

HS-02

การศึกษาบทบาทของสแตตส์ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดเดนไดรต์ที่ถูกกระตุ้นด้วยอินเตอร์เฟียรอนชนิดเบต้า
แบบจำลองในโรคมุมิแพ้นตนเอง

The Role of STAT4 Transcription Factor in Purified Human Dendritic Cells Treated with Interferon-Beta, an Autoimmune Disease Model

เทอดเกียรติ ผลบุญ¹ ปณิตพันธ์ มกระธัช² จิรเดช มังเจริญ³ พชรี ฤทธิ์ประจักษ์⁴ ณัฐฐิยา หิรัญกาญจน์⁵ กมลพร ออมรสุมภ์⁶
พิมพเยาว์ สดใส⁷ และภัทริน ตั้งชนตระกุล⁸

Terdkiat Phonboon¹, Pannaphan Makarathut², Jiradej Makjaroen³, Patcharee Ritparachak⁴, Nattiya Hirankarn⁵,
Kamolporn Amornsapak⁶, Pimpayao Sodsai⁷ and Pattarin Tangtanatakul⁸

¹ บัณฑิตวิทยาลัย, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

^{2,6,8} ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

³ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านชีววิทยาเชิงระบบ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

⁴ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

^{5,7} ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

^{5,7,8} ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยาและโรคที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อีเมล: Pattarin.T@chula.ac.th

บทคัดย่อ

SNPs ของ STAT4 มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมุมิแพ้นตนเองชนิดต่างๆ แม้ว่าจะมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการสร้าง IFN- γ ในเซลล์เม็ดเลือดขาวหลายชนิด ข้อมูลเกี่ยวกับการแสดงออกและหน้าที่ของ STAT4 ใน dendritic cell (DC) ยังไม่มีผู้ทำการศึกษา ดังนั้นเพื่อต้องการศึกษาการแสดงออกและบทบาทของ STAT4 ใน DC ผู้วิจัยได้ทำการแยก DC จากผู้บริจาคที่มีสุขภาพดีจำนวน 6 ราย ด้วย magnetic isolation ตามด้วย flow cytometry ในการแยก dendritic cell ออกเป็น 3 ชนิดย่อยคือ plasmacytoid dendritic cell (pDC; CD123⁺), conventional dendritic cell 1 (cDC1; CLEC9A⁺), และ conventional dendritic cell 2/3 (cDC2/3; CD1c⁺) DC ที่ได้จะถูกนำไปกระตุ้นด้วย IFN- β เพื่อวัดการแสดงออกของ STAT4 ด้วย Real-Time PCR และ Western blotting โดย DC ที่มีการแสดงออกของ STAT4 จะถูกนำมาศึกษาบทบาทด้วยวิธี lisofylline inhibition โดยใช้สาร lisofylline จากผลการทดลองพบว่าจำนวน pDC, cDC1, และ cDC2/3 ในผู้บริจาคมีค่าเฉลี่ยประมาณ $0.07 \pm 0.03\%$, $0.04 \pm 0.02\%$ และ $0.31 \pm 0.10\%$ เป็นที่น่าสนใจว่าเมื่อนำ DC มากระตุ้นด้วย IFN- β แล้วมีเพียง DC2/3 เท่านั้นที่มีการแสดงออกของ STAT4 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ จากการศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่า STAT4 อาจมีบทบาทที่สำคัญในการควบคุมการตอบสนองของ DC ในสภาวะที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบได้

คำหลัก: เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดเดนไดรต์ โปรตีนSTAT4 IFN-เบต้า โรคมุมิแพ้นตนเอง

Abstract

STAT4 (Signal Transducer Activator of Transcription factor 4 polymorphisms are risk factors contributed to autoimmune disease. While STAT4 has a dominant role in promoting interferon (IFN- γ) in T lymphocytes and NK cells, its existence and function exert in dendritic cells (DCs) are still absent. To characterize the STAT4 in human DCs, we isolated DCs from buffy coat of health blood donors (n = 6). The DCs are enriched and specifically sorted into 3 subtypes, including plasmacytoid DCs (pDCs; CD123⁺), CD8⁺ priming DC (cDC1; CLEC9A⁺), and CD4⁺ priming DC (cDC2/3; CD1c⁺) using magnetic isolation and flow cytometry. The isolated DCs was stimulated with IFN- β to study STAT4 expression by real-time PCR and western-blotting. In addition, we study the role of STAT4 by performing the lisofylline inhibition. Regarding to our analysis, the number of each DCs subset are $0.07 \pm 0.03\%$ for pDC, $0.04 \pm 0.02\%$ for cDC1 and $0.31 \pm 0.10\%$ for cDC2/3 in healthy blood donors. The IFN- β enhanced *STAT4* expression as well as phosphorylated STAT4 were prominent in mature DCs especially in cDC2/3, but not in pDC and cDC1 (p -value < 0.01). Our study highlights that STAT4 may play important role regulating DC responses in pro-inflammatory condition.

Keywords: Dendritic cells, STAT4 protein, Interferon- β , autoimmune disease

บทนำ

โรคแพ้ภูมิตนเองเป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติในระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งเดิมมีหน้าที่ทำลายเชื้อจุลชีพ แต่กลับทำลายเซลล์ของตนเอง โดยการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า กลไกการต่อต้านแอนติเจนของตนเอง (Self-tolerance) ในผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ตนเองเกิดความผิดปกติ ทั้งนี้อาจเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น การถูกเหนี่ยวนำจากแอนติเจนของเชื้อไวรัส (Hussein & Rahal, 2019) เกิดความผิดปกติตั้งแต่ขั้นตอนการสร้างของเซลล์เม็ดเลือดขาว (Hematopoiesis) โดยเฉพาะกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวในระบบ Adaptive Immune Systems (T และ B lymphocyte) ในขั้นตอน Negative selection และการนำเสนอแอนติเจนของร่างกายให้โดยผ่านทาง Dendritic cells (Fierabracci, 2011) ด้วยเหตุผลต่างๆ ข้างต้น เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการก่อให้เกิดโรคภูมิแพ้ตนเอง และส่งผลต่อการตอบสนองต่อแอนติเจนของตนเอง โดยโรคภูมิแพ้ตนเองมีอุบัติการณ์ที่สูงในกลุ่มชาติพันธุ์เอเชีย และพบว่าเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย

