikroarray, FACS
Li (2010)	DN3, reife CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen	CreErt2-Loxp-System (Cre-transgene Mäuse)	Mikroarray, qPCR, FACS
Vorliegende Arbeit	reife CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen	CreErt2-Loxp-System (Cre-transgene Mäuse)	RNA-Seq, qPCR

Tabelle 5 vergleicht die Ergebnisse der Forschungsgruppen bezüglich des Einflusses von Bcl11b auf T-, NK- und Stammzell-assoziierte Moleküle mit den Ergebnissen der RNA-Sequenzierungs- und qPCR-Analysen der vorliegenden Arbeit. Hierbei fällt auf, dass eine vermehrte Expression stammzellassoziierter Gene nur in T-Zellvorstufen zu sehen ist, bei denen der Verlust von Bcl11b bereits im DN1- oder DN2-Stadium initiiert wurde, nicht aber bei fortgeschrittenen T-Zellvorstufen und reifen T-Zellen. Lediglich der Stammzellfaktor-Rezeptor Kit bildet hier eine Ausnahme. Auch die Herunterregulation des TZR-Komplexes (TZR-Moleküle, CD3) findet nur bis zum DN3-Stadium statt und nicht mehr in reifen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. Im Gegensatz zu anderen Untersuchungen zeigt das in dieser Arbeit genutzte Screening keine Suppression von T-Zell-assoziierten Transkriptionsfaktoren und nur eine mäßige Heraufregulation NK-Zell-assoziiierter Transkriptionsfaktoren. Bezüglich mehreren NK-Zell-Markern findet sich aber in allen Arbeiten Einigkeit über die starke Induktion, sei es auf transkriptioneller oder Protein-Ebene.

**Tabelle 5: Vergleich von veröffentlichten wissenschaftlichen Arbeiten und der vorliegenden Arbeit bezüglich der Genexpression von T- und NK-Zell-assoziierten Molekülen in *Bcl11b*-defizienten T-Zellen und ihren Vorstufen**

Dargestellt ist die Expression kategorisierter Gene bzw. Proteine bei *Bcl11b*-defizienten T(-Vorläufer)-Zellen im Vergleich zu Kontrollgruppen: ++/- - = deutliche Hoch-/Herunterregulation; +/- = dezente Hoch-/Herunterregulation; ≈ = keine relevante Änderung. Sternchen\* und graue Schriftfarbe kennzeichnen durchflusszytometrische Daten. Die anderen Daten entstammen RNA-Analysen.

Quelle: Eigene Darstellung nach Daten von den in Tabellenkopf genannten Autoren und eigenen Daten

<b>Gen (Protein)</b>	<b>Li et al. (2010)</b>	<b>Ha et al. (2017)</b>	<b>Longabaugh et al. (2017)</b>	<b>Kastner et al. (2010)</b>	<b>Li (2010)</b>	<b>Vorliegende Arbeit</b>
<b>T-Zell-assoziierte Marker/Moleküle</b>						
<i>Tcrb</i> (TCRβ)/ <i>Ptcra</i> (Pre-TCRα)	≈	--			--* (DN1–DN3) ≈* (CD8 <sup>+</sup> -Zellen)	≈
<i>CD3d/CD3e/CD3g</i> (CD3)	-		--	--*	--* (DN1–DN3) ≈* (CD8 <sup>+</sup> -Zellen)	≈
<i>CD8a</i> (CD8)				-*	--	≈
<i>Il7r</i> (IL-7-R)	+	--		++	--	≈
<i>Rag1/Rag2</i>	≈	--		--		≈
<i>Lck</i>	≈	--		--		≈
<i>Zap-70</i>	--	--				≈
<b>T-Zell-assoziierte Transkriptionsfaktoren</b>						
<i>Gata3</i>	≈		--		--	≈
<i>Tcf-1</i>	≈				--	≈
<i>Hes1</i>	≈				--	≈
<i>Tbx21</i> (T-bet)	≈				--	≈
<i>Thpok</i>				++		≈
<i>Runx3</i>	≈	++		++		≈
<b>NK-Zell-assoziierte Marker/Moleküle</b>						
<i>CD244</i>					++	++
<i>Il2rb/Il15rb</i>	++		++		++	+
<i>Klrb1c</i> (NK1.1)	++*			++*	++*	++
<i>Ncr1</i> (NKp46)					++*	++
<i>Klra</i> (Ly49)				++*	++* (nur <i>in vivo</i> )	≈
<b>NK-Zell-assoziierte Transkriptionsfaktoren</b>						
<i>Id2</i>	++		++	++	++	≈
<i>Nfil3</i>	++		++	++	++	+
<i>Zbtb16</i>	++	++	++			≈
<i>Zbtb32</i>					++	+
<i>Zfp105</i>	++				++	++
<b>Mit Stamm-/Vorläuferzellen assoziierte Gene</b>						
<i>BAALC, GFI1b, HOXA9</i>		++				≈
<i>Lyl1, Erg, Spi1, Gfi1b, Bcl11a</i>	++		++			≈
<i>Kit</i>	++		++		++	++

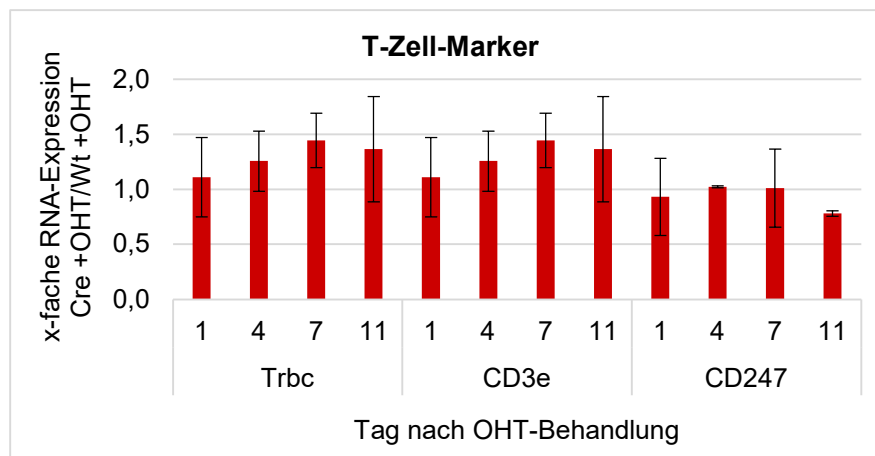
### 3.4 Einfluss des *Bcl11b*-Knockouts auf T- und NK-Zell-assoziierte Oberflächenmarker und Signalmoleküle

#### 3.4.1 T-Zell-Rezeptor-Komplex und T-Zell-Differenzierungsmerkmale

Um die Expression des TZR-Komplexes als ein wichtiges Merkmal von T-Zellen in *Bcl11b*-Knockoutzellen zu untersuchen, wurde das Transkriptionslevel folgender Anteile des TZR-Komplexes bestimmt:

- *Trbc*, kodierend für die konstante Domäne der  $\beta$ -Kette des TZR
- *CD3e*, kodierend für die Untereinheit CD3 $\epsilon$
- *CD247*, kodierend für die  $\zeta$ -Kette

Dabei ergaben sich zwischen Knockout- und Kontrollgruppe keine relevanten Unterschiede in der RNA-Expression der drei Gene (siehe Abbildung 9). Der Erhalt der Oberflächenexpression von CD3 auf den untersuchten *Bcl11b*-Knockoutzellen wurde in der Arbeitsgruppe durchflusszytometrisch bestätigt (mündliche Kommunikation mit B. Hoffmann, nicht gezeigte Daten), einhergehend mit den Untersuchungen von Li (2010) zur fortwährenden Expression des TZR auf T-Zellen mit *Bcl11b*-Knockout jenseits des DN3-Stadiums.



**Abbildung 9: Verhältnis der *Trbc*-, *CD3e*- und *CD247*-RNA-Expression von *Bcl11b*-Knockoutzellen zur Kontrollgruppe**

Dargestellt ist der Quotient aus den auf *B2m* bezogenen RNA-Kopienzahlen (y-Achse) der Gene *Trbc*, *CD3e* und *CD247* von *Bcl11b*-Knockoutzellen (Cre +OHT) und einer Kontrollgruppe (Wt +OHT) zu vier verschiedenen Zeitpunkten nach OHT-Behandlung (x-Achse). Die Daten stammen von drei Versuchen mit murinen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, deren Kopienzahlen in Form von Mittelwert (Säulen) und Standardabweichung (Fehlerindikatoren) veranschaulicht werden. Bei jeweils einem Versuch wurden die Kopienzahlen an Tag 6 und Tag 8 erhoben und gemittelt, um einen Wert für Tag 7 zu erhalten. qPCR. Cre = die Cre-Rekombinase exprimierend; Wt = Wildtyp (keine Cre-Rekombinase exprimierend); OHT = Hydroxytamoxifen; +OHT = Zugabe von OHT; -OHT = keine Zugabe von OHT.

Die Zusammenschau der Ergebnisse demonstriert, dass die umprogrammierten reifen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen trotz Entwicklung von NK-Zell-Merkmalen ihre T-Zell-Identität beibehalten.

Zur Untersuchung, ob die durch den Knockout induzierte Umprogrammierung mit einer veränderten Differenzierung der T-Zellen einhergeht, wurden die Oberflächenmarker *Ccr7* und *CD44* genutzt. Der Zytokinrezeptor *Ccr7* steuert das Homing von Lymphozyten in die Lymphknoten. Er befindet sich auf ruhenden Zellen, also naiven T-Zellen und zentralen Gedächtnis-T-Zellen, allerdings nicht auf Effektor-T-Zellen und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen. (Sallusto et al. 1999) Das Adhäsionsmolekül *CD44* wird als Aktivierungsmarker auf Effektor-T-Zellen, zentralen Gedächtnis-T-Zellen und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen exprimiert, nicht aber auf naiven T-Zellen (Pure und Cuff 2001). Die RNA-Expression von *Ccr7* und *CD44* nach *Bcl11b*-Knockout wurde in zwei verschiedenen T-Zell-Populationen ermittelt. In der einen Population startete die Kultivierung mit nicht weiter selektierten CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, unter denen sich also naive, Effektor- und Gedächtniszellen befanden (Gesamtpopulation). Bei der anderen Population wurden rein naive Zellen aus den Lymphknoten isoliert und kultiviert. Eine leicht verminderte Expression von *Ccr7* um ca. 50 % im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen zeigte sich bei der naiv isolierten T-Zell-Population an Tag 7 und 11 sowie bei der Gesamtpopulation an Tag 11. Weiterhin fand sich an allen Tagen eine Tendenz zur Hochregulation von *CD44* (auf das 1,2- bis 3-fache) in der naiv isolierten T-Zell-Population (siehe Abbildung 10). Die dezenten Hinweise auf eine vermehrte terminale Differenzierung der naiven T-Zell-Population im Rahmen des *Bcl11b*-Knockouts können Anhalt dafür sein, dass die Umprogrammierung zu ITNK mit einer terminalen Differenzierung zu aktivierten T-Zellen einhergeht. Jedoch ist zu bemerken, dass die rein naiv isolierten Zellen vor dem Knockout bereits eine Woche unter IL-2-Stimulation aktiviert und vervielfältigt wurden und sich somit möglicherweise schon den Differenzierungsvoraussetzungen der Gesamt-T-Zell-Population angenähert hatten. Ein direkter *Bcl11b*-Knockout bei naiven T-Zellen hätte gegebenenfalls stärkere Tendenzen aufzeigen können, war aufgrund der begrenzten Zellzahl in den Kulturen jedoch nicht umsetzbar.



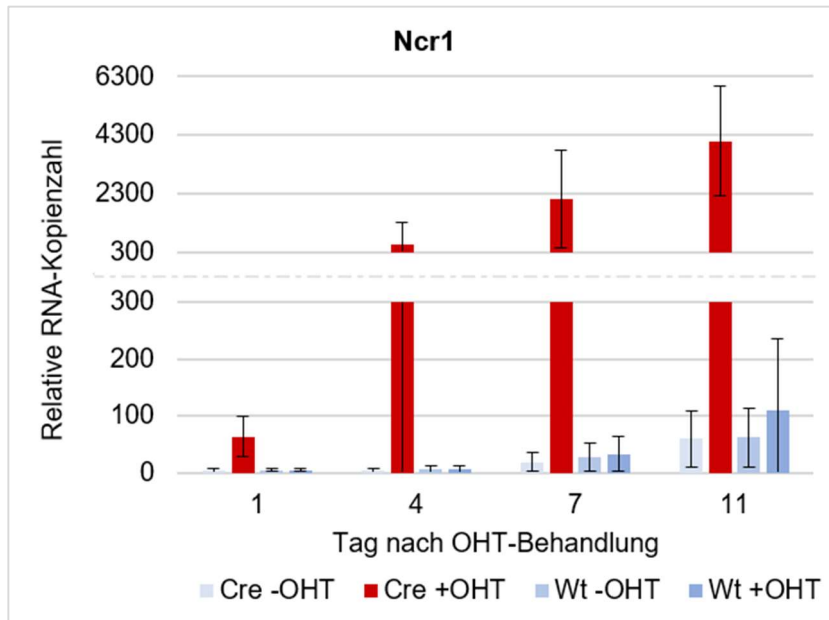
**Abbildung 10: Verhältnis der Ccr7- und CD44-RNA-Expression von *Bcl11b*-Knockoutzellen zur Kontrollgruppe**

Dargestellt ist der Quotient aus den auf *B2m* bezogenen RNA-Kopienzahlen (y-Achse) der Gene *Ccr7* und *CD44* von *Bcl11b*-Knockoutzellen (Cre +OHT) und einer Kontrollgruppe (Wt +OHT) zu vier verschiedenen Zeitpunkten nach OHT-Behandlung (x-Achse). Die Kopienzahlen wurden von jeweils drei Versuchen mit Populationen von naiven und nicht-naiven CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (T-Zell-Gesamtpopulation, linke Spalte) und mit Populationen von rein naiven CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (Naive T-Zell-Population, rechte Spalte) erhoben und in Form von Mittelwert (Säulen) und Standardabweichung (Fehlerindikatoren) veranschaulicht. Bei jeweils einem Versuch wurden die Kopienzahlen an Tag 6 und Tag 8 erhoben und gemittelt, um einen Wert für Tag 7 zu erhalten. qPCR. Cre = die Cre-Rekombinase exprimierend; Wt = Wildtyp (keine Cre-Rekombinase exprimierend); OHT = Hydroxytamoxifen; +OHT = Zugabe von OHT; -OHT = keine Zugabe von OHT.

### 3.4.2 NK-Zell-Rezeptoren und Dynamik der Merkmalsakquisition

Das Gen *Natural cytotoxicity triggering receptor 1 (Ncr1)* kodiert den aktivierenden NK-Zell-Rezeptor NKp46 (Pessino et al. 1998; Kelley et al. 2005). Sowohl Peng Li als auch die Greifswalder Arbeitsgruppe nutzen vorrangig diesen NK-Zell-spezifischen Marker, um ITNK nach *Bcl11b*-Knockout zu definieren. *Ncr1* ist zugleich eins der stärksten hochregulierten Gene in der RNA-Sequenzierung (siehe Anhang Tabelle 6). Um den zeitlichen Verlauf der Expression zu untersuchen, wurden die RNA-Kopienzahlen von *Ncr1* zu vier verschiedenen Zeitpunkten nach *Bcl11b*-Knockout

gemessen. Hierbei wird die kontinuierlich und stark zunehmende RNA-Expression von *Ncr1* deutlich (siehe Abbildung 11). Bereits einen Tag nach OHT-Behandlung ist die *Ncr1*-Expression in der *Bcl11b*-Knockoutgruppe im Vergleich zu den Kontrollgruppen im Mittel 19-fach erhöht.



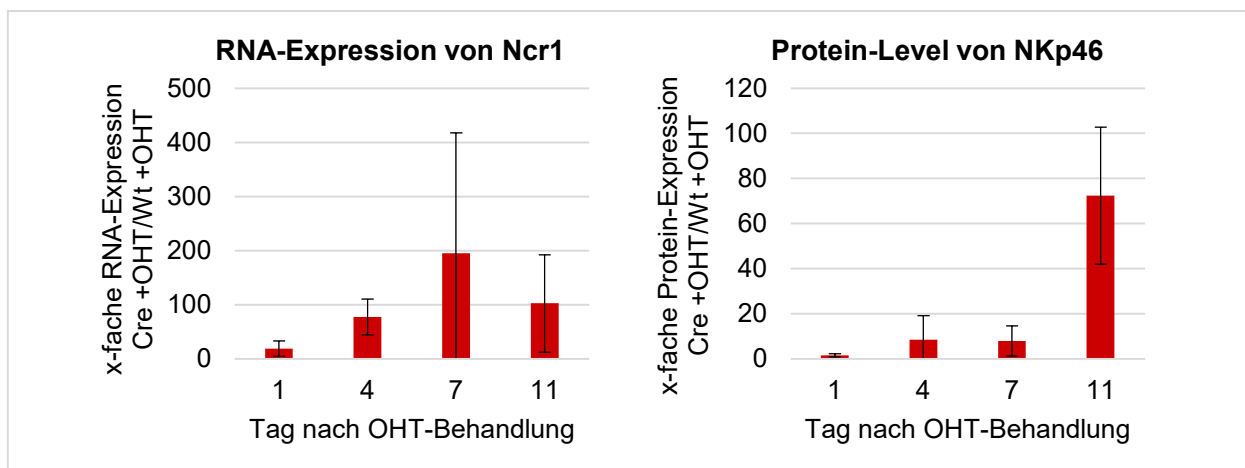
**Abbildung 11: RNA-Expression von *Ncr1* in *Bcl11b*-Knockoutzellen und Kontrollgruppen**

Dargestellt ist die relative RNA-Kopienzahl von *Ncr1* (y-Achse), bezogen auf die Referenz-RNA *B2m*, in *Bcl11b*-Knockoutzellen (Cre +OHT) und Kontrollgruppen (Cre -OHT, Wt -OHT, Wt +OHT) zu vier verschiedenen Zeitpunkten (x-Achse). Zu beachten ist die Unterbrechung der y-Achse mit Anpassung der Intervallgröße. Die Daten stammen von drei Versuchen mit murinen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, deren Kopienzahlen in Form von Mittelwert (Säulen) und Standardabweichung (Fehlerindikatoren) veranschaulicht werden. Bei einem Versuch wurden Daten an Tag 6 und 8 erhoben und gemittelt, um Werte für Tag 7 zu erhalten. qPCR. Cre = die Cre-Rekombinase exprimierend; Wt = Wildtyp (keine Cre-Rekombinase exprimierend); OHT = Hydroxytamoxifen; +OHT = Zugabe von OHT; -OHT = keine Zugabe von OHT.

Das Verhältnis der *Ncr1*-RNA-Kopienzahl von der Experimentalgruppe zur Kontrollgruppe Wt +OHT (Abbildung 12) steigt jedoch ab Tag 4 nicht mehr derart kontinuierlich an wie die Kopienzahl selbst. Es erreicht an Tag 7 ein Maximum mit durchschnittlich 195-facher Expression. Dies ist dadurch bedingt, dass auch in den Kontrollgruppen im Laufe der Kultivierung unter aktivierenden Bedingungen ein Anstieg der *Ncr1*-Expression zu vermerken ist, wenn auch deutlich geringfügiger als in der Knockoutgruppe. Durch die anfangs sehr niedrigen Kopienzahlen in der Kontrollgruppe rufen diese schon bei leichtem Anstieg merkliche Veränderungen des Quotienten hervor. Abbildung 12 zeigt des Weiteren die durchflusszytometrisch erfassten Protein-Level des Oberflächenmarkers NKp46 für dieselben Versuche. Auf Proteinebene ist die NKp46-Expression in den Knockoutzellen gegenüber der



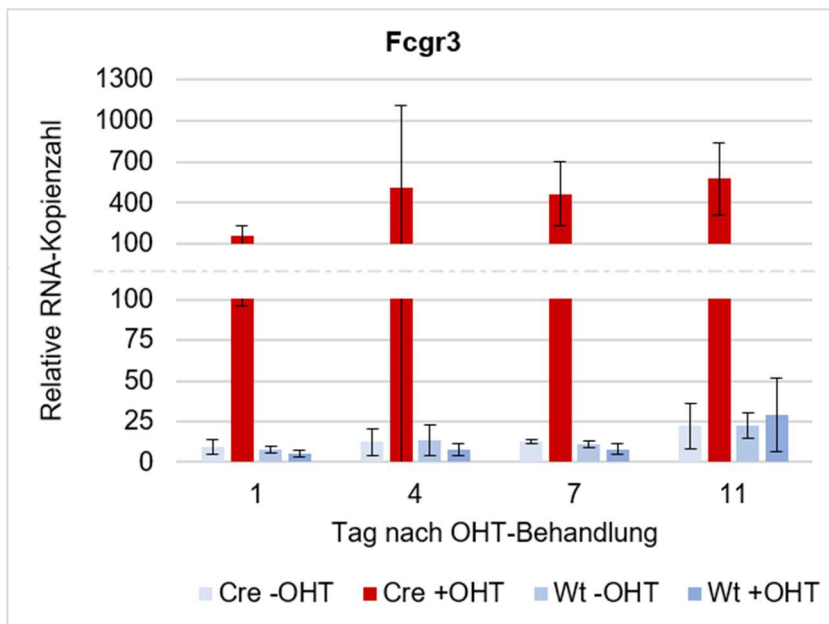
Kontrollgruppe Wt +OHT am ersten Messtag nach OHT-Behandlung kaum erhöht, an Tag 4 und 7 im Mittel auf das 8-fache. Erst an Tag 11 folgt ein scharfer Anstieg zu durchschnittlich 72-facher Expressionsstärke im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies bildet einen interessanten Gegensatz zur mRNA-Expression, welche bereits zu früheren Zeitpunkten stärker gegenüber der Kontrollgruppe gesteigert ist und deren Kopienzahlen kontinuierlicher zunehmen. Die deutlich erhöhte Transkriptionsrate von *Ncr1* scheint sich demnach erst mit zeitlicher Verzögerung auch auf Proteinebene niederzuschlagen.



**Abbildung 12: Verhältnis der RNA-Expression bzw. Proteinexpression von *Ncr1*/NKp46 von *Bcl11b*-Knockoutzellen zur Kontrollgruppe**

Auf der linken Bildseite dargestellt ist der Quotient aus der auf *B2m* bezogenen RNA-Kopienzahl (y-Achse) von *Ncr1* in *Bcl11b*-Knockoutzellen (Cre +OHT) und einer Kontrollgruppe (Wt +OHT) zu vier verschiedenen Zeitpunkten nach OHT-Behandlung (x-Achse). Der rechte Bildabschnitt zeigt für die gleichen Versuche den Quotienten aus der Protein-Expression (y-Achse) des von *Ncr1* kodierten Proteins NKp46 der *Bcl11b*-Knockoutzellen und Kontrollgruppe zu denselben Zeitpunkten (x-Achse). Die Daten stammen von drei Versuchen mit murinen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und werden in Form von Mittelwert (Säulen) und Standardabweichung (Fehlerindikatoren) veranschaulicht. Bei einem Versuch wurden Daten an Tag 6 und 8 erhoben und gemittelt, um Werte für Tag 7 zu erhalten. qPCR/Durchflusszytometrie. Cre = die Cre-Rekombinase exprimierend; Wt = Wildtyp (keine Cre-Rekombinase exprimierend); OHT = Hydroxytamoxifen; +OHT = Zugabe von OHT; -OHT = keine Zugabe von OHT.

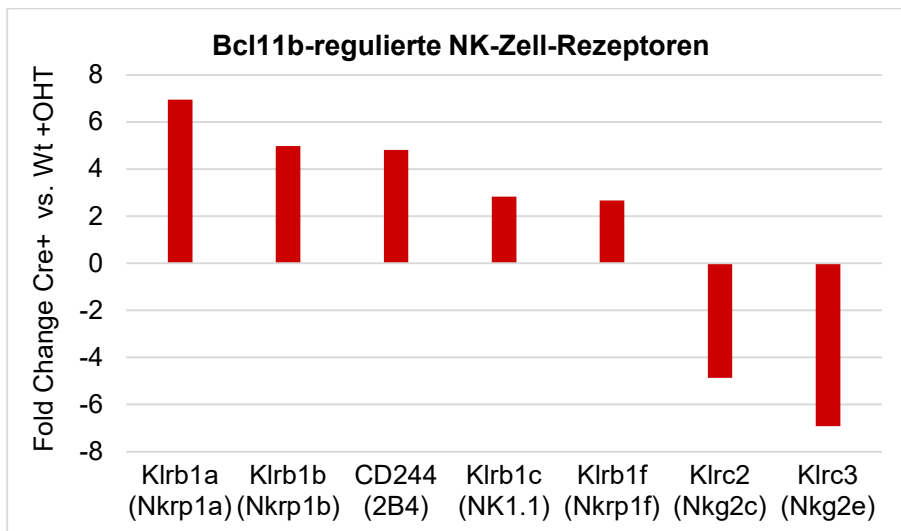
Der murine Rezeptor III für das Fc-Fragment von IgG (FcγRIII, kodiert durch das Gen *Fcgr3*) ist der Hauptvermittler der ADCC. Seine Expression zeigt in der RNA-Sequenzierungsanalyse ebenfalls eine enorme Hochregulation bei *Bcl11b*-Knockout. Diese wurde auch mit qPCR nachgewiesen (siehe Abbildung 13). Das Verhältnis der RNA-Kopienzahlen von Knockoutzellen zu der Kontrollgruppe Wt +OHT war bereits an Tag 1 nach OHT-Behandlung mit einer im Mittel 35-fachen Expression stark erhöht und stieg im weiteren Verlauf auf ein Maximum von einer durchschnittlich 67-fachen Erhöhung an Tag 7 nach OHT-Behandlung.



**Abbildung 13: RNA-Expression von *Fcgr3* in *Bcl11b*-Knockoutzellen und Kontrollgruppen**

Dargestellt ist die relative RNA-Kopienzahl von *Fcgr3* (y-Achse), bezogen auf die Referenz-RNA *B2m*, in *Bcl11b*-Knockoutzellen (Cre +OHT) und Kontrollgruppen (Cre -OHT, Wt -OHT, Wt +OHT) zu vier verschiedenen Zeitpunkten (x-Achse). Zu beachten ist die Unterbrechung der y-Achse mit Anpassung der Intervallgröße. Die Daten stammen von drei Versuchen mit murinen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, deren Kopienzahlen in Form von Mittelwert (Säulen) und Standardabweichung (Fehlerindikatoren) veranschaulicht werden. Bei einem Versuch wurden Daten an Tag 6 und 8 erhoben und gemittelt, um Werte für Tag 7 zu erhalten. qPCR. Cre = die Cre-Rekombinase exprimierend; Wt = Wildtyp (keine Cre-Rekombinase exprimierend); OHT = Hydroxytamoxifen; +OHT = Zugabe von OHT; -OHT = keine Zugabe von OHT.

In der RNA-Sequenzierung fiel die Veränderung der Genexpression weiterer NK-Zell-Rezeptoren in *Bcl11b*-Knockoutzellen gegenüber den Kontrollgruppen auf (siehe Abbildung 14). Gemäß den in Kapitel 3.3.1 genannten Kriterien für *Bcl11b*-regulierte Gene fand sich eine relevante Hochregulation von mehreren Genen für aktivierende Rezeptoren, *Klrb1a* (Nkrp1a), *Klrb1c* (Nkrp1c/Nk1.1), *Klrb1f* (Nkrp1f) und *CD244* (2B4). Ein Gen für einen inhibitorischen Rezeptor, *Klrb1b* (Nkrp1b), erschien ebenfalls induziert. Eine verminderte Expression zeigte sich bei zwei Genen für aktivierende Rezeptoren, *Klrc2* (Nkg2c) und *Klrc3* (Nkg2e).



