

Aus der Klinik für Infektiologie und Mikrobiologie
Direktor: Prof. Dr. med. Jan Rupp

**Der Einfluss der HIF-1 α Stabilisierung auf die
Differenzierung und den Metabolismus von
humanen regulatorischen T-Zellen**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Universität zu Lübeck

- aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

Lea Marie Feldhoff

aus Bad Oldesloe

Lübeck 2017

- 1. Berichtstatter: Prof. Dr. med. Jan Rupp**
- 2. Berichtstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Malte Ziemann**

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2017
zum Druck genehmigt. Lübeck, den 13.12.2017
Promotionskommission der Sektion Medizin

1 Inhaltsverzeichnis

2	Abkürzungsverzeichnis	3
3	Zusammenfassung.....	6
4	Einleitung.....	8
4.1	Das Immunsystem	8
4.2	Die T-Zellen	9
4.3	Die Rolle von CD4 ⁺ T-Zellen während der Entzündung.....	11
4.4	Die Beeinflussung der regulatorischen Immunantwort	16
4.4.1	Der Einfluss von IL-1 β während der Entzündungsreaktion	16
4.4.2	Die Bedeutung des metabolischen Profils für Tregs	17
4.4.3	Die Rolle von HIF-1 α während der Entzündungsreaktion	18
4.5	Eigene Fragestellung	20
5	Material.....	22
5.1	Geräte.....	22
5.2	Verbrauchsmaterialien	22
5.3	Chemikalien und Reagenzien:	23
5.4	Puffer und Lösungen.....	26
5.5	Software	26
6	Methoden	27
6.1	Die Zellpräparation	27
6.1.1	Die CD4 ⁺ Zellisolation aus peripheren mononukleären Blutzellen	27
6.1.2	Die Zellsortierung der Tcons (CD8 ⁻ CD4 ⁺ CD25 ⁻ CD127 ^{high})	28
6.1.3	Die Treg/Th17 Polarisation.....	28
6.1.4	Die HIF-1 α Stabilisierung während der iTreg/iTh17 Polarisation.....	29
6.2	Analyse.....	29
6.2.1	Die durchflusszytometrische Analyse	29
6.2.2	Die Probengewinnung für die Western Blot Analyse	32
6.2.3	SDS-Page.....	32
6.2.4	Die Western Blot Analyse.....	33
6.3	Die Analyse des Metabolismus.....	34
6.3.1	Die Analyse der mitochondrialen Respiration	34
6.3.2	Die Analyse der glykolytischen Kapazität	35
6.4	Die Daten Analyse	36

7	Ergebnisse	37
7.1	Der Einfluss von IL-1 β auf die HIF-1 α Stabilisierung in iTregs.....	37
7.2	Der Einfluss von IL-1 β auf die Polarisierung von iTregs	40
7.3	Der Einfluss von DMOG auf die HIF-1 α Stabilisierung in iTregs	44
7.4	Der Einfluss von DMOG auf die Polarisierung von iTregs.....	45
7.5	Der Einfluss von Etx auf die HIF-1 α Stabilisierung in iTregs	46
7.6	Der Einfluss von Etx auf die Polarisierung von iTregs	48
7.7	Der Einfluss der HIF-1 α Induktion auf die Zytokinproduktion der iTregs	50
7.8	Der Einfluss der HIF-1 α Induktion in Tcons und FOXP3 ⁻ Zellen.....	53
7.8.1	Die HIF-1 α Expression in FOXP3 ⁻ Zellen.....	53
7.8.2	Die HIF-1 α und FOXP3 Expression in Tcons	54
7.9	Der Einfluss der HIF-1 α Induktion auf den iTreg Metabolismus.....	57
7.9.1	Die mitochondriale Respiration.....	57
7.9.2	Die Beeinflussung des Glukosemetabolismus.....	60
8	Diskussion	62
8.1	IL-1 β ist ein wichtiger Inhibitor der iTreg Differenzierung	62
8.2	HIF-1 α Stabilisierung mittels DMOG und Etx hemmt die iTreg Polarisation	63
8.3	HIF-1 α Stabilisierung hat keinen Einfluss auf die Zytokinproduktion in iTregs	65
8.4	Die Änderung des Metabolismus durch HIF-1 α Induktion ist abhängig vom jeweiligen Stimulus	67
8.5	Bedeutung und Ausblick.....	71
9	Literaturverzeichnis	75
10	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	86
10.1	Abbildungsverzeichnis.....	86
10.2	Tabellenverzeichnis.....	87
11	ANHANG	88
11.1	Danksagung	88
11.2	Lebenslauf.....	90
11.3	Veröffentlichungen und Kongressbeiträge.....	91

2 Abkürzungsverzeichnis

Verzeichnis, der in der Arbeit verwendeten Abkürzungen.

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AMPK	Adenosinmonophosphat aktivierte Proteinkinase
APC	<i>antigen-presenting cell</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-6	<i>B cell lymphoma 6 protein</i>
BS	Basale Respiration
Bzw.	Beziehungsweise
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CTLA-4	<i>cytotoxic T lymphocyte antigen 4</i>
DC	<i>dendritic cell</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMOG	Dimethylallylglycine, N-(Methoxyoxoacetyl)- glycine methylester
ECAR	<i>extracellular acidification rate</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	<i>et alia</i>
Etx	Etomoxir
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCCP	Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon
FKS	Fetales Kälberserum
FMO	<i>fluorescence minus one</i>
FOXP3	Forkhead-Box-Protein P3
GATA-3	GATA bindendes Protein 3
Glut-1	Glukose Transporter 1
HIF-1	Hypoxie induzierbarer Faktor 1
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IPEX	Immundysregulations, Polyendokrinopathie, Enteropathie X chromosomales Syndrom

2. Abkürzungsverzeichnis

iTregs	induzierbare regulatorische T-Zellen
MACS	<i>magnetic cell separation</i>
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MR	Maximale Respiration
mTOR	<i>mammalian target of Rapamycin</i>
mTORC	<i>mTOR Complex</i>
NFAT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
nTregs	natürliche regulatorische T-Zellen
OCR	<i>oxygen consumption rate</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PHD	Prolylhydroxylasen
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
RORγt	<i>retinoid-related orphan nuclear receptor γt</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SC	<i>spare capacity</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	<i>standard error of the mean</i>
STAT 3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
TCA	tricarboxylic acid cycle
Tcons	konventionelle T-Zellen
TCR	<i>T cell receptor</i>
Th Zellen	T-Helferzellen
Teffs	Effektor T-Zellen
TGF-β	<i>transforming growth factor -β</i>
TLR	<i>toll like receptor</i>
TNF-α	Tumornekrosefaktor- α
Tregs	Regulatorische T-Zellen
pVHL	von Hippel Lindau Protein

z.B.

zum Beispiel

2-DG

2-Desoxy-D-Glukose

3 Zusammenfassung

Tregs (regulatorische T-Zellen) sind eine T-Zellsubpopulation, die eine zentrale Rolle in der Kontrolle und Begrenzung von inflammatorischen Reaktionen spielt. Außerdem sind sie an der Entwicklung der zentralen und peripheren Toleranz beteiligt. Eine beeinträchtigte Treg Funktion kann mit chronischen Entzündungsprozessen oder Autoimmunerkrankungen assoziiert sein.

iTregs (induzierbare Tregs) differenzieren sich im peripherem Gewebe und können dabei unterschiedlichen Bedingungen wie z.B. (zum Beispiel) niedrigen Sauerstoffbedingungen (Hypoxie), pro-inflammatorischen Zytokinen oder Nährstoffmangel ausgesetzt sein. Diese Faktoren können die Differenzierung der iTregs beeinträchtigen, indem sie den Metabolismus der Zellen verändern und/oder HIF-1 α (Hypoxie induzierbaren Faktor 1 α) stabilisieren.

Versuche in der Maus haben gezeigt, dass eine HIF-1 α Stabilisierung in naiven T-Zellen die Differenzierung von iTregs hemmt. Die Rollen von HIF-1 α in humanen iTregs ist hingegen noch nicht eindeutig erforscht.

In dieser Arbeit wurden humane naive T-Zellen in iTreg polarisierenden Bedingungen untersucht. Im Mittelpunkt stand die Frage, ob die HIF-1 α Stabilisierung durch unterschiedliche Stimuli die Polarisierung der iTregs beeinflusst. Des Weiteren wurde der Einfluss der HIF-1 α Expression auf das metabolische Profil der iTregs untersucht. Zur Stabilisierung von HIF-1 α wurden drei unterschiedliche Ansatzpunkte verwendet. Das pro-inflammatorische Zytokin IL(Interleukin)-1 β , ein chemischer HIF-1 α Stabilisierer (DMOG, Dimethyloxallylglycin) und ein Inhibitor der β -Oxidation (Etx (Etomoxir)) wurden ausgetestet.

Es konnte gezeigt werden, dass HIF-1 α in humanen iTregs durch die drei Stimuli stabilisiert werden konnte. Während alle drei Stimuli HIF-1 α in humanen iTregs stabilisierten, hatten sie einen unterschiedlichen Einfluss auf das metabolische Profil der iTregs. Etx und DMOG reduzierten die mitochondriale Respiration der iTregs. IL-1 β hatte trotz der HIF-1 α Stabilisierung lediglich einen geringen Einfluss auf den iTreg Metabolismus.

Um die Unterschiede der verschiedenen Stimuli deutlicher herauszuarbeiten, wurden die aktivierten Signalkaskaden untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die HIF-

1 α Stabilisierung durch IL-1 β von mTORC1 (*mammalian target of Rapamycin Complex 1*) abhängig war. Wohingegen der mTORC1-Signalweg keine Rolle in der HIF-1 α Induktion durch DMOG und Etx spielte.

Zusammenfassend deuten die Daten darauf hin, dass die mitochondriale Respiration sowie die HIF-1 α Stabilisierung einen entscheidenden Einfluss auf die Regulation der humanen iTreg Differenzierung haben. In Abhängigkeit des umgebenden Milieus können demzufolge ganz unterschiedliche Stimuli über verschiedene Kaskaden die Differenzierung von iTregs beeinflussen und somit in die Regulation entzündlicher Reaktionen eingreifen.

4 Einleitung

4.1 Das Immunsystem

Alle Organismen sind äußeren Einflüssen und Gefahren ausgesetzt. Zum Schutz gegen Pathogene hat sich im Laufe der Evolution das Immunsystem entwickelt. Einfache Abwehrmechanismen wie die physikalische Barriere der Haut, extreme pH-Werte z. B. im Magen-Darm-Trakt und die Sekretion von Enzymen wie Lysozym in der Tränenflüssigkeit, verhindern das Eindringen potentieller Pathogene in den Organismus. Ist diese Barriere überwunden greifen komplexere Abwehrsysteme, die in das angeborene und das adaptive Immunsystem unterteilt werden. Beide Systeme zeichnen sich durch einen humoralen und einen zellulären Anteil aus [1].

Das angeborene Immunsystem ist für die schnelle Reaktion auf ein Pathogen verantwortlich, es reagiert innerhalb von Minuten. Das Erkennen von Fremdbestandteilen erfolgt über konservierte, ubiquitäre Strukturbestandteile der Pathogene [2]. Zum humoralen Teil zählt das Komplementsystem. Wichtige Zellen des angeborenen Immunsystems sind: Mastzellen, NK-Zellen (Natürliche Killerzellen), Makrophagen, Neutrophile, Basophile, Eosinophile Granulozyten und DCs (Dendritische Zellen).

Das adaptive Immunsystem interagiert mit dem angeborenen Immunsystem, es bildet eine antigenspezifische Immunantwort und kann ein immunologisches Gedächtnis ausbilden. Humorale Bestandteile des adaptiven Immunsystems sind die von Plasmazellen gebildeten Antikörper. Der zelluläre Anteil des adaptiven Immunsystems sind T- und B-Zellen. T-Zellen können weiter in zytotoxische T-Zellen mit dem Oberflächenmarker CD8 (*cluster of differentiation*) und in T-Helferzellen mit dem Oberflächenmarker CD4 unterteilt werden. Die Spezifität für unterschiedliche Antigene des adaptiven Immunsystems wird über eine breite Variabilität von B-Zellrezeptoren bzw. (beziehungsweise) Antikörpern und den TCR (*T cell receptor*) garantiert [1].

Im Zuge einer effektiven Immunantwort interagieren die Anteile des Immunsystems miteinander über direkte Zellinteraktionen und Mediatoren wie Zytokine [2]. Eine wichtige funktionelle Verbindung der Systeme stellen dabei die T-Zellen dar.

4.2 Die T-Zellen

T-Zellen entstehen im Knochenmark aus lymphatischen Vorläuferzellen und wandern im unreifen Zustand in den Thymus ein. Im Thymus erfolgt die weitere Reifung der T-Vorläuferzelle unter anderem durch Interaktion mit Thymuszellen [3]. Nach einer positiven und negativen Selektion entstehen CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen, die nach weiteren Entwicklungsschritten den Thymus in die Peripherie verlassen können [1]. Naive, nicht aktivierte oder T-Gedächtniszellen zirkulieren im lymphatischen Gewebe und Blutsystem. Ihr metabolisches Profil ist an diesen Zustand angepasst [4]. Ihre Energiegewinnung dient der Aufrechterhaltung der Zellgrundfunktionen, wie dem Ionen-transport und der Integrität der Zellmembranen [5]. Den überwiegenden Anteil des ATPs (Adenosintriphosphat) gewinnen sie durch oxidative Phosphorylierung, β -Oxidation und den TCA (*tricarboxylic acid cycle*). Die Glut-1 Expression der Zellen ist gering, was die Glukoseaufnahme aus dem extrazellulären Raum beschränkt [6] (**Abb. 4.1**). Infolge der T-Zellaktivierung im Zuge einer immunologischen Reaktion ändern sich die Ansprüche und energetischen Anforderungen der T-Zelle schlagartig [6],[7]. Aktivierte T-Zellen müssen sich schnell teilen, wachsen und ihre Effektorfunktionen ausüben. Stoffwechselwege wie der Glutamin- und Glukosemetabolismus werden hierbei hochreguliert und die Energiegewinnung über β -Oxidation und den TCA verlieren an Bedeutung [6]. Die Abhängigkeit vom Glukosemetabolismus wird durch die starke Hochregulierung der Expression von Glut-1 auf der Zelloberfläche deutlich [7]. Die Umstellung des Metabolismus im Zuge der T-Zellaktivierung ist essentiell und wird unter anderem durch den Transkriptionsfaktor *c-myc* herbeigeführt [7]. *c-myc* reguliert die Expression von Glut-1, der Laktatdehydrogenase A, der Hexokinase 2 und des Glutamin Transporters [8],[9]. Die bedeutenden Energiegewinnungswege nach der T-Zellaktivierung sind die Glykolyse und die Glutaminolyse [10] (**Abb. 4.1**). Die Umstellung des metabolischen Profils ist bedeutungsvoll, damit T-Zellen im Rahmen eines Entzündungsvorgangs ihre jeweilige Funktion effektiv ausüben können.

