

# Untersuchung der Genexpression Notch modulierter T-Helfer-Zellen

vorgelegt von  
Dipl. Biochem. **Frederik Heinrich**  
aus Berlin

Von der Fakultät III - Prozesswissenschaften  
der Technischen Universität Berlin  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
- Dr. rer. nat. -  
genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzende: Prof. Dr.-Ing. Vera Meyer  
Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Roland Lauster  
Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Alexander Scheffold

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 10.01.2014

Berlin 2014

D 83



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>9</b>
1.1. Zelldifferenzierung und der Notch Signalweg	11
1.2. Einleitung einer Immunantwort – Das Angeborene Immunsystem	14
1.3. Das Adaptive Immunsystem – Aufbau und Entwicklung	16
1.3.1. B-Zellen	16
1.3.2. T-Zell-Entwicklung: Knochenmark, Thymus und Peripherie	17
1.3.3. T-Helfer-Zellen	18
1.3.4. Regulation der adaptiven T-Zell-vermittelten Immunantwort	20
1.4. Rolle des Notch Signalwegs im Immunsystem	22
<b>2. Zielsetzung</b>	<b>25</b>
<b>3. Methoden &amp; Materialien</b>	<b>29</b>
3.1. Zellisolation und Sortierung	31
3.2. Supplementierte Zellmedien (T <sub>H</sub> 0, T <sub>H</sub> 1, T <sub>H</sub> 2, T <sub>H</sub> 17 und T <sub>H</sub> 22)	34
3.3. Retrovirus Generierung in HEK293T Zellen	36
3.4. N3IZD und c-Maf Überexpression	38
3.5. Restimulation, Fixierung und Färbung von T-Zellen	39
3.6. Durchflusszytometrie	40
3.7. Adaptiertes ELISA-Protokoll (eBioscience) für IL-10 und IL-22	43
3.8. Zytokin Sekretions Assay für IL-10 und IL-22 (Miltenyi Biotec)	44
3.9. mRNA Isolation, Reverse Transkription und Real-time PCR	45
3.10. Aufnahme und Ausgabe der Transkriptome	46
3.11. Einzelvergleich: Berechnungen und Ausgaben signifikanter FCs	50
3.11.1. Gruppenvergleiche Notch modulierter T <sub>H</sub> 0-Zellen mit T <sub>H</sub> 1-, T <sub>H</sub> 2- oder T <sub>H</sub> 17-polarisierten Zellen	52
3.11.2. Gruppenvergleiche zwischen verschiedenen Notch modulierten T-Helfer-Subsets	54
3.11.3. Vergleich IL-10 sekretierender und nicht-sekretierender Notch modulierter T <sub>H</sub> 1-Zellen	58
3.11.4. Vergleich IL-22 sekretierender und nicht-sekretierender T <sub>H</sub> 17 Notch modulierter Zellen	59
3.12. <i>In silico</i> siRNA Design	60
3.12.1. siRNA Transfektion mit dem Nucleofector™ System von Amaxa für Einzeltransfektionen	62
3.12.2. Nucleofection™ voraktivierter T <sub>H</sub> 1-Zellen nach Transfektion mit konstitutiv aktivem Notchsignal für einzelne siRNA-Nucleofectionen™	63

3.12.3. Transfektion voraktivierter T <sub>H</sub> 1-Zellen im Screen (96-Lochplatte)	64
3.12.4. Transfektion Naiver T-Zellen im Screen (96-Lochplatte)	65
3.13. Behandlung Notch modulierter T <sub>H</sub> 1-Zellen mit Erk-Inhibitor (PD 184,352)	66
3.14. Vorbereitung einer Arbeitslösung des AhR-Liganden FICZ für die <i>in vitro</i> Modulation von T-Helfer-Zellen	67
3.15. Statistische Auswertung der Ergebnisse	68
3.16. Verwendete Materialien und Geräte	69
3.16.1. Medien und Puffer	69
3.16.2. Primer und Bedingungen für quantitative PCR	72
3.16.3. Maus spezifische Antikörper	74
3.16.4. Rekombinante Zytokine	74
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>75</b>
4.1. Kostimulatorische Signale sind entscheidend für die Ausprägung der Notch Modulation von T-Helfer-Zellen	77
4.1.1. Die Aktivierung des Notch Signalwegs in T <sub>H</sub> 0-Zellen führt zu einem diffusen Expressionsprofil aus T <sub>H</sub> 1-, T <sub>H</sub> 2- und T <sub>H</sub> 17-Zellen.	79
4.1.2. Die Modulation von T <sub>H</sub> 0-Zellen durch den Notch Signalweg führt zu einer Erhöhung der T <sub>H</sub> 17-spezifischen Zytokine IL-17A und IL-22	84
4.1.3. Die Transkriptionsfaktoren Tbet (T <sub>H</sub> 1), Gata-3 (T <sub>H</sub> 2) und RoRγT (T <sub>H</sub> 17) werden nicht durch den Notch Signalweg in T <sub>H</sub> 0-Zellen moduliert	86
4.1.4. Die Aktivierung des Notch Signalwegs führt zu unterschiedlich starken Modulation der Expressionsprofile in T <sub>H</sub> 0-, T <sub>H</sub> 1-, T <sub>H</sub> 2- und T <sub>H</sub> 17-Zellen	89
4.1.5. Der Anteil Subset-spezifisch regulierter Transkripte in Notch modulierten T-Helfer-Zellen nimmt mit steigendem Fold Change cut-off zu	91
4.2. Vergleichende Transkriptomanalyse IL-10 sekretierender und nicht-sekretierender Notch modulierter T <sub>H</sub> 1-Zellen	95
4.2.1. Identifizierung Notch modulierter Transkriptionsfaktoren mit einem IL-10 spezifischen Expressionsmuster in T <sub>H</sub> 1-Zellen	96
4.2.2. Quantifizierung Notch modulierter Transkriptionsfaktoren in IL-10 sortierten T <sub>H</sub> 1-Zellen	98
4.2.3. Blimp-1 und c-Maf binden in konservierten nicht-codierenden Sequenzen oberhalb des Transkriptionsstartpunktes des IL-10 Gens	100
4.3. siRNA Knock-down von Transkriptionsfaktoren, die in Notch modulierter T <sub>H</sub> 1-Zellen verstärkt exprimiert werden	102
4.3.1. Verminderung der IL-10 Expression durch Knock-down Notch modulierter Transkriptionsfaktoren in T <sub>H</sub> 1-Zellen	104
4.4. Blimp-1 ist limitierender Faktor für die gesteigerte IL-10 Expression in Notch und c-Maf modulierten T <sub>H</sub> 1-Zellen	109
4.5. Die Inhibition der ERK Aktivierung in Notch modulierten T <sub>H</sub> 1-Zellen führt zu einer Reduktion der Zytokinexpression von IL-10 und IL-2	114

4.5.1. Die Aktivierung von Erk und die Aktivierung des Notch Signalweges, haben unterschiedlichen Einfluss auf die Expression von IL-2 und IL-10 in T <sub>H</sub> 1-Zellen	117
4.6. Die Expression von IL-10 und IL-22 in Notch modulierten T <sub>H</sub> 1-Zellen ist unabhängig von der Expression des Arylhydrocarbon Rezeptors (AhR)	119
4.7. Notch Modulation führt zur Erhöhung der Zytokinexpression von IL-22, auf mRNA- und Proteinebene, in T <sub>H</sub> 17- und T <sub>H</sub> 22-Zellen	124
4.7.1. Steigerung und Stabilisierung der IL-17 und IL-22 Proteinexpression in T <sub>H</sub> 17-Zellen durch Integration von TGF-β- und AhR-Signalen durch den Notch Signalweg	126
4.7.2. Die Sekretion eines endogenen Liganden des AhR ist nicht maßgeblich für die Expression von IL-22 in Notch modulierten T <sub>H</sub> 17- und T <sub>H</sub> 22-Zellen	129
4.8. Der Transkriptomvergleich von CD4 <sup>+</sup> GFP <sup>+</sup> IL-22 <sup>+</sup> mit CD4 <sup>+</sup> GFP <sup>+</sup> IL-22 <sup>-</sup> Notch modulierten T <sub>H</sub> 17-Zellen zeigt eine signifikante Erhöhung der gesamten Genexpression innerhalb der IL-22 positiven Fraktion	132

## **5. Diskussion 137**

5.1. Direkte und indirekte Modulation der Genexpression durch den Notch Signalweg in T-Helfer-Zellen.	139
5.2. Notch Modulation naiver T-Helfer-Zellen führt zu einem atypischen Expressionsprofil von Zytokinen und Transkriptionsfaktoren, die keine eindeutige T <sub>H</sub> 1-, T <sub>H</sub> 2-, oder T <sub>H</sub> 17-Polarisierung aufweisen.	141
5.3. Die Notch Modulation von T-Helfer-Zellen wird maßgeblich durch die vorhandenen Umgebungssignale bestimmt.	143
5.3.1. Notch Modulation von T <sub>H</sub> 1-Zellen	143
5.3.2. Notch Modulation von T <sub>H</sub> 2-Zellen	144
5.3.3. Notch Modulation von T <sub>H</sub> 17-Zellen	144
5.3.4. T <sub>H</sub> 9-Zellen	145
5.3.5. T <sub>Reg</sub>	145
5.4. Multilaterale Signalintegration in T-Helfer-Zellen durch den Notch Signalweg	146
5.5. Mit IL-10 Expression assoziierte Transkriptionsfaktoren in Notch modulierten T <sub>H</sub> 1-Zellen.	148
5.5.1. c-Maf	148
5.5.2. Blimp-1	149
5.5.3. Evi1	151
5.5.4. Fli1	151
5.5.5. Etv5	152
5.5.6. Satb1	152
5.5.7. Tcf7	153
5.6. Blimp-1 ist der limitierende Faktor der Notch und c-Maf vermittelten IL-10 Expression in T <sub>H</sub> 1-Zellen.	153
5.7. Modulation der Stärke des T-Zell-Rezeptor Signals	154

5.8.	Notch modulierte IL-10 und IL-22 Expression in Abhängigkeit von AhR	154
5.9.	Starke Genexpressionsunterschiede zwischen Notch modulierten IL-22 <sup>-</sup> - und IL-22 <sup>+</sup> -T <sub>H</sub> 17-Zellen	157
5.10.	Die Notch vermittelte Signalintegration erhöht die IL-10 Expression in T <sub>H</sub> 1-Zellen und IL-22 Expression in T <sub>H</sub> 17-Zellen.	158
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>163</b>
<b>7.</b>	<b>Referenzen</b>	<b>167</b>
<b>8.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>177</b>
<b>9.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>179</b>
<b>10.</b>	<b>Formelverzeichnis</b>	<b>181</b>
<b>11.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>183</b>
<b>12.</b>	<b>Selbständigkeitserklärung</b>	<b>187</b>
<b>13.</b>	<b>Anhang</b>	<b>189</b>
<b>14.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>191</b>

*„Der unermesslich reichen, stets sich erneuernden Natur gegenüber wird der Mensch, soweit er auch in der wissenschaftlichen Erkenntnis fortgeschritten sein mag, immer das sich wundernde Kind bleiben und muß sich stets auf neue Überraschungen gefasst machen.“*

- Max Planck

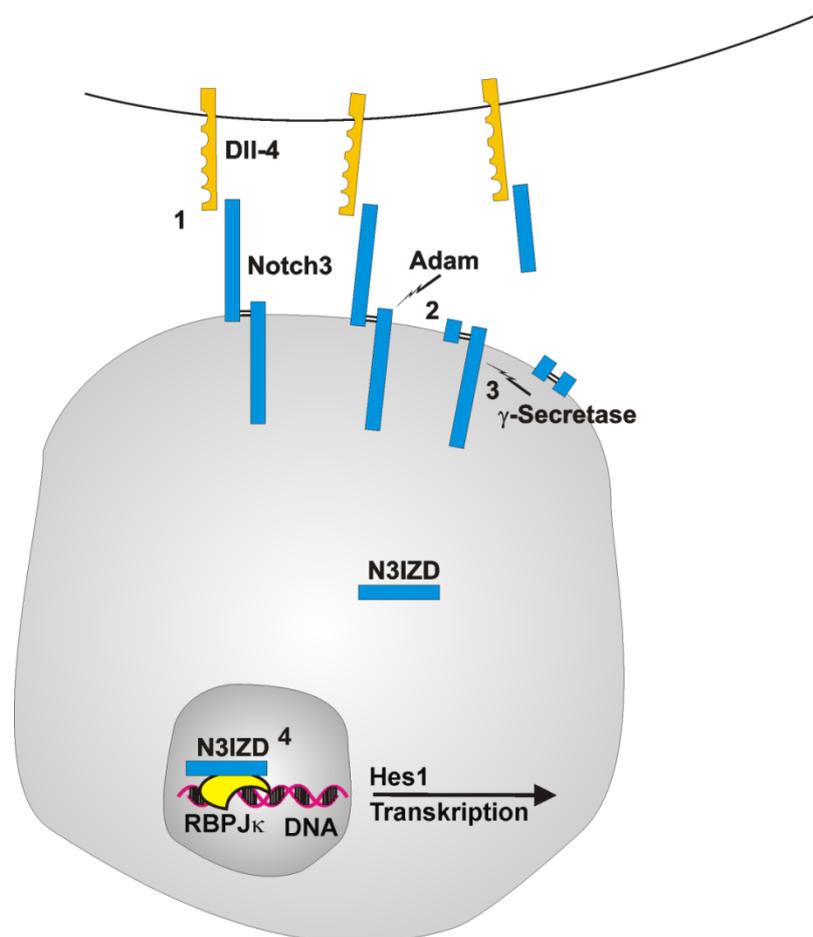


## 1. Einleitung



## 1.1. Zelldifferenzierung und der Notch Signalweg

Der Aufbau mehrzelliger Organismen setzt eine strenge Koordination von Signalwegen voraus, die es dem Organismus erlaubt die Entwicklung der Keimblätter bei der frühen Embryogenese zu regulieren [1]. Die verschiedenen Keimblätter werden als Endo-, Meso- und Ektoderm bezeichnet. Einer der essentiellen Signalwege für die Steuerung dieses Prozesses ist der Notch Signalweg (Abb. 1). Der Signalweg sorgt für eine periodische Taktung der Genexpression entlang der anterior-posterior verlaufenden Achse des Embryos, wodurch die Bildung der Somiten aus dem Mesoderm gesteuert wird [2].



**Abbildung 1**

Der Notch Signalweg am Beispiel der Interaktion zwischen DLL-4 und Notch3. (1) Der Notch-Ligand DLL-4 bindet extrazellulär an den Notch3 Rezeptor. (2) Daraufhin kommt es zu einer proteolytischen Abspaltung des extrazellulären Teils des Notch Rezeptors durch das Enzym Adam 10 (a disintegrin and metallopeptidase domain 10). (3) Im nächsten Schritt wird die intrazelluläre Domäne des Notch Rezeptors (N3IZD) durch den Enzymkomplex  $\gamma$ -Secretase vom transmembralen Teil abgespalten und ins Zytosol entlassen. (4) Schließlich kommt es zur Translokation von N3IZD in den Nucleus. Dort bindet N3IZD an RBPJ $\kappa$  (recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region), wodurch die Transkription, von Beispielsweise Hes-1 (hairy and enhancer of split 1 (Drosophila)), induziert wird.

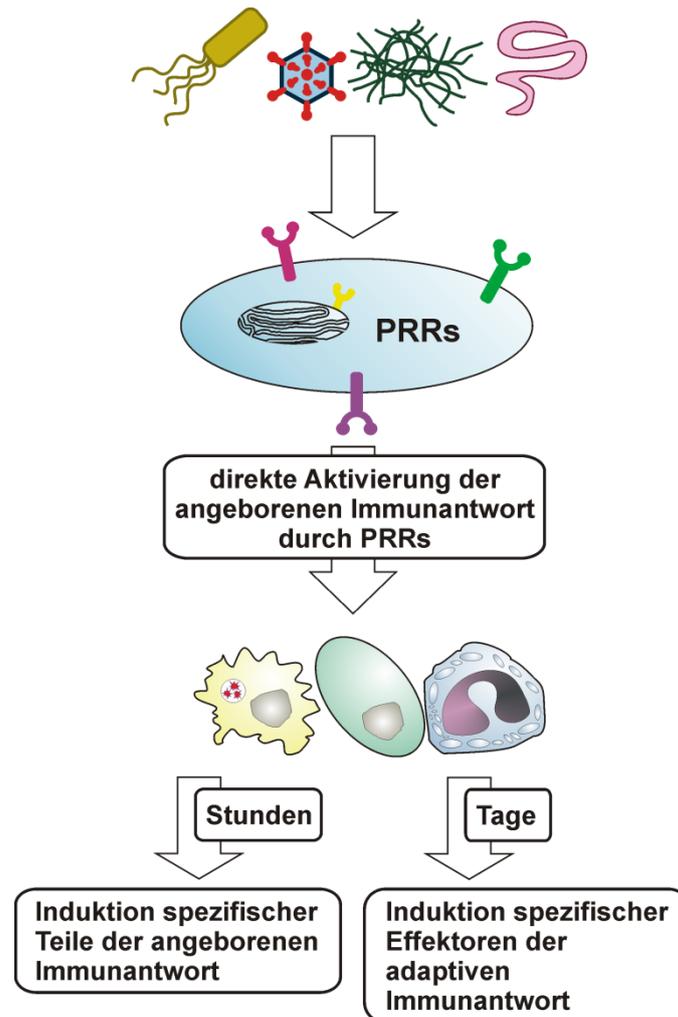
Neben der Embryonalgenese spielt der Notch Signalweg eine weitreichende Rolle während der Entwicklung unterschiedlicher Zellen und Organe. Dazu gehören beispielsweise Zellen des zentralen Nervensystems [3], des Herzens [4], des Pankreas [5], des Darms [6], der Knochen [7], und Zellen des Immunsystems [8, 9]. Daher führt eine Fehlregulation oder gar der Verlust des Signalweges zu schwerwiegenden Schäden des Organismus. Diese Schäden können sowohl während der Entwicklung, als auch im Erwachsenenalter auftreten, da gezeigt werden konnte, dass der Notch Signalweg auch für die Homöostase von Zellen in etlichen Organen mitverantwortlich ist. Des Weiteren ist Notch als Onkogen in einer Vielzahl von Krebserkrankungen beschrieben [10, 11]. In Studien an Krebszellen, basierend auf genomweiten Expressions- und Chromatin-Immünpräzipitations-Analysen (ChIP), konnte gezeigt werden, dass der Notch Signalweg an der Regulation einer Vielzahl von Genen beteiligt ist [12, 13]. In dieser Arbeit wird exklusiv die Rolle des Notch Signalweges in T-Helfer-Zellen, die einen wichtigen Bestandteil des Immunsystems darstellen, betrachtet. Um die verschiedenen Aspekte des Notch Signalweges, innerhalb des Immunsystems, verstehen zu können, muss zunächst der Signalweg (Abb. 1) eingehender erläutert werden.

Der ursprünglich in Fruchtfliegen (*Drosophila Melanogaster*) identifizierte Notch Signalweg, ist ein evolutionär konserviertes Zell-Zell-Kommunikationssystem [14]. Wie in Abbildung 1 zu sehen ist, wird er durch die Interaktion zwischen dem Notch Rezeptor (Notch) und einem Notch-Liganden (Abb. 1, DLL-4) eingeleitet. Säugetiere besitzen, im Gegensatz zu *Drosophila Melanogaster*, vier Notch Rezeptoren (Notch 1-4), diese können über fünf verschiedene Liganden, der Jagged- (Jag-1 und Jag-2), und Delta-like-Familie (DLL-1, DLL-3 und DLL-4), aktiviert werden. Die biochemischen Grundlagen des kanonischen Notch Signalweges [11] sind zwar relativ simpel, dennoch trägt die Aktivierung zu einer enormen Diversität der zellulären Genexpression bei, die maßgeblich durch, sich in der Umgebung befindliche, Stimuli beeinflusst wird [10]. Darüber hinaus sind nicht-kanonische Notch Signalwege beschrieben, die unabhängig von RBPJk (Abb. 1) funktionieren. Die nicht-kanonische Signalgebung kann in Abwesenheit der Spaltung des Rezeptors, oder durch Wechselwirkung mit anderen Signalwegen (NFκB, TGF-β, Hypoxie induzierte Signale) auftreten [15-17]. In dieser Arbeit wurde vor allem die Auswirkung des kanonischen Notch Signalweges betrachtet. Hierzu wurde die intrazelluläre Domäne von Notch3 (N3IZD) mittels retroviraler Überexpression in die Zellen eingebracht. Das verwendete retrovirale Plasmid kodiert neben N3IZD auch für ein fluoreszierendes Protein (GFP - grün fluoreszierendes Protein), sodass selektiv Zellen betrachtet werden können, in denen der Notch Signalweg aktiviert ist (Kapitel 2.3 und 2.4). Somit wird eine Liganden-unabhängige Aktivierung des Notch 3 Signals erreicht. Bevor die Funktionen des Notch Signalweges im Immunsystem (Kapitel 1.4) eingehender erklärt werden können, müssen zunächst der Aufbau und die

Funktionsweise des angeborenen (Kapitel 1.2) und adaptiven Immunsystems (Kapitel 1.3) eingehender erläutert werden.

### 1.2. Einleitung einer Immunantwort – Das Angeborene Immunsystem

Der Organismus von Säugetieren befindet sich in stetigem Kontakt mit einer Vielzahl verschiedener Mikroorganismen. Hierbei werden vier Gruppen pathogener Mikroorganismen unterschieden: Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten. Das Immunsystem ist in der Lage spezifisch auf die verschiedenen Erreger zu antworten. Damit es überhaupt zu einer Antwort durch den Organismus auf das Pathogen kommt, müssen die Krankheitserreger zunächst die Barriere der Haut, bzw. der Schleimhäute, überwinden. Die Oberflächenstruktur, bzw. Enzyme auf der Oberfläche, verhindern die Anheftung von Mikroorganismen, oder wirken direkt antimikrobiell. Gelingt es einem Pathogen dennoch diese Barrieren zu passieren, so trifft es auf einen weiteren Abwehrmechanismus, nämlich das angeborene und adaptive Immunsystem. Vermittelt wird diese Abwehr durch Leukozyten, die sich aus Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems zusammensetzen. In erster Instanz reagiert das angeborene Immunsystem. Dieses ist dazu fähig Krankheitserreger schon innerhalb der ersten paar Stunden nach Kontakt mit dem Organismus zu eliminieren. Diese Art der Infektion verläuft meist unbemerkt. Wird der Erreger nicht beseitigt so kommt es zu einer lokalen Infektion, die zur Aussendung verschiedener Botenstoffe führt, wodurch weitere Effektor Mechanismen des angeborenen Immunsystems aktiviert werden. Dazu gehören das Komplementsystem, Mastzellen, Basophile, Eosinophile und phagozytierende Zellen, wie Makrophagen und NK-Zellen. NK-Zellen haben zu dem die Aufgabe, krankhaft veränderte Zellen, die für die Entstehung von Tumoren verantwortlich sind, zu erkennen und zu beseitigen. Das angeborene Immunsystem registriert wiederkehrende Strukturen von Krankheitserregern, die als pathogen assoziierte molekulare Muster bezeichnet werden (PAMP: pathogen-associated molecular pattern). Somit kann das angeborene Immunsystem die Art des Erregers identifizieren und dementsprechend viren-, bakterien-, pilz-, bzw. parasiten-spezifisch reagieren. Die Erkennung erfolgt über verschiedene Mustererkennungsrezeptoren (PRR: pattern-recognition receptor). Die Funktionen des angeborenen Immunsystems sind schematisch in Abbildung 2 dargestellt [18, 19].



**Abbildung 2**

Einleitung einer Immunantwort: Die Wiederkehrenden Strukturmerkmale von Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten werden über Mustererkennungsrezeptoren vom angeborenen Immunsystem identifiziert, woraufhin diese Zellen aktiviert werden.

Erst wenn es dem Pathogen gelingt der Beseitigung durch diese Komponenten des angeborenen Immunsystems zu entgehen wird eine adaptive Immunantwort eingeleitet. Diese zeichnet sich dadurch aus, dass sie nicht nur zwischen den verschiedenen Erregerarten unterscheidet, sondern spezifisch auf ein Pathogen reagieren kann.

### 1.3. Das Adaptive Immunsystem – Aufbau und Entwicklung

Die spezifische Erkennung eines Pathogen erfolgt durch B- und T-Lymphozyten des adaptiven Immunsystems. B-Zellen sezernieren Antikörper, die in der Lage sind lösliche Antigene zu binden und zu eliminieren, man bezeichnet dies auch als humorale Immunantwort. T-Zellen sind für die zelluläre Immunantwort verantwortlich, sie werden eingeteilt in  $CD4^+$  und  $CD8^+$  Zellen.  $CD4^+$  T-Zellen werden als T-Helfer-Zellen bezeichnet, sie sind maßgeblich für die Regulation der adaptiven Immunantwort gegen die verschiedenen Arten von Pathogenen zuständig. Die weitere Aufspaltung in unterschiedliche  $CD4^+$  T-Helfer Subtypen wird später genauer erklärt.  $CD8^+$  T-Zellen sind die sogenannten zytotoxischen T-Zellen. Zum einen eliminieren sie Zellen, die von intrazellulären Pathogen befallen sind, wie beispielsweise Viren, zum anderen sind sie für die Beseitigung von malignen Zellen zuständig, und beugen so der Tumorentstehung im Organismus vor. B-Zellen und T-Zellen entstammen beide hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks. Sowohl in ihrer Entwicklung, als auch in der Erkennung des Antigens unterscheiden sich B- und T-Lymphozyten erheblich voneinander [20].

#### 1.3.1. B-Zellen

B-Lymphozyten durchlaufen mehrere Vorläuferstadien im Knochenmark bevor sie als unreife B-Zellen dieses verlassen und weiter in die Milz wandern. Hier reifen sie zu Follikulären-, Marginalzonen-, oder B-1-B-Zellen heran. Die große Rezeptorvielfalt der B-Zellen entsteht während der frühen Entwicklung. Durch die beiden Rekombinationsenzyme RAG1 und RAG2 (recombination activating gene 1/2) werden die VDJ Genregionen, die für den B-Zell-Rezeptor codieren, umgeordnet, womit eine hohe Rezeptorvielfalt gewährleistet wird. Nach Abschluss der Genrekombination wird auf der reifen B-Zelle ein einmaliger B-Zell-Rezeptor exprimiert. Dieser ist im Stande direkt an das Pathogen zu binden. Durch diese Bindung kommt es zur Expansion der B-Zelle und im Zuge dessen zur sogenannten Somatischen Hypermutation. Bei der Somatischen Hypermutation werden durch das Enzym AICDA (activation-induced cytidine deaminase) zufällige Mutationen in das rezeptorcodierende Gen eingefügt, was zu einer höheren Affinität des Antikörpers gegenüber seinem Antigen führen kann. B-Zellen mit hoher Affinität des Rezeptors zu dem Antigen werden daraufhin positiv selektiert und reifen weiter zu Antikörper sezernierenden Gedächtnis-B-Zellen, oder Plasma-Zellen. Die Ausschüttung hochaffinen Antikörper ist zentraler Bestandteil der humoralen Immunantwort. Ferner gehören Gedächtnis-B-Zellen und Plasma-Zellen zu den langlebigen Lymphozyten, die es dem Organismus ermöglichen sehr schnell und effektiv auf das von ihnen erkannte Pathogen, im Falle einer erneuten Infektion, zu reagieren. Diese Zellen sind wichtige Bestandteile des Immunologischen

Gedächtnisses, die es dem Organismus ermöglichen einen lebenslangen Schutz, vor bereits bekämpften Krankheitserregern, aufzubauen [21].

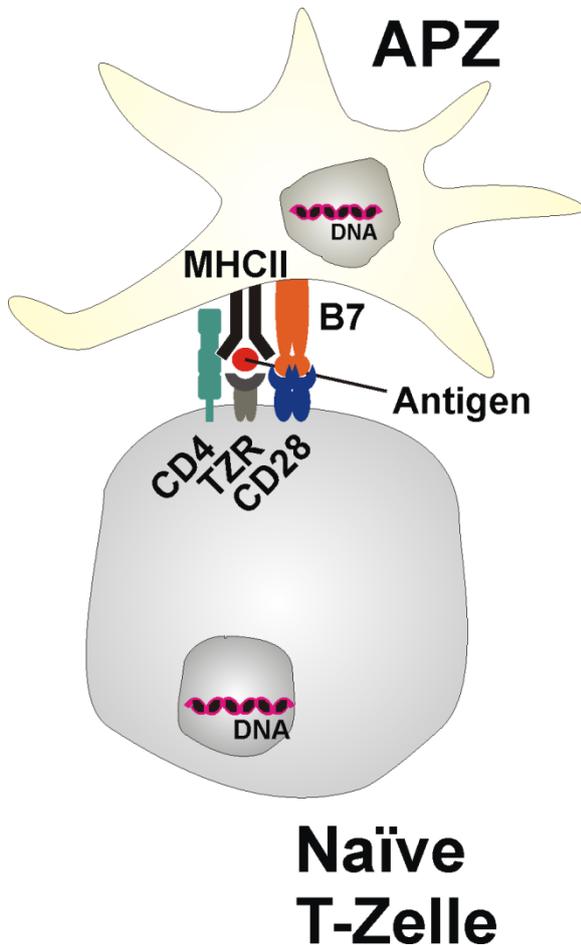
### 1.3.2. T-Zell-Entwicklung: Knochenmark, Thymus und Peripherie

Auch T-Zellen entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks, allerdings werden dort nur Vorläufer gebildet, die anschließend in den Thymus wandern, wo es zur eigentlichen Entwicklung der T-Zellen kommt. Die in den Cortex des Thymus einwandernden Vorläuferzellen tragen noch keinen T-Zell-Rezeptor (TZR) und auch keinen der kostimulatorischen Oberflächenrezeptoren CD4, oder CD8. Sie werden daher als Doppelt negativ bezeichnet (DN). Die Zellen durchlaufen vier doppelnegative Stadien in denen eine positive Selektion der Thymozyten erfolgt. Selektiert werden Thymozyten, die in der Lage sind MHC I, oder MHC II Moleküle (MHC: major histocompatibility complex) auf anderen Zellen zu erkennen. Auf diese Weise werden ca. 10 % der Zellen ausgewählt, die in der Folge einen prä-TZR tragen und entweder zu  $\alpha\beta$ -, oder  $\gamma\delta$ -T-Zellen werden. Dies geschieht beim Übergang von Stadium DN3 zu DN4 der doppelnegativen Thymozyten. Der Großteil der Zellen (90 %) geht bei der positiven Selektion in die Apoptose über. Die positiv selektierten Thymozyten befinden sich kurzweilig im Stadium intermediär unreifer einzelpositiver  $CD8^+CD4^-$ -Zellen, bevor die prä-TZR tragenden Zellen zu Doppeltpositiven (DP) Thymozyten werden. Die DP-Thymozyten migrieren, entlang von sich im Cortex des Thymus befindlichen Epithelzellen, wieder aus dem Cortex hinaus, bevor sie als  $CD4^-$ , oder  $CD8^-$  positive Zellen in die Medulla eintreten. An dieser Stelle wird die zentrale Toleranz ausgebildet. Thymozyten, die zu stark durch Autoantigene aktiviert werden erfahren negative Selektion, indem sie durch Induktion von Apoptose eliminiert werden. Hierfür werden körpereigene Antigene auf MHC I- und MHC II-Molekülen den einzelpositiven Thymozyten präsentiert und schließlich die Thymozyten ausgewählt, die nur sehr schwach mit diesen MHC-Peptid-Komplexen interagieren und durch diese Interaktion nicht aktiviert werden. Ein Schlüsselfaktor der T-Zell-Entwicklung innerhalb des Thymus ist der Notch Signalweg (Abb. 1), der, vermittelt über Zell-Zell-Kontakt, maßgeblich für die Bildung funktionierender T-Zellen mitverantwortlich ist [22]. Die Thymozyten, die diese Selektionsprozesse durchlaufen haben, werden in der Folge als naive T-Zellen in die Peripherie entlassen. Dort findet die eigentliche Immunreaktion statt.

Die Initiation der Immunantwort erfolgt durch Aufnahme von Fragmenten des Pathogen durch dendritische Zellen, die darauf hin zu den drainierenden Lymphknoten wandern. Die aufgenommenen Fragmente werden prozessiert und auf MHC-II-Rezeptoren geladen, die dann in den drainierenden Lymphknoten naiven T-Zellen präsentiert werden [23-25].

### 1.3.3. T-Helfer-Zellen

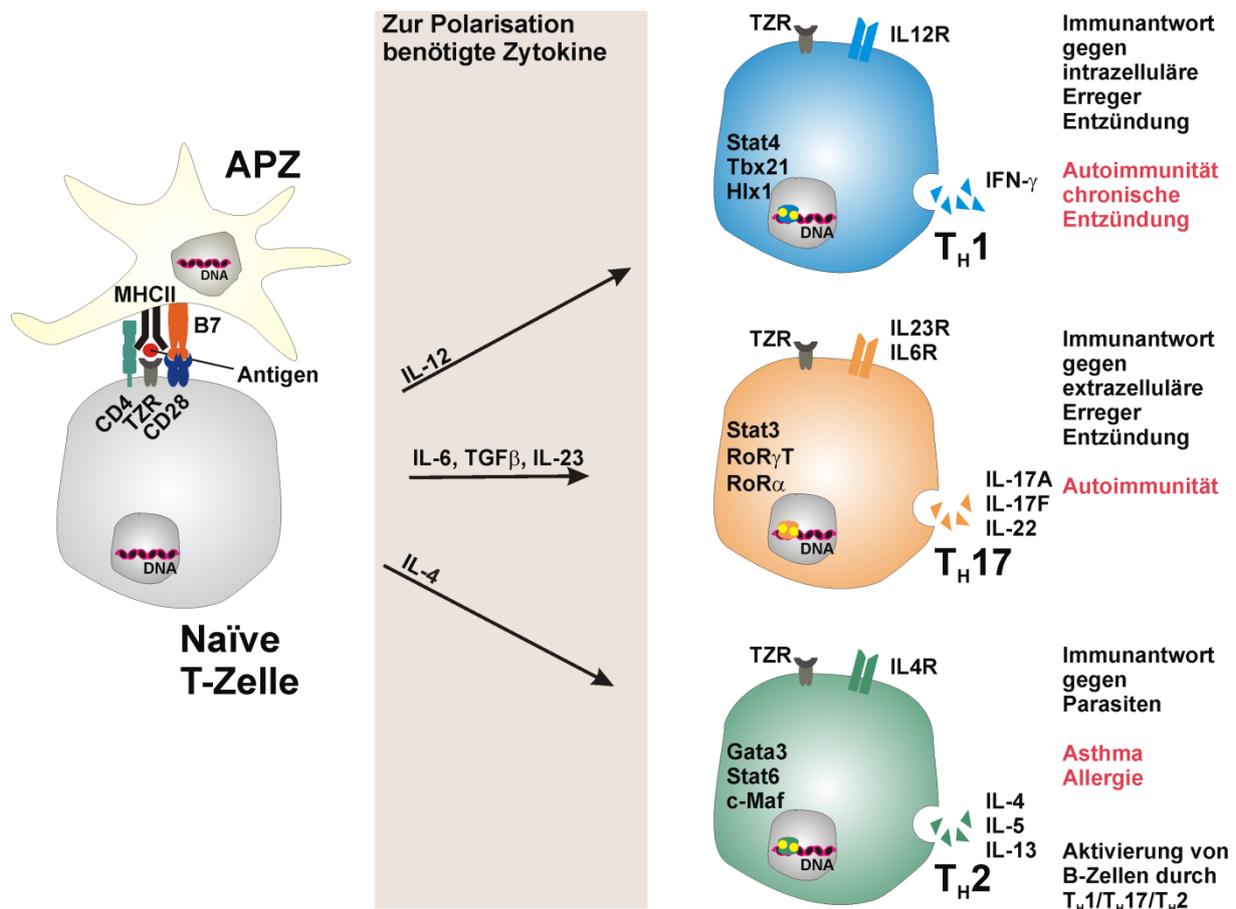
T-Helfer-Zellen sind von zentraler Bedeutung für das adaptive Immunsystem. Sie erkennen Fragmente von Pathogenen, die ihnen von antigenpräsentierenden Zellen (APZ) auf MHC-II-Molekülen in der Peripherie präsentiert werden, wodurch es zur Aktivierung der naïven T-Helfer-Zelle kommt.



**Abbildung 3**

Einleitung der adaptiven Immunantwort durch die Interaktion einer antigenpräsentierenden Zelle (APZ) und einer naïven T-Helfer-Zelle.

Wie bereits erwähnt ist die adaptive Immunantwort spezifisch für den jeweiligen Erreger, der sie auslöst. Um naïve T-Zellen bestmöglich auf die Bekämpfung des Pathogenes vorzubereiten, für das sie spezifisch sind, kommt es im Zuge der Aktivierung auch zu einer Polarisierung der T-Helfer-Zelle durch die APZ. Die Polarisierung erfolgt vor allem durch Ausschüttung von Zytokinen (Botenstoffen) der antigenpräsentierenden Zelle. Die folgende Abbildung zeigt die unterschiedlichen Effektor T-Helfer-Zellen, die zur Differenzierung nötigen Zytokine und die Art der Pathogene, die von den jeweiligen Zellen bekämpft werden.



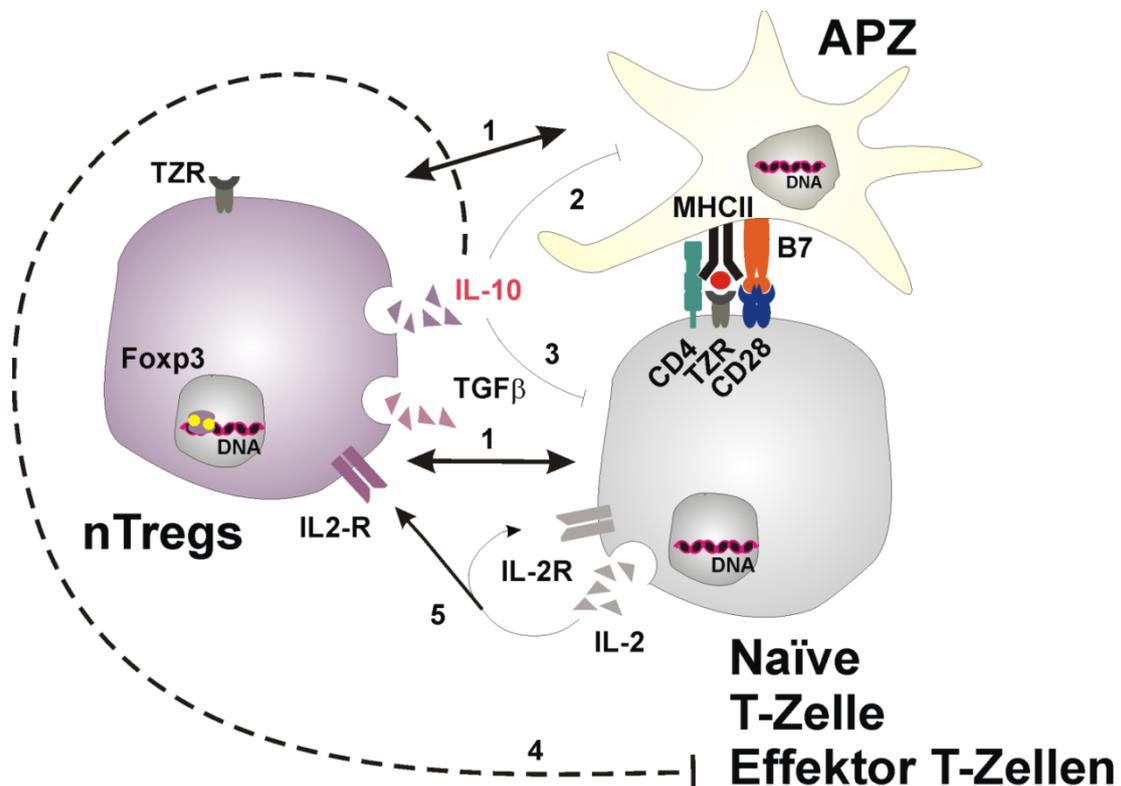
**Abbildung 4**

Naïve T-Helfer-Zellen differenzieren zu verschiedenen Effektor T-Zellen, sogenannten T-Helfer-Subsets. Je nach Herkunft des Antigens, das von der APZ präsentiert wird, schüttet diese Zytokine aus, die wiederum die naïve T-Zelle zu einem Subset differenzieren, das das Pathogen, von dem das Antigen stammt, bekämpfen kann.

Für die effektive Bekämpfung, unterschiedlicher Pathogene, ist eine strenge Regulation der Immunantwort unabdingbar. Mögliche Folgen einer Dysregulation des Immunsystems sind in Abbildung 4 (rot) aufgelistet. So kann es, neben der erwünschten Immunantwort gegen die verschiedenen Krankheitserreger, auch zu unerwünschten Folgen, wie Autoimmunität, chronischen Entzündungen, Asthma, und/oder Allergien, kommen. Das Immunsystem hat eine Reihe von Mechanismen entwickelt, um die körpereigene Abwehr zu regulieren [26-29].

## 1.3.4. Regulation der adaptiven T-Zell-vermittelten Immunantwort

Das Immunsystem bietet verschiedene Möglichkeiten, die eigene Immunantwort zu regulieren. So können zum Beispiel durch zell-intrinsische Mechanismen selbstreaktive T-Zellen eliminiert werden. Dies geschieht einerseits, durch Apoptose, während der Entwicklung im Thymus. Andererseits durch chronische Aktivierung in der Peripherie, was zur Anergie der Zellen führt. Dadurch wird eine fehlgeleitete Immunreaktion bereits vor ihrem Einsetzen unterbunden. Des Weiteren verfügt das Immunsystem über spezielle regulatorische T Zellen, die die Immunantwort kontrollieren und somit eine pathologische Immunreaktion verhindern. Diese Art der Regulation ist vor allem für bereits laufende Immunreaktionen von Bedeutung. Mechanistisch geschieht dies über Zell-Zell-Kontakt, Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine, Entziehung proliferationsfördernder Zytokine und/oder Modulation der Aktivierung antigenpräsentierender Zellen. Das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 (Abb. 5) spielt hierbei eine zentrale Rolle [30].



**Abbildung 5**

Regulation der T-Zell-Antwort am Beispiel natürlicher Regulatorischer T-Zellen (nTregs). (1) Regulation durch direkten Kontakt der antigenpräsentierenden Zelle, oder der zu aktivierenden naiven T-Zelle. Die Ausschüttung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation von Immunantworten. IL-10 vermindert die Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen (2), sowie die Reaktionsempfindlichkeit naiver T-Zellen. (4) Des Weiteren supprimiert IL-10 Effektor Zellen des angeborenen, und adaptiven Immunsystems. (5) Außerdem verfügen nTregs über einen hoch-affinen IL-2 Rezeptor, mit dem sie, dass von T-Zellen ausgeschüttete IL-2, diesen entziehen, und somit deren Proliferation hemmen.

Das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 reguliert nicht nur Zellen des Immunsystems, sondern wirkt auch protektiv auf Zellen des entzündeten Gewebes. Neben den natürlichen Regulatorischen T-Zellen sind mittlerweile auch diverse andere Quellen für IL-10 beschrieben. Die Expression konnte in etlichen T-Helfer- und T-Helfer-verwandten-Subsets, wie  $T_{H1}$ ,  $T_{H2}$ ,  $T_{H9}$ ,  $T_{H17}$ ,  $T_{H22}$ , TFH,  $T_{R1}$  und  $iT_{Reg}$  nachgewiesen werden [31, 32].

In Effektor T-Zellen ist die Sekretion von IL-10 ein entscheidender Mechanismus für die Selbstlimitierung der Immunantwort. Wie die Expression von IL-10, und somit die Limitierung der Immunantwort reguliert wird ist eine der entscheidenden Fragen, denn verschiedene Tumor- und Infektionsmodelle konnten zeigen, dass sowohl Krebszellen [33], als auch verschiedene Pathogene [34, 35], der Bekämpfung durch das Immunsystem entgehen, indem sie die Produktion von IL-10 induzieren. Daher ist es von immenser Wichtigkeit die Regulation, des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10, zu verstehen. Neben IL-10, rückt mit IL-22, mehr und mehr, ein weiteres Mitglied der IL-10-Zytokinfamilie in den Fokus, wenn es um autoregulatorische Mechanismen geht, die den Kollateralschaden, einer adaptiven Immunantwort auf den eigenen Körper, begrenzen können [36].

$T_{H1}$ -,  $T_{H17}$ - und  $T_{H22}$ -Zellen sind die in der Literatur beschriebene Quellen für IL-22 unter den Effektor-T-Helfer-Zellen [32, 37]. Im Gegensatz zu IL-10 wirkt IL-22 nicht auf hämatopoetische Zellen, sondern vor allem auf Zellen des Epithels [31, 32, 36-39]. Für das Verständnis der Regulation der beiden Zytokine ist die Identifizierung von Transkriptionsfaktoren essentiell, die an der Steuerung der Expression von IL-10 und IL-22 beteiligt sind. Für die ubiquitär exprimierten Transkriptionsfaktoren AP-1, C/EBPs, CREB, Erk, IRFs, NF- $\kappa$ B und SP-1 ist bereits anderorts ausführlich beschrieben worden [31, 32, 40, 41], wie sie an der Expressionsregulation von IL-10 mitwirken. Zu den Faktoren, die sowohl an der Regulation der IL-10-, als auch der IL-22-Expression beteiligt sind, gehören der Arylhydrocarbon Rezeptor (AhR), c-Maf, Smad, verschiedene STATs (Signal Transducer and Activator of Transcription) und der Notch Signalweg [31, 32, 37].

### 1.4. Rolle des Notch Signalwegs im Immunsystem

Während der Hämatopoese ist der Notch Signalweg wichtiger Bestandteil der T-Zell-Entwicklung-, und Reifung innerhalb des Thymus. Hier führt die Aktivierung des Signalweges zur Festlegung der Vorläuferzellen auf die T-Zell-Linie und unterdrückt die Entstehung von B-Zellen, myeloider, und dendritischer Zellen [42-44]. Jedoch führt die Aktivierung des Notch Signalweges nicht per Se zur Unterdrückung der B-Zell-Entwicklung, denn es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass es innerhalb der Milz zur Ausprägung zweier unterschiedlicher B-Zell-Subsets, durch den Notch Signalweg kommt. Nämlich zu folliculären B-Zellen und MZB-Zellen (Marginal Zone B-Zellen) [45]. Dies weist darauf hin, dass die Aktivierung des Notch Signalweges in unterschiedlichen Umgebungen, divergente Auswirkungen auf die Entwicklung einer Zelle haben kann. In diesem Zusammenhang wird in dieser Arbeit der Einfluss des Notch Signalweges auf die Polarisierung und Funktion von naiven T-Helfer-Zellen analysiert, die in der Peripherie aktiviert werden und zu T-Effektor-Zellen reifen. Hierfür wurden naive T-Helfer-Zellen *in vitro* aktiviert und polarisiert (Kapitel 3.1 und 3.2) und schließlich die Transkriptome von Zellen verglichen (Kapitel 3.11.1 und 3.11.2), die mit, und ohne Einschalten des kanonischen Notch Signalweges, kultiviert wurden. Es ist nach wie vor strittig, welchen Einfluss der Notch Signalweg auf die Polarisierung und Funktion peripherer T-Helfer-Zellen hat.

Neben der, bestens bekannten, Rolle von Notch bei der Entwicklung und Homöostase von T-Zellen, wird der Einfluss auf die Funktion und Polarisierung von T-Helfer-Zellen kontrovers diskutiert. So ist publiziert, dass der Notch Signalweg direkt unterschiedliche T-Helfer-Subsets induzieren kann. Ferner wird beschrieben, dass die Aktivierung über Delta-like-Liganden zur spezifischen Induktion von  $T_H1$ -Zellen führt und  $T_H2$ -Zellen und  $T_{regs}$  entstehen, wenn der Notch Signalweg über Jagged-Liganden angeschaltet wird [42, 46-50]. Die Idee, dass unterschiedliche Pathogene in APZs durch verschiedene TLRs (Toll-Like-Rezeptoren) erkannt werden und somit die Expression bestimmter Notch-Liganden induzieren [51], die wiederum eine spezifische Polarisierung von T-Zellen nach sich zieht, ist ansprechend. Wir konnten bereits in unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass naive T-Helfer-Zellen durchaus Notch-Liganden spezifisch (Dll-4) moduliert werden können [52], dies allerdings in Abhängigkeit von vorhandenen kostimulatorischen Signalen geschieht [53, 54]. Dass die Aktivierung des Notch Signalweges über spezifische Liganden an sich, nicht zur Polarisierung in Richtung eines bestimmten T-Helfer-Subsets führen kann, wird durch andere Arbeiten unterstützt. Da verschiedene Notch-Liganden über einen Rezeptor die Signalgebung induzieren können, verliert der Rezeptor nach Abspaltung der extrazellulären Domäne, die weiterhin mit dem Liganden assoziiert ist, die Information darüber, welcher Ligand den Signalweg ursprünglich aktiviert hat (Kapitel 1.1, Abb. 1 Schritt 2 und 3) [55].

Nichtsdestotrotz wäre es möglich, dass Notch in der Lage ist zumindest eines der zuvor beschriebenen Effektor-T-Helfer-Subsets ( $T_H1$ ,  $T_H2$ , oder  $T_H17$ ) zu induzieren, um dies genauer untersuchen zu können haben wir in dieser Arbeit in nicht-polarisierten ( $T_H0$ ),  $T_H1$ -,  $T_H2$ -, und  $T_H17$ -polarisierten Zellen die intrazelluläre Domäne von Notch3 retroviral überexprimiert, nach 5-tägiger *in vitro* Kultur die retroviral behandelten Zellen isoliert und schließlich die Expressionsprofile der Zellen analysiert. Damit sollte auf Transkriptomebene geklärt werden, ob der Notch Signalweg zu einer spezifischen T-Helfer-Zell-Polarisation in nicht-polarisierten Zellen führt, bzw. welchen Einfluss der Notch Signalweg auf die Transkriptome modulierter T-Helfer-Subsets hat.



## 2. Zielsetzung



Der Notch Signalweg ist essentiell für die Entwicklung, Homöostase und Modulation von T-Helfer-Zellen. Bezüglich der Modulation konnte bereits gezeigt werden, dass Notch, in Abhängigkeit von STAT4, zur Induktion der IL-10 Expression, und somit zur Limitierung der Immunantwort in  $T_H1$ -Zellen, führt. Für  $T_H17$ -Zellen ist beschrieben, dass die Notch vermittelte IL-22 Expressionssteigerung von STAT3 abhängt. Im Zuge dieser Arbeit sollte, durch umfassende Genexpressionsanalysen, an Hand von Notch modulierten T-Helfer-Zellen, ermittelt werden, welchen Einfluss die Aktivierung des Notch Signalweges auf die Polarisation naiver T-Helfer-Zellen hat, da nach wie vor strittig ist, ob die Aktivierung des Notch Signalweges in nicht-polarisierten T-Helfer-Zellen zu einer spezifischen Polarisation in Richtung  $T_H1$ -,  $T_H2$ -, oder  $T_H17$ -Zellen führt. Außerdem sollte erforscht werden, welchen Einfluss die Aktivierung des Notch Signalweges auf das Genexpressionsprofil in unterschiedlich polarisierten Subsets hat. Neben der Identifizierung, noch unbekannter, immunregulierender Faktoren, sollte so ermittelt werden welche Transkriptionsfaktoren durch Einschalten des Notch Signalweges mit IL-10 und IL-22 koexprimiert werden. Eine größere Auswahl immunregulierender Elemente, und ein besseres Verständnis davon, wie eine Aktivierung bekannter immunregulierender Faktoren bewerkstelligt werden kann, würde die Möglichkeiten, einer dysregulierten Immunantwort spezifisch entgegen zu wirken, ausweiten.



### **3. Methoden & Materialien**



### 3.1. Zellisolation und Sortierung

Das adaptierte Multisort Protokoll (Miltenyi Biotec) wurde für die Isolation naiver T-Helfer-Zellen ( $CD25^-CD4^+CD62L^+$ ) und MHCII<sup>+</sup> positiver Zellen verwendet. Die benutzten Volumina beziehen sich auf Zellzahlen aus insgesamt 5 Mäusen. Nachfolgende Arbeiten wurden steril durchgeführt. Zur Vorbereitung wurde ein Cellstrainer in eine mit PBS/BSA befüllte Petrischale auf Eis überführt.

Mäuse werden in einem geeigneten Behälter durch Isofluran anästhesiert und mittels zervikaler Dislokation getötet.

Die Milz, sowie die cervicalen, axillaren, mesenterialen und inguinalen Lymphknoten wurden seziiert und in den vorbereiteten Cellstrainer überführt. Als nächstes wurden Milz und Lymphknoten unter Benutzung eines Einwegspritzenstempels durch den Cellstrainer gepresst (homogenisiert). Die erhaltene Zellsuspension wird in ein 50 ml Falcon Tube überführt und mit PBS/BSA aufgefüllt und für 7 Min bei 300xg zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und es werden 1-2 ml/Maus Erythrozyten-Lyse-Puffer auf die Zellen gegeben. Die Lyse der Erythrozyten findet für 2-3 Minuten auf Eis statt. Im Anschluss wird das Falcon mit PBS/BSA aufgefüllt und die Suspension über einen Cellstrainer in ein neues Falcon überführt, danach werden die Zellen abermals gewaschen. Nachdem der Überstand abgenommen wurde werden die Zellen in 1 ml PBS/BSA aufgenommen und nun für 20 Minuten zusammen mit jeweils 5  $\mu$ l  $\alpha$ CD4-FITC und 5  $\mu$ l  $\alpha$ CD25-Biotin auf Eis inkubiert. Vor der Inkubation wurde die Suspension durchmischt. Im Anschluss wird ein Aliquot abgenommen und die Zellen gewaschen, der Überstand abgenommen und wiederum in 1 ml PBS/BSA aufgenommen bevor man 100  $\mu$ l  $\alpha$ Biotin-Beads hinzu gibt. Alles wird gut durchmischt und für 10 Minuten bei (8 °C; Wein Cooler) inkubiert und danach gewaschen. Die Zellen werden in 3 ml PBS/BSA aufgenommen und über eine LS-Säule gegeben. Die Säule wird mehrmals mit PBS/BSA gewaschen, das Eluat enthält die  $CD25^-$  Zellen. Die  $CD25^+$  Zellen auf der Säule werden im Anschluss eluiert, nachdem die Säule aus dem Magneten entfernt wurde. Von den verschiedenen Fraktionen werden wieder Aliquote aufgehoben. Die  $CD25^-$  Zellen werden gewaschen und in 1 ml PBS/BSA aufgenommen und mit 100  $\mu$ l  $\alpha$ FITC-Beads für 10 Minuten bei 8 °C inkubiert. Danach werden die Zellen abermals gewaschen und in 3 ml PBS/BSA aufgenommen. Die Zellen werden über eine LS-Säule gegeben. Das Eluat enthält die  $CD4^-$  Zellen. Die Säule wird aus dem Magneten entfernt und die  $CD4^+$  Zellen eluiert. Es wird ein Aliquot der  $CD4^+$  und der  $CD4^-$  Zellen abgenommen. Die beiden Fraktionen werden gewaschen und in jeweils 1 ml PBS/BSA aufgenommen. Die  $CD4^+$  Zellen werden in ein 15 ml Falcon überführt und 33  $\mu$ l RELEASE REAGENZ hinzugefügt und für 30 Minuten im Kühlschrank inkubiert. In der Zeit werden die

CD4<sup>-</sup> Zellen mit 100 µl MHCII-direct Beads gemischt und für 10 Minuten bei 8 °C inkubiert. Nach der Inkubation werden sie gewaschen, anschließend in 3 ml PBS/BSA aufgenommen und über eine LS-Säule gegeben. Vom Durchfluss, der die MHCII<sup>-</sup> Zellen erhält wird ein Aliquot genommen, die MHCII<sup>+</sup> Zellen werden von der Säule eluiert, nachdem diese aus dem Magneten entfernt wurde. Ein Aliquot der MHCII<sup>+</sup> Zellen wird abgenommen. Die MHCII<sup>+</sup> Zellen werden gezählt und in RPMI Medium aufgenommen, sodass sie eine Konzentration von  $1 \cdot 10^7$  MHCII<sup>+</sup> Zellen/ml haben. Die MHCII<sup>+</sup> Zellen in RPMI Medium werden auf Eis für 28 Minuten bei 30 Gray subletal bestrahlt. Während der Bestrahlung wird das Falcon der mit RELEASE REAGENZ behandelten Zellen mit PBS/BSA aufgefüllt und die gesamte Suspension über eine LS-Säule gegeben. Auf der Säule verbleiben sämtliche αFITC-Beads, das Eluat enthält die freigegebenen, mit RELEASE-REAGENZ behandelten, CD4<sup>+</sup> Zellen, die anschließend gewaschen und in 1 ml PBS/BSA aufgenommen werden. Zusätzlich kommen 100 µl αCD62L-direct Beads dazu, die Suspension wird gut vermischt und für 10 Minuten bei 8 °C inkubiert. Nach der Inkubation werden die Zellen gewaschen und danach in 3 ml PBS/BSA aufgenommen und über eine LS-Säule gegeben. Das Eluat enthält die CD62L<sup>-</sup> Zellen von denen ein Aliquot abgenommen wird. Die LS-Säule wird aus dem Magneten entfernt und die CD62L<sup>+</sup> Zellen werden eluiert. Das Eluat mit den CD62L<sup>+</sup> Zellen wird erneut über eine LS-Säule gegeben. Nach Eluation der CD62L<sup>+</sup> Zellen von der zweiten LS-Säule werden Aliquote der CD62L<sup>-</sup> und CD62L<sup>+</sup>-Zellen genommen. Die CD62L<sup>+</sup> Zellen werden gewaschen, in RPMI Medium aufgenommen und gezählt. Die zuvor genommenen Aliquote, werden mit Fluorochrome-gekoppelten Antikörpern gegen CD4, CD25, CD62L und MHCII für 10 Minuten auf Eis, inkubiert. Anschließend werden die Zellen gewaschen, in 500 µl PBS/BSA aufgenommen, 1 µl PJ dazu gegeben und durchflusszytometrisch ihre Reinheit bestimmt. Die naiven (CD25<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) T Zellen werden entsprechend ihrer Reinheit auf eine Konzentration von  $2,5 \cdot 10^6$  Zellen/ml RPMI Medium eingestellt. Naïve T Zellen, bestrahlte APZs und zusätzliches RPMI-Medium werden zu gleichen Teilen gemischt und in Zellkultur-Lochplatten ausgesät. Dem RPMI-Medium werden weitere Zytokine und Antikörper entsprechend der gewünschten Polarisation beigefügt (Kapitel 3.2).

Verwendete Mausstämme:

Mäuse	Modifikation	Quelle
Wildtyp	C57BL/6 oder Balb/c - keine	Jackson Lab
Ahr <sup>D</sup>	Defizient für Ahr	Prof. Dr. Charlotte Esser
Blimp-1 <sup>-/-</sup>	Blimp-1 <sup>fl/fl</sup> xCD4 <sup>Cre/WT</sup> CD4 Zellen Defizient für Blimp-1	Prof. Dr. Kathryn Calamé Dr. Andrey Kruglov

**Tabelle 1**

Verwendete Mausstämme für die durchgeführten *in vitro* Experimente. Die verwendeten Ahr<sup>D</sup> und Blimp-1<sup>-/-</sup> Mäuse hatten einen C57BL/6 genetischen Background. Die Tiere wurden im Tierstall des DRFZs unter Einhaltung der geltenden Tierschutzverordnung § 11 Abs.1 Nr. 1 Tierschutzgesetz gehalten.

### 3.2. Supplementierte Zellmedien (T<sub>H</sub>0, T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>17 und T<sub>H</sub>22)

Für die *in vitro* Polarisation naiver T-Zellen zu T<sub>H</sub>0-, T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2- und T<sub>H</sub>17-Zellen, werden folgende Zytokine und Antikörper dem RPMI-Medium beigefügt. Die Medien wurden dreifach konzentriert angesetzt und zu gleichen Volumenanteilen mit naiven T-Zellen (Kapitel 3.1) und subletal bestrahlten APZs (Kapitel 3.1) für die Kultivierung gemischt.

T<sub>H</sub>0-Medium:

Zytokin/Antikörper	Endkonzentration in der Kultur	Konzentration des Ansatzes
αCD3	0,5 µg/ml	1,5 µg/ml
αCD28	1,0 µg/ml	3,0 µg/ml
αIL-4	10,0 µg/ml	30,0 µg/ml
αIFN-γ	10,0 µg/ml	30,0 µg/ml
αIL-12	10,0 µg/ml	30,0 µg/ml
rIL-2	10,0 ng/ml	30,0 ng/ml

T<sub>H</sub>1-Medium:

Zytokin/Antikörper	Endkonzentration in der Kultur	Konzentration des Ansatzes
αCD3	0,5 µg/ml	1,5 µg/ml
αCD28	1,0 µg/ml	3,0 µg/ml
αIL-4	10,0 µg/ml	30,0 µg/ml
rIL-12	5,0 ng/ml	15,0 ng/ml
rIL-2	10,0 ng/ml	30,0 ng/ml

T<sub>H</sub>2-Medium:

Zytokin/Antikörper	Endkonzentration in der Kultur	Konzentration des Ansatzes
αCD3	0,5 µg/ml	1,5 µg/ml
αCD28	1,0 µg/ml	3,0 µg/ml
αIFN-γ	10,0 µg/ml	30,0 µg/ml
αIL-12	10,0 µg/ml	30,0 µg/ml
rIL-4	10,0 ng/ml	30,0 ng/ml

T<sub>H</sub>17-Medium:

Zytokin/Antikörper	Endkonzentration in der Kultur	Konzentration des Ansatzes
αCD3	0,5 µg/ml	1,5 µg/ml
αCD28	1,0 µg/ml	3,0 µg/ml
αIL-4	10,0 µg/ml	30,0 µg/ml
αIFN-γ	10,0 µg/ml	30,0 µg/ml
rIL-6	20,0 ng/ml	60,0 ng/ml
rIL-23	10,0 ng/ml	30,0 ng/ml
rTGF-β	2,0 ng/ml	6,0 ng/ml

T<sub>H</sub>22-Medium:

Zytokin/Antikörper	Endkonzentration in der Kultur	Konzentration des Ansatzes
αCD3	0,5 µg/ml	1,5 µg/ml
αCD28	1,0 µg/ml	3,0 µg/ml
αIL-4	10,0 µg/ml	30,0 µg/ml
αIFN-γ	10,0 µg/ml	30,0 µg/ml
rIL-6	20,0 ng/ml	60,0 ng/ml
rIL-23	10,0 ng/ml	30,0 ng/ml

### 3.3. Retrovirus Generierung in HEK293T Zellen

Ein komplettes Röhrchen kryokonservierter HEK293T Zellen wird in 30 ml DMEM aufgenommen und in einer Zellkulturflasche für adhärente Zellen ausgesät. Die HEK293T Zellen werden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Alle 2-3 Tage werden die Zellen aufgeteilt, um sie zu expandieren, bzw. die Kultur bei angemessener Dichte weiter zu führen. Die Aufteilung der Zellen erfolgt nach folgendem Schema:

1. Das Medium über den Zellen wird vorsichtig abgesaugt.
2. Die Zellen werden sachte mit 5 ml vorgewärmten PBS gewaschen. Bei diesem Schritt sollen sich die Zellen nicht lösen. Anschließend das PBS wieder absaugen.
3. Es werden 3 ml Trypsin EDTA auf die Zellen gegeben, die Zellen kurz geschwenkt, und dann für 3 min bei 5% CO<sub>2</sub> und 37 °C im Inkubator inkubiert.
4. Anschließend werden die Zellen mit 10 ml DMEM abgespült und in einem 50 ml Falconröhrchen aufgenommen. (Gesamtvolumen 13 ml)
5. Für die Weiterführung der Zellen werden 3 ml der mit Trypsin behandelten Zellen, die mit DMEM abgespült wurden mit 27 ml vorgewärmten DMEM verdünnt und in einer Zellkulturflasche für adhärente Zellen überführt.
6. Bestimmung der Zellzahl lebendiger HEK293T mittels Neubauer Zählkammer.

