

Aus dem Institut für Immunologie
(Direktor: Prof. Dr. Alexander Scheffold)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Modulation der Funktion humaner regulatorischer T-Zellen durch den Notch-Signalweg

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Anne Rieke Bickenbach
aus Kiel

Kiel 2024

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Alexander Scheffold

2. Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Katja Klausz

Tag der mündlichen Prüfung: 30.09.2025

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 11.07.2025

gez.: Prof. Dr. Alexander Scheffold

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.2 T-Zellen	1
1.2.1 T-Zell Aktivierung	3
1.3 Kontrolle der adaptiven Immunantwort	4
1.3.1 Regulatorische T-Zellen	4
1.3.1.1 Wirkungsweisen von regulatorischen T-Zellen	5
1.3.2 IL-10 als inhibitorisches Zytokin	7
1.3.2.1 Regulation der IL-10-Expression in T-Zellen	8
1.3.3 Coinhibitorische Rezeptoren	9
1.3.3.1 Coinhibitorische Rezeptoren in T-Zellen	9
1.4 ADAM-Proteasen	11
1.4.1 ADAM-Proteasen in Immunzellen	13
1.5 Der Notch-Signalweg	14
1.5.1 Ablauf des Notch-Signalweges	14
1.5.2 Bedeutung von Notch für T-Zellen	16
1.5.2.1 Einfluss des Notch-Signalweges auf regulatorische T-Zellen	17
1.6 Fragestellung	19
2 Material und Methoden	20
2.1 Verwendete Materialien	20
2.2 Methoden	27
2.2.1 Zellisolation	27
2.2.1.1 Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes aus Leukozyten Kegeln ...	27
2.2.1.2 Isolation von PBMCs aus peripheren EDTA-Blutproben	27
2.2.2 Magnetische Zellsortierung (MACS)	28
2.2.2.1 Verwendung von MACS zur Anreicherung von Zellpopulationen	28
2.2.3 Isolation und Analyse von Zellen mittels Durchflusszytometrie	29
2.2.3.1 FACS-Isolation von naiven und <i>memory</i> konventionellen T-Zellen	30

2.2.3.2	FACS-Isolation von regulatorischen T-Zellen.....	30
2.2.4	Zellkultur	31
2.2.4.1	Aktivierung der konventionellen T-Zellen über ihren T-Zellrezeptor	32
2.2.4.2	Herstellung der CD3/CD28/CD2-MACSiBeads	32
2.2.4.3	Aktivierung des Notch-Signalweges.....	32
2.2.4.4	Ansetzen und Verlauf der konventionellen T-Zellkulturen	33
2.2.4.5	Ansetzen und Verlauf der Treg-Kulturen	34
2.2.5	Inhibition des Notch-Signalweges durch ADAM-Inhibitoren	34
2.2.6	Zellfärbung	34
2.2.6.1	Färbung zur Bestimmung der Zellviabilität	35
2.2.6.2	Oberflächen-Färbungen.....	36
2.2.6.3	Intrazelluläre Färbungen	36
2.2.6.4	Intranukleäre Färbungen	37
2.2.6.5	Entfernung von Zellfärbungen durch <i>REAlase</i>	37
2.2.7	Analyse der mRNA-Expression	37
2.2.7.1	RNA-Isolation	38
2.2.7.2	RNA-Isolation zur Durchführung einer qPCR und Ablauf der qPCR	38
2.2.7.3	Synthese von cDNA.....	38
2.2.7.4	Quantitative Echtzeit-PCR.....	39
2.2.7.5	RNA-Isolation zur T-Zell Sequenzierung.....	40
2.2.8	Messung der Zytokin-Konzentration im Überstand via <i>MACSPlex</i>	40
2.2.9	Datenverarbeitung, Statistik und Abbildungen	41
3	Ergebnisse	42
3.1	Bedeutung des Notch-Signalweges für die Funktion von Tregs.....	42
3.1.1	Der Einfluss verschiedener Kulturbedingungen auf die Notch-Rezeptor-Expression	43
3.2	Expression der ADAM-Proteasen 10 und 17 in verschiedenen T-Zelltypen.....	46
3.3	Interaktion zwischen Notch-Rezeptor und -Liganden	48
3.3.1	Aktivierung von Notch-Zielgenen in konventionellen T-Zellen.....	50
3.4	Expression von c-Maf und IL-10 in T-Zellen.....	52
3.4.1	Expression und Sekretion von IL-10 durch CD4+ T-Zellen	54
3.5	Übertragung der Untersuchungen auf regulatorische T-Zellen	58
3.5.1	Von Tregs exprimierte Notch-1 Rezeptoren interagieren mit DLL4	58
3.5.2	Expression von c-Maf in Tregs	59
3.5.3	Einfluss der Kulturbedingungen auf die IL-10 Sekretion von Tregs	61

3.6	Inhibition von ADAM-Proteasen	63
3.6.1	ADAM-Inhibitoren haben einen geringen Einfluss auf die Notch-1-Expression	63
3.6.2	Die Expression von Notch-Zielgenen wird durch ADAM-Inhibitoren beeinflusst	64
3.6.3	Einfluss der Inhibitoren auf die c-Maf- und IL-10-Expression.....	65
3.7	Die Expression coinhibitorischer Rezeptoren in Abhängigkeit von Notch und Zytokinen...	69
3.7.1	Die Expression verschiedener coinhibitorischer Rezeptoren in konventionellen T-Zellen	69
3.7.2	Die Expression verschiedener coinhibitorischer Rezeptoren in regulatorischen T-Zellen	73
4	Diskussion	78
4.1	Expression verschiedener Notch-Rezeptoren in CD4+ Zellen	78
4.2	Beeinflussung des Notch-Signalweges auf Ebene der S2-Spaltung	79
4.3	Veränderte Notch-Rezeptor-Oberflächenexpressionen sprechen für eine Interaktion und Aktivierung des Notch-Signalweges.....	81
4.4	IFN- α /IL-6/IL-21/DLL4-vermittelte Induktion von IL-10 in konventionellen T-Zellen	82
4.5	Das von T-Zellen produzierte IL-10 zeigt eine suppressive Wirkung auf mit LPS-stimulierte Monozyten	84
4.6	Induktion coinhibitorischer Rezeptoren in konventionellen T-Zellen	85
4.7	Die Effekte des IFN- α /IL-6/IL-21/DLL4-Kultursystems auf regulatorische T-Zellen	87
4.7.1	Die Rolle von c-Maf in der Induktion von IL-10 in regulatorischen T-Zellen	87
4.7.2	Eine Kultivierung mit IFN- α /IL-6/IL-21/DLL4 vermittelt auch in regulatorischen T-Zellen eine Induktion von IL-10.....	88
4.7.3	Beeinflussung der Expression coinhibitorischer Rezeptoren in Tregs.....	90
4.8	Inhibition des Notch-Signalweges durch ADAM-Inhibitoren.....	93
4.9	Ausblick	96
5	Zusammenfassung.....	98
6	Abkürzungsverzeichnis.....	100
7	Literaturverzeichnis.....	104
8	Anhang	117
9	Veröffentlichungen.....	121
10	Danksagung	122

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Wirkungsweisen von regulatorischen T-Zellen	7
Abbildung 2:	Aufbau humaner ADAM-Proteasen.....	12
Abbildung 3:	Der Notch-Signalweg.....	16
Abbildung 4:	FACS-Isolation von <i>memory</i> und naiven T-Zellen.....	31
Abbildung 5:	<i>Gating</i> -Strategie am Beispiel einer Färbung auf regulatorischen T-Zellen	35
Abbildung 6:	Übersicht über die Zellgewinnung, Kultivierung und Analyse	42
Abbildung 7:	Notch-Expression in totalen CD4+ Zellen.....	44
Abbildung 8:	Notch-Expression in verschiedenen T-Zelltypen.....	45
Abbildung 9:	ADAM10/ 17-Expression in verschiedenen T-Zelltypen	46
Abbildung 10:	Tetraspanin-Expression verschiedener T-Zelltypen	47
Abbildung 11:	iRhom-Expression verschiedener T-Zelltypen	48
Abbildung 12:	Expression von c-Maf und Notch-1 in konventionellen T-Zellen unter verschiedenen Kulturbedingungen	50
Abbildung 13:	Induktion der Expression von <i>HES-1</i>	51
Abbildung 14:	Expression von c-Maf in konventionellen T-Zellen	54
Abbildung 15:	IL-10-Expression und Produktion durch konventionelle T-Zellen.....	56
Abbildung 16:	Notch-1-Expression in regulatorischen T-Zellen.....	59
Abbildung 17:	c-Maf-Expression in regulatorischen T-Zellen	60
Abbildung 18:	IL-10-Produktion durch regulatorische T-Zellen.....	62
Abbildung 19:	Einfluss der ADAM-Inhibitoren GI254023X und GW280264X auf die Notch- Expression.....	64
Abbildung 20:	Einfluss der ADAM-Inhibitoren GI254023X und GW280264X auf die Aktivierung des Notch-Signalweges.....	65
Abbildung 21:	Einfluss der ADAM-Inhibitoren GI und GW auf die IL-10 und c-Maf-Expression .	68
Abbildung 22:	Expression coinhibitorischer Rezeptoren durch konventionelle T-Zellen.....	72
Abbildung 23:	Expression coinhibitorischer Rezeptoren durch regulatorische T-Zellen.....	76
Abbildung 24:	Expression der coinhibitorischen Rezeptoren auf RNA-Ebene in regulatorischen und konventionellen T-Zellen.....	77

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verwendete Geräte	20
Tabelle 2:	Verwendete Labor- und Verbrauchsmaterialien.....	21
Tabelle 3:	Verwendete Chemikalien/ Lösungen	22
Tabelle 4:	Verwendete Zellkulturmaterialien.....	22
Tabelle 5:	Verwendete Puffer, Lösungen und Nährmedien	23
Tabelle 6:	Verwendete <i>Kits</i>	24
Tabelle 7:	Verwendete Zytokine und Stimulanzen	24
Tabelle 8:	Verwendete Antikörper	25
Tabelle 9:	Verwendete <i>Primer</i>	26
Tabelle 10:	Verwendete <i>Software</i>	26
Tabelle 11:	<i>MACSiBeads</i>	32
Tabelle 12:	Konditionen	33
Tabelle 13:	Reaktionsmix cDNA <i>Kit</i>	38
Tabelle 14:	Temperaturprofil <i>Thermocycler</i>	39
Tabelle 15:	Temperaturprofil <i>Real-Time-PCR</i>	39
Tabelle 16:	Reaktionsmix <i>Real-Time-PCR</i>	39

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem dient dem Körper als Schutz vor potenziell schädlichen Zellen, Organismen und Substanzen, denen er teilweise tagtäglich ausgesetzt ist. Darüber hinaus spielt es eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Toleranz körpereigener und ungefährlicher körperfremder Strukturen, wofür die Fähigkeit des Immunsystems zwischen selbst und nicht-selbst unterscheiden zu können, essenziell ist (Chaplin, 2010). Um diese Aufgaben zu erfüllen, hat sich im Laufe der menschlichen Evolution ein komplexes zelluläres und molekulares System entwickelt (beschrieben in Chaplin, 2010).

Teil des zellulären Systems sind die Lymphozyten. Diese können in die im Knochenmark reifenden B-Lymphozyten und die im Thymus reifenden T-Lymphozyten, welche sich in der Struktur ihrer Antigenrezeptoren und Funktion unterscheiden, eingeteilt werden (Murphy und Weaver, 2018 S. 31).

Sowohl B-Lymphozyten als auch T-Lymphozyten tragen auf ihrer Oberfläche Rezeptoren einer einzigen Spezifität. Diese Rezeptoren entstehen durch zufällige Kombination variabler Rezeptorgensegmente und Zusammenlagerung verschiedener variabler Proteinketten zu Antikörpern (Immunglobuline). Die zufälligen Rekombinationsprozesse führen zu einer hohen Diversität der Rezeptorspezifitäten von B- und T-Zellen, die nahezu alle möglichen Antigenstrukturen erkennen können (Murphy und Weaver, 2018 S. 31). Kommt es zu einem adäquaten Antigenkontakt reagieren und proliferieren nur antigenspezifische T- und B-Lymphozyten. In Folge der Aktivierung produzieren B-Lymphozyten lösliche Immunglobuline (Ig), welche zum humoralen Teil des adaptiven Immunsystems zählen und mit deren Hilfe extrazelluläre Pathogene phagozytiert, lysiert oder neutralisiert werden können (Murphy und Weaver, 2018 S. 34ff). T-Lymphozyten können als zytotoxische T-Zellen ähnlich wie die Zellen des angeborenen Immunsystems von Pathogenen befallene Zellen eliminieren oder als T-Helfer Zellen andere Immunzellen aktivieren und sind so indirekt an der humoralen und zellulären Immunität beteiligt (Murphy und Weaver, 2018 S. 36ff).

1.2 T-Zellen

T-Lymphozyten (T-Zellen) sind einer der Hauptakteure des adaptiven Immunsystem. Alle T-Zellen entwickeln sich im Thymus, können aber anhand des von ihnen exprimierten T-Zell Rezeptors (TCR) sowie verschiedener Oberflächenmoleküle in verschiedene Subpopulationen unterteilt werden. T-Zellen verlassen den Thymus zunächst als ruhende, naive (ungeprägte) T-Zellen, welche aufgrund der von ihnen exprimierten Oberflächenrezeptoren C-C Chemokinrezeptor Typ 7 (CCR7) und *Cluster of Differentiation* 62L (CD62L) die Fähigkeit besitzen durch sekundäre lymphatische Organe (SLO) zu wandern. Sie sind jedoch noch nicht in der Lage, eine Reaktion hervorzurufen, die vor einer Infektion

schützen könnte (Pennock et al., 2013). Um diese Fähigkeit zu erwerben, müssen naive T-Zellen zunächst zu T-Effektorzellen (*memory* T-Zellen) differenzieren, welche anders als naive T-Zellen nicht den Rezeptor CD45RA, sondern CD45RO exprimieren. Zusätzlich exprimieren sie verschiedene für ihre Subtypen spezifische Adhäsionsmoleküle und Chemokinrezeptoren, die ihnen neben dem Eintritt in SLO auch den Eintritt in nicht-lymphatische Organe ermöglichen (Pennock et al., 2013).

Ein Oberflächenmolekül, welches alle reifen T-Zellen exprimieren ist der CD3 Komplex. Dieser besteht aus den γ -, δ -, ϵ -, und ζ -Untereinheiten und ist mit dem T-Zell-Rezeptor assoziiert (Pennock et al., 2013). Der TCR ist ein aus 2 Ketten bestehendes Heterodimer, wobei die Zusammensetzung dieser Ketten eine Einteilung der T-Zellen in zwei Typen ermöglicht. Handelt es sich bei den zwei Ketten um eine α - und eine β -Kette, spricht man bei der exprimierenden T-Zelle von einer $\alpha\beta$ -T-Zelle. Besteht der TCR hingegen aus einer γ - und einer δ -Kette spricht man von einer $\gamma\delta$ -T-Zelle (Hayday, 2009). Jede T-Zellrezeptor-Kette enthält eine variable und eine konstante Region. Durch somatische Rekombination der variablen Kette entstehen unterschiedliche spezifische Antigenbindungsstellen. Der T-Zellrezeptor erkennt Antigene, welche von antigenpräsentierenden Zellen (APCs), wie vor allem dendritischen Zellen (DC), aber auch B-Zellen und Makrophagen präsentiert werden. Die Erkennung ist dabei insofern limitiert, als dass die Präsentation zusammen mit einem Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC-Molekül) erfolgen muss. Entscheidend dafür welches MHC-Molekül (MHC-I oder -II) benötigt wird, ist dabei der mit dem TCR assoziierte CD4 oder CD8 Co-Rezeptor, welcher eine weitere Unterscheidung der TCR-tragenden Zellen in T-Helferzellen (CD4+) und zytotoxische T-Zellen (CD8+) ermöglicht (Pennock et al., 2013).

CD4+ T-Helferzellen (T_H -Zellen) erkennen über MHC-II präsentierte Antigene. MHC-II Moleküle werden von den meisten antigenpräsentierenden Zellen exprimiert und präsentieren von diesen aus dem Extrazellulärraum per Phagozytose aufgenommene Peptide (Murphy und Weaver, 2018 S.36). CD4+ T-Zellen unterstützen die Immunreaktion daraufhin durch die Produktion von Zytokinen und Chemokinen, die entweder benachbarte Zellen dazu aktivieren bestimmte Funktionen auszuführen (Zytokine) oder weitere Immunzellen zum Ort der Immunreaktion rekrutieren (Chemokine) (Pennock et al., 2013). Je nach produzierten Zytokinmuster können verschiedene Untergruppen von T-Helferzellen unterschieden werden. T_H1 -Zellen sind vor allem für die Beseitigung von intrazellulären Mikroorganismen in Makrophagen verantwortlich. Sie sind gekennzeichnet durch die Produktion von IFN- γ , welches wiederum die antimikrobielle Aktivität von befallenen Makrophagen stimuliert. T_H2 -Zellen synthetisieren hingegen IL-4, IL-5 und IL-13 und tragen insbesondere dazu bei Infektionen durch Helminthen, aber auch andere extrazelluläre Parasiten zu kontrollieren. Dies tun sie, indem sie die Reaktion von eosinophilen Zellen und Mastzellen sowie die Bildung von IgE Antikörpern unterstützen (Murphy und Weaver, 2018 S. 479). Eine weitere wichtige T_H -Zell Subgruppe sind die sogenannten T_H17 -Zellen, welche neben den namensgebenden IL-17A und IL-17F auch IL-22

produzieren. T_H17-Zellen verstärken die Reaktion neutrophiler Zellen, welche zur Beseitigung extrazellulärer Bakterien und Pilze beitragen (Murphy und Weaver, 2018 S.481). Neben den bisher beschriebenen aktivierend wirkenden T-Zellen gibt es auch CD4⁺ T-Zellen, die T-Zell-Antworten unterdrücken. Diese sogenannten regulatorischen T-Zellen (Tregs) (siehe auch Abschnitt 1.3.1) begrenzen Immunantworten und verhindern Autoimmunität.

1.2.1 T-Zell Aktivierung

Für eine vollständige T-Zell Aktivierung wird neben der Erkennung eines passenden Antigens und MHC-Moleküls zusätzlich ein costimulatorisches Signal benötigt. Dieses wird durch Ligation von CD28 auf dem T-Lymphozyt und seinen u.a. auf dendritischen Zellen exprimierten Liganden CD80 und CD86 (B7 Familie) übermittelt (Segura und Villadangos, 2009). In Abwesenheit eines solchen costimulatorischen Signals kann die Erkennung eines Antigens in der T-Zelle einen Zustand der Anergie auslösen, in welchem die T-Zelle nicht mehr aktiviert werden kann (Pennock et al., 2013). Dies spielt insbesondere bei der Inhibition autoreaktiver T-Zellen zur Erhaltung der peripheren Toleranz eine Rolle (Appleman und Boussiotis, 2003; Pennock et al., 2013).

Nach Bindung des Antigen-MHC-Komplexes an den TCR und CD4/CD8 kommt es zur Rekrutierung der mit dem Co-Rezeptor assoziierten Lymphozyten-spezifischen Protein-Tyrosinkinase (Lck) und somit zur Phosphorylierung der Immunrezeptor-Tyrosin-basierten Aktivierungssequenzen (ITAM-Sequenzen) des CD3 Moleküls. Diese Phosphorylierung wird über mehrere Zwischenschritte bis in den Nukleus transduziert. Durch verschiedene Transkriptionsfaktoren wie *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NFκB), *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) und Aktivator-Protein-1 (AP-1) kommt es zur Transkription von für Proliferation, Effektorfunktionen und Differenzierung verantwortlichen Genen (Conley et al., 2016). Zusammen mit den sogenannten costimulatorischen Signalen führt dies zur antigenspezifischen klonalen Expansion von T-Zellen (Murphy und Weaver, 2018 S.473-76).

Das wichtigste proliferationsfördernde, vor allem von T-Zellen produzierte und autokrin wirkende Zytokin ist Interleukin-2 (IL-2). Dieses bindet an den aus drei Untereinheiten (α , β und γ) bestehenden T-Zellrezeptor und führt über verschiedene Signalkaskaden zur Proliferation und Differenzierung von T-Lymphozyten. Weiterhin stimuliert es in T-Zellen die Produktion verschiedener Interleukine und Interferone (Ross und Cantrell, 2018; Spolski et al., 2018). Während die β - und γ -Untereinheiten des Rezeptors konstitutiv auf T-Zellen exprimiert werden, wird die α -Untereinheit erst nach der T-Zell Aktivierung exprimiert und führt zur Bildung eines deutlich affineren Rezeptors.

1.3 Kontrolle der adaptiven Immunantwort

Während das Immunsystem den Körper vor einer Infektion schützt, muss dieser zugleich vor Angriffen und Schäden durch das eigene Immunsystem geschützt werden. Solche Schäden können im Rahmen einer Allergie, also einer unangemessenen Reaktion des Immunsystems auf ein nicht pathogenes Antigen, einer chronischen Entzündung mit Gewebeschädigung oder einer gegen Bestandteile des eigenen Körpers gerichteten Autoimmunität auftreten (Kane et al., 2014).

Um solche Reaktionen zu verhindern und gleichzeitig einen ausreichenden Schutz des Körpers zu gewährleisten, hat sich ein komplexes System aus vielfältigen regulatorischen Mechanismen entwickelt.

1.3.1 Regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen spielen eine entscheidende Rolle für die Immunhomöostase, indem sie T-Zell-Antworten insbesondere auf auto-Antigene unterdrücken und Immunantworten begrenzen (Caramalho et al., 2015).

Nach ihrem Ursprung unterscheidet man drei verschiedene Treg Populationen (Shevach und Thornton, 2014). Natürliche regulatorische Tregs (nTregs), die den größten Anteil bilden, gehen wie die anderen T-Zell Subtypen im Thymus aus CD4, CD8 doppelpositiven Thymozyten hervor (Murphy und Weaver, 2018 S.426). Sie entwickeln sich aus $\alpha\beta$ -TCR exprimierenden T-Zellen, welche sich im Thymus dadurch auszeichnen, dass sie an MHC-Moleküle gebundene Selbstpeptide mit einer höheren Avidität als andere T-Zellen binden. Diese höhere Avidität ist dabei jedoch nicht so hoch, als dass es zur Deletion durch negative Selektion kommt (Lucca und Dominguez-Villar, 2020; Sakaguchi, 2004). nTregs finden sich vor allem im Blutkreislauf sowie in Lymphknoten, wo sie hauptsächlich an der Toleranz gegenüber Autoantigenen beteiligt sind (Sakaguchi et al., 2008).

Eine weitere natürlich vorkommende Gruppe von Tregs sind die so genannten peripheren Tregs (pTregs), welche sich in der Peripherie unter Einfluss von IL-2 und TGF- β aus konventionellen T-Zellen entwickeln können (Shevyrev und Tereshchenko, 2020). Sie kommen vor allem in peripheren Barrieren, wie der Haut und der Darmmukosa vor, wo eine ihrer Hauptfunktionen die Regulation von Immunantworten gegen die kommensale Mikroflora sowie gegen in den mucosalen Geweben des Darms vorkommende Mikroorganismen ist (Murphy und Weaver, 2018 S.488; Shevyrev und Tereshchenko, 2020). Zusammen machen die nTregs und pTregs 5-10 % der zirkulierenden CD4⁺ T-Zellen im Kreislauf aus (Murphy und Weaver, 2018 S.487).

Eine weitere Treg Gruppe stellen die induzierten Tregs (iTregs) dar, welche sich *in vitro* in Anwesenheit von TGF- β aus konventionellen T-Zellen entwickeln können. Inwiefern diese Treg Gruppe die Eigenschaften der *in vivo* generierten nTregs und pTregs widerspiegelt, ist noch nicht vollständig geklärt (Shevach und Thornton, 2014).

Allen Treg Gruppen gemein ist die Expression des Transkriptionsfaktors *Forkhead-Box-Protein P3* (FoxP3), welcher für Entwicklung und Funktion der Tregs von besonderer Bedeutung ist. Während bisher noch keine für nTregs oder pTregs spezifische Marker gefunden werden konnten, unterscheiden sich die verschiedenen Treg Gruppen insbesondere in der Stabilität der Expression von FoxP3 (Shevyrev und Tereshchenko, 2020). Die Stabilität der Expression ist dabei stark von der Methylierung von CpG-Inseln im Lokus des zweiten *Intron Enhancers* des FoxP3 Gens abhängig. Ist diese auch als konservative nichtkodierende Sequenz 2 (CNS2) oder *Major TSDR* (Treg-spezifische demethylierte Region) bezeichnete Region, wie für nTregs charakteristisch, demethyliert, führt dies zu einer stabilen Expression von FoxP3 (Shevyrev und Tereshchenko, 2020).

Wie auch konventionelle CD4⁺ T-Zellen exprimieren Tregs, neben CD4 einen mit CD3 assoziierten TCR. Das Repertoire an Antigen spezifischen Treg-TCR ist dabei genauso groß, wie das naiver konventioneller T-Zellen und umfasst neben nicht-selbst-Antigenen auch auto-Antigene (Sakaguchi, 2004). Die TCR-Spezifitäten von nTregs und pTregs überlappen sich dabei nur geringfügig. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass das Spektrum der durch pTregs erkannten Antigene über die vom Autoimmun-Regulator (AIRE) im Thymus präsentierten Antigene hinaus um weitere Antigene, wie zum Beispiel harmlose Umweltantigene, erweitert ist (Shevyrev und Tereshchenko, 2020).

Ein weiteres Treg Charakteristikum ist die starke Expression der auch als CD25 bezeichneten α -Kette des IL-2 Rezeptors. Anders als konventionelle T-Zellen exprimieren Tregs nicht nur im aktivierten Zustand, sondern konstitutiv CD25, dessen Expression zusätzlich lediglich in Tregs unter der Kontrolle von FoxP3 steht (Sakaguchi, 2004). Interleukin-2 ist für Wachstum und Überleben von Tregs essentiell und die hohe Expression des Rezeptors ermöglicht ihnen auch bei geringen IL-2 Konzentrationen bereits proliferieren zu können (de la Rosa et al., 2004).

1.3.1.1 Wirkungsweisen von regulatorischen T-Zellen

Tregs können auf verschiedene Weise Einfluss auf Immunreaktionen nehmen, wobei man grob vier verschiedene Wirkungsmechanismen unterscheiden kann (Vignali et al., 2008) (Abbildung 1).

[1] Zum einen nehmen Tregs Einfluss auf antigenpräsentierende Zellen (APCs), wie dendritische Zellen und blockieren deren Übermittlung von aktivierenden Signalen an T-Effektorzellen (Murphy und Weaver, 2018 S.487). Das konstitutiv von Tregs exprimierte *Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4* (CTLA-4) (s.a. 1.3.3 Coinhibitorische Rezeptoren) konkurriert mit den von APCs exprimierten CD80 und CD86, welche wiederum für die T-Zell Aktivierung als costimulatorische Signale nötig sind (s.a. 1.2.1 T-Zell Aktivierung) (Shevyrev und Tereshchenko, 2020). Die Interaktion mit DCs führt des Weiteren zur Produktion von Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO), ein regulatorisches Molekül, welches zur Produktion pro-apoptotischer Metaboliten führt und so T-Effektorzellen unterdrückt (Vignali et al., 2008) und zusätzlich lokal weitere Tregs aktivieren kann (Sharma et al., 2007). Über einen weiteren coinhibitorischen Rezeptor, das Lymphozyten aktivierende Gen 3 (LAG-3)

können Tregs zusätzlich die Reifung von DCs durch Bindung an MHC-II Moleküle blockieren (Vignali et al., 2008) (Abbildung 1). Neben CTLA-4 und LAG-3 exprimieren Tregs noch weitere coinhibitorische Rezeptoren, welche auf verschiedene Weise direkt und indirekt Einfluss auf T-Zellantworten nehmen können (Abschnitt 1.3.3.1).

[2] Tregs können ähnlich wie CD8⁺ zytotoxische T-Zellen durch Granzyme zytotoxisch auf andere Zellen wirken. Neben der von Tregs durch Granzym A und B vermittelten Zytotoxizität (Shevryev und Tereshchenko, 2020; Vignali et al., 2008) zeigen Studien auch eine von Tregs durch TRAIL-DR5 (*tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-death receptor 5*) vermittelte Apoptose in Effektorzellen (Ren et al., 2007).

[3] Ein dritter Mechanismus, der es Tregs erlaubt Einfluss auf die Proliferation und Funktion anderer Zellen zu nehmen, ist durch Konkurrenz um proliferationsfördernde Zytokine. So können Tregs zwar nicht selbst IL-2 produzieren, haben aber aufgrund ihrer starken Expression des IL-2 Rezeptors CD25 im Wettbewerb mit naiven T-Zellen um IL-2 einen Vorteil (de la Rosa et al., 2004; Scheffold et al., 2005) (Abbildung 1). Tregs entziehen dadurch konventionellen T-Zellen das für ihre Differenzierung und Proliferation sowie für die Produktion wichtiger Zytokine notwendige IL-2 (Murphy und Weaver, 2018 S.487).

[4] Eine weitere Treg-Funktion wird durch die Produktion der anti-inflammatorischen Zytokine IL-10, IL-35 und TGF- β vermittelt, welche ein breites Wirkungsspektrum aufweisen (Shevryev und Tereshchenko, 2020). So kann das von Tregs produzierte TGF- β die T-Zell-Proliferation hemmen, aber auch weitere Tregs (pTregs) induzieren (Murphy und Weaver, 2018 S.488; Shevryev und Tereshchenko, 2020). Ein weiteres von Tregs produziertes inhibitorisches Zytokin ist IL-35. Dieses wird von Tregs zum Erreichen ihrer maximalen suppressiven Aktivität benötigt und scheint unter anderem Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung von Effektorzellen zu nehmen (Collison et al., 2007; Sawant et al., 2015). Das wohl mit bedeutendste inhibitorische Zytokin ist jedoch IL-10, welches von Tregs in einer späten Phase der Immunantwort produziert wird (Murphy und Weaver, 2018 S.488). IL-10 wirkt dabei auf mehrere Weisen anti-inflammatorisch (siehe 1.3.2 IL-10 als inhibitorisches Zytokin). Deutlich wird dies an der Rolle des von pTregs produzierten IL-10 für die Homöostase des Gastrointestinaltraktes. Kommt es zu einer fehlenden oder nicht ausreichenden Produktion des inhibitorischen Zytokins, kann dies zu chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) führen (Murphy und Weaver, 2018, S.488).

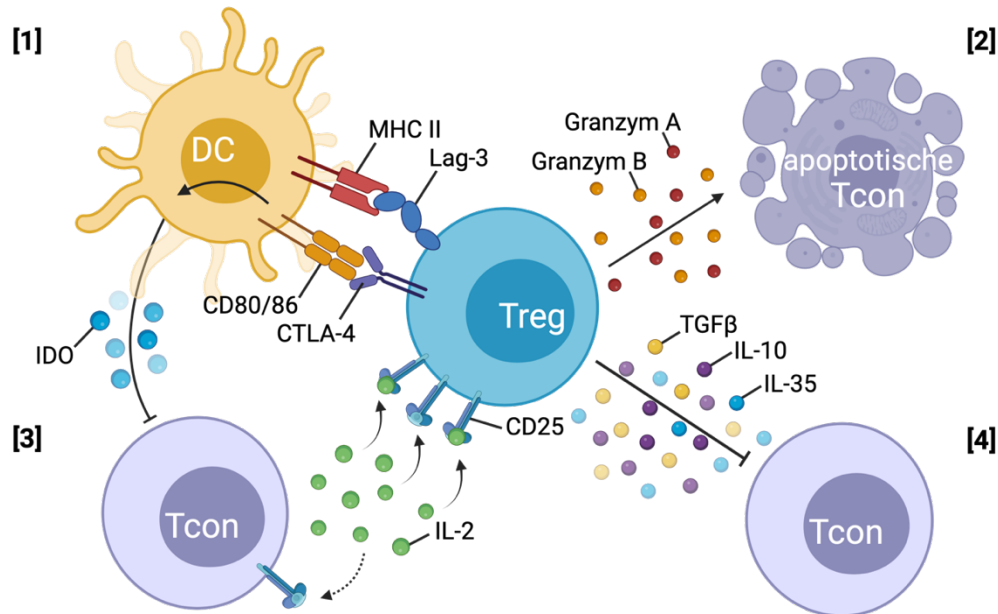


Abbildung 1: Wirkungsweisen von regulatorischen T-Zellen

Regulatorische T-Zellen (Tregs) können auf verschiedene Weise Einfluss auf immunologische Reaktionen nehmen. Zum einen können Tregs indirekt Einfluss auf konventionelle T-Zellen nehmen, indem sie durch coinhibitorische Rezeptoren, welche mit CD80/86 und MHC-II Molekülen auf dendritischen Zellen (DC) interagieren, letztere in der Produktion aktivierender Signale hemmen. Es kommt zur Produktion von Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO), welche zur Produktion pro apoptotischer Metaboliten führt [1]. Zum anderen können Tregs auch direkt Einfluss auf konventionelle T-Zellen nehmen. So können Tregs, ähnlich wie CD8⁺ zytotoxische T-Zellen durch Granzyme zytotoxisch auf andere Immunzellen wirken [2]. Weiterhin stehen Tregs und Tcons in Konkurrenz um das Zytokin IL-2, wobei Tregs durch ihre hohe Expression des IL-2 Rezeptors CD25 im Vorteil sind und den Tcons das zur Proliferation notwendige IL-2 entziehen [3]. Tregs können außerdem inhibitorische Zytokine, wie IL-10, TGF-β und IL-35 produzieren und so direkt inhibitorisch auf konventionelle T-Zellen (Tcons) einwirken [4]. (Abbildung nach Shevryev und Tereshchenko, 2020 und Vignali et al., 2008)

1.3.2 IL-10 als inhibitorisches Zytokin

Eine entscheidende Rolle bei der Regulation und Begrenzung von Immunantworten spielt das anti-inflammatorisch wirkende Interleukin-10 (IL-10). Erstmals wurde IL-10 1989 von Fiorentino et al., in T_H2-Zellen beschrieben. Sie beobachteten, dass dieses von T_H2-Zellen produzierte Zytokin, die Produktion verschiedener Zytokine durch T_H1-Zellen inhibiert, weshalb sie ihm den Namen *Cytokine Synthesis Inhibitory Factor* (CSIF) gaben (Fiorentino et al., 1989). Mittlerweile ist bekannt, dass IL-10 von einer Vielzahl sowohl myeloider als auch lymphoider Zellen produziert werden kann. So können neben T_H2-Zellen und regulatorischen T-Zellen weitere CD4⁺ und CD8⁺ T-Zelltypen sowie B-Zellen, aber auch Makrophagen, Monozyten, dendritische Zellen, neutrophile und eosinophile Granulozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Mastzellen unter bestimmten Bedingungen zumindest vorübergehend IL-10 produzieren (Couper et al., 2008). Die Hauptquelle variiert dabei in verschiedenen Geweben und abhängig vom Stadium einer Infektion (Couper et al., 2008).

IL-10 vollführt seine immunregulatorischen Funktionen einerseits direkt durch einen hemmenden Einfluss auf T-Zell Antworten, andererseits aber auch indirekt, vermittelt durch direkte Effekte auf Makrophagen und Monozyten (Couper et al., 2008). Indirekt nimmt IL-10 Einfluss auf die Aktivität und Proliferation von humanen T-Zellen, indem es unter anderem die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine, wie u.a. IL-1 α und β , IL-6, IL-12, IL-18 und TNF α , von Chemokinen und costimulatorischen Molekülen, wie CD80 und CD86, durch APCs vermindert (zusammengefasst in Moore et al., 2001). Auch nimmt IL-10 Einfluss auf die Fähigkeit der APCs Antigene zu präsentieren, indem es die Expression des für die Präsentation notwendigen MHC-Klasse-II-Komplexes reduziert (de Waal Malefyt et al., 1991). Der direkte Einfluss von IL-10 auf CD4⁺ T-Zellen führt zu einer inhibierten Proliferation und verringerten Produktion von IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-5 und TNF α (zusammengefasst in Saraiva et al., 2020).

IL-10 reguliert außerdem Wachstum und Proliferation von B-Zellen, NK-Zellen, Thymozyten, Mastzellen, Granulozyten, DCs, Keratinozyten und auch Endothelzellen und fördert das Überleben und die Aktivität von regulatorischen T-Zellen (Moore et al., 2001). Neben hemmenden Effekten konnten in verschiedenen *in vivo* Modellen zur Untersuchung von Autoimmunität, Krebs und Transplantationen, abhängig von Ursprung, Zeitpunkt, Dosis und Ort der IL-10-Expression, auch verstärkende Effekte auf Immun- und Entzündungsreaktionen beobachtet werden (Moore et al., 2001).

Die Hauptfunktion liegt jedoch in der Begrenzung und letztendlichen Beendigung von Entzündungsreaktionen, welches eine Elimination eines Pathogens mit minimaler Schädigung des eigenen Mechanismus ermöglicht (Moore et al., 2001).

1.3.2.1 Regulation der IL-10-Expression in T-Zellen

Die Bedeutung der Regulation der IL-10-Expression zeigt sich an den Folgen einer veränderten bzw. fehlerhaften IL-10 Konzentration. So führt eine zu hohe IL-10-Expression potenziell zur Verhinderung der letztendlichen Bekämpfung eines Pathogens mit daraus folgender Persistenz, weiterer Schädigung und chronischer Entzündung. Eine zu niedrige Expression oder eine zu einem falschen Zeitpunkt stattfindende Produktion hingegen kann zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen sowie zu einer Schädigung des Organismus durch unerwünschte und ungehemmte Immunantworten führen (Iyer und Cheng, 2012).

Die Regulation der IL-10-Expression wird dabei von zahlreichen Faktoren beeinflusst. So führen neben der Aktivierung des TCRs auch verschiedene Zytokine zu einer IL-10-Produktion. IL-27 zum Beispiel wirkt über die *Signal transducer and activator of transcription* (STAT)1 und STAT3 und IL-6 sowie IL-21 über STAT3 positiv auf die IL-10-Produktion (Ahlers et al., 2022; Iyer und Cheng, 2012). Je nach T-Zellsubtyp sind neben einer starken TCR-Stimulation zudem, die zur Differenzierung nötigen Zytokine, wie IL-12 für T_H1-Zellen oder IL-4 für T_H2-Zellen für die IL-10-Produktion wesentlich (Rutz und Ouyang, 2016). Weiter konnte gezeigt werden, dass der Notch-Signalweg auf einem IL-12, IL-27

abhängigen, STAT4 vermittelten Weg zur Induktion einer IL-10-Produktion in T_H1-Zellen führen kann (Rutz et al., 2008). In humanen T-Zellen scheint darüber hinaus das für die T_H1-Immunität wichtige Interferon vom Typ 1 (IFN) über STAT1/3 auch die Produktion von IL-10 zu stimulieren (Aman et al., 1996; Corre et al., 2013; Ziegler-Heitbrock et al., 2003). In T_H1-Zellen konnte weiterhin eine Abhängigkeit der IL-10-Produktion von *B-Lymphocyte-Induced Maturation Protein 1* (Blimp-1) gezeigt werden, wobei dessen IL-10 induzierende Wirkung durch die synergistische Funktion des Transkriptionsfaktors *c-musculoaponeurotic fibrosarcoma factor* (c-Maf) weiter verstärkt wurde (Neumann et al., 2014). Letzterer kann wiederum durch verschiedene Faktoren induziert werden, unter anderem auch durch den Notch-Signalweg (Neumann et al., 2014). Der Effekt einer Kombination verschiedener mit einer IL-10-Induktion in Verbindung gebrachter Zytokine ist hingegen bisher nur wenig untersucht. Auch die Kombination mit weiteren Stimuli, wie der Aktivierung des Notch-Signalweges und dessen Auswirkung auf die IL-10-Produktion ist noch nicht ausreichend geklärt.

1.3.3 Coinhibitorische Rezeptoren

Für eine vollständige Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen sowie zur Beendigung oder Unterdrückung einer T-Zell-Antwort werden neben den über den T-Zell Rezeptor vermittelten Signalen weitere Antigen-unabhängige Signale, übermittelt durch costimulatorische und coinhibitorische Rezeptoren benötigt (Azuma und Yagita, 2019). Coinhibitorische Rezeptoren wirken der T-Zell Rezeptor vermittelten Aktivierung entgegen und führen zu Anergie und einem Zustand von Toleranz. Dies verhindert zum einen schädliche exzessive Immunreaktionen, kann zum anderen aber auch eine effektive Reaktion von T-Zellen auf maligne Zellen und persistierende Krankheitserreger reduzieren (Joller und Kuchroo, 2017). Durch ihre besondere Rolle im Kontext der Immunhomöostase werden coinhibitorische Rezeptoren in einer Vielzahl von Krankheitssituationen, wie Autoimmun- und Krebserkrankungen zur Immunintervention adressiert (zusammengefasst in Thaventhiran et al., 2012).

1.3.3.1 Coinhibitorische Rezeptoren in T-Zellen

T-Zellen exprimieren ein vielfältiges Repertoire an coinhibitorischen Rezeptoren, welches sich in Abhängigkeit von der Umgebung und dem Aktivierungsstatus der T-Zelle verändert (Joller und Kuchroo, 2017). Zu den coinhibitorischen Rezeptoren, die sowohl von T_H-Zellen als auch von regulatorischen T-Zellen exprimiert werden können, gehören das *Programmed Cell Death Protein 1* (PD-1), das *Cytotoxic T Lymphocyte Associated Protein 4* (CTLA-4), das *lymphocyte-activation gene 3* (LAG-3), der *T Cell Immunoreceptor With Ig And ITIM Domains* (TIGIT) und das *T Cell Immunoglobulin And Mucin Domain-Containing Protein 3* (Tim-3) (zusammengefasst in Chen und Flies, 2013). Diese coinhibitorischen Rezeptoren wirken dabei grundlegend auf drei verschiedene Weisen auf eine T-Zell Aktivierung.

Einleitung

Zum einen wirken auf der Zelloberfläche exprimierte coinhibitorische Rezeptoren durch eine Konkurrenz mit costimulatorischen Rezeptoren um gemeinsame Liganden hemmend auf die Effektor T-Zell Aktivierung. So konkurriert CTLA-4 mit dem costimulatorischen Rezeptor CD28 um die gemeinsamen Liganden CD80 und CD86. Die Liganden werden dabei aufgrund einer bivalenten Bindung mit deutlich höherer Affinität von CTLA-4 gebunden und so ein CD28 vermitteltes costimulatorisches Signal verhindert (Thaventhiran et al., 2012). PDL1, einer der zwei PD-1-Liganden, kann neben PD-1 auch CD80 binden. Eine solche Bindung verhindert dann ebenfalls das über CD28 vermittelte positive Signal (Odorizzi und Wherry, 2012).

Ein anderer Mechanismus findet intrazellulär in T-Zellen statt. Viele coinhibitorische Rezeptoren, unter anderem PD1, besitzen einen zytoplasmatischen Teil mit sogenannten *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs* (ITIM) und/oder *immunoreceptor tyrosine-based switch motifs* (ITSM). Durch diese können intrazelluläre Phosphatasen rekrutiert werden, welche wiederum Signalmoleküle *downstream* des T-Zell-Rezeptors, B-Zell-Rezeptors oder costimulatorischer Rezeptoren dephosphorylieren und so zu einer quantitativen Reduktion der aktivierungsinduzierten Signaltransduktion und der folgenden Genexpression führen (Thaventhiran et al., 2012). Tim-3 trägt diese klassischen inhibitorischen Motive zwar nicht, leitet aber durch fünf konservierte Tyrosin Reste und deren Phosphorylierung und Bindung an das Adapterprotein Bat3 (*HLA-B associated transcript 3*) ebenfalls inhibitorische Signale in die Zelle (Joller und Kuchroo, 2017).

Als dritten Wirkmechanismus können coinhibitorische Rezeptoren direkt an der Regulation von Immunreaktionen beeinflussenden Genen beteiligt sein. So reguliert PD-1 die Expression des *basic leucine zipper transcription factor* (BATF) in erschöpften T-Zellen hoch, welches zu einer reduzierten Proliferation und IL-2 Sekretion nach Stimulation führt (Odorizzi und Wherry, 2012).

Neben diesen direkten Einflüssen wirken coinhibitorische Rezeptoren auch über regulatorische T-Zellen auf konventionelle T-Zellen und ihre Aktivierung ein. So kann CTLA-4 eine T-Zell Aktivierung auch dadurch abschwächen, dass es die suppressive Funktion von regulatorischen T-Zellen verstärkt (Wing et al., 2008). Regulatorische T-Zellen exprimieren eine Vielzahl coinhibitorischer Rezeptoren, wodurch sie einen Teil ihrer suppressiven Wirkung erlangen (s.a. 1.3.1.1 Wirkungsweisen von regulatorischen T-Zellen). Im Vergleich zu anderen CD4⁺ Zellen exprimieren regulatorische T-Zellen dabei in einem deutlich höheren Maß LAG-3 (Anderson et al., 2016). LAG-3 hemmt durch Assoziation mit CD3 die T-Zell-Proliferation, Zytokinproduktion und den Kalziumfluss in konventionellen T-Zellen, verstärkt andererseits aber auch die regulatorische Funktion von Tregs und Typ-I-regulatorischen Zellen (T_R1-Zellen) (*ibidem*). Die Koexpression von LAG-3 und CD49b gilt weiterhin als Marker eines suppressiven T_R1-Phänotypes und ist mit einer IL-10-Produktion durch diese assoziiert (Gagliani et al., 2013).

Des Weiteren kann auch die Fähigkeit von antigenpräsentierenden Zellen Effektor T-Zellen zu aktivieren durch coinhibitorische Rezeptoren beeinflusst werden. So führt die Bindung von CTLA-4 an

das von antigenpräsentierenden Zellen exprimierte B7 zu einer reduzierten Zytokinproduktion und verminderten Expression von costimulatorischen Liganden durch die antigenpräsentierende Zelle (Joller und Kuchroo, 2017). LAG-3 wirkt sich negativ auf die T-Zell Expansion aus, indem es von APCs exprimierte MHC-II Moleküle bindet und so deren Interaktion mit CD4 verhindert (Anderson et al., 2016). Durch Interaktion des auf dendritischen Zellen exprimierten CD155 mit dem von Tregs exprimierten TIGIT kann es in beiden Zellen zu einer vermehrten Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 kommen, welches wiederum wirksam und selektiv T_H1 - und T_H17 -Reaktionen unterdrückt (Anderson et al., 2016).

Coinhibitorische Rezeptoren können durch vielfältige Wirkmechanismen, welche weit über die oben genannten hinaus gehen, deren Kombination sowie noch weitere, bisher zum Teil noch unbekannte Mechanismen, eine T-Zell Aktivierung modulieren (Thaventhiran et al., 2012). Eine erhöhte Expression coinhibitorischer Rezeptoren erweitert dabei die immunregulatorischen Fähigkeiten einer Effektorzelle. Zu beachten ist dabei, dass die Oberflächenexpression eines coinhibitorischen Rezeptors zum Teil nicht nur transkriptionell, sondern auch durch Proteasen reguliert wird. So wird beispielsweise Tim-3 durch die Metalloproteasen ADAM10 und 17 proteolytisch prozessiert (Möller-Hackbarth et al., 2013).

1.4 ADAM-Proteasen

ADAM (*A disintegrin and metalloproteinase*)-Proteasen sind Typ-I-Transmembran-Endopeptidasen, welche zur Metzincin-Superfamilie gezählt werden. Dieser Art von Metalloproteasen ist gemein, dass sie ein für ihre katalytische Aktivität erforderliches zinkbindendes Motiv aufweisen (Smith et al., 2020). Im Menschen sind 21 Mitglieder der ADAM-Familie beschrieben, 13 dieser besitzen eine proteolytisch aktive Domäne und teilen eine gemeinsame Multidomän-Struktur (Abbildung 2). Der intrazelluläre Teil des Proteins enthält eine SH3-bindende Domäne. Ihr folgt der Transmembranbereich, welchem sich extrazellulär eine dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF)-ähnliche Domäne und bei ADAM10 und ADAM17 eine *Stalk*-Region anschließt. Einer cysteinreichen-Domäne, welche eine hypervariable Region enthält, folgt eine Disintegrin-Domäne sowie die Metalloproteinase-Domäne. Letztere enthält das katalytische Zentrum und vermittelt dadurch die proteolytische Aktivität (Giebeler und Zigrino, 2016). Die katalytische Kernsequenz besteht dabei aus drei Histidin-Resten, welche als Ligand für das katalytische Zink-Ion fungieren (Zn^{2+}). Die meisten ADAM-Proteasen können daher durch Zn^{2+} -chelatbildende, z. B. Hydroxamat-basierte Inhibitoren gehemmt werden (Groot und Vooijs, 2012). Aminoterminal werden ADAMs durch eine chaperonähnliche Prodomäne mit zwei Konvertase-Erkennungsstellen sowie ein Signalpeptid abgeschlossen (Groot und Vooijs, 2012; Lambrecht et al., 2018). Die Prodomäne hält dabei die ADAM-Proteaseaktivität auf dem sekretorischen Weg durch das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat in einem latenten Zustand, bis sie während der Reifung durch Furin abgespalten wird (Lambrecht et al., 2018).

Neben der membrangebundenen Form können ADAM10 und ADAM17 auch in löslicher Form vorkommen. Die durch *shedding* entstehenden sADAM10 und sADAM17 zeigen im Vergleich zu ihrer Transmembranform zum Teil überlappende, aber auch abweichende Substrate, aus welchen zusätzliche biologische Funktionen resultieren können (Scharfenberg et al., 2020). ADAMs können andere Transmembranproteine von der Plasmamembran abspalten. Auf diesen als *Ectodomain-Shedding* bekannten Prozess kann bei einigen Substraten eine sogenannte regulierte intramembranäre Proteolyse (RIP) der Transmembranproteine beispielsweise durch den γ -Sekretase-Komplex folgen (Smith et al., 2020). Die durch *Ectodomain-Shedding* freigesetzten Ektodomänen können aktivierend oder inhibierend auf Proteinfunktionen wirken, während die anschließend durch RIP freigesetzten intrazellulären Domänen der gespalteten Moleküle in der Zelle als Signalmoleküle oder Transkriptionsfaktoren im Nukleus wirken können (Lambrecht et al., 2018).

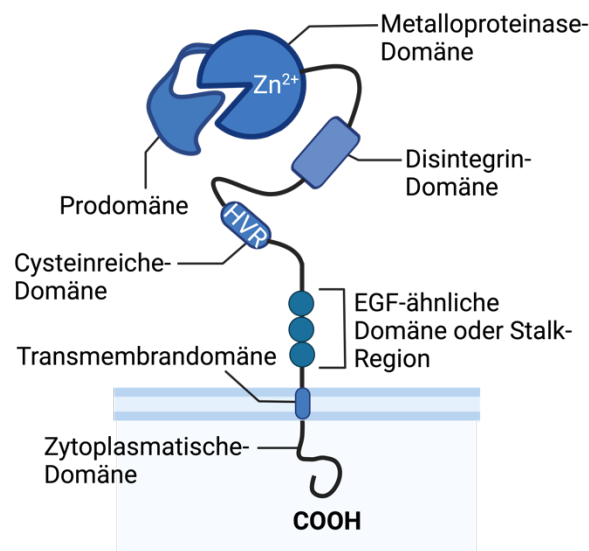


Abbildung 2: Aufbau humaner ADAM-Proteasen

ADAM-Metalloproteasen sind Typ-I-Transmembranproteine und weisen eine Multidomän-Struktur auf. N-Terminal befindet sich die Prodomäne, diese hält die ADAM-Protease bis zur Aktivierung in einem latenten Zustand. An die Metalloproteinase-Domäne schließen sich die Disintegrin- und die Cysteinreiche-Domäne an. Letztere enthält eine Hypervariable Region (HVR). Es folgt die EGF-ähnliche Domäne oder eine *Stalk*-Region. Die Protease wird durch die Transmembrandomäne (TMD) in der Membran verankert und C-Terminal durch die Zytoplasmatische Domäne abgeschlossen. Abbildung nach Lambrecht et al., 2018.

Die wohl bekannteste Funktion von ADAMs ist die Spaltung des membrangebundenen Tumornekrosefaktors α (TNF- α) in seine lösliche Form (sTNF- α) durch ADAM17, welche aufgrund dieser Aktivität ursprünglich auch *TNF- α -converting enzyme* (TACE) genannt wurde (Black et al., 1997). Die Aktivität von ADAMs beschränkt sich aber nicht nur auf die Spaltung von Zytokinvorläufern in deren lösliche bioaktive Form. Durch ihre breite Gewebsexpression und ihre zahlreichen Substrate - alleine für ADAM10 sind über 100 Substrate bekannt (Harrison et al., 2021) - spielen ADAMs eine Schlüsselrolle in zahlreichen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen sowie in vielen biologischen

Prozessen, wie Zelladhäsion, Phagozytose, Fertilisation sowie der Signalübertragung durch Zytokine und Wachstumsfaktoren, viele davon ihrerseits verbunden mit wichtigen Rollen im Immunsystem (Groot und Vooijs, 2012; Lambrecht et al., 2018).