Der Mechanismus der Aktivierung der T-Zellen erfolgt z.B. im Zuge einer inflammatorischen Reaktion auf ein Antigen durch Interaktion mit Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Um auf die unterschiedlichsten Gefahren der Umwelt reagieren zu können, muss eine hohe Diversität der Antigenspezifität vorliegen. In T-Zellen wird diese Diversität unter anderem durch die

genetische Rekombination auf DNA (Desoxyribonukleinsäure)-Ebene der TCR-Untereinheit garantiert. Der TCR besteht aus zwei Untereinheiten, dessen hypervariable Bereiche die Epitope fragmentierter Antigene erkennen [11]. Die prozessierten Antigene werden von allen kernhaltigen Zellen auf MHC-I (*major histocompatibility complex*) Molekülen und von speziellen APCs (*antigene presenting cells*) auf MHC-II Molekülen präsentiert [1]. CD4⁺ T-Zellen interagieren mit fragmentierten Antigenen, die auf MHC-II Molekülen präsentiert werden, wohingegen CD8⁺ T-Zellen Proteine auf MHC-I Molekülen identifizieren [12]. Durch das Erkennen der prozessierten Antigene im Kontext des jeweiligen MHC Moleküls wird der TCR aktiviert [1]. Die vollständige Aktivierung der T-Zellen ist ein komplexer Prozess der neben der TCR-Aktivierung, ko-stimulierende Signale durch andere Immunzellen und Rezeptoren, sowie stimulierende Zytokine, wie z.B. IL-2 erfordert [1]. Die Aktivierung der T-Zellen führt zur Signalweiterleitung mittels des TCR-Korezeptors CD3 und Aktivierung intrazellulärer Signalwege. Eine zentrale Rolle spielt die Aktivierung des NF- κ B- (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) und des NFAT- (*nuclear factor of activated T cells*)-Signalwegs, die die Proliferation, Differenzierung und Zytokinproduktion der jeweiligen T-Zelle fördern [13].

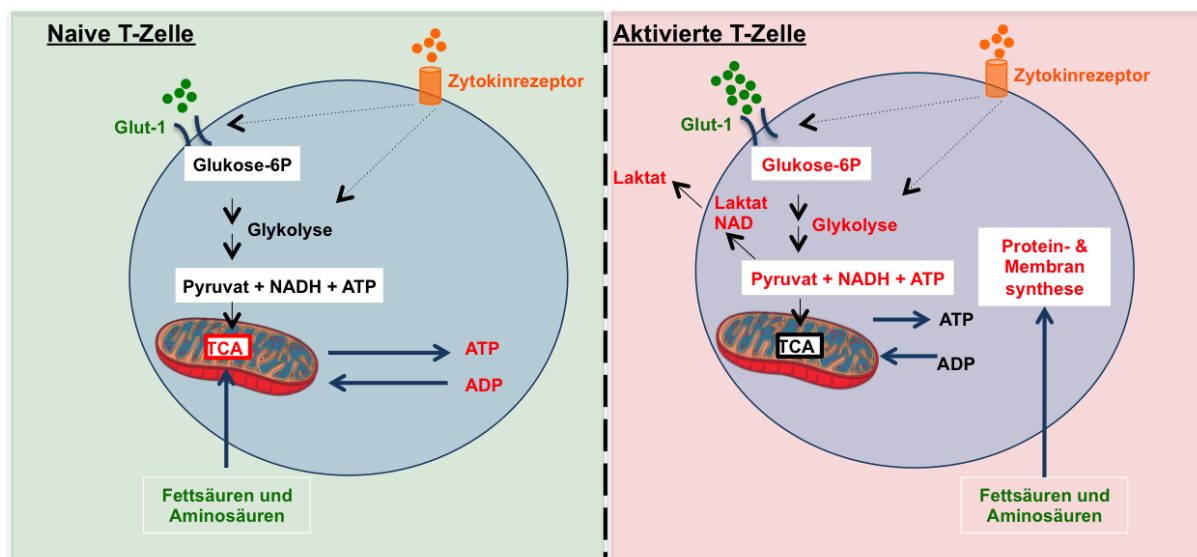


Abb. 4.1 Umstellung des T-Zellmetabolismus nach der TCR Stimulierung. Naive T-Zellen gewinnen ihre Energie hauptsächlich über den TCA. Die niedrige Glut-1 Expression und die Zytokinstimulation unterstützen dieses metabolische Profil. Nach der Aktivierung der T-Zelle wird der Metabolismus auf die glykolytischen Stoffwechselwege umgestellt. Die Glut-1 Expression sowie die der glykolytischen Enzyme werden hierbei hochreguliert. Fett- und Aminosäuren werden nicht in den TCA eingeschleust, sondern zur Proteinbiosynthese und Membransynthese verwendet (nach Barbi et al., 2013).

Im Rahmen einer Entzündungsreaktion interagieren CD4⁺ T-Zellen mit unterschiedlichen Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems, um diese zu aktivieren, zu inhibieren oder zu rekrutieren [14].

4.3 Die Rolle von CD4⁺ T-Zellen während der Entzündung

Es existieren unterschiedliche CD4⁺ Subpopulationen, die im Rahmen einer Entzündung unterschiedliche Aufgaben übernehmen [1]. Die Einteilung der CD4⁺ Subpopulation erfolgt anhand der Zytokinproduktion und der Expression von bestimmten Transkriptionsfaktoren [1], (**Abb. 4.2**). Nach Aktivierung der T-Zelle über den TCR und weiterer ko-stimulierender Signale wird die Differenzierung der T Zellen hauptsächlich durch Zytokine beeinflusst [15]. Klassischerweise galt diese Differenzierung der einzelnen CD4⁺ T-Zellsubpopulationen als dauerhaft. Aktuell wird die Differenzierung der Subpopulationen als ein plastischer Prozess verstanden. Die Produktion der Zytokine und Transkriptionsfaktoren der einzelnen Subpopulationen kann transient vorkommen und ist abhängig von dem umgebenden Milieu [15].

Obwohl der Übergang zwischen den CD4⁺ Subpopulationen fließend ist, hat die Einteilung in die Subpopulationen weiterhin Bestand. Wie bei der Aktivierung der T-Zellen spielt auch für die Funktion der Subpopulationen das metabolische Profil eine entscheidende Rolle [16]. Eine wesentliche Bedeutung in der Unterstützung der zellulären Immunantwort spielen Th1 Zellen (T-Helferzellen). Für ihre Polarisation wird IFN- γ (Interferon) und IL-12 benötigt und als linienspezifische Transkriptionsfaktor gilt T-bet [17]. Th1 Zellen produzieren IFN- γ und sind an der Eradikation von intrazellulären Erregern beteiligt. Während des entzündlichen Prozesses, interagieren Th1 Zellen insbesondere mit Makrophagen und NK-Zellen [18]. Für eine effektive Immunantwort muss das humorale System des spezifischen Immunsystems aktiviert werden. An dieser Aufgabe sind Th2 Lymphozyten beteiligt. Th2 Zellen wirken an der Aktivierung von B-Zellen mit und können über die Zytokinproduktion einen Antikörper-Isotypenwechsel in den B-Zellen herbeiführen. Außerdem unterstützen Th2 Zellen die Eradikation von extrazellulären Pathogenen und die Abwehr von Parasiten über die Interaktion mit Eosinophilen Granulozyten. Für die Th2 Zelldifferenzierung und die Expression des spezifischen Transkriptionsfaktors GATA-3 (GATA bindendes Protein 3) wird IL-4 benötigt [15],[18]. Eine weitere Subpopulation, die die humorale Immunantwort unterstützt, sind die folliculären CD4⁺ Zellen. Sie wurden in Lymphfollikeln nachgewiesen und

sind an der Reifung von B-Zellen beteiligt. Für die folliculäre T-Zellentwicklung ist IL-6 erforderlich, folliculäre T-Zellen produzieren IL-21 und exprimieren den Transkriptionsfaktor Bcl-6 (*B cell lymphoma 6 protein*) [1]. Eine wichtige Verbindung zwischen dem adaptiven und dem angeboren Immunsystem stellen die Th17 Zellen dar. Sie sind definiert durch die Produktion von IL-17A und IL-17F [19],[20]. Th17 Zellen exprimieren den zelllinienspezifischen Transkriptionsfaktor ROR γ t (*retinoid-related orphan nuclear receptor γ t*) [18]. In der Dynamik einer Entzündungsreaktion entstehen Th17 zu einem frühen Zeitpunkt [1]. Th17 Zellen differenzieren sich in Anwesenheit von IL-6, TGF- β (*transforming growth factor β*) und IL-1 β [19],[21],[22]. IL-23 spielt eine Rolle in der Aufrechterhaltung des Th17 Zellprofils [21]. Th17 Zellen sind an der Abwehr von extrazellulären Pathogenen beteiligt [23]. Das IL-17 Signal unterstützt das pro-inflammatorische Milieu, indem die Produktion von inflammatorischen Mediatoren in Fibroblasten und Epithelzellen induziert wird [23]. Diese Mediatoren stimulieren die Granulopoese und führen zur Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten [24]. Neben der Initiierung der frühen Immunantwort unterstützen Th17 Zellen die B-Zellaktivierung und damit die humorale Immunantwort. In Makrophagen und DCs wird sowohl die Th1 polarisierende Zytokinproduktion induziert als auch die B-Zellen Aktivierung, Proliferation und Homöostase über den IL-17 Rezeptor direkt beeinflusst [25]–[27]. Für die Funktion und Polarisation von Th17 Zellen ist die aerobe Glykolyse erforderlich [28].

Ebenso bedeutend wie die Initiierung einer Immunantwort, ist das Beenden und die Beschränkung der inflammatorischen Reaktion, damit durch den Prozess kein Schaden entsteht. Eine wichtige CD4⁺ Subpopulation, die an der Begrenzung von immunologischen Prozessen beteiligt ist, sind die Tregs. Humane Tregs sind charakterisiert durch die Expression von CD4, CD25 und den Transkriptionsfaktor FOXP3 (*Forkhead-Box-Protein P3*), dessen DNA-Lokus in humanen Tregs spezifisch demethyliert ist [29],[30]. Die Gruppe der FOXP spielen allgemein eine Rolle in der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose [31]. Die Proteine besitzen eine monomere DNA-Bindungsdomäne und fungieren als Genexpression aktivierende Transkriptionsfaktoren [32]. FOXP3 wird nicht ausschließlich in Tregs exprimiert, sondern ebenfalls in aktivierten humanen T-Zellen transient hochreguliert [33]. Zudem existieren FOXP3⁻ T-Zellen mit regulatorischen Funktionen [1],[33]. Die FOXP3⁺ Tregs werden unterteilt in nTregs (natürliche Tregs) und iTregs. nTregs differenzieren sich bereits während der positiven Selektion im Thymus [34],[35]. Eine

hoch affine MHC:TCR Interaktion führt in nTregs zu einer konstanten FOXP3 Expression [36]–[38]. iTregs differenzieren im peripherem Gewebe aus naiven CD4⁺ T-Zellen bzw. Tcons (konventionelle T-Zellen) [39]. Für die iTreg Differenzierung werden die Zytokine IL-2 und TGF- β benötigt [40].