Für die Generierung des Virusüberstandes werden HEK293T Zellen in DMEM in einer Dichte von  $4 \cdot 10^5$ /ml in 10 cm Ø Zellkulturschalen ausgesät (10 ml mit  $4 \cdot 10^6$  Zellen/Zellkulturschale). 24 Stunden später, wenn die Zellen eine Konfluenz von 70% – 80% erreicht haben, werden sie mit verschiedenen Plasmiden mittels der Calciumphosphat-Methode transfiziert. Die Transfektionslösung für die HEK293T Zellen wird kurz vorher vorbereitet. Dazu werden 1,5 ml bidest. H<sub>2</sub>O, 400 µl 1,25 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung (steril filtriert), 20 µl pCGP, 20 µl pEco und 40 µl Überexpressionsplasmid in einem FACS-Tube gemischt (Die Plasmide sind in Tabelle 2 aufgeführt). Unter ständigem Einleiten von Luft werden 2 ml 2x HBS Puffer tropfenweise dazu gegeben. Die Luft wird mittels eines Pipetboys, eingestellt auf die niedrigste Stufe, und einer langen Pasteurpipette in das FACS-Röhrchen eingeleitet. Die Transfektionslösung sollte sich leicht eintrüben. Von der Transfektionslösung werden 2 ml/Zellkulturschale verwendet indem sie tropfenweise auf die HEK293T Zellen gegeben werden. Die Zellen werden für 4 Stunden inkubiert und anschließend vorsichtig zweimal mit 10 ml vorgewärmten PBS gewaschen bevor sie 10 ml neues vorgewärmtes DMEM bekommen. Die HEK293T Zellen werden für weitere 48 Stunden inkubiert bevor der Virusüberstand geerntet werden kann. Der Virusüberstand wird mit einem 0,45 µm Filter steril filtriert und abschließend mit HEPES gepuffert (Endkonzentration 10 mM).

Bezeichnung	Überexpressionsplasmid	Funktion	Quelle
Notch	pMy-N3IC-IRES-GFP	konstitutive Aktivierung und Expression von N3IZD und GFP	Dr. K. Hozumi [56]
c-Maf	pMy-c-Maf-IRES-GFP	konstitutive Aktivierung und Expression von c-Maf und GFP	Genentech
Kontrolle	pMy-IRES-GFP	Expression von GFP	Dr. K. Hozumi [56]
Strukturplasmid für den Retrovirus	pCGP	Codiert für <i>gag</i> und <i>pol</i> , die entscheidend für Struktur- und Enzym-Proteine sind. Wodurch die Integration ins Wirtsgenom ermöglicht wird.	Dr. K. Murphy [57]
Verpackungsplasmid für den Retrovirus	pEco	Codiert für das Glykoprotein <i>env</i> , das wichtiger Bestandteil der Verpackung des Viruspartikels ist.	Dr. K. Murphy [57]

**Tabelle 2**

Verwendete Plasmide zur Generierung retroviraler Partikel. Das Verpackungsplasmid (pEco) und das für die retrovirale Integration und Struktur verantwortliche Plasmid (pCGP) wurden für alle Ansätze verwendet. Für die Überexpression von Notch, c-Maf und der Kontrolle wurden die jeweiligen Überexpressionsplasmide in einem Virus verpackt.

### 3.4. N3IZD und c-Maf Überexpression

Um ein konstitutiv aktives Notch Signal in den CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen anzuschalten, werden diese mit einem Retrovirus transfiziert, dessen Genom, die Codierung für die intrazelluläre Domäne des Notch3 Rezeptors (N3IZD) trägt. Des Weiteren codiert das retrovirale Genom für GFP (green fluorescent protein; grün fluoreszierendes Protein). Auf diese Weise können Zellen sortiert werden die einem konstanten Notch Signal ausgesetzt sind (GFP<sup>+</sup>). N3IZD und GFP sind durch eine IRES site (Internal Ribosome Entry Site; interne ribosomale Eintrittsstelle), voneinander getrennt. Dementsprechend verläuft die konstitutive Aktivierung von c-Maf durch Überexpression des c-Maf codierenden Plasmids. Die verwendeten Plasmide und deren Funktion sind in Tabelle 2 (Kapitel 3.3) aufgeführt. Parallel dazu werden Zellen mit einem Kontrollplasmid transfiziert, das nur die Codierung für GFP trägt. Durch vergleich Kontrolle transfizierter und Notch, bzw. c-Maf transfizierter Zellen (jeweils Sortierung der GFP<sup>+</sup> Zellen) hat man nun die Möglichkeit Faktoren zu identifizieren die entweder durch den Notch Signalweg, oder c-Maf reguliert werden. Außerdem wird durch den gleichen Applikationsweg der Plasmide der Effekt der retroviralen Transfektion beim Vergleich der Zellen eliminiert.

Für die Infektion der primären Zellen wird der Virusüberstand mit 8 µg/ml Polybren versetzt. Der Überstand der primären Zellen wird nach 24 Stunden Kultur (T<sub>H0</sub>, T<sub>H1</sub>, T<sub>H2</sub> oder T<sub>H17</sub>) vorsichtig abgenommen und durch eine entsprechende Menge Virusüberstand ersetzt. Der Überstand der Primärkultur wird im Inkubator aufbewahrt, währenddessen der Virusüberstand für 75 Minuten bei 300xg und 32 – 34 °C auf die Zellen zentrifugiert wird. Die Zentrifugation wird ohne Bremse gefahren. Die Zentrifuge sollte bereits zuvor vorgewärmt werden. Danach wird der Virusüberstand wieder entfernt und durch den alten Überstand ersetzt. Der verwendete Virusüberstand wird abschließend vernichtet.

### 3.5. Restimulation, Fixierung und Färbung von T-Zellen

Die *in vitro* kultivierten Zellen werden gewaschen und anschließend in frischem RPMI Medium aufgenommen. Die Zellen werden in einer Dichte von  $5 \cdot 10^6$ /ml ausgesät. Die Restimulation erfolgt über 5 Stunden im Inkubator bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> mit 1 µg/ml Ionomycin und 0,01 µg/ml PMA. Nach einer Stunde Inkubationszeit werden 5 µg/ml Brefeldin A dazu gegeben, um die Ausschüttung intrazellulärer Zytokin zu verhindern. Im Anschluss werden die Zellen mit PBS gewaschen. Eine Lebend-Tod Färbung (LIVE/DEAD® Invitrogen) erfolgte vor der Fixierung der Zellen. Die Zellen werden mit 2% para-Formaldehyd in PBS für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Der Stopp der Fixierung erfolgt durch Zugabe des 10fachen Volumens PBS/BSA. Letztlich werden die Zellen zentrifugiert, der Überstand abgenommen, und die Zellen erneut in 1 ml PBS/BSA/Azid aufgenommen.

Für Lebende Zellen ohne Fixierung wurde Pi (Propidiumiodid), zum Anfärben toter Zellen verwendet.

Für die anschließende durchflusszytometrische Analyse, wurden entsprechend der zu analysierenden Faktoren, Färbelösungen mit Fluoreszenz gekoppelten Antikörpern (Kapitel 3.16.3 Tabelle 9) vorbereitet. Die Antikörper wurden zuvor titriert und entsprechend verdünnt. Für die intrazellulären Färbungen erfolgte die Verdünnung mit 0,5 % Saponin-Lösung in PBS/BSA. Für Oberflächenfärbungen wurde ausschließlich PBS/BSA für die Verdünnungen verwendet.

Für die intranukleäre Färbung von pErk wurden die Puffer und das Protokoll von BD Bioscience verwendet (BD Phosflow™).

### 3.6. Durchflusszytometrie

Zellen werden mittels hydrodynamischer Fokussierung in einem Flüssigkeitsstrom vereinzelt und können dann mit Lasern definierter Wellenlängen charakterisiert werden. Beim Passieren des Lasers löst die Zelle eine Vorwärtsstreuung und eine Seitwärtsstreuung des Lichtes aus. Die Vorwärtsstreuung (FSC; forward scatter) korreliert mit der Größe der Zelle und die Seitwärtsstreuung (SSC; side scatter) gibt Aufschluss über die Membranfaltung und die Granularität der Zelle. Des Weiteren können mit Hilfe Fluoreszenz gekoppelter Antikörper Bestandteile der Zelle sichtbar gemacht werden (Oberflächenrezeptoren, intrazelluläre Moleküle, DNA und Membranbestandteile). Die in dieser Arbeit verwendeten FACS Geräte verfügen über mindestens zwei Laser, die die Fluorochrome mit Licht definierter Wellenlänge, über Glasfaserkabel, Strahlformungsoptik und eine achromatisch fokussierende Linse, anregen (Radbruch, Springer Lab Manuals, 2nd ed. 2000).

Laser	Wellenlänge (nm)
Coherent Sapphire Solid State	488 (blau)
JDS Uniphase HeNe Air Cooled	633 (rot)
Point Source Violet Solid State	407 (violett)

#### Tabelle 3

Das FACS Aria ist mit bis zu drei Lasern unterschiedlicher Wellenlänge ausgestattet, die die verwendeten Fluorochrome anregen.

Die Fluorochrome werden entsprechend ihres Absorptionsspektrums durch die Laser angeregt und emittieren in der Folge Licht größerer Wellenlänge, das über Fluoreszenz objektiv Linsen gebündelt wird. Emittiertes Licht der höchsten Wellenlänge wird auf das erste Photomultiplerröhrchen (Photomultiplier tube; PMT) weitergeleitet und Licht niedrigerer Wellenlänge über eine Reihe dichroiter Spiegel (LP Filter) und Bandpassfilter (BP Filter) auf nachgeschaltete Photomultiplerröhrchen umgelenkt. Hierbei gilt; Je kürzer die Wellenlänge, desto später wird sie detektiert. In der folgenden Tabelle sind die Standardeinstellungen für den FACS Aria aufgelistet. Eine Anpassung erfolgt entsprechend der verwendeten Fluorochrome.

Laser	PMT	LP Filter	BP Filter	Farbstoff
Octagon (488-nm blauer Laser)	A	735	780/60	PE-Cy7
	B	655	695/40	PerCP-Cy5.5 oder PI
			675/20	PerCP
	C	595	610/20	PE-Texas Red
	D	556	575/26	PE oder PI
			585/42	PE/PI wenn kein PE-Texas Red verwendet wird.
E	502	530/30	FITC	
F	-	-	488/10	Seitwärtsstreuung (SSC)
Trigon (633-nm roter Laser)	A	735	780/60	APC-Cy7
	B	-	660/20	APC
Trigon (407-nm violetter Laser)	A	502	530/30	AlexaFluor430®, Hoeschst
	B	-	450/40	

Tabelle 4

Auflistung des Detektionsspektrums. Die angeregten Farbstoffe emittierten, Strahlung der Wellenlängen 450-780 nm.

Die durch die Photomultiplerröhrchen detektierten Signale werden mittels der FACSDiVa Software analysiert. Die Software bildet die Zellen entsprechend ihrer Vorwärtsstreuung, Seitwärtsstreuung und der emittierten Fluoreszenzen als Punktwolken ab. Durch das Setzen von Analysefenstern (gates) kann man bestimmen, welche Zellen sortiert werden sollen.

Für die Sortierung wird der Flüssigkeitsstrom so beeinflusst, dass die einzelnen Tropfen des Flüssigkeitsstroms elektrisch aufgeladen werden, wenn die Zelle innerhalb des Tropfens, die Vorwärtsstreuung, Seitwärtsstreuung und emittierten Fluoreszenzen besitzen, die sortiert werden sollen. Der geladene Tropfen wird dann durch zwei Deflektor Platten, entweder in die eine, oder andere Richtung abgelenkt. Trägt eine Zelle nicht die definierten Parameter (FSC, SSC, und Fluoreszenzen), dann wird der Tropfen nicht geladen und somit die Zelle auch nicht durch die Deflektoren abgelenkt. Diese Zellen fließen durch und werden in einem Abfallbehälter aufgefangen.

Die Analyse (ohne Sortierung) erfolgt analog, es findet jedoch keine Aufladung der Zellen zur Deflektion statt. Eine ausführliche Beschreibung der angewandten Methode ist im Handbuch (Radbruch, Springer Lab Manuals, 2nd ed. 2000), und in den jeweiligen Handbüchern der verwendeten Geräte, dargestellt. Für das Sortieren von Zellen wurde das FACSAria (BD), oder FACSArialI (BD) verwendet. Die Analyse der Zellen erfolgte am FACSCanto, LSR Fortessa oder am LSR II (BD) (Besonderer Dank gilt hier Toralf Kaiser und Jenny Kirsch).

Für die intrazelluläre Färbung werden fixierte Zellen (Kapitel 3.5) verwendet

Vorbereiten: 0,5% Saponin (v/v) in PBS/BSA. 45 ml PBS/BSA + 5 ml 5% Saponin-Lösung.  
Eppendorf Gefäße (Eppis) für die zu messenden Zellen, Einzelfärbungen und ungefärbte Zellen vorbereiten.

Aliquote der zu messenden Zellen (ca. 100 µl) in eines der vorbereiteten Eppis geben.  
Anschließend 1 ml 0,5% Saponin-Lösung auf die Zellen geben und kurz vortexen. Zellen runter zentrifugieren: 2300 rpm (Tischzentrifuge) für 7 Minuten.

Färbe Mix vorbereiten:

- (Anzahl der Proben + 1) \* 100 µl 0,5% Saponin-Lösung vorlegen

Anschließend die Antikörper entsprechend ihrer Verdünnung dazu geben.

Überstand der zentrifugierten Zellen absaugen. Die Zellen in jeweils 100 µl Färbe Mix färben.  
Die Zellen der Einzelfärbungen und der ungefärbten Zellen in jeweils 100 µl 0,5% Saponin-Lösung aufnehmen. Für die Einzelfärbungen den jeweiligen Antikörper entsprechend seiner Verdünnung dazu geben.

Kurz vortexen

15 Minuten bei RT (lichtgeschützt färben)

1 ml 0,5% Saponin-Lösung dazugeben.

Zellen runter zentrifugieren: 2300 rpm (Tischzentrifuge) für 7 Minuten.

Überstand absaugen.

Zellen in 300 µl PBS/BSA aufnehmen.

Durchflusszytometrisch analysieren.

### 3.7. Adaptiertes ELISA-Protokoll (eBioscience) für IL-10 und IL-22

#### IL-10 ELISA von eBioscience

Der Beschichtungspuffer muss vor dem ersten Gebrauch steril filtriert werden (0,22 µm)

- Beschichtung bei 4 °C über Nacht. Mit Beschichtungspuffer und capturing Antikörper 1:2000 (**1:400**) verdünnt werden 96-Lochplatten mit 50 µl pro Vertiefung befüllt.
- 5x waschen mit PBS + 0,05% Tween. (oder Programm #5 ELISA-washer).
- Blockierung mit 1x Assay diluent 100 µl pro Vertiefung bei Raumtemperatur für 1 Stunde.
- 5x waschen mit PBS + 0,05% Tween. (oder Programm #5 ELISA-washer).
- Standard und Proben: 100 µl Standard (7 Verdünnungen) oder Probe pro Vertiefung. Jeweils mindestens Doppelwerte und 3-4 Verdünnungen pro Probe. Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler.
- 5x waschen mit PBS + 0,05% Tween. (oder Programm #5 ELISA-washer).
- Vorbereiten: Detektionsantikörper verdünnen 1:1000 mit 1x Assay diluent. 100 µl pro Vertiefung. Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler.
- 5x waschen mit PBS + 0,05% Tween. (oder Programm #5 ELISA-washer)
- Vorbereiten: Avidin-HRP verdünnen 1:250 (**1:400**) in 1x Assay diluent. 100 µl pro Vertiefung. Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler.
- 10x (**7x**) waschen mit PBS + 0,05% Tween. (oder Programm #5 ELISA-washer 3 mal)
- TMB Substrat 50 µl pro Vertiefung Inkubation max. 15 Minuten bei Raumtemperatur.

Stopp der Reaktion durch Hinzufügen von 50 µl 12,5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Messung erfolgt am ELISA Reader bei 450 nm, und 450 nm – 650 nm Wellenlängen.

Der IL-22 ELISA funktioniert analog dazu, nur das entsprechend andere Standards, capturing und Detektionsantikörper verwendet wurden. Außerdem gelten entsprechend die fett gedruckten Verdünnungen, bzw. Anzahl an Waschschrinen in Klammern. Der Beschichtungspuffer des IL-22 ELISAs musste nicht steril filtriert werden.

### 3.8. Zytokin Sekretions Assay für IL-10 und IL-22 (Miltenyi Biotec)

Für die FACS-Sortierung IL-10-, bzw. IL-22-sekretierender Zellen:

- Lebende T-Helfer-Zellen werden mittels Ficoll aus der *in vitro* Kultur isoliert.
- Lebende Zellen ( $5 \cdot 10^6$ /ml) werden für 3h mit PMA/Ionomycin restimuliert.
- Zellen werden gewaschen und anschließend für 5 Minuten auf Eis mit „Catch“-Reagent für das jeweilige Zytokin inkubiert.
- Zellen werden bei einer Konzentration von  $1 \cdot 10^5$  Zellen/ml (5-10% Zytokin sekretierende Zellen) für 45 Minuten bei 37 °C rotierend inkubiert. Bei höheren Frequenzen Zytokin sekretierender Zellen müssen die Zellen weiter verdünnt (IL-10), oder mit nicht sekretierenden Zellen (IL-22) auf die geeignete Frequenz eingestellt werden.
- Nach der Sekretionsphase werden die Zellen gewaschen.
- Das aufgefangene Zytokin wird auf der Zelloberfläche durch einen weiteren Antikörper, Fluoreszenz markiert ist, gefärbt. Des Weiteren wird CD4 gefärbt. Färbung erfolgt auf Eis für 10 Minuten.
- Die Zellen werden erneut gewaschen.
- Vor der FACS Sortierung werden den Zellen 1 µl PJ/Ansatz beigefügt, um tote Zellen von der Sortierung auszuschließen.

Der IL-10 Secetion Assay (Order No. 130-090-435) ist im Data Sheet von Miltenyi Biotec ausführlich beschrieben. Für den IL-22 SA wurde in Kooperation mit Miltenyi Biotec der entsprechende Assay etabliert. Die Antikörper wurden von eBiocscience erworben und durch Miltenyi Biotec entsprechend modifiziert. Für den IL-22 Assay wurden *in vitro* generierte Notch modulierte T<sub>H</sub>17-Zellen verwendet.

### 3.9. mRNA Isolation, Reverse Transkription und Real-time PCR

Die mRNA wurde mittels des mRNA Midi Kits (72041) von Quiagen aus den Zellen isoliert. Es wurde entsprechend dem Herstellerprotoll verfahren.

Für die reverse Transkription wurde das TaqMan® Kit (N8080234) von Invitrogen™ entsprechend dem Protokoll verwendet. Die Ansätze wurden auf Eis präpariert.

Die Reaktion der reversen Transkription fand in einem Thermocycler von Thermo Fisher unter Verwendung des folgenden Programms statt:

10 Minuten 25 °C

40 Minuten 48 °C

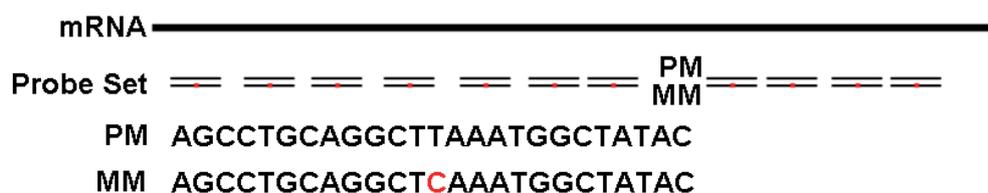
5 Minuten 95 °C

Pause 4 °C

Die so generierte cDNA wurde abschließend mittels real-time PCR (Brilliant II SYBR® Green) quantifiziert. Als Referenz wurde jeweils die Expression von UBC in den Zellen mit quantifiziert. Die Annealing-Temperatur und die verwendete MgCl<sub>2</sub> Konzentration wurde entsprechend der verwendeten Primer modifiziert (siehe Kapitel 3.16.2, Tabelle 8).

### 3.10. Aufnahme und Ausgabe der Transkriptome

Zunächst eine kurze Einleitung zur Generierung und Analyse der Transkriptome, die mit Hilfe des GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Arrays von Affymetrix erfolgte. Das Auslesen der Signale geschah durch das GeneChip® Scanner 3000 7G System unter Verwendung der GeneChip® Operating Software (GCOS) v1.1.1. Auf dem GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array befinden sich 45101 Probe Sets. Diese decken das Transkriptom einer murinen Zelle ab und bieten darüber hinaus verschiedene Kontrollen der Analyse. Eine ausführliche Beschreibung der Methode und der verwendeten Geräte finden sich auf der Affymetrix Homepage (<http://www.affymetrix.com>), (Data Sheets: GeneChip® Mouse Genome Array, Affymetrix GeneChip® Scanner 3000 7G, [http://www.affymetrix.com/partners\\_programs/programs/developer/gcos\\_sdk/gcos\\_sdk\\_overview.affx#1\\_1](http://www.affymetrix.com/partners_programs/programs/developer/gcos_sdk/gcos_sdk_overview.affx#1_1)). Jedes Probe Set beinhaltet 11 unterschiedliche Probenpaare, die das zu detektierende Transkript binden (Abb. 6).



#### Abbildung 6

Aufbau eines Probe Sets des GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Arrays von Affymetrix. Das Probe Set besteht aus 11 Probenpaaren. Jedes Probenpaar besteht aus einem „Perfect Match“ (PM) und einem „Miss Match“ (MM) Oligonukleotid aus 25 Basen, das die hybridisierte prozessierte mRNA eines spezifischen Transkriptes detektiert.

Die 25 Basen des PM Oligonukleotides sind hierbei komplementär zu einer Sequenz des zu detektierenden Transkriptes. Die Spezifität eines Probenpaares wird ermittelt indem die Signalintensitäten der PM und MM Nukleotide miteinander verglichen werden. Ist die Folgende Bedingung erfüllt, dann gilt das Signal des Probenpaares als spezifisch:

$$R > \tau \text{ für } \tau = 0,015$$

$$R_i = \frac{PM_i - MM_i}{PM_i + MM_i}$$

#### Formel 1

Die Bedingung  $R > \tau$  für  $\tau = 0,015$  ist gegeben wenn der Unterschied der Signalintensitäten  $PM_i - MM_i \geq 3\%$  ist. Der Grenzwert  $\tau$  entspricht hierbei den vordefinierten Grundeinstellungen. Eine Erhöhung des Grenzwertes  $\tau$  verringert einerseits die Detektion falsch Positiver Werte, führt aber auch zu mehr falsch Negativen Werten. Des Weiteren berechnet die GeneChip® Operating Software (GCOS) unter Verwendung des Rangsummentest von Wilcoxon für gepaarte Stichproben (PM und MM) die

Detektionswahrscheinlichkeit (detection p-Value) jedes einzelnen Probe Sets an Hand der Resultate der 11 Probenpaare. Dadurch wird letztendlich jedem Signal ein Detektionswahrscheinlichkeitswert (detection p-Value) zugewiesen. Der Wert der Detektionswahrscheinlichkeit wird zusätzlich durch ein „Present Call“ ausgedrückt. Ein Signal gilt als vorhanden (present), wenn der p-Value  $< 0,04$  ist, als marginal wenn gilt  $0,04 \leq \text{p-Value} \leq 0,06$  und als nicht vorhanden (absent) wenn der p-Value  $> 0,06$  ist (ausführlich beschrieben im Affymetrix Statistical Algorithms Reference Guide, online abrufbar: [media.affymetrix.com/support/technical/technotes/statistical\\_reference\\_guide.pdf](http://media.affymetrix.com/support/technical/technotes/statistical_reference_guide.pdf)).

Die Aufbereitung der zu analysierenden mRNA, sowie die Hybridisierung auf den Affymetrix-Chip, wurden in der DRFZ internen Einrichtung durchgeführt. Besonderer Dank gilt hier Heidi Schliemann. Das Auslesen der Chipdaten und die Bedienung der Affymetrix-Software wurde durch die Abteilung Bioinformatik durchgeführt. Besonderer Dank gilt hier Joachim Grün.

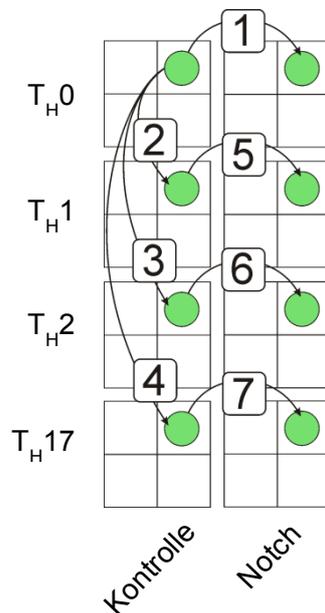
Die Rohdaten der Transkriptome werden schließlich in Tabellenform ausgegeben, exemplarisch ist hier das Signal für das IL-10 Transkript in nicht-modulierten  $T_H1$ -Zellen dargestellt.

Probe Set	Gensymbol	Signal Intensität (SI)	Detektionswahrscheinlichkeit (p-Value)
1450330_at	IL-10	1176,5	0,000244

**Tabelle 5**

Das Probe Set, das aus 11 verschiedenen Oligonukleotiden aufgebaut ist erkennt einen Teil des mRNA Transkriptes. Hier am Beispiel des IL-10 Genes. Da etliche Transkripte auf dem Chip von mehreren unterschiedlichen Probe Sets detektiert werden, hat jedes dieser Probe Sets einen Identifikator (Beispiel IL-10: 1450330\_at). Die ausgegebene Signal Intensität ist eine arbiträre Größe die keinen direkten Aufschluss über die Menge des detektierten Transkriptes gibt. Sie bietet lediglich die Möglichkeit des Vergleichs mit einer entsprechenden Kontrollbedingung. Die Detektionswahrscheinlichkeit (p-Value) gibt an, ob es sich um ein spezifisches, oder zufälliges Signal handelt. Das obige Beispiel entstammt dem Datensatz nicht-modulierter  $T_H1$ -Zellen ( $KT_{H1A}$ ). Eine Auflistung der analysierten Transkriptome findet sich in der nachfolgenden Tabelle 6.

Basierend auf den gemessenen Transkriptomen wurden für die folgenden Vergleiche in Abbildung 7 die Fold Changes für die signifikant regulierten Transkripte ermittelt. Die Transkriptome lagen jeweils als Duplikate vor.



Es wurden insgesamt sieben Einzelvergleiche durchgeführt, für die jeweils ein Fold Change pro Signal ermittelt wurde:

1. Kontrolle  $T_{H0}$ -Zellen gg. Notch  $T_{H0}$ -Zellen
2. Kontrolle  $T_{H0}$ -Zellen gg. Kontrolle  $T_{H1}$ -Zellen
3. Kontrolle  $T_{H0}$ -Zellen gg. Kontrolle  $T_{H2}$ -Zellen
4. Kontrolle  $T_{H0}$ -Zellen gg. Kontrolle  $T_{H17}$ -Zellen
5. Kontrolle  $T_{H1}$ -Zellen gg. Notch  $T_{H1}$ -Zellen
6. Kontrolle  $T_{H2}$ -Zellen gg. Notch  $T_{H2}$ -Zellen
7. Kontrolle  $T_{H17}$ -Zellen gg. Notch  $T_{H17}$ -Zellen

**Abbildung 7**

Schematische Darstellung der durchgeführten Einzelvergleiche Notch modulierter T-Helfer-Zellen. Überblick der Untersuchten Transkriptome (grün), für die in der Folge die Fold Changes in insgesamt sieben Vergleichen berechnet wurden.

Chip #	Transkriptom von:	Bezeichnung
1	T <sub>H</sub> 0 polarisierte Zellen mit Kontrollplasmid transfiziert (A)	KT <sub>H</sub> 0 <sub>A</sub>
2	T <sub>H</sub> 0 polarisierte Zellen mit Kontrollplasmid transfiziert (B)	KT <sub>H</sub> 0 <sub>B</sub>
3	T <sub>H</sub> 0 polarisierte Zellen mit Notch transfiziert (A)	NT <sub>H</sub> 0 <sub>A</sub>
4	T <sub>H</sub> 0 polarisierte Zellen mit Notch transfiziert (B)	NT <sub>H</sub> 0 <sub>B</sub>
5	T <sub>H</sub> 1 polarisierte Zellen mit Kontrollplasmid transfiziert (A)	KT <sub>H</sub> 1 <sub>A</sub>
6	T <sub>H</sub> 1 polarisierte Zellen mit Kontrollplasmid transfiziert (B)	KT <sub>H</sub> 1 <sub>B</sub>
7	T <sub>H</sub> 1 polarisierte Zellen mit Notch transfiziert (A)	NT <sub>H</sub> 1 <sub>A</sub>
8	T <sub>H</sub> 1 polarisierte Zellen mit Notch transfiziert (B)	NT <sub>H</sub> 1 <sub>B</sub>
9	T <sub>H</sub> 2 polarisierte Zellen mit Kontrollplasmid transfiziert (A)	KT <sub>H</sub> 2 <sub>A</sub>
10	T <sub>H</sub> 2 polarisierte Zellen mit Kontrollplasmid transfiziert (B)	KT <sub>H</sub> 2 <sub>B</sub>
11	T <sub>H</sub> 2 polarisierte Zellen mit Notch transfiziert (A)	NT <sub>H</sub> 2 <sub>A</sub>
12	T <sub>H</sub> 2 polarisierte Zellen mit Notch transfiziert (B)	NT <sub>H</sub> 2 <sub>B</sub>
13	T <sub>H</sub> 17 polarisierte Zellen mit Kontrollplasmid transfiziert (A)	KT <sub>H</sub> 17 <sub>A</sub>
14	T <sub>H</sub> 17 polarisierte Zellen mit Kontrollplasmid transfiziert (B)	KT <sub>H</sub> 17 <sub>B</sub>
15	T <sub>H</sub> 17 polarisierte Zellen mit Notch transfiziert (A)	NT <sub>H</sub> 17 <sub>A</sub>
16	T <sub>H</sub> 17 polarisierte Zellen mit Notch transfiziert (B)	NT <sub>H</sub> 17 <sub>B</sub>
17	T <sub>H</sub> 1 polarisierte Zellen mit Kontrollplasmid transfiziert IL-10 positive Zellen nach Sekretions Assay	KT <sub>H</sub> 1 <sub>IL10+</sub>
18	T <sub>H</sub> 1 polarisierte Zellen mit Kontrollplasmid transfiziert IL-10 negative Zellen nach Sekretions Assay	KT <sub>H</sub> 1 <sub>IL10-</sub>
19	T <sub>H</sub> 1 polarisierte Zellen Notch transfiziert IL-10 positive Zellen nach Sekretions Assay	NT <sub>H</sub> 1 <sub>IL10+</sub>
20	T <sub>H</sub> 1 polarisierte Zellen Notch transfiziert IL-10 negative Zellen nach Sekretions Assay	NT <sub>H</sub> 1 <sub>IL10-</sub>
A+	T <sub>H</sub> 17 polarisierte Zellen Notch transfiziert IL-22 positive Zellen nach Sekretions Assay	NT <sub>H</sub> 17 <sub>IL22_A+</sub>
A-	T <sub>H</sub> 17 polarisierte Zellen Notch transfiziert IL-22 negative Zellen nach Sekretions Assay	NT <sub>H</sub> 17 <sub>IL22_A-</sub>
B+	T <sub>H</sub> 17 polarisierte Zellen Notch transfiziert IL-22 positive Zellen nach Sekretions Assay	NT <sub>H</sub> 17 <sub>IL22_B+</sub>
B-	T <sub>H</sub> 17 polarisierte Zellen Notch transfiziert IL-22 negative Zellen nach Sekretions Assay	NT <sub>H</sub> 17 <sub>IL22_B-</sub>
C+	T <sub>H</sub> 17 polarisierte Zellen Notch transfiziert IL-22 positive Zellen nach Sekretions Assay	NT <sub>H</sub> 17 <sub>IL22_C+</sub>
C-	T <sub>H</sub> 17 polarisierte Zellen Notch transfiziert IL-22 negative Zellen nach Sekretions Assay	NT <sub>H</sub> 17 <sub>IL22_C-</sub>
D+	T <sub>H</sub> 17 polarisierte Zellen Notch transfiziert IL-22 positive Zellen nach Sekretions Assay	NT <sub>H</sub> 17 <sub>IL22_D+</sub>
D-	T <sub>H</sub> 17 polarisierte Zellen Notch transfiziert IL-22 negative Zellen nach Sekretions Assay	NT <sub>H</sub> 17 <sub>IL22_D-</sub>

Tabelle 6

Auflistung der in dieser Arbeit analysierten Transkriptome. Die Transkriptome (Chips 1-20) wurden mit dem oben beschriebenen System: GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Arrays von Affymetrix untersucht. Die Rohdaten der Transkriptome (Chips A-D, jeweils plus und minus) wurden extern, durch Miltenyi Biotec mit Hilfe des Agilent Systems generiert. Die Zellen der IL-22<sup>+</sup>- und IL-22<sup>-</sup>-Populationen wurden in unserer Arbeitsgruppe *in vitro* generiert. Die Rohdaten signifikant regulierter Transkripte befinden sich in den Anhängen I-VI.

3.11. Einzelvergleich: Berechnungen und Ausgaben signifikanter FCs

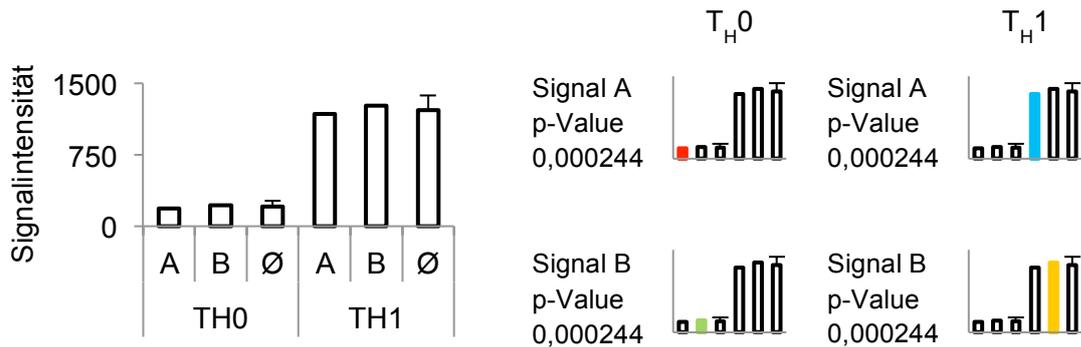


Abbildung 8

Schematische Darstellung der, in die Analyse eingeflossenen, Daten. Am Beispiel des Probe Sets 1450330\_at werden in der Folge die Bedingungen erläutert, die erfüllt sein mussten, damit ein signifikanter Fold Change für den Einzelvergleich ausgegeben wurde. Vergleich 2 (siehe Abb. 7) von Kontrolle  $T_{H0}$ - gg. Kontrolle  $T_{H1}$ -Zellen. Welche Chipdaten den jeweiligen Berechnungen zu Grunde liegen ist Tabelle 6 zu entnehmen.

Wenn diese Bedingungen ( $^{pos}FC$ ) erfüllt sind:

$$\left( \begin{array}{l} \frac{KT_{H1A} p - Value}{KT_{H1B} p - Value} < 0,05 \\ \frac{KT_{H1A}}{KT_{H0A}} > 1,0 \\ \frac{KT_{H1A}}{KT_{H0B}} > 1,0 \\ \frac{KT_{H1B}}{KT_{H0A}} > 1,0 \\ \frac{KT_{H1B}}{KT_{H0B}} > 1,0 \end{array} \right)$$

Formel 2

Dann wird ein positiver Fold Change ( $^{pos}FC$ ) berechnet und ausgegeben.

$$\left( \frac{KT_{H1} \emptyset}{KT_{H0} \emptyset} \right)$$

Formel 3

Ist die Signalintensität für das Transkript in  $T_{H1}$ -Zellen (Abb. 8 rechts) höher als in  $T_{H0}$ -Zellen (Abb. 8 links) und sind zusätzlich die Signale für das Transkript in  $T_{H1}$ -Zellen „Wahre Signale“ (Formel 1), dann wird der positive Fold Change gebildet. Ist Formel 2 erfüllt, dann wird Formel 3 ausgegeben. Ist eines der Argumente in Formel 2 nicht erfüllt, dann wird Formel 3 nicht berechnet, sondern geprüft, ob die Argumente in Formel 4 erfüllt sind.

Formel 4 prüft die Bedingungen (<sup>neg</sup>FC) für einen negativen Fold Change.

$$\left( \begin{array}{l} \mathbf{KT_H0_A} \text{ } p - \text{Value} < 0,05 \\ \mathbf{KT_H0_B} \text{ } p - \text{Value} < 0,05 \\ \frac{\mathbf{KT_H0_A}}{\mathbf{KT_H1_A}} > 1,0 \\ \frac{\mathbf{KT_H0_A}}{\mathbf{KT_H1_B}} > 1,0 \\ \frac{\mathbf{KT_H0_B}}{\mathbf{KT_H1_A}} > 1,0 \\ \frac{\mathbf{KT_H0_B}}{\mathbf{KT_H1_B}} > 1,0 \end{array} \right)$$

#### Formel 4

Sind diese Bedingungen (Formel 4) erfüllt, dann wird ein negativer Fold Change (<sup>neg</sup>FC) berechnet (Formel 5).

$$\left( -1 * \left( \frac{\mathbf{KT_H0} \emptyset}{\mathbf{KT_H1} \emptyset} \right) \right)$$

#### Formel 5

Sind weder die Bedingungen für einen positiven- (Formel 2), noch einen negativen Fold Change (Formel 4) erfüllt, dann wird der Wert Null ausgegeben. Die Fold Changes wurden so für alle Probe Sets in den sieben Einzelvergleichen (siehe Abb. 7) ermittelt.

Um Aufschluss darüber zu geben, ob die Aktivierung des Notch Signalweges zu einer Polarisation von T<sub>H</sub>0-Zellen führt, die mit einem der untersuchten Effektor-Subsets vergleichbar ist, bzw. welchen Einfluss die Notch Modulation in den verschiedenen Subsets hat wurden in der Folge Gruppenvergleiche der Transkriptome (Kapitel 3.11.1 und 3.11.2) durchgeführt.

### 3.11.1. Gruppenvergleiche Notch modulierter T<sub>H</sub>0-Zellen mit T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2- oder T<sub>H</sub>17-polarisierten Zellen

Abfrage nach Transkripten, die sowohl durch Notch in T<sub>H</sub>0-Zellen, als auch durch eine T<sub>H</sub>1 Polarisation reguliert werden. Hierzu wurde ein Gruppenvergleich der Einzelvergleiche 1 und 2 (siehe Abb. 7) durchgeführt.

Gruppenvergleich T<sub>H</sub>1 Polarisation (Einzelvergleiche 1 und 2, siehe Abbildung 7)

Ist eine der folgenden Bedingungen erfüllt:

$$\left( \begin{array}{l}
 NT_{H0A} p - Value < 0,05 \\
 NT_{H0B} p - Value < 0,05 \\
 KT_{H1A} p - Value < 0,05 \\
 KT_{H1B} p - Value < 0,05 \\
 \frac{NT_{H0A}}{KT_{H0A}} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_{H0A}}{KT_{H0B}} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_{H0B}}{KT_{H0A}} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_{H0B}}{KT_{H0B}} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_{H1A}}{KT_{H0A}} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_{H1A}}{KT_{H1B}} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_{H0B}}{KT_{H1A}} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_{H0B}}{KT_{H1B}} \geq 1,0
 \end{array} \right) \quad \text{oder} \quad \left( \begin{array}{l}
 KT_{H0A} p - Value < 0,05 \\
 KT_{H0B} p - Value < 0,05 \\
 \frac{KT_{H0A}}{NT_{H0A}} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_{H0A}}{NT_{H0B}} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_{H0B}}{NT_{H0A}} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_{H0B}}{NT_{H0B}} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_{H1A}}{KT_{H0A}} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_{H1A}}{KT_{H1B}} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_{H0B}}{KT_{H1A}} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_{H0B}}{KT_{H1B}} \geq 1,0
 \end{array} \right)$$

#### Formel 6

Dann wird der Wert 1 ausgegeben, es handelt sich also um ein Transkript das sowohl durch Notch Aktivierung in T<sub>H</sub>0-Zellen, als auch durch T<sub>H</sub>1 Polarisation reguliert wird. Ist dies nicht der Fall dann wird der Wert 0 ausgegeben. Dies wurde des Weiteren für steigende Fold Change cut-offs  $\geq 1,5$ ;  $\geq 2,0$ ;  $\geq 2,5$  und  $\geq 3,0$  durchgeführt. Hierfür wurde der Wert 1,0 durch den entsprechenden cut-off in Formel 6 modifiziert.

Diese Gruppenvergleiche wurden nach dem gleichen Schema für T<sub>H</sub>2 und T<sub>H</sub>17 Polarisation durchgeführt. Für die T<sub>H</sub>2 Polarisation, wurde in Formeln 6 die Einzelvergleiche 1 und 3 (siehe Abbildung 7) verwendet und für T<sub>H</sub>17 Polarisation die Einzelvergleiche 1 und 4.

In einem weiteren Gruppenvergleich wurde nach Transkripten gesucht, die nur unter einer Polarisationsbedingung so reguliert sind, wie durch die Notch Aktivierung in T<sub>H</sub>0-Zellen. Am Beispiel der exklusiven T<sub>H</sub>1 Polarisation (\*T<sub>H</sub>1), ändert sich die Abfrage (Formel 6) folgendermaßen:

Gruppenvergleich \*T<sub>H</sub>1 Polarisation

$$\left( \begin{array}{l}
 NT_{H0A} p - Value < 0,05 \\
 NT_{H0B} p - Value < 0,05 \\
 KT_{H1A} p - Value < 0,05 \\
 KT_{H1B} p - Value < 0,05 \\
 \frac{NT_{H0A}}{KT_{H0A}} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_{H0A}}{KT_{H0B}} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_{H0B}}{KT_{H0A}} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_{H0B}}{KT_{H0B}} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_{H1A}}{KT_{H0A}} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_{H1A}}{KT_{H0B}} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_{H1B}}{KT_{H0A}} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_{H1B}}{KT_{H0B}} \geq 1,0 \\
 \text{Ergebnis der Einzelvergleiche 3 und 4} \\
 \text{Formel 2 – 5 für } T_{H2} \text{ und } T_{H17} \text{ Zellen} \\
 \frac{KT_{H2\emptyset}}{KT_{H0\emptyset}} < 1 \\
 \frac{KT_{H17\emptyset}}{KT_{H0\emptyset}} < 1
 \end{array} \right) \quad \text{oder} \quad \left( \begin{array}{l}
 KT_{H0A} p - Value < 0,05 \\
 KT_{H0B} p - Value < 0,05 \\
 \frac{KT_{H0A}}{NT_{H0A}} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_{H0A}}{NT_{H0B}} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_{H0B}}{NT_{H0A}} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_{H0B}}{NT_{H0B}} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_{H1A}}{KT_{H0A}} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_{H1A}}{KT_{H1B}} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_{H0B}}{KT_{H1A}} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_{H0B}}{KT_{H1B}} \geq 1,0 \\
 \text{Ergebnis der Einzelvergleiche 3 und 4} \\
 \text{Formel 2 – 5 für } T_{H2} \text{ und } T_{H17} \text{ Zellen} \\
 \frac{KT_{H2\emptyset}}{KT_{H0\emptyset}} > -1 \\
 \frac{KT_{H17\emptyset}}{KT_{H0\emptyset}} > -1
 \end{array} \right)$$

**Formel 7**

Die Abfrage in Formel 7 identifiziert Transkripte, die durch Notch Modulation von T<sub>H</sub>0-Zellen und durch T<sub>H</sub>1 Polarisierung gleichermaßen reguliert werden, aber nicht durch T<sub>H</sub>2, oder T<sub>H</sub>17 Polarisierung. Sind alle Argumente in der Menge links oder rechts in Formel 7 erfüllt, so ist die Ausgabe dieser Abfrage 1, ansonsten wird der Wert 0 ausgegeben. Auch hier wurden steigende Fold Change cut-offs bis FC ≥3,0 gesetzt. Für die Ermittlung der Transkripte, die exklusiv in T<sub>H</sub>2-Zellen (\*T<sub>H</sub>2), oder in T<sub>H</sub>17-Zellen (\*T<sub>H</sub>17) gleich reguliert sind wie in Notch modulierten T<sub>H</sub>0-Zellen, wurden die obigen Bedingungen entsprechend angepasst.

### 3.11.2. Gruppenvergleiche zwischen verschiedenen Notch modulierten T-Helfer-Subsets

Auf Transkriptomebene kann die Modulationen der T-Helfer-Zellen durch den Notch Signalweg durch die Betrachtung der Einzelvergleiche 1, 5, 6 und 7 für T<sub>H</sub>0-, T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2- und T<sub>H</sub>17-Zellen (siehe Abbildung 7) untersucht werden. Basierend auf den Einzelvergleichen 1 (Notch Modulation von T<sub>H</sub>0-Zellen), 5 (Notch Modulation von T<sub>H</sub>1-Zellen), 6 (Notch Modulation von T<sub>H</sub>2-Zellen) und 7 (Notch Modulation von T<sub>H</sub>17-Zellen) können unterschiedliche Gruppenvergleiche angestellt werden. Insgesamt wurden 15 verschiedene Gruppenvergleiche durchgeführt, die dafür verwendeten Abfragen lassen sich in vier Untergruppen einteilen. Transkripte, die nur in einem Subset, in zwei Subsets, in drei Subsets, oder in allen Subsets auf die gleiche Weise durch den Notch Signalweg reguliert werden. In der Folge wird jeweils eine Abfrage für jede dieser Untergruppen dargestellt. Formel 8 beschreibt Transkripte, die nur in T<sub>H</sub>0-, T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2-, oder T<sub>H</sub>17-Zellen durch Notch moduliert sind, am Beispiel von T<sub>H</sub>1-Zellen.

Gruppenvergleich <sup>Notch</sup>T<sub>H</sub>1, beschreibt exklusiv in T<sub>H</sub>1-Zellen durch den Notch Signalweg regulierte Transkripte. Dies ist gegeben, wenn entweder die Bedingung für ein hoch- (Formel 8 links), oder runter- (Formel 8 links) reguliertes Transkript erfüllt sind. Ist dies der Fall so wird der Wert 1 ausgegeben, ansonsten der Wert 0.

$$\left( \begin{array}{l}
 NT_{H1A} p - Value < 0,05 \\
 NT_{H1B} p - Value < 0,05 \\
 \frac{NT_{H1A}}{KT_{H1A}} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_{H1A}}{KT_{H1B}} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_{H1B}}{KT_{H1A}} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_{H1B}}{KT_{H1B}} \geq 1,0 \\
 \text{Ergebnis der Einzelvergleiche} \\
 \text{1, 6 und 7, Formel 2 – 5} \\
 \text{für } T_{H0}, T_{H2} \text{ und } T_{H17} \text{ Zellen} \\
 \frac{NT_{H0\emptyset}}{KT_{H0\emptyset}} < 1 \\
 \frac{NT_{H2\emptyset}}{KT_{H2\emptyset}} < 1 \\
 \frac{NT_{H17\emptyset}}{KT_{H17\emptyset}} < 1
 \end{array} \right) \text{ oder } \left( \begin{array}{l}
 KT_{H1A} p - Value < 0,05 \\
 KT_{H1B} p - Value < 0,05 \\
 \frac{KT_{H1A}}{NT_{H1A}} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_{H1A}}{NT_{H1B}} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_{H1B}}{NT_{H1A}} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_{H1B}}{NT_{H1B}} \geq 1,0 \\
 \text{Ergebnis der Einzelvergleiche} \\
 \text{1, 6 und 7, Formel 2 – 5} \\
 \text{für } T_{H0}, T_{H2} \text{ und } T_{H17} \text{ Zellen} \\
 \frac{NT_{H0\emptyset}}{KT_{H0\emptyset}} > -1 \\
 \frac{NT_{H2\emptyset}}{KT_{H2\emptyset}} > -1 \\
 \frac{NT_{H17\emptyset}}{KT_{H17\emptyset}} > -1
 \end{array} \right)$$

**Formel 8**

Auch für diese Gruppenvergleiche wurden steigende Fold Change cut-offs bis FC ≥3,0 gesetzt. Die Abfragen wurden für die Gruppenvergleich <sup>Notch</sup>T<sub>H</sub>0, <sup>Notch</sup>T<sub>H</sub>2 und <sup>Notch</sup>T<sub>H</sub>17 entsprechend modifiziert.

Danach wurden mit einer Abfrage Transkripte identifiziert, die in zwei Subsets durch den Notch Signalweg reguliert werden ( $T_{H0+1}$ ,  $T_{H0+2}$ ,  $T_{H0+17}$ ,  $T_{H1+2}$ ,  $T_{H1+17}$  und  $T_{H2+17}$ ). Bei positiver Beantwortung der Anfrage wurde der Wert 1 ausgegeben, bei einer negativen Beantwortung der Wert 0. Formel 9 zeigt den Gruppenvergleich für die gleiche Modulation durch den Notch Signalweg in  $T_{H0}$ - und  $T_{H1}$ -Zellen ( $^{\text{Notch}}T_{H0+1}$ ).

$$\left( \begin{array}{l}
 NT_{H1A} p - \text{Value} < 0,05 \\
 NT_{H1B} p - \text{Value} < 0,05 \\
 NT_{H0A} p - \text{Value} < 0,05 \\
 NT_{H0B} p - \text{Value} < 0,05 \\
 \frac{NT_{H1A}}{KT_{H1A}} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_{H1B}}{KT_{H1B}} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_{H1B}}{KT_{H1A}} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_{H1B}}{KT_{H1B}} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_{H0A}}{KT_{H0A}} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_{H0A}}{KT_{H0B}} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_{H0B}}{KT_{H0A}} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_{H0B}}{KT_{H0B}} \geq 1,0 \\
 \text{Ergebnis der Einzelvergleiche} \\
 \text{6 und 7, Formel 2 – 5} \\
 \text{für } T_{H2} \text{ und } T_{H17} \text{ Zellen} \\
 \frac{NT_{H2\emptyset}}{KT_{H2\emptyset}} < 1 \\
 \frac{NT_{H17\emptyset}}{KT_{H17\emptyset}} < 1
 \end{array} \right) \quad \text{oder} \quad \left( \begin{array}{l}
 KT_{H1A} p - \text{Value} < 0,05 \\
 KT_{H1B} p - \text{Value} < 0,05 \\
 KT_{H0A} p - \text{Value} < 0,05 \\
 KT_{H0B} p - \text{Value} < 0,05 \\
 \frac{KT_{H1A}}{NT_{H1A}} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_{H1B}}{NT_{H1B}} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_{H1B}}{NT_{H1A}} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_{H1B}}{NT_{H1B}} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_{H0A}}{NT_{H0A}} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_{H0A}}{NT_{H0B}} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_{H0B}}{NT_{H0A}} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_{H0B}}{NT_{H0B}} \geq 1,0 \\
 \text{Ergebnis der Einzelvergleiche} \\
 \text{6 und 7, Formel 2 – 5} \\
 \text{für } T_{H2} \text{ und } T_{H17} \text{ Zellen} \\
 \frac{KT_{H2\emptyset}}{NT_{H2\emptyset}} > -1 \\
 \frac{KT_{H17\emptyset}}{NT_{H17\emptyset}} > -1
 \end{array} \right)$$

**Formel 9**

Auch hier wurden steigende Fold Change cut-offs von  $FC \geq 1,0$  bis  $FC \geq 3,0$  gesetzt. Die Abfragen für die restlichen Gruppenvergleiche ( $T_{H0+2}$ ,  $T_{H0+17}$ ,  $T_{H1+2}$ ,  $T_{H1+17}$  und  $T_{H2+17}$ ) zur Identifizierung Notch modulierter Transkripte unter zwei Polarisationsbedingungen wurden entsprechend modifiziert.

Hiernach wurde mit einer Abfrage nach Transkripten, die in drei Subsets durch den Notch Signalweg reguliert werden ( $T_{H0+1+2}$ ,  $T_{H0+1+17}$ ,  $T_{H0+2+17}$ ,  $T_{H1+2+17}$ ) gesucht.

Am Beispiel des Gruppenvergleichs  $Notch_{T_{H0+1+2}}$  muss eine der folgenden Bedingungen erfüllt sein

$$\left( \begin{array}{l}
 NT_{H1A} p - Value < 0,05 \\
 NT_{H1B} p - Value < 0,05 \\
 NT_{H0A} p - Value < 0,05 \\
 NT_{H0B} p - Value < 0,05 \\
 NT_{H2A} p - Value < 0,05 \\
 NT_{H2B} p - Value < 0,05 \\
 \frac{NT_{H1A}}{KT_{H1A}} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_{H1A}}{KT_{H1B}} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_{H1B}}{KT_{H1A}} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_{H1B}}{KT_{H1B}} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_{H0A}}{KT_{H0A}} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_{H0A}}{KT_{H0B}} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_{H0B}}{KT_{H0A}} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_{H0B}}{KT_{H0B}} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_{H2A}}{KT_{H2A}} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_{H2A}}{KT_{H2B}} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_{H2B}}{KT_{H2A}} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_{H2B}}{KT_{H2B}} \geq 1,0 \\
 \text{Ergebnis des Einzelvergleichs 7} \\
 \text{Formel 2 – 5 für } T_H17 \text{ Zellen} \\
 \frac{NT_{H17\emptyset}}{KT_{H17\emptyset}} < 1
 \end{array} \right) \quad \text{oder} \quad \left( \begin{array}{l}
 KT_{H1A} p - Value < 0,05 \\
 KT_{H1B} p - Value < 0,05 \\
 KT_{H0A} p - Value < 0,05 \\
 KT_{H0B} p - Value < 0,05 \\
 KT_{H2A} p - Value < 0,05 \\
 KT_{H2B} p - Value < 0,05 \\
 \frac{KT_{H1A}}{NT_{H1A}} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_{H1A}}{NT_{H1B}} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_{H1B}}{NT_{H1A}} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_{H1B}}{NT_{H1B}} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_{H0A}}{NT_{H0A}} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_{H0A}}{NT_{H0B}} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_{H0B}}{NT_{H0A}} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_{H0B}}{NT_{H0B}} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_{H2A}}{NT_{H2A}} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_{H2A}}{NT_{H2B}} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_{H2B}}{NT_{H2A}} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_{H2B}}{NT_{H2B}} \geq 1,0 \\
 \text{Ergebnis des Einzelvergleichs 7} \\
 \text{Formel 2 – 5 für } T_H17 \text{ Zellen} \\
 \frac{KT_{H17\emptyset}}{NT_{H17\emptyset}} > -1
 \end{array} \right)$$

### Formel 10

Wie zuvor beschrieben, wenn eine der Bedingungen (Formel 10) erfüllt ist, dann wird der Wert 1 ausgegeben, andernfalls der Wert 0. Auch hier wurden steigende Fold Change cut-offs bis  $FC \geq 3,0$  gesetzt. Die Abfragen für die restlichen Gruppen wurden entsprechend modifiziert.

Abschließend wurden die Transkripte ermittelt, die unter allen Polarisationsbedingungen durch den Notch Signalweg reguliert werden. War eine der Bedingung (Formel 11) erfüllt, so wurde für dieses Transkript der Wert 1 ausgegeben, ansonsten der Wert 0.

$$\left( \begin{array}{l}
 NT_H1_A p - Value < 0,05 \\
 NT_H1_B p - Value < 0,05 \\
 NT_H0_A p - Value < 0,05 \\
 NT_H0_B p - Value < 0,05 \\
 NT_H2_A p - Value < 0,05 \\
 NT_H2_B p - Value < 0,05 \\
 NT_H17_A p - Value < 0,05 \\
 NT_H17_B p - Value < 0,05 \\
 \frac{NT_H1_A}{KT_H1_A} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_H1_A}{KT_H1_B} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_H1_B}{KT_H1_A} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_H1_B}{KT_H1_B} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_H0_A}{KT_H0_A} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_H0_A}{KT_H0_B} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_H0_B}{KT_H0_A} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_H0_B}{KT_H0_B} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_H2_A}{KT_H2_A} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_H2_A}{KT_H2_B} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_H2_B}{KT_H2_A} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_H2_B}{KT_H2_B} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_H17_A}{KT_H17_A} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_H17_A}{KT_H17_B} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_H17_B}{KT_H17_A} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_H17_B}{KT_H17_B} \geq 1,0
 \end{array} \right) \quad \text{oder} \quad \left( \begin{array}{l}
 KT_H1_A p - Value < 0,05 \\
 KT_H1_B p - Value < 0,05 \\
 KT_H0_A p - Value < 0,05 \\
 KT_H0_B p - Value < 0,05 \\
 KT_H2_A p - Value < 0,05 \\
 KT_H2_B p - Value < 0,05 \\
 KT_H17_A p - Value < 0,05 \\
 KT_H17_B p - Value < 0,05 \\
 \frac{KT_H1_A}{NT_H1_A} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_H1_A}{NT_H1_B} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_H1_B}{NT_H1_A} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_H1_B}{NT_H1_B} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_H0_A}{NT_H0_A} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_H0_A}{NT_H0_B} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_H0_B}{NT_H0_A} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_H0_B}{NT_H0_B} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_H2_A}{NT_H2_A} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_H2_A}{NT_H2_B} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_H2_B}{NT_H2_A} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_H2_B}{NT_H2_B} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_H17_A}{NT_H17_A} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_H17_A}{NT_H17_B} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_H17_B}{NT_H17_A} \geq 1,0 \\
 \frac{KT_H17_B}{NT_H17_B} \geq 1,0
 \end{array} \right)$$

**Formel 11**

Auch hier (Formel 11) wurden erneut steigende Fold Change cut-offs bis FC  $\geq 3,0$  gesetzt.

### 3.11.3. Vergleich IL-10 sekretierender und nicht-sekretierender Notch modulierter T<sub>H</sub>1-Zellen

In einem weiteren Experiment wurden Transkriptome IL-10-sortierter T<sub>H</sub>1-Zellen mit und ohne Notch Modulation miteinander verglichen. Als Transkripte, die dem IL-10-Expressionsprofil folgen, wurden solche identifiziert, die die unten beschriebene Bedingung (Formel 12) erfüllen.

$$\left( \begin{array}{l} NT_{H1}1_{IL10+} p - Value < 0,05 \\ \frac{NT_{H1}1_{IL10+}}{NT_{H1}1_{IL10-}} \geq 3 \\ \frac{NT_{H1}1_{IL10+}}{KT_{H1}1_{IL10-}} \geq 3 \\ NT_{H1}1_{IL10+} > 46,58 \end{array} \right) \text{ oder } \left( \begin{array}{l} NT_{H1}1_{IL10-p} - Value < 0,05 \\ KT_{H1}1_{IL10-p} - Value < 0,05 \\ \frac{NT_{H1}1_{IL10-}}{NT_{H1}1_{IL10+}} \geq 3 \\ \frac{KT_{H1}1_{IL10-}}{NT_{H1}1_{IL10+}} \geq 3 \\ NT_{H1}1_{IL10-} > 46,58 \\ KT_{H1}1_{IL10-} > 46,58 \end{array} \right)$$

**Formel 12**

Da die Transkriptome dieses Experiments nur als Einzelwerte vorlagen wurde das durchschnittliche Hintergrundsignal 45,58, als weiterer Grenzwert verwendet. So wurden nur die Transkripte eingehender untersucht, deren Signalintensitäten diesen Grenzwert überschritten. Für die weitere Einschränkung wurde ein Fold Change cut-off bei 3 gesetzt.