1.4.1 ADAM-Proteasen in Immunzellen

In Immunzellen werden 9 verschiedene ADAMs exprimiert: ADAM8, ADAM9, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17, ADAM19, ADAM28 und ADAM33 (Lambrecht et al., 2018). Die sich funktionell und auch strukturell sehr ähnlichen ADAM10 und 17 sind dabei am besten erforscht und in vielen Immunzellen, wie beispielsweise auch in T-Zellen zu finden (Lambrecht et al., 2018; Smith et al., 2020).

ADAM17 spielt eine wichtige Rolle in der Abwehr von und Reaktion auf Infektionen und Verletzungen, indem es zum einen TNF- α als inflammatorisches Zytokin freisetzt und so eine Entzündung fördert und zum anderen Liganden des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) freisetzt und so zum Erhalt der epidermalen Barrierefunktion beiträgt (Matthews et al., 2016). ADAM10 hingegen spielt unter anderem eine wichtige Rolle in Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen, indem es den Notch-Rezeptor prozessiert und so den Notch-Signalweg aktiviert (*ibidem*). Die Schlüsselrolle die ADAM10 in der Aktivierung des Notch-Signalweges spielt, zeigt sich unter anderem in der phänotypischen Ähnlichkeit ADAM10-defizienter Mäuse zu Notch-defizienten Mäusen. ADAM10-defiziente Mäuse zeigen dabei unter anderem multiple Defekte der Somiten, des kardiovaskulären und des neuronalen Systems (Hartmann et al., 2002).

Wie die ADAM-Proteasen in ihrer Funktion reguliert werden, ist nicht abschließend geklärt. In der Literatur wird unter anderem von einer Tetraspanin- (Tspan) bzw. Rhomboid- (iRhom) abhängigen Regulation von ADAM10 und ADAM17 berichtet. Diese scheinen für die enzymatische Reifung sowie den Transport der ADAMs an die Zelloberfläche erforderlich zu sein, wobei der jeweilige Interaktionspartner auch Einfluss auf das Substratspektrum der jeweiligen ADAM-Protease zu nehmen scheint (Harrison et al., 2021; Matthews et al., 2016). ADAM10 interagiert insbesondere mit den aufgrund ihrer acht Cystein-Resten als TspanC8-Untergruppe zusammengefassten Tetraspaninen 5, 10, 14, 15, 17 sowie 33, während ADAM17 vor allem mit den katalytisch-inaktiven Rhomboid-Pseudoproteasen iRhom1 und 2 interagiert (Harrison et al., 2021; Matthews et al., 2016). Inwiefern dies auch in T-Zellen zutrifft, bleibt zu klären.

Neben ADAM-Proteasen exprimieren T-Zellen auf ihrer Oberfläche auch zahlreiche ADAM-Substrate, wie beispielsweise TNF- α , LAG-3, Tim-3 und Notch (Smith et al., 2020). Durch ADAM-vermitteltes *Ectodomain-Shedding* können aus diesen lösliche *Decoy*-Rezeptoren, Wachstumsfaktoren und Zytokine freigesetzt werden und intrazelluläre Signalwege, wie beispielsweise der Notch-Signalweg initiiert werden (Lambrecht et al., 2018).

1.5 Der Notch-Signalweg

Der Notch-Signalweg ist evolutionär hoch konserviert und für ein breites Spektrum zellulärer Systeme essenziell (Steinbuck und Winandy, 2018). Er spielt eine kritische Rolle in Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen in einer Vielzahl von Geweben, so auch in der Entwicklung von T-Zellen (Steinbuck und Winandy, 2018). Seine Dysregulation oder sein Ausfall kann mit einer Vielzahl an Entwicklungsstörungen sowie Krankheiten im Erwachsenenalter, zum Beispiel Krebserkrankungen in Verbindung gebracht werden (Kopan und Ilagan, 2009).

Sowohl beim Notch-Rezeptor, als auch bei seinen Liganden handelt es sich um Transmembranproteine, welche vorwiegend aus epidermalen Wachstumsfaktor (EGF)-ähnlichen Wiederholungen bestehen (Bray, 2006). Die Lokalisation der Liganden an der Zelloberfläche beschränkt dabei die Signalübertragung vor allem auf benachbarte Zellen (Bray, 2006).

Beim Menschen sind vier verschiedene Notch-Rezeptoren (Notch-1 bis Notch-4) mit zum Teil einzigartigen, aber auch redundanten Funktionen sowie fünf Liganden beschrieben (Kopan und Ilagan, 2009). Die Liganden werden dabei je nach Ähnlichkeit zu den ursprünglich in *Drosophila melanogaster* beschriebenen Liganden Delta und Serrate sowie der An- bzw. Abwesenheit von cysteinreichen Domänen in zwei Klassen unterteilt (Kopan und Ilagan, 2009). Es gibt drei dem Delta Liganden ähnelnde Liganden ohne cysteinreiche Domäne, bezeichnet als *Delta like Ligand 1* (DLL1), DLL3 und DLL4 sowie zwei Serrate ähnelnde Liganden mit cysteinreicher Domäne im Menschen als Jagged1 (Jag1) und Jag2 bezeichnet (Steinbuck und Winandy, 2018). Obwohl sich die verschiedenen Rezeptoren in ihrer Funktion unterscheiden, kommt es nach Interaktion mit einem der Liganden zur Aktivierung desselben kanonischen Signalweges (Steinbuck und Winandy, 2018).

1.5.1 Ablauf des Notch-Signalweges

Der Notch-Signalweg ist geprägt von einer Reihe proteolytischer Prozessierungsschritte (Abbildung 3). Bereits im trans-Golgi-Netzwerk kommt es durch eine Furin-ähnliche Protease zur Spaltung an der S1-site. Diese führt zur Entstehung eines durch Ca^{2+} -abhängige ionische Bindungen zusammengehaltenen heterodimeren Notch-Rezeptors (Steinbuck und Winandy, 2018), bestehend aus zwei Polypeptiden, der extrazellulären Domäne (NECD) und der Transmembran-Domäne (TMD). Letztere enthält neben dem aus 70 Aminosäuren bestehenden Transmembranteil auch eine intrazelluläre Domäne (Steinbuck und Winandy, 2018).

Die Menge der Notch-Rezeptoren an der Zellmembran wird durch eine Ubiquitin-Ligasen-geförderte konstitutive Endozytose kontrolliert. Ein beträchtlicher Teil der Notch-Rezeptoren wird ubiquitiniert und im Proteasom abgebaut, während der Rest auf der Zellmembran verbleibt und Signale ins Zellinnere vermittelt (Zhou et al., 2022).

Kommt es zur Interaktion eines Liganden mit einem Notch-Rezeptor folgen zwei weitere proteolytische Spaltungen. Wichtig für die zweite proteolytische Spaltung ist die sogenannte negative regulatorische Region (NRR), welche in Abwesenheit eines Signals eine Notch-Aktivierung verhindert (Steinbuck und Winandy, 2018). Es wird angenommen, dass es nach Interaktion von Rezeptor und Liganden durch Endozytose des rezeptorgebundenen Liganden in die Liganden-tragende Zelle zu einem Zug auf das extrazelluläre Fragment des Notch-Rezeptors kommt. Dieser mechanische Zug führt zu einer Konformationsänderung der NRR, welche wiederum ADAM-Proteasen den Zugang zur S2-Spaltstelle, welche sich 12 Aminosäuren außerhalb der Membran befindet, ermöglicht und zur Freisetzung der extrazellulären Notch-Domäne (NECD) führt (Steinbuck und Winandy, 2018). Ob ADAM10 und/oder ADAM17, die grundsätzlich beide in Säugetierzellen Notch prozessieren können, für diesen Schritt der Signalweiterleitung hauptverantwortlich ist, ist noch nicht vollkommen geklärt (Steinbuck und Winandy, 2018). Erst nach abgelaufener S2-Spaltung kann der finale Schritt der Notch-Aktivierung stattfinden. Dieser besteht aus der γ -Sekretase vermittelten S3-Spaltung des an der Membran verbleibenden Teils des Rezeptors NEXT (für *Notch extracellular truncation*). Die intramembranöse γ -Sekretase ist ein aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzter, die Aspartylprotease Presenilin-1 oder -2 enthaltener Proteinkomplex und kann ein Substrat erst nach erfolgtem *Ectodomain-Shedding* spalten (Struhl und Adachi, 2000). Dies geschieht beim Notch-Signalweg durch die S2-Spaltung, welche dadurch zum Geschwindigkeits-bestimmenden Schritt des Signalweges wird (Steinbuck und Winandy, 2018). Die S3-Spaltung führt zur Freisetzung der intrazellulären Notch-Domäne (NICD) aus der Membran, welche dann in den Nukleus gelangt und mit dem DNA-bindenden Protein CSL (CBF1/RBPjk/Su(H)/Lag-1) interagiert (Kopan und Ilagan, 2009). Ohne die NICD ist das Notch-Signal inhibiert, da CSL mit ubiquitären Co-Repressor-Proteinen (Co-R) sowie Histon-Deacetylasen (HDACs) assoziiert ist und so die Transkription einiger Zielgene unterdrückt. Nach Bindung der NICD kommt es zu einer allosterischen Veränderung des CSL, welches wiederum die Verdrängung von Transkriptionsrepressoren erleichtert. Der transkriptionelle Koaktivator *Mastermind* (MAM) kann daraufhin die NICD/CSL-Schnittstelle erkennen und zusammen mit zusätzlich rekrutierten Koaktivatoren (Co-A) die Transkription von Notch-Zielgenen aktivieren (Kopan und Ilagan, 2009). Typische durch Notch regulierte Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren (TF), wie z. B. *HES-1* (*hairy and enhancer of split-1*) und Signalmoleküle, die wiederum die Reifung entlang bestimmter Entwicklungspfade entweder hemmen und fördern können (Deftos und Bevan, 2000).

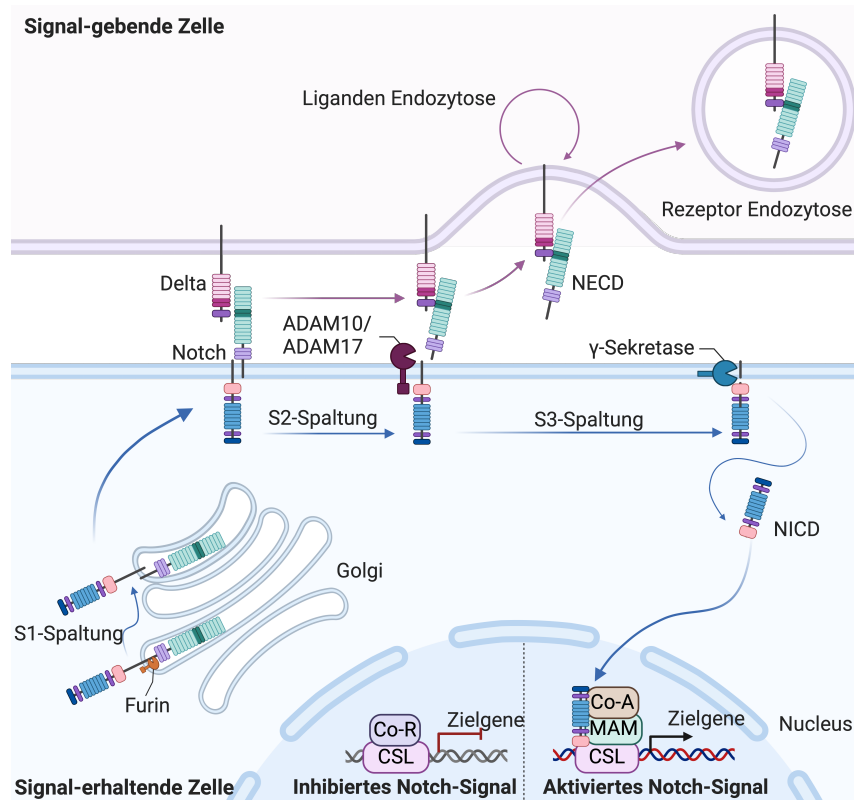


Abbildung 3: Der Notch-Signalweg

Der Notch-Rezeptor (Notch) wird bereits im trans-Golgi Netzwerk (Golgi) proteolytisch durch eine Furin-ähnliche Protease (Furin) prozessiert. Nachdem der Notch-Rezeptor mit einem Liganden, hier mit einem Delta-ähnlichen Liganden (Delta), interagiert hat, folgen zwei weitere Spaltungen, welche zur Freisetzung der extrazellulären Notch-Domäne (NECD) (S2-Spaltung) und der intrazellulären Notch-Domäne (NICD) (S3-Spaltung) führen. Ohne die NICD ist die Expression von Genen des Notch-Signals durch Ko-Repressor-Proteine (Co-R) inhibiert, nach Bindung der NICD kann der Transkriptionsaktivator *Mastermind* (MAM) sowie Koaktivatoren (Co-A) binden und Zielgene transkribiert werden. Abbildung nach (Kopan und Ilagan, 2009; Takebe et al., 2014); Angepasst von "Notch Signaling Pathway", von BioRender.com (2021). Abgerufen von <https://app.biorender.com/biorender-templates>

1.5.2 Bedeutung von Notch für T-Zellen

Eine wichtige Rolle spielt der Notch-Signalweg auch im Immunsystem und der Entwicklung von T-Zellen. Der Einfluss von Notch beginnt dabei schon im Thymus bei der Festlegung lymphatischer Vorläuferzellen auf die T-Zelllinie (Murphy und Weaver, 2018 S.405; Steinbuck und Winandy, 2018). Zudem konnte bei der Entscheidung zwischen $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -T-Zelllinie ein Einfluss von Notch gezeigt werden, welcher eine Entwicklung hin zu $\alpha\beta$ -T-Zellen zu begünstigen scheint (Defetos und Bevan, 2000; Washburn et al., 1997). Des Weiteren beeinflussen Notch-Signale auch die Entwicklung in Richtung CD4⁺ und CD8⁺ T-Zelllinien. Notch-1-Signale lenken dabei die Entwicklung von CD4/CD8 doppelpositiven Lymphozyten in Richtung CD8⁺ Linie (Defetos und Bevan, 2000; Robey et al., 1996). Auch konnte ein über *HES-1* vermittelter Einfluss von Notch-1 auf die Unterdrückung der Expression von CD4 in CD8⁺ Thymozyten beobachtet werden (Defetos und Bevan, 2000; Kim und Siu, 1998).

Neben einem Einfluss auf diese frühen, im Thymus stattfindenden Entwicklungsschritte, wurden auch Einflüsse auf die Aktivierung und Differenzierung peripherer T-Zellen beschrieben (beschrieben in Sezin et al., 2022).

Zum einen wird ein Einfluss von Notch auf die Entwicklung verschiedener T_H-Zell-Typen sowie deren Zytokinproduktion beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass Notch an der Antigen- und Ko-Stimulator-abhängigen Entwicklung von T-Helferzellen in ihre Subtypen (T_H1, T_H2, T_H3 und T_R1) sowie an der Entwicklung von regulatorischen Zellen beteiligt ist. Der für die Entwicklung von T_H1-Zellen wichtige Transkriptionsfaktor T-Bet (*T-box expressed in T cells*) (Minter et al., 2005) konnte, wie auch das für die T_H2 Entwicklung notwendige IL-4 und GATA-3, als direkte Transkriptionsziele von Notch identifiziert werden (Fang et al., 2007).

Neben der Fähigkeit die Differenzierung von naiven T-Zellen in T_H1- und T_H2-Zellen zu bewirken, konnte auch ein direkter Einfluss auf die Aktivierung peripherer T-Zellen gezeigt werden. Dabei konnten sowohl T-Zell aktivierende und proliferationsfördernde als auch gegenteilige Effekte beobachtet werden (beschrieben in Eagar et al., 2004). Unterschiede in der Aktivierung von T-Zellen (Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69) sowie des Proliferationsverhaltens konnten insbesondere auch in Abhängigkeit des mit den Notch-Rezeptoren der T-Zellen interagierenden Liganden (DLL4, DLL1 oder Jagged1) festgestellt werden (Rutz et al., 2005).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Notch die pro-inflammatorische Wirkung von T_H1-Zellen um anti-inflammatorische Kapazitäten erweitern kann. So kann insbesondere der Notch-Ligand DLL4 zusammen mit STAT4 (IL-12, IL-27) eine massive Produktion von IL-10 durch murine T_H1-Zellen bewirken, welches wiederum durch eine Verhinderung der APC Aktivität selbstregulierend auf die Effektorfunktionen der T_H1-Zellen wirkt (Kassner et al., 2010; Rutz et al., 2008).

Neben diesen direkten Wirkungen auf T-Effektorzellfunktionen beeinflusst der Notch-Signalweg eine Immunreaktion auch indirekt, indem es die Hemmung einer solchen Reaktion durch regulatorische T-Zellen beeinflusst (Amsen et al., 2015).

1.5.2.1 Einfluss des Notch-Signalweges auf regulatorische T-Zellen

In mehreren Studien konnte ein Einfluss von Notch auf die Treg-Differenzierung, -Proliferation und -Suppressionskapazität nachgewiesen werden (beschrieben in Amsen et al., 2015). Auch konnte gezeigt werden, dass auch regulatorische T-Zellen selbst in unterschiedlicher Ausprägung verschiedene Notch-Rezeptoren, v.a. Notch-1 und Notch-2 und die Notch-Liganden Jagged1, DLL1 und DLL4 exprimieren (Charbonnier et al., 2015) und so auf andere Zellen und deren Funktion einwirken können (Asano et al., 2008; Huang et al., 2009; Ostroukhova, 2006). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Expression des für Tregs charakteristischen FoxP3 durch Notch über einen RBP-J und *HES-1* abhängigen Mechanismus beeinflusst werden kann (Ou-Yang et al., 2009).

Einleitung

Bezogen auf den Einfluss von Notch auf die Funktion und Proliferation von Tregs wurden konträre Ergebnisse beschrieben. So wurde zum einen gezeigt, dass Jagged Liganden T-Zellen mit suppressiver Kapazität hervorbringen können sowie die Vermehrung oder Aufrechterhaltung der Anzahl von Tregs *in vivo* fördern können (beschrieben in Amsen et al., 2015). Zum anderen zeigten jedoch Charbonnier et al., dass der *Knock-out* von Notch oder RBPjk (*Recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region*) in bereits entwickelten Tregs einen positiven Effekt auf die Fitness und Funktion dieser sowohl im Ruhezustand als auch im Kontext einer Entzündung hatte. Im Entzündungszustand zeigten sie weiter, dass Notch zur Destabilisierung von Tregs durch Förderung von Apoptose und IFN- γ -Produktion beiträgt (Charbonnier et al., 2015). Gleichermäßen führte eine Überexpression der intrazellulären Notch-1 Domäne zur Destabilisierung des Phänotyps und Beeinträchtigung der Treg-Funktion, welches wiederum zu einer Aktivierung von Immunzellen, Lymphoproliferation und Autoimmunität führte (Charbonnier et al., 2015).

Trotz zahlreicher, vorwiegend an murinen Tregs durchgeführten Studien, verbleiben somit insbesondere bezüglich des Effektes von Notch auf humane regulatorische T Zellen, noch viele Fragen. Die genaue Bedeutung der bisher beobachteten Effekte und möglicher weiterer Einflüsse von Notch auf Tregs bedarf weiterer Untersuchungen.

1.6 Fragestellung

Regulatorische T-Zellen haben eine unverzichtbare Rolle bei der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz (Goswami et al., 2022). Indem sie unter anderem T-Zell-Antworten auf Autoantigene unterdrücken, können sie Immunantworten begrenzen und Gewebeschäden vermeiden (Caramalho et al., 2015). Essenziell für ihre suppressive Funktion ist dabei das immunsuppressive Zytokin IL-10, welches von murinen Tregs im Intestinum in hohen Mengen produziert wird. Die Produktion von IL-10 wird unter anderem durch die Notch/c-Maf Achse reguliert (Neumann et al., 2019a).

Überraschenderweise exprimieren humane Tregs *ex vivo* und nach polyklonaler Aktivierung *in vitro* fast keine Effektorzytokine und auch die Produktion von IL-10 ist unklar. Weiterhin sind die Regulation der IL-10-Expression und die Signale, die zur Induktion von IL-10 in menschlichen Tregs führen noch nicht vollständig untersucht.

Da die IL-10-Produktion durch Tregs als ein wichtiger Suppressionsmechanismus angesehen wird, zielt diese Arbeit darauf ab, die kritischen Bedingungen für die IL-10-Produktion menschlicher Tregs zu identifizieren, wobei der Notch-Signalweg die zentrale Achse darstellt.

Ahlers et al. zeigten, dass Notch zusammen mit den über STAT3 wirkenden Zytokinen IFN- α , IL-6 und IL-21 in der Lage ist in verschiedenen T-Effektorzelltypen eine IL-10-Produktion zu induzieren. Die von den Transkriptionsfaktoren Blimp-1/c-Maf gesteuerte IL-10-Produktion ging weiterhin mit einer Hochregulierung verschiedener coinhibitorischer Rezeptoren einher (Ahlers et al., 2022).

Während Ahlers et al. eine Form von Gedächtnis für IL-10 induzierende Kulturbedingungen und eine nach vorübergehenden Ruhephase durch Restimulation induzierbare IL-10-Produktion zeigte, sollen in dieser Arbeit die unmittelbaren Effekte dieser Kulturbedingungen auf T-Zell-Funktionen untersucht werden. Als zwei der vielfältigen Wirkungsmechanismen regulatorischer T-Zellen (Shevyrev und Tereshchenko, 2020) stehen dabei die Produktion von IL-10 sowie die Expression coinhibitorischer Rezeptoren durch Tregs im Mittelpunkt. Von besonderem Interesse ist es dabei zu überprüfen, ob und inwieweit die in konventionellen T-Zellen beschriebene IFN- α /IL-6/IL-21/DLL-4-abhängige IL-10-Produktion auch in regulatorischen T-Zellen zu beobachten ist.

Ziel dieser Arbeit ist es daher:

- Das von Ahlers et al. etablierte Kultursystem auf humane regulatorische T-Zellen zu übertragen.
- Die Effekte des Notch-Liganden DLL4 sowie der STAT3 aktivierenden Zytokine und deren Kombination auf die Expression von IL-10 sowie coinhibitorischer Rezeptoren in Tregs zu untersuchen.
- Die in konventionellen und regulatorischen T-Zellen beobachteten Effekte miteinander zu vergleichen.
- Den Einfluss der Metalloproteasen ADAM10 und 17 auf Notch-abhängige Effekte durch Einsatz spezifischer Inhibitoren zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

In den folgenden Tabellen (Tabelle 1-10) werden die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Materialien, Geräte sowie *Software* aufgelistet.

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Bioanalyzer	2100 Bioanalyzer	Agilent
Durchflusszytometer	<i>MACSQuant</i> ® 16 <i>MACSQuant</i> ® X <i>LSRFortessa</i> ™	Miltenyi Biotec Miltenyi Biotec Becton Dickinson
Durchflusszytometer mit Sortier-Funktion	<i>FACS Aria</i> ™ <i>Fusion</i>	Becton Dickinson
Eismaschine	Flockeneisbereiter AF 80	Scotsman
Heizblock	Thermomixer 5436	Eppendorf AG
Lichtmikroskop	Invertoskop ID03	ZEISS
Magnet für magnetische Zellseparierung	<i>QuadroMACS</i> ™ Separator	Miltenyi Biotec
Magnet Halterung	<i>MACS</i> ® <i>MultiStand</i>	Miltenyi Biotec
<i>Pipetboy</i>	<i>Accu-jet</i> ®	Brand
Pipetten 0,1-1000 µL	Eppendorf Research® plus Pipetten	Eppendorf AG
<i>Real-Time</i> PCR System	<i>The QuantStudio</i> ™ 5 <i>Real-Time PCR System</i>	Applied Biosystems
Spectrophotometer	<i>NanoDrop</i> ™ 1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific
Sterilbank	<i>MSC-Advantage</i> ™	Thermo Fisher Scientific
Thermocycler	<i>T1 Thermocycler</i>	Biometra
Tischzentrifuge	Mini-Zentrifuge <i>ROTILABO</i> ® Uni-fuge	Carl Roth
Tube Rotator	<i>MACSmix Tube</i> ™ Rotator	Miltenyi Biotec
Vortexer	VortexGenie®2 REAX top Vortex Schüttler, <i>lab dancer</i>	Scientific Industries Bender & Hobein AG VWR
Wasserbad	GFL-Schüttelwasserbad Typ-1083	GFL (heute LAUDA)
Zellinkubator	<i>CellXpert</i> ® C170	Eppendorf AG

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Zentrifugen	<i>Centrifuge 5417R</i> Mikrozentrifuge	Eppendorf AG
	MIKRO 200R	Hettich Zentrifugen
	MEGA Star 3.0R	VWR
	<i>Mini-Zentrifuge Sprout® Plus</i>	Heathrow Scientific

Tabelle 2: Verwendete Labor- und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Blutentnahme Röhrchen: EDTA Monovetten®, 9 ml	Sarstedt
CELLSTAR® Tubes 15 und 50 ml	Greiner Bio-One
Deckel für RNA-Streifen für Sequenzierung: <i>SMARTer Apollo caps for 0,2 ml PCR 8- tube strips, clear</i>	Takara Bio
FACS Röhrchen: 5 ml <i>Polystyrene Round-Bottom Tube</i>	FALCON
Biosphere® Filter Tips (0,5-20 µl, 2-20 µl, 2-100 µl, 2-200 µl, 1000 µl)	Sarstedt
Abdeckfolien qPCR-Platte: <i>MicroAmp™ Optical Adhesive Film</i>	Applied Biosystems
MACS-Säule: <i>LS Column</i>	Miltenyi Biotec
MACSQuant Running Buffer	Miltenyi Biotec
MACSQuant Washing Solution	Miltenyi Biotec
Nitrilhandschuhe Peha-soft®	HARTMANN
PCR-Streifen: <i>PCR strips/Multiply®-µStrip Pro 8er Kette</i>	Sarstedt
Pipettenspitzen (20 µl, 200 µl und 1000 µl)	Sarstedt
Protein low binding Gefäße 1,5 ml	Sarstedt
Reaktionsgefäße (1,5 ml und 2,0 ml)	Sarstedt
RNA-Streifen für Sequenzierung: <i>SMARTer Apollo 0,2 mL PCR 8-tube strips, clear</i>	Takara Bio
Safety-Multifly® -Kanüle 21G	Sarstedt
Serologische Pipetten, steril	Greiner Bio-One
Spritze zum Sterilfiltern: <i>Omnifix® Luer Solo 10ml</i>	Braun
Sterilfilter: <i>Filtropur S 0.2</i>	Sarstedt AG & CO. KG
96-Well-Platte für qPCR: <i>MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate</i>	Applied Biosystems
96-Well-Platte high binding	Greiner Bio-One
96-Well-Platte U-Boden, Nunclon Delta Surface	Thermo Fisher Scientific
96-Well-Platte V-Boden	Nerbe plus

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien/ Lösungen

Bezeichnung	Hersteller
(+)-Sodium-L-ascorbate (Vitamin C)	Sigma-Aldrich
2-Mercaptoethanol 50mM	Gibco Life Technologies
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Ethanol (96 %)	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Boehringer
Ficoll-paque® PLUS	Cytiva
RNase AWAY™ Oberflächendekontaminationsmittel	Thermo Fisher Scientific
Tandem Signal Enhancer	Miltenyi Biotec
Viability 405/520 Fixable Dye	Miltenyi Biotec

Tabelle 4: Verwendete Zellkulturmaterialien

Material	Hersteller
DLL4-Beads: DLL4-MACSiBeads	Miltenyi Biotec
DMEM Medium: Dulbecco's Modified Eagle Medium	Gibco Life Technologies
DPBS (steril): Dulbecco Phosphate Buffered Saline	Lonza
EDTA: 0,5mM EDTA pH8,0	invitrogen
Fetales Kälberserum (FCS): Heat Inactivated Bovine Serum	Gibco Life Technologies
GI254023X	Merck
GW280264X	Iris Biotech
Humanes AB-Serum: Human Serum, H4522	Sigma-Aldrich
Nicht essenzielle Aminosäuren: MEM Non-essential Amino Acid Solution M7145	SIGMA Life Science
Penicillin/Streptomycin: Penicillin-Streptomycin (100X) for cell culture	PanReac AppliChem
RPMI- Zellkulturmedium: RPMI 1640	Gibco Life Technologies
T-Zell Aktivierungsbeads: T Cell Activation/Expansion Kit, human	Miltenyi Biotec
TexMACS™ Medium	Miltenyi Biotec
Trans Act Beads: T Cell TransAct™, human	Miltenyi Biotec

Tabelle 5: Verwendete Puffer, Lösungen und Nährmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung
Sort-Medium	RPMI 5% AB Serum
Medien für konventionelle T-Zellen	
DMEM	DMEM 10 % FCS 100 IU/ml Penicillin und Streptomycin 50 µM/ml 2-Mercaptoethanol
Tcon Medium	DMEM 10 % FCS 100 IU/ml Penicillin und Streptomycin 250 IU/ml IL-2 50 µM/ml 2-Mercaptoethanol
Tcon Medium plus Zytokine (Angaben für eine Lösung in zweifacher finaler Konzentration)	Tcon Medium + 40 ng/ml IFN α 40 ng/ml IL-6 40 ng/ml IL-21
Medien für Tregs	
TexMacs	TexMACS™ Medium 5 % AB- Serum 100 IU/ml Penicillin und Streptomycin 1 % nicht essenzielle Aminosäuren
Treg Medium	TexMACS™ Medium 5 % AB- Serum 100 IU/ml Penicillin und Streptomycin 1 % nicht essenzielle Aminosäuren 250 IU/ml IL-2
Treg Medium plus Zytokine (Angaben für eine Lösung in zweifacher finaler Konzentration)	Treg Medium + 40 ng/ml IFN α 40 ng/ml IL-6 40 ng/ml IL-21

Puffer	
PEB	PBS 10 % BSA 0,5 M EDTA
PEB AB	PBS 0,5 % AB-Serum 0,5 M EDTA

Tabelle 6: Verwendete *Kits*

Kit	Bezeichnung	Hersteller
Antikörper Entfernung	<i>REAlase® Support kit</i>	Miltenyi Biotec
Bioanalyser Kit	<i>Agilent RNA 6000 Pico Kit</i>	Agilent
cDNA Synthese	<i>RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit</i>	Thermo Fisher Scientific
Intranukleäre Färbung	<i>FoxP3 Staining Buffer Set</i>	Miltenyi Biotec
Intrazelluläre Färbung	<i>Inside Stain Kit (mit Inside Fix und Inside Perm)</i>	Miltenyi Biotec
qPCR Mastermix	<i>SYBR™ Select Master Mix</i>	Thermo Fisher Scientific
RNA Isolation qPCR	<i>peqGOLD Total RNA Kit</i>	VWR
RNA Isolation	<i>RNeasy Micro Kit</i>	Qiagen
Sequenzierung		
Zytokinbestimmung	<i>MACSPlex Cytokine 12 Kit, human</i>	Miltenyi Biotec

Tabelle 7: Verwendete Zytokine und Stimulanzen

	Stockkonzentration	Verdünnung	Finale Konzentration	Hersteller
IFN-α2a	100 µg/ml	1:5000	20 ng/ml	Miltenyi Biotec
IL-2	1x10 ⁵ IU/ml	1:400	250 IU/ml	Miltenyi Biotec
IL-21	100 µg/ml	1:5000	20 ng/ml	Miltenyi Biotec
IL-6	100 µg/ml	1:5000	20 ng/ml	Miltenyi Biotec

Tabelle 8: Verwendete Antikörper

Spezifität	Klon	Fluorochrom/ Konjugat	Hersteller
Färbung von Molekülen auf der Zelloberfläche			
CD4	LT20	APC-Vio® 770	Miltenyi Biotec
CD4	OKT4	Alexa Flour™ 700 (<i>Af700</i>)	BioLegend
CD8	REA734	VioGreen™	Miltenyi Biotec
CD14	REA599	VioGreen™	Miltenyi Biotec
CD20	LT20	VioGreen™	Miltenyi Biotec
CD25	BC96	Brilliant Violet 711™	BioLegend
CD25	REAL 128	APC REAlease®	Miltenyi Biotec
CD25	REA570	APC	Miltenyi Biotec
CD45R0	REA611	VioBlue®	Miltenyi Biotec
CD45R0	REA611	APC-Vio 770	Miltenyi Biotec
CD45RA	REA1047	APC	Miltenyi Biotec
CD45RA REAlease®	REAL164	FITC	Miltenyi Biotec
CD49b	P1E6-C5	PerCP	BioLegend
CD127	A019D5	Brilliant Violet 605™ (BV605)	BioLegend
CD127	REA614	APC	Miltenyi Biotec
Labeling check reagent		VioBlue®	Miltenyi Biotec
LAG-3 (CD223)	REA351	APC	Miltenyi Biotec
Notch-1	REA849	Vio Bright B515	Miltenyi Biotec
PD1	EH12.2H7	Brilliant Violet 785™ (BV785)	BioLegend
TIGIT	REA1004	PE-Vio 615	Miltenyi Biotec
TIM3	F38-2E2	Vio Bright FITC	Miltenyi Biotec
Intrazelluläre Färbungen			
CD154	REA238	PE-Vio770	Miltenyi Biotec
CD137	4B4-1	Brilliant Violet 605™ (BV605)	BioLegend
CD154	REA238	FITC	Miltenyi Biotec
CTLA-4	BNI3	PE	Miltenyi Biotec
IL-10	JES3-9D7	PE/Dazzle™ 594	BioLegend
Intranukleäre Färbungen			
c-Maf	sym0F1	PE	eBioscience
FOXP3	236A/E7	PE-Cyanine7	eBioscience

Tabelle 9: Verwendete Primer

Gen	Sequenz		Hersteller
Actb	Forward 5'-3'	5'-GAG CAC AGA GCC TCG CCT TT-3'	biomers.net
	Reverse 3'-5'	5'-TCA TCA TCC ATG GTG AGC TGG-3'	
HES-1	Forward 5'-3'	5'-GCT CTG AAG AAA GAT AGC TCG C-3'	biomers.net
	Reverse 3'-5'	5'-TTC CGG AGG TGC TTC ACT G-3'	
IL-10	Forward 5'-3'	5'-TGG AGG ACT TTA AGG GTT AC-3'	biomers.net
	Reverse 3'-5'	5'-TCT TGG TTC TCA GCT TGG-3'	
IL-22	Forward 5'-3'	5'-GCA CCT TCA TGC TGG CTA AG-3'	biomers.net
	Reverse 3'-5'	5'-GCG CTC ACT CAT ACT GAC TC-3'	
Notch-1	Forward 5'-3'	5'-GGT GAA CTG CTC TGA GGA GAT C-3'	biomers.net
	Reverse 3'-5'	5'-GGA TTG CAG TCG TCC ACG TTG A-3'	
Notch-2	Forward 5'-3'	5'-GTG CCT ATG TCC ATC TGG ATG G-3'	biomers.net
	Reverse 3'-5'	5'-AGA CAC CTG AGT GCT GGC ACA A-3'	
Notch-3	Forward 5'-3'	5'-TAC TGG TAG CCA CTG TGA GCA G-3'	biomers.net
	Reverse 3'-5'	5'-CAG TTA TCA CCA TTG TAG CCA GG-3'	
Notch-4	Forward 5'-3'	5'-TTC CAC TGT CCT CCT GCC AGA A-3'	biomers.net
	Reverse 3'-5'	5'-TGG CAC AGG CTG CCT TGG AAT C-3'	

Tabelle 10: Verwendete Software

Bezeichnung	Hersteller
BioRender	Biorender
<i>Design and Analysis Software v1.5.1, QuantStudio 3 and 5 systems</i>	Applied Biosystems Thermo Fisher Scientific
FlowJo 10.8.0.	Treestar
GraphPad Prism Version 7.04	GraphPad Software
Inkscape	Free Software Foundation, Inc.
MACSQuantify™ Software	Miltenyi Biotec
Microsoft Office 16.10	Microsoft Corporation

2.2 Methoden

2.2.1 Zellisolation

Als Ausgangsmaterial für die im Folgenden beschriebene Zellisolation dienten einerseits vor Ort entnommene periphere EDTA-Blutproben freiwilliger Spenderinnen und Spender und andererseits Leukozyten Kegel anonymisierter Blutspenderinnen und Blutspender des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein. Alle Spenderinnen und Spender gaben ihr Einverständnis zur Blutspende (Votum der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät vom 14.01.2019 unter AZ D578/18).

2.2.1.1 Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes aus Leukozyten Kegeln

Leukozyten Kegel wurden mit 25 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gespült und mit PBS auf 35 ml aufgefüllt. Die Suspension wurde auf 15 ml Ficoll-Trennlösung überschichtet und anschließend bei Raumtemperatur (25 °C) und 700 x g ohne Bremse 20 Minuten zentrifugiert. Dies ermöglicht eine Trennung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) von den restlichen Zellen des Blutes, wie Erythrozyten und Granulozyten anhand ihrer spezifischen Dichte. Die zu isolierenden PBMCs, also Lymphozyten und Monozyten, sammeln sich in der Interphase zwischen dem Ficoll und dem Überstand in Form eines Zellringes. Während der Überstand Thrombozyten und Serum enthält, pelletieren Erythrozyten und Granulozyten aufgrund ihrer vergleichsweise höheren Dichten unterhalb der Trennlösung.

Die sich oberhalb der Trennlösung angereicherten PBMCs wurden abgenommen und mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Anschließend wurden die Zellen bei 400 x g und 4 °C für 15 min mit Bremse zentrifugiert, um Ficollrückstände zu entfernen. Das gebildete Zellpellet wurde isoliert, in PBS resuspendiert, mit diesem auf 50 ml aufgefüllt und bei 200 x g und 4 °C mit Bremse für 10 min zur Entfernung von Thrombozyten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 5 ml RPMI resuspendiert, eine Probe für eine Zellzahlbestimmung entnommen (10 µl) und mit weiteren 10 ml RPMI aufgefüllt.

2.2.1.2 Isolation von PBMCs aus peripheren EDTA-Blutproben

Von freiwilligen Spenderinnen und Spendern wurde Blut mittels Flügelkanülen und EDTA Monovetten (9 ml) entnommen. Bei einer Tcon-Isolation wurden je Spender 27 ml und bei einer Treg-Isolation 100 ml Blut entnommen. Anschließend wurden zunächst jeweils zwei Monovetten *gepoolt*, die Monovetten mit jeweils 3 ml PBS nachgespült und dann mit PBS auf 35 ml aufgefüllt. Das Blut wurde auf 15 ml Ficoll aufgeschichtet und anschließend wie bei der Gewinnung aus Leukozyten Kegeln (2.2.1.1) verfahren.

2.2.2 Magnetische Zellsortierung (MACS)

Zur Isolation verschiedener Zellpopulationen aus den PBMCs wurden diese mittels magnetischer Zellsortierung angereichert. Die magnetische Zellsortierung beruht auf der Markierung von Zellen mit magnetischen Partikeln, sogenannten *MicroBeads*. Diese *MicroBeads* bestehen aus Dextran und Eisenoxid und sind kovalent an Antikörper oder Liganden, welche spezifisch für Zelloberflächenmoleküle sind, gebunden. Bindet dieser Antikörper oder Ligand an eine Zelle, so wird diese magnetisch markiert.

Die markierten Zellen werden auf eine Isolations-Säule (MACS-Säule) gegeben, welche sich in einem magnetischen Feld befindet. Die Säulen enthalten eine Matrix aus ferromagnetischen Kugeln, welche das Magnetfeld 10.000-fach verstärken und so eine starke Magnetkraft innerhalb der Säule induzieren (Miltenyi Biotec, "MACS cell Separation.pdf").

In der Säule werden die Zellen, welche durch *MicroBeads* markiert wurden, zurückgehalten, während unmarkierte Zellen die Säule passieren, beziehungsweise durch Waschschrte mit Puffer weiter ausgespült werden können. Durch Entfernen der Säule aus dem magnetischen Feld und ein erneutes Auftragen von Puffer auf die Säule können mit Druck, aufgebaut durch einen fest aufgesetzten Kolben, auch die markierten Zellen aus der Säule hinausgelöst werden. Die magnetische Zellsortierung ermöglicht so die Separation einer gewünschten Zellpopulation anhand der Expression spezifischer Zelloberflächenmarker.

2.2.2.1 Verwendung von MACS zur Anreicherung von Zellpopulationen

Es wurden zwei verschiedene Methoden verwendet, um zum einen CD4 positive (CD4+) und zum anderen CD25 positive (CD25+) Zellen anzureichern.

Sollte nach der Anreicherung eine weitere Isolation und Differenzierung von Tregs durch FACS durchgeführt werden, wurde eine Anreicherung von CD25+ Zellen durchgeführt. Hierfür wurden die PBMCs zunächst 10 min bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Anschließend wurden die Zellen in einer aus 980 µl Puffer und 20 µl CD25 *anti human APC REAlease* Antikörper bestehenden Lösung resuspendiert und 10 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Verbliebene ungebundene Antikörper wurden durch Waschen mit 4 ml PEB, Zentrifugieren bei 300 x g und 4 °C für 10 min und anschließendem Abnehmen des Überstandes entfernt. Das Zellpellet wurde in 20 µl *Anti APC MicroBeads* und 80 µl PEB pro 1×10^7 Zellen resuspendiert. Anschließend wurde nach Herstellerangaben verfahren.

Sollte eine weitere Isolation und Differenzierung von Tcons durch FACS durchgeführt werden und/oder totale CD4+ Zellen isoliert werden, wurde ein CD4-MACS durchgeführt. Hierbei dienten entweder komplette PBMCs oder der CD25 negative Anteil des CD25-MACS als Ausgangspopulation.

Von den zuvor isolierten PBMCs/ den CD25 unmarkierten Zellen des CD25-MACS wurde die gewünschte Zellzahl (zwischen 1×10^8 und 2×10^8 , je nach Anzahl der Konditionen) entnommen, diese

für 10 min bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in 130 µl PBS pro 1×10^8 Zellen gelöst und 40 µl *MicroBeads* hinzugegeben. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei 4 °C im Dunkeln wurden die überschüssigen *MicroBeads* durch Zugabe von 10 ml PEB und Zentrifugation für 10 min bei 300 x g und 4 °C herausgewaschen. Das Zellpellet wurde in 1 ml PEB ($500 \mu\text{l}/1 \times 10^8$ PBMC) resuspendiert und auf die MACS-Säule gegeben.

Für das Equilibrieren und Spülen der Säulen sowie für das Herauswaschen der Zellen aus der Säule wurde jeweils das vom Hersteller empfohlene Volumen von PEB verwendet. Zur Anreicherung wurde ein *QuadroMACS*TM Separator verwendet.

2.2.3 Isolation und Analyse von Zellen mittels Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS = *Fluorescence Activated Cell Sorting*) ermöglicht eine Analyse und Sortierung von Zellpopulationen anhand verschiedener Parameter auf Einzelzellniveau. Zellen werden mithilfe einer Mantelflüssigkeit hydrodynamisch fokussiert, durch einen oder mehrere Laser bestimmter Wellenlängen angestrahlt und die so erzeugte Lichtstreuung sowie Fluoreszenzlichtsignale detektiert. Die Streuung des Laserlichtes wird dabei in zwei verschiedene Richtungen gemessen, in Vorwärtsrichtung (*Forward Scatter* oder FSC) und in 90 ° zu dieser in Seitenrichtung (*Side Scatter* oder SSC). Hierdurch können Informationen zur Zellgröße (FSC) sowie zur inneren Komplexität und Granularität (SSC) gewonnen werden (McKinnon, 2018).

Zur weiteren Differenzierung und Analyse der Zellen können diese vor der Messung mit verschiedenen fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt werden, deren Fluorochrome dann bei Anregung durch den entsprechenden Laser Fluoreszenzlichtsignale erzeugen. Eine Reihe dichroitischer Filter lenkt das Fluoreszenzlicht zu bestimmten Detektoren und Bandfiltern, welche die Wellenlänge des emittierten Lichtes analysieren und so eine Unterscheidung, Erkennung und Messung einzelner Fluorochrome ermöglichen.

Zur Markierung der Zellen können mit Fluorochromen konjugierte Antikörper, welche bestimmte Marker auf der Zelloberfläche erkennen, genutzt werden. Diese Marker können charakteristisch für bestimmte Zellpopulationen sein (*Lineage Marker*) oder können genutzt werden um eine weitere Differenzierung von Zellen oder Zellpopulationen anhand von Aktivierungsmarkern (CD25 und CD69), Gedächtnismarkern (CD45R0), Gewebe-*Homing*-Markern ($\alpha 4/\beta 7$) und Chemokinrezeptormarkern (CCR7, CCR5, CXCR4, CCR6) vorzunehmen (McKinnon, 2018).

Neben Oberflächenmarkern ist auch eine Messung intrazellulärer und intranukleärer Marker möglich. Zu diesen zählen beispielsweise FoxP3, Zytokine (IL-10), Proliferationsmarker (Ki67, CFSE) und antigenspezifische Marker (Hapthistokompatibilitäts- oder MHC-Tetramere) (McKinnon, 2018).

Mittels spezieller Software können die so gesammelten Informationen zu Zelleigenschaften und exprimierten Markern genutzt werden, um verschiedene Zellpopulationen zu unterscheiden und mittels *gating* getrennt näher zu betrachten.

Zellsorter ermöglichen es weiterhin, Zellproben nicht nur zu analysieren, sondern auch in ihre Zellpopulationen zu sortieren, um diese für weitere Experimente separat verwenden zu können.

Die gewünschte Zellpopulation, welche zum Beispiel für einen bestimmten Marker positiv oder negativ ist, kann ausgewählt werden und gezielt isoliert werden. Der *Sorter* trennt dabei die Zellen, indem er in einer hohen Frequenz Tropfen erzeugt, welche die gewünschten Zellen enthalten. Diese Tropfen werden dann entweder positiv oder negativ geladen und über ein elektrisches Feld in ein entsprechendes Sammelgefäß geleitet (McKinnon, 2018).

2.2.3.1 FACS-Isolation von naiven und *memory* konventionellen T-Zellen

Zur Isolation von naiven und *memory* konventionellen T-Zellen wurden zunächst PBMCs aus Leukozytenfiltern oder frischen EDTA-Blutproben isoliert und aus diesen mittels MACS CD4⁺ Zellen angereichert. Die angereicherten Zellen wurden anschließend mit CD4 *Af700*, CD8, CD14, CD20 *VioGreen*, CD127 *BV605*, CD45 RA *FITC REAlease*, CD45 R0 *VioBlue* sowie einem *Live Dead* Farbstoff auf *VioGreen* gefärbt (siehe auch 2.2.6 Zellfärbung). Dies ermöglichte zum einen den Ausschluss toter Zellen sowie verbliebener CD8, CD14 oder CD20 positiver Zellen und zum anderen eine weitere Unterscheidung der CD4⁺ Zellen in naive (CD25⁻, CD17⁺, CD4⁺, CD45RA⁺) und *memory* (CD25⁻, CD127⁺, CD4⁺, CD45R0⁺) konventionelle T-Zellen. Nach der Färbung wurden die Zellen in PEB aufgenommen und bis zur Sortierung bei 4 °C im Dunklen gelagert.

2.2.3.2 FACS-Isolation von regulatorischen T-Zellen

Da die Charakterisierung von Tregs als CD3⁺CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ Zellen eine intrazelluläre Färbung von FoxP3 erfordert und dies einer Isolierung vitaler Tregs durch Durchflusszytometrie entgegensteht, wurde das an der Zelloberfläche lokalisierte CD127 als weiterer Marker betrachtet. Dieser ermöglicht auch ohne FoxP3 eine eindeutige Unterscheidung zwischen Tregs und aktivierten konventionellen T-Zellen, da eine negative Korrelation zwischen der CD127-Expression und der Expression von FoxP3 gezeigt werden konnte (Liu et al., 2006, S. 127). Auch wenn die CD127-Expression durchaus auch in konventionellen T-Zellen zum Beispiel durch IL-7 reduziert sein kann (Park et al., 2004), stellt die Isolation von CD3⁺CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} Zellen und spätere Bestimmung von FoxP3 derzeit die am weitesten verbreitete Methode zur Isolation von Tregs via Durchflusszytometrie dar (Shevyrev und Tereshchenko, 2020).

Für die Anreicherung von regulatorischen T-Zellen wurden PBMCs aus 100 ml frischem EDTA-Blut isoliert. Anschließend wurde, wie in 2.2.2.1 beschrieben, eine Voranreicherung der CD25⁺ Zellen durch einen APC-MACS vorgenommen. Die angereicherten CD25⁺ Zellen wurden anschließend mit CD25 *APC REAlease*, CD4 *Af700*, CD8, CD14, CD20 *VioGreen*, CD45 RA *FITC REAlease*, CD45 R0 *VioBlue* und CD127 *BV605* gefärbt. Der Färbelösung wurde außerdem ein *Live Dead* Farbstoff zur Diskriminierung toter Zellen beigelegt (s.a. 2.2.6.2 Oberflächen-Färbungen). Mit dieser Färbung konnte zwischen naiven (CD4⁺CD25⁺CD45RA⁺CD127^{dim/-}) und *memory*

(CD4⁺CD25⁺CD45R0⁺CD127^{dim/-}) regulatorischen T-Zellen unterschieden werden. Nach der Färbung wurden die Zellen in *Sort*-Medium aufgenommen und unmittelbar mit der Sortierung begonnen (Sortierungs-Strategie in Abbildung 4).

Um einen Zellverlust zu verhindern und das Überleben der Zellen zu erhöhen, wurden die *Sorttubes* zuvor mit PEB-AB über Nacht im *MACS*-Rotator beschichtet und anschließend mit 1 ml RPMI + 5 % AB-Serum befüllt.

Um die Reinheit der Sortierung zu bestimmen, wurden jeweils 10 µl der zuvor sortierten Zelltypen in 90 µl PEB verdünnt und durchflusszytometrisch reanalysiert, die Reinheit der isolierten Zellen (naive und *memory* Tcon/ Treg) betrug jeweils >99 %.

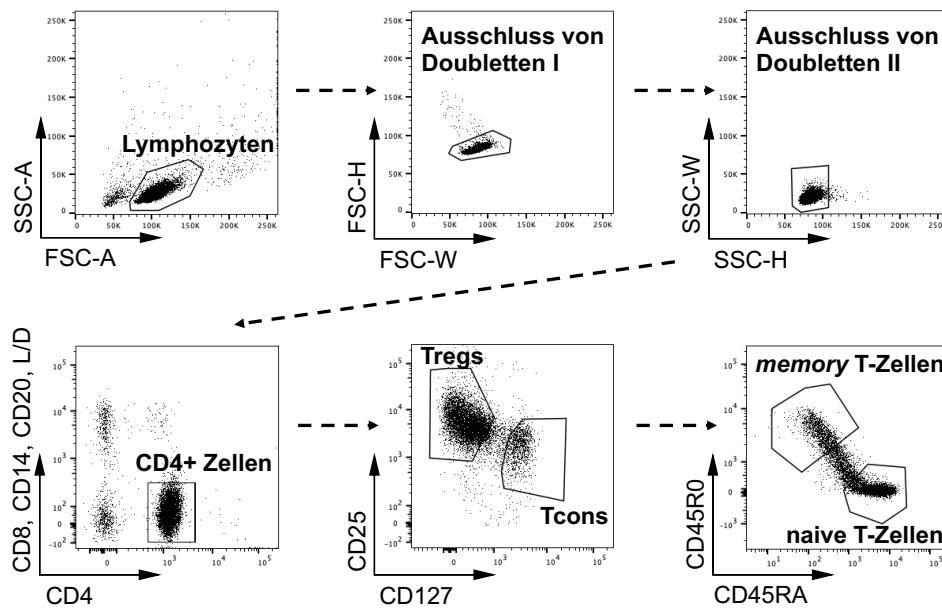


Abbildung 4: FACS-Isolation von *memory* und naiven T-Zellen

Sortierungs-Strategie für die verschiedenen T-Zellen: In zuvor angereicherten CD25⁺ Zellen zur Isolation von Tregs (hier abgebildet) bzw. CD4⁺ Zellen zur Isolation von Tcons (nicht abgebildet) wurden die Oberflächenmoleküle CD25, CD4, CD8, CD14, CD20, CD45RA, CD45R0 und CD127 gefärbt und eine Zellviabilitätsfärbung (L/D) durchgeführt. Nach Identifikation der Lympozyten erfolgte zunächst ein Ausschluss von Doubletten. Unter den CD4⁺ Zellen wurden Tregs als CD25 positive, CD127 negative Zellen definiert, während Tcons als CD25 negative CD127 positive Zellen definiert wurden. Anschließend erfolgte unter den Tregs bzw. Tcons eine Differenzierung zwischen CD45RA positiven Zellen als naive Zellen und CD45R0 positiven Zellen als *memory* Zellen.

2.2.4 Zellkultur

Mit Hilfe von T-Zellkulturen konnte der Einfluss von STAT3 aktivierenden Zytokinen sowie der Anwesenheit des Notch-Liganden DLL4 auf die Expression verschiedener Zytokine und coinhibitorischer Rezeptoren durch verschiedene T-Zelltypen *in vitro* untersucht werden. Hierfür wurden Kulturen von naiven und *memory* konventionellen T-Zellen sowie von naiven und *memory* regulatorischen T-Zellen etabliert.