Dendritic cell (DC) เป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการตอบสนองแบบจำเพาะผ่านการนำเสนอแอนติเจน Dendritic cell สามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ plasmacytoid dendritic cell (pDC) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการสร้าง type-I IFN กระตุ้นการทำลายของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส และการตายของเซลล์ conventional dendritic cell (cDC) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการนำเสนอแอนติเจนเพื่อกระตุ้นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ โดยสามารถแบ่งแยกย่อยได้อีก 2 ชนิดคือ เม็ด conventional dendritic cell type 1 (cDC1) ซึ่งนำเสนอแอนติเจนให้ CD8⁺ T-cells และ conventional dendritic cell type 2 (cDC2) ซึ่งนำเสนอแอนติเจนให้ CD4⁺ T-cell (Guilliams et al., 2018) จากการค้นพบก่อนหน้านี้พบว่า conventional dendritic cells 3 (cDC3) ซึ่งจัดเป็น inflammatory DC มักตรวจพบ เมื่อร่างกายมีการสร้าง IFN- β ปริมาณเพิ่มขึ้น ซึ่ง DC3 นี้

จะทำหน้าที่ในการกระตุ้นการพัฒนาของ Th17 และพบมากในผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ตนเอง (Girard et al., 2020) ทั้งนี้การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า cDC2 และ cDC3 เป็นเซลล์ที่กระตุ้นการอักเสบและมีความสำคัญในโรคภูมิแพ้ตนเอง (Dutertre et al., 2019)

ในสภาวะปกติกำเนิดของโรคภูมิแพ้ตนเอง Dendritic cell มีบทบาทสำคัญในการเริ่มต้น เพิ่ม หรือ คงความรุนแรงของโรค โดยจะทำหน้าที่ในการกำจัดเศษเซลล์ที่ตายแล้วเพื่อป้องกันไม่ให้มีส่วนประกอบของเซลล์ที่ตายแล้ว เช่น ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ โปรตีนหลงเหลือ (Shao & Cohen, 2011) ซึ่งในกรณีของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ตนเอง องค์ประกอบของเซลล์ที่ตายเหล่านี้ สามารถกระตุ้นการทำงานของ pDC ให้สร้าง type-I IFN ได้ รวมทั้งกระตุ้นให้เกิดการพัฒนาของ Th1 และ Th17 ในการสร้าง IFN- γ ซึ่งเป็นไซโตไคน์ของการเริ่มต้นการอักเสบ นอกจากนี้ Dendritic cell ยังทำหน้าที่ในการนำเสนอแอนติเจนให้กับ T cells ซึ่งเป็นจุดที่สำคัญในการกระตุ้นการอักเสบ อย่างไรก็ตาม การศึกษาถึงบทบาทของ Dendritic cell ที่ช่วยกระตุ้นให้เกิดการพัฒนาของ Th17 ซึ่งพบว่ามีความสูงชันในผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ตนเองนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด (López et al., 2016; Yu et al., 2010)

Signal transducer and activator of transcription 4 (STAT4 transcription factor) หรือ โปรตีน STAT4 จัดเป็น transcription factor ที่มีความสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ โปรตีน STAT4 มีการแสดงออกในเซลล์เม็ดเลือดขาวหลายชนิด โดยเฉพาะใน NK-cells T และ B lymphocytes โดยถูกกระตุ้นผ่าน JAK-STAT pathway จากการเหนี่ยวนำของไซโตไคน์ (Liang et al., 2014) หลักฐานสำคัญเผยว่า IL-12 เป็นไซโตไคน์ที่สำคัญที่ใช้ในการกระตุ้น STAT4 ทำให้เซลล์สร้าง IFN- γ และนำไปสู่การพัฒนาของ Th1 (Ueno, 2020) (Athie-Morales et al., 2004) ใน CD8+ T-cell โปรตีน STAT4 เป็นส่วนสำคัญในการอยู่รอดของเซลล์เนื่องจาก STAT4 ไปกระตุ้นการแสดงออกของยีนกลุ่ม anti-apoptotic และกดการแสดงออกของยีนในกลุ่ม pro-apoptotic ภายใน CD8+ T-cell (Li et al., 2006) ใน Follicular T-helper cells โปรตีน STAT4 ทำให้เกิดการ differentiation ซึ่งจะไปกระตุ้นการสร้าง IL-21 ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการ differentiate B-cell ให้กลายเป็น Plasma cell ซึ่งอาจเป็นจุดเริ่มต้นที่สำคัญของการพัฒนา auto reactive B-cell โคลนต่าง ๆ (Schmitt et al., 2009) นอกจากนี้ STAT4 ยังทำงานใน NK-cell โดยการเพิ่มการสร้าง IFN- γ ในการกำจัดเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสในร่างกายอีกด้วย (Miyagi et al., 2007) อีกทั้งยังมีส่วนในการสร้าง Perforin ซึ่งเป็นกลไกหลักในการตอบสนองต่อเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสควบคู่ไปกับการหลั่ง Granzyme-B ใน NK-cells อีกด้วย (Yamamoto et al., 2002)

การทำงานของ STAT4 จะเริ่มต้นจากการสร้างโปรตีน STAT4 ในรูปแบบ full-length เมื่อถูกกระตุ้น โปรตีนจะมีการเติมหมู่ phosphate ที่ตำแหน่ง Tyr693 กลายเป็น phosphorylated STAT4 (pSTAT4) และเข้าไปทำงานภายใน nucleus ของเซลล์ เป็นที่น่าสนใจว่าบทบาทของ STAT4 มีความแตกต่างกันในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ต่างชนิดกัน เช่นใน T-cell activated STAT4 ทำให้ T-cell มีชีวิตอยู่นานขึ้น (Li et al., 2006) แต่ใน NK-cell นั้นช่วยให้มีความเป็นพิษในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมสูงขึ้น (Yamamoto et al., 2002) ทั้งนี้การแสดงออกของ STAT4 ใน Dendritic cell ในมนุษย์ยังไม่มีการศึกษาทดลอง

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในโรคภูมิแพ้ตนเองหลายโรค พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของ STAT4 มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคภูมิแพ้ตนเองอย่างมีนัยสำคัญ เป็นที่น่าสนใจว่า ความหลากหลายทางพันธุกรรมนี้พบคล้ายคลึงกันในทุกเชื้อชาติ (Oparina et al., 2019; Wang et al., 2013) แสดงให้เห็นว่าการทำงานหรือบทบาทของโปรตีน STAT4 อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคภูมิแพ้ตนเอง มีการรายงานก่อนหน้านี้ พบว่า การเปลี่ยนแปลง base ในตำแหน่ง rs7574865 จาก C เป็น T สามารถจัดเป็นยีนที่เสี่ยงในการพัฒนาของโรคแพ้ภูมิตนเองได้ โดยส่งผลให้เกิดการเพิ่มปริมาณการถอดรหัสและแปลรหัสพันธุกรรมของ STAT4 mRNA (Lamana et al., 2015) ในสัตว์ทดลองที่ถูกลบหรือกดการแสดงออก