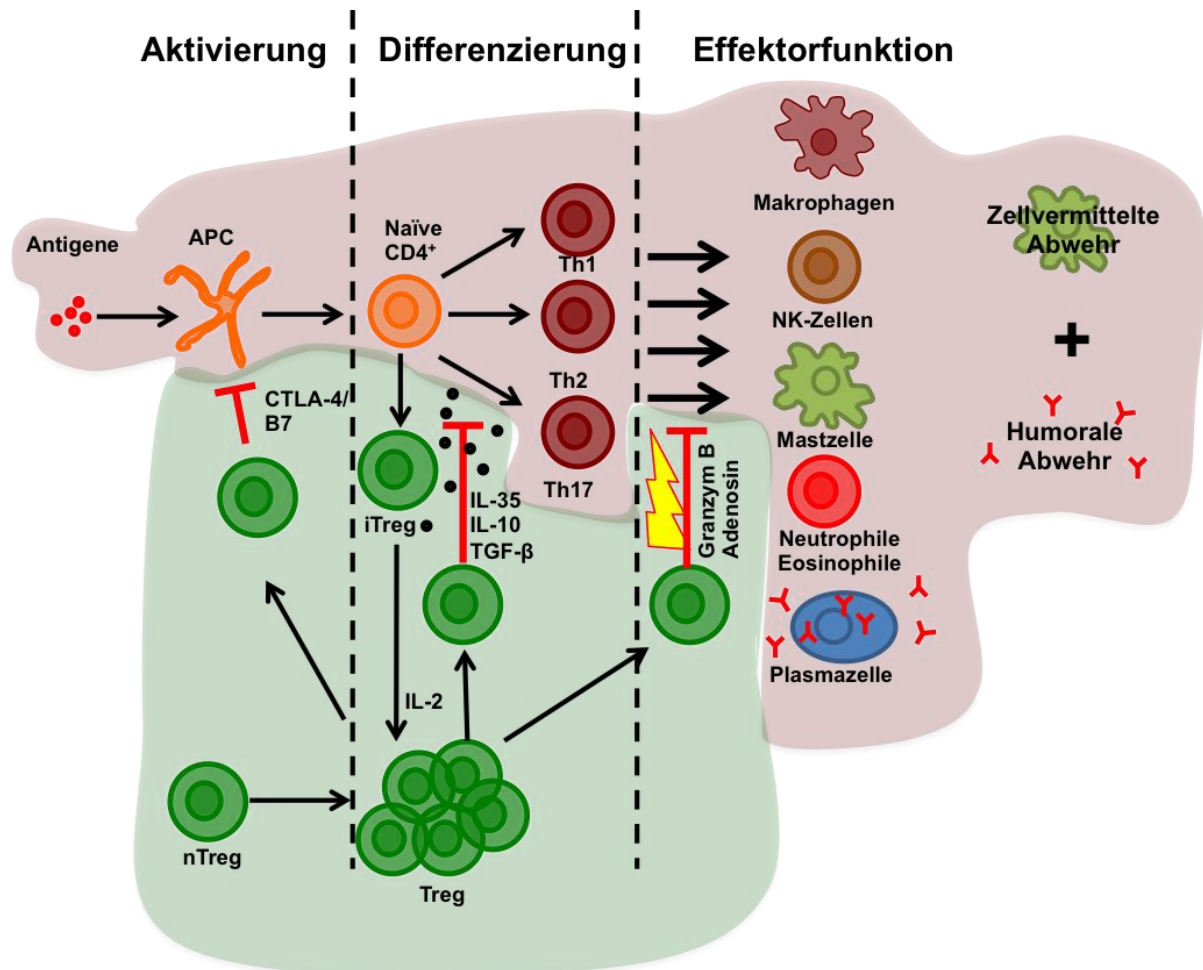


Abb. 4.2 Die Rolle von CD4⁺ Zellen während der Inflammation. Naive T-Zellen differenzieren nach der Aktivierung durch APCs in unterschiedliche Subpopulationen. Die T-Effektorzellen (Th1, Th2, Th17) aktivieren und unterstützen Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Der Pool der Tregs ergibt sich aus iTregs und nTregs, die bereits bei niedrigen Konzentrationen proliferieren. Sie inhibieren die Funktion der CD4⁺ Zellen auf multiplen Ebenen. Erstens durch einen proliferativen Vorteil während der Differenzierung, zweitens durch Hemmung der APCs, drittens durch inhibitorische Zytokine und viertens durch Zelllyse der Effektorzellen.

Um einen entzündlichen Prozess einzudämmen, supprimieren Tregs die Aktivität und klonale Expansion von naiven und Teffs (Effektor T-Zellen) [34]. Außerdem inhibieren Tregs die Effektorfunktion von DCs, B-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen, um die inflammatorische Immunantwort zu beenden und einzuschränken [41],[42].

Bisher sind vier verschiedene Mechanismen bekannt, durch die Tregs andere Zellen supprimieren (**Abb. 4.2**), [43].

Aktivierte Tregs produzieren die Zytokine IL-10, TGF- β und IL-35, um andere Immunzellen zu hemmen. IL-10 bremst die Differenzierung von Th1 und Th2 Zellen durch das Herunterregulieren von MHC-II und CD80/CD86 Molekülen auf APCs. IL-10 vermittelt außerdem eine Hemmung der Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen und führt im Allgemeinen zu einer verminderten T-Zellproliferation und B-Zell Differenzierung [44]. TGF- β hemmt besonders die Proliferation von Lymphozyten [45]. Eine besonders wichtige Rolle spielen IL-10 und TGF- β bei der Begrenzung der Immunantwort im Zuge von chronischen Infektionen (z.B. mit *Mycobacterium tuberculosis*), bei allergischen Reaktionen oder bei chronisch entzündlichen Organerkrankungen [44],[46]–[49]. IL-35 unterstützt die maximale inhibitorische Kapazität von Tregs [50].

IL-2 ist ein wichtiger Proliferationsfaktor für T-Zellen. Im Gegensatz zu naiven T-Zellen oder Teffs, exprimieren Tregs die α -Untereinheit des IL-2 Rezeptors konstitutiv [1]. Dadurch werden sie bereits bei niedrigen IL-2 Konzentrationen zur Proliferation stimuliert [51]. Zusätzlich wird diskutiert, dass Tregs IL-2 „verbrauchen“ und es so nicht mehr als Proliferationssignal für andere Zellen dienen kann [1]. Eine weitere wichtige Rolle spielt das von Tregs freigesetzte Adenosin. Adenosin hemmt die Proliferation von Teffs direkt und indirekt durch die Modulation der Zytokinproduktion zugunsten von anti-inflammatorischen Zytokinen [52],[53].

Des Weiteren modulieren Tregs die Reifung und Funktion von DCs. Tregs exprimieren CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen 4*) und interagieren damit mit CD86/CD80, welches auf DCs exprimiert wird [1]. Durch CD86/CD80 der DCs wird ein wichtiges ko-stimulierendes Signal in der Aktivierung von Immunzellen vermittelt [1]. CTLA-4 reguliert diese ko-stimulierenden Molekülen auf DCs herunter und blockiert sie, wodurch Teffs weniger effizient aktiviert werden können und die Rekrutierung von Immunzellen an den Entzündungsort eingeschränkt wird [54]–[56].

Außerdem wird eine Treg vermittelte Zellyse diskutiert. Die genauen Mechanismen und die Bedeutung der direkten Zellyse für die Treg Funktion sind noch nicht eindeutig geklärt. Eine Granzym B-abhängige Inhibierung der B-Zellproliferation konnte allerdings in Ko-Kulturexperimenten nachgewiesen werden [57]. Des

Weiteren führte eine Granzym-B Defizienz *in vitro* zu einer verringerten inhibitorischen Funktion von murinen Tregs [58].

Eine gestörte oder verminderte Treg Funktion kann dazu führen, dass ein inflammatorischer Prozess nicht effektiv kontrolliert werden kann und spielt eine Rolle in der Pathophysiologie von chronischen Entzündungsprozessen und der Entstehung von Autoimmunerkrankungen. Mutationen im FOXP3 Gen führen zu einer defekten Treg Entwicklung und können von syndromalen Erkrankungen begleitet sein (z.B. vom IPEX-Syndrom (Immudysregulations, Polyendokrinopathie, Enteropathie X chromosomales Syndrom)) [59]. Erste Symptome dieses Syndroms treten typischerweise bereits in der perinatalen Periode mit unterschiedlich stark ausgeprägten Autoimmunphänomenen auf [59]. Des Weiteren kann es zu multiplen chronischen Entzündungen kommen, die mit einer enorm gesteigerten Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen einhergehen [60]. Die zentrale Bedeutung von Tregs im Zuge von Autoimmunerkrankungen und chronischen inflammatorischen Prozessen wird deutlich, wenn man die Häufigkeit und Funktion der Tregs der betroffenen Patienten untersucht. Ein verringerter Anteil an Tregs oder eine verminderte Funktionalität der Tregs konnte unter anderem in Patienten mit Systemischem Lupus Erythematodes, Diabetes mellitus Typ 1, Multiples Sklerose, Aplastischer Anämie oder *Graft-versus-host*-Reaktionen nachgewiesen werden [61]–[63].

Faktoren, die die Treg Funktion und Entwicklung beeinflussen, könnten folglich eine ursächliche Rolle in der Pathophysiologie von Autoimmunerkrankungen und chronischen Entzündungsprozessen spielen. Möglicherweise könnte über die Beeinflussung dieser Faktoren die Entstehung oder Aufrechterhaltung des Entzündungsprozesses verändert werden.

4.4 Die Beeinflussung der regulatorischen Immunantwort

Die regulatorische Immunantwort wird durch das Zusammenspiel vieler Faktoren beeinflusst. Sie kann im Wesentlichen vom inflammatorischen Milieu, dem Zellmetabolismus, dem Angebot an Nährstoffen und durch die Sauerstoffbedingungen des Gewebes beeinflusst werden.

4.4.1 Der Einfluss von IL-1 β während der Entzündungsreaktion

Das inflammatorische Milieu beeinflusst unter anderem die Differenzierung von iTregs. Hierbei bestimmen insbesondere die Anwesenheit und Zusammensetzung der Zytokine die Polarisation. Ein essentielles pro-inflammatorisches Zytokin, des frühen entzündlichen Prozesses ist IL-1 β [21],[64]. Im Zuge einer akuten Entzündung wird durch die Stimulation von TLR (*toll like receptor*), mit Endotoxinen die Bildung von IL-1 β Vorläufermolekülen induziert. Nach lysosomaler Modifikation wird IL-1 β exozytotisch von Immunzellen sekretiert [65]. Der Rezeptor für IL-1 β Typ 1 befindet sich auf nahezu allen Körperzellen, seine Aktivität wird durch einen Antagonisten reguliert [66]. Das IL-1 β Rezeptorsignal wird intrazellulär über den NF- κ B-Signalweg vermittelt [67]. Der IL-1 β Rezeptor Typ 2 bindet IL-1 β ohne das Signal intrazellulär weiterzuleiten und trägt damit zur Begrenzung des inflammatorischen Signals bei [66]. IL-1 β als ein wichtiges pro-inflammatorisches Zytokin spielt eine Rolle im Zuge des septischen Schocks, in der Pathophysiologie von Diabetes mellitus Typ 1 und multiplen inflammatorischen Erkrankungen wie z.B. der Juvenilen Ideopathischen Arthritis [68]. Durch die IL-1 β Rezeptoraktivierung in Endothelzellen kommt es zur Stimulierung der Prostaglandin E₂ Synthese, was unter anderem eine Erhöhung der Körperkerntemperatur herbeiführt [66]. In Neuronen des Hypothalamus bewirkt IL-1 β die Ausschüttung des *Corticotropin Releasing Hormons* [68]. Des Weiteren vermittelt IL-1 β die CD14 Expression auf Makrophagen und Monozyten [66]. CD14 spielt eine wichtige Rolle in der entzündlichen Reaktion insbesondere in der Abwehr von bakteriellen Erregern [66]. IL-1 β verstärkt zudem die Reifung und Freisetzung von Neutrophilen Granulozyten [66]. Außerdem fördert IL-1 β die IL-6 Produktion und unterstützt die Differenzierung und IL-17 Produktion von Th17 Zellen [69]. Für Tregs hat IL-1 β eine wesentliche Bedeutung. IL-1 β hemmt die Proliferation der iTregs und führt zu einer Differenzierung von nTregs in FOXP3⁻ Zellen [61]–[63],[70]. Diese Ergebnisse weisen auf einen negativen Einfluss von IL-1 β auf FOXP3⁺ Tregs im Verlauf des entzündlichen Prozesses hin.

Neben dem pro-inflammatorischen Milieu bestimmt das metabolische Profil die Funktion und Differenzierung von Tregs.

4.4.2 Die Bedeutung des metabolischen Profils für Tregs

Die CD4⁺ Subpopulationen haben ein unterschiedliches metabolisches Profil, welches durch die Expression diverser Faktoren bestimmt wird [71]. In der Proliferation und im Metabolismus von T-Zellen nimmt mTOR eine zentrale Rolle ein. mTOR ist eine Kinase, die aus den zwei Untereinheiten, mTORC1 und mTORC2, besteht. mTOR wird in den CD4⁺ Subpopulationen unterschiedlich stark exprimiert. In aktivierten Teffs wird mTOR exprimiert und unterstützt unter anderem die Hochregulierung des glykolytischen Metabolismus [72]. In Tregs hingegen wird mTOR nur gering bzw. oszillierend exprimiert, was die geringe Bedeutung des glykolytischen Metabolismus in den Tregs unterstreicht [7]. Tregs gewinnen ihre Energie hauptsächlich über die β -Oxidation [7]. Im Gegensatz zu mTOR, wird die AMPK (Adenosinmonophosphat aktivierte Proteinkinase) in Tregs stark exprimiert [7]. AMPK wird hauptsächlich über das ADP/ATP (Adenosindiphosphat/ATP) Verhältnis in den Zellen reguliert. Die AMPK Stabilisierung führt zur Aktivierung der β -Oxidation und hemmt die Lipidsynthese. AMPK führt zu einer Reduktion der Expression von Glut-1 auf der Zelloberfläche von Tregs und limitiert damit die Glukoseaufnahme in die Zelle [73]. Außerdem ist AMPK der „Gegenspieler“ von mTORC1 und unterdrückt dessen Aktivierung [74].

Es konnte gezeigt werden, dass das metabolische Profil nicht nur zellspezifisch unterschiedlich ist, sondern zusätzlich die T-Zellfunktion und Differenzierung beeinflusst [28],[73]. Die Inhibition glykolytischer Stoffwechselwege in naiven CD4⁺ Zellen führte zur verstärkten Treg Differenzierung und verringerte die Th17 Polarisierung [4],[28],[75]. Th17 Zellen sind besonders abhängig von glykolytischen Stoffwechselwegen, daher kommt es schon zu Beginn ihrer Differenzierung zur Stabilisierung der glykolytischen Gene [28],[40]. *In vivo* führte das Überangebot von Glukose und die erhöhte Glut-1 Expression in T-Zellen zu einer präferenziellen Entwicklung von Teffs [73]. Dagegen führte die Inhibition der β -Oxidation zur verringerten iTreg Differenzierung, während das Überangebot an Lipiden die Differenzierung von Tregs fördert und die von Teffs verringert [73]. So kann über die Beeinflussung des metabolischen Profils und des Nährstoffangebots die Treg Differenzierung direkt induziert oder gehemmt werden.

Die Sauerstoffkonzentration spielt eine wesentliche Rolle in der Regulation des Metabolismus und hat einen bedeutenden Effekt auf das Nährstoffangebot. Zusätzlich zum Metabolismus, haben niedrige Sauerstoffkonzentrationen (Hypoxie) ebenfalls einen direkten Einfluss auf die iTreg Differenzierung.