**Abbildung 14: Weitere NK-Zell-Rezeptoren mit veränderter Gentranskription in *Bcl11b*-Knockoutzellen**

Dargestellt ist das Verhältnis der Anzahl an RNA-Transkripten ausgewählter NK-Zell-Rezeptoren (x-Achse) von *Bcl11b*-Knockoutzellen (Cre +OHT) und einer Kontrollgruppe (Wt +OHT) in Form des Fold Changes (y-Achse). Die Daten stammen von einem Versuch mit murinen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen 11 Tage nach OHT-Behandlung. RNA-Sequenzierung. Cre = die Cre-Rekombinase exprimierend; Wt = Wildtyp (keine Cre-Rekombinase exprimierend); OHT = Hydroxytamoxifen; +OHT = Zugabe von OHT.

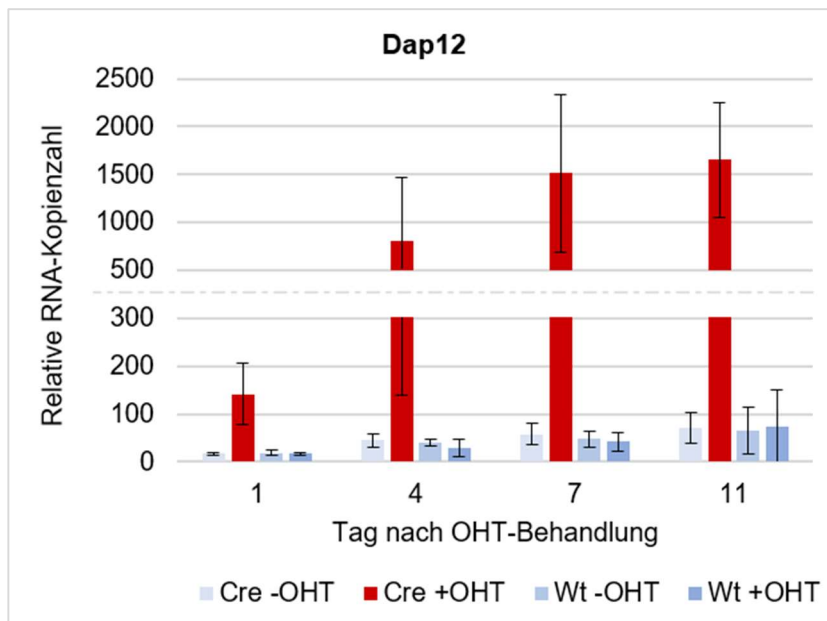
### 3.4.3 Signalmoleküle

In T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und teilweise auch in myeloischen Zellen wird die Aktivierung der Immunantwort durch membranverankerte Adaptermoleküle vermittelt, die mit aktivierenden Membranrezeptoren interagieren. Sie enthalten in ihrer zytoplasmatischen Domäne ITAM, über welche intrazelluläre Signalkaskaden bei Stimulation der assoziierten Rezeptoren initiiert werden. Zu den ITAM-enthaltenden Adaptermolekülen zählen u.a. (Lanier und Bakker 2000; Tomasello und Vivier 2005):

- CD3-Moleküle (CD3 $\epsilon$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\gamma$ ) und die  $\zeta$ -Kette (CD3zeta), welche als Teil des TZR-Komplexes mit dem TZR auf T-Lymphozyten assoziieren
- die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette von CD79 (Iga und Igb), die als Teil des B-Zell-Rezeptors an das membranständige Ig binden
- Dap12, Fc $\epsilon$ 1 $\gamma$  und ebenfalls die  $\zeta$ -Kette, welche Signale von NK-Zell-Rezeptoren und Rezeptoren myeloischer Zellen vermitteln

In der RNA-Sequenzierungsanalyse erschien *Dap12* als eines der am stärksten hochregulierten Gene in *Bcl11b*-Knockoutzellen (siehe Anhang Tabelle 6). Die Überprüfung der RNA-Expression von *Dap12* mit qPCR bestätigte die deutliche Hochregulation (siehe Abbildung 15). Das Verhältnis der RNA-Expression von *Bcl11b*-Knockoutzellen gegenüber der Kontrollgruppe Wt +OHT reicht von einer

durchschnittlich 8-fachen Steigerung an Tag 1 bis zu einer durchschnittlich 36-fachen Erhöhung an Tag 11.

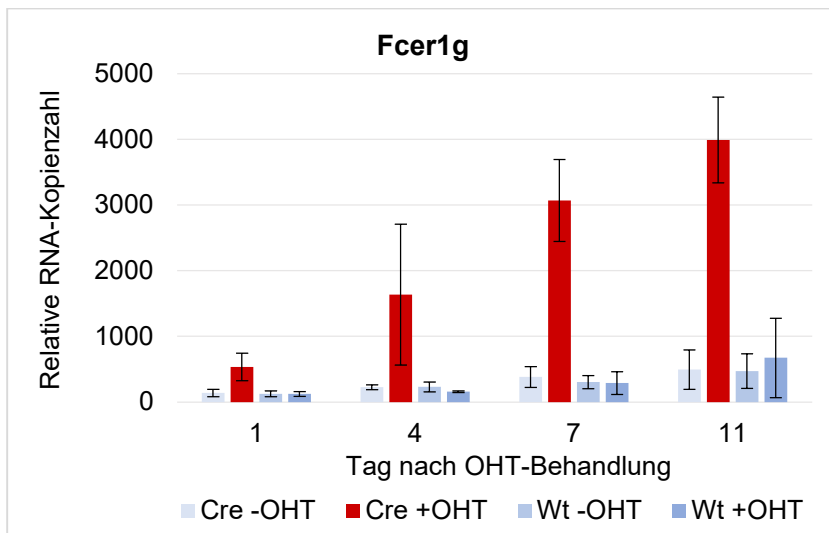


**Abbildung 15: RNA-Expression von *Dap12* in *Bcl11b*-Knockoutzellen und Kontrollgruppen**

Dargestellt ist die relative RNA-Kopienzahl von *Dap12* (y-Achse), bezogen auf die Referenz-RNA *B2m*, in *Bcl11b*-Knockoutzellen (Cre +OHT) und Kontrollgruppen (Cre -OHT, Wt -OHT, Wt +OHT) zu vier verschiedenen Zeitpunkten nach OHT-Behandlung (x-Achse). Zu beachten ist die Unterbrechung der y-Achse mit Anpassung der Intervallgröße. Die Daten stammen von drei Versuchen mit murinen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, deren Kopienzahlen in Form von Mittelwert (Säulen) und Standardabweichung (Fehlerindikatoren) veranschaulicht werden. Bei einem Versuch wurden Daten an Tag 6 und 8 erhoben und gemittelt, um einen Wert für Tag 7 zu erhalten. qPCR. Cre = die Cre-Rekombinase exprimierend; Wt = Wildtyp (keine Cre-Rekombinase exprimierend); OHT = Hydroxytamoxifen; +OHT = Zugabe von OHT; -OHT = keine Zugabe von OHT.

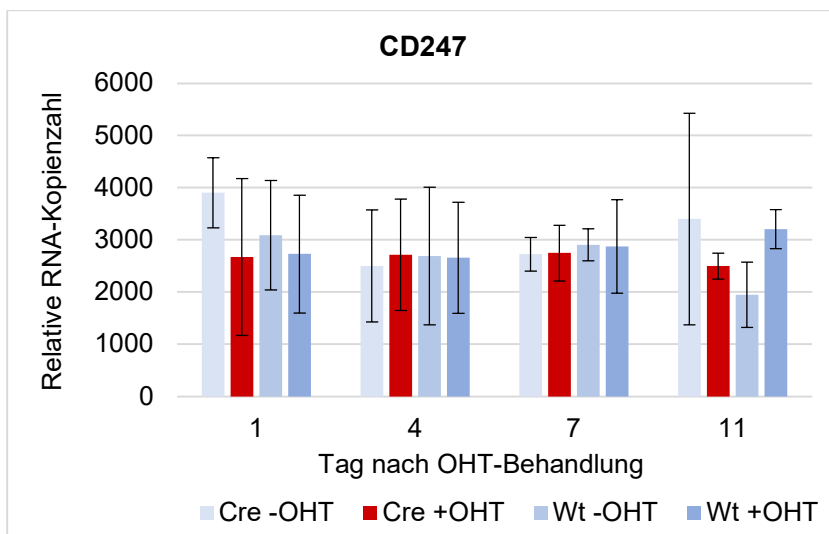
Auch *Fcer1g* fiel in der RNA-Sequenzierung durch eine deutlich erhöhte Expression auf, welche sich ebenfalls in der qPCR widerspiegelte (siehe Abbildung 16). So waren die RNA-Kopienzahlen des Rezeptors an Tag 1 gegenüber der Kontrollgruppe Wt +OHT im Mittel 5-fach erhöht, an Tag 11 schließlich 10-fach.

Die  $\zeta$ -Kette (CD3zeta) findet sich sowohl in T-Zellen als Teil des TZR-Komplexes als auch in NK-Zellen assoziiert mit bestimmten NK-Zell-Rezeptoren (Lanier und Bakker 2000). Im Vergleich zu *Dap12* und *Fcer1g* erscheint die  $\zeta$ -Kette in der Expression ihres Gens *CD247* durch den *Bcl11b*-Knockout unbeeinflusst (siehe Abbildung 17 sowie Kapitel 3.4.1 Abbildung 9).



**Abbildung 16: RNA-Expression von *Fcer1g* in *Bcl11b*-Knockoutzellen und Kontrollgruppen**

Dargestellt ist die relative RNA-Kopienzahl von *Fcer1g* (y-Achse), bezogen auf die Referenz-RNA *B2m*, in *Bcl11b*-Knockoutzellen (Cre +OHT) und Kontrollgruppen (Cre -OHT, Wt -OHT, Wt +OHT) zu vier verschiedenen Zeitpunkten nach OHT-Behandlung (x-Achse). Die Daten stammen von drei Versuchen mit murinen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, deren Kopienzahlen in Form von Mittelwert (Säulen) und Standardabweichung (Fehlerindikatoren) veranschaulicht werden. Bei einem Versuch wurden Daten an Tag 6 und 8 erhoben und gemittelt, um einen Wert für Tag 7 zu erhalten. qPCR. Cre = die Cre-Rekombinase exprimierend; Wt = Wildtyp (keine Cre-Rekombinase exprimierend); OHT = Hydroxytamoxifen; +OHT = Zugabe von OHT; -OHT = keine Zugabe von OHT.



**Abbildung 17: RNA-Expression von *CD247* in *Bcl11b*-Knockoutzellen und Kontrollgruppen**

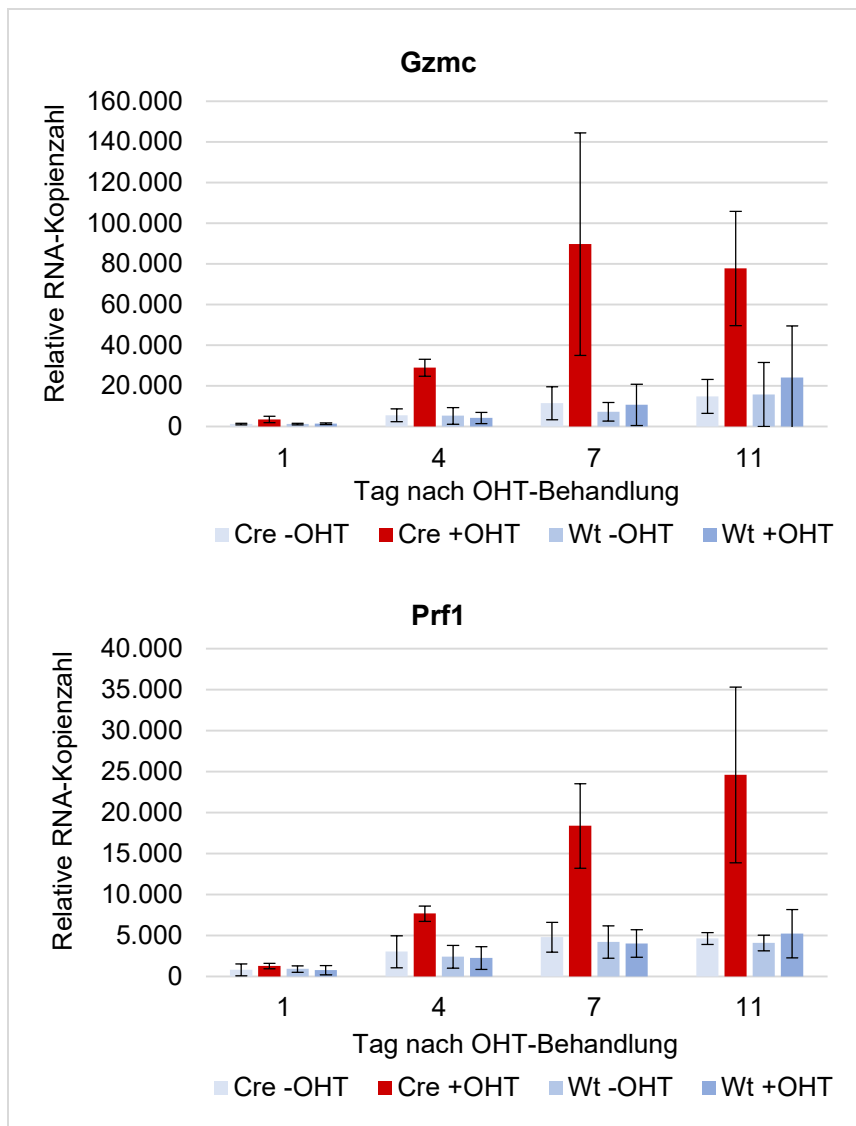
Dargestellt ist die relative RNA-Kopienzahl von *CD247* (y-Achse), bezogen auf die Referenz-RNA *B2m*, in *Bcl11b*-Knockoutzellen (Cre +OHT) und Kontrollgruppen (Cre -OHT, Wt -OHT, Wt +OHT) zu vier verschiedenen Zeitpunkten nach OHT-Behandlung (x-Achse). Die Daten stammen von drei Versuchen mit murinen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, deren Kopienzahlen in Form von Mittelwert (Säulen) und Standardabweichung (Fehlerindikatoren) veranschaulicht werden. Bei einem Versuch wurden Daten an Tag 6 und 8 erhoben und gemittelt, um einen Wert für Tag 7 zu erhalten. qPCR. Cre = die Cre-Rekombinase exprimierend; Wt = Wildtyp (keine Cre-Rekombinase exprimierend); OHT = Hydroxytamoxifen; +OHT = Zugabe von OHT; -OHT = keine Zugabe von OHT.

Der *Bcl11b*-Knockout scheint auch auf die Expression des ITAM-enhaltenden Signalmoleküls CD79b (Igb) Auswirkungen zu haben. Als Heterodimer mit CD79a (Iga) assoziiert CD79b mit dem membranständigen Immunglobulin des B-Zell-Rezeptors und vermittelt die intrazelluläre Signalkaskade durch Bindung der Proteinkinasen Syk und Lyn (Heizmann et al. 2010). Das Molekül ist in der RNA-Sequenzierungsanalyse 3- bis 5-fach herunterreguliert (siehe Anhang Tabelle 6).

#### **3.4.4 Effektormoleküle**

Um festzustellen, ob die Umprogrammierung bei *Bcl11b*-Knockout auch mit verbesserten Voraussetzungen zur Zytotoxizität einhergeht, wurde die Expression der Hauptvermittler der Zytolyse geprüft, den Perforinen und Granzymen. Dies erfolgte über die Messung der RNA-Kopienzahlen von *Gzmc* (Granzym C) und *Prf1* (Perforin 1). Die RNA-Kopienzahlen stiegen in allen Kulturgruppen im Laufe der Kultivierung unter aktivierenden Bedingungen auf hohe Größenordnungen an, von rund tausend Kopien auf mehrere tausend bis zehntausend Kopien pro 100.000 Kopien *B2m*. Die Expression in *Bcl11b*-Knockoutzellen verzeichnete jedoch den größten Anstieg (siehe Abbildung 18). Alle Zeitpunkte zusammengefasst waren sowohl *Gzmc* als auch *Prf1* gegenüber der Kontrollgruppe Wt +OHT im Mittel etwa 5-fach verstärkt exprimiert.

Im Gegensatz zu den Molekülen der Zytolyse gibt es auf Transkriptionsebene keinen Hinweis für eine gesteigerte Expression der ebenfalls die Apoptose von Zielzellen vermittelnden Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  (siehe Anhang Tabelle 6). In der RNA-Sequenzierungsanalyse finden sich hingegen zahlreiche vermindert exprimierte Interferon-regulierte Gene (siehe Ergebnisse Kapitel 3.3.1 sowie Diskussion Kapitel 4.1.7) und auch die  $\beta$ -Kette des IFN- $\gamma$ -Rezeptors (*Ifngr2*) zeigt eine reduzierte Transkriptionsrate.



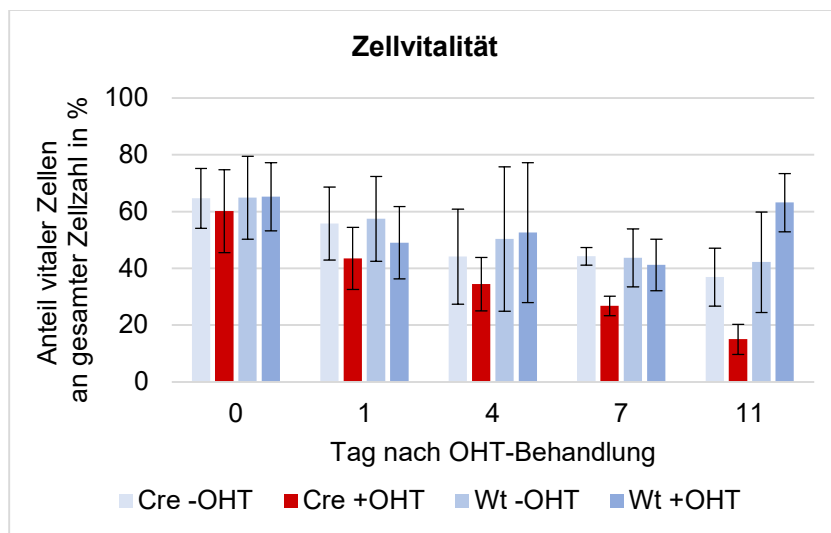
**Abbildung 18: RNA-Expression von *Gzmc* und *Prf1* in *Bcl11b*-Knockoutzellen und Kontrollgruppen**

Dargestellt ist die relative RNA-Kopienzahl von *Gzmc* und *Prf1* (y-Achse), bezogen auf die Referenz-RNA *B2m*, in *Bcl11b*-Knockoutzellen (Cre +OHT) und Kontrollgruppen (Cre -OHT, Wt -OHT, Wt +OHT) zu vier verschiedenen Zeitpunkten nach OHT-Behandlung (x-Achse). Die Daten stammen von drei Versuchen mit murinen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, deren Kopienzahlen in Form von Mittelwert (Säulen) und Standardabweichung (Fehlerindikatoren) veranschaulicht werden. Bei jeweils einem Versuch wurden die Kopienzahlen an Tag 6 und Tag 8 erhoben und gemittelt, um einen Wert für Tag 7 zu erhalten. qPCR. Cre = die Cre-Rekombinase exprimierend; Wt = Wildtyp (keine Cre-Rekombinase exprimierend); OHT = Hydroxytamoxifen; +OHT = Zugabe von OHT; -OHT = keine Zugabe von OHT.

### 3.5 Erhöhter Zelluntergang bei *Bcl11b*-Knockoutzellen

#### 3.5.1 Reduzierte Zellvitalität in der *Bcl11b*-Knockout-Kultur

Für alle *Bcl11b*-Knockout-Versuche wurde neben der Gesamtzellzahl regulär die Zellvitalität durchflusszytometrisch mittels des interkalierenden DNA-Farbstoffes 7-AAD bestimmt. Dabei fiel stets eine stärkere Reduktion vitaler Zellen in der Knockoutpopulation auf. Abbildung 19 stellt die Vitalitätsentwicklung von drei Knockout-Versuchen zusammengefasst dar, als Anteil vitaler Zellen an der Gesamtzahl vitaler und abgestorbener Zellen in der T-Zell-Kultur. Ersichtlich ist ein verstärktes und kontinuierliches Absinken der Vitalität der *Bcl11b*-Knockoutzellen gegenüber den Kontrollgruppen, beginnend ab dem Zeitpunkt der Induktion des Knockouts. Bis Tag 11 hat sich der Anteil vitaler Zellen an der Gesamtzellzahl in der Knockoutzellkultur mit einem Durchschnitt von 15 % um mehr als die Hälfte reduziert im Vergleich zu den Kontrollgruppen mit 37 % bis 63 %.

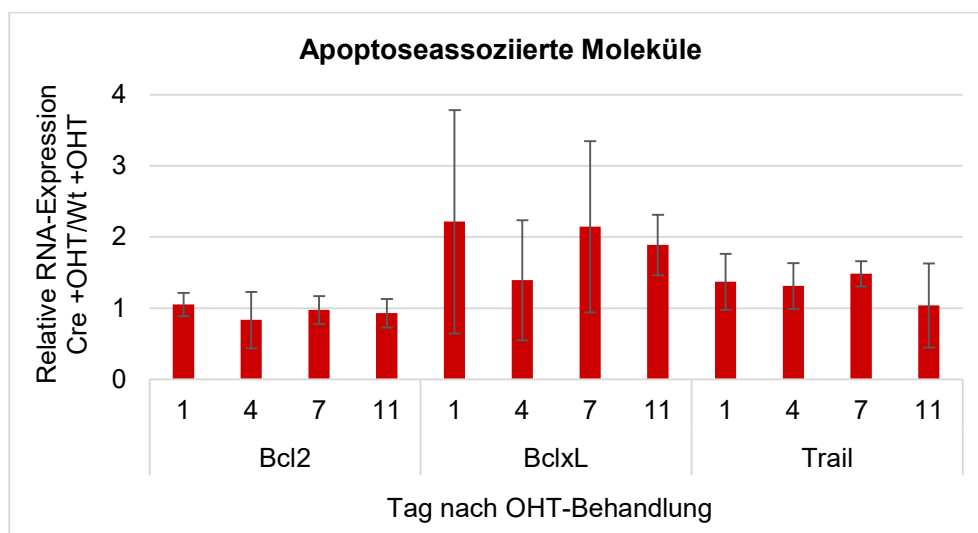


**Abbildung 19: Zellvitalität von *Bcl11b*-Knockoutzellen und Kontrollgruppen im zeitlichen Verlauf**  
Dargestellt ist der prozentuale Anteil der vitalen Zellen an der Gesamtzahl vitaler und toter Zellen (y-Achse) in der *Bcl11b*-Knockout-Kultur (Cre +OHT) und den Kontrollgruppen (Cre -OHT, Wt -OHT, Wt +OHT) zu fünf verschiedenen Zeitpunkten nach OHT-Behandlung (x-Achse). Die Daten stammen von drei Versuchen mit murinen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und werden in Form von Mittelwert (Säulen) und Standardabweichung (Fehlerindikatoren) veranschaulicht. Bei einem Versuch wurden Daten an Tag 6 und 8 erhoben und gemittelt, um Werte für Tag 7 zu erhalten. Durchflusszytometrie. Cre = die Cre-Rekombinase exprimierend; Wt = Wildtyp (keine Cre-Rekombinase exprimierend); OHT = Hydroxytamoxifen; +OHT = Zugabe von OHT; -OHT = keine Zugabe von OHT.



### 3.5.2 RNA-Expression apoptoseassoziiierter Faktoren

Dass die OHT-Behandlung, die Cre-Rekombinase oder die eingebrachten Loxp-Sequenzen im *Bcl11b*-Gen die erhöhte Sterberate bedingen, ist durch die Konstellation der Kontrollgruppen ausgeschlossen. Die beeinträchtigte Vitalität muss daher Folge des Knockouts von *Bcl11b* sein. Zur Überprüfung, ob eine vermehrte Expression proapoptotischer Faktoren oder verminderte Expression antiapoptotischer Faktoren der reduzierten Vitalität von *Bcl11b*-Knockoutzellen zugrunde liegen, wurde die mRNA-Expression von *Bcl2*, *BclxL* und *Trail* quantifiziert (siehe Abbildung 20). *Bcl2* und *BclxL* sind zwei bedeutende antiapoptotische Faktoren der Bcl-Familie, *Trail* stellt hingegen einen apoptoseauslösenden Todesrezeptorliganden dar. In der Expression von *Bcl2* fiel kein Unterschied zwischen *Bcl11b*-Knockoutzellen und Kontrollzellen auf, während *BclxL* eine durchschnittlich 1,4- bis 2,2-fach gesteigerte Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe Wt +OHT aufwies. Da *BclxL* eine antiapoptotische Wirkung besitzt, stellt die leichte Erhöhung keinen Grund für die reduzierte Vitalität dar. *Trail* präsentiert sich kaum erhöht. Mit der gewählten Untersuchungsmethode ergibt sich auf mRNA-Ebene somit kein Hinweis auf einen nennenswerten Anteil von *Bcl2*, *BclxL* oder *Trail* an der gesteigerten Apoptose in den *Bcl11b*-Knockoutzellen.



**Abbildung 20: Verhältnis der RNA-Expression apoptosebeeinflussender Faktoren von *Bcl11b*-Knockoutzellen zur Kontrollgruppe**

Dargestellt ist der Quotient aus den auf *B2m* bezogenen RNA-Kopienzahlen (y-Achse) der Gene *Bcl2*, *BclxL* und *Trail* von *Bcl11b*-Knockoutzellen (Cre +OHT) und einer Kontrollgruppe (Wt +OHT) zu vier verschiedenen Zeitpunkten nach OHT-Behandlung (x-Achse). Die Daten stammen von drei Versuchen mit murinen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, deren Kopienzahlen in Form von Mittelwert (Säulen) und Standardabweichung (Fehlerindikatoren) veranschaulicht werden. Bei einem Versuch wurden Daten an Tag 6 und Tag 8 erhoben und gemittelt, um einen Wert für Tag 7 zu erhalten. qPCR. Cre = die Cre-Rekombinase exprimierend; Wt = Wildtyp (keine Cre-Rekombinase exprimierend); OHT = Hydroxytamoxifen; +OHT = Zugabe von OHT; -OHT = keine Zugabe von OHT.

## 4 Diskussion

### 4.1 Differentielle Genexpression in *Bcl11b*-Knockoutzellen

#### 4.1.1 Zusammenhang von RNA-Expression und Proteinexpression

RNA-Level zeigen aufgrund zahlreicher posttranskriptioneller, translationaler und Proteinabbau-Mechanismen oft nur eine mäßige Korrelation mit der Proteinexpression. So lässt sich etwa 40–70 % der Proteinkonzentration von Zellen im stationären Zustand (Fließgleichgewicht) durch die RNA-Expressionslevel erklären, wobei die Studienergebnisse stark variieren (Vogel und Marcotte 2012). Auch wenn insgesamt für das Genom eine positive Korrelation besteht, kann diese für einzelne Gene stark reduziert oder gar aufgehoben sein (Guo et al. 2008; Liu et al. 2016). Diskrepanzen kommen u.a. zustande, weil die Proteinexpression kurzfristig durch schneller verfügbare Regulationsmechanismen als die Geninduktion erhöht werden kann, etwa durch Aufheben einer Translationsblockade. Weiterhin verringert der rasche Abbau überflüssig gewordener Proteine die Proteinkonzentration, wobei das mRNA-Level konstant bleibt. Andersherum kommt z.B. eine Stabilisation der Proteinkonzentration trotz schwankender Zahl von mRNA-Transkripten durch ihre längere Halbwertszeit und Anpassung der Translationsraten zustande. Die Translationsrate hängt u.a. von der Zahl verfügbarer Ribosomen und freier Aminosäuren ab, von der Sequenz des RNA-Transkripts sowie der Bindung von mikroRNAs und anderen Faktoren an regulatorische Elemente auf Transkripten. Außerdem vermögen posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen die Funktionsaktivität von Proteinen zu steuern. (Liu et al. 2016) Das Ziehen von Rückschlüssen von Veränderungen auf Transkriptionsebene nach Knockout von *Bcl11b* auf die Proteinexpression und damit den Funktionszustand der Zelle ist daher nur bedingt möglich. Weiterhin können Effekte des Knockouts auf Transkriptionsebene unerkennlich bleiben. So ist es möglicherweise für den Todesrezeptorliganden Trail der Fall, welcher in der vorliegenden Arbeit eine unveränderte RNA-Transkription nach *Bcl11b*-Knockout zeigt. Für Trail wiesen Studien Änderungen der Proteinexpression bei unbeeinflusster RNA-Expression nach (siehe Kapitel 4.3).