### 3.11.4. Vergleich IL-22 sekretierender und nicht-sekretierender T<sub>H</sub>17 Notch modulierter Zellen

Für die vergleichende Transkriptomanalyse IL-22<sup>-</sup>- und IL-22<sup>+</sup>-Zellen, die als Quadruplikate vorlagen wurde die folgende Abfrage für hoch- (Formel 13 links), oder runterregulierte (Formel 13 rechts) Transkripte verwendet:

$$\left( \begin{array}{l}
 NT_{H17}^{IL22\_A+} p - Value < 0,05 \\
 NT_{H17}^{IL22\_B+} p - Value < 0,05 \\
 NT_{H17}^{IL22\_C+} p - Value < 0,05 \\
 NT_{H17}^{IL22\_D+} p - Value < 0,05 \\
 \frac{NT_{H17}^{IL22\_A+}}{NT_{H17}^{IL22\_A-}} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_{H17}^{IL22\_A+}}{NT_{H17}^{IL22\_B-}} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_{H17}^{IL22\_A+}}{NT_{H17}^{IL22\_C-}} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_{H17}^{IL22\_A+}}{NT_{H17}^{IL22\_D-}} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_{H17}^{IL22\_B+}}{NT_{H17}^{IL22\_A-}} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_{H17}^{IL22\_B+}}{NT_{H17}^{IL22\_B-}} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_{H17}^{IL22\_B+}}{NT_{H17}^{IL22\_C-}} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_{H17}^{IL22\_B+}}{NT_{H17}^{IL22\_D-}} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_{H17}^{IL22\_C+}}{NT_{H17}^{IL22\_A-}} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_{H17}^{IL22\_C+}}{NT_{H17}^{IL22\_B-}} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_{H17}^{IL22\_C+}}{NT_{H17}^{IL22\_C-}} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_{H17}^{IL22\_C+}}{NT_{H17}^{IL22\_D-}} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_{H17}^{IL22\_D+}}{NT_{H17}^{IL22\_A-}} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_{H17}^{IL22\_D+}}{NT_{H17}^{IL22\_B-}} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_{H17}^{IL22\_D+}}{NT_{H17}^{IL22\_C-}} \geq 1,0 \\
 \frac{NT_{H17}^{IL22\_D+}}{NT_{H17}^{IL22\_D-}} \geq 1,0
 \end{array} \right) \quad \text{oder} \quad \left( \begin{array}{l}
 NT_{H17}^{IL22\_A-} p - Value < 0,05 \\
 NT_{H17}^{IL22\_B-} p - Value < 0,05 \\
 NT_{H17}^{IL22\_C-} p - Value < 0,05 \\
 NT_{H17}^{IL22\_D-} p - Value < 0,05 \\
 \frac{NT_{H17}^{IL22\_A+}}{NT_{H17}^{IL22\_A-}} \leq 1,0 \\
 \frac{NT_{H17}^{IL22\_A+}}{NT_{H17}^{IL22\_B-}} \leq 1,0 \\
 \frac{NT_{H17}^{IL22\_A+}}{NT_{H17}^{IL22\_C-}} \leq 1,0 \\
 \frac{NT_{H17}^{IL22\_A+}}{NT_{H17}^{IL22\_D-}} \leq 1,0 \\
 \frac{NT_{H17}^{IL22\_B+}}{NT_{H17}^{IL22\_A-}} \leq 1,0 \\
 \frac{NT_{H17}^{IL22\_B+}}{NT_{H17}^{IL22\_B-}} \leq 1,0 \\
 \frac{NT_{H17}^{IL22\_B+}}{NT_{H17}^{IL22\_C-}} \leq 1,0 \\
 \frac{NT_{H17}^{IL22\_B+}}{NT_{H17}^{IL22\_D-}} \leq 1,0 \\
 \frac{NT_{H17}^{IL22\_C+}}{NT_{H17}^{IL22\_A-}} \leq 1,0 \\
 \frac{NT_{H17}^{IL22\_C+}}{NT_{H17}^{IL22\_B-}} \leq 1,0 \\
 \frac{NT_{H17}^{IL22\_C+}}{NT_{H17}^{IL22\_C-}} \leq 1,0 \\
 \frac{NT_{H17}^{IL22\_C+}}{NT_{H17}^{IL22\_D-}} \leq 1,0 \\
 \frac{NT_{H17}^{IL22\_D+}}{NT_{H17}^{IL22\_A-}} \leq 1,0 \\
 \frac{NT_{H17}^{IL22\_D+}}{NT_{H17}^{IL22\_B-}} \leq 1,0 \\
 \frac{NT_{H17}^{IL22\_D+}}{NT_{H17}^{IL22\_C-}} \leq 1,0 \\
 \frac{NT_{H17}^{IL22\_D+}}{NT_{H17}^{IL22\_D-}} \leq 1,0
 \end{array} \right)$$

**Formel 13**

Die IL-22 negativen und IL-22 positiven Populationen Notch modulierter T<sub>H</sub>17-Zellen wurden mit Hilfe eines IL-22 Sekretions Assay (Kooperation mit Miltenyi Biotec) voneinander getrennt.

### 3.12. *In silico* siRNA Design

Die cDNA Sequenzen für IL-10, STAT4, c-Maf, Blimp-1, Evi1, Etv5, Fli1 und Satb1 wurden in den siRNA Selection Server des Whitehead Institutes hochgeladen und jeweils 5 verschiedene Sequenzen selektiert. Für das siRNA Muster wurden die vorgeschlagenen Sequenzen verwendet [58-60]. Als Filterkriterien wurden die folgenden Limitierungen gebraucht:

1. 30-70 % GC-Anteil
2. Weniger als 7 aufeinanderfolgende GCs in einer Reihe
3. Höchstens 4 gleiche aufeinanderfolgende Basen in einer Reihe.

Aus der Auswahl der vorgeschlagenen siRNAs wurden präferenziell die gewählt, die einen negativen  $\Delta G$ -Wert aufweisen und innerhalb der CDS-Region, nicht in unmittelbarer Nähe zur Transkriptionsstartseite, liegen. Anschließend wurden durch eine Blast-Suche siRNA Sequenzen herausgefiltert, die nicht mehr als 16 Basen Übereinstimmung mit einer Off-Target Sequenz haben. Anschließend wurde *in silico* die Faltung der verbliebenden siRNAs berechnet und die günstigsten Strukturen [61] ausgewählt. Die so selektierten cDNA Sequenzen, die das Target der siRNA darstellen, sind in Tabelle 7 aufgeführt. Die daraus resultierende siRNA aus Sense und Anti-sense Strang wurde von der Firma IBA synthetisiert und zur Stabilisierung der siRNA [62] chemisch modifiziert. Hier exemplarisch für siRNA#1 für c-Maf dargestellt:

cDNA: GGG ACG CCT ACA AGG AGA AAT AC  
sense: mGmGG ACG CCU ACA AGG AGdA dAdAmU  
anti-sense: mCmCC UGC GGA UGU UCC UC U U UdA

#### Abbildung 9

cDNA und modifizierte sense und anti-sense Stränge der verwendeten siRNAs (IBA). Beispiel siRNA#1 für c-Maf. m: methyliert, d: Desoxyribose

Auf diese Weise wurden insgesamt 40 verschiedene siRNAs für 8 unterschiedliche Zieltranskripte generiert, die in Tabelle 7 aufgelistet sind.

Zieltranskript	Kürzel	cDNA Target-Sequenz	Quelle
IL-10	A1	ATCCTGCTTTCAAGCTCATATTG	IBA
	A2	GAGAGCAATTGTGTCTGTTAAAG	
	A3	AACCTTCTCGATGTCTAATAATT	
	A4	CTCGAGCCTGTTCAACAATGTGA	
	A5	TTGAGGAGCTCTTGTTTGAAAAG	
STAT4	B1	AAGTGCAGTACTGGGAGTAAAGG	IBA
	B2	AAGGCGTCCATTGACAAGAATGT	
	B3	ACCAGCTTCAGAACTGCTTTACC	
	B4	CGCTGCAAGAAATGCTTAATAGT	
	B5	GTGCAGATGACAGAACAAGATAC	
c-Maf	C1	GGGACGCCTACAAGGAGAAATAC	IBA
	C2	CAGCTAGCCACCTTGTTAAATGC	
	C3	CTGGACATGTATGGTATAATTAT	
	C4	CATGTGCTTGCAACTTAAATATA	
	C5	AGGGACTGACATCCTGTCTTAGA	
Blimp-1	D1	ATCAGGGTGCCTTTAGCAAATTG	IBA
	D2	GAGGCAAAGACTCACTATATATA	
	D3	TGGCCATTCTTTGTAGATAATTT	
	D4	CAGTAGGAGTGCAGGAATTAATG	
	D5	TTGGTGTTCAAGGTGTAATAAAG	
Evi1	E1	ATCTGGCTTCGATAACTAATAAG	IBA
	E2	CAGACCCACTCCCTTCTTCATGG	
	E3	GACCCGCTTGAAGCTTTGAAAGA	
	E4	CAGTGCCATCCAGTCCATAAGCC	
	E5	CAGCACTACGTCTTCCTTAAATA	
Etv5	F1	GAGGCCAGGAGAGCCGTTACTCA	IBA
	F2	CAGCCGAGCCGTCACCATAAGTA	
	F3	CTGCCTGATTGACAGGAATTTGC	
	F4	AACTGGCTAGAGATTTATTTGTT	
	F5	CCCTGCCGAGCTGCGTATATTCT	
Fli1	G1	AAGGCAGGATGTTTATAATCTTA	IBA
	G2	GACGGGCAGAGGATTAATAACA	
	G3	CAGAAGGCAACTAACTGTATAAA	
	G4	CATGCCCAAACAAGATCTGTTTA	
	G5	GAGGAGCATGGAACAATAATATG	
Satb1	H1	GAAGGGAGCACAGACGTTAATGC	IBA
	H2	CACCACCGGTATTTCTAACAAC	
	H3	AACCCGCCACACTAGTCTTTGGA	
	H4	AAGGAGGAGCACGCGGAATTTGT	
	H5	TTGGAAGGTGGTACAAACATTC	

Tabelle 7

Sequenzen verwendeter siRNAs. Für die Targets IL-10, STAT4, c-Maf, Blimp-1, Evi1, Etv5, Fli1 und Satb1.

Das Einbringen der siRNA in die Zellen erfolgte mittels Nucleofection™. Verwendet wurde das folgende Kit der Firma Lonza.

#### Nucleofection™ von murinen T-Zellen

Medium	Quelle	Katalognummer
Mouse T Cell Nucleofector™ Kit - das Supplement wird vor der Nucleofection™ frisch dazu gegeben	Lonza	VPA-1006

### 3.12.1. siRNA Transfektion mit dem Nucleofector™ System von Amaxa für Einzeltransfektionen

Die Zellen werden durch Elektroporation in zellspezifischem Medium mit Hilfe des Nucleofector™ Systems von Amaxa transfiziert.

Maximal werden  $1 \cdot 10^7$  Zellen in einer einzelnen Küvette in 100  $\mu$ l ergänztem Nucleofections™ Medium mit 500 pMol siRNA transfiziert.

Vorbereiten:

Das RPMI Medium wird im Wasserbad vorgewärmt.

Dem Nucleofections™ Medium (2,25 ml) wird das gesamte Ergänzungsmedium (0,5 ml) zugesetzt. Die zu transfizierenden Zellen werden gezählt und auf eine geeignete Zellzahl eingestellt (maximal  $1 \cdot 10^7$ /Nucleofection™). Die Zellen werden zentrifugiert und der Großteil des Mediums abgenommen und in eine frische Zellkulturplatte überführt.

Der Amaxa Nucleofector™ wird eingeschaltet und das Programm X-001 eingestellt.

Die Transfektionsprozedur muss möglichst schnell durchgeführt werden, um die Aufenthaltszeit der Zellen im Nucleofections™ Medium zu verkürzen, die folgenden Schritte werden für jeden Transfektionsansatz einzeln durchgeführt:

1. Entfernung des restlichen Überstandes der Zellen.
2. Lösen der Zellen im ergänzten Nucleofections™ Medium mit siRNA.
3. Überführung der Suspension in die Transfektionsküvette.
4. Die Küvette wird in den Amaxa Nucleofector™ gestellt und das Programm gestartet.
5. 500  $\mu$ l vorgewärmtes RPMI Medium werden auf die Zellen in der Küvette gegeben und die Suspension anschließend mittels Plastikpipette aus der Küvette entfernt und mit dem alten Überstand in der neuen Zellkulturplatte vereinigt.

### **3.12.2. Nucleofection™ voraktivierter T<sub>H</sub>1-Zellen nach Transfektion mit konstitutiv aktivem Notchsignal für einzelne siRNA-Nucleofektionen™**

Wie bereits zuvor beschrieben (Kapitel 3.1 und 3.2), werden pro Ansatz  $2,5 \times 10^6$  naive T-Zellen ( $CD25^+CD4^+CD62L^+$ ) mit  $1 \times 10^7$  subletal bestrahlten APZs ( $MHCII^+$ ) in T<sub>H</sub>1-Medium kultiviert. Diese nach 24 Stunden retroviral mit dem Notchplasmid transfiziert. Nach weiteren 24 Stunden werden die gesamten Zellen eines Ansatzes ( $2,5 \times 10^6$  naive T-Zellen und  $1 \times 10^7$  APZs) auf zwei Nucleofections™ansätze aufgeteilt und gemäß der oben beschriebenen Prozedur (Kapitel 3.12.1) behandelt. Für die Bestimmung der Knock-down Effizienz wurde an Tag 3 ein Teil der Zellen entnommen, die mRNA isoliert und per qPCR die relative Expression des Zieltranskriptes der siRNA bestimmt. An Tag 5 wurde der Überstand (nach Restimulation) und erneut die mRNA (vor Restimulation) der Zellen isoliert. An Hand der mRNA wurde die relative Expression von IL-10 auf transkriptioneller Ebene bestimmt und im Überstand mittels ELISA die sekretierte Proteinmenge analysiert. Die in Vorversuchen bestimmten Knock-down Effizienzen der siRNAs sind in Tabelle 10 (Kapitel 4.3) dargestellt.

### 3.12.3. Transfektion voraktivierter T<sub>H</sub>1-Zellen im Screen (96-Lochplatte)

Voraktivierung:

Plattenbeschichtung:

- Verwendet wurden sterile ELISA 96-Lochplatten mit Flachboden und Deckel.
- Beschichtung mit 5 µg/ml αCD3 + 1µg/ml rmDLL4 in PBS.

Kultur:

- 5x10<sup>5</sup>/Well Naïve (CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) T-Zellen wurden in den beschichteten Platten ausgesät.
- Dem Medium wurden 1 µg/ml αCD28 und 10 ng/ml rIL-12 zugefügt.
- Nach 48h wurden die Zellen auf neue Platten transferiert.

Nucleofection™ der voraktivierten T<sub>H</sub>1-Zellen

- siRNA Nucleofection™ an Tag 5 der Kultur

2x10<sup>5</sup> Zellen pro Nucleofection™ für 40 verschiedene siRNAs oder Kontrolle

- Nucleofizierte™ T-Zellen ruhten einen weiteren Tag in zuvor verwendetem Medium
- An Tag 6 Restimulation mit PMA/Ionomycin und Brefeldin A (6h)

Durchflusszytometrische Analyse von IFN-γ und IL-10 in fixierten Zellen

### 3.12.4. Transfektion Naiver T-Zellen im Screen (96-Lochplatte)

Plattenbeschichtung:

- Sterile ELISA 96-Lochplatten mit Flachboden und Deckel wurden verwendet.
- Beschichtung mit 5 µg/ml αCD3 + 1µg/ml rmDLL4 in PBS.

Nucleofection™:

- $2 \times 10^5$  Naive ( $CD4^+CD62L^+$ ) T-Zellen pro Ansatz wurden mit 40 verschiedenen siRNAs oder der Kontrolle nucleofiziert™.

Kultivierung:

- Die Zellen ruhten in frischem RPMI Medium für 20 Stunden.
- Umsetzen der Zellen auf die beschichteten Platten und Zugabe von 1 µg/ml αCD28 und 10 ng/ml rIL-12.
- Nach 48 Stunden erneutes Umsetzen der Zellen auf unbeschichtete Platten
- An Tag 5 wurden die Zellen mit PMA/Ionomycin und Brefeldin A restimuliert (6h).

Durchflusszytometrische Analyse von IFN-γ und IL-10 in fixierten Zellen

### 3.13. Behandlung Notch modulierter T<sub>H</sub>1-Zellen mit Erk-Inhibitor (PD 184,352)

T<sub>H</sub>1 polarisierte Zellen wurden gemäß Kapitel 3.4 retroviral mit Notch moduliert. An Tag 5 werden die Zellen geerntet und gemäß dem folgendem Protokoll behandelt

**Vorbereitung:** 15 ml Falcons werden mit 3 ml Fixierpuffer (vor Licht schützen) aus dem Kühlschrank genommen und aufgewärmt.  
15 ml Falcons mit 3 ml Permeabilisierungspuffer III (vor Licht schützen) kurz vor Gebrauch gekühlt.

Erk-Inhibitor

- Zellen wurden gezählt und auf  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml eingestellt
- 1 ml der Zellsuspension werden in eine Vertiefung einer 24-Lochplatte überführt
- Der Erk-Inhibitor wird mit entsprechender Konzentration für 30 Minuten mit den Zellen bei 37 °C inkubiert
- PMA/Ionomycin wird zu den Zellen gegeben und für weitere 15 Minuten bei 37 °C inkubiert
- 200 µl der Zellsuspension werden in Eppis überführt und zentrifugiert
- 50 µl des Fixierpuffers werden dazu gegeben und für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert
- 2x waschen
- 50 µl Permeabilisierungspuffer III werden zu den Zellen gegeben und für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert.
- 2x waschen
- Die Zellen wurden in 50 µl PBS/BSA suspendiert
- Färbung mit 5 µl anti-pErk.

Anschließend Durchflusszytometrische Analyse

### 3.14. Vorbereitung einer Arbeitslösung des AhR-Liganden FICZ für die *in vitro* Modulation von T-Helfer-Zellen

FICZ (100 µg Feststoff) wird in 7,024 ml DMSO gelöst.

Dies entspricht einer Konzentration von 50 µM.

Die Vorratslösung kann bei -80 °C einen Monat aufbewahrt werden.

Verwendete Konzentrationen:

500 nM: 10 µl Vorratslösung /ml Medium

100 nM: 2 µl Vorratslösung /ml Medium

10 nM: 1:10 Verdünnung der Vorratslösung in DMSO  
2 µl der Verdünnung /ml Medium

### 3.15. Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte der durchgeführten Experimente, die zuvor normiert wurden. Der Standardabweichung entspricht dem SEM (standard error of the mean). Die Überprüfung der statistischen Signifikanz erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney-U Tests für parameterfreie nicht gleichverteilte Werte. Die zu erreichenden Signifikanzwerte betragen, 5% (\*  $p < 0,05$ ), 1% (\*\*  $p < 0,01$ ) und 1‰ (\*\*\*)  $p < 0,001$ ). Die Berechnungen wurden mit Hilfe von Microsoft Excel und GraphPad Prism 5 durchgeführt.

### 3.16. Verwendete Materialien und Geräte

#### 3.16.1. Medien und Puffer

##### RPMI 1640 Medium – Invitrogen/Life Technologies

FCS	10%	Sigma
Penicillin	100 U/ml	PAA Laboratories
Streptomycin	100 µg/ml	PAA Laboratories
2-Mercaptoethanol	50 µM	Invitrogen/ Life Technologies

##### DMEM Medium – Invitrogen/Life Technologies

FCS	10%	Sigma
Penicillin	100 U/ml	PAA Laboratories
Streptomycin	100 µg/ml	PAA Laboratories
2-Mercaptoethanol	50 µM	Invitrogen/ Life Technologies

##### LB Medium

Trypton	10 g	Oxoid
Hefeextrakt	5 g	Invitrogen/Life Technologies
NaCl	10 g	Merck
add 1 Liter bidest. H <sub>2</sub> O		

##### SOCS Medium

Trypton	20 g	Oxoid
Hefeextrakt	5 g	Invitrogen/Life Technologies
NaCl	10 mM	Merck
KCl	2,5 mM	Merck
MgCl <sub>2</sub>	10 mM	Merck
MgSO <sub>4</sub>	10 mM	Merck
Glukose	20 mM	Sigma
add 1 Liter bidest. H <sub>2</sub> O		

##### PBS; pH 7,2

NaCl	137 mM	Merck
KCl	2,7 mM	Merck
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM	Merck
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	8,0 mM	Merck

##### PBS/BSA; pH 7,2

PBS		
<i>bovine serum albumin</i>	0,5% (w/v)	PAA Laboratories

##### PBS/BSA/Azid; pH 7,2

PBS/BSA		
NaN <sub>3</sub>	0,02% (w/v)	Merck

## Methoden & Materialien

---

### Erythrozyten Lysis Puffer (EL-Puffer); pH 7,5

KHCO <sub>3</sub>	0,01 M	Merck
NH <sub>4</sub> Cl	0,155 M	Merck
EDTA	0,1 mM	Sigma

### 2x HBS pH 7,05 ± 0,05

HEPES pH 7,05	50 mM	Merck
KCl	10 mM	Merck
Dextrose	12 mM	Merck
NaCl	280 mM	Merck
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5 mM	Merck

### CaCl<sub>2</sub>-Lösung 1,25 M

CaCl <sub>2</sub>	1,25 M	Merck
-------------------	--------	-------

### Saponin 5% (w/v) gelöst in PBS/BSA/Azid (Stammlösung)

Saponin	50 g/l	Merck
---------	--------	-------

### Saponin 0,5% (w/v) gelöst in PBS/BSA/Azid (Arbeitslösung)

Saponin	5 g/l	Merck
---------	-------	-------

### Formaldehyd 4% (v/v) in PBS

Formaldehyd 37% ad 500 ml PBS	54 ml	Merck
----------------------------------	-------	-------

### 10x TBE

Tris-Base	0,9 M	Sigma
Borsäure	0,9 M	Merck
EDTA; pH 8,0	2 mM	Sigma

### Tween 20 0,05% (v/v) in PBS

Tween 20 ad 2000 ml PBS	1 ml	Sigma
----------------------------	------	-------

### IL-10 ELISA Beschichtungspuffer

ELISA Coating Buffer Powder wird in 1l dest. H <sub>2</sub> O gelöst und anschließend steril filtriert (0,22 µM)		eBioscience
--	--	-------------

### IL-22 ELISA Beschichtungspuffer

10x PBS ELISA Coating Buffer	1:10 mit dest. H <sub>2</sub> O verdünnen	eBioscience
---------------------------------	--	-------------

### ELISA Probenverdünnungsmittel

5x Assay dilluent	1:5 mit dest. H <sub>2</sub> O verdünnen	eBioscience
-------------------	--	-------------

**IL-10/IL-22 ELISASubstratlösung, Tetramethylbenzidin (TMB) Lösung**

---

TMB Lösung wird unverdünnt eingesetzt

| eBioscience

**IL-10/IL-22 ELISA Abstopplösung, 12,5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**

---

### 3.16.2. Primer und Bedingungen für quantitative PCR

Zielgen	SEQUENZ (5'→3')	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Temp. (°C)	Produktlänge
IL-10	F: ATCGATTTCTCCCCTGTGAA R: TTCGGAGAGAGGTACAAACGA	5 mM	60 °C	284 bp
Nfatc2	F: GCCACAGAACTCTGCCTTTC R: TGGTGCTGGATAATGGATGA	4 mM	67 °C	208 bp
Ubc	F: AGCCCAGTGTTACCACCAAG R: TCACACCCAAGAACAAGCAC	4 mM	60 °C	101 bp
Runx2	F: CCTCTGACTTCTGCCTCTGG R: TATGGAGTGCTGCTGGTCTG	2 mM	67 °C	295 bp
Stat4	F: ACCTTCTGGACTTGGCTTGA R: AGAGCCGACAGTCTCCCTTT	2 mM	63 °C	263 bp
Satb1	F: AGCTACCCTTGCCACTGAGA R: CTTCGGATCATCGACAGGTT	2 mM	63 °C	233 bp
c-Kit	F: TCCATGTCAGAGTGGCTTTG R: TCACTCCGCTAAGCCTCTGT	4 mM	63 °C	366 bp
c-Maf	F: GCATGCTGGACATGTATGGT R: ATGTACAACGGGAGGCTGAA	4 mM	65 °C	241 bp
HPRT	F: AAGCTTGCTGGTGAAAAGGA R: TTGCGCTCATCTTAGGCTTT	2,5 mM	60 °C	186 bp
Etv5	F: AGGACCCCAGGCTGTACTTT R: TTCTTCTGGATACCCCAACG	5 mM	65 °C	253 bp
Evi1	F: GGCAACCAGGACTGTAAGGA R: GAGATCGAATGTGTCGCTGA	2 mM	65 °C	241 bp
Fli1	F: CCTCTCCTTGGAGGATCACA R: AATTCATGTTGGGCTTGCTC	3 mM	65 °C	271 bp
Cyp1b1	F: CAGCAACTTCGTTCTGGACA R: ACAACCTGGTCCAACCTCAGC	5 mM	65 °C	288 bp
Ahr	F: ATACCCCAGACCAGCTTCCT R: TTCGAATTTCCAGGATGGAG	5 mM	65 °C	237 bp
Blimp-1	F: GACGGGGGTACTTCTGTTCA R: GGCATTCTTGGGAACCTGTGT	1 mM	60 °C	180 bp
Blimp-1 Ex5-8	F: AGTGCAATGTCTGTGCCAAG R: TGTGGCTTCTCTCCTGTGTG	2,5 mM	60 °C	200 bp
Blimp-1 floxGap	F: CCCCTCATCGGTGAAGTCTA R: GCATCCAGTTGCTTTTCTCC	2,5 mM	60 °C	200 bp
IL-17A	F: TCCAGAAGGCCCTCAGACTA R: AGCATCTTCTCGACCCTGAA	2 mM	60 °C	238 bp
IL-22	F: GGTGGTGCCTTTCCTGACCA R: AGCTTCTTCTCGCTCAGACG	2 mM	69 °C	203 bp
Tbx21	F: CCTGGACCCAACCTGTCAACT R: AACTGTGTTCCCGAGGTGTC	2 mM	60 °C	156 bp
Rorc	F: TGCAAGACTCATCGACAAGG R: AGGGGATTCAACATCAGTGC	2,5 mM	60 °C	177 bp
Gata3	F: CCTACCGGGTTCGGATGTAAGT R: AGTTCGCGCAGGATGTCC	3 mM	65 °C	233 bp

Primer und Bedingungen für quantitative PCR (Fortsetzung)

Zielgen	Sequenz (5'→3')	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Temp. (°C)	Produktlänge
Foxp3	F: CAGCAGGAGAAAGCGGATAC R: GCCCTGATGGATGTCTCCTA	2,5 mM	60 °C	109 bp
IL-23r	F: GGTCTTCTTGGCCATCATGT R: GCCACTTTGGGATCATCAGT	2 mM	67 °C	107 bp
IL-6ra	F: GCAAGAATCCTCGTCCATGT R: GTGGAGGAGAGGTCGTCTTG	2 mM	60 °C	152 bp
STAT3	F: TCACTTGGGTGGAAAAGGAC R: TGGTCGCATCCATGATCTTA	2 mM	60 °C	128 bp
Hlx1	F: TAAGGACACCATGCCACAGA R: CTGGAACCACACCTTCACCT	2 mM	60 °C	183 bp
IL-12rb2	F: AGTCACCAACCTGTCCCTTG R: GAACAGGCCACAGTTCATT	2,5 mM	60 °C	177 bp
Smarca2	F: TGAGAGGGTGGAGAAGCAGT R: GCAATGGTCTGGATGGTCTT	2,5 mM	60 °C	156 bp
Hes7	F: GATTGGGGGTGGTGTAGAGA R: GAAGGGACTGGGACTGGACT	2,5 mM	60 °C	210 bp
Vdr	F: TGGTAAGTCCCCAAGTCCAG R: CTCCAGGCTTCAGACACCTC	2,5 mM	60 °C	210 bp
RoRa	F: CCCCTACTGTTCCCTTCACCA R: AGCTGCCACATCACCTCTCT	5 mM	65 °C	202 bp
Bcl6	F: CCTGAGGGAAGGCAATATCA R: CGGCTGTTCAAGAACTCTTC	2,5 mM	60 °C	153 bp
Tcf7	F: ATCCTTGATGCTGGGATCTG R: CTTCTCTGCCTTGGGTTCTG	2,5 mM	60 °C	139 bp
STAT1	F: TGGTGAAATTGCAAGAGCTG R: TGTGTGCGTACCCAAGATGT	2,5 mM	60 °C	119 bp

**Tabelle 8**

Primer für quantitative PCRs. Die Transkription der Ziel Gene wurde mittels eines Forward-(F)- und eines Reverse-(R)-Primers unter den verschiedenen Reaktionsbedingungen quantifiziert.

### 3.16.3. Maus spezifische Antikörper

Spezifität	Klon	Isotyp	Fluorochrom	Quelle
aktivierende Antikörper für murine T-Zellen				
CD3	145-2C11	IgG1, κ	-	BD Bioscience
CD28	37.51	IgG2, λ1	-	BD Bioscience
blockierende Antikörper				
IL-4	11B11	ratIgG1	-	DRFZ
IL-12	C17.8	ratIgG2a	-	DRFZ
IFN-γ	AN18.17.24	ratIgG	-	DRFZ
Antikörper für FACS Analyse und Sortierung				
IL-10	JES5-16E3	IgG2b, κ	PE	eBioscience
IFN-γ	XMG1.2	IgG1, κ	PE-Cy™7	BD Bioscience
IL-17	TC11-18H10.1	ratIgG1, κ	PE	Biozol
IL-22 (murin/human)	IL22JOP	ratIgG2a, κ	APC	eBioscience
IL-22	1H8PWSR	ratIgG1, κ	PE	eBioscience
IL-2	JES6-5H4	ratIgG2b, κ	eFluor®450	eBioscience
TNFα	MP6-XT22	ratIgG1	APC-Cy™7	BD Bioscience
IL-4	11B11	ratIgG1	Cy5	DRFZ
CD4	RM4-5	IgG2a, κ	Pacific Blue™	BD Bioscience
CD4	GK1.5	IgG2b, κ	PerCP	Biozol
CD160	CNX46-3	ratIgG2a, κ	PE	eBioscience
CD62L	MEL14	ratIgG2a	PE	DRFZ
CD25	pC61.5	ratIgG1, λ	Cy5	DRFZ
LIVE/DEAD® Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit	fluorescent reactive dye	-	Anregung 405 nm Emission 526 nm	Invitrogen
pERK1/2	20A	mouselgG1	Pacific Blue™	BD Bioscience

Tabelle 9

Mausspezifische Antikörper zur Aktivierung, Blockierung und Anfärbung verschiedener Ziele.

### 3.16.4. Rekombinante Zytokine

Zytokin	Quelle
rmIL-2	R&D Systems
rmIL-12	R&D Systems
rmIL-4	R&D Systems
rmIL-6	R&D Systems
rmIL-23	R&D Systems
rhTGF-β1	R&D Systems

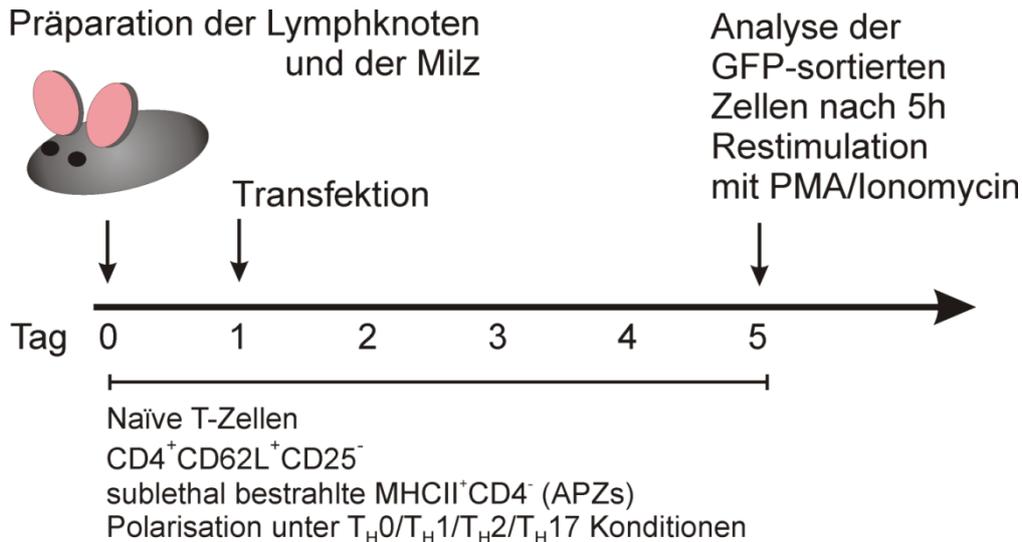
## 4. Ergebnisse



#### 4.1. Kostimulatorische Signale sind entscheidend für die Ausprägung der Notch Modulation von T-Helfer-Zellen

Der Notch Signalwegs steuert viele Differenzierungsschritte in verschiedenen Zellarten. In vorangegangenen Publikationen unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass der Notch Signalweg, insbesondere vermittelt durch den Liganden Delta-like-4, zur starken Anhebung der Expression des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 in T<sub>H</sub>1-Zellen führt [52, 53]. In T<sub>H</sub>0- und T<sub>H</sub>2-Zellen war dieser Effekt nicht zu sehen [54]. Damit konnte sowohl *in vivo*, als auch *in vitro*, gezeigt werden, dass die Aktivierung des Notch Signalweges eine starke Modulation der Eigenschaften von T<sub>H</sub>1-Zellen zur Folge hat. Andererseits wird durch etliche Veröffentlichungen proklamiert, dass der Notch Signalweg, an sich, im Stande ist die Polarisation von T-Helfer-Zellen zu steuern. So ist die Differenzierung von T<sub>H</sub>1- [47, 63, 64] und T<sub>H</sub>17- [65, 66] Zellen mit der Aktivierung des Notch Signalweges über die Delta-like-Liganden assoziiert, wohingegen die Aktivierung über Jagged-Liganden zur Differenzierung in Richtung T<sub>H</sub>2-, [47, 67] und regulatorischen [68, 69] T-Helfer-Zellen führen kann. Diese Kontroverse, auf welche Weise die Regulation der verschiedenen Effektor-T-Helfer-Zellen über den Notch Signalweg von Statten geht [31, 32, 42, 50, 54], sollte in dieser Arbeit auf transkriptionellem Level eingehender betrachtet werden. Es stellten sich die Fragen, welche Effekte direkt durch den Notch Signalweg, unabhängig von anderen Stimuli, reguliert werden, und welche Modulationen sich durch die Integration aus Notch Aktivierung und kostimulatorischen Differenzierungssignalen ergeben? Um dies eingehender untersuchen zu können, wurden unterschiedlich polarisierte Effektor-T-Helfer-Zellen *in vitro* generiert und mit einem konstitutiv aktiven Notch3 transfiziert. Der zeitliche Ablauf des Versuches ist in Abbildung 10 dargestellt. Neben Notch3 wurde, durch den gleichen Vektor vermittelt, GFP in den Zellen exprimiert, sodass mittels FACS selektiv Zellen mit Aktivierung des Signalweges herausgefiltert werden konnten. In Abbildung 11 A ist, am Beispiel modulierter T<sub>H</sub>1-Zellen, die Sortierstrategie und in Abbildung 11 B die schematische Auflistung der generierten Zellen mit und ohne konstitutiv aktivem Notchsignal dargestellt.

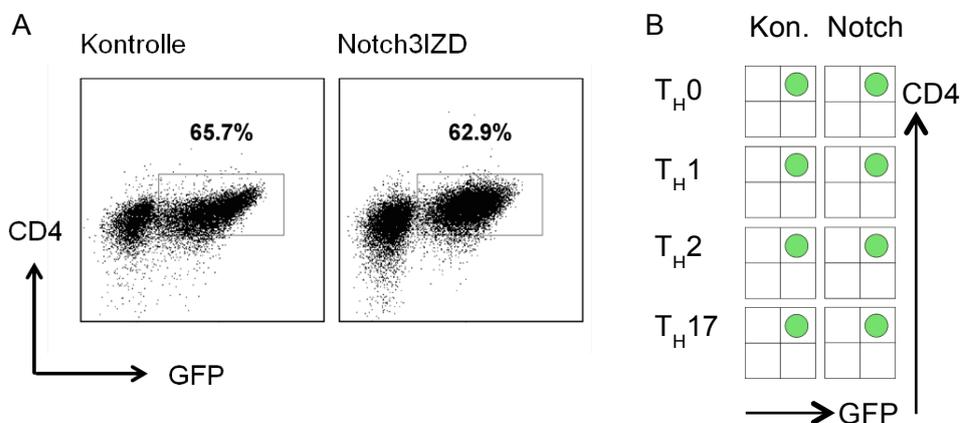
## Ergebnisse



### Abbildung 10

Experimenteller Ablauf der Notch-Modulation von  $T_H0^-$ ,  $T_H1^-$ ,  $T_H2^-$  und  $T_H17^-$  Zellen *in vitro*. Die Zellen wurden nach 24 Stunden retroviral mit einem GFP exprimierenden Kontroll-, oder GFP exprimierenden Notch-Plasmid, das zusätzlich die intrazelluläre Domäne von Notch3 exprimiert, transfiziert.

Durch FACS Sortierung wurden die *in vitro* modulierten T-Helfer-Zellen mit und ohne Notch Aktivierung isoliert (Abbildung 11A, Modulierte  $T_H1^-$ -Zellen). Die FACS Sortierung, lebender  $CD4^+GFP^+$  Zellen, erfolgte entsprechend dem Beispiel in Abbildung 11A, für  $T_H0^-$ ,  $T_H1^-$ ,  $T_H2^-$  und  $T_H17^-$ -Zellen (schematische Darstellung Abbildung 11B).



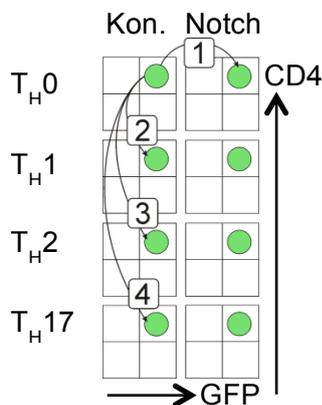
### Abbildung 11

Sortierschema der modulierten T-Helfer-Zellen. (A) Sortierung  $CD4^+GFP^+$  Zellen mit (N3IZD - Notch) und ohne (Kontrolle – Kon.) konstitutiv aktives Notch Signal am Beispiel modulierter (mit N3IZD) und nicht-modulierter (Kontrolle)  $T_H1^-$ -Zellen. Die Zellen wurden an Tag 5 mit PMA/Ionomycin restimuliert. Die oben abgebildeten Populationen wurden zuvor auf lebende (P $\beta$ ) Lymphozyten selektiert. (B) Sortierschema für die verschiedenen Notch modulierten und nicht modulierten T-Helfer-Zellen, die unter  $T_H0^-$ ,  $T_H1^-$ ,  $T_H2^-$  und  $T_H17^-$ -Bedingungen kultiviert wurden.

Die Transkriptomanalyse erfolgte mittels dem GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array von Affymetrix (Kapitel 3.10). Die so generierten Daten wurden zunächst in Einzelvergleichen (Abbildung 12A und Abbildung 15A) ausgewertet (Kapitel 3.11).

#### 4.1.1. Die Aktivierung des Notch Signalwegs in $T_H0$ -Zellen führt zu einem diffusen Expressionsprofil aus $T_H1$ -, $T_H2$ - und $T_H17$ -Zellen.

Zunächst wurde ermittelt, inwiefern die Notch Modulation von nicht-polarisierten  $T_H0$ -Zellen, ein Genexpressionsprofil induziert, das einer  $T_H1$ - (Stimulation mit rekombinantem IL-12),  $T_H2$ - (Stimulation mit rekombinantem IL-4), oder  $T_H17$ - (Stimulation mit rekombinantem IL-6, IL-23 und TGF- $\beta$ ) Polarisation zu zuordnen ist. Die verwendeten Kulturbedingungen sind im Kapitel 3.2 aufgeführt. Hierzu wurden die in Abbildung 12 dargestellten Einzelvergleiche, mittels Gruppenvergleichen (Kapitel 3.11.1), der Transkriptome von  $T_H1$ -,  $T_H2$ -,  $T_H17$ - und Notch modulierten  $T_H0$ -Zellen, mit Kontrolle modulierten  $T_H0$ -Zellen, kombiniert (Formel 6).



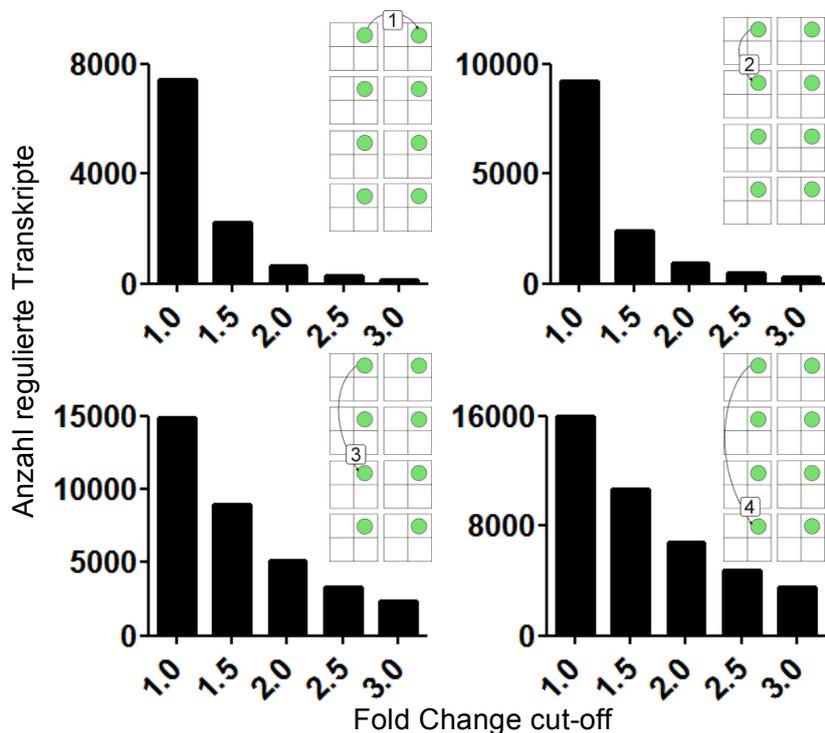
**Abbildung 12**

Notch Modulation von  $T_H0$ -Zellen im Vergleich zu  $T_H1$ -,  $T_H2$ - und  $T_H17$ -polarisierten Zellen. Die schematisch dargestellten Einzelvergleiche (1-4) wurden in Gruppenvergleichen kombiniert:  $T_H1$  (1+2),  $T_H2$  (1+3) und  $T_H17$  (1+4), um heraus zu finden, welcher Polarisation, die Modulation von  $T_H0$ -Zellen durch den Notch Signalweg am ehesten entspricht. (n=2)

Zunächst wurden die Einzelvergleiche (1-4) mit steigendem Fold Change cut-off berechnet und die signifikant regulierten Transkripte herausgefiltert (siehe Kapitel 3.11, Formel 2 und 4).

## Ergebnisse

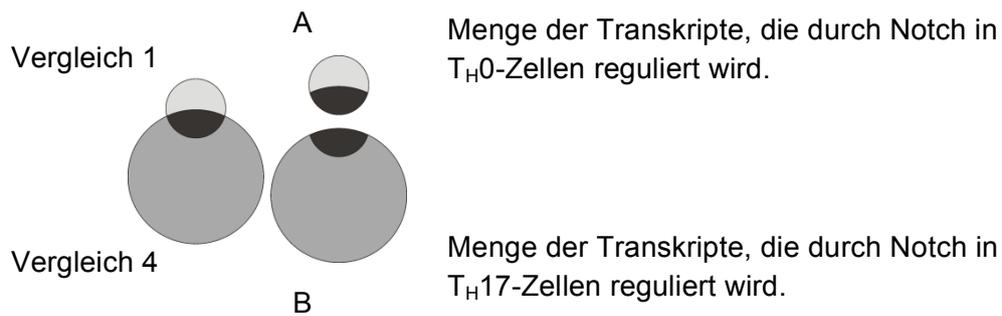
Abbildung 13 zeigt die Anzahl regulierter Transkripte für die Einzelvergleiche 1-4 mit steigendem Fold Change cut-off.



**Abbildung 13**

Bei Erhöhung des Grenzwerts (Fold Change) für die Einzelvergleiche nimmt die Anzahl der regulierten Transkripte kontinuierlich ab. (n=2)

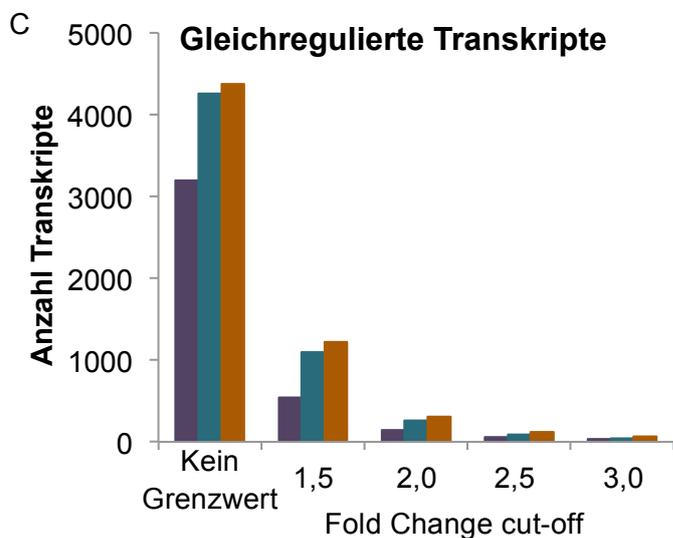
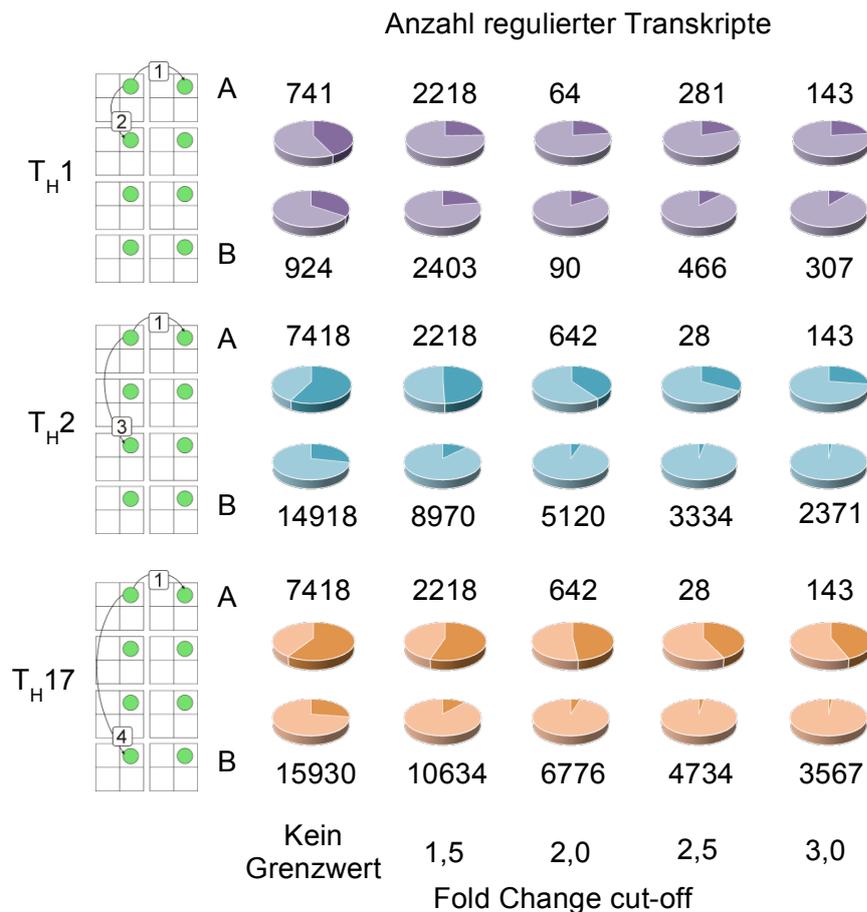
Die Betrachtung der Anzahl regulierter Transkripte in Abhängigkeit des gesetzten Fold Changes für die Einzelvergleiche verdeutlicht, dass umso stärker sich die Kulturbedingungen der verglichenen Zellen voneinander unterscheiden, desto mehr Transkripte werden signifikant differentiell reguliert. In Vergleich 1 unterscheiden sich die Zellen darin, dass sie mit und ohne Aktivierung des Notch Signals kultiviert wurden. In Vergleich 2 werden Zellen miteinander verglichen, die unter  $T_H0$ - (aktivierende AK:  $\alpha$ CD3,  $\alpha$ CD28, blockierende AK:  $\alpha$ IL-4,  $\alpha$ IFN- $\gamma$ ,  $\alpha$ IL-12 und rIL-2) und  $T_H1$ - (aktivierende AK:  $\alpha$ CD3,  $\alpha$ CD28, blockierende AK:  $\alpha$ IL-4, rIL-2 und rIL-12) Bedingungen kultiviert wurden. In Vergleich 3 werden  $T_H0$ - und  $T_H2$ - (aktivierende AK:  $\alpha$ CD3,  $\alpha$ CD28, blockierende AK:  $\alpha$ IFN- $\gamma$ ,  $\alpha$ IL-12 und rIL-4) Zellen miteinander verglichen. In Vergleich 4 werden  $T_H0$ -Zellen  $T_H17$  (aktivierende AK:  $\alpha$ CD3,  $\alpha$ CD28, blockierende AK:  $\alpha$ IL-4,  $\alpha$ IFN- $\gamma$ , rIL-6, rIL-23 und rTGF- $\beta$ ) kultivierten Zellen gegenüber gestellt. Für die Analyse gleich regulierter Transkripte unter verschiedenen Bedingungen wurde die Menge regulierter Transkripte eines Einzelvergleichs, mit der Menge regulierter Transkripte eines weiteren Einzelvergleichs herangezogen und deren Überlappung bestimmt. In Abbildung 14 ist dies am Beispiel von Vergleich 1+4 gezeigt für einen Fold Change cut-off von 2,0.



#### Abbildung 14

Darstellung gleich regulierter Transkripte als Überlappung von zwei Mengen am Beispiel von Notch modulierten  $T_H0$ -Zellen (Vergleich 1) und  $T_H17$  polarisierten Zellen (Vergleich 4) für einen Fold Change cut-off von 2,0.

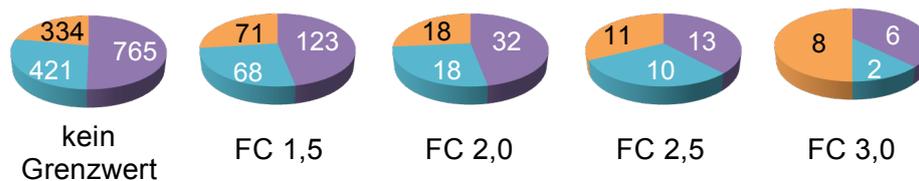
Bildet man die Schnittmenge gleich regulierter Transkripte aus zwei Einzelvergleichen, so kann in der Folge die Überlappung als Teil der Menge (A), oder der Menge (B) dargestellt werden. Je nachdem wie viele differentiell regulierte Transkripte innerhalb eines Einzelvergleichs identifiziert werden konnten, unterscheiden sich die Darstellungsformen A und B recht stark voneinander. In Abbildung 15 sind die beiden Darstellungen einander gegenüber gestellt. In der Darstellungsform A gibt es größere Überlappungen des Vergleichs 1 mit  $T_H2$  (Vergleich 3) und  $T_H17$  (Vergleich 4) polarisierten Zellen, wohingegen in der Darstellungsform B Überlappungen mit  $T_H1$ -Zellen überwiegen.



**Abbildung 15**

Vergleichende Analyse Subset-spezifischer Genexpressionsprofile mit Notch modulierten nicht polarisierten T-Helfer-Zellen (T<sub>H</sub>0). (A) Die Gesamtfläche entspricht allen in Vergleich 1 gefundenen differentiell regulierten Transkripten. Dunkel dargestellt ist die jeweilige Überlappung mit T<sub>H</sub>1- (Vergleich 2), T<sub>H</sub>2- (Vergleich 3), bzw. T<sub>H</sub>17- (Vergleich 4) Zellen. (B) Die Gesamtfläche entspricht der Anzahl regulierter Transkripte aus Vergleich 2 (T<sub>H</sub>1), 3 (T<sub>H</sub>2), oder 4 (T<sub>H</sub>17). Dunkel dargestellt ist wiederum die Überlappung mit den regulierten Transkripten aus dem Vergleich 1. (C) Die Anzahl der gleich regulierten Transkripte zwischen Notch modulierten T<sub>H</sub>0-Zellen und T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2-, bzw. T<sub>H</sub>17-Zellen, entsprechend den Überlappung (A+B). (n=2)

Vergleicht man die Schnittmengen aus Abbildung 15 A so wird deutlich, dass es etliche Transkripte gibt, die in den Gruppenvergleichen 1+2 ( $T_{H1}$ ), 1+3 ( $T_{H2}$ ) und/oder 1+4 ( $T_{H17}$ ) vorhanden sind. Daher wurden abschließend die Transkripte betrachtet, die nur in einem der Gruppenvergleiche zu finden sind (Kapitel 3.11, Formel 7  $T_{H1}^*$ ,  $T_{H2}^*$  und  $T_{H17}^*$ ). Dies ist in Abbildung 16 dargestellt.



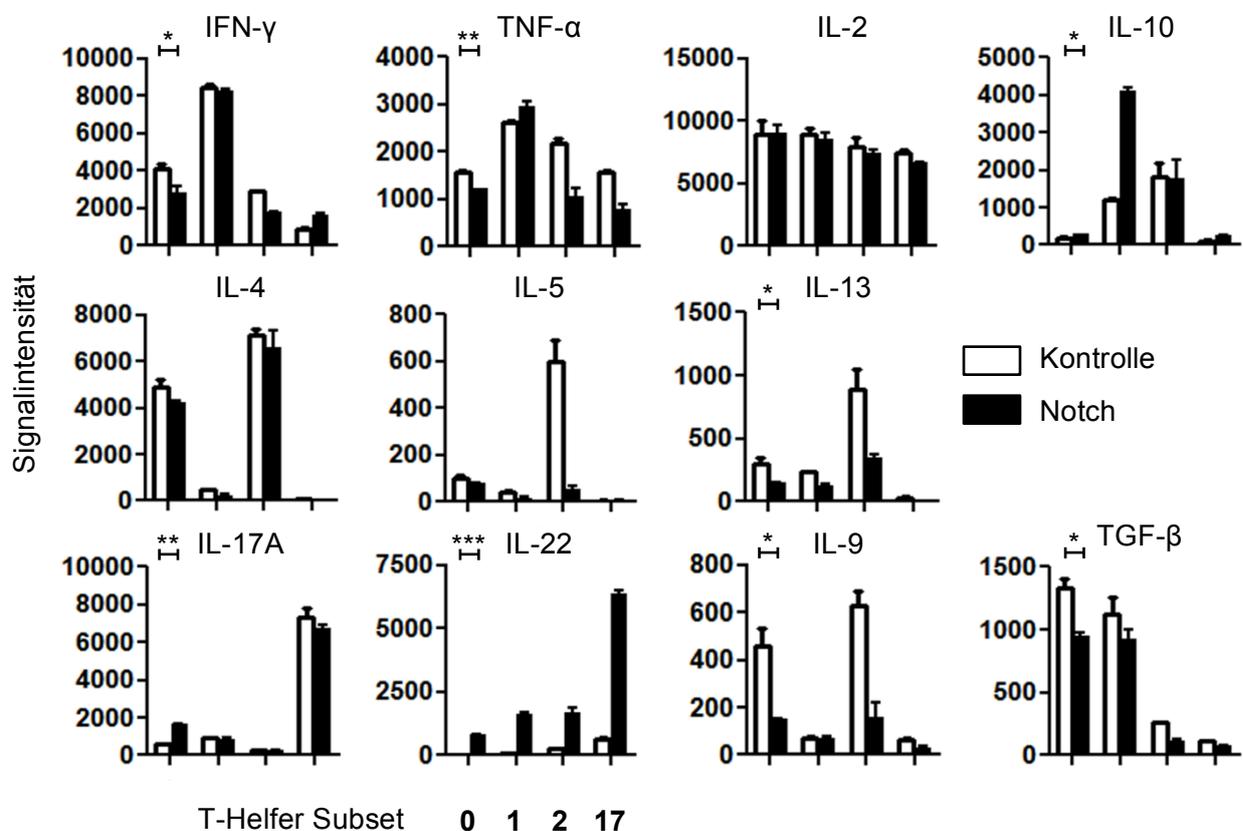
**Abbildung 16**

Transkripte die nur in einem Gruppenvergleich ( $T_{H1}^*$  (violett),  $T_{H2}^*$  (türkis),  $T_{H17}^*$  (orange)) gleich reguliert sind, wie in Notch modulierten  $T_{H0}$ -Zellen. Bei steigendem Fold Change cut-off bis 3,0. (n=2)

In den Gruppenvergleichen 1+2 ( $T_{H1}$ ), 1+3 ( $T_{H2}$ ) und 1+4 ( $T_{H17}$ ) zeigt sich, dass die Aktivierung des Notch Signalweges in  $T_{H0}$ -Zellen zu einem Expressionsprofil führt, das Ähnlichkeiten mit allen hier untersuchten Subsets aufweist. Die Überlappung Notch modulierter Transkripte in  $T_{H0}$ -Zellen mit  $T_{H17}$ -polarisierten Zellen ist hierbei am stärksten ausgeprägt (Abb. 15). Betrachtet man die durch Notch in  $T_{H0}$ -Zellen regulierten Transkripte etwas differenzierter und schaut sich ausschließlich die modulierten Transkripte an, die exklusiv in  $T_{H1}^*$ ,  $T_{H2}^*$ , oder  $T_{H17}^*$  Zellen auf die gleiche Weise reguliert sind (Abb. 16), wie in Notch modulierten  $T_{H0}$ -Zellen, so sieht man, dass es eine Verschiebung der Schnittmengen gibt. In Abbildung 15 gibt es größere Schnittmengen mit  $T_{H2}$ - und  $T_{H17}$ -Zellen, als mit  $T_{H1}$ -Zellen und in Abbildung 16 größere mit  $T_{H1}$ -Zellen. Für den restriktivsten Fold Change cut-off (3,0) ist wiederum die größte Übereinstimmung mit  $T_{H17}$ -Zellen zu sehen (Abb. 16). Die quantitative Betrachtung der Transkriptome zeigt, dass die Aktivierung des Notch Signalweges in nicht-polarisierten  $T_{H0}$ -Zellen, zu keiner klaren präferentiellen Polarisation in Richtung  $T_{H1}$ -,  $T_{H2}$ -, oder  $T_{H17}$ -Zellen führt. Eine Aktivierung des Notch Signalweges in  $T_{H0}$ -Zellen induziert vielmehr ein Expressionsprofil, das sowohl mit  $T_{H17}$ - und  $T_{H2}$ -Zellen, als auch mit  $T_{H1}$ -Zellen überlappt (Abb. 15+16). Um die quantitativen Beobachtungen auch qualitativ unterstützen zu können, wurden anschließend einige charakteristische Zytokine und Transkriptionsfaktoren analysiert, von denen ein Subset-spezifisches Expressionsmuster in den verschiedenen T-Helfer-Zellen zu erwarten war, und deren Expression mit Notch modulierten nicht-polarisierten  $T_{H0}$ -Zellen verglichen.

## 4.1.2. Die Modulation von T<sub>H</sub>0-Zellen durch den Notch Signalweg führt zu einer Erhöhung der T<sub>H</sub>17-spezifischen Zytokine IL-17A und IL-22

Die analysierten Effektor Subsets: T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 und T<sub>H</sub>17 (Kapitel 1.3.3 Abb. 4) haben deutliche Unterschiede in ihrem Zytokinexpressionsprofil. Es stellte sich die Frage, ob der Notch Signalweg in der Lage ist eines dieser Zytokinexpressionsprofile in T<sub>H</sub>0-Zellen zu induzieren. In Abbildung 17 ist zu sehen, dass die Notch Modulation einen unterschiedlich starken Einfluss auf die Expression von Zytokinen in T<sub>H</sub>0-Zellen hat. Die Aktivierung führt zur Reduktion der IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-13, IL-9 und TGF- $\beta$  Expression, wohingegen die Expression von IL-10, IL-17A und IL-22 erhöht ist. Somit wird durch die Aktivierung des Notch Signalwegs ein T<sub>H</sub>17-ähnliches Zytokinexpressionsprofil in T<sub>H</sub>0-Zellen induziert.