2.2.4.1 Aktivierung der konventionellen T-Zellen über ihren T-Zellrezeptor

Um die konventionellen T-Zellen *in vitro* aktivieren zu können wurden diese mit polyklonalen, aktivierenden Antikörpern gegen CD3, CD28 und CD2 über ihren TCR stimuliert. Diese Antikörper wurden den konventionellen T-Zellen in Form von CD3/CD28/CD2-*MACSiBeads* präsentiert, welche die natürliche Präsentation durch antigenpräsentierende Zellen mimiken. Die *Beads* wurden in einem 1:1 Zell-*Bead*-Verhältnis verwendet. Eine Expansion der Zellen wurde durch Zugabe von Interleukin-2 (IL-2) zum Zellkulturmedium erreicht. Zur Kultivierung wurden 96-*Well* U-Boden Platten und je 200 µl Medium pro *Well* verwendet.

2.2.4.2 Herstellung der CD3/CD28/CD2-*MACSiBeads*

Tabelle 11: *MACSiBeads*

Reagenz	Volumen	Menge
anti-CD3-Biotin	50 µl	5 µg
anti-CD28-Biotin	50 µl	5 µg
anti-CD2-Biotin	50 µl	5 µg
anti-Biotin <i>MACSiBeads</i> TM	250 µl	5 x 10 ⁷ <i>MACSiBeads</i>
PEB	900 µl	-

Die Reagenzien wurden der Reihenfolge der Tabelle 11 entsprechend in ein 2 ml Reaktionsgefäß zusammengegeben und anschließend über Nacht oder für mindestens 2 h im *MACSMix Tube Rotator* bei 4 °C unter konstanter milder Rotation inkubiert. Nach der Inkubation wurden weitere 700 µl PEB hinzugefügt und so eine Konzentration von $2,5 \times 10^4$ *MACSiBeads*/µl erreicht.

2.2.4.3 Aktivierung des Notch-Signalweges

Die Aktivierung des Notch-Signalweges erfolgte durch Interaktion mit dem Notch-Liganden DLL4, welcher im Vergleich zu den Notch-Liganden DLL1 und Jagged1 eine stärkere Induktion des Notch-Signalweges bewirken kann (Rutz et al., 2005). Eine effektivere Notch-Aktivierung kann dabei durch Fusion des Notch-Liganden mit einer Fc-Einheit oder eine Immobilisierung durch Bindung an eine Matrix beobachtet werden (Bray, 2006). In den durchgeführten Versuchen wurden hierfür ebenfalls *MACSiBeads* verwendet. Diese wurden durch Dr. Jonas Ahlers in Zusammenarbeit mit *Miltenyi Biotec* mit rekombinanten murinen DLL4, welches zuvor mit einem humanen Antikörper-Fc-Teil fusioniert wurde, beladen. In Vorversuchen wurde neben *Beads* zusätzlich die Verwendung spezieller *high binding* Kulturplatten getestet. Die Platten wurden für 4 h bei 37 °C bzw. über Nacht bei 4 °C mit 100 µl einer 50 µg/ml DLL4 enthaltenen PBS- Lösung inkubiert und so mit dem Liganden beschichtet. Unmittelbar bevor die Zellen ausgesät wurden, wurde die DLL4-Lösung abgenommen und die *Wells* zweimal mit jeweils 200 µl PBS gewaschen, um verbliebendes ungebundenes DLL4 zu entfernen. Aufgrund

konstanter Ergebnisse einer stärkeren Notch-Induktion und einfacherer Handhabung wurde jedoch der Einsatz der DLL4-MACSiBeads als Standard-Verfahren gewählt.

2.2.4.4 Ansetzen und Verlauf der konventionellen T-Zellkulturen

Je nach geplanter Analyse wurden neben FACS sortierten konventionellen T-Zellen insbesondere bei hoher gewünschter Zellzahl auch nur durch CD4-MACS angereicherte Zellen (gekennzeichnet als totale CD4+ Zellen) verwendet. Die sich in *Sort*- oder MACS-Puffer befindlichen-Zellen wurden 10 min bei 300 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen in einer Konzentration von 5×10^5 Zellen pro Milliliter in Tcon Medium aufgenommen. Von dieser Zelllösung wurden dann jeweils 5×10^4 Zellen in einem Volumen von 100 µl pro *Well* ausgesät. Entsprechend der jeweiligen Kondition wurde entweder 100 µl Tcon Medium bzw. Tcon Medium mit IFN- α , IL-6 und IL-21 in zweifacher Konzentration der finalen Zytokinkonzentration hinzugefügt.

Zur Aktivierung wurden anschließend in einem Zell-Bead-Verhältnis von 1:1 CD3/CD28/CD2-MACSiBeads (2 µl entsprechend 5×10^4 Beads) hinzugefügt. Hierfür wurde die benötigte Menge Beads entnommen, diese mit 1 ml Medium gewaschen (400 x g, 5 min, 4 °C), in der dem Ursprungsvolumen entsprechenden Menge DMEM resuspendiert und anschließend in die jeweiligen *Wells* hinzugefügt.

Sollte der Notch-Signalweg aktiviert werden, wurden anschließend DLL4-MACSiBeads in einem Zell-Bead-Verhältnis von 1:3 hinzugegeben (15×10^4 Beads bei 5×10^4 Zellen), diese wurden wie auch die CD3/CD28/CD2-MACSiBeads zunächst mit Medium gewaschen und dann in diesem aufgenommen und in die entsprechenden *Wells* hinzugefügt.

Auf diese Weise ergaben sich vier verschiedene Konditionen, welche im Rahmen dieser Arbeit verglichen wurden (Tabelle 12).

Tabelle 12: Konditionen

Bezeichnung	Stimulation
Kontrolle	CD3/CD28/CD2-MACSiBeads, IL-2
+ Zytokine	CD3/CD28/CD2-MACSiBeads, IL-2, IFN- α , IL-6, IL-21
+ DLL4	CD3/CD28/CD2-MACSiBeads, IL-2, DLL4-MACSiBeads
+ DLL4 + Zytokine	CD3/CD28/CD2-MACSiBeads, IL-2, DLL4-MACSiBeads, IFN- α , IL-6, IL-21

War eine RNA-Isolation geplant, wurde zusätzlich zwischen 1×10^5 und 5×10^5 Zellen (abhängig von der totalen zur Verfügung stehenden Zellzahl) pro *Well* ausgesät. Die CD3/CD28/CD2-MACSiBeads sowie die DLL4-MACSiBeads wurden entsprechend der angegebenen Verhältnisse hoch titriert.

Nach einer 48-stündigen Kultivierung (37 °C, 5 % CO₂) unter den verschiedenen Aktivierungsbedingungen wurde die Zellkulturplatte zentrifugiert (300 x g, 10 min), der Überstand abgenommen und für eine spätere Zytokinkonzentrationsbestimmung bei -20 °C gelagert. Die Zellen wurden in 200 µl PBS resuspendiert und anschließend entsprechend der weiteren Analyse verfahren.

2.2.4.5 Ansetzen und Verlauf der Treg-Kulturen

Die FACS-sortierten regulatorischen T-Zellen wurden in einer Konzentration von 5×10^5 Zellen pro Milliliter in Treg Medium aufgenommen. Von dieser Zelllösung wurden dann jeweils 5×10^4 Zellen in einem Volumen von 100 μ l pro *Well* ausgesät. Entsprechend der jeweiligen Kondition (siehe Tabelle 12) wurde, wie auch bei den T_H-Zellen entweder 100 μ l Treg Medium oder Treg Medium mit Zytokinen hinzugefügt.

Zur Aktivierung wurden, wie auch bei den konventionellen T-Zellen CD3/CD28/CD2-MACSiBeads in einem Zell-Bead-Verhältnis von 1:1 (5×10^4 *Beads*) verwendet. Vorversuche zeigten, dass die Verwendung dieser *Beads* in diesem Verhältnis, im Vergleich zu beschichteten CD3 (1 μ g/ml) und löslichen CD28 (1 μ g/ml) sowie zu *TransAct*TM-*Beads* das beste Überleben und die konstanteste Aktivierung (gemessen anhand der CD25-Expression sowie der Proliferation) bewirkten sowie in den entsprechenden Konditionen die stärkste Notch-Induktion ermöglichten. Beim Aussäen und der Hinzugabe der DLL4-MACSiBeads sowie dem weiteren Verlauf der Kultur wurde, abgesehen vom verwendeten Medium in gleicher Weise wie bei den konventionellen T-Zellen verfahren. Sollte RNA isoliert werden, wurde, wie auch bei den konventionellen T-Zellen, die Zellzahl pro *Well* entsprechend der Gesamtzahl der sortierten Zellen auf ein Maximum von $2,5 \times 10^5$ Zellen mit entsprechender Anpassung der *Bead*-Zahl erhöht.

Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit von regulatorischen T-Zellen, insbesondere der naiven Zellen wurden zum Teil bereits kultivierte naive Tregs verwendet, welche ins beschriebene Kultursystem transferiert wurden und in diesem dann 48h kultiviert wurden.

2.2.5 Inhibition des Notch-Signalweges durch ADAM-Inhibitoren

Zur Inhibition der ADAM-Proteasen 10 und 17 wurden die Hydroxamat-basierten Inhibitoren GI254023X und GW280264X verwendet (siehe auch 1.4 ADAM-Proteasen). GW280264X hemmt sowohl ADAM10 ($IC_{50} = 12$ nM) als auch ADAM17 ($IC_{50} = 8$ nM) (Ludwig et al., 2005). GI254023X ist hingegen ein selektiver ADAM10 Inhibitor, der ADAM10 mit einer vergleichbaren Potenz hemmt ($IC_{50} = 5,3$ nM), während seine Potenz ADAM17 zu hemmen im Vergleich mehr als 100-fach reduziert ist ($IC_{50} = 541$ nM) (Hundhausen et al., 2003; Ludwig et al., 2005). Beide Inhibitoren wurden in einer finalen Konzentration von 3 μ M eingesetzt und zu Beginn der Kultur sowie erneut nach 24 h zum Medium hinzugegeben.

2.2.6 Zellfärbung

Zur weiteren Analyse der aus PBMCs isolierten Zellen wurde die Expression von Markern wie Oberflächenmolekülen, Zytokinen und Transkriptionsfaktoren mittels FACS untersucht.

Hierfür wurden Antikörper verwendet, welche spezifisch für einen entsprechenden Marker sind und mit einem Fluorochrom konjugiert sind. Je nach Lokalisation des Markers in der Zelle wurden

Färbeprotokolle für Oberflächen-Färbungen, intrazelluläre Färbungen, intranukleäre Färbungen oder eine Kombination dieser verwendet. Wurden *Tandem dye* konjugierte Antikörper verwendet, wurde *Tandem Signal Enhancer* (TSE) im Verhältnis 1:10 zur Färbelösung hinzugegeben, um die spezifische Bindung dieser Antikörper zu erhöhen (Herstellerangaben).

Um zum Zeitpunkt der Färbung zwischen den Aktivierungs- bzw. DLL4 *MACSiBeads* und den Zellen unterscheiden zu können, wurde der Oberflächenfärbung *Labeling check Reagent* im Verhältnis 1:50 hinzugefügt. Dieses färbt das Dextran der *Beads*, wodurch diese als Dextran positiv im FACS-Plot erkannt werden können und von der späteren Analyse ausgeschlossen werden können.

Die Analyse der jeweiligen Marker erfolgte in der sich aus folgender *Gating*-Strategie ergebenen Subpopulation: Lymphozyten → Einzelzellen → Dextran negative Zellen → lebende CD4 positive; CD8, 14, 20 negative Zellen (s. Abbildung 5).

Gefärbt wurde in 1,5ml Reaktionsgefäßen oder 96-Well-V-Boden-Platten. Die Messungen erfolgten an einem *BD LSRFortessaTM* und wurden mit *FlowJo* 10.8.0 analysiert.

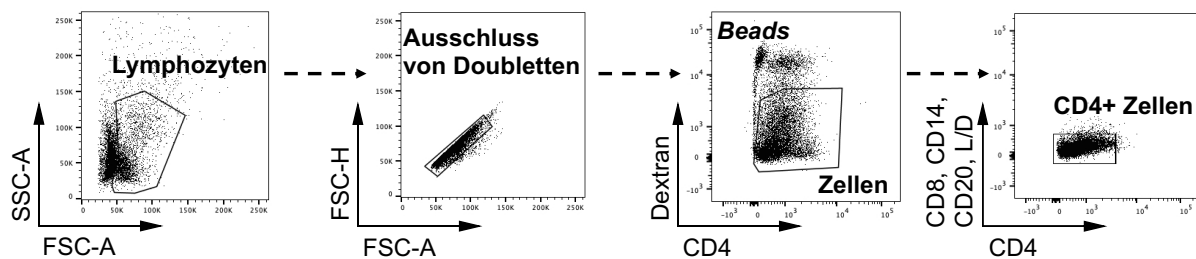


Abbildung 5: *Gating*-Strategie am Beispiel einer Färbung auf regulatorischen T-Zellen

2.2.6.1 Färbung zur Bestimmung der Zellviabilität

Um in Kombination mit der durchflusszytometrischen Analyse der Expression von Oberflächen- oder intrazellulären Markern zwischen lebenden und toten Zellen differenzieren zu können, wurde das *Viability 405/520 Fixable Dye (Live/Dead)* verwendet. Die Analyse der Zellviabilität beruht auf dem Prinzip, dass ein Fluoreszenzfarbstoff mit primären Amingruppen, welche sich sowohl an der Zelloberfläche als auch intrazellulär befinden, reagiert. Bei lebenden Zellen werden aufgrund einer intakten Zellmembran, welche die Fluoreszenzfarbstoffe nicht passieren können, lediglich die sich auf der Zelloberfläche befindenden Gruppen gefärbt. Bei Zellen mit einer geschädigten Zellmembran, wie sie bei sterbenden oder bereits toten Zellen zu finden ist, kann der Farbstoff auch ins Zellinnere eindringen und dort Proteine anfärben. Dies führt zu einer bis zu 50-fach intensiveren Färbung toter Zellen und ermöglicht so eine durchflusszytometrische Diskriminierung zwischen toten und lebenden Zellen. Um tote Zellen von der Analyse auszuschließen, wurde eine Färbung zur Bestimmung der Zellviabilität mit der entsprechenden Oberflächenfärbung kombiniert oder bei einer intrazellulären Färbung vor der Fixierung durchgeführt. Zur Bestimmung der Viabilität wurden die zu färbenden Zellen zentrifugiert (Tcons: 400 x g 5 min 4°C, Tregs: 300 x g 10 min), der Überstand verworfen und *Fixable*

Dye 1:100 in der Oberflächen-Färbelösung oder in PEB gelöst auf das Zellpellet gegeben. Die Zellen wurden resuspendiert und für 15 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Vor der durchflusszytometrischen Messung oder vor einer anschließenden intrazellulären Färbung wurden die Zellen mit 200 µl PBS gewaschen (Tcons: 400 x g 5 min 4 °C, Tregs: 300 x g 10 min) (nach Herstellerangaben).

2.2.6.2 Oberflächen-Färbungen

Oberflächenfärbungen wurden nicht nur zur Analyse der Zellen [1], sondern auch zur FACS-Isolation [2] verwendet. Eine Oberflächenfärbung ermöglicht dabei das Färben von lebenden Zellen, sodass diese nach der Isolation für weitere Versuche verwendet werden können. Sollte eine Oberflächenfärbung mit einer intrazellulären oder intranukleären Färbung kombiniert werden, so wurde das jeweilige Protokoll im Anschluss an die Oberflächenfärbung durchgeführt.

Zur Färbung wurden bis zu 5×10^4 Zellen in 25 µl Färbelösung [1] bzw. bis zu 5×10^7 Zellen in 100 µl Färbelösung [2] gefärbt. Die Färbelösung bestand aus den entsprechenden Antikörpern, PEB, Vitamin C und *Tandem Signal Enhancer* (TSE). Die entsprechende Zellzahl wurde entnommen, mit 200 µl PBS gewaschen (Tcons: 400 x g 5 min 4 °C, Tregs: 300 x g 10 min) und der Überstand entfernt. Unmittelbar vor der Färbung wurde der Färbelösung *Live/Dead* (2.2.6.1 Färbung zur Bestimmung der Zellviabilität) hinzugegeben. Die Zellen wurden in der entsprechenden Menge Färbelösung resuspendiert und 15 min bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 200 µl [1] bzw. 1 ml PBS [2] gewaschen (Tcons: 400 x g 5 min 4 °C, Tregs: 300 x g 10 min) und der Überstand abgenommen.

Sollte eine intranukleäre oder intrazelluläre Färbung durchgeführt werden, folgte nun eine Fixierung. Anderenfalls wurde das Zellpellet in 200 µl PEB [1] bzw. 1 ml Sortmedium [2] resuspendiert und bis zur Messung bzw. bis zur Zellsortierung bei 4 °C und Dunkelheit gelagert.

2.2.6.3 Intrazelluläre Färbungen

Bei intrazellulären Färbungen folgte auf die Oberflächenfärbung eine Fixierung und Permeabilisierung, damit die entsprechenden Antikörper für die intrazellulären Färbungen ins Zytoplasma gelangen konnten. Nach der 15-minütigen Inkubation der Oberflächenfärbung wurden die Zellen mit 200 µl PBS gewaschen, der Überstand entfernt und die Zellen zur Fixierung in 30 µl *Inside Fix* resuspendiert und für 15 min bei Raumtemperatur und Dunkelheit fixiert. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 400 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in 200 µl *Inside Perm* resuspendiert und die Lösung erneut für 5 min bei 400 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Färbelösung der intrazellulären Färbung wurde nun *Inside Perm* hinzugegeben und die Zellen in 25 µl dieser Lösung resuspendiert. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und Dunkelheit wurde 200 µl *Inside Perm* hinzugegeben und bei 400 x g für 5 min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Zellpellet je nach Zellzahl in 100 bis 300 µl PEB resuspendiert und bis zur Messung bei 4 °C und Dunkelheit gelagert.

2.2.6.4 Intranukleäre Färbungen

Sollten neben Oberflächen- und intrazellulären Markern auch intranukleäre Marker, wie zum Beispiel Transkriptionsfaktoren gefärbt werden, wurde das *FoxP3-Staining-Buffer-Set* verwendet. Nach der 15-minütigen Inkubation der Oberflächenfärbung wurden die Zellen zunächst mit 200 µl PBS pro Probe gewaschen und dann in je 95 µl *Fix Solution*, bestehend aus *Fix Solution* 1 und 2 im Verhältnis 1:4 resuspendiert. Nach einer 20-minütigen Fixation bei 4 °C wurden die Zellen zunächst mit 200 µl PEB und anschließend mit 90 µl des zuvor 1 zu 10 verdünnten *Perm-Buffers* (1x *Perm*) gewaschen (400 x g, 5 min, 4 °C). Anschließend wurde der aus Antikörpern, Vitamin C und TSE bestehenden Antikörperlösung im Verhältnis von 1 zu 10 10 x *Perm* hinzugefügt und mit 1 x *Perm* auf das gewünschte Färbevolumen aufgefüllt. Die Zellen wurden in der Lösung resuspendiert und 45 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit 90 µl 1 x *Perm* gewaschen und dann in 200 µl PEB aufgenommen. Bis zur Messung wurden die Zellen bei 4 °C und Dunkelheit gelagert.

2.2.6.5 Entfernung von Zellfärbungen durch *REAl ease*

Aufgrund der noch von der Durchflusssortierung verbliebenen Antikörper auf der Zelloberfläche waren auch zum 48 h Zeitpunkt (gemessen seit Start der Kultivierung) noch einzelne Fluoreszenzkanäle durch diese blockiert. Um diese Kanäle für die Messung anderer Marker verwenden zu können, musste die verbliebene Färbung vor einer erneuten Färbung der Zellen entfernt werden. Hierfür mussten bereits zum Zeitpunkt der Sortierungsfärbung spezielle, wieder entfernbare, sogenannte *REAl ease*® Antikörper verwendet werden. Diese lassen sich durch Zugabe einer Freisetzungsreagenz (*REAl ease*® *Reagent*) durch Aufspaltung des Antikörper-Fluorochrom-Konjugates von der Zelloberfläche entfernen und ermöglichen so ein erneutes Verwenden des zuvor blockierten Fluoreszenz-Detektionskanal und auch blockierter Epitope. Musste die Sortierungsfärbung entfernt werden, wurden bis zu 5×10^4 Zellen entnommen, bei 300 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen in 245 µl PEB und 5 µl Freisetzungsreagenz resuspendiert. Die Zelllösung wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 1 ml PEB gewaschen (Tcons: 400 x g 5 min 4 °C, Tregs: 300 x g 10 min). Vor Beginn einer neuen Färbung wurde die Entfernung der Sortierungsfärbung durch Messung einer Probe der nun entfärbten Zellen am *MACSQuant* 16 überprüft.

2.2.7 Analyse der mRNA-Expression

Um Veränderungen der Zytokinproduktion auf mRNA-Ebene zu analysieren, wurde aus Zellen RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und anschließend für eine quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) verwendet. Zur RNA-Isolation wurden mindestens 1×10^5 Zellen geerntet, mit 500 µl PBS gewaschen (400 x g, 5 min, 4 °C) und der Überstand gründlich entfernt. Bis zur Isolation wurde das Zellpellet bei -80 °C aufbewahrt. Bereits isolierte RNA wurde ebenfalls bei -80 °C aufbewahrt, cDNA bei -20 °C.

2.2.7.1 RNA-Isolation

Je nach Zellzahl und Ziel der RNA-Isolation (qPCR oder Sequenzierung) wurden zwei verschiedene Protokolle durchgeführt.

2.2.7.2 RNA-Isolation zur Durchführung einer qPCR und Ablauf der qPCR

Erfolgte die RNA-Isolation zur späteren Durchführung einer qPCR wurden zu Beginn der Kultur 5×10^4 totale CD4⁺ Zellen eingesetzt und nach 48 h Kultur geerntet. Zur Isolation wurde das *peqGOLD Total RNA Kit* nach Herstellerangaben, ohne Durchführung des DNase Verdaues verwendet. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde das zur Elution verwendete dH₂O auf 70 °C erwärmt und fünf Minuten auf der *PerfectBind RNA Column* inkubiert. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die gewonnene RNA in sterilem RNase freien dH₂O bei -80 °C aufbewahrt. Zur Konzentrationsbestimmung wurde ein Thermo Scientific *NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer* verwendet und die Konzentration auf die höchstmögliche einheitliche Konzentration angeglichen (zwischen 15 und 25 ng/μl).

2.2.7.3 Synthese von cDNA

Aus der isolierten RNA wurde unter Verwendung des *Thermo Scientific RevertAid Erststrang cDNA-Synthesekit* nach Herstellerangaben cDNA synthetisiert. Es wurden zwischen 150 und 250 ng RNA eingesetzt. Hierfür wurde der folgende Reaktionsmix (Tabelle 13) in der angegebenen Reihenfolge in einem sterilen, Nuklease-freien 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis angesetzt.

Tabelle 13: Reaktionsmix cDNA Kit

Reagenz	Volumen/ Reaktion [μl]
Oligo (dT) ₁₈ Primer, 100 μM	1
Wasser, Nuklease frei	1
5X Reaction Buffer: 250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 250 mM KCl, 20 mM MgCl ₂ , 50 mM DTT	4
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/μL)	1
10 mM dNTP Mix	2
RevertAid M-MuLV RT (200 U/μL)	1
totales Volumen	10

In die *Wells* eines DNase und RNase freien PCR-Streifens wurden jeweils 10 μl RNA pipettiert und 10 μl des Reaktionsmixes hinzugefügt. Zur Synthese wurde anschließend folgendes Temperaturprofil (Tabelle 14) in einem Biometra *T1Thermocycler* verwendet.

Tabelle 14: Temperaturprofil *Thermocycler*

Temperatur [°C]	Dauer [min]	Funktion
42	60	cDNA Synthese
70	5	Beenden der Reaktion
4	∞	Lagerung

Nach Beendigung der Synthese wurden 60 µl Nuklease-freies Wasser zur cDNA-Lösung hinzugegeben. Die gewonnene cDNA wurde anschließend direkt durch eine quantitative Echtzeit-PCR quantifiziert oder bis zu dieser bei -20 °C gelagert.

2.2.7.4 Quantitative Echtzeit-PCR

Zur Quantifizierung der gewonnenen cDNA wurde anschließend eine quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) durchgeführt. Für die qPCR wurde der *SYBR Green PCR Master Mix* verwendet. Durchgeführt wurde sie an einem *Applied Biosystems QuantStudio 5 Real-Time-System* mit 96 *Well* Blockformat mit folgendem Temperaturprofil (Tabelle 15).

Tabelle 15: Temperaturprofil *Real-Time-PCR*

Temperatur [°C]	Dauer [min]		Funktion
50	2		
95	2		Denaturierung
95	1 min	x40	Amplifikation
60			
12	∞		Lagerung

Für jeden verwendeten *Primer* wurde die folgende Reaktionsmischung (Tabelle 16) angesetzt.

Tabelle 16: Reaktionsmix *Real-Time-PCR*

Reagenz	Volumen/ Reaktion [µl]
<i>SYBR Green PCR Master Mix</i>	5
<i>Primer Forward</i> (5 µM)	0,5
<i>Primer Reverse</i> (5 µM)	0,5

Von der entsprechenden Reaktionsmischung wurden 6 µl in ein *Well* der 96-*Well* Platte gegeben und 4 µl der entsprechenden Probe hinzugegeben.

Es wurden jeweils 2 Replikate gemessen (Ziel-Differenz <1), der Mittelwert gebildet und zur Analyse eine vergleichende Ct-Methode verwendet. Diese Methode vergleicht den Ct-Wert eines Zielgens mit dem eines anderen Gens, zum Beispiel eines Haushaltsgens anhand der Formel $2^{-\Delta\Delta T}$. Als Haushaltsgen

wurde hierbei *AKTIN beta* gewählt. Zur Kontrolle der Aktivierung des Notch-Signalweges wurde *HES-1* als direktes Notch-Zielgen verwendet. Um weiter zu standardisieren wurde, wenn angegeben, zusätzlich jeweils zur Kondition „Kontrolle“ normiert.

2.2.7.5 RNA-Isolation zur T-Zell Sequenzierung

Sollte die isolierte RNA zur Sequenzierung verwendet werden, wurde die maximale Zellzahl (1×10^4 , $1,5 \times 10^4$ oder $2,5 \times 10^4$) der vier sortierten Zellarten (*memory* und naive Tcons und Tregs) ausgesät und nach 48 h Kultur geerntet. Zur Isolation wurde das *Qiagen RNeasy Micro Kit* nach Herstellerangaben verwendet. Das Protokoll wurde insofern verändert, als dass das zur Elution verwendete dH_2O auf 70°C erwärmt und $14\ \mu\text{l}$ von diesem für fünf Minuten auf der Säule inkubiert wurden.

Zur Bestimmung der Konzentration und Qualität (*RNA integrity number* RIN) wurde ein *Agilent 2100 Bioanalyzer* verwendet. Proben mit einem RIN-Wert ≥ 7 wurden in *Apollo PCR Strips* überführt.

Die weitere Verarbeitung und Sequenzierung erfolgten durch Dr. Mir-Farzin Mashreghi und Dr. Frederik Heinrich vom Deutschen Rheuma-Forschungszentrum Berlin. Die weitere Analyse erfolgte durch Mohammad Mahdi Rasa. Für die Berechnung der normalisierten Anzahl („*normalized Count*“) wurde das DESeq2 R-Paket v1.20.0 (Love et al., 2014) mit den Standardparametern verwendet.

2.2.8 Messung der Zytokin-Konzentration im Überstand via *MACSPlex*

Zur Bestimmung der durch die kultivierten Zellen sekretierten Zytokine wurde der Zellüberstand, wie im Abschnitt 2.2.4.4 beschrieben, abgenommen, eingefroren und anschließend via *MACSPlex* analysiert. Hierfür wurde das *MACSPlex Cytokine 12 Kit, human* von Miltenyi nach Herstellerangaben verwendet. Das Kit ermöglicht das Messen verschiedener Analyten in einer Probe. Verschiedene Populationen spezieller *Capture Beads* mit definierten Fluoreszenzeigenschaften sind mit spezifischen Antikörpern beschichtet, welche wiederum mit dem jeweiligen Analyten in der Probe reagieren. Mit Hilfe von Standardlösungen können so die Mengen des jeweiligen Analyten in der Lösung bestimmt werden. Die verdünnten Überstände werden hierfür zwei Stunden mit den *MACSPlex Capture Beads* inkubiert, mit *MACSPlex* Puffer gewaschen und anschließend eine Stunde mit der *MACSPlex*-Zytokin-Detektionsreagenz inkubiert. Auf diese Weise entstehen Sandwichkomplexe aus den *MACSPlex Capture Beads*, dem Analyten und der Nachweisreagenz. Anhand der Fluoreszenzeigenschaften der *MACSPlex-Beads* und der Detektionsreagenz kann mittels Standardkurven die Konzentration des Analyten in der Probe bestimmt werden (Datenblatt: „*MACSPlex Cytokine 12 Kit human*“, Miltenyi Biotec).

Die Überstände wurden entsprechend der ausgesäten Zellzahl verdünnt (5×10^5 Zellen: 1 zu 5, $2,5 \times 10^5$ Zellen: 1 zu 2, 1×10^5 und $1,5 \times 10^5$ unverdünnt). Die Messung erfolgte in Duplikaten, aus welchen nach Berücksichtigung der Verdünnung der Mittelwert gebildet wurde. Anschließend wurde zur Kontroll-Kondition normiert, um den Einfluss der verschiedenen Kulturbedingungen darzustellen.

Gemessen werden konnten die Konzentrationen von IL-10, GM-CSF, IFN- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-12p70, IL-17A und TNF- α . Die Messung erfolgte an einem *MACSQuant X*.

2.2.9 Datenverarbeitung, Statistik und Abbildungen

Alle statistischen Berechnungen erfolgten unter Nutzung von *GraphPad Prism*. Vor der anschließenden Analyse wurde ein „Ausreißertest nach Grubbs“ durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde $\alpha=0,05$ gewählt. Relative Expressionen wurden durch Berechnung des Quotienten aus entsprechender Kondition (Dividend) und Kontroll-Kondition (Divisor) errechnet.

Die Annahme einer Normalverteilung der verschiedenen Ergebnisse wurde mittels Durchführung eines „Shapiro-Wilk“ Tests überprüft. Waren die beobachteten p-Werte größer als 0,05 konnte die Nullhypothese, dass die Ergebnisse normalverteilt sind, nicht abgelehnt werden. Aufgrund der geringen Probenzahl ist die Aussagekraft des durchgeführten Tests, allerdings als gering anzusehen. Je nach Ergebnis wurden verschiedene Signifikanztests durchgeführt. Bei Annahme einer Normalverteilung wurde zur Testung der Signifikanz der Unterschiede zwischen den verschiedenen Konditionen eine einfaktorielle Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) mit „Geisser-Greenhouse Korrektur“ und einem „*Turkey's multiple comparison test*“ durchgeführt. Fehlten einzelne Werte der Konditionen, beispielsweise da aufgrund zu geringer Zellzahlen auf einzelne Konditionen verzichtet werden musste, konnte dieser Test nicht verwendet werden. Stattdessen wurde in diesen Fällen eine „*mixed effects analysis*“, welche die *Maximum-Likelihood*-Methode nutzt, durchgeführt. Wurden lediglich zwei Konditionen verglichen, wurde ein t-Test (*paired t-test*) durchgeführt.

Im Falle einer Ablehnung der Annahme einer Normalverteilung kam ein „Wilcoxon Test“ bzw. bei mehr als zwei Konditionen ein „Friedmans Test“ sowie ein „*Dunn's multiple comparison test*“ zur Anwendung. Welcher Test angewandt wurde und die entsprechenden p-Werte sind in der jeweiligen Abbildungsbeschreibung vermerkt.

In allen genannten Tests wurde die Nullhypothese entsprechend keinem Unterschied in den verschiedenen Gruppen bei einem $p<0,05$ abgelehnt. Signifikanzlevel werden als * $\triangleq p<0,05$; ** $\triangleq p<0,01$; *** $\triangleq p<0,001$ und **** $\triangleq p<0,0001$ angegeben. Zur besseren Veranschaulichung wurde die Darstellung relativer Expressionen gewählt. Da nach der durchgeführten Normierung keine Normalverteilung mehr anzunehmen ist, wurden die genannten Tests an den Originalwerten durchgeführt. Die abgebildeten Signifikanzen stellen daher die Unterschiede zwischen den Originalwerten und nicht zwischen den abgebildeten normierten Daten dar.

Abbildungen wurden mit Microsoft PowerPoint, Inkscape und BioRender.com erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Bedeutung des Notch-Signalweges für die Funktion von Tregs

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte der Einfluss des Notch-Signalweges auf die Funktion regulatorischer T-Zellen untersucht werden. Neben dem Effekt des Notch-Liganden DLL4 sollte weiterhin auch der Effekt der STAT3 aktivierenden Zytokine IFN- α , IL-6 und IL-21 sowie die Kombination dieser mit DLL4 untersucht werden. Als Maß für die Funktionalität von Tregs wurde die Produktion von IL-10 sowie die Expression verschiedener coinhibitorischer Rezeptoren, beides wichtige Regulationsmechanismen regulatorischer T-Zellen, analysiert. Neben regulatorischen T-Zellen (*memory* und *naiv*) dienten konventionelle T-Zellen (*total*, *memory* und *naiv*) als Vergleich um eventuelle Unterschiede oder aber auch Gemeinsamkeiten in der Reaktion auf die verschiedenen Stimulationen festzustellen.

Die T-Zellen wurden aus frischen Spenderblut oder Leukozytenfiltern durch eine PBMC-Isolation und anschließender magnetischer Zellsortierung (MACS) isoliert. Je nach gewünschter Zellpopulation wurden die Zellen durch FACS weiter in *memory* oder *naive* Tcons bzw. Tregs sortiert. Die Zellen wurden für 48 h entsprechend vier verschiedener Konditionen, einer Kontroll-, einer Zytokin-, einer DLL4- und einer Zytokin-DLL4-Kondition kultiviert. Anschließend wurden die Zellen per qPCR, FACS, RNA-Sequenzierung oder einer Zytokinmessung auf die Effekte der Kultur hin untersucht.

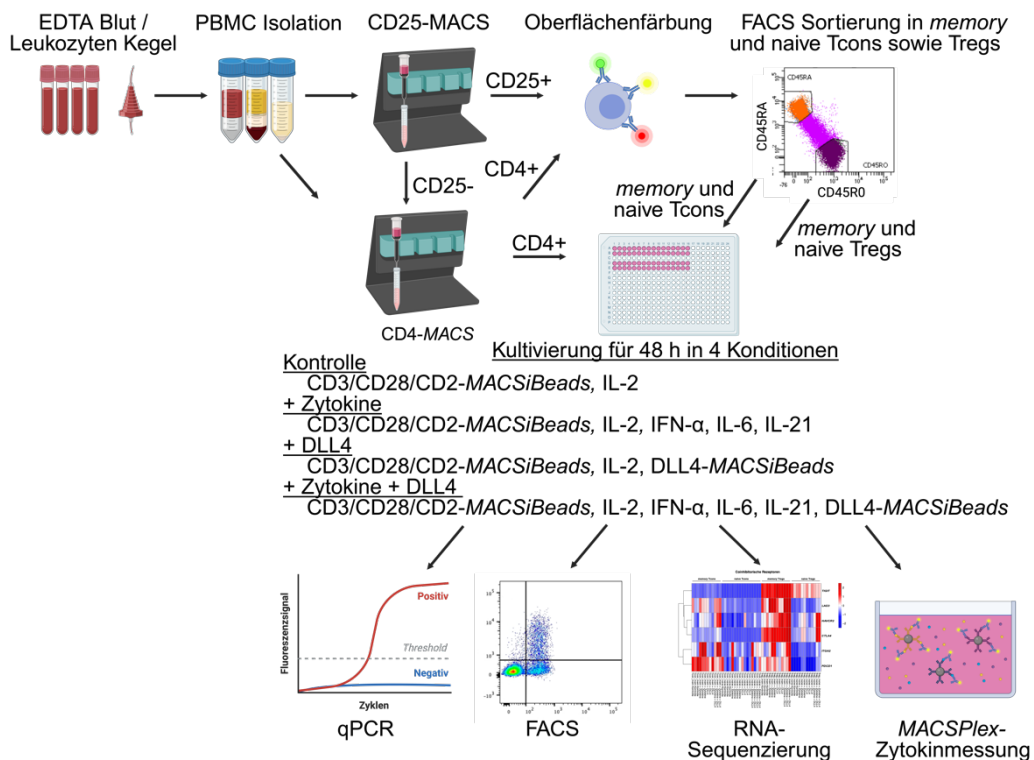


Abbildung 6: Übersicht über die Zellgewinnung, Kultivierung und Analyse

3.1.1 Der Einfluss verschiedener Kulturbedingungen auf die Notch-Rezeptor-Expression

In der Literatur wurden bereits einige Effekte des Notch-Signalweges auf T-Zellen beschrieben (1.5.2 Bedeutung von Notch für T-Zellen). Diese konnten überwiegend auf die Interaktion mit dem Notch-1 Rezeptor zurückgeführt werden (Deftos und Bevan, 2000; Eagar et al., 2004). Über diesen hinaus können T-Zellen jedoch auch Notch-2 und -3 exprimieren (Amsen et al., 2015; Auderset et al., 2012; Charbonnier et al., 2015; Koyanagi et al., 2012).

Daher sollte für die in dieser Arbeit untersuchten Zellen zunächst der für die Notch vermittelten Effekte ursächliche Rezeptor identifiziert werden. Weiterhin sollten mögliche Einflüsse auf die Expression dieses Rezeptors durch die verschiedenen Kulturbedingungen untersucht werden.

Hierzu wurden MACS-angereicherte CD4⁺ Zellen isoliert, 48 h kultiviert und per qPCR auf die Expression der Notch-Rezeptoren 1 bis 4 untersucht. Kultiviert wurden die Zellen unter vier verschiedenen Konditionen. Die Kontroll-Kondition enthielt lediglich die in allen Konditionen zur Stimulation der Proliferation verwendeten CD3/CD28/CD2-MACSiBeads (Aktivierungsbeads) sowie IL-2. In einer ersten Kondition wurde dem Kulturmedium die Zytokine IFN- α , IL-6 und IL-21 hinzugegeben. In einer weiteren Kondition wurden zusätzlich zu den Aktivierungsbeads mit DLL4 gekoppelte Beads in einem 1 zu 3 Zell-Bead-Verhältnis hinzugegeben. Die letzte Kondition bestand aus einer Kombination der anderen beiden Konditionen (im Vergleich zur Kontrolle zusätzlich IFN- α , IL-6 und IL-21 sowie DLL4 gekoppelte Beads (siehe Abbildung 6).

Bei der Untersuchung der Expressionsstärke der einzelnen Notch-Rezeptoren in totalen CD4⁺ Zellen mittels qPCR wurden signifikante Unterschiede deutlich (Abbildung 7A). Am stärksten wurde in allen Konditionen der Notch-1 Rezeptor exprimiert, gefolgt von Notch-2. Über die verschiedenen Konditionen und alle Versuche gemittelt wurden die Notch-Rezeptoren 3 und 4 signifikant weniger exprimiert als die Notch-Rezeptoren 1 und 2. Notch-1 wurde dabei ca. 4-mal stärker exprimiert als Notch-2 und über 3.500-mal bzw. über 7.500-mal stärker als Notch-3 bzw. -4. Die Werte für Notch-3 und -4 lagen dabei zum Teil unterhalb der gewählten Schwelle der relativen Expression von $6,7 \times 10^{-7}$ (Abbildung 7A). Diese Schwelle entspricht Ct-Werten von 38 oder höher für den jeweiligen Rezeptor bei Anwendung eines Durchschnittswertes aller *AKTIN b* Ct-Werte. Ct-Werte im Bereich von 38-40 können lediglich als schwach positiv gewertet werden und sind in ihrer Aussagekraft eingeschränkt. Zwischen den verschiedenen Konditionen (mit/ohne DLL4 und/oder Zytokinen) konnte kein Unterschied in der Expression des Notch-1 sowie Notch-2 Rezeptors gezeigt werden. Vereinzelt kam es in den verschiedenen Konditionen zu leicht erhöhten oder leicht erniedrigten Expressionen, wobei die Schwankungen in der Zytokin-DLL4-Kondition am größten waren.

Die Expressionstärke von Notch-3 und Notch-4 war in den Ansätzen mit DLL4 und/oder Zytokinen im Vergleich zur Kontroll-Kondition reduziert. Signifikante Unterschiede der Expression im Vergleich zur

Kontroll-Kondition waren für Notch-3 in der Zytokin-Kondition und der Zytokin-DLL4-Kondition sowie für Notch-4 in der Zytokin-DLL4-Kondition zu beobachten (Abbildung 7B). Da die Ct-Werte für diese Rezeptoren jedoch für alle Konditionen hoch waren (nahe 40), ist eine Beurteilung dieser Unterschiede nur bedingt möglich.

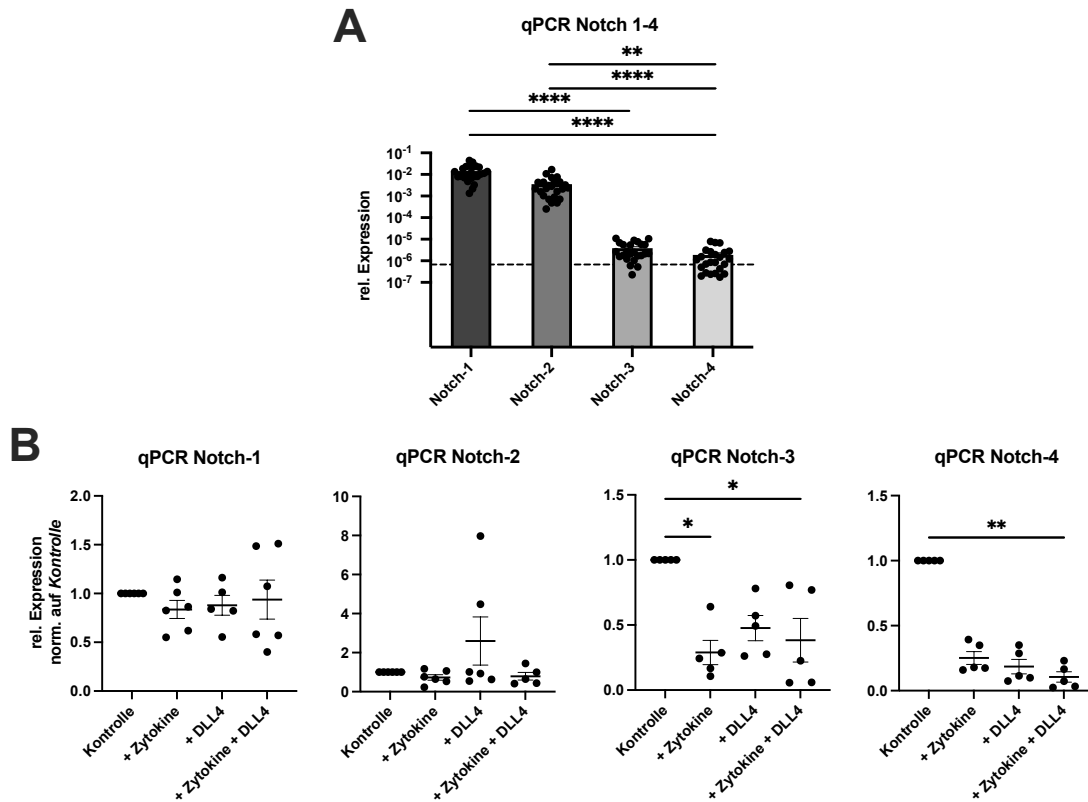


Abbildung 7: Notch-Expression in totalen CD4+ Zellen

5 x 10⁵ totale CD4+ Zellen wurden für 48 h entsprechend der jeweiligen Kondition kultiviert, die RNA isoliert und 250 ng dieser zur cDNA-Synthese eingesetzt. Es folgte eine qPCR für Notch-1, -2, -3 und -4, als Kontroll-Haushaltsgen diente *AKTIN b*. (A) Relative Expression der verschiedenen Notch-Rezeptoren (bezogen auf *AKTIN b*). Die Werte der verschiedenen Konditionen wurden für die jeweiligen Rezeptoren vereint. (n=24, Friedmans Test und *Dunns multiple comparisons* Test, **** $\triangle$ p < 0,0001; ** $\triangle$ p = 0,0032). Die horizontale Linie entspricht einem Ct-Wert der Probe von 38 bezogen auf den durchschnittlichen *AKTIN b* Ct-Wert und kann als Schwellenwert für verlässliche Daten gesehen werden.

(B) Relative Expressionen der verschiedenen Notch-Rezeptoren unter den verschiedenen Bedingungen sowie deren Durchschnitt mit SEM (*Standard error of the mean*). Neben den in allen Konditionen verwendeten CD3/CD28/CD2-MACSiBeads wurde in der Zytokin-Kondition IFN- α , IL-6 sowie IL-21 ins Kulturmedium hinzugefügt. In der DLL4-Kondition wurden mit dem Notch-Liganden DLL4 gekoppelte *Beads* im Zell-*Bead*-Verhältnis von 1 zu 3 hinzugeben und in der Zytokine-DLL4-Kondition zusätzlich zu den DLL4-*Beads* die auch in der Zytokin-Kondition verwendeten Zytokine. Die Expressionstärken wurden auf die jeweilige Kontroll-Kondition normiert. (n=5/6) (Friedmans Test und *Dunns multiple comparisons test*, Notch-3: „Kontrolle“ vs. „+ Zytokine + DLL4“ p=0,0437; Notch-4: „Kontrolle“ vs. „+ DLL4“ p=0,0437; „Kontrolle“ vs. „+ Zytokine + DLL4“ p=0,011)

Aufgrund der geringen gewonnenen Zellzahl konnte, die bei konventionellen T-Zellen etablierte qPCR nicht für regulatorische T-Zellen verwendet werden. Eine aus den Zellen dieser Arbeit erfolgte RNA-Sequenzierung (Abbildung 8) bestätigte jedoch zum einen die beobachteten Ergebnisse für die konventionellen T-Zellen und zeigte darüber hinaus auch in Tregs eine deutlich höhere Expression von Notch-1 und -2 gegenüber Notch-3 und -4. Die höchste Expression fand sich dabei für den Notch-Rezeptor 2. Zwischen den verschiedenen Konditionen zeigten sich dabei zum Teil leichte Expressionsunterschiede.

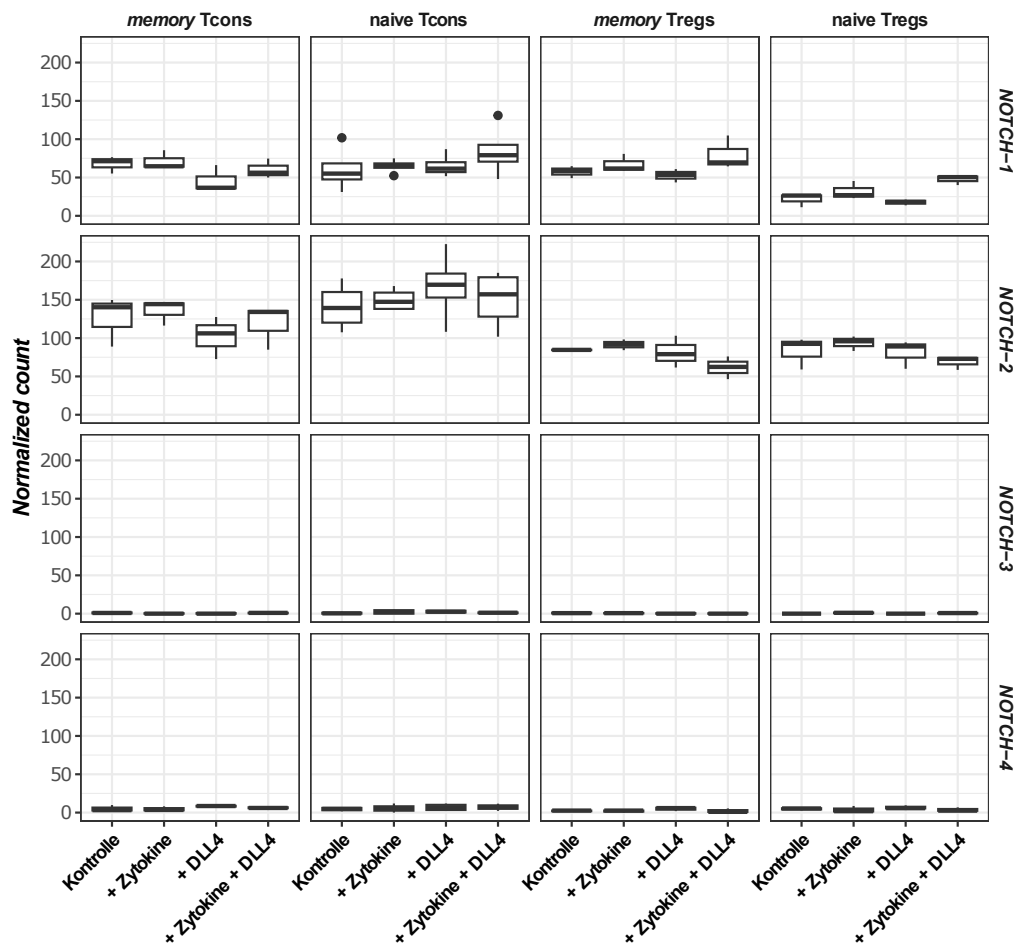


Abbildung 8: Notch-Expression in verschiedenen T-Zelltypen

Zuvor in *memory* und naive Tcons und Tregs sortierte Zellen (n=3/4) wurden für 48 h entsprechend der jeweiligen Kondition kultiviert und anschließend die RNA isoliert und eine RNA-Sequenzierung durchgeführt. Vergleich der Notch-Expression in *memory* sowie naiven Tcons und Tregs. Werte angegeben als *normalized count*.

Insgesamt zeigte sich somit in allen T-Zelltypen eine deutlich höhere Expression der Notch-Rezeptoren 1 und 2, während sich die Expression in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen nur geringfügig veränderte. Da Notch-1 in der qPCR die höchste Expression zeigte, konzentrierten sich die weiteren Untersuchungen auf diesen Rezeptor.

3.2 Expression der ADAM-Proteasen 10 und 17 in verschiedenen T-Zelltypen

Mittels RNA-Sequenzierung konnte zudem die Expression, der für die S2-Spaltung des Notch-Signalwegs verantwortlichen ADAM-Proteasen 10 und 17 analysiert werden (Abbildung 9).

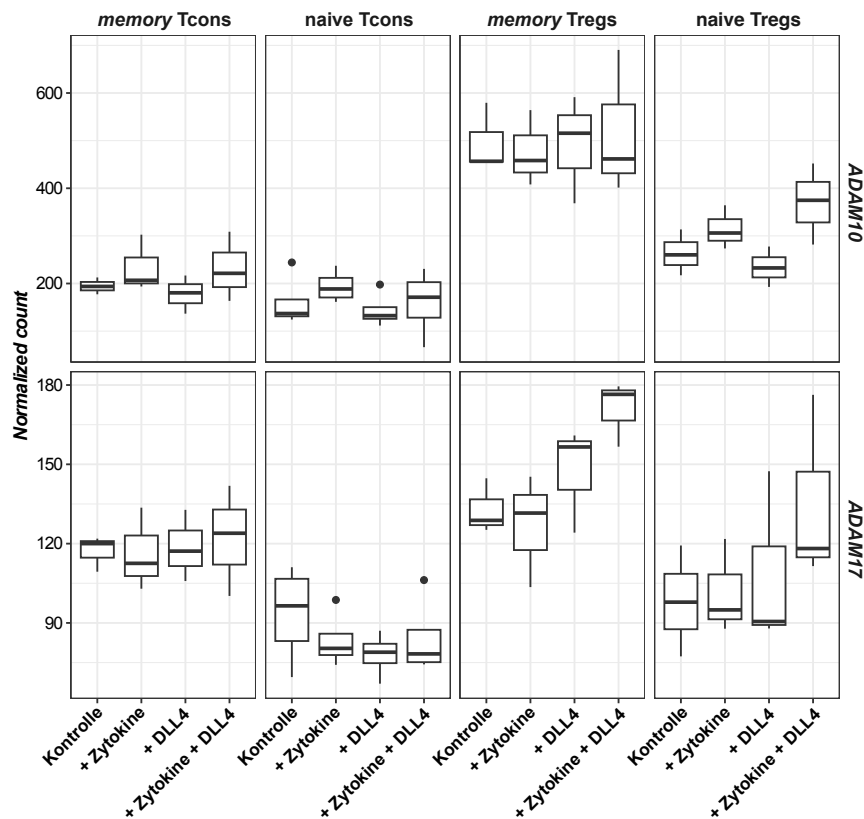


Abbildung 9: ADAM10/ 17-Expression in verschiedenen T-Zelltypen

Zuvor in *memory* und naive Tcons und Tregs sortierte Zellen (n=3/4) wurden für 48 h entsprechend der jeweiligen Kondition kultiviert, anschließend ihre RNA isoliert und eine Sequenzierung durchgeführt. Abgebildet ist die Expression von ADAM10 und 17 in *memory* und naiven Tregs/ Tcons. Werte angegeben als *normalized count*.