Besonders bezüglich Transkriptionsfaktoren ist die Aussagekraft der RNA-Level eingeschränkt. Zusätzlich zu den posttranskriptionellen und posttranslationalen Mechanismen hängt ihre Aktivität von regulierten Prozessen wie der Relokation in den Nukleus, der Dimerisierung, der Interaktion mit Kofaktoren sowie der DNA-Bindung ab (Calkhoven und Ab 1996). Eine Studie von LPS-aktivierten Makrophagen zeigt

beispielsweise, dass Transkriptionsfaktoren nach rascher Induktion auf Transkriptionsebene bereits zwei Stunden später wieder stark gesunkene RNA-Level im Sinne eines negativen Feedbacks aufweisen können, während die Proteinsynthese fortbesteht. Ebenfalls können sie einen Anstieg oder Abfall in der Proteinsynthese verzeichnen, ohne dass sich das RNA-Level verändert hat. (Eichelbaum und Krijgsveld 2014) Auch in Analysen muriner embryonaler Stammzellen fiel auf, dass Änderungen von RNA- und Proteinlevel bedeutender Transkriptionsfaktoren oft gar nicht korrelieren (Lu et al. 2009). Mehrere Untersuchungen zeigen, dass speziell Transkriptionsfaktoren bei Bedarf oft durch Induktion der Translation konstitutiv exprimierter RNA-Transkripte hochreguliert werden (Liu et al. 2016).

Allerdings wurde nachgewiesen, dass sich die RNA- und Proteinexpression von differentiell exprimierten Genen im Allgemeinen besser korrelieren lassen (Koussounadis et al. 2015), sodass für stark hoch- oder herunterregulierte Gene in der Experimentalgruppe ein gleichartiger Effekt auf Proteinebene vermutet werden kann. Berechnungen von Jovanovic et al. (2015) ergaben, dass gut 60 % der Proteinexpression in postmitotischen, murinen Dendritischen Zellen im stationären Zustand durch die mRNA-Transkription erklärt werden können, bei Stimulation durch LPS seien sogar 90 % der Änderung der Proteinexpression durch mRNA-Veränderungen verursacht. Diese Ergebnisse implizieren einen stärkeren Zusammenhang zwischen RNA- und Proteinexpression von zur Immunabwehr induzierten Genen.

Interessant erscheint die Diskrepanz zwischen der Hochregulation von *Ncr1* auf Transkriptionsebene, welche bereits ab Start des *Bcl11b*-Knockouts durch OHT-Behandlung stark ansteigt, und der verzögerten Hochregulation von NKp46 auf Proteinebene. Erst von Tag 7 auf Tag 11 nach OHT-Behandlung verzeichnet die zuvor gering erhöhte Proteinexpression einen scharfen Anstieg. Die zeitliche Verzögerung zwischen Transkription und Translation kann dies nicht erklären, da sie eher einige Stunden statt Tage ausmacht (Fournier et al. 2010; Eichelbaum und Krijgsveld 2014). Möglicherweise muss erst eine Art Schwellenwert von mRNA-Transkripten überschritten werden, damit sich die Erhöhung auch auf Proteinebene niederschlägt, etwa weil die maximale Kapazität abbauender Mechanismen überschritten ist. Kenntnisse über die verzögerte Expression von Proteinen, die das zytotoxische Potential der *Bcl11b*-Knockoutzellen vermitteln, sind notwendig zur Identifikation des optimalen Zeitpunktes für Funktionsanalysen wie Killingassays und für den möglichen Zelltransfer in Patienten.

#### 4.1.2 Transkriptionelle Unterschiede bei *Bcl11b*-Verlust in verschiedenen Stadien der T-Zell-Entwicklung

So wie nach Knockout/-down von *Bcl11b* in verschiedenen Entwicklungsstadien der T-Zell-Linie unterschiedliche Funktionsbeeinträchtigungen zu bemerken sind, unterscheidet sich auch das Transkriptionsprogramm (siehe Ergebnisse Kapitel 3.3.2). Kastner et al. (2010) bemerkten bei *Bcl11b*-Knockout in DN2-Zellen, dass das T-Zell-Programm mit Markern und Transkriptionsfaktoren zwar wie in Kontrollgruppen hochreguliert wird, jedoch keine Suppression von Genen stattfindet, die mit Stammzellen, myeloiden Zellen, NK-Zellen oder B-Zellen assoziiert sind. Bei *Bcl11b*-Knockout in späteren Stadien fanden Arbeitsgruppen hingegen die ordnungsgemäße Unterdrückung von Stammzellgenen, aber eine Herunterregulation T-Zell-assoziiierter Transkriptionsfaktoren und Marker einschließlich des TZR-Komplexes. Nach Knockout von *Bcl11b* in reifen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen wird der TZR-Komplex wiederum normal weiterexprimiert. In der vorliegenden Arbeit mit reifen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen bleiben auf Transkriptionsebene neben dem TZR-Komplex auch T-Zell-assoziierte Transkriptionsfaktoren sowie der Korezeptor CD8 unverändert. Letzterer erschien in einem CreLck-Loxp-Knockoutsystem von Zhang et al. (2010) sowohl in der mRNA- als auch der Oberflächenexpression reduziert. Eine Hochregulation von NK-Zell-assoziierten Markern und Transkriptionsfaktoren findet hingegen in allen T-Zell-Stadien bis hin zu reifen Zellen statt.

*Bcl11b* scheint also in unterschiedlichen Entwicklungsstadien zum Teil verschiedenartige Auswirkungen auf das Transkriptom zu haben. Sobald stammzellassoziierte Gene einmal herunterreguliert und T-Zell-Marker einmal heraufreguliert sind, nimmt der *Bcl11b*-Knockout offenbar keinen entscheidenden Einfluss mehr auf die Expression dieser Gene. Longabaugh et al. (2017) postulieren dazu zwei Arten von durch *Bcl11b* reprimierten Genen: Zum einen soll das vom DN2a- zum DN2b-Stadium hochregulierte *Bcl11b* Gene der vorhergehenden, noch nicht linienspezifischen Entwicklungsphase von Leukozytenvorläuferzellen unterdrücken. Einige davon sind nur zu diesem Zeitpunkt von *Bcl11b* regulierbar und zeigen bei Deletion von *Bcl11b* in weiterentwickelten T-Zellen keine Veränderung der Expression. Zum anderen soll *Bcl11b* die Expression von Genen blockieren, die normalerweise in NK-Zellen und ILC bedeutsam sind. Bei diesen Genen sei *Bcl11b* auch im weiteren Verlauf nötig, um ihre Expression zu verhindern.

In Transkriptomstudien von Hosokawa et al. (2018) fällt generell auf, dass transkriptionelle Veränderungen sowohl reprimierter als auch induzierter Gene bei

*Bcl11b*-Knockout in frühen T-Zell-Vorläufern ohne Linienspezifität deutlich gravierender sind als die in späteren T-Zell-Vorläuferstadien mit bereits vorhandener T-Zell-Identität, also ab dem Stadium DN2b. Neben der Verfügbarkeit im Blut von Patienten ist die Generierung *Bcl11b*-defizienter Zellen aus reifen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen somit auch hinsichtlich des Genexpressionsprogramms besser für den adoptiven Zelltransfer geeignet. Sie verzeichnen weniger weitreichende, identitätsstörende Veränderungen im Transkriptom. Beim Vergleich der bei *Bcl11b*-Verlust stark hoch- oder herunterregulierten Gene von Longabaugh (2017) mit denen von Kastner (2010) und Li (2010) zeigt sich nur eine Handvoll gemeinsamer Gene (Longabaugh et al. 2017: ergänzendes Material), ebenso im Vergleich mit den Daten dieser Arbeit (u.a. *Dap12*, *Fcgr3*, *Fcer1g*, *CD244*, *Myoe1*). Hierdurch wird die eingeschränkte Übertragbarkeit von Ergebnissen fremder Forschungsarbeiten erneut deutlich.

#### **4.1.3 Beibehaltung von T-Zell-Merkmalen bei Akquisition von NK-Zell-Merkmalen**

Reife CD8<sup>+</sup>-T-Zellen akquirieren nach *Bcl11b*-Knockout NK-Zell-Merkmale ohne T-Zell-Marker zu verlieren. Dies zeigen eine unverändert hohe mRNA-Expression von Bestandteilen des TZR-Komplexes und des Korezeptors *CD8a* sowie die durchflusszytometrisch fortwährende CD3-Expression an. Erhaltene T-Zell-Eigenschaften und gewonnene NK-Zell-Funktionen könnten somit einen entscheidenden Vorteil in der Tumorreaktivität ermöglichen. Es wurde berichtet, dass Subgruppen von NK-Zellen, die CD8 in Form eines  $\alpha$ - $\alpha$ -Homodimers exprimieren, eine stärkere Zytotoxizität gegen Tumorzellen sowie eine Resistenz gegen die der zytotoxischen Aktivität folgenden Apoptose aufweisen (Addison et al. 2005). Eine genauere Untersuchung der Expression eines funktionsfähigen TZR auf der Oberfläche von *Bcl11b*-Knockoutzellen sollte sich jedoch anschließen. In der Literatur herrschen nämlich uneinige Daten über die persistierende Expression der T-Zell-Moleküle. Li (2010) berichtete von einer Herunterregulation von *CD8a*, aber dem Erhalt der TZR-Oberflächenexpression bei *Bcl11b*-Knockout-Zellen jenseits des DN3-Stadiums. Geng et al. (2017) konnten jedoch bei der Reprogrammierung zu NK-ähnlichen Zellen durch *CD147*-Knockout (siehe Kapitel 4.5) trotz unbeeinflusster mRNA-Expression teilweise keine TZR-Oberflächenexpression sehen.

Zwar zeigt sich im Gegensatz zu anderen Arbeiten in den *Bcl11b*-Knockoutzellen der vorliegenden Untersuchungen mit Ausnahme von *Zfp105* nur eine mäßige (*Nfil3*, *Zbtb32*) oder gar keine (*Id2*, *Zbtb16*) Hochregulation von NK-Zell-assoziierten

Transkriptionsfaktoren. Eindeutig gesteigert exprimiert werden aber Moleküle der NK-Zell-Stimulation (Gene von NK-Zell-Rezeptoren *Ncr1*, *Fcgr3*, *Klrba* bis *Klrbf*, *Klrc1* bis *Klrc3*, *CD244*), Moleküle von aktivierenden Signalketten (*Dap12*, *Fcer1g*) und zytotoxische Moleküle (Granzyme, Perforin). Diese werden in den folgenden Kapiteln ausführlich diskutiert.

Viele akquirierte NK-Zell-assoziierte Merkmale zeigen in ihren RNA-Kopienzahlen einen relativ kontinuierlichen Anstieg nach OHT-Behandlung, selbst nach über einer Woche nach Knockout steigen die Kopienzahlen weiter. Jedoch ist auch meist ein geringer Anstieg in den Kontrollgruppen zu vermerken, sodass die fortlaufende Akquisition von aktivitäts- und zytotoxizitätsassoziierten Molekülen sicherlich auch Folge der andauernden Stimulation der kultivierten Zellen mit IL-2 und Beads ist. NK-Zell-Rezeptoren sind auch regulär geringfügig auf aktivierten T-Zellen zu finden und auch zytotoxische T-Zellen nutzen Granzyme und Perforine, demnach ergibt der Anstieg dieser Moleküle in den Kontrollgruppen bei fortwährender Aktivierung Sinn.

#### **4.1.4 NK-Zell-Rezeptoren**

Bei den am stärksten hochregulierten NK-Zell-Rezeptoren in *Bcl11b*-Knockoutzellen handelt es sich um NKp46 und FcyRIII. Der aktivierende NK-Zell-Rezeptor NKp46 (kodiert durch *Ncr1*) wird häufig als NK-Zell-Marker genutzt, da er sich spezifisch auf ruhenden und aktivierten NK-Zellen befindet (Sivori et al. 1997). Außerhalb der NK-Zelllinie wird NKp46 nur von einigen anderen ILC exprimiert (Pegram et al. 2011; Glasner et al. 2017). Auch Peng Li (2010) verwendete NKp46, um ITNK in seinen Kulturen von *Bcl11b*<sup>flox/flox</sup>-T-Zellen zu identifizieren. Während die Hochregulation einiger NK-Zell-Rezeptoren sowie zytotoxischer Moleküle auch im Rahmen der Aktivierung von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen stattfindet, spricht die Akquisition des NK-Zell-spezifischen NKp46 auf den ITNK von Li und den in der vorliegenden Arbeit generierten *Bcl11b*-Knockoutzellen für eine Umprogrammierung von T-Zellen zu NK-Zellen. Dass es sich lediglich um NKp46<sup>+</sup>-ILC handelt, ist unwahrscheinlich, da diese im Gegensatz zu NK-Zellen nicht NK1.1 und Perforine exprimieren (Rankin et al. 2013). Sowohl das für NK1.1 kodierende Gen (*Klrk1*) als auch Perforin 1 (*Prf1*) ist in den *Bcl11b*-Knockoutzellen hochreguliert.

Als Liganden von NKp46 wurden u.a. virale Hämagglutine und Heparinsulfate erkannt, wobei auch bisher nicht identifizierte zelluläre Marker von Tumoren als Liganden fungieren müssen (Pegram et al. 2011). Neben der Vermittlung antiviralen Vorgehens wurde NKp46 nämlich als einer der Hauptvermittler zytotoxischer Abwehrreaktionen

gegen murine und humane Tumorzellen erkannt (Pessino et al. 1998; Sivori et al. 1999). Eine Kontrolle von Virus- und Tumorlast durch NKp46-vermittelte NK-Zell-Zyotoxizität wurde z.B. für HIV-1-Infektionen, Influenzavirusinfektionen, die murine Lymphomzelllinie PD1.6, B16-Melanomzellen sowie Metastasen von B16-Melanomen und D122-Lungenkarzinomzellen nachgewiesen (Halfteck et al. 2009; Glasner et al. 2012; Tomescu et al. 2015; Glasner et al. 2017). Die von Peng Li (2010) beobachtete drastische Reduktion von Lungenmetastasen einer B16-Melanomzelllinie durch *Bcl11b*-Knockoutzellen könnte also durchaus an der Überexpression von NKp46 liegen. Der Transkriptionsfaktor Runx3 wurde als ein positiver Verstärker in der Promoterregion von *Ncr1* entdeckt (Lai und Mager 2012). Da in einigen Untersuchungen zur Entwicklung von T-Zellen bei *Bcl11b*-Defizienz eine verstärkte Expression von *Runx3* aufgezeigt wurde (Kastner et al. 2010; Kojo et al. 2017; Ha et al. 2017), könnte diese Signalkette als ein Regulationsmechanismus von NKp46 in *Bcl11b*-Knockoutzellen eine Rolle spielen.

Der FcγRIII, der murine Rezeptor III für das Fc-Fragment von IgG (auch CD16, kodiert durch *Fcgr3*), ist der einzige Fc-Rezeptor, der von NK-Zellen exprimiert wird. Er findet sich weiterhin auf Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten, in speziellen Fällen auch auf Effektor-T-Zellen (Ravetch und Kinet 1991; Bjorkstrom et al. 2008). Durch Bindung des konstanten Teils von Immunglobulinen, welche auf Zelloberflächen an Antigene gebunden haben, wird die intrazelluläre Aktivierungskaskade über die ITAM der γ-Untereinheit (FcRγ/FcεRIγ) vermittelt (Vivier et al. 1991). Allerdings wurde für NK-Zellen auch nachgewiesen, dass statt der γ-Untereinheit ein Homodimer der ζ-Kette mit dem FcγRIII funktionsfähig assoziiert (Lanier et al. 1989; Nimmerjahn und Ravetch 2008). In der nachfolgenden Signalkette kommt es u.a. zur Aktivierung der PLC-γ1 (Ting et al. 1992; Nimmerjahn und Ravetch 2008). Interessanterweise ist die RNA-Transkription von *Plcg1* in den Knockoutzellen stark herunterreguliert, was mit Ergebnissen von Zhang et al. (2010) einhergeht.

Der FcγRIII vermittelt die ADCC gegenüber infizierten oder tumorösen Zellen, welche als einer der Hauptwirkmechanismen von therapeutisch angewandten monoklonalen Antikörpern wie Rituximab gehandelt wird (Caligiuri 2008). Die Kombination von *Bcl11b*-Knockoutzellen mit ihrer starken Hochregulation von *Fcgr3* und Antikörpern stellt daher einen aussichtsreichen Ansatz für die Tumorthherapie dar.

Mit der starken Überexpression von *Ncr1* (NKp46) und *Fcgr3* (CD16) weisen die *Bcl11b*-Knockoutzellen somit zwei sehr wirksame Induktoren der Zytolyse von Tumorzellen auf und werden damit für den Einsatz in der Tumorthherapie interessant.

#### 4.1.5 Adapterproteine

*DNAX activating protein of 12 kDa* (Dap12), auch *TYRO protein tyrosine kinase binding protein* (Tyrobp) oder *killer cell activating receptor-associated protein* (Karap) genannt, ist hauptsächlich mit aktivierenden Rezeptoren von NK-Zellen und myeloiden Zellen wie Dendritischen Zellen und Monozyten assoziiert, kommt jedoch auch in Subgruppen von NK-Zell-Rezeptoren tragenden T- und B-Zellen vor (Tomasello und Vivier 2005). Für zahlreiche aktivierende NK-Zell-Rezeptoren wurde bisher eine molekulare Assoziation mit Dap12 nachgewiesen, darunter aktivierende KIR und NKp44 aus dem humanen System, die aktivierenden Ly49-Rezeptoren Ly49D und Ly49H des murinen Systems, CD94-NKG2C und CD94-NKG2E sowie NKG2D (Smith et al. 1998; Lanier et al. 1998; Cantoni et al. 1999; Diefenbach et al. 2002; McQueen und Parham 2002; Orbelyan et al. 2014). Einhergehend mit der Funktion als Signalvermittler der Aktivierung von Immunzellfunktionen fanden sich in Organismen mit *Dap12*-Depletion zwar eine normale Entwicklung der Immunzellen, jedoch eine eingeschränkte Funktion antigenpräsentierender Zellen, eine verminderte Zytotoxizität von NK-Zellen und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen sowie nicht funktionsfähige Ly49-Rezeptoren (Bakker et al. 2000; Tomasello et al. 2000; Karimi et al. 2005). Da der Dap12-assoziierte Rezeptor Ly49H das MHC-ähnliche-Protein m157 des murinen Zytomegalievirus erkennt, verwundert es nicht, dass eine Dap12-Defizienz zu einer verminderten Resistenz gegen das Virus führt (Sjolin et al. 2002). Die Hochregulation von *Dap12* in *Bcl11b*-Knockoutzellen könnte somit eine bemerkenswerte Verstärkung der Antitumorfunktion mit sich bringen.

Interessanterweise sind gerade die für die Interaktion mit Dap12 bekannten NK-Zell-Rezeptoren laut RNA-Sequenzierung nicht hochreguliert, wie im Fall von *Klra4* (Ly49D) und *Klra8* (Ly49H), oder gar herunterreguliert, wie *Klrc2* (NKG2C) und *Klrc3* (NKG2E) und in geringerem Maße *Klrk1* (NKG2D). Die in der RNA-Sequenzierung am stärksten hochregulierten NK-Zell-Rezeptoren, *Ncr1* (Nkp46) und *Fcgr3* (CD16), assoziieren hingegen nach Literaturangaben nicht mit dem am stärksten hochregulierten Adaptermolekül *Dap12*. Stattdessen binden sie die ζ-Kette (CD3zeta) und den FcεR1γ, wobei jedoch nur *Fcer1g* eine gesteigerte Expression in *Bcl11b*-Knockoutzellen aufweist (Lanier et al. 1989; Vivier et al. 1991; Vitale et al. 1998; Cantoni et al. 1999).

Das Genprodukt von *Fcer1g*, FcεR1γ oder FcRγ, stellt nicht nur die γ-Untereinheit des hochaffinen Igε-Rezeptor I (FcεR1) auf Mastzellen und basophilen Granulozyten dar, sondern assoziiert auch mit dem Fcα-Rezeptor und allen drei Unterarten von Fcγ-



Rezeptoren (Masuda und van den Roos 1993; Morton et al. 1995). Durch die starke Hochregulation von *Fcer1g* als Assoziationspartner des Fc $\gamma$ RIII auf NK-Zellen wird somit der Verdacht des Vorkommens der ADCC in *Bcl11b*-Knockoutzellen gestützt. Neben NKp46 wurde auch eine Assoziation des NK-Zell-Rezeptors NK1.1 (Nkr-p1c) als ein aktivierender Vertreter der Nkr-p1-Familie mit Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$  nachgewiesen (Arase et al. 1997). Sein Gen *Klrb1c* erscheint in der RNA-Sequenzierungsanalyse in *Bcl11b*-Knockoutzellen deutlich verstärkt exprimiert, ebenso wie die Gene der anderen Mitglieder der Nkr-p1-Familie.

Des Weiteren assoziiert in einigen Subgruppen von T-Zellen das Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$ -Molekül anstelle der  $\zeta$ -Kette mit dem TZR-CD3-Komplex. Dieser Fund zeigte sich u.a. in humanen CD4<sup>+</sup>-Effektorzellen im Gegensatz zu naiven und Gedächtniszellen, in CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten tumortragender Mäuse sowie in murinen NK-ähnlichen T-Zellen (TZR<sup>+</sup>, NK1.1<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>, CD8<sup>-</sup>) (Koyasu et al. 1992; Mizoguchi et al. 1992; Krishnan et al. 2003). Auch die weitere Signaltransduktion wies Veränderungen auf, nämlich eine Verminderung der Tyrosinkinase Lck und Fyn und die Rekrutierung von Syk statt Zap-70, welche auch bei NK-Zellen die bevorzugte Tyrosinkinase ist (Mizoguchi et al. 1992; Krishnan et al. 2003). Durch strukturelle und funktionelle Homologie sind die Folgen der veränderten Signaltransduktion gering, die lytische Funktion und Zytokinproduktion bei TZR-Stimulation blieb erhalten (Rodewald et al. 1991; Koyasu et al. 1992; Mizoguchi et al. 1992). Interessant wäre, ob auch durch den *Bcl11b*-Knockout ein Ersatz der  $\zeta$ -Kette durch Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$  stattfindet, zumal sie ebenfalls NK-Marker zeigen. Zwar wurde hier keine Herunterregulation der  $\zeta$ -Kette gesehen, diese konnte von Mizoguchi et al. (1992) jedoch auch nur auf Proteinebene bei unveränderten mRNA-Leveln aufgezeigt werden.

Für ein weiteres Adaptermolekül aktivierender Rezeptoren, EAT-2, fand sich in der RNA-Sequenzierung von *Bcl11b*-Knockoutzellen eine erhöhte Expression des zugehörigen Gens *Sh2d1b1*. EAT-2 wird vorrangig von Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert, u.a. NK-Zellen. Es rekrutiert Src-Kinasen nach Bindung an Tyrosinreste von *signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) receptors*. (Veillette et al. 2007) Zu diesen gehört auch CD244 (2B4), das in den *Bcl11b*-Knockoutzellen hochreguliert ist. Auch für EAT-2 wurde durch Überexpression in murinen und humanen Zellen ein positiver Einfluss auf die NK-Zell-Aktivität und Zytolyse von Tumorzellen nachgewiesen (Veillette et al. 2007; Aldhamen et al. 2011; Aldhamen et al. 2014).

#### 4.1.6 Effektormoleküle

Durch die bestätigte Erhöhung der Granzym- und Perforinexpression in *Bcl11b*-Knockoutzellen im Vergleich zu den aktivierten CD8<sup>+</sup>-T-Zellen der Kontrollgruppe wird das zytotoxische Potential der *Bcl11b*-Knockoutzellen komplettiert. Perforine wurden bereits im direkten Zusammenhang mit der Kontrolle von Tumoren gesehen. So sind Perforin-defiziente Mäuse deutlich empfänglicher für die Tumorentwicklung (Smyth et al. 2000). Interessanterweise fällt in der RNA-Sequenzierung die verstärkte Expression der Granzyme C-F auf, die der klassischerweise für ihre zytolytische Aktivität anerkannten Granzyme A und B jedoch nicht. Zhang et al. (2010) sahen gegenteilig eine deutliche Reduktion der RNA- und Proteinexpression von Granzym B und Perforin in CD8<sup>+</sup>-T-Zellen bei *Bcl11b*-Knockout durch eine Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des dLck-Promoters. Hierbei zeigte sich eine eingeschränkte zytolytische Funktion bei Lm-Ova-Infektion. Auch hier wird die Diskrepanz von Untersuchungsergebnissen verschiedener *Bcl11b*-Knockoutsysteme deutlich, zumal Li (2010) mit dem Knockout durch ein Cre-Loxp-System eine erstaunliche Zunahme der zytotoxischen Aktivität vermerkte. Auch die im vorliegenden Fall generierten *Bcl11b*-Knockoutzellen verfügen über kein Defizit der zytolytischen Funktion, wie Killingassays demonstrieren (nicht veröffentlichte Daten).

#### 4.1.7 Interferon-regulierte Moleküle

Auffällig in der RNA-Sequenzierung der *Bcl11b*-Knockoutzellen ist die stark verminderte Expression Interferon-regulierter Gene, darunter die IFN- $\gamma$ -induzierten GTPasen Irgb2b1 (*Gm12185*), Irga6 (*ligp1*), Irgb6 (*Tgtp*), Irgb10 (*Gm12250*), Irgm1 (*ligp3*), Irgm2 (*ligp2*), Irgm3 (*Igtp*) aus der Familie der *Immun-related GTPases* (IRGs, auch p47-GTPasen genannt), *Gbp2*, *Gbp4*, *Gbp6*, *Gbp7*, *Gbp10* und *Gbp11* aus der Familie der *P65 guanylate-binding proteins* (GBPs) sowie die *Interferon-gamma-inducible GTPasen* Ifgga2 (*Gm4951*), Ifgga3 (*Gm4841*) und Ifgga4 (*F830016B08Rik*). Sie werden normalerweise bei Befall von Zellen mit intrazellulären Pathogenen wie Listerien und Toxoplasmen scharf heraufreguliert und stellen bedeutende Abwehrmoleküle gegenüber diesen Erregern dar. (Bekpen et al. 2005; Degrandi et al. 2007) Neben diesen G-Proteinen mit direkter GTPase-Aktivität befanden sich unter den vermindert exprimierten Genen ein weiteres GTP-Bindeprotein (*Gem*), GTP-Austauschfaktoren (*Dennd5a*, *Rasgrp2*), Moleküle mit GTPase-modulierender Aktivität (*Rgs11*, *Rgs16*), G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (*S1pr1*, *Tbxa2r*) und Moleküle, die an deren Oberflächenexpression beteiligt sind (*Rtp4*). Somit wird der

weitreichende Einfluss einer *Bcl11b*-Deletion auf G-Protein-gekoppelte Signalwege deutlich. Zu weiteren herunterregulierten IFN-stimulierten Genen ohne GTPase-Aktivität zählen *Ifit1* (*Isg56*), *Ifit3* (*Isg60*), *Ifi271a* und *Irf1*.