**Abbildung 17**

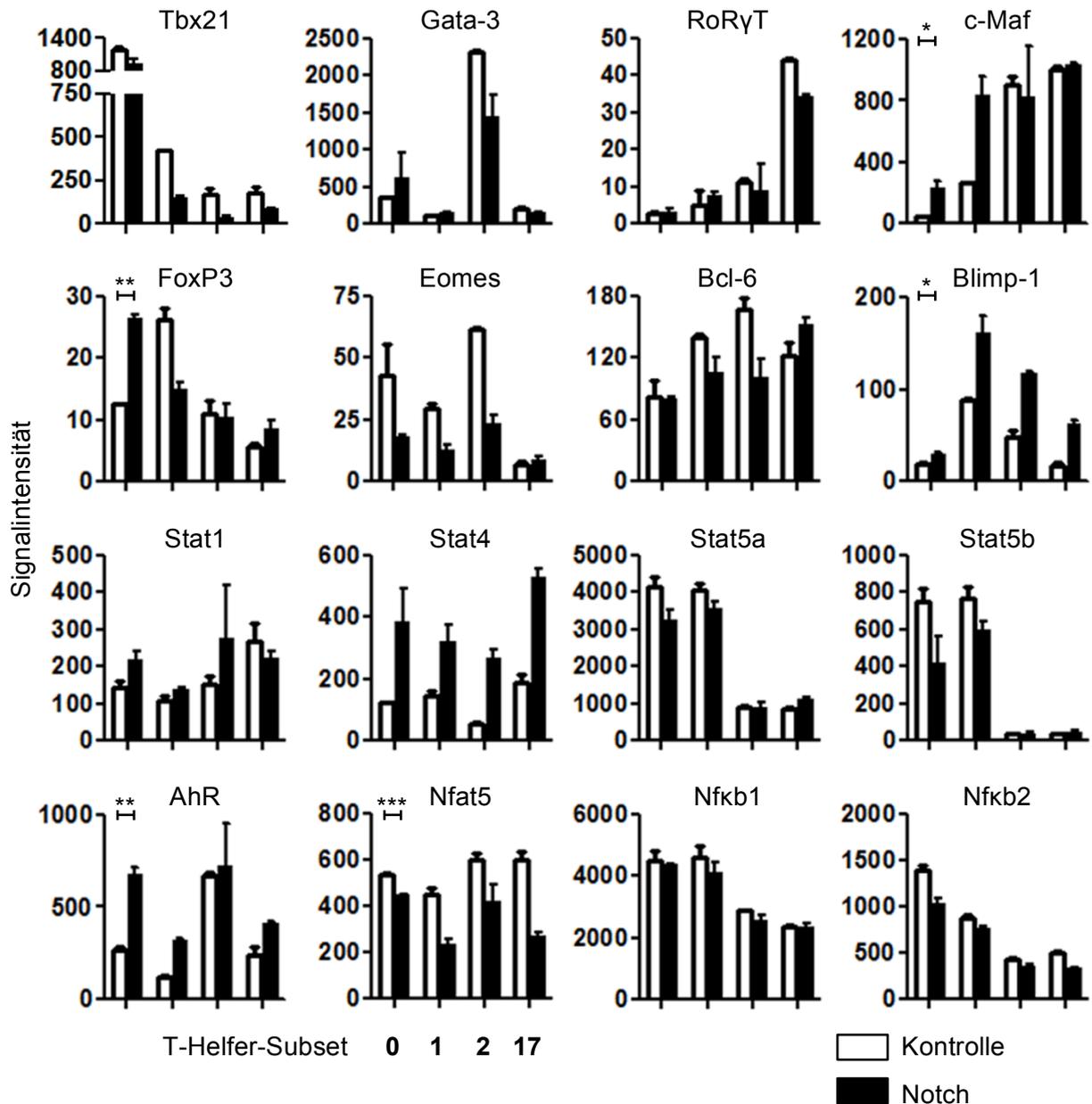
Signalintensität verschiedener, von T-Helfer-Zellen sekretierter, Zytokine. Es sind jeweils die Signale der Kontroll Zellen (weiße Balken), den Notch modulierten Zellen (schwarze Balken), gegenüber gestellt. Die Balkenpaare entsprechen den jeweiligen Kulturbedingungen unter denen die T-Helfer-Zellen (v.l. nach rechts) T<sub>H</sub>0, T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 und T<sub>H</sub>17 stimuliert wurden. (n=2)

Bei den betrachteten Zytokinen (Abb. 17) sieht man eine charakteristische Expressionsverteilung zwischen den untersuchten T-Helfer-Subsets. In T<sub>H</sub>1-Zellen werden die Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  (Abb. 17, obere Reihe) stärker exprimiert, als in T<sub>H</sub>2- und T<sub>H</sub>17-Zellen. In T<sub>H</sub>2-Zellen werden die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 (Abb. 17, mittlere Reihe)

am stärksten exprimiert. IL-10 (Abb. 17, obere Reihe) wird sowohl von T<sub>H</sub>2-, als auch von T<sub>H</sub>1-Zellen stark exprimiert. In T<sub>H</sub>17-Zellen haben die Signaturzytokine IL-17A und IL-22 die stärkste Signalintensität (Abb. 17, untere Reihe). Somit besitzen die untersuchten T-Helfer-Zellen auf Zytokinebene das erwartete Subset-spezifische Expressionsmuster, was verdeutlicht, dass die jeweilige *in vitro* Polarisation erfolgreich war. Würden in Abbildung 17 ausschließlich nicht-polarisierte T<sub>H</sub>0-Zellen mit und ohne Notch Modulation betrachtet werden, so könnte man schlussfolgern, dass die Aktivierung des Notch Signalweges zur Induktion von T<sub>H</sub>17-Zellen führt, beurteilt man jedoch den Einfluss der Notch Modulation unter Berücksichtigung aller untersuchten Subsets, so wird deutlich, dass es gravierende, kostimulationsabhängige Unterschiede gibt. Auf diese Weise betrachtet zeigt sich insbesondere für IL-10, bzw. IL-22, dass beide Faktoren in nicht polarisierten T<sub>H</sub>0-Zellen durch Notch hochreguliert sind, doch dass deren Expression noch weitaus stärker in modulierten T<sub>H</sub>1-, bzw. T<sub>H</sub>17-Zellen ist. Das lässt vermuten, dass Notch an sich, einen weitaus weniger starken direkten Einfluss auf das Genexpressionsprofil hat, sondern die Modulation hauptsächlich über Integration der Kostimulatorischen Signale verläuft. Vergleicht man CD4<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> Notch modulierten T-Helfer-Zellen der verschiedenen Subsets mit den Kontroll Plasmid transfizierten T-Helfer-Zellen des gleichen Subsets (Abb. 17), so werden die verschiedenen Zytokine unterschiedlich stark und mitunter mit abweichender Tendenz in den analysierten Subsets moduliert. Für die weitere Beurteilung, welchen Einfluss der Notch Signalweg auf die Polarisation in T<sub>H</sub>0-Zellen hat, wurde in der Folge die Expressionsverteilung Subset-spezifischer Transkriptionsfaktoren (Abb. 18) in T<sub>H</sub>0-, T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2- und T<sub>H</sub>17-Zellen mit und ohne Notch Modulation betrachtet.

### **4.1.3. Die Transkriptionsfaktoren Tbet (T<sub>H</sub>1), Gata-3 (T<sub>H</sub>2) und RoRγT (T<sub>H</sub>17) werden nicht durch den Notch Signalweg in T<sub>H</sub>0-Zellen moduliert**

Zunächst wurde der Einfluss der Notch Modulation auf die Expression der Subset-spezifischen Transkriptionsfaktoren, Tbx21 [70] (T<sub>H</sub>1-Zellen), Gata-3 [71] (T<sub>H</sub>2-Zellen) und RoRγT [72] (T<sub>H</sub>17-Zellen), in T<sub>H</sub>0-Zellen untersucht (Abb. 18). Neben diesen Schlüsseltranskriptionsfaktoren wurden des Weiteren die Transkriptionsfaktoren FoxP<sub>3</sub> [73] (regulatorische T-Helfer-Zellen (T<sub>Reg</sub>)), Eomes [74] (CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen), Bcl6 [75, 76] (follikuläre T-Helfer-Zellen) und Blimp-1 [77, 78] (terminale Differenzierung von T-Zellen), sowie die durch den T-Zell-Rezeptor aktivierten Transkriptionsfaktoren Nfat [79] und Nfkb [80] betrachtet. Zusätzlich wurde analysiert, ob die Notch Modulation von T<sub>H</sub>0-Zellen, zu einer Veränderung der Expression der Transkriptionsfaktoren Stat1, Stat4, Stat5a, Stat5b (aktiviert in T<sub>H</sub>1 polarisierten Zellen [81]), AhR (T<sub>Reg</sub> [82], T<sub>R</sub>1- [83] und T<sub>H</sub>17-Zellen [84]) und c-Maf (erhöhte Expression in T<sub>H</sub>2- [85], T<sub>R</sub>1- [83] und T<sub>H</sub>17-Zellen [86]) führt. In Abbildung 18 sind die durchschnittlichen Signalintensitäten der oben genannten Faktoren in T<sub>H</sub>0-, T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2- und T<sub>H</sub>17-Zellen, mit und ohne Notch Modulation aufgeführt.

**Abbildung 18**

Signalintensität verschiedener T-Zell spezifischer Transkriptionsfaktoren. Es sind jeweils die Signale der Kontrollzellen (weiße Balken), den Notch modulierten Zellen (schwarze Balken), gegenüber gestellt. Die Balkenpaare entsprechen den jeweiligen Stimulationsbedingungen unter denen die T-Helfer-Zellen (v.l. nach rechts)  $T_{H0}$ ,  $T_{H1}$ ,  $T_{H2}$  und  $T_{H17}$  kultiviert wurden. (n=2)

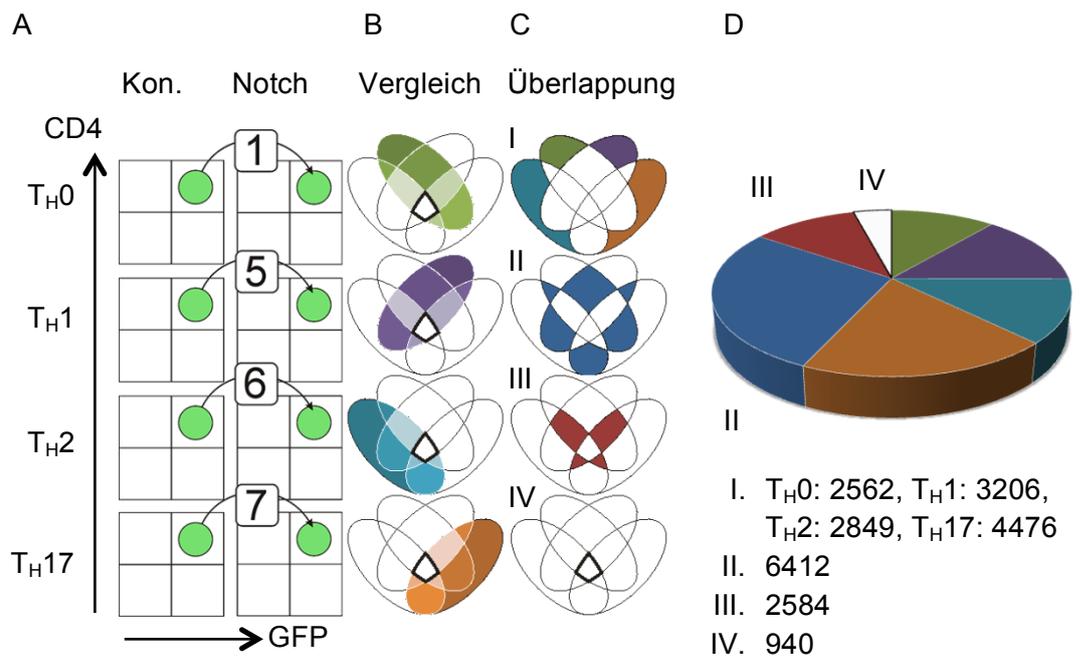
Die Expression der Schlüsseltranskriptionsfaktoren, der T-Helfer-Subsets  $T_{H1}$  (Tbx21),  $T_{H2}$  (Gata-3) und  $T_{H17}$  (RoRyT), die in der Literatur ausführlich beschrieben sind, wird durch den Notch Signalweg in  $T_{H0}$ -Zellen nicht signifikant moduliert (Abb. 18, obere Reihe). Auf diesem Level ist keine präferentielle Polarisation, durch den Notch Signalweg, in Richtung eines der Effektor-T-Helfer-Subsets, in  $T_{H0}$ -Zellen ersichtlich. Vergleicht man die Expression dieser Transkriptionsfaktoren innerhalb der untersuchten Effektor Subsets ( $T_{H1}$ ,  $T_{H2}$  und  $T_{H17}$ ) miteinander, so ist zu erkennen, dass unabhängig von der Aktivierung des Notch

Signalwegs, Tbx21 am stärksten in T<sub>H</sub>1-Zellen, Gata-3 am stärksten in T<sub>H</sub>2-Zellen und RoR $\gamma$ T am stärksten in T<sub>H</sub>17-Zellen exprimiert wird. Dies unterstreicht, dass es sich bei den *in vitro* polarisierten T-Helfer-Zellen, wie bereits für deren Zytokinexpression gezeigt werden konnte (Abb. 17), um die jeweiligen Effektor Subsets (T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 und T<sub>H</sub>17) handelt. Wie zuvor gezeigt (Kapitel 4.1.1) führt die Aktivierung des Notch Signalwegs in T<sub>H</sub>0-Zellen zu keiner eindeutigen Polarisation in Richtung eines der untersuchten Subsets (T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>17). Obwohl man eine signifikante Steigerung der IL-17A und IL-22 Expression (Abb. 17) in Notch modulierten T<sub>H</sub>0-Zellen sieht und die größte Übereinstimmung im Vergleich mit T<sub>H</sub>17-Zellen (Abb. 15, Gruppenvergleich 1+4) zu finden ist, ist der Notch Signalweg nicht in der Lage die Expressionslevel von IL-17A (Abb. 17 untere Reihe) und RoR $\gamma$ T (Abb. 18 oberste Reihe) auf das Niveau von T<sub>H</sub>17 polarisierten Zellen zu heben. Einzig die Expression von IL-22 wird durch den Notch Signalweg (auch polarisationsunabhängig) auf das Niveau von T<sub>H</sub>17-Zellen angehoben (Abb. 17, IL-22 Expression in Kontroll (weiße Balken) modulierten T<sub>H</sub>17-Zellen) Ausschlaggebend dafür könnte die Notch vermittelte Erhöhung des Arylhydrocarbon Rezeptors (AhR) in T<sub>H</sub>0-Zellen sein. In den Kapiteln 4.6 und 4.7 wird ein mögliches Zusammenspiel des Notch Signalwegs und des AhR eingehender beleuchtet. Neben den nicht-modulierten Schlüsseltranskriptionsfaktoren ist die Notch vermittelte Modulation von c-Maf und Blimp-1 besonders hervorzuheben. Insbesondere im Hinblick auf die durch Notch gesteigerte IL-10 Expression in T<sub>H</sub>1-Zellen, spielen c-Maf und Blimp-1 eine tragende Rolle (Neumann et. al., submitted).

Abschließend können wir festhalten, dass die Modulation von T<sub>H</sub>0-Zellen durch den Notch Signalweg zu keiner präferentiellen Polarisation, in Richtung eines der untersuchten Effektor Subsets (T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>17), führt. Zumindest sehen wir keine eindeutige Verstärkung der Expression eines spezifischen Transkriptionsfaktors, da die durch den Notch Signalweg modulierten Faktoren in T<sub>H</sub>0-Zellen (Abb. 18) sowohl mit T<sub>H</sub>1- (Stat4), T<sub>H</sub>2- (c-Maf), T<sub>H</sub>17- (AhR, c-Maf), terminaldifferenzierten- (Blimp-1), als auch mit regulatorischen T-Zellen (FoxP<sub>3</sub>, AhR) assoziiert werden können. Im folgenden Kapitel (4.1.4) wurde daher, die Auswirkung, der Notch Modulation, innerhalb der verschiedenen untersuchten T-Helfer-Subsets analysiert, um den integrativen Effekt der Notch Modulation auf Kostimulatorische Signale betrachten zu können.

#### 4.1.4. Die Aktivierung des Notch Signalwegs führt zur unterschiedlich starken Modulation der Expressionsprofile in T<sub>H</sub>0-, T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2- und T<sub>H</sub>17-Zellen

Der Notch Signalweg ist entscheidend für die Entwicklung von Zellen in den unterschiedlichsten Kompartimenten [87]. Es ist daher nicht überraschend, dass die Anzahl regulierter Transkripte innerhalb der Vergleiche (Abb. 19A+B) verschiedener T-Helfer-Subsets (T<sub>H</sub>0, T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>17) mit und ohne Aktivierung des Signalweges sich stark unterscheiden. So moduliert Notch die Expression von 7418 Transkripten in T<sub>H</sub>0-(Anhang I), 9533 Transkripten in T<sub>H</sub>1-(Anhang II), 9291 Transkripten in T<sub>H</sub>2-(Anhang III), und 11187 Transkripten in T<sub>H</sub>17-Zellen (Anhang IV). Schaut man sich als nächstes an, welche Überlappungen (Abb. 19 C) es zwischen den regulierten Transkripten der verschieden polarisierten Zellen gibt, so wird deutlich, dass die Mehrheit der Transkripte zur Gruppe I gehört (Abb.19 C und D). Die Einteilung der Überlappungen (Abb. 19) in unterschiedliche Gruppen ergibt sich wie folgt: Transkripte, die nur in einem (Gruppe I), zwei (Gruppe II), drei (Gruppe III), oder allen (Gruppe IV) betrachteten T-Helfer-Subsets durch Notch reguliert sind. Insgesamt konnten 23029 Transkripte identifiziert werden, deren Expression in mindestens einem T-Helfer-Subset (Abb. 19) durch Aktivierung des Notch Signalwegs moduliert wird. Die Kriterien und Algorithmen für die verschiedenen Abfragen sind in Kapitel 3.11 erläutert. Die Einzelvergleiche (Notch gg. Kontrolle) sind als Ellipsen in einem *Venn*-Diagramm dargestellt (Abb. 19 B und C).



**Abbildung 19**

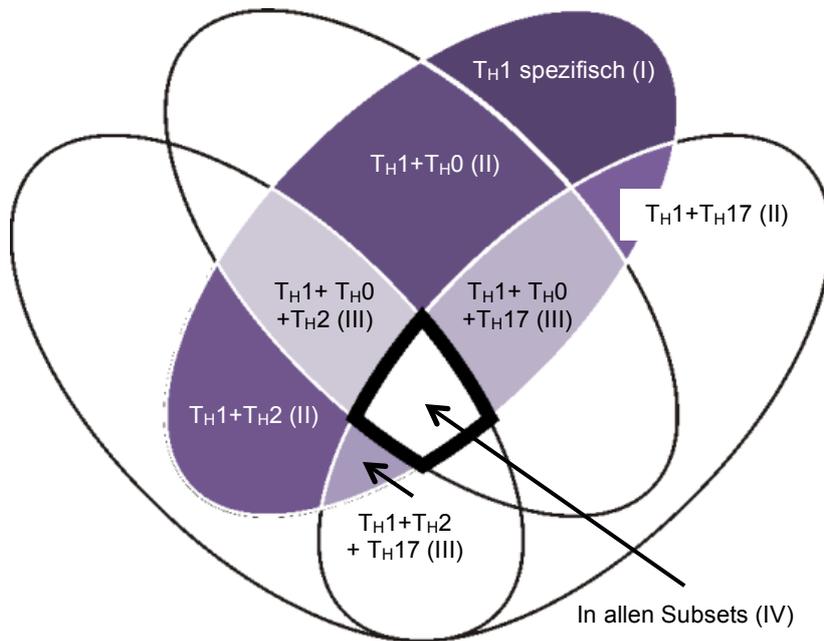
Einfluss der Notch Modulation unter verschiedenen Polarisationsbedingungen. (A) Schematische Darstellung der Transkriptomvergleiche. (B) Verteilung aller regulierten Transkripte in den unterschiedlichen T-Helfer-Subsets: T<sub>H</sub>0, T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 und T<sub>H</sub>17 (von oben nach unten). Für jeden Einzelvergleich ergeben sich acht Überlappungsmöglichkeiten mit den restlichen Einzelvergleichen. (C) Darstellung und Unterteilung der verschiedenen Überlappungsmöglichkeiten, die durch Notch in den einzelnen T-Helfer-Subsets beeinflussten Transkripte. (D) Anteil der verschiedenen Überlappungen an allen, durch Notch, in den hier untersuchten Subsets, regulierten Transkripten. (n=2)

Aus dieser Analyse wird deutlich, dass lediglich 4,1 % (940) der regulierten Transkripte polarisationsunabhängig, direkt durch den Notch Signalweg reguliert werden (Abb. 19 D, Gruppe IV). Der Hauptteil (56,9 %) wird polarisationsspezifisch (Abb. 19 D, Gruppe I) reguliert, was dafür spricht, dass der Effekt der Notch Modulierung in T-Helfer-Zellen stärker durch Integration der kostimulatorischen Signale wirkt, als durch direkte Notch vermittelte Genexpression. Etwas mehr als ein Drittel der modulierten Transkripte, die in den Gruppen II und III zu finden sind (Abb. 19 C und D), werden weder polarisationsabhängig, noch unabhängig reguliert. Eine mögliche Erklärung dafür könnten die HES-Gene sein, die direkt durch den Notch Signalweg reguliert werden, und deren eigene Expression oszilliert [88], sodass hier sekundär Effekte auftreten, die weder als polarisationsabhängig noch unabhängig identifiziert werden können. Um zunächst die Anzahl signifikant regulierter Transkripte, direkt abhängig von Notch, oder polarisationsabhängig moduliert durch Notch, weiter eingrenzen zu können, wurden aufsteigende Grenzwerte, für die in Abbildung 19 B dargestellten Vergleiche, gesetzt.

#### **4.1.5. Der Anteil Subset-spezifisch regulierter Transkripte in Notch modulierten T-Helfer-Zellen nimmt mit steigendem Fold Change cut-off zu**

Wie bereits im vorangegangenen Kapitel gezeigt werden konnte, werden mehr als die Hälfte der Notch modulierten Transkripte Subset-spezifisch reguliert (Kapitel 4.1.4, Abb. 19 D - Gruppe I). Um differenzieren zu können, ob es sich bei diesen Transkripten um stark, oder schwach differentiell regulierte Transkripte handelt, wurden in der Folge steigende Fold Change cut-offs gesetzt und erneut analysiert, inwiefern es Überlappungen unter verschiedenen Polarisationsbedingungen gibt. In Abbildung 20 A sind noch einmal die möglichen Überlappungen der Einzelvergleiche (Abb. 19 A) am Beispiel von Notch modulierten  $T_H1$ -Zellen dargestellt. Die Abfragen (Kapitel 3.11.2) wurden für alle 15 möglichen Überlappungen der vier verschiedenen Transkriptomvergleiche ( $T_{H0}$ ,  $T_{H1}$ ,  $T_{H2}$  und  $T_{H17}$  jeweils Notch gg. Kontrolle) modifiziert und für fünf unterschiedliche Fold Change cut-offs bis 3,0 durchgeführt (Abb. 20 B).

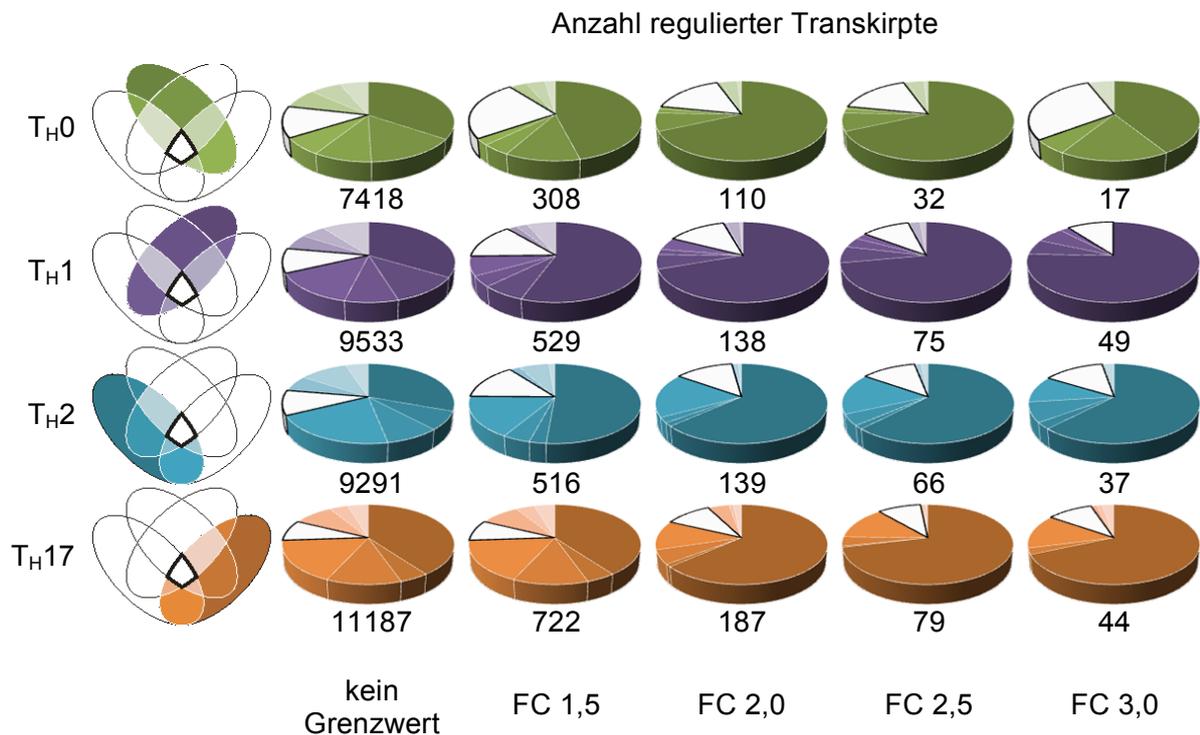
**A Überlappungen des T<sub>H</sub>1-Transkriptomvergleiches (Notch gg. Kontrolle) mit den entsprechenden Transkriptomvergleichen unter T<sub>H</sub>0, T<sub>H</sub>2 und T<sub>H</sub>17 Kulturbedingungen**



**Abbildung 20**

Verglichen wurden jeweils Notch modulierte mit nicht-modulierten Zellen. (A) Für jede Kulturbedingung ergeben sich 8 mögliche Schnittmengen, hier am Beispiel von Notch modulierten T<sub>H</sub>1-Zellen dargestellt. Einordnung in die verschiedenen Gruppen I-IV in Klammern. (B) Die Tortendiagramme geben die prozentuale Verteilung, für steigende FC Grenzwerte, auf die Schnittmengen wieder, die sich aus den Venn-Diagrammen ergeben.

**B Veränderung der Anteile der Überlappungen bei steigendem Fold Change**



Der prozentuale Anteil der direkt durch den Notch Signalweg regulierten Transkripte bleibt bei Einführung eines Fold Change Grenzwertes relativ konstant (Abb. 20 B). Eine Ausnahme stellen die nicht polarisierten T-Helfer-Zellen (T<sub>H</sub>0) dar. Die Subset-spezifisch regulierten Transkripte nehmen bis zu einem Fold Change cut-off von 2,5 zu, bei einer weiteren Anhebung des Grenzwertes auf 3,0, jedoch deutlich ab (Abb. 20 B, T<sub>H</sub>0). In Notch

modulierten  $T_H0$ -Zellen werden fast 2/3 der stark regulierten Transkripte (FC 3,0) auch, in mindestens einem anderen Subset, durch den Notch Signalweg in die gleiche Richtung reguliert (Abb. 20 B). In  $T_H1$ -,  $T_H2$ - und  $T_H17$ -Zellen, die durch den Notch Signalweg moduliert werden nimmt der Anteil der Subset-spezifisch regulierten Transkripte mit steigendem Fold Change Grenzwert stark zu (Abb. 20 B). Die Anteile der Transkripte, die in zwei, oder drei Subsets gleich reguliert sind nehmen hingegen deutlich ab. Das veranschaulicht, dass der Effekt der Notch Modulation zu einem kleinen Teil darin besteht, direkt auf die Transkription verschiedener Gene zu wirken, und zu einem weitaus größeren Teil darin, andere Stimuli, die die Genexpression beeinflussen können, zu integrieren. Da wir in nicht-polarisierten  $T_H0$ -Zellen weniger, zu integrierende, Stimuli haben, erklärt dies auch, weshalb wir weniger Subset-spezifisch regulierte Transkripte finden, als in  $T_H1$ -,  $T_H2$ -, und  $T_H17$ -Zellen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Notch Modulation nicht polarisierter T-Helfer-Zellen nicht per Se zu einer präferentiellen Polarisation in Richtung eines der untersuchten Subsets  $T_H1$ ,  $T_H2$ , oder  $T_H17$  führt (Kapitel 4.1.1-3), sondern vielmehr die Genexpression in den verschiedenen Subsets, durch das Zusammenspiel der Notch Aktivierung und der vorhandenen Stimuli, individuell verändert wird. Besonders hervorzuheben ist die Notch vermittelte Modulation der Zytokine IL-10 und IL-22 unter  $T_H1$ -, bzw.  $T_H17$ -polarisierenden Bedingungen (Kapitel 4.1.2, Abb. 17).

Obwohl in einem geringen Maße auch in  $T_H0$ - und  $T_H17$ -Zellen eine Notch vermittelte Anhebung der IL-10 Expression zu sehen ist, so ist sie doch weitaus stärker ausgeprägt in  $T_H1$ -Zellen (Abb. 17). Um die Modulation der IL-10 Expression durch den Notch Signalweg in  $T_H1$  polarisierten Zellen weitergehend zu untersuchen und gegebenenfalls noch andere Faktoren zu identifizieren, die direkt an dieser Regulation beteiligt sind, haben wir uns in der Folge die Transkriptome IL-10 produzierender ( $IL-10^+$ ) und nicht produzierender ( $IL-10^-$ )  $T_H1$ -Zellen angeschaut. Der Fokus lag hierbei auf Transkriptionsfaktoren, die durch den Notch Signalweg induziert, bzw. reguliert werden (Kapitel 4.2).

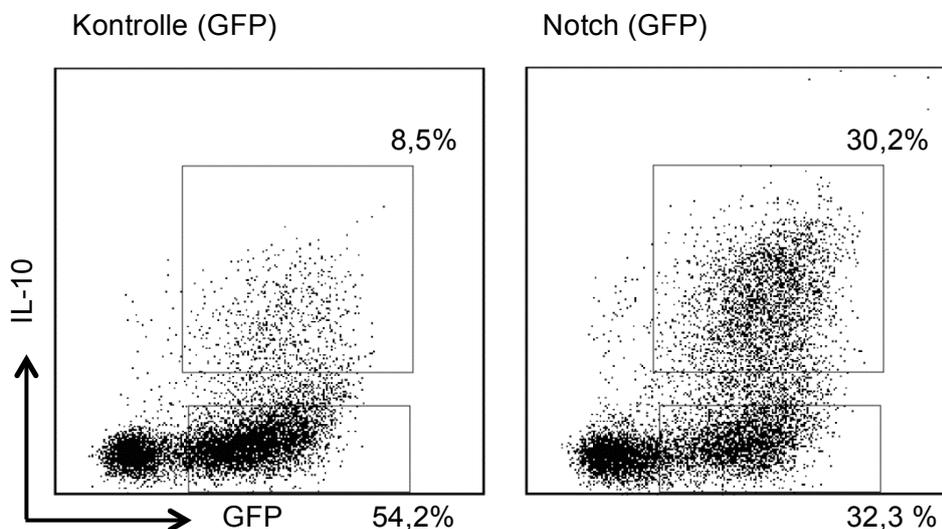
Außerdem wurde innerhalb dieser Genexpressionsanalyse, das, zur IL-10-Familie dazugehörige Zytokin IL-22, als direktes Notch Ziel identifiziert (Kapitel 4.1.2, Abb. 17). Im Gegensatz zu IL-10 hat IL-22 keinen direkten Einfluss auf die Lymphozyten, sondern wirkt modulierend auf das Gewebe. Es wird kontrovers diskutiert, ob IL-22 dabei eine entzündungsfördernde, oder hemmende Rolle einnimmt. Auf der einen Seite fördert IL-22 während einer Infektion wichtige Abwehr- und Schutzfunktionen der Epithelzellen, wie Steigerung der Schleimabsonderung [89, 90], Erneuerung und Reparatur des Gewebes [91, 92], Produktion anti-mikrobieller Proteine [93-95] und Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen zum Dirigat der Entzündung [96-98], auf der anderen Seite können eben diese

Entzündungsförderung und Steigerung der Zellproliferation pathologische Ausmaße annehmen, wenn sie nicht hinreichend kontrolliert werden [37]. Die Notch vermittelte Modulation der IL-22 Expression wurde in der Folge eingehender in  $T_H1$ -,  $T_H17$ -, und  $T_H22$ -Zellen untersucht (Kapitel 4.6-8). Insbesondere im Hinblick auf die kooperative Wirkung des Notch- und AhR-Signalweges [31, 99].

#### 4.2. Vergleichende Transkriptomanalyse IL-10 sekretierender und nicht-sekretierender Notch modulierter T<sub>H</sub>1-Zellen

Die Expression von IL-10 ist ein entscheidender Faktor, um einer dysregulierten Immunantwort, wie sie bei Allergien, Autoimmunität, und chronischen Entzündungen auftritt (Kapitel 1.3.4, Abb. 5), entgegen zu wirken. In der Literatur sind bereits einige Transkriptionsfaktoren beschrieben, die die Expression von IL-10 in unterschiedlichen Zellen positiv beeinflussen können. Wir konnten bereits zeigen, dass, in Abhängigkeit eines STAT4 Signals in T<sub>H</sub>1-Zellen, die Expression des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 durch Notch drastisch gesteigert werden kann [53]. Dennoch verfügen nicht alle Zellen, die innerhalb einer Kultur, sowohl ein Notch-, als auch ein STAT4-Signal erhalten haben, über die Kapazität IL-10 zu exprimieren. Wir wollten daher wissen, worin sich die Transkriptome IL-10-produzierender-(IL-10<sup>+</sup>)- und nicht-produzierender-(IL-10<sup>-</sup>)-Zellen, die ansonsten unter identischen Bedingungen generiert wurden, unterscheiden. Um dies eingehender zu untersuchen wurden T<sub>H</sub>1-Zellen *in vitro* generiert und ±Notch Aktivierung kultiviert. An Tag 5 wurden dann mit Hilfe eines IL-10 Sekretions Assay die IL-10<sup>+</sup>-Zellen sortiert (Kapitel 3.8). Anschließend wurden die Transkriptome (Kapitel 3.11.3) der sortierten Zellen analysiert.

Unter T<sub>H</sub>1 Bedingungen kultivierte Zellen

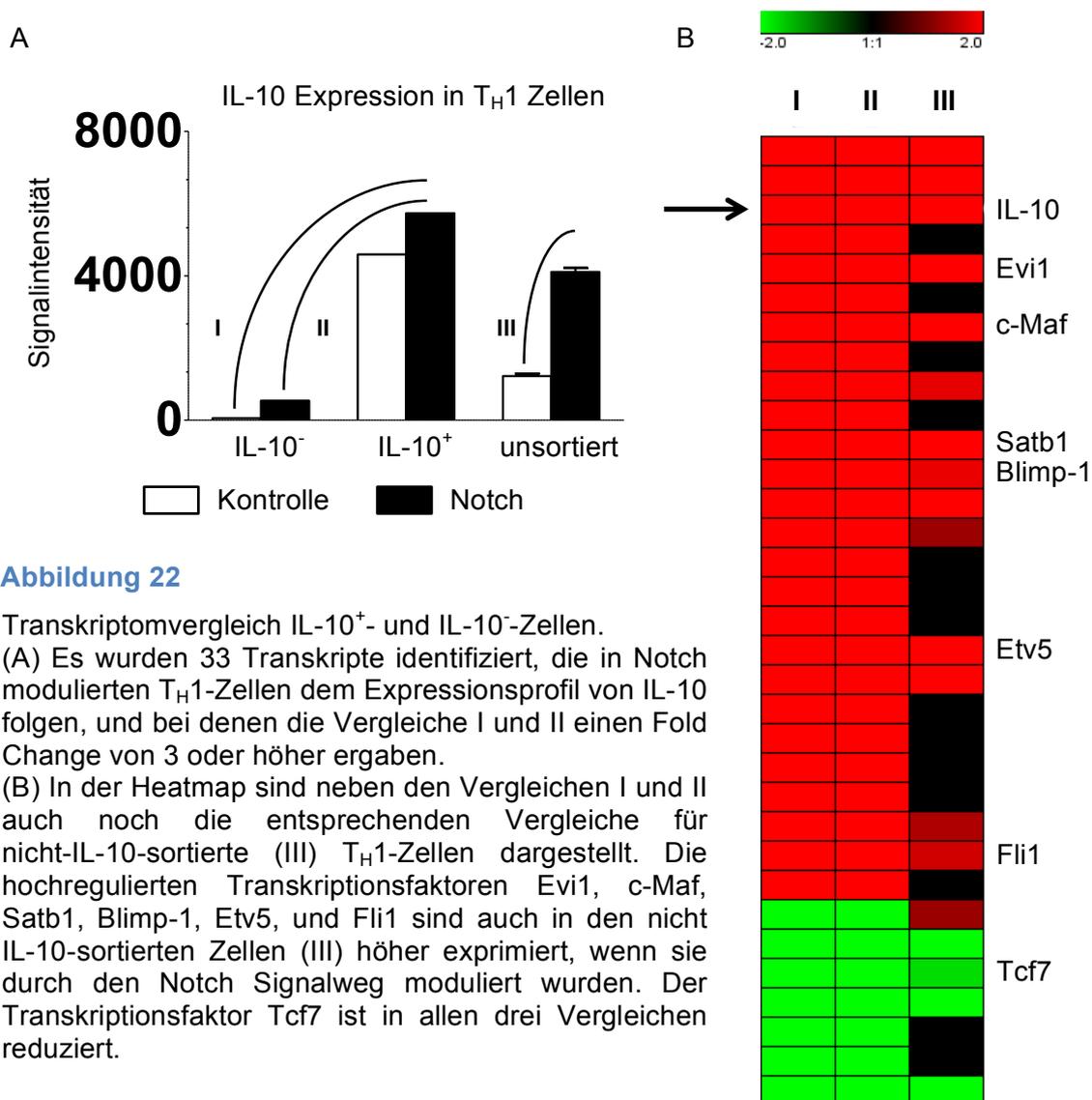


**Abbildung 21**

Sortierung IL-10<sup>+</sup>- und IL-10<sup>-</sup>-T<sub>H</sub>1-Zellen mittels IL-10 Sekretions Assay (IL-10-SA). Naïve T-Helfer-Zellen wurden *in vitro* für 5 Tage unter T<sub>H</sub>1 Bedingungen Kultiviert, nach 24 Stunden Kultur wurden die Zellen retroviral transfiziert, entweder mit Kontroll-(links), oder Notchplasmid (rechts). An Tag 5 wurden die restimulierten Zellen sortiert.

## 4.2.1. Identifizierung Notch modulierter Transkriptionsfaktoren mit einem IL-10 spezifischen Expressionsmuster in T<sub>H</sub>1-Zellen

Beim Vergleich der Transkriptome der sortierten Zellen, konnten insgesamt 8442 Transkripte identifiziert werden, die dem Expressionsprofil von IL-10 folgen (Kapitel 3.11.3). Durch das Setzen eines Fold Change Cut-Offs von 3,0 wurde die Anzahl auf 33 Transkripte eingegrenzt. Unter den 33 differentiell exprimierten Transkripten konnten sieben Transkripte, als Transkriptionsfaktoren identifiziert werden (Abb. 22).



**Abbildung 22**

Transkriptomvergleich IL-10<sup>+</sup>- und IL-10<sup>-</sup>-Zellen.

(A) Es wurden 33 Transkripte identifiziert, die in Notch modulierten T<sub>H</sub>1-Zellen dem Expressionsprofil von IL-10 folgen, und bei denen die Vergleiche I und II einen Fold Change von 3 oder höher ergaben.

(B) In der Heatmap sind neben den Vergleichen I und II auch noch die entsprechenden Vergleiche für nicht-IL-10-sortierte (III) T<sub>H</sub>1-Zellen dargestellt. Die hochregulierten Transkriptionsfaktoren Evi1, c-Maf, Satb1, Blimp-1, Etv5, und Fli1 sind auch in den nicht IL-10-sortierten Zellen (III) höher exprimiert, wenn sie durch den Notch Signalweg moduliert wurden. Der Transkriptionsfaktor Tcf7 ist in allen drei Vergleichen reduziert.

Die untersuchten Transkriptome IL-10<sup>+</sup>- und IL-10<sup>-</sup>-Populationen von T<sub>H</sub>1-Zellen, die entweder mit dem Notch-, oder dem Kontrollplasmid transfiziert wurden (Abb. 22), lagen jeweils als Einzelwerte vor. Um möglichst wenig falsch positive Transkripte für die weiterführenden Untersuchungen zu haben wurde neben dem Fold Change cut-off, auch ein Grenzwert für die Signalintensität gesetzt (Kapitel 3.11.3). Der Grenzwert 46,58 entspricht der durchschnittlichen Signalintensität aller Signale auf den gemessenen Chips des IL-10

Sekretionsexperimenten. Wie schon zuvor erwähnt galt unser Hauptaugenmerk den Transkriptionsfaktoren, da die bereits gezeigten Daten (Kapitel 4.1.2, Abb. 17) darauf hinweisen, dass Notch nicht allein für die Produktion von IL-10 verantwortlich ist. Auch wenn der Notch Signalweg zu einer signifikanten Erhöhung der IL-10 Expression in nicht-polarisierten ( $T_H0$ ) Zellen führt, so ist dieser Effekt in Notch modulierten  $T_H1$ -Zellen wesentlich stärker (Kapitel 4.1.2, Abb. 17). Die differentiell regulierten Transkripte (Abb. 22 B) wurden in der Folge mit Hilfe der Gene Ontology website analysiert [100]. Die Faktoren Evi1, c-Maf, Satb1, Blimp-1, Etv5, Fli1 und Tcf7 konnten mit GO:Terms (Gen Ontologie:Begriffen), die den Begriff „Transcription“ tragen, assoziiert werden (Tab. 10). Eine Beschreibung der GO:Terms findet sich im Abkürzungsverzeichnis.

Gen /GO:Term	Evi1	c-Maf	Satb1	Prdm1 (Blimp1)	Etv5	Fli1	Tcf7
GO:0000122		√	√	√			
GO:0000981		√					
GO:0003700	√	√	√		√	√	√
GO:0005667							√
GO:0006351	√	√	√	√		√	√
GO:0006355	√	√	√	√	√	√	√
GO:0006357							√
GO:0006366		√					
GO:0010628*		√		√			
GO:0044212					√		√
GO:0045892	√						
GO:0045893	√				√		
GO:0045944	√	√					

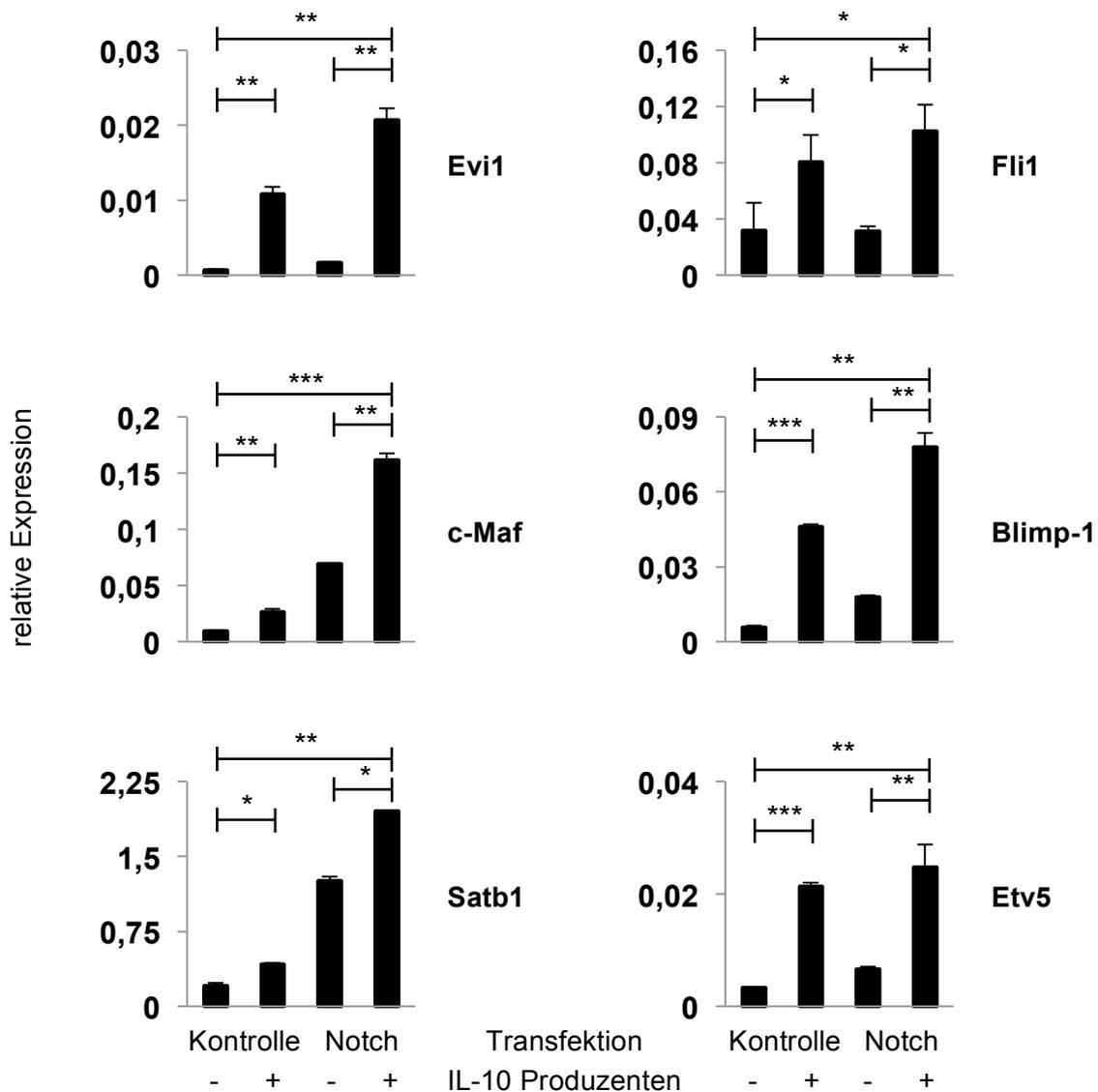
**Tabelle 10**

Notch modulierte Faktoren in IL-10<sup>+</sup>- $T_H1$ -Zellen, die mit GO:Terms assoziiert sind, die das Wort „Transcription“ enthalten. Eine Ausnahme ist GO:0010628\*. Dieser Begriff steht für den biologischen Prozess: positive Regulation der Genexpression.

In der Folge wurden vor allem die, durch Notch Modulation, verstärkten Transkriptionsfaktoren (Abb. 22 B) Evi1, c-Maf, Satb1, Blimp-1, Etv5 und Fli1 eingehender untersucht. Zunächst wurde die Expression dieser Faktoren, durch real time PCR, in IL-10<sup>+</sup>- und IL-10<sup>-</sup>- $T_H1$ -Zellen, mit und ohne Notch Modulation, verifiziert (Kapitel 4.2.2).

#### 4.2.2. Quantifizierung Notch modulierter Transkriptionsfaktoren in IL-10 sortierten T<sub>H</sub>1-Zellen

Notch Modulation von T<sub>H</sub>1-Zellen führt zu einer starken Erhöhung der IL-10 Expression (Abb. 21). Dennoch besitzen nicht alle Notch modulierten T<sub>H</sub>1-Zellen die Fähigkeit IL-10 zu exprimieren. Im vorangegangenen Kapitel konnten durch den Transkriptomvergleich IL-10-produzierender- und nicht-produzierender T<sub>H</sub>1-Zellen die Transkriptionsfaktoren Evi1, c-Maf, Satb1, Fli1, Blimp-1 und Etv5, als durch den Notch Signalweg erhöhte Transkripte identifiziert werden (Abb. 22). Eine Quantifizierung dieser Faktoren (Abb. 23), durch real-time PCR, zeigt eine spezifische Erhöhung der mRNA Expression in IL-10 positiven T<sub>H</sub>1-Zellen, und jeweils die stärkste Expression in Notch modulierten IL-10 positiven T<sub>H</sub>1-Zellen.



**Abbildung 23**

Quantifizierung der Transkriptionsfaktorexpression mittels real-time PCR. Die relative Expression, der zuvor identifizierten Transkriptionsfaktoren ist in IL-10<sup>+</sup>-T<sub>H</sub>1-Zellen erhöht und wird durch den Notch Signalweg weiter verstärkt. (n=3)

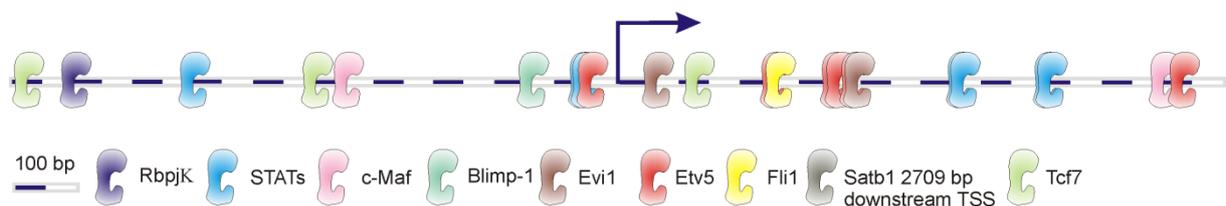
Die Expressionsverteilung der Transkriptionsfaktoren aus dem Transkriptomvergleich IL-10<sup>+</sup>- und IL-10<sup>-</sup>-Zellen (Kapitel 4.2.1, Abb. 22) konnte mittels quantitativer PCR bestätigt werden (Abb. 23). Die Transkriptionsfaktoren Evi1, Fli1, c-Maf, Blimp-1, Satb1 und Etv5 sind alle signifikant in IL-10 positiven T<sub>H</sub>1-Zellen erhöht (Abb. 23) und deren Expression wird durch Aktivierung des Notch Signalweges in IL-10-sortierten und nicht-sortierten T<sub>H</sub>1-Zellen erhöht (Kapitel 4.2.1; Abb. 22).

Als nächstes stellte sich die Frage, inwieweit diese Beobachtung biologisch relevant ist. Um dies eingehender zu beleuchten wurde zunächst *in silico* der murine IL-10-Promotor nach putativen Bindungsstellen für die identifizierten Transkriptionsfaktoren durchsucht. Hierbei wurde auch der Transkriptionsfaktor Tcf7 berücksichtigt, dessen Expression durch Aktivierung des Notch Signalweges reduziert ist (Kapitel 4.2.1, Abb. 22).

### 4.2.3. Blimp-1 und c-Maf binden in konservierten nicht-codierenden Sequenzen oberhalb des Transkriptionsstartpunktes des IL-10 Gens

Zunächst wurde das murine IL-10 Gen betrachtet. Hierfür wurde der MatInspector, der Genomatix Software Suite verwendet [101]. Analysiert wurden putative Bindungsstellen für die zuvor identifizierten Transkriptionsfaktoren (Kapitel 4.2.1, Abb. 22) in einem Bereich von 1000 Basenpaaren ober- und unterhalb des Transkriptionsstartpunkts (TSS - transcription start site) des IL-10 Gens. Zusätzlich wurden die putativen Bindungsstellen für das Notch response element Rbpjk und für STATs (signal transducers and activators of transcription) mit angezeigt (Abb. 24).

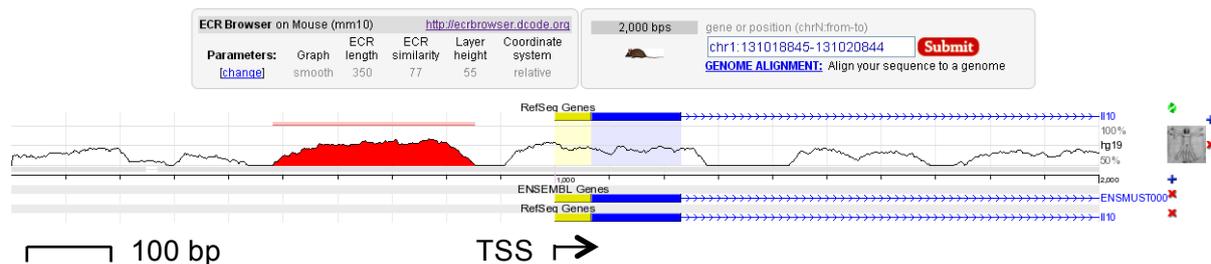
muriner IL-10 Promotor



#### Abbildung 24

Darstellung des murinen IL-10-Promotors mit putativen Bindungsstellen, für die zuvor identifizierten Transkriptionsfaktoren. Adaptiert vom MatInspector der Genomatix Software Suite, putative Bindungsstellen der, in Notch modulierten IL-10<sup>+</sup>-T<sub>H</sub>1-Zellen, signifikant erhöhten Transkriptionsfaktoren.

Mit Ausnahme des chromatinremodulierenden Faktors Satb1, verfügen alle analysierten Transkriptionsfaktoren (Rbpjk, STATs, c-Maf, Blimp-1, Evi1, Etv5, Fli1 und Tcf7) über putative Bindungsstellen im Bereich von 1000 Basenpaaren ober- und unterhalb des TSS im murinen IL-10 Gen (Abb. 24). Als nächstes wurden mittels rVista 2.0 [102] evolutionär konservierte Regionen (ECR - evolutionary conserved region), zwischen Mensch und Maus, innerhalb dieser Region (siehe Abb. 24) um den TSS analysiert. Als Parameter der Analyse wurden die „Core ECR“-Einstellungen [103] übernommen. Bei Verwendung dieser Einstellung werden Sequenzbereiche mit einer Identität  $\geq 77\%$  und einer minimalen Länge von 350 Basen, als evolutionär konserviert identifiziert. Der auf diese Weise analysierte Bereich ist in Abbildung 25 dargestellt. Regionen, die die „Core ECR“-Einstellungen erfüllen, sind rot markiert.



### Abbildung 25

Sequenzabgleich des murinen und humanen IL-10-Gens. Dargestellt ist der Sequenzbereich analog zu Abbildung 24. Rot markierte Bereiche beschreiben die evolutionär konservierten Regionen.

Innerhalb des konservierten Bereichs, binden die Transkriptionsfaktoren Tcf7, c-Maf und Blimp-1 (v.l.n.r.). Innerhalb der Notch modulierten IL-10<sup>+</sup>-T<sub>H</sub>1-Zellen ist die Tcf7 Expression reduziert (Kapitel 4.2.1; Abb. 22) und die Expression von c-Maf und Blimp-1 signifikant erhöht (Kapitel 4.2.1; Abb. 22, 23). Sowohl für c-Maf [31, 41, 83, 86, 104-106], als auch Blimp-1 [78, 107, 108], konnte in unterschiedlichen Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems gezeigt werden, dass sie an der Regulation der IL-10 Expression beteiligt sind.

In der Folge wurden die hochregulierten Transkriptionsfaktoren in Notch modulierten IL-10<sup>+</sup>-T<sub>H</sub>1-Zellen eingehender untersucht. Hierfür wurden siRNAs für IL-10, STAT4, c-Maf, Satb1, Fli1, Blimp-1, Evi1 und Etv5 generiert, um herauszufinden, welchen Einfluss der Knock-down dieser Faktoren, auf die IL-10 Expression in Notch modulierten T<sub>H</sub>1-Zellen hat. Neben dem siRNA vermittelten Knock-down wurde des Weiteren versucht, Überexpressionsplasmide für die verschiedenen Transkriptionsfaktoren zu generieren (Kapitel 4.4, Überexpression von c-Maf), und einen konditionellen Knock-down in Mäusen, mittels Anwendung des Cre loxP Systems, zu etablieren (Kapitel 4.4 konditioneller Knock-out von Blimp-1). Zunächst werden wir uns den getesteten siRNAs (Kapitel 4.3) widmen.

### 4.3. siRNA Knock-down von Transkriptionsfaktoren, die in Notch modulierter T<sub>H</sub>1-Zellen verstärkt exprimiert werden

Die Möglichkeiten ein Defizit von Transkriptionsfaktoren in einem zellulären System zu untersuchen sind häufig durch das Fehlen geeigneter genetisch-modifizierter Zellen begrenzt. So führt in vielen Fällen der Knock-out von Transkriptionsfaktoren zu einer Entwicklungsstörung von Zellpopulationen, kompletter Organe, oder verläuft sogar embryonal letal [109]. Hier bietet die Nucleofection™ von Zellen, mit stabilisierter siRNA, eine gute Möglichkeit, einen spezifischen Knock-down dieser Faktoren auf transkriptioneller Ebene *in vitro* durchzuführen [62]. Mittels siRNA sollte daher untersucht werden, inwieweit die IL-10 Expression in Notch modulierten T<sub>H</sub>1-Zellen von den zuvor identifizierten Transkriptionsfaktoren, mit IL-10-spezifischem Expressionsmuster, abhängt. Dazu wurden *in silico* für jedes Transkript 5 verschiedene stabilisierte siRNAs generiert (Kapitel 3.12, Tab. 7). In Kapitel 3.12 sind auch die Selektionskriterien für die siRNA-Sequenzen ausführlich beschrieben. Zunächst wurden in Vorversuchen die verschiedenen siRNAs auf ihre Knock-down Effizienz getestet (Tabelle 11).

siRNA Ziel	Nummer	Knock-down	getestet in
IL-10	1	<b>81,7 %</b>	T <sub>H</sub> 2-Zellen
	2	49,8 %	
	3	72,4 %	
	4	51,4 %	
	5	54,5 %	
c-Maf	1	47,9 %	
	2	55,0 %	
	3	83,8 %	
	4	59,1 %	
	5	<b>89,3 %</b>	
Satb1	1	72,9 %	
	2	<b>90,7 %</b>	
	3	67,0 %	
	4	84,0 %	
	5	88,2 %	
Fli1	1	98,4 %	T <sub>H</sub> 17-Zellen
	2	98,8 %	
	3	98,8 %	
	4	<b>99,9 %</b>	
	5	99,7 %	
Blimp-1	1	Kein Knock-down	
	2		
	3		
	4		
	5		
Stat4	1	78,2 %	T <sub>H</sub> 1-Zellen
	2	<b>92,4 %</b>	
	3	84,2 %	
	4	73,6 %	
	5	80,6 %	
Etv5	1	Kein Knock-down	
	2		
	3	23,8 %	
	4	<b>31,9 %</b>	
	5	Kein K-d	

Tabelle 11

Knock-down Effizienz der getesteten siRNAs. T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2-, oder T<sub>H</sub>17-Zellen wurden mit den oben genannten siRNAs nucleofiziert™ und der Knock-down der entsprechenden Zieltranskripte, im Vergleich zu Zellen, die mit unspezifischer siRNA (SC) behandelt wurden, analysiert.

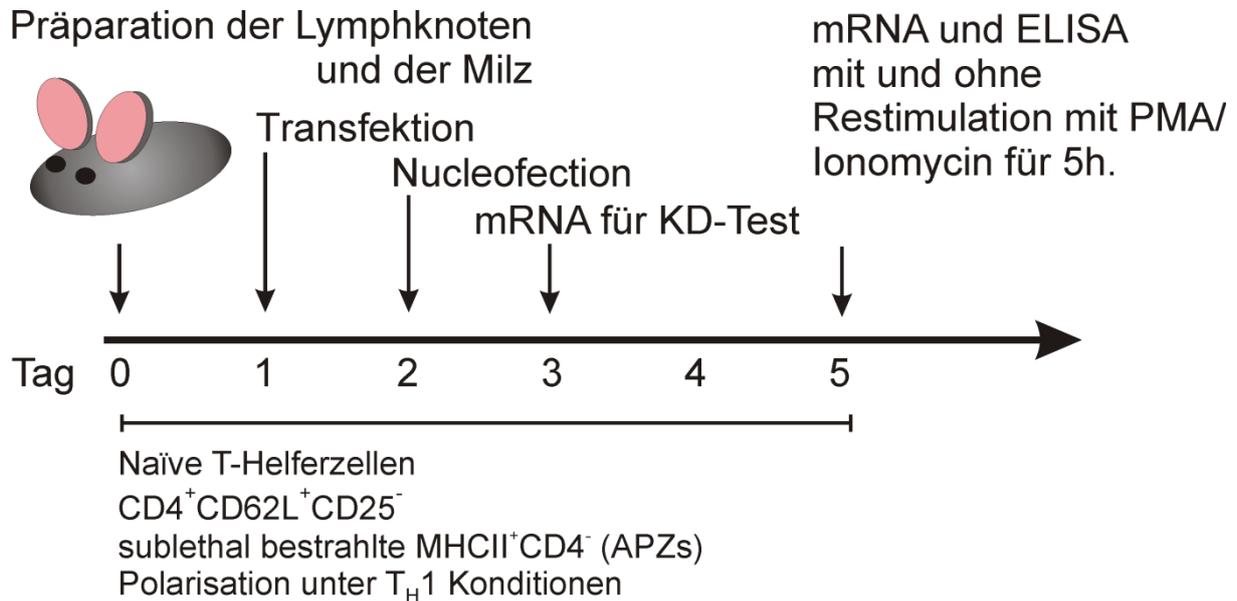
Die siRNA gegen den Transkriptionsfaktor Evi1 konnte nicht erfolgreich in einem der Vorversuche untersucht werden, da das Expressionslevel in T-Zellen ohne Aktivierung des Notch Signalweges unterhalb der Detektionsgrenze lag, und eine Quantifizierung mittels real-time PCR nicht gelang.

### 4.3.1. Verminderung der IL-10 Expression durch Knock-down Notch modulierter Transkriptionsfaktoren in T<sub>H</sub>1-Zellen

Mit Hilfe der vorangegangenen Transkriptomanalysen konnten Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die ein IL-10-spezifisches Expressionsmuster, in Notch modulierten T<sub>H</sub>1-Zellen, zeigen (Abb. 22, Kapitel 4.2.1). Durch den Einsatz chemisch modifizierter siRNAs gelangen robuste Knock-downs etlicher dieser Faktoren in behandelten T-Helfer-Zellen (Tab. 11). In der Folge sollte der siRNA-vermittelte Knock-down dieser Faktoren, auf die Fähigkeit Notch modulierter T<sub>H</sub>1-Zellen IL-10 zu exprimieren, untersucht werden. Zunächst wurden, sämtliche *in silico* identifizierten siRNAs (Kapitel 3.12, Tab. 7), innerhalb eines Screens, betrachtet. In Zusammenarbeit mit Andrej Mantei und Lonza wurden hierfür voraktivierte, bzw. naive T-Helfer-Zellen mit dem 96-well Shuttle™ System (Lonza) nucleofiziert™ (Kapitel 3.12.3 und 3.12.4). Die Aktivierung der Zellen und des Notch Signalweges erfolgte mit αCD3 und rmDLL-4 beschichteten Platten (Kapitel 3.12.3 und 3.12.4). Der Read-out, für den verwendeten Screen, war die durchflusszytometrische Analyse der IFN-γ und IL-10 Expression auf Einzelzellebene. Diese erfolgte nach Restimulation der Zellen mit PMA/Ionomycin und Brefeldin A (Kapitel 3.12.3 und 3.12.4). Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede der IFN-γ und IL-10 Expression auf Einzelzellebene, zwischen Zellen, die mit unspezifischer (SC) und spezifischer siRNA behandelt wurden, gemessen werden. Auch der Knock-down, der zuvor in einzeln nucleofizierten™ Zellen gezeigt werden konnte (Tab. 11), ließ sich innerhalb des Screens nicht nachweisen (Daten nicht gezeigt).