4.4.3 Die Rolle von HIF-1 α während der Entzündungsreaktion

In lymphatischen und entzündeten Geweben herrschen niedrige Sauerstoffkonzentrationen von ungefähr 0,5-4,5% vor, an diese Bedingung müssen sich T-Zellen anpassen können [28],[67],[76]. Unter niedrigen Sauerstoffkonzentrationen werden unterschiedliche Regulationsmechanismen aktiviert, eine besondere Bedeutung hat dabei HIF-1. HIF-1 gehört zu den Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktoren [77]. HIF-1 besteht aus zwei Untereinheiten. Während die β -Untereinheit konstitutiv exprimiert wird, wird die α -Untereinheit unter normoxischen Bedingungen abgebaut [77]. Die α -Untereinheit wird durch von pVHL (Hippel Lindau Protein) gebunden und darauf folgend von Eisen(II)- und O₂-abhängigen PHD (Prolylhydroxylasen) für die Ubiquitinierung markiert [78]. Die Ubiquitinierung führt zum proteasomalen Abbau von HIF-1 α [78]. Die Aktivität der PHD wird durch niedrige Sauerstoffkonzentrationen, einen verringerten Eisen(II)-gehalt, erhöhte Stickoxid-Konzentrationen, durch ROS (*reactive oxygen species*) oder Metabolite des TCA eingeschränkt [79],[80]. Asparaginhydroxylasen ermöglichen die Assoziation HIF-1 mit Ko-aktivatoren [79],[80]. Des Weiteren wird HIF-1 α translational durch IL-1 β und Adenosin sowie transkriptional über NF- κ B oder NFAT Aktivierung und Lipopolysaccharid Stimulierung induziert [81]–[84].

Als Transkriptionsfaktor ist HIF-1 α an der Regulation von unterschiedlichen Genen beteiligt. Die Genprodukte von HIF-1 α spielen eine Rolle in der Angiogenese, der Zellproliferation, dem Zellüberleben, der Erythropoese, der Eisen- und Energiehomöostase sowie dem Metabolismus [77],[85].

Besonders der Metabolismus wird von HIF-1 α auf multiplen Ebenen beeinflusst. Durch die erhöhte Transkription von Glut-1 kann vermehrt Glukose in die Zelle aufgenommen werden [85]. Zudem wird die Pyruvatdehydrogenase-1 hochreguliert, wodurch die Umwandlung von Pyruvat in Acetyl-CoA und dadurch die Aktivität des TCA verringert wird [85]. Zusätzlich wird die oxidative Phosphorylierung durch die HIF-1 α Stabilisierung verringert [86]. Außerdem werden glykolytische Enzyme induziert, wie unter anderem die Laktatdehydrogenase, die Hexokinase 2, Enolase 1,

Glukose-6-Phosphat-Isomerase [28],[87]. Folglich verringert die HIF-1 α Stabilisierung die mitochondriale Respiration und Fettsäuresynthese und steigert die anaerobe Glykolyse.

HIF-1 α spielt zudem eine wichtige Rolle in der Modulation von inflammatorischen Signalen. Zum einen wird HIF-1 α neben hypoxischen Signalen durch inflammatorische Signale stabilisiert, zum anderen beeinflusst die HIF-1 α Induktion den entzündlichen Prozess und spielt eine wesentliche Rolle in der Differenzierung, der Funktion und der Entwicklung von CD4⁺ T-Zellen [88]. Die Induktion des entzündlichen Signals durch HIF-1 α wird unter anderen über die Differenzierung von Th17 Zellen vermittelt [50]. Hypoxie führt in T-Zellen zu einer moderaten HIF-1 α Induktion, wohingegen die TCR-Stimulierung und inflammatorische Zytokine wie IL-6 HIF-1 α stärker stabilisieren [28],[89]. Die Stimulierung des TCR führt über den PI3K/mTOR (Phosphoinositid-3-Kinasen) Signalweg zur HIF-1 α -Stabilisierung. Die HIF-1 α -Stabilisierung durch IL-6 hingegen, wird über STAT3 (*signal transducer and activator of transcription*) vermittelt und führt zu einem stabilen und lang anhaltenden HIF-1 α Signal [28]. Neben dem Mechanismus des proteasomalen Abbaus kommt der transkriptionellen Stabilisierung von HIF-1 α in T-Zellen eine besondere Bedeutung zu [90].

In vielen Zellen sorgt HIF-1 α für eine anabole Stoffwechsellage und eine Umstellung auf glykolytische Stoffwechselwege. Während der essentiellen Aktivierung der aeroben Glykolyse im Zuge der T-Zellaktivierung spielt HIF-1 α jedoch eine untergeordnete Rolle [10]. Allerdings hat HIF-1 α einen wesentlichen Einfluss auf die Stabilisierung und die Aufrechterhaltung des glykolytischen metabolischen Profils in Th17 Zellen [4],[91].

4.5 Eigene Fragestellung

HIF-1 α ist ein wichtiger Sensor für die Umgebung der Zelle und spielt eine zentrale Rolle im Rahmen einer Entzündungsreaktion. Im Zuge der Entzündungsreaktion kann HIF-1 α durch niedrige Sauerstoffkonzentrationen und pro-inflammatorische Signale stabilisiert werden und ist intrazellulär in hohen Konzentrationen vorhanden. HIF-1 α beeinflusst die Expression bestimmter Gene und kann den Metabolismus der entsprechenden Zelle an die Bedingungen anpassen. Zusätzlich unterstützt HIF-1 α die pro-inflammatorische Reaktion durch unterschiedliche Mechanismen. Hier sind vor allem Tregs ein interessanter Ansatzpunkt. In murinen Zellen wird HIF-1 α als negativer Regulator der Treg Differenzierung diskutiert und gilt als nicht vereinbar mit einer stabilen FOXP3 Expression [28],[40],[91]. Unter physiologischen Bedingungen könnte über eine HIF-1 α Expression die Treg vermittelten Auflösung der Entzündung verhindert werden. Pathologisch könnte eine gestörte Balance in der HIF-1 α Stabilisierung zu einer anhaltenden, chronischen Entzündungsreaktion führen. Der Einfluss von HIF-1 α auf humane Tregs wurde bisher wenig untersucht. Daher ist es wichtig die Rolle von HIF-1 α in der Differenzierung von Tregs und die vermittelten Effekte auf den Entzündungsprozess genauer zu erforschen.

Neben der Hypothese, dass HIF-1 α durch unterschiedliche Stimuli in humanen iTregs stabilisiert werden kann, sollte untersucht werden, welche Signalwege über HIF-1 α Expression in humanen iTregs aktiviert werden. Des Weiteren stand die reziproke Beeinflussung von HIF-1 α und dem metabolischen Profil im Fokus der Analysen.

Die konkreten Ziele der Arbeit waren:

- die Induktion oder Stabilisierung von HIF-1 α in humanen iTregs durch unterschiedliche Stimuli zu untersuchen
- den Einfluss von HIF-1 α auf die iTreg Differenzierung und die Zytokinproduktion der iTregs zu untersuchen
- den Einfluss von HIF-1 α auf das metabolische Profil der iTregs zu analysieren

Ein besseres Verständnis in der Rolle von HIF-1 α in der Differenzierung und Balance der T-Zellantworten könnte zur Aufklärung der Entstehung oder Erhaltung chronischer Entzündungen führen. Letztendlich könnte HIF-1 α oder ein abhängiger Signalweg neue Therapieansätze bieten, um eine solche Reaktion zu beeinflussen.

5 Material

5.1 Geräte

AutoMACSPro	Miltenyi Biotec, AnnAuburn, CA, USA
Blotapparatur Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Benchtop analyzer LSR II	BD Bioscience, USA
<u>Brutschränke (37°C, 5% CO₂)</u>	
Forma Series II 3131	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MS, USA
Typ: BB6220	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
myTEMPMini H2200-H	Benchmark Scientific, Edison NJ, USA
Cell Sorter FACS (<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>) Aria III	BD Bioscience, USA
Elektrophoresekammer Mini-Protean Tetra	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Heizblock PCH-2	Grants-Instruments Ltd, Shepreth, GB
Imagingsystem Fusion FX7	Vilber Lourmat GmbH, Eberhardzell
Magnetrührer, RMO	Gerhardt GmbH, Königswinter
MoFloLegacy	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
pH-Meter MP220	Mettler Toledo, Gießen
<u>Sicherheitswerkbänke</u>	
EN 12469	Clean Air Techniek B.V., Woerden, NL
SterilGard Hood Class IIA/B3	Baker Company, Stanford, ME, USA
Vakuumpumpe Laboport	KNF neoLab, Heidelberg
Vortex Schüttler REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH, Schwalbach
<u>Zentrifugen</u>	
Centrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
Megafuge 2.0 R	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Multifuge 3 S-R	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
XF ^e 24 Extracellular Flux Analyzer	SeahorseBioscience, Kopenhagen, DK
5.2 Verbrauchsmaterialien	
24-, 96 well- Platten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Blotpapier	Schleicher & Schuell, Dassel

Gelkämme: Mini Protean 3 (1,0 mm)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Glasplatte: Mini Protean 3 (1,0 mm)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
MACS-(<i>Magnetig cell seperation</i>) Säulen LS	MiltenyiBiotec, AnnAuburn, CA, USA
Neubauer Zählkammer	Hassa Laborbedarf, Lübeck
Nitrocellulosemembran Protean	Whatman Inc, Florham Park, NJ, USA
Pipetten Eppendorf Reference 10,100, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen Biosphere filter tips, 10 100, 1000 µl	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Röhrchen (12,15, 50 mL)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
XF24 Zellkulturplatten	SeahorseBioscience, Kopenhagen, DK
XF24 Kalibrationsplatten	SeahorseBioscience, Kopenhagen, DK

5.3 Chemikalien und Reagenzien:

1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Acylamid/Bisacrylamid	BioRad laboratories GmbH, München
Anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads	Invitrogen, Grand Island, NY, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Brefeldin A	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Bromphenolblau	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Bovines Serum Albumin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
CD4-Isolation Kit II	MiltenyiBiotec, AnnAuburn, CA, USA
CellTak	BD Bioscience, USA
<u>CompBeads</u>	
Anti-Mouse Ig, κ	BD Bioscience, USA
Anti-Rat Ig, κ	BD Bioscience, USA
DMOG (Dimethyloxalylglycine)	Cayman Chemical Company, AnnArbor, MI, USA
Fixation/permeabilization Buffer	eBioscience, San Diego, CA, USA
Glycerol	Merck KGaA, Darmstadt
Glycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
EtX (Etomoxir)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Durchflusszytometrie Antikörper

CD3-PE	ebioscience, San Diego, CA, USA
CD8-FITC	BD Bioscience, USA
CD25-APC	BD Bioscience, USA
CD127-PE	BeckmanCoulter, Fullerton, CA, USA
FOXP3- e660	ebioscience, San Diego, USA
Glut-1-AlexaFluor700	R&D Systems, Boston, MA, USA
HIF-1 α	Cayman chemicals, AnnArbor, MI, USA
Zenon af488 labeling Kit	Life Technology, Grand Island, NY, USA
IL-17-PE	ebioscience, San Diego, CA, USA
IFN- γ -PECY7	BD Bioscience, USA
Cell Tracker violet	BD Bioscience, USA
LIVE/DEAD auqua	BD Bioscience, USA
Fixable Dead Cell Stain Kit	Invitrogen, Grand Island, NY, USA
Ki67-PerCP-Cy5.5	BD Bioscience, USA
Ficoll-Paque PLUS	GE Healthcare, Fairfield, CT, USA
FKS (Fetales Kälberserum)	GE Healthcare, Fairfield, CT, USA
Humanes IgG	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
KCL (Kaliumchlorid)	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt
<u>Medium</u>	
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Life Technology, Grand Island, USA
XF Assay Medium	SeahorseBioscience, Kopenhagen, DK
XF Calibrant	SeahorseBioscience, Kopenhagen, DK
X- vivo 15 serum free media	Lonza, Basel, CH
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Monensin	eBioscience, San Diego, CA, USA
NaCl (Natriumchlorid)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat- Mono-Hydrat (NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O)	Merck KGaA, Darmstadt
N',N',N',N'-Tetramethylethylen-diamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Permeabilization Buffer	eBioscience, San Diego, CA, USA
PMA(Phorbol-12-myristat-3-acetat)	Sigma-Alderich, St. Louis, MO, USA
PX-478	MedKoo Bioscience, NC, USA
Rapamycin	Sigma-Alderich, St. Louis, MO, USA
Rattenserum	eBioscience, San Diego, CA, USA
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Merck KGaA, Darmstadt
Super Signal West Femto	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MS, USA
Titriplex III Ethylen- diamintetraessigsäure (EDTA)	Merck KGaA, Darmstadt
Tris (hydroxymethyl)aminomethan	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Tris-HCl	Sigma-Alderich, St. Louis, MO, USA
Trockenmilchpulver	Sigma-Alderich, St. Louis, MO, USA
Trypanblau (0,4%)	Sigma-Alderich, St. Louis, MO, USA
Tween-20	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Vacutainer CPT Röhrchen	BD Bioscience, USA
<u>Western-Blot Antikörper</u>	
β -Actin	Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA
HIF-1 α	Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA
c-Rel	Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA
pp70	Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA
Anti-Kaninchen	Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA
Anti-Maus	Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA
<u>Zytokine</u>	
IL-1 β	Peptotech, Rocky Hill, NJ, USA
IL-2	bereitgestellt von: National Institutes of AIDS Research and Reference Reagent Program, Bethesda, MD
IL-6	MiltenyiBiotec, AnnAuburn, CA, USA
IL-23	R&D Systems, Boston, MA, USA
TGF- β	MiltenyiBiotec, AnnAuburn, CA, USA

β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
XF-mito stress test kit	SeahorseBioscience Kopenhagen, DK
XF-glycolysis stress test kit	SeahorseBioscience Kopenhagen, DK

5.4 Puffer und Lösungen

Blockpuffer (5%)	5 g Trockenmilchpuler, 100 mL T-TBS-Puffer
Blotpuffer	3 g Tris, 14,4 g Glycin, 200 mL Methanol, ad 1 L destilliertes Wasser
Elektrophoresepuffer (5x)	15 g Tris, 72 g Glycin, 5 g SDS, ad 1 L destilliertes Wasser, pH 8,3
Lysispuffer	3,94 g Tris-HCL, 40 mL Glycerol, 8 g SDS, 20 mL DTT (1 M), Bromphenolblau, ad 200 mL destilliertes Wasser, pH 7,2
MACS-Puffer	500 ml PBS, 2,5 g BSA, 2 ml 0,5 M EDTA.
PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung)	80 g NaCl, 2 g KCl, 11,5 g Na ₂ HPO ₄ 12xH ₂ O, 2 g KH ₂ PO ₄ , ad 1 L destilliertes Wasser, pH 7,2
Sammelgel (4%)	3,2 mL H ₂ O, 1,25 mL Sammelgelpuffer, 0,5 mL Acrylamid, 50 µL 10 % SDS-Lösung, 5 µL TEMED, 25 µL 10 % APS-Lösung
Sammelgelpuffer	30 g Tris, ad 500 mL destilliertes Wasser, pH 6,8
TBS-Puffer (10 x)	24,2 g Tris, 80 g NaCl, ad 1 L destilliertes Wasser, pH 7,6
Trenngel (10%)	2,45 mL H ₂ O, 1,25 mL Trenngelpuffer, 1,25 mL Acrylamid/Bisacrylamid, 50 µL 10% SDS-Lösung, 2,5 µL TEMED, 10 % APS-Lösung
Trenngelpuffer	90,5 g Tris, ad 500 mL destilliertes Wasser, pH 8,8
T-TBS-Puffer	100 mL TBS (10x), 1 mL Tween-20, ad 1 L destilliertes Wasser

5.5 Software

Bio1D	Vilber Lourmat GmbH, Eberhardzell
FACSDiva software version 6.1.2	BD Bioscience, USA
FlowJow 7.6.2	TreeStar, Ashland, OR, USA
GraphPad Prism 6.0	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
XF Software	SeahorseBioscience Kopenhagen, DK

6 Methoden

6.1 Die Zellpräparation

6.1.1 Die CD4⁺ Zellisolation aus peripheren mononukleären Blutzellen

Gesunde Blutspender wurden durch das Hoxworth Blood Center (Cincinnati, OH) und durch die Klinik für Infektiologie und Mikrobiologie in Lübeck rekrutiert. Die PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) Isolation erfolgte mittels Ficoll oder mit Hilfe von Vacutainer Röhren.