In der RNA-Sequenzierung von *Bcl11b*-Knockoutzellen scheint auch die IFN-Signalkette selbst betroffen. Interferone vom Typ I (u.a. IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$ ) und Typ II (IFN- $\gamma$ ) werden bei Erkennung viraler Strukturen durch *Toll-like*-Rezeptoren und intrazelluläre Rezeptoren induziert. Die Bindung an jeweilige Interferonrezeptoren führt zu einer Aktivierung des Jak-Stat-Signalweges. Januskinasen phosphorylieren Stat1-Transkriptionsfaktoren, welche in Form eines Homodimers in den Nukleus translozieren und u.a. die Transkription von Interferon-stimulierten Genen (ISG) und Interferon-regulatorischen Faktoren (IRF) aktivieren. Bei Stimulation durch Typ-I-Interferone bildet sich auch der Transkriptionskomplex *Interferon stimulated gene factor 3* (ISGF3), bestehend aus Stat1, Stat2 und Irf9. (Platanias 2005) In *Bcl11b*-Knockoutzellen konnten mehrere herunterregulierte Moleküle in der IFN-Signaltransduktion erkannt werden. *Stat1* und die  $\beta$ -Kette des IFN- $\gamma$ -R (*Ifngr2*) zeigen eine stark erniedrigte Transkription, leicht vermindert ist die von *Stat2*, *Irf9* und der  $\alpha$ -Kette des IFN- $\gamma$ -R (*Ifngr1*). Während die  $\alpha$ -Kette und  $\beta$ -Kette des IFN- $\gamma$ -R in ruhenden T-Zellen auch in Form von mRNA und zytoplasmatischem Protein vorkommen, wird die Oberflächenexpression der  $\beta$ -Kette erst bei andauernder Aktivierung und TZR-Restimulation nennenswert induziert. Erst dadurch werden die Zellen sensibel für durch endogenes IFN- $\gamma$  ausgelösten AICD. (Novelli et al. 1996; Sakatsume und Finbloom 1996; Novelli et al. 1997) Eine Internalisierung der auf der Oberfläche exprimierten  $\beta$ -Kette des IFN- $\gamma$ -R und damit die Prävention des Zelltodes wird z.B. bei Differenzierung zu TH1-Zellen beobachtet (Groux et al. 1997).

Die Herunterregulation IFN- $\gamma$ -induzierter Gene in *Bcl11b*-Knockoutzellen könnte des Weiteren mit Beobachtungen von Abboud et al. (2016) und Fang et al. (2018) einhergehen, welche bei *Bcl11b*-Verlust in CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und TH1-Zellen eine verminderte Zahl IFN- $\gamma$ -positiver Zellen erkannten.

Warum der *Bcl11b*-Knockout derartige Auswirkungen auf IFN-induzierte Signalwege hat, muss erst durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Da die IFN-Stat1-Signaltransduktion eine bedeutende Quelle der zytolytischen Aktivität von T-Zellen und NK-Zellen gegenüber Viren und Tumorzellen darstellt (Durbin et al. 1996; Lee et al. 2000; Putz et al. 2016), scheint sich in der Zusammenschau der Ergebnisse die Induktion der zytotoxischen Aktivität in *Bcl11b*-Knockoutzellen vom IFN-Stat-Signalweg zu anderen Triggern zu verschieben.

Die einzige Ausnahme unter den einheitlich herunterregulierten IFN-induzierten Genen bildet der deutlich verstärkt exprimierte Transkriptionsfaktor *Irf8*. *Irf8* reguliert durch Interaktion mit Pu.1, anderen IRF und dem ISGF3 die Transkription weiterer Interferon-stimulierter Gene und damit das antivirale Vorgehen (Kubosaki et al. 2010). Neben bedeutenden Aufgaben in der Entwicklung und Funktion von myeloischen Zellen und B-Zellen wurde *Irf8* außerdem eine Rolle bei der Reifung von naiven CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zu Effektorzellen sowie der terminalen Reifung von NK-Zellen zugesprochen (Tamura und Ozato 2002; Wang und Morse 2009; Miyagawa et al. 2012; Mace et al. 2017). NK-Zellen eines Probanden mit homozygoter *Irf8*-Mutation zeigten einen weniger reifen Phänotyp, eine eingeschränkte Zytotoxizität sowie eine Herunterregulation von NK-Zell-assoziierten Transkriptionsfaktoren wie *NFIL3* und *IKZF2* und von Effektormolekülen wie Granzym A, B und Perforin (Mace et al. 2017). Die Vermutung, dass es sich dadurch möglicherweise um ein direktes, reprimiertes Zielgen von *Bcl11b* handeln könnte, erscheint jedoch eher unwahrscheinlich, da sich nur eine geringe Anzahl dysregulierter Gene von *Bcl11b*-Knockoutzellen mit entgegengesetzt regulierten Genen bei *Irf8*-Verlust überschneiden (in NK-Zellen mit homozygoter *Irf8*-Mutation [Mace et al. 2017] 5/403 Genen: *Prf1*, *Fcgr3*, *Ii23a*, *CD5*, *Cxcr3*; in B-Zellen mit *Irf8*-Knockdown [Shin et al. 2011] 2/279 Genen: *Igtp*, *Gbp4*).

## 4.2 *Bcl11b*-Knockout induziert pervasive Transkription

Der induzierte Verlust von *Bcl11b* in murinen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen führt zu einer deutlich verstärkten Transkription nicht-kodierender DNA-Abschnitte bis 170 kB stromabwärts des kodierenden *Bcl11b*-Abschnitts (siehe Ergebnisse Kapitel 3.2.3). Es ist allgemein bekannt, dass nicht nur der geringe Protein-kodierende Anteil der DNA transkribiert wird, sondern in niedrigerer Intensität weite Teile des Genoms. Dies wird als pervasive Transkription bezeichnet. So entsteht eine Vielzahl von nicht-kodierenden RNAs in intergenen Abschnitten, Intronsequenzen sowie in mit den 5'- und 3'-Enden von offenen Leserahmen assoziierten Regionen. (Berretta und Morillon 2009) Interessanterweise unterliegt die pervasive Transkription Veränderungen, z.B. bei Zellstress oder in den verschiedenen Entwicklungsstadien der Drosophila-Fliege (Stolc et al. 2004, Dutrow et al. 2008).

Eine Art der pervasiven Transkription, welche Ähnlichkeiten zu dem beobachteten Phänomen in *Bcl11b*-Knockoutzellen aufweist, sind die sogenannten *Downstream of gene containing transcripts* (DoGs). Dabei handelt es sich um die vermehrte Transkription langer nicht-kodierender RNAs viele Kilobasen stromabwärts im

Anschluss an Gensequenzen (Vilborg et al. 2015). DoGs werden durch verschiedene Arten von Zellstress deutlich induziert, etwa bei osmotischem und oxidativem Stress, Hitze und Hypoxie (Vilborg et al. 2015; Vilborg et al. 2017; Wiesel et al. 2018). Bei osmotischem Stress durch KCl-Behandlung konnte bei über 10 % der proteinkodierenden Gene eine Induktion von DoGs gefunden werden. Außerdem zeigten sich, ähnlich wie stromabwärts von *Bcl11b*, intergene Spleißkontakte innerhalb der DoGs. (Vilborg et al. 2015) Auch bei HSV-1-Infektion und in Nierenzellkarzinomen wurden DoGs mit Transkription bis in benachbarte Gene hinein entdeckt (Rutkowski et al. 2015; Grosso et al. 2015).

DoGs entstehen durch den sogenannten *Readthrough* aufgrund von fehlender Terminierung der Transkription eines Gens, begünstigt durch eine verminderte Zahl von Polyadenylierungs- und anderen Signalen in der Sequenz (Rutkowski et al. 2015; Vilborg et al. 2015; Vilborg et al. 2017). Vilborg et al. bieten Argumente, dass DoGs keine „Fehler“ sind, sondern eine Rolle beim Offenhalten von Chromatin und bei der Stabilisierung des Kerngerüsts einnehmen, etwa aufgrund der Bedrohung der Kernkondensation bei osmotischem Stress (Vilborg et al. 2015; Vilborg et al. 2017; Vilborg und Steitz 2017). Im Fall von *Bcl11b*-Knockoutzellen handelt es sich hingegen um einen „Fehler“. Es liegt nahe, dass die Deletion des letzten Exons von *Bcl11b*, Exon 4, durch fehlende terminierende Signale zu einer Fortsetzung der Elongation durch die RNA-Polymerase II und den Spleißverbindungen der Exons 2 und 3 mit *Peak 1* und *2* führt. Während die von Vilborg et al. (2017) erkannten DoGs jedoch durchgängig bis über 100 kB stromabwärts des assoziierten Gens reichen, beschränkt sich die pervasive Transkription in *Bcl11b*-Knockoutzellen vorrangig auf die Peaks. Nach der Spleißverbindung zu *Peak 2* scheint die Transkription zu terminieren und sich dann in Form einer isoliert gesteigerten Transkription von *Peak 3* fortzusetzen.

Es stellt sich die Frage, ob die entstehenden abberanten Transkripte Auswirkungen haben könnten. Eine Ausschleusung aus dem Zellkern erscheint unwahrscheinlich, da DoGs im Zellkern verbleiben und nicht translatiert werden (Rutkowski et al. 2015; Vilborg et al. 2015; Vilborg et al. 2017). Allerdings werden einigen langen intergenen nicht-kodierenden RNAs (lincRNAs) regulatorische Funktionen bei der Gentranskription wie die Blockierung und Gewährung der Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren oder Chromatinmodifikationen zugesprochen (Berretta und Morillon 2009). Auch Antisense-RNA, die innerhalb von Genen oder in ihrer Promoterregion entsteht, kann die Transkription desselben Gens oder anderer Gene modifizieren. So verhindert z.B. eine Antisense-RNA im Rahmen von HSV-1-

induzierter pervasiver Transkription die Expression des für den proapoptotischen Faktor Puma kodierenden Gens (Wyler 2017). Weitere Untersuchungen könnten präzisieren, ob es sich bei *Peak 3* um einen irrelevanten Transkriptionsfehler handelt und ob dieser funktionelle Bedeutung aufweist und z.B. Auswirkungen auf die Regulation der Transkription von *Bcl11b* oder anderen Genen hat. Weiterhin könnte die Akkumulation der zusätzlichen RNA für die Zellen einen Indikator für Zellschäden oder Zellstress darstellen und damit auch als Einflussfaktor für die gesteigerte Apoptose in Betracht kommen.

#### 4.3 Verringerte Überlebenszeit von *Bcl11b*-Knockoutzellen

In den vorliegenden Untersuchungen zeigt sich eine deutlich reduzierte Vitalität von *Bcl11b*-Knockoutzellen im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Das vermehrte Sterben von *Bcl11b*-defizienten Zellen wurde auch in anderen T-Zell-Stadien und -Entartungen beobachtet, etwa in DN4-Zellen, DP-Zellen, Jurkat-, Hut78- und Molt4-Zellen, jedoch bisher nicht in reifen peripheren T-Zellen, siehe Einleitung Kapitel 1.3.4 (Inoue et al. 2006; Albu et al. 2007; Grabarczyk et al. 2007; Huang 2011). Bei der durch den *Bcl11b*-Verlust verstärkten Apoptose könnte es sich z.B. um eine direkte Folge durch veränderte Signalwege oder eine indirekte Stressreaktion handeln. In Jurkat- und Hut78-Zellen wurde sowohl eine Beteiligung des extrinsischen Apoptosewegs als auch des intrinsischen Weges nachgewiesen (Grabarczyk et al. 2007; Karanam et al. 2010). Da sie in der Literatur in Zellen mit *Bcl11b*-Verlust gehäuft eine dysregulierte mRNA-Expression aufwiesen, wurden die apoptoseassoziierten Faktoren *B-cell lymphoma 2* (*Bcl2*), *B-cell lymphoma extra large* (*BclxL*, auch *Bcl2l1*) und *Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand* (*Trail*, auch *Tnfsf10*) auch in den vorliegenden *Bcl11b*-Knockoutzellen auf Veränderungen untersucht. *Bcl2* und *BclxL* stellen Gegenspieler der intrinsisch induzierten Apoptose dar, welche in Form des ACAD in der Kontraktionsphase nach T-Zell-Aktivierung stattfindet. Dabei wirken sie der Freisetzung apoptosevermittelnder Substanzen aus den Mitochondrien entgegen. (Siddiqui et al. 2015) Der Todesrezeptorligand *Trail* wird von unreifen NK-Zellen exprimiert und von zytotoxischen T-Zellen und reifen NK-Zellen bei IFN- $\gamma$ -, IL-2- und IL-15-Stimulation sezerniert (Zamai et al. 1998; Kayagaki et al. 1999; Falschlehner et al. 2009). *Trail* vermittelt die Zytolyse von virusinfizierten Zellen und Tumorzellen nach Bindung an seine Rezeptoren DR4/DR5 auf der Zielzellmembran (Falschlehner et al. 2009). Als Induktor der extrinsischen Apoptose kann *Trail* auch, ähnlich dem Fas-Liganden, den AICD in der Kontraktionsphase aktivierter T-Zellen bewirken. Dies ist

vorrangig bei CD8<sup>+</sup>-T-Zellen der Fall, welche ohne CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Hilfe aktiviert wurden. (Janssen et al. 2005) Laut Mirandola et al. (2004) sollen sowohl ruhende als auch aktivierte NK-Zellen und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in Abhängigkeit vom apoptoseinhibierenden Molekül c-Flip normalerweise resistent gegen Apoptose durch den eigens sezernierten Trail sein.

Inoue et al. (2006) und Abu et al. (2007) bemerkten unter *Bcl11b*-Verlust eine verminderte Expression von *Bcl2* und *BclxL* in DN4-Zellen bzw. DP-Zellen. Eine Herunterregulation von *BCLxL* fand sich auch in Jurkat-, Hut78-, Molt4-Zellen und humanen nicht-malignen reifen T-Zellen, in denen *BCL11B* durch siRNA inaktiviert wurde. Jurkat-, Hut78-Zellen und Molt4-Zellen zeigten bei *BCL11B*-Knockdown außerdem eine deutliche Heraufregulation von *TRAIL*, humane nicht-maligne T-Zellen geringfügig. (Grabarczyk et al. 2007; Huang et al. 2011) Eine nennenswerte Herauf- oder Herunterregulation von *Bcl2*, *BclxL* und *Trail* ergab sich in den vorliegenden Untersuchungen zu murinen reifen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen mit *Bcl11b*-Verlust jedoch nicht und damit kein Anhalt auf einen Einfluss von *Bcl11b* auf die RNA-Expression dieser Faktoren. Während *Bcl2* und *BclxL* auch auf Transkriptionsebene moduliert werden, findet die Regulation vieler Mitglieder der *Bcl2*-Familie posttranskriptionell statt, vor allem bei proapoptotischen Faktoren (Lu und Finn 2008, Siddiqui et al. 2015). So fand auch Abu (2007) *BclxL* und *Bcl2* auf mRNA- und Proteinebene in DP-Zellen leicht herunterreguliert, während Veränderungen proapoptotischer Faktoren auf Proteinebene, aber nicht in der mRNA-Expression zu sehen waren. Es wäre demnach möglich, dass sich Veränderungen apoptoseassoziiierter Faktoren in der *Bcl11b*-Knockoutkultur nur auf Proteinebene zeigen. Eine Untersuchung der *Trail*-Proteinexpression von *Bcl11b*-Knockoutzellen erscheint auch deshalb interessant, da *Trail* auf der Zelloberfläche von murinen NK-Zellen dosisabhängig von NKp46 exprimiert wird. Bei Fehlen von NKp46 ist die *Trail*-Expression deutlich reduziert. Die Regulation erfolgt allerdings auf posttranskriptionaler Ebene. (Turchinovich et al. 2018; Sheppard et al. 2018) Generell könnte ein Zusammenhang zwischen der NKp46-Heraufregulation und der verstärkten Apoptose bestehen. Studienergebnisse zeigen, dass die Interaktion von NKp46 mit seinen Liganden auf Tumorzellen nicht nur zur Aktivierung zytolytischer Aktivität in humanen NK-Zellen führt, sondern auch zur Apoptoseinduktion in den NK-Zellen selbst durch Heraufregulation des Fas-Liganden (Poggi et al. 2005).

In der RNA-Sequenzierung von *Bcl11b*-Knockoutzellen fielen noch weitere apoptoseassoziierte Moleküle auf. Moleküle mit bekannten antiapoptotischen

Eigenschaften zeigen dabei eine erhöhte Expression, darunter *Bcl2a1a*, *Spp1* sowie die Serinprotease(Granzym)-Inhibitoren *Serpinb6b* und *Serpinb9b*. Interessant erscheint hingegen der verstärkt exprimierte *Nuclear Receptor 4a3 (Nr4a3)*. Für ihn ist u.a. eine Induktion in Mastzellen durch Signale des  $Fc\epsilon R1\gamma$  bekannt (Lundequist et al. 2011). Das als Tumorsuppressor bekannte Molekül führt bei Überexpression in Lymphomzelllinien zur Induktion proapoptotischer Faktoren (Deutsch et al. 2017). Möglicherweise wurde sich mit Erwerb der NK-Zell-Eigenschaften und -Funktionen auch die kürzere Lebensdauer von NK-Zellen im Vergleich zu T-Zellen erkauft. Durch das Annehmen einer partiellen NK-Zell-Identität könnte die Stimulation mit IL-2 für die umprogrammierten *Bcl11b*-Knockoutzellen im Gegensatz zu den Kontroll-T-Zellen nicht ausreichen. Einen Versuch, die erhöhte Apoptoserate zu vermindern, stellt daher die Zugabe von IL-15 zur Kultur dar. Das Zytokin ist ein wichtiger Förderer der Homöostase und des Überlebens von NK-Zellen (Ma et al. 2006). Es soll unter anderem die Expression von Bcl2 verstärken und die des proapoptotischen Faktors Bim unterdrücken (Cooper et al. 2002; Huntington et al. 2007). Membrangebundenes IL-15 auf Nierenkarzinomzellen kann beispielsweise eine durch fehlende Zugabe von IL-2 in der NK-Zell-Kultur ausgelöste Apoptose vollständig kompensieren (Wittnebel et al. 2007). Außerdem kann IL-15 den Trail-induzierten, auf Antigen-Restimulation folgenden Zelltod von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, welche ohne CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Hilfe geprimt wurden, verhindern (Oh et al. 2008). Versuche der Arbeitsgruppe, humane *Bcl11b*-defiziente CD8<sup>+</sup>-T-Zellen mit IL-15 zu kultivieren, zeigen vielversprechende Ergebnisse.

#### 4.4 Kritische Auseinandersetzung mit den ermittelten Daten

Aufgrund der kleinen Stichprobengröße und in einigen Fällen großen Schwankungsbreite der Werte verschiedener T-Zell-Versuche besitzen die Ergebnisse eine eingeschränkte Aussagekraft und können zufälligen Fehlern unterliegen. Dennoch lassen sich bei mehreren untersuchten Genen auch rein deskriptiv klare Tendenzen zur Hochregulation erkennen. Somit sind bei eindeutiger und in allen Versuchen sichtbarer Hochregulation wie bei den untersuchten NK-Zell-Rezeptoren oder Adaptermolekülen Schlussfolgerungen möglich bzw. reichen im umgekehrten Fall berechnete Werte aus, um eine nennenswerte Verursachung an einer phänotypischen Veränderung in *Bcl11b*-Knockoutzellen durch bestimmte Gene mit der gewählten Untersuchungsmethode als unwahrscheinlich zu erachten. Hingegen sind gerade dezente Veränderungen, wie die Tendenzen der Differenzierungsmarker *Ccr7* und *CD44* bei naiven T-Zellen nach *Bcl11b*-Knockout, mit Vorsicht zu betrachten.



Insbesondere hier wäre eine statistische Analyse zusätzlich hilfreich gewesen, wobei jedoch aufgrund der nicht durchgängig vorhandenen Normalverteilung die Nutzung eines t-Tests nicht möglich war und die Stichprobengröße maximal einen einseitigen Rangsummentest als nicht-parametrisches Verfahren zuließ, wobei ein zweiseitiger Rangsummentest der statistisch gesehen korrekten Durchführung entspräche.

Die eingeschränkte Möglichkeit, von Veränderungen der mRNA-Expression Rückschlüsse auf die Konzentration und Aktivität von Proteinen zu ziehen, wurde in Kapitel 4.1.1 erläutert und damit bewusst der Diskussion für eine kritische Auseinandersetzung vorangestellt.

#### 4.5 Bedeutung der Ergebnisse und weiterführende Überlegungen

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse dienen einer verbesserten Kenntnis der generierten *Bcl11b*-Knockoutzellen. In der Literatur beschriebene Untersuchungen von *Bcl11b*-defizienten T-Zellen weisen zum Teil erhebliche Unterschiede bezüglich der Veränderungen der Genexpression sowie der zytotoxischen Potenz auf. Die Arbeiten variieren dabei in der Art der Ausgangszellen, ihrem Entwicklungsstadium, der Knockout-/Knockdownmethode sowie der Messmethode. Die Diskrepanz der Ergebnisse unterstreicht nicht nur die Vielschichtigkeit der Genexpression, sondern auch die Notwendigkeit der genauen Untersuchung des eigenen Ausgangsmaterials im Gegensatz zur simplen Annahme einer Ergebnisgleichheit mit den Untersuchungen vorangegangener Forschungsarbeiten.

Die Arbeit demonstriert den Erhalt von T-Zell-Markern bei gleichzeitiger Hochregulation mehrerer NK-Zell-assoziiierter Moleküle, für welche eine direkte funktionelle Relevanz für die Lyse von virusbefallenen und Tumorzellen nachgewiesen wurde. Dies lässt hoffen, dass die onkologisch relevanten, vorteilhaften Merkmale sowohl von NK-Zellen als auch von T-Zellen im klinischen Einsatz greifen. Dabei könnten sich das tumorantigenspezifische T-Zell-Vorgehen und die von der MHC-Expression und Antigenpräsentation unabhängige NK-Zell-Zytotoxizität addieren und mögliche Tumorescapemechanismen umgangen werden. Große Hindernisse der NK-Zell-Therapie waren bisher der Erhalt einer ausreichenden Zellzahl und die kurze Überlebenszeit von etwa zwei Wochen im Empfänger (Cho und Campana 2009; Vogel et al. 2014). Die Gewinnung von *Bcl11b*-Knockoutzellen aus CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten bringt diesbezüglich Vorteile: Es können Zellen aus einem fast dreimal größeren Pool im peripheren Blut rekrutiert werden und es zeigt sich laut Li (2010) eine deutlich

ausgeprägtere Expansion nach Stimulation sowie eine Homöostase im Empfänger über erheblich längere Zeiträume. Die ausgesprochen gute Überlebenszeit der ITNK ist in den hier kultivierten *Bcl11b*-Knockoutzellen jedoch nicht zu vermerken. Ihre Vitalität sinkt bereits nach einer Woche zügig ab. Hier sind weitere Untersuchungen zur Ursachenklärung der gesteigerten Apoptose sowie zur Bereitstellung geeigneter Überlebenssignale nötig.

Die Analyse der genutzten Signal- und Effektorwege von *Bcl11b*-Knockoutzellen erhält praktische Relevanz für Überlegungen, welche Mechanismen beansprucht werden können, um die Effektivität der *Bcl11b*-Knockoutzellen in der Tumorthherapie zu potenzieren. So ist die Hochregulation von *Fcgr3* und *Fcer1g* ein starker Hinweis auf das Vorkommen der ADCC, welche durch die Kombination mit monoklonalen Antikörpern gegen Tumorantigene ausgenutzt werden könnte.

Die in der Arbeit deklarierten Veränderungen der Genexpression stellen bisher hauptsächlich Deregulationen auf Transkriptionsebene dar. Eine Bestätigung auf Proteinebene sowie der Nachweis von Kausalitäten mit z.B. transgenen Methoden stehen aus, um klinisch verwendbare Aussagen treffen zu können.

In vielen Versuchen muss weiterhin geklärt werden, ob ITNK tatsächlich zur Anwendung am Menschen im Sinne des adoptiven Zelltransfers geeignet sind. Versuche mit weiteren Tumorzelllinien und Langzeitstudien zu möglichen Komplikationen und Wirkverlusten sind genau so nötig wie die Erforschung von Methoden zur klinisch anwendbaren Reprogrammierung von humanen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, beispielsweise über das CRISPR/Cas-System. Auch alternative und indirekte Wege der Beeinflussung der *Bcl11b*-Expression können in Betracht gezogen werden, etwa über das Transmembranprotein CD147. Bei dessen Funktionsverlust wird die *Bcl11b*-Expression vermutlich über eine eingeschränkte Aktivierung des Transkriptionsfaktors Tcf-1 indirekt supprimiert. Der *CD147*-Knockout sowie die Antikörperblockade von CD147 generieren NK-ähnliche Zellen aus verschiedenen Stadien der T-Zell-Entwicklung bis hin zu peripheren reifen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, welche den ITNK sowohl hinsichtlich des Genexpressionsprogramms als auch der ausgeprägten zytotoxischen Aktivität gleichen. Die Funktionsblockade von CD147 durch Antikörper reduziert das Tumorstadium und Metastasenauftreten von hepatozellulären Karzinomen im Mausmodell signifikant, wenn auch nicht so effektiv wie der *CD147*-Knockout. Die Anti-CD147-Antikörpertherapie war bereits vor dieser Entdeckung als Tumorthherapie bekannt. Die Entwicklung hochzytotoxischer NK-ähnlicher Zellen scheint eine bedeutende Ursache für den Anti-Tumor-Effekt zu sein. (Geng et al. 2017)

Auch wenn eine Methode gefunden wird, die Bcl11b in menschlichen Zellen nachhaltig, effizient und ohne unerwünschte Nebenwirkungen eliminiert, bringt die Reprogrammierung möglicherweise nicht den gewünschten Effekt wie im Mausmodell. Dass sich die Genregulation in Maus und Mensch unterschiedlich verhalten kann, wurde auch für Bcl11b aufgezeigt. Murine und humane *Bcl11b*-Knockoutzellen zeigten beispielsweise eine unterschiedliche Regulation von Genen, welche wichtige Moleküle wie den IL-7- und IL-2-Rezeptor und die Transkriptionsfaktoren Id2 und T-bet kodieren (Ha et al. 2017). Zusammengefasst weisen die transkriptionellen Veränderungen von *Bcl11b*-Knockoutzellen auf ein gutes tumorlytisches Potential hin, für die praktische Anwendung fehlen jedoch noch mehrere Meilensteine.

## Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor Bcl11b ist in der Entwicklung von T-Lymphozyten als ein essentieller Bewahrer der T-Zell-Identität etabliert. Nach Knockout von *Bcl11b* entwickeln sich T-Vorläuferzellen und reife CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten zu NK-ähnlichen Zellen mit einem hohen zytotoxischen Potential gegenüber Tumorzellen. Durch die resultierende Kombination von NK- und T-Zell-Eigenschaften erscheinen diese Zellen für den Einsatz in der Tumorthherapie interessant. Die vorliegende Arbeit untersucht transkriptionelle Veränderungen in *Bcl11b*-Knockoutzellen, welche mithilfe eines Cre-Loxp-Rekombinasesystems aus reifen murinen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen generiert wurden. Konkret wurden die Auswirkungen des Knockouts auf das *Bcl11b*-Gen selbst, auf das Genexpressionsprogramm sowie die Überlebenseigenschaften überprüft.