ของยีน *STAT4* นั้น ระบุว่ามีโอกาสที่ลดความรุนแรงของโรคเชื้อหุ้มสมองอักเสบจากภูมิคุ้มกัน (EAE) แต่ในทางกลับกันการลบยีน *IL-12* และ *IFN- γ* ที่เป็น upstream และ downstream ของ *STAT4* ตามลำดับนั้นกลับไม่ทำให้ความรุนแรงของโรคเบาลงเลย จึงคาดว่า *STAT4* นั้นอาจมีหน้าที่อย่างอื่นในกลไกการเกิดโรคแพ้ภูมิคุ้มกันตนเองที่ยังไม่ถูกค้นพบ (McWilliams et al., 2015) ยิ่งไปกว่านั้นการศึกษาก่อนหน้านี้ประสบความสำเร็จในการรักษาหนูที่เป็นโรคไตอักเสบลุบัสจากการใช้ *STAT4* antisense oligonucleotide (ASO) ในการยับยั้ง *STAT4* mRNA (Menke et al., 2011) อย่างไรก็ตาม การกวดการทำงานของ *STAT4* เฉพาะใน T หรือ B-cells กลับไม่ให้เกิดผลต่อการรักษา ดังนั้นจากข้อมูลข้างต้นผู้วิจัยจึงสันนิษฐานถึงบทบาทของ *STAT4* ในเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันชนิดอื่น คือ Dendritic cell ซึ่งยังไม่มีการศึกษาในก่อนหน้านี้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการแสดงออกของโปรตีน *STAT4* ใน Dendritic cell ของมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วย *IFN- β*
2. เพื่อศึกษาบทบาทของโปรตีน *STAT4* ใน Dendritic cell ของมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วย *IFN- β*

วิธีดำเนินการวิจัย

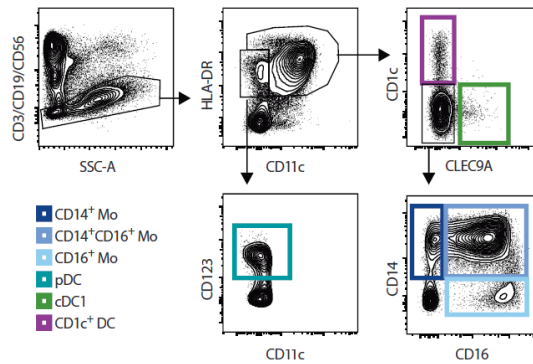
การแยก dendritic cell และการกระตุ้นด้วย *IFN- α* และ *IFN- β*

เมื่อดเลือดขาวที่กรองจากผู้บริจาคที่มีสุขภาพดี ภายใต้การควบคุมจากคณะกรรมการจริยธรรมจากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติสภากาชาดไทย (COA No. NBC 2/2021) จำนวน 6 ราย ถูกนำมาใช้ในการแยก PBMC โดยใช้หลักการปั่นเหวี่ยง (gradient centrifugation) เมื่อได้เซลล์ออกมาแล้ว ผู้วิจัยจะล้างเซลล์ด้วย RPMI ที่ผสมด้วย 10,000 U/mL penicillin และ 10,000 μ g/mL streptomycin (Gibco, Thermo-scientific) เซลล์ที่ได้จะนำไปเก็บใน 10% DMSO ใน Fetal bovine serum (FBS) จัดเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว จนกว่าถูกนำมาใช้งาน PBMC ที่ถูกแช่แข็งนี้จะถูกนำมาละลายและแยกเอา dendritic cell ออกมาโดยหลักการ negative selection magnetic beads ด้วยชุดสกัด EasySep™ Human Pan-DC Pre-Enrichment Kit (Stemcell technologies) โดยชุดตรวจจะแยกเซลล์ T-lymphocyte, B-lymphocyte, Macrophage, NK-cells, ILC cells ออกมา จากนั้นผู้วิจัยจะจำแนก subset ของ dendritic cell ด้วยเทคนิค flow cytometry sorting ออกเป็น pDC (HLA-DR⁺, CD123⁺), cDC1 (HLA-DR⁺, CD11c⁺, CLEC9A⁺), และ cDC2/3 (HLA-DR⁺, CD11c⁺, CD1c⁺) โดย dendritic cell แต่ละ subset จะถูกนำมาเลี้ยงกระตุ้นด้วย *IFN- β* (25 ng/ml) 15 นาที เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน *STAT4* และ p*STAT4* protein และ 18 ชั่วโมง เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *STAT4* เนื่องจาก *IFN- α* เป็น hallmark ของโรคภูมิแพ้ตนเอง ผู้วิจัยเปรียบเทียบการแสดงออกของ *STAT4* ใน DC อีกส่วนจะถูกเลี้ยงกระตุ้นด้วย *IFN- α* ใน condition เดียวกับ *IFN- β* เพื่อเปรียบเทียบผลของ type I IFN ต่อการแสดงออกของ *STAT4* และหลังจากครบเวลาสารน้ำที่ใช้เลี้ยงเซลล์จะถูกเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียสเพื่อใช้สำหรับการตรวจวัดไซโตไคน์

การแยก dendritic cell subsets ด้วย Flow cytometry sorting

Dendritic cell (3×10^6 cells) จะถูกนำมาล้างและผสมใน FACS buffer (10% FBS ใน PBS buffer) จากนั้นจะถูกย่อยด้วย antibodies ที่จำเพาะต่อ DC maker แต่ละชนิดดังนี้ anti-CD3 FITC (OKT3; Invitrogen), anti-CD19 FITC (HIB19; Invitrogen), anti-CD56 FITC (TULY56; Invitrogen), anti-HLA-DR APC (L243; Biolegend), anti-CD11c PE (3.9;

Invitrogen), anti-CD1c PE-CYN7 (L161; Invitrogen), anti-CLEAC9a APC-EF780 (9A11; Invitrogen), anti-CD123 PE/Dazzle 594 (6H6; Biolegend), anti-CD14 PerCP/Cy5.5 (M5E2; Biolegend), anti-CD16 Alexa flour 700 (B73.1; Biolegend), anti-CD80 Alexa Fluor 488 (2D10; Biolegend), and anti-CD86 APC (IT2.2; biolegend) โดยแสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แผนผังการเกทเซลล์ PBMC เพื่อแยกชนิดย่อยของ dendritic cell (สีฟ้าคือกลุ่มของ Monocyte (CD14, CD16), สีครามคือ pDC (CD123⁺), สีเขียวคือ cDC1 (CLEC9a⁺), สีม่วงคือกลุ่ม cDC2/3 (CD1c⁺) (Girard et al., 2020)

การวิเคราะห์โปรตีน STAT4 และ phosphorylated STAT4 (pSTAT4) ด้วย Western blotting และการวัดปริมาณโปรตีนด้วยเทคนิค Densitometry