PBMC-Isolation mittels Vacutainer-Röhren: Nach der Blutabnahme, wurden die Röhren bei 1650 g bei RT (Raumtemperatur) 13 min zentrifugiert. Das Plasma von zwei Vacutainer-Röhren wurde in ein 50 mL Röhren überführt und mittels MACS-Puffer aufgefüllt und 10 min bei 1200 rpm (Umdrehungen pro Minute) bei 4 °C zentrifugiert.

PBMC-Isolation mittels Ficoll: 20 mL Blut wurde mit 15 mL PBS in einem 50 mL Röhren vermischt, mit 10 mL Ficoll unterschichtet und bei 2300 rpm bei 22 °C 25 min ohne Bremsen und Beschleunigung zentrifugiert. Die PBMCs wurden von der Ficoll-Interphase mittels Transferpipette vorsichtig aufgenommen, mit 40 mL PBS gewaschen (Zentrifugation: 1200 rpm/ 4 °C/ 10 min).

Im Folgenden ist das Protokoll identisch für beide Isolationsarten: Nach einem weiteren Waschschriff mit 30 mL MACS-Puffer (Zentrifugation: 1000 rpm/10 min/4 °C) wurde die Zellzahl mittels Neubauer- Zählkammer bestimmt.

Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer: eine 1:10 Verdünnung der Trypanblau:Zellsuspension wurde hergestellt und 10 µL davon in die Neubauer-Zählkammer gegeben. Tote Zellen konnten von vitalen durch ihre blaue Farbe unterschieden werden, da Trypanblau durch die Zellmembran toter Zellen diffundiert. Nach der folgenden Formel wurde aus den gezählten Zellen die Zellzahl in der Zellsuspension pro Großquadrat bestimmt: $\text{Zellen/mL} = (\text{gezählte Zellzahl} \times \text{Verdünnungsfaktor}) / (10^{-4} \text{ ml})$.

Die Zellen wurden in 30 µL MACS-Puffer je 10^7 Zellen resuspendiert. Es wurde 3,3 µL je 10^7 Zellen Biotin *Antibody-Cocktail* hinzugegeben und anschließend die Zellen bei 4 °C für 10 min inkubiert. Nach der Zugabe von 6,6 µL anti-Biotin *MicroBeads* je 10^7 Zellen, wurden die Zellen für weitere 15 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend

wurden die Zellen mit 15 mL MACS-Puffer gewaschen (Zentrifugation: 10 min/300 g/4 °C) und anschließend in 2 mL MACS-Puffer resuspendiert. Nachdem die MACS-Säulen je mit 3 × 1 mL MACS-Puffer gespült wurde, wurden die Säule dreimalig mit 2 mL der Zelllösung beladen. Die Bestimmung der CD4⁺ Zellzahl erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer.

6.1.2 Die Zellsortierung der Tcons (CD8⁻CD4⁺CD25⁻CD127^{high})

Die CD4⁺ Zellen wurden in 300 µL PBS mit 2% FKS resuspendiert. Die entsprechenden Antikörper für die Zellsortierung wurden zugegeben und die Zellen 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert (**Tabelle 1**). Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 10 mL 4 °C kaltem PBS mit 2% FKS gewaschen und für die Zellsortierung in 1 mL PBS mit 2% FKS pro 10⁶ Zellen überführt. Die Zellsortierung erfolgte durch den „Cell Analysis Core“ der Universität zu Lübeck. Als Zielpopulation wurden Tcons als CD8⁻CD4⁺CD25⁻CD127^{high} Zellen definiert. Entsprechende Kompensationen wurde von 0,25 × 10⁶ Zellen in 100 µL PBS mit 2% FKS mittels ungefärbter Kontrolle und Einzelfärbungen jeder Farbe mit der entsprechenden Antikörpermenge durchgeführt. Manuelle Nachkompensation erfolgte mit Hilfe der FACSDiva Software.

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Antikörper für die Zellsortierung

Extrazellulärer Durchflusszytometrie Antikörper	Mengenangabe pro 10 ⁶ Zellen
CD8-FITC	8 µL
CD25-APC	20 µL
CD127-PE	10 µL

6.1.3 Die Treg/Th17 Polarisation

Nachdem die Zellzahl der Tcons mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt wurde, wurden die Zellen mit *Violet Tracker* gefärbt. Dazu wurden die Zellen in PBS verdünnt (10⁶ Zellen/1 mL PBS) und 1 µL der -entsprechend der Herstelleranleitung der *Violet Tracker* Färbung gelösten- Färbelösung je 10⁶ Zellen dazugegeben und 30 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. 1% FKS wurde nach der Inkubation zugegeben und die Zellen anschließend mit 30 mL PBS gewaschen (Zentrifugation: 10 min/300 g/4 °C). Die Zellen wurden in x-vivo 15 Medium suspendiert, 0,25 × 10⁶ Zellen je

1000 μL Medium. Die Aktivierung der Zellen erfolgte mittels anti-CD3/anti-CD28 *Dynabeads* in einem 1:1 Verhältnis *Bead*:Zellen. Für die iTreg-Polarisation wurden folgende Zytokine zugefügt IL-2 (100 U/mL), TGF- β (1 ng/mL) und für die Th17 Polarisation IL-1 β (100 ng/mL), IL-6 (20 ng/mL), TGF- β (1 ng/mL), IL-23 (100 ng/mL). Die Zellen wurden 6 Tage unter Normoxie (21% Sauerstoff) in 24 *well*-Platten inkubiert. Jedem *well* wurden $0,25 \times 10^6$ Zellen in 1 mL Medium zugefügt. An Tag 3 der Inkubation wurden die Zytokine und das Medium erneuert. Als Kontrolle dienten aktivierte Tcons ohne Zytokinstimulation.

6.1.4 Die HIF-1 α Stabilisierung während der iTreg/iTh17 Polarisation

DMOG (100 μM) wurde zur chemische HIF-1 α Stabilisierung in zwei Modalitäten zugefügt. Die DMOG-Kontrolle: DMOG kont.: DMOG wurde an den Tagen 0,2,3,4 und 6 hinzugegeben. DMOG spät: Zugabe von DMOG an den Tagen 4 und 6. PX-478 (10 μM) wurde zur Inhibierung von HIF-1 α an den Tagen 0,3 und 6 hinzugefügt. IL-1 β (100 ng/mL) wurde in die iTreg-Polarisation an den Tagen 0 und 3 hinzugegeben. Eine weitere Kondition ergab sich aus der kombinierten Stimulation von IL-1 β und PX-478. Etx (200 μM) wurde zur Inhibierung der β -Oxidation an den Tagen 1 und 4 hinzugegeben. Stimulationen wurden an den Treg, Th17 polarisierten und unpolarisierten Zellen durchgeführt. Rapamycin wurde zur mTORC1-Inhibition in der Konzentration von 25 μM an den Tagen 0, 3 und 6 hinzugefügt.

6.2 Analyse

6.2.1 Die durchflusszytometrische Analyse

Die Färbung für die Antikörper-vermittelte Durchflusszytometer Analyse erfolgte an Tag 6 der Polarisation. Die Zellen wurden 5 h mit 1 $\mu\text{g/mL}$ Ionomycin und 10 ng/mL PMA inkubiert, nach einer Stunde wurden die Zellen zusätzlich mit 10 $\mu\text{g/mL}$ Brefeldin und Monensin für 4 h in einer 1:1000 Verdünnung stimuliert. Anschließend wurden die Proben je mit 1,5 mL PBS gewaschen (Zentrifugation: 300 g/5 min/RT). Nachdem die Zellzahl bestimmt wurde und die Zellen erneut im gleichen Verfahren gewaschen wurden, wurden sie für den Färbevorgang in eine 96 *well*-Platte in 200 μL PBS überführt. Die extrazellulären Antikörper wurden pro Probe dazugegeben (**Tabelle 2**) und die Proben 30 min abgedeckt bei 4 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Die Zellen wurden zweimalig mit jeweils 200 μL PBS 2% FKS gewaschen und der Überstand mit der Vakuumpumpe abgenommen (Zentrifugation: 1200 rpm/4 $^{\circ}\text{C}$ /4 min). Nach der

Zugabe von 200 µL Fix/Perm Puffer wurden die Zellen 1 h abgedeckt im Kühlschrank inkubiert. Nach zweimaligen Waschen mit jeweils 200 µL PBS (Zentrifugation: 2000 rpm/4 °C/4 min), wurden die Proben in 200 µL Perm Puffer gewaschen und anschließend in 50 µL Perm Puffer versetzt mit 4% Rattenserum 15 min abgedeckt im Kühlschrank inkubiert. Die intrazellulären Antikörper wurden direkt in den Perm Puffer gegeben (**Tabelle 2**). Der HIF-1α Antikörper wurde zuvor mit AlexaFluor488 entsprechend der Herstellerangaben markiert. Die Inkubationszeit für die intrazellulären Antikörper betrug 60 min abgedeckt bei 4 °C. Nach zweimaligen Waschen mit 200 µL Perm Puffer, wurden die Zellen in 300 µL kaltem PBS in die FACS-Analyse Röhren überführt und mit Hilfe des Cell Sorter FACS Aria III im „*Cell Analysis Core*“ der Universität zu Lübeck durchgeführt. Entsprechende Kompensationskontrollen wurden mit Hilfe von *CompBeads* gemäß der Instruktionen der Herstellerangaben durchgeführt. Manuelle Nachkompensation erfolgte mittels FACSDiva Software und die Auswertung mit Hilfe der FlowJow Software. Dubletten und tote Zellen wurden aus der Analyse ausgeschlossen.

Tabelle 2: Übersicht der verwendete Durchflusszytometrie Antikörper

Extrazellulärer Durchflusszytometrie Antikörper	Mengenangabe pro 10⁶ Zellen
Glut-1-AlexaFluor700	5 µL
<i>Live/Dead</i>	2,5 µL, einer 1:10 Verdünnung
Intrazellulärer Durchflusszytometrie Antikörper	Mengenangabe pro 10⁶ Zellen
HIF-1α-ZenonAlexaFluor488	0,5 µg
FOXP3-e660	4 µL
IL-17A-PE	5 µL
Ki67-PerCP-Cy5.5	5 µL
IFN-γ-PECY7	5 µL

Die *Gating*-Strategie zur Ermittlung der FOXP3⁺ Zellen erfolgte mittels Negativkontrolle durch die unpolarisierten Zellen (**Abb. 6.1**). Unterschiedliche TGF-β Konzentrationen wurden ausgetestet und da keine Unterschiede in der Häufigkeit der FOXP3⁺ Zellen an Tag 6 bei TGF-β Konzentrationen von 1 ng/mL, 2 ng/mL und 5

ng/mL festzustellen waren, wurde die TGF- β von 1 ng/mL für die Experimente verwendet (**Abb. 6.2, Abb. 6.3**).

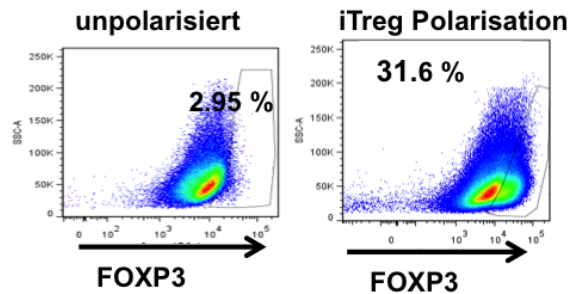


Abb. 6.1 Darstellung der Gating-Strategie der FOXP3+ Zellen. Als Negativkontrolle dienten jeweils unpolarisierte aktivierte Tcons mit derselben Stimulation. In den unpolarisierte aktivierte Zellen exprimierten ungefähr 3-5% der Zellen transient FOXP3, in den iTreg polarisierten waren es in demselben Gate 30-60% der Zellen.