In RNA-Sequenzierungs- und qPCR-Analysen bestätigte sich der *Bcl11b*-Knockout durch eine stark verringerte Expression von Exon 4 des *Bcl11b*-Gens. Interessanterweise scheint eine fehlerhafte Terminierung der Transkription zur pervasiven Transkription und zu Spleißvorgängen in der Region stromabwärts des *Bcl11b*-Gens zu führen. Bei der Untersuchung von T- und NK-Zell-assoziierten Genen fiel eine deutliche Hochregulation der mRNA-Transkription einzelner NK-Zell-Rezeptoren (NKp46, NK1.1, FcγRIII, CD244) und ITAM-enthaltender Adaptermoleküle (Dap12, FcεRIγ) auf, während die mRNA-Expression des TZR-Komplexes unbeeinflusst blieb. Da NKp46, Dap12 und die über den FcγRIII (CD16) vermittelte Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität als bedeutende Mechanismen der Antitumoraktivität von NK-Zellen bekannt sind, könnten diese Stimulations- und Signalwege auch in *Bcl11b*-Knockoutzellen den Zuwachs an zytotoxischer Aktivität erklären. Die nachgewiesene gesteigerte mRNA-Expression von Granzymen und Perforinen komplettiert das zytotoxische Potential.

*Bcl11b*-Knockoutzellen zeigen im vorliegenden Kultivierungsversuch eine rascher sinkende Vitalität als Kontroll-CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. Eine Deregulation der antiapoptotischen Faktoren Bcl2 und BclxL sowie des Todesrezeptorliganden Trail bei Bcl11b-Verlust wurde in der Literatur für DN4- und DP-T-Zellen sowie für humane Lymphom-/Leukämiezelllinien beschrieben. Eine maßgebliche Beteiligung von Bcl2, BclxL und Trail an der gesteigerten Apoptose nicht maligner, reifer CD8<sup>+</sup>-T-Zellen konnte mit dieser Arbeit zumindest auf mRNA-Ebene ausgeschlossen werden. Insgesamt werden sowohl vielversprechende als auch noch verbesserbare Merkmale der generierten *Bcl11b*-Knockoutzellen für den adoptiven Zelltransfer in der Tumorthherapie aufgezeigt.

## Literaturverzeichnis

Abboud, Georges; Stanfield, Jessica; Tahiliani, Vikas; Desai, Pritesh; Hutchinson, Tarun E.; Lorentsen, Kyle J. et al. (2016): Transcription Factor Bcl11b Controls Effector and Memory CD8 T cell Fate Decision and Function during Poxvirus Infection. In: *Frontiers in immunology* 7, S. 425. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00425.

Addison, Elena G.; North, Janet; Bakhsh, Ismail; Marden, Chloe; Haq, Sumaira; Al-Sarraj, Samia et al. (2005): Ligation of CD8alpha on human natural killer cells prevents activation-induced apoptosis and enhances cytolytic activity. In: *Immunology* 116 (3), S. 354–361. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2005.02235.x.

Albu, Diana I.; Feng, Dongyun; Bhattacharya, Debarati; Jenkins, Nancy A.; Copeland, Neal G.; Liu, Pentao; Avram, Dorina (2007): BCL11B is required for positive selection and survival of double-positive thymocytes. In: *The Journal of experimental medicine* 204 (12), S. 3003–3015. DOI: 10.1084/jem.20070863.

Aldhamen, Yasser A.; Appledorn, Daniel M.; Seregin, Sergey S.; Liu, Chyong-jy J.; Schuldt, Nathaniel J.; Godbehere, Sarah; Amalfitano, Andrea (2011): Expression of the SLAM family of receptors adapter EAT-2 as a novel strategy for enhancing beneficial immune responses to vaccine antigens. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 186 (2), S. 722–732. DOI: 10.4049/jimmunol.1002105.

Aldhamen, Yasser A.; Seregin, Sergey S.; Aylsworth, Charles F.; Godbehere, Sarah; Amalfitano, Andrea (2014): Manipulation of EAT-2 expression promotes induction of multiple beneficial regulatory and effector functions of the human innate immune system as a novel immunomodulatory strategy. In: *International immunology* 26 (5), S. 291–303. DOI: 10.1093/intimm/dxt061.

Andersen; M. H.; Becker, J. C.; Schrama, D.; Straten, P. (2006): Cytotoxic T Cells. In: *Journal of Investigative Dermatology* 126 (1), S. 32–41.

Andoniou, Christopher E.; van Dommelen, Serani L. H.; Voigt, Valentina; Andrews, Daniel M.; Brizard, Geraldine; Asselin-Paturel, Carine et al. (2005): Interaction between conventional dendritic cells and natural killer cells is integral to the activation of effective antiviral immunity. In: *Nature immunology* 6 (10), S. 1011–1019. DOI: 10.1038/ni1244.

Andrews, Daniel M.; Scalzo, Anthony A.; Yokoyama, Wayne M.; Smyth, Mark J.; Degli-Esposti, Mariapia A. (2003): Functional interactions between dendritic cells and

NK cells during viral infection. In: *Nature immunology* 4 (2), S. 175–181. DOI: 10.1038/ni880.

Andrews, Daniel M.; Smyth, Mark J. (2010): A potential role for RAG-1 in NK cell development revealed by analysis of NK cells during ontogeny. In: *Immunology and cell biology* 88 (2), S. 107–116. DOI: 10.1038/icb.2009.94.

Andrews, R. G.; Singer, J. W.; Bernstein, I. D. (1989): Precursors of colony-forming cells in humans can be distinguished from colony-forming cells by expression of the CD33 and CD34 antigens and light scatter properties. In: *The Journal of experimental medicine* 169 (5), S. 1721–1731.

Arase, N.; Arase, H.; Park, S. Y.; Ohno, H.; Ra, C.; Saito, T. (1997): Association with FcRgamma is essential for activation signal through NKR-P1 (CD161) in natural killer (NK) cells and NK1.1+ T cells. In: *The Journal of experimental medicine* 186 (12), S. 1957–1963.

Arlotta, Paola; Molyneaux, Bradley J.; Jabaudon, Denis; Yoshida, Yutaka; Macklis, Jeffrey D. (2008): Ctip2 controls the differentiation of medium spiny neurons and the establishment of the cellular architecture of the striatum. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28 (3), S. 622–632. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2986-07.2008.

Ashburner, M.; Ball, C. A.; Blake, J. A.; Botstein, D.; Butler, H.; Cherry, J. M. et al. (2000): Gene ontology. Tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. In: *Nature genetics* 25 (1), S. 25–29. DOI: 10.1038/75556.

Avram, D.; Fields, A.; Pretty On Top, K.; Nevriy, D. J.; Ishmael J.E.; Leid, M. (2000): Isolation of a Novel Family of C2H2 Zinc Finger Proteins Implicated in Transcriptional Repression Mediated by Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor (COUP-TF) Orphan Nuclear Receptors. In: *J Biol Chem.* 275 (14), S. 10315–10322.

Avram, Dorina; Fields, Andrew; Senawong, Thanaset; Topark-Ngarm, Acharawan; Leid, Mark (2002): COUP-TF (chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor)-interacting protein 1 (CTIP1) is a sequence-specific DNA binding protein. In: *The Biochemical journal* 368 (Pt 2), S. 555–563. DOI: 10.1042/BJ20020496.

Badovinac, Vladimir P.; Porter, Brandon B.; Harty, John T. (2002): Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. In: *Nature immunology* 3 (7), S. 619–626. DOI: 10.1038/ni804.

Bain, G.; Engel, I.; Robanus Maandag, E. C.; te Riele, H. P.; Volland, J. R.; Sharp, L. L. et al. (1997): E2A deficiency leads to abnormalities in alphabeta T-cell development and to rapid development of T-cell lymphomas. In: *Molecular and cellular biology* 17 (8), S. 4782–4791.

Bakker, A. B.; Hoek, R. M.; Cerwenka, A.; Blom, B.; Lucian, L.; McNeil, T. et al. (2000): DAP12-deficient mice fail to develop autoimmunity due to impaired antigen priming. In: *Immunity* 13 (3), S. 345–353.

Banerjee, Arnob; Gordon, Scott M.; Intlekofer, Andrew M.; Paley, Michael A.; Mooney, Erin C.; Lindsten, Tulia et al. (2010): Cutting edge. The transcription factor eomesodermin enables CD8+ T cells to compete for the memory cell niche. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 185 (9), S. 4988–4992. DOI: 10.4049/jimmunol.1002042.

Bekpen, Cemalettin; Hunn, Julia P.; Rohde, Christoph; Parvanova, Iana; Guethlein, Libby; Dunn, Diane M. et al. (2005): The interferon-inducible p47 (IRG) GTPases in vertebrates. Loss of the cell autonomous resistance mechanism in the human lineage. In: *Genome biology* 6 (11), R92. DOI: 10.1186/gb-2005-6-11-r92.

Bell, J. Jeremiah; Bhandoola, Avinash (2008): The earliest thymic progenitors for T cells possess myeloid lineage potential. In: *Nature* 452 (7188), S. 764–767. DOI: 10.1038/nature06840.

Bendelac, A.; Bonneville, M.; Kearney, J. F. (2001): Autoreactivity by design. Innate B and T lymphocytes. In: *Nature reviews. Immunology* 1 (3), S. 177–186. DOI: 10.1038/35105052.

Beresford, P. J.; Zhang, D.; Oh, D. Y.; Fan, Z.; Greer, E. L.; Russo, M. L. et al. (2001): Granzyme A activates an endoplasmic reticulum-associated caspase-independent nuclease to induce single-stranded DNA nicks. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (46), S. 43285–43293. DOI: 10.1074/jbc.M108137200.

Berretta, Julia; Morillon, Antonin (2009): Pervasive transcription constitutes a new level of eukaryotic genome regulation. In: *EMBO reports* 10 (9), S. 973–982. DOI: 10.1038/embor.2009.181.

Bevan, Michael J. (2004): Helping the CD8(+) T-cell response. In: *Nature reviews. Immunology* 4 (8), S. 595–602. DOI: 10.1038/nri1413.

Bezman, Natalie A.; Kim, Charles C.; Sun, Joseph C.; Min-Oo, Gundula; Hendricks, Deborah W.; Kamimura, Yosuke et al. (2012): ImmGen Report: Molecular definition of Natural Killer cell identity and activation. In: *Nature immunology* 13 (10), S. 1000–1009. DOI: 10.1038/ni.2395.

Bjorkstrom, Niklas K.; Gonzalez, Veronica D.; Malmberg, Karl-Johan; Falconer, Karolin; Alaeus, Annette; Nowak, Greg et al. (2008): Elevated numbers of Fc gamma RIIIA+ (CD16+) effector CD8 T cells with NK cell-like function in chronic hepatitis C virus infection. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 181 (6), S. 4219–4228. DOI: 10.4049/jimmunol.181.6.4219.

Bjorkstrom, Niklas K.; Lindgren, Therese; Stoltz, Malin; Fauriat, Cyril; Braun, Monika; Evander, Magnus et al. (2011): Rapid expansion and long-term persistence of elevated NK cell numbers in humans infected with hantavirus. In: *The Journal of experimental medicine* 208 (1), S. 13–21. DOI: 10.1084/jem.20100762.

Blood Atlas (Internet). Human Protein Atlas; Stockholm 2003 (v.20.1; Zugriff am 10.07.2021). Zugriff über <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000127152-BCL11B/blood>

Brenner, Dirk; Krammer, Peter H.; Arnold, Rudiger (2008): Concepts of activated T cell death. In: *Critical reviews in oncology/hematology* 66 (1), S. 52–64. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2008.01.002.

Brentjens, Renier J.; Davila, Marco L.; Riviere, Isabelle; Park, Jae; Wang, Xiuyan; Cowell, Lindsay G. et al. (2013): CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. In: *Science translational medicine* 5 (177), 177ra38. DOI: 10.1126/scitranslmed.3005930.

Califano, Danielle; Cho, Jonathan J.; Uddin, Mohammad N.; Lorentsen, Kyle J.; Yang, Qi; Bhandoola, Avinash et al. (2015): Transcription Factor Bcl11b Controls Identity and Function of Mature Type 2 Innate Lymphoid Cells. In: *Immunity* 43 (2), S. 354–368. DOI: 10.1016/j.immuni.2015.07.005.

Caligiuri, Michael A. (2008): Human natural killer cells. In: *Blood* 112 (3), S. 461–469. DOI: 10.1182/blood-2007-09-077438.

Calkhoven, C. F.; Ab, G. (1996): Multiple steps in the regulation of transcription-factor level and activity. In: *The Biochemical journal* 317 (Pt 2), S. 329–342. DOI: 10.1042/bj3170329.



Cantoni, C.; Bottino, C.; Vitale, M.; Pessino, A.; Augugliaro, R.; Malaspina, A. et al. (1999): NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. In: *The Journal of experimental medicine* 189 (5), S. 787–796.

Chang, Chien-Chung; Ferrone, Soldano (2007): Immune selective pressure and HLA class I antigen defects in malignant lesions. In: *Cancer immunology, immunotherapy* : CII 56 (2), S. 227–236. DOI: 10.1007/s00262-006-0183-1.

Cherrier, T.; Suzanne, S.; Redel, L.; Calao, M.; Marban, C.; Samah, B. et al. (2009): p21(WAF1) gene promoter is epigenetically silenced by CTIP2 and SUV39H1. In: *Oncogene* 28 (38), S. 3380–3389. DOI: 10.1038/onc.2009.193.

Cho, Duck; Campana, Dario (2009): Expansion and activation of natural killer cells for cancer immunotherapy. In: *The Korean journal of laboratory medicine* 29 (2), S. 89–96. DOI: 10.3343/kjlm.2009.29.2.89.

Chraa, Dounia; Naim, Asmaa; Olive, Daniel; Badou, Abdallah (2018): T lymphocyte subsets in cancer immunity. Friends or foes. In: *Journal of leukocyte biology*. DOI: 10.1002/JLB.MR0318-097R.

Cismasiu, Valeriu B.; Adamo, Karen; Gecewicz, Jennifer; Duque, Javier; Lin, Qishan; Avram, Dorina (2005): BCL11B functionally associates with the NuRD complex in T lymphocytes to repress targeted promoter. In: *Oncogene* 24 (45), S. 6753–6764. DOI: 10.1038/sj.onc.1208904.

Cismasiu, Valeriu B.; Duque, Javier; Paskaleva, Elena; Califano, Danielle; Ghanta, Sailaja; Young, Howard A.; Avram, Dorina (2009): BCL11B enhances TCR/CD28-triggered NF-kappaB activation through up-regulation of Cot kinase gene expression in T-lymphocytes. In: *The Biochemical journal* 417 (2), S. 457–466. DOI: 10.1042/BJ20080925.

Cismasiu, Valeriu B.; Ghanta, Sailaja; Duque, Javier; Albu, Diana I.; Chen, Hong-Mei; Kasturi, Rohini; Avram, Dorina (2006): BCL11B participates in the activation of IL2 gene expression in CD4+ T lymphocytes. In: *Blood* 108 (8), S. 2695–2702. DOI: 10.1182/blood-2006-05-021790.

Civin, C. I.; Strauss, L. C.; Brovall, C.; Fackler, M. J.; Schwartz, J. F.; Shaper, J. H. (1984): Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 133 (1), S. 157–165.

Coca, S.; Perez-Piqueras, J.; Martinez, D.; Colmenarejo, A.; Saez, M. A.; Vallejo, C. et al. (1997): The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. In: *Cancer* 79 (12), S. 2320–2328.

Collins, K. L.; Chen, B. K.; Kalams, S. A.; Walker, B. D.; Baltimore, D. (1998): HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. In: *Nature* 391 (6665), S. 397–401. DOI: 10.1038/34929.

Colucci, Francesco; Caligiuri, Michael A.; Di Santo, James P. (2003): What does it take to make a natural killer? In: *Nature reviews. Immunology* 3 (5), S. 413–425. DOI: 10.1038/nri1088.

Cooper, M. A.; Fehniger, T. A.; Turner, S. C.; Chen, K. S.; Ghaehri, B. A.; Ghayur, T. et al. (2001): Human natural killer cells. A unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. In: *Blood* 97 (10), S. 3146–3151.

Cooper, Megan A.; Bush, Jennifer E.; Fehniger, Todd A.; VanDeusen, Jeffrey B.; Waite, Ross E.; Liu, Yang et al. (2002): In vivo evidence for a dependence on interleukin 15 for survival of natural killer cells. In: *Blood* 100 (10), S. 3633–3638. DOI: 10.1182/blood-2001-12-0293.

Cudkowicz, G.; Stimpfling, J. H. (1964): Induction of immunity and of unresponsiveness to parental marrow grafts in adult F-1 hybrid mice. In: *Nature* 204, S. 450–453.

Darmon, A. J.; Nicholson, D. W.; Bleackley, R. C. (1995): Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. In: *Nature* 377 (6548), S. 446–448. DOI: 10.1038/377446a0.

Davila, Marco L.; Riviere, Isabelle; Wang, Xiuyan; Bartido, Shirley; Park, Jae; Curran, Kevin et al. (2014): Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. In: *Science translational medicine* 6 (224), 224ra25. DOI: 10.1126/scitranslmed.3008226.

Degrandi, Daniel; Konermann, Carolin; Beuter-Gunia, Cornelia; Kresse, Alexandra; Wurthner, Jan; Kurig, Stefanie et al. (2007): Extensive characterization of IFN-induced GTPases mGBP1 to mGBP10 involved in host defense. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 179 (11), S. 7729–7740. DOI: 10.4049/jimmunol.179.11.7729.

Deutsch, Alexander J. A.; Rinner, Beate; Pichler, Martin; Prochazka, Katharina; Pansy, Katrin; Bischof, Marco et al. (2017): NR4A3 Suppresses Lymphomagenesis through Induction of Proapoptotic Genes. In: *Cancer research* 77 (9), S. 2375–2386. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2320.

Diefenbach, Andreas; Tomasello, Elena; Lucas, Mathias; Jamieson, Amanda M.; Hsia, Jennifer K.; Vivier, Eric; Raulet, David H. (2002): Selective associations with signaling proteins determine stimulatory versus costimulatory activity of NKG2D. In: *Nature immunology* 3 (12), S. 1142–1149. DOI: 10.1038/ni858.

Dougan, Michael; Dranoff, Glenn (2009): Immune therapy for cancer. In: *Annual review of immunology* 27, S. 83–117. DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132544.

Dubuissez, Marion; Loison, Ingrid; Paget, Sonia; Vorng, Han; Ait-Yahia, Saliha; Rohr, Olivier et al. (2016): Protein Kinase C-Mediated Phosphorylation of BCL11B at Serine 2 Negatively Regulates Its Interaction with NuRD Complexes during CD4+ T-Cell Activation. In: *Molecular and cellular biology* 36 (13), S. 1881–1898. DOI: 10.1128/MCB.00062-16.

Durbin, J. E.; Hackenmiller, R.; Simon, M. C.; Levy, D. E. (1996): Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. In: *Cell* 84 (3), S. 443–450. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81289-1.

Egawa, Takeshi; Tillman, Robert E.; Naoe, Yoshinori; Taniuchi, Ichiro; Littman, Dan R. (2007): The role of the Runx transcription factors in thymocyte differentiation and in homeostasis of naive T cells. In: *The Journal of experimental medicine* 204 (8), S. 1945–1957. DOI: 10.1084/jem.20070133.

Eichelbaum, Katrin; Krijgsveld, Jeroen (2014): Rapid temporal dynamics of transcription, protein synthesis, and secretion during macrophage activation. In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 13 (3), S. 792–810. DOI: 10.1074/mcp.M113.030916.

Enomoto, Takayuki; Ohmoto, Makoto; Iwata, Tetsuo; Uno, Ayako; Saitou, Masato; Yamaguchi, Tatsuya et al. (2011): Bcl11b/Ctip2 controls the differentiation of vomeronasal sensory neurons in mice. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31 (28), S. 10159–10173. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1245-11.2011.

Falschlehner, Christina; Schaefer, Uta; Walczak, Henning (2009): Following TRAIL's path in the immune system. In: *Immunology* 127 (2), S. 145–154. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2009.03058.x.

Fan, Zusen; Beresford, Paul J.; Zhang, Dong; Xu, Zhan; Novina, Carl D.; Yoshida, Akira et al. (2003): Cleaving the oxidative repair protein Ape1 enhances cell death mediated by granzyme A. In: *Nature immunology* 4 (2), S. 145–153. DOI: 10.1038/ni885.

Fang, Difeng; Cui, Kairong; Hu, Gangqing; Gurram, Rama Krishna; Zhong, Chao; Oler, Andrew J. et al. (2018): Bcl11b, a novel GATA3-interacting protein, suppresses Th1 while limiting Th2 cell differentiation. In: *The Journal of experimental medicine* 215 (5), S. 1449–1462. DOI: 10.1084/jem.20171127.

Fournier, Marjorie L.; Paulson, Ariel; Pavelka, Norman; Mosley, Amber L.; Gaudenz, Karin; Bradford, William D. et al. (2010): Delayed correlation of mRNA and protein expression in rapamycin-treated cells and a role for Ggc1 in cellular sensitivity to rapamycin. In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 9 (2), S. 271–284. DOI: 10.1074/mcp.M900415-MCP200.

Freud, Aharon G.; Becknell, Brian; Roychowdhury, Sameek; Mao, Hsiaoyin C.; Ferketich, Amy K.; Nuovo, Gerard J. et al. (2005): A human CD34(+) subset resides in lymph nodes and differentiates into CD56bright natural killer cells. In: *Immunity* 22 (3), S. 295–304. DOI: 10.1016/j.immuni.2005.01.013.

Fu, Wenjing; Yi, Shengguo; Qiu, Lei; Sun, Jingru; Tu, Ping; Wang, Yang (2017): BCL11B-Mediated Epigenetic Repression Is a Crucial Target for Histone Deacetylase Inhibitors in Cutaneous T-Cell Lymphoma. In: *The Journal of investigative dermatology* 137 (7), S. 1523–1532. DOI: 10.1016/j.jid.2017.02.980.

Fujimoto, Shinji; Ikawa, Tomokatsu; Kina, Tatsuo; Yokota, Yoshifumi (2007): Forced expression of Id2 in fetal thymic T cell progenitors allows some of their progeny to adopt NK cell fate. In: *International immunology* 19 (10), S. 1175–1182. DOI: 10.1093/intimm/dxm085.

Gascoyne, Duncan M.; Long, Elaine; Veiga-Fernandes, Henrique; Boer, Jasper de; Williams, Owen; Seddon, Benedict et al. (2009): The basic leucine zipper transcription factor E4BP4 is essential for natural killer cell development. In: *Nature immunology* 10 (10), S. 1118–1124. DOI: 10.1038/ni.1787.

- Geiger, Theresa L.; Sun, Joseph C. (2016): Development and maturation of natural killer cells. In: *Current opinion in immunology* 39, S. 82–89. DOI: 10.1016/j.coi.2016.01.007.
- Geller, Melissa A.; Cooley, Sarah; Judson, Patricia L.; Ghebre, Rahel; Carson, Linda F.; Argenta, Peter A. et al. (2011): A phase II study of allogeneic natural killer cell therapy to treat patients with recurrent ovarian and breast cancer. In: *Cytotherapy* 13 (1), S. 98–107. DOI: 10.3109/14653249.2010.515582.
- Geng, Jie-Jie; Tang, Juan; Yang, Xiang-Min; Chen, Ruo; Zhang, Yang; Zhang, Kui et al. (2017): Targeting CD147 for T to NK Lineage Reprogramming and Tumor Therapy. In: *EBioMedicine*. DOI: 10.1016/j.ebiom.2017.05.022.
- Girolomoni, Giampiero; Gisondi, Paolo; Ottaviani, Chiara; Cavani, Andrea (2004): Immunoregulation of allergic contact dermatitis. In: *The Journal of dermatology* 31 (4), S. 264–270.
- Glasner, Ariella; Ghadially, Hormas; Gur, Chamutal; Stanietzky, Noa; Tsukerman, Pinchas; Enk, Jonatan; Mandelboim, Ofer (2012): Recognition and prevention of tumor metastasis by the NK receptor NKp46/NCR1. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 188 (6), S. 2509–2515. DOI: 10.4049/jimmunol.1102461.
- Glasner, Ariella; Isaacson, Batya; Viukov, Sergey; Neuman, Tzahi; Friedman, Nehemya; Mandelboim, Michal et al. (2017): Increased NK cell immunity in a transgenic mouse model of NKp46 overexpression. In: *Scientific reports* 7 (1), S. 13090. DOI: 10.1038/s41598-017-12998-w.
- GO-Enrichment Analysis (Internet). Gene Ontology (Zugriff am 12.02.2019). Zugriff über <http://geneontology.org/>
- Godfrey, D. I.; Kennedy, J.; Suda, T.; Zlotnik, A. (1993): A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 150 (10), S. 4244–4252.
- Golonzhka, Olga; Liang, Xiaobo; Messaddeq, Nadia; Bornert, Jean-Marc; Campbell, Adam L.; Metzger, Daniel et al. (2009a): Dual role of COUP-TF-interacting protein 2 in epidermal homeostasis and permeability barrier formation. In: *The Journal of investigative dermatology* 129 (6), S. 1459–1470. DOI: 10.1038/jid.2008.392.

Golonzhka, Olga; Metzger, Daniel; Bornert, Jean-Marc; Bay, Brian K.; Gross, Michael K.; Kioussi, Chrissa; Leid, Mark (2009b): CtIP2/Bcl11b controls ameloblast formation during mammalian odontogenesis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (11), S. 4278–4283. DOI: 10.1073/pnas.0900568106.

Golubovskaya, Vita; Wu, Lijun (2016): Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. In: *Cancers* 8 (3). DOI: 10.3390/cancers8030036.

Grabarczyk, P.; Przybylski, G. K.; Depke, M.; Volker, U.; Bahr, J.; Assmus, K. et al. (2007): Inhibition of BCL11B expression leads to apoptosis of malignant but not normal mature T cells. In: *Oncogene* 26 (26), S. 3797–3810. DOI: 10.1038/sj.onc.1210152.

Grabarczyk, Piotr; Nahse, Viola; Delin, Martin; Przybylski, Grzegorz; Depke, Maren; Hildebrandt, Petra et al. (2010): Increased expression of bcl11b leads to chemoresistance accompanied by G1 accumulation. In: *PloS one* 5 (9). DOI: 10.1371/journal.pone.0012532.

Grabarczyk, Piotr; Winkler, Passorn; Delin, Martin; Sappa, Praveen K.; Bekeschus, Sander; Hildebrandt, Petra et al. (2018): The N-Terminal CCHC Zinc Finger Motif Mediates Homodimerization of Transcription Factor BCL11B. In: *Molecular and cellular biology* 38 (5). DOI: 10.1128/MCB.00368-17.

Grayson, J. M.; Zajac, A. J.; Altman, J. D.; Ahmed, R. (2000): Cutting edge. Increased expression of Bcl-2 in antigen-specific memory CD8+ T cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 164 (8), S. 3950–3954.

Groh, V.; Rhinehart, R.; Randolph-Habecker, J.; Topp, M. S.; Riddell, S. R.; Spies, T. (2001): Costimulation of CD8 $\alpha$ beta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. In: *Nature immunology* 2 (3), S. 255–260. DOI: 10.1038/85321.

Grosso, Ana R.; Leite, Ana P.; Carvalho, Silvia; Matos, Mafalda R.; Martins, Filipa B.; Vitor, Alexandra C. et al. (2015): Pervasive transcription read-through promotes aberrant expression of oncogenes and RNA chimeras in renal carcinoma. In: *eLife* 4. DOI: 10.7554/eLife.09214.