Dendritic cell ที่ถูกกระตุ้นด้วย IFN- β แล้วจะถูกนำมาสกัดโปรตีนด้วย 8 M urea ใน 100 mM TEAB buffer (1X Proteinase + 1X Phosphatase inhibitor) จากนั้นตรวจวัดปริมาณโปรตีนที่ได้ทั้งหมดด้วยวิธี microBCA โปรตีนที่ถูกใช้งานทั้งหมดจะถูกแยกตามขนาดของโปรตีนโดยหลักการ SDS-PAGE ด้วยความต่างศักย์ 130 โวลต์ ที่เวลา 90 นาที จากนั้นจะถูก transfer ไปยัง nitrocellulose membrane โปรตีน Beta-actin STAT4 และ pSTAT4 จะถูกตรวจจับด้วย primary antibody 3 ชนิด คือ rabbit monoclonal anti-beta-actin (13E5) rabbit monoclonal anti-STAT4 (C46B10) (81 kDa) และ mouse monoclonal anti-pSTAT4 antibody (A19016A) (81 kDa) จากนั้นจะใช้ secondary antibodies 2 ชนิดเป็นตัวส่งสัญญาณ Fluorescent คือ anti-mouse antibody (800 nm) และ anti-rabbit antibody (680 nm) ในที่สุดสัญญาณจาก secondary antibodies จะถูกตรวจจับและวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Odyssey DLx imaging system (LI-COR) และวัดค่าปริมาณโปรตีนแบบ Semi-Quantitative ด้วยวิธี Densitometry

การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน STAT4 ด้วยหลักการ Real-time PCR

Dendritic cell ที่ถูกกระตุ้นด้วย IFN- β แล้วจะถูกนำมาสกัด RNA ด้วยชุดสกัด miRneasy kit manufacturer's protocol (Qiagen) RNA โดยดำเนินการตาม Protocol จากบริษัท จนท้ายที่สุด RNA ที่ได้จะถูกนำมาวัดคุณภาพและปริมาณด้วย nanodrop (ThermoScientific) จากนั้น RNA จะถูกนำมา reverse-transcribe เป็น cDNA ด้วย iScript Reverse

Transcription Supermix for RT-qPCR (Bio-rad) และวิเคราะห์การแสดงผลของยีนเทคนิค Real-time PCR ด้วยน้ำยา SSO Advanved Universal SYBR Green Supermix (Bio-rad) ด้วย primer ทั้งหมด 6 target gene ได้แก่ *GAPDH*, *TNFSF18*, *STAT4*, *IL-12*, *IL-23*, และ *IFN- γ*

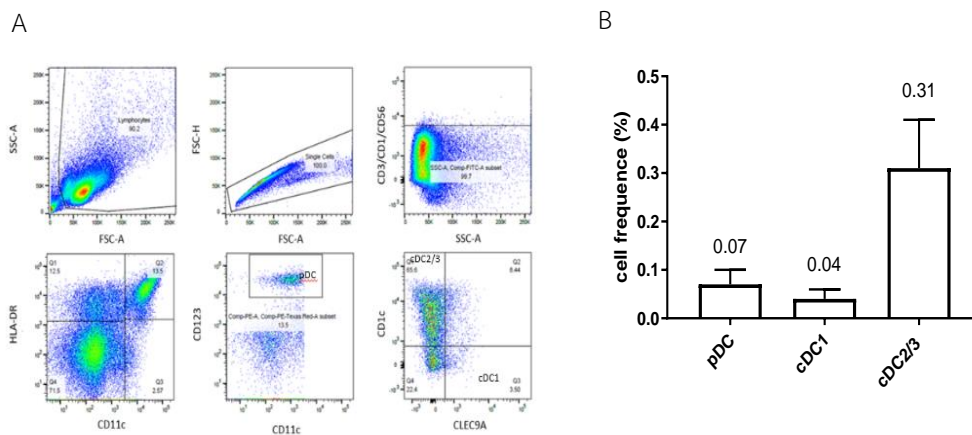
สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ผลการทดลอง

ปริมาณการแสดงผลของโปรตีนที่สนใจจะถูกรายงานออกมาเป็นค่าความหนาแน่นด้วยหลักการ Densitometry โดยค่าที่ออกมาของ pSTAT4 นั้นจะถูกนำมา normalize ด้วย total STAT4 อีกทีจนได้ผลออกมาเป็นค่า pSTAT4/STAT4 ratio ที่สามารถใช้เปรียบกันระหว่างกลุ่มตัวอย่างได้ ส่วนการเปรียบเทียบการแสดงผลของยีนระหว่างกลุ่มตัวอย่างนั้นจะใช้ตัวสถิติ student's t-test

ผลการวิจัย

ผลการแยกสกัดแยก Dendritic cell ออกจากถุง Buffy coat จากผู้บริจาคที่มีสุขภาพดี

เพื่อต้องการ dendritic cell ที่จะมาทำการทดลอง เบื้องต้นผู้วิจัยได้ทำการแยก dendritic cell ออกจากเลือดของผู้บริจาคที่มีสุขภาพดี จำนวน 6 ราย โดยใช้ชุด Pan-DC kit โดยอาศัย magnetic bead ที่ coated ด้วยแอนติบอดี CD3, CD9, CD14, CD16, CD19, CD34, CD56, CD66b, Glycophorin A แยกเซลล์กลุ่มอื่นๆออกมาก่อน เพื่อลดการปนเปื้อนของเซลล์ ก่อนที่จะนำมาแยก dendritic cell subset ต่างๆด้วย Flow sorting โดยใช้ antibody anti-CD3 FITC, CD19 FITC, anti-CD56 FITC, anti-HLA-DR APC, anti-CD11c PE, anti-CD1c PE-CY7, anti-CLEAC9a APC-EF780, anti-CD123 PE/Dazzle 594 (ภาพ 2C) โดยพบว่าปริมาณเซลล์ที่ได้ (ภาพ 1D) มีความใกล้เคียงกับค่าอ้างอิง (ตารางที่ 1)



ภาพที่ 2 ผลการสกัด dendritic cell A) PBMC (1×10^8 cells) ที่แยกโดยวิธี gradient density centrifugation จากผู้บริจาคสุขภาพดี 6 ราย จากนั้นเพิ่มความบริสุทธิ์ของเซลล์โดยใช้ magnetic isolation ก่อนนำมาเข้าเครื่อง flow cytometry sorting เพื่อแยกเก็บเซลล์ชนิดต่างๆ ข้างต้น B) เป็นแผนภูมิแสดงความถี่ของ Dendritic cell subsets ที่แยกจาก PBMC ของผู้บริจาคสุขภาพดี 6 ราย โดยการใช้ magnetic separation ร่วมกับ flow sorting