Daraufhin wurde von diesem Ansatz Abstand genommen und in einzeln nucleofizierten™ Zellen, erneut versucht, ob ein Knock-down Notch modulierter Transkriptionsfaktoren in T<sub>H</sub>1-Zellen zu einem Rückgang der IL-10 Expression führt. Hierfür wurden naive T-Helfer-Zellen unter T<sub>H</sub>1 polarisierenden Bedingungen kultiviert, der Notch Signalweg nach 24 Stunden durch Retrovirale Transfektion (Kapitel 3.4) aktiviert und die verschiedenen Transkriptionsfaktoren nach weiteren 24 Stunden durch Nucleofection™ mit siRNA ausgeknockt (Abb. 26). Es wurden ausschließlich die siRNA Sequenzen für die unterschiedlichen Zieltranskripte mit der höchsten Knock-down-Effizienz verwendet (Tab. 11). Die Knock-down-Effizienz innerhalb des Versuchs wurde erneut 24 Stunden nach Behandlung, mit der entsprechenden siRNA, analysiert und schließlich die Kapazität der Zellen IL-10 zu produzieren an Tag 5 auf mRNA- und Protein-Ebene analysiert. Die mRNA Expression wurde vor, und die Protein Expression vor und nach Restimulation der Zellen mit PMA/Ionomycin untersucht. Auf diese Weise wurde der Knock-down von IL-10, STAT4, Satb1, Fli1 und c-Maf in Notch modulierten T<sub>H</sub>1-Zellen betrachtet. Die Transkriptionsfaktoren

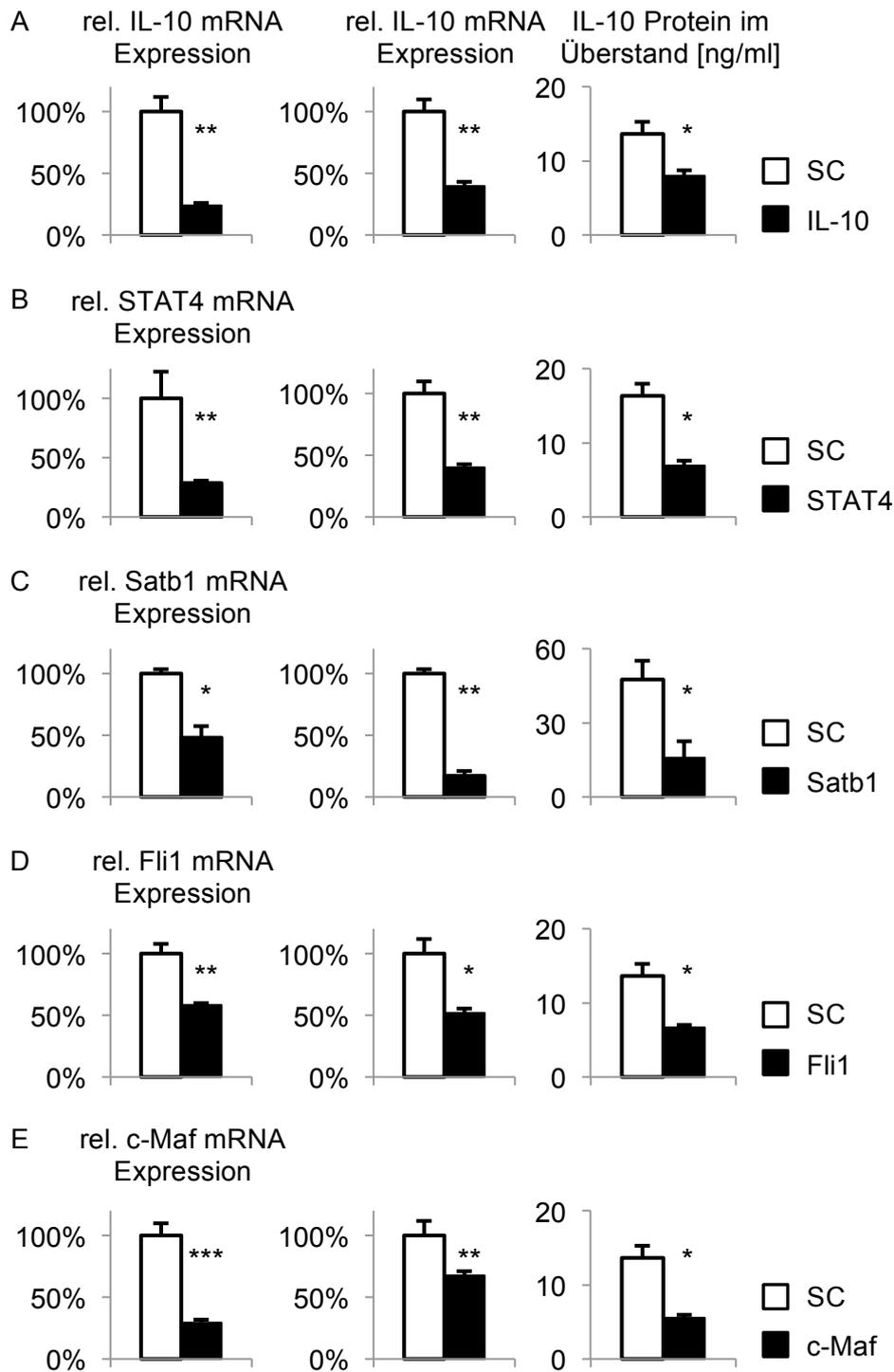
Etv5 und Blimp-1 wurden in den folgenden siRNA Versuchen nicht weiter inspiziert, da die Effizienz des Knock-downs zu gering ausfiel, bzw. nicht erfolgreich war (Tab. 11).



#### Abbildung 26

Versuchsaufbau für den siRNA vermittelten Knock-down Notch modulierter Transkriptionsfaktoren in  $T_H1$ -Zellen. Naïve T-Helfer-Zellen ( $CD4^+CD62L^+CD25^-$ ) wurden *in vitro* zu  $T_H1$ -Zellen polarisiert und nach 24 Stunden retroviral transfiziert. Nach weiteren 24 Stunden wurde entweder eine unspezifische siRNA [1], oder eine siRNA gegen einen durch Notch induzierten Transkriptionsfaktor in die Zelle mittels Nucleofektion™ eingebracht. Der Knock-down wurde an Tag 3 an Hand der isolierten mRNA ermittelt. An Tag 5 wurde wiederum mRNA (vor Restimulation) aus den Zellen isoliert und die Überstände zur Bestimmung der sekretierten Proteinmenge (vor und nach Restimulation) gesammelt.

Auf diese Weise (Abb. 26) wurden die Transkriptionsfaktoren Satb1, Fli1 und c-Maf mittels siRNA ausgeknockt und der Einfluss auf die IL-10 Expression in Notch modulierten  $T_H1$ -Zellen ermittelt (Abb. 27 C-E). Zusätzlich wurden IL-10- und STAT4-spezifische siRNAs in Notch modulierten  $T_H1$ -Zellen, als Positivkontrollen, verwendet (Abb. 27 A und B).

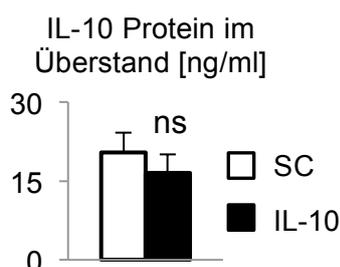


**Abbildung 27**

Der siRNA-vermittelte Knock-down von Transkriptionsfaktoren (TF), deren Expression durch den Notch Signalweg in  $T_H1$ -Zellen verstärkt ist, führt zur signifikanten Reduktion der IL-10 Expression. Zellen wurden an Tag 2 entweder mit unspezifischer (weiße Balken), oder TF-spezifischer siRNA nucleofiziert<sup>TM</sup>. Die Effizienz des Knock-downs (linke Spalte A-E) wurde 24 Stunden nach Nucleofektion<sup>TM</sup> der Zellen bestimmt. Die Expression von IL-10 wurde an Tag 5 auf mRNA-, (mittlere Spalte A-E) und Proteinebene (rechte Spalte A-E) bestimmt. Es wurden spezifische siRNAs gegen (A) IL-10 (n=3), (B) STAT4 (n=3), (C) Satb1 (Doppelwerte eines Versuchs), (D) Fli1 (n=2) und (E) c-Maf (n=4) verwendet. Die Werte wurden normiert auf Zellen, die mit unspezifischer siRNA (SC) behandelt wurden.

Wie in Abbildung 27 (linke Spalte) zu sehen ist, führt die Behandlung der Notch modulierten T<sub>H</sub>1-Zellen mit spezifischer siRNA gegen IL-10 (A), STAT4 (B) und c-Maf (E) zu einer 75%igen Reduktion der mRNA Expression dieser Faktoren im Vergleich zu Zellen, die mit unspezifischer siRNA (SC) behandelt wurden. Der, durch siRNA vermittelte, Knock-down von Satb1 (C) und Fli1 (D) ist schwächer und liegt bei 50%. Die Knock-down-Effizienz wurde jeweils 24 Stunden nach Nucleofection™ bestimmt. Für IL-10 wurde der Knock-down der mRNA an zwei Zeitpunkten bestimmt. 24 Stunden (Abb. 27 A, linke Spalte) und 72 Stunden (Abb. 27 A, mittlere Spalte) nach Nucleofection™. Dies zeigt, dass auch an Tag 5 der Knock-down des Zieltranskriptes IL-10 weiterhin stabil ist (>60%). Die Auswirkung auf die mRNA Expression von IL-10 und die Proteinkonzentration von IL-10 im Überstand ist in der mittleren Spalte, bzw. rechten Spalte (Abb. 27) zu sehen. Durch den, siRNA-vermittelten, Knock-down von IL-10 (Abb. 27 A) konnte die Funktionalität der gewählten Methode bestätigt werden. Dass die Reduktion eines Transkriptionsfaktors durch siRNA auch weiterführenden Einfluss auf die Expression der IL-10 Expression in Notch modulierten T<sub>H</sub>1-Zellen hat, konnte mit dem Knock-down von STAT4 (Abb. 27 B) gezeigt werden. In der Literatur wurde bereits für STAT4 Defiziente T<sub>H</sub>1-Zellen beschrieben, dass das STAT4 Signal essentiell für die Notch induzierte Anhebung der IL-10 Expression in diesen Zellen ist [53]. Die hier dargestellten Ergebnisse unterstreichen, dass neben STAT4 (Abb. 27 A), auch ein Knock-down der Transkriptionsfaktoren Satb1 (Abb. 27 C), Fli1 (Abb. 27 D) und c-Maf (Abb. 27 E) an Tag 2 (Abb. 26) zu einer signifikanten Reduktion der IL-10 Expression sowohl auf mRNA- (Abb. 27 mittlere Spalte), als auch auf Proteinebene (Abb. 27 rechte Spalte), an Tag 5 führt.

Die Konzentration des IL-10 Proteins im Überstand wurde mittels ELISA (Kapitel 2.6), vor und nach Restimulation mit PMA/Ionomycin, bestimmt. Die abgebildeten Proteinkonzentrationen von IL-10 (Abb. 27 rechte Spalte) beziehen sich auf Messungen vor der Restimulation. Wie in Abbildung 28 am Beispiel von IL-10 zu sehen ist, bewirkt die Restimulation mit PMA/Ionomycin einerseits eine Erhöhung der IL-10 Proteinkonzentrationen und andererseits eine deutliche Schwächung, des siRNA-vermittelten Knock-down Effekts, auf die Reduktion der IL-10 Proteinkonzentration (Abb. 28).

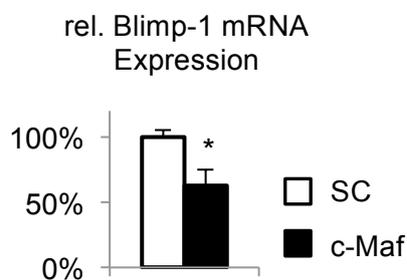


**Abbildung 28**

IL-10 Proteinkonzentration im Überstand nach Restimulation mit PMA/Ionomycin. Zellen wurden entweder mit unspezifischer siRNA (SC), oder IL-10 spezifischer siRNA behandelt. (n=3) ns : nicht signifikant

Dass die Restimulation der Zellen mit PMA/Ionomycin zu einem Rückgang des siRNA-vermittelten Knock-downs auf Proteinebene führt (Abb. 28) ist ein möglicher Grund dafür, dass (wie zuvor beschrieben) innerhalb des Screens kein Effekt auf die IFN- $\gamma$  und IL-10 Expression auf Einzelzellebene, nach Behandlung mit siRNA, gemessen werden konnte.

Es stellte sich nun die Frage, welche anderen Optionen es gibt, den Effekt der Notch modulierten Transkriptionsfaktoren, auf die induzierte IL-10 Expression in T<sub>H</sub>1-Zellen, auch auf Einzelzellebene eingehender untersuchen zu können. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Fähigkeit einer Zelle, das anti-inflammatorische Zytokin IL-10, zu exprimieren, mit der Expression sowohl von c-Maf, als auch Blimp-1 zusammenhängt [31, 41, 78, 83, 86, 104-108]. Zudem konnte in Kapitel 4.2.1 gezeigt werden, dass Blimp-1 und c-Maf die einzigen Transkriptionsfaktoren sind, die, basierend auf der Gen Ontologie Analyse, direkt mit dem biologischen Prozess der positiven Regulation der Genexpression assoziiert werden können (Tab. 10). Darüber hinaus konnte in Kapitel 4.2.3 gezeigt werden, dass beide Transkriptionsfaktoren, Blimp-1 und c-Maf, putative Bindungsstellen in konservierten nicht-codierenden Sequenzen oberhalb des TSS im IL-10-Gen besitzen (Abb. 24 und 25). Bei der Betrachtung möglicher Interaktionen zwischen diesen Faktoren sind wir darauf gestoßen, dass Notch modulierte T<sub>H</sub>1-Zellen, die mit c-Maf spezifischer siRNA behandelt wurden, einen signifikanten Rückgang der exprimierten Blimp-1 mRNA aufweisen (Abb. 29).



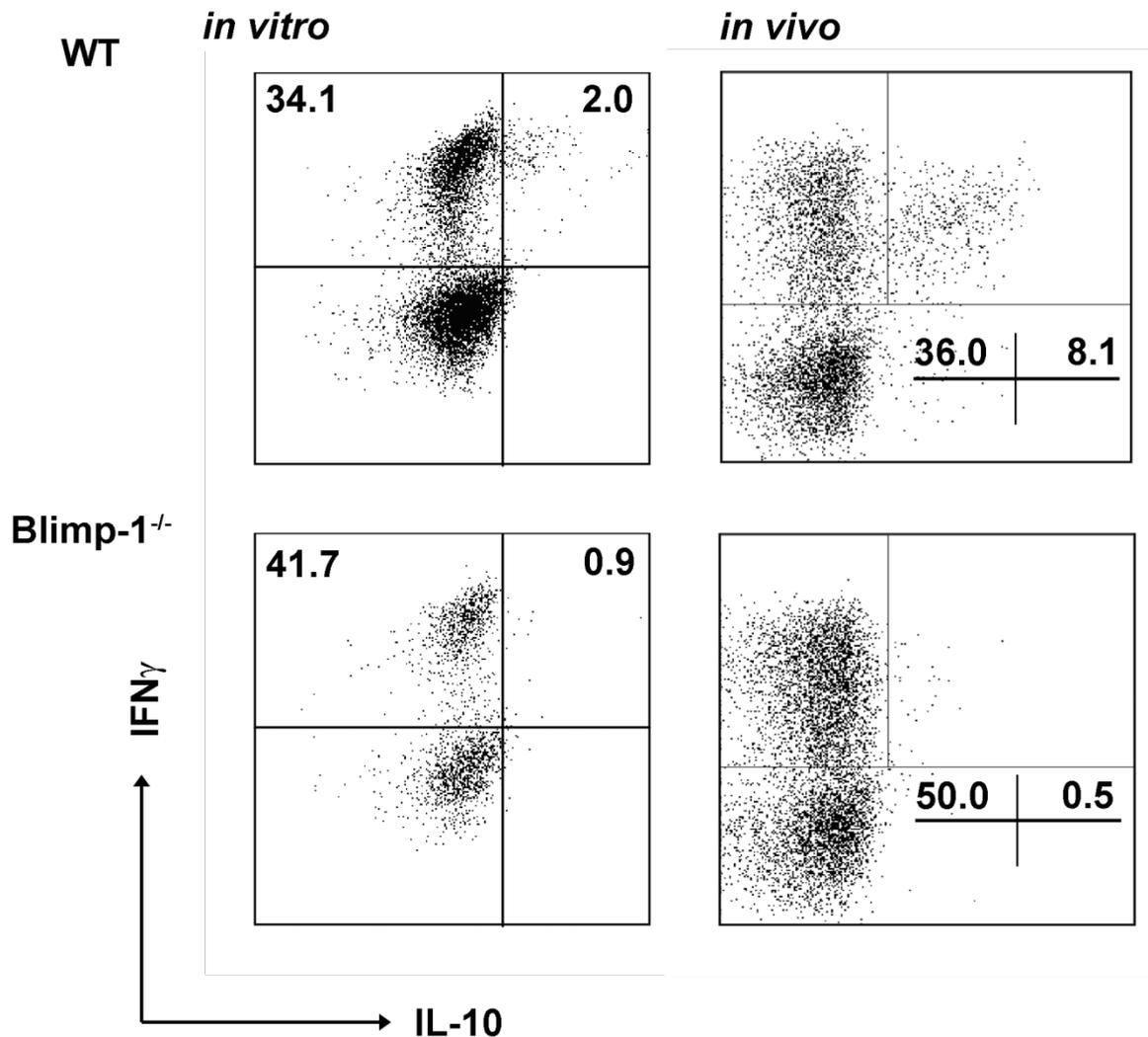
**Abbildung 29**

Der Knock-down von c-Maf in Notch modulierten T<sub>H</sub>1-Zellen, führte zu einem signifikanten Rückgang der Blimp-1 mRNA Expression. Normiert auf Zellen, die mit unspezifischer (SC) siRNA behandelt wurden. (n=4)

Dieser äußerst interessante Zusammenhang zwischen der Aktivierung des Notch Signalweges, der Expression von c-Maf, Blimp-1 und IL-10 in T<sub>H</sub>1-Zellen, wurde daraufhin eingehender analysiert. Um dieses Phänomen genauer untersuchen zu können wurden einerseits Mäuse generiert, deren CD4-Population defizient für Blimp-1 ist und andererseits, in Kooperation mit Genentech, der Transkriptionsfaktor c-Maf retroviral überexprimiert. Das c-Maf Überexpressionsplasmid (c-Maf<sup>+/+</sup>) codiert ausschließlich den translatierten Teil des Transkriptes von c-Maf.

#### 4.4. Blimp-1 ist limitierender Faktor für die gesteigerte IL-10 Expression in Notch und c-Maf modulierten T<sub>H</sub>1-Zellen

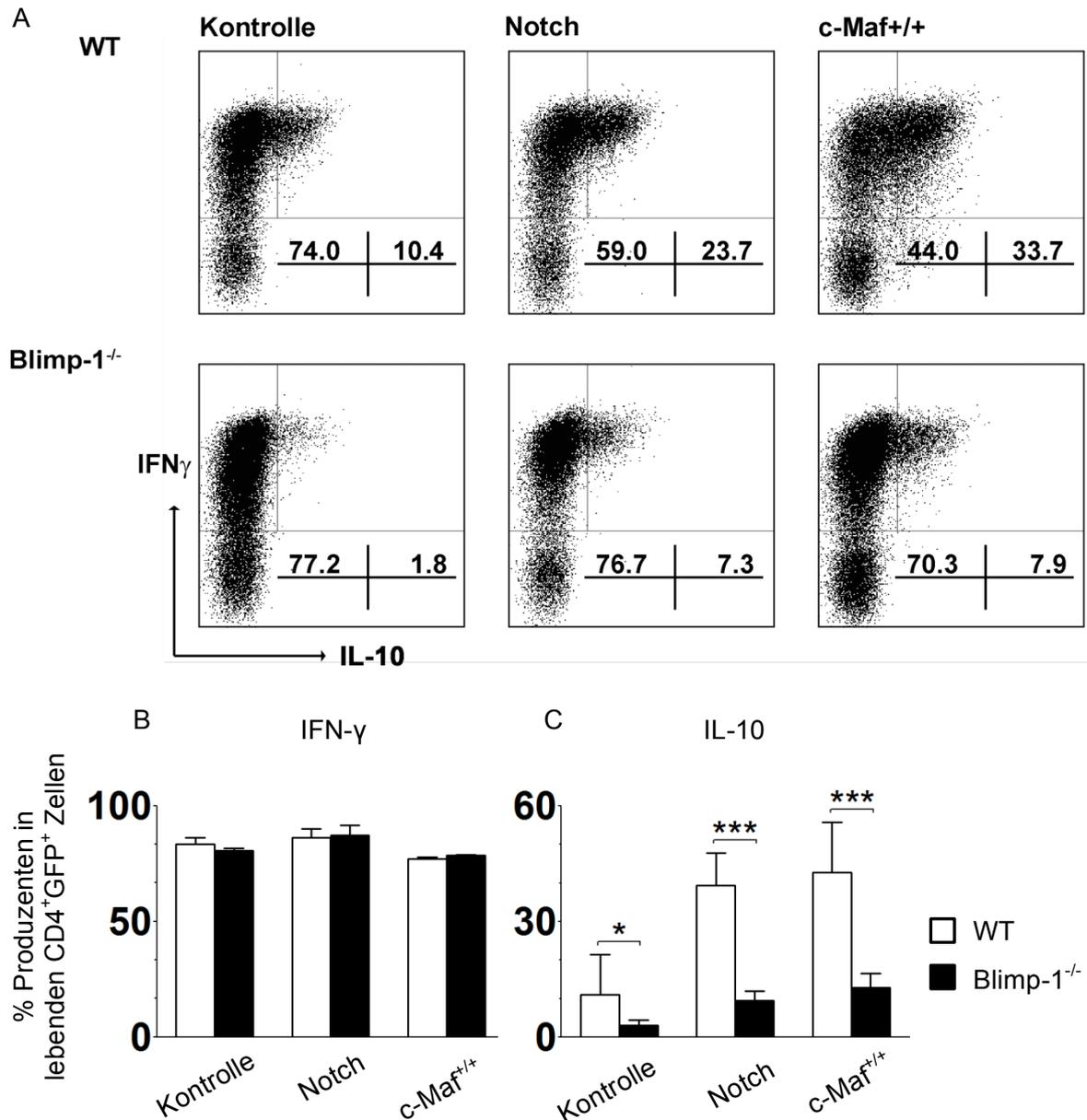
Eine Aktivierung des Notch Signalweges in T<sub>H</sub>1-Zellen führt sowohl zur Induktion der c-Maf-, als auch der Blimp-1-Expression. Für c-Maf konnte bereits im vorherigen Kapitel gezeigt werden, dass ein siRNA vermittelter Knock-down zur Reduktion der IL-10 Expression auf mRNA- und Proteinebene führt. Die Rolle von Blimp-1 konnte mittels siRNA Nucleofection™ nicht geklärt werden, da die von uns verwendete siRNA zu keinem verlässlichen Knock-down des Blimp-1 Transkriptes führte. Da Blimp-1 als entscheidender Faktor, sowohl in T<sub>reg</sub> [107], als auch in Effektor-T-Zellen [78, 108], für die Regulation der IL-10 Expression beschrieben ist, wurden Blimp-1<sup>fl/fl</sup>xCD4<sup>Cre/Wt</sup> Mäuse generiert, um testen zu können welchen Einfluss Blimp-1 auf die Expression von IL-10 in T<sub>H</sub>1 polarisierten Zellen hat. Sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* sehen wir in Blimp-1 defizienten T<sub>H</sub>1-Zellen eine stark verminderte IL-10 Expression auf Einzelzellebene (Abb. 30). Für die *in vitro* Analyse wurden Wildtyp, oder Blimp-1 defiziente naive T-Helfer-Zellen polyclonal aktiviert, und unter T<sub>H</sub>1 polarisierenden Bedingungen kultiviert (Kapitel 3.2) und schließlich an Tag 5 mit PMA/Ionomycin und Brefeldin A restimuliert, bevor ihre Zytokinexpression (IFN-γ und IL-10) durchflusszytometrisch gemessen wurde. Für die *in vivo* Analyse wurden naive T-Helfer-Zellen aus Wildtyp oder Blimp-1<sup>fl/fl</sup>xCD4<sup>Cre/Wt</sup> Mäusen isoliert und in Rag2<sup>-/-</sup> Mäuse gespritzt. Dieser Transfer führte zur Ausprägung einer Kolitis in den Rag2<sup>-/-</sup> Mäusen. Nach Einsetzen der Kolitis wurden die transferierten Zellen erneut aus der Milz und den Lymphknoten der Tiere isoliert und die Zytokinexpression (IFN-γ und IL-10) der Zellen nach Restimulation mit PMA/Ionomycin und Brefeldin A mittels Durchflusszytometer gemessen. Besonderer Dank an dieser Stelle gebührt Christian Neumann, der die *in vivo* Daten zur Verfügung gestellt hat.



**Abbildung 30**

Verlust der IL-10 Expression in Blimp-1 Defizienten CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1-Zellen *in vitro* (Kultivierung naiver T-Helfer-Zellen unter T<sub>H</sub>1 polarisierenden Bedingungen) und *in vivo* (isolierte T-Zellen nach Aktivierung im Transferkolitis Modell). Vor der Analyse am Durchflusszytometer wurden die Zellen für 5 Stunden mit PMA/Ionomycin restimuliert.

Diese Beobachtung warf die Frage auf, ob der Verlust der IL-10 Expression in Blimp-1 defizienten Zellen durch die Überexpression der intrazellulären Domäne von Notch3, bzw. durch c-Maf wieder hergestellt werden kann (Abb. 31). Hierfür wurden Blimp-1 defiziente Zellen *in vitro* unter T<sub>H</sub>1 polarisierenden Bedingungen kultiviert und nach 24 Stunden die intrazelluläre Domäne von Notch3 (Notch), bzw. c-Maf (c-Maf<sup>+/+</sup>) retroviral überexprimiert. Das Experiment wurde analog zum, in Abbildung 10 (Kapitel 4.1) beschriebenen, Versuchsaufbau durchgeführt.

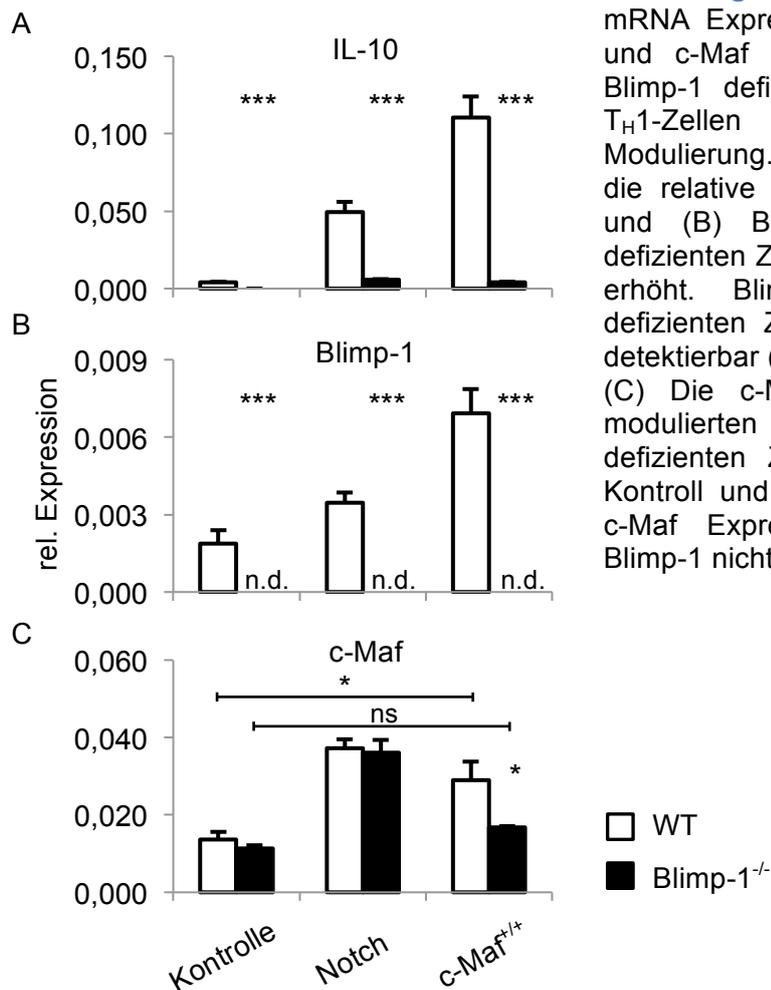
**Abbildung 31**

Überexpression des Kontrollplasmides, der intrazellulären Domäne von Notch3 (Notch), oder c-Maf (c-Maf<sup>+/+</sup>) in Wildtyp und Blimp-1 defizienten T<sub>H</sub>1-Zellen. Blimp-1 ist der limitierende Faktor für die, durch Notch (A und C Mitte) und c-Maf<sup>+/+</sup> (A und C rechts) verstärkten, IL-10 Expression in T<sub>H</sub>1-Zellen. Die Expression von IFN- $\gamma$  wird durch das Fehlen von Blimp-1 nicht beeinflusst (A und B). Angezeigt ist die IFN- $\gamma$  und IL-10 Expression für lebende CD4<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> Zellen nach Restimulation mit PMA/Ionomycin. Die Zellen wurden an Tag 5 für 5 Stunden restimuliert. (n=3)

Die durchflusszytometrische Analyse der Zellen zeigte, dass in Blimp-1 defizienten T<sub>H</sub>1-Zellen, die Steigerung der IL-10 Expression, sowohl durch Notch, als auch c-Maf<sup>+/+</sup> Modulation, limitiert ist. (Abb. 31 A und C). Die Expression von IFN- $\gamma$  wird durch die Abwesenheit von Blimp-1 nicht beeinflusst (Abb. 31 A und B). Um genauer untersuchen zu können inwieweit sich die Expression von IL-10, Blimp-1 und c-Maf in den verschiedenen Ansätzen auf Ebene der mRNA Expression unterscheidet, und welchen Einfluss die

## Ergebnisse

Restimulation der Zellen, auf die Expression von IL-10 hat, wurden lebende CD4<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> Zellen FACS sortiert und die mRNA Expression anschließend mittels real-time PCR bestimmt. Die FACS sortierten Zellen wurden nicht restimuliert. Auf Ebene der mRNA wird deutlich, dass die Expressionsunterschiede von IL-10 in WT und Blimp-1 defizienten CD4 Zellen (Abb. 32) ohne Restimulation, noch wesentlich stärker sind, als dies nach Restimulation mit PMA/Ionomycin, auf Proteinebene der Fall ist. Abbildung 32 zeigt die mRNA Expression von IL-10 (A), Blimp-1 (B) und c-Maf (C).



**Abbildung 32**

mRNA Expression von IL-10 (A), Blimp-1 (B) und c-Maf (C) in WT (weiße Balken) und Blimp-1 defizienten CD4<sup>+</sup> (schwarze Balken) T<sub>H</sub>1-Zellen mit Notch oder c-Maf<sup>+/+</sup> Modulation. In WT Zellen (weiße Balken) ist die relative mRNA Expression von (A) IL-10 und (B) Blimp-1 gegenüber den Blimp-1 defizienten Zellen (schwarze Balken) signifikant erhöht. Blimp-1 Expression ist in den defizienten Zellen (B schwarze Balken) nicht detektierbar (n.d.)

(C) Die c-Maf Expression ist in c-Maf<sup>+/+</sup> modulierten WT Zellen gegenüber Blimp-1 defizienten Zellen signifikant erhöht. In den Kontroll- und Notch modulierten Zellen ist die c-Maf Expression durch das Fehlen von Blimp-1 nicht beeinflusst. (n=3)

Vergleicht man die IL-10 Proteinexpression (Abb. 31 C) nach Restimulation, und mRNA Expression ohne Restimulation (Abb. 32 A), so wird deutlich, dass die Beeinträchtigung der Notch- und c-Maf-vermittelten Verstärkung der IL-10 Expression in T<sub>H</sub>1-Zellen auf mRNA-Ebene ohne Restimulation wesentlich stärker ausgeprägt ist.

Zusätzlich sehen wir in Blimp-1 defizienten Zellen, dass die endogene c-Maf Expression nach Überexpression von c-Maf<sup>+/+</sup> signifikant reduziert ist (Abb. 32 C). Die endogenen

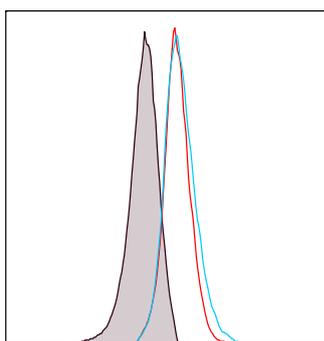
exprimierte c-Maf mRNA und die mRNA des c-Maf Überexpressionsplasmides (c-Maf+/+) werden durch die verwendeten Primer für die Quantifizierung (Kapitel 3.16.2, Tab. 8) unterschieden. Das c-Maf Überexpressionsplasmid codiert nur den translatierten Bereich der c-Maf Sequenz, die hier verwendeten Primer binden jedoch innerhalb des nicht-translatierten Bereichs, sodass bei der qPCR ausschließlich endogene c-Maf Expression detektiert wird. Somit konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung der c-Maf Expression, durch c-Maf selbst in Blimp-1 defizienten T<sub>H</sub>1-Zellen, gestört ist (Abb. 32 C).

Die hier gezeigten Ergebnisse machen deutlich, dass die Verstärkung der IL-10 Expression in T<sub>H</sub>1-Zellen sowohl durch Notch, als auch durch c-Maf, vermittelt werden können (Abb. 31 und 32). Darüber hinaus unterstreichen die Ergebnisse, dass Blimp-1 den limitierenden Faktor für die Verstärkung der IL-10 Expression, durch Notch und c-Maf, in T<sub>H</sub>1-Zellen darstellt (Abb. 31 A und C, Abb. 32 A und B).

Das folgende Kapitel (3.5) nimmt Bezug auf Arbeiten von Saraiva et. al. [40]. Die Arbeiten beschreiben, dass die Stärke des T-Zell-Rezeptor Signals die Expression von IL-10 in T<sub>H</sub>1-Zellen beeinflussen kann. So wird gezeigt, dass ein starkes T-Zell-Rezeptor-Signal in T<sub>H</sub>1-Zellen, eine Verstärkung des MAPKinase-Signalweges zur Folge hat, die wiederum in Abhängigkeit von STAT4, zu einer Erhöhung der IL-10 Expression in diesen Zellen führt. Ferner wird eine Korrelation zwischen erhöhter c-Maf und IL-10 Expression diskutiert. Da für die Notch induzierte IL-10 Expression in T<sub>H</sub>1-Zellen, ebenfalls eine Abhängigkeit von STAT4 gezeigt wurde [53], stellte sich die Frage, inwieweit die Notch Modulation der IL-10 Expression in T<sub>H</sub>1-Zellen mit der Aktivierung des MAPKinase-Signalwegs zusammenhängt.

### 4.5. Die Inhibition der ERK Aktivierung in Notch modulierten T<sub>H</sub>1-Zellen führt zu einer Reduktion der Zytokinexpression von IL-10 und IL-2

Neben den verschiedenen Transkriptionsfaktoren, die für die Induktion der IL-10 Expression beschrieben sind, wird in der Literatur auch der Einfluss der T-Zell-Rezeptor-Signal-Stärke als Faktor diskutiert, der darüber entscheidet, ob eine T-Zelle IL-10 exprimiert, oder nicht. Es wurde gezeigt, dass die Erhöhung der IL-10 Expression mit einem stärkeren T-Zell-Rezeptor-Signal einhergeht [40]. Ein entscheidender Signalweg, der über den T-Zell-Rezeptor angeschaltet wird, ist die MAPK Kaskade, die zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors Erk führt. Im finalen Schritt der Kaskade wird der Transkriptionsfaktor Erk zu pErk phosphoryliert, und somit aktiviert. In den hier beschriebenen *in vitro* Experimenten wird diese Phosphorylierung während der Restimulation mit PMA/Ionomycin stark induziert (Abb. 33). Daraus ergab sich die Fragestellung, inwiefern eine Aktivierung des Notch Signalweges diese Phosphorylierung beeinflusst und welche Auswirkungen dies auf die Expression von IL-10 in Notch modulierten T<sub>H</sub>1-Zellen hat. Um diese Fragen zu beantworten, wurden Notch modulierte T<sub>H</sub>1-Zellen *in vitro* generiert und mit einem pErk-Inhibitor behandelt. Der verwendete Inhibitor PD 184,352 (Alexis Biochemicals) wurde in einem Konzentrationsbereich von 0,1-25 µM eingesetzt. Der Inhibitor wurde direkt vor der Restimulation mit PMA/Ionomycin (PMA/Iono) an Tag 5 zu den Zellen gegeben. Für die intranukleäre Färbung von pErk wurden die Zellen für 15 Minuten restimuliert, für die intrazelluläre Färbung der Zytokine erfolgte die Restimulation über 5 Stunden (Kapitel 3.13). Zunächst wurde die Phosphorylierung von transfizierten Zellen verglichen, die entweder mit dem Kontroll-, oder Notch-Plasmid behandelt wurden (Abb. 33).



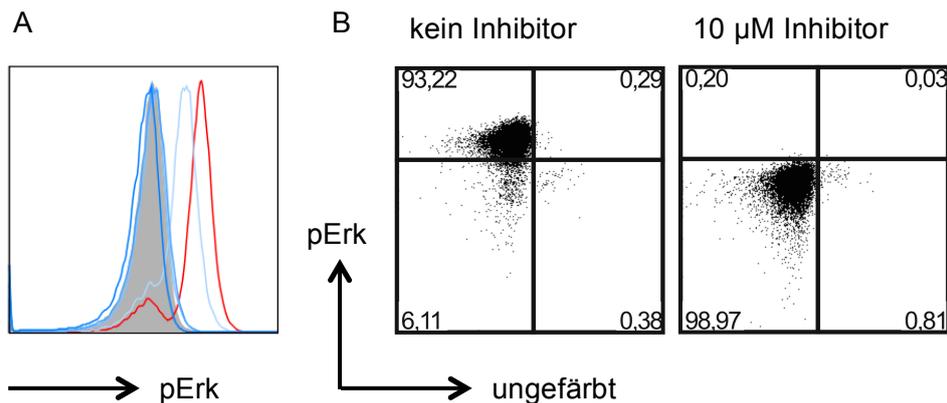
	Probe	GeoMean
	unstimuliert	751
	Kontrolle	2126
	Notch	2344

**Abbildung 33**

Färbung von pErk in Notch-, und Kontroll-Plasmid modulierten T<sub>H</sub>1-Zellen nach Restimulation. (n=2)

Die intranukleäre Färbung von pErk ergab keinen Unterschied der Fluoreszenz Intensität (GeoMean) zwischen Notch-, und Kontroll-Plasmid transfizierten T<sub>H</sub>1-Zellen nach Restimulation mit PMA/Ionomycin. Die anschließenden Versuche wurden daraufhin ausschließlich in Notch modulierten T<sub>H</sub>1-Zellen durchgeführt.

In der Folge wurden Notch modulierte T<sub>H</sub>1-Zellen, vor der Restimulation mit PMA/Ionomycin, mit einem Erk-Inhibitor behandelt und anschließend die Anzahl überlebender-, pErk-, IFN- $\gamma$ -, IL-2-, und IL-10-positiver Zellen bestimmt und mit restimulierten Zellen verglichen, die nicht mit Inhibitor behandelt wurden (Abb. 35). Zunächst ist in Abbildung 34, sowohl die gemessene Erk-Phosphorylierung in Abhängigkeit der eingesetzten Inhibitor Konzentration (A) in einem Histogramm gezeigt, als auch auf Einzelzellebene, die pErk-Färbung in einem (B) Dot Plot dargestellt.

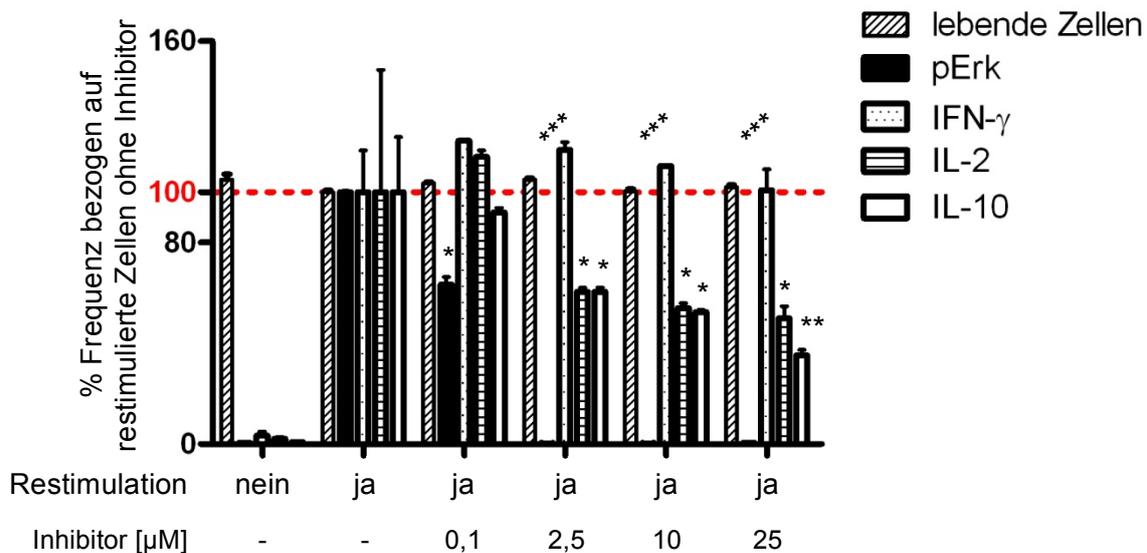


	Probe	
	RE	Inhibitor
	+	-
	-	-
	+	0,1 $\mu$ M
	+	2,5 $\mu$ M
	+	10 $\mu$ M
	+	25 $\mu$ M

#### Abbildung 34

Abhängigkeit der Erk-Phosphorylierung von der eingesetzten Inhibitor Konzentration. (A) Das Histogramm zeigt den Rückgang der Erk-Phosphorylierung mit steigender Inhibitor Konzentration. (B) Repräsentativer Dot Plot der pErk-Färbung restimulierter Zellen, ohne (links) und mit (rechts) Inhibitor Vorbehandlung (10  $\mu$ M). Die Zellen wurden für 15 Minuten restimuliert. (n=2)

Die steigenden Erk Inhibitor Konzentrationen zeigen, dass bereits bei 2,5-10  $\mu$ M die maximale Blockierung der Phosphorylierung erreicht ist (Abb. 34 A und B). Für die in Abbildung 35 dargestellten Daten wurden die mit Inhibitor behandelten Zellen über 5 Stunden restimuliert, um somit auch die Auswirkung auf das Überleben der Zellen und ihre Zytokinexpression sichtbar machen zu können. Die durchflusszytometrische Analyse der pErk-Expression erfolgte wie zuvor nach 15 Minuten Restimulation mit PMA/Ionomycin.



**Abbildung 35**

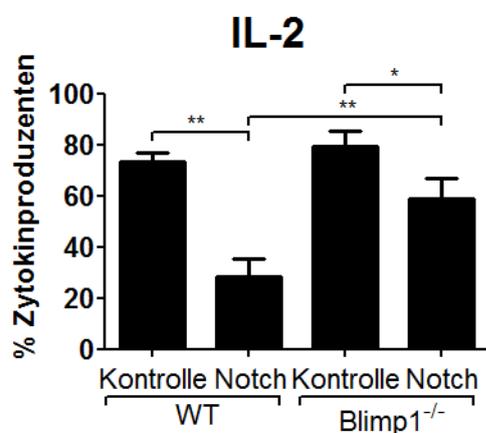
Einfluss steigender Konzentration des verwendeten Erk Inhibitors auf das Überleben der Zellen, die Frequenz pErk positiver Zellen und die Zytokinexpression (IFN- $\gamma$ , IL-2 und IL-10) im Vergleich zu Zellen ohne Inhibitor. Notch modulierte  $T_H1$ -Zellen wurden nach 5 Tagen in Kultur mit Erk Inhibitor Konzentrationen von 0-25  $\mu$ M behandelt und anschließend mit PMA/Ionomycin und Bref A restimuliert. Die Erk-Phosphorylierung wurde nach 15 Minuten (ohne Bref A), und die Zytokinexpression nach 5 Stunden, Restimulation gemessen. Die Ergebnisse sind auf restimulierte Zellen ohne Inhibitor Behandlung normiert. (n=2)

In Abbildung 35 wird deutlich, dass die Behandlung der Zellen mit steigender Erk Inhibitor Konzentration keinen Einfluss auf das Überleben der Zellen hat und auch die Expression von IFN- $\gamma$  nicht verändert wird. Ab einer Inhibitor Konzentration von 2,5  $\mu$ M, bei dieser ist die Phosphorylierung von Erk bereits aufgehoben, nimmt die Frequenz IL-2- und IL-10-positiver Zellen, im Vergleich zu restimulierten Zellen ohne Inhibitor Behandlung, deutlich ab. Für IL-10-positive Zellen ist die Frequenz, bei einer verwendeten Inhibitor Konzentration von 25  $\mu$ M, abermals reduziert.

Die Versuche zeigen, dass, in Notch modulierten  $T_H1$ -Zellen, die Zytokinexpression von IL-10 von der Erk-Phosphorylierung abhängig ist. Da wir jedoch auch eine Reduktion der IL-2 Expression in diesen Zellen sehen, ist fraglich, ob die Stärke der Restimulation, die letztendlich zur Erk-Phosphorylierung führt, exklusiv für die Zytokinexpression von IL-10 verantwortlich gemacht werden kann, wie es zuvor beschrieben wurde [40]. Darüber hinaus konnte kein Einfluss der Notch Aktivierung auf die pErk Aktivierung beobachtet werden (Abb. 33).

#### 4.5.1. Die Aktivierung von Erk und die Aktivierung des Notch Signalweges, haben unterschiedlichen Einfluss auf die Expression von IL-2 und IL-10 in T<sub>H</sub>1-Zellen

In Kapitel (4.4 Abb. 31 C und Abb. 32) konnte gezeigt werden, dass Blimp-1 der limitierende Faktor, für die Anhebung der IL-10 Expression in Notch modulierten T<sub>H</sub>1-Zellen, ist. Außerdem führt die Notch induzierte Steigerung der Blimp-1 Expression in T<sub>H</sub>1-Zellen (Kapitel 4.4, Abb. 32 B), zu einer Reduktion der IL-2 Expression (Abb. 36). In Abbildung 36 ist darüber hinaus zu sehen, dass die Blimp-1 bedingte Repression von IL-2 [110, 111] in Notch modulierten Blimp-1 defizienten T<sub>H</sub>1-Zellen schwächer ist.



**Abbildung 36**

In Notch modulierten Wildtyp T<sub>H</sub>1-Zellen ist der Anteil IL-2-positiver Zellen reduziert. Dieser Effekt ist in Blimp-1<sup>-/-</sup> Notch modulierten T<sub>H</sub>1-Zellen schwächer ausgeprägt. (n=3)

Die IL-2 Expression ist in Notch modulierten Wildtyp T<sub>H</sub>1-Zellen reprimiert. Diese Repression ist in Blimp-1 defizienten Zellen vermindert. Der reprimierende Effekt von Blimp-1 auf die Expression von IL-2 [110, 111], die auch einen wichtigen Aspekt der Autoregulation von IL-2 darstellt [110,

112, 113], konnte bereits beschrieben werden.

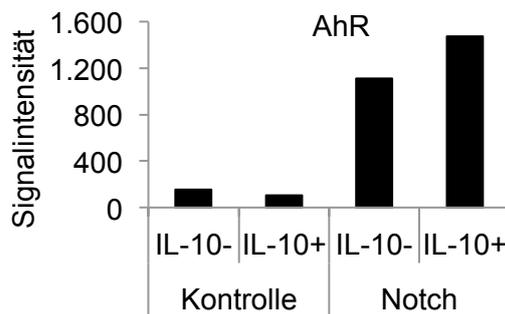
Somit führt die Aktivierung des Notch Signalweges in Abhängigkeit von Blimp-1 zu einer Erhöhung der IL-10 (Kapitel 4.4) und einer Verringerung der IL-2 Expression (Abb. 36) in T<sub>H</sub>1-Zellen, wohingegen die Aktivierung von Erk zu einer Erhöhung beider Zytokine führt (Kapitel 4.5, Abb. 35). Berücksichtigt man, dass die Aktivierung des Notch Signalweges keinen Einfluss auf die Stärke der Erk Aktivierung hat (Kapitel 4.5, Abb. 33), und Notch spezifisch, und gegensätzlich, die Expression von IL-10 und IL-2 durch Induktion der Blimp-1 Expression moduliert, wohingegen die Aktivierung von Erk zu einer allgemeinen Erhöhung der Zytokin Expression beiträgt (Kapitel 4.5, Abb. 35), lässt dies den Schluss zu, dass die Notch Modulation von T<sub>H</sub>1-Zellen nicht durch Veränderung der pErk Aktivierung hervorgerufen wird.

Es wäre interessant, sich im Zusammenhang mit der Stärke des T-Zell-Rezeptor Stimulus auch die Expression von c-Maf und Blimp-1 auf mRNA Ebene in verschiedenen T-Helfer-Subsets näher anzuschauen.

In dem sich anschließenden Teil der Ergebnisse (Kapitel 4.6) wird auf verschiedene Arbeiten eingegangen, die den Arylhydrocarbon Rezeptor (AhR), als wichtigen Faktor der IL-10 Regulation in T<sub>Reg</sub> [82, 99, 114] und T<sub>R</sub>1-Zellen [83, 99] beschreiben. Hinzu kommt, dass AhR als regulierender Transkriptionsfaktor für die IL-22 Expression [31, 32, 41, 115] in T<sub>H</sub>17- [84, 116], und T<sub>H</sub>22-[117]-Zellen beschrieben wird, und IL-22 eines der am stärksten regulierten Zieltranskripte des Notch Signalwegs, unabhängig von der T-Zell-Polarisation, ist (Kapitel 4.1.2, Abb. 17). Daher stellte sich die Frage, ob die Aktivierung des Notch Signalweges in T<sub>H</sub>1-Zellen, neben IL-10, auch zur Erhöhung der IL-22 Expression auf Einzelzellebene führt, und ob diese Erhöhung unabhängig von der Expression des Arylhydrocarbon Rezeptors geschieht.

#### 4.6. Die Expression von IL-10 und IL-22 in Notch modulierten T<sub>H</sub>1-Zellen ist unabhängig von der Expression des Arylhydrocarbon Rezeptors (AhR)

In den Vergleichenden Genexpressionsanalysen von Transkriptionsfaktoren (Kapitel 4.1.3, Abb. 18) wurde der Arylhydrocarbon Rezeptor (AhR), ein in der Toxikologie ausführlich beschriebener Regulator [118, 119], als eines der Zieltranskripte des Notch Signalweges in modulierten T<sub>H</sub>0-, T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>17-Zellen identifiziert (Kapitel 4.1.4, Abb. 19 C, Gruppe III). Der Transkriptionsfaktor gewinnt an zunehmender Bedeutung auch für die Immunologie [120]. So ist beschrieben, dass der AhR für die Regulation von IL-10 [31, 32, 41] in T<sub>R</sub>1-Zellen [83, 99] und T<sub>Reg</sub> [82, 99, 114] und für die Regulation von IL-22 [31, 32, 41, 115] in T<sub>H</sub>17-[84, 116], und T<sub>H</sub>22-[117]-Zellen eine wichtige Rolle spielt. Zunächst sollte geklärt werden, wie sich die simultane Stimulation des Notch Signalweges und die Aktivierung des Arylhydrocarbon Rezeptors auf die Expression von IL-10 und IL-22 in T<sub>H</sub>1-Zellen auswirkt. Als erstes betrachten wir die Signalintensität des AhR in IL-10<sup>-</sup>- und IL-10<sup>+</sup>-T<sub>H</sub>1-Zellen, mit und ohne Aktivierung des Notch Signalweges (Abb. 37).



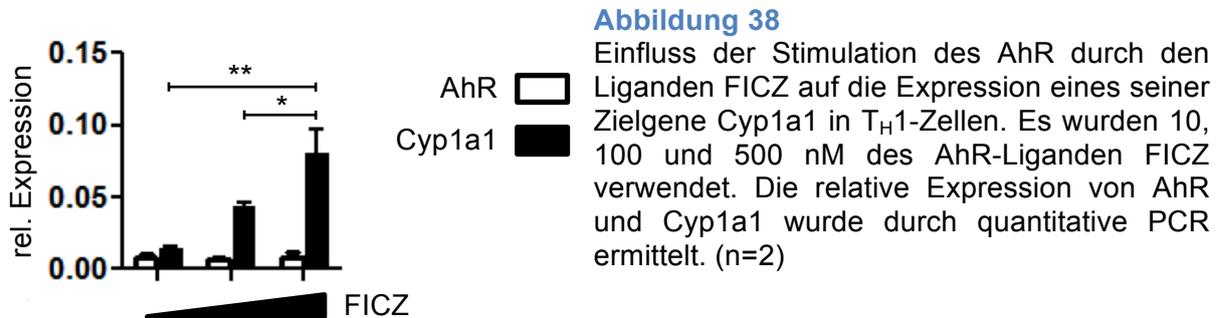
**Abbildung 37**

Die AhR Expression ist in Notch modulierten T<sub>H</sub>1-Zellen stark induziert. Die Erhöhung im Vergleich von IL-10<sup>-</sup> mit IL-10<sup>+</sup> Notch modulierten T<sub>H</sub>1-Zellen (FC<1,4) ist jedoch recht schwach.

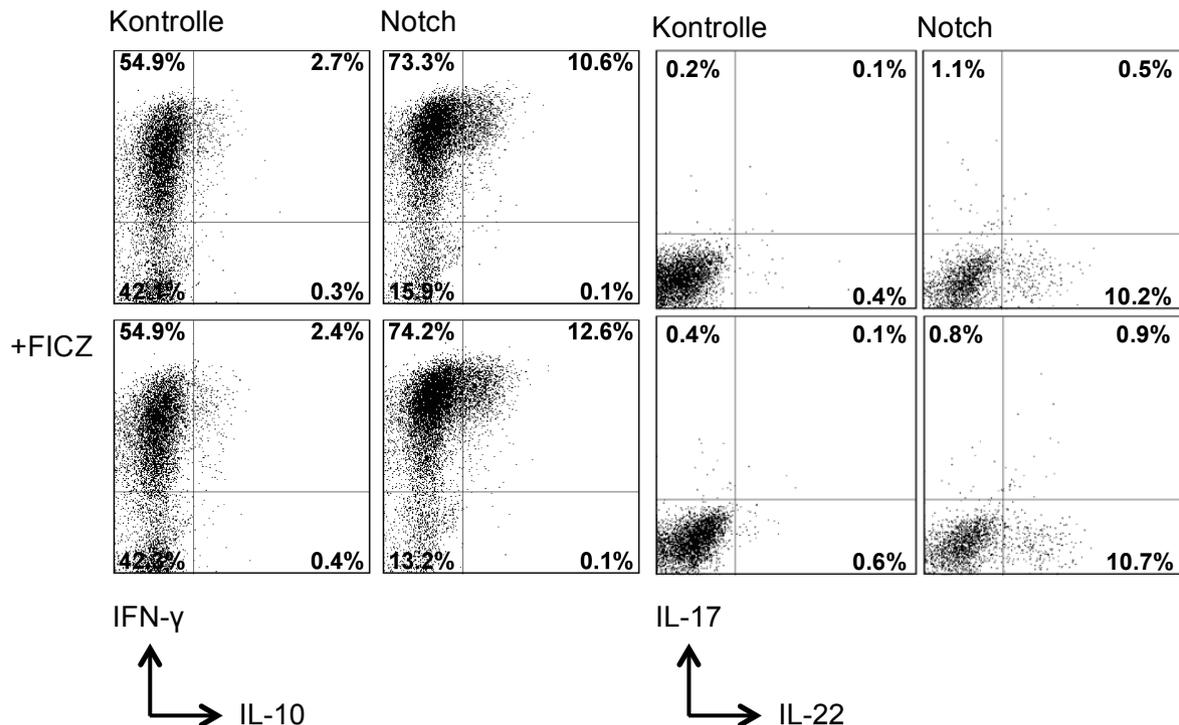
Die Expression des Arylhydrocarbon Rezeptors wird zwar in Notch modulierten T<sub>H</sub>1-Zellen stark induziert, jedoch wird er unabhängig von der IL-10 Sekretion der Zellen exprimiert. Um zu testen, ob die Notch Modulation von T<sub>H</sub>1-Zellen dennoch zu einer AhR-vermittelten Steigerung der IL-10 Expression führt, wurde in der Folge die synergistische Aktivierung beider Faktoren betrachtet. Zusätzlich wurde der Einfluss auf die IL-22 Expression in Notch modulierten T<sub>H</sub>1-Zellen untersucht. Dazu wurden, analog zum Versuchsaufbau (Kapitel 3.4), T<sub>H</sub>1-Zellen retroviral mit N3IZD-, oder einem Kontroll-Plasmid transfiziert und zusätzlich der AhR über den AhR-Liganden 6-Formylindolo[3,2-b]carbazol (FICZ) stimuliert.

## Ergebnisse

Die Aktivierung des AhR über den Liganden FICZ (Kapitel 3.14) führt zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der Cyp1A1 Expression [121, 122], die auch in T-Zellen zu sehen ist (Abb. 38).



Somit konnte zunächst gezeigt werden, dass der AhR auch in T<sub>H</sub>1-Zellen, ohne Aktivierung des Notch Signalweges exprimiert wird und er durch den eingesetzten Liganden FICZ aktiviert werden kann (Abb. 38). Als nächstes wurden *in vitro* T<sub>H</sub>1 polarisierte Zellen, in An-, und Abwesenheit eines aktiven Notch Signals  $\pm$  Ahr-Ligand FICZ (100 nM an Tag 0) generiert (Kapitel 3.4). Die Expression von IL-10 und IL-22 wurde mittels FACS nach Restimulation auf Einzelzellebene an Tag 5 betrachtet. Die Zellen wurden zuvor für 5 Stunden mit PMA/Ionomycin, unter Zugabe von Brefeldin A, restimuliert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 39 in Form von Dot Plots dargestellt.



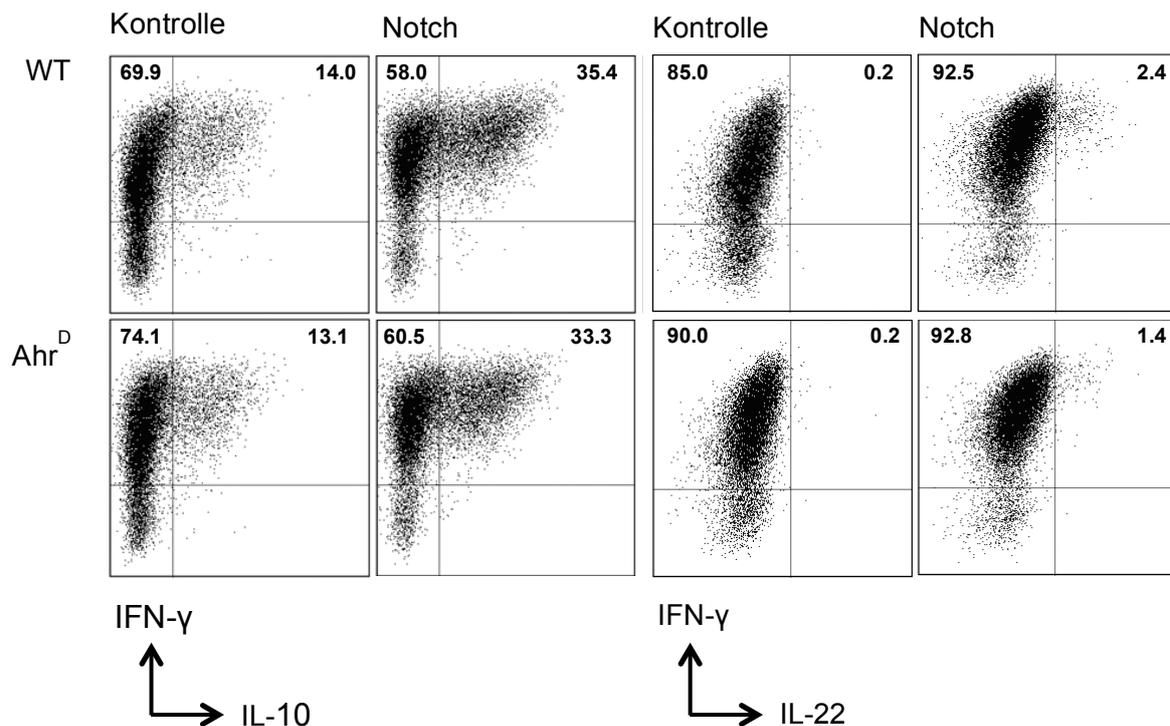
### Abbildung 39

Synergistischer Effekt, der Aktivierung des Notch Signalwegs bei gleichzeitiger Stimulation des Arylhydrocarbon Rezeptors, auf die Expression von IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-17 und IL-22 auf Einzelzellebene in  $T_H1$ -Zellen. Die Expression der Zytokine wurde an Tag 5 nach Restimulation gemessen. (n=2)

Die Aktivierung des Notch Signalweges führte sowohl zur Steigerung der IL-10-, als auch der IL-22-Expression in  $T_H1$ -Zellen (Abb. 37). Bei gleichzeitiger Stimulation des AhR mit dem Liganden FICZ wird lediglich die Expression von IL-10 in Notch modulierten  $T_H1$ -Zellen leicht erhöht (von 10,7% auf 12,7%). Die mit Kontrollplasmid transfizierten Zellen exprimierten nur sehr geringe Level IL-10 und nahezu kein IL-22 (Abb. 39), unabhängig von der Stimulation mit dem AhR-Liganden FICZ. Um sicher zu stellen, dass die Expression der Zytokine IL-10 und IL-22 in Notch modulierten  $T_H1$ -Zellen unabhängig von der Expression des Arylhydrocarbon Rezeptors ist, wurde die Überexpression der intrazellulären Domäne von Notch3 in AhR-defizienten (Ahr<sup>D</sup>) Zellen wiederholt und die Expression von IFN- $\gamma$ , IL-10 und IL-22 erneut auf Einzelzellebene betrachtet (Abb. 40). Die Ahr<sup>D</sup>-Mäuse wurden uns freundlicher Weise von Prof. Dr. Charlotte Esser zur Verfügung gestellt [123].

## Ergebnisse

Analog zu dem zuvor beschriebenen Versuchsaufbau wurden naive T-Helfer-Zellen aus Wildtyp, bzw.  $Ahr^D$ -Mäusen isoliert (3.1) und *in vitro* unter  $T_H1$  Polarisierenden Bedingungen kultiviert und mit Kontroll-, bzw. Notchplasmid nach 24 Stunden transfiziert (Kapitel 3.4). Nach fünf stündiger Restimulation der Zellen mit PMA/Ionomycin unter Zugabe von Brefeldin A an Tag 5, konnte auf Einzelzellebene festgestellt werden, dass die Aktivierung des Notch Signalweges, auch in den  $Ahr^D$ -Zellen, zur Erhöhung der IL-10 und IL-22 Expression in  $T_H1$ -Zellen führt (Abb. 40).

