

Sehr geehrte Damen und Herren,

am 8. Februar 2010 schloss ich meine Dissertation zum Thema „Mathematische und Experimentelle Analyse regulatorischer Netzwerke in T-Helfer-Zellen“ mit *summa cum laude* ab. Mit einem kombiniert experimentell-theoretischen Ansatz untersuchte ich das Gen-regulatorische Netzwerk, das die Differenzierung von Th1-Lymphozyten während der Immunantwort steuert. Mit der Arbeit möchte ich mich für den MTZ-Award für medizinische Systembiologie bewerben.

## **Kurzfassung der Dissertation**

### 1. Fragestellung

T-Helfer Typ I Zellen (Th1) spielen eine zentrale Rolle in der Immunabwehr intrazellulärer Erreger. Ihre fehlgeleitete Entstehung und Aktivierung trägt jedoch auch maßgeblich zu Autoimmunerkrankungen bei. Die Signale und Transkriptionsfaktoren, die die Differenzierung von Th1-Zellen steuern, wurden bereits vor langer Zeit entdeckt, ihre genaue Rolle jedoch blieb unklar [2]. So war bekannt, dass Expression des sogenannten Th1 Master-Transkriptionsfaktors T-bet durch das Zytokin Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) induziert wird [1]. Paradoxerweise ist IFN- $\gamma$  allein jedoch nicht in der Lage, Th1 Differenzierung auszulösen, dafür wird ein weiteres Zytokin, Interleukin-12 (IL-12), benötigt. Obwohl die Regulation der beteiligten Zytokine und Transkriptionsfaktoren gut untersucht war, blieb das Verständnis ihres Zusammenspiels und damit auch ihrer Funktion lückenhaft. Um das Zusammenwirken dieser Faktoren zu untersuchen, wählte ich daher in meiner Arbeit bewusst einen systembiologischen Ansatz, in dem ich quantitative Messungen mit mathematischer Modellierung verband.

### 2. Forschungsansatz

Um die Funktionsweise des Gen-regulatorischen Netzwerks zu untersuchen, das die Differenzierung von Th1-Zellen steuert, ging ich in zwei Schritten vor. Zuerst klärte ich die Struktur des Netzwerks auf. Dann untersuchte ich die biologische Funktion der beteiligten Gene, um zu verstehen, wie das Netzwerk den Differenzierungsprozess steuert.

Um die Netzwerkstruktur aufzuklären, entwickelte ich, ausgehend von bereits in der Literatur beschriebenen Regulationsmechanismen, ein mathematisches Modell des Th1-Netzwerks, bestehend aus gewöhnlichen Differentialgleichungen. Um dieses Modell zu testen, führte ich kinetische Messungen der Expression Th1-spezifischer Gene (IFN- $\gamma$ , T-bet, IL-12R) während der *in vitro* Th1-Differenzierung durch und untersuchte, wie diese auf Inhibition verschiedener Signalwege reagieren. Da das literatur-basierte Modell die experimentellen Daten nicht erklären konnte, postulierte ich in einem iterativen Prozess zusätzliche Regulationsmechanismen, integrierte diese in das Modell und testete kritische

Modellvorhersagen experimentell. Mit dieser Strategie konnte ich zwei bisher unbekannte Regulationsmechanismen nachweisen, die von zentraler Bedeutung für unser Verständnis von Th1-Differenzierung sind, und konnte somit die Netzwerkstruktur vervollständigen [3].

Im zweiten Schritt untersuchte ich den Zusammenhang zwischen den Expressionsniveaus der beteiligten Gene und dem Differenzierungserfolg. Überraschenderweise zeigte diese Analyse, dass das Expressionsniveau von T-bet, dem Th1 Master-Transkriptionsfaktor, nur zu bestimmten Zeitpunkten, nämlich in der späteren Phase mit dem Erfolg der Differenzierung korreliert.

### 3. Ergebnisse

Durch die beschriebene Vorgehensweise konnte ich zeigen, dass Th1-Differenzierung in mehreren Schritten abläuft. In der initialen Effektorphase produziert die Zelle Th1 Effektorzytokine wie IFN- $\gamma$ , dieser Th1-Phenotyp ist jedoch instabil. Erst in der späteren Differenzierungsphase legt sich die Zellen auf den Th1-Phenotyp fest. In der frühen Effektorphase wird die Expression von T-bet, wie schon vorher bekannt, durch das IFN- $\gamma$ -Signal gesteuert [1]. In der darauffolgenden Differenzierungsphase jedoch wird T-bets Expression durch einen bisher unbekanntem IL-12-abhängigen Mechanismus aufrecht erhalten. Ich konnte zeigen, dass das Antigen-Signal als „Schalter“ zwischen den beiden Phasen fungiert, da es IFN- $\gamma$  induziert, IL-12-Signaltransduktion durch Repression der IL-12-Rezeptorexpression jedoch inhibiert. Daher beschränkt sich die Wirkung von IL-12 hauptsächlich auf die spätere Phase, wenn die Antigenstimulation beendet ist. Meine Ergebnisse zeigen, dass die Expression von T-bet in dieser späten Phase wiederum den Erfolg des Differenzierungsprozesses bestimmt. Da also IL-12, nicht jedoch IFN- $\gamma$ , die Expression von T-bet in der späten Phase aufrecht erhalten kann, fungiert IL-12 als zentrales Differenzierungssignal. Diese wichtige Rolle, die IL-12 in der Th1-Differenzierung spielt, war zwar schon lange bekannt, der Wirkungsmechanismus konnte jedoch erst mit der vorliegenden Arbeit aufgeklärt werden.