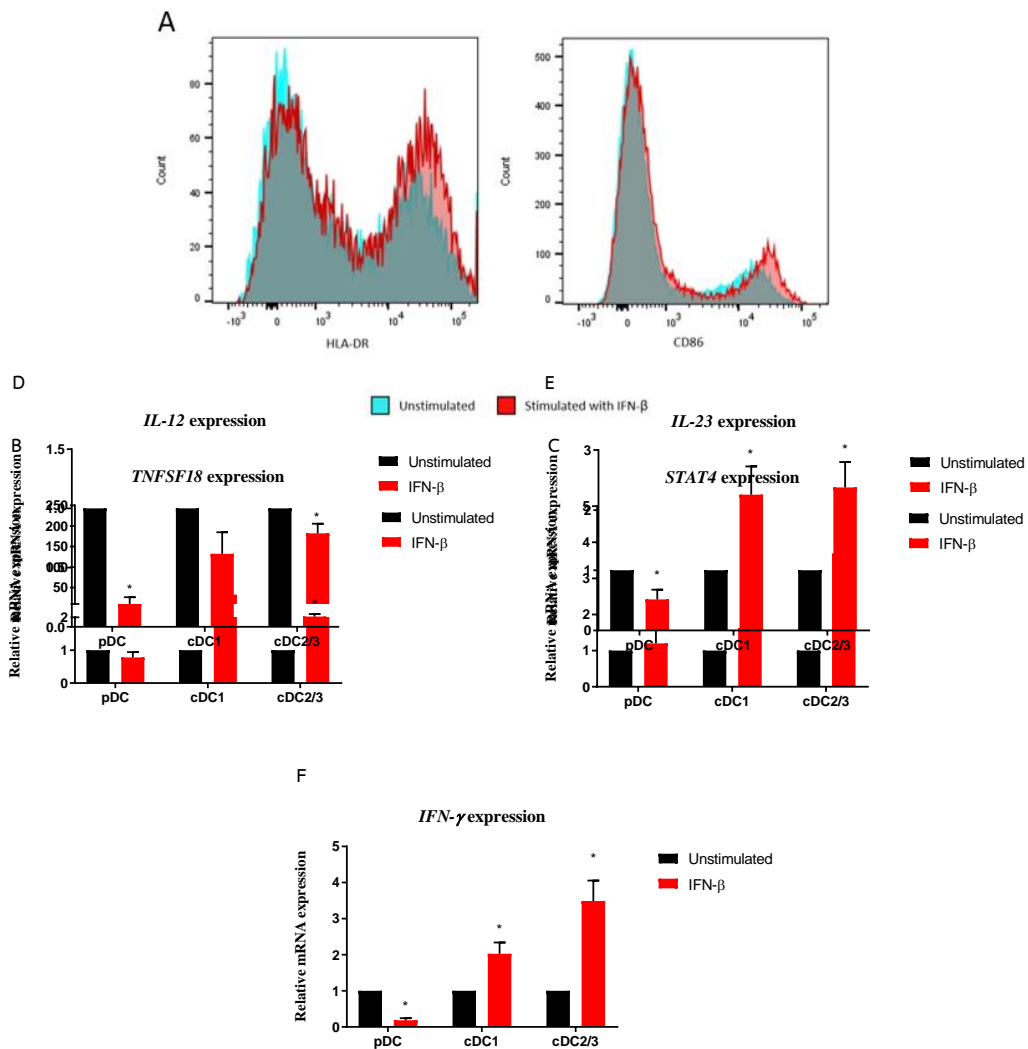
ตารางที่ 1 ช่วงปกติของความถี่ของ Dendritic cell และ Dendritic cell subsets

Cells	Normal range in healthy adult (%)
Dendritic cell (DC)	0.5-1
Conventional DCs	0.2-0.4
Plasmacytoid DCs	0.1-0.2

ผลการแสดงออกของยีน *STAT4* และยีนอื่นๆที่เป็น Downstream ของ *STAT4* หลังการถูกกระตุ้นด้วย *IFN-β*

เมื่อผู้วิจัยได้ dendritic cell ที่มีความเหมาะสมในการทำการทดลองแล้ว ผู้วิจัยได้นำเซลล์ดังกล่าวมากระตุ้นด้วย *IFN-β* พบว่า dendritic cell มีการแสดงออกของโปรตีน HLA-DR และ CD86 เพิ่มขึ้น (ภาพ 3A) แสดงถึง เซลล์ที่มีการ mature และพร้อมในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน จากการศึกษาก่อนหน้านี้ (Girard et al., 2020) พบว่า dendritic cell ที่ถูกกระตุ้นด้วย *IFN-β* ทำให้การแสดงออกของ *TNFSF18* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญใน dendritic cell ทั้งนี้เพื่อวัดประสิทธิภาพของ *IFN-β* ที่ใช้ ผู้วิจัยเลือกยีน *TNFSF18* เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ผลของการกระตุ้นด้วย *IFN-β* โดยผลการทดลองพบว่า การแสดงออกของยีน *TNFSF18* มีการแสดงออกสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มของ cDC1 และ cDC2/3 (ภาพ 3B) และ *STAT4* มีการแสดงออกสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เฉพาะในกลุ่มของ cDC2/3 เท่านั้น (ภาพ 3C)

เนื่องจาก *IFN-β* สามารถกระตุ้นการหลั่งของ Cytokine ได้หลายชนิด ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาการแสดงออกของยีน cytokine ที่มีความเกี่ยวข้องการกระตุ้นการอักเสบและอาจเป็น downstream ของ *STAT4* ได้ คือ *IL-12*, *IL-23* และ *IFN-γ* จากผลการศึกษาการแสดงออกของยีนดังกล่าวพบว่า *IL-12* มีการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มของ pDC และ cDC2/3 (ภาพ 3D) ส่วน *IL-23* และ *IFN-γ* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มของ cDC1 และ cDC2/3 (ภาพ 3E-F)