In allen untersuchten Zellen zeigte sich eine stärkere ADAM10- als ADAM17-Expression (Abbildung 9). Für ADAM10 zeigte sich weiterhin eine stärkere Expression durch Tregs als durch Tcons. Der *normalized count* zeigte sich in den Tregs verglichen mit den Tcons in etwa doppelt so hoch. Auch ADAM17 wurde im Vergleich von *memory* Tcons zu *memory* Tregs sowie naiven Tcons zu naiven Tregs in den Tregs jeweils stärker exprimiert. Insbesondere in der Kontroll-Kondition war der Unterschied dabei geringer als bei ADAM10.

In den Zytokine enthaltenen Konditionen zeigte sich tendenziell eine erhöhte ADAM10-Expression, während DLL4 tendenziell die ADAM17-Expression zu erhöhen schien. Die höchste Expression der ADAM-Proteasen zeigte sich außer für die naiven Tcons in allen Zelltypen in der Zytokin-DLL4-Kondition (Abbildung 9).

Neben der Expressionsstärke wird die proteolytische Aktivität der ADAM-Proteasen auch durch Inhibitoren, Aktivatoren sowie andere Interaktionspartner reguliert. Zu letzteren gehören Tetraspanine (Tspans) und katalytisch-inaktive Rhomboid-Pseudoproteasen (iRhoms), welche für den Transport der ADAMs an die Zelloberfläche wichtig sind und hierüberhinaus Einfluss auf das Substratspektrum der jeweiligen ADAM nehmen (Harrison et al., 2021; Matthews et al., 2016). Aus diesem Grund wurde im Rahmen der RNA-Sequenzierung auch die Expression der Tetraspanine 5, 10, 14, 15, 17 sowie 33 und der iRhoms1 und 2 verglichen (Abbildung 10, 11).

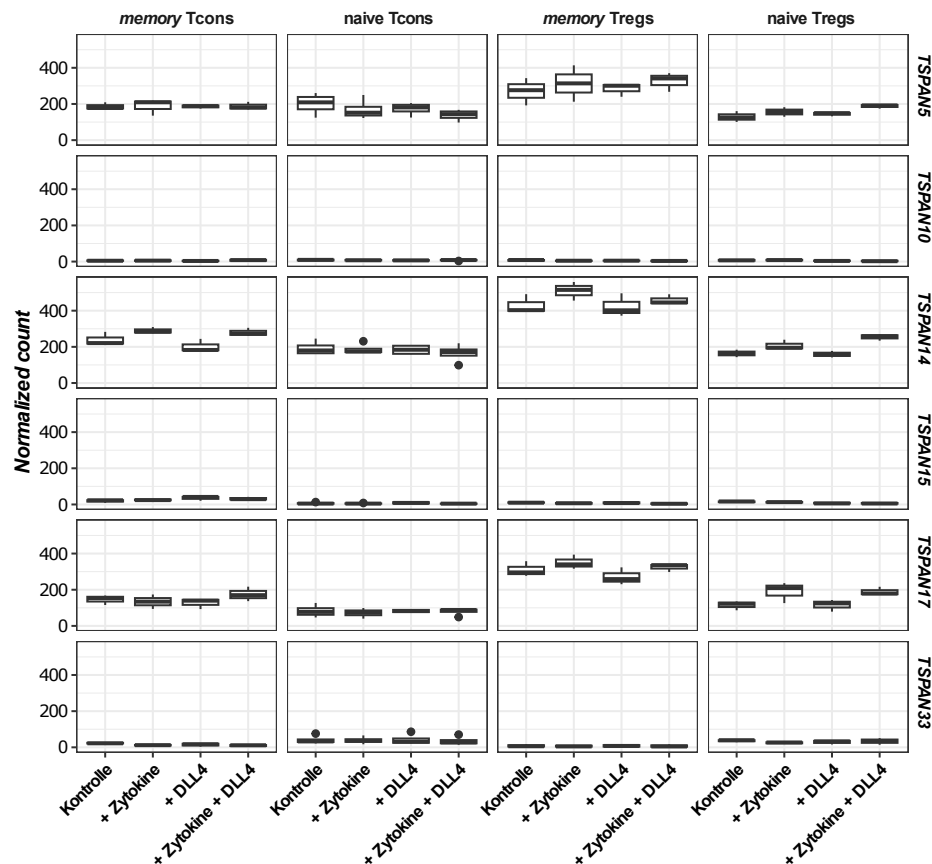


Abbildung 10: Tetraspanin-Expression verschiedener T-Zelltypen

Zuvor in *memory* und naive Tcons und Tregs sortierte Zellen (n=3/4) wurden für 48 h entsprechend der jeweiligen Kondition kultiviert und anschließend die RNA isoliert und eine RNA-Sequenzierung durchgeführt. Vergleich der Expression der Tetraspanine (Tspan) 5, 10, 14, 15, 17, 33 in *memory* und naiven Tregs/ Tcons. Werte angegeben als *normalized count*.

Die Tetraspanine 10, 15 und 33 wurden sowohl von Tcons als auch von Tregs kaum exprimiert, weshalb von einer untergeordneten Rolle dieser Tspans im Kultursystem ausgegangen werden kann. Im Vergleich hierzu zeigte sich für Tspan5, 14 und 17 in allen T-Zelltypen eine deutlich höhere Expression mit der höchsten Expression in *memory* Tregs (Abbildung 10).

Insbesondere in den Tregs und für Tspan14 auch in *memory* Tcons, zeigte sich für alle Tspans die Tendenz einer durch Zytokine erhöhten Expression (Abbildung 10).

Bei Betrachtung der Pseudoproteasen iRhom1 und 2 (Abbildung 11) zeigte sich, dass lediglich iRhom2 kodiert durch *RHBDF2* von den T-Zellen exprimiert wurde. Die stärkste Expression zeigte sich in den *memory* Tcons, wobei auch diese deutlich geringer als die Tetraspanin-Expression war. In Bezug auf die verschiedenen Kulturkonditionen zeigten sich für *RHBDF2* keine eindeutigen Veränderungstendenzen.

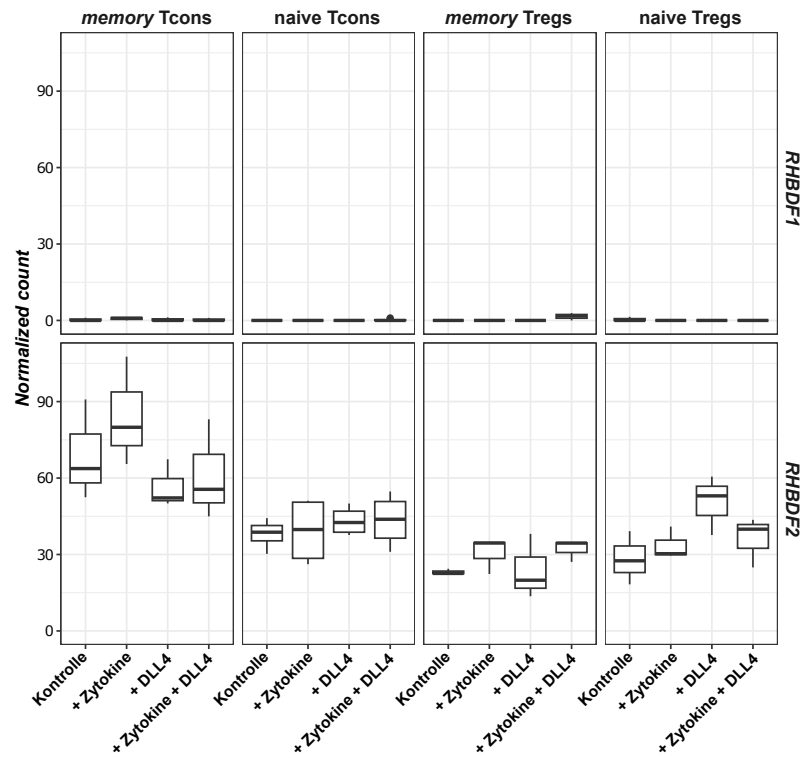


Abbildung 11: iRhom-Expression verschiedener T-Zelltypen

Zuvor in *memory* und *naive* Tcons und Tregs sortierte Zellen (n=3/4) wurden für 48 h entsprechend der jeweiligen Kondition kultiviert, anschließend die RNA isoliert und eine RNA-Sequenzierung durchgeführt. Vergleich der Expression der für die Rhomboid-Pseudoproteasen iRhom1 und 2 kodierenden *RHBDF1* und *RHBDF2* in *memory* und *naiven* Tregs/ Tcons. Werte angegeben als *normalized count*.

3.3 Interaktion zwischen Notch-Rezeptor und -Liganden

Kommt es zu einer Interaktion zwischen einem Notch-Rezeptor und einem seiner Liganden führt dies zu zwei proteolytischen Spaltungen. In einem ersten Schritt wird dabei die extrazelluläre Notch-Domäne (NECD) durch eine ADAM-Protease freigesetzt (S2-Spaltung). Nach vorheriger S2-Spaltung kann dann durch eine weitere proteolytische Spaltung durch die γ -Sekretase die intrazelluläre Notch-Domäne (NICD) freigesetzt werden. Die NICD kann daraufhin in den Nukleus einwandern und dort durch Interaktion mit Co-Repressoren und Aktivatoren zur Transkription von Notch-Zielgenen führen (Steinbuck und Winandy, 2018).

Um nach Stimulation von verschiedenen T-Zell Typen (totale CD4⁺ Zellen, *memory* und naive Tcons) mit dem eingebrachten Notch-Liganden DLL4 eine Interaktion dessen mit dem Notch-Rezeptor zu untersuchen, wurde nach 48 h Kultur eine Oberflächenfärbung des Notch-1 Rezeptors durchgeführt (2.2.6.2 Oberflächen-Färbungen, Abbildung 12A). Durch die S2-Spaltung wird die NECD von der Zelloberfläche freigesetzt und ist somit nicht mehr an der Zelloberfläche detektierbar, weshalb das Ausmaß der Oberflächen-Expression des *full-length* Rezeptors als Indikator einer stattgefundenen S2-Spaltung angesehen werden kann.

Da bei der Analyse insbesondere die durch die Kulturbedingungen entstandenen Unterschiede und nicht die möglichen interindividuellen Unterschiede der Spenderinnen und Spender von Interesse waren, wurden die jeweiligen Messwerte der Zellen eines Spenders/ einer Spenderin unter verschiedenen Konditionsbedingungen auf die Kontroll-Kondition normiert.

Betrachtete man totale CD4⁺ Zellen zeigte sich in der Zytokin-Kondition eine geringe Abnahme der Expression auf durchschnittlich 85% des Kontroll-Konditionswertes. Die nicht normierten Werte (siehe Anhang 1) lagen dabei in der Kontroll-Kondition zwischen 18 und 87 % Notch-1 positiver Zellen (durchschnittlich 57 %) und in der Zytokin-Kondition zwischen 10 und 85 % (Durchschnitt: 50,8 %).

Die Zugabe von DLL4 mit bzw. ohne zusätzliche Zytokine zur CD4⁺ Kultur führte im Vergleich zur Kontrollbedingung zu einer signifikanten Abnahme der Oberflächenexpression des Notch-Rezeptors (Abbildung 12B). Im Vergleich zur Kontroll-Kondition reduzierte sich dabei die Oberflächenexpression von Notch-1 in der DLL4 Kondition um 78 % auf maximal 23 % positive Zellen (Minimum 6 %, *Mean* 11,75 %) und in der Zytokin-DLL4-Kondition um 83 % auf maximal 19 % positive Zellen (Minimum 3 %, *Mean* 9,4 %) (siehe Anhang 1).

Auch in zuvor in *memory* und naive Zellen sortierten T-Zellen führte eine Kultivierung mit DLL4 (mit und ohne Zytokine) zu einer verringerten Oberflächenexpression von Notch-1.

Bei den *memory* Zellen erfolgte im Vergleich zur Kontroll-Kondition bei Zugabe von DLL4 eine Abnahme um 65 % („+ DLL4“) und 68 % („+ Zytokine + DLL4“) bzw. von durchschnittlich 43,2 % positiver Zellen auf 14,5 % und 11,2 % (relative Werte in Abb. 12B).

Im Durchschnitt exprimierten 53 % der naiven T-Zellen in der Kontroll-Kondition Notch-1 auf der Oberfläche. In der DLL4-Kondition waren es 12,7 % und bei zusätzlichen Zytokinen 16,9 % („+ Zytokine + DLL4“). Dies entspricht einer Abnahme um 74 % bzw. 70 % bezogen auf die Kontroll-Kondition (Abbildung 12B).

Zusätzlich konnte bei beiden Zelltypen eine nicht signifikante Zunahme der Notch-Expression bei Zugabe von Zytokinen („+ Zytokine“) zur Kultur beobachtet werden, die Expression stieg um 47 % (*memory* Tcons) bzw. 30 % (naive Tcons).

Für die verwendeten DLL4-*MACSiBeads* zeigte sich hierüberhinaus eine Anfärbbarkeit gegen DLL4 und Notch-1 (Daten nicht gezeigt), welche für einen Verbleib der extrazellulären Notch-Domäne an dem DLL4 der *Beads* spricht.

In Kombination mit der Abnahme der Notch-1 Oberflächenexpression auf allen Zelltypen nach Zugabe des Notch-Liganden DLL4 kann dies als Hinweis auf eine erfolgte Liganden-Rezeptor-Interaktion und anschließende S2-Spaltung von Notch-1 gesehen werden.

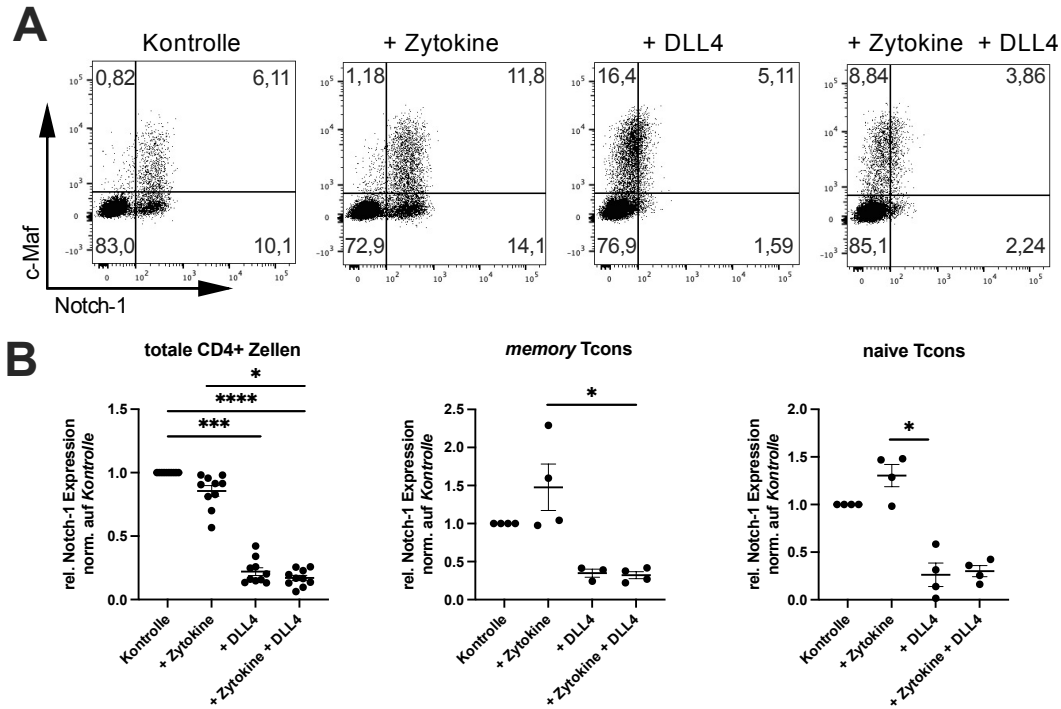


Abbildung 12: Expression von c-Maf und Notch-1 in konventionellen T-Zellen unter verschiedenen Kulturbedingungen

CD4-MACS angereicherte CD4 positive Zellen wurden entweder direkt in Kultur genommen (totale CD4⁺ Zellen) oder zuvor zusätzlich durch FACS in *memory* und naive T-Zellen sortiert. Die Zellen wurden 48 h entsprechend der jeweiligen Kondition kultiviert und anschließend Notch-1 auf der Zelloberfläche und c-Maf intranukleär gefärbt. (A) Repräsentativer *Dotplot* der Expression von c-Maf und Notch-1 in den verschiedenen Konditionen. Abgebildet sind *memory* Tcons.

(B) Darstellung der relativen Notch-1-Expression in den verschiedenen T-Zell Typen und Kulturbedingungen (totale CD4⁺ Zellen n=10; *memory* n=4; naive n=4). Die Werte wurden durch Division des Anteils positiver Zellen der jeweiligen Kondition durch den Anteil der positiven Zellen in der Kontroll-Kondition auf letztere normiert. Dargestellt sind die einzelnen Messungen als Einzelpunkte sowie der *Mean* mit SEM. (B: Friedmans Test und *Dunns multiple comparisons test*: totale CD4⁺ Zellen: „Kontrolle“ vs. „+ DLL4“ p=0,0008; „Kontrolle“ vs. „+ Zytokine + DLL4“ p<0,0001; „+ Zytokine“ vs. „+ Zytokine + DLL4“ p=0,011; *memory* Tcon: „+ Zytokine“ vs. „+ Zytokine + DLL4“ p=0,016; naive Tcon: „+ Zytokine“ vs. „+ DLL4“ p=0,037)

3.3.1 Aktivierung von Notch-Zielgenen in konventionellen T-Zellen

Die Translokation der proteolytisch freigesetzten intrazellulären Notch-Domäne in den Nukleus führt zur gesteigerten Expression verschiedener Notch-Zielgene, wie z. B. *HES-1*. Bei dem *basic helix loop helix* Molekül *HES-1* (*hairy and enhancer of split-1*) handelt es sich um ein direktes Notch-Zielgen,

dessen Expression in Folge einer Notch-Aktivierung hochreguliert wird (Bray, 2006). Weiterhin zeigten Ting et al., dass der auch in dieser Arbeit verwendete Notch-Ligand DLL4 in der Lage ist, die Expression von *HES-1* in verschiedenen T-Zelltypen zu aktivieren. Die Expression von *HES-1* kann somit als ein Maß für eine stattgefundene Interaktion zwischen Notch-Rezeptoren und dem Liganden DLL4 und für die daraus folgende Aktivierung des Notch-Signalweges dienen.

Nach 48 h Kultur entsprechend der jeweiligen Kondition mit oder ohne DLL4 und/oder Zytokinen wurde die RNA von totalen CD4⁺ Zellen isoliert und eine qPCR zum Nachweis von für *HES-1* codierender mRNA durchgeführt. Es zeigte sich eine signifikante Expressionszunahme von *HES-1* in den DLL4 enthaltenen Konditionen auf das 19,8-Fache („+ DLL4“) bzw. 23,4-Fache („+ Zytokine + DLL4“) der Expression der Kontroll-Kondition (Abbildung 13A).

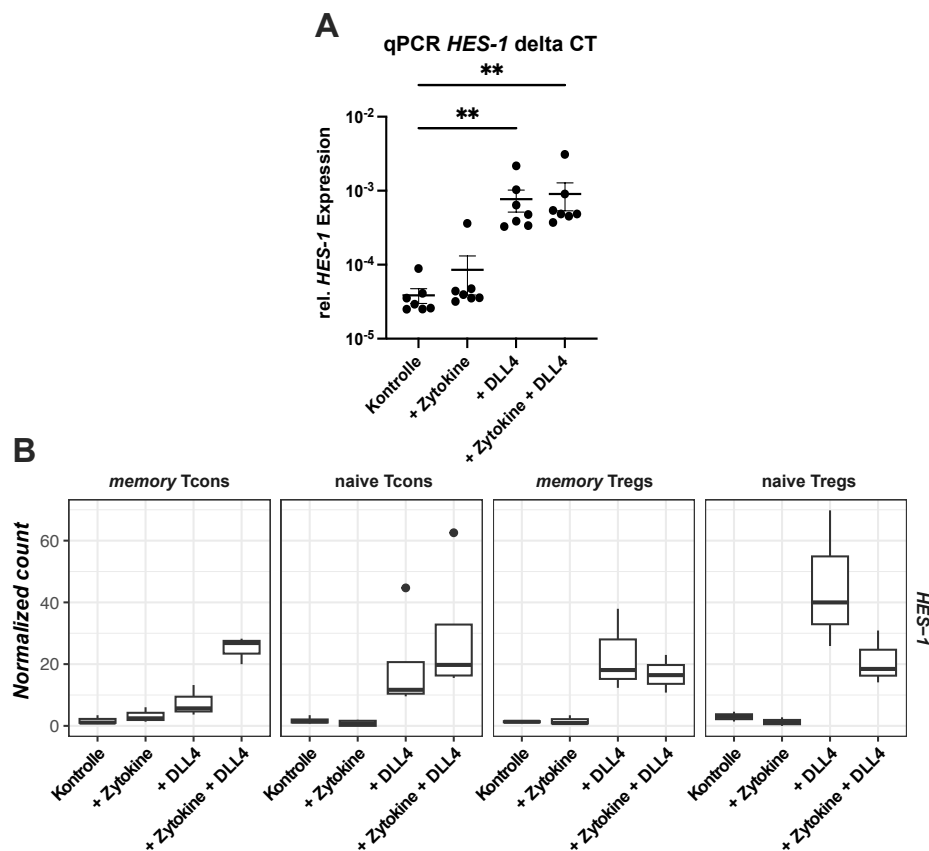


Abbildung 13: Induktion der Expression von *HES-1*

(A) 5×10^5 Totale CD4⁺ Zellen wurden für 48 h entsprechend der jeweiligen Kondition kultiviert und anschließend ihre RNA isoliert. 250 ng dieser wurde zur cDNA-Synthese eingesetzt und eine qPCR für *HES-1* durchgeführt (n=7). Unter Nutzung einer vergleichenden Ct-Methode wurde die relative Expression im Vergleich zum Haushaltsgen *AKTIN b* ermittelt. Abgebildet ist die relative Expression sowie der Mean mit SEM. (Friedmans Test und Dunns multiple comparisons test, „Kontrolle“ vs. „+ DLL4“ p=0,0026; „Kontrolle“ vs. „+ Zytokine + DLL4“ p=0,0012.)

(B) Zuvor in *memory* und *naive* Tcons und Tregs sortierte Zellen (n=3/4) wurden für 48 h entsprechend der jeweiligen Kondition kultiviert, ihre RNA isoliert und eine RNA-Sequenzierung durchgeführt. Vergleich der *HES-1*-Expression in *memory* und *naiven* Tregs/ Tcons. Werte angegeben als *normalized count*.

Mittels RNA-Sequenzierung konnte ebenso in *memory* und naiven Tcons und Tregs ein Anstieg der *HES-1*-Expression gezeigt werden (Abbildung 13B). Dabei war die Expressionszunahme für Tcons in der Zytokin-DLL4-Kondition und für Tregs in der DLL4-Kondition am größten.

Zusammenfassend lässt die mittels verschiedener Methoden gezeigte Erhöhung der *HES-1*-Expression auf eine erfolgreiche Aktivierung des Notch-Signalweges durch Kultivierung mit DLL4 in allen untersuchten T-Zelltypen schließen.

In Kombination mit den vorherigen Ergebnissen sind somit die grundlegenden Erfordernisse zur Untersuchung des Effektes des Notch-Liganden DLL4 auf die T-Zellfunktion gegeben: die untersuchten Zellen exprimieren einen Notch-Rezeptor und dieser ist in der Lage mit dem angebotenen Liganden zu interagieren sowie die bei einer Aktivierung beschriebenen Signalwege einzuleiten.

3.4 Expression von c-Maf und IL-10 in T-Zellen

Weiterhin sollte untersucht werden inwiefern die Funktion der T-Zellen durch die beobachtete Aktivierung von Notch sowie durch die beigefügten Zytokine beeinflusst wird. Dabei sollte IL-10, als das wichtigste anti-inflammatorische Zytokin als *Readout* dienen, um eine Entwicklung hin zu einem regulatorischen Phänotyp festzustellen. Um das intrazelluläre Zytokin IL-10 zu färben, müssen Zellen anders als bei den anderen Färbungen zunächst mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) und Ionomycin restimuliert werden sowie die Sekretion ins Kulturmedium durch Brefeldin A gehemmt werden (Cossarizza et al., 2019). Um auch ohne eine solche Restimulation indirekt eine Aussage über die IL-10-Produktion treffen zu können, wurde stattdessen der Transkriptionsfaktor c-Maf gefärbt.

C-Maf wird dabei unter anderem im Rahmen TGF- β -abhängiger Signalwege induziert und bindet an Konsensmotive (Maf-Erkennungselement (MARE)) im IL-10-Promotor (Neumann et al., 2014; Xu et al., 2009). Neumann et al. sowie Saraiva et al. konnten hierüber hinaus zeigen, dass die c-Maf-Expression mit der IL-10-Produktion verschiedener T-Effektor Zelltypen korreliert (Neumann et al., 2014; Saraiva et al., 2009).

Zudem konnte die von Ahlers et al. beobachtete Notch und IFN- α /IL-6/IL-21 vermittelte IL-10-Produktion in T-Zellen von ihnen auf die Transkriptionsfaktoren Blimp-1 sowie c-Maf zurückgeführt werden. C-Maf positive Zellen waren dabei signifikant häufiger IL-10 positiv als c-Maf negative Zellen (Ahlers et al., 2022). Eine c-Maf-Expression kann somit für eine Entwicklung der Zellen hin zu einem IL-10 exprimierenden Phänotyp sprechen.

Um eine Expression von c-Maf und die damit verbundene Entwicklung hin zu einem IL-10 exprimierenden Phänotyp zu überprüfen wurden die T-Zellen (totale CD4⁺ Zellen, *memory* und naive Tcons) 48 h lang kultiviert und im Anschluss eine intranukleäre Färbung für c-Maf durchgeführt (2.2.6.4 Intranukleäre-Färbungen) (Abbildung 12A).

In totalen CD4⁺ Zellen zeigte eine Kultivierung mit Zytokinen keinen Einfluss auf die c-Maf-Expression. Der Anteil c-Maf positiver Zellen lag dabei in der Kontroll-Kondition im Durchschnitt bei 17,6 %, in der Zytokin-Kondition bei 19 %. Wurden die Zellen mit DLL4 kultiviert, konnte eine höhere relative Expression verglichen mit der Kontroll-Kondition beobachtet werden. Im Vergleich zur Kontroll-Kondition exprimierten die mit DLL4 kultivierten Zellen ungefähr doppelt so häufig c-Maf (Durchschnittlich 35,3 %). Die Kombination aus Zytokinen und DLL4 zeigte einen vergleichbaren Effekt, wie DLL4 allein (Durchschnittlich 34,1 %) (relative Werte abgebildet in Abbildung 14A).

Somit scheint die c-Maf Expression in CD4⁺ Zellen insbesondere durch DLL4 und nur geringfügig von den Zytokinen IFN- α , IL-6 und IL-21 beeinflusst zu werden.

Dieser Einfluss von DLL4 auf die c-Maf-Expression zeigte sich ebenfalls in den in *memory* und naive T-Zellen sortierten Zellen. In *memory* T-Zellen führte die Zugabe von Zytokinen in die Kultur zu einem Anstieg der relativen c-Maf-Expression auf fast das 2-Fache der Kontroll-Kondition, die Zugabe von DLL4 zu einem Anstieg auf das 2,4-Fache, die Kombination aus beiden zum Anstieg auf das 1,4-Fache (Abbildung 14A). Der Anteil c-Maf positiver Zellen lag dabei im Durchschnitt bei 29,3 % („Kontrolle“), 35,2 % („+ Zytokine“), 43,9 % („+ DLL4“) und 34,9 % („+ Zytokine + DLL4“).

In naiven T-Zellen zeigte sich in der Kontroll-Kondition eine deutlich geringere c-Maf-Expression als bei den *memory* T-Zellen. Sie betrug im Durchschnitt 6,9 % und blieb durch eine Kultivierung mit Zytokinen weitestgehend unbeeinflusst (6,3 %). In der DLL4-Kondition stieg der Anteil positiver Zellen hingegen auch bei naiven T-Zellen an. Der Anteil c-Maf positiver Zellen verdreifachte sich auf durchschnittlich 18,9 % c-Maf positive Zellen und in der Zytokin-DLL4-Kondition stieg der Anteil sogar um 24,6 % auf 31,5 % (relative Werte in Abb. 14A).

Vergleicht man die c-Maf-Expression in den verschiedenen Zelltypen, so zeigt sich die höchste c-Maf-Expression in den *memory* Tcons und die niedrigste in den naiven Tcons.

In allen drei Zelltypen schien die Kultivierung mit DLL4 einen stärkeren c-Maf induzierenden Effekt zu haben als die Kultivierung mit IFN- α , IL-6 und IL-21. Die Zytokine führten nur in den *memory* Tcons zu einem signifikanten Anstieg der c-Maf-Expression.

In der RNA-Sequenzierung (Abbildung 14B) konnten diese Daten weitestgehend bestätigt werden. In *memory* Tcons zeigte sich Zytokin-vermittelt eine Zunahme der Expression von *MAF* (codiert für c-Maf). DLL4-vermittelt zeigte sich hingegen nur eine geringfügige Expressionssteigerung von *MAF*. In naiven T-Zellen zeigte sich insgesamt eine niedrigere Expression von *MAF* und lediglich durch DLL4 kam es zu einer Zunahme der Expression, welche sich in der zusätzlich zu DLL4 auch Zytokine enthaltenen Kondition noch weiter verstärkte.

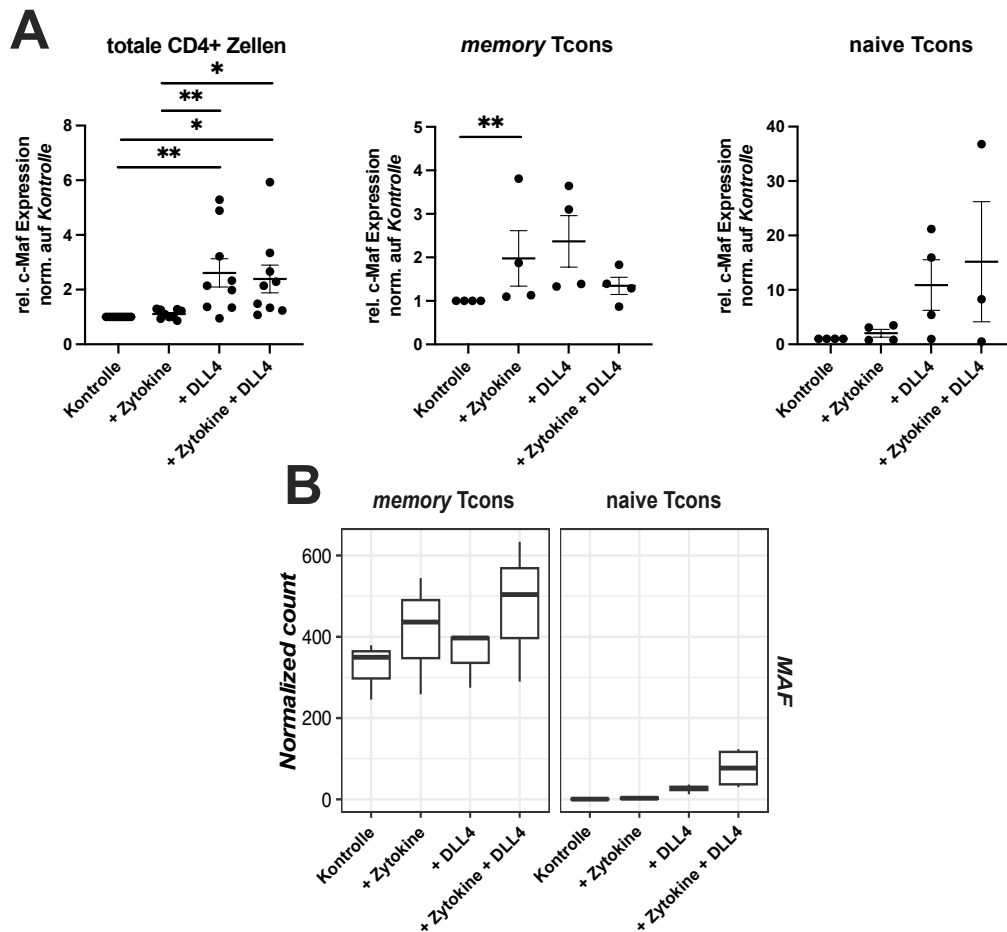


Abbildung 14: Expression von c-Maf in konventionellen T-Zellen

(A) CD4-MACS angereicherte CD4+ Zellen wurden entweder direkt in Kultur genommen (totale CD4+ Zellen) oder zuvor zusätzlich durch FACS in *memory* und naive T-Zellen sortiert. Die Zellen wurden 48 h entsprechend der jeweiligen Kondition kultiviert und anschließend c-Maf intranukleär gefärbt. Dargestellt ist die ermittelte relative Expression von c-Maf sowie der *Mean* mit SEM. Die Werte wurden durch Division des Anteils positiver Zellen der jeweiligen Kondition durch den Anteil der positiven Zellen in der Kondition „Kontrolle“ auf letztere normiert. (*One-way ANOVA*: totale CD4+ Zellen: „Kontrolle“ vs. „+ DLL4“ $p=0,0046$; „Kontrolle“ vs. „+ Zytokine + DLL4“ $p=0,023$; „+ Zytokine“ vs. „+ DLL4“ $p=0,0045$; „+ Zytokine“ vs. „+ Zytokine + DLL4“ $p=0,024$; *Memory Tcons*: „+ Kontrolle“ vs. „+ Zytokine“ $p=0,0018$)

(B) Für 48 h kultivierte *memory* und naive Tcons ($n=3$) wurden für 48 h entsprechend der jeweiligen Kondition kultiviert, anschließend die RNA isoliert und eine RNA-Sequenzierung durchgeführt. Vergleich der Expression des für c-Maf kodierenden Gens *MAF*. Werte angegeben als *normalized count*.

3.4.1 Expression und Sekretion von IL-10 durch CD4+ T-Zellen

Neben c-Maf als indirekter Indikator einer IL-10-Expression sollte weiterhin auch die Expression von IL-10 direkt gemessen werden. Der Effekt der Kulturbedingungen auf die IL-10-Produktion wurde sowohl auf RNA-Ebene als auch auf Proteinebene anhand einer Konzentrationsmessung des in den Zellkulturüberstand sekretierten IL-10 bestimmt.

Die RNA von zuvor 48 h der jeweiligen Kulturbedingung entsprechend mit Zytokinen und/oder DLL4 kultivierten totalen CD4+ Zellen wurde isoliert und eine IL-10 qPCR durchgeführt. Als Haushaltsgen

wurde *AKTIN b* gewählt. In der Zytokin-Kondition zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Expression von IL-10 auf das 4-Fache der Kontroll-Kondition. Die Kondition mit DLL4 zeigte eine 1,6-fach erhöhte IL-10-Expression. Eine signifikante Erhöhung war ebenfalls in der sowohl Zytokine als auch DLL4 enthaltenen Kondition zu beobachten. Hier betrug die relative IL-10-Expression im Median dem mehr als 12-Fachen der Expression der Kontroll-Kondition (Abbildung 15A).

Die Daten der qPCR in totalen CD4⁺ Zellen konnten durch eine RNA-Sequenzierung um Daten zu *memory* und naiven Tcons erweitert werden (Abbildung 15C und E). Diese zeigten sowohl für *memory* als auch für naive Tcons eine Zunahme der IL-10-Expression in der DLL4 und Zytokine enthaltenen Kondition. In den *memory* T-Zellen zeigte sich außerdem allein durch Zugabe von Zytokinen eine Zunahme der Expression und insgesamt eine deutlich höhere IL-10-Expression als in den naiven Tcons. Die IL-10 Konzentration wurde zusätzlich im Kulturmedium via *MACSPlex* gemessen (Abb. 15B, D, F). In einem ersten Versuch wurde die IL-10 Konzentration in den Überständen von für 48 h kultivierten totalen CD4⁺ Zellen gemessen (Abb. 15B). Die Werte lagen dabei teilweise außerhalb des Detektionsbereiches des verwendeten *Kits*. Dennoch konnte dieser Versuch zeigen, dass IL-10 sekretiert wird und dass in der Kondition mit Zytokinen und DLL4 die höchste IL-10 Konzentration zu erwarten war (Abb. 15B). Weiterhin wurde die Messungen der IL-10 Konzentrationen in den Überständen von *memory* und naiven T-Zellen aufgrund dieser Ergebnisse auf die Überstände der Kontroll- und der Zytokin-DLL4-Kondition begrenzt (Abb. 15D u. F). Es zeigte sich im Vergleich zur Kontroll-Kondition eine signifikant höhere IL-10 Konzentration in der Zytokin-DLL4-Kondition.

In *memory* Tcons betrug die durchschnittliche IL-10 Konzentration in den Kontroll-Konditions-Überständen 3.017,9 pg/ml, während sie in der Zytokin-DLL4 Kondition mit 19.777 pg/ml das mehr als 6,5-Fache betrug (Abbildung 15D).

Eine deutlich geringere IL-10 Konzentration fand sich in den Überständen der naiven T-Zellen. Hier betrug sie in der Kontroll-Kondition durchschnittlich 165 pg/ml und in der Zytokin-DLL4 Kondition 788 pg/ml (Abbildung 15F).

Eine IL-10-Produktion konnte somit sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Es zeigte sich weiterhin, dass *memory* T-Zellen sowohl in der Kontroll- (18-mal) als auch in der Zytokin-DLL4- Kondition (25-mal) höhere IL-10-Konzentrationen produzierten als naive T-Zellen.

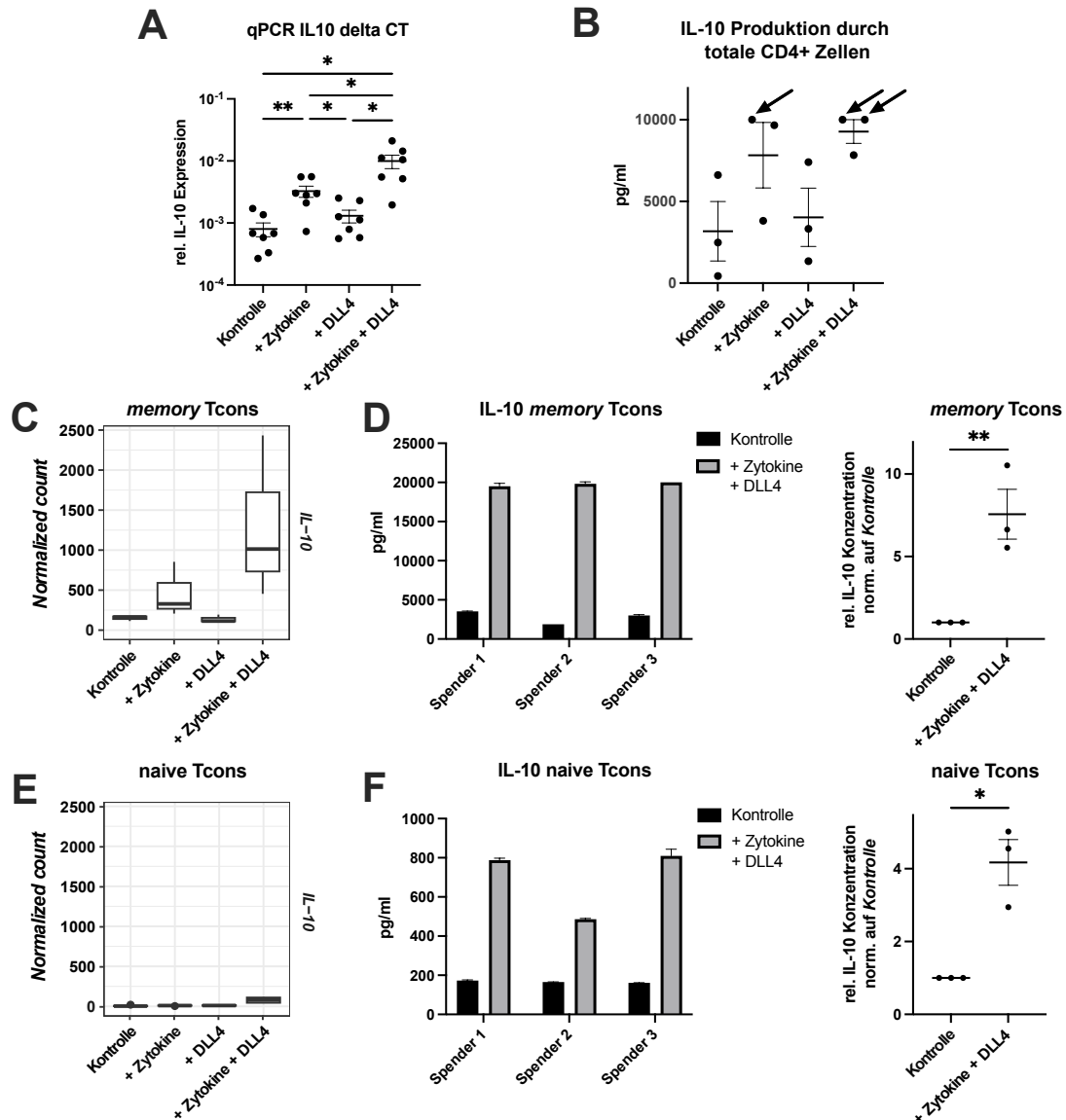


Abbildung 15: IL-10-Expression und Produktion durch konventionelle T-Zellen

(A) Die RNA von für 48 h entsprechend der jeweiligen Kondition kultivierten 5×10^5 CD4⁺ Zellen wurde isoliert, 250 ng dieser RNA zur cDNA-Synthese eingesetzt und eine qPCR für IL-10 durchgeführt. Unter Nutzung einer vergleichenden Ct-Methode wurde die relative Expression zum Haushaltsgen *AKTIN b* ermittelt. Dargestellt sind die relative Expression und der Mittelwert mit Angabe des SEM (n=7). (B) Der Überstand dieser Zellen wurde durch *MACSplex* auf die enthaltene IL-10 Konzentration untersucht. Die mit Pfeil markierten Punkte lagen mit einer Konzentration von über 10.000 pg/ml außerhalb des Detektionsbereiches. Dargestellt sind die aus einer Doppelmessung hervorgegangenen Werte sowie der Mittelwert mit SEM (n=3). (C-F) $2,5 \times 10^5$ in *memory* (n= 3) und *naive* (n=3) konventionelle T-Zellen sortierte Zellen wurden 48 h entsprechend der jeweiligen Kondition kultiviert. (C+E) Die RNA wurde isoliert und die IL-10-Expression in einer RNA-Sequenzierung bestimmt. Dargestellt ist der *normalized count*. (D+F) Der Überstand der kultivierten Zellen wurde mittels *MACSplex* analysiert, dargestellt ist links die totale IL-10-Konzentration und rechts die relative Konzentration normiert auf die Kontroll-Kondition sowie deren Mittelwert.

(A: *One-way ANOVA*: „Kontrolle“ vs. „+ Zytokine“ p=0,009; „Kontrolle“ vs. „+ Zytokine + DLL4“ p=0,028; „+ Zytokine“ vs. „+ DLL4“ p=0,015; „+ Zytokine“ vs. „+ Zytokine + DLL4“ p=0,048; „+ DLL4“ vs. „+ Zytokine + DLL4“ p=0,027; C: *paired t-test* „Kontrolle“ vs. „+ Zytokine + DLL4“ p=0,001; D: *paired t-test* „Kontrolle“ vs. „+ Zytokine + DLL4“ p=0,037)

In weiteren Versuchen der Arbeitsgruppe konnte hierüber hinaus gezeigt werden, dass das durch die *memory* CD4⁺ T-Zellen produzierte IL-10 eine suppressive Wirkung auf mit Lipopolysacchariden (LPS)-stimulierte Monozyten hat (Ahlers et al., 2022). Hierzu wurden aus PBMCs gewonnene Monozyten dem Medium der in dieser Arbeit beschriebenen Versuche ausgesetzt. Verglichen wurden die Zellkulturüberstände der Kontroll-Kondition mit denen der Zytokin-DLL4-Kondition. Die Monozyten wurden in den entsprechenden Medien mit LPS stimuliert und nach 6 h per qPCR die Expression von HLA-DR und CD40 untersucht. Die durch Stimulation mit LPS erhöhte CD40-Expression stieg bei Exposition gegenüber den Überständen der Kontroll-Kondition weiter an. Im Gegensatz hierzu blieb die CD-40-Expressionszunahme in den Monozyten, welche den Überständen der mit DLL4 und Zytokinen kultivierten T-Zellen ausgesetzt waren, aus. Die CD40-Expression entsprach dabei in etwa der Expression der nicht mit LPS stimulierten Monozyten. Weiterhin zeigte sich bei Exposition gegenüber den Kontroll-Konditionsüberständen eine verstärkte HLA-DR-Expression, auch diese blieb in den Monozyten, welche den Zytokin-DLL4-Konditionsüberständen ausgesetzt waren, aus. Durch Einsatz eines Anti-IL-10-Rezeptor-Antikörpers stieg die reduzierte CD40-Expression sowie HLA-DR-Expression auch in den Monozyten, welche den Zytokin-DLL4-Konditionsüberständen ausgesetzt waren, an.

Zusammenfassend zeigen die Versuche, dass in Tcons nicht nur eine Aktivierung des Notch-Signalweges erfolgt, sondern insbesondere auch durch die STAT3 aktivierenden Zytokine eine veränderte IL-10 Sekretion und somit eine mögliche Funktionsveränderungen stattfindet. Das produzierte IL-10 zeigte dabei einen negativen Effekt auf die CD40- sowie HLA-DR-Expression in aus PBMCs isolierten Monozyten.

3.5 Übertragung der Untersuchungen auf regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen stellen eine Untergruppe von CD4⁺ T-Zellen dar, welche sich in ihrer Funktion zum Teil erheblich von den anderen Mitgliedern dieser Gruppe unterscheiden. Beispielsweise wirken Tregs T-Zell-Antworten insbesondere auf auto-Antigene entgegen und unterdrücken so Immunantworten (Caramalho et al., 2015). Um ungewollte oder aber auch um zu starke Immunreaktionen zu begrenzen, stehen Tregs mehrere Suppressionsmechanismen zur Verfügung - einer dieser Mechanismen ist die Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 (1.3.1.1 Wirkungsweise von regulatorischen T-Zellen). Um zu überprüfen, ob die in den konventionellen T-Zellen beobachteten Einflüsse der Konditionsbedingungen auch bei Tregs zu beobachten sind und um mögliche Unterschiede in der Interaktion mit dem Notch-Liganden DLL4, den Zytokinen, aber auch in der Regulation der IL-10-Produktion zu untersuchen, wurden die zuvor beschriebenen Versuche mit in naive und *memory* Zellen sortierten regulatorischen T-Zellen durchgeführt.

3.5.1 Von Tregs exprimierte Notch-1 Rezeptoren interagieren mit DLL4

Analog zu konventionellen T-Zellen wurde auch bei Tregs nach 48 h Kultur eine Oberflächenfärbung von Notch-1 durchgeführt (Abbildung 16A). Die regulatorischen T-Zellen (*memory* Tregs: 51 %, naive Tregs: 52,4 %) zeigten dabei eine zu den konventionellen T-Zellen (totale CD4⁺ Zellen: 57 %, naive Tcons: 53 %) vergleichbare Oberflächenexpression des Notch-1 Rezeptors. Lediglich in konventionellen *memory* T-Zellen war mit durchschnittlich 43 % eine leicht geringere Expression zu verzeichnen.

In der Kontroll-Kondition der *memory* Tregs exprimierten im Durchschnitt 51 % der Zellen den Notch-1 Rezeptor, in der Kondition mit Zytokinen waren es 54 %. Im Gegensatz hierzu war die Oberflächenexpression des Notch-1 Rezeptors in den Konditionen mit DLL4 signifikant vermindert. In der DLL4-Kondition waren durchschnittlich 2,9 % der Zellen Notch positiv und in der Zytokin-DLL4-Kondition 4,0 %. Auf die Kontroll-Kondition normiert ergab sich eine signifikante Abnahme der Notch Oberflächenexpression um über 90% auf das 0,05-Fache des Ausgangswertes in der DLL4-Kondition und auf das 0,07-Fache in der Zytokin-DLL4-Kondition (Abbildung 16B).

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch in naiven Tregs. In der Kontroll-Kondition betrug der Anteil Notch-1 positiver Zellen im Durchschnitt 52,4 %, im Vergleich hierzu zeigte sich in der Zytokin-Kondition mit 59,6 % eine leicht erhöhte Expression. In den Konditionen mit DLL4 zeigte sich auch in naiven Tregs die Notch-1-Expression deutlich vermindert. In der DLL4-Kondition waren im Durchschnitt lediglich 3,9 % der Zellen Notch-1 positiv, in der Zytokin-DLL4-Kondition waren es 4,9 %. Normiert auf die Kontroll-Kondition ergibt dies einen 20 %-igen Anstieg in der Zytokin-Kondition und eine signifikante Abnahme auf weniger als 1/10 des Kontrollwertes in den beiden Konditionen mit DLL4 („+ DLL4“: 0,075; „+ Zytokine + DLL4“: 0,03) (Abbildung 16B).

Auf RNA-Ebene (Abbildung 8) zeigte sich währenddessen, wie auch schon bei den konventionellen T-Zellen keine Abnahme der Notch-1-Expression in den entsprechenden Konditionen. In der Zytokin-DLL4-Kondition zeigte sich sogar eine leichte Zunahme der Notch-1-Expression. Somit kann auch in den regulatorischen T-Zellen von einer Interaktion zwischen Rezeptor und Liganden mit anschließender proteolytischer Spaltung ausgegangen werden.

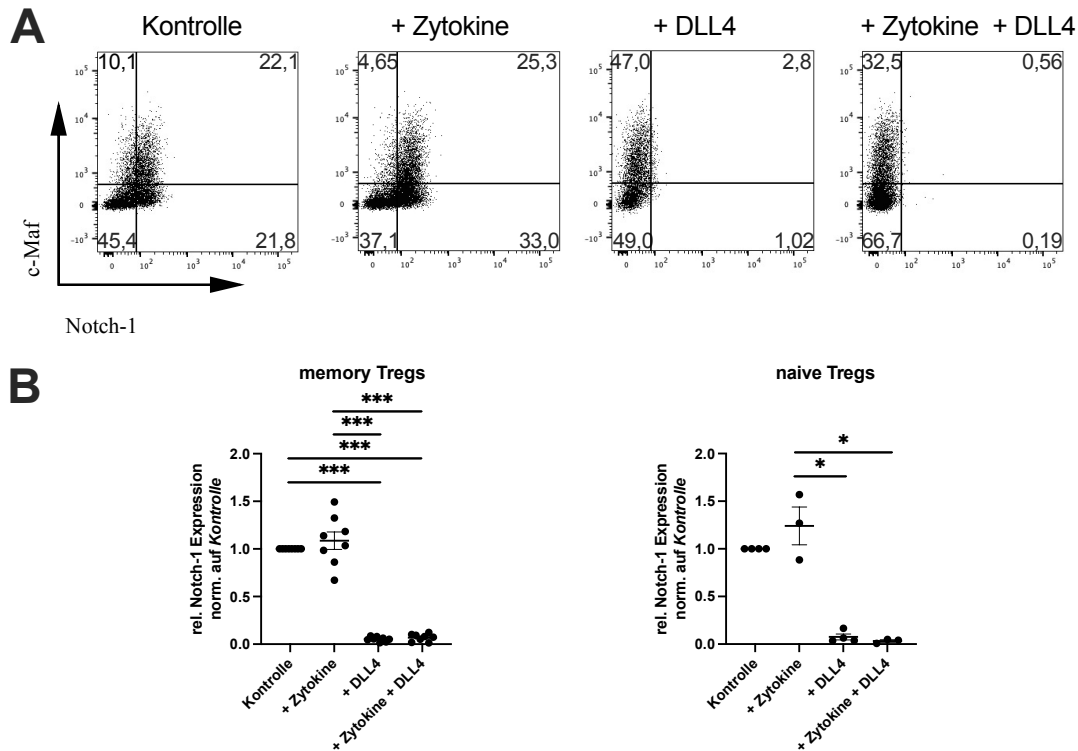


Abbildung 16: Notch-1-Expression in regulatorischen T-Zellen

CD25-MACS angereicherte Zellen wurden via FACS in *memory* und naive regulatorische T-Zellen (Tregs) sortiert. Die Zellen wurden 48 h entsprechend der jeweiligen Kondition kultiviert und anschließend der Notch-1 Rezeptor auf der Zelloberfläche sowie c-Maf intranukleär gefärbt. (A) Repräsentativer Dotplot der Expression von c-Maf und Notch-1 in den verschiedenen Konditionen in *memory* Tregs. (B) Darstellung der relativen Notch-1-Expression in *memory* und naiven Tregs (*memory* n=8/9; naive n= 3/4). Die Werte wurden durch Division des Anteils positiver Zellen der jeweiligen Kondition durch den Anteil der positiven Zellen in der Kontroll-Kondition auf letztere normiert. Dargestellt sind die einzelnen Messungen als Einzelpunkte sowie der *Mean* und SEM. (B: *One-way ANOVA*: *memory* Tregs: „Kontrolle“ vs. „+ DLL4“ p=0,0008; „Kontrolle“ vs. „+ Zytokine + DLL4“ p=0,0007; „+ Zytokine“ vs. „+ DLL4“ p=0,0009; „+ Zytokine“ vs. „+ Zytokine + DLL4“ p=0,0009; *Mixed-effects analysis*: naive Tregs: „+ Zytokine“ vs. „+ DLL4“ p=0,0497; „+ Zytokine“ vs. „+ DLL4“ p=0,0499)

3.5.2 Expression von c-Maf in Tregs

Nach 48 h Kultur entsprechend der vier Konditionen wurden die regulatorischen T-Zellen wie auch die konventionellen T-Zellen intranukleär für c-Maf gefärbt. Zusätzlich wurde eine FoxP3 und CD137 Färbung durchgeführt. Zellen, die eine starke Expression dieser Marker zeigten, wurden als Tregs identifiziert.