### **Bezug der Arbeit zur medizinisch orientierten Systembiologie**

Th1-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Immunabwehr intrazellulärer Erreger, wie z. B. von Listerien oder Tuberkulose. Da zudem chronisch aktivierte Th1-Zellen an vielen rheumatischen Erkrankungen beteiligt sind, ist ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen, die die Aktivität dieser Zellen kontrollieren, eine Voraussetzung, um gezielt neue Therapien entwickeln zu können. Meine Arbeit hat gezeigt, dass für ein solch besseres Verständnis das Zusammenwirken der verschiedenen Faktoren untersucht werden muss. Als Teil eines komplexen Netzwerks erfüllt jeder Faktor mehrere Funktionen, die stark von der Aktivität der restlichen Faktoren und von externen Signalen abhängen, die die Zelle empfängt. Zum Beispiel ist das Antigen-Signal essentiell für Th1-Effektorfunktionen, wie die IFN- $\gamma$ -Produktion. Daher werden häufig Medikamente zur Immunsuppression verwendet,

die Signalwege inhibieren, welche den Antigenstimulus in T-Zellen vermitteln. Meine Analyse hat jedoch gezeigt, dass der Antigenstimulus außerdem noch die Expression des IL-12-Rezeptors reprimiert, was sich wiederum negativ auf die Entstehung von stabilen Th1-Zellen auswirkt. Daher könnte, unter bestimmten Umständen, medikamentöse Inhibition des Antigenstimulus zwar Th1-Effektorfunktionen inhibieren, dafür aber Differenzierung, und damit chronische Entzündungen verstärken. Möglicherweise trägt dieser Effekt zu den starken Nebenwirkungen dieser Medikamente bei. Meine Arbeit zeigt sehr deutlich, dass Th1-Differenzierung durch ein kompliziertes regulatorisches Netzwerk gesteuert wird. Nur ein genaues quantitatives Verständnis dieses Netzwerks mit Hilfe des beschriebenen systembiologischen Ansatzes wird ein gezieltes therapeutisches Eingreifen ermöglichen.

### **Herausragendes Ergebnis der Dissertation, auch im Hinblick auf die Ziele der MTZ®Stiftung**

In der eingereichten Arbeit habe ich das erste Daten-basierte Mathematische Modell des Gen-regulatorischen Netzwerks der Th1-Differenzierung entwickelt. Dabei ist klar geworden, dass es zwingend notwendig ist, (1) die Interaktionen zwischen den beteiligten Faktoren zu untersuchen und (2) die Dynamik des Prozesses zu berücksichtigen. Dadurch konnte ich zeigen, dass der Differenzierungsprozess in mehreren Schritten abläuft, die mit unterschiedlichen Funktionen assoziiert sind. Dieses Ergebnis wurde in der Fachzeitschrift IMMUNITY (Impact Faktor 20,5) veröffentlicht und ist auf großes Interesse gestoßen [3]. Es wurde in derselben Ausgabe von IMMUNITY als „Preview“ hervorgehoben und in der Zeitschrift „Nature Reviews of Immunology“ als „Research Highlight“ vorgestellt. Daher hoffe ich, mit meiner Arbeit einen wichtigen Beitrag zur Akzeptanz systembiologischer Ansätze in der Immunologie geleistet zu haben. In ähnlicher Weise möchte auch die MTZ-Stiftung die medizinische Systembiologie fördern und sichtbar machen. Außerdem ist der von mir gewählte interdisziplinäre Ansatz, in dem ich sowohl die experimentellen Messungen durchgeführt habe, als auch alle mathematischen Modelle entwickelt habe, im Einklang mit den Zielen der MTZ-Stiftung.

Ich hoffe, dass ich Ihr Interesse an meiner Arbeit wecken konnte.

Mit freundlichen Grüßen

Edda G. Schulz

[1] A. A. Lighvani, D. M. Frucht, D. Jankovic, H. Yamane, J. Aliberti, B. D. Hissong, B. V. Nguyen, M. Gadina, A. Sher, W. E. Paul, and J. J. O’Shea. T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(26):15137–42, Dec 18 2001.

[2] K. M. Murphy and S. L. Reiner. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol*, 2(12):933–44, Dec 2002.

[3] E. G. Schulz, L. Mariani, A. Radbruch, and T. Höfer. Sequential polarization and imprinting of type 1 T helper lymphocytes by interferon-gamma and interleukin-12. *Immunity*, 30(5):673–683, May 2009.