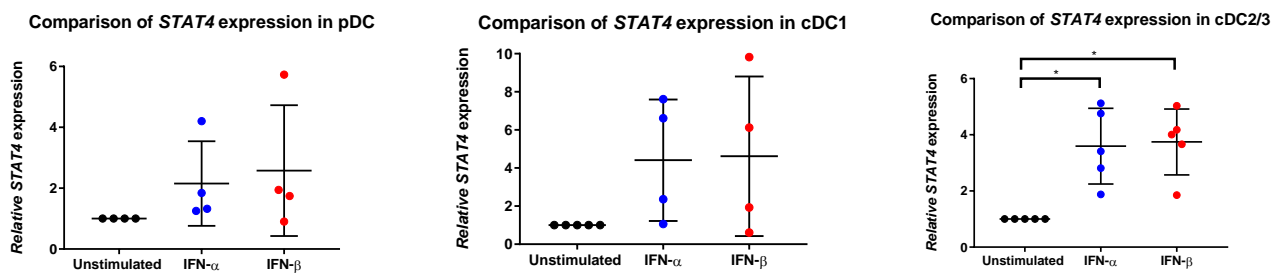
ภาพที่ 3 แสดงผลการกระตุ้นเซลล์ด้วย IFN- β (A) Flow histogram แสดงผลการแสดงออกของโปรตีน HLA-DR และ CD86 โดยวิธี flow cytometry สีแดงหมายถึง การถูกกระตุ้นด้วย IFN- β (B-F) แสดงสัดส่วนการแสดงออกของยีน *TNFSF18* (B), *STAT4* (C), *IL-12* (D), *IL-23* (E), *IFN- γ* (F) ใน DC เซลล์แต่ละชนิด โดยผู้วิจัย ได้ทำการสกัด RNA จาก pDC, cDC1, และ cDC2/3 จากผู้บริจาคที่มีสุขภาพดีทั้งหมด 6 ราย DC แต่ละชนิดจะถูกกระตุ้นด้วย 25 ng/ml เป็นเวลา IFN- β 18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Real-time PCR

* แสดงค่า นัยสำคัญทางสถิติ p-value < 0.05 โดยวิธี unpair student's t-Test ด้วยโปรแกรม Prism

ผลการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *STAT4* จากการกระตุ้นด้วย IFN- α และ IFN- β

เนื่องจากทั้ง IFN- α และ IFN- β จัดเป็น type-I IFN ที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้เช่นเดียวกัน และยิ่งไปกว่านั้นจากที่กล่าวมาแล้วว่ามีการศึกษามากมายยืนยันว่า IFN- α นั้นถือเป็น Hallmark ที่สำคัญในผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันและเป็น mediator ที่สำคัญใน JAK-STAT signaling pathway ทางผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษา

เปรียบเทียบความสามารถในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน *STAT4* ระหว่าง IFN- α และ IFN- β ผลการทดลองพบว่า IFN- β และ IFN- α สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ *STAT4* ได้ใกล้เคียงกัน โดย *STAT4* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่ม DC2/3 (ภาพที่ 4)

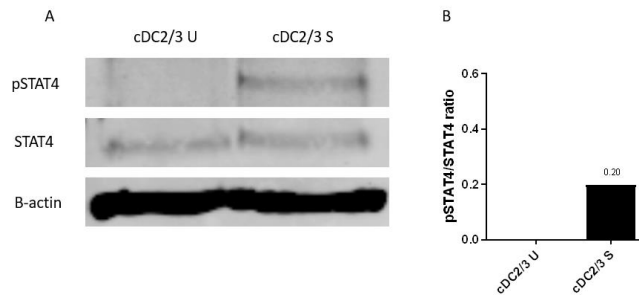


ภาพที่ 4 การเปรียบเทียบความสามารถในการกระตุ้นการแสดงออกของ *STAT4* ในแต่ละ subset ของ Dendritic cell โดย Unstimulated (สีดำ) IFN- α (สีน้ำเงิน) และ IFN- β (สีแดง) (ซ้าย; pDC, กลาง; cDC1, ขวา; cDC2/3)

* แสดงค่า นัยสำคัญทางสถิติ p-value < 0.05 โดยวิธี unpair student's t-Test ด้วยโปรแกรม Prism

การแสดงออกของโปรตีน *STAT4* และ phosphorylated *STAT4* ใน conventional DC2/3

จากผลการแสดงออกของยีน *STAT4* ที่สูงขึ้นเฉพาะในกลุ่ม cDC2/3 และข้อจำกัดด้านปริมาณเซลล์เดนไดรต์กลุ่มอื่น ผู้วิจัยจึงศึกษาการแสดงออกของโปรตีน *STAT4* ในกลุ่ม cDC2/3 เท่านั้น ผลการทดลองปรากฏว่า *STAT4* เกิดการ activated เมื่อถูกกระตุ้นด้วย IFN- β โดยผู้วิจัยตรวจพบปริมาณ p*STAT4* ในตัวอย่างเซลล์ที่ถูกกระตุ้น (ภาพ 5A และ B)



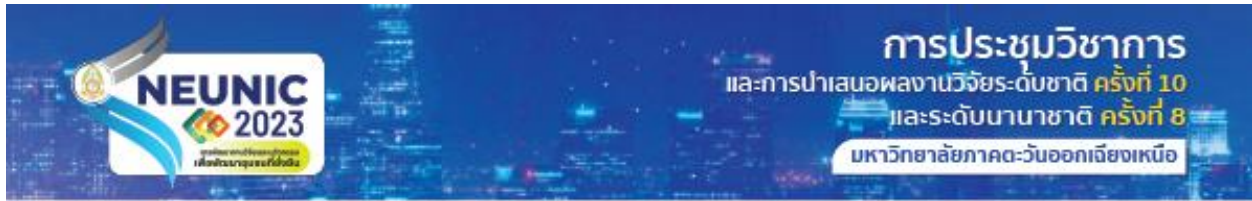
ภาพที่ 5 A) ผล Western blot cDC2/3 ที่แยกได้จากเลือดของผู้บริจาคจำนวน 3 ราย ที่กระตุ้นด้วย 25 ng/ml IFN- β เป็นเวลา 15 นาที โปรตีน phosphorylated STAT4 ขนาด 81 kDa และโปรตีน STAT4 ขนาด 81 kDa เปรียบเทียบกับ beta actin เป็น control โปรตีน B) ผลการวัด Densitometry ความเข้มของโปรตีน โดยเครื่อง Li-Cor Odyssey CLx และคำนวณเป็นอัตราส่วนระหว่าง pSTAT4/STAT4 พบว่า phosphorylated STAT4 สูงขึ้นใน activated cDC2/3

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

จากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า STAT4 จะถูกเหนี่ยวนำขึ้นใน dendritic cell ระยะ mature เท่านั้น (Maturation-dependent manner) หรือก็คือต้องถูกกระตุ้นด้วย Antigen จากภายนอก เช่น PAMPs (Pathogen associated molecular pattern) จากการติดเชื้อส่งผลให้มีการกระตุ้น pro-inflammatory cytokine มากมาย เช่น type-I IFN, IL-23, IL-2, IL-17, IL-35 ยิ่งไปกว่านั้นได้มีการศึกษาพบว่า pro-inflammatory cytokine เหล่านี้สามารถเหนี่ยวนำให้เกิด phosphorylated STAT4 ต่อไปได้อีกด้วย (Fukao et al., 2001; Yang et al., 2020)