Mit durchschnittlich 66,7 % c-Maf positiven Zellen in der Kontroll-Kondition zeigten *memory* Tregs eine deutlich höhere c-Maf-Expression als die konventionellen *memory* T-Zellen dieser Kondition (29,2 % s.a. Abschnitt 3.4). Bei Zugabe von Zytokinen war tendenziell eine Abnahme der c-Maf-Expression zu beobachten. Von den mit Zytokinen kultivierten *memory* Tregs waren 58,5 % c-Maf positiv, von den mit Zytokinen und DLL4 kultivierten waren es 53,4 % (relative Werte in Abbildung 17A). In der Kondition allein mit DLL4 zeigte sich hingegen keine signifikante Veränderung, in ihr waren 63,8 % der Zellen c-Maf positiv. Auf die Kontroll-Kondition normiert ergab sich so für die Zytokin und DLL4 enthaltene Kondition eine signifikant niedrigere c-Maf-Expression mit im Durchschnitt dem 0,79-fachen Wert des Ausgangswertes (Abbildung 17A).

Bei den naiven Tregs zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Konditionen (Abb. 17A). Der Anteil c-Maf positiver Zellen war dabei insgesamt niedriger als in den *memory* Tregs (Kontroll-Kondition Tregs naiv: 35,5 %), aber deutlich höher als bei den naiven Tcons (6,9 %).

Für die *memory* Tregs bestätigten sich die zuvor beobachteten lediglich geringen Effekte der Zytokine und des DLL4 auf die c-Maf-Expression auch in der durchgeführten RNA-Sequenzierung (Abbildung 17B), wobei sich der negative Effekt der Kombination aus Zytokinen und DLL4 nicht zeigte. In den naiven Tregs zeigte sich hingegen ähnlich zu den naiven Tcons eine Zunahme der *MAF*-Expression in der Zytokin-DLL4-Kondition.

Für Tregs zeigte sich eine im Vergleich zu konventionellen T-Zellen höhere Expression von c-Maf. Die Expression schien dabei durch die verschiedenen Kulturbedingungen nur geringfügig beeinflusst zu werden.

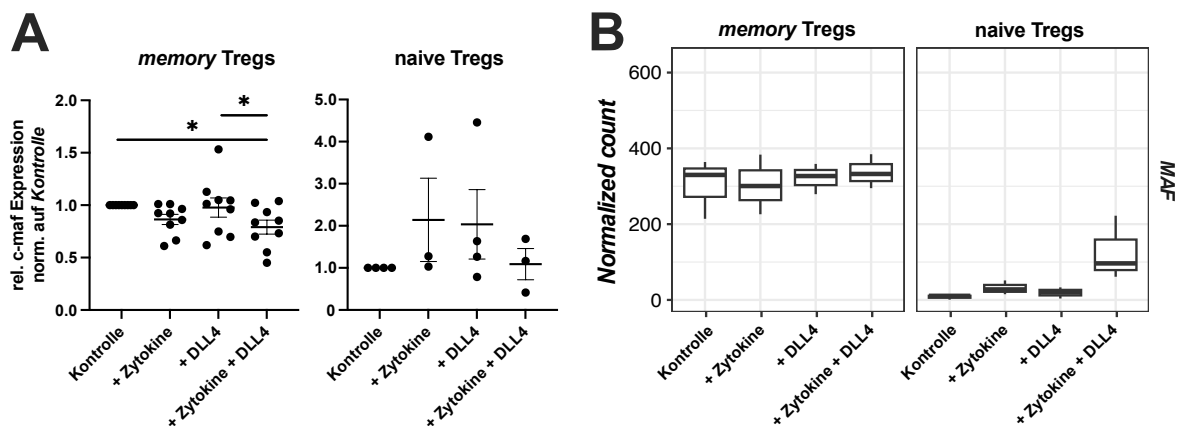


Abbildung 17: c-Maf-Expression in regulatorischen T-Zellen

CD25-MACS angereicherte Zellen wurden durch FACS weiter in *memory* und naive Tregs sortiert. (A) Die Zellen wurden 48 h entsprechend der jeweiligen Kondition kultiviert und anschließend c-Maf intranukleär gefärbt. Werte ermittelt durch Division des Anteils positiver Zellen der jeweiligen Kondition durch den Anteil der positiven Zellen in der Kontroll-Kondition. Dargestellt sind die einzelnen Messungen als Einzelpunkte sowie der *Mean* und SEM (*memory* n= 9; naiv n=3). (*One-way ANOVA*: *memory* Tregs: „Kontrolle“ vs. „+ Zytokine + DLL4“ p=0,041; „+ DLL4“ vs. „+ Zytokine + DLL4“ p=0,013 (B) Die RNA von Zellen aus n=3 Kulturen wurde isoliert und eine RNA-Sequenzierung durchgeführt. Vergleich der Expression des für c-Maf kodierenden *MAF*. Werte angegeben als *normalized count*.

3.5.3 Einfluss der Kulturbedingungen auf die IL-10 Sekretion von Tregs

Analog zu den konventionellen T-Zellen wurde nach 48 h Kultur die IL-10 Konzentration im Zellkulturüberstand von Tregs via *MACSPlex* gemessen. Die Konzentrationen waren dabei ebenfalls in den naiven Zellen geringer als in den *memory* Zellen. Normiert auf 5×10^4 Zellen ergab sich eine durchschnittliche Konzentration von 336 pg/ml in der Kontroll-Kondition und von 1.223 pg/ml in der Zytokin-DLL4-Kondition. Dies entspricht einer mehr als 3,6-fachen Expressionszunahme in der Zytokin-DLL4-Kondition im Vergleich zur Kontroll-Kondition (Abbildung 18B).

In den naiven Tregs fand sich eine gemittelte Konzentration von 43 pg/ml in der Kontroll-Kondition und 292,3 pg/ml in der Zytokin-DLL4-Kondition. Dies entspricht einer mehr als 6,7-fachen Zunahme der IL-10-Produktion (Abbildung 18D).

Verglichen mit den konventionellen T-Zellen ist die relative Zunahme in den naiven regulatorischen T-Zellen höher (Tcon: 4) und in den *memory* Zellen geringer (Tcon: 7), insgesamt aber in einem vergleichbaren Maß. Die absoluten Werte der Konzentration normiert auf 5×10^4 T-Zellen sind für die konventionellen *memory* Zellen höher mit durchschnittlich 561,6 pg/ml in der Kontroll-Kondition und 3955,4 pg/ml in der Zytokin-DLL4-Kondition als in den *memory* Tregs. Bei den naiven T-Zellen hingegen sind die entsprechenden Werte für die konventionellen T-Zellen mit durchschnittlich 33,3 pg/ml (Kontroll-Kondition) und 138,9 pg/ml (Zytokin-DLL4-Kondition) geringer als bei den regulatorischen T-Zellen (vergleiche auch 3.4.1 Expression und Sekretion von IL-10 durch CD4⁺ T-Zellen) (Abb. 18B).

Weiterhin konnte auch in Tregs die IL-10-Induktion auf RNA-Ebene dargestellt werden. In der RNA-Sequenzierung zeigte sich dabei in den *memory* Tregs zusätzlich bereits eine Zunahme in der nur Zytokine enthaltenen Kondition (Abbildung 18A u. C).

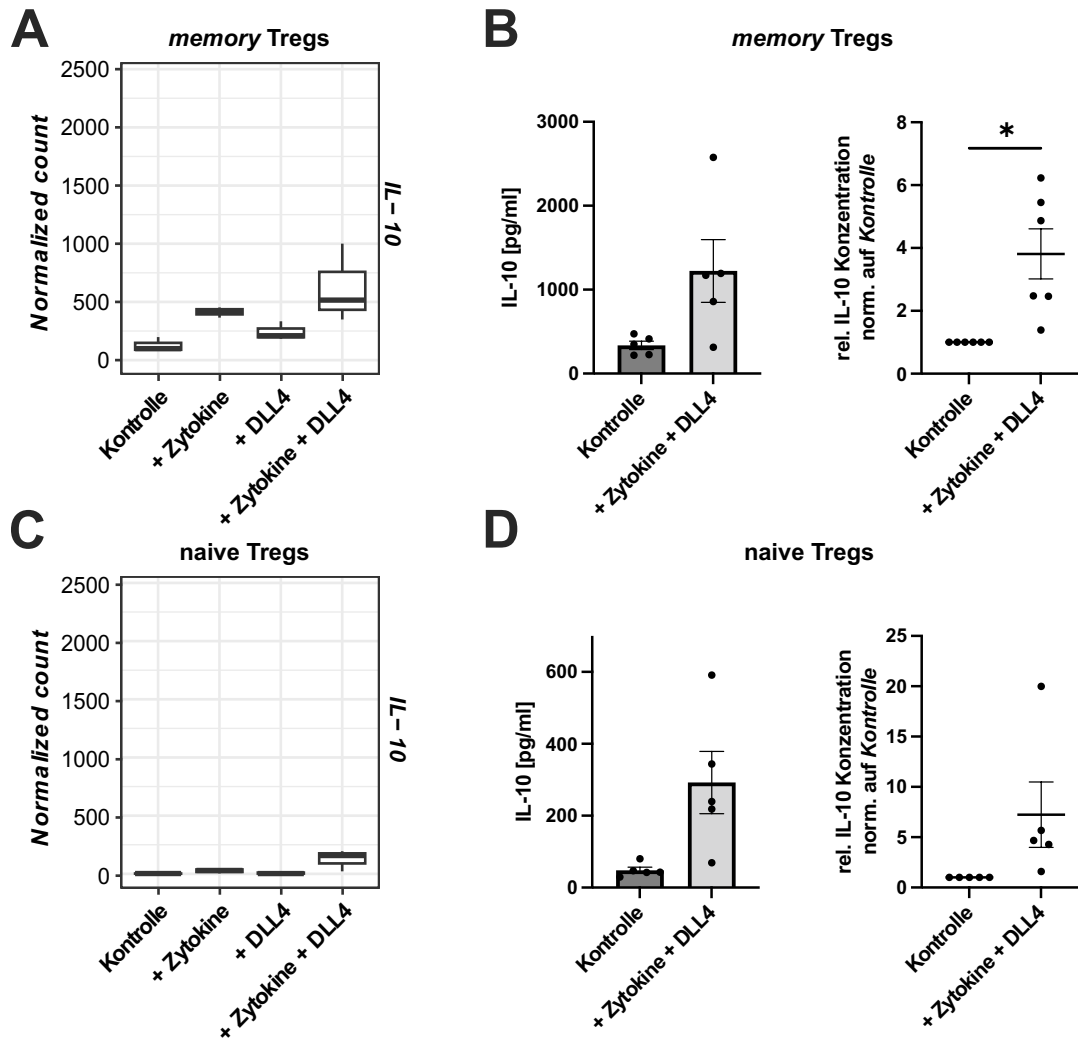


Abbildung 18: IL-10-Produktion durch regulatorische T-Zellen

CD25-MACS angereicherte Zellen wurden durch FACS weiter in *memory* (A, B) und *naive* (C, D) regulatorische T-Zellen (Tregs) sortiert. Die Zellen wurden 48 h entsprechend der jeweiligen Kondition kultiviert, der Überstand abgenommen und dieser per *MACSplex* auf seine IL-10 Konzentration untersucht (B, D). Aufgrund der Differenz der zur Verfügung stehenden Zellen wurden unterschiedliche Zellzahlen eingesetzt: *Memory* Tregs: zwischen 5×10^4 und $2,5 \times 10^5$ Zellen; *Naive* Tregs: zwischen 5×10^4 und $1,5 \times 10^5$ Zellen. Die totalen Werte wurden rechnerisch an eine Zellzahl von 5×10^4 angepasst. Abgebildet sind zum einen die totale Konzentration des gemessenen IL-10 und zum anderen die zur Kontroll-Kondition normierten relativen IL-10 Konzentrationen sowie jeweils der *Mean* und SEM (*paired t-test*: $p=0,017$).

(A, C) Weiterhin wurden die Zellen von $n=3$ Versuchen im Rahmen einer RNA-Sequenzierung auf ihre Expression von IL-10 untersucht. Werte angegeben als *normalized count*.

3.6 Inhibition von ADAM-Proteasen

Die S2-Spaltung des Notch-Rezeptors durch ADAM-Proteasen stellt den Geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Notch-Signalweges dar (Steinbuck und Winandy, 2018). Dabei ist nicht geklärt ob ADAM10 und/oder ADAM17 für diesen Schritt der Signalweiterleitung verantwortlich ist (Steinbuck und Winandy, 2018). Die Hydroxamat-basierten Inhibitoren GI254023X (GI) und GW280264X (GW) sind in der Lage ADAM10 (GI und GW) bzw. ADAM17 (GW) zu inhibieren.

Um den Einfluss des ADAM vermittelten Schrittes des Notch-Signalweges zu untersuchen und einen möglichen Unterschied in der Bedeutung der beiden ADAM-Proteasen aufzuzeigen, wurde der Einfluss dieser Inhibitoren auf die Expression von *HES-1* und IL-10 via qPCR sowie von Notch-1 und c-Maf per FACS-Färbung gemessen.

3.6.1 ADAM-Inhibitoren haben einen geringen Einfluss auf die Notch-1-Expression

Mit Hilfe einer Färbung des sich auf der Oberfläche befindlichen Notch-1 Rezeptors und dessen Veränderung in Abhängigkeit von den Konditionsbedingungen sowie insbesondere der Zugabe der ADAM-Inhibitoren, sollte der Einfluss der ADAM-Proteasen auf die S2-Spaltung näher untersucht werden. Auch in diesen Versuchen zeigte sich dabei die bereits zuvor beschriebene Abnahme des Anteils Notch-1 positiver Zellen bei Zugabe von DLL4. Der Anteil Notch-1 positiver Zellen betrug dabei in der DLL4-Kondition in etwa 25% der Kontroll-Kondition und in der Zytokin-DLL4-Kondition in etwa 18% der Kontroll-Kondition.

Bei Zugabe des ADAM10 hemmenden GI254023X zu den Kulturen totaler CD4⁺ Zellen konnte in allen Konditionen tendenziell ein leichter Anstieg des Anteils Notch-1 positiver Zellen beobachtet werden. Diese Zunahme war dabei in keiner Kondition signifikant.

Wurde der sowohl ADAM10 als auch ADAM17 hemmende Inhibitor GW280264X hinzugefügt, kam es in der Zytokin-Kondition sowie der DLL4-Kondition ebenfalls tendenziell zu einer Zunahme der Notch-1-Expression, während sich in der Zytokin-DLL4-Kondition kein Effekt zeigte (Abbildung 19A). Die Inhibitoren wurden ebenfalls zu *memory* Treg-Kulturen hinzugegeben (Abbildung 19B). Auch hier zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der Notch-1-Expression. In der Zytokin-Kondition konnte bei Zugabe von GI eine Abnahme der relativen Zahl Notch-1 positiver Zellen beobachtet werden. Bei durchschnittlich fast 70 % Notch-1 positiven Zellen in der Zytokin-Kondition zeigten sich in der „+ Zytokine + GI“ Kondition nur noch durchschnittlich 60 % der Zellen Notch-1 positiv. Bei Zugabe von GW zeigte sich ein noch größerer negativer Effekt, sodass in der „+ Zytokine + GW“ Kondition nur noch durchschnittlich 47% der Zellen Notch-1 positiv waren (auf die Kontroll-Kondition normierte Werte in Abbildung 19B).

In der DLL4-Kondition kam es durch Zugabe von GI hingegen zu einer nicht signifikanten Zunahme der Notch-1-Expression auf jeweils mehr als das Doppelte (Abbildung 19B). Auch in der Zytokin-

DLL4-Kondition konnte tendenziell eine Zunahme der Notch-1-Expression durch Zugabe von GI beobachtet werden, wobei diese im Vergleich zur DLL4 Kondition geringer ausfiel. Durch Zugabe von GW konnte ein solcher Effekt hingegen in keiner der beiden Konditionen beobachtet werden.

Der Anteil Notch-1 positiver Zellen blieb dabei in allen Konditionen deutlich unter dem der Kontroll-Kondition.

Insgesamt zeigten sich somit für beide eingesetzten ADAM-Inhibitoren nur ein sehr geringer und nicht signifikanter Einfluss auf die Oberflächen-Expression von Notch-1. Insbesondere konnte auch der DLL4 vermittelten Abnahme der Notch-Expression lediglich geringfügig entgegengewirkt werden.

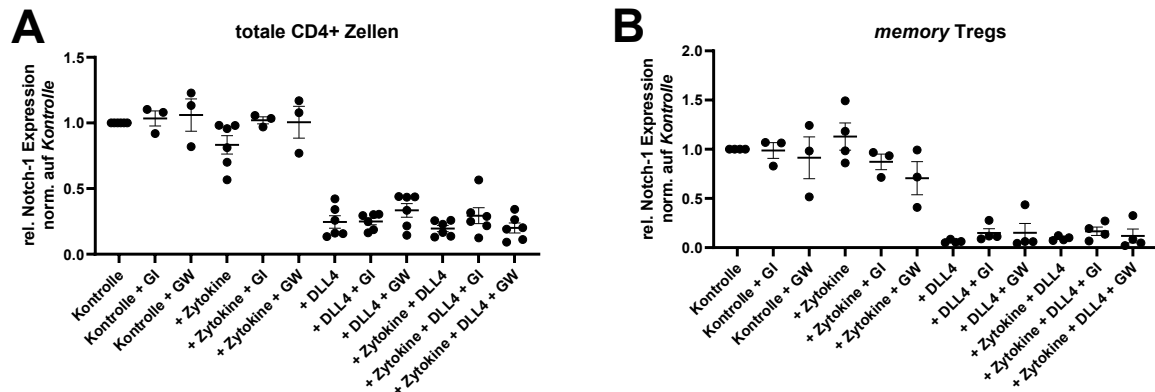


Abbildung 19: Einfluss der ADAM-Inhibitoren GI254023X und GW280264X auf die Notch-Expression

Totale CD4⁺ Zellen (A) bzw. FACS sortierte *memory* regulatorische T-Zellen (B) wurden 48 h entsprechend den verschiedenen Konditionen kultiviert. Zum Zeitpunkt 0 h sowie nach 24 h wurden die ADAM-Inhibitoren GI254023X (GI) oder GW280264X (GW) in einer finalen Konzentration von 3 μ M ins Medium hinzugegeben. Nach 48 h Kultur wurde eine Oberflächen-Färbung von Notch-1 durchgeführt. Abgebildet ist die relative Notch-1-Expression ermittelt durch Normierung auf die Kontroll-Kondition.

3.6.2 Die Expression von Notch-Zielgenen wird durch ADAM-Inhibitoren beeinflusst

Wie bereits beschrieben handelt es sich beim *HES-1*-Molekül um ein direktes Notch-Zielgen, dessen Expressions-Zunahme eine Notch-Aktivierung widerspiegelt. Um den Einfluss der ADAM-Proteasen bzw. einer Hemmung dieser durch die ADAM-Inhibitoren GI und GW auf den weiteren Verlauf des Notch-Signalweges zu untersuchen, wurde nach 48 h Kultur in den vier Konditionen sowie unter Zugabe der Inhibitoren eine qPCR für *HES-1* in CD4⁺ Zellen durchgeführt.

Wie auch bei den bereits beschriebenen qPCR-Versuchen an totalen CD4⁺ Zellen zeigte sich in der DLL4- und der Zytokin-DLL4-Kondition eine Zunahme der relativen *HES-1*-Expression auf jeweils in etwa das 20-Fache der Kontroll-Kondition. Fügt man diesen Konditionen einen der Inhibitoren hinzu, zeigte sich diese Zunahme nicht bzw. weniger stark ausgeprägt (Abbildung 20).

Die *HES-1*-Expression zeigte sich in der „+ DLL4 + GI“-Kondition im Vergleich zur DLL4-Kondition um mehr als 90 % reduziert, sodass die Expression der „+ DLL4 + GI“-Kondition nur noch weniger als dem 1,5-Fachen der Kontroll-Kondition entsprach. Durch Zugabe von GW nahm die Expression im

Vergleich zur reinen DLL4-Kondition um etwas weniger als 90 % ab, sodass die *HES-1*-Expression in der „+ DLL4 + GW“-Kondition noch in etwa dem 2-Fachen der Kontroll-Kondition entsprach.

In der Zytokin-DLL4-Kondition kam es unter Einsatz der Inhibitoren ebenfalls zu einer Abnahme der *HES-1*-Expression. Bei Zugabe von GI oder GW wurde jeweils ca. 80 % weniger *HES-1* exprimiert als ohne, sodass die *HES-1*-Expression noch ca. 3,5-fach höher als in der Kontroll-Kondition lag (Abbildung 20). Auch in der Kontroll- und Zytokin-Kondition kam es durch Zugabe der Inhibitoren zu einer Abnahme der *HES-1*-Expression. Mit einer Reduktion um je ca. 27 % in der Kontroll- und 11 % (GI) bzw. 34 % (GW) in der Zytokin-Kondition war diese tendenziell geringer ausgeprägt als in den anderen Konditionen und nicht signifikant (Abbildung 20).

Zwischen den beiden Inhibitoren fand sich in keiner der Konditionen ein signifikanter Unterschied, lediglich in der Zytokin-Kondition scheint GW einen stärkeren Einfluss zu haben.

Insgesamt scheinen sowohl GI als auch GW Einfluss auf die Expression direkter Notch-Zielgene in T-Zellen zu nehmen und einer durch Notch-Liganden hervorgerufenen Induktion entgegenzuwirken.

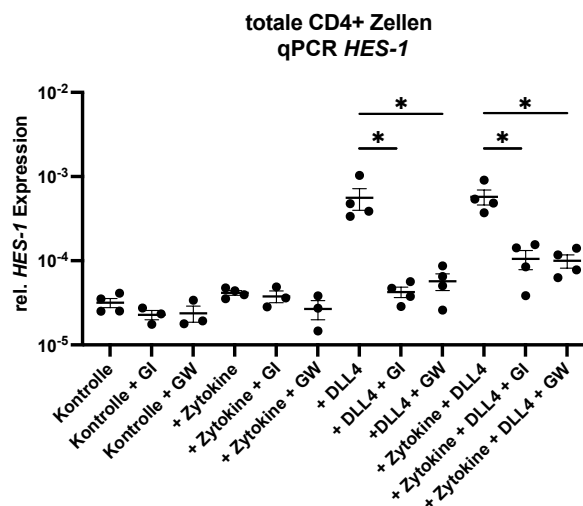


Abbildung 20: Einfluss der ADAM-Inhibitoren GI254023X und GW280264X auf die Aktivierung des Notch-Signalweges

Die RNA von 5×10^5 totalen CD4+ Zellen, welche für 48 h entsprechend der jeweiligen Kondition kultiviert wurden, wurde isoliert und eine *HES-1* qPCR durchgeführt. Abgebildet ist die durch eine vergleichende Ct-Methode ermittelte, relative Expression von *HES-1* (Haushaltsgen: *AKTIN b*) ($n=3/4$). (zwischen den DLL4 enthaltenen Konditionen: *uncorrected Fisher's LSD*; „+ DLL4“ vs. „+ DLL4 + GI“ $p=0,045$; „+ DLL4“ vs. „+ DLL4 + GW“ $p=0,045$; „+ Zytokine + DLL4“ vs. „+ Zytokine + DLL4 + GI“ $p=0,037$; „+ Zytokine + DLL4“ vs. „+ Zytokine + DLL4 + GW“ $p=0,022$)

3.6.3 Einfluss der Inhibitoren auf die c-Maf- und IL-10-Expression

Nachdem der Einfluss der Inhibitoren auf die Interaktion von Ligand und Rezeptor sowie die Wirkung auf direkte Notch-Zielgene betrachtet wurde, sollte nun auch die Wirkung auf die zuvor beschriebene Induktion von c-Maf sowie IL-10 untersucht werden. Hierzu wurde zum einen eine intranukleäre Färbung des Transkriptionsfaktors c-Maf in totalen CD4+ Zellen sowie in sortierten *memory* Tregs durchgeführt und zum anderen eine qPCR für IL-10 in totalen CD4+ Zellen.

Den vorherigen Beobachtungen entsprechend zeigte sich in beiden DLL4 enthaltenen Konditionen ein im Vergleich zur Kontroll-Kondition in etwa doppelt so hoher Anteil c-Maf positiver CD4⁺ Zellen.

Fügte man der DLL4-Kondition nun den ADAM10 Inhibitor GI hinzu, reduzierte sich im Vergleich zur DLL4-Kondition der Anteil c-Maf positiver Zellen signifikant um 58 %. Der Anteil c-Maf positiver Zellen erreichte in der DLL4-Kondition unter Zugabe von GI damit nur noch das 0,83-Fache der Kontroll-Kondition (Abbildung 21A). Bei Zugabe des sowohl ADAM10 als auch ADAM17 inhibierenden GW kam es ebenfalls zu einer signifikanten Abnahme des Anteils c-Maf positiver Zellen. Der Effekt von GW war dabei tendenziell etwas größer als der von GI, so zeigten sich in der „+ DLL4 + GW“-Kondition 63 % weniger c-Maf positive Zellen als in der DLL4 Kondition. Der Anteil c-Maf positiver Zellen entsprach dabei dem 0,95-Fachen der Kontroll-Kondition (Abbildung 21A).

Auch in der Zytokin-DLL4-Kondition reduzierte sich durch die ADAM-Inhibitoren der Anteil c-Maf positiver Zellen. Bei Zugabe von GI kam es zu einer Abnahme um 41 %, sodass der Anteil positiver Zellen beim 1,2-Fachen der Kontroll-Kondition lag. Bei Zugabe von GW kam es zu einer signifikanten Abnahme um 55 %, der Anteil positiver Zellen entsprach in etwa dem der Kontroll-Kondition (Abbildung 21A). Zusätzlich zu den DLL4 enthaltenen Konditionen zeigte sich auch in der Kontroll- und Zytokin-Kondition eine Verringerung der c-Maf-Expression durch Zugabe von GI und GW (Abbildung 21A). In der Kontroll-Kondition reduzierte sich der Anteil c-Maf positiver Zellen durch Zugabe von GI um über 50 %, durch Zugabe von GW sogar um mehr als 66 %. In der Zytokin-Kondition reduzierte sich der Anteil um 25 % durch GI und durch GW um mehr als 50 %.

Zusammenfassend zeigten die ADAM-Inhibitoren über alle konventionellen T-Zell Konditionen hinweg einen negativen Effekt auf den Anteil c-Maf positiver Zellen. Am stärksten ausgeprägt war dieser in der DLL4-Kondition. Während sich in keiner Kondition ein signifikanter Unterschied zwischen den Inhibitoren ergab, scheint GW tendenziell eine stärkere Reduktion zu bewirken als GI.

Diese Beobachtungen zeigten sich auch bei Betrachtung regulatorischer *memory* T-Zellen. In allen Konditionen zeigte sich durch Zugabe der ADAM-Inhibitoren eine Abnahme des Anteils c-Maf positiver Zellen, wobei diese in keiner Kondition signifikant war (Abbildung 21B). Durch Hinzugabe von GI reduzierte sich der Anteil c-Maf positiver Tregs in der Kontroll-Kondition um 4 %, bei Zugabe von GW um 22 % und damit mehr als 5 mal stärker als bei Zugabe von GI (Abbildung 21B). In der Zytokin-Kondition zeigte sich der Anteil c-Maf positiver Zellen durch Hinzugabe von GI um 11 % reduziert, durch Zugabe von GW um 27 %. Bei bereits in der Zytokin-Kondition im Vergleich zur Kontroll-Kondition leicht verminderter c-Maf-Expression, lag der Anteil c-Maf positiver Zellen in der „+ Zytokine + GW“-Kondition nur noch beim 0,7-Fachen der Kontroll-Kondition.

Auch in der DLL4-Kondition reduzierte sich der Anteil c-Maf exprimierender Tregs durch Zugabe der Inhibitoren. Bei Zugabe von GI exprimierten 3,5 % weniger Zellen c-Maf, bei Zugabe von GW zeigte sich der Anteil c-Maf exprimierender Zellen um mehr als 20 % reduziert. Der größte Effekt zeigte sich

jedoch in der Zytokin-DLL4-Kondition. Während der Effekt von GI mit einer Abnahme um 6,5 % noch gering war, reduzierte sich der Anteil positiver Zellen durch Hinzugabe von GW im Vergleich zur gleichen Kondition ohne Inhibitor um mehr als 30 %. Der Anteil c-Maf positiver Zellen betrug somit nur dem 0,6-Fachen des Anteils in der Kontroll-Kondition.

Über alle Treg-Konditionen hinweg zeigte GW tendenziell einen stärkeren Effekt als GI. Dieser tendenziell stärkere Effekt von GW war dabei in den einzelnen Konditionen nicht signifikant, unterteilte man jedoch die Messungen ohne Betrachtung der jeweiligen Zytokin-/DLL4-Exposition lediglich anhand des Vorhandenseins der Inhibitoren GI, GW oder keines Inhibitors auf drei neue Konditionen (Kontrolle, GI, GW), zeigte sich eine signifikante Abnahme der c-Maf-Expression in der GW enthaltenen Kondition (s. Anhang 2). Dies könnte auf eine besondere Rolle von ADAM17 in der c-Maf-Expression in regulatorischen T-Zellen hinweisen.

Zusätzlich zur Messung der c-Maf-Expression wurde eine IL-10 qPCR an RNA von mit oder ohne Inhibitoren kultivierten konventionellen T-Zellen durchgeführt (Abbildung 21C). Hierbei zeigte sich die bereits in Abschnitt 3.4.1 beschriebene Zunahme der IL-10-Expression auf das 3,7-Fache in der Zytokin-Kondition, das 1,6-Fache in der DLL4-Kondition und das 12-Fache in der Zytokin-DLL4-Kondition. Durch Zugabe von GI oder GW verminderte sich in allen Konditionen die IL-10-Expression. In der Kontroll-Kondition sank durch Zugabe von GI die IL-10-Expression um mehr als 60 % und bei Zugabe von GW um 52 %. Der ADAM10-Inhibitor GI senkte in der Zytokin-Kondition die IL-10 Expression um 52 %, das zusätzlich auch ADAM17 hemmende GW reduzierte die IL-10-Expression um 38 %, die IL-10-Expression entsprach damit in etwa dem 2,4-Fachen bzw. dem 3-Fachen der Kontroll-Kondition. Durch Zugabe von GI kam es in der DLL4-Kondition zu einer signifikanten Abnahme der IL-10-Expression um mehr als 60 %. GW zeigte mit einer Abnahme von ebenfalls mehr als 60 % einen vergleichbaren Effekt, sodass die IL-10-Expression durch beide Inhibitoren nur noch dem ca. 0,7-Fachen der Kontroll-Kondition entsprach. Auch in der Zytokin-DLL4-Kondition kam es durch Einsatz der Inhibitoren zu einer signifikant reduzierten IL-10-Expression. Während die IL-10 Expression in der Zytokin-DLL4-Kondition dem 12-Fachen der Kontroll-Kondition entsprach, reduzierte sich diese durch Zugabe von GI um 64 %, sodass die IL-10-Expression dem 4,5-Fachen der Kontroll-Kondition entsprach. GW zeigte einen noch deutlicheren Effekt und reduzierte die IL-10-Expression im Vergleich zur Kondition ohne Inhibitoren um 70 % auf das 4-Fache der Kontroll-Kondition (Abbildung 21C).

Auch in Bezug auf die IL-10-Expression zeigte sich dabei in keiner Kondition ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden ADAM-Inhibitoren.

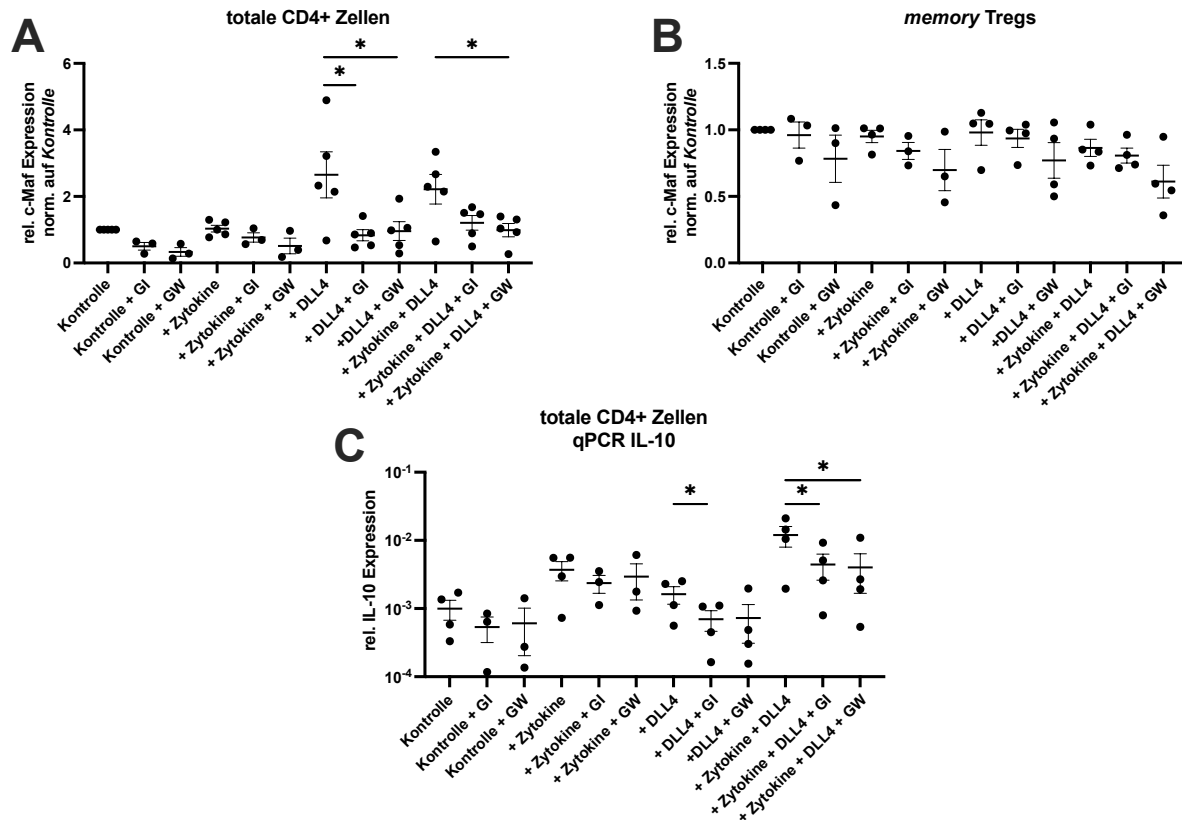


Abbildung 21: Einfluss der ADAM-Inhibitoren GI und GW auf die IL-10 und c-Maf-Expression
 Totale CD4+ Zellen (A+C) sowie *memory* Tregs (B) wurden 48 h entsprechend den verschiedenen Konditionen kultiviert. Zum 0 h- sowie zum 24 h-Zeitpunkt wurden die ADAM-Inhibitoren GI254023X (GI) und GW280264X (GW) in einer finalen Konzentration von 3 μ M ins Medium gegeben. (A + B): Nach 48 h Kultur wurde eine intranukleäre-Färbung von c-Maf durchgeführt. Abgebildet ist die relative c-Maf-Expression ermittelt durch Normierung auf die Kontroll-Kondition (totale CD4+ Zellen n= 3/5 ; *memory* Tregs n=3/4). (C) 5 x 10⁵ CD4+ Zellen wurden kultiviert, nach 48 h ihre RNA isoliert und eine IL-10 qPCR durchgeführt. Abgebildet ist die durch eine vergleichende Ct-Methode ermittelte relative Expression von IL-10 (Haushaltsgen: *AKTIN b*) (n=3/4). (A: Friedman Test: „+ DLL4“ vs. „+ DLL4 + GI“ p=0,024; „+ DLL4“ vs. „+ DLL4 + GW“ p=0,024; „+ Zytokine + DLL4“ vs. „+ Zytokine + DLL4 + GW“ p=0,041; C: *Mixed effects analysis*: „+ DLL4“ vs. „+ DLL4 + GI“ p=0,029; „+ Zytokine + DLL4“ vs. „+ Zytokine + DLL4 + GI“ p=0,045; „+ Zytokine + DLL4“ vs. „+ Zytokine + DLL4 + GW“ p=0,044”)

Die Inhibition der ADAM-Proteasen 10 und 17 durch GI bzw. GW zeigte somit sowohl in konventionellen als auch in regulatorischen *memory* T-Zellen einen negativen Effekt auf die Expression von c-Maf. Der ADAM10 und 17 Inhibitor GW zeigte dabei in Tregs einen tendenziell stärkeren Effekt als der alleinige ADAM10 Inhibitor GI. Beide Inhibitoren zeigten ebenso einen negativen Effekt auf die IL-10-Expression totaler CD4+ Zellen. Sowohl die durch Zytokine als auch die durch DLL4 oder die Kombination beider induzierte Expressionszunahme konnte durch Einsatz der Inhibitoren verringert werden. Daher kann angenommen werden, dass die ADAM-Proteasen an der Regulation des Transkriptionsfaktors c-Maf, wie auch an der IL-10-Expression durch CD4+ T-Zellen beteiligt sind.

3.7 Die Expression coinhibitorischer Rezeptoren in Abhängigkeit von Notch und Zytokinen

Einen weiteren Regulationsmechanismus von Immunantworten stellen coinhibitorische Rezeptoren dar, diese werden sowohl von konventionellen als auch von regulatorischen T-Zellen exprimiert. Anhand der von Tcons und Tregs exprimierten Rezeptoren LAG-3, PD-1, TIGIT, Tim-3 und CTLA-4 sollte überprüft werden ob der Notch-Ligand DLL4 sowie die STAT3 aktivierenden Zytokine IFN- α , IL-6 und IL-21 auch auf diesen Mechanismus der Immunregulation Einfluss nehmen.

3.7.1 Die Expression verschiedener coinhibitorischer Rezeptoren in konventionellen T-Zellen

Um einen möglichen Einfluss der STAT3 aktivierenden Zytokine IFN- α , IL-6 und IL-21 sowie des Notch-Liganden DLL4 auf die Expression verschiedener coinhibitorischer Rezeptoren festzustellen, wurden zunächst CD4⁺ Zellen per MACS angereichert. Die angereicherten Zellen wurden entweder als totale CD4⁺ Zellen betrachtet oder per FACS weiter in *memory* und naive CD4⁺ Zellen sortiert.

Im weiteren Verlauf wurden die Zellen 48 h mit oder ohne Zytokine und/oder DLL4 kultiviert und dann per FACS-Oberflächen-Färbung bzw. intrazellulären Färbung gegen CTLA-4 auf die Expression der verschiedenen Rezeptoren hin untersucht (Abbildung 22A).

Bei Betrachtung von Tim-3 zeigte sich in totalen CD4⁺ Zellen sowohl bei Zugabe von DLL4 als auch bei Zugabe der Zytokine zur Kultur eine signifikante Zunahme der Expression. Während DLL4 die Expression von durchschnittlich 2,99 % in der Kontroll-Kondition auf mehr als das Doppelte steigerte (7,07 %), kam es bei Zugabe der Zytokine nur zu einer deutlich geringeren Zunahme der Tim-3-Expression auf das 1,3-Fache (3,84 % positive Zellen). Auch in Kombination der Zytokine mit dem Notch-Liganden war ein expressionssteigernder Effekt zu beobachten, wobei dieser den Effekt des DLL4 noch überstieg (7,9 %). In den in *memory* und naive Zellen sortierten Kulturen zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der Expression von Tim-3 in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen. Bei den *memory* Tcons zeigte sich in der Zytokin-DLL4-Kondition eine Erhöhung der Tim-3-Expression auf das 1,5-Fache („Kontrolle“: 8,16 %; „+ Zytokine + DLL4“: 11,36 %). Bei den naiven Tcons zeigte sich ähnlich, wie bei den unsortierten Zellen eine Zunahme in beiden DLL4 enthaltenen Konditionen auf das 1,9-Fache („+ DLL4“) bzw. das 1,5-Fache („+ Zytokine + DLL4“) (Abbildung 22B).

Die Expression von TIGIT zeigte in keiner der Zelltypen eine signifikante Veränderung durch die Kulturbedingungen. Ähnlich wie bei Tim-3 zeigte sich auch für TIGIT eine Tendenz hin zu einer Erhöhung der Expression in den DLL4 enthaltenen Konditionen, wobei diese geringer ausgeprägt war als bei Tim-3 (Abbildung 22B). Im Vergleich der verschiedenen T-Zelltypen fiel eine fast 10-fach

höhere TIGIT-Expression in den *memory* Zellen als in den naiven Tcons auf (Kontroll-Kondition: *memory* Tcons: 21,74 %; naive Tcons: 2,51 %) (siehe auch Anhang 3).

Bei einer generell eher niedrigen CD49b-Expression (Kontroll-Kondition totale CD4⁺ Zellen: 0,71 %; *memory* Tcons: 1,17 %, naive Tcons: 0,97 %) kam es bei Zugabe der Zytokine über alle T-Zelltypen hinweg zu einem Anstieg der CD49b-Expression auf mehr als das Doppelte der jeweiligen Kontroll-Kondition (totale CD4⁺ Zellen: 2,6-fach, Tcons mem: 3-fach; Tcons naiv: 3,3-fach) (Abbildung 22B). Die alleinige Zugabe von DLL4 zeigte hingegen keinen Effekt. In der Zytokin-DLL4-Kondition zeigte sich ebenfalls eine erhöhte Expression, die Expressionszunahme entsprach dabei in etwa der, der Zytokin-Kondition.

Das bei Co-Expression mit CD49b T_R1-Zellen charakterisierende LAG-3 (Anderson et al., 2016) wurde in einem deutlich höheren Ausmaß exprimiert als CD49b. In der Kontroll-Kondition der totalen CD4⁺ Zellen exprimierten 47,1 % der Zellen LAG-3 auf ihrer Oberfläche, bei den naiven Tcons waren es mit 52,1 % in etwa gleich viele, während wiederum nur 26,7 % der *memory* Tcons LAG-3 exprimierten (Anhang 3). Zwischen den T-Zelltypen zeigten sich Unterschiede in der Reaktion auf die verschiedenen Kulturbedingungen. Bei den totalen CD4⁺ Zellen führte die Zugabe von DLL4 zu einem signifikanten Abfall der LAG-3-Expression auf die Hälfte der Expression der Kontroll-Kondition (von durchschnittlich 47,1 % auf 23,3 %). Während die reine Zugabe von Zytokinen zum Zellmedium keinen Effekt zeigte, konnte in Kombination mit DLL4 im Vergleich zur alleinigen DLL4-Kondition ein leichter Wiederanstieg der LAG-3-Expression beobachtet werden. Die LAG-3-Expression stieg vom 0,5-Fachen der Kontroll-Kondition in der DLL4-Kondition auf das 0,7-Fache der Kontroll-Kondition in der Zytokin-DLL4-Kondition („+ DLL4“: 23,3 %; „+ Zytokine + DLL4“: 34,6 %) (Abbildung 22B). Ein solcher Effekt durch DLL4 war weder in den naiven noch in den *memory* Tcons zu beobachten. In beiden zeigte sich lediglich ein nicht signifikanter Anstieg der LAG-3-Expression in den Zytokine enthaltenen Konditionen. In naiven T-Zellen zeigte sich weiterhin eine signifikant geringere Expression in der DLL4-Kondition (das 0,78-Fache der Kontroll-Kondition) als in der Zytokin-Kondition (das 1,33-Fache der Kontroll-Kondition) (Abbildung 22B).

In totalen CD4⁺ Zellen zeigte sich über die verschiedenen Konditionsbedingungen hinweg eine gleichbleibende CTLA-4-Expression (Abbildung 22B). In der Kontroll-Kondition exprimierten dabei durchschnittlich 40,6 % der Zellen CTLA-4. In den *memory* Tcons zeigte sich mit durchschnittlich 48,8 % eine ähnliche Expression, wie in den totalen CD4⁺ Zellen. Bei Zugabe von Zytokinen zeigte sich hier jedoch eine nicht signifikante Zunahme der CTLA-4-Expression auf das 1,2-Fache der Kontroll-Kondition (56,4 %) und in Kombination der Zytokine mit DLL4 ein weiterer Anstieg auf das 1,4-Fache (66,2 %). Dieser Kombinationseffekt war ebenfalls in den naiven Tcons zu beobachten, hier zeigte die Zytokin-DLL4-Kondition mit durchschnittlich 53,2 % einen signifikant ca. 1,5-fach höheren Wert als die 35 % der Kontroll-Kondition (Abbildung 22B).

Die PD-1-Expression zeigte sich in totalen CD4⁺ Zellen durch Kultivierung mit DLL4 signifikant verringert. Während in der Kontroll-Kondition durchschnittlich 47,4 % der Zellen PD-1 exprimierten, exprimierten in der DLL4-Kondition 28,6 % und in der Zytokin-DLL4-Kondition 31,2 % PD-1. Dies entspricht einer Abnahme auf in etwa das 0,6-Fache der Kontroll-Kondition (Abbildung 22B).

In den *memory* Tcons zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der PD-1-Expression, während in den naiven T-Zellen bei Kultivierung mit Zytokinen sowie DLL4 eine signifikante Zunahme der Expression von 37,57 % auf 53,17 % zu beobachten war. In beiden Zytokine enthaltenen Konditionen exprimierten in etwa 1,4-mal so viele Zellen PD-1, wie in der Kontroll-Kondition (Abbildung 22B).

Insgesamt zeigten sich sowohl bei Betrachtung der verschiedenen coinhibitorischen Rezeptoren als auch zum Teil für einen Rezeptor in den verschiedenen konventionellen T-Zelltypen keine einheitlichen Reaktionen auf die verschiedenen Kulturbedingungen. Die größten Effekte zeigten sich bei TIGIT, Tim-3 und CTLA-4 in der Zytokin-DLL4-Kondition, welches auf einen synergistischen Effekt hinweisen kann. Die Tim-3-Expression scheint hierüber hinaus auch bereits durch DLL4 allein positiv beeinflusst zu werden. Insbesondere CD49b hingegen scheint nicht durch die Anwesenheit des Notch-Liganden DLL4 beeinflusst zu werden, zeigt aber eine deutliche, wenn auch nicht signifikante Expressionszunahme in Anwesenheit der Zytokine.

Auf die Expression von LAG-3 und PD-1 scheint DLL4 eher einen negativen Einfluss zu haben, während auch hier die Zytokine zumindest in den sortierten Subtypen zu einer Expressionssteigerung zu führen scheinen.

Die Expression der verschiedenen coinhibitorischen Rezeptoren wurde zusätzlich auch auf RNA- Ebene untersucht. In der RNA-Sequenzierung bestätigten sich dabei überwiegend die in den FACS-Färbungen beobachteten Tendenzen. Eine Übersichtsdarstellung dessen findet sich in Form einer *Heatmap* in Abbildung 24.

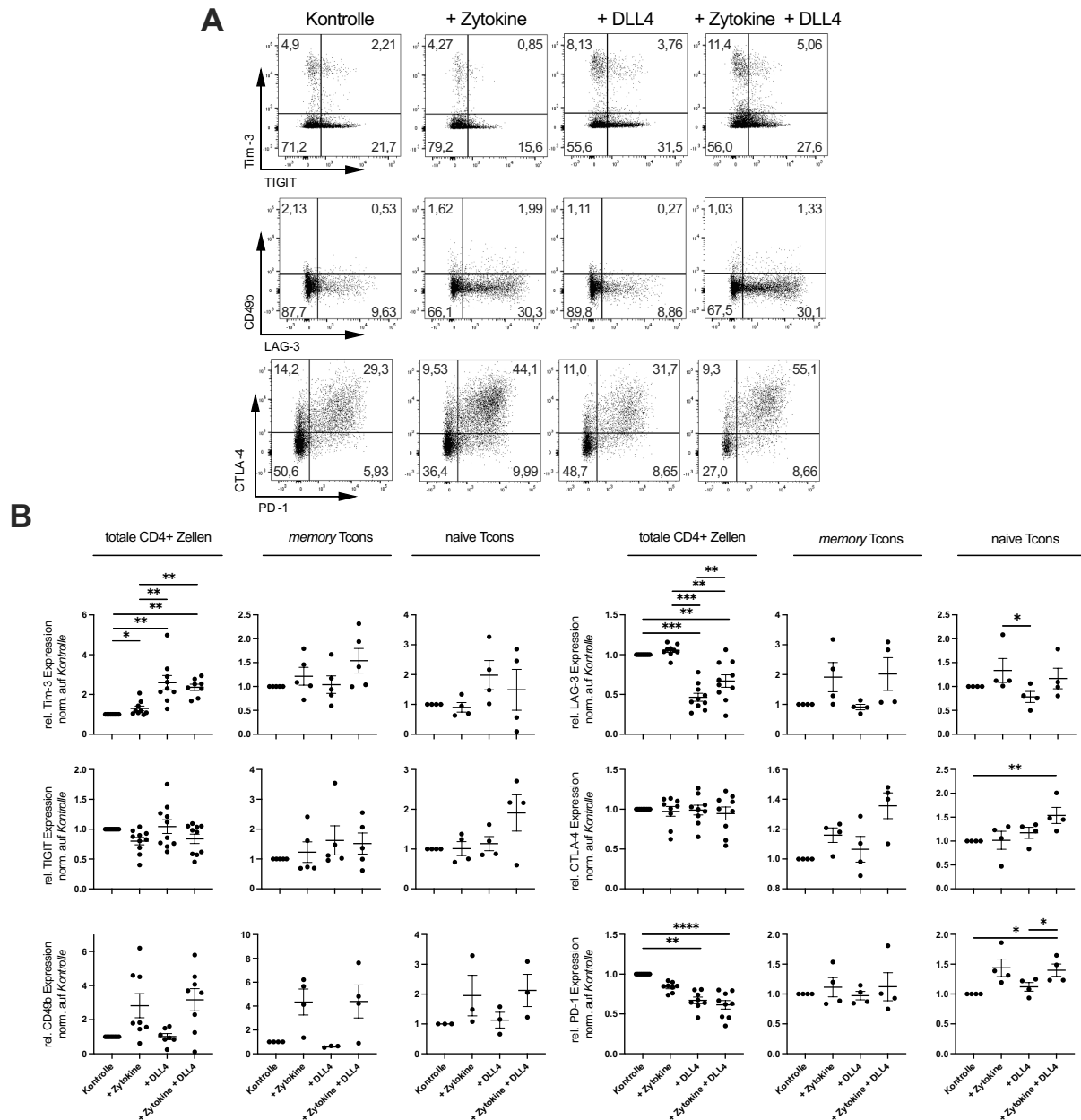


Abbildung 22: Expression coinhibitorischer Rezeptoren durch konventionelle T-Zellen
 CD4-MACS angereicherte Zellen sowie durch FACS in *memory* und naive Tcons sortierte Zellen wurden 48 h entsprechend der jeweiligen Kondition kultiviert und anschließend Tim-3, TIGIT, CD49b, LAG-3 und PD-1 auf der Zelloberfläche sowie CTLA-4 intrazellulär gefärbt. (A) Repräsentativer *Dotplot* der Expression coinhibitorischer Rezeptoren auf konventionellen *memory* T-Zellen. (B) Darstellung der relativen Expression der verschiedenen Rezeptoren in den unterschiedlichen T-Zelltypen und Kulturbedingungen (totale CD4+ Zellen n=10; *memory* n=4/5 ; naive n=3/4). Dargestellt sind die auf die Kontroll-Kondition normierten Werte sowie der *Mean* und SEM. (* $\triangleq$ p<0,05; ** $\triangleq$ p<0,01; *** $\triangleq$ p<0,001; **** $\triangleq$ p<0,0001; genaue p-Werte sowie Angabe zum Test in Anhang 4)

3.7.2 Die Expression verschiedener coinhibitorischer Rezeptoren in regulatorischen T-Zellen

Als einer ihrer Hauptwirkungsmechanismen spielen coinhibitorische Rezeptoren bei der Funktion regulatorischer T-Zellen eine entscheidende Rolle. Inwiefern diese Funktion dabei durch die Exposition gegenüber den STAT3 aktivierenden Zytokinen IFN- α , IL-6 und IL-21 sowie durch DLL4 beeinflusst werden kann, sollte anhand der folgenden Versuche untersucht werden.