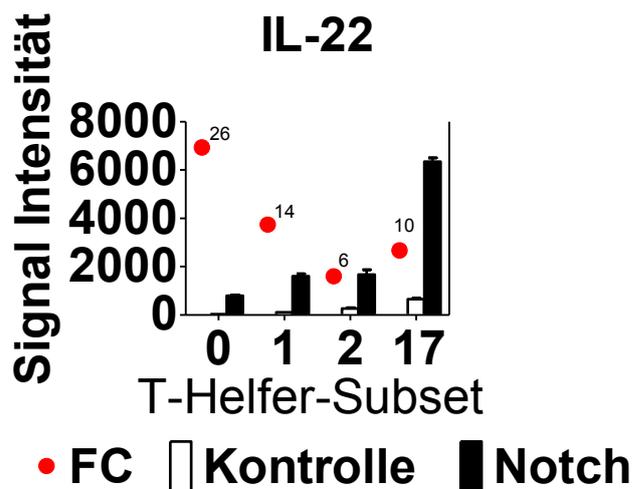


**Abbildung 40**

Retrovirale Überexpression des N3IZD-Plasmids in Wildtyp (WT) und  $Ahr$ -defizienten ( $Ahr^D$ )  $T_H1$ -Zellen. Die Zellen wurden an Tag 5 mit PMA/Ionomycin restimuliert und die Expression von IFN- $\gamma$ , IL-10 und IL-22 auf Einzelzellebene gemessen. (n=2)

Die Untersuchungen an Notch modulierten  $Ahr^D$   $T_H1$ -Zellen (Abb. 40) zeigen, dass die Expressionserhöhung des Zytokins IL-10, weitestgehend unabhängig von der Stimulation des Arylhydrocarbon Rezeptors ist. Für IL-22 sehen wir nahezu eine Verdoppelung der Expression (Abb. 40: 1,4% in  $Ahr^D$  und 2,4% in WT), die wir in den Kontroll modulierten Zellen nicht sehen. Die deutlichen Frequenzunterschiede (Abb. 39 und 40) führen wir auf einen Wechsel der FCS-Charge zurück, wie in laborinternen Tests bestätigt werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Um eventuelle Synergien zwischen dem Notch Signalweg und dem Arylhydrocarbon Rezeptor, insbesondere für die Regulation der IL-22 Expression [115], genauer untersuchen zu können haben wir uns in der Folge eingehender Notch modulierten T<sub>H</sub>17- und T<sub>H</sub>22-Zellen gewidmet (Kapitel 4.7). In Notch modulierten T<sub>H</sub>17-Zellen ist die Expressionerhöhung von IL-22 zwar geringer, als in T<sub>H</sub>0- und T<sub>H</sub>1-Zellen, allerdings ist die absolute Expression wesentlich stärker, wie in Abbildung 41 zu sehen ist. Der prozentuale Anteil IL-22 exprimierender Zellen (Kontrolle) ist in T<sub>H</sub>0-, T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen vernachlässigbar.



**Abbildung 41**

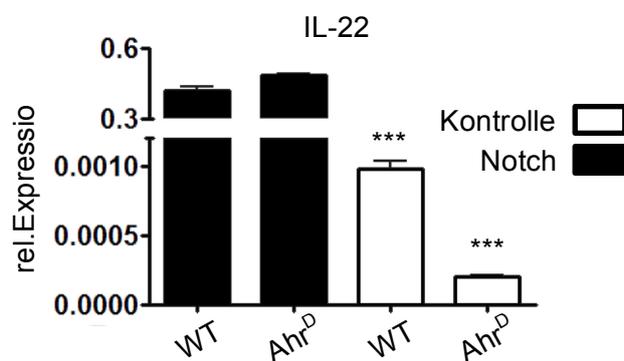
IL-22 Expression in T<sub>H</sub>0-, T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2- und T<sub>H</sub>17-Zellen ± Notch Aktivierung. Der Fold Change (FC) gibt an um welchen Faktor die Signal Intensität in den Notch modulierten Zellen stärker ist. Die höchste Signalintensität findet sich in Notch modulierten T<sub>H</sub>17-Zellen. (n=2)

### 4.7. Notch Modulation führt zur Erhöhung der Zytokinexpression von IL-22, auf mRNA- und Proteinebene, in T<sub>H</sub>17- und T<sub>H</sub>22-Zellen

IL-10 und IL-22 gehören der gleichen Zytokinfamilie an, dennoch unterscheiden sie sich maßgeblich durch ihre Wirkweise. IL-10 wirkt vor allem auf Zellen des Immunsystems, wohingegen IL-22, Signale an Epithelzellen, die den IL-22 Rezeptor exprimieren, weiter gibt. Intestinale Epithelzellen, Hepatozyten und Keratinozyten sind bereits beschriebene IL-22 Ziele [31, 36, 37]. Hierbei wird die Rolle von IL-22 kontrovers diskutiert, da es sowohl Publikationen gibt, die IL-22 als entzündungsfördernd beschreiben, als auch Publikationen, die zeigen, dass IL-22 das Gewebe während einer Immunantwort schützt. Immunpathologische Beispiele lassen sich in Psoriasis Modellen [124], bei der Bekämpfung intestinaler Parasiten [125] oder in einem Modell Kollagen-induzierter Arthritis [126] finden. Protektive Eigenschaften wurden in diversen Infektionsmodellen des Lungen-[98, 127] und Intestinal Gewebes [89, 128] für IL-22 beschrieben.

IL-10 und IL-22 werden nur sehr selten von einer Zelle gleichzeitig exprimiert [32, 86]. Einer der entscheidenden Faktoren hierfür ist das Zytokin TGF- $\beta$ , das ein wichtiger Faktor für die Generierung von T<sub>H</sub>17-Zellen ist. In diesen konnte gezeigt werden, dass TGF- $\beta$  einerseits die Expression von IL-10 begünstigt und andererseits die Expression von IL-22 unterdrückt. In den hier durchgeführten Transkriptomanalysen konnte festgestellt werden, dass die Aktivierung des Notch Signalweges in T<sub>H</sub>0-, T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2- und T<sub>H</sub>17-Zellen zu einem drastischen Anstieg der IL-22 Expression führt (Kapitel 4.1.2, Abb. 17). Für T<sub>H</sub>1-Zellen konnte dieses auch auf Einzelzellebene gezeigt (Kapitel 4.6, Abb. 39 und 40) werden. Im vorangegangenen Kapitel konnte zudem gezeigt werden, dass die IL-22 Expression auch unabhängig vom Vorhandensein des Arylhydrocarbon Rezeptors in Notch modulierten T<sub>H</sub>1-Zellen möglich ist (Abb. 40). Um diese Untersuchungen auch auf T<sub>H</sub>17-Zellen auszuweiten, wurde zunächst in Notch modulierten T<sub>H</sub>17-Zellen geschaut, inwieweit die Notch induzierte Steigerung der IL-22 Expression abhängig vom AhR ist. Dazu wurden T<sub>H</sub>17-Zellen aus naïven Wildtyp- und AhR<sup>D</sup>-Zellen generiert, indem sie unter T<sub>H</sub>17 Bedingungen kultiviert wurden und der Notch Signalweg mittels Notchplasmid Transfektion eingeschaltet wurde (Kapitel 3.4). Die mRNA wurde an Tag 5, nach FACS-Sortierung auf lebende CD4<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> Zellen, aus diesen isoliert und anschließend mittels qPCR die IL-22 Expression quantifiziert (Abb. 42).

Es ist eine extreme Ahr-unabhängige Steigerung der IL-22 mRNA Expression in den untersuchten *in vitro* Kulturen (Abb. 42) zu sehen.



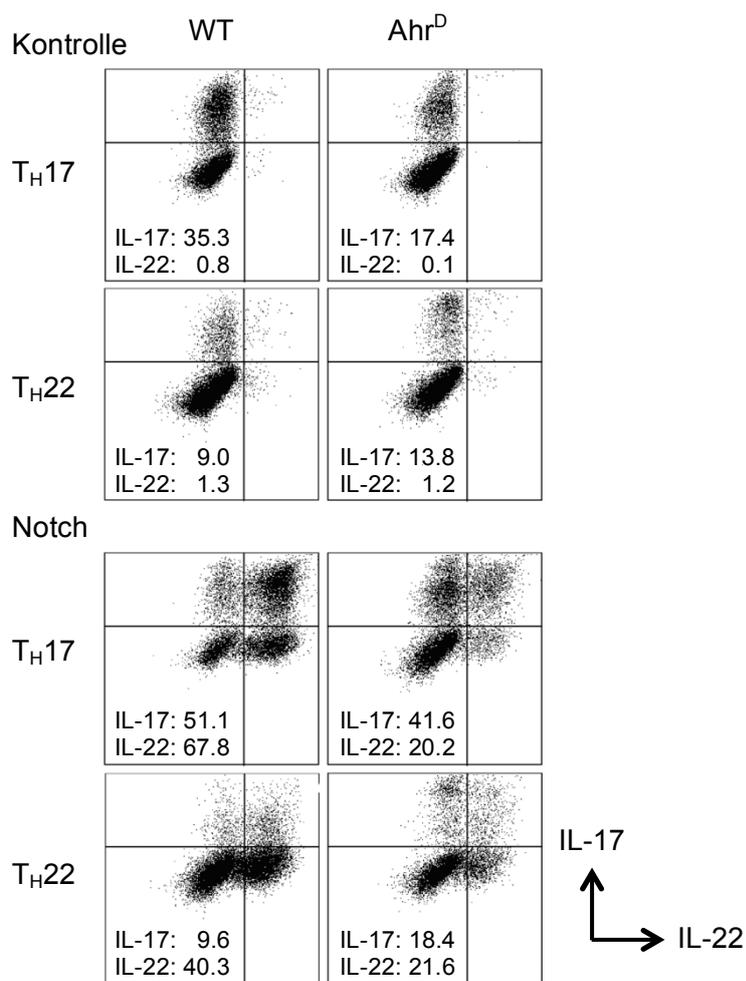
**Abbildung 42**

Die Expression der IL-22 mRNA in Notch modulierten T<sub>H</sub>17-Zellen ist ca. 1000fach erhöht gegenüber den Kontrollen. Diese Erhöhung ist unabhängig vom Arylhydrocarbon Rezeptor. (n=3)

Nun stellte sich die Frage, ob sich die Expression von IL-22 auch in einem anderen, IL-22 exprimierenden Subset, unabhängig von der Expression des Arylhydrocarbon Rezeptors, durch Aktivierung des Notch Signalweges, verstärken lässt. Um diese Frage zu beantworten wurde in der Folge, der Einfluss der Notch Modulation auf die Expression von IL-22 in T<sub>H</sub>17- und T<sub>H</sub>22-Zellen betrachtet, dies wiederum in An- und Abwesenheit des Arylhydrocarbon Rezeptors. Hierzu wurden naive (CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) T-Helfer-Zellen *in vitro* unter T<sub>H</sub>17 und T<sub>H</sub>22 polarisierenden Bedingungen kultiviert und nach 24 Stunden retroviral mit konstitutiv aktivem Notch, oder einem Kontrollplasmid transfiziert (Kapitel 3.4) und anschließend nach Restimulation mit PMA/Ionomycin die Zytokinexpression auf Einzelzellebene an Tag 2, 3, 4 und 5 analysiert. Ein weiterer wichtiger Aspekt war die kinetische Betrachtung der IL-17 und IL-22 Expression. In Abbildung 43 (Kapitel 4.7.1) ist exemplarisch die Zytokinexpression an Tag 5 dargestellt.

## 4.7.1. Steigerung und Stabilisierung der IL-17 und IL-22 Proteinexpression in T<sub>H</sub>17-Zellen durch Integration von TGF- $\beta$ - und AhR-Signalen durch den Notch Signalweg

Wie schon für T<sub>H</sub>1-Zellen gezeigt (Kapitel 4.6, Abb. 40), führt die Aktivierung des Notch Signalweges in T<sub>H</sub>17- und T<sub>H</sub>22-Zellen zur drastischen Erhöhung der IL-22 Expression, dies auch unabhängig von der Expression des AhR, wobei der Kooperative Effekt von Notch und AhR in diesen Zellen (Abb. 43) wesentlich stärker ist, als in T<sub>H</sub>1-Zellen (Kapitel 4.6, Abb. 40).



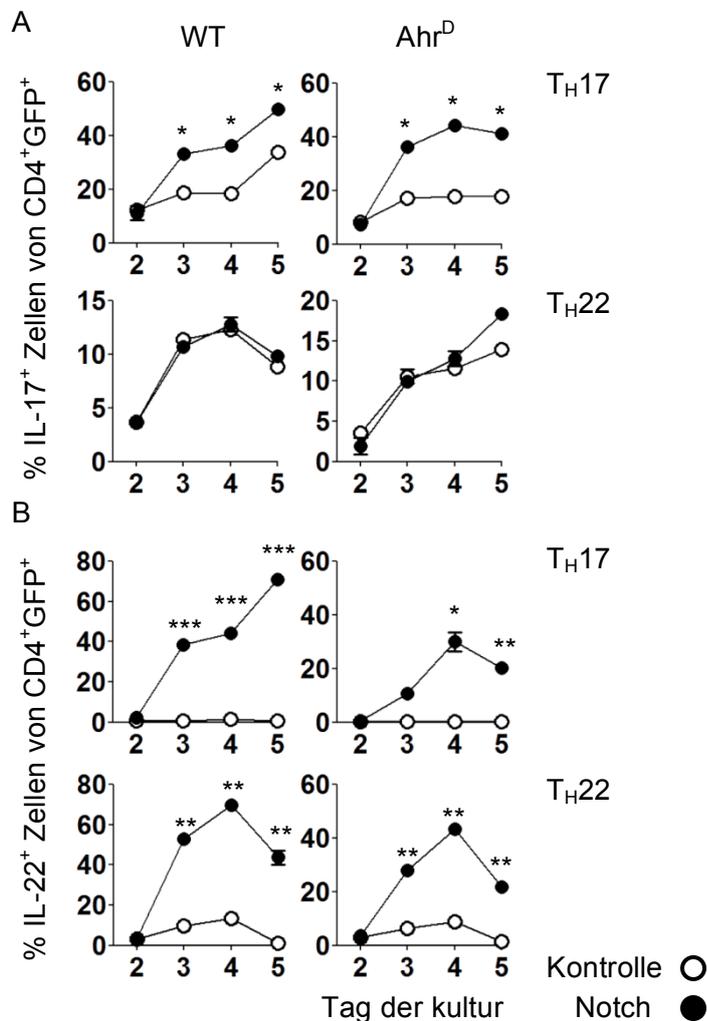
### Abbildung 43

Wildtyp (WT) und Ahr-defiziente (Ahr<sup>D</sup>) Zellen wurden unter T<sub>H</sub>17 oder T<sub>H</sub>22 Bedingungen kultiviert und nach 24 Stunden mit Notch-, oder einem Kontrollplasmid transfiziert. Gezeigt sind die Zytokin Expressionen von IL-17 und IL-22 auf Einzelzellebene, die Zellen wurden an Tag 5 mit PMA/Ionomycin unter Zugabe von Brefeldin A für fünf Stunden restimuliert, gezeigt sind lebende CD4<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> Zellen. (n=2)

In Anwesenheit von TGF- $\beta$  (in T<sub>H</sub>17-Zellen) ist der kooperative Effekt von Notch und AhR deutlich stärker ausgeprägt, als in Abwesenheit von TGF- $\beta$ , wie es bei T<sub>H</sub>22-Zellen der Fall ist (Abb. 43). Neben der induzierenden und stabilisierenden Wirkung durch Notch auf die IL-22 Expression,

ist auch die Expression von IL-17 in den Notch modulierten T<sub>H</sub>17-Zellen höher als in den dazu gehörigen Kontrollen. Wie schon in Kapitel 4.1.2 gezeigt werden konnte führt die Aktivierung des Notch Signalweges in T<sub>H</sub>0-Zellen zu einer signifikanten Erhöhung der mRNA Expression von IL-22 und IL-17A (Abb. 17) an Tag 5. Betrachtet man die mRNA Expression von IL-17 und IL-22 in Notch modulierten T<sub>H</sub>17-Zellen (Kapitel 4.1.2, Abb. 17) und die Zytokin Expression auf Einzelzellebene zum selben Zeitpunkt (Abb. 43), und vergleicht diese mit den jeweiligen Kontrollplasmid transfizierten Zellen, so wird deutlich, dass Notch die IL-17 Proteinexpression stabilisiert und die IL-22 mRNA- und Proteinexpression stark induziert und

ebenfalls stabilisiert. Die induzierende und stabilisierende Wirkung von Notch auf die Proteinexpression von IL-17 und IL-22 ist besonders prägnant in Notch modulierten  $T_H17$ -Zellen in Anwesenheit des AhR (Abb. 44 A und B WT  $T_H17$ -Zellen).



**Abbildung 44**

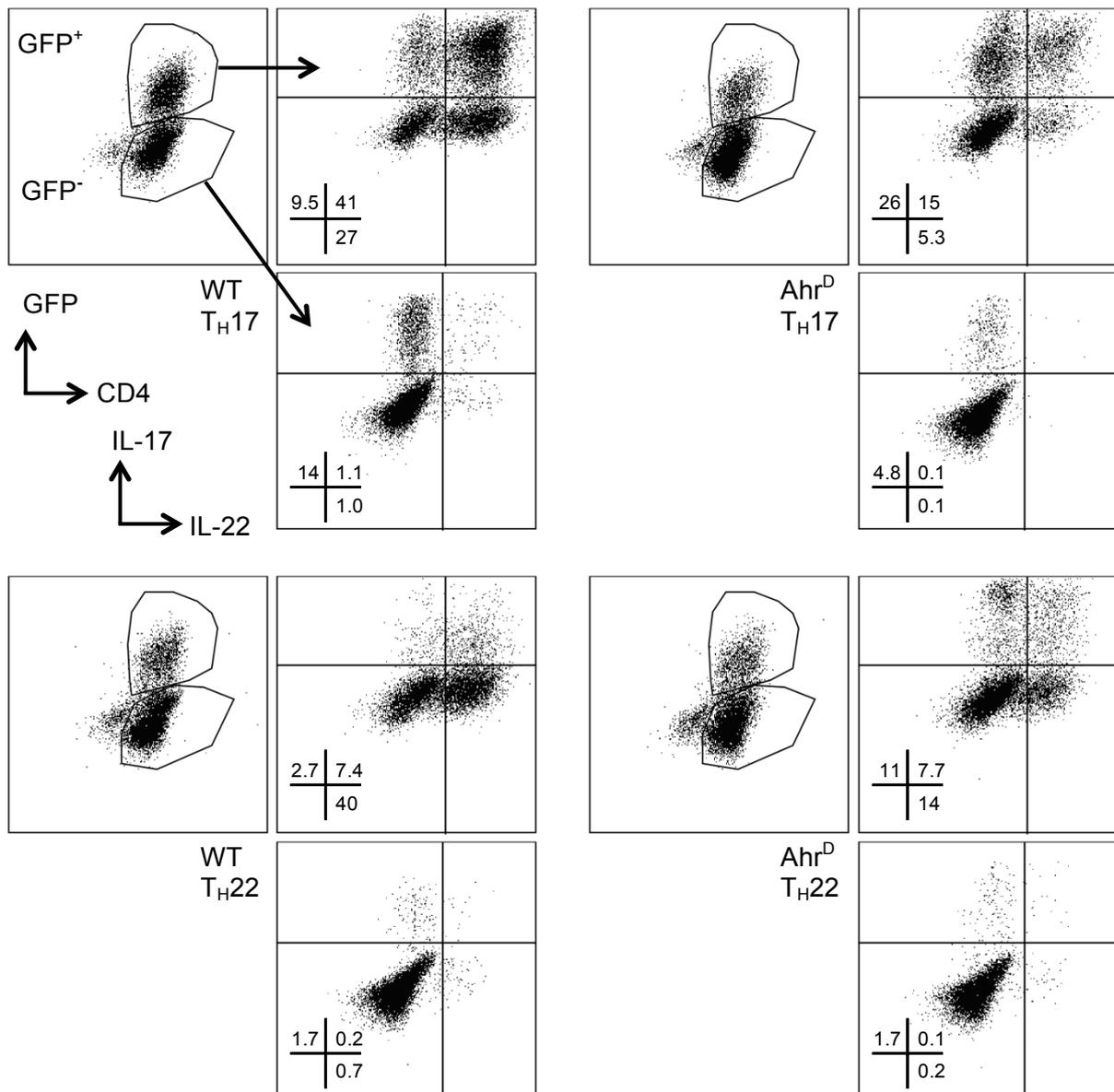
Der Kinetische Expressionsverlauf von (A) IL-17 und (B) IL-22 auf Einzelzellebene. Naïve T-Zellen wurden unter  $T_H17$ , oder  $T_H22$  polarisierenden Bedingungen kultiviert und nach 24h an Tag 1 retroviral transfiziert. Entweder mit Kontroll- (weiße Kreise) oder Notchplasmid (schwarze Kreise). An den Tagen 2, 3, 4 und 5 wurden Zellen entnommen und für 5 Stunden mit PMA/Ionomycin, unter Zugabe von Brefeldin A, restimuliert und anschließend die Zytokinexpression von IL-17 und IL-22 am FACS analysiert. (n=2)

Die Aktivierung des Notch Signalweges führt in Anwesenheit von TGF- $\beta$  zu einer Steigerung der IL-17 Expression (Abb. 44 A oben). Werden die Zellen ohne TGF- $\beta$  unter  $T_H22$  Polarisationsbedingungen kultiviert, exprimieren sie generell weniger IL-17, dessen Expression durch Aktivierung des Notch Signalweges auch nicht wieder erhöht werden kann (Abb. 44 A unten). Anders verhält es sich mit der Expression von IL-22 (Abb. 44 B). Hier führt die Aktivierung des Notch Signalweges sowohl unter  $T_H17$ , als auch unter  $T_H22$  Bedingungen zu einer starken Erhöhung des IL-22-Levels (Abb. 44 schwarze Kreise). Vergleicht man die mit Kontrollplasmid behandelten Zellen (Abb. 44 B weiße Kreise), so sieht man, dass in Anwesenheit von TGF- $\beta$  ( $T_H17$ ) die Zellen nicht in der Lage sind IL-22 zu exprimieren. Dies bestätigt bereits publizierte Experimente, wonach die Repression der IL-22

Expression durch TGF- $\beta$  vermittelt wird [86]. Kommt es allerdings zur Aktivierung des Notch Signalweges, so wird die TGF- $\beta$  vermittelte Repression aufgehoben, was jedoch in Abwesenheit des Arylhydrocarbon Rezeptors, abgeschwächt ist (Abb. 44 B oben). Verglichen mit den Experimenten in T<sub>H</sub>1-Zellen (Kapitel 4.6, Abb. 39 und 40), sieht man in T<sub>H</sub>17-Zellen, einen stärkeren Einfluss des Arylhydrocarbon Rezeptors auf, die Notch induzierte, IL-22 Expression. Eine der Möglichkeiten wie es zu einem Cross-Talk zwischen diesen Faktoren kommen könnte wird in der Literatur beschrieben [115]. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des Notch Signalweges in CD4<sup>+</sup> Zellen zur Sekretion von endogenen, nicht identifizierten, AhR-Liganden führt, die wiederum in der Lage sind den AhR zu stimulieren und somit die IL-22 Expression zu steigern. Um dies genauer zu analysieren, wurden transfizierte und nicht-transfizierte Zellen innerhalb einer Kultur betrachtet (Kapitel 4.7.2, Abb. 45).

#### 4.7.2. Die Sekretion eines endogenen Liganden des AhR ist nicht maßgeblich für die Expression von IL-22 in Notch modulierten T<sub>H</sub>17- und T<sub>H</sub>22-Zellen

Wir haben auch diese Möglichkeit der Notch vermittelten, AhR-abhängigen Modulation, der IL-22 Expression in T<sub>H</sub>17- und T<sub>H</sub>22-Zellen betrachtet. Dazu wurden in Abbildung 45 (Notch Modulation) und 46 (Kontrollplasmid) die Zytokinproduktion der GFP<sup>+</sup>- und GFP<sup>-</sup>-Fraktion der gleichen Kultur, an Tag 5 nach Restimulation, miteinander verglichen.



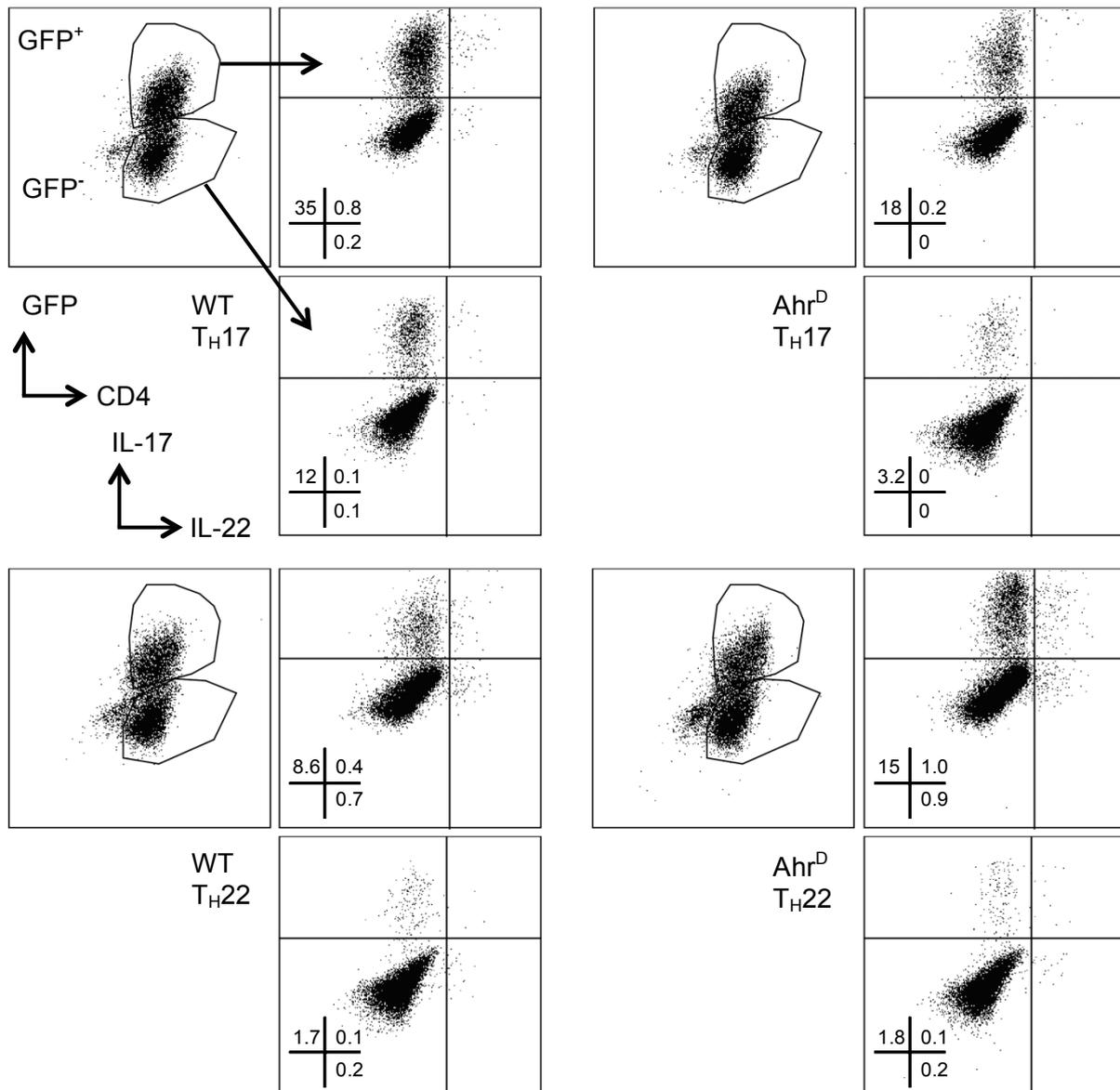
**Abbildung 45**

Vergleich der GFP<sup>+</sup>- und GFP<sup>-</sup>- mit Notchplasmid transfizierten T<sub>H</sub>17- und T<sub>H</sub>22-Kulturen von WT- und Ahr<sup>D</sup>-Zellen. Dargestellt sind, lebende, CD4<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>GFP<sup>-</sup>, an Tag 5 mit PMA/Ionomycin, unter Zugabe von Brefeldin A, für 5 Stunden restimierte Zellen. Angefärbt sind die Zytokine IL-17 und IL-22. (n=2)

Betrachtet man die Zytokinexpression der GFP<sup>+</sup>- und GFP<sup>-</sup>-Fraktionen gesondert, so wird deutlich, dass die IL-22 Expression auf Zellen, mit intrazellulärem Notch Signal (GFP<sup>+</sup>),

## Ergebnisse

beschränkt ist. Würde die maßgebliche Regulation über einen sekretierten Faktor erfolgen, der den AhR stimuliert, so dürfte, zumindest in den GFP<sup>-</sup> Wildtyp Zellen, die IL-22 Expression nicht so stark abgeschwächt sein (Abb. 45 links). Neben der Integration der unterschiedlichen Signale durch den Notch Signalweg kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass transfizierte Zellen gegenüber nicht-transfizierten Zellen einen Vorteil haben, da GFP<sup>+</sup>-Zellen ein generell höheres Zytokinexpressionsniveau aufweisen, als GFP<sup>-</sup>-Zellen. Dies wird besonders bei Betrachtung der Kontrollplasmid behandelten Zellen in Abbildung 46 deutlich.



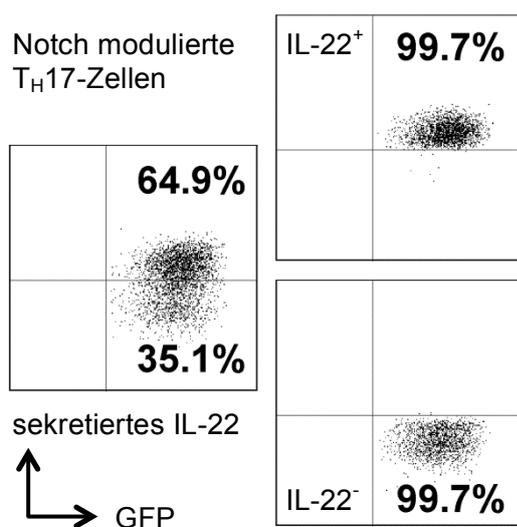
### Abbildung 46

Vergleich der GFP<sup>+</sup> und GFP<sup>-</sup> mit Kontrollplasmid transfizierten TH17 und TH22 Kulturen von WT- und Ahr<sup>D</sup>-Zellen. Dargestellt sind, lebende, CD4<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>GFP<sup>-</sup>, an Tag 5 mit PMA/Ionomycin, unter Zugabe von Brefeldin A, für 5 Stunden restimulierte Zellen. Angefärbt sind die Zytokine IL-17 und IL-22. (n=2)

In Abbildung 45 und 46 sieht man, dass die GFP negativen Zellen im Allgemeinen einen niedrigeren Aktivierungsstatus haben. Bei Verwendung des Kontrollplasmides (Abb. 46) sind die Verhältnisse zwischen den Frequenzen von IL-17<sup>+</sup>-, IL-22<sup>+</sup>- und IL-17<sup>+</sup>IL-22<sup>+</sup>-Zellen, im Vergleich der GFP<sup>+</sup>- und GFP<sup>-</sup>-Fraktion, relativ konstant. Da dies, in den mit Notch Plasmid transfizierten Zellen, nicht der Fall ist (Abb. 45), kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der Notch vermittelten IL-22 Expressionssteigerung um einen intrinsischen Effekt handelt, der nicht per Se durch Sekretion eines AhR-Liganden stattfindet.

Resümierend können wir festhalten, dass die Expression von IL-22 direkt an ein aktives Notch Signal innerhalb der Zelle gekoppelt ist. Nichtsdestotrotz verbleibt ein Teil der IL-22 Expression, der AhR-abhängig ist, da die GFP<sup>-</sup> WT-Zellen eine höhere Expression von IL-22 aufweisen, als die dazugehörigen AhR<sup>D</sup>-Zellen (Abb. 45). Die Ergebnisse schließen nicht aus, dass die Aktivierung des Notch Signalweges zur Expression eines endogenen AhR-Liganden führt, und darüber die IL-22 Expression begünstigt wird, der Hauptteil der IL-22 Induktion geschieht jedoch innerhalb der Zelle, vermittelt durch die intrazelluläre Domäne von Notch.

Interessant wäre in der Folge, die genauere Betrachtung und Aufschlüsselung, inwieweit die Signalwege von Notch, dem Arylhydrocarbon Rezeptor, vorhandene STATs und TGF- $\beta$  bei der Regulation von IL-17 und IL-22 zusammen spielen. Um die Regulation der Notch vermittelten IL-22 Expression in T<sub>H</sub>17-Zellen genauer beschreiben zu können, wurde analog zu IL-10 in Notch modulierten T<sub>H</sub>1-Zellen, in Kooperation mit Ebioscience und Miltenyi Biotec, an der Etablierung eines IL-22 Sekretions Assay gearbeitet (Abb. 47), der es ermöglichte auf Transkriptomebene einen direkten Vergleich von IL-22<sup>+</sup>- und IL-22<sup>-</sup>-Zellen durchführen zu können (Kapitel 4.8).

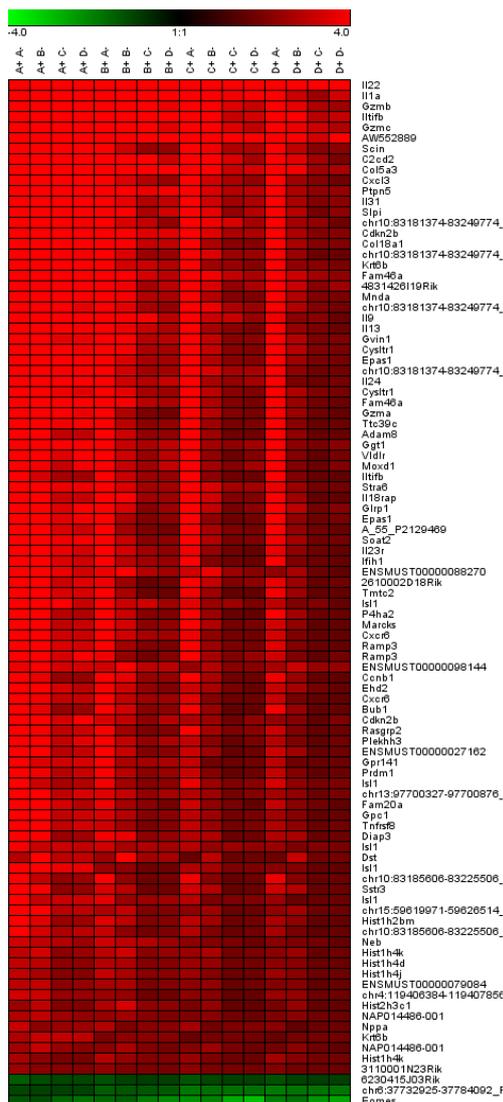


#### Abbildung 47

T<sub>H</sub>17-Zellen wurden mit konstitutiv aktivem Notch3 (GFP) transfiziert und an Tag 5 nach Restimulation mit PMA/Ionomycin mittels Sekretions Assay für IL-22 sortiert. Von den so aufgereinigten Fraktionen IL-22<sup>+</sup>- und IL-22<sup>-</sup>-Zellen wurde anschließend die mRNA isoliert und eine vergleichende Transkriptomanalyse beider Populationen durchgeführt. Für diese Analyse wurde das Agilent-System von Miltenyi Biotec verwendet. (n=4)

#### 4.8. Der Transkriptomvergleich von CD4<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>IL-22<sup>+</sup> mit CD4<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>IL-22<sup>-</sup> Notch modulierten T<sub>H</sub>17-Zellen zeigt eine signifikante Erhöhung der gesamten Genexpression innerhalb der IL-22 positiven Fraktion

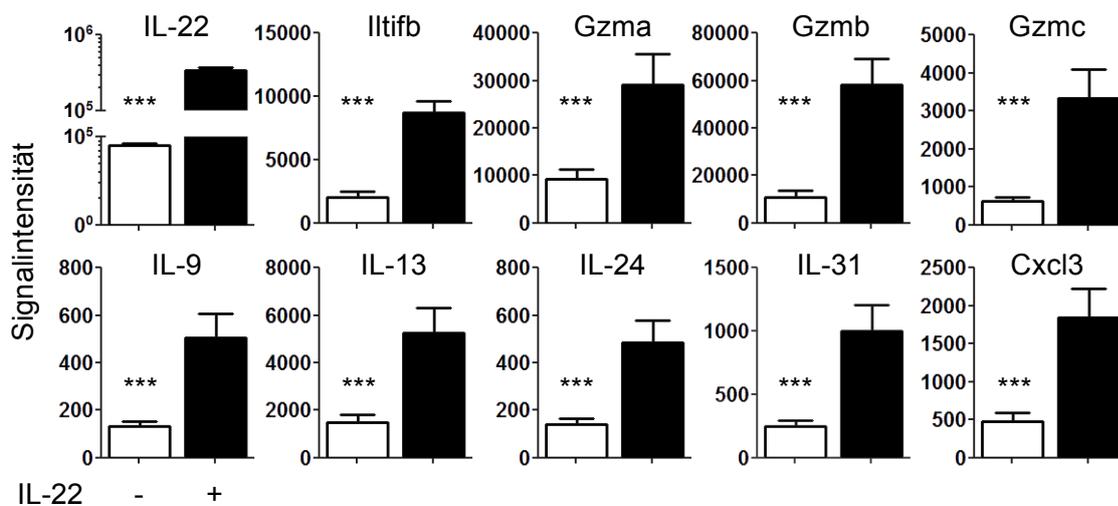
Die vergleichende Genexpressionsanalyse verschiedener Zellpopulationen bietet eine gute Möglichkeit die unterschiedlichen Charakteristika eines Zelltyps auf transkriptioneller Ebene umfangreich zu analysieren. Die Notch Modulation von T<sub>H</sub>17-Zellen führt zu einer starken Induktion des Zytokins IL-22. Dennoch gibt es innerhalb dieser Zellpopulation (GFP<sup>+</sup>) sowohl IL-22<sup>+</sup>- als auch IL-22<sup>-</sup>-Zellen (Kapitel 4.7.2, Abb. 47). Wir haben diese Zellen mit Hilfe, des zuvor beschriebenen IL-22 Sekretions Assay (Kapitel 3.8), voneinander getrennt und anschließend deren Transkriptome miteinander verglichen (Abb. 48). Neben etlichen Zytokinen und Oberflächenmolekülen, wurden 4 Transkriptionsfaktoren identifiziert, die das gleiche Expressionsmuster wie IL-22 aufweisen. Vier unterschiedliche Ansätze Notch modulierter T<sub>H</sub>17-Zellen (A-D) wurden mittels IL-22 Sekretions Assay sortiert, und, die so separierten Zellpopulationen miteinander verglichen (Kapitel 3.11.4).



**Abbildung 48**

Heatmap-Darstellung des Vergleichs IL-22-negativer und IL-22-positiver Notch modulierter T<sub>H</sub>17-Zellen. Beim Vergleich der IL-22<sup>-</sup> und IL-22<sup>+</sup>-Transkriptome, die mittels IL-22 Sekretions Assay aus 4 verschiedenen Ansätzen Notch modulierter T<sub>H</sub>17-Zellen isoliert wurden, konnten 97 Transkripte identifiziert werden (Kapitel 3.11.4), die signifikant differentiell exprimiert wurden. (n=4)

Neben IL-22 sind weitere sekretierte Faktoren, wie IL-1a, verschiedene Granzyme, IL-9, IL-13, IL-24, IL-31, Iltf und Cxcl3 in IL-22 positiven Zellen signifikant erhöht. Außerdem ist die Expression der Oberflächenmoleküle IL-18R, IL-23R, Cxcr6 und Tnfrsf8 (CD30) in den IL-22<sup>+</sup>-Zellen stärker. Als Transkriptionsfaktoren, die dem IL-22 Expressionsmuster folgen, konnten Epas-1, Isl1, Blimp-1 und Eomes herausgefiltert werden. Insgesamt nur drei Faktoren, die auf diese Weise identifiziert wurden sind in den IL-22<sup>+</sup>-Zellen signifikant schwächer exprimiert, wobei der Transkriptionsfaktor Eomes einer dieser Faktoren ist.



**Abbildung 49**

Die Signalintensität der sekretierten Faktoren IL-22, Il1fb, Gzma, Gzmb, Gzmc, IL-9, IL-13, IL-24, IL-31 und Cxcl3 ist in IL-22<sup>+</sup> Notch modulierten T<sub>H</sub>17-Zellen gegenüber den IL-22<sup>-</sup> Zellen signifikant erhöht.

In Notch modulierten T<sub>H</sub>17-Zellen sehen wir, selbst in der IL-22<sup>-</sup>-Fraktion, die kein IL-22 sekretieren, ein extrem starkes Signal für IL-22, das um eine weitere Zehnerpotenz stärker in der positiven Fraktion exprimiert wird.

Ein weiterer Faktor dessen Expression nach oben reguliert ist, ist Il1fb, dieser Interleukin-10 verwandte, aus T-Zellen stammende induzierbare Faktor, wird in der Literatur auch als IL-22b beschrieben. Il1fb weist sowohl mit IL-10, als auch mit IL-22 Homologien auf und wurde als ein durch Etomidat in Krebszellen induzierter Faktor beschrieben [129].

Die Granzyme a, b und c werden vor allem in zytotoxischen T-Zellen exprimiert, wurden allerdings auch schon in Verbindung mit IL-22 beschrieben. In humanen Studien ist gezeigt das T<sub>H</sub>17-Zellen, die sowohl IL-22, als auch Granzym b exprimieren, sehr effizient die Bluthirnschranke passieren und maßgeblich die Inflammation des zentralen Nervensystems fördern und an der Eliminierung von neuronalen Zellen beteiligt sind [130]. In einem weiteren Ansatz, der zeigt, dass *in vitro* IL-21 in der Lage ist IL-22 in humanen CD8 Zellen zu induzieren, wird auch beobachtet, dass Granzym b in diesen Zellen stark koexprimiert wird [131]. In einem bovinen Tuberkulose Modell wurden des Weiteren die Faktoren IL-22 und Granzyme A als mögliche Biomarker zur Bestimmung der Infektion beschrieben [132]. Außerdem konnte eine direkte Abhängigkeit zytotoxischer Faktoren vom Notch Signalweg in CD8<sup>+</sup> Zellen gezeigt werden [133].

Zur Expression von IL-9 wissen wir aus vorangegangenen Experimenten, dass die Notch Modulation von T<sub>H</sub>17-Zellen zu einer deutlichen Reduktion dieses Faktors führt (Kapitel

4.1.2, Abb. 17). Umso erstaunlicher, dass dieses Zytokin, wenn auch recht schwach exprimiert, in den IL-22<sup>+</sup>-Zellen signifikant stärker exprimiert wird, als in den IL-22<sup>-</sup>-Zellen. Obwohl IL-9, vor allem in T<sub>H</sub>9-Zellen bereits ausführlich beschrieben ist gibt es keine Hinweise auf IL-9/IL-22 koexprimierende Zellen.

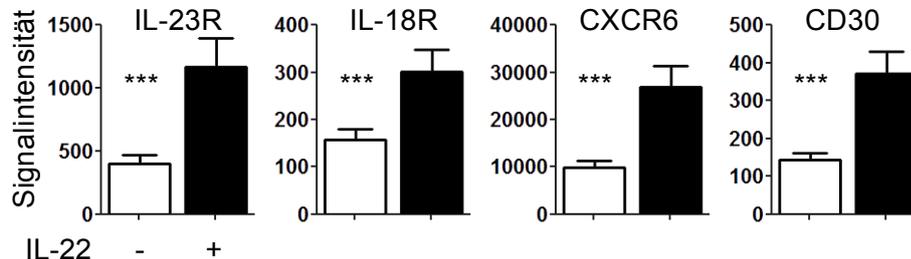
IL-13 konnte in Patienten mit atopischer Dermatitis als Zytokin identifiziert werden, das von CD8<sup>+</sup>-Zellen mit IL-22 koexprimiert wird [134].

Ebenfalls für atopische Dermatitis sind pro-inflammatorische Eigenschaften für IL-31 beschrieben, sowie eine schwache Expression zusammen mit IL-22 gezeigt [135].

IL-24, neben IL-22 ebenfalls ein Mitglied der IL-10 Zytokinfamilie, ist ähnlich wie IL-22, in Psoriasis-Modellen als entzündungsfördernd beschrieben. In Bezug auf Psoriasis werden auch redundante Effekte von IL-24 und IL-19, wiederum ein Mitglied der IL-10 Zytokinfamilie, diskutiert [136].

Für das Chemokin Cxcl3 ist gezeigt, dass es stark mit der Expression von IL-22 korreliert, so haben IL-22 defiziente Tiere, wesentlich niedrigere Level an Cxcl3 verglichen mit IL-22-kompetenten Tieren [137].

Neben den sekretierten Faktoren haben wir auch vier Oberflächenmoleküle identifiziert, die in den Notch modulierten IL-22<sup>+</sup>-T<sub>H</sub>17-Zellen signifikant hochreguliert sind.



**Abbildung 50**

Die Signalintensität der Oberflächenmoleküle IL-23R, IL-18R, CXCR6 und CD30 ist in IL-22<sup>+</sup> Notch modulierten T<sub>H</sub>17-Zellen gegenüber den IL-22<sup>-</sup>-Zellen signifikant erhöht.

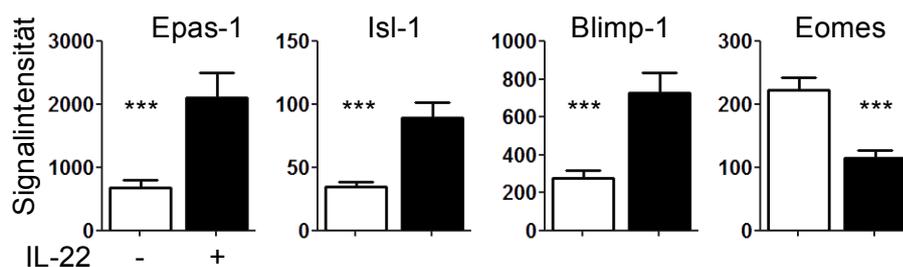
Da bereits gezeigt werden konnte, dass IL-23 zu einer Erhöhung der IL-22-Level führt [32], ist die signifikante Erhöhung des Signals für den IL-23 Rezeptor (IL-23R) interessant. Die IL-22<sup>+</sup>-Zellen könnten somit ein stärkeres Signal über IL-23 erhalten, als IL-22<sup>-</sup>-Zellen. Außerdem ist in einem *in vivo* Modell oraler Infektion mit *Toxoplasma Gondii* beschrieben, dass die Immunpathologie IL-23 vermittelt ist und von der IL-22 Expression abhängt [138]. Die Erhöhung des IL-18 Rezeptors in IL-22<sup>+</sup>-Zellen könnte zu einem T<sub>H</sub>1 Bias führen, da der IL-18 Rezeptor vorwiegend auf T<sub>H</sub>1-Zellen exprimiert wird [139] und die Stimulation zur Induktion von Tbx21 [140] führt.

CXCR6 ist bereits als ein Marker identifiziert, der in Abhängigkeit von Notch 2 in adulten ROR $\gamma$ <sup>+</sup>-Lymphozyten des angeborenen Immunsystems exprimiert ist [141]. Darüber hinaus ist der Rezeptor an der Lymphozyten Wanderung in Richtung entzündeter Gewebe beschrieben [142, 143].

Ebenso wie die erhöhte Expression des IL-18-Rezeptors, könnte auch die Hochregulierung von Tnfrsf8 (CD30) zu einem T<sub>H</sub>1 Bias in IL-22<sup>+</sup>-Zellen führen [144].

Die Möglichkeit einer T<sub>H</sub>1-ähnlichen Polarisierung und eventuelle spezifische „homing“-Eigenschaften der Zellen sind äußerst interessant, und sollten auf jeden Fall in sich anschließenden Untersuchungen näher betrachtet werden. CXCR6 könnte gegebenenfalls als Oberflächenmarker verwendet werden, um IL-22<sup>+</sup>- und IL-22<sup>-</sup>-Zellen voneinander zu trennen, auch ohne Verwendung eines Sekretions Assay, da er signifikant differentiell, und wesentlich stärker exprimiert wird, als andere untersuchte Oberflächenmoleküle.

Unser besonderes Interesse galt, wie auch schon bei den sortierten IL-10 Produzenten (Kapitel 4.2), der differentiellen Expression von Transkriptionsfaktoren.



#### Abbildung 51

Die Signalintensität der Transkriptionsfaktoren Epas-1, Isl-1 und Blimp-1 ist in IL-22<sup>+</sup> Notch modulierten T<sub>H</sub>17-Zellen gegenüber den IL-22<sup>-</sup>-Zellen stark erhöht. Der Transkriptionsfaktor Eomes ist eines der wenigen Transkripte, die in IL-22<sup>-</sup>-Zellen höher exprimiert wird, als in den positiven Zellen.

Epas-1 ist ein durch Sauerstoffmangel induzierter Transkriptionsfaktor, der auch unter dem Namen Hif2 $\alpha$  bekannt ist. Die durch Hypoxie regulierten Transkriptionsfaktoren spielen eine wichtige Rolle bei der Induktion der Vaskularisierung, die für den Organismus eine Variante darstellt, die Sauerstoffzufuhr im Bereich der Hypoxie zu erhöhen [145]. Interessanterweise ist für eine andere Isoform, nämlich Hif1 $\alpha$  bekannt, dass sie direkt mit Arnt (Hif1 $\beta$ ) interagiert [146]. Arnt, der Arylhydrocarbon Receptor Nuclear Translocator, ist wiederum eng an die Aktivität von AhR gekoppelt. Die starke Hochregulation von Epas-1 könnte möglicherweise ein wichtiger Faktor in IL-22<sup>+</sup>-Notch modulierten T<sub>H</sub>17-Zellen sein, der auch im Stande ist die Defizienz von AhR zu kompensieren, was erklären würde weshalb die Notch Aktivierung auch in AhR<sup>D</sup>-Zellen zu einer starken Induktion der IL-22 Expression führt.

Isl-1 ist ein entscheidender Transkriptionsfaktor für die Entwicklung des Pankreas, für die auch der Notch Signalweg von essentieller Bedeutung ist [147].

Die Expression von Blimp-1 wird, wie schon zuvor gezeigt, unter sämtlichen untersuchten Polarisationsbedingungen durch den Notch Signalweg gesteigert (Kapitel 4.1.3, Abb. 18). Sowohl in den IL-10 sortierten  $T_H1$ -Zellen, als auch in den IL-22 sortierten  $T_H17$ -Zellen, ist die Expression von Blimp-1 innerhalb der positiven Fraktion verstärkt.

Der Transkriptionsfaktor Eomes stellt eine Besonderheit dar, da es einer der wenigen Transkripte ist, die in IL-22<sup>+</sup>-Zellen schwächer exprimiert werden. Eomes ist ein entscheidender Transkriptionsfaktor für die Entwicklung zytotoxischer T-Zellen. Wie bereits gezeigt wurde führt die Blockade des Notch Signalweges zum Verlust der Eomes Expression [133]. Erstaunlicher Weise ist in den hier durchgeführten Experimenten ein gegenteiliges Bild (Kapitel 4.1.3, Abb. 18 und Kapitel 4.8, Abb. 51) zu erkennen.

Beim Vergleich der IL-22<sup>+</sup>- und IL-22<sup>-</sup>-Transkriptome konnten einige interessante Transkripte identifiziert werden, die stark differentiell reguliert werden. Zum einen verfügen die Notch modulierten IL-22<sup>+</sup>- $T_H17$  Zellen über ein sehr ungewöhnliches Expressionsprofil von Zytokinen, und zum anderen sollten die Oberflächenmoleküle, insbesondere der für das „Homing“ verantwortliche Faktor CXCR6, genauer betrachtet werden. Dies könnte dazu beitragen, die Funktion dieser Zellen besser zu verstehen. Da für IL-22 sekretierende Zellen sowohl anti-, als auch pro-inflammatorische Eigenschaften beschrieben sind, scheint der Wirkungsort der Zellen maßgeblich dafür zu sein, welche dieser Charakteristika überwiegen [31, 37]. Schließlich konnten wir zeigen, dass der Notch Signalweg einen entscheidenden Faktor für die Expression von IL-22 in  $T_H17$ -Zellen darstellt, inwieweit dies von der Expression anderer Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise Epas-1 (Abb. 51), abhängt, muss in weiterführenden Experimenten ermittelt werden.

## 5. Diskussion



## 5.1. Direkte und indirekte Modulation der Genexpression durch den Notch Signalweg in T-Helfer-Zellen.

In der Literatur werden drei unterschiedliche Modelle propagiert, wie der Notch Signalweg die Polarisierung einer T-Helfer-Zelle modulieren kann. Diese können in ein Liganden-gesteuertes, Zytokin-getriebenes und integrierendes Modell unterteilt werden. Das Liganden-gesteuerte Modell beschreibt, dass die Polarisierung naiver T-Helfer-Zellen in der Peripherie direkt durch die verschiedenen Notch-Liganden spezifisch induziert werden kann [46, 67, 148, 149]. Demnach werden  $T_H1$ -Zellen durch Delta-Like-Liganden exprimierende APZs, bzw.  $T_H2$ -Zellen durch Jagged-Liganden exprimierende APZs induziert. Es konnte gezeigt werden, dass APZs präferentiell Jagged-Liganden, bzw. Delta-like-Liganden exprimieren, wenn sie mit mikrobiellen Stimuli in Kontakt kommen, die eine  $T_H2$ -, bzw.  $T_H1$ -Immunantwort auslösen. Außerdem wurde *in vitro* gezeigt, dass die Überexpression von Jagged1, bzw. Delta-like-1 in APZs zur erhöhten Expression der Signaturzytokine IL-4 ( $T_H2$ ), bzw. IFN- $\gamma$  ( $T_H1$ ) in zusammen kultivierten T-Helfer-Zellen führt [46]. Darüber hinaus konnte *in vivo* und *in vitro* experimentell gezeigt werden, dass eine GSI vermittelte Blockade des Notch Signalweges in  $T_H1$ -Zellen zur Aufhebung der Tbet und IFN- $\gamma$  Transkription führt, die *in vitro* durch Überexpression der intrazellulären Domäne von Notch1 wiederhergestellt werden kann [149], was für eine Notch vermittelte Polarisierung zu  $T_H1$ -Zellen spricht. Für die Regulation von Gata3, dem Schlüsseltranskriptionsfaktor für  $T_H2$ -Zellen, konnte in ChIP-Experimenten eine direkte Bindung durch Notch gezeigt werden. Zudem führte die Überexpression der intrazellulären Domäne von Notch1 selbst in Stat6-defizienten  $T_H1$ -Zellen zur Expression von IL-4. Zusätzlich wurde gezeigt, dass in Anwesenheit eines dominant negativen Koaktivators (dominant negative mastermind-like - DNMAML) des Notch Signalweges die Expression von IL-4 in neutral polarisierten T-Helfer-Zellen aufgehoben ist [67]. Das Notch1 in der Lage ist sowohl  $T_H1$ -, als auch  $T_H2$ -Zellen zu induzieren wird dadurch erklärt, dass die Induktion von  $T_H1$ -Zellen nur in Abwesenheit von Gata3 stattfinden kann, wie durch Überexpression der intrazellulären Domäne von Notch1 in Gata3 defizienten Zellen, an Hand der induzierten IFN- $\gamma$  Expression gezeigt werden konnte [148]. Der größte Schwachpunkt des Liganden-gesteuerten Modells ist, dass nach Abspaltung der extrazellulären Domäne des Notch-Rezeptors der weitere Verlauf des Signalweges, unabhängig davon, ob er durch Jagged-, oder Delta-like-Liganden aktiviert wurde, gleich ist. Daher ist es fragwürdig, ob es durch Aktivierung eines Signalweges zur Induktion diametral unterschiedlicher Entwicklungsprogramme kommen kann.

Diese Diskrepanz wird durch das Zytokin-gesteuerte [55] und integrierende [150] Modell der Notch vermittelten T-Helfer-Zell-Modulation aufgegriffen. Die Arbeiten bezüglich des Zytokin-gesteuerten Modells zeigen, dass *in vitro* weder Delta-like-1, noch Jagged1 in der Lage sind

$T_H1$ -, bzw.  $T_H2$ -Zellen zu induzieren, wenn polarisierende Zytokine blockiert werden. Des Weiteren ist dargestellt, dass, auch in Abwesenheit eines funktionierenden  $\gamma$ -Sekretase Komplexes und/oder des Transkriptionsfaktors Rbpjk, polarisierende Zytokine fähig sind  $T_H1$ -, bzw.  $T_H2$ -Zellen zu induzieren. Ein Fehlen des funktionierenden  $\gamma$ -Sekretase Komplexes hatte jedoch eine Verminderung der Proliferation und Zytokinsekretion der Zellen zur Folge [55]. Diese indirekte Regulation von  $T_H1$ -Zellen durch Modulation der Sekretion von Zytokinen vermittelt über den Notch Signalweg wird ebenfalls durch Arbeiten an *L. major* infizierten Mäusen unterstützt, die zeigen, dass die IFN- $\gamma$  Sekretion in Abwesenheit der Rezeptoren Notch1 und Notch2 gestört ist, was zu einer erhöhten Parasitenbelastung und zur Verschlimmerung der Infektion führt, die unabhängig von dem DNA-bindenden Faktor Rbpjk ist [49]. Insbesondere die Arbeiten von Ong et. al. [55] widerlegen, dass verschiedene Notch-Liganden über ein und denselben Rezeptor fähig sind unterschiedliche T-Helfer-Subsets zu induzieren. Darüber hinaus ist auch eine Rolle des Notch Signalweges in weiteren distinktiven T-Helfer-Zellen, beschrieben. Wie verschiedene Arbeiten zeigen konnten, ist Notch sowohl an der Regulation von  $T_{Reg}$ s [16], TFH-Zellen [151], zytotoxischen T-Zellen [133],  $T_H9$ -Zellen [152], als auch  $T_H17$ -Zellen [153] beteiligt. Diese Beobachtungen können durch das Liganden-gesteuerte Modell nur unzureichend erklärt werden.

Das erst kürzlich beschriebene Modell der integrierenden Modulation externer Signale durch den Notch Signalweg bei der Polarisation unterschiedlicher T-Helfer-Subsets versucht die zuvor beschriebenen Modelle und Beobachtungen zu vereinen [150]. Mit Hilfe eines dominant negativen Notch response elements (DNMAML) wurde gezeigt, dass Notch unabhängig von Zytokinen gleichzeitig  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Zellen reguliert. So war die Expression sowohl von IFN- $\gamma$  und Tbet ( $T_H1$ -Zellen), als auch von IL-4 und Gata3-1a ( $T_H2$ -Zellen) in DNMAML-Zellen vermindert, wenn diese unter neutralen Bedingungen kultiviert wurden. Darüber hinaus wurde durch die GSI-vermittelte Blockade des Notch Signalweges an unterschiedlichen Zeitpunkten gezeigt, dass ein anhaltendes Notch Signal nötig ist, um sowohl  $T_H1$ -, als auch  $T_H2$ -Zellprogramme aufrecht zu erhalten. Zusätzlich zeigen die Arbeiten, dass eine Blockade des Notch Signalweges in T-Helfer-Zellen eine Verminderung der Sensibilität auf exogene Zytokine zur Folge hat. So exprimierten T-Helfer-Zellen, die unter steigender Verdünnung der  $T_H1$ -,  $T_H2$ -, bzw.  $T_H17$ -polarisierenden Bedingungen kultiviert wurden, signifikant niedrigere Level an IFN- $\gamma$ , IL-4, bzw. IL-17A, wenn gleichzeitig der Notch Signalweg blockiert wurde. Mechanistisch konnte zudem mit Hilfe von CHIP- und Luziferase-Assay-Experimenten verifiziert werden, dass die intrazelluläre Domäne von Notch1 und Tbet bei der Transkription von IFN- $\gamma$  zusammen wirken. Das Modell der Signalintegration vereint die verschiedenen Ebenen, auf denen es zur Modulation einer Zelle durch den Notch Signalweg kommen kann und wird somit der zuvor beschriebenen Diversität und Komplexität des Signalweges am ehesten gerecht [10, 87, 154, 155]. Auch

zuvor durchgeführte Arbeiten unseres Labors in denen gezeigt werden konnte, dass die Stimulation des Notch Signalweges durch Jagged1, Delta-like-1 oder Delta-like-4 in nicht-polarisierten T-Helfer-Zellen zu keiner spezifischen Induktion von IL-4 oder IFN- $\gamma$  führte, sondern vielmehr die TZR abhängige Aktivierung einer Zelle, unabhängig von Rbpjk, modulierte, befindet sich im Einklang mit diesem Modell [54].

Die Diskrepanz zwischen den in der Literatur beschriebenen Beobachtungen beruht vor allem auf den verschiedenen Herangehensweisen der Modulation des Notch Signalweges und den sich unterscheidenden experimentellen Aufbauten.

Um die diffizile Rolle des Notch Signalweges in peripheren T-Helfer-Zellen weitergehend zu beschreiben, wurde in dieser Arbeit untersucht, welche Faktoren der transkriptionellen Kontrolle des Liganden-unabhängig-aktivierten Notch3 Rezeptors in verschiedenen T-Helfer-Subsets unterliegen. Zudem sollte geklärt werden, welche dieser Faktoren abhängig und unabhängig von vorhandenen Polarisationsignalen in T-Helfer-Zellen reguliert werden. Mit Hilfe dieser Analysen sollte beantwortet werden, ob die Aktivierung des Notch3 Signalweges in nicht-polarisierten T-Helfer-Zellen ( $T_H0$ ) zu einer spezifischen Polarisation, in Richtung  $T_H1$ -,  $T_H2$ -, oder  $T_H17$ -Zellen, führt. Außerdem sollte erforscht werden, welchen Einfluss die Aktivierung des Notch Signalwegs auf das Genexpressionsprofil in den unterschiedlich polarisierten Subsets hat.