อย่างไรก็ดีจากผลในงานวิจัยนี้ การทดลองกระตุ้น PBMC ของมนุษย์ด้วย IL-12 นั้นไม่สามารถกระตุ้นการ phosphorylated STAT4 ได้ซึ่งขัดแย้งกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ทำการศึกษากการ phosphorylation ของ STAT4 ในกลุ่ม peripheral blood monocyte และ monocyte-derived DCs ซึ่งจัดเป็นกลุ่ม Myeloid cell ของมนุษย์ พบว่าในสภาวะปกติที่ไม่ถูกกระตุ้นให้เป็น Mature cell ด้วย LPS และ/หรือ IFN- γ หรือแม้แต่ IL-12 ที่เป็น mediator หลักของ STAT4 ก็ไม่สามารถเหนี่ยวนำการเกิด phosphorylated STAT4 ในกลุ่มเซลล์นี้ได้ แต่เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นให้อยู่ใน mature state การ phosphorylation ของ STAT4 กลับสามารถถูกเหนี่ยวนำได้ด้วย IL-12 และ IFN- α (Frucht et al., 2000) ในทางกลับกันเซลล์ในกลุ่ม Lymphoid เช่น Lymphocyte สามารถถูกเหนี่ยวนำ phosphorylated STAT4 จากทั้ง IL-12 และ IFN- α ได้โดยไม่ต้องผ่านการ mature มาก่อน (Cho et al., 1996) นี่จึงแสดงให้เห็นว่ากลุ่มเซลล์ที่แตกต่างกันใน PBMC ของมนุษย์ มีเงื่อนไขและศักยภาพในการถูกเหนี่ยวนำให้เกิด phosphorylated STAT4 ได้ต่างกัน

จากงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่ศึกษาการแสดงออกของ STAT4 ใน DC subset ต่างๆจากเลือดของผู้บริจาคโดยตรง ผู้วิจัยพบว่าการกระตุ้น conventional dendritic cells 2/3 (cDC2/3) ด้วย IFN- β ทำให้มีการแสดงออกของ STAT4 เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งไม่สามารถพบใน DC subset อื่นๆ อาจมีสาเหตุมาจากการที่ IFN- β ไม่มีคุณสมบัติในการกระตุ้น Maturation ได้รุนแรงเทียบเท่ากับ LPS หรือ IFN- γ ที่ถูกนำมาศึกษาในงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Frucht et al., 2000) โดยแสดงให้เห็นจากภาพ 3A ที่มีการแสดงออกของ CD86 สูงขึ้นเพียงเล็กน้อยเทียบกับการไม่ถูกกระตุ้น ด้วยเหตุนี้จึงอาจส่งผลให้กลุ่มเซลล์



ส่วนใหญ่ไม่มีการแสดงออกของ phosphorylated STAT4 แต่ไม่ใช้กับ cDC2/3 ที่งานวิจัยก่อนหน้านี้ค้นพบว่าเป็น DC subset เดียวที่ตอบสนองต่อ IFN- β ได้ดีที่สุด สังเกตได้จากการแสดงออกของ *TNFSF18* (ภาพ 3B) ที่สูงมาก ซึ่งจัดเป็น maturation marker อย่างหนึ่งของ cDC (Girard et al., 2020) ด้วยเหตุนี้จึงบ่งบอกได้ว่า IFN- β กระตุ้น mature state ใน cDC2/3 ได้ดีที่สุดส่งผลให้มีการแสดงออกของ *STAT4 gene* อย่างมีนัยสำคัญ (ภาพ 3C) จากที่กล่าวมาข้างต้นได้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของ cDC2/3 ผ่าน *STAT4 pathway* ซึ่งไม่เพียงแต่การกระตุ้นให้เกิดโรคแพ้ภูมิตนเองที่สร้างความเสียหายให้กับเจ้าบ้านเท่านั้น แต่เนื่องด้วย *STAT4* เป็น regulator หลักของการสร้าง IFN- γ ที่ซึ่งสามารถกระตุ้นการ proliferation ของ Th1 ซึ่งอาจเป็นสาเหตุในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในผู้ป่วยได้ นอกจากนี้ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ศึกษาใน oral keratinocyte พบว่า *STAT4* สามารถกระตุ้นให้เกิดการหลั่ง IL-17 ได้ (Ge et al., 2020) ซึ่ง IL-17 นั้นเป็น Cytokine ที่หลั่งออกมาจาก Th17 ในกระแสเลือดโดยมีบทบาทสำคัญในพยาธิกำเนิดของโรคแพ้ภูมิตนเองหลายชนิด ดังนั้นการศึกษบทบาทของ phosphorylated *STAT4* ใน cDC2/3 ที่มีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการ CD4⁺ T-cells priming นั้นอาจสามารถอธิบายกลไกควบคุมการหลั่ง IL-17 ผ่านกลไก Th-17 differentiation ได้

ข้อเสนอแนะ

ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการทำงานของ *STAT4* transcription จากการถูกกระตุ้นด้วย IFN- β ใน cDC2/3 ซึ่งเป็น Dendritic cell ชนิดใหม่ที่สามารถถูกยืนยันได้โดยการแสดงออกของ GITRL protein ที่สูงมาก อีกทั้งยังมีความวิจัยยืนยันว่า cDC2/3 ที่สูงขึ้นนั้นสัมพันธ์กับความรุนแรงในผู้ป่วยที่เป็นโรค SLE และยังมีความสัมพันธ์กับการ Differentiate in vitro Th17 ในสภาวะที่มี Serum ของผู้ป่วย SLE อีกด้วย ด้วยเหตุนี้ถ้าผู้วิจัยจึงอยากเสนอแนะสำหรับการดำเนินงานในระยะต่อไปในส่วนของการศึกษบทบาทของ *STAT4* ใน dendritic cells จากผู้ป่วย SLE โดยตรง หรืออาจศึกษา *STAT4 SNP* ที่มีผลต่อการแสดงออกของ *STAT4* ในเดนไดรท์เซลล์ หรือการศึกษาความสามารถในการ polarize Th17 ในผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ตนเอง

กิตติกรรมประกาศ

ทุน Fundamental Fund ประจำปี 2565

ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านชีววิทยาเชิงระบบ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

- Athie-Morales, V., Smits, H. H., Cantrell, D. A., & Hilkens, C. M. (2004). Sustained IL-12 signaling is required for Th1 development. *J Immunol*, 172(1), 61-69. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.1.61>
- Cho, S. S., Bacon, C. M., Sudarshan, C., Rees, R. C., Finbloom, D., Pine, R., & O'Shea, J. J. (1996). Activation of *STAT4* by IL-12 and IFN- α : evidence for the involvement of ligand-induced tyrosine and serine phosphorylation. *J Immunol*, 157(11), 4781-4789.