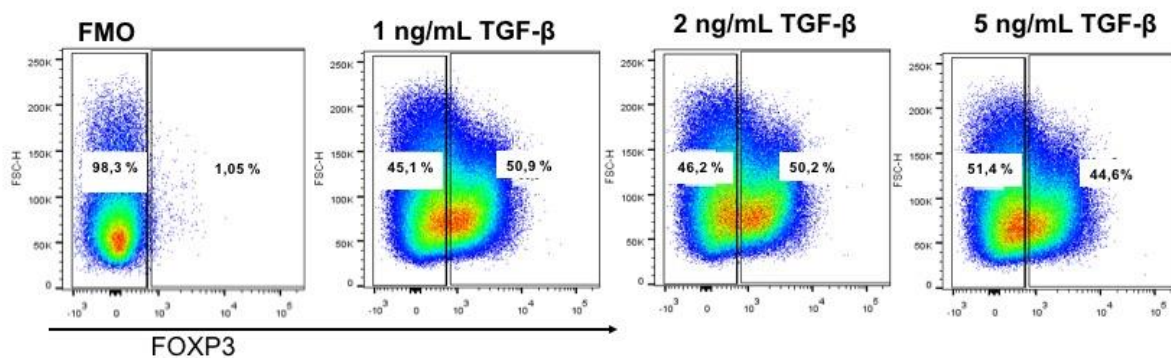


Abb. 6.2 Austestung unterschiedlicher TGF- β Konzentrationen. TGF- β Konzentrationen wurden in den Konzentrationen 1 ng/mL, 2 ng/mL und 5 ng/mL der iTreg Polarisation hinzugefügt. Die Definition der FOXP3+ Zellen wurde anhand einer FMO (*fluorescences minus one*) bestimmt. Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie an Tag 6 der Polarisation.

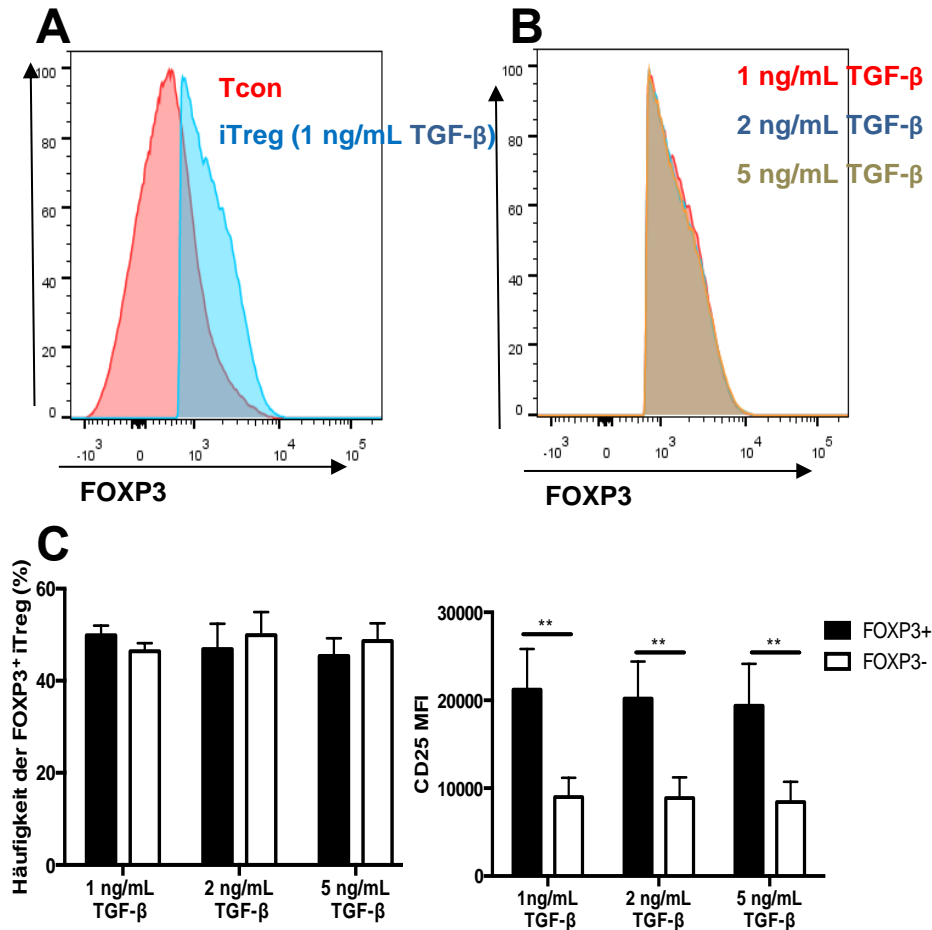


Abb. 6.3 Austestung unterschiedlicher TGF- β Konzentrationen. TGF- β Konzentrationen wurden in den Konzentrationen 1 ng/mL, 2 ng/mL und 5 ng/mL der iTreg Polarisation hinzugefügt. Die Definition der FOXP3⁺ Zellen wurde anhand von FMOs bestimmt. Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie an Tag 6 der Polarisation. (A-B) FOXP3 Histogramm von Tcon Zelle und iTreg Zellen mit unterschiedlichen TGF- β Konzentrationen (C) Häufigkeit der FOXP3⁺ und FOXP3⁻ Zellen der iTreg Polarisation mit unterschiedlichen TGF- β Konzentrationen. CD25 MFI (*Mean fluorescence intensity*) der FOXP3⁺ und FOXP3⁻ Zellen an Tag 6 der Polarisation, analysiert mittels Durchflusszytometrie (n=3; **p<0,01).

6.2.2 Die Probengewinnung für die Western Blot Analyse

Nach 1, 3 und 6 Tagen Inkubation in iTreg Polarisationsbedingungen wurde die Zellen eines *well*s einer 24 *well*-Platte geerntet und bei 300 g, 5 min zentrifugiert und 200 μ L Lysispuffer pro Probe zugegeben. Bis zur weiteren Analyse wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

6.2.3 SDS-Page

Die Proteine wurden mittels *SDS-Page* entsprechend ihrer Molekularmasse aufgetrennt. Ein 10%-iges Trenngel und ein 4%-iges Sammelgel wurden gegossen. Die Proteine der Proben wurden bei 95°C für 5 min denaturiert. Die polymerisierten

Gele wurden mit jeweils 20 μL der Proben pro Geltasche beladen. 7 μL eines Molekulargewichtsmarkers dienten als Standard. Eine Spannung von 70 V wurde für 15 min und anschließend eine von 200 V für 55 min angeschlossen, so dass die Proteine entsprechend ihrer molekularen Masse aufgetrennt wurden.

6.2.4 Die Western Blot Analyse

Mit der Methode des Nass-Blots wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Zum Transfer auf die Membran wurde eine Spannung von 75 V für 1,5 h angelegt. Nach dem Transfer wurde die Membran für 1 h bei RT mit Blockpuffer auf dem Schüttler inkubiert, so dass die unspezifischen Bindungen blockiert wurden. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler. Die Primärantikörper (**Tabelle 3**) wurden in jeweils 10 mL Blockpuffer verwendet. Nach der Inkubation wurden die Membranen zweimalig mit 10 mL T-TBS gewaschen und jeweils 15 min bei RT auf dem Schüttler aufbewahrt. Die Zugabe der Sekundärantikörper (**Tabelle 3**) erfolgte jeweils in 10 mL T-TBS. Die sekundären Antikörper waren mit HRP (*horseradish peroxidase*) gekoppelt. Nach erneutem zweimaligen Waschen mit T-TBS gemäß der geschilderten Prozedur, erfolgte die Zugabe eines Luminol-haltigen Substrats nach Anleitung des Herstellers. Die Detektion des Signals erfolgte mittels automatisierten Fusion FX7 Systems. Die weitere Auswertung der Signalintensivität erfolgte mittels Bio1D Software. Die Proteinmenge wurde auf das β -Aktinsignal der jeweiligen Probe normalisiert.

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Westernblot- Antikörper

Primärantikörper	Verdünnung
Anti-HIF-1 α (monoklonaler Maus-Antikörper)	1:500
Anti- β -Aktin (polyklonaler Kanninchen-Antikörper)	1:2000
Anti-c-rel-Antikörper (monoklonaler Maus-Antikörper)	1:1000
Anti-pp70 (monoklonaler Maus-Antikörper)	1:1000
Sekundärantikörper	Verdünnung
Anti-Maus Antikörper (polyklonal)	1:4000
Anti-Kanninchen Antikörper (polyklonal)	1:4000

6.3 Die Analyse des Metabolismus

6.3.1 Die Analyse der mitochondrialen Respiration

Die Messung der mitochondrialen Respiration wurde mittels XF^e24 Extracellular Flux Analyzer unter Verwendung des *mito-stress test* Kits durchgeführt.

Am Tag vor dem Experiment.

Beschichtung der XF 24 well-Platte: 1,4 mL Natrium-Bicarbonat Puffer (0,1 M) und 17 µL *CellTak* wurden vermischt und 50 µL pro well hinzugefügt. Nach 20-minütiger Inkubation folgte eine zweimalige Spülung mit 500 µL sterilem destilliertem Wasser. Anschließend musste die Platte unter der Werkbank vollständig trocknen.

Isolation der Tcons: Die Tcons wurden wie in Kapitel 6.1.1 und 6.1.2 beschrieben aus Frischblut isoliert und 400 000 Zellen in 450 µL DMEM ohne FKS überführt, Treg oder Th17 Zytokine wurden in den entsprechenden Konzentrationen zugefügt. Die Stimulation der Zellsuspension fand mit DMOG, IL-1β, Etx oder PX-478 in den entsprechenden Konzentrationen statt. 450 µL DMEM ohne FKS wurde in die „*Background-wells*“ pipettiert und die Zellsuspension in die entsprechenden *wells* der XF24 *well-Platte* zugegeben. Die Platte wurde zentrifugiert: 40 g ohne Beschleunigung und Bremse, dabei musste der Zentrifugationsvorgang gestoppt werden, sobald 40 g erreicht wurde. Die Platte wurde um 180° gedreht und der Vorgang bei 80 g wiederholt. Die Zellen wurden 24 h bei 37 °C, 5% CO₂ inkubiert.

Vorbereitung der Kalibrationsplatte: Nachdem in jedes der XF Kalibrationsplatte 1 mL XF Kalibrationsmedium zugefügt wurde, wurde die Platte 12 h bei 37 °C ohne CO₂ inkubiert.

Am Tag des Seahorse Experiments

Nachdem das XF Assaymedium (100 mL Seahorse Medium, 1 mL 100 mM Na⁺Pyruvat und 2,5 mL 180 g/L D-Glucose) auf 37°C erwärmt wurde, wurde der pH auf 7,4 +/- 0,1 eingestellt. Die vorbereiteten Zellen wurden zweimalig mit 600 µL Seahorsemedium gewaschen, wobei 50 µL pro Platte belassen wurden und das Medium zwischen den Waschschrritten mit der Vakuumpumpe abgenommen wurde. Die Zellen wurden 1 h bei 37°C ohne CO₂ inkubiert. Die Substanzen des „*mito stress test*“ wurden in 75 µL des XF Assaymediums gelöst und gemäß der Anleitung in Port A, B oder C pipettiert (Port A: Oligomycin (1 µM), Port B: FCCP (Carbonylcyanid-p-

trifluoromethoxyphenylhydrazon) ($0,9 \mu\text{M}$) und Port C: Antimycin A/Rotenone (je $1 \mu\text{M}$). Nach der Kalibration, konnte der Assay gestartet werden. Im Zuge des „*mito-stress test*“ wurde die OCR (*oxygen consumption rate*) bestimmt (**Abb. 6.4**). Die basale Respiration ist definiert als die OCR vor der Stimulation. Die OCR post Oligomycin Stimulation gilt als Protonenleck. Aus der Differenz von Protonenleck und BR (*basal respiration*) kann die ATP Produktion errechnet werden. Die maximale Respiration wird nach der FCCP Stimulation erreicht und die SC (*spare capacity*) errechnet sich aus der Differenz von MR (*maximal respiration*) und BR. Pro Versuch wurden pro Kondition fünffach Bestimmungen durchgeführt.

Besonderheit der Etx- und IL-1 β - Stimulation: Die Etx Stimulation erfolgte 6 h vor den Waschschrinen und die Stimulation wurde 1 h vor dem Assay aufgefrischt. Für die IL-1 β -Stimulation wurden die Zellen 48 h mit anti-CD3/anti-CD28 *Beads* voraktiviert, bevor sie 6 h mit IL-1 β stimuliert wurden.

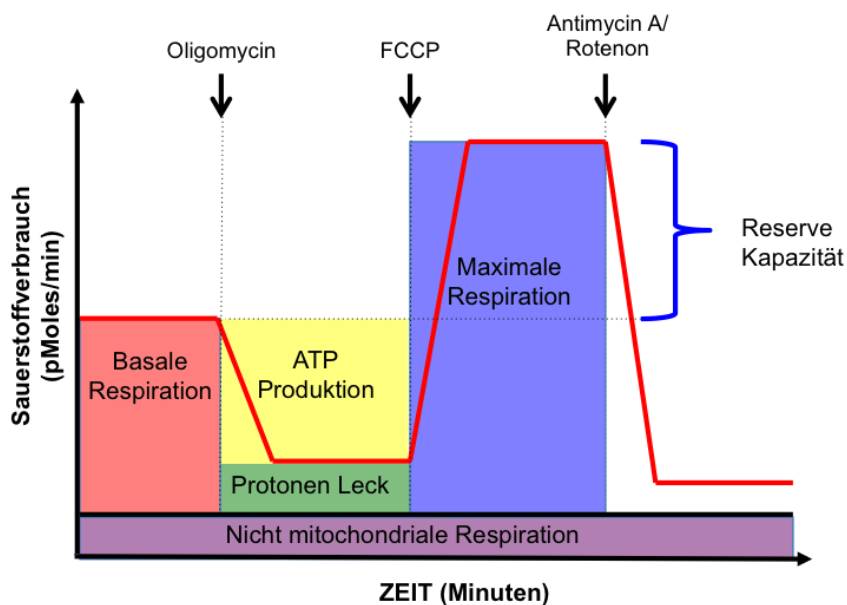


Abb. 6.4 Schematische Darstellung des „mito stress test“ zur Ermittlung der mitochondrialen Respiration. Aufgetragen ist der Sauerstoffverbrauch der Zellen gegen die Zeit.