Analog zu den konventionellen T-Zellen wurden die Tregs zunächst per FACS in *memory* und naive Zellen sortiert, anschließend entsprechend der jeweiligen Kondition kultiviert und zum 48 h-Zeitpunkt eine Oberflächenfärbung bzw. für CTLA-4 eine intrazelluläre Färbung durchgeführt (Abbildung 23A). Zusätzlich wurde die Expression der coinhibitorischen Rezeptoren, wie auch schon bei den konventionellen T-Zellen, durch eine RNA-Sequenzierung auch auf RNA-Ebene untersucht. Eine Übersichtsdarstellung dessen findet sich in Form einer *Heatmap* in Abbildung 24.

In *memory* Tregs zeigte sich in der Zytokin-Kondition eine nicht signifikante Abnahme der Tim-3-Expression auf in etwa das 0,6-Fache der Kontroll-Kondition („Kontrolle“: 13,7 %, „+ Zytokine“: 7,4 %). Im Vergleich zur Zytokin-Kondition zeigten sowohl die DLL4-Kondition als auch die Zytokin-DLL4-Kondition eine signifikant höhere Tim-3-Expression. In der DLL4-Kondition entsprach die Tim-3-Expression dabei im Durchschnitt dem 2-Fachen der Kontroll-Kondition, in der zusätzlich auch Zytokine enthaltenen Kondition dem 1,4-Fachen. Auch in den naiven Tregs kam es in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen zu einer unterschiedlichen Tim-3-Expression. Sowohl durch Zytokine als auch durch DLL4 kam es zu einer Zunahme der durchschnittlichen Expression auf jeweils ca. das 1,6-Fache der Kontroll-Kondition und damit von ca. 16 % positiven Zellen auf ca. 25 % positive Zellen (Abbildung 23B). In Kombination von DLL4 mit Zytokinen zeigte sich im Vergleich zur ausschließlich DLL4 enthaltenen Kondition eine signifikant höhere Expression von Tim-3 mit durchschnittlich 39,4 % positiven Zellen. Insgesamt war die Tim-3-Expression mit ca. 13 % in der *memory* Kontroll-Kondition und ca. 16 % in den naiven Tregs etwas höher als in den konventionellen T-Zellen mit ca. 8 % bzw. 12 % (s. Anhang 3).

Mit durchschnittlich über 80 % positiven Zellen zeigte sich in den Treg-Kulturen auch ein deutlich höherer Anteil TIGIT exprimierender Zellen als in den konventionellen T-Zellen (*memory* Tcons 21,7 %; naive Tcons: 2,5 %, s.a. Anhang 3). Bei Zugabe von Zytokinen in die *memory* Treg-Kulturen kam es zu einer geringen Abnahme der TIGIT exprimierenden Zellen auf das ca. 0,9-Fache der Kontroll-Kondition, die Zugabe von DLL4 zeigte hingegen keinen Effekt. Die Zytokin-DLL4-Kondition zeigte dabei im Vergleich zur DLL4-Kondition signifikant weniger TIGIT exprimierende Zellen (85,9 % bzw. 78,4 %) (Abbildung 23B). In den naiven Tregs zeigte sich in beiden Zytokine enthaltenen Konditionen eine leichte Abnahme der TIGIT-Expression auf das 0,95-Fache der Kontroll-Kondition sowie eine leichte Zunahme in der DLL4-Kondition auf das 1,1-Fache (Abbildung 23B).

Im Gegensatz zu den konventionellen T-Zellen war bei den regulatorischen T-Zellen keine Erhöhung der Expression von CD49b in der Zytokin-Kondition zu beobachten. Insgesamt war die Expression mit 24,1 % in den *memory* Tregs und 14,2 % in den naiven Tregs allerdings deutlich höher als in den konventionellen T-Zellen (*memory* Tcons: 1,2 %; naive Tcons: 1 %, s. a. Anhang 3).

LAG-3, welches die regulatorische Funktion von Tregs verstärkt (Anderson et al., 2016) zeigte sowohl in den *memory* als auch in den naiven Tregs eine signifikant erhöhte Expression in beiden Zytokine enthaltenen Konditionen. In den *memory* Tregs war in beiden Zytokine enthaltenen Konditionen eine Zunahme auf in etwa das 1,2-Fache der Kontroll-Kondition bzw. von 54 % positiven Zellen in der Kontroll-Kondition auf je ca. 64 % in den Zytokine enthaltenen Konditionen zu beobachten (Abbildung 23B). In den naiven Tregs war dieser Effekt noch stärker ausgeprägt, hier stieg die durchschnittliche LAG-3-Expression in den Zytokine enthaltenen Konditionen auf je ca. 69 % positive Zellen, also dem 1,5-fachen Wert der Kontroll-Kondition (45 %). Dies entsprach jeweils einer signifikanten Expressionszunahme gegenüber der entsprechenden Kondition ohne Zytokine („Kontrolle“ vs. „+ Zytokine“ und „+ DLL4“ vs. „+ Zytokine + DLL4“) (Abbildung 23B). DLL4 zeigte hingegen keinen Effekt auf die LAG-3-Expression.

Die LAG-3-Expression lag im Vergleich zu den konventionellen *memory* T-Zellen in den *memory* Tregs deutlich höher (Tregs: 54 %, Tcons: 26 %), in den naiven T-Zellen zeigte sich hingegen eine vergleichbare Expression (Tregs: 45 %; Tcons 52 %) (Abbildung 24, Anhang 3).

CTLA-4 zeigte in naiven und *memory* Tregs mit über 90 % positiven Zellen eine deutlich höhere Expression als in den konventionellen T-Zellen (Anhang 3). In den *memory* Tregs wurde durch die verschiedenen Kulturbedingungen keine Veränderung der Expression erzielt, während in den naiven Tregs durch Hinzugabe von Zytokinen und DLL4 allein sowie auch in Kombination beider eine weitere Erhöhung der Expression zu beobachten war. Während die Expression in der Kontroll-Kondition, wie auch in den *memory* Zellen ca. 90 % betrug, waren in der Zytokin-Kondition bereits 94 % der naiven Tregs CTLA-4 positiv und in der DLL4-Kondition mit 95 % signifikant mehr Zellen positiv als in der Kontroll-Kondition. Waren sowohl Zytokine als auch DLL4 im Medium, zeigte sich eine weitere Zunahme auf fast 97 % positive Zellen. Aufgrund der bereits hohen Expression in der Kontroll-Kondition entsprachen diese Veränderungen lediglich einer 1,05-fachen Expression der Kontroll-Kondition in der Zytokin- und der DLL4-Kondition bzw. einer 1,08-fachen Expression der Kontroll-Kondition in der Zytokin-DLL4-Kondition (Abbildung 23B).

Als letzter coinhibitorischer Rezeptor wurde, wie auch bei den konventionellen T-Zellen PD-1 betrachtet. In den *memory* Tregs zeigte sich in der DLL4-Kondition eine signifikante Abnahme der Expression auf das 0,8-Fache der Kontroll-Kondition. Auch in der Zytokin-DLL4-Kondition kam es zu einer Abnahme der Expression, wobei diese nicht signifikant war. Die Zytokine allein zeigten hingegen keinen Effekt auf die PD-1-Expression. Mit 60 % positiven Zellen lag der Anteil PD-1 positiver Zellen

in den *memory* Tregs deutlich höher als in den naiven Tregs mit 30 % und den *memory* Tcons mit 44 % sowie naiven Tcons mit 37 % (Abbildung 24; Anhang 3).

Wie auch bei LAG-3 zeigte sich in den naiven Tregs bei PD-1 eine signifikant höhere Expression in der Zytokin-Kondition. Mit 50,3 % positiven Zellen exprimierten 1,75-fach mehr Zellen PD-1 als in der Kontroll-Kondition. DLL4 zeigte mit einer durchschnittlich dem 0,85-Fachen der Kontroll-Kondition entsprechenden Wert sowie in Kombination mit Zytokinen dem 1,41-Fachen Wert tendenziell einen negativen Effekt auf die LAG-3 Expression (Abbildung 23B).

Wie auch schon bei den konventionellen T-Zellen, zeigte sich auch für regulatorische T-Zellen kein einheitlicher Effekt der Kulturbedingungen auf die Expression verschiedener coinhibitorischer Rezeptoren. Weiterhin zeigten sich insbesondere für CTLA-4 und PD-1 zum Teil deutliche Unterschiede zwischen den *memory* und den naiven Tregs (Abbildung 24). Für CTLA-4 zeigte sich nur in der naiven Population eine leichte Expressionszunahme durch DLL4 bzw. Zytokine sowie eine weitere Zunahme bei Kombination der beiden. Für PD-1 zeigte sich in *memory* Tregs eine Abnahme der Expression durch DLL4, während in naiven Tregs eine Zunahme der Expression durch Zytokine zu verzeichnen war.

Eine solche Zunahme der Expression durch Zytokine zeigte sich ebenfalls für LAG-3 in *memory* und naiven Tregs. Die CD49b-Expression zeigte hingegen sowohl in *memory* als auch in naiven Tregs keine Reaktion auf die verschiedenen Kulturbedingungen.

Die verschiedenen Effekte der Kulturbedingungen zeigten sich ebenfalls in der RNA-Sequenzierung, sodass die auf Proteinebene beobachteten Effekte auch auf RNA-Ebene bestätigt werden konnten (Abbildung 24). Neben den Effekten der Kulturbedingungen wurde in der RNA-Sequenzierung insbesondere auch die unterschiedliche Expressionstärke der verschiedenen coinhibitorischen Rezeptoren zwischen den Zelltypen deutlich. Wie auch im Anhang 3 in den Kontroll-Konditionen dargestellt, zeigt sich insbesondere für CTLA-4 und TIGIT eine deutlich höhere Expression in Tregs. Weniger stark ausgeprägt findet sich dies ebenfalls für Tim-3 sowie für *memory* Zellen für LAG-3. Weiterhin zeigte sich im Vergleich zu den jeweiligen naiven Zellen eine stärkere PD-1-Expression durch *memory* Zellen (Abbildung 24). Die auf Proteinebene beobachtete höhere Expression von CD49b in Tregs zeigte sich auf RNA-Ebene hingegen weniger deutlich.

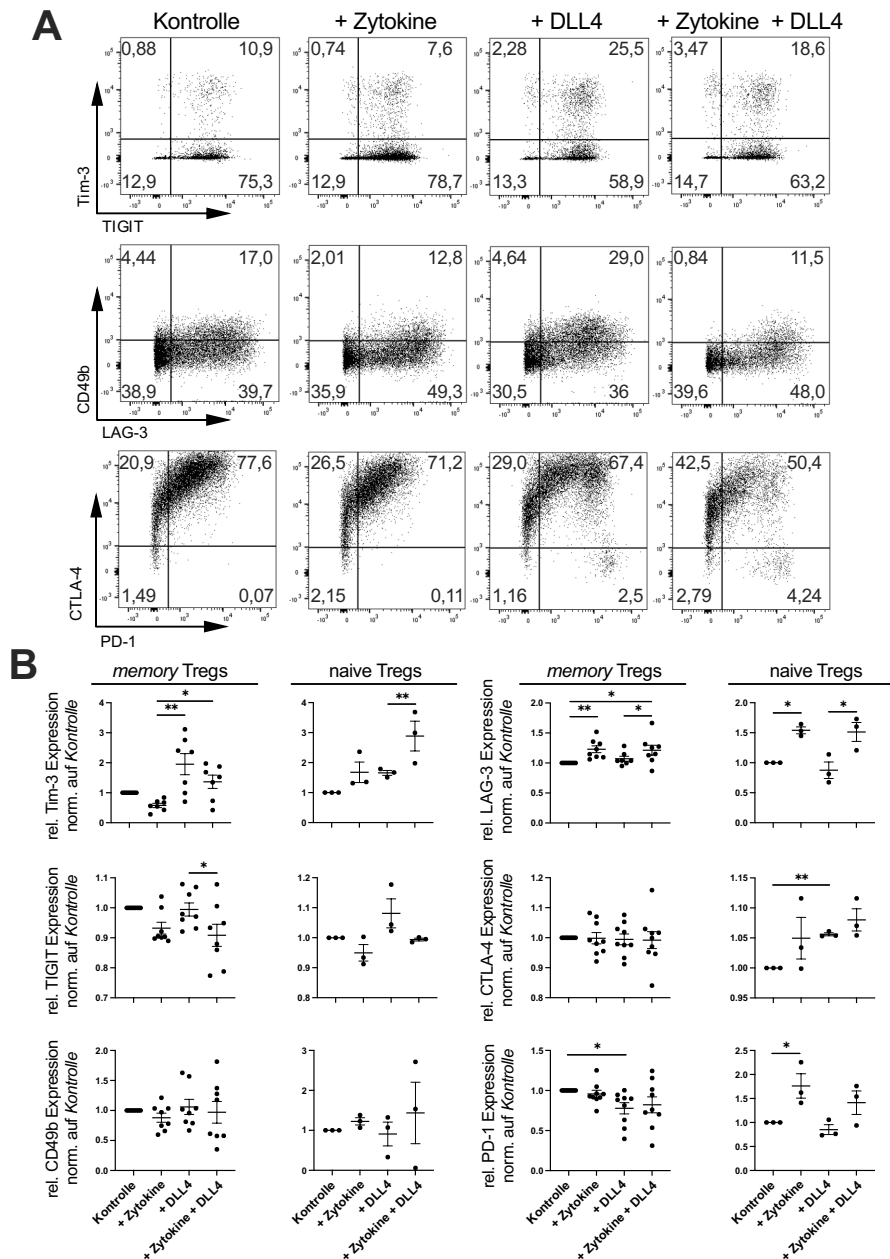


Abbildung 23: Expression coinhibitorischer Rezeptoren durch regulatorische T-Zellen

In *memory* und naive Tregs sortierte Zellen wurden 48 h entsprechend der jeweiligen Kondition kultiviert und anschließend Tim-3, TIGIT, CD49b, LAG-3 und PD-1 auf der Zelloberfläche sowie CTLA-4 intrazellulär gefärbt. (A) Repräsentativer *Dotplot* der Expression verschiedener coinhibitorischer Rezeptoren auf *memory* Tregs. (B) Darstellung der relativen Expression der verschiedenen Rezeptoren in den unterschiedlichen T-Zell Typen und Kulturbedingungen (*memory* n=7/9; naive n=3). Die Werte wurden durch Division des Anteils positiver Zellen der jeweiligen Kondition durch den Anteil der positiven Zellen in der Kontroll-Kondition auf letztere normiert. Dargestellt sind die einzelnen Messungen als Einzelpunkte sowie der *Mean* und SEM. (* $\triangleq$ p<0,05; ** $\triangleq$ p<0,01; *** $\triangleq$ p<0,001; **** $\triangleq$ p<0,0001, genaue p-Werte sowie Angabe zum Test in Anhang 5)

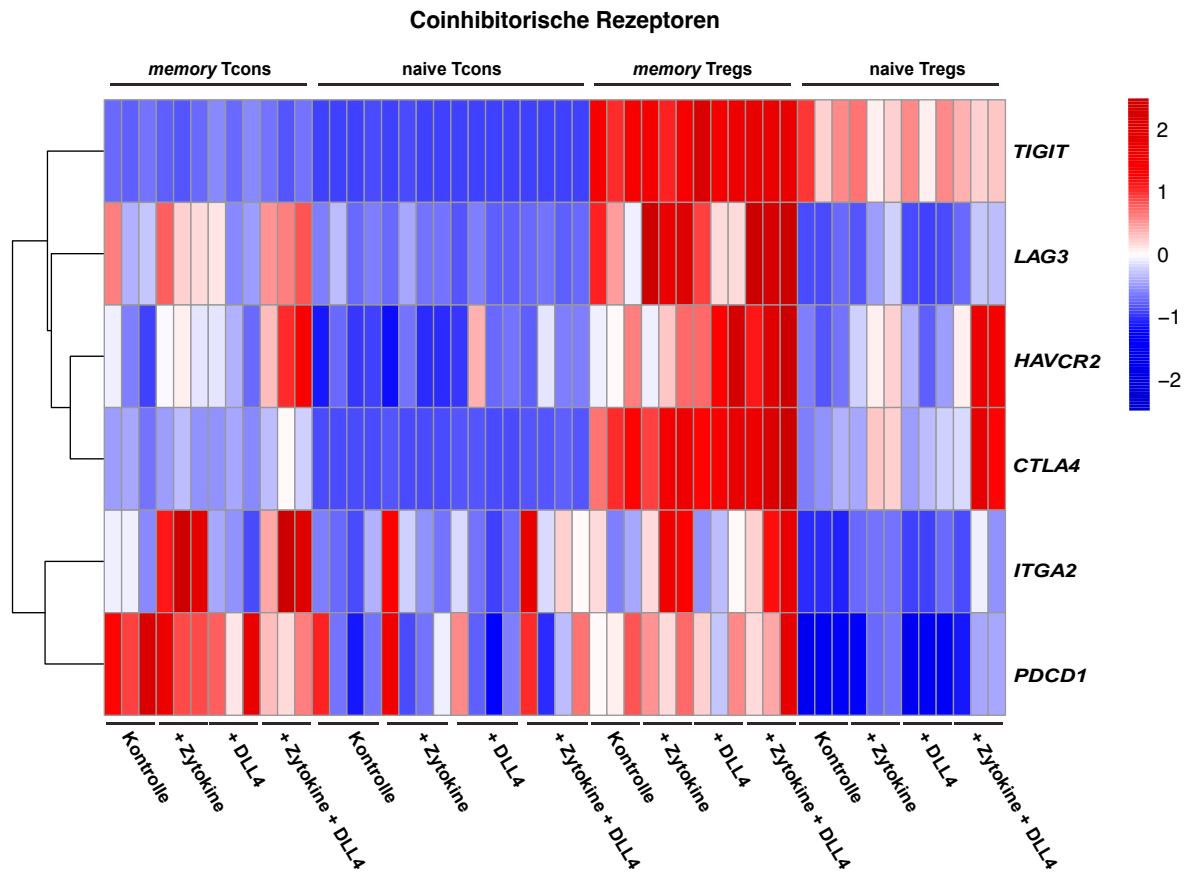


Abbildung 24: Expression der coinhibitorischen Rezeptoren auf RNA-Ebene in regulatorischen und konventionellen T-Zellen

In *memory* und *naive* Zellen sortierte Tcons und Tregs wurden für 48 h entsprechend der jeweiligen Kondition kultiviert, die RNA isoliert und eine RNA-Sequenzierung durchgeführt. Abgebildet ist der *normalized count* der Expression der verschiedenen coinhibitorischen Rezeptoren (vertikal) sowie die verschiedenen Proben (horizontal) (n=3; naive Tcons n=4).

HAVCR2 kodiert für Tim-3, *ITGA2* für CD49b und *PDCD1* für PD-1.

4 Diskussion

Regulatorische T-Zellen spielen eine wichtige Rolle in Autoimmunerkrankungen, chronischen Entzündungen sowie Krebserkrankungen (Lucca und Dominguez-Villar, 2020; Shevyrev und Tereshchenko, 2020).

Als zwei der vielfältigen Wirkungsmechanismen regulatorischer T-Zellen stellen die Produktion von IL-10 sowie die Expression coinhibitorischer Rezeptoren einen möglichen Angriffspunkt neuer Therapieansätze dar (Shevyrev und Tereshchenko, 2020).

Ahlers et al. konnten zeigen, dass in konventionellen T-Zellen durch die Kombination des Notch-Liganden DLL4 mit den Zytokinen IFN- α , IL-6 und IL-21 eine erhebliche Produktion von IL-10 induziert werden kann und die Expression verschiedener coinhibitorischer Rezeptoren beeinflusst wird. Im Rahmen dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob und inwieweit die in konventionellen T-Zellen beschriebene IFN- α /IL-6/IL-21/DLL-4-abhängige IL-10-Induktion auch in regulatorischen T-Zellen zu beobachten ist.

4.1 Expression verschiedener Notch-Rezeptoren in CD4⁺ Zellen

Der Notch-Signalweg ist von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung, Differenzierung sowie Funktion von T-Zellen (Murphy und Weaver, 2018 S.405; Steinbuck und Winandy, 2018). Die beobachteten Effekte des Notch-Signalweges konnten dabei überwiegend auf die Interaktion mit dem Notch-1 Rezeptor zurückgeführt werden (Deftos und Bevan, 2000; Eagar et al., 2004). Darüber hinaus zeigten verschiedene Arbeiten, dass neben Notch-1 auch Notch-2 und -3 von T-Zellen exprimiert werden können (Amsen et al., 2015; Auderset et al., 2012; Charbonnier et al., 2015; Koyanagi et al., 2012). Welche Rezeptoren von den im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendeten humanen CD4⁺ Zellen exprimiert werden, wurde anhand einer qPCR sowie im Rahmen einer RNA-Sequenzierung untersucht. In der qPCR zeigte sich in totalen CD4⁺ Zellen eine deutlich stärkere Expression der Notch-Rezeptoren 1 und 2, während die Rezeptoren Notch-3 und -4 nur in sehr geringem Ausmaß exprimiert werden. Die RNA-Sequenzierung konnte dieses Ergebnis auch für *memory* und naive konventionelle und regulatorische T-Zellen zeigen. Die Expression des Notch-3 Rezeptors lag dabei in der qPCR höher als die des Notch-4 Rezeptors, während in der RNA-Sequenzierung eine höhere Expression von Notch-4 als Notch-3 gezeigt werden konnte. Dieser Unterschied könnte darauf zurückzuführen sein, dass in der qPCR für Notch-3 und Notch-4 hohe Ct-Werte (Notch-3: >35, Notch-4 >36) gemessen wurden, also die Expressionslevel nah am Detektionslimit des *Assays* lagen und somit in ihrer Aussagekraft begrenzt sind.

Die deutlich höhere Expression der Notch-Rezeptoren 1 und 2 stimmt mit den Daten des „*The Human Protein Atlas*“ (<https://www.proteinatlas.org>, letzter Zugriff: 1.03.2023) überein. Weiterhin zeigten

auch Jiao et al. in einer Untersuchung zur Expression von Notch in T-Helferzellen von an rheumatoider Arthritis erkrankten Patienten ähnliche Ergebnisse innerhalb der gesunden Kontrollen, während sich in Abhängigkeit des Krankheitsstatus die Expression der verschiedenen Notch-Rezeptoren veränderte (Jiao et al., 2010). Sowohl die Daten des „*The human protein Atlas*“ als auch Jiao et al. zeigen dabei die in der RNA-Sequenzierung beobachtete höhere Expression des Notch-4 als des Notch-3 Rezeptors.

Die in Tregs beobachtete Expression der Notch-Rezeptoren passt weiterhin zu den von Charbonnier et al. in murinen regulatorischen T-Zellen gemachten Beobachtung, dass diese neben den Notch-Liganden Jagged1, DLL1 und DLL4 auch verschiedene Notch-Rezeptoren, v.a. Notch-1 gefolgt von Notch-2 und in vernachlässigbar geringer Menge auch Notch-3 und -4 exprimieren (Charbonnier et al., 2015).

Zusammen mit der in allen getesteten T-Zelltypen vergleichbaren Oberflächenexpression des Notch-1 Rezeptors kann angenommen werden, dass sich die verschiedenen T-Zelltypen nicht bedeutend in ihrer Notch-1-Expression unterscheiden und somit ähnliche Voraussetzungen für eine Liganden-Rezeptor-Interaktion vorlagen. Mögliche Unterschiede in den DLL4 vermittelten Effekten könnten somit auf der Rezeptor-Liganden-Interaktion nachgeschaltete Unterschiede im Signalweg hindeuten.

4.2 Beeinflussung des Notch-Signalweges auf Ebene der S2-Spaltung

ADAM10 und ADAM17 können den Notch-Rezeptor im Rahmen der S2-Spaltung proteolytisch spalten und so die extrazelluläre Notch-Domäne freisetzen (Bozkulak und Weinmaster, 2009; Bray, 2006). Dies stellt den Geschwindigkeits-bestimmenden Schritt des Notch-Signalweges dar (Steinbuck und Winandy, 2018). Daher war es von Interesse die Expression der beteiligten Metalloproteasen im Rahmen einer RNA-Sequenzierung zu untersuchen.

Es zeigte sich, dass alle untersuchten T-Zelltypen die ADAM-Proteasen 10 und 17 exprimieren. Die Expression von ADAM10 war dabei höher als die von ADAM17, dies passt zu der von Ebsen et al. beschriebenen höheren Oberflächen-Expression von ADAM10 im Vergleich zu ADAM17 auf T-Zellen. Weiterhin zeigten regulatorische T-Zellen, insbesondere *memory* Tregs, eine höhere ADAM10 und ADAM17-Expression als konventionelle T-Zellen, welches auf eine Rolle in für Tregs spezifischen Funktionen hinweisen könnte. Zudem exprimieren Tregs höhere Mengen verschiedener ADAM-Substrate, so wurden das von Tregs konstitutiv exprimierte CD25 sowie der von Tregs stärker exprimierte coinhibitorische Rezeptor LAG-3 als ADAM10 und ADAM17 Substrate identifiziert (Gibb et al., 2011; Huang et al., 2004; Kirschke et al., 2022).

In Abhängigkeit der Kulturbedingungen zeigte sich, dass es in den Zytokine enthaltenen Konditionen tendenziell zu einer erhöhten Expression von ADAM10 kam, während die ADAM17-Expression tendenziell durch DLL4 erhöht wurde. Die höchste Expression fand sich für beide ADAMs in den sowohl Zytokine als auch DLL4 enthaltenen Konditionen. Eine Beeinflussung der ADAM-Expression durch die Kulturbedingungen könnte Einfluss auf die DLL4-Notch-vermittelten Effekte des

Kultursystems nehmen. Zur weiteren Analyse wäre eine Oberflächenfärbung von ADAM10 und 17 interessant, um mögliche Unterschiede auf Proteinebene festzustellen. Inwiefern die Zytokine und der Notch-Ligand direkt Einfluss auf die ADAM-Expression nehmen oder ob IFN- α /IL-6/IL-21/DLL4-vermittelte Effekte indirekt die ADAM-Expression beeinflussen, bleibt zu klären.

Neben der Expression der ADAM-Proteasen wurde die Expression der auf die Funktion der ADAM-Proteasen Einfluss nehmenden C8-Tetraspanine 5, 10, 14, 15, 17 und 33 sowie der iRhoms1 und 2 untersucht (Harrison et al., 2021; Matthews et al., 2016). Die Tetraspanine 5, 14 und 17 sowie iRhom2 zeigten eine deutlich höhere Expression als die übrigen untersuchten Tspans und iRhom1. Im Vergleich der verschiedenen untersuchten T-Zelltypen fiel auch hier eine erhöhte Expression der Tetraspanine in *memory* Tregs auf. Dies passt zu der ebenfalls in *memory* Tregs beobachteten höheren Expression von ADAM10 und deutet auf eine besondere Bedeutung von ADAM10 in Tregs hin.

Passend zu den Ergebnissen dieser Arbeit ist Tspan14, gefolgt von Tspan5 und Tspan17, als das am stärksten in humanen und murinen T-Zellen exprimierte Tetraspanin beschrieben (beschrieben in Matthews et al., 2018). Zusätzlich können humane T-Zellen im Gegensatz zu murinen T-Zellen Tspan15 exprimieren (Matthews et al., 2018). Im Rahmen dieser Arbeit zeigte Tspan15 die nächsthöchste Expression unter den Tspans, wobei diese deutlich unter denen der zuvor genannten Tetraspanine lag. Durch *Knock-out* sowie Überexpression der verschiedenen Tspans wurde gezeigt, dass Tspan5 und Tspan14, nicht aber Tspan15 und Tspan33 das *Notch-Signaling* fördern (Harrison et al., 2021; Jouannet et al., 2016). Tspan5 und Tspan14 wirken dabei redundant und eine Notch-Signalübertragung kann nur bei gleichzeitiger Ausschaltung beider Tetraspanine gehemmt werden (Saint-Pol et al., 2017). Auch Tspan17, welches in der Sequenzierung ebenfalls eine starke Expression zeigte, könnte bei der Notch-Signalübertragung eine Rolle spielen. Es zeigt innerhalb der C8-Tetraspanine mit 78 % die höchste Proteinsequenz-Übereinstimmung mit Tspan5 (Harrison et al., 2021) und mit 57 % ebenfalls eine starke Übereinstimmung mit dem zweiten Notch-regulierenden Tetraspanin Tspan14 (Matthews et al., 2018). Mit den Tetraspaninen 5, 14 und 17 zeigte sich in der RNA-Sequenzierung somit eine starke Expression genau der Tetraspanine, für die ein über ADAM10-vermittelter Einfluss auf den Notch-Signalweg beschrieben ist.

Weiterhin zeigten die Tetraspanine eine Tendenz zu einer Zytokin-vermittelten erhöhten Expression. Zusammen mit der durch die Zytokine tendenziell ebenfalls erhöhten ADAM10-Expression könnte dies für einen Effekt der Zytokine auf die S2-Spaltung des Notch-Signalweges sprechen.

Die Pseudoproteasen iRhom1 und 2 können beide die Aktivität von ADAM17 regulieren, wobei passend zu den in der T-Zell-Sequenzierung gezeigten Ergebnissen in der Literatur in Leukozyten und Thrombozyten lediglich eine iRhom2-Expression gezeigt wurde (Matthews et al., 2016).

Die durch die RNA-Sequenzierung aufgezeigten Tendenzen bezüglich des Einflusses der Kulturbedingungen auf die Expression der ADAM-Proteasen sowie der Tetraspanine und ihre Effekte auf den Notch-Signalweg sollten in weiteren Versuchen näher untersucht und so ggf. bestätigt werden. Über die Tetraspanine und iRhoms hinaus wäre dabei auch interessant, inwieweit die *Sheddases* von ADAM10 und 17, ADAM8, 9 und 15 exprimiert werden, da diese durch *Shedden* von ADAM10 (ADAM9, 15) und ADAM17 (ADAM8) von der Zelloberfläche deren Substrat-Spezifität sowie Funktion beeinflussen können (Scharfenberg et al., 2020).

4.3 Veränderte Notch-Rezeptor-Oberflächenexpressionen sprechen für eine Interaktion und Aktivierung des Notch-Signalweges

Nachdem gezeigt wurde, dass sowohl der Notch-Rezeptor als auch die für die S2-Spaltung verantwortlichen ADAM-Proteasen durch die untersuchten Zellen exprimiert werden, sollte untersucht werden, ob die Oberflächenexpression des Notch-1 Rezeptors durch die verschiedenen Kulturbedingungen beeinflusst wird. In Kultur mit Zytokinen zeigte sich in allen Zelltypen außer den totalen CD4⁺ Zellen eine nicht signifikante Zunahme der Notch-Oberflächen-Expression.

Bemerkenswerterweise zeigten alle untersuchten T-Zelltypen (totale CD4⁺ Zellen, *memory* und naive Tcons, *memory* und naive Tregs) in den Oberflächenfärbungen jedoch eine signifikante Abnahme der Notch-1-Expression in den DLL4 enthaltenen Konditionen. Eine Notch-1 qPCR in CD4⁺ Zellen sowie die durchgeführte RNA-Sequenzierung zeigten hingegen keine Veränderung der Notch-1-Expression in den verschiedenen Konditionen. Die verminderte Oberflächenexpression war somit nicht mit einer verminderten Expression auf RNA-Ebene verbunden.

Dies kann als Hinweis auf eine proteolytische Prozessierung des Notch-Rezeptors nach stattgefundener Liganden-Rezeptor-Interaktion gesehen werden. Nach Interaktion der sich auf der T-Zelle befindlichen Notch-Rezeptoren mit dem auf den *Beads* präsentierten DLL4 kommt es im Rahmen der S2-Spaltung zur proteolytischen Prozessierung des Notch-Rezeptors mit Freisetzung der NECD (1.5.1 Ablauf des Notch-Signalweges) (Steinbuck und Winandy, 2018). Der sich zuvor auf der Zelloberfläche befindliche extrazelluläre Teil des Notch-Rezeptors, an welchen der für die Oberflächenfärbung genutzte Antikörper bindet, befindet sich nach stattgefundener S2-Spaltung nicht mehr auf der Zelloberfläche. Eine erfolgte Liganden-Rezeptor-Interaktion mit nachfolgender S2-Spaltung kann somit eine Erklärung für die verminderte Oberflächenexpression von Notch-1 sein.

In Bezug auf die Abnahme des auf der Oberfläche gefärbten Notch-1, insbesondere in Anbetracht der unveränderten Expression auf RNA-Ebene, sollte weiterhin ein Problem der Interaktion des FACS- anti-Notch-1 Antikörpers mit dem mit DLL4 interagierenden Notch-1 Rezeptor ausgeschlossen werden. Liegt die Bindestelle des Antikörpers innerhalb der Ligandenbindestelle oder aber wird diese durch den Liganden in anderer Weise blockiert, könnte eine fehlende Anfärbbarkeit trotz vorhandenem Rezeptor

resultieren. Die genaue Bindestelle des Antikörpers konnte nicht in Erfahrung gebracht werden. Da durch das *Gating* die *MACSiBeads* allerdings von der Analyse ausgeschlossen wurden, müsste bei Blockade der Bindestelle durch das DLL4 der *Beads*, sich dieses von den *MACSiBeads* gelöst haben. Zum Ausschluss dessen erfolgte weiterhin eine FACS-Färbung gegen DLL4 und Notch-1. Die durch Dextran angefärbten, sich noch in der Kultur befindlichen *MACSiBeads*, zeigten sich dabei für Ligand und Rezeptor positiv. Dies spricht einerseits gegen ein Färbe-Problem und im Weiteren für eine Interaktion des DLL4 auf den *Beads* mit anschließender Lösung der NECD des Notch-1 Rezeptors von den Zellen und Verbleib am DLL4 der *Beads*.

Insgesamt kann die beobachtete Abnahme der Oberflächenexpression des Notch-1 Rezeptors somit auf eine im Rahmen der Interaktion zwischen Liganden und Rezeptor stattfindende proteolytische Spaltung des Notch-Rezeptors zurückgeführt werden.

Dass die Interaktion von DLL4 und Notch und die daraus resultierende proteolytische Prozessierung des Notch-Rezeptors auch zur Aktivierung des Notch-Signalweges in den T-Zellen führte, konnte anhand einer Untersuchung der Expression des Notch-Zielgens *hairy and enhancer of split-1 (HES-1)* gezeigt werden. *HES-1* wies in den DLL4 enthaltenen Konditionen eine signifikant erhöhte Expression im Vergleich zu den Kontrollbedingungen auf, welches für eine Aktivierung des Notch-Signalweges durch den angebotenen Liganden spricht (Deftos und Bevan, 2000). Die RNA-Sequenzierung zeigte dabei, dass dies nicht nur auf die totalen CD4⁺ Zellen, sondern auch auf naive und *memory* konventionelle und regulatorische T-Zellen zutraf. Der stärkste Effekt zeigte sich dabei in naiven Tregs, insgesamt zeigte sich aber in allen T-Zelltypen eine vergleichbare Induktion. Über alle Subtypen hinweg konnte somit eine suffiziente Aktivierung des Notch-Signalweges durch den auf den *Beads* präsentierten Notch-Liganden erreicht werden.

4.4 IFN- α /IL-6/IL-21/DLL4-vermittelte Induktion von IL-10 in konventionellen T-Zellen

In verschiedenen T-Effektor Zelltypen konnte eine Korrelation zwischen der Expression des Transkriptionsfaktors c-Maf und der Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 gezeigt werden (Neumann et al., 2014; Saraiva et al., 2009). Zudem konnte die Notch und IFN- α /IL-6/IL-21-vermittelte IL-10-Produktion in T-Zellen von Ahlers et al. auf eine STAT3 vermittelte Aktivierung der Transkriptionsfaktoren c-Maf sowie Blimp-1 zurückgeführt werden. Eine erhöhte IL-10-Produktion korrelierte dabei mit einer stärkeren c-Maf-Expression, sodass die c-Maf-Expression als indirekter Indikator für eine IL-10-Produktion angesehen werden kann (Ahlers et al., 2022).

Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich in totalen CD4⁺ Zellen eine signifikante Zunahme der c-Maf-Expression in beiden DLL4 enthaltenen Konditionen. In *memory* T-Zellen zeigte sich eine signifikante Zunahme in der Zytokin-Kondition sowie eine stärkere, jedoch nicht signifikante Zunahme der

Expression in der DLL4-Kondition. In naiven T-Zellen konnte ebenfalls eine Zunahme der c-Maf-Expression in den DLL4 enthaltenen Konditionen beobachtet werden.

Insgesamt scheint somit insbesondere der Notch-Ligand DLL4 Einfluss auf die c-Maf-Expression in den untersuchten Zelltypen zu nehmen.

Auf RNA-Ebene zeigte sich ein positiver Effekt der Zytokine nicht nur auf die c-Maf-Expression, sondern zusätzlich auch auf die IL-10-Expression. Dieser positive Effekt wurde dabei in beiden Fällen durch DLL4 im Sinne eines synergistischen Effektes noch weiter verstärkt. Diese Veränderung war dabei ebenfalls auf Proteinebene in der Messung des im Zellkulturüberstand enthaltenen IL-10 zu sehen. Dabei lag die IL-10-Produktion, wie auch von Ahlers (2017) beschrieben, in den *memory* Zellen deutlich höher als in den naiven konventionellen T-Zellen. Ebenso war die relative Zunahme der IL-10-Expression in der IFN- α /IL-6/IL-21/DLL4-Kondition im Vergleich zur Kontroll-Kondition in den *memory* Zellen höher als in den naiven Zellen.

Dieser auch in Ahlers et al. beschriebene synergistische Effekt von DLL4 und IFN- α , IL-6 und IL-21 kann durch Überschneidungen der Signalwege erklärt werden. Ahlers et al. zeigten, dass die IFN- α , IL-6 und IL-21 vermittelten Effekte in erster Linie abhängig von STAT3 waren. Weiterhin ist bekannt, dass Notch über sein Zielgen *HES-1* und dessen Assoziation mit Januskinase 2 (JAK2) und STAT3 zu einer verstärkten Phosphorylierung und Aktivierung von STAT3 führen kann (Kamakura et al., 2004; Murano et al., 2014). Da *HES-1* als direktes Notch-Zielgen, wie auch in den Experimenten dieser Arbeit gezeigt, durch eine DLL4 vermittelte Notch-Aktivierung induziert wird, ist es möglich, dass der synergistische Effekt auf einer verstärkten STAT3-Aktivierung beruht.

Für die Verbindung zwischen Notch, c-Maf und IL-10 spricht dabei auch, dass die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Inhibition der ADAM-Proteasen 10 und 17 zu einer Abnahme der DLL4 induzierten c-Maf und IL-10-Expression in konventionellen T-Zellen führte. Unter Berücksichtigung der entscheidenden Rolle der ADAM-Proteasen für die S2-Spaltung des Notch-Signalweges (Steinbuck und Winandy, 2018) spricht dies ebenfalls für eine DLL4 und damit Notch-vermittelte Induktion von c-Maf sowie IL-10 in konventionellen T-Zellen.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen der sowohl von Ahlers et al. als auch im Rahmen dieser Arbeit beobachteten IFN- α /IL-6/IL-21/DLL4-vermittelten IL-10-Produktion durch konventionelle T-Zellen ist der Zeitpunkt bzw. die Umstände der Induktion. So wurden die T-Zellen in den Versuchen von Ahlers et al. vor der Messung der IL-10-Expression zunächst für 120 h den Zytokinen bzw. DLL4 ausgesetzt, dann für 24 h in reines DMEM Medium überführt und anschließend mit PMA-Ionomycin für 6 h restimuliert (Ahlers et al., 2022). Ahlers et al. konnten so zeigen, dass in den T-Zellen eine Art Gedächtnis für die Fähigkeit IL-10 zu produzieren existiert. Dieses ermöglicht es den T-Zellen bei Reaktivierung über den TCR, unabhängig von den initialen IL-10 induzierenden Stimuli wieder IL-10 zu exprimieren (Ahlers (2017)). In weiteren Versuchen zeigte Ahlers jedoch auch, dass dieses

Gedächtnis im Gegensatz zu dem Gedächtnis für die Expression von bestimmten Effektorzytokinen nicht über einen längeren Zeitraum stabil ist (Ahlers, 2017; Löhning et al., 2002).

Im Gegensatz zu den Versuchen von Ahlers et al. wurde in den Versuchen dieser Arbeit die IL-10-Induktion im Rahmen der primären Aktivierung der T-Zellen über ihren TCR untersucht. Die Messung der IL-10-Expression wurde bereits nach 48 h Kultur mit Zytokinen bzw. DLL4 und ohne vorangehendes Stimuli-freies Intervall durchgeführt. Auch fand vor der Messung keine erneute Aktivierung der Zellen über den TCR statt. Dieser Ansatz zeigt, dass unter den gleichen Stimuli bereits bei der primären Aktivierung der T-Zellen IL-10 induziert wird. Somit wird neben der Induktion von Effektorzytokinen unter Einfluss von IFN- α /IL-6/IL-21/DLL4 bereits bei der primären TCR Aktivierung der T-Zell-Antwort entgegengewirkt.

4.5 Das von T-Zellen produzierte IL-10 zeigt eine suppressive Wirkung auf mit LPS-stimulierte Monozyten

Wie beschrieben kann IL-10 sowohl direkt durch Wirkung auf die T-Zell Antwort, als auch indirekt durch Effekte auf Makrophagen und Monozyten immunregulatorische Funktionen ausüben (Couper et al., 2008). IL-10 reduziert in APCs die Expression von MHC-Klasse-II, welches deren Fähigkeit Antigene zu präsentieren einschränkt (de Waal Malefyt et al., 1991). Auch die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und costimulatorischen Molekülen sowie CD80 und CD86 durch APCs kann durch IL-10 reduziert werden (zusammengefasst in Moore et al., 2001).

Dass das durch die Kulturbedingungen induzierte IL-10 auch tatsächlich solche immunregulatorischen Funktionen einnehmen kann, konnte im Rahmen weiterer Versuche der Arbeitsgruppe gezeigt werden (Ahlers et al., 2022). Hierfür wurden die Überstände aus den in dieser Arbeit beschriebenen Zellkulturen auf ihren Effekt auf die HLA-DR- und CD40-Expression von Monozyten untersucht. Beide Moleküle sind dabei von entscheidender Bedeutung für die Monozytenfunktion. So geht eine Hochregulation von HLA-DR mit einer verstärkten Antigenpräsentation einher (Tillinger et al., 2013) und durch Interaktion von CD40 mit seinem Liganden CD154 kommt es zu einer vermehrten Synthese pro-inflammatorischer Zytokine (Suttles et al., 1999).

Bei Exposition gegenüber den Überständen der mit DLL4 und Zytokinen kultivierten T-Zellen kam es im Gegensatz zur Exposition mit Kontroll-Konditions-Überständen nicht zu einer Zunahme der HLA-DR-Expression in LPS-stimulierten Monozyten. Weiterhin nahm auch die CD40-Expression ab. Durch Einsatz eines Anti-IL-10-Rezeptor-Antikörpers, der die gezeigten Effekte verringerte, konnte gezeigt werden, dass diese Effekte tatsächlich auf das in den Überständen vorhandene IL-10 zurückzuführen sind (s. auch Ahlers et al., 2022).

Die durch IFN- α /IL-6/IL-21/DLL4 induzierte IL-10-Produktion durch T-Zellen führt somit durch Abnahme der Expression der co-stimulatorischen Moleküle CD40 und HLA-DR durch Monozyten zur

Induktion eines regulatorischen Phänotyps dieser APCs. Inwieweit eine direkte Exposition der Monozyten gegenüber den IL-10 produzierenden Zellen, die gleichen Effekte zeigen würde und ob diese dann wiederum auch *in vivo* zu beobachten sind bleibt in weiteren Versuchen zu klären.

4.6 Induktion coinhibitorischer Rezeptoren in konventionellen T-Zellen

Neben einer gesteigerten IL-10-Produktion zeigte sich in Abhängigkeit von der Kultivierung mit oder ohne DLL4 und den Zytokinen IFN- α , IL-6 und IL-21 ebenfalls eine veränderte Expression verschiedener coinhibitorischer Rezeptoren durch konventionelle T-Zellen.

Wie von Ahlers et al. in *memory* T_H-Zellen beschrieben, zeigte sich auch in den Versuchen dieser Arbeit eine Zytokin/DLL4-vermittelte Erhöhung der Oberflächen-Expression von TIGIT, CD49b, LAG-3, CTLA-4 und Tim-3 in *memory* T-Zellen, wobei diese nicht signifikant waren.

Interessanterweise zeigte sich die beobachtete Expressionszunahme von CD49b und LAG-3 bereits bei alleiniger Exposition gegenüber den Zytokinen, welches auf eine besondere Rolle dieser hierbei hinweisen kann. Weiterhin konnte die von Ahlers (2017) auf RNA-Ebene beschriebene induzierende Wirkung von IFN- α /IL-6/IL-21/DLL4 auf CTLA-4 im Rahmen dieser Arbeit durch eine intrazelluläre Färbung auch auf Protein-Ebene gezeigt werden. Hierbei wurde ebenfalls bereits in der nur Zytokine enthaltenen Kondition eine erhöhte intrazelluläre CTLA-4-Expression gemessen.

Anders als in Ahlers et al. (2022) zeigte sich im Rahmen dieser Arbeit jedoch keine Erhöhung der Expression von PD-1, welches unter anderem durch Inhibition von über den T-Zellrezeptor-vermittelten Signalen hemmend auf die T-Zell-Proliferation wirken kann (Odorizzi und Wherry, 2012).

Auf naiven T-Zellen konnten Sumida et al. 2022 zeigen, dass Interferon- β Einfluss auf die Oberflächen-Expression coinhibitorischer Rezeptoren nimmt. Interferon vermittelt beobachteten sie eine Zunahme der PD-1, Tim-3 und LAG-3-Expression sowie eine Abnahme der TIGIT-Expression.

Die von Sumida et al. beobachteten Effekte zeigten sich bei den in dieser Arbeit kultivierten naiven T-Zellen unter Exposition gegenüber IFN- α , IL-6 und IL-21 nicht. Lediglich die PD-1-Expression schien durch die Zytokine erhöht, während sich kein Effekt auf die Tim-3 und LAG-3-Expression und insbesondere auch keine Abnahme der TIGIT-Expression fand. Ob dies durch die Exposition gegenüber den zusätzlichen Zytokinen IL-6 und IL-21 oder durch den Einsatz von IFN- α , an Stelle von IFN- β zu erklären ist, bleibt ungeklärt. Sumida et al. zeigten weiterhin, dass sich die IFN- β induzierte Expressionssteigerung von Tim-3, LAG-3 und PD-1 sowie die reduzierte TIGIT-Expression zumindest auf RNA-Ebene am stärksten zum 72 h Zeitpunkt und damit 24 h nach dem in dieser Arbeit gewählten Messpunkt finden lassen. Die Unterschiede könnten somit auch auf die Expressions-Kinetiken der verschiedenen Rezeptoren zurückzuführen sein.

Vergleicht man die Effekte der Kultivierung mit IFN- α , IL-6, IL-21 und DLL4 auf die Expression coinhibitorischer Rezeptoren in naiven Tcons mit denen in *memory* Tcons zeigten sich überwiegend die

gleichen Effekte. Lediglich bezogen auf Tim-3 zeigten naive T-Zellen eine deutlichere Beeinflussung durch DLL4, während *memory* T- Zellen v.a. auf Zytokine zu reagieren schienen.

Im Vergleich hierzu unterschieden sich die in totalen CD4⁺ Zellen beobachteten Effekte zum Teil erheblich von denen der FACS-sortierten Zellen. So wurden in totalen CD4⁺ Zellen für PD-1 und LAG-3 signifikant geringere Oberflächen-Expressionen in den DLL4 enthaltenen Konditionen und für TIGIT und PD-1 tendenziell eine erniedrigte Expression in den Zytokine enthaltenen Konditionen gemessen, während die gleichen Bedingungen keinen Effekt oder eine Erhöhung der Expression in den sortierten Zellen zeigten. Weiterhin schien die intrazelluläre CTLA-4-Expression in totalen CD4⁺ Zellen weder durch Zytokine noch durch DLL4 beeinflusst zu werden. Eine Erklärung hierfür ist, dass sich in den Kulturen der rein durch CD4-MACS angereicherten Zellen eine spenderspezifische Zusammensetzung aus verschiedenen CD4⁺ Zellen, wie konventionellen naiven und *memory* T-Zellen, verschiedenen T_H-Subtypen und regulatorischen T-Zellen befanden. Die verschiedenen CD4⁺ Zellen zeigen wiederum zum Teil erhebliche Unterschiede in der Oberflächen-Expression verschiedener Marker. In *memory* T-Zellen fand sich beispielsweise eine 10-fach höhere TIGIT-Oberflächen-Expression als in naiven T- Zellen. Durch eine spenderspezifische unterschiedliche Zusammensetzung der verschiedenen Zellen könnten sich so die unterschiedlichen Ergebnisse erklären. Interessant wäre daher auch die Betrachtung von nicht weiter sortierten, also totalen CD4⁺ Zellen im Vergleich zu sortierten T-Zellen eines einzelnen Spenders. Zusätzlich kann sich die Zellzusammensetzung auch während der Kultur beispielsweise durch unterschiedliches Proliferationsverhalten der verschiedenen Zelltypen verändern. Eine scheinbare Expressionsveränderung könnte dann nicht durch eine tatsächlich veränderte Expression, sondern lediglich durch eine Zu- oder Abnahme des relativen Anteils eines bestimmten Zelltyps bedingt sein.

Eine mögliche Erklärung für die sowohl in naiven Tcons als auch in totalen CD4⁺ Zellen beobachtete DLL4 vermittelte Tim-3-Expressionssteigerung könnte darin begründet sein, dass Tim-3, wie auch Notch ein Substrat der Metalloproteasen ADAM10 und 17 ist (Möller-Hackbarth et al., 2013). Tim-3 und Notch stehen somit in „Konkurrenz“ um die Prozessierung durch die Proteasen, wobei Notch nur nach Interaktion mit einem Liganden, wie beispielsweise DLL4 durch ADAMs gespalten werden kann (Steinbuck und Winandy, 2018). Somit könnten erhöhte Tim-3 Level auf eine geringere Prozessierung von Tim-3 durch ADAMs aufgrund einer gesteigerten Aktivität dieser Proteasen gegenüber Notch-1 in Folge der DLL4-Stimulation bedingt sein.

Neben der Induktion einer IL-10-Produktion nimmt die Kultivierung mit IFN- α /IL-6/IL-21/DLL4 durch Einfluss auf die Expression verschiedener coinhibitorischer Rezeptoren auch über einen weiteren Mechanismus Einfluss auf die Fähigkeit von T-Zellen regulatorisch auf Immunantworten einzuwirken. Durch ihre vielfältigen Wirkmechanismen können coinhibitorische Rezeptoren dabei auf verschiedene Art und Weise einer T-Zell Aktivierung direkt und auch indirekt entgegenwirken (Vergleiche auch

Abschnitt 1.3.3 Coinhibitorische Rezeptoren). Eine erhöhte Expression der genannten coinhibitorischen Rezeptoren erweitert somit die immunregulatorischen Fähigkeiten der Effektorzellen und kann daher als Hinweis auf eine Entwicklung hin zu einem regulatorischen Zell-Typ gewertet werden.

Inwiefern die induzierten coinhibitorischen Rezeptoren tatsächlich die in der Literatur beschriebenen Effekte im untersuchten Kultursystem ausüben, bleibt in weiteren Versuchen zu klären. Möglich wären hierfür zum Beispiel Kokulturen mit anderen T-Zellen und APCs, im Sinne eines *in vitro* Suppressions-Assays, wie beispielsweise von Collison und Vignali beschrieben (Collison und Vignali, 2011). Ebenso konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden, auf welchen molekularen Prozessen bzw. Signalwegen die Veränderungen der Expression der verschiedenen Rezeptoren beruhen.

4.7 Die Effekte des IFN- α /IL-6/IL-21/DLL4-Kultursystems auf regulatorische T-Zellen

4.7.1 Die Rolle von c-Maf in der Induktion von IL-10 in regulatorischen T-Zellen

In konventionellen T-Zellen konnte gezeigt werden, dass die beobachtete IFN- α /IL-6/IL-21/DLL4-vermittelte IL-10-Induktion mit einer erhöhten c-Maf-Expression korreliert, weshalb dieser Transkriptionsfaktor im Rahmen dieser Arbeit als indirekter Nachweis einer IL-10-Expression gewählt wurde. In Analogie zu den konventionellen T-Zell-Kulturen wurde auch in den Treg-Kulturen nach 48-stündiger Kultur entsprechend den verschiedenen Konditionen eine intranukleäre Färbung gegen c-Maf durchgeführt. In dieser zeigte sich trotz einer ebenfalls Zytokin-DLL4 vermittelten IL-10-Induktion, anders als in den konventionellen T-Zellen keine Korrelation zwischen den verschiedenen Kulturbedingungen und der per FACS gemessenen c-Maf-Expression.