## **5.2. Notch Modulation naïver T-Helfer-Zellen führt zu einem atypischen Expressionsprofil von Zytokinen und Transkriptionsfaktoren, die keine eindeutige $T_H1$ -, $T_H2$ -, oder $T_H17$ -Polarisierung aufweisen.**

Bei der quantitativen Auswertung konnte zunächst gezeigt werden (Kapitel 4.1.1, Abb. 13), dass es umso mehr differentiell exprimierte Transkripte im Vergleich zweier Zellpopulationen gibt, desto stärker sich die Differenzierungssignale, unter denen die Zellen kultiviert wurden, voneinander unterscheiden (verwendete Zytokinsignale der verschiedenen Kulturbedingungen, siehe Kapitel 3.2). Die Betrachtung von Transkripten, die in Notch modulierten  $T_H0$ -Zellen (Vergleich 1) mit  $T_H1$ - (Vergleich 2),  $T_H2$ - (Vergleich 3) und/oder  $T_H17$ - (Vergleich 4) Zellen gleich reguliert sind, ergab, dass es die größte Überlappung mit  $T_H17$ -Zellen gibt (Kapitel 4.1.1, Abb. 15 C), gemessen an der absoluten Zahl differentiell regulierter Transkripte. Dementsprechend ist auch der Anteil der gleich regulierten Transkripte (Kapitel 4.1.1, Abb. 15 A) zwischen Notch modulierten  $T_H0$ -Zellen und  $T_H17$ -Zellen, bezogen auf die Gesamtmenge in  $T_H0$ -Zellen regulierter Transkripte am größten. Bezieht man jedoch die Anzahl differentiell gleich regulierter Transkripte zwischen Notch modulierten  $T_H0$ -Zellen und den verschiedenen Subsets ( $T_H1$ ,  $T_H2$ ,  $T_H17$ ) auf die Menge differentiell regulierter Transkripte in den jeweiligen Subsets (Kapitel 4.1.1., Abb. 15

B), so ist der Anteil der Überlappung mit T<sub>H</sub>1-Zellen am größten. Da diese Betrachtung auch differentiell exprimierte Transkripte einschloss, die beispielsweise in T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2-polarisierten Zellen und Notch modulierten T<sub>H</sub>0-Zellen gleich reguliert sind, und sich daher nicht eignen eine eindeutige Polarisierung Notch modulierter T<sub>H</sub>0-Zellen in Richtung von T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2-, oder T<sub>H</sub>17-Zellen zu bestimmen, wurden im nächsten Schritt ausschließlich Transkripte betrachtet, die nur in einem der untersuchten Subsets (T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>17) auf die gleiche Weise reguliert waren, wie in Notch modulierten T<sub>H</sub>0-Zellen (Kapitel 4.1.1., Abb. 16). Diese Analyse zeigt, dass die Mehrzahl der Transkripte, die durch Notch in T<sub>H</sub>0-Zellen moduliert werden, auch in T<sub>H</sub>1 polarisierten Zellen zu finden ist. Lediglich die stark differentiell exprimierten Transkripte (FC > 3,0) sind stärker mit einer T<sub>H</sub>17-Polarisierung der Zellen assoziiert. Aus diesen quantitativen Analysen konnte gefolgert werden, dass die Aktivierung des Notch Signalweges keine präferentielle Polarisierung naiver T-Helfer-Zellen in Richtung T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2-, oder T<sub>H</sub>17-Zellen zur Folge hat. Um diese Schlussfolgerung auch qualitativ unterstützen zu können, wurden anschließend gezielt verschiedene Zytokine und Transkriptionsfaktoren betrachtet für die eine Subset-spezifische Expression zu erwarten war (Kapitel 4.1.2, Abb. 17 und Kapitel 4.1.3, Abb. 18).

Insbesondere die Analyse der Schlüsseltranskriptionsfaktoren zeigte, dass die Aktivierung des Notch Signalweges in T<sub>H</sub>0-Zellen, die Expression von Tbet (T<sub>H</sub>1), Gata3 (T<sub>H</sub>2) und RoRγT (T<sub>H</sub>17) nicht beeinflusst (Kapitel 4.1.3, Abb. 18). Dahingegen ergab die Auswertung der transkriptionellen Expression der Zytokine, dass IL-10 (T<sub>H</sub>2 und regulatorische T-Zellen), IL-17A und IL-22 (T<sub>H</sub>17) stärker und IFN-γ (T<sub>H</sub>1), TNF-α (T<sub>H</sub>1), IL-13 (T<sub>H</sub>2), IL-9 (T<sub>H</sub>9) und TGF-β (regulatorische T-Zellen) schwächer in Notch modulierten T<sub>H</sub>0-Zellen exprimiert waren, als in nicht modulierten T<sub>H</sub>0-Zellen (Kapitel 4.1.2, Abb. 17). Bezüglich der Transkriptionsfaktoren konnte festgestellt werden, dass c-Maf (T<sub>H</sub>2), FoxP3 (T<sub>Reg</sub>), Blimp-1 (terminaldifferenzierte T-Zellen) und AhR (T<sub>Reg</sub> und T<sub>H</sub>17) in den Notch modulierten T<sub>H</sub>0-Zellen stärker und Nfat5 schwächer exprimiert waren im Vergleich zu den Kontrollen (Kapitel 4.1.3, Abb. 18). Durch diese Kombination der quantitativen und qualitativen Analyse Notch modulierter T<sub>H</sub>0-Zellen konnte gefolgert werden, dass die Aktivierung des Notch Signalweges in T<sub>H</sub>0-Zellen nicht ausreichend ist, um ein T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2-, oder T<sub>H</sub>17-spezifisches Expressionsprofil zu induzieren. Vielmehr wird der Effekt der Notch Modulierung durch vorhandene Ko-Stimuli beeinflusst, weshalb in der Folge der Einfluss der Notch Modulierung innerhalb der betrachteten T-Helfer-Subsets (T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>17) eingehender untersucht wurde.

### **5.3. Die Notch Modulation von T-Helfer-Zellen wird maßgeblich durch die vorhandenen Umgebungssignale bestimmt.**

Es konnte gezeigt werden (Kapitel 4.1.4, Abb. 19 und Kapitel 4.1.5, Abb. 20), dass, sowohl quantitativ, als auch qualitativ, die mit der Aktivierung des Notch Signalwegs einhergehende Änderung des Expressionsprofils stark von den vorhandenen Umgebungssignalen abhängt. Lediglich 5 %, der modulierten Transkripte wurden unabhängig von den Polarisierungssignalen innerhalb der verschiedenen Kulturen direkt durch den Notch Signalweg reguliert (Kapitel 4.1.4, Abb. 19 Gruppe IV), wohingegen über 50 % der Transkripte in nur einem Subset reguliert waren (Kapitel 4.1.4, Abb. 19 Gruppe I). Somit sind für die Veränderungen der Notch modulierten Transkriptome die vorhandenen Umgebungssignale maßgeblich, wie es bereits beschrieben werden konnte [53-55]. Die im vorangegangenen Kapitel (Kapitel 5.2) diskutierte Rolle der Notch Modulation von  $T_H0$ -Zellen unterstreicht, dass die Aktivierung des Notch Signalweges nicht zur präferentiellen Induktion eines  $T_H1$ -,  $T_H2$ -, oder  $T_H17$ -spezifischen Transkriptionsmusters in naiven T-Helfer-Zellen führt. Welchen Einfluss aber hat die Notch Modulation auf das Expressionsprofil der unterschiedlichen Subsets? In der Folge wird die Subset-spezifische Transkriptionsmodulation durch den Notch Signalweg in  $T_H1$ -,  $T_H2$ - und  $T_H17$ -Zellen näher diskutiert.

#### **5.3.1. Notch Modulation von $T_H1$ -Zellen**

Dass die Notch Aktivierung zu einer Steigerung der IL-10 Proteinexpression in nicht-polarisierten-,  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Zellen führt [53] und somit, vor allem in  $T_H1$ -Zellen, zur IL-10 vermittelten Selbstlimitierung der Immunantwort beiträgt [52] konnte bereits gezeigt werden. Übereinstimmend mit den in diesen Arbeiten [52, 53] beschriebenen Ergebnissen, sehen wir ebenfalls eine starke Steigerung der IL-10 mRNA-Expression in  $T_H1$ -Zellen. Zusätzlich konnten in den hier durchgeführten Versuchen eine Notch vermittelte Steigerung der IL-10 mRNA-Expression in  $T_H0$ - und  $T_H17$ -Zellen dokumentiert werden. Auf mRNA-Ebene konnte jedoch keine Steigerung der IL-10 Expression in  $T_H2$ -Zellen festgestellt werden, wie sie zuvor für die Protein-Expression dokumentiert wurde, was vermuten lässt, dass in  $T_H2$ -Zellen der Notch Signalweg zu einer post-translationalen Steigerung, bzw. Stabilisierung der IL-10 Expression beiträgt. Des Weiteren führt die Aktivierung des Notch Signalweges in  $T_H1$ -Zellen zur Expressionssteigerung der Transkriptionsfaktoren, c-Maf, Blimp-1, STAT4 und AhR, und zur Induktion der IL-22 Expression. Diese Beobachtungen werden in den Kapiteln 5.4 und 5.6 eingehender diskutiert.

### 5.3.2. Notch Modulation von T<sub>H</sub>2-Zellen

Die Reduktion der IL-13 Expression wurde *in vivo* in einem allergischen Asthmamodell mit der Aktivierung des Notch Signalweges korreliert [156]. Diese Arbeit zeigt, dass die *in vitro* Behandlung dendritischer Zellen mit rekombinantem Delta-like-4 zur Induktion der Notch-Liganden Expression von Jagged1, Delta-like-1 und Delta-like-4 in diesen Zellen führt. Werden diese Zellen dann zusammen mit T-Helfer-Zellen in einem OVA-spezifischen allergenen Asthmamodell transferiert, so zeigte sich ein signifikanter Rückgang der IL-13 Konzentration in der Lungenflüssigkeit der Rezipienten, verglichen mit Mäusen denen dendritische Zellen ohne vorherige Delta-like-4 Behandlung verabreicht wurden [156]. Diese dokumentierte Korrelation deckt sich mit den hier durchgeführten Experimenten, die zeigen, dass die intrazelluläre Domäne von Notch3 zur Reduktion der IL-13 Transkription in T<sub>H</sub>0-, T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen führt (Kapitel 4.1.2, Abb. 17). Die Notch3 vermittelte Reduktion von IL-13 sollte auf jeden Fall innerhalb eines T<sub>H</sub>2-spezifischen T-Zell-Modells eingehender untersucht werden, um die Möglichkeiten der Notch-vermittelten Immunmodulation von T<sub>H</sub>2-Zellen genauer beschreiben zu können. Im Zuge dessen könnte auch die zuvor beschriebene Notch-vermittelte Repression der IL-5 Expression in T<sub>H</sub>2-Zellen [157], die in den hier durchgeführten Experimenten auf mRNA-Ebene bestätigt werden konnte, eingehender analysiert werden.

### 5.3.3. Notch Modulation von T<sub>H</sub>17-Zellen

Die Steigerung der mRNA Expression von IL-17A und IL-22 in Notch modulierten T<sub>H</sub>0-Zellen befindet sich im Einklang mit den in der Literatur beschriebenen Beobachtungen. Für die Proteinexpression von IL-17A konnte bereits in T<sub>H</sub>0- und T<sub>H</sub>17-Zellen eine Abhängigkeit von der Aktivierung der intrazellulären Domäne von Notch1 gezeigt werden [153]. Diese Arbeit zeigte ebenfalls eine Abhängigkeit der IL-22 Proteinexpression in T<sub>H</sub>17-Zellen von einem aktiven Notch1 Signal. Ferner wurde in ChIP-Experimenten in humanen CD4<sup>+</sup> Zellen verdeutlicht, dass die intrazelluläre Domäne von Notch1 sowohl innerhalb des RoRγT-, als auch innerhalb des IL-17-Promotors bindet. Darüber hinaus konnte in einem Luziferase Assay eine direkte Steigerung der IL-17 Reporteraktivität durch die intrazelluläre Domäne von Notch1 gezeigt werden. In den hier durchgeführten Experimenten konnte auf mRNA-Ebene lediglich eine Steigerung der IL-17A mRNA Expression in T<sub>H</sub>0-Zellen und eine polarisationsunabhängige Steigerung der IL-22 mRNA Expression (Kapitel 4.1.2, Abb. 17) festgestellt werden, wohingegen die RoRγT mRNA Expression nicht durch Aktivierung der intrazellulären Domäne von Notch3 verändert werden konnte (Kapitel 4.1.3, Abb. 18). Da in dieser Arbeit jedoch auch eine gesteigerte IL-17 Proteinexpression vermittelt durch die intrazelluläre Domäne von Notch3 in T<sub>H</sub>17-Zellen gezeigt werden konnte (Kapitel 4.7.1, Abb. 43 und 44), liegt die Vermutung nahe, dass es sowohl redundante als auch diskrete

Effekte gibt, die durch die verschiedenen Notch Rezeptoren, auf transkriptioneller und post-translationaler Ebene, vermittelt werden. Hinzu kommt, dass die beschriebenen ChIP-, und Reporter Assay Experimente in humanen Zellen durchgeführt wurden [153], sodass diese Systeme, trotz evolutionärer Konservierung des Notch Signalweges, nicht ohne Weiteres eins zu eins miteinander verglichen werden können.

#### 5.3.4. T<sub>H</sub>9-Zellen

Bezüglich IL-9, dem Signaturzytokin von T<sub>H</sub>9-Zellen ist eine direkte Abhängigkeit vom Notch Signalweg beschrieben. An Hand von ChIP-Experimenten und einem Luziferase Assay konnte gezeigt werden, dass es einen synergistischen Effekt zwischen NICD1, Rbpjk und Smad3, aktiviert von TGF- $\beta$ , gibt, der dazu beiträgt die Expression von IL-9 in T-Helfer-Zellen zu verstärken [152]. Dass wir in den hier durchgeführten Experimenten eine starke Reduktion der IL-9 Transkription in T<sub>H</sub>0- und T<sub>H</sub>2-Zellen und keine Veränderung in T<sub>H</sub>17-Zellen sehen, wenn diese durch die intrazelluläre Domäne von Notch3 moduliert wurden (Kapitel 4.1.2, Abb. 17), könnte auf die unterschiedlichen Stimulationen der Zellen zurückzuführen sein. Zum einen unterscheiden sich die verwendeten Polarisationsbedingungen für T<sub>H</sub>2- und T<sub>H</sub>17-Zellen, bzw. fehlt ein Vergleich mit nicht-polarisierten T-Helfer-Zellen [152] und zum anderen wurde in den hier durchgeführten Experimenten lediglich der Einfluss auf die Notch modulierte Transkription betrachtet, nicht jedoch eine Veränderung der IL-9 Proteinexpression. Für die weitere Untersuchung des Einflusses, der Notch Modulation, auf die IL-9 Produktion in T-Helfer-Zellen wäre es interessant zu analysieren, ob verschiedene Notch Rezeptoren die mRNA- und Proteinexpression von IL-9, bzw. die Sekretion des Proteins unterschiedlich beeinflussen. Von besonderem Interesse ist die Frage, ob Notch in Verbindung mit TGF- $\beta$  in der Lage ist, auch in Stat6 defizienten Zellen, die IL-9 Expression zu induzieren [158], da STAT6 als essentiell für die IL-9 Expression beschrieben wurde.

#### 5.3.5. T<sub>Reg</sub>

Neben T<sub>H</sub>9-Zellen ist auch in regulatorischen T-Helfer-Zellen ein Crosstalk zwischen Notch1 und TGF- $\beta$  beschrieben. Es wurde gezeigt, dass bei GSI vermittelter Blockade des kanonischen Notch Signalweges es zu einer signifikanten Verringerung der Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Helfer-Zellen in der Peripherie kommt [16]. Des Weiteren ist beschrieben, dass Jag2 zu einer Notch3 abhängigen Expansion von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>-T-Zellen führt, wie in einem NOD-Maus-Modell (NOD - non-obese diabetic) gezeigt werden konnte. Die hier dokumentierte Anhebung der Foxp3 (Kapitel 4.1.3, Abb. 16) Transkription in Notch3 modulierten T<sub>H</sub>0-Zellen wirft die Frage auf, ob Notch unter neutralen Bedingungen T<sub>Reg</sub>s induzieren kann, und ob dies durch zusätzliche Gabe von TGF- $\beta$  verstärkt werden kann. Ein

interessanter Ansatz hierbei wäre die Überexpression der intrazellulären Domäne von Notch3 in  $T_H0$ -Zellen mit und ohne rekombinantem TGF- $\beta$ , bzw. die Überexpression in naiven T-Helfer-Zellen unter  $T_{Reg}$ -polarisierenden Bedingungen.

### 5.4. Multilaterale Signalintegration in T-Helfer-Zellen durch den Notch Signalweg

Die Expressionsanalyse Notch modulierter T-Helfer-Zellen zeigt, dass es sowohl Faktoren gibt, die direkt durch Aktivierung des kanonischen Notch Signalweges verstärkt exprimiert werden, wie IL-22 (Kapitel 4.1.2, Abb. 17) und Blimp-1 (Kapitel 4.1.3, Abb. 18), als auch Faktoren, die nur unter bestimmten kostimulatorischen Bedingungen durch den Notch Signalweg verstärkt werden, wie beispielsweise IL-10 (Kapitel 4.1.2, Abb. 17, verstärkt exprimiert in Notch modulierten  $T_H0$ -,  $T_H1$ - und  $T_H17$ -Zellen). Auch bei den direkten Zielgenen des Notch Signalweges (am Beispiel von IL-22 und Blimp-1) zeigt sich, dass diese unterschiedlich stark, in Abhängigkeit der vorhandenen Kostimuli, transkribiert werden, was auf einen kooperativen Effekt mit anderen Faktoren hindeutet.

Der evolutionär konservierte Notch Signalweg, der sowohl in Fruchtliegen, als auch in höheren Lebewesen, wie dem Menschen, zu finden ist, wurde bereits in etlichen Publikationen eingehend beschrieben. Obgleich die, durch Zell-Zell-Kontakt ausgelöste, Signalgebung des kanonischen Notch Signalweges linear und ohne Amplifikation verläuft und somit einem simplen Mechanismus (Kapitel 1.1, Abb. 1) folgt, ist die Auswirkung der Aktivierung des Signalweges auf das Genexpressionsprofil einer Zelle äußerst komplex, da die Transkription von Genen auf mehreren Ebenen reguliert wird [87, 155]. Dies resultiert zum Einen daraus, dass die Aktivierung von Rbpjk zur Aufhebung der Repression dieses Faktors führt [159, 160] und zum Anderen daraus, dass Notch die Transkription einer Gruppe von bHLH-(basic-Helix-Loop-Helix)-Faktoren induziert, die ihrerseits die Expression von Genen an anderer Stelle reprimieren können [154]. Darüber hinaus sind eine Vielzahl von Interaktionen zwischen dem Notch Signalweg mit weiteren Signalwegen der Zelle beschrieben [87]. Bezüglich der beschriebenen Interaktionen sind vor allem der Crosstalk von Notch mit Nfkb [161], Wnt/Tcf [109, 155, 162] und STATs [53, 163] in T-Helfer-Zellen von besonderer Bedeutung.

Notch1 und Nfkb sind entscheidende Transkriptionsfaktoren bei der Entstehung von Lymphomen. Sowohl Notch1, als auch Nfkb sind in der Lage die Expression des bHLH-Faktors Hes1 zu induzieren. Hes1 wiederum führt zur Repression der Cyld Expression. Bei Cyld handelt es sich um eine Deubiquitinase [164], die die aktivierenden Ubiquitinreste entfernt, die an Nfkb gebunden sind. Somit führt Hes1 zur transkriptionellen Repression der Cyld Expression, was zur Folge hat, dass die Ubiquitin vermittelte

Aktivierung von NfκB nicht mehr ausreichend durch die Deubiquitinase Cyld reguliert werden kann, wodurch es zur Hyperaktivierung des NfκB Signalweges kommt. In einem murinen Tumortransplantationsmodell konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der intrazellulären Domäne von Notch1 in Zellen des Knochenmarks zur Entstehung von Lymphomen (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Zellen) führt, die nach Transfer in bestrahlte Rezipienten, im Blut und im Knochenmark dieser akkumulieren. Die Entstehung und Akkumulation dieser Zellen konnte sowohl durch Knock-down von Hes1, als auch durch Überexpression von Cyld unterbunden werden. Des Weiteren wurde in einem Reporter Assay gezeigt, dass Hes1 direkt an den Cyld Promotor bindet und dadurch die Expression von Cyld gehemmt wird [161]. Diese Experimente heben den weitreichenden Effekt der Repression von Genen durch die Notch induzierten bHLH-Faktoren hervor [154], wie hier [161] am Beispiel von Hes1 gezeigt werden konnte. Darüber hinaus wird an Hand der Interaktion zwischen dem Notch und NfκB Signalweges gezeigt, wie die Aktivierung des Notch Signalweges zur Amplifikation eines weiteren Signalweges führen kann.

Im Gegensatz dazu werden der Wnt- und Notch Signalweg, die eingehend als Regulatoren der Somitogenese beschrieben sind, reziprok aktiviert, wobei es zu einer oszillierenden Expression ihrer Zielgene kommt [155]. Durch Aktivierung des Wnt Signalweges wird die Phosphorylierung von β-Catenin und dadurch die sukzessive Degradierung des Proteins durch das Proteasom verhindert. Diese Degradierung wird wiederum durch das Anschalten des Notch Signalweges begünstigt. Für die β-Catenin abhängige Transkriptionsaktivierung ist Tcf1 ein entscheidender Faktor [109]. Tcf1 wiederum wird durch Notch1 Aktivierung, induziert durch Delta-like-1, verstärkt exprimiert, wie Mittels Tcf1 defizienten Mäusen festgestellt werden konnte [162]. In dieser Studie wurde ferner mit Hilfe der EMSA-(Electromobility shift assay)-Methode gezeigt, dass Rbpjk direkt an Tcf1 bindet, und dass durch ein aktives Notch Signal die Expression von Tcf1 angeschaltet wird. Tcf1 wiederum führt zur Repression des Notch Signalweges, sodass eine reziproke Regulation des Wnt- und Notch Signalweges gesichert ist [165].

STAT-(signal transducers and activators of transcription)-Moleküle sind essentiell für die Signalweiterleitung aktivierter Zytokinrezeptoren in Zellen des Immunsystems [166]. Bezüglich der Interaktion von STATs und dem Notch Signalweg konnte in STAT4 defizienten T<sub>H</sub>1-Zellen gezeigt werden, dass die Notch induzierte Steigerung der IL-10 Expression in Abwesenheit von STAT4 aufgehoben ist. Wobei es keinen Unterschied machte, ob eine IL-12, oder IL-27 vermittelte Aktivierung von STAT4 vorlag [53]. Eine weitere Studie belegt, dass die Suppression der endogenen Hes1 Expression zu einer Reduktion von phosphoryliertem STAT3 führt. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Hes1 direkt mit dem STAT3-phosphorylierenden Enzym Jak2 und STAT3 wechselwirkt und somit die

Phosphorylierung begünstigt [163]. In den hier durchgeführten Experimenten sehen wir, vor allem für STAT4, dass Notch die Transkription dieses Faktors in allen untersuchten T-Helfer-Subsets begünstigt (Kapitel 4.1.3, Abb. 18). Die unterschiedlichen Herangehensweisen machen deutlich, dass auch im Falle der Interaktion zwischen STATs und dem Notch Signalweg eine Wechselwirkung auf verschiedenen Ebenen stattfinden kann.

Die Komplexität des Notch Signalwegs wird weiterhin dadurch gesteigert, dass gezeigt werden konnte, dass neben der *trans*-Aktivierung von Notch durch seine Liganden auch eine *cis*-Inhibition des Signalweges stattfindet, wenn der Rezeptor und ein Ligand von derselben Zelle exprimiert werden [167]. Des Weiteren erfährt Rbpjk, das DNA-bindende Response Element des kanonischen Notch Signalweges, Notch abhängige und unabhängige Aktivierung [168]. Da die reine Betrachtung der differentiellen Transkription Hinweise bietet, jedoch keine Rückschlüsse ermöglicht, wie der Notch Signalweg die verschiedenen Faktoren im Einzelnen moduliert, konzentrierte sich der weiterführende Verlauf dieser Arbeit darauf, wie Notch die Expression von IL-10 in T<sub>H</sub>1-Zellen, und IL-22 in T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>17-, und T<sub>H</sub>22-Zellen beeinflusst.

### **5.5. Mit IL-10 Expression assoziierte Transkriptionsfaktoren in Notch modulierten T<sub>H</sub>1-Zellen.**

Einer der identifizierten Faktoren, die durch Notch, vor allem in T<sub>H</sub>1-Zellen, hochreguliert wird, ist das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 (Kapitel 4.1.2, Abb. 17). Dass dies präferentiell in T<sub>H</sub>1-Zellen geschieht, ist der Aktivierung des STAT4-Signalweges geschuldet, wie bereits beschrieben werden konnte [53], dennoch exprimieren nicht alle Notch modulierten T<sub>H</sub>1-Zellen IL-10 (Kapitel 4.2, Abb. 21), weshalb die Notch vermittelte Steigerung der IL-10 Expression gesondert in IL-10 sortierten Zellen betrachtet wurde (Kapitel 4.2). Hierbei wurden sieben Transkriptionsfaktoren identifiziert, die ein IL-10-ähnliches Expressionsprofil haben (Kapitel 4.2). Die identifizierten Transkriptionsfaktoren sind c-Maf, Blimp-1, Evi1, Fli1, Ets2, Satb1 und Tcf7. Vor allem für c-Maf, ist in den unterschiedlichen Zellpopulationen des hämatopoetischen Systems bereits beschrieben, dass die IL-10 Expression durch diesen Faktor verstärkt wird [32].

#### **5.5.1. c-Maf**

Der Transkriptionsfaktor c-Maf wurde ursprünglich als einer der Schlüsselfaktoren in T<sub>H</sub>2-Zellen beschrieben, der für die Regulation von IL-4 verantwortlich ist [85, 169]. Für diesen Zelltyp konnte jedoch keine Abhängigkeit der IL-10 Expression von diesem Faktor nachgewiesen werden. In anderen Zellpopulationen des hämatopoetischen Systems konnte gezeigt werden, dass die Expression von IL-10 von c-Maf abhängig ist. Dies gilt für Myeloma

Zellen [170], Makrophagen [104, 171], T<sub>R</sub>1-Zellen, AhR-abhängig [83], und -unabhängig [105] und T<sub>H</sub>17-Zellen [106]. Hier konnte gezeigt werden, dass c-Maf auch direkt die Expression von IL-10 in T<sub>H</sub>1-Zellen steigert (Kapitel 4.3 und 4.4) und die Erhöhung der IL-10 Expression kein Resultat einer unterdrückten T<sub>H</sub>1 Polarisierung ist, wie sie auch in der Literatur beschrieben wurde [85]. Obwohl die Expression des Transkriptionsfaktors Tbet, der essentiell für die T<sub>H</sub>1 Polarisierung ist, durch die Notch Modulation in T<sub>H</sub>1-Zellen signifikant gesenkt wird (Kapitel 4.1.3, Abb. 18), zeigten die untersuchten T<sub>H</sub>1-Zellen keine Verringerung der Expression von IFN- $\gamma$  (Kapitel 4.1.2, Abb. 17), was als T<sub>H</sub>1 Schlüsselzytokin beschrieben ist. Was ebenfalls dafür spricht, dass es sich nicht um eine Polarisationsumkehrung von T<sub>H</sub>1- zu T<sub>H</sub>2-Zellen handelt, ist die Beobachtung, dass in den IL-10 sortierten Zellen Tbet in der IL-10 positiven Fraktion signifikant höher exprimiert wird, als in der negativen Fraktion. Würde in den Notch modulierten T<sub>H</sub>1-Zellen die erhöhte Expression von c-Maf zu einer Reduktion der Tbet Expression führen und somit eine T<sub>H</sub>2 Polarisierung begünstigen und sukzessive die Expression von IL-10 steigern, so würde man eine schwächere Expression von Tbet in den IL-10 positiven Zellen erwarten (Anhang II und V). Außerdem konnten wir zeigen, dass c-Maf direkt die Expression von IL-10 in T<sub>H</sub>1-Zellen steigert (Kapitel 4.4, Abb. 31) und dies keinen Einfluss auf die IFN- $\gamma$  Expression hat. Hinzu kommt, dass die Steigerung der c-Maf Expression keinerlei Einfluss auf die IL-4 (Kapitel 4.1.2, Abb. 17) und Gata3 (Kapitel 4.1.3, Abb. 18) Expression hat, was wiederum gegen einen T-Helfer-Subset-Switch von T<sub>H</sub>1- zu T<sub>H</sub>2-Zellen spricht.

### 5.5.2. Blimp-1

**B-Lymphocyte induced maturation protein 1** ist der transkriptionelle Schlüsselfaktor für die Entstehung von Plasmazellen. Plasmazellen sind spezialisierte, Antikörper sezernierende, terminal differenzierte B-Zellen, die einen wichtigen Bestandteil des Immunologischen Gedächtnisses darstellen [172, 173]. Neben der Bedeutung für die terminale Differenzierung in B-Zellen spielt Blimp-1 auch in T-Zellen zunehmend eine größere Rolle [78, 174-176]. Es konnte gezeigt werden, dass der Repressor Blimp-1 ebenfalls für die terminale Differenzierung von T-Helfer-Zellen verantwortlich ist [76, 77, 177]. Ein entscheidendes Zielgen, das reprimiert wird, ist das proliferationsfördernde Zytokin IL-2 [110, 113, 178]. Ferner ist beschrieben, dass Blimp-1 als Gegenspieler von Bcl-6 fungiert [76]. Bcl-6 wiederum ist der Schlüsseltranskriptionsfaktor folliculärer T-Helfer-Zellen (TFH) [75, 179], wie mittel Bcl6 defizienter T-Zellen gezeigt werden konnte [75]. Zudem war Bcl6 ausreichend, um TFH-Zellen zu induzieren. Dies konnte experimentell durch Überexpression dieses Faktors bestätigt werden [75], wodurch fast ausschließlich TFH-Zellen entstanden. Die reziproke Regulierung der Expression von Bcl-6 und Blimp-1 [76] ist entscheidend an der Differenzierung von Effektor-T-Helfer-Zellen [179] und regulatorischen Effektor-T-Zellen [107]

beteiligt. Eine starke Expression von Bcl-6 führt zur Repression von Blimp-1, wobei TFH-Zellen entstehen, die über eine erhöhte Proliferationskapazität verfügen, jedoch nur geringe Mengen an Zytokinen sekretieren [177]. Eine erhöhte Expression von Blimp-1 wiederum reprimiert die Expression von Bcl-6. Die hierbei entstehenden Zellen verfügen nur über eine sehr geringe Proliferationskapazität, wohingegen die Zytokin Sekretion erhöht ist [177]. Ausserdem konnte eine direkte Abhängigkeit der IL-10 Expression von Blimp-1 in zytotoxischen T-Zellen, mit Hilfe Blimp-1 defizienter Zellen, gezeigt werden [108].

Die Beobachtung, dass eine Erhöhung der Expression des Repressors Blimp-1 zu einer Erhöhung der IL-10 Expression in Notch modulierten T<sub>H</sub>1-Zellen führt, könnte dadurch erklärt werden, dass IL-10 durch einen weiteren Repressor reguliert wird, dessen Expression wiederum der Kontrolle von Blimp-1 unterliegt. Auch wenn dieser Repressor noch nicht identifiziert ist, so wurde diese Überlegung bereits in der Literatur diskutiert [78].

Hier konnte gezeigt werden, dass Notch und c-Maf die IL-10 Expression in T<sub>H</sub>1-Zellen, in Abhängigkeit von Blimp-1, steigern (Kapitel 4.4). Zusätzlich wurde in unserer Arbeitsgruppe in ChIP-Experimenten bestätigt, dass sowohl c-Maf, als auch Blimp-1 das murine IL-10-Gen, innerhalb der konservierten Region, binden. Ausserdem wurde in einem Luziferase Assay festgestellt, dass Blimp-1 und c-Maf kooperativ an den IL-10 Promotor binden und zu einer Erhöhung der IL-10 Expression führen. Dies spricht dafür, dass Blimp-1 nicht nur als Repressor, sondern auch als Aktivator, der Genexpression fungieren kann (Neumann et. al., submitted). Des Weiteren wird gezeigt, dass Blimp-1 nicht zu einer Reduktion der IFN- $\gamma$  Expression in T<sub>H</sub>1-Zellen führt (Neumann et. al., submitted). Dies steht im Widerspruch zu zuvor beschriebenen Arbeiten, die zeigen, dass die T<sub>H</sub>1 Differenzierung, durch Repression von Tbet und IFN- $\gamma$ , vermittelt durch Blimp-1, geschwächt wird. [180-182]. Auch diese Diskrepanz könnte dadurch erklärt werden, dass Blimp-1 nicht per Se als Repressor der Genexpression wirkt, sondern auch, in Abhängigkeit weiterer Faktoren wie c-Maf, als Aktivator fungieren kann.

In den hier durchgeführten Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von N3IZD zur Expressionssteigerung von Blimp-1 in allen untersuchten Subsets führte (Kapitel 4.1.3, Abb. 18), gegensätzlich hierzu ist jedoch auch beschrieben, dass T-Helfer-Zellen, die defizient für die Notch Rezeptoren 1 und 2 sind, vermehrt Blimp-1 exprimieren und dies dazu führte, dass weniger folliculäre T-Helfer-Zellen gebildet wurden. Im Zuge einer Infektion kam es in konditionellen Notch1/2<sup>-/-</sup> Tieren zu einer gestörten GC-(germinal center)-Bildung, was einen Abfall der gebildeten IgG1 Antikörpermenge zur Folge hatte [151], und auf einen Verlust der TFH-Zellen zurückgeführt wurde. Es wäre äußerst interessant, ob eine Überexpression der intrazellulären Domäne von Notch in naiven Notch1/2<sup>-/-</sup> Zellen den Verlust der Bildung von TFH-Zellen umkehren kann, um herauszufinden unter welchen Konditionen Notch zu einer Repression der Blimp-1 Expression führt. Außerdem sind weitere

Versuche notwendig, um feststellen zu können in wie weit die Aktivierung eines Notch Rezeptors, das Fehlen eines anderen kompensieren kann, um die verschiedenen und teils kontroversen Ergebnisse besser verstehen zu können.

### 5.5.3. Evi1

Evi1 ist ein ausführlich beschriebenes Onkogen hämatopoetischer Stammzellen, das in Verbindung mit dem Immunsystem vor Allem bei der Entstehung von Leukämie Erwähnung findet [183]. Interessanterweise ist für *C. elegans* das Evi1 Homolog Egl-43, als Ziel, Notch vermittelter Zelldifferenzierung, beschrieben [184]. Da Evi1 am stärksten in Notch modulierten IL-10 positiven Zellen exprimiert wird, war dieser Transkriptionsfaktor eines der interessantesten Zielgene für die Regulation der IL-10 Expression. Um die Rolle der Evi1 Expression auf IL-10 in Notch modulierten T<sub>H</sub>1-Zellen zu untersuchen haben wir zum einen versucht Evi1 mit Hilfe von siRNA auf Transkriptionsebene zu eliminieren, und zum anderen durch Klonierung in einen Retrovirus dieses Gen zu überexprimieren. Der siRNA vermittelte Knock-Out konnte hier nicht erfolgreich etabliert werden, jedoch zeigten weiterführende Experimente mit einem Evi-1 Überexpressionsplasmid, dass dies zu einer Erhöhung der IL-10 Expression in transfizierten Zellen führt (Dr. Katrin Neumann, AG Scheffold). Da der genetische Knock-Out von Evi1 embryonal letal ist [185], ist geplant diesen Transkriptionsfaktor in konditionellen Knock-Outs eingehender zu untersuchen.

### 5.5.4. Fli1

Friend leukemia integration-1 ist als ausführlich beschriebenes Onkogen des Ewing Sarkomas bekannt [186, 187]. Es gibt unterschiedliche Berichte zu Fli1, die mit Autoimmunerkrankungen zusammenhängen. Für die systemische Autoimmunerkrankung Lupus Erythematoses ist Fli1 als einer der Faktoren beschrieben, die zur deregulierten Entwicklung von Lymphozyten führt, wohingegen für die systemische Sklerose Fli1 Defizienz in Fibroblasten und Epithelzellen als maßgeblicher Auslöser für die histopathologische Ausprägung der Erkrankung aufgezeigt wird [188, 189]. Mit Hilfe von siRNA vermitteltem Knock-down des Fli1 Transkriptes konnte gezeigt werden, dass der Knock-down von Fli1 in Notch modulierten T<sub>H</sub>1-Zellen eine Reduktion der IL-10 Expression zur Folge hat (Kapitel 4.3.1, Abb. 27 D). Dieser Faktor wurde dennoch nicht näher betrachtet, da keine konservierte Bindungsstelle innerhalb des untersuchten Bereichs des IL-10-Promotors für Fli1 identifiziert werden konnte (Kapitel 4.2.3, Abb. 25). Ferner gelang es nicht Fli1 retroviral zu überexprimieren. Dennoch sollte der Transkriptionsfaktor in weiterführenden Versuchen, insbesondere in Verbindung mit Ets5, eingehender analysiert werden.

### 5.5.5. Etv5

Das **ets** variant gene **5** gehört zu einer der größten bekannten Transkriptionsfaktorfamilien. Diese Transkriptionsfaktoren sind beteiligt an der Regulation des Zellzyklus, der Proliferation von Zellen, der zellulären Differenzierung, der Migration, der Angiogenese, sowie der Apoptose [190]. In den Ewing Sarkomen treten die ETS Transkriptionsfaktoren häufig als Fusionsproteine in Verbindung mit Fli1 auf [187]. Weitere Fusionsproteine der ETS Familie sind für verschiedene Prostatakrebsarten beschrieben [191]. Außerdem wurde gezeigt, dass diese Familie der Transkriptionsfaktoren durch Modulation des Zytoskelett auch maßgeblich an der Entstehung von Metastasen beteiligt sind [192, 193]. Ferner steuern sie die embryonale Entwicklung der Arm- und Beinansätze, die neuronale Entwicklung, sowie die Spermatogenese [194-197]. Bezüglich der Spermatogenese konnte ebenfalls gezeigt werden, dass das Fehlen von Etv5 in den Testikeln zu einer erhöhten Inflammation führt, wenn in die Testikel Wildtypkeimzellen indiziert werden. Eine Erklärung hierfür ist die Überbrückung der Blut-Testikel-Barriere und somit eine Aufhebung der testikulären immunprivilegierten Zone [196]. Etv5 ist stark, insbesondere in der IL-10-positiven Fraktion, in Notch modulierten  $T_H1$ -Zellen exprimiert (Kapitel 4.2.2, Abb. 23). Bezüglich der IL-10 Expression in diesen Zellen könnte die Ko-regulation von Etv5 mit Fli1 von besonderem Interesse sein. Durch siRNA vermittelten Knock-Down konnte die Frage der Abhängigkeit der IL-10 Expression von Etv5 in Notch modulierten  $T_H1$ -Zellen nicht abschließend geklärt werden, da die Behandlung mit der spezifischen siRNA zu einer starken Reduktion der Überlebensrate der Zellen führte. Auch die Überexpression innerhalb eines retroviralen Vektors gelang nicht.

### 5.5.6. Satb1

Das **S**pecial **AT**-rich sequence **b**inding protein **1** ist ein in T-Zellen stark exprimierter Transkriptionsfaktor, der für die Organisation und die Zugänglichkeit des Chromatins von entscheidender Bedeutung ist und starken Einfluss auf die T-Zell Entwicklung hat [198-203]. Neben der transkriptionellen Kontrolle spielen vor allem post-translationalen Modifikationen des Proteins eine wichtige Rolle bei der Regulation der Chromatin Remodulierung durch diesen Faktor [202]. Insbesondere in  $T_H2$ -Zellen reguliert Satb1 die Expression der spezifischen Zytokine des IL-4 Lokus durch Rekrutierung der Transkriptionsfaktoren c-Maf, STAT6 und Gata-3 [199, 204]. Besonders interessant bezüglich der T-Zellentwicklung ist ein möglicher Crosstalk zwischen dem Notch- und Wnt-Signalweg, bei dem Satb1 eine entscheidende integrative Rolle spielen könnte [162, 205-209]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Satb1 und Foxp3 redundante Effekte für die Etablierung der transkriptionellen Signatur regulatorischer T-Helfer-Zellen haben, was mitverantwortlich für die Expression von IL-10 sein könnte [210]. Durch siRNA-vermittelten Knock-Down von Satb1 konnten wir

zeigen, dass dadurch eine Reduktion der IL-10 Expression in Notch modulierten T<sub>H</sub>1-Zellen erreicht werden kann (Kapitel 4.3.1, Abb. 27 C). Um zu untersuchen wie weitreichend der Effekt der Eliminierung von Satb1 in Notch modulierten T<sub>H</sub>1-Zellen ist, wäre es interessant in weiteren Versuchen die Transkriptome mit und ohne Satb1 Knock-Down in diesen Zellen zu untersuchen. Insbesondere post-translationale Histonmodifikationen, die für die Satb1 vermittelte Chromatin Remodulierung beschrieben sind erfordern detailliertere Analysen.

### 5.5.7. Tcf7

Der T-Zell-spezifische Transkriptionsfaktor Tcf7 ist einer der entscheidenden, Notch induzierten Faktoren während der frühen T-Zell-Entwicklung im Thymus. [162, 211-221]. Neben dem Notch Signalweg ist der Wnt Signalweg als Regulator der Tcf7 Expression ausführlich beschrieben [222-224]. In T-Helfer-Zellen der Peripherie wird die Entstehung von T<sub>H</sub>2-Zellen durch die Expression von Tcf7, was wiederum die Expression von GATA-3 fördert, begünstigt [205, 208, 225]. Ferner konnte in einer humanen Studie, der Tcf7 Gen Locus mit der Entstehung von Diabetes Typ I assoziiert werden [226]. Die Studien zur T-Zell-Entwicklung im Thymus und in der Peripherie zeigen, dass der Notch Signalweg zur Induktion von Tcf7 führt. Bei der, von T-Zellen ausgehenden, akuten lymphatischen Leukämie (T-ALL) könnte jedoch eine gegensätzliche Kausalität bestehen. Zum einen ist bekannt, dass über 50% der T-ALL Lymphome durch eine Hyperaktivierung des NOTCH1 Signalweges ausgelöst werden und zum anderen konnte gezeigt werden, dass T-Zellen von Tcf7-defizienten Mäusen einen T-ALL Phänotyp besitzen [227, 228]. Die akuten lymphatischen Lymphome sind deshalb von großem Interesse, da sie auch eine erhöhte Expression des immunsuppressiven Zytokins IL-10 haben [229]. Es wäre interessant sich anzuschauen, ob Tcf7 an das IL-10 Gen bindet, und ob eine Überexpression des Transkriptionsfaktors Tcf7 zu einer direkten Repression der IL-10 Expression führt.

### 5.6. Blimp-1 ist der limitierende Faktor der Notch und c-Maf vermittelten IL-10 Expression in T<sub>H</sub>1-Zellen.

Durch Überexpression von c-Maf und Notch konnte in Blimp-1 defizienten Zellen gezeigt werden, dass die erhöhte IL-10 Expression durch Blimp-1 limitiert wird (Kapitel 4.4). Die Transkriptionsfaktoren Notch und c-Maf führten auch in den Blimp-1 defizienten Zellen zu einer Erhöhung der IL-10 Expression, jedoch war das erreichte Expressionsniveau wesentlich niedriger, als in Blimp-1 kompetenten Zellen (Neumann et. al., submitted). Es stellt sich die Frage, ob ein initiales Notch Signal bei Induktion der Immunantwort [52], letztlich Blimp-1 vermittelt sicherstellt, dass eine Immunantwort terminiert werden kann, sodass es nicht zur Entstehung einer chronischen Reaktion kommt, bzw. eine autoimmune Reaktion vermieden wird. In weiterführenden Versuchen sollten zum einen Blimp-1 defiziente

und kompetente Zellen mit und ohne Notch Modulation eingehender in Transkriptomvergleich untersucht werden und zum anderen wäre interessant, ob auch die IL-10 Produktion, *in vivo* durch Notch induziert [52], in der Abwesenheit von Blimp-1 entfällt. Obwohl wir bereits zeigen konnten, dass Blimp-1 in Kooperation mit c-Maf zur Expressionssteigerung von IL-10 führt (Neumann et. al., submitted), sollte auch die Idee [78], dass Blimp-1 einen IL-10 Repressor reprimiert und somit die Expression von IL-10 ermöglicht, eingehender untersucht werden. Tcf7 wäre hierbei ein interessanter Kandidat (Kapitel 4.2).

### 5.7. Modulation der Stärke des T-Zell-Rezeptor Signals

Neben den beschriebenen Transkriptionsfaktoren, die zur Erhöhung der IL-10 Expression in verschiedenen Zellen des Hämatopoetischen Systems führen [32], wird auch die Stärke des TZR Signals, gemessen an der Aktivität des resultierenden Erk-Signals, als maßgeblicher Faktor diskutiert, der entscheidet, ob eine Immunzelle IL-10 exprimiert, oder nicht [41]. Wir konnten zeigen, dass die Aktivierung eines Notch Signals nicht zu einer Steigerung der TZR Stärke führt, bzw. Inhibierung der Erk-Phosphorylierung nicht durch Überexpression der intrazellulären Domäne von Notch3 kompensiert werden kann (Kapitel 4.5, Abb. 33). Diese Inhibition des Erk-Signals führt in unseren Versuchen zu einer Reduktion der IL-2 und IL-10 Expression in Notch modulierten T<sub>H</sub>1-Zellen (Kapitel 4.5, Abb. 35). Somit konnten wir zeigen, dass eine Abschwächung des TZR-Signals nicht zu einer exklusiven Verringerung der IL-10 Expression führt, wie sie zuvor beschrieben wurde [40], sondern auch für die IL-2 Expression von Bedeutung ist. Dass die Notch vermittelte Steigerung von IL-10 in T<sub>H</sub>1-Zellen von Blimp-1 abhängt wird weitergehend auch dadurch gestützt, dass IL-2 in diesen Zellen schwächer exprimiert wird, was ebenfalls auf eine Erhöhung der Blimp-1 Expression zurückzuführen ist [110], da dieser Effekt in Blimp-1 defizienten Zellen signifikant verringert ist (Kapitel 4.5.1, Abb. 36). Interessant in diesem Zusammenhang wäre es, sich den Einfluss der Erk-Aktivierung auf die Expression von c-Maf und Blimp-1 eingehender anzuschauen, da bereits eine positive Korrelation zwischen Erk-Aktivierung und c-Maf gemacht wurde [41](Neumann et. al., submitted).

### 5.8. Notch modulierte IL-10 und IL-22 Expression in Abhängigkeit von AhR

Ein weiteres Transkript, das wir genauer betrachtet haben ist der Arylhydrocarbon Rezeptor (AhR), der durch Notch in T<sub>H</sub>0-, T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>17-Zellen verstärkt exprimiert wird. Der AhR ist sowohl für die Regulation der IL-10, als auch der IL-22 Expression beschrieben [32].

IL-22 ist eines der am stärksten induzierten Gene in Notch modulierten T-Helfer-Zellen, unabhängig von der Polarisation. Besonders augenfällig war dies in den IL-10 sortierten Zellen. Sowohl in der IL-10 positiven, als auch in der IL-10 negativen Fraktion der Notch modulierten T<sub>H</sub>1-Zellen werden IL-22, AhR und Cyp1b1 (Zytochrom P450 Oxygenase eines der AhR Zielgene) exprimiert. Daher haben wir zunächst in T<sub>H</sub>1-Zellen die Abhängigkeit der IL-10 und IL-22 Expression von der AhR Aktivierung betrachtet (Kapitel 4.6). Die, durch Notch gesteigerte, IL-10 Expression in T<sub>H</sub>1-Zellen ist weitestgehend unabhängig von der Aktivierung des Arylhydrocarbon Rezeptors, was auch im Hinblick auf das Expressionsmuster von IL-10 und AhR zu erwarten war. Die IL-22 Proteinexpression war in Notch modulierten T<sub>H</sub>1-Zellen nur sehr schwach ausgeprägt und ohne Notch Modulierung nicht zu detektieren (Kapitel 4.6, Abb.40). In der Folge wurde die IL-22 Expression in T<sub>H</sub>17- und T<sub>H</sub>22-Zellen betrachtet (Kapitel 4.7). Zwar ist die Notch vermittelte Expressionssteigerung in T<sub>H</sub>17-Zellen geringer (Kapitel 4.6, Abb. 41) als in T<sub>H</sub>0- und T<sub>H</sub>1-Zellen, allerdings ist das absolute Expressionsniveau in T<sub>H</sub>17-Zellen am höchsten.

Es konnte gezeigt werden, dass die IL-22 Expression in Notch modulierten T<sub>H</sub>17- und T<sub>H</sub>22-Zellen durch die Anwesenheit des Arylhydrocarbon Rezeptors verstärkt wird (Kapitel 4.7, Abb. 43 u. Abb. 44), jedoch nicht vom Arylhydrocarbon Rezeptor abhängt. Hier wird deutlich, dass es durchaus einen synergistischen Effekt zwischen dem Notch Signalweg und dem Arylhydrocarbon Rezeptor gibt, die gemeinsam die IL-22 Expression regulieren. Zudem konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Notch induzierten IL-22 Expressionssteigerung in T<sub>H</sub>17- und T<sub>H</sub>22-Zellen um einen intrinsischen Effekt handelt, der in der Notch negativen Fraktion (GFP<sup>-</sup>) nicht vorhanden ist (Kapitel 4.7.2, Abb. 45). Dies steht im Widerspruch zu Arbeiten, in denen publiziert ist, dass, vermittelt durch den Notch Signalweg, ein sezernerter AhR-Ligand maßgeblich für die Sekretion von IL-22 ist [115]. Diese Arbeiten zeigen jedoch auch, dass es eine direkte Steigerung der IL-22 Expression durch den Notch Signalweg sowohl in T<sub>H</sub>0-, T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2-, als auch in T<sub>H</sub>17-Zellen gibt. Zudem wird in dieser Arbeit [115] lediglich die IL-22 mRNA-Expression, nicht aber die Proteinexpression auf Einzelzellebene betrachtet. So könnte es durchaus sein, dass eine optimale IL-22 Expression und Sekretion nur gewährleistet ist, wenn sowohl Notch, als auch AhR aktiv sind. Außerdem zeigen die Versuche [115], dass eine nähere Betrachtung der Interaktion von Notch und den aktivierten STAT-Signalen, wie STAT3 (eingeschaltet durch IL-6) und STAT3/4 (eingeschaltet durch IL-23) interessant wäre, da STAT3 defiziente Zellen nach Überaktivierung des Notch Signalweges weniger IL-22 produzieren, als die entsprechenden Kontrollen. Da bereits gezeigt werden konnte, dass STAT4 essentiell für die Notch vermittelte Regulation von IL-10 in T<sub>H</sub>1-Zellen ist [53], und dass die Aktivierung des Notch Signalweges zur Stabilisierung von STAT3 führt [163], liegt die Vermutung nahe, dass die IL-10 Expression in T<sub>H</sub>1-Zellen, und die IL-22 Expression in T<sub>H</sub>17- und T<sub>H</sub>22-Zellen, auf ähnliche Weise durch Notch stabilisiert

werden. So würde der Notch Signalweg in  $T_H1$ -Zellen präferentiell zur Intensivierung des STAT4 Signals führen, dadurch die c-Maf und Blimp-1 Expression verstärken, die wiederum eine Anhebung der IL-10 Expression zur Folge hat (Abb. 52), und in  $T_H17$ -Zellen zur Verstärkung des STAT3 Signals führen, wodurch die IL-22 Expression gesteigert, und die TGF- $\beta$  abhängige Repression von IL-22 [86] kompensiert wird (Abb. 53). Um dies eingehender untersuchen zu können, wäre es interessant die Notch vermittelte Expressionssteigerung von IL-22 in STAT3-, STAT4- und STAT3/STAT4-defizienten  $T_H17$ - und  $T_H22$ -Zellen zu betrachten. Auf diese Weise könnte analysiert werden, welchen Anteil ein STAT3, bzw. STAT4 Signal, an der Notch vermittelten IL-22 Expressionssteigerung in diesen Zellen, hat. Auch die Rolle von TGF- $\beta$  im Zusammenspiel mit Notch, aktivierten STAT-Signalen und dem Arylhydrocarbon Rezeptor für die Regulation der IL-17 und IL-22 Expression sollte eingehender untersucht werden. Für TGF- $\beta$  und Notch sind bereits kooperative Funktionen im Bereich der Zelldifferenzierung beschrieben [16, 230] und es gibt Arbeiten, die zeigen, dass die Stimulation von  $T_H17$ -Zellen mit TGF- $\beta$  zur c-Maf abhängigen Repression der IL-22 Expression führen [86]. Ein erster Ansatz um die transkriptionelle Regulation von IL-22 in Notch modulierten  $T_H17$ -Zellen besser verstehen zu können wurde in dieser Arbeit mit Hilfe eines Transkriptomvergleichs IL-22 sekretierender und nicht-sekretierender Zellen unternommen (Kapitel 4.8).

## 5.9. Starke Genexpressionsunterschiede zwischen Notch modulierten IL-22<sup>-</sup>- und IL-22<sup>+</sup>-T<sub>H</sub>17-Zellen

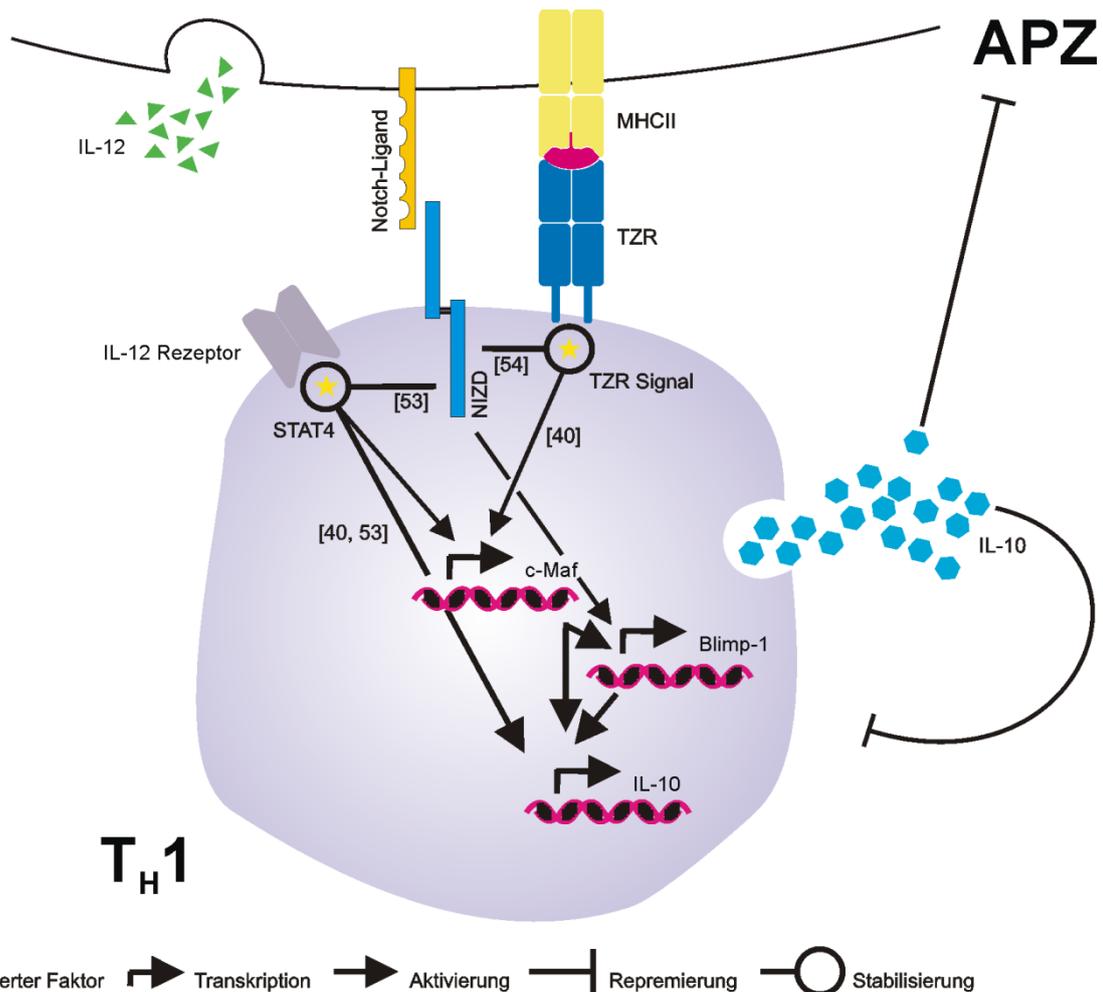
Letztendlich wurden die Unterschiede zwischen der IL-22-positiven, und IL-22-negativen Population innerhalb der Notch modulierten T<sub>H</sub>17-Zellen untersucht (Kapitel 4.8). Bei den vergleichenden Transkriptomanalysen IL-22<sup>+</sup> und IL-22<sup>-</sup> Notch modulierter T<sub>H</sub>17-Zellen konnten etliche Zytokine (Kapitel 4.8, Abb. 49), Oberflächenmoleküle (Kapitel 4.8, Abb. 50) und Transkriptionsfaktoren (Kapitel 4.8, Abb. 51) identifiziert werden, die in IL-22 positiven Zellen wesentlich stärker exprimiert sind. Diese könnten Aufschluss über mögliche Unterschiede der biologischen Relevanz IL-22 positiver und negativer Zellen geben. So würden IL-22 positive Zellen auf Grund der höheren Expression von CXCR6 wahrscheinlich früher das entzündete Gewebe erreichen [142, 143], als IL-22 negative Zellen. Hier könnte man mit Hilfe eines Homing-Assay nach Transfer dieser Zellen in verschiedenen Entzündungsmodellen schauen, inwieweit IL-22 sekretierende Notch modulierte T<sub>H</sub>17-Zellen pro-, bzw. anti-inflammatorisch wirken und wie sich diese im Vergleich zu nicht IL-22 sekretierenden Zellen verhalten. Auch die mit IL-22 zusammen exprimierten Zytokine IL-9, IL-13, IL-24 und IL-31, sowie die verschiedenen Granzyme (Kapitel 4.8, Abb. 49) sollten in weiterführenden Experimenten eingehender untersucht werden, um die IL-22<sup>+</sup> Notch modulierten T<sub>H</sub>17-Zellen besser charakterisieren zu können.

Ein weiteres Augenmerk lag auf den Transkriptionsfaktoren, die zusammen mit IL-22 exprimiert werden. Obwohl der Notch Signalweg in der Lage ist, die mRNA Expression von IL-22 in allen untersuchten T-Helfer-Zellen stark zu induzierenden (Kapitel 4.6, Abb. 41), so ist doch eine robuste IL-22 Proteinexpression auf Notch modulierte T<sub>H</sub>17-Zellen beschränkt. In Anlehnung an die Versuche mit IL-10 sekretierenden Notch modulierten T<sub>H</sub>1-Zellen, für die gezeigt werden konnte, dass die Expression von IL-10 von c-Maf und Blimp-1 abhängig ist (Kapitel 4.3 und 4.4), die kooperativ an den IL-10-Promotor binden (Neumann et. al., submitted), wurde ein ähnlicher Mechanismus für die Regulation der IL-22 Expression in Notch modulierten T<sub>H</sub>17-Zellen vermutet. Die Transkriptionsfaktoren Epas-1, Blimp-1 und Isl-1 wurden in der vergleichenden Transkriptomanalyse als mögliche Kandidaten für die Regulation der IL-22 Expression identifiziert (Kapitel 4.8, Abb. 51). Interessanter Weise werden die Zytokine IL-10 und IL-22 in der Regel nicht von Zellen koexprimiert [32], daher liegt die Vermutung nahe, dass beide Zytokine über einen Transkriptionsfaktor reziprok reguliert werden. Ferner ist bekannt, dass TGF-β in Abhängigkeit von c-Maf die Expression von IL-22 in T<sub>H</sub>17-Zellen reprimiert [86]. Zudem konnte gezeigt werden, dass auch die Blimp-1 Expression durch Stimulation mit TGF-β in T<sub>H</sub>1-Zellen reprimiert werden kann (Neumann et. al., submitted). Dementsprechend könnte ein reziproker Mechanismus für die Expression von IL-10 und IL-22 so aussehen, dass IL-10 kooperativ von c-Maf und Blimp-1

induziert wird, wohingegen IL-22 von Blimp-1 nur in Abwesenheit von c-Maf induziert werden kann. Zur weiteren Aufklärung des Mechanismus, wie IL-22 in T<sub>H</sub>17-Zellen reguliert wird, müssen die identifizierten Transkriptionsfaktoren in diesem Setting eingehender untersucht werden. Mittels CHIP-Experimenten könnte so gezeigt werden, ob Epas-1, Blimp-1 und Isl-1 einzeln, oder kooperativ an den IL-22-Promotor binden und dadurch zur Regulation der Genexpression beitragen. Auch die direkte Rolle des Notch Signalweges an der Genexpression von IL-22 in den unterschiedlichen T-Helfer-Subsets sollte mittels CHIP-Experimenten abschließend geklärt werden. Basierend auf den hier und in der Literatur beschriebenen Ergebnissen werden folgende Modelle für die Notch vermittelte Erhöhung der IL-10 Expression in T<sub>H</sub>1-Zellen (Abb. 52) und der IL-22 Expression in T<sub>H</sub>17-Zellen (Abb. 53) vorgeschlagen.

### **5.10. Die Notch vermittelte Signalintegration erhöht die IL-10 Expression in T<sub>H</sub>1-Zellen und IL-22 Expression in T<sub>H</sub>17-Zellen.**

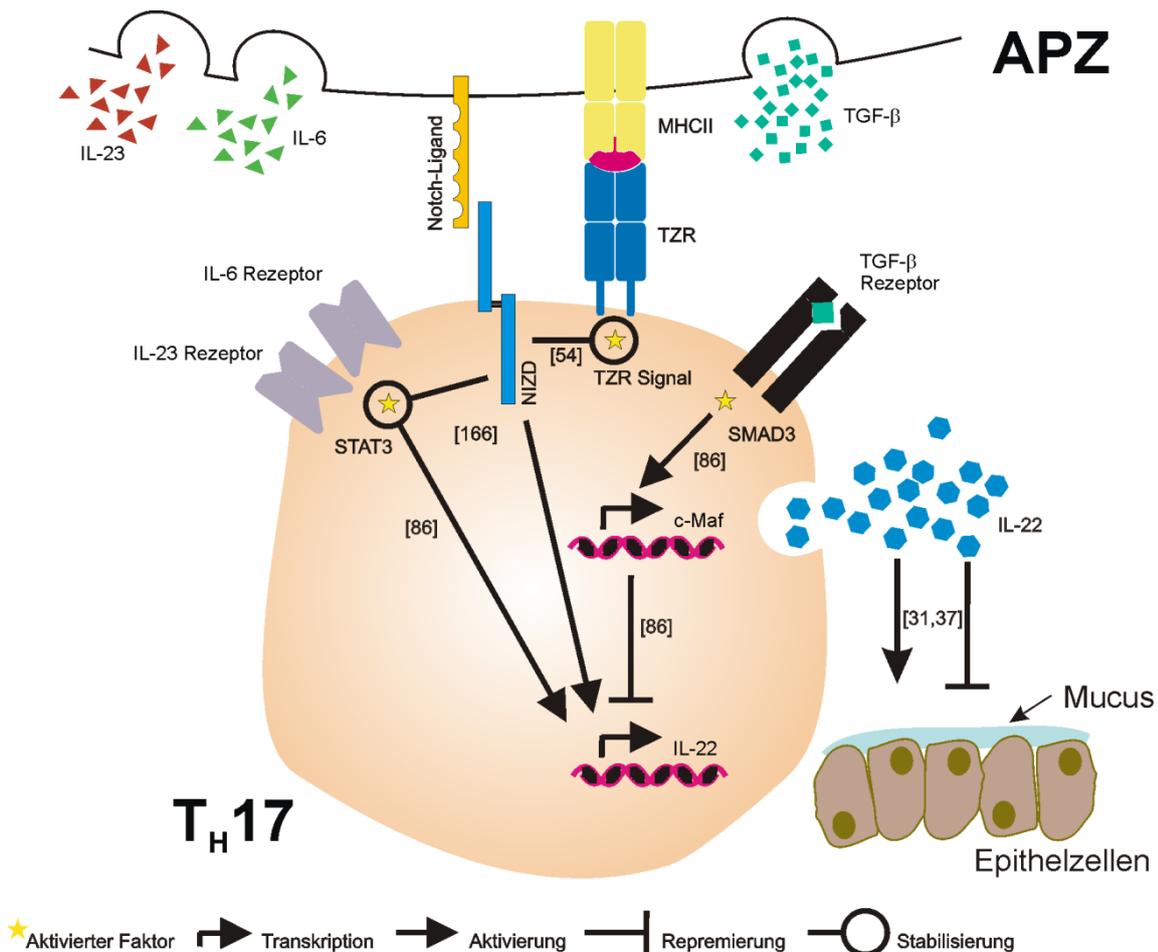
Durch Integration der vorhandenen Umgebungssignale trägt der Notch Signalweg grundsätzlich zur Stabilisierung der jeweiligen Polarisierung eines T-Helfer-Subsets bei [150]. Insbesondere für die Zytokine IL-10 in T<sub>H</sub>1-Zellen und IL-22 in T<sub>H</sub>17-Zellen konnte gezeigt werden, dass deren Expression maßgeblich durch ein aktives Notch Signal gesteigert wird.