6.3.2 Die Analyse der glykolytischen Kapazität

Die Zellvorbereitung ist identisch mit der beim „*mito stress test*“ mit Ausnahme einiger Besonderheiten. Das XF Assaymedium wurde ohne Zusatz von Glukose zubereitet und der pH-Wert des erwärmten Mediums wurde auf $7,35 \pm 0,01$

eingestellt. Pro Port in 75 μL Medium wurden folgende Substanzen zugefügt: Port A: 2 mM Glukose, Port B: 1 μM Oligomycin und Port C: 2 mM 2-Desoxy-D-Glukose (2-DG). Während des Assays wurde die ECAR (*extracellular acidification rate*) bestimmt, wobei die glykolytische Kapazität als ECAR nach Glukose und Oligomycin Stimulation definiert ist (**Abb. 6.5**).

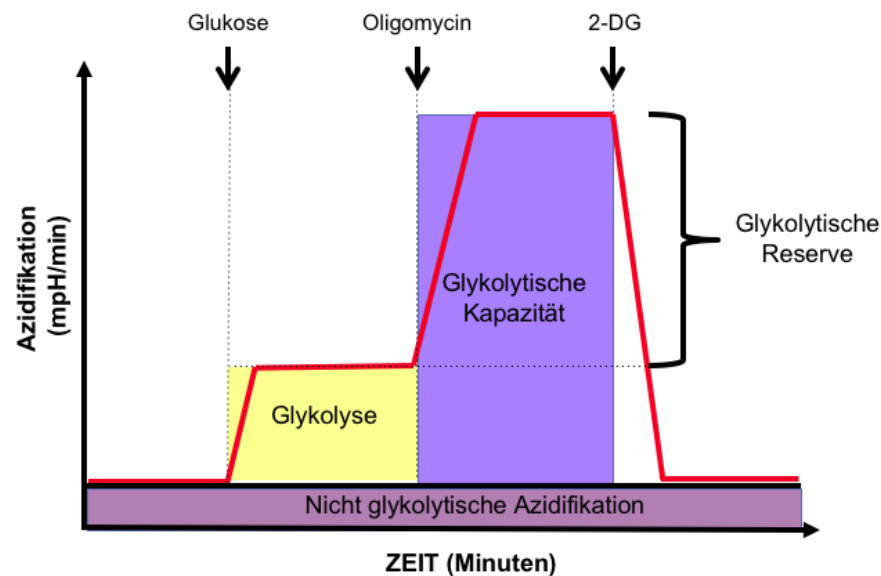


Abb. 6.5 Schematische Darstellung des "glycolytic stress test" zur Ermittlung der zellulären Glykolyse mittels extrazellulärer Azidifikation. Aufgetragen ist die Änderung des pH-Werts des Mediums gegen die Zeit.

6.4 Die Daten Analyse

Zur statistischen Analyse wurde die GraphPad Prism 6,0 Software verwendet. Der Vergleich der unbehandelten und behandelten Konditionen erfolgte mittels abhängigem zweiseitigem, gepaarten t-Test. Bei mehrfaktoriellen Analysen wurde der ANOVA-Test verwendet. Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha = 0,05$ festgelegt, dementsprechend wurden Ergebnisse ab einem $p < 0,05$ als signifikant angesehen. Bei der Auswertung wurde der abhängige t-Test verwendet, außer wenn in den Abbildungsunterschriften der ANOVA als statistisches Verfahren gekennzeichnet ist. Wenn nicht anders benannt sind die Daten in den Abbildungen im Ergebnisteil dargestellt als Mittelwert, die Fehlerbalken zeigen den SEM (*standard error of the mean*).

7 Ergebnisse

Humane iTregs können im peripheren Gewebe aus naiven und bereits differenzierten T-Zellen entstehen. Im Folgenden werden Faktoren untersucht, die die humane *in vitro* iTreg Differenzierung über eine HIF-1 α Stabilisierung beeinflussen. Dafür wurden naive Tcons 6 Tage unter iTreg polarisierenden Bedingungen inkubiert und die Anzahl der FOXP3⁺ iTregs analysiert.

7.1 Der Einfluss von IL-1 β auf die HIF-1 α Stabilisierung in iTregs

Um zu untersuchen, ob IL-1 β zur Induktion von HIF-1 α in iTregs führt, wurden Tcons 6 Tage unter Treg Polarisationsbedingungen in Ab- und Anwesenheit von IL-1 β inkubiert.

Die Stabilisierung von HIF-1 α durch IL-1 β wurde mittels Western Blot Analysen untersucht und konnte ab Tag 3 nachgewiesen werden (**Abb. 7.1A und B**). An Tag 1 und 2 der Inkubation konnte kein Anstieg des HIF-1 α Levels nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Anhand von Durchflusszytometrie Analysen wurde der HIF-1 α MFI in der FOXP3⁺ Population der iTregs an Tag 6 bestätigt. Die statistische Analyse der Intensität der HIF-1 α Expression in der Population der FOXP3⁺ Zellen zeigte einen signifikanten Anstieg der HIF-1 α Expression durch IL-1 β in den iTregs (**Abb. 7.1C**). Das HIF-1 α Signal konnte nur aufrechterhalten werden, wenn die IL-1 β Stimulation kontinuierlich über 6 Tage stattfand.

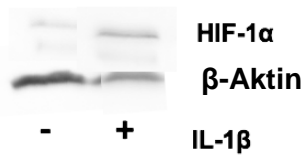
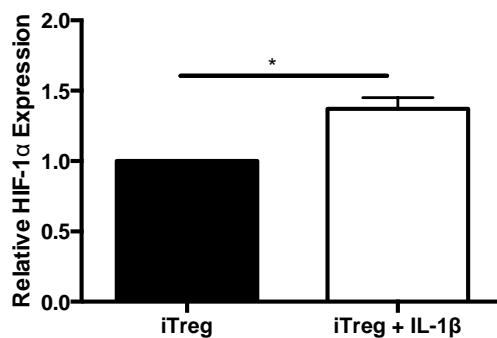
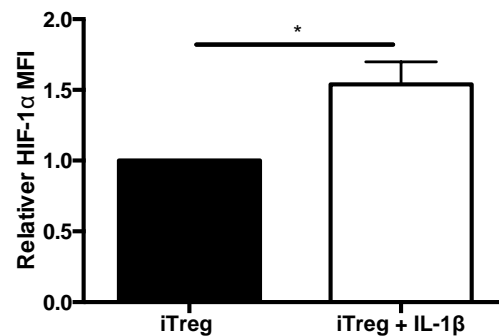
A**B****C**

Abb. 7.1 Die Induktion von HIF-1 α durch IL-1 β in iTregs. A) Repräsentativer Western Blot an Tag 3 der iTreg Polarisation B) Densitometrische Auswertung der Western Blot Ergebnisse an Tag 3 der Inkubation. Die HIF-1 α Werte wurden auf die unstimulierten iTregs normalisiert. Die Proteinbeladung wurde anhand der β -Aktin Expression normalisiert (n=6). C) Durchflusszytometrie Analyse der HIF-1 α Expression an Tag 6 der iTreg Polarisation in den FOXP3⁺ Zellen ohne und mit IL-1 β Stimulation (n=12; *p<0,05).

Im Folgenden wurde der Einfluss des mTORC1-Signalwegs im Zuge der IL-1 β vermittelten HIF-1 α Induktion untersucht. IL-1 β führte zur Induktion von mTORC1 in iTregs an Tag 3 der Polarisation (**Abb. 7.2A und C**). Die mTORC1 Aktivierung wurde mittels Detektion der p70S6 Kinase (im Folgenden als pp70 bezeichnet) einem Schlüsselenzym des mTORC1-Signalwegs analysiert [1].

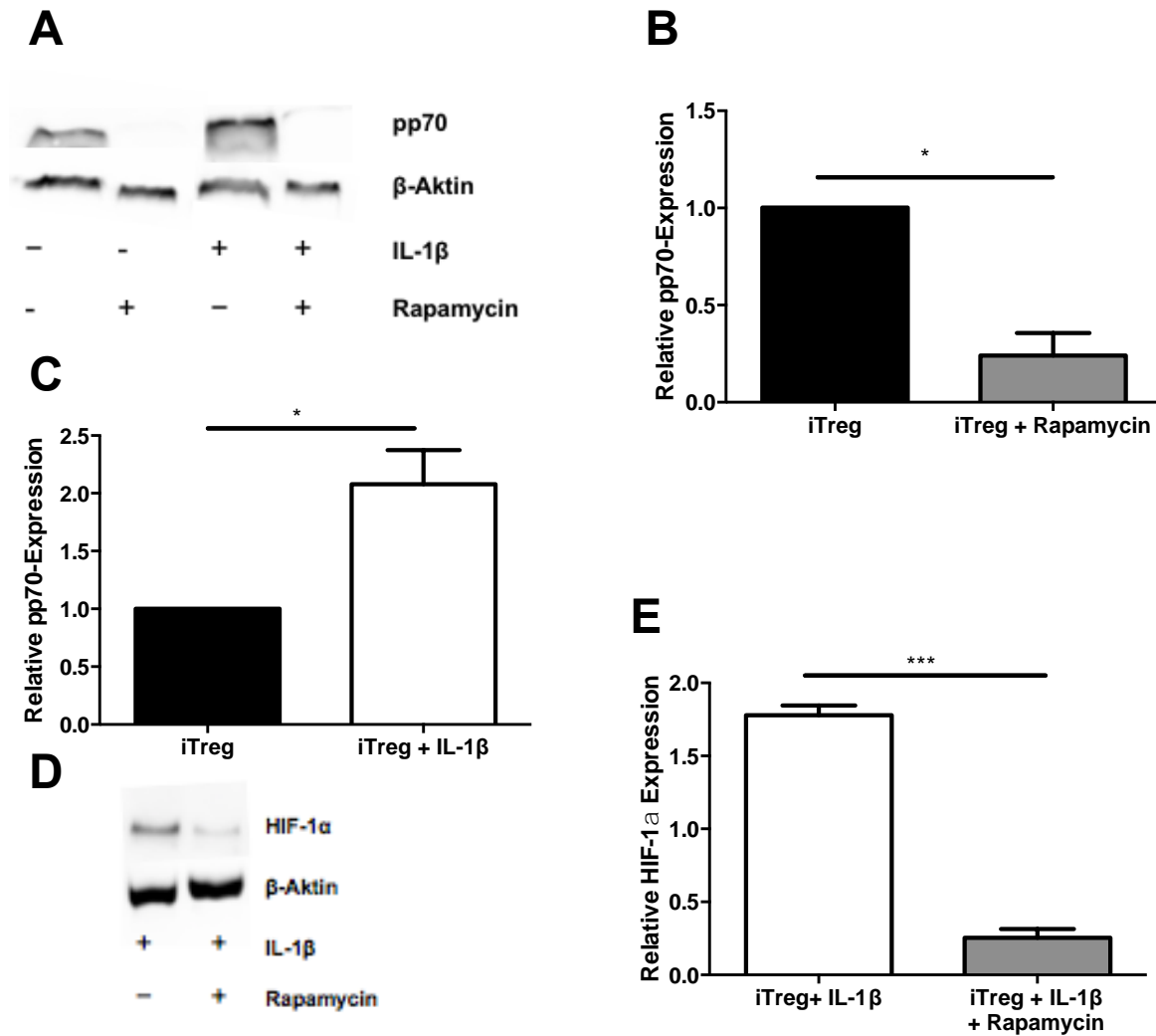


Abb. 7.2 Der Einfluss des mTORC1 Signalwegs auf die IL-1 β vermittelte HIF-1 α Induktion. pp70 Proteinexpression an Tag 3 der iTreg Polarisation unter Stimulation mit IL-1 β und/oder Rapamycin mittels Western Blot Analyse. A) Repräsentativer pp70 Western Blot an Tag 3 der Inkubation. B) Densitometrische Analyse der relativen pp70 Expression der iTregs ohne und mit Rapamycin Stimulation (n=3). C) Densitometrische Analyse der relativen pp70 Expression in iTregs ohne und mit IL-1 β Stimulation (n=3). D) Repräsentative HIF-1 α Western Blot Tag 3 der Inkubation. E) Densitometrische Analyse der relativen HIF-1 α Expression in iTregs plus IL-1 β Stimulation mit und ohne Rapamycin (n=3). Die densitometrischen Analysen wurden auf iTregs ohne Stimulation und unter Berücksichtigung der β -Aktin Expression der jeweiligen Probe normalisiert (* p <0,05, *** p <0,001).

Um zu zeigen, dass die mTORC1-Aktivierung eine direkte Rolle in der IL-1 β vermittelten HIF-1 α Induktion spielt, wurde IL-1 β mit dem mTOR Inhibitor Rapamycin kombiniert. Rapamycin führte zur Inhibition von mTORC1 (**Abb.7.2B**) und verhinderte die IL-1 β vermittelte HIF-1 α Induktion (**Abb.7.2D und E**). Es konnte gezeigt werden, dass die HIF-1 α Stabilisierung durch IL-1 β über den mTORC1 Signalweg vermittelt wird.

Als ein weiterer wichtiger Signalweg der HIF-1 α Induktion durch IL-1 β wurde der NF- κ B-Signalweg beschrieben. Die iTreg Stimulation durch IL-1 β zeigte keine erhöhte Expression von c-rel, einem Protein des NF- κ B Komplexes (**Abb. 7.3**).