- Dutertre, C. A., Becht, E., Irac, S. E., Khalilnezhad, A., Narang, V., Khalilnezhad, S., Ng, P. Y., van den Hoogen, L. L., Leong, J. Y., Lee, B., Chevrier, M., Zhang, X. M., Yong, P. J. A., Koh, G., Lum, J., Howland, S. W., Mok, E., Chen, J., Larbi, A., . . . Ginhoux, F. (2019). Single-Cell Analysis of Human Mononuclear Phagocytes Reveals Subset-Defining Markers and Identifies Circulating Inflammatory Dendritic Cells. *Immunity*, 51(3), 573-589.e578. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.08.008>
- Fierabracci, A. (2011). Recent insights into the role and molecular mechanisms of the autoimmune regulator (AIRE) gene in autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, 10(3), 137-143. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.autrev.2010.08.019>.
- Frucht, D. M., Aringer, M., Galon, J., Danning, C., Brown, M., Fan, S., Centola, M., Wu, C. Y., Yamada, N., El Gabalawy, H., & O'Shea, J. J. (2000). Stat4 is expressed in activated peripheral blood monocytes, dendritic cells, and macrophages at sites of Th1-mediated inflammation. *J Immunol*, 164(9), 4659-4664. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.9.4659>.
- Fukao, T., Frucht, D. M., Yap, G., Gadina, M., O'Shea, J. J., & Koyasu, S. (2001). Inducible expression of Stat4 in dendritic cells and macrophages and its critical role in innate and adaptive immune responses. *J Immunol*, 166(7), 4446-4455. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.7.4446>
- Ge, X., Xie, H., Nguyen, T., Zhao, B., Xu, J., & Du, J. (2020). Renin Promotes STAT4 Phosphorylation to Induce IL-17 Production in Keratinocytes of Oral Lichen Planus. *iScience*, 23(4), 100983. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.100983>.
- Girard, M., Law, J. C., Edilova, M. I., & Watts, T. H. (2020). Type I interferons drive the maturation of human DC3s with a distinct costimulatory profile characterized by high GITRL. *Sci Immunol*, 5(53). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abe0347>
- Guilliams, M., Mildner, A., & Yona, S. (2018). Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity*, 49(4), 595-613. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.10.005>.
- Hussein, H. M., & Rahal, E. A. (2019). The role of viral infections in the development of autoimmune diseases. *Critical Reviews in Microbiology*, 45(4), 394-412. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2019.1614904>
- Lamana, A., López-Santalla, M., Castillo-González, R., Ortiz, A. M., Martín, J., García-Vicuña, R., & González-Álvaro, I. (2015). The Minor Allele of rs7574865 in the STAT4 Gene Is Associated with Increased mRNA and Protein Expression. *PLoS One*, 10(11), e0142683. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142683>
- Li, Q., Eppolito, C., Odunsi, K., & Shrikant, P. A. (2006). IL-12-programmed long-term CD8+ T cell responses require STAT4. *J Immunol*, 177(11), 7618-7625. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.11.7618>
- Liang, Y., Pan, H. F., & Ye, D. Q. (2014). Therapeutic potential of STAT4 in autoimmunity. *Expert Opin Ther Targets*, 18(8), 945-960. <https://doi.org/10.1517/14728222.2014.920325>



- López, P., Rodríguez-Carrio, J., Caminal-Montero, L., Mozo, L., & Suárez, A. (2016). A pathogenic IFN α , BlyS and IL-17 axis in Systemic Lupus Erythematosus patients. *Sci Rep*, 6, 20651. <https://doi.org/10.1038/srep20651>.
- McWilliams, I. L., Rajbhandari, R., Nozell, S., Benveniste, E., & Harrington, L. E. (2015). STAT4 controls GM-CSF production by both Th1 and Th17 cells during EAE. *J Neuroinflammation*, 12, 128. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0351-3>.
- Menke, J., Bork, T., Kutska, B., Byrne, K. T., Blanfeld, M., Relle, M., Kelley, V. R., & Schwarting, A. (2011). Targeting transcription factor Stat4 uncovers a role for interleukin-18 in the pathogenesis of severe lupus nephritis in mice. *Kidney Int*, 79(4), 452-463. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.438>.
- Miyagi, T., Gil, M. P., Wang, X., Louten, J., Chu, W. M., & Biron, C. A. (2007). High basal STAT4 balanced by STAT1 induction to control type 1 interferon effects in natural killer cells. *J Exp Med*, 204(10), 2383-2396. <https://doi.org/10.1084/jem.20070401>.
- Oparina, N., Martínez-Bueno, M., & Alarcón-Riquelme, M. E. (2019). An update on the genetics of systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol*, 31(6), 659-668. <https://doi.org/10.1097/bor.0000000000000654>.
- Schmitt, N., Morita, R., Bourdery, L., Bentebibel, S. E., Zurawski, S. M., Banchereau, J., & Ueno, H. (2009). Human dendritic cells induce the differentiation of interleukin-21-producing T follicular helper-like cells through interleukin-12. *Immunity*, 31(1), 158-169. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.04.016>
- Shao, W. H., & Cohen, P. L. (2011). Disturbances of apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis research & therapy*, 13(1), 202. <https://doi.org/10.1186/ar3206>.
- Ueno, H. (2020). The IL-12-STAT4 axis in the pathogenesis of human systemic lupus erythematosus. *Eur J Immunol*, 50(1), 10-16. <https://doi.org/10.1002/eji.201948134>.
- Wang, C., Sandling, J. K., Hagberg, N., Berggren, O., Sigurdsson, S., Karlberg, O., Rönnblom, L., Eloranta, M. L., & Syvänen, A. C. (2013). Genome-wide profiling of target genes for the systemic lupus erythematosus-associated transcription factors IRF5 and STAT4. *Ann Rheum Dis*, 72(1), 96-103. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-201364>.
- Yamamoto, K., Shibata, F., Miyasaka, N., & Miura, O. (2002). The human perforin gene is a direct target of STAT4 activated by IL-12 in NK cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 297(5), 1245-1252. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(02\)02378-1](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(02)02378-1).
- Yang, C., Mai, H., Peng, J., Zhou, B., Hou, J., & Jiang, D. (2020). STAT4: an immunoregulator contributing to diverse human diseases. *Int J Biol Sci*, 16(9), 1575-1585. <https://doi.org/10.7150/ijbs.41852>



- Yang, Z., Chen, M., Fialkow, L. B., Ellett, J. D., Wu, R., & Nadler, J. L. (2003). Inhibition of STAT4 activation by lisofylline is associated with the protection of autoimmune diabetes. *Ann N Y Acad Sci*, 1005, 409-411. <https://doi.org/10.1196/annals.1288.069>.
- Yu, C. F., Peng, W. M., Oldenburg, J., Hoch, J., Bieber, T., Limmer, A., Hartmann, G., Barchet, W., Eis-Hübinger, A. M., & Novak, N. (2010). Human plasmacytoid dendritic cells support Th17 cell effector function in response to TLR7 ligation. *J Immunol*, 184(3), 1159-1167. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901706>.