Groux, H.; Sornasse, T.; Cottrez, F.; Vries, J. E. de; Coffman, R. L.; Roncarolo, M. G.; Yssel, H. (1997): Induction of human T helper cell type 1 differentiation results in

- loss of IFN-gamma receptor beta-chain expression. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 158 (12), S. 5627–5631. Online verfügbar unter <https://www.jimmunol.org/content/158/12/5627>.
- Gu, Xiaoguang; Wang, Yang; Zhang, Gaolei; Li, Weiwei; Tu, Ping (2013): Aberrant expression of BCL11B in mycosis fungoides and its potential role in interferon-induced apoptosis. In: *The Journal of dermatology* 40 (8), S. 596–605. DOI: 10.1111/1346-8138.12160.
- Gu, Y.; Sarnecki, C.; Fleming, M. A.; Lippke, J. A.; Bleackley, R. C.; Su, M. S. (1996): Processing and activation of CMH-1 by granzyme B. In: *The Journal of biological chemistry* 271 (18), S. 10816–10820.
- Guicciardi, M. E.; Gores, G. J. (2009): Life and death by death receptors. In: *The FASEB journal* 23 (6), S. 1625–1637.
- Guo, Yanfang; Xiao, Peng; Lei, Shufeng; Deng, Feiyan; Xiao, Gary Guishan; Liu, Yaozhong et al. (2008): How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes. In: *Acta biochimica et biophysica Sinica* 40 (5), S. 426–436.
- Gutierrez, A.; Kentsis, A.; Sanda, T.; Holmfeldt, L.; Chen, S.; Zhang, J. et al. (2011): The BCL11B tumor suppressor is mutated across the major molecular subtypes of T-cell acute lymphoblastic leukemia. In: *Blood* 118 (15), S. 4169–4173.
- Ha, V. L.; Luong, A.; Li, F.; Casero, D.; Malvar, J.; Kim, Y. M. et al. (2017): The T-ALL related gene BCL11B regulates the initial stages of human T-cell differentiation. In: *Leukemia*. DOI: 10.1038/leu.2017.70.
- Halfteck, Gili G.; Elboim, Moran; Gur, Chamutal; Achdout, Hagit; Ghadially, Hormas; Mandelboim, Ofer (2009): Enhanced in vivo growth of lymphoma tumors in the absence of the NK-activating receptor NKp46/NCR1. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 182 (4), S. 2221–2230. DOI: 10.4049/jimmunol.0801878.
- Hall, Bradford; Limaye, Advait; Kulkarni, Ashok B. (2009): Overview: Generation of Gene Knockout Mice. In: *Current Protocols in Cell Biology* 19 (Supplement 44), S. 11–17. DOI: 10.1002/0471143030.cb1912s44.
- Han, Hua; Tanigaki, Kenji; Yamamoto, Norio; Kuroda, Kazuki; Yoshimoto, Momoko; Nakahata, Tatsutoshi et al. (2002): Inducible gene knockout of transcription factor

recombination signal binding protein-J reveals its essential role in T versus B lineage decision. In: *International immunology* 14 (6), S. 637–645.

Hashimoto, W.; Osaki, T.; Okamura, H.; Robbins, P. D. (1999): Differential Antitumor Effects of Administration of Recombinant IL-18 or Recombinant IL-12 Are Mediated Primarily by Fas-Fas Ligand- and Perforin-Induced Tumor Apoptosis, Respectively. In: *Journal of immunology* 163 (2), S. 583–589.

Heizmann, Beate; Reth, Michael; Infantino, Simona (2010): Syk is a dual-specificity kinase that self-regulates the signal output from the B-cell antigen receptor. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (43), S. 18563–18568. DOI: 10.1073/pnas.1009048107.

Henkart, P. A.; Millard, P. J.; Reynolds, C. W.; Henkart, M. P. (1984): Cytolytic activity of purified cytoplasmic granules from cytotoxic rat large granular lymphocyte tumors. In: *The Journal of experimental medicine* 160 (1), S. 75–93.

Hess Michelini, Rodrigo; Doedens, Andrew L.; Goldrath, Ananda W.; Hedrick, Stephen M. (2013): Differentiation of CD8 memory T cells depends on Foxo1. In: *The Journal of experimental medicine* 210 (6), S. 1189–1200. DOI: 10.1084/jem.20130392.

Hildeman, David A.; Zhu, Yanan; Mitchell, Thomas C.; Bouillet, Philippe; Strasser, Andreas; Kappler, John; Marrack, Philippa (2002): Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim. In: *Immunity* 16 (6), S. 759–767.

Hosokawa, Hiroyuki; Romero-Wolf, Maile; Yui, Mary A.; Ungerback, Jonas; Quiloan, Maria L. G.; Matsumoto, Masaki et al. (2018): Bcl11b sets pro-T cell fate by site-specific cofactor recruitment and by repressing Id2 and Zbtb16. In: *Nature immunology* 19 (12), S. 1427–1440. DOI: 10.1038/s41590-018-0238-4.

Huang, Xin; Chen, Shaohua; Shen, Qi; Yang, Lijian; Li, Bo; Zhong, Liye et al. (2010): Analysis of the expression pattern of the BCL11B gene and its relatives in patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia. In: *Journal of hematology & oncology* 3 (1), S. 44. DOI: 10.1186/1756-8722-3-44.

Huang, Xin; Shen, Qi; Chen, Si; Chen, Shaohua; Yang, Lijian; Weng, Jianyu et al. (2011): Gene expression profiles in BCL11B-siRNA treated malignant T cells. In: *Journal of hematology & oncology* 4, S. 23. DOI: 10.1186/1756-8722-4-23.



Huntington, Nicholas D.; Puthalakath, Hamsa; Gunn, Priscilla; Naik, Edwina; Michalak, Ewa M.; Smyth, Mark J. et al. (2007): Interleukin 15-mediated survival of natural killer cells is determined by interactions among Bim, Noxa and Mcl-1. In: *Nature immunology* 8 (8), S. 856–863. DOI: 10.1038/ni1487.

Ikawa, Tomokatsu; Hirose, Satoshi; Masuda, Kyoko; Kakugawa, Kiyokazu; Satoh, Rumi; Shibano-Satoh, Asako et al. (2010): An essential developmental checkpoint for production of the T cell lineage. In: *Science (New York, N.Y.)* 329 (5987), S. 93–96. DOI: 10.1126/science.1188995.

Inoue, Jun; Kanefuji, Tsutomu; Okazuka, Kiyoshi; Watanabe, Hisami; Mishima, Yukio; Kominami, Ryo (2006): Expression of TCR alpha beta partly rescues developmental arrest and apoptosis of alpha beta T cells in Bcl11b<sup>-/-</sup> mice. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 176 (10), S. 5871–5879.

Janssen, Edith M.; Droin, Nathalie M.; Lemmens, Edward E.; Pinkoski, Michael J.; Bensinger, Steven J.; Ehst, Benjamin D. et al. (2005): CD4<sup>+</sup> T-cell help controls CD8<sup>+</sup> T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. In: *Nature* 434 (7029), S. 88–93. DOI: 10.1038/nature03337.

Johansson, Sofia; Johansson, Maria; Rosmaraki, Eleftheria; Vahlne, Gustaf; Mehr, Ramit; Salmon-Divon, Mali et al. (2005): Natural killer cell education in mice with single or multiple major histocompatibility complex class I molecules. In: *The Journal of experimental medicine* 201 (7), S. 1145–1155. DOI: 10.1084/jem.20050167.

Jones, Mary Elizabeth; Zhuang, Yuan (2007): Acquisition of a functional T cell receptor during T lymphocyte development is enforced by HEB and E2A transcription factors. In: *Immunity* 27 (6), S. 860–870. DOI: 10.1016/j.immuni.2007.10.014.

Joshi, N.; Cui, W.; Chandele, A.; Lee, H.; Urso, D.; Hagman, J. et al. (2007): Inflammation Directs Memory Precursor and Short-Lived Effector CD8(+) T Cell Fates via the Graded Expression of T-bet Transcription Factor. In: *Immunity* 27 (2), S. 281–295. DOI: 10.1016/j.immuni.2007.07.010.

Jovanovic, Marko; Rooney, Michael S.; Mertins, Philipp; Przybylski, Dariusz; Chevrier, Nicolas; Satija, Rahul et al. (2015): Immunogenetics. Dynamic profiling of the protein life cycle in response to pathogens. In: *Science (New York, N.Y.)* 347 (6226), S. 1259038. DOI: 10.1126/science.1259038.

Kaech, Susan M.; Cui, Weiguo (2012): Transcriptional control of effector and memory CD8<sup>+</sup> T cell differentiation. In: *Nature reviews. Immunology* 12 (11), S. 749–761. DOI: 10.1038/nri3307.

Kaech, Susan M.; Tan, Joyce T.; Wherry, E. John; Konieczny, Bogumila T.; Surh, Charles D.; Ahmed, Rafi (2003): Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. In: *Nature immunology* 4 (12), S. 1191–1198. DOI: 10.1038/ni1009.

Kamimura, K.; Mishima, Y.; Obata, M.; Endo, T.; Aoyagi, Y.; Kominami, R. (2007a): Lack of Bcl11b tumor suppressor results in vulnerability to DNA replication stress and damages. In: *Oncogene* 26 (40), S. 5840–5850. DOI: 10.1038/sj.onc.1210388.

Kamimura, Kenya; Ohi, Hiroyuki; Kubota, Tomoyuki; Okazuka, Kiyoshi; Yoshikai, Yoshihiro; Wakabayashi, Yu-ichi et al. (2007b): Haploinsufficiency of Bcl11b for suppression of lymphomagenesis and thymocyte development. In: *Biochemical and biophysical research communications* 355 (2), S. 538–542. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.02.003.

Karanam, Narasimha Kumar; Grabarczyk, Piotr; Hammer, Elke; Scharf, Christian; Venz, Simone; Gesell-Salazar, Manuela et al. (2010): Proteome analysis reveals new mechanisms of Bcl11b-loss driven apoptosis. In: *Journal of proteome research* 9 (8), S. 3799–3811. DOI: 10.1021/pr901096u.

Karimi, Mobin; Cao, Thai M.; Baker, Jeanette A.; Verneris, Michael R.; Soares, Luis; Negrin, Robert S. (2005): Silencing human NKG2D, DAP10, and DAP12 reduces cytotoxicity of activated CD8<sup>+</sup> T cells and NK cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 175 (12), S. 7819–7828.

Karlsson, Anneli; Nordigarden, Amanda; Jonsson, Jan-Ingvar; Soderkvist, Peter (2007): Bcl11b mutations identified in murine lymphomas increase the proliferation rate of hematopoietic progenitor cells. In: *BMC cancer* 7, S. 195. DOI: 10.1186/1471-2407-7-195.

Kastner, Philippe; Chan, Susan; Vogel, Walter K.; Zhang, Ling-Juan; Topark-Ngarm, Acharawan; Golonzhka, Olga et al. (2010): Bcl11b represses a mature T-cell gene expression program in immature CD4(+)CD8(+) thymocytes. In: *European journal of immunology* 40 (8), S. 2143–2154. DOI: 10.1002/eji.200940258.

Kayagaki, N.; Yamaguchi, N.; Nakayama, M.; Takeda, K.; Akiba, H.; Tsutsui, H. et al. (1999): Expression and function of TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine

activated NK cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 163 (4), S. 1906–1913.

Keersmaecker, Kim de; Real, Pedro J.; Della Gatta, Giusy; Palomero, Teresa; Sulis, Maria Luisa; Tosello, Valeria et al. (2010): The TLX1 oncogene drives aneuploidy in T cell transformation. In: *Nature medicine* 16 (11), S. 1321–1327. DOI: 10.1038/nm.2246.

Kelley, James; Walter, Lutz; Trowsdale, John (2005): Comparative genomics of natural killer cell receptor gene clusters. In: *PLoS genetics* 1 (2), S. 129–139. DOI: 10.1371/journal.pgen.0010027.

Kiessling, R.; Klein, E.; Wigzell, H. (1975): "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. In: *European journal of immunology* 5 (2), S. 112–117. DOI: 10.1002/eji.1830050208.

Kim, Sungjin; Iizuka, Koho; Kang, Hyun-Seok P.; Dokun, Ayotunde; French, Anthony R.; Greco, Suellen; Yokoyama, Wayne M. (2002): In vivo developmental stages in murine natural killer cell maturation. In: *Nature immunology* 3 (6), S. 523–528. DOI: 10.1038/ni796.

Kojo, Satoshi; Tanaka, Hirokazu; Endo, Takaho A.; Muroi, Sawako; Liu, Ye; Seo, Wooseok et al. (2017): Priming of lineage-specifying genes by Bcl11b is required for lineage choice in post-selection thymocytes. In: *Nature communications* 8 (1), S. 702. DOI: 10.1038/s41467-017-00768-1.

Kominami, R. (2012): Role of the transcription factor Bcl11b in development and lymphomagenesis. In: *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences* 88 (3), S. 72–87.

Kondo, M.; Weissman, I. L.; Akashi, K. (1997): Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. In: *Cell* 91 (5), S. 661–672.

Koussounadis, Antonis; Langdon, Simon P.; Um, In Hwa; Harrison, David J.; Smith, V. Anne (2015): Relationship between differentially expressed mRNA and mRNA-protein correlations in a xenograft model system. In: *Scientific reports* 5, S. 10775. DOI: 10.1038/srep10775.

Koyasu, S.; D'Adamio, L.; Arulanandam, A. R.; Abraham, S.; Clayton, L. K.; Reinherz, E. L. (1992): T cell receptor complexes containing Fc epsilon RI gamma

homodimers in lieu of CD3 zeta and CD3 eta components. A novel isoform expressed on large granular lymphocytes. In: *The Journal of experimental medicine* 175 (1), S. 203–209.

Krishnan, Sandeep; Warke, Vishal G.; Nambiar, Madhusoodana P.; Tsokos, George C.; Farber, Donna L. (2003): The FcR gamma subunit and Syk kinase replace the CD3 zeta-chain and ZAP-70 kinase in the TCR signaling complex of human effector CD4 T cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 170 (8), S. 4189–4195.

Kubosaki, Atsutaka; Lindgren, Gabriella; Tagami, Michihira; Simon, Christophe; Tomaru, Yasuhiro; Miura, Hisashi et al. (2010): The combination of gene perturbation assay and ChIP-chip reveals functional direct target genes for IRF8 in THP-1 cells. In: *Molecular immunology* 47 (14), S. 2295–2302. DOI: 10.1016/j.molimm.2010.05.289.

Kueh, Hao Yuan; Yui, Mary A.; Ng, Kenneth K. H.; Pease, Shirley S.; Zhang, Jingli A.; Damle, Sagar S. et al. (2016): Asynchronous combinatorial action of four regulatory factors activates Bcl11b for T cell commitment. In: *Nature immunology* 17 (8), S. 956–965. DOI: 10.1038/ni.3514.

Kumar, Vijay (2014): Innate lymphoid cells. New paradigm in immunology of inflammation. In: *Immunology letters* 157 (1-2), S. 23–37. DOI: 10.1016/j.imlet.2013.11.003.

Lai, C. Benjamin; Mager, Dixie L. (2012): Role of runt-related transcription factor 3 (RUNX3) in transcription regulation of natural cytotoxicity receptor 1 (NCR1/NKp46), an activating natural killer (NK) cell receptor. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (10), S. 7324–7334. DOI: 10.1074/jbc.M111.306936.

Lanier, L. L.; Bakker, A. B. (2000): The ITAM-bearing transmembrane adaptor DAP12 in lymphoid and myeloid cell function. In: *Immunology today* 21 (12), S. 611–614.

Lanier, L. L.; Corliss, B.; Wu, J.; Phillips, J. H. (1998): Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors. In: *Immunity* 8 (6), S. 693–701.

Lanier, L. L.; Yu, G.; Phillips, J. H. (1989): Co-association of CD3 zeta with a receptor (CD16) for IgG Fc on human natural killer cells. In: *Nature* 342 (6251), S. 803–805. DOI: 10.1038/342803a0.

- Lee, C. K.; Rao, D. T.; Gertner, R.; Gimeno, R.; Frey, A. B.; Levy, D. E. (2000): Distinct requirements for IFNs and STAT1 in NK cell function. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 165 (7), S. 3571–3577. DOI: 10.4049/jimmunol.165.7.3571.
- Leone, Patrizia; Shin, Eui-Cheol; Perosa, Federico; Vacca, Angelo; Dammacco, Franco; Racanelli, Vito (2013): MHC class I antigen processing and presenting machinery. Organization, function, and defects in tumor cells. In: *Journal of the National Cancer Institute* 105 (16), S. 1172–1187. DOI: 10.1093/jnci/djt184.
- Levine, Bruce L.; Miskin, James; Wonnacott, Keith; Keir, Christopher (2017): Global Manufacturing of CAR T Cell Therapy. In: *Molecular therapy. Methods & clinical development* 4, S. 92–101. DOI: 10.1016/j.omtm.2016.12.006.
- Leyfman, Yan (2018): Chimeric antigen receptors. Unleashing a new age of anti-cancer therapy. In: *Cancer cell international* 18, S. 182. DOI: 10.1186/s12935-018-0685-x.
- Li, Long; Leid, Mark; Rothenberg, Ellen V. (2010): An early T cell lineage commitment checkpoint dependent on the transcription factor Bcl11b. In: *Science (New York, N.Y.)* 329 (5987), S. 89–93. DOI: 10.1126/science.1188989.
- Li, Long; Zhang, Jingli A.; Dose, Marei; Kueh, Hao Yuan; Mosadeghi, Ruzbeh; Gounari, Fotini; Rothenberg, Ellen V. (2013): A far downstream enhancer for murine Bcl11b controls its T-cell specific expression. In: *Blood* 122 (6), S. 902–911. DOI: 10.1182/blood-2012-08-447839.
- Li, Peng (2010): Reprogramming of T Cells to Natural Killer-Like Cells upon BCL11B Deletion. Dissertation. University of Cambridge, Queens' College. The Wellcome Trust Sanger Institut.
- Liu, Yansheng; Beyer, Andreas; Aebersold, Ruedi (2016): On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. In: *Cell* 165 (3), S. 535–550. DOI: 10.1016/j.cell.2016.03.014.
- Ljunggren, H. G.; Karre, K. (1990): In search of the 'missing self'. MHC molecules and NK cell recognition. In: *Immunology today* 11 (7), S. 237–244.
- Löffler, Georg (2008): Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie. 9. Aufl. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.

Longabaugh, William J. R.; Zeng, Weihua; Zhang, Jingli A.; Hosokawa, Hiroyuki; Jansen, Camden S.; Li, Long et al. (2017): Bcl11b and combinatorial resolution of cell fate in the T-cell gene regulatory network. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (23), S. 5800–5807. DOI: 10.1073/pnas.1610617114.

Lopez-Verges, Sandra; Milush, Jeffrey M.; Schwartz, Brian S.; Pando, Marcelo J.; Jarjoura, Jessica; York, Vanessa A. et al. (2011): Expansion of a unique CD57(+)NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (36), S. 14725–14732. DOI: 10.1073/pnas.1110900108.

Lorentsen, Kyle J.; Cho, Jonathan J.; Luo, Xiaoping; Zuniga, Ashley N.; Urban, Joseph F., JR; Zhou, Liang et al. (2018): Publisher Correction. Bcl11b is essential for licensing Th2 differentiation during helminth infection and allergic asthma. In: *Nature communications* 9 (1), S. 2901. DOI: 10.1038/s41467-018-05360-9.

Lu, B.; Finn, O. J. (2008): T-cell death and cancer immune tolerance. In: *Cell death and differentiation* 15 (1), S. 70–79. DOI: 10.1038/sj.cdd.4402274.

Lu, Rong; Markowitz, Florian; Unwin, Richard D.; Leek, Jeffrey T.; Airoidi, Edoardo M.; MacArthur, Ben D. et al. (2009): Systems-level dynamic analyses of fate change in murine embryonic stem cells. In: *Nature* 462 (7271), S. 358–362. DOI: 10.1038/nature08575.

Lundequist, Anders; Calounova, Gabriela; Wensman, Helena; Ronnberg, Elin; Pejler, Gunnar (2011): Differential regulation of Nr4a subfamily nuclear receptors following mast cell activation. In: *Molecular immunology* 48 (15-16), S. 1753–1761. DOI: 10.1016/j.molimm.2011.04.017.

Ma, Averil; Koka, Rima; Burkett, Patrick (2006): Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. In: *Annual review of immunology* 24, S. 657–679. DOI: 10.1146/annurev.immunol.24.021605.090727.

Mace, Emily M.; Bigley, Venetia; Gunesch, Justin T.; Chinn, Ivan K.; Angelo, Laura S.; Care, Matthew A. et al. (2017): Biallelic mutations in IRF8 impair human NK cell maturation and function. In: *The Journal of clinical investigation* 127 (1), S. 306–320. DOI: 10.1172/JCI86276.

Mackensen, A.; Ferradini, L.; Carcelain, G.; Triebel, F.; Faure, F.; Viel, S.; Hercend, T. (1993): Evidence for in situ amplification of cytotoxic T-lymphocytes with antitumor

activity in a human regressive melanoma. In: *Cancer research* 53 (15), S. 3569–3573.

Makwana, Nandini; Foley, Bree; Fernandez, Sonia; Lee, Silvia; Irish, Ashley; Pircher, Hanspeter; Price, Patricia (2017): CMV drives the expansion of highly functional memory T cells expressing NK-cell receptors in renal transplant recipients. In: *European journal of immunology*. DOI: 10.1002/eji.201747018.

Mami-Chouaib, Fathia; Echchakir, Hamid; Dorothee, Guillaume; Vergnon, Isabelle; Chouaib, Salem (2002): Antitumor cytotoxic T-lymphocyte response in human lung carcinoma. Identification of a tumor-associated antigen. In: *Immunological reviews* 188, S. 114–121.

Marban, Celine; Suzanne, Stella; Dequiedt, Franck; Walque, Stephane de; Redel, Laetitia; van Lint, Carine et al. (2007): Recruitment of chromatin-modifying enzymes by CTIP2 promotes HIV-1 transcriptional silencing. In: *The EMBO journal* 26 (2), S. 412–423. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601516.

Masuda, M.; van den Roos, D. (1993): Association of all three types of Fc gamma R (CD64, CD32, and CD16) with a gamma-chain homodimer in cultured human monocytes. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 151 (12), S. 7188–7195.

Matsumoto, Y.; Kosugi, S.; Shinbo, T.; Chou, D.; Ohashi, M.; Wakabayashi, Y. et al. (1998): Allelic loss analysis of gamma-ray-induced mouse thymic lymphomas. Two candidate tumor suppressor gene loci on chromosomes 12 and 16. In: *Oncogene* 16 (21), S. 2747–2754. DOI: 10.1038/sj.onc.1201810.

Maude, S. L.; Teachey D. T.; Rheingold S. R. (2017): Sustained remissions with CD19-specific chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells in children with relapsed/refractory ALL. In: *Journal of Clinical Oncology* 34 (15), S. 3011. DOI: 10.1200/JCO.2016.34.15\_suppl.3011.

Maude, Shannon L.; Frey, Noelle; Shaw, Pamela A.; Aplenc, Richard; Barrett, David M.; Bunin, Nancy J. et al. (2014): Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. In: *The New England journal of medicine* 371 (16), S. 1507–1517. DOI: 10.1056/NEJMoa1407222.

McMahon, C. W.; Raulet, D. H. (2001): Expression and function of NK cell receptors in CD8+ T cells. In: *Current opinion in immunology* 13 (4), S. 465–470.

- McQueen, Karina L.; Parham, Peter (2002): Variable receptors controlling activation and inhibition of NK cells. In: *Current opinion in immunology* 14 (5), S. 615–621.
- Melero, Ignacio; Rouzaut, Ana; Motz, Greg T.; Coukos, George (2014): T-cell and NK-cell infiltration into solid tumors. A key limiting factor for efficacious cancer immunotherapy. In: *Cancer discovery* 4 (5), S. 522–526. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-13-0985.
- Mi, Huaiyu; Muruganujan, Anushya; Ebert, Dustin; Huang, Xiaosong; Thomas, Paul D. (2019): PANTHER version 14. More genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools. In: *Nucleic acids research* 47 (D1), D419–D426. DOI: 10.1093/nar/gky1038.
- Miller, Jeffrey S.; Soignier, Yvette; Panoskaltsis-Mortari, Angela; McNearney, Sarah A.; Yun, Gong H.; Fautsch, Susan K. et al. (2005): Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. In: *Blood* 105 (8), S. 3051–3057. DOI: 10.1182/blood-2004-07-2974.
- Mirandola, Prisco; Ponti, Cristina; Gobbi, Giuliana; Sponzilli, Ivonne; Vaccarezza, Mauro; Cocco, Lucio et al. (2004): Activated human NK and CD8+ T cells express both TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptors but are resistant to TRAIL-mediated cytotoxicity. In: *Blood* 104 (8), S. 2418–2424. DOI: 10.1182/blood-2004-04-1294.
- Miyagawa, Fumi; Zhang, Hong; Terunuma, Atshushi; Ozato, Keiko; Tagaya, Yutaka; Katz, Stephen I. (2012): Interferon regulatory factor 8 integrates T-cell receptor and cytokine-signaling pathways and drives effector differentiation of CD8 T cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (30), S. 12123–12128. DOI: 10.1073/pnas.1201453109.
- Mizoguchi, H.; O'Shea, J. J.; Longo, D. L.; Loeffler, C. M.; McVicar, D. W.; Ochoa, A. C. (1992): Alterations in signal transduction molecules in T lymphocytes from tumor-bearing mice. In: *Science (New York, N.Y.)* 258 (5089), S. 1795–1798.
- Monaco, Gianni; Lee, Bernett; Xu, Weili; Mustafah, Seri; Hwang, You Yi; Carré, Christophe et al. (2019): RNA-Seq Signatures Normalized by mRNA Abundance Allow Absolute Deconvolution of Human Immune Cell Types. In: *Cell reports* 26 (6), 1627-1640.e7. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.01.041.
- Morton, H. C.; Herik-Oudijk, I. E.; Vossebeld, P.; Snijders, A.; Verhoeven, A. J.; Capel, P. J.; van de Winkel, J. G. (1995): Functional association between the human



myeloid immunoglobulin A Fc receptor (CD89) and FcR gamma chain. Molecular basis for CD89/FcR gamma chain association. In: *The Journal of biological chemistry* 270 (50), S. 29781–29787.

Mullbacher, Arno; Lobigs, Mario; Hla, Ron Tha; Tran, Thao; Stehle, Thomas; Simon, Markus M. (2002): Antigen-dependent release of IFN-gamma by cytotoxic T cells up-regulates Fas on target cells and facilitates exocytosis-independent specific target cell lysis. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 169 (1), S. 145–150.

Murphy, W. J.; Kumar, V.; Bennett, M. (1987): Acute rejection of murine bone marrow allografts by natural killer cells and T cells. Differences in kinetics and target antigens recognized. In: *The Journal of experimental medicine* 166 (5), S. 1499–1509.

Nagamachi, Akiko; Yamasaki, Norimasa; Miyazaki, Kazuko; Oda, Hideaki; Miyazaki, Masaki; Honda, Zen-Ichiro et al. (2009): Haploinsufficiency and acquired loss of Bcl11b and H2AX induces blast crisis of chronic myelogenous leukemia in a transgenic mouse model. In: *Cancer science* 100 (7), S. 1219–1226. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2009.01172.x.

Nagy, A. (2000): Cre recombinase. The universal reagent for genome tailoring. In: *Genesis (New York, N.Y. : 2000)* 26 (2), S. 99–109.

Ngoenkam, Jatuporn; Schamel, Wolfgang W.; Pongcharoen, Sutatip (2018): Selected signalling proteins recruited to the T-cell receptor-CD3 complex. In: *Immunology* 153 (1), S. 42–50. DOI: 10.1111/imm.12809.