Bereits in der Kontroll-Kondition zeigten regulatorische T-Zellen dabei eine deutlich höhere c-Maf-Expression als die konventionellen T-Zellen, wobei der Anteil c-Maf positiver Zellen in den *memory* Tregs fast doppelt so hoch war, wie in den naiven Tregs. Die bereits hohe Expression ließ sich in beiden Zelltypen weder durch Zugabe der Zytokine IFN- α , IL-6 und IL-21 noch durch den Notch-Liganden DLL4 signifikant erhöhen. In Kombination beider kam es sogar zu einer Abnahme der c-Maf-Expression in *memory* Tregs. Lediglich in der RNA-Sequenzierung zeigte sich eine Induktion des für c-Maf kodierenden *MAF* in naiven Tregs, welches für eine ähnliche Rolle von c-Maf, wie in konventionellen T-Zellen spricht. Eine klare Korrelation zwischen der c-Maf-Expression und der IL-10-Produktion, wie sie in Tcons zu sehen ist und welche c-Maf in diesen zu einem guten indirekten Nachweis für IL-10 macht, findet sich allerdings auch in den naiven Tregs nicht.

Die deutlich höhere c-Maf-Expression in Tregs passt zu den von Neumann et al. in Mäusen gemachten Beobachtungen, dass in verschiedenen murinen Geweben (u.a. Milz, Thymus und mesenterische Lymphknoten), die c-Maf-Expression der regulatorischen T-Zellen, die der konventionellen T-Zellen übersteigt.

Während sich die c-Maf-Expression in *memory* Tregs, im Gegensatz zu naiven Tregs nicht durch die Kulturbedingungen beeinflussen ließ, konnte ihre IL-10-Produktion durch IFN- α /IL-6/IL-21/DLL4 dennoch gesteigert werden. Diese Beobachtung könnte dafür sprechen, dass die IFN- α /IL-6/IL-21/DLL4 vermittelte IL-10-Induktion in regulatorischen *memory* T-Zellen allein oder zusätzlich über einen anderen Signalweg und andere Transkriptionsfaktoren vermittelt wird als in konventionellen T-Zellen. Dennoch scheint c-Maf auch in Tregs notwendig für eine IL-10-Produktion zu sein. So zeigen Mäuse mit einer Treg-spezifischen c-Maf Deletion eine reduzierte IL-10-Produktion (Neumann et al., 2019a). Auch die im Rahmen dieser Arbeit gezeigte hohe c-Maf-Expression in *memory* Tregs spricht für eine Rolle von c-Maf in der IL-10-Produktion von Tregs, eine c-Maf-Expression allein scheint jedoch nicht hinreichend für diese zu sein.

Neben c-Maf sollten auch weitere Transkriptionsfaktoren, welche mit einer IL-10-Produktion durch Tregs, aber auch durch andere T-Zellen in Verbindung gebracht wurden auf ihre Rolle in der IFN- α /IL-6/IL-21/DLL4-vermittelten IL-10-Induktion hin untersucht werden. Zu nennen sind hier unter anderem Blimp-1, E4BP4 und IRF4 (Übersicht über weitere mit einer IL-10-Produktion in Verbindung gebrachten Transkriptionsfaktoren in: Neumann et al., 2019b). Für Blimp-1 konnte dabei in konventionellen T-Zellen bereits eine mit c-Maf synergistische Wirkung bei der Induktion von IL-10 durch IFN- α /IL-6/IL-21/DLL4 gezeigt werden (Ahlers et al., 2022), ob dies auch für Tregs zutrifft ist unklar. Hinweise darauf, welche Transkriptionsfaktoren anstelle von beziehungsweise zusätzlich zu c-Maf für die IFN- α /IL-6/IL-21/DLL4-vermittelte IL-10-Induktion verantwortlich sind, könnten anhand der an den Zellen dieser Arbeit durchgeführten RNA-Sequenzierung gewonnen werden. Der Effekt des jeweiligen Transkriptionsfaktors auf die IL-10-Produktion könnte dann anhand der Auswirkungen einer Blockade des Transkriptionsfaktors durch den Einsatz von siRNA oder eines CRISPR/Cas9 vermittelten Knockouts des Transkriptionsfaktors untersucht werden. Ein CRISPR/Cas9 vermittelter Knockout von c-Maf in Tregs könnte als nächster Schritt weiterhin auch Klarheit über die Bedeutung von c-Maf für die IFN- α /IL-6/IL-21/DLL4-vermittelte IL-10-Produktion geben.

4.7.2 Eine Kultivierung mit IFN- α /IL-6/IL-21/DLL4 vermittelt auch in regulatorischen T-Zellen eine Induktion von IL-10

Da IL-10 einen der Regulationsmechanismen regulatorischer T-Zellen darstellt (Shevyrev und Tereshchenko, 2020), war es von besonderem Interesse zu überprüfen, ob die in konventionellen T-Zellen beschriebene IFN- α /IL-6/IL-21/DLL4-abhängige IL-10-Induktion auch in regulatorischen T-Zellen zu beobachten ist. Wie auch schon bei den konventionellen T-Zellen wurden die Tregs für 48 h kultiviert (2.2.4.5. Ansetzen und Verlauf der Treg-Kulturen) und anschließend die IL-10 Konzentration im Zellkulturüberstand via *MACSPlex* bestimmt. Tregs, welche für 48 h mit IFN- α , IL-6 und IL-21 sowie DLL4 kultiviert wurden, produzierten dabei deutlich mehr IL-10 als die Zellen der Kontroll-Kondition. Wie auch schon bei den konventionellen T-Zellen zeigten *memory* Tregs eine höhere IL-10-

Produktion als naive Tregs. Die durch die Kulturbedingungen bewirkte relative Zunahme der IL-10-Produktion, wie auch die finale IL-10-Konzentration waren dabei bei regulatorischen *memory* T-Zellen geringer als bei den konventionellen *memory* T-Zellen. Im Vergleich hierzu zeigten die naiven regulatorischen T-Zellen eine stärkere Zunahme der IL-10-Produktion und auch eine höhere finale IL-10-Konzentration als die konventionellen naiven T-Zellen.

Ein möglicher Grund für das unterschiedliche Ansprechverhalten der verschiedenen T-Zelltypen könnte eine unterschiedliche Expression der für die Effekte verantwortlichen Rezeptoren sein. Da wie bereits beschrieben alle betrachteten T-Zelltypen eine ähnliche Oberflächen-Expression des Notch-1 Rezeptors zeigten, könnten Unterschiede insbesondere auch in der Expression der Zytokin-Rezeptoren liegen. So könnte eine im Vergleich zu *memory* Tcons verringerte Expression der IFN- α -, IL-6- oder IL-21-Rezeptoren durch naive Tcons sowie *memory* Tregs eine geringere IL-10-Induktion in diesen erklären. Um mögliche Expressionsunterschiede zwischen den Zytokin-Rezeptoren darzustellen, wäre eine Oberflächenfärbung der entsprechenden Rezeptoren mit anschließender FACS-Analyse denkbar. Hierbei wäre dann insbesondere ein Vergleich von *memory* und naiven Subtypen aber auch von Tcons und Tregs von Interesse.

Auch wäre denkbar, dass die verschiedenen T-Zelltypen eine unterschiedliche Kinetik der IL-10-Expression zeigen. So wurde im Rahmen dieser Arbeit lediglich für CD4⁺ T-Zellen eine Kinetik der IL-10-Expression durchgeführt, in welcher sich die höchste Expression nach 48 h zeigte. Ahlers (2017) zeigte hingegen, dass *memory* T_H-Zellen bereits nach 24 h und naive T_H-Zellen erst nach 48 h IL-10-mRNA exprimieren. Dies könnte darauf hinweisen, dass zum gewählten Messzeitpunkt von 48 h, die durch die Kulturbedingungen induzierte IL-10-Produktion noch nicht seinen Maximalwert erreicht hat. Um dies zu klären wären weitere Kinetiken für die einzelnen T-Zelltypen anzustreben.

Die beobachtete stärkere bzw. ggf. lediglich frühere IL-10-Produktion durch *memory* T-Zellen könnte darauf zurückgeführt werden, dass *memory* T-Zellen bereits *in vivo* durch körpereigene Zytokine auf die IL-10-Produktion vorbereitet sein können und sie so *in vitro* schneller auf die in der Kultur präsentierten Stimuli reagieren und IL-10 produzieren können. Generell ist bekannt, dass *memory* T-Zellen früher nach der Aktivierung Effektor-Funktionen, wie die Sekretion verschiedener Zytokine, aufweisen als naive T-Zellen (Berard et al., 2002). Die schnelle Expression von Effektorzytokinen könnte dabei auf eine Modulation der Chromatinstruktur oder auch einer Demethylierung von Promotoren für Zytokin-Gene zurückzuführen sein, welche auch in ruhenden T_H1- und T_H2-Zellen in Abwesenheit weiterer Stimulationen beschrieben sind (Agarwal und Rao, 1998). Ob die beobachteten Effekte auf diesen zwischen *memory* und naiven T-Zellen bestehenden Unterschieden beruhen und ob diese auch auf Tregs zu übertragen sind, bleibt zu klären.

Um nachzuweisen, dass das produzierte IL-10 auch tatsächlich durch regulatorische T-Zellen produziert wird, wäre weiterhin eine FACS-Färbung gegen IL-10, FoxP3, CD137 und CD154 anzustreben, um

eine IL-10-Expression in CD137⁺CD154⁻FoxP3⁺ Tregs festzustellen. Verglichen mit ersten Versuchen zu einer IFN- α /IL-6/IL-21/DLL4-vermittelten IL-10-Induktion in regulatorischen T-Zellen durch Ahlers (2017) konnten jedoch Zweifel bezüglich der Herkunft des gemessenen IL-10 weitestgehend entkräftet werden. Wurde in der genannten Arbeit lediglich ein CD25-MACS durchgeführt, wurde in dieser Arbeit eine FACS-Sortierung der Zellen mit einer Reinheit von >99 % an diese angeschlossen. Weiterhin ermöglicht die kürzere Kulturzeit von 48 h keine signifikante Zunahme etwaig doch in der Kultur verbliebener konventioneller T-Zellen und durch zusätzliche Färbungen der Zellen zum 48 h Zeitpunkt gegen FoxP3 sowie CD137 konnten die Zellen weiterhin als regulatorische T-Zellen identifiziert werden (Nowak et al., 2018). Somit kann in den vorliegenden Versuchen von einer IL-10-Produktion durch regulatorische T-Zellen ausgegangen werden.

Eine Kultivierung mit IFN- α /IL-6/IL-21 sowie dem Notch-Liganden DLL4 kann somit über die von Ahlers et al. beschriebenen naiven und *memory* T_H-Zellen sowie T_H1, T_H2, T_H17 und T_H1/17-Zellen hinaus auch in regulatorischen T-Zellen eine IL-10-Produktion induzieren.

Offen bleibt hierbei inwiefern bereits die einzelnen Zytokine, wie beispielsweise IL-6, eine Zunahme der IL-10-Produktion in Tregs bewirken können. Außerdem wäre interessant, ob auch bei der ursprünglich von Ahlers et al. beschriebenen Kultivierung für 120 h mit anschließender Stimulation mit PMA-Ionomycin eine IL-10-Produktion zu beobachten wäre. Hierfür müsste allerdings die Kultivierung regulatorischer T-Zellen weiter optimiert werden, da mit den zum Zeitpunkt dieser Arbeit in unserer Arbeitsgruppe etablierten Protokollen eine Kultivierung für einen so langen Zeitraum nur in Ko-Kultur mit weiteren PBMCs möglich ist. Da diese durch die von ihnen auf der Oberfläche exprimierten Rezeptoren und Liganden wiederum Einfluss auf die regulatorischen T-Zellen nehmen, könnte in dieser Form der Kultur nicht eindeutig der Effekt der Zytokine sowie des DLL4 geklärt werden.

Es bleibt festzuhalten, dass IFN- α /IL-6/IL-21/DLL4-vermittelt auch in regulatorischen T-Zellen eine IL-10-Induktion zu beobachten ist. Die genauen Mechanismen, die zu dieser führen, sowie die aus der IL-10-Produktion folgenden Effekte bedürfen weiterer Untersuchungen.

4.7.3 Beeinflussung der Expression coinhibitorischer Rezeptoren in Tregs

Neben IL-10 stellen coinhibitorische Rezeptoren einen der Hauptwirkungsmechanismen regulatorischer T-Zellen dar (s. auch 1.3.1.1. Wirkungsweisen von regulatorischen T-Zellen). Um zu klären, inwiefern auch die Expression dieser durch die STAT3 aktivierenden Zytokine IFN- α , IL-6 und IL-21 sowie durch DLL4 beeinflusst wird, wurde die Expression verschiedener coinhibitorischer Rezeptoren in Abhängigkeit der verschiedenen Kulturbedingungen untersucht. Wie auch in den konventionellen T-Zellen wurde die Expression von Tim-3, TIGIT, LAG-3, CTLA-4 und PD-1 sowie des Integrins CD49b bestimmt.

Im Vergleich zu den entsprechenden konventionellen T-Zellen zeigten regulatorische T-Zellen für alle coinhibitorischen Rezeptoren, außer PD-1 in naiven Tregs, einen höheren Anteil positiver Zellen.

Besonders große Unterschiede fanden sich für TIGIT, Tim-3 und CTLA4 sowie für das bei Koexpression mit LAG-3 T_R1-Zellen definierende CD49b (Anderson et al., 2016). Die von Huang et al. 2004 beschriebene deutlich höhere Expression von LAG-3 durch regulatorische T-Zellen zeigte sich lediglich in *memory* Tregs, welche eine in etwa doppelt so hohe Expression wie *memory* Tcons aufwiesen, die naiven Tregs zeigten hingegen eine geringfügig geringere Expression als die naiven konventionellen Zellen.

Eine hohe Expression der coinhibitorischen Rezeptoren durch Tregs passt zu dem in der Literatur beschriebenen Beitrag verschiedener coinhibitorischer Rezeptoren zur Kontrolle der Funktion und Stabilität von Tregs in verschiedenen Krankheitssituationen (beschrieben in Lucca und Dominguez-Villar, 2020). So stellen CTLA-4 und TIGIT direkte Transkriptionsziele von FoxP3 dar und werden daher konstitutiv von thymischen Tregs exprimiert. PD-1 und TIGIT tragen weiterhin über ihre unterdrückende Wirkung auf den PI3K-AKT-mTOR-Signalweg zur Aufrechterhaltung der Identität und Stabilität von Tregs bei und Tim-3, LAG-3 sowie TIGIT werden bei der TCR-vermittelten Aktivierung von Tregs hochreguliert (beschrieben in Lucca und Dominguez-Villar, 2020).

Vergleicht man die IFN- α /IL-6/IL-21/DLL4-vermittelten Effekte auf die Expression coinhibitorischer Rezeptoren in konventionellen T-Zellen mit denen auf regulatorische T-Zellen, fanden sich überwiegend dieselben Effekte. So zeigte sich in *memory* und naiven Tregs eine DLL4 vermittelte Tim-3-Induktion, welche in naiven Tregs durch Zytokine noch weiter gesteigert werden konnte. In Tregs geht eine hohe Tim-3-Expression dabei mit starken suppressiven Fähigkeiten *in vitro* (Gautron et al., 2014) und *in vivo* (Sakuishi et al., 2013) einher und ist mit einer erhöhten IL-10-Produktion assoziiert (Anderson et al., 2016; Li et al., 2016). Die erhöhte Tim-3-Expression könnte somit auf eine DLL4 vermittelte Erhöhung der suppressiven Fähigkeiten von regulatorischen T-Zellen hinweisen. Wie bereits im Zusammenhang mit der Tim-3-Expression durch Tcons erörtert, könnte in diesem Zusammenhang auch eine „Konkurrenz“ der Substrate Notch und Tim-3 um eine proteolytische Prozessieren durch ADAMs eine Rolle spielen.

DLL4 zeigte in naiven Tregs weiterhin einen positiven Effekt auf die in Tregs generell bereits sehr hohe CTLA-4-Expression. CTLA-4 hemmt wie auch LAG-3 konventionelle T-Zellen, während es gleichzeitig die suppressive Funktion von Tregs verstärkt (Chen und Flies, 2013). DLL4 scheint somit auch über CTLA-4 auf die suppressiven Fähigkeiten von Tregs Einfluss nehmen zu können.

Die LAG-3-Expression wurde in den Versuchen wiederum sowohl in *memory* Tregs als auch in stärkerem Ausmaß in naiven Tregs durch die Zytokine IFN- α , IL-6 und IL-21 erhöht. LAG-3 markiert dabei IL-10 positive Tregs, welche zusätzlich über eine Zell-Zell-Kontakt vermittelte starke Suppressionsaktivität verfügen (Camisaschi et al., 2010).

Die Zytokine zeigten weiterhin einen positiven Effekt auf die PD-1-Expression in naiven Tregs, während sie die PD-1-Expression durch *memory* Tregs nicht beeinflussten. In letzteren konnte jedoch

eine DLL4 vermittelte Reduktion der PD-1-Expression nachgewiesen werden. PD-1 wirkt wie auch LAG-3 und CTLA-4 hemmend auf konventionelle T-Zellen, nimmt wie diese allerdings auch negativen Einfluss auf die Proliferation von Tregs. So zeigen stark PD-1 positive Zellen *in vitro* ein gestörtes Proliferationspotenzial und sind mit einer IFN- γ -Produktion assoziiert (Lowther et al., 2016).

Memory Tregs zeigten im Vergleich zu naiven Tregs in der Kontroll-Kondition bereits einen deutlich höheren Anteil PD-1 positiver Zellen. Durch eine reduzierte PD-1-Expression könnte sich ein positiver Effekt auf die Proliferationsfähigkeit der *memory* Tregs ergeben.

Während die Kulturbedingungen keinen Effekt auf die CD49b-Expression zeigten, kam es insbesondere in den *memory* Tregs Zytokin-vermittelt zu einer Abnahme der TIGIT-Expression. Eine TIGIT-Expression geht in regulatorischen T-Zellen mit einer höheren Expression von Treg spezifischen Genen, wie FoxP3 und CD25 und auch CTLA-4 einher, zusätzlich korreliert die TIGIT-Expression mit der IL-10-Expression (beschrieben in Joller und Kuchroo, 2017). Eine Zytokin-vermittelte Reduktion der TIGIT-Expression spricht also im Gegensatz zu den zuvor beobachteten Ergebnissen für eine reduzierte Suppressionsfähigkeit der Tregs. Dieser Widerspruch verdeutlicht die Wichtigkeit von funktionellen Untersuchungen der Suppressionsfähigkeit von Tregs. Den tatsächlichen Effekt einer veränderten Expression der verschiedenen coinhibitorischen Rezeptoren könnte dabei zum Beispiel in Kokulturen mit konventionellen T-Zellen untersucht werden.

Insgesamt zeigt sich für Tregs, wie auch schon in den konventionellen T-Zellen beobachtet, dass die Expression der untersuchten coinhibitorischen Rezeptoren durch eine Kultivierung mit den STAT3 aktivierenden Zytokinen IFN- α , IL-6 und IL-21 und dem Notch-Liganden DLL4 beeinflusst werden kann. Überwiegend scheinen die Kulturbedingungen dabei zu einer höheren Expression der Rezeptoren beizutragen, während es insbesondere in *memory* Tregs auch zum Teil zu einer Abnahme der Expression kam (TIGIT und PD-1). Inwieweit sich die suppressive Aktivität der Tregs durch die veränderte Oberflächenexpression der coinhibitorischen Rezeptoren verändert, bleibt jedoch unklar.

Auch bleibt zu klären auf welchen molekularen Mechanismen die Induktion der verschiedenen coinhibitorischen Rezeptoren beruht. Insbesondere wäre dabei von Interesse, ob die für die Induktion von IL-10 in konventionellen T-Zellen identifizierten Transkriptionsfaktoren c-Maf und Blimp-1, ggf. auch einen Effekt auf die coinhibitorischen Rezeptoren in Tregs haben. Beide Transkriptionsfaktoren konnten dabei in der Vergangenheit bereits mit der Expression von coinhibitorischen Rezeptoren in murinen T-Zellen in Verbindung gebracht werden (Chihara et al., 2018). Weiterhin wäre auch von Interesse, inwiefern die Notch vermittelten Effekte durch Inhibition der ADAM-Proteasen 10 und 17 beeinflusst werden können.

Insgesamt zeigte die Kultivierung von regulatorischen T-Zellen mit den STAT3 aktivierenden Zytokinen IFN- α , IL-6 und IL-21 sowie dem Notch-Liganden DLL4 ähnliche Effekte wie in konventionellen T-Zellen. So konnte auch in Tregs eine erhöhte IL-10-Produktion induziert werden. Die relative Zunahme der IL-10-Produktion ist dabei in naiven regulatorischen T-Zellen höher als in naiven konventionellen T-Zellen und auch die IL-10-Produktion bezogen auf die Zellzahl ist in naiven Tregs höher. In *memory* Tregs ist die relative Zunahme sowie die auf die Zellzahl bezogene IL-10-Produktion hingegen geringer als in *memory* Tcons. Mit jeweils einer in etwa 7-fachen Zunahme der IL-10-Expression ist der Effekt der Kultur mit IFN- α /IL-6/IL-21/DLL4 in *memory* Tcons vergleichbar mit dem in naiven Tregs. Die höchste absolute IL-10-Produktion bezogen auf die Zellzahl zeigte sich in *memory* Tcons.

Während in konventionellen Tcons c-Maf als einer der für die Effekte verantwortlichen Transkriptionsfaktoren identifiziert werden und eine Korrelation zwischen der c-Maf-Expression und der IL-10-Produktion durch Tcons festgestellt werden konnte, fand sich eine solche Korrelation in Tregs nicht. Tregs zeigten dabei insgesamt eine deutlich höhere c-Maf-Expression als Tcons, welche sich jedoch nicht durch Kultivierung mit IFN- α /IL-6/IL-21/DLL4 weiter steigern ließ. Neben c-Maf scheinen in Tregs somit weitere Transkriptionsfaktoren für die IFN- α /IL-6/IL-21/DLL4-vermittelte IL-10-Induktion notwendig zu sein.

Weiterhin kam es Zytokin- bzw. Notch-vermittelt, wie auch in konventionellen T-Zellen zu einer Veränderung der Expression coinhibitorischer Rezeptoren. Bei deutlich höherem Anteil positiver Zellen in der Kontroll-Kondition als in den Tcons zeigten sich überwiegend ähnliche Effekte der verschiedenen Konditionen.

Mit der Erhöhung der IL-10-Produktion sowie der Expression der coinhibitorischen Rezeptoren konnten dabei Zytokin- und Notch-vermittelt wichtige Suppressionsmechanismen regulatorischer T-Zellen verstärkt werden und Tregs mit potenziell hohem suppressivem Potenzial induziert werden.

4.8 Inhibition des Notch-Signalweges durch ADAM-Inhibitoren

Im Rahmen dieser Arbeit konnten verschiedene Notch vermittelte Effekte auf T-Zellen beobachtet werden. Der Notch-Ligand DLL4 führte in CD4⁺ T-Zellen zu einer erhöhten Expression des direkten Notch-Zielgens *HES-1* (Bray, 2006; Steinbuck und Winandy, 2018) und zeigte, wie auch in Ahlers et al. beschrieben, einen synergistischen Effekt auf die durch IFN- α , IL-6 und IL-21 induzierte IL-10-Expression. Weiterhin zeigte DLL4 in totalen CD4⁺ Zellen eine induzierende Wirkung auf den mit einer IL-10-Produktion in T-Zellen in Verbindung gebrachten Transkriptionsfaktor c-Maf (Übersicht in Imbratta et al., 2020). Sowohl in konventionellen als auch in regulatorischen T-Zellen kam es zudem zu einer Abnahme der Oberflächen-Expression des Notch-1 Rezeptors in Anwesenheit von DLL4.

Inwiefern diese Notch vermittelten Effekte durch eine Inhibition der an der S2-Spaltung beteiligten ADAM-Proteasen 10 und 17 beeinflusst werden, wurde durch Einsatz der Hydroxamat-basierten Inhibitoren GI254023X (GI, hemmt ADAM10)) und GW280264X (GW, hemmt ADAM10 und 17) analysiert. Der Einsatz der Inhibitoren sollte weiterhin auch Hinweise darauf geben, welche der beiden ADAM-Proteasen für die beobachteten Effekte verantwortlich ist, denn grundsätzlich sind beide ADAMs in der Lage Notch zu spalten (Bozkulak und Weinmaster, 2009; Bray, 2006) und beide Proteasen werden durch die in dieser Arbeit untersuchten Zellen exprimiert.

Die Notch-1 Oberflächenexpression, welche sowohl in Tregs als auch in totalen CD4⁺ Zellen durch Hinzugabe von DLL4 signifikant reduziert wurde, konnte durch Einsatz der ADAM-Inhibitoren in keiner der Zelltypen signifikant erhöht werden. Dies ließ zunächst vermuten, dass keine Inhibition der S2-Spaltung und damit des Notch-Signalweges erfolgt war. In totalen CD4⁺ Zellen zeigte sich allerdings, dass die zuvor durch Notch induzierte Expressionssteigerung von c-Maf sowie die auf RNA-Ebene beobachtete Induktion von *HES-1* und IL-10 durch Zugabe der Inhibitoren vermindert wurde. Die Werte für *HES-1* waren weiterhin im Vergleich zur Kontroll-Kondition leicht erhöht, während sich für die IL-10 und c-Maf-Expression eine nahezu hundertprozentige Inhibition der DLL4-vermittelten Effekte zeigte.

Durch die ADAM-Inhibitoren konnten somit die Notch-vermittelten Effekte deutlich reduziert werden. Zwischen dem selektiv ADAM10 inhibierenden GI und dem sowohl ADAM10 als auch 17 hemmenden GW zeigten sich dabei in keinem der Versuche signifikante Unterschiede. ADAM17 scheint bei Inhibition von ADAM10 (GI) nicht in der Lage zu sein dessen Ausfall zu kompensieren und eine zusätzliche Inhibition von ADAM17 hatte im Vergleich zu einer reinen ADAM10 Inhibition bezogen auf die Messungen keine effektverstärkende Wirkung. Dies kann darauf hinweisen, dass insbesondere ADAM10 für die beobachteten Effekte von Bedeutung ist.

Lediglich in regulatorischen T-Zellen zeigte sich bei Betrachtung der c-Maf-Expression ein stärkerer Effekt des ADAM17 und ADAM10 hemmenden GW als des GI. Dieser Effekt war allerdings nicht signifikant. Unterteilte man die Messungen allerdings ohne Betrachtung der jeweiligen Zytokin- und DLL4- Exposition, lediglich nach Vorhandensein der Inhibitoren GI, GW oder keines Inhibitors in drei neue Konditionen (Kontrolle, GI, GW), zeigte sich eine signifikante Abnahme der c-Maf-Expression in der GW enthaltenen Kondition (s. Anhang 2). Diese stark vereinfachte Darstellung könnte einen Hinweis darauf geben, dass in Tregs die c-Maf-Expression tatsächlich auch durch ADAM17 beeinflusst wird. Zusammen mit dem Ergebnis, dass die c-Maf-Expression in regulatorischen T-Zellen nicht durch die Kultivierung mit Zytokinen und DLL4 beeinflusst wurde, spricht dies für eine sich von der Regulation in konventionellen T-Zellen unterscheidenden Regulation der c-Maf-Expression in regulatorischen T-Zellen, an der auch ADAM17-vermittelte Prozesse beteiligt sind.

Zur weiteren Klärung der Rolle von ADAM17 in der c-Maf-Expression durch Tregs sollte zunächst überprüft werden, ob sich der scheinbar stärkere inhibitorische Effekt von GW auch in den ursprünglichen Konditionen bestätigt. Weiterhin wäre insbesondere auch in Tregs von Interesse, welche Effekte eine alleinige Hemmung von ADAM17 zeigt. Hierfür wäre der Einsatz eines selektiven ADAM17 Inhibitors, wie der von Hirata et al. eingesetzte *reverse-hydroxamate* basierte KP-457 oder eines von Knapinska et al. beschriebenen *exosite-targeting* Inhibitors notwendig. Bolik et al. setzten neben dem ADAM17 Inhibitor TAPI-1 weiterhin die hochspezifische ADAM17 Prodomäne (ADAM17 PD) zur Inhibition ein, auch dies wäre denkbar (Bolik et al., 2022). Weiterhin könnte auch via CRISPR/Cas9 ein gezielter ADAM17 Knockout erfolgen und so die über diese Protease vermittelten Effekte beobachtet werden.

Insgesamt bestätigen die durchgeführten Versuche, die von Bozkulak und Weinmaster in embryonalen Maus Fibroblasten (MEF) beschriebene Rolle von ADAM10 für den Notch-Signalweg. In diesen konnten sie zeigen, dass die klassische ligandenabhängige Notch-Aktivierung von ADAM10 abhängig ist und die Aktivität von ADAM10 funktionell nicht durch ADAM17 kompensiert werden kann. Andererseits zeigten sie, dass bei einer ligandenunabhängigen Notch-Aktivierung, wie sie grundsätzlich auch in T-Zellen beobachtet wurde (Steinbuck und Winandy, 2018) nicht ADAM10, sondern ADAM17 erforderlich war. Mit ihren Ergebnissen unterstützen Bozkulak und Weinmaster somit die Hypothese, dass die ligandenabhängige und -unabhängige Aktivierung von Notch verschiedene ADAMs erfordert. Eine ligandenunabhängige Aktivierung von Notch könnte auch die durch Einsatz der Inhibitoren beobachtete nicht signifikante Abnahme der *HES-1* sowie c-Maf-Expression in den nicht DLL4 enthaltenen Konditionen erklären, welche bei Einsatz von GW stärker ausgeprägt war.

Auch ist zu beachten, dass auch ohne externe Zugabe von Notch-Liganden in Form der DLL4-*Beads* durch von den T-Zellen selbst auf ihrer Oberfläche exprimierte Notch-Liganden eine ligandenabhängige Aktivierung prinzipiell möglich ist.

Bozkulak und Weinmaster zeigten weiter, dass in Abwesenheit von ADAM10 ligandenabhängig eine alternative Metalloprotease Notch spaltet, welches wiederum zu einem Fragment ähnlicher Größe führt, welches die Signalübertragung allerdings nicht nachweisbar aktiviert (Bozkulak und Weinmaster, 2009). Eine solche von ADAM10 und ADAM17 unabhängige Spaltung des extrazellulären Notch-Anteils könnte eine Erklärung für die in dieser Arbeit gezeigte, trotz Einsatzes der ADAM-Inhibitoren beobachtete Abnahme der Notch-1-Expression auf der Zelloberfläche bei Zugabe von DLL4 sein. Diese Abnahme war dabei, passend zu der Beobachtung von Bozkulak und Weinmaster nicht mit einer Expressionszunahme des auf eine Notch-Aktivierung hinweisenden *HES-1* verbunden.

Weiterhin sollte, wie auch bereits in Bezug auf den Einfluss der Kulturbedingungen auf die Expression der Notch-Rezeptoren diskutiert, ein Problem der Antikörper-Notch-Rezeptor-Interaktion in Betracht gezogen werden.

Inwiefern die weiterhin verminderte Notch-1-Expression auf der Zelloberfläche der T-Zellen tatsächlich auf einer trotz ADAM-Inhibition stattgefundenen Spaltung durch eine ADAM-Protease oder aber eine andere Metalloprotease beruht oder ob es aufgrund einer anderen Ursache, denkbar wäre auch ein rein mechanischer Zug im Rahmen der Prozessierung der Zellen, zu einer Abnahme der Notch-Expression kommt, bleibt letztlich nicht ausreichend geklärt.

Zur weiteren Klärung der Funktion der einzelnen ADAM-Proteasen auf die T-Zellfunktion wäre der Einsatz anderer Inhibitoren und anderer Methoden, wie einer siRNA-vermittelten Inhibition oder eines CRISPR/Cas9 Knockouts in den Zellen anzustreben. Im weiteren Verlauf könnten dann auch die Effekte einer Inhibition der ADAM-Proteasen auf weitere Parameter, wie die IL-10-Konzentration in den Zellkulturüberständen oder die Expression der coinhibitorischen Rezeptoren untersucht werden.

4.9 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit gemachte Beobachtung, dass IFN- α /IL-6/IL-21/DLL4-vermittelt in regulatorischen T-Zellen eine vermehrte IL-10-Produktion induziert werden kann, könnte im Zusammenhang mit der Entwicklung neuer Therapien für chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) von Interesse sein. So konnte bereits in verschiedenen Studien eine besondere Rolle von Tregs und auch IL-10 in der Entstehung und Therapie von CED gezeigt werden. Weiterhin konnte in immundefizienten Mäusen mit Zeichen einer Kolitis der Transfer von CD4⁺CD25⁺ Tregs die Kolitis verbessern (Mottet et al., 2003). In einer ersten klinischen Studie wurden hierüber hinaus 2012 erstmalig Patienten mit aktivem Morbus Crohn aus PBMCs gewonnene, frisch isolierte Tregs infundiert, wobei dies gut toleriert wurde und mit einer Reduktion der Krankheitsaktivität einherging (Desreumaux, 2012). Weiterhin stehen CED im Zusammenhang mit dem anti-inflammatorischen Zytokin IL-10, so entwickeln IL-10 defiziente Mäuse eine Kolitis (Kühn et al., 1993) und es besteht eine genetische Assoziation von CED mit defizienten IL-10 Reaktionen (beschrieben in Saraiva et al., 2020). In CED-Patienten wurde bereits die systemische Gabe von rekombinanten IL-10 zur Therapie getestet, wobei sich vermutlich aufgrund einer zu niedrigen lokalen IL-10 Konzentration im Darm jedoch keine signifikanten Verbesserungen zeigten (Saraiva et al., 2020).

Ein Transfer von zuvor zur IL-10-Produktion stimulierten Tregs oder aber eine Modulation der Signalwege *in vivo* mit konstitutiv erhöhter IL-10-Produktion durch T-Zellen könnte somit, die beiden zuvor angesprochenen Therapieansätze verbinden. Unter GMP-Bedingungen könnten Tregs aus dem Blut von an CED erkrankten Patienten isoliert werden, in Kultur expandiert werden und durch Stimulation mit IFN- α /IL-6/IL-21/DLL4 zur IL-10-Produktion angeregt werden. Weiterhin könnte durch Induktion der Expression von bestimmten Chemokinrezeptoren ein vermehrtes Einwandern in den Darm erreicht werden. Diese IL-10 produzierenden Tregs könnten anschließend dem Patienten

mittels adoptiven Transfer wieder zugeführt werden und möglicherweise Einfluss auf die Krankheitsaktivität nehmen.

Voraussetzung für einen solchen Therapieansatz ist eine stabile IL-10-Produktion durch die Tregs, welche auch nach dem Transfer anhält. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Stabilität der induzierten IL-10-Produktion bisher nicht untersucht. Im Verlauf wären hierzu Kinetiken der IL-10-Produktion unter den Kulturbedingungen sowie nach Umsetzen der Zellen in ein Kontrollmedium ohne weitere Stimulation durch Zytokine oder DLL4 anzustreben.

Um hierüber hinaus ein Einwandern der induzierten Tregs in die Darmmukosa zu ermöglichen, ist die Expression von Chemokinrezeptoren, wie dem Integrin $\alpha 4\beta 7$ oder CCR9 von Bedeutung. Die Expression dieser kann in T-Zellen durch Kultivierung mit all-trans-Retinsäure erreicht werden (De Calisto et al., 2011), weshalb geprüft werden sollte, ob eine Kultivierung mit dieser zusätzlich zu IFN- α /IL-6/IL-21/DLL4 möglich ist und ob diese unter gleichbleibender IL-10-Induktion die Expression von $\alpha 4\beta 7$ und CCR9 auch in Tregs induzieren kann. Vor dem Hintergrund einer Erweiterung der Kulturbedingungen um all-trans-Retinsäure und auch zum weiteren Verständnis der genauen Mechanismen der Induktion wäre es interessant, inwiefern auch bereits die einzelnen Zytokine eine IL-10-Produktion durch Tregs bewirken können. Hierzu sollten die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Konditionen um die einzelnen Zytokine sowie Kombinationen dieser ergänzt werden.

Weiterhin bleibt zu klären, welche Effekte die erhöhte Expression der coinhibitorischen Rezeptoren durch die Tregs und die konventionellen T-Zellen hat. Hierbei ist insbesondere von Interesse, inwiefern sich die suppressive Kapazität regulatorischer T-Zellen durch die erhöhte Expression der coinhibitorischen Rezeptoren auch in Kombination mit der erhöhten IL-10-Produktion verändert. Hierfür wären *in vitro* Suppressions-Assays, wie beispielsweise von Collison und Vignali beschrieben denkbar (Collison und Vignali, 2011).

Aufbauend auf den beobachteten Unterschieden in der Regulation der IL-10-Produktion in konventionellen und regulatorischen T-Zellen könnten weiterhin Versuche bezüglich einer spezifischen Induktion in Tregs angestrebt werden.

Die Möglichkeit der Expression der beschriebenen Chemokinrezeptoren, die Stärke der suppressiven Kapazität sowie die Stabilität, der in Tregs induzierten IL-10-Produktion sollten in weiteren Versuchen untersucht werden, um die Grundlage für eine auf dem Transfer von IL-10 produzierenden Tregs beruhenden Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen zu schaffen.

5 Zusammenfassung

In der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz sowie in der Begrenzung von Immunantworten kommt regulatorischen T-Zellen eine unverzichtbare Rolle zu. Die Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 ist dabei essenziell für die suppressive Funktion der Tregs. Neben Tregs können auch andere T_H-Zellen zur IL-10-Produktion angeregt werden, wodurch diese suppressive Fähigkeiten erlangen und ihre eigene Aktivität regulieren können. Ahlers et al. konnten zeigen, dass verschiedene T-Effektorzelltypen durch Kultivierung mit dem Notch-Signalweg aktivierenden DLL4 in Kombination mit den über STAT3 wirkenden Zytokinen IFN- α , IL-6 und IL-21 zu einer erhöhten IL-10-Expression angeregt werden können. Weiterhin konnte eine Steigerung der Expression verschiedener coinhibitorischer Rezeptoren beobachtet werden (Ahlers et al., 2022). Für professionelle regulatorische T-Zellen, deren suppressive Kapazität neben IL-10 insbesondere auch auf diesen coinhibitorischen Rezeptoren beruht, war der Effekt einer IFN- α /IL-6/IL-21/DLL4-Stimulation bisher noch unklar und wurde in dieser Arbeit genauer untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte anhand von RNA-Sequenzierungen sowie FACS-Färbungen gezeigt werden, dass sowohl konventionelle als auch regulatorische T-Zellen die Notch-Rezeptoren 1 und 2 sowie die für die S2-Spaltung verantwortlichen Proteasen ADAM10 und 17 exprimieren. Weiterhin wurde durch den eingesetzten Notch-Liganden DLL4 in allen Zelltypen eine Aktivierung des Notch-Signalweges, verdeutlicht durch eine Expressionssteigerung des direkten Notch-Zielgens *HES-1*, erreicht.

IFN- α /IL-6/IL-21/DLL4-vermittelt konnte in konventionellen und regulatorischen T-Zellen eine IL-10-Expression induziert werden. Die IL-10-Produktion zeigte sich in konventionellen sowie regulatorischen T-Zellen in den *memory* T-Zellen stärker ausgeprägt als in den naiven T-Zellen. Die höchste IL-10-Produktion fand sich in konventionellen *memory* T-Zellen.

Während in konventionellen T-Zellen eine Korrelation zwischen der IL-10-Produktion und dem Transkriptionsfaktor c-Maf gezeigt werden konnte, bestand diese in Tregs nicht. In Tregs scheinen daher neben c-Maf auch noch weitere Transkriptionsfaktoren für die IFN- α /IL-6/IL-21/DLL4 vermittelte IL-10-Induktion von Bedeutung zu sein. Um welche Transkriptionsfaktoren es sich hierbei handelt bleibt vorerst ungeklärt, erste Hinweise könnten sich aus den Sequenzierungsdaten der in dieser Arbeit gewonnenen Tregs ergeben.

Durch Einsatz von ADAM10/17 Inhibitoren konnte der Notch-vermittelte Effekte auf die c-Maf- sowie IL-10-Expression in den T-Zellen reduziert werden. Der im Rahmen dieser Arbeit beobachteten DLL4 vermittelten Reduktion der Notch-Oberflächenexpression konnte durch die ADAM-Inhibitoren hingegen nicht entgegengewirkt werden. Inwiefern dies auf eine Spaltung durch eine alternative Metalloprotease hinweist oder ob es andere Ursachen hierfür gibt, bleibt zu klären.

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen insgesamt die besondere Rolle von ADAM10 für den Notch-Signalweg und der mit dieser verbundenen Funktion von T-Zellen. Weiterhin konnten erste Hinweise auf eine besondere Rolle von ADAM17 in Tregs gesammelt werden, welche es in Zukunft genauer zu analysieren gilt.

Sowohl in konventionellen als auch in regulatorischen T-Zellen konnte neben der erhöhten IL-10-Expression auch ein Einfluss auf die Expression verschiedener coinhibitorischer Rezeptoren beobachtet werden. Die Veränderungen waren dabei nicht einheitlich zwischen den verschiedenen Zelltypen und insbesondere *memory* und naive Tregs zeigten zum Teil große Unterschiede. Tim-3 zeigte in allen untersuchten Zellen eine DLL4 vermittelte Induktion während LAG-3 und CTLA-4 insbesondere Zytokin-vermittelt vermehrt exprimiert wurden. In *memory* Tregs zeigte sich hierüber hinaus eine DLL4 und Zytokin vermittelte Abnahme der Expression von PD-1 und TIGIT. Die molekularen Mechanismen hinter diesen Expressionsveränderungen sowie die Konsequenz für die suppressiven Fähigkeiten der jeweiligen T-Zelle bleiben ungeklärt.

Auf Basis dieser ersten Erkenntnisse bezüglich der IFN- α /IL-6/IL-21/DLL4-vermittelten Effekte in regulatorischen T-Zellen sollte in zukünftigen Experimenten weitergehend die molekularen Mechanismen der induzierten Effekte untersucht werden. Hierbei sollte ein Augenmerk insbesondere auf den Unterschieden zwischen konventionellen und regulatorischen T-Zellen liegen. Unter Berücksichtigung dieser Unterschiede könnten die Grundlagen für neue Therapieansätze für Krankheiten geschaffen werden, welche auf einer beeinträchtigten IL-10-Produktion durch regulatorische und auch T_H-Zellen beruhen.

6 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ADAM	<i>A disintegrin and metalloproteinase</i>
ADAM17 PD	ADAM17 Prodomäne
AIRE	Autoimmun-Regulator
<i>AKTIN b</i>	<i>AKTIN beta</i>
ANOVA	<i>one-way analysis of variance</i>
AP-1	Aktivator-Protein-1
APC	Allophycocyanin
APC	Antigenpräsentierende Zellen
Bat3	<i>HLA-B associated transcript 3</i>
BATF	<i>basic leucine zipper transcription factor</i>
BCR	B-Zell-Rezeptor
Blimp-1	<i>B-Lymphocyte-Induced Maturation Protein 1</i>
BSA	bovines Serumalbumin
c-Maf	<i>c-musculoaponeurotic fibrosarcoma factor</i>
Ca ²⁺	Calcium Ionen
CCR	CC-Chemokinrezeptor
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CNS2	konservative nichtkodierende Sequenz 2
Co-A	Ko-Aktivator
Co-R	Ko-Repressor
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CSIF	<i>Cytokine Synthesis Inhibitory Factor</i>
CSL	CBF1/RBPjκ/Su(H)/Lag-1
CTLA-4	<i>Cytotoxic T Lymphocyte Associated Protein 4</i>
DC	Dendritische Zellen
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DLL	Delta Liganden ähnelnder Ligand
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure

Abkürzungsverzeichnis

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
E4BP4	Alias NFIL3 (<i>Nuclear factor, interleukin 3 regulated</i>)
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FoxP3	<i>Forkhead-Box-Protein P3</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
g	Erdbeschleunigung 9,81m/s ²
g	Gramm
GI	GI254023X
GMP	Gute Herstellungspraxis (<i>Good Manufacturing Practice</i>)
GW	GW280264X
h	Stunde(n)
HDAC	Histon-Deacetylase
<i>HES-1</i>	<i>hairy and enhancer of split-1</i>
HLA-DR	Humanes Leukozyten Antigen – DR Isotyp
HVR	Hypervariable Region
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iRhom	katalytisch-inaktiven Rhomboid Pseudoproteasen
IRF4	Interferon-Regulations-Faktor 4
ITAM	Immunrezeptor-Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv
ITIM	Immunrezeptor-Tyrosin-basiertes Inhibitionsmotiv
iTregs	induzierte regulatorische T-Zellen
ITSM	<i>immunoreceptor tyrosine-based switch motifs</i>
Jag	Jagged
JAK	Januskinase
LAG-3	Lymphozyten aktivierendes Gen 3
Lck	Lymphozyten-spezifische Protein-Tyrosinkinase
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molar

Abkürzungsverzeichnis

MACS	Magnetische Zellsortierung
MAM	<i>Mastermind</i> Transkriptionsfaktor
MARE	Maf-Erkennungselement
MEF	Embryonale Maus Fibroblasten
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
NECD	extrazelluläre Notch-Domäne
NEXT	<i>Notch extracellular truncation</i>
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NFκB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NICD	Intrazelluläre Notch Domäne
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
NRR	negative regulatorische Region
nTregs	Natürliche regulatorische T-Zellen
PBMCs	mononukleären Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PD-1	<i>Programmed Cell Death Protein 1</i>
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
pTregs	Periphere regulatorische T-Zellen
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RBPjκ	<i>Recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region</i>
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RIP	regulierte intramembranäre Proteolyse
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SH3	<i>Src-homology 3</i>
SLO	sekundäre lymphatische Organe
SSC	<i>Side Scatter</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>

Abkürzungsverzeichnis

T-Bet	<i>T-box expressed in T cells</i>
TACE	<i>TNF-α-converting enzyme</i>
Tcon	konventionelle T-Zelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
T _H -Zellen	T-Helferzellen
TIGIT	<i>T Cell Immunoreceptor With Ig And ITIM Domains</i>
Tim-3	<i>T Cell Immunoglobulin And Mucin Domain-Containing Protein 3</i>
TMD	Transmembrandomäne
TNF	Tumornekrosefaktor
T _R 1-Zellen	Typ-I-regulatorische Zellen
TRAIL-DR5	<i>tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-death receptor 5</i>
Tregs	Regulatorische T-Zellen
TSDR	Treg-spezifische demethylierte Region
TSE	<i>Tandem Signal Enhancer</i>
Tspan	Tetraspanin
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol

7 Literaturverzeichnis

- Agarwal, S., Rao, A., 1998. Modulation of Chromatin Structure Regulates Cytokine Gene Expression during T Cell Differentiation. *Immunity* 9, 765–775. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80642-1](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80642-1)
- Ahlers, J., 2017. Die Induktion von Interleukin-10 in humanen T-Helfer-Zellen und seine transkriptionelle Regulation. Dissertation, zur Erlangung des akademischen Grades Doctor Rerum Naturalium, Fakultät III – Prozesswissenschaften der technischen Universität Berlin, Berlin.
- Ahlers, J., Mantei, A., Lozza, L., Stäber, M., Heinrich, F., Bacher, P., Hohnstein, T., Menzel, L., Yüz, S.G., Alvarez-Simon, D., Bickenbach, A.R., Weidinger, C., Mockel-Tenbrinck, N., Köhl, A.A., Siegmund, B., Maul, J., Neumann, C., Scheffold, A., 2022. A Notch/STAT3-driven Blimp-1/c-Maf-dependent molecular switch induces IL-10 expression in human CD4⁺ T cells and is defective in Crohn's disease patients. *Mucosal Immunol.* <https://doi.org/10.1038/s41385-022-00487-x>
- Aman, M.J., Tretter, T., Eisenbeis, I., Bug, G., Decker, T., Aulitzky, W.E., Tilg, H., Huber, C., Peschel, C., 1996. Interferon- α Stimulates Production of Interleukin-10 in Activated CD4⁺ T Cells and Monocytes. *Blood*;87(11):4731-4736.
- Amsen, D., Helbig, C., Backer, R.A., 2015. Notch in T Cell Differentiation: All Things Considered. *Trends in Immunology* 36, 802–814. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.10.007>
- Anderson, A.C., Joller, N., Kuchroo, V.K., 2016. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. *Immunity* 44, 989–1004. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.05.001>
- Appleman, L.J., Boussiotis, V.A., 2003. T cell anergy and costimulation: Appleman & Boussiotis · T cell anergy and costimulation. *Immunological Reviews* 192, 161–180. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065X.2003.00009.x>
- Asano, N., Watanabe, T., Kitani, A., Fuss, I.J., Strober, W., 2008. Notch1 Signaling and Regulatory T Cell Function. *J Immunol* 180, 2796–2804. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.5.2796>
- Auderset, F., Schuster, S., Coutaz, M., Koch, U., Desgranges, F., Merck, E., MacDonald, H.R., Radtke, F., Tacchini-Cottier, F., 2012. Redundant Notch1 and Notch2 Signaling Is Necessary for IFN γ Secretion by T Helper 1 Cells During Infection with *Leishmania major*. *PLoS Pathog* 8, e1002560. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002560>
- Azuma, M., Yagita, H. (Eds.), 2019. Co-signal Molecules in T Cell Activation: Immune Regulation in Health and Disease, *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer Singapore, Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-32-9717-3>
- Berard, M., Tough, D.F., Rg, B., 2002. Qualitative differences between naïve and memory T cells. *Immunology*. 2002 Jun;106(2):127-38. doi: 10.1046/j.1365-2567.2002.01447.x. PMID: 12047742; PMCID: PMC1782715.