**Abbildung 52**

Die Notch Modulation von  $T_H1$ -Zellen führt zur Induktion der Blimp-1-abhängigen, c-Maf vermittelten, Expressionssteigerung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10.

In  $T_H1$ -Zellen wird durch Einschalten des Notch Signalweges die Expression der Transkriptionsfaktoren c-Maf und Blimp-1 erhöht (Kapitel 4.2.1, Abb. 23) und diese Transkriptionsfaktoren regulieren, in der Folge kooperativ, die Expression von IL-10 in  $T_H1$ -Zellen (Abb. 52) (Neumann et. al., submitted). In diesen Arbeiten konnte für  $T_H1$ -Zellen gezeigt werden, dass die Überexpression sowohl von Notch, c-Maf, als auch Blimp-1 zur Steigerung der IL-10 Expression führt, und dass Blimp-1 den limitierenden Faktor für die Expression von IL-10 in diesen Zellen darstellt.



**Abbildung 53**

In Notch modulierten  $T_H17$ -Zellen ist die TGF- $\beta$ -induzierte, c-Maf-abhängige, Repression von IL-22 gestört, sodass es zu einer starken Steigerung der IL-22 Expression kommt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die mRNA Expression von IL-22 direkt durch Aktivierung des Notch Signalweges (Kapitel 4.1.2, Abb. 17), unabhängig von den vorhandenen Umgebungssignalen, induziert wird. Wobei das Expressionsniveau in  $T_H17$ -polarisierten Zellen am höchsten war (Kapitel 4.6, Abb. 41). Wie bereits beschrieben werden konnte, wird die Expression von IL-22 maßgeblich durch IL-6 und IL-23 induziert und, abhängig von c-Maf, durch TGF- $\beta$  reprimiert [86]. Hier konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des Notch Signalweges zu einer starken Erhöhung der IL-22 Proteinexpression, sowohl in Anwesenheit ( $T_H17$ ), als auch in Abwesenheit ( $T_H22$ ) von TGF- $\beta$  (Kapitel 4.7.1, Abb. 44), führt. Dies spricht dafür, dass die Modulation durch den Notch Signalweg in einer Verstärkung des STAT3 Signals resultiert, die in der Lage ist, die TGF- $\beta$  vermittelte Repression von IL-22 zu überlagern. Zumal bereits eine direkte, Hes-1-abhängige Interaktion zwischen dem Notch und STAT3 Signalweg gezeigt werden konnte, die das STAT3 Signal verstärkt [163].

Auch wenn abschließend hier noch kein molekularer Mechanismus für die Signalintegration durch Notch in T<sub>H</sub>17-Zellen ermittelt werden konnte, der für die Expressionssteigerung von IL-22 verantwortlich ist, so verdichten sich doch die Hinweise darauf, dass es ein ähnlicher Mechanismus ist, wie er bereits für die Regulation von IL-10 in T<sub>H</sub>1-Zellen beschrieben werden konnte [53](Neumann et. al., submitted) (Abb. 52). Einerseits die Integration des STAT Signals, STAT4 in T<sub>H</sub>1-Zellen [53] und STAT3 in T<sub>H</sub>17-Zellen [163], und andererseits die Steigerung der Blimp-1 Expression in Notch modulierten IL-22<sup>+</sup>-T<sub>H</sub>17-Zellen (Kapitel 4.8, Abb. 51), als auch in IL-10<sup>+</sup>-T<sub>H</sub>1-Zellen. Somit würden c-Maf und Blimp-1 zusammen zur optimalen Expressionssteigerung von IL-10 führen und Blimp-1 in Abwesenheit von c-Maf die Expressionssteigerung von IL-22 begünstigen, was auch erklären würde, weshalb IL-10 und IL-22 für gewöhnlich nicht von einer Zelle koexprimiert werden. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass IL-10 durch Blimp-1 und c-Maf, und IL-22 durch Blimp-1 und einen Faktor, der mit c-Maf konkurriert, reziprok reguliert werden. Hier sollten vor allem die mit IL-22 koexprimierten Transkriptionsfaktoren Epas-1 und Isl-1 (Kapitel 4.8, Abb. 51) eingehender untersucht werden. Auch der Arylhydrocarbon Rezeptor müsste in diesem Zusammenhang, auf eine mögliche Interaktion mit c-Maf und/oder Blimp-1 in T<sub>H</sub>17-Zellen, erneut untersucht werden. Besonders interessant wäre die Betrachtung der Expression von c-Maf, Blimp-1, Epas-1, Isl-1 und AhR in STAT3 defizienten T<sub>H</sub>17-Zellen. Für diese konnte bereits eine verminderte IL-22 Expression in Notch modulierten Zellen gezeigt werden [115], die ggf. durch eine Veränderung der Expression von c-Maf, Blimp-1, Epas-1 Isl-1 und/oder AhR vermittelt ist. Diese Varianten sollten in sich anschließenden Studien genauer untersucht werden, um abschließend einen molekularen Mechanismus für die Regulation der IL-22 Expression formulieren zu können.



## 6. Zusammenfassung



Eine strenge Regulation von Immunantworten ist essentiell, um den Organismus vor der Entstehung chronischer Entzündungen, Allergien und autoimmunen Reaktionen zu bewahren. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des Notch Signalweges, *in vivo* und *in vitro*, zur Selbstlimitierung der Immunantwort von T<sub>H</sub>1-Zellen, durch Anhebung der Expression des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10, führt. Es werden gegensätzliche Hypothesen diskutiert, wie der Notch Signalweg T-Helfer-Zellen moduliert. Einerseits konnte gezeigt werden, dass Notch die Differenzierung von T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2-, T<sub>H</sub>17-, bzw. regulatorischer T-Helfer-Zellen induzieren kann und andererseits gibt es Arbeiten, die dokumentieren, dass Notch Umgebungssignale integriert, wonach bestimmte Genmuster, wie z.B. IL-10 in T<sub>H</sub>1-Zellen, oder IL-22 in T<sub>H</sub>17-Zellen, in Abhängigkeit der zellulären Zusammensetzung induziert werden können.

Daher wurde in dieser Arbeit untersucht welchen Einfluss eine Notch Modulation auf die Genexpression in unterschiedlichen T-Helfer-Subsets hat, und ob der Notch Signalweg, unabhängig von anderen Stimuli, in der Lage ist ein Expressionsprofil zu induzieren, das dem von T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2-, oder T<sub>H</sub>17-Zellen entspricht. Die Ergebnisse zeigen, dass die Veränderung der Genexpression in Notch modulierten T-Helfer-Zellen entscheidend durch kostimulatorische Signale in den verschiedenen Subsets reguliert wird. Zudem ist dargestellt, dass die Aktivierung des Notch Signalweges nicht ausreichend ist, um ein T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2-, oder T<sub>H</sub>17-spezifisches Expressionsprofil, in nicht-polarisierten T-Helfer-Zellen, zu induzieren. Damit widersprechen die hier gezeigten Genexpressionsanalysen dem Modell, wonach der Notch Signalweg in der Lage ist distinkte T-Helfer-Subsets zu induzieren. Die Ergebnisse sprechen eher dafür, dass Notch die Signalwege, die in Abhängigkeit der Zusammensetzung der zellulären Umgebung aktiviert sind, integriert. Dies wird ferner dadurch bekräftigt, dass nur ein geringer Anteil der differentiell exprimierten Transkripte direkt durch Notch, unabhängig von den vorhandenen Kostimuli, moduliert wird. Eines der direkten Zielgene, die identifiziert werden konnten ist IL-22, wobei auch in diesem Fall deutlich wird, dass das Expressionsniveau abermals durch die Zusammensetzung der Kostimuli unterschiedlich stark beeinflusst wird. Im Gegensatz zu IL-22, handelt es sich bei IL-10 um kein direktes Notch Ziel. Die Notch vermittelte Expressionssteigerung von IL-10 in T<sub>H</sub>1-Zellen ist demnach von weiteren Faktoren abhängig.

In der vorliegenden Arbeit wurden c-Maf und Blimp-1, als Transkriptionsfaktoren identifiziert, die zusammen mit IL-10 in Notch modulierten T<sub>H</sub>1-Zellen koexprimiert werden. Es konnte experimentell gezeigt werden, dass die Expressionen von Blimp-1 und IL-10, durch den siRNA-vermittelten Knock-Down von c-Maf in Notch modulierten T<sub>H</sub>1-Zellen, stark reduziert werden, während die direkte Überexpression von c-Maf in T<sub>H</sub>1-Zellen zu einem drastischen Anstieg beider Expressionen führte. Die c-Maf Expression auf der

anderen Seite war in Blimp-1 defizienten  $T_H1$ -Zellen nahezu unverändert, wohingegen die IL-10 Expression fast vollständig aufgehoben war, und auch durch Überexpression von Notch, oder c-Maf nicht wieder hergestellt werden konnte. Somit konnte gezeigt werden, dass die IL-10 Expressionssteigerung in Notch modulierten  $T_H1$ -Zellen durch c-Maf vermittelt wird, und von Blimp-1 abhängig ist.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit untersucht, ob Notch die Expressionen der Zytokine IL-10 in  $T_H1$ -Zellen und IL-22 in  $T_H1$ -,  $T_H17$ - und  $T_H22$ -Zellen unabhängig vom Arylhydrocarbon Rezeptor modulieren kann, da AhR sowohl in Verbindung mit IL-10, als auch IL-22, bereits als einer der möglichen Regulatoren, beschrieben werden konnte. In AhR defizienten T-Helfer-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Notch induzierte Steigerung der IL-10 und IL-22 Expression in  $T_H1$ -Zellen unabhängig vom AhR ist. Hingegen war die IL-22 Expression in  $T_H17$ - und  $T_H22$ -Zellen in Abwesenheit des AhR deutlich reduziert. Dass Notch die Sekretion eines AhR-Liganden begünstigt, und somit zur Erhöhung der IL-22 Expression beiträgt konnte hier nicht festgestellt werden, da eine Steigerung auf Zellen beschränkt war, die ein intrazelluläres Notch Signal erhalten hatten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bekräftigen die Idee einer multilateralen Signalintegration durch den Notch Signalweg in T-Helfer-Zellen. Außerdem wird durch diese Arbeit deutlich, dass nur ein Teil dieser Signalintegration durch die differentielle Regulierung der Genexpression realisiert wird. Für IL-10 konnte ein Notch induzierter Mechanismus beschrieben werden, der zeigt, dass die IL-10 Expression in  $T_H1$ -Zellen Blimp-1 abhängig und AhR unabhängig ist und von c-Maf vermittelt wird.

## 7. Referenzen

1. Schier, A.F. and M.M. Shen, *Nodal signalling in vertebrate development*. Nature, 2000. **403**(6768): p. 385-9.
2. Oates, A.C., L.G. Morelli, and S. Ares, *Patterning embryos with oscillations: structure, function and dynamics of the vertebrate segmentation clock*. Development, 2012. **139**(4): p. 625-39.
3. Corbin, J.G., et al., *Regulation of neural progenitor cell development in the nervous system*. J Neurochem, 2008. **106**(6): p. 2272-87.
4. de la Pompa, J.L. and J.A. Epstein, *Coordinating tissue interactions: Notch signaling in cardiac development and disease*. Dev Cell, 2012. **22**(2): p. 244-54.
5. Shin, J.H., et al., *Corepressor MMTR/DMAP1 is an intrinsic negative regulator of CAK kinase to regulate cell cycle progression*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **402**(1): p. 110-5.
6. Koch, U., R. Lehal, and F. Radtke, *Stem cells living with a Notch*. Development, 2013. **140**(4): p. 689-704.
7. Mead, T.J. and K.E. Yutzey, *Notch signaling and the developing skeleton*. Adv Exp Med Biol, 2012. **727**: p. 114-30.
8. Hayday, A.C. and D.J. Pennington, *Key factors in the organized chaos of early T cell development*. Nat Immunol, 2007. **8**(2): p. 137-44.
9. Koch, U. and F. Radtke, *Mechanisms of T cell development and transformation*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2011. **27**: p. 539-62.
10. Bray, S.J., *Notch signalling: a simple pathway becomes complex*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(9): p. 678-89.
11. Kopan, R. and M.X. Ilagan, *The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism*. Cell, 2009. **137**(2): p. 216-33.
12. Real, P.J., et al., *Gamma-secretase inhibitors reverse glucocorticoid resistance in T cell acute lymphoblastic leukemia*. Nat Med, 2009. **15**(1): p. 50-8.
13. Kridel, R., et al., *Whole transcriptome sequencing reveals recurrent NOTCH1 mutations in mantle cell lymphoma*. Blood, 2012. **119**(9): p. 1963-71.
14. Radtke, F. and K. Raj, *The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor?* Nat Rev Cancer, 2003. **3**(10): p. 756-67.
15. Poellinger, L. and U. Lendahl, *Modulating Notch signaling by pathway-intrinsic and pathway-extrinsic mechanisms*. Curr Opin Genet Dev, 2008. **18**(5): p. 449-54.
16. Samon, J.B., et al., *Notch1 and TGFbeta1 cooperatively regulate Foxp3 expression and the maintenance of peripheral regulatory T cells*. Blood, 2008. **112**(5): p. 1813-21.
17. Heitzler, P., *Biodiversity and noncanonical Notch signaling*. Curr Top Dev Biol, 2010. **92**: p. 457-81.
18. Medzhitov, R., *Recognition of microorganisms and activation of the immune response*. Nature, 2007. **449**(7164): p. 819-26.
19. Delves, P.J. and I.M. Roitt, *The immune system. First of two parts*. N Engl J Med, 2000. **343**(1): p. 37-49.
20. Delves, P.J. and I.M. Roitt, *The immune system. Second of two parts*. N Engl J Med, 2000. **343**(2): p. 108-17.
21. Montecino-Rodriguez, E. and K. Dorshkind, *B-1 B cell development in the fetus and adult*. Immunity, 2012. **36**(1): p. 13-21.
22. Ciofani, M. and J.C. Zuniga-Pflucker, *The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2007. **23**: p. 463-93.
23. Singer, A.L. and G.A. Koretzky, *Control of T cell function by positive and negative regulators*. Science, 2002. **296**(5573): p. 1639-40.
24. Boehm, T., *Self-renewal of thymocytes in the absence of competitive precursor replenishment*. J Exp Med, 2012. **209**(8): p. 1397-400.

25. Lo, W.L. and P.M. Allen, *Self-awareness: how self-peptide/MHC complexes are essential in the development of T cells*. Mol Immunol, 2013. **55**(2): p. 186-9.
26. Pulendran, B. and D. Artis, *New paradigms in type 2 immunity*. Science, 2012. **337**(6093): p. 431-5.
27. Littman, D.R. and A.Y. Rudensky, *Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation*. Cell, 2010. **140**(6): p. 845-58.
28. Reiner, S.L., *Development in motion: helper T cells at work*. Cell, 2007. **129**(1): p. 33-6.
29. Yazdanbakhsh, M., P.G. Kremsner, and R. van Ree, *Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis*. Science, 2002. **296**(5567): p. 490-4.
30. Scheffold, A., J. Huhn, and T. Hofer, *Regulation of CD4+CD25+ regulatory T cell activity: it takes (IL-)two to tango*. Eur J Immunol, 2005. **35**(5): p. 1336-41.
31. Ouyang, W., et al., *Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 71-109.
32. Rutz, S. and W. Ouyang, *Regulation of interleukin-10 and interleukin-22 expression in T helper cells*. Curr Opin Immunol, 2011. **23**(5): p. 605-12.
33. Sheng, K.C., M.D. Wright, and V. Apostolopoulos, *Inflammatory mediators hold the key to dendritic cell suppression and tumor progression*. Curr Med Chem, 2011. **18**(36): p. 5507-18.
34. Redford, P.S., P.J. Murray, and A. O'Garra, *The role of IL-10 in immune regulation during M. tuberculosis infection*. Mucosal Immunol, 2011. **4**(3): p. 261-70.
35. Jankovic, D., D.G. Kugler, and A. Sher, *IL-10 production by CD4+ effector T cells: a mechanism for self-regulation*. Mucosal Immunol, 2010. **3**(3): p. 239-46.
36. Ouyang, W., *Distinct roles of IL-22 in human psoriasis and inflammatory bowel disease*. Cytokine Growth Factor Rev, 2010. **21**(6): p. 435-41.
37. Rutz, S., C. Eidenschenk, and W. Ouyang, *IL-22, not simply a Th17 cytokine*. Immunol Rev, 2013. **252**(1): p. 116-32.
38. Pickert, G., et al., *STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing*. J Exp Med, 2009. **206**(7): p. 1465-72.
39. Sonnenberg, G.F., L.A. Fouser, and D. Artis, *Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22*. Nat Immunol, 2011. **12**(5): p. 383-90.
40. Saraiva, M., et al., *Interleukin-10 production by Th1 cells requires interleukin-12-induced STAT4 transcription factor and ERK MAP kinase activation by high antigen dose*. Immunity, 2009. **31**(2): p. 209-19.
41. Saraiva, M. and A. O'Garra, *The regulation of IL-10 production by immune cells*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(3): p. 170-81.
42. Radtke, F., N. Fasnacht, and H.R. Macdonald, *Notch signaling in the immune system*. Immunity, 2010. **32**(1): p. 14-27.
43. Feyerabend, T.B., et al., *Deletion of Notch1 converts pro-T cells to dendritic cells and promotes thymic B cells by cell-extrinsic and cell-intrinsic mechanisms*. Immunity, 2009. **30**(1): p. 67-79.
44. von Boehmer, H., *Notch 1 keeps pro-T cells on track*. Immunity, 2009. **30**(1): p. 5-7.
45. Allman, D. and S. Pillai, *Peripheral B cell subsets*. Curr Opin Immunol, 2008. **20**(2): p. 149-57.
46. Amsen, D., et al., *Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells*. Cell, 2004. **117**(4): p. 515-26.
47. Amsen, D., C.G. Spilianakis, and R.A. Flavell, *How are T(H)1 and T(H)2 effector cells made?* Curr Opin Immunol, 2009. **21**(2): p. 153-60.
48. Auderset, F., M. Coutaz, and F. Tacchini-Cottier, *The role of Notch in the differentiation of CD4(+) T helper cells*. Curr Top Microbiol Immunol, 2012. **360**: p. 115-34.
49. Auderset, F., et al., *Redundant Notch1 and Notch2 signaling is necessary for IFNgamma secretion by T helper 1 cells during infection with Leishmania major*. PLoS Pathog, 2012. **8**(3): p. e1002560.

50. Radtke, F., H.R. MacDonald, and F. Tacchini-Cottier, *Regulation of innate and adaptive immunity by Notch*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(6): p. 427-37.
51. Vanhoutte, F., et al., *Toll-like receptor (TLR)2 and TLR3 synergy and cross-inhibition in murine myeloid dendritic cells*. Immunol Lett, 2008. **116**(1): p. 86-94.
52. Kassner, N., et al., *Cutting edge: Plasmacytoid dendritic cells induce IL-10 production in T cells via the Delta-like-4/Notch axis*. J Immunol, 2010. **184**(2): p. 550-4.
53. Rutz, S., et al., *Notch regulates IL-10 production by T helper 1 cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(9): p. 3497-502.
54. Rutz, S., et al., *Notch ligands Delta-like1, Delta-like4 and Jagged1 differentially regulate activation of peripheral T helper cells*. Eur J Immunol, 2005. **35**(8): p. 2443-51.
55. Ong, C.T., et al., *Notch and presenilin regulate cellular expansion and cytokine secretion but cannot instruct Th1/Th2 fate acquisition*. PLoS One, 2008. **3**(7): p. e2823.
56. Hozumi, K., et al., *Active form of Notch members can enforce T lymphopoiesis on lymphoid progenitors in the monolayer culture specific for B cell development*. J Immunol, 2003. **170**(10): p. 4973-9.
57. Farrar, J.D., et al., *An instructive component in T helper cell type 2 (Th2) development mediated by GATA-3*. J Exp Med, 2001. **193**(5): p. 643-50.
58. Tuschl, T., *Expanding small RNA interference*. Nat Biotechnol, 2002. **20**(5): p. 446-8.
59. Reynolds, A., et al., *Rational siRNA design for RNA interference*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(3): p. 326-30.
60. Ui-Tei, K., et al., *Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(3): p. 936-48.
61. Patzel, V., et al., *Design of siRNAs producing unstructured guide-RNAs results in improved RNA interference efficiency*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(11): p. 1440-4.
62. Mantei, A., et al., *siRNA stabilization prolongs gene knockdown in primary T lymphocytes*. Eur J Immunol, 2008. **38**(9): p. 2616-25.
63. Skokos, D. and M.C. Nussenzweig, *CD8- DCs induce IL-12-independent Th1 differentiation through Delta 4 Notch-like ligand in response to bacterial LPS*. J Exp Med, 2007. **204**(7): p. 1525-31.
64. Sun, J., C.J. Krawczyk, and E.J. Pearce, *Suppression of Th2 cell development by Notch ligands Delta1 and Delta4*. J Immunol, 2008. **180**(3): p. 1655-61.
65. Ito, T., et al., *TLR9 regulates the mycobacteria-elicited pulmonary granulomatous immune response in mice through DC-derived Notch ligand delta-like 4*. J Clin Invest, 2009. **119**(1): p. 33-46.
66. Mukherjee, S., et al., *Regulation of T cell activation by Notch ligand, DLL4, promotes IL-17 production and Rorc activation*. J Immunol, 2009. **182**(12): p. 7381-8.
67. Fang, T.C., et al., *Notch directly regulates Gata3 expression during T helper 2 cell differentiation*. Immunity, 2007. **27**(1): p. 100-10.
68. Vigouroux, S., et al., *Induction of antigen-specific regulatory T cells following overexpression of a Notch ligand by human B lymphocytes*. J Virol, 2003. **77**(20): p. 10872-80.
69. Kared, H., et al., *Jagged2-expressing hematopoietic progenitors promote regulatory T cell expansion in the periphery through notch signaling*. Immunity, 2006. **25**(5): p. 823-34.
70. Szabo, S.J., et al., *A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment*. Cell, 2000. **100**(6): p. 655-69.
71. Zheng, W. and R.A. Flavell, *The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells*. Cell, 1997. **89**(4): p. 587-96.
72. Ivanov, I.I., et al., *The orphan nuclear receptor RORgamma directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells*. Cell, 2006. **126**(6): p. 1121-33.
73. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. Science, 2003. **299**(5609): p. 1057-61.

74. Pearce, E.L., et al., *Control of effector CD8+ T cell function by the transcription factor Eomesodermin*. Science, 2003. **302**(5647): p. 1041-3.
75. Nurieva, R.I., et al., *Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells*. Science, 2009. **325**(5943): p. 1001-5.
76. Johnston, R.J., et al., *Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation*. Science, 2009. **325**(5943): p. 1006-10.
77. Kallies, A. and S.L. Nutt, *Terminal differentiation of lymphocytes depends on Blimp-1*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(2): p. 156-62.
78. Martins, G.A., et al., *Transcriptional repressor Blimp-1 regulates T cell homeostasis and function*. Nat Immunol, 2006. **7**(5): p. 457-65.
79. Clipstone, N.A. and G.R. Crabtree, *Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation*. Nature, 1992. **357**(6380): p. 695-7.
80. Emmel, E.A., et al., *Cyclosporin A specifically inhibits function of nuclear proteins involved in T cell activation*. Science, 1989. **246**(4937): p. 1617-20.
81. Gadina, M., et al., *Signaling by type I and II cytokine receptors: ten years after*. Curr Opin Immunol, 2001. **13**(3): p. 363-73.
82. Quintana, F.J., et al., *Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor*. Nature, 2008. **453**(7191): p. 65-71.
83. Apetoh, L., et al., *The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27*. Nat Immunol, 2010. **11**(9): p. 854-61.
84. Veldhoen, M., et al., *The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins*. Nature, 2008. **453**(7191): p. 106-9.
85. Ho, I.C., D. Lo, and L.H. Glimcher, *c-maf promotes T helper cell type 2 (Th2) and attenuates Th1 differentiation by both interleukin 4-dependent and -independent mechanisms*. J Exp Med, 1998. **188**(10): p. 1859-66.
86. Rutz, S., et al., *Transcription factor c-Maf mediates the TGF-beta-dependent suppression of IL-22 production in T(H)17 cells*. Nat Immunol, 2011. **12**(12): p. 1238-45.
87. Andersson, E.R., R. Sandberg, and U. Lendahl, *Notch signaling: simplicity in design, versatility in function*. Development, 2011. **138**(17): p. 3593-612.
88. Jouve, C., et al., *Notch signalling is required for cyclic expression of the hairy-like gene HES1 in the presomitic mesoderm*. Development, 2000. **127**(7): p. 1421-9.
89. Zheng, Y., et al., *Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens*. Nat Med, 2008. **14**(3): p. 282-9.
90. Sugimoto, K., et al., *IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis*. J Clin Invest, 2008. **118**(2): p. 534-44.
91. Kong, X., et al., *Interleukin-22 induces hepatic stellate cell senescence and restricts liver fibrosis in mice*. Hepatology, 2012. **56**(3): p. 1150-9.
92. Dudakov, J.A., et al., *Interleukin-22 drives endogenous thymic regeneration in mice*. Science, 2012. **336**(6077): p. 91-5.
93. Wolk, K., et al., *IL-22 increases the innate immunity of tissues*. Immunity, 2004. **21**(2): p. 241-54.
94. Liang, S.C., et al., *Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides*. J Exp Med, 2006. **203**(10): p. 2271-9.
95. Bonifacio, K., et al., *A role for T cell-derived interleukin 22 in psoriatic skin inflammation*. Clin Exp Immunol, 2007. **150**(3): p. 407-15.
96. Wolk, K., et al., *IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis*. Eur J Immunol, 2006. **36**(5): p. 1309-23.
97. Liang, S.C., et al., *IL-22 induces an acute-phase response*. J Immunol, 2010. **185**(9): p. 5531-8.
98. Aujla, S.J., et al., *IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia*. Nat Med, 2008. **14**(3): p. 275-81.

99. Gandhi, R., et al., *Activation of the aryl hydrocarbon receptor induces human type 1 regulatory T cell-like and Foxp3(+) regulatory T cells*. Nat Immunol, 2010. **11**(9): p. 846-53.
100. Ashburner, M., et al., *Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium*. Nat Genet, 2000. **25**(1): p. 25-9.
101. Cartharius, K., et al., *MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites*. Bioinformatics, 2005. **21**(13): p. 2933-42.
102. Loots, G.G. and I. Ovcharenko, *rVISTA 2.0: evolutionary analysis of transcription factor binding sites*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Web Server issue): p. W217-21.
103. Ovcharenko, I., L. Stubbs, and G.G. Loots, *Interpreting mammalian evolution using Fugu genome comparisons*. Genomics, 2004. **84**(5): p. 890-5.
104. Cao, S., et al., *The protooncogene c-Maf is an essential transcription factor for IL-10 gene expression in macrophages*. J Immunol, 2005. **174**(6): p. 3484-92.
105. Pot, C., et al., *Cutting edge: IL-27 induces the transcription factor c-Maf, cytokine IL-21, and the costimulatory receptor ICOS that coordinately act together to promote differentiation of IL-10-producing Tr1 cells*. J Immunol, 2009. **183**(2): p. 797-801.
106. Xu, J., et al., *c-Maf regulates IL-10 expression during Th17 polarization*. J Immunol, 2009. **182**(10): p. 6226-36.
107. Cretney, E., et al., *The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells*. Nat Immunol, 2011. **12**(4): p. 304-11.
108. Sun, J., et al., *CD4+ T cell help and innate-derived IL-27 induce Blimp-1-dependent IL-10 production by antiviral CTLs*. Nat Immunol, 2011. **12**(4): p. 327-34.
109. Grigoryan, T., et al., *Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice*. Genes Dev, 2008. **22**(17): p. 2308-41.
110. Martins, G.A., et al., *Blimp-1 directly represses Il2 and the Il2 activator Fos, attenuating T cell proliferation and survival*. J Exp Med, 2008. **205**(9): p. 1959-65.
111. Thiele, S., et al., *miR-9 enhances IL-2 production in activated human CD4(+) T cells by repressing Blimp-1*. Eur J Immunol, 2012. **42**(8): p. 2100-8.
112. Johnston, R.J., et al., *STAT5 is a potent negative regulator of TFH cell differentiation*. J Exp Med, 2012. **209**(2): p. 243-50.
113. Gong, D. and T.R. Malek, *Cytokine-dependent Blimp-1 expression in activated T cells inhibits IL-2 production*. J Immunol, 2007. **178**(1): p. 242-52.
114. Weiner, H.L., et al., *Oral tolerance*. Immunol Rev, 2011. **241**(1): p. 241-59.
115. Alam, M.S., et al., *Notch signaling drives IL-22 secretion in CD4+ T cells by stimulating the aryl hydrocarbon receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(13): p. 5943-8.
116. Veldhoen, M., et al., *Natural agonists for aryl hydrocarbon receptor in culture medium are essential for optimal differentiation of Th17 T cells*. J Exp Med, 2009. **206**(1): p. 43-9.
117. Trifari, S., et al., *Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells*. Nat Immunol, 2009. **10**(8): p. 864-71.
118. Stejskalova, L., Z. Dvorak, and P. Pavek, *Endogenous and exogenous ligands of aryl hydrocarbon receptor: current state of art*. Curr Drug Metab, 2011. **12**(2): p. 198-212.
119. Abel, J. and T. Haarmann-Stemann, *An introduction to the molecular basics of aryl hydrocarbon receptor biology*. Biol Chem, 2010. **391**(11): p. 1235-48.
120. Esser, C., A. Rannug, and B. Stockinger, *The aryl hydrocarbon receptor in immunity*. Trends Immunol, 2009. **30**(9): p. 447-54.
121. Oberg, M., et al., *Identification of the tryptophan photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole, in cell culture medium, as a factor that controls the background aryl hydrocarbon receptor activity*. Toxicol Sci, 2005. **85**(2): p. 935-43.

122. Jonsson, M.E., et al., *The tryptophan photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) binds multiple AHRs and induces multiple CYP1 genes via AHR2 in zebrafish.* Chem Biol Interact, 2009. **181**(3): p. 447-54.
123. Esser, C., *The immune phenotype of AhR null mouse mutants: not a simple mirror of xenobiotic receptor over-activation.* Biochem Pharmacol, 2009. **77**(4): p. 597-607.
124. Sabat, R., et al., *Immunopathogenesis of psoriasis.* Exp Dermatol, 2007. **16**(10): p. 779-98.
125. Stange, J., et al., *IL-22 mediates host defense against an intestinal intracellular parasite in the absence of IFN-gamma at the cost of Th17-driven immunopathology.* J Immunol, 2012. **188**(5): p. 2410-8.
126. Geboes, L., et al., *Proinflammatory role of the Th17 cytokine interleukin-22 in collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice.* Arthritis Rheum, 2009. **60**(2): p. 390-5.
127. Dhiman, R., et al., *IL-22 produced by human NK cells inhibits growth of Mycobacterium tuberculosis by enhancing phagolysosomal fusion.* J Immunol, 2009. **183**(10): p. 6639-45.
128. Schulz, S.M., et al., *Protective immunity to systemic infection with attenuated Salmonella enterica serovar enteritidis in the absence of IL-12 is associated with IL-23-dependent IL-22, but not IL-17.* J Immunol, 2008. **181**(11): p. 7891-901.
129. Wu, F., et al., *Down-regulation of EGFL8: a novel biomarker for advanced gastric cancer.* Anticancer Res, 2011. **31**(10): p. 3377-80.
130. Kebir, H., et al., *Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation.* Nat Med, 2007. **13**(10): p. 1173-5.
131. Liu, Y., et al., *Interleukin-21 induces the differentiation of human Tc22 cells via phosphorylation of signal transducers and activators of transcription.* Immunology, 2011. **132**(4): p. 540-8.
132. Aranday-Cortes, E., et al., *Transcriptional profiling of disease-induced host responses in bovine tuberculosis and the identification of potential diagnostic biomarkers.* PLoS One, 2012. **7**(2): p. e30626.
133. Cho, O.H., et al., *Notch regulates cytolytic effector function in CD8+ T cells.* J Immunol, 2009. **182**(6): p. 3380-9.
134. Hijnen, D., et al., *CD8(+) T cells in the lesional skin of atopic dermatitis and psoriasis patients are an important source of IFN-gamma, IL-13, IL-17, and IL-22.* J Invest Dermatol, 2013. **133**(4): p. 973-9.
135. Szegedi, K., et al., *Increased frequencies of IL-31-producing T cells are found in chronic atopic dermatitis skin.* Exp Dermatol, 2012. **21**(6): p. 431-6.
136. Chan, J.R., et al., *IL-23 stimulates epidermal hyperplasia via TNF and IL-20R2-dependent mechanisms with implications for psoriasis pathogenesis.* J Exp Med, 2006. **203**(12): p. 2577-87.
137. Van Belle, A.B., et al., *IL-22 is required for imiquimod-induced psoriasiform skin inflammation in mice.* J Immunol, 2012. **188**(1): p. 462-9.
138. Munoz, M., et al., *Interleukin (IL)-23 mediates Toxoplasma gondii-induced immunopathology in the gut via matrixmetalloproteinase-2 and IL-22 but independent of IL-17.* J Exp Med, 2009. **206**(13): p. 3047-59.
139. Kaplan, M.H., et al., *Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice.* Nature, 1996. **382**(6587): p. 174-7.
140. Bachmann, M., et al., *Interleukin-18 directly activates T-bet expression and function via p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB in acute myeloid leukemia-derived predendritic KG-1 cells.* Mol Cancer Ther, 2007. **6**(2): p. 723-31.
141. Possot, C., et al., *Notch signaling is necessary for adult, but not fetal, development of RORgammat(+) innate lymphoid cells.* Nat Immunol, 2011. **12**(10): p. 949-58.
142. Dusseaux, M., et al., *Human MAIT cells are xenobiotic-resistant, tissue-targeted, CD161hi IL-17-secreting T cells.* Blood, 2011. **117**(4): p. 1250-9.
143. Gunther, C., et al., *CXCL16 and CXCR6 are upregulated in psoriasis and mediate cutaneous recruitment of human CD8+ T cells.* J Invest Dermatol, 2012. **132**(3 Pt 1): p. 626-34.

144. Simhadri, V.L., et al., *A novel role for reciprocal CD30-CD30L signaling in the cross-talk between natural killer and dendritic cells*. *Biol Chem*, 2012. **393**(1-2): p. 101-6.
145. Duan, L.J., Y. Zhang-Benoit, and G.H. Fong, *Endothelium-intrinsic requirement for Hif-2alpha during vascular development*. *Circulation*, 2005. **111**(17): p. 2227-32.
146. Weir, L., et al., *Hypoxia-mediated control of HIF/ARNT machinery in epidermal keratinocytes*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1813**(1): p. 60-72.
147. Habener, J.F., D.M. Kemp, and M.K. Thomas, *Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development*. *Endocrinology*, 2005. **146**(3): p. 1025-34.
148. Amsen, D., et al., *Direct regulation of Gata3 expression determines the T helper differentiation potential of Notch*. *Immunity*, 2007. **27**(1): p. 89-99.
149. Minter, L.M., et al., *Inhibitors of gamma-secretase block in vivo and in vitro T helper type 1 polarization by preventing Notch upregulation of Tbx21*. *Nat Immunol*, 2005. **6**(7): p. 680-8.
150. Bailis, W., et al., *Notch simultaneously orchestrates multiple helper T cell programs independently of cytokine signals*. *Immunity*, 2013. **39**(1): p. 148-59.
151. Auderset, F., et al., *Notch signaling regulates follicular helper T cell differentiation*. *J Immunol*, 2013. **191**(5): p. 2344-50.
152. Elyaman, W., et al., *Notch receptors and Smad3 signaling cooperate in the induction of interleukin-9-producing T cells*. *Immunity*, 2012. **36**(4): p. 623-34.
153. Keerthivasan, S., et al., *Notch signaling regulates mouse and human Th17 differentiation*. *J Immunol*, 2011. **187**(2): p. 692-701.
154. Fischer, A. and M. Gessler, *Delta-Notch--and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors*. *Nucleic Acids Res*, 2007. **35**(14): p. 4583-96.
155. Wang, H.Y., et al., *Mathematical models for the Notch and Wnt signaling pathways and the crosstalk between them during somitogenesis*. *Theor Biol Med Model*, 2013. **10**: p. 27.
156. Huang, H.M., et al., *Notch ligand delta-like 4-pretreated dendritic cells alleviate allergic airway responses by enhancing IL-10 production*. *PLoS One*, 2013. **8**(5): p. e63613.
157. Edwards, S., et al., *TLR7 stimulation of APCs results in inhibition of IL-5 through type I IFN and Notch signaling pathways in human peripheral blood mononuclear cells*. *J Immunol*, 2013. **190**(6): p. 2585-92.
158. Jabeen, R. and M.H. Kaplan, *The symphony of the ninth: the development and function of Th9 cells*. *Curr Opin Immunol*, 2012. **24**(3): p. 303-7.
159. Olave, I., D. Reinberg, and L.D. Vales, *The mammalian transcriptional repressor RBP (CBF1) targets TFIID and TFIIA to prevent activated transcription*. *Genes Dev*, 1998. **12**(11): p. 1621-37.
160. Lai, E.C., *Keeping a good pathway down: transcriptional repression of Notch pathway target genes by CSL proteins*. *EMBO Rep*, 2002. **3**(9): p. 840-5.
161. Espinosa, L., et al., *The Notch/Hes1 pathway sustains NF-kappaB activation through CYLD repression in T cell leukemia*. *Cancer Cell*, 2010. **18**(3): p. 268-81.
162. Germar, K., et al., *T-cell factor 1 is a gatekeeper for T-cell specification in response to Notch signaling*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(50): p. 20060-5.
163. Kamakura, S., et al., *Hes binding to STAT3 mediates crosstalk between Notch and JAK-STAT signalling*. *Nat Cell Biol*, 2004. **6**(6): p. 547-54.
164. Delbridge, A.R., L.J. Valente, and A. Strasser, *The role of the apoptotic machinery in tumor suppression*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012. **4**(11).
165. Yu, S. and H.H. Xue, *TCF-1 mediates repression of Notch pathway in T lineage-committed early thymocytes*. *Blood*, 2013. **121**(19): p. 4008-9.
166. O'Shea, J.J. and R. Plenge, *JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and immune-mediated disease*. *Immunity*, 2012. **36**(4): p. 542-50.
167. Yaron, A. and D. Sprinzak, *The cis side of juxtacrine signaling: a new role in the development of the nervous system*. *Trends Neurosci*, 2012. **35**(4): p. 230-9.

168. Johnson, J.E. and R.J. Macdonald, *Notch-independent functions of CSL*. Curr Top Dev Biol, 2011. **97**: p. 55-74.
169. Kim, J.I., et al., *The transcription factor c-Maf controls the production of interleukin-4 but not other Th2 cytokines*. Immunity, 1999. **10**(6): p. 745-51.
170. Otsuki, T., et al., *IL-10 in myeloma cells*. Leuk Lymphoma, 2002. **43**(5): p. 969-74.
171. Dhiman, R., et al., *c-Maf-dependent growth of Mycobacterium tuberculosis in a CD14(hi) subpopulation of monocyte-derived macrophages*. J Immunol, 2011. **186**(3): p. 1638-45.
172. Turner, C.A., Jr., D.H. Mack, and M.M. Davis, *Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells*. Cell, 1994. **77**(2): p. 297-306.
173. Lin, Y., K. Wong, and K. Calame, *Repression of c-myc transcription by Blimp-1, an inducer of terminal B cell differentiation*. Science, 1997. **276**(5312): p. 596-9.
174. Martins, G. and K. Calame, *Regulation and functions of Blimp-1 in T and B lymphocytes*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 133-69.
175. Kallies, A., *Distinct regulation of effector and memory T-cell differentiation*. Immunol Cell Biol, 2008. **86**(4): p. 325-32.
176. Kallies, A., et al., *Transcriptional repressor Blimp-1 is essential for T cell homeostasis and self-tolerance*. Nat Immunol, 2006. **7**(5): p. 466-74.
177. Crotty, S., R.J. Johnston, and S.P. Schoenberger, *Effectors and memories: Bcl-6 and Blimp-1 in T and B lymphocyte differentiation*. Nat Immunol, 2010. **11**(2): p. 114-20.
178. Calame, K., *Activation-dependent induction of Blimp-1*. Curr Opin Immunol, 2008. **20**(3): p. 259-64.
179. Crotty, S., *Follicular helper CD4 T cells (TFH)*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 621-63.
180. Cimmino, L., et al., *Blimp-1 attenuates Th1 differentiation by repression of ifng, tbx21, and bcl6 gene expression*. J Immunol, 2008. **181**(4): p. 2338-47.
181. Oestreich, K.J., S.E. Mohn, and A.S. Weinmann, *Molecular mechanisms that control the expression and activity of Bcl-6 in TH1 cells to regulate flexibility with a TFH-like gene profile*. Nat Immunol, 2012. **13**(4): p. 405-11.
182. Oestreich, K.J. and A.S. Weinmann, *Transcriptional mechanisms that regulate T helper 1 cell differentiation*. Curr Opin Immunol, 2012. **24**(2): p. 191-5.
183. Arai, S., et al., *Evi-1 is a transcriptional target of mixed-lineage leukemia oncoproteins in hematopoietic stem cells*. Blood, 2011. **117**(23): p. 6304-14.
184. Hwang, B.J., A.D. Meruelo, and P.W. Sternberg, *C. elegans EVI1 proto-oncogene, EGL-43, is necessary for Notch-mediated cell fate specification and regulates cell invasion*. Development, 2007. **134**(4): p. 669-79.
185. Hoyt, P.R., et al., *The Evi1 proto-oncogene is required at midgestation for neural, heart, and paraxial mesenchyme development*. Mech Dev, 1997. **65**(1-2): p. 55-70.
186. Lee, K.A., *Ewings family oncoproteins: drunk, disorderly and in search of partners*. Cell Res, 2007. **17**(4): p. 286-8.
187. Arvand, A. and C.T. Denny, *Biology of EWS/ETS fusions in Ewing's family tumors*. Oncogene, 2001. **20**(40): p. 5747-54.
188. Nowling, T.K. and G.S. Gilkeson, *Regulation of Fli1 gene expression and lupus*. Autoimmun Rev, 2006. **5**(6): p. 377-82.
189. Asano, Y., A.M. Bujor, and M. Trojanowska, *The impact of Fli1 deficiency on the pathogenesis of systemic sclerosis*. J Dermatol Sci, 2010. **59**(3): p. 153-62.
190. Sharrocks, A.D., *The ETS-domain transcription factor family*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(11): p. 827-37.
191. Clark, J.P. and C.S. Cooper, *ETS gene fusions in prostate cancer*. Nat Rev Urol, 2009. **6**(8): p. 429-39.
192. Larsson, C., *Protein kinase C and the regulation of the actin cytoskeleton*. Cell Signal, 2006. **18**(3): p. 276-84.
193. Yu, H., et al., *The FERM family proteins in cancer invasion and metastasis*. Front Biosci (Landmark Ed), 2011. **16**: p. 1536-50.

194. Mao, J., et al., *Fgf-dependent Etv4/5 activity is required for posterior restriction of Sonic Hedgehog and promoting outgrowth of the vertebrate limb*. Dev Cell, 2009. **16**(4): p. 600-6.
195. Ramesh, V., *Merlin and the ERM proteins in Schwann cells, neurons and growth cones*. Nat Rev Neurosci, 2004. **5**(6): p. 462-70.
196. Morrow, C.M., et al., *ETV5 is required for continuous spermatogenesis in adult mice and may mediate blood testes barrier function and testicular immune privilege*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1120**: p. 144-51.
197. Oatley, J.M. and R.L. Brinster, *Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2008. **24**: p. 263-86.
198. Cai, S., H.J. Han, and T. Kohwi-Shigematsu, *Tissue-specific nuclear architecture and gene expression regulated by SATB1*. Nat Genet, 2003. **34**(1): p. 42-51.
199. Cai, S., C.C. Lee, and T. Kohwi-Shigematsu, *SATB1 packages densely looped, transcriptionally active chromatin for coordinated expression of cytokine genes*. Nat Genet, 2006. **38**(11): p. 1278-88.
200. Dickinson, L.A., et al., *A tissue-specific MAR/SAR DNA-binding protein with unusual binding site recognition*. Cell, 1992. **70**(4): p. 631-45.
201. Krangel, M.S., *T cell development: better living through chromatin*. Nat Immunol, 2007. **8**(7): p. 687-94.
202. Pavan Kumar, P., et al., *Phosphorylation of SATB1, a global gene regulator, acts as a molecular switch regulating its transcriptional activity in vivo*. Mol Cell, 2006. **22**(2): p. 231-43.
203. Yasui, D., et al., *SATB1 targets chromatin remodelling to regulate genes over long distances*. Nature, 2002. **419**(6907): p. 641-5.
204. Son, J.S., et al., *Enhanced chromatin accessibility and recruitment of JUNB mediate the sustained IL-4 expression in NFAT1 deficient T helper 2 cells*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e22042.
205. Lund, R., et al., *Identification of genes involved in the initiation of human Th1 or Th2 cell commitment*. Eur J Immunol, 2005. **35**(11): p. 3307-19.
206. Notani, D., et al., *Global regulator SATB1 recruits beta-catenin and regulates T(H)2 differentiation in Wnt-dependent manner*. PLoS Biol, 2010. **8**(1): p. e1000296.
207. Ma, J., et al., *beta-catenin/TCF-1 pathway in T cell development and differentiation*. J Neuroimmune Pharmacol, 2012. **7**(4): p. 750-62.
208. Xue, H.H. and D.M. Zhao, *Regulation of mature T cell responses by the Wnt signaling pathway*. Ann N Y Acad Sci, 2012. **1247**: p. 16-33.
209. Weerkamp, F., J.J. van Dongen, and F.J. Staal, *Notch and Wnt signaling in T-lymphocyte development and acute lymphoblastic leukemia*. Leukemia, 2006. **20**(7): p. 1197-205.
210. Fu, W., et al., *A multiply redundant genetic switch 'locks in' the transcriptional signature of regulatory T cells*. Nat Immunol, 2012. **13**(10): p. 972-80.
211. Braunstein, M. and M.K. Anderson, *HEB in the spotlight: Transcriptional regulation of T-cell specification, commitment, and developmental plasticity*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 678705.
212. Carlin, S.M., et al., *Notch signalling inhibits CD4 expression during initiation and differentiation of human T cell lineage*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e45342.
213. Hattori, N., et al., *Involvement of transcription factors TCF-1 and GATA-3 in the initiation of the earliest step of T cell development in the thymus*. J Exp Med, 1996. **184**(3): p. 1137-47.
214. Hoflinger, S., et al., *Analysis of Notch1 function by in vitro T cell differentiation of Pax5 mutant lymphoid progenitors*. J Immunol, 2004. **173**(6): p. 3935-44.
215. Kuo, C.T. and J.M. Leiden, *Transcriptional regulation of T lymphocyte development and function*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 149-87.
216. Ohteki, T., et al., *Selectively impaired development of intestinal T cell receptor gamma delta+ cells and liver CD4+ NK1+ T cell receptor alpha beta+ cells in T cell factor-1-deficient mice*. Eur J Immunol, 1996. **26**(2): p. 351-5.

217. Okamura, R.M., et al., *Redundant regulation of T cell differentiation and TCRalpha gene expression by the transcription factors LEF-1 and TCF-1*. *Immunity*, 1998. **8**(1): p. 11-20.
218. Tydell, C.C., et al., *Molecular dissection of prethymic progenitor entry into the T lymphocyte developmental pathway*. *J Immunol*, 2007. **179**(1): p. 421-38.
219. van de Wetering, M., et al., *Identification and cloning of TCF-1, a T lymphocyte-specific transcription factor containing a sequence-specific HMG box*. *EMBO J*, 1991. **10**(1): p. 123-32.
220. Verbeek, S., et al., *An HMG-box-containing T-cell factor required for thymocyte differentiation*. *Nature*, 1995. **374**(6517): p. 70-4.
221. Weber, B.N., et al., *A critical role for TCF-1 in T-lineage specification and differentiation*. *Nature*, 2011. **476**(7358): p. 63-8.
222. Galceran, J., et al., *Wnt3a-/-like phenotype and limb deficiency in Lef1(-/-)Tcf1(-/-) mice*. *Genes Dev*, 1999. **13**(6): p. 709-17.
223. Ioannidis, V., et al., *The beta-catenin--TCF-1 pathway ensures CD4(+)CD8(+) thymocyte survival*. *Nat Immunol*, 2001. **2**(8): p. 691-7.
224. Staal, F.J., et al., *Wnt signaling is required for thymocyte development and activates Tcf-1 mediated transcription*. *Eur J Immunol*, 2001. **31**(1): p. 285-93.
225. Maier, E., et al., *Inhibition of suppressive T cell factor 1 (TCF-1) isoforms in naive CD4+ T cells is mediated by IL-4/STAT6 signaling*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(2): p. 919-28.
226. Erlich, H.A., et al., *Evidence for association of the TCF7 locus with type I diabetes*. *Genes Immun*, 2009. **10 Suppl 1**: p. S54-9.
227. Yu, S., et al., *The TCF-1 and LEF-1 transcription factors have cooperative and opposing roles in T cell development and malignancy*. *Immunity*, 2012. **37**(5): p. 813-26.
228. Lobry, C., P. Oh, and I. Aifantis, *Oncogenic and tumor suppressor functions of Notch in cancer: it's NOTCH what you think*. *J Exp Med*, 2011. **208**(10): p. 1931-5.
229. Wu, C.P., et al., *Immunophenotype and increased presence of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in patients with acute lymphoblastic leukemia*. *Oncol Lett*, 2012. **3**(2): p. 421-424.
230. Tang, Y., et al., *Notch and transforming growth factor-beta (TGFbeta) signaling pathways cooperatively regulate vascular smooth muscle cell differentiation*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(23): p. 17556-63..

## 8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 .....	11
Abbildung 2 .....	15
Abbildung 3 .....	18
Abbildung 4 .....	19
Abbildung 5 .....	20
Abbildung 6 .....	46
Abbildung 7 .....	48
Abbildung 8 .....	50
Abbildung 9 .....	60
Abbildung 10 .....	78
Abbildung 11 .....	78
Abbildung 12 .....	79
Abbildung 13 .....	80
Abbildung 14 .....	81
Abbildung 15 .....	82
Abbildung 16 .....	83
Abbildung 17 .....	84
Abbildung 18 .....	87
Abbildung 19 .....	90
Abbildung 20 .....	92
Abbildung 21 .....	95
Abbildung 22 .....	96
Abbildung 23 .....	98
Abbildung 24 .....	100
Abbildung 25 .....	101
Abbildung 26 .....	105
Abbildung 27 .....	106
Abbildung 28 .....	107
Abbildung 29 .....	108
Abbildung 30 .....	110
Abbildung 31 .....	111
Abbildung 32 .....	112
Abbildung 33 .....	114
Abbildung 34 .....	115
Abbildung 35 .....	116
Abbildung 36 .....	117
Abbildung 37 .....	119
Abbildung 38 .....	120
Abbildung 39 .....	121
Abbildung 40 .....	122
Abbildung 41 .....	123
Abbildung 42 .....	125
Abbildung 43 .....	126
Abbildung 44 .....	127
Abbildung 45 .....	129
Abbildung 46 .....	130
	177

Abbildung 47 .....	131
Abbildung 48 .....	132
Abbildung 49 .....	133
Abbildung 50 .....	134
Abbildung 51 .....	135
Abbildung 52 .....	159
Abbildung 53 .....	160

## 9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 .....	33
Tabelle 2 .....	37
Tabelle 3 .....	40
Tabelle 4 .....	41
Tabelle 5 .....	47
Tabelle 6 .....	49
Tabelle 7 .....	61
Tabelle 8 .....	73
Tabelle 9 .....	74
Tabelle 10 .....	97
Tabelle 11 .....	103



## 10. Formelverzeichnis

Formel 1 .....	46
Formel 2 .....	50
Formel 3 .....	50
Formel 4 .....	51
Formel 5 .....	51
Formel 6 .....	52
Formel 7 .....	53
Formel 8 .....	54
Formel 9 .....	55
Formel 10 .....	56
Formel 11 .....	57
Formel 12 .....	58
Formel 13 .....	59



## 11. Abkürzungsverzeichnis

Adam	a distintegrin and metallopeptidase
AhR	Arylhydrocarbon Rezeptor
AICDA	Activation-induced cytidine deaminase
APZ	antigenpräsentierende Zelle
Arnt	Arylhydrocarbon receptor nuclear translocator
Blimp-1	b lymphocyte induced maturation protein 1
BP-Filter	bandpass filter
BSA	bovine serum albumin
<b>B-Zellen</b>	<b>bone marrow derived</b>
BZR	B-Zell-Rezeptor
<b>CD</b>	<b>cluster of differentiation</b>
cDNA	complementary DNA
CDS	coding DNA sequence
c-Maf	avian musculoaponeurotic fibrosarcoma (v-maf) AS42 oncogene homolog
cRNA	coding RNA
Cxcl3	chemokine (C-X-C motif) ligand 3
Cxcr6	chemokine (C-X-C motif) receptor 6
DLL-	Delta-like-
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DN	doppelt negativ
DNA	Desoxyribonucleic acid
DP	doppelt positiv
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
env	codiert für die Hüllproteine des Virus
Epas-1	endothelial PAS domain protein 1
Erk	extracellular regulated MAP kinase
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FSC	forward scatter
gag	codiert die Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine
gag,pol,env	Bestandteile der genomischen RNA eines Retrovirus
GC	germinal center

## Abkürzungsverzeichnis

---

GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GO:0000122	biological process, negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
GO:0000981	molecular function, sequence-specific DNA binding RNA polymerase II transcription factor activity
GO:0003700	molecular function, sequence-specific DNA binding transcription factor activity
GO:0005667	cellular component, transcription factor complex
GO:0006351	biological process, transcription, DNA-dependent
GO:0006355	biological process, regulation of transcription, DNA-dependent
GO:0006357	biological process, regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
GO:0006366	biological process, transcription from RNA polymerase II promoter
GO:0010628*	biological process, positive regulation of gene expression
GO:0044212	molecular function, transcription regulatory region DNA binding
GO:0045892 dependent	biological process, negative regulation of transcription, DNA-dependent
GO:0045893 dependent	biological process, positive regulation of transcription, DNA-dependent
GO:0045944	biological process, positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
Gzma, b, c	granzyme A, B, C
HBS	HEPES Buffered Saline
HEK	human embryonic kidney
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
Hes	hairy and enhancer of split (Drosophila)
Hif1 $\alpha$	hypoxia inducible factor 1, alpha subunit
IFN-	Interferon-
IL-	Interleukin
Il1fb	interleukin 10-related T cell-derived inducible factor beta
IRES	internal ribosomal integration site
Isl-1	ISL 1 transcription factor, LIM/homeodomain
Jag-	Jagged-
KD	knock-down

LB-Medium	lysogeny broth
LP-Filter	longpass filter
LS-Säule	Säulen zur positiven Selektion magnetisch markierter Zellen
MACS <sup>®</sup>	magnetic cell sorting
MHC	Major Histocompatibility Complex
mRNA	messenger Ribonucleic acid
MZB	marginal zone b-cells
n.d.	nicht detektierbar
NIZD	Notch intrazelluläre Domäne
<b>NK-Zellen</b>	<b>Natürliche Killer Zellen</b>
<b>PAMP</b>	<b>pathogen associated molecular patterns</b>
PBA	PBS/BSA/Azid
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PI	Propidiumiodid
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMT	photo multiplier tube
pol	codiert die viralen Enzyme Protease, Reverse Transkriptase und Integrase
<b>PRR</b>	<b>PAMP recognition receptors</b>
qPCR	quantitative PCR
<b>RAG</b>	<b>recombination activating gene</b>
RBPJk	recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J Region
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
SA	Sekretions Assay
SC	scrambled
siRNA	single interfering RNA
Smad	MAD homolog (Drosophila)
SOCS	suppressor of cytokine signaling
SSC	side scatter
STAT	signal transducer and activator of transcription
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TF	Transkriptionsfaktor
TGF-	transforming growth factor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	transcription start site

## Abkürzungsverzeichnis

---

T-Zellen	thymus derived
TZR	T-Zell-Rezeptor
v/v	volume/volume
VDJ-Region	V-, D- und J-Segmente der an der somatischen Rekombination beteiligten Gene
w/v	weight/volume
$\alpha$ -	anti-
$\alpha\beta$ -T-Zellen	T-Zellen deren Rezeptor aus einer alpha- und einer beta-Kette bestehen
$\gamma\delta$ -T-Zellen	T-Zellen deren Rezeptor aus einer gamma- und einer delta-Kette bestehen
$\Delta G$	Gibbs-Energie

## **12. Selbständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit selbständig von mir angefertigt wurde. Ich versichere, dass ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen wurden.

Frederik Heinrich

Berlin, den 28.11.2013



### 13. Anhang

- Anhang I:      signifikant differentiell expremierte Transkripte in TH0 Zellen.xlsx
- Anhang II:     signifikant differentiell expremierte Transkripte in TH1 Zellen.xlsx
- Anhang III:    signifikant differentiell expremierte Transkripte in TH2 Zellen.xlsx
- Anhang IV:     signifikant differentiell expremierte Transkripte in TH17 Zellen.xlsx
- Anhang V:      signifikant differentiell expremierte Transkripte in IL-10 sortierten  
                  TH1 Zellen.xlsx
- Anhang VI:     signifikant differentiell expremierte Transkripte in IL-22 sortierten  
                  Notch modulierten TH17 Zellen.xlsx
- Anhang VII:    Notch modulierte T-Helfer-Zellen.mdb
- Anhang VIII:   IL-10 sortierte Zellen.mdb
- Anhang IX:     IL-22 sortierte Zellen.mdb

Die Anhänge sind über [f.heinrich@drfz.de](mailto:f.heinrich@drfz.de), oder [frederik.heinrich@gmx.de](mailto:frederik.heinrich@gmx.de) erhältlich.



## 14. Danksagung

Der größte Dank gilt meiner Mutter. Ohne Deine bedingungslose Unterstützung hätte ich die Doktorarbeit nicht zu Ende schreiben können.

Roland Lauster Dir danke ich für die Bereitschaft die Doktorarbeit an der TU-Berlin zu betreuen und für die Zusammenstellung einer Arbeitsgruppe mit der man auch seine Freizeit gerne verbringt.

Alexander Scheffold und Andreas Radbruch, Euch danke ich für die Geduld, die anregenden Diskussionen, und die angenehme Betreuung der Doktorarbeit am DRFZ. Alex Dir danke ich außerdem für die Weihnachtsfeiern mit höchst Champions-League-verdächtigen Semmelknödeln, auf die ich mich jedes Jahr aufs Neue freue. Andreas Dir danke ich für die Ausrichtung der Gruppen- und Institusausflüge, die kulinarisch den Semmelknödeln in nichts nachstehen. In diesem Zusammenhang gilt mein besonderer Dank auch Nina und Carmen für die Bereitstellung der Räumlichkeiten für dererlei Veranstaltungen.

Der AG Scheffold und dem gesamten DRFZ (sowohl den aktuellen, als auch ehemaligen Mitgliedern) für die beste Arbeitsatmosphäre, die man sich vorstellen kann. Besonderer Dank gilt Sascha Rutz und Christian Neumann, für die unermüdliche Unterstützung an der Veröffentlichung des Papers. Danke Euch für die unerschöpflichen Ideen für die geeigneten Experimente und die Unterstützung bei deren Durchführung. Ohne Eure Hilfe wären meine Ergebnisse nicht ansatzweise zur Veröffentlichung gekommen. Für die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente gilt mein besonderer Dank weiterhin Nadine Matzmohr, Jonas Ahlers, Susan Brandenburg, Marko Jahnke, Andrej Mantei, Thordis Hohnstein und Manuela Dingeldey, die mir mit Rat und Tat bei Seite standen.

Ein großes Dankeschön für die Einführung in die Kunst der Auswertung von Array-Daten geht an Joachim Grün, Thomas Häupl und Andreas Grützkau. Für die Umsetzung der grafischen Darstellung und die gemeinsamen Arbeitswege danke ich besonders Jacqueline Hirscher. Dank Dir konnte ich mich mit Microsoft Office, Photoshop und dem Schnee in Berlin anfreunden.

Ein großer Dank gilt der Kaufmännischen Direktorin Petra, den Labmanagern: Heidi, Heidi, Tuula, Gudrun und Annette, den Betreuern der FACS Facility: Toralf, Jenny und Katharina, dem IT-Bereich: Hilmar, Hilmar und Falk, den Betreuern der Versuchstiere: Anja, Astrid, Kristina, Sabine, Helmut und Manuela, der Laborküche: Birgit, Angela und Regina, der Verwaltung: Christine, Tanja, Holger, Marion, Angela, Norbert, Katrin, Corinna, Katharina und Catja, der Bücherei: Beate, den Wissenschaftlichen Koordinatorinnen: Elke, Eva und Katrin, dem Lager: Carsten und Andreas, dem Empfang: Lutz und den Hauswarten: Sven,

Christian und Marco, sowie den Putzkräften, die alle im Hintergrund dafür sorgen, dass das Institut rund läuft und geforscht werden kann.

Für die fachlichen Diskussionen, die oftmals abschweiften, danke ich Andrey, Farzin, Ben und Christian.

Meinen Freunden danke ich für die Unterstützung und die Gelegenheiten der mentalen Zerstreuung.