Nimmerjahn, Falk; Ravetch, Jeffrey V. (2008): Fc gamma receptors as regulators of immune responses. In: *Nature reviews. Immunology* 8 (1), S. 34–47. DOI: 10.1038/nri2206.

Novelli, F.; Bernabei, P.; Ozmen, L.; Rigamonti, L.; Allione, A.; Pestka, S. et al. (1996): Switching on of the proliferation or apoptosis of activated human T lymphocytes by IFN-gamma is correlated with the differential expression of the alpha- and beta-chains of its receptor. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 157 (5), S. 1935–1943.

Novelli, F.; D'Elia, M. M.; Bernabei, P.; Ozmen, L.; Rigamonti, L.; Almerigogna, F. et al. (1997): Expression and role in apoptosis of the alpha- and beta-chains of the IFN-gamma receptor on human Th1 and Th2 clones. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 159 (1), S. 206–213.

- Obata, Miki; Kominami, Ryo; Mishima, Yukio (2012): BCL11B tumor suppressor inhibits HDM2 expression in a p53-dependent manner. In: *Cellular signalling* 24 (5), S. 1047–1052. DOI: 10.1016/j.cellsig.2011.12.026.
- Oh, Sangkon; Perera, Liyanage P.; Terabe, Masaki; Ni, Ling; Waldmann, Thomas A.; Berzofsky, Jay A. (2008): IL-15 as a mediator of CD4+ help for CD8+ T cell longevity and avoidance of TRAIL-mediated apoptosis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (13), S. 5201–5206. DOI: 10.1073/pnas.0801003105.
- O'Leary, Jacqueline G.; Goodarzi, Mahmoud; Drayton, Danielle L.; Andrian, Ulrich H. von (2006): T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. In: *Nature immunology* 7 (5), S. 507–516. DOI: 10.1038/ni1332.
- Orbelyan, Gerasim A.; Tang, Fangming; Sally, Benjamin; Solus, Jason; Meresse, Bertrand; Ciszewski, Cezary et al. (2014): Human NKG2E is expressed and forms an intracytoplasmic complex with CD94 and DAP12. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 193 (2), S. 610–616. DOI: 10.4049/jimmunol.1400556.
- Oshiro, Aya; Tagawa, Hiroyuki; Ohshima, Koichi; Karube, Kennosuke; Uike, Naokuni; Tashiro, Yukie et al. (2006): Identification of subtype-specific genomic alterations in aggressive adult T-cell leukemia/lymphoma. In: *Blood* 107 (11), S. 4500–4507. DOI: 10.1182/blood-2005-09-3801.
- Pahl, Jens; Cerwenka, Adelheid (2017): Tricking the balance: NK cells in anti-cancer immunity. In: *Immunobiology* 222 (1), S. 11–20. DOI: 10.1016/j.imbio.2015.07.012.
- Parkhurst, Maria R.; Riley, John P.; Dudley, Mark E.; Rosenberg, Steven A. (2011): Adoptive transfer of autologous natural killer cells leads to high levels of circulating natural killer cells but does not mediate tumor regression. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17 (19), S. 6287–6297. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1347.
- Paul, Sourav; Lal, Girdhari (2017): The Molecular Mechanism of Natural Killer Cells Function and Its Importance in Cancer Immunotherapy. In: *Frontiers in immunology* 8, S. 1124. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01124.
- Pegram, Hollie J.; Andrews, Daniel M.; Smyth, Mark J.; Darcy, Phillip K.; Kershaw, Michael H. (2011): Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. In: *Immunology and cell biology* 89 (2), S. 216–224. DOI: 10.1038/icb.2010.78.

- Penn, I.; Starzl, T. E. (1972): Proceedings. The effect of immunosuppression on cancer. In: *Proceedings. National Cancer Conference* 7, S. 425–436.
- Pessino, A.; Sivori, S.; Bottino, C.; Malaspina, A.; Morelli, L.; Moretta, L. et al. (1998): Molecular cloning of NKp46. A novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. In: *The Journal of experimental medicine* 188 (5), S. 953–960.
- Platanias, Leonidas C. (2005): Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. In: *Nature reviews. Immunology* 5 (5), S. 375–386. DOI: 10.1038/nri1604.
- Plitz, Thomas (1999): Erzeugung genetisch veränderter Mauslinien zum Studium von Genfunktionen in vivo. Analyse mutanter Formen des Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptors 1 in einem transgenen Mausmodell, sowie CRE-loxP-vermittelte konstitutive und konditionale Inaktivierung des Kinectin-Gens. München: Herbert Utz Verlag.
- Podack, E. R.; Young, J. D.; Cohn, Z. A. (1985): Isolation and biochemical and functional characterization of perforin 1 from cytolytic T-cell granules. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 (24), S. 8629–8633.
- Poggi, Alessandro; Massaro, Anna-Maria; Negrini, Simone; Contini, Paola; Zocchi, Maria Raffaella (2005): Tumor-induced apoptosis of human IL-2-activated NK cells. Role of natural cytotoxicity receptors. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 174 (5), S. 2653–2660.
- Przybylski, G. K.; Dik, W. A.; Wanzec, J.; Grabarczyk, P.; Majunke, S.; Martin-Subero, J. I. et al. (2005): Disruption of the BCL11B gene through inv(14)(q11.2q32.31) results in the expression of BCL11B-TRDC fusion transcripts and is associated with the absence of wild-type BCL11B transcripts in T-ALL. In: *Leukemia* 19 (2), S. 201–208. DOI: 10.1038/sj.leu.2403619.
- Pure, E.; Cuff, C. A. (2001): A crucial role for CD44 in inflammation. In: *Trends in molecular medicine* 7 (5), S. 213–221. DOI: 10.1016/s1471-4914(01)01963-3.
- Putz, Eva Maria; Majoros, Andrea; Gotthardt, Dagmar; Prchal-Murphy, Michaela; Zebedin-Brandl, Eva Maria; Fux, Daniela Alexandra et al. (2016): Novel non-canonical role of STAT1 in Natural Killer cell cytotoxicity. In: *Oncoimmunology* 5 (9), e1186314. DOI: 10.1080/2162402X.2016.1186314.

Rabacal, Whitney; Pabbisetty, Sudheer K.; Hoek, Kristen L.; Cendron, Delphine; Guo, Yin; Maseda, Damian; Sebzda, Eric (2016): Transcription factor KLF2 regulates homeostatic NK cell proliferation and survival. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (19), S. 5370–5375. DOI: 10.1073/pnas.1521491113.

Rankin, Lucille C.; Groom, Joanna R.; Chopin, Michael; Herold, Marco J.; Walker, Jennifer A.; Mielke, Lisa A. et al. (2013): The transcription factor T-bet is essential for the development of NKp46+ innate lymphocytes via the Notch pathway. In: *Nature immunology* 14 (4), S. 389–395. DOI: 10.1038/ni.2545.

Ravetch, J. V.; Kinet, J. P. (1991): Fc receptors. In: *Annual review of immunology* 9, S. 457–492. DOI: 10.1146/annurev.iy.09.040191.002325.

Reynolds, C. W.; Bonyhadi, M.; Herberman, R. B.; Young, H. A.; Hedrick, S. M. (1985): Lack of gene rearrangement and mRNA expression of the beta chain of the T cell receptor in spontaneous rat large granular lymphocyte leukemia lines. In: *The Journal of experimental medicine* 161 (5), S. 1249–1254.

Rodewald, H. R.; Arulanandam, A. R.; Koyasu, S.; Reinherz, E. L. (1991): The high affinity Fc epsilon receptor gamma subunit (Fc epsilon RI gamma) facilitates T cell receptor expression and antigen/major histocompatibility complex-driven signaling in the absence of CD3 zeta and CD3 eta. In: *The Journal of biological chemistry* 266 (24), S. 15974–15978.

Romee, Rizwan; Rosario, Maximillian; Berrien-Elliott, Melissa M.; Wagner, Julia A.; Jewell, Brea A.; Schappe, Timothy et al. (2016): Cytokine-induced memory-like natural killer cells exhibit enhanced responses against myeloid leukemia. In: *Science translational medicine* 8 (357), 357ra123. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaf2341.

Rosenbauer, Frank; Owens, Bronwyn M.; Yu, Li; Tumang, Joseph R.; Steidl, Ulrich; Kutok, Jeffery L. et al. (2006): Lymphoid cell growth and transformation are suppressed by a key regulatory element of the gene encoding PU.1. In: *Nature genetics* 38 (1), S. 27–37. DOI: 10.1038/ng1679.

Rothenberg, Ellen V. (2011): T cell lineage commitment. Identity and renunciation. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 186 (12), S. 6649–6655. DOI: 10.4049/jimmunol.1003703.

Rutkowski, Andrzej J.; Erhard, Florian; L'Hernault, Anne; Bonfert, Thomas; Schilhabel, Markus; Crump, Colin et al. (2015): Widespread disruption of host

transcription termination in HSV-1 infection. In: *Nature communications* 6, S. 7126. DOI: 10.1038/ncomms8126.

Sakamoto, Naoyuki; Ishikawa, Takeshi; Kokura, Satoshi; Okayama, Tetsuya; Oka, Kaname; Ideno, Mitsuko et al. (2015): Phase I clinical trial of autologous NK cell therapy using novel expansion method in patients with advanced digestive cancer. In: *Journal of translational medicine* 13, S. 277. DOI: 10.1186/s12967-015-0632-8.

Sakatsume, M.; Finbloom, D. S. (1996): Modulation of the expression of the IFN-gamma receptor beta-chain controls responsiveness to IFN-gamma in human peripheral blood T cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 156 (11), S. 4160–4166.

Sallusto, F.; Lenig, D.; Forster, R.; Lipp, M.; Lanzavecchia, A. (1999): Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. In: *Nature* 401 (6754), S. 708–712. DOI: 10.1038/44385.

Sato, Takehito; Ohno, Shin-ichiro; Hayashi, Takumi; Sato, Chiharu; Kohu, Kazuyoshi; Satake, Masanobu; Habu, Sonoko (2005): Dual functions of Runx proteins for reactivating CD8 and silencing CD4 at the commitment process into CD8 thymocytes. In: *Immunity* 22 (3), S. 317–328. DOI: 10.1016/j.immuni.2005.01.012.

Satterwhite, E.; Sonoki, T.; Willis, T. G.; Harder, L.; Nowak, R.; Arriola, E. L. et al. (2001): The BCL11 gene family. Involvement of BCL11A in lymphoid malignancies. In: *Blood* 98 (12), S. 3413–3420.

Schmitt, Thomas M.; Ciofani, Maria; Petrie, Howard T.; Zuniga-Pflucker, Juan Carlos (2004): Maintenance of T cell specification and differentiation requires recurrent notch receptor-ligand interactions. In: *The Journal of experimental medicine* 200 (4), S. 469–479. DOI: 10.1084/jem.20040394.

Senawong, Thanaset; Peterson, Valerie J.; Avram, Dorina; Shepherd, David M.; Frye, Roy A.; Minucci, Saverio; Leid, Mark (2003): Involvement of the histone deacetylase SIRT1 in chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF)-interacting protein 2-mediated transcriptional repression. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (44), S. 43041–43050. DOI: 10.1074/jbc.M307477200.

Setoguchi, Ruka; Tachibana, Masashi; Naoe, Yoshinori; Muroi, Sawako; Akiyama, Kaori; Tezuka, Chieko et al. (2008): Repression of the transcription factor Th-POK by Runx complexes in cytotoxic T cell development. In: *Science (New York, N.Y.)* 319 (5864), S. 822–825. DOI: 10.1126/science.1151844.

Shearer, William T.; Rosenblatt, Howard M.; Gelman, Rebecca S.; Oyomopito, Rebecca; Plaeger, Susan; Stiehm, E. Richard et al. (2003): Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age. The Pediatric AIDS Clinical Trials Group P1009 study. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 112 (5), S. 973–980. DOI: 10.1016/j.jaci.2003.07.003.

Sheppard, Sam; Schuster, Iona S.; Andoniou, Christopher E.; Cocita, Clement; Adejumo, Thomas; Kung, Sam K. P. et al. (2018): The Murine Natural Cytotoxic Receptor NKp46/NCR1 Controls TRAIL Protein Expression in NK Cells and ILC1s. In: *Cell reports* 22 (13), S. 3385–3392. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.03.023.

Shin, Dong-Mi; Lee, Chang-Hoon; Morse, Herbert C. 3rd (2011): IRF8 governs expression of genes involved in innate and adaptive immunity in human and mouse germinal center B cells. In: *PloS one* 6 (11), e27384. DOI: 10.1371/journal.pone.0027384.

Siddiqui, Waseem Ahmad; Ahad, Amjid; Ahsan, Haseeb (2015): The mystery of BCL2 family. Bcl-2 proteins and apoptosis: an update. In: *Archives of toxicology* 89 (3), S. 289–317. DOI: 10.1007/s00204-014-1448-7.

Simon, R.; Baumann, L.; Fischer, J.; Seigfried, F. A.; Bruyckere, E. de; Liu, P. et al. (2016): Structure-function integrity of the adult hippocampus depends on the transcription factor Bcl11b/Ctip2. In: *Genes, brain, and behavior* 15 (4), S. 405–419. DOI: 10.1111/gbb.12287.

Simon, Ruth; Brylka, Heike; Schwegler, Herbert; Venkataramanappa, Sathish; Andratschke, Jacqueline; Wiegrefe, Christoph et al. (2012): A dual function of Bcl11b/Ctip2 in hippocampal neurogenesis. In: *The EMBO journal* 31 (13), S. 2922–2936. DOI: 10.1038/emboj.2012.142.

Simon, Ruth; Wiegrefe, Christoph; Britsch, Stefan (2020): Bcl11 Transcription Factors Regulate Cortical Development and Function. In: *Frontiers in molecular neuroscience* 13, S. 51. DOI: 10.3389/fnmol.2020.00051.

Sivori, S.; Pende, D.; Bottino, C.; Marcenaro, E.; Pessino, A.; Biassoni, R. et al. (1999): NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. In: *European journal of immunology* 29 (5), S. 1656–1666. DOI: 10.1002/(SICI)1521-4141(199905)29:05<1656::AID-IMMU1656>3.0.CO;2-1.

Sivori, S.; Vitale, M.; Morelli, L.; Sanseverino, L.; Augugliaro, R.; Bottino, C. et al. (1997): p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. In: *The Journal of experimental medicine* 186 (7), S. 1129–1136.

Sjolin, Hanna; Tomasello, Elena; Mousavi-Jazi, Mehrdad; Bartolazzi, Armando; Karre, Klas; Vivier, Eric; Cerboni, Cristina (2002): Pivotal role of KARAP/DAP12 adaptor molecule in the natural killer cell-mediated resistance to murine cytomegalovirus infection. In: *The Journal of experimental medicine* 195 (7), S. 825–834.

Smith, K. M.; Wu, J.; Bakker, A. B.; Phillips, J. H.; Lanier, L. L. (1998): Ly-49D and Ly-49H associate with mouse DAP12 and form activating receptors. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 161 (1), S. 7–10.

Smyth, M. J.; Crowe, N. Y.; Godfrey, D. I. (2001): NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. In: *International immunology* 13 (4), S. 459–463.

Smyth, M. J.; Thia, K. Y.; Street, S. E.; MacGregor, D.; Godfrey, D. I.; Trapani, J. A. (2000): Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. In: *The Journal of experimental medicine* 192 (5), S. 755–760.

Sternberg, N.; Hamilton, D. (1981): Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. In: *Journal of molecular biology* 150 (4), S. 467–486.

Stolc, Viktor; Gauhar, Zareen; Mason, Christopher; Halasz, Gabor; van Batenburg, Marinus F.; Rifkin, Scott A. et al. (2004): A gene expression map for the euchromatic genome of *Drosophila melanogaster*. In: *Science (New York, N.Y.)* 306 (5696), S. 655–660. DOI: 10.1126/science.1101312.

Street, S. E.; Cretney, E.; Smyth, M. J. (2001): Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. In: *Blood* 97 (1), S. 192–197.

Strehl, S.; König, M.; Spath, K.; Pisecker, M.; Mann, G. (2007): Juxtaposition of the BCL11B Gene to a Novel Region at 17q by a t(14;17)(q32;Q21) in Childhood T-Cell Lymphoblastic Lymphoma. In: *Blood*, 110(11), 4130 110 (11), S. 4130.

Strom, T. B.; Tilney, N. L.; Carpenter, C. B.; Busch, G. J. (1975): Identity and cytotoxic capacity of cells infiltrating renal allografts. In: *The New England journal of medicine* 292 (24), S. 1257–1263. DOI: 10.1056/NEJM197506122922402.

Sun, Joseph C.; Beilke, Joshua N.; Lanier, Lewis L. (2009a): Adaptive immune features of natural killer cells. In: *Nature* 457 (7229), S. 557–561. DOI: 10.1038/nature07665.

Sun, Joseph C.; Beilke, Joshua N.; Lanier, Lewis L. (2010): Immune memory redefined. Characterizing the longevity of natural killer cells. In: *Immunological reviews* 236, S. 83–94. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2010.00900.x.

Sun, Joseph C.; Lanier, Lewis L. (2008): Tolerance of NK cells encountering their viral ligand during development. In: *The Journal of experimental medicine* 205 (8), S. 1819–1828. DOI: 10.1084/jem.20072448.

Sun, Joseph C.; Lanier, Lewis L. (2011): NK cell development, homeostasis and function: Parallels with CD8+ T cells. In: *Nature reviews. Immunology* 11 (10), S. 645–657. DOI: 10.1038/nri3044.

Sun, Joseph C.; Ma, Averil; Lanier, Lewis L. (2009b): Cutting edge. IL-15-independent NK cell response to mouse cytomegalovirus infection. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 183 (5), S. 2911–2914. DOI: 10.4049/jimmunol.0901872.

Takahama, Yousuke (2006): Journey through the thymus. Stromal guides for T-cell development and selection. In: *Nature reviews. Immunology* 6 (2), S. 127–135. DOI: 10.1038/nri1781.

Takeda, K.; Tsutsui, H.; Yoshimoto, T.; Adachi, O.; Yoshida, N.; Kishimoto, T. et al. (1998): Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice. In: *Immunity* 8 (3), S. 383–390.

Takeda, Kazuyoshi; Smyth, Mark J.; Cretney, Erika; Hayakawa, Yoshihiro; Kayagaki, Nobuhiko; Yagita, Hideo; Okumura, Ko (2002): Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. In: *The Journal of experimental medicine* 195 (2), S. 161–169.

Tamura, Tomohiko; Ozato, Keiko (2002): ICSBP/IRF-8. Its regulatory roles in the development of myeloid cells. In: *Journal of interferon & cytokine research : the*



*official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 22 (1), S. 145–152. DOI: 10.1089/107999002753452755.

The Gene Ontology Consortium (2021): The Gene Ontology resource. Enriching a GOld mine. In: *Nucleic acids research* 49 (D1), D325-D334. DOI: 10.1093/nar/gkaa1113.

Ting, A. T.; Karnitz, L. M.; Schoon, R. A.; Abraham, R. T.; Leibson, P. J. (1992): Fc gamma receptor activation induces the tyrosine phosphorylation of both phospholipase C (PLC)-gamma 1 and PLC-gamma 2 in natural killer cells. In: *The Journal of experimental medicine* 176 (6), S. 1751–1755. DOI: 10.1084/jem.176.6.1751.

Ting, C. N.; Olson, M. C.; Barton, K. P.; Leiden, J. M. (1996): Transcription factor GATA-3 is required for development of the T-cell lineage. In: *Nature* 384 (6608), S. 474–478. DOI: 10.1038/384474a0.

Tomasello, E.; Desmoulins, P. O.; Chemin, K.; Guia, S.; Cremer, H.; Ortaldo, J. et al. (2000): Combined natural killer cell and dendritic cell functional deficiency in KARAP/DAP12 loss-of-function mutant mice. In: *Immunity* 13 (3), S. 355–364.

Tomasello, Elena; Vivier, Eric (2005): KARAP/DAP12/TYROBP. Three names and a multiplicity of biological functions. In: *European journal of immunology* 35 (6), S. 1670–1677. DOI: 10.1002/eji.200425932.

Tomescu, Costin; Mavilio, Domenico; Montaner, Luis J. (2015): Lysis of HIV-1-infected autologous CD4+ primary T cells by interferon-alpha-activated NK cells requires NKp46 and NKG2D. In: *AIDS (London, England)* 29 (14), S. 1767–1773. DOI: 10.1097/QAD.0000000000000777.

Tomita, K.; Hattori, M.; Nakamura, E.; Nakanishi, S.; Minato, N.; Kageyama, R. (1999): The bHLH gene Hes1 is essential for expansion of early T cell precursors. In: *Genes & development* 13 (9), S. 1203–1210.

Topark-Ngarm, Acharawan; Golonzhka, Olga; Peterson, Valerie J.; Barrett, Brian, JR; Martinez, Brigetta; Crofoot, Kristi et al. (2006): CTIP2 associates with the NuRD complex on the promoter of p57KIP2, a newly identified CTIP2 target gene. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (43), S. 32272–32283. DOI: 10.1074/jbc.M602776200.

- Trambas, Christina M.; Griffiths, Gillian M. (2003): Delivering the kiss of death. In: *Nature immunology* 4 (5), S. 399–403. DOI: 10.1038/ni0503-399.
- Turchinovich, Gleb; Ganter, Stefan; Barenwaldt, Anne; Finke, Daniela (2018): NKp46 Calibrates Tumoricidal Potential of Type 1 Innate Lymphocytes by Regulating TRAIL Expression. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 200 (11), S. 3762–3768. DOI: 10.4049/jimmunol.1701333.
- Uddin, Mohammad Nizam; Sultana, Dil Afroz; Lorentsen, Kyle J.; Cho, Jonathan J.; Kirst, Mariana E.; Brantly, Mark L. et al. (2016): Transcription factor Bcl11b sustains iNKT1 and iNKT2 cell programs, restricts iNKT17 cell program, and governs iNKT cell survival. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (27), S. 7608–7613. DOI: 10.1073/pnas.1521846113.
- Uhlén, Mathias; Fagerberg, Linn; Hallström, Björn M.; Lindskog, Cecilia; Oksvold, Per; Mardinoglu, Adil et al. (2015): Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. In: *Science (New York, N.Y.)* 347 (6220), S. 1260419. DOI: 10.1126/science.1260419.
- Veillette, Andre; Dong, Zhongjun; Latour, Sylvain (2007): Consequence of the SLAMFAP signaling pathway in innate-like and conventional lymphocytes. In: *Immunity* 27 (5), S. 698–710. DOI: 10.1016/j.immuni.2007.11.005.
- Vilborg, Anna; Passarelli, Maria C.; Yario, Therese A.; Tycowski, Kazimierz T.; Steitz, Joan A. (2015): Widespread Inducible Transcription Downstream of Human Genes. In: *Molecular cell* 59 (3), S. 449–461. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.06.016.
- Vilborg, Anna; Sabath, Niv; Wiesel, Yuval; Nathans, Jenny; Levy-Adam, Flonia; Yario, Therese A. et al. (2017): Comparative analysis reveals genomic features of stress-induced transcriptional readthrough. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (40), E8362-E8371. DOI: 10.1073/pnas.1711120114.
- Vilborg, Anna; Steitz, Joan A. (2017): Readthrough transcription. How are DoGs made and what do they do? In: *RNA biology* 14 (5), S. 632–636. DOI: 10.1080/15476286.2016.1149680.
- Vitale, M.; Bottino, C.; Sivori, S.; Sanseverino, L.; Castriconi, R.; Marcenaro, E. et al. (1998): NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-

- restricted tumor cell lysis. In: *The Journal of experimental medicine* 187 (12), S. 2065–2072.
- Vivier, E.; Rochet, N.; Kochan, J. P.; Presky, D. H.; Schlossman, S. F.; Anderson, P. (1991): Structural similarity between Fc receptors and T cell receptors. Expression of the gamma-subunit of Fc epsilon RI in human T cells, natural killer cells and thymocytes. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 147 (12), S. 4263–4270.
- Vogel, B.; Tennert, K.; Full, F.; Ensser, A. (2014): Efficient generation of human natural killer cell lines by viral transformation. In: *Leukemia* 28 (1), S. 192–195. DOI: 10.1038/leu.2013.188.
- Vogel, Christine; Marcotte, Edward M. (2012): Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. In: *Nature reviews. Genetics* 13 (4), S. 227–232. DOI: 10.1038/nrg3185.
- Vosshenrich, Christian A. J.; Garcia-Ojeda, Marcos E.; Samson-Villeger, Sandrine I.; Pasqualetto, Valerie; Enault, Laurence; Richard-Le Goff, Odile et al. (2006): A thymic pathway of mouse natural killer cell development characterized by expression of GATA-3 and CD127. In: *Nature immunology* 7 (11), S. 1217–1224. DOI: 10.1038/ni1395.
- Wakabayashi, Yuichi; Inoue, Jun; Takahashi, Yoshiaki; Matsuki, Atsushi; Kosugi-Okano, Hitomi; Shinbo, Toshimitsu et al. (2003a): Homozygous deletions and point mutations of the Rit1/Bcl11b gene in gamma-ray induced mouse thymic lymphomas. In: *Biochemical and biophysical research communications* 301 (2), S. 598–603.
- Wakabayashi, Yuichi; Watanabe, Hisami; Inoue, Jun; Takeda, Naoki; Sakata, Jun; Mishima, Yukio et al. (2003b): Bcl11b is required for differentiation and survival of alphabeta T lymphocytes. In: *Nature immunology* 4 (6), S. 533–539. DOI: 10.1038/ni927.
- Walker, Jennifer A.; Oliphant, Christopher J.; Englezakis, Alexandros; Yu, Yong; Clare, Simon; Rodewald, Hans-Reimer et al. (2015): Bcl11b is essential for group 2 innate lymphoid cell development. In: *The Journal of experimental medicine* 212 (6), S. 875–882. DOI: 10.1084/jem.20142224.
- Wang, Hongsheng; Morse, Herbert C. 3rd (2009): IRF8 regulates myeloid and B lymphoid lineage diversification. In: *Immunologic research* 43 (1-3), S. 109–117. DOI: 10.1007/s12026-008-8055-8.

Weber, Brittany Nicole; Chi, Anthony Wei-Shine; Chavez, Alejandro; Yashiro-Ohtani, Yumi; Yang, Qi; Shestova, Olga; Bhandoola, Avinash (2011): A critical role for TCF-1 in T-lineage specification and differentiation. In: *Nature* 476 (7358), S. 63–68. DOI: 10.1038/nature10279.

Wiesel, Yuval; Sabath, Niv; Shalgi, Reut (2018): DoGFinder. A software for the discovery and quantification of readthrough transcripts from RNA-seq. In: *BMC genomics* 19 (1), S. 597. DOI: 10.1186/s12864-018-4983-4.

Wittnebel, Sebastian; Da Rocha, Sylvie; Giron-Michel, Julien; Jalil, Abdelali; Opolon, Paule; Escudier, Bernard et al. (2007): Membrane-bound interleukin (IL)-15 on renal tumor cells rescues natural killer cells from IL-2 starvation-induced apoptosis. In: *Cancer research* 67 (12), S. 5594–5599. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4406.

Yokoyama, Wayne M.; Kim, Sungjin; French, Anthony R. (2004): The dynamic life of natural killer cells. In: *Annual review of immunology* 22, S. 405–429. DOI: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104711.

Yu, Yong; Wang, Cui; Clare, Simon; Wang, Juexuan; Lee, Song-Choon; Brandt, Cordelia et al. (2015): The transcription factor Bcl11b is specifically expressed in group 2 innate lymphoid cells and is essential for their development. In: *The Journal of experimental medicine* 212 (6), S. 865–874. DOI: 10.1084/jem.20142318.