- Black, R., Rauch, C., Kozlosky, C., Pschon, J., Slack, J., Wolfson, M., Castner, B., Stocking, K., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J., Johnson, R., Paxton, R., March, C., Cerretti, D., 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/385729a0>
- Bolik, J., Krause, F., Stevanovic, M., Gandraß, M., Thomsen, I., Schacht, S.-S., Rieser, E., Müller, M., Schumacher, N., Fritsch, J., Wichert, R., Galun, E., Bergmann, J., Roder, C., Schafmayer, C., Egberts, J.-H., Becker-Pauly, C., Saftig, P., Lucius, R., Schneider-Brachert, W., Barikbin, R., Adam, D., Voss, M., Hitzl, W., Krüger, A., Strilic, B., Sagi, I., Walczak, H., Rose-John, S., Schmidt-Arras, D., 2022. Inhibition of ADAM17 impairs endothelial cell necroptosis and blocks metastasis. *J Exp Med*. 2022;219(1):e20201039. doi:10.1084/jem.20201039
- Bozkulak, E.C., Weinmaster, G., 2009. Selective Use of ADAM10 and ADAM17 in Activation of Notch1 Signaling. *MCB* 29, 5679–5695. <https://doi.org/10.1128/MCB.00406-09>
- Bray, S.J., 2006. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 678–689. <https://doi.org/10.1038/nrm2009>
- Camisaschi, C., Casati, C., Rini, F., Perego, M., De Filippo, A., Triebel, F., Parmiani, G., Belli, F., Rivoltini, L., Castelli, C., 2010. LAG-3 Expression Defines a Subset of CD4+CD25highFoxp3+ Regulatory T Cells That Are Expanded at Tumor Sites. *The Journal of Immunology* 184, 6545–6551. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903879>
- Caramalho, Í., Nunes-Cabaço, H., Foxall, R.B., Sousa, A.E., 2015. Regulatory T-Cell Development in the Human Thymus. *Front. Immunol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00395>
- Chaplin, D.D., 2010. Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125, S3–S23. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980>
- Charbonnier, L.-M., Wang, S., Georgiev, P., Sefik, E., Chatila, T.A., 2015. Control of peripheral tolerance by regulatory T cell–intrinsic Notch signaling. *Nat Immunol* 16, 1162–1173. <https://doi.org/10.1038/ni.3288>
- Chen, L., Flies, D.B., 2013. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* 13, 227–242. <https://doi.org/10.1038/nri3405>
- Chihara, N., Madi, A., Kondo, T., Zhang, H., Acharya, N., Singer, M., Nyman, J., Marjanovic, N.D., Kowalczyk, M.S., Wang, C., Kurtulus, S., Law, T., Etminan, Y., Nevin, J., Buckley, C.D., Burkett, P.R., Buenrostro, J.D., Rozenblatt-Rosen, O., Anderson, A.C., Regev, A., Kuchroo, V.K., 2018. Induction and transcriptional regulation of the co-inhibitory gene module in T cells. *Nature* 558, 454–459. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0206-z>
- Collison, L.W., Vignali, D.A.A., 2011. In Vitro Treg Suppression Assays, in: Kassiotis, G., Liston, A. (Eds.), *Regulatory T Cells, Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 21–37. https://doi.org/10.1007/978-1-61737-979-6_2

- Collison, L.W., Workman, C.J., Kuo, T.T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K.M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R.S., Vignali, D.A.A., 2007. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450, 566–569. <https://doi.org/10.1038/nature06306>
- Conley, J.M., Gallagher, M.P., Berg, L.J., 2016. T Cells and Gene Regulation: The Switching On and Turning Up of Genes after T Cell Receptor Stimulation in CD8 T Cells. *Front. Immunol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00076>
- Corre, B., Perrier, J., El Khouri, M., Cerboni, S., Pellegrini, S., Michel, F., 2013. Type I interferon potentiates T-cell receptor mediated induction of IL-10-producing CD4⁺ T cells: Immunomodulation. *Eur. J. Immunol.* 43, 2730–2740. <https://doi.org/10.1002/eji.201242977>
- Cossarizza, A., Chang, H., Radbruch, A., Acs, A., Adam, D., Adam-Klages, S., Agace, W.W., Aghaeepour, N., Akdis, M., Allez, M., Almeida, L.N., Alvisi, G., Anderson, G., Andrä, I., Annunziato, F., Anselmo, A., Bacher, P., Baldari, C.T., Bari, S., Barnaba, V., Barros-Martins, J., Battistini, L., Bauer, W., Baumgart, S., Baumgarth, N., Baumjohann, D., Baying, B., Bebawy, M., Becher, B., Beisker, W., Benes, V., Beyaert, R., Blanco, A., Boardman, D.A., Bogdan, C., Borger, J.G., Borsellino, G., Boulais, P.E., Bradford, J.A., Brenner, D., Brinkman, R.R., Brooks, A.E.S., Busch, D.H., Büscher, M., Bushnell, T.P., Calzetti, F., Cameron, G., Cammarata, I., Cao, X., Cardell, S.L., Casola, S., Cassatella, M.A., Cavani, A., Celada, A., Chatenoud, L., Chattopadhyay, P.K., Chow, S., Christakou, E., Čičin-Šain, L., Clerici, M., Colombo, F.S., Cook, L., Cooke, A., Cooper, A.M., Corbett, A.J., Cosma, A., Cosmi, L., Coulie, P.G., Cumano, A., Cvetkovic, L., Dang, V.D., Dang-Heine, C., Davey, M.S., Davies, D., De Biasi, S., Del Zotto, G., Dela Cruz, G.V., Delacher, M., Della Bella, S., Dellabona, P., Deniz, G., Dessing, M., Di Santo, J.P., Diefenbach, A., Dieli, F., Dolf, A., Dörner, T., Dress, R.J., Dudziak, D., Dustin, M., Dutertre, C., Ebner, F., Eckle, S.B.G., Edinger, M., Eede, P., Ehrhardt, G.R.A., Eich, M., Engel, P., Engelhardt, B., Erdei, A., Esser, C., Everts, B., Evrard, M., Falk, C.S., Fehniger, T.A., Felipe-Benavent, M., Ferry, H., Feuerer, M., Filby, A., Filkor, K., Fillatreau, S., Follo, M., Förster, I., Foster, J., Foulds, G.A., Frehse, B., Frenette, P.S., Frischbutter, S., Fritzsche, W., Galbraith, D.W., Gangaev, A., Garbi, N., Gaudilliere, B., Gazzinelli, R.T., Geginat, J., Gerner, W., Gherardin, N.A., Ghoreschi, K., Gibellini, L., Ginhoux, F., Goda, K., Godfrey, D.I., Goettlinger, C., González-Navajas, J.M., Goodyear, C.S., Gori, A., Grogan, J.L., Grummitt, D., Grützkau, A., Haftmann, C., Hahn, J., Hammad, H., Hämmerling, G., Hansmann, L., Hansson, G., Harpur, C.M., Hartmann, S., Hauser, A., Hauser, A.E., Haviland, D.L., Hedley, D., Hernández, D.C., Herrera, G., Herrmann, M., Hess, C., Höfer, T., Hoffmann, P., Hogquist, K., Holland, T., Höllt, T., Holmdahl, R., Hombrink, P., Houston, J.P., Hoyer, B.F., Huang, B., Huang, F., Huber, J.E., Huehn, J., Hundemer, M., Hunter, C.A., Hwang, W.Y.K., Iannone, A., Ingelfinger, F., Ivison, S.M., Jäck, H., Jani, P.K., Jávega, B., Jonjic, S., Kaiser, T., Kalina, T., Kamradt, T., Kaufmann, S.H.E., Keller, B., Ketelaars, S.L.C., Khalilnezhad, A., Khan, S., Kisielow, J., Klennerman, P., Knopf, J., Koay, H.,

Kobow, K., Kolls, J.K., Kong, W.T., Kopf, M., Korn, T., Kriegsmann, K., Kristyanto, H., Kroneis, T., Krueger, A., Kühne, J., Kukat, C., Kunkel, D., Kunze-Schumacher, H., Kurosaki, T., Kurts, C., Kvistborg, P., Kwok, I., Landry, J., Lantz, O., Lanuti, P., LaRosa, F., Lehuen, A., LeibundGut-Landmann, S., Leipold, M.D., Leung, L.Y.T., Levings, M.K., Lino, A.C., Liotta, F., Litwin, V., Liu, Y., Ljunggren, H., Lohoff, M., Lombardi, G., Lopez, L., López-Botet, M., Lovett-Racke, A.E., Lubberts, E., Luche, H., Ludewig, B., Lugli, E., Lunemann, S., Maecker, H.T., Maggi, L., Maguire, O., Mair, F., Mair, K.H., Mantovani, A., Manz, R.A., Marshall, A.J., Martínez-Romero, A., Martrus, G., Marventano, I., Maslinski, W., Matarese, G., Mattioli, A.V., Maueröder, C., Mazzoni, A., McCluskey, J., McGrath, M., McGuire, H.M., McInnes, I.B., Mei, H.E., Melchers, F., Melzer, S., Mielenz, D., Miller, S.D., Mills, K.H.G., Minderman, H., Mjösberg, J., Moore, J., Moran, B., Moretta, L., Mosmann, T.R., Müller, S., Multhoff, G., Muñoz, L.E., Münz, C., Nakayama, T., Nasi, M., Neumann, K., Ng, L.G., Niedobitek, A., Nourshargh, S., Núñez, G., O'Connor, J., Ochel, A., Oja, A., Ordonez, D., Orfao, A., Orłowski-Oliver, E., Ouyang, W., Oxenius, A., Palankar, R., Panse, I., Pattanapanyasat, K., Paulsen, M., Pavlinic, D., Penter, L., Peterson, P., Peth, C., Petriz, J., Piancone, F., Pickl, W.F., Piconese, S., Pinti, M., Pockley, A.G., Podolska, M.J., Poon, Z., Pracht, K., Prinz, I., Pucillo, C.E.M., Quataert, S.A., Quatrini, L., Quinn, K.M., Radbruch, H., Radstake, T.R.D.J., Rahmigh, S., Rahn, H., Rajwa, B., Ravichandran, G., Raz, Y., Rebhahn, J.A., Recktenwald, D., Reimer, D., Reis e Sousa, C., Remmerswaal, E.B.M., Richter, L., Rico, L.G., Riddell, A., Rieger, A.M., Robinson, J.P., Romagnani, C., Rubartelli, A., Ruland, J., Saalmüller, A., Saeys, Y., Saito, T., Sakaguchi, S., Sala-de-Oyanguren, F., Samstag, Y., Sanderson, S., Sandroock, I., Santoni, A., Sanz, R.B., Saresella, M., Sautes-Fridman, C., Sawitzki, B., Schadt, L., Scheffold, A., Scherer, H.U., Schiemann, M., Schildberg, F.A., Schimisky, E., Schlitzer, A., Schlosser, J., Schmid, S., Schmitt, S., Schober, K., Schraivogel, D., Schuh, W., Schüler, T., Schulte, R., Schulz, A.R., Schulz, S.R., Scottá, C., Scott-Algara, D., Sester, D.P., Shankey, T.V., Silva-Santos, B., Simon, A.K., Sitnik, K.M., Sozzani, S., Speiser, D.E., Spidlen, J., Stahlberg, A., Stall, A.M., Stanley, N., Stark, R., Stehle, C., Steinmetz, T., Stockinger, H., Takahama, Y., Takeda, K., Tan, L., Tárnok, A., Tiegs, G., Toldi, G., Tornack, J., Traggiai, E., Trebak, M., Tree, T.I.M., Trotter, J., Trowsdale, J., Tsoumakidou, M., Ulrich, H., Urbanczyk, S., Veen, W., Broek, M., Pol, E., Van Gassen, S., Van Isterdael, G., Lier, R.A.W., Veldhoen, M., Vento-Asturias, S., Vieira, P., Voehringer, D., Volk, H., Borstel, A., Volkmann, K., Waisman, A., Walker, R.V., Wallace, P.K., Wang, S.A., Wang, X.M., Ward, M.D., Ward-Hartstonge, K.A., Warnatz, K., Warnes, G., Warth, S., Waskow, C., Watson, J.V., Watzl, C., Wegener, L., Weisenburger, T., Wiedemann, A., Wienands, J., Wilharm, A., Wilkinson, R.J., Willmsky, G., Wing, J.B., Winkelmann, R., Winkler, T.H., Wirz, O.F., Wong, A., Wurst, P., Yang, J.H.M., Yang, J., Yazdanbakhsh, M., Yu, L., Yue, A., Zhang, H., Zhao, Y., Ziegler, S.M., Zielinski, C., Zimmermann, J., Zychlinsky, A., 2019. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). Eur. J.

- Immunol. 49, 1457–1973. <https://doi.org/10.1002/eji.201970107>
- Couper, K.N., Blount, D.G., Riley, E.M., 2008. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *J Immunol* 180, 5771–5777. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.9.5771>
- De Calisto, J., Villablanca, E.J., Wang, S., Bono, M.R., Roseblatt, M., Mora, J.R., 2011. T-Cell Homing to the Gut Mucosa: General Concepts and Methodological Considerations, in: Shimaoka, M. (Ed.), *Integrin and Cell Adhesion Molecules, Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 411–434. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-166-6_24
- de la Rosa, M., Rutz, S., Dorninger, H., Scheffold, A., 2004. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur. J. Immunol.* 34, 2480–2488. <https://doi.org/10.1002/eji.200425274>
- de Waal Malefyt, Rene, John Abrams, Bruce Bennett, Carl G. Figdor and Jan E. de Vries, 1991. Interleukin 10 (IL-10) Inhibits Cytokine Synthesis by Human Monocytes: An Autoregulatory Role of IL-10 Produced by Monocytes. *J Exp Med.* 1991;174(5):1209-1220. doi:10.1084/jem.174.5.1209
- Defetos, M.L., Bevan, M.J., 2000. Notch signaling in T cell development. *Current Opinion in Immunology* 12, 166–172. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(99\)00067-9](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(99)00067-9)
- Desreumaux, P., 2012. Safety and Efficacy of Antigen-Specific Regulatory T-Cell Therapy for Patients With Refractory Crohn's Disease, *Gastroenterology*. 2012; 143(5):1207-1217.e2. doi:10.1053/j.gastro.2012.07.116.
- Eagar, T.N., Tang, Q., Wolfe, M., He, Y., Pear, W.S., Bluestone, J.A., 2004. Notch 1 Signaling Regulates Peripheral T Cell Activation. *Immunity* 20, 407–415. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(04\)00081-0](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(04)00081-0)
- Ebsen, H., Schröder, A., Kabelitz, D., Janssen, O., 2013. Differential Surface Expression of ADAM10 and ADAM17 on Human T Lymphocytes and Tumor Cells. *PLoS ONE* 8, e76853. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076853>
- Fang, T.C., Yashiro-Ohtani, Y., Del Bianco, C., Knoblock, D.M., Blacklow, S.C., Pear, W.S., 2007. Notch Directly Regulates Gata3 Expression during T Helper 2 Cell Differentiation. *Immunity* 27, 100–110. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.04.018>
- Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med.* 1989;170(6):2081-2095. doi:10.1084/jem.170.6.2081
- Gagliani, N., Magnani, C.F., Huber, S., Gianolini, M.E., Pala, M., Licona-Limon, P., Guo, B., Herbert, D.R., Bulfone, A., Trentini, F., Di Serio, C., Bacchetta, R., Andreani, M., Brockmann, L., Gregori, S., Flavell, R.A., Roncarolo, M.-G., 2013. Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nat Med* 19, 739–746. <https://doi.org/10.1038/nm.3179>
- Gautron, A.-S., Dominguez-Villar, M., de Marcken, M., Hafler, D.A., 2014. Enhanced suppressor function of TIM-3⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells: Immunomodulation. *Eur. J. Immunol.* 44, 2703–2711.

- <https://doi.org/10.1002/eji.201344392>
- Gibb, D.R., Saleem, S.J., Chaimowitz, N.S., Mathews, J., Conrad, D.H., 2011. The emergence of ADAM10 as a regulator of lymphocyte development and autoimmunity. *Molecular Immunology* 48, 1319–1327. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2010.12.005>
- Giebeler, N., Zigrino, P., 2016. A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM): Historical Overview of Their Functions. *Toxins (Basel)*. 2016;8(4):122. Published 2016 Apr 23. doi:10.3390/toxins8040122
- Goswami, T.K., Singh, M., Dhawan, M., Mitra, S., Emran, T.B., Rabaan, A.A., Mutair, A.A., Alawi, Z.A., Alhumaid, S., Dhama, K., 2022. Regulatory T cells (Tregs) and their therapeutic potential against autoimmune disorders – Advances and challenges. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 18, 2035117. <https://doi.org/10.1080/21645515.2022.2035117>
- Groot, A.J., Vooijs, M.A., 2012. The Role of Adams in Notch Signaling, in: Reichrath, J., Reichrath, S. (Eds.), *Notch Signaling in Embryology and Cancer*, *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer US, New York, NY, pp. 15–36. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0899-4_2
- Harrison, N., Koo, C.Z., Tomlinson, M.G., 2021. Regulation of ADAM10 by the TspanC8 Family of Tetraspanins and Their Therapeutic Potential. *IJMS* 22, 6707. <https://doi.org/10.3390/ijms22136707>
- Hartmann, D., de Strooper, B., Serneels, L., Craessaerts, K., Herreman, A., Annaert, W., Umans, L., 2002. The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for a-secretase activity in fibroblasts. *Hum Mol Genet.* 2002; 11(21):2615-2624. doi:10.1093/hmg/11.21.2615
- Hayday, A.C., 2009. $\gamma\delta$ T Cells and the Lymphoid Stress-Surveillance Response. *Immunity* 31, 184–196. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.08.006>
- Hirata, S., Murata, T., Suzuki, D., Nakamura, S., Jono-Ohnishi, R., Hirose, H., Sawaguchi, A., Nishimura, S., Sugimoto, N., Eto, K., 2017. Selective Inhibition of ADAM17 Efficiently Mediates Glycoprotein Iba α Retention During Ex Vivo Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Platelets. *Stem Cells Translational Medicine* 6, 720–730. <https://doi.org/10.5966/sctm.2016-0104>
- Huang, C.-T., Workman, C.J., Flies, D., Pan, X., Marson, A.L., Zhou, G., Hipkiss, E.L., Ravi, S., Kowalski, J., Levitsky, H.I., Powell, J.D., Pardoll, D.M., Drake, C.G., Vignali, D.A.A., 2004. Role of LAG-3 in Regulatory T Cells. *Immunity* 21, 503–513. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.08.010>
- Huang, M.-T., Dai, Y.-S., Chou, Y.-B., Juan, Y.-H., Wang, C.-C., Chiang, B.-L., 2009. Regulatory T Cells Negatively Regulate Neovasculature of Airway Remodeling via DLL4-Notch Signaling. *J Immunol* 183, 4745–4754. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804371>
- Hundhausen, C., Misztela, D., Berkhout, T.A., Broadway, N., Saftig, P., Reiss, K., Hartmann, D., Fahrenholz, F., Postina, R., Matthews, V., Kallen, K.-J., Rose-John, S., Ludwig, A., 2003. The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1

- (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood* 102, 1186–1195. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-12-3775>
- Imbratta, C., Hussein, H., Andris, F., Verdeil, G., 2020. c-MAF, a Swiss Army Knife for Tolerance in Lymphocytes. *Front. Immunol.* 11, 206. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00206>
- Iyer, S.S., Cheng, G., 2012. Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. *Crit Rev Immunol* 32, 23–63. <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.v32.i1.30>
- Jiao, Z., Wang, W., Guo, M., Zhang, T., Chen, L., Wang, Y., You, H., Li, J., 2010. Expression analysis of Notch-related molecules in peripheral blood T helper cells of patients with rheumatoid arthritis. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 39, 26–32. <https://doi.org/10.3109/03009740903124424>
- Joller, N., Kuchroo, V.K., 2017. Tim-3, Lag-3, and TIGIT, in: Yoshimura, A. (Ed.), *Emerging Concepts Targeting Immune Checkpoints in Cancer and Autoimmunity*, Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer International Publishing, Cham, pp. 127–156. https://doi.org/10.1007/82_2017_62
- Jouannet, S., Saint-Pol, J., Fernandez, L., Nguyen, V., Charrin, S., Boucheix, C., Brou, C., Milhiet, P.-E., Rubinstein, E., 2016. TspanC8 tetraspanins differentially regulate the cleavage of ADAM10 substrates, Notch activation and ADAM10 membrane compartmentalization. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 1895–1915. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2111-z>
- Kamakura, S., Oishi, K., Yoshimatsu, T., Nakafuku, M., Masuyama, N., Gotoh, Y., 2004. Hes binding to STAT3 mediates crosstalk between Notch and JAK–STAT signalling. *Nat Cell Biol* 6, 547–554. <https://doi.org/10.1038/ncb1138>
- Kane, B.A., Bryant, K.J., McNeil, H.P., Tedla, N.T., 2014. Termination of Immune Activation: An Essential Component of Healthy Host Immune Responses. *J Innate Immun* 6, 727–738. <https://doi.org/10.1159/000363449>
- Kassner, N., Krueger, M., Yagita, H., Dzionek, A., Hutloff, A., Kroczeck, R., Scheffold, A., Rutz, S., 2010. Cutting Edge: Plasmacytoid Dendritic Cells Induce IL-10 Production in T Cells via the Delta-Like-4/Notch Axis. *J Immunol.* 184, 550–554. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903152>
- Kim, H.K., Siu, G., 1998. The Notch Pathway Intermediate HES-1 Silences CD4 Gene Expression. *Mol Cell Biol* 18, 7166–7175. <https://doi.org/10.1128/MCB.18.12.7166>
- Kirschke, S., Ogunsulire, I., Selvakumar, B., Schumacher, N., Sezin, T., Rose-John, S., Scheffold, A., Garbers, C., Lokau, J., 2022. The metalloprotease ADAM10 generates soluble interleukin-2 receptor alpha (sCD25) in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 298, 101910. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101910>
- Knapinska, A.M., Dreytmüller, D., Ludwig, A., Smith, L., Golubkov, V., Sohail, A., Fridman, R., Giulianotti, M., LaVoi, T.M., Houghten, R.A., Fields, G.B., Minond, D., 2015. SAR Studies of

- Exosite-Binding Substrate-Selective Inhibitors of A Disintegrin And Metalloprotease 17 (ADAM17) and Application as Selective in Vitro Probes. *J. Med. Chem.* 58, 5808–5824. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00354>
- Kopan, R., Ilagan, M.X.G., 2009. The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. *Cell* 137, 216–233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.045>
- Koyanagi, A., Sekine, C., Yagita, H., 2012. Expression of Notch receptors and ligands on immature and mature T cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 418, 799–805. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.01.106>
- Kühn, R., Rajewsky, K., Müller, W., Löhler, J., Rennick, D., 1993. Interleukin-10-Deficient Mice Develop Chronic Enterocolitis. *Cell*. 1993;75(2):263-274. doi:10.1016/0092-8674(93)80068-p
- Lambrecht, B.N., Vanderkerken, M., Hammad, H., 2018. The emerging role of ADAM metalloproteinases in immunity. *Nat Rev Immunol* 18, 745–758. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0068-5>
- Li, S., Wan, J., Anderson, W., Sun, H., Zhang, H., Peng, X., Yu, Z., Wang, T., Yan, X., Smith, W., 2016. Downregulation of IL-10 secretion by Treg cells in osteoarthritis is associated with a reduction in Tim-3 expression. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 79, 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.01.036>
- Liu, W., Putnam, A.L., Xu-yu, Z., Szot, G.L., Lee, M.R., Zhu, S., Gottlieb, P.A., Kapranov, P., Gingeras, T.R., de St. Groth, B.F., Clayberger, C., Soper, D.M., Ziegler, S.F., Bluestone, J.A., 2006. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *Journal of Experimental Medicine* 203, 1701–1711. <https://doi.org/10.1084/jem.20060772>
- Löhning, M., Richter, A., Radbruch, A., 2002. Cytokine memory of T helper lymphocytes, in: *Advances in Immunology*. Elsevier, pp. 115–181. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(02\)80014-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(02)80014-1)
- Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15, 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lowther, D.E., Goods, B.A., Lucca, L.E., Lerner, B.A., Raddassi, K., van Dijk, D., Hernandez, A.L., Duan, X., Gunel, M., Coric, V., Krishnaswamy, S., Love, J.C., Hafler, D.A., 2016. PD-1 marks dysfunctional regulatory T cells in malignant gliomas. *JCI Insight* 1. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.85935>
- Lucca, L.E., Dominguez-Villar, M., 2020. Modulation of regulatory T cell function and stability by co-inhibitory receptors. *Nat Rev Immunol* 20, 680–693. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0296-3>
- Ludwig, A., Hundhausen, C., Lambert, M., Broadway, N., Andrews, R., Bickett, D., Leesnitzer, M., Becherer, J., 2005. Metalloproteinase Inhibitors for the Disintegrin-Like Metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 that Differentially Block Constitutive and Phorbol Ester-Inducible Shedding of Cell Surface Molecules. *Comb Chem High Throughput Screen*.8, 161–171.

- <https://doi.org/10.2174/1386207053258488>
- MACS cell Separation.pdf, n.d.
- Matthews, A.L., Koo, C.Z., Szyroka, J., Harrison, N., Kanhere, A., Tomlinson, M.G., 2018. Regulation of Leukocytes by TspanC8 Tetraspanins and the “Molecular Scissor” ADAM10. *Front. Immunol.* 9, 1451. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01451>
- Matthews, A.L., Noy, P.J., Reyat, J.S., Tomlinson, M.G., 2016. Regulation of A disintegrin and metalloproteinase (ADAM) family sheddases ADAM10 and ADAM17: The emerging role of tetraspanins and rhomboids. *Platelets* 28, 333–341. <https://doi.org/10.1080/09537104.2016.1184751>
- McKinnon, K.M., 2018. Flow Cytometry: An Overview. *Current Protocols in Immunology* 120. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>
- Minter, L.M., Danielle M Turley, Pritam Das, 2005. Inhibitors of g-secretase block in vivo and in vitro T helper type 1 polarization by preventing Notch upregulation of Tbx21. *Nat Immunol* 6, 680–688. <https://doi.org/10.1038/ni1209>
- Möller-Hackbarth, K., Dewitz, C., Schweigert, O., Trad, A., Garbers, C., Rose-John, S., Scheller, J., 2013. A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM) 10 and ADAM17 Are Major Sheddases of T Cell Immunoglobulin and Mucin Domain 3 (Tim-3). *Journal of Biological Chemistry* 288, 34529–34544. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.488478>
- Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L., O’Garra, A., 2001. Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 683–765. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.683>
- Mottet, C., Uhlig, H.H., Powrie, F., 2003. Cutting Edge: Cure of Colitis by CD4+CD25+ Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology* 170, 3939–3943. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.8.3939>
- Murano, T., Okamoto, R., Ito, G., Nakata, T., Hibiya, S., Shimizu, H., Fujii, S., Kano, Y., Mizutani, T., Yui, S., Akiyama-Morio, J., Nemoto, Y., Tsuchiya, K., Nakamura, T., Watanabe, M., 2014. Hes1 promotes the IL-22-mediated antimicrobial response by enhancing STAT3-dependent transcription in human intestinal epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 443, 840–846. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.12.061>
- Murphy, K., Weaver, C., 2018. *Janeway Immunologie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-56004-4>
- Neumann, C., Blume, J., Roy, U., Teh, P.P., Vasanthakumar, A., Beller, A., Liao, Y., Heinrich, F., Arenzana, T.L., Hackney, J.A., Eidenschenk, C., Gálvez, E.J.C., Stehle, C., Heinz, G.A., Maschmeyer, P., Sidwell, T., Hu, Y., Amsen, D., Romagnani, C., Chang, H.-D., Kruglov, A., Mashreghi, M.-F., Shi, W., Strowig, T., Rutz, S., Kallies, A., Scheffold, A., 2019a. c-Maf-dependent Treg cell control of intestinal TH17 cells and IgA establishes host–microbiota homeostasis. *Nat Immunol* 20, 471–481. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0316-2>

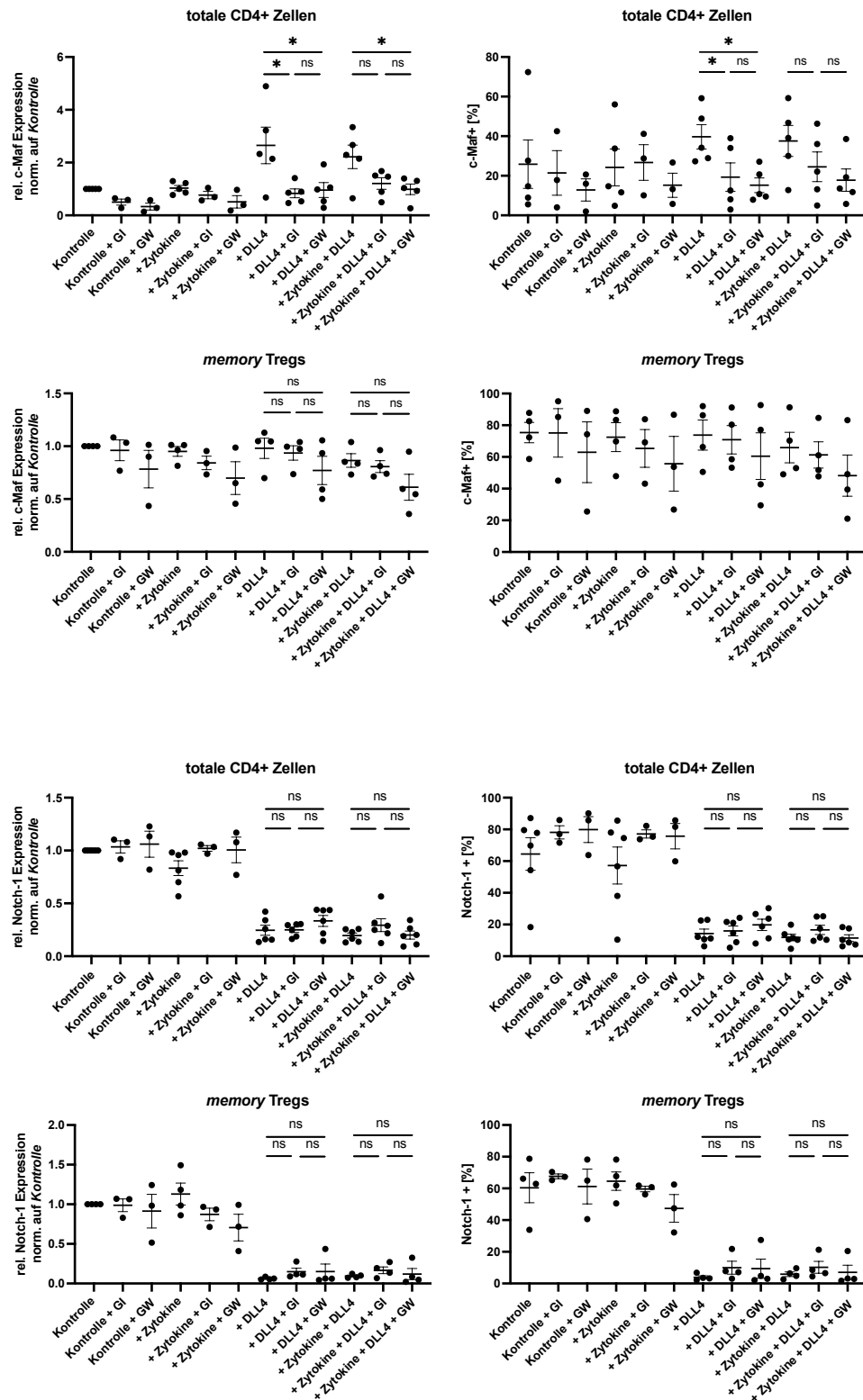
- Neumann, C., Heinrich, F., Neumann, K., Junghans, V., Mashreghi, M.-F., Ahlers, J., Janke, M., Rudolph, C., Mockel-Tenbrinck, N., Köhl, A.A., Heimesaat, M.M., Esser, C., Im, S.-H., Radbruch, A., Rutz, S., Scheffold, A., 2014. Role of Blimp-1 in programming Th effector cells into IL-10 producers. *Journal of Experimental Medicine* 211, 1807–1819. <https://doi.org/10.1084/jem.20131548>
- Neumann, C., Scheffold, A., Rutz, S., 2019b. Functions and regulation of T cell-derived interleukin-10. *Seminars in Immunology* 44, 101344. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.101344>
- Nowak, A., Lock, D., Bacher, P., Hohnstein, T., Vogt, K., Gottfreund, J., Giehr, P., Polansky, J.K., Sawitzki, B., Kaiser, A., Walter, J., Scheffold, A., 2018. CD137+CD154– Expression As a Regulatory T Cell (Treg)-Specific Activation Signature for Identification and Sorting of Stable Human Tregs from In Vitro Expansion Cultures. *Front. Immunol.* 9, 199. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00199>
- Odorizzi, P.M., Wherry, E.J., 2012. Inhibitory Receptors on Lymphocytes: Insights from Infections. *J.Immunol.* 188, 2957–2965. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100038>
- Ostroukhova, M., 2006. Treg-mediated immunosuppression involves activation of the Notch-HES1 axis by membrane-bound TGF-. *Journal of Clinical Investigation* 116, 996–1004. <https://doi.org/10.1172/JCI26490>
- Ou-Yang, H.-F., Zhang, H.-W., Wu, C.-G., Zhang, P., Zhang, J., Li, J.-C., Hou, L.-H., He, F., Ti, X.-Y., Song, L.-Q., Zhang, S.-Z., Feng, L., Qi, H.-W., Han, H., 2009. Notch signaling regulates the FOXP3 promoter through RBP-J- and Hes1-dependent mechanisms. *Mol Cell Biochem* 320, 109–114. <https://doi.org/10.1007/s11010-008-9912-4>
- Park, J.-H., Yu, Q., Erman, B., Appelbaum, J.S., Montoya-Durango, D., Grimes, H.L., Singer, A., 2004. Suppression of IL7Ralpha Transcription by IL-7 and Other Prosurvival Cytokines: A Novel Mechanism for Maximizing IL-7-Dependent T Cell Survival, *Immunity*. 2004;21(2):289-302. doi:10.1016/j.immuni.2004.07.016
- Pennock, N.D., White, J.T., Cross, E.W., Cheney, E.E., Tamburini, B.A., Kedl, R.M., 2013. T cell responses: naïve to memory and everything in between. *Advances in Physiology Education* 37, 273–283. <https://doi.org/10.1152/advan.00066.2013>
- Ren, X., Ye, F., Jiang, Z., Chu, Y., Xiong, S., Wang, Y., 2007. Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4 þ CD25 þ regulatory T cells. *Cell Death and Differentiation*, 2007;14(12):2076-2084. doi:10.1038/sj.cdd.4402220.
- Robey, E., Chang, D., Itano, A., Cado, D., Alexander, H., Lans, D., Weinmaster, G., Salmon, P., 1996. An Activated Form of Notch Influences the Choice between CD4 and CD8 T Cell Lineages. *Cell* 87, 483–492. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81368-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81368-9)
- Rutz, S., Janke, M., Kassner, N., Hohnstein, T., Krueger, M., Scheffold, A., 2008. Notch regulates IL-10 production by T helper 1 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 3497–3502. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712102105>

- Rutz, S., Mordmüller, B., Sakano, S., Scheffold, A., 2005. Notch ligands Delta-like1, Delta-like4 and Jagged1 differentially regulate activation of peripheral T helper cells. *Eur. J. Immunol.* 35, 2443–2451. <https://doi.org/10.1002/eji.200526294>
- Rutz, S., Ouyang, W., 2016. Regulation of Interleukin-10 Expression, in: Ma, X. (Ed.), *Regulation of Cytokine Gene Expression in Immunity and Diseases*, Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 89–116. https://doi.org/10.1007/978-94-024-0921-5_5
- Saint-Pol, J., Billard, M., Dornier, E., Eschenbrenner, E., Danglot, L., Boucheix, C., Charrin, S., Rubinstein, E., 2017. New insights into the tetraspanin Tspan5 using novel monoclonal antibodies. *Journal of Biological Chemistry* 292, 9551–9566. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.765669>
- Sakaguchi, S., 2004. Naturally Arising Cd4⁺ Regulatory T Cells For Immunologic Self-Tolerance And Negative Control Of Immune Responses. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 531–562. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141122>
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., Ono, M., 2008. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell* 133, 775–787. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.009>
- Sakuishi, K., Ngiow, S.F., Sullivan, J.M., Teng, M.W.L., Kuchroo, V.K., Smyth, M.J., Anderson, A.C., 2013. TIM3⁺ FOXP3⁺ regulatory T cells are tissue-specific promoters of T-cell dysfunction in cancer. *OncoImmunology* 2, e23849. <https://doi.org/10.4161/onci.23849>
- Saraiva, M., Christensen, J.R., Veldhoen, M., Murphy, T.L., Murphy, K.M., O’Garra, A., 2009. Interleukin-10 Production by Th1 Cells Requires Interleukin-12-Induced STAT4 Transcription Factor and ERK MAP Kinase Activation by High Antigen Dose. *Immunity* 31, 209–219. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.05.012>
- Saraiva, M., Vieira, P., O’Garra, A., 2020. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *Journal of Experimental Medicine* 217, e20190418. <https://doi.org/10.1084/jem.20190418>
- Sawant, D.V., Hamilton, K., Vignali, D.A.A., 2015. Interleukin-35: Expanding Its Job Profile. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 35, 499–512. <https://doi.org/10.1089/jir.2015.0015>
- Scharfenberg, F., Helbig, A., Sammel, M., Benz, J., Schlomann, U., Peters, F., Wichert, R., Bettendorff, M., Schmidt-Arras, D., Rose-John, S., Moali, C., Lichtenthaler, S.F., Pietrzik, C.U., Bartsch, J.W., Tholey, A., Becker-Pauly, C., 2020. Degradome of soluble ADAM10 and ADAM17 metalloproteases. *Cell. Mol. Life Sci.* 77, 331–350. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03184-4>
- Scheffold, A., Hühn, J., Höfer, T., 2005. Regulation of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell activity: it takes (IL-)two to tango. *Eur. J. Immunol.* 35, 1336–1341. <https://doi.org/10.1002/eji.200425887>
- Segura, E., Villadangos, J.A., 2009. Antigen presentation by dendritic cells in vivo. *Current Opinion in Immunology* 21, 105–110. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.03.011>
- Sezin, T., Selvakumar, B., Scheffold, A., 2022. The role of A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM)-10 in T helper cell biology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*

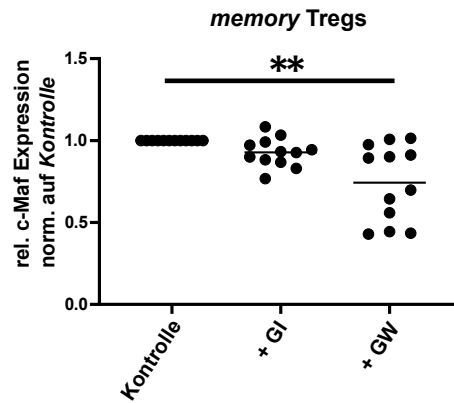
- 1869, 119192. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2021.119192>
- Sharma, M.D., Baban, B., Chandler, P., Hou, D.-Y., Singh, N., Yagita, H., Azuma, M., Blazar, B.R., Mellor, A.L., Munn, D.H., 2007. Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest.* 117, 2570–2582. <https://doi.org/10.1172/JCI31911>
- Shevach, E.M., Thornton, A.M., 2014. tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. *Immunol Rev* 259, 88–102. <https://doi.org/10.1111/imr.12160>
- Shevryev, D., Tereshchenko, V., 2020. Treg Heterogeneity, Function, and Homeostasis. *Front. Immunol.* 10, 3100. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03100>
- Smith, T.M., Tharakan, A., Martin, R.K., 2020. Targeting ADAM10 in Cancer and Autoimmunity. *Front. Immunol.* 11, 499. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00499>
- Steinbuck, M.P., Winandy, S., 2018. A Review of Notch Processing With New Insights Into Ligand-Independent Notch Signaling in T-Cells. *Front. Immunol.* 9, 1230. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01230>
- Struhl, G., Adachi, A., 2000. Requirements for Presenilin-Dependent Cleavage of Notch and Other Transmembrane Proteins. *Molecular Cell* 6, 625–636. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00061-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00061-7)
- Sumida, T.S., Dulberg, S., Schupp, J.C., Lincoln, M.R., Stillwell, H.A., Axisa, P.-P., Comi, M., Unterman, A., Kaminski, N., Madi, A., Kuchroo, V.K., Hafler, D.A., 2022. Type I interferon transcriptional network regulates expression of coinhibitory receptors in human T cells. *Nat Immunol* 23, 632–642. <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01152-y>
- Suttles, J., Milhorn, D.M., Miller, R.W., Poe, J.C., Wahl, L.M., Stout, R.D., 1999. CD40 Signaling of Monocyte Inflammatory Cytokine Synthesis through an ERK1/2-dependent Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 274, 5835–5842. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.9.5835>
- Takebe, N., Nguyen, D., Yang, S.X., 2014. Targeting Notch signaling pathway in cancer: Clinical development advances and challenges. *Pharmacology & Therapeutics* 141, 140–149. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.09.005>
- Thaventhiran, T., Sethu, S., Han Xian Aw Yeang, Al-Huseini, L., Hamdam, J., Jean G Sathish, 2012. T Cell Co-inhibitory Receptors-Functions and Signalling Mechanisms. *J Clin Cell Immunol* 01. <https://doi.org/10.4172/2155-9899.S12-005>
- Tillinger, W., Jilch, R., Waldhoer, T., Reinisch, W., Junger, W., 2013. Monocyte Human Leukocyte Antigen–DR Expression—A Tool to Distinguish Intestinal Bacterial Infections From Inflammatory Bowel Disease? *Shock* 40, 89–94. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e318299ebdd>
- Ting, H.-A., Schaller, M.A., de Almeida Nagata, D.E., Rasky, A.J., Maillard, I.P., Lukacs, N.W., 2017. Notch Ligand Delta-like 4 Promotes Regulatory T Cell Identity in Pulmonary Viral Infection.

- J.Immunol. 198, 1492–1502. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601654>
- Vignali, D.A.A., Collison, L.W., Workman, C.J., 2008. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 8, 523–532. <https://doi.org/10.1038/nri2343>
- Washburn, T., Schweighoffer, E., Gridley, T., Chang, D., Fowlkes, B.J., Cado, D., Robey, E., 1997. Notch activity influences the alphabeta versus gammadelta T cell lineage decision, *Cell*. 1997;88(6):833-843. doi:10.1016/s0092-8674(00)81929-7
- Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T., Sakaguchi, S., 2008. CTLA-4 Control over Foxp3+ Regulatory T Cell Function. *Science* 322, 271–275. <https://doi.org/10.1126/science.1160062>
- Xu, J., Yang, Y., Qiu, G., Lal, G., Wu, Z., Levy, D.E., Ochando, J.C., Bromberg, J.S., Ding, Y., 2009. c-Maf Regulates IL-10 Expression during Th17 Polarization. *J Immunol* 182, 6226–6236. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900123>
- Zhou, B., Lin, W., Long, Y., Yang, Y., Zhang, H., Wu, K., Chu, Q., 2022. Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics. *Signal Transduct Target Ther.* 7, 95. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00934-y>
- Ziegler-Heitbrock, L., Lötzerich, M., Schaefer, A., Werner, T., Frankenberger, M., Benkhart, E., 2003. IFN- α Induces the Human IL-10 Gene by Recruiting Both IFN Regulatory Factor 1 and Stat3. *The Journal of Immunology* 171, 285–290. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.1.285>

8 Anhang



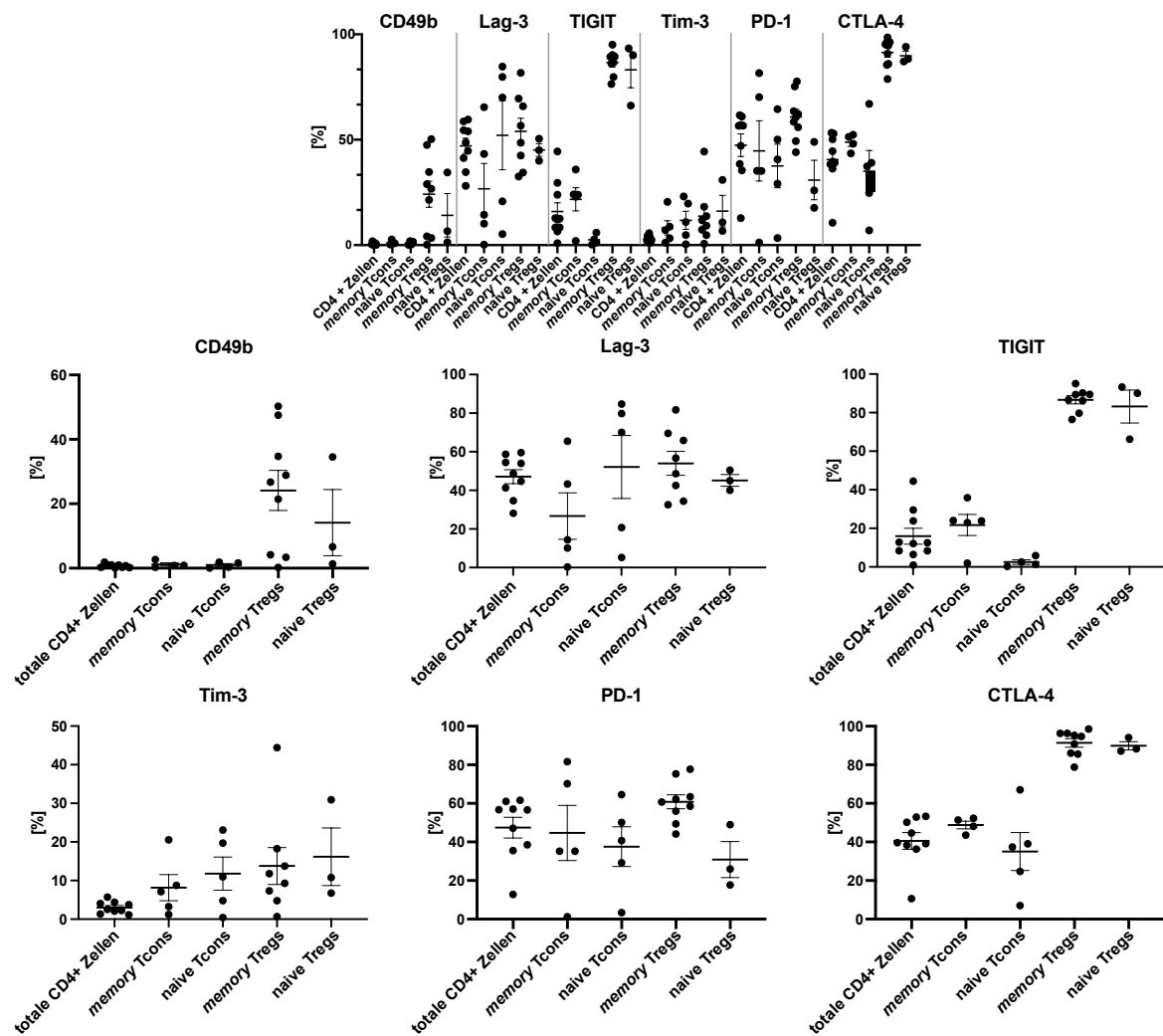
Anhang 1: Abbildung der relativen Notch-1- bzw. c-Maf-Expression in totalen CD4+ Zellen und *memory* Tregs sowie in % positive Zellen



Anhang 2: c-Maf-Expression in *memory* Tregs nach Unterteilung der Konditionen in Abhängigkeit vom Vorhandensein der ADAM-Inhibitoren GI und GW

Um trotz einer geringen Versuchszahl den Effekt der ADAM-Inhibitoren weiter zu analysieren wurden die Messungen bei zuvor nur geringfügiger Veränderung der c-Maf-Expression durch die verschiedenen Kulturbedingungen ohne Berücksichtigung der jeweiligen Kondition lediglich nach Vorhandensein der Inhibitoren GI, GW oder keines Inhibitors auf drei neue Konditionen (Kontrolle, GI, GW) aufgeteilt und erneut analysiert.

(n=12, Friedmans Test und Dunns *multiple comparisons* Test, $p=0,0033$)



Anhang 3: Vergleich der Expression der verschiedenen coinhibitorischen Rezeptoren in der Kontroll-Kondition der verschiedenen T-Zelltypen in % positive Zellen

Anhang 4: Angaben zur statistischen Berechnung der in Abbildung 22 gezeigten Daten

	Kondition 1	Kondition 2	Tests	p=
Totale CD4+ Zellen Tim-3	Kontrolle	+ DLL4	<i>One-way ANOVA</i>	0,0051
	Kontrolle	+ Zytokine + DLL4		0,0024
	+ Zytokine	+ DLL4		0,0066
	+ Zytokine	+ Zytokine + DLL4		0,0021
Totale CD4+ Zellen LAG-3	Kontrolle	+ DLL4	<i>One-way ANOVA</i>	0,0001
	Kontrolle	+ Zytokine + DLL4		0,0058
	+ Zytokine	+ DLL4		<0,0001
	+ Zytokine	+ Zytokine + DLL4		0,0005
	+ DLL4	+ Zytokine + DLL4		0,0009
naive Tcons LAG-3	+ Zytokine	+ DLL4	<i>One-way ANOVA</i>	0,0445
naive Tcons CTLA4	Kontrolle	+ Zytokine + DLL4	<i>One-way ANOVA</i>	0,0021
Totale CD4+ Zellen PD-1	Kontrolle	+ DLL4	Friedmans Test	0,0016
	Kontrolle	+ Zytokine + DLL4		<0,0001
naive Tcons PD-1	Kontrolle	+ Zytokine + DLL4	<i>One-way ANOVA</i>	0,0344
	+ DLL4	+ Zytokine + DLL4		0,0352

Anhang 5: Angaben zur statistischen Berechnung der in Abbildung 23 gezeigten Daten

	Kondition 1	Kondition 2	Tests	p=
<i>memory</i> Tregs Tim-3	+ Zytokine	+ DLL4	Friedmans Test	0,0014
	+ Zytokine	+ Zytokine + DLL4		0,0402
<i>memory</i> Tregs LAG-3	+ DLL4	+ Zytokine + DLL4	<i>One-way ANOVA</i>	0,0014
<i>memory</i> Tregs LAG-3	Kontrolle	+ Zytokine	<i>One-way ANOVA</i>	0,0025
	Kontrolle	+ Zytokine + DLL4		0,0439
	+ DLL4	+ Zytokine + DLL4		0,0156
naive Tregs LAG-3	Kontrolle	+ Zytokine	<i>One-way ANOVA</i>	0,024
	+ DLL4	+ Zytokine + DLL4		0,0162
<i>memory</i> Tregs TIGIT	+ DLL4	+ Zytokine + DLL4	Friedmans Test	0,0402
naive Tregs CTLA-4	Kontrolle	+ DLL4	<i>One-way ANOVA</i>	0,0037
<i>memory</i> Tregs PD-1	Kontrolle	+ DLL4	<i>One-way ANOVA</i>	0,0451
naive Tregs PD-1	Kontrolle	+ Zytokine	<i>One-way ANOVA</i>	0,0203

9 Veröffentlichungen

Ahlers, J., Mantei, A., Lozza, L., Stäber, M., Heinrich, F., Bacher, P., Hohnstein, T., Menzel, L., Yüz, S.G., Alvarez-Simon, D., **Bickenbach, A.R.**, Weidinger, C., Mockel-Tenbrinck, N., Köhl, A.A., Siegmund, B., Maul, J., Neumann, C., Scheffold, A., 2022. A Notch/STAT3-driven Blimp-1/c-Maf-dependent molecular switch induces IL-10 expression in human CD4⁺ T cells and is defective in Crohn's disease patients. *Mucosal Immunol.* <https://doi.org/10.1038/s41385-022-00487-x>

10 Danksagung

Zum Abschluss dieser Arbeit möchte ich meine Dankbarkeit für all die Menschen zum Ausdruck bringen, ohne deren Unterstützung diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre.

Ein besonderer Dank gilt dabei Herrn Prof. Dr. Alexander Scheffold, der es mir ermöglicht hat die vorliegende Doktorarbeit am Institut für Immunologie des UKSH Campus Kiel durchzuführen, mich als Teil seiner Arbeitsgruppe aufnahm und mir dieses interessante Thema anvertraut hat.

Weiterhin danke ich ihm für die umfangreiche Betreuung, die gemeinsame Weiterentwicklung des Projektes sowie für die Unterstützung bei der Korrektur dieser Arbeit. Alex, ich danke dir für all die Mühe und Zeit, die du in dieses Projekt investiert hast, für deine ständige Erreichbarkeit bei jeglichen Fragen sowie für all das Wissen, welches du mir in der Zeit vermitteln konntest.

Ein großer Dank gilt zudem dem SFB 877: Proteolyse als regulatorisches Ereignis in der Pathophysiologie. Durch die Unterstützung durch das Stipendium konnte ich mir erlauben ein ganzes Jahr im Rahmen dieser Doktorarbeit im Labor zu forschen und mich vollkommen auf die Doktorarbeit zu konzentrieren. Weiterhin konnte ich mein Wissen nicht nur in der Immunologie erweitern, sondern einen Überblick über die Bedeutung von Proteasen in verschiedenen Bereichen gewinnen. Insbesondere möchte ich mich hierbei bei Prof. Dr. Christoph Becker-Pauly bedanken, der mir bei jeglichen Schwierigkeiten stets zu helfen wusste und mir eine große Stütze sowohl in wissenschaftlichen als auch organisatorischen Fragen war.

Ein Teil dieser Arbeit baut auf der Forschung von Dr. Jonas Ahlers auf. Ich möchte hiermit Jonas dafür danken, dass er die Grundlagen für diese Arbeit geschaffen hat und mir bei Fragen stets zur Seite stand. Weiterhin danke ich der gesamten Arbeitsgruppe Scheffold am Immunologischen Institut des UKSH Kiel. Ich bedanke mich bei euch für eure zeitliche, wissenschaftliche und auch zwischenmenschliche Unterstützung während meiner und eurer Zeit im Labor und auch danach.

Carina, dir danke ich für deine Betreuung insbesondere zu Beginn meiner Arbeit, für all dein Wissen, welches du mit mir geteilt hast, für die Zeit, die du in mich investiert hast und für die Konstanz, die du im Rahmen meiner Doktorarbeit warst.

Simge, ich danke dir, dass du dich mir angenommen hast und die Betreuung meiner Arbeit gleich zu Beginn deiner Tätigkeit in der AG Scheffold übernommen hast. Danke, dass du die Zeit und Geduld investiert hast, um mich und dieses Projekt weiter voranzubringen.

Ich danke dir, Cathrin, dafür, dass du mich in meinen Experimenten stets unterstützt hat, dafür dass du dich stets um mich gesorgt hast und dafür, dass du das Team zu einer zweiten Familie gemacht hast.

Xenia, mit dir habe ich nicht nur eine treue Begleiterin für lange Labornächte, sondern auch eine unschätzbare neue Freundin gewonnen.

Danksagung

Tanya, Silja, Bala, Daniel, Ireti, Mahdi, Yi, Sandra, Esther: auch wenn unsere gemeinsame Zeit in der Arbeitsgruppe begrenzt war, hattet auch ihr einen nachhaltigen Einfluss auf mich und diese Doktorarbeit. Ich danke jedem einzelnen von euch für eure Mühen und Unterstützung.

Auch danke ich Prof. Dr. Petra Bacher und ihrer Arbeitsgruppe für die Zusammenarbeit, den Austausch und die wissenschaftliche Expertise, die mich in meiner Forschung maßgeblich vorangebracht haben.

Für die RNA-Sequenzierung danke ich Dr. Mir-Farzin Mashregi und Dr. Frederik Heinrich vom Deutschen Rheuma-Forschungszentrum Berlin. Ein großer Dank geht weiterhin an Mahdi, der mir bei der Analyse und Darstellung der aus der Sequenzierung gewonnenen Daten geholfen hat.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Schwester Kira und meinen Eltern danken. Eure bedingungslose Unterstützung, euer Verständnis und eure ermutigenden Worte haben mir die Kraft gegeben, die Herausforderungen dieser Doktorarbeit zu meistern. Kira, deine wissenschaftlichen Erfahrungen und ständige Unterstützung haben mich stets weitergebracht und entscheidenden Einfluss auf diese Arbeit genommen. Leander, ich danke dir für deine Unterstützung und dein Verständnis für die langen Labornächte und Wochenenden im Labor.