Yui, Mary A.; Rothenberg, Ellen V. (2014): Developmental gene networks. A triathlon on the course to T cell identity. In: *Nature reviews. Immunology* 14 (8), S. 529–545. DOI: 10.1038/nri3702.

Zamai, L.; Ahmad, M.; Bennett, I. M.; Azzoni, L.; Alnemri, E. S.; Perussia, B. (1998): Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity. Differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. In: *The Journal of experimental medicine* 188 (12), S. 2375–2380. DOI: 10.1084/jem.188.12.2375.

Zha, Shan; Bassing, Craig H.; Sanda, Takaomi; Brush, James W.; Patel, Harin; Goff, Peter H. et al. (2010): ATM-deficient thymic lymphoma is associated with aberrant tcrd rearrangement and gene amplification. In: *The Journal of experimental medicine* 207 (7), S. 1369–1380. DOI: 10.1084/jem.20100285.

Zhang, D. H.; Cohn, L.; Ray, P.; Bottomly, K.; Ray, A. (1997): Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (34), S. 21597–21603.

Zhang, Ling-Juan; Vogel, Walter K.; Liu, Xiao; Topark-Ngarm, Acharawan; Arbogast, Brian L.; Maier, Claudia S. et al. (2012): Coordinated regulation of transcription factor Bcl11b activity in thymocytes by the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways and protein sumoylation. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (32), S. 26971–26988. DOI: 10.1074/jbc.M112.344176.

Zhang, Shuning; Rozell, Mike; Verma, Raj K.; Albu, Diana I.; Califano, Danielle; VanValkenburgh, Jeffrey et al. (2010): Antigen-specific clonal expansion and cytolytic effector function of CD8+ T lymphocytes depend on the transcription factor Bcl11b. In: *The Journal of experimental medicine* 207 (8), S. 1687–1699. DOI: 10.1084/jem.20092136.

Zhou, Fang (2009): Molecular mechanisms of IFN-gamma to up-regulate MHC class I antigen processing and presentation. In: *International reviews of immunology* 28 (3-4), S. 239–260. DOI: 10.1080/08830180902978120.

Zhu, Jinfang; Paul, William E. (2008): CD4 T cells. Fates, functions, and faults. In: *Blood* 112 (5), S. 1557–1569. DOI: 10.1182/blood-2008-05-078154.

Zlotoff, Daniel A.; Sambandam, Arivazhagan; Logan, Theodore D.; Bell, J. Jeremiah; Schwarz, Benjamin A.; Bhandoola, Avinash (2010): CCR7 and CCR9 together recruit hematopoietic progenitors to the adult thymus. In: *Blood* 115 (10), S. 1897–1905. DOI: 10.1182/blood-2009-08-237784.

## Anhang

**Tabelle 6: Liste von Genen mit verstärkter oder verminderter RNA-Expression in *Bcl11b*-Knockoutzellen**

Alphabetisch aufgelistet sind alle Gene, welche die in Kapitel 3.3.1 genannten Kriterien der vermehrten oder verminderten Expression erfüllen, dargestellt als Fold change von *Bcl11b*-Knockoutzellen (Cre +OHT) gegenüber den drei Kontrollgruppen (Cre -OHT, Wt -OHT und Wt +OHT) zu fünf verschiedenen Zeitpunkten. Die Daten stammen von einem Einzelversuch mit murinen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. RNA-Sequenzierung. Normierung mit Size Factor. Cre = die Cre-Rekombinase exprimierend; OHT = Hydroxytamoxifen; +OHT = Zugabe von OHT; -OHT = keine Zugabe von OHT.

Gen	Tag 1 nach OHT-Behandlung			Tag 4 nach OHT-Behandlung			Tag 7 nach OHT-Behandlung			Tag 11 nach OHT-Behandlung			Tag 14 nach OHT-Behandlung		
	Fold change Cre+ OHT vs			Fold change Cre+ OHT vs			Fold change Cre+ OHT vs			Fold change Cre+ OHT vs			Fold change Cre+ OHT vs		
	Cre - OHT	Wt - OHT	Wt +OHT	Cre - OHT	Wt - OHT	Wt +OHT	Cre - OHT	Wt - OHT	Wt +OHT	Cre - OHT	Wt - OHT	Wt +OHT	Cre - OHT	Wt - OHT	Wt +OHT
<b>5730508B09Rik</b>	-1.58	-1.58	1.00	-3.27	-3.53	-3.57	-2.30	-1.54	-1.39	-3.49	-5.08	-4.03	-5.62	-6.19	-6.79
<b>9330175E14Rik</b>	-1.22	-1.97	-1.90	-2.67	-2.15	-2.29	-2.52	-1.66	-1.49	-2.68	-3.60	-5.18	-2.62	-3.40	-4.13
<b>A930005H10Rik</b>	-1.26	-1.90	-1.93	-2.51	-2.45	-2.98	-2.43	-1.74	-1.28	-2.58	-3.11	-3.60	-2.31	-3.67	-3.75
<b>Al836003</b>	2.98	2.86	2.19	5.40	5.10	3.49	24.84	33.76	42.72	64.96	38.16	59.71	68.87	77.16	42.68
<b>Alox5</b>	1.27	1.17	1.40	2.04	1.99	2.13	6.41	9.52	9.61	5.69	6.39	6.44	7.61	6.35	7.53
<b>Art2b</b>	-2.86	-3.49	-2.93	-3.16	-3.20	-3.05	-2.76	-1.99	-1.96	-11.94	-14.87	-15.33	-5.18	-9.46	-10.38
<b>Asb2</b>	1.93	1.59	1.46	3.14	3.58	2.84	2.86	6.84	4.24	4.02	3.51	3.08	5.90	4.15	4.39
<b>Avil</b>	1.56	1.70	1.51	4.15	4.20	2.86	11.37	34.99	29.83	19.62	18.43	21.14	21.82	21.16	18.50
<b>Bcl2a1a</b>	1.07	1.09	-1.13	2.42	2.22	1.99	2.09	5.01	3.44	3.83	5.01	4.77	4.39	3.59	4.27
<b>Bcl2a1d</b>	-1.10	-1.12	-1.19	2.02	2.63	2.09	2.45	5.50	4.09	3.63	3.57	3.96	4.31	3.53	4.65
<b>Bend4</b>	-1.42	-1.65	-1.42	-2.85	-2.40	-3.25	-3.08	-1.01	-1.72	-2.88	-3.48	-3.77	-2.95	-3.88	-4.21
<b>Ccl5</b>	-1.91	-2.61	-1.76	-2.18	-2.59	-1.39	-1.61	-3.01	1.34	-9.90	-8.75	-8.32	-3.94	-9.07	-9.96
<b>Ccr11i</b>	2.71	4.16	1.97	3.39	2.91	9.54	5.79	16.54	16.19	8.01	9.10	12.89	3.25	7.54	10.12
<b>Cd244</b>	4.07	3.32	3.37	4.08	4.05	3.74	3.70	9.82	10.59	4.15	4.00	4.82	4.71	3.73	5.48
<b>Cd5</b>	-2.18	-2.56	-2.20	-2.92	-2.48	-2.45	-4.47	-3.04	-2.59	-6.16	-7.37	-7.82	-4.51	-6.84	-7.48
<b>Cd6</b>	-1.68	-2.11	-1.89	-3.01	-2.79	-2.91	-3.21	-2.06	-1.68	-2.79	-3.74	-4.75	-2.80	-4.23	-4.59

<b>Cd79b</b>	-1.72	-2.17	-2.04	-3.08	-2.41	-2.36	-4.70	-4.57	-2.42	-4.72	-7.51	-5.48	-3.54	-3.48	-3.01
<b>Chd3</b>	-1.77	-2.10	-1.97	-2.79	-2.68	-2.77	-3.97	-1.90	-1.94	-4.85	-6.00	-7.02	-3.12	-5.62	-6.09
<b>Csf2</b>	1.70	1.34	1.31	2.83	6.51	3.81	2.22	4.09	2.76	7.92	8.20	6.84	4.99	3.78	3.21
<b>Cxcr3</b>	-1.31	-1.65	-1.59	-2.70	-2.51	-2.27	-5.35	-2.32	-2.97	-24.30	-31.77	-39.14	-15.48	-29.70	-33.00
<b>Cxcr4</b>	-1.29	-1.60	-1.50	-2.84	-2.21	-3.15	-2.53	-1.63	-1.60	-5.98	-7.41	-8.44	-3.42	-4.99	-4.38
<b>Dennd5a</b>	-1.48	-1.80	-1.90	-2.27	-2.03	-2.50	-2.74	-1.08	-1.50	-2.55	-3.36	-4.06	-2.45	-3.29	-4.05
<b>Egr2</b>	1.64	1.27	1.45	8.82	5.07	4.85	3.07	5.01	6.15	2.76	4.31	3.26	3.62	2.23	2.41
<b>Egr3</b>	-1.10	1.05	1.16	2.17	2.46	2.20	2.58	3.29	4.70	4.73	3.74	3.43	2.02	2.85	3.45
<b>Eva1b</b>	-2.44	-2.71	-2.48	-2.14	-2.56	-2.86	-3.04	-1.61	-1.19	-2.29	-3.69	-3.70	-1.48	-1.82	-1.79
<b>F830016B08Rik</b>	-2.24	-2.74	-3.44	-4.81	-4.49	-6.10	-5.61	-2.07	-5.21	-22.59	-26.91	-26.18	-6.52	-9.53	-10.35
<b>Fcer1g</b>	3.61	3.21	3.61	4.38	6.42	4.41	4.33	7.82	11.17	4.12	3.50	4.75	4.86	3.50	4.61
<b>Fcgr3</b>	4.80	5.93	3.39	17.65	11.37	15.26	16.05	35.20	18.31	5.73	7.26	10.77	22.64	11.32	17.22
<b>Fcrl6</b>	1.44	1.04	2.25	5.05	2.52	3.07	2.76	4.29	5.27	4.17	4.13	6.47	7.47	5.89	9.14
<b>Gbp10</b>	-2.03	-2.65	-2.66	-3.03	-2.89	-3.26	-3.82	-1.79	-2.27	-4.64	-6.00	-6.35	-2.52	-3.28	-3.92
<b>Gbp11</b>	-1.97	-2.18	-2.15	-1.97	-2.03	-1.80	-2.89	-1.38	-1.39	-3.42	-4.03	-3.79	-3.65	-4.23	-4.39
<b>Gbp2</b>	-2.31	-2.71	-3.22	-5.37	-4.24	-4.95	-8.62	-4.23	-5.19	-20.40	-25.29	-29.26	-9.64	-15.22	-18.10
<b>Gbp4</b>	-1.56	-1.88	-1.90	-3.11	-2.57	-2.99	-3.18	-1.28	-1.68	-3.03	-3.96	-4.10	-2.76	-3.25	-3.55
<b>Gbp6</b>	-2.10	-2.71	-2.75	-2.98	-2.65	-2.91	-3.60	-1.63	-2.02	-4.24	-5.20	-5.67	-2.13	-2.89	-3.30
<b>Gbp7</b>	-1.36	-1.56	-1.80	-2.49	-2.43	-2.98	-3.17	1.17	-1.66	-3.55	-4.58	-5.13	-2.65	-4.03	-4.06
<b>Gdf11</b>	-1.37	-1.63	-1.59	-2.07	-2.20	-2.27	-3.67	-2.02	-2.32	-5.17	-4.95	-6.08	-2.28	-3.45	-3.75
<b>Gem</b>	2.08	1.82	1.52	2.38	5.61	3.57	1.77	5.60	3.84	3.72	4.36	4.21	2.43	1.97	2.62
<b>Glyctk</b>	-2.43	-2.59	-2.78	-4.39	-3.85	-2.78	-3.10	1.02	1.06	-2.57	-3.64	-3.45	-1.47	-1.72	-2.41
<b>Gm12185</b>	-1.91	-2.48	-2.94	-3.00	-2.80	-3.46	-6.37	-2.33	-4.64	-11.75	-14.01	-15.85	-7.49	-9.45	-10.39
<b>Gm12250</b>	-1.76	-2.24	-2.25	-3.98	-2.96	-3.62	-5.82	-2.29	-3.03	-6.27	-8.13	-9.39	-3.90	-6.05	-7.29
<b>Gm14446</b>	-2.64	-3.34	-3.18	-2.84	-2.86	-2.91	-4.95	-3.10	-3.47	-7.76	-8.73	-8.62	-5.45	-7.30	-7.97
<b>Gm4841</b>	-1.88	-2.35	-2.56	-3.38	-3.75	-5.31	-7.88	-3.32	-4.94	-8.79	-8.63	-10.66	-6.03	-8.77	-10.11
<b>Gm4951</b>	-2.57	-3.15	-3.98	-5.98	-5.07	-6.12	-12.30	-3.44	-7.59	-9.70	-11.70	-12.39	-11.97	-16.37	-19.66
<b>Gm5547</b>	-2.19	-3.32	-3.62	-1.61	-1.70	-1.86	-4.02	-2.28	-2.03	-3.82	-3.45	-3.61	-1.40	-2.09	-2.46
<b>Gzmc</b>	3.31	3.96	2.43	4.33	7.60	6.38	4.96	10.80	17.41	4.47	4.90	7.35	5.46	4.38	8.46

<b>Gzmd</b>	2.24	2.92	1.92	2.92	4.87	4.26	2.61	4.88	7.04	2.58	3.11	4.12	4.56	3.83	6.31
<b>Gzme</b>	2.07	2.55	1.91	3.11	4.61	4.23	2.10	4.68	6.76	2.56	2.75	3.46	4.19	3.65	5.42
<b>Gzmf</b>	2.07	2.91	2.14	3.35	7.65	6.57	3.62	8.28	9.52	2.79	3.82	5.43	5.11	4.54	7.68
<b>H2-Ob</b>	-2.10	-2.83	-2.77	-3.96	-3.36	-2.46	-3.44	-2.00	-1.27	-4.12	-3.71	-2.80	-2.77	-3.13	-3.02
<b>Hgfac</b>	1.76	1.47	-1.06	2.01	3.27	2.23	2.36	3.73	8.12	2.97	3.28	3.02	4.26	2.57	3.44
<b>Hhex</b>	2.55	-1.10	1.14	3.41	2.76	2.36	3.51	3.43	4.60	2.36	2.01	3.46	1.67	2.24	2.90
<b>I830012O16Rik</b>	-2.00	-2.59	-2.71	-1.99	-2.63	-2.82	-4.99	-3.33	-3.52	-12.59	-15.74	-14.76	-5.37	-10.08	-13.50
<b>Ifi2712a</b>	-2.13	-2.34	-2.27	-3.15	-2.07	-2.01	-7.77	-4.07	-2.99	-11.03	-16.63	-17.78	-5.53	-9.12	-8.47
<b>Ifit1</b>	-2.32	-2.64	-2.45	1.34	-1.01	1.08	-4.16	-1.79	-2.96	-7.07	-7.73	-6.61	-3.82	-5.59	-6.42
<b>Ifit3</b>	-1.84	-2.54	-2.42	-2.21	-2.09	-2.30	-8.89	-6.37	-6.83	-25.97	-27.78	-31.93	-9.87	-14.37	-21.00
<b>Ifngr2</b>	-1.81	-1.98	-1.91	-4.37	-4.61	-4.48	-2.81	-1.87	-1.77	-3.96	-6.09	-6.90	-3.31	-5.95	-5.60
<b>Igtp</b>	-1.97	-2.34	-2.53	-4.71	-3.92	-4.29	-5.75	-3.13	-3.04	-6.75	-8.60	-10.12	-4.19	-6.80	-7.86
<b>Iigp1</b>	-2.66	-3.50	-3.86	-5.52	-5.54	-6.76	-20.53	-5.75	-13.94	-39.90	-47.35	-58.13	-25.79	-35.38	-45.36
<b>Ii23a</b>	1.02	-1.12	-2.64	2.88	2.09	4.06	4.43	7.02	5.86	10.58	10.88	3.08	11.06	7.47	12.69
<b>Irf1</b>	-1.67	-1.97	-2.09	-3.09	-2.21	-2.58	-3.51	-2.00	-1.77	-4.58	-5.59	-7.09	-2.10	-3.52	-4.05
<b>Irf8</b>	1.11	-1.09	-1.16	2.12	3.42	2.38	3.22	6.19	6.92	8.51	8.40	7.69	7.59	5.67	6.66
<b>Irgm1</b>	-1.79	-2.02	-2.19	-3.61	-2.55	-2.91	-5.09	-2.65	-2.77	-6.92	-8.56	-10.31	-3.88	-6.04	-7.37
<b>Irgm2</b>	-1.58	-2.05	-2.00	-3.36	-2.63	-2.98	-3.93	-1.58	-2.18	-4.99	-5.94	-6.49	-2.88	-4.54	-5.06
<b>Kcna3</b>	-1.43	-1.73	-1.62	-2.69	-2.61	-2.49	-3.32	1.04	-1.61	-3.04	-4.44	-5.23	-3.01	-4.15	-4.39
<b>Kctd11</b>	2.65	3.02	1.70	1.47	2.39	3.14	1.84	5.42	8.21	4.48	3.37	3.28	5.46	3.72	4.87
<b>Kit</b>	1.43	1.31	1.24	2.82	2.55	2.87	4.33	6.39	6.23	3.47	3.52	3.74	5.45	4.47	4.49
<b>Klf2</b>	-1.53	-2.17	-1.83	-2.29	-2.95	-2.38	-2.52	-4.04	-1.49	-5.06	-7.52	-6.77	-4.79	-7.75	-8.98
<b>Klrb1a</b>	-1.13	1.19	1.40	2.16	2.46	2.60	8.98	12.49	13.21	8.44	6.70	6.96	7.89	8.18	8.16
<b>Klrb1b</b>	1.56	1.20	1.41	2.88	2.63	5.78	4.45	4.36	4.49	6.35	3.66	4.97	9.57	5.79	6.62
<b>Klrb1c</b>	4.05	3.49	3.78	3.28	5.06	4.49	3.47	9.75	7.55	2.71	2.40	2.83	4.52	3.49	4.22
<b>Klrb1f</b>	-1.03	-1.28	-1.12	3.22	2.63	2.15	5.05	8.28	9.00	4.09	2.77	2.66	7.94	6.69	4.55
<b>Klrc2</b>	-1.06	-1.31	-1.24	-2.33	-2.02	-2.44	-3.17	1.06	-1.23	-4.47	-5.94	-4.86	-4.51	-4.56	-4.00
<b>Klrc3</b>	-1.29	-1.33	-1.21	-2.05	-2.14	-2.51	-3.16	1.20	-1.56	-4.32	-7.11	-6.92	-2.66	-2.87	-2.77
<b>Lama1</b>	-1.16	-1.16	-1.26	2.02	1.81	1.67	2.60	2.20	5.40	2.66	2.49	2.18	3.08	2.48	2.61



<b>Mcpt8</b>	2.65	2.12	3.19	9.01	7.41	9.79	3.85	6.46	14.00	3.31	3.01	3.39	10.06	7.98	11.11
<b>Metrn1</b>	2.51	2.93	1.77	1.34	1.85	1.19	2.40	5.25	6.86	2.19	2.12	2.32	3.06	2.07	2.69
<b>Mgst2</b>	-1.73	-2.07	-1.45	-2.70	-2.76	-1.78	-2.81	-1.59	1.18	-4.85	-6.06	-3.33	-3.63	-4.96	-3.58
<b>Myl10</b>	-1.95	-2.33	-1.31	-3.15	-2.36	-1.00	-6.52	-4.42	-1.92	-2.27	-2.31	-1.29	-2.27	-2.76	-2.03
<b>Ncr1</b>	2.55	1.91	1.35	19.15	7.11	13.87	52.57	57.73	70.75	28.97	23.67	35.58	32.83	21.03	24.25
<b>Nlrc5</b>	-1.40	-1.76	-1.59	-2.65	-2.10	-2.10	-2.72	-1.39	-1.33	-2.22	-2.94	-3.41	-2.06	-3.01	-3.28
<b>Nr4a3</b>	1.21	1.14	1.14	2.12	1.79	1.53	3.11	4.87	4.88	3.16	2.78	4.22	2.44	2.26	2.79
<b>Nrgn</b>	1.03	1.18	1.82	3.57	4.36	2.67	2.50	5.02	5.42	2.34	2.50	2.77	4.28	3.93	3.97
<b>Pfpl</b>	2.08	2.23	2.16	4.21	3.21	4.03	7.17	11.79	8.81	22.76	11.47	25.90	13.21	11.14	17.66
<b>Pglyrp1</b>	2.09	1.95	1.80	1.55	2.57	1.80	3.14	3.97	8.12	2.77	2.75	3.34	3.95	3.15	4.17
<b>Phf11c</b>	-1.88	-2.20	-2.37	-1.80	-1.67	-1.85	-5.30	-2.46	-3.52	-6.27	-7.79	-9.48	-4.42	-6.70	-7.88
<b>Plcg1</b>	-1.91	-2.27	-2.14	-5.02	-4.13	-4.05	-9.62	-3.71	-4.23	-14.15	-17.87	-18.42	-14.28	-19.95	-21.15
<b>Pld4</b>	-1.89	-2.08	-2.50	-4.49	-2.45	-4.59	-5.19	-4.29	-3.17	-5.56	-7.76	-10.18	-4.11	-6.86	-8.25
<b>Prf1</b>	1.87	2.08	1.57	1.95	3.73	2.85	1.94	5.58	6.08	3.76	3.81	4.03	4.57	3.77	5.28
<b>Rasgrp2</b>	-1.73	-2.48	-1.92	-2.86	-2.79	-2.61	-5.65	-4.13	-2.31	-6.63	-9.23	-9.71	-2.50	-5.62	-5.77
<b>Rgs11</b>	-1.58	-2.00	-1.84	-2.03	-1.65	-1.74	-3.10	-2.17	1.04	-2.45	-2.32	-3.30	-2.21	-3.82	-3.18
<b>Rgs16</b>	1.92	2.05	1.77	3.60	5.89	4.70	3.69	5.77	8.94	4.22	5.44	7.00	5.55	4.30	6.72
<b>Rtp4</b>	-2.05	-2.47	-2.67	-1.47	-1.35	-1.46	-3.84	-2.62	-2.51	-8.36	-8.67	-10.06	-6.03	-8.96	-11.38
<b>S1pr1</b>	-1.52	-2.05	-1.79	-2.45	-2.36	-2.61	-2.44	-1.97	-2.00	-12.31	-18.56	-24.54	-8.32	-17.31	-28.94
<b>Samhd1</b>	-1.74	-2.25	-2.11	-3.18	-2.89	-3.07	-3.61	-2.72	-1.88	-8.10	-9.20	-9.36	-3.32	-5.30	-6.00
<b>Scimp</b>	1.06	1.18	-1.06	2.29	2.16	1.75	3.42	5.41	4.09	2.78	2.89	3.34	3.31	2.75	4.19
<b>Sema4c</b>	1.86	2.29	1.95	2.51	2.42	2.66	7.57	11.78	10.92	8.52	7.76	10.91	17.14	13.84	15.88
<b>Serpib1a</b>	-2.41	-2.30	-2.55	-2.88	-1.81	-2.12	-3.64	-1.42	-1.04	-4.85	-4.40	-2.71	-2.13	-2.37	-1.66
<b>Serpib6b</b>	2.07	2.01	1.77	2.28	2.96	1.87	3.46	9.90	8.04	4.12	4.37	4.82	7.31	6.42	8.18
<b>Serpib9b</b>	1.01	-1.01	-1.24	4.42	7.90	6.31	5.50	12.68	7.52	5.74	7.81	8.51	9.51	10.21	10.67
<b>Sh2d1b1</b>	2.49	2.51	2.65	5.71	6.34	8.21	6.74	14.34	11.08	5.04	4.91	7.58	7.61	6.66	7.20
<b>Slc2a6</b>	2.82	3.03	2.42	2.86	3.63	2.92	3.80	7.11	5.76	3.80	2.81	1.67	9.51	4.64	4.62
<b>Smpdl3a</b>	-1.75	-2.16	-2.05	-2.76	-2.50	-2.60	-2.27	-1.53	-1.78	-3.50	-3.79	-3.78	-1.86	-2.61	-2.62
<b>Socs2</b>	-1.52	-1.72	-1.94	-2.62	-1.61	-2.37	-3.40	-1.83	-2.15	-2.93	-3.68	-4.98	-2.50	-3.62	-4.72

<b>Spin4</b>	-1.64	-1.45	-1.35	3.27	6.46	3.18	2.34	11.15	7.67	2.48	2.20	2.83	3.48	3.36	6.46
<b>Spp1</b>	1.44	1.55	1.19	3.12	5.56	4.00	1.97	3.86	4.40	2.79	2.85	3.52	4.53	3.81	5.49
<b>Stat1</b>	-1.92	-2.43	-2.62	-3.41	-2.98	-3.33	-5.51	-2.46	-3.62	-7.79	-9.70	-11.52	-4.49	-6.71	-8.03
<b>Tbxa2r</b>	-2.13	-3.19	-2.76	-1.62	-1.78	-1.80	-4.25	-2.64	-1.78	-6.07	-8.33	-8.59	-2.77	-4.75	-3.89
<b>Tgm2</b>	-1.34	-1.36	-2.11	-3.15	-1.93	-2.51	-8.30	-4.11	-5.45	-4.20	-6.59	-12.27	-7.39	-13.80	-17.04
<b>Tgtp1</b>	-2.15	-2.58	-2.82	-4.29	-3.50	-4.44	-6.85	-3.00	-4.02	-15.01	-16.68	-20.01	-6.57	-9.91	-11.29
<b>Tlr1</b>	-1.69	-2.32	-2.20	-2.41	-2.44	-2.29	-3.90	-2.14	-2.37	-5.39	-8.96	-10.31	-3.95	-6.44	-8.45
<b>Tlr12</b>	-2.12	-2.66	-2.25	-2.58	-2.78	-2.33	-2.14	-1.73	-1.16	-2.31	-5.62	-2.97	-1.65	-1.69	-1.72
<b>Tmem119</b>	1.91	2.45	1.71	4.05	2.80	2.79	6.11	12.95	12.66	4.34	3.59	7.69	8.92	5.39	7.12
<b>Tmem221</b>	-2.77	-2.58	-1.77	-3.49	-2.50	-2.63	-3.10	-2.02	-1.33	-4.44	-4.96	-6.58	-2.30	-2.70	-3.99
<b>Tmem71</b>	-1.91	-2.32	-2.14	-2.29	-2.23	-2.21	-2.42	-1.28	-1.09	-5.48	-6.68	-6.16	-2.29	-2.84	-2.88
<b>Tnp2</b>	-1.35	-1.12	-1.75	-2.28	-1.89	-1.59	-4.26	-2.95	-2.55	-3.67	-5.57	-6.47	-3.08	-5.59	-4.71
<b>Tyropb</b>	3.33	1.98	2.72	9.14	7.23	6.06	20.87	36.82	34.64	18.86	14.07	19.74	27.95	21.81	22.33
<b>Ube2l6</b>	-1.18	-1.24	-1.27	-3.71	-3.00	-3.80	-3.04	-1.47	-1.60	-3.76	-4.40	-3.66	-3.82	-4.21	-3.99
<b>Xcl1</b>	3.67	3.05	2.74	37.49	34.45	40.41	12.02	22.67	15.23	17.20	13.71	8.75	15.79	12.44	7.96
<b>Zbp1</b>	-1.78	-2.03	-2.17	-2.60	-2.32	-2.46	-5.73	-4.80	-3.40	-5.78	-8.07	-8.10	-4.06	-5.55	-6.65
<b>Zfp105</b>	1.17	1.19	1.96	2.37	2.32	2.16	4.53	6.03	9.69	3.99	5.31	3.84	4.03	2.86	3.97