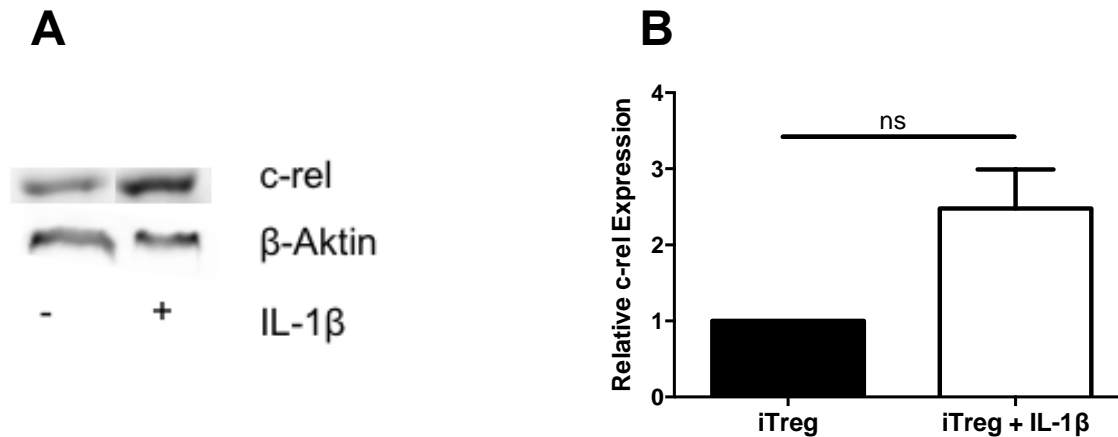


Abb. 7.3 Einfluss der IL-1 β Stimulation auf die c-rel Expression in iTregs. A) Repräsentativer c-rel Western Blot Versuch an Tag 3 der Polarisation. B) Densitometrische Analyse der relativen c-rel Expression in iTregs ohne und mit IL-1 β (n=4). Die densitometrischen Analysen wurden auf iTregs ohne weitere Stimulation und unter Berücksichtigung der β -Aktin Expression der jeweiligen Probe normalisiert (ns=nicht signifikant).

7.2 Der Einfluss von IL-1 β auf die Polarisierung von iTregs

Um zu untersuchen, ob die IL-1 β vermittelte HIF-1 α Stabilisierung einen Einfluss auf die iTreg Polarisierung hat, wurde die Anzahl an CD4⁺FOXP3⁺ Zellen an Tag 6 der Polarisation zwischen den unpolarisierten T-Zellen, iTregs und iTregs unter Stimulation mit IL-1 β verglichen. Die unpolarisierten Zellen zeigten eine geringe transiente FOXP3-Expression, während es in den iTreg polarisierten Zellen zu einem deutlichen Anstieg von FOXP3⁺ Zellen kam. IL-1 β führte bei dieser Stimulation zu einer deutlichen Reduktion der FOXP3⁺ Zellen (**Abb. 7.4**).

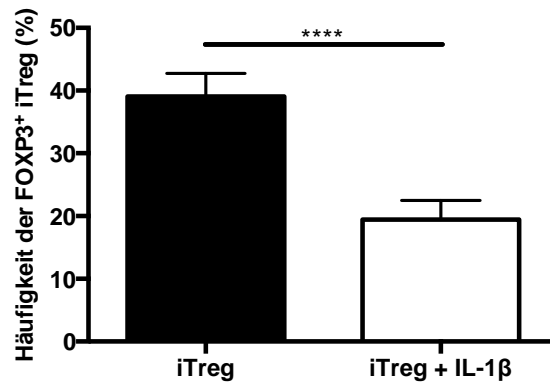


Abb. 7.4 Inhibition der iTreg Polarisation unter IL-1β Stimulation. Durchflusszytometrie Analyse an Tag 6 der iTreg Polarisation zur Bestimmung von FOXP3⁺ Zellen. Anzahl der FOXP3⁺ Zellen in Prozent ohne und mit IL-1β (n=12; **** p<0,0001).

Die Aktivierung der iTregs mit anti-CD3/anti-CD28 *Beads* führte zu einer erhöhten Expression des IL-1 Rezeptors (**Abb. 7.5**). Eine *Live/Dead* sowie eine Ki67 Färbung wurde eingesetzt, um zu überprüfen, dass die Reduktion der FOXP3⁺ Zellen nicht durch eine verminderte Vitalität oder Proliferation der Zellen herbeigeführt wurde (**Abb. 7.6**). Unter IL-1β Stimulation wurde die Vitalität und Proliferation der iTreg nicht beeinträchtigt (**Abb. 7.6**).

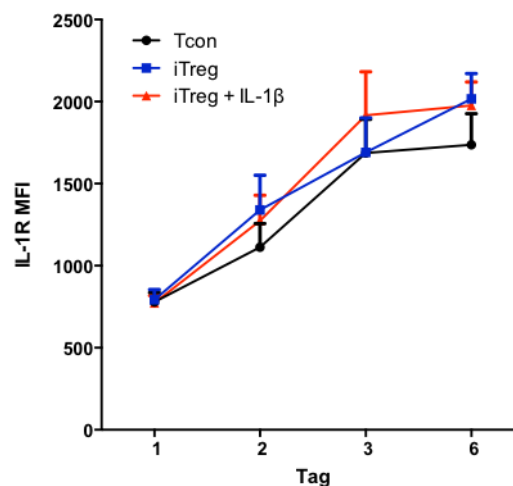


Abb. 7.5 Expression des IL-1 Rezeptors. Durchflusszytometrie Analyse des IL-1 Rezeptors an den Tagen 1, 2, 3 und 6 in anti-CD3/anti-CD28 *Beads* aktivierten T-Zellen: Tcon= ohne Zytokine, iTreg= mit IL-2 und TGF-β, iTreg + IL-1β= mit IL-2, TGF-β und IL-1β. Dargestellt ist der IL-1R MFI in den Zellen (n=6). Experimente durchgeführt von Cesar Ruenda.

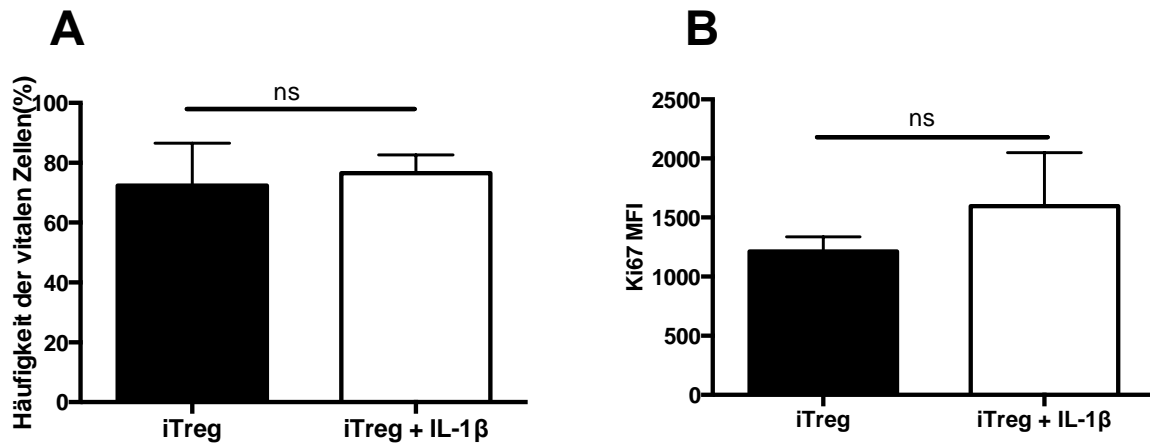


Abb. 7.6 Vitalität und Proliferation der iTregs unter IL-1β Stimulation. Durchflusszytometrie Analyse der A) vitalen Zellen und B) des Ki67 MFI an Tag 6 der iTreg Polarisation mit und ohne IL-1β Stimulation (n=12; ns= nicht signifikant).

Um zu überprüfen, ob die Inhibition der iTreg Differenzierung direkt von der HIF-1 α Expression abhängig ist, wurden die iTregs mit dem HIF-1 α Inhibitor PX-478 inkubiert. Die Anzahl der FOXP3⁺ Zellen wurde durch alleinige PX-478 Stimulation nicht beeinflusst (**Abb. 7.7A**). Die Kombination von PX-478 und IL-1β führte dazu, dass der IL-1β-Effekt auf die iTreg Differenzierung aufgehoben wurde (**Abb. 7.7B**). Durch die Kombination von IL-1β und PX-478 konnte nachgewiesen werden, dass die Inhibition der iTreg Differenzierung abhängig von HIF-1 α ist.

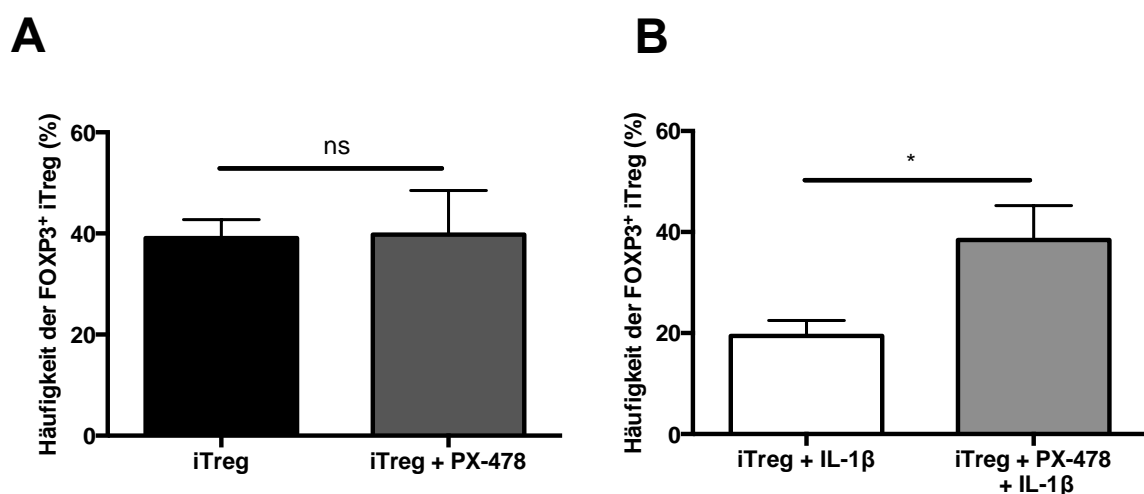


Abb. 7.7 Einfluss der HIF-1 α Inhibition auf die iTreg Differenzierung unter IL-1β Stimulation. A) Anzahl der FOXP3⁺ Zellen an Tag 6 ohne und mit PX-478 mittels Durchflusszytometrie Analyse (n=12). B) Anzahl der FOXP3⁺ Zellen unter IL-1β Stimulation an Tag 6 ohne und mit PX-478 mittels Durchflusszytometrie Analyse (n=12; ns= nicht signifikant, *p<0,05).

Der Einfluss von mTORC1 auf die IL-1 β und HIF-1 α vermittelte Inhibition der iTreg Differenzierung wurde mittels mTORC1 Inhibition durch Rapamycin überprüft.

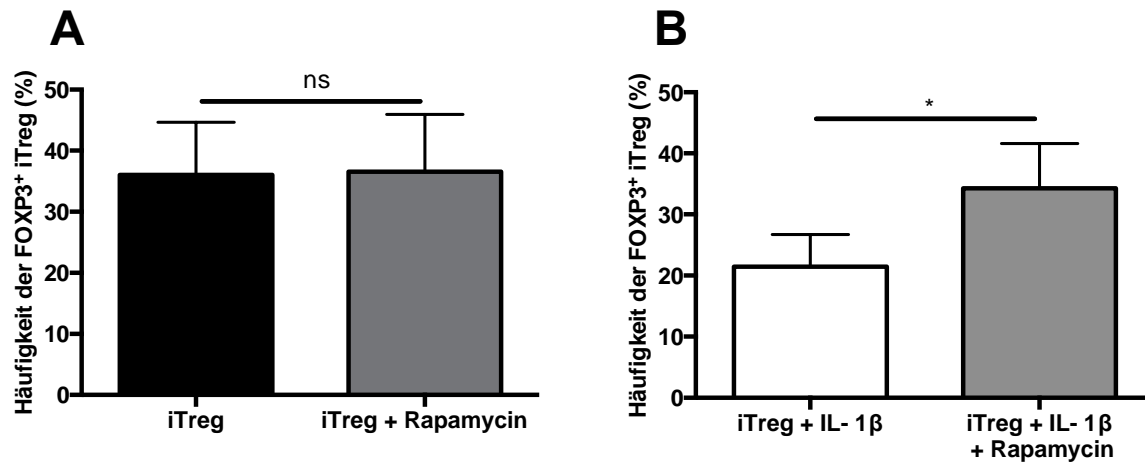


Abb. 7.8 Einfluss der mTORC1 Inhibition auf die iTreg Differenzierung unter IL-1 β Stimulation. Durchflusszytometrie Analyse der FOXP3 $^+$ Zellen an Tag 6. A) Anzahl der FOXP3 $^+$ Zellen unter iTreg Bedingungen in Prozent ohne und mit Rapamycin (n=5). B) Anzahl der FOXP3 $^+$ Zellen unter iTreg Bedingungen plus IL-1 β in Prozent ohne und mit Rapamycin (n=5; ns= nicht signifikant, *p<0,05).

Die mTORC1 Inhibition hatte keinen Einfluss auf die iTreg Differenzierung (**Abb. 7.8A**). Die Kombination von mTORC1 Inhibition und IL-1 β machte die Inhibition der IL-1 β vermittelten iTreg Differenzierung rückgängig (**Abb. 7.8B**).

Es konnte nachgewiesen werden, dass IL-1 β HIF-1 α mTORC1-abhängig induziert und die iTreg Differenzierung durch die HIF-1 α und mTORC1 Induktion inhibiert wird.

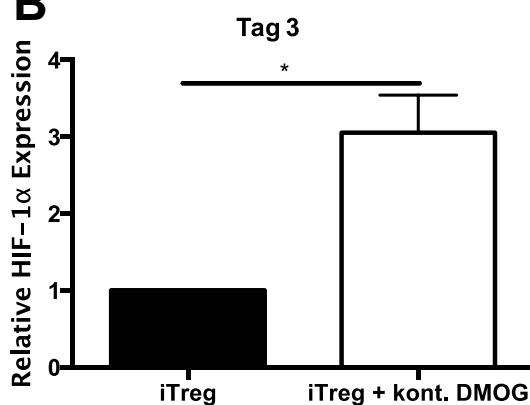
7.3 Der Einfluss von DMOG auf die HIF-1 α Stabilisierung in iTregs

Um den Einfluss von HIF-1 α auf die iTreg Differenzierung zu untersuchen, wurde HIF-1 α mittels chemischer Stimulation stabilisiert. Für die HIF-1 α Stabilisierung wurde DMOG verwendet. DMOG inhibiert den Abbau von HIF-1 α indem PHD-Enzyme gehemmt werden [92],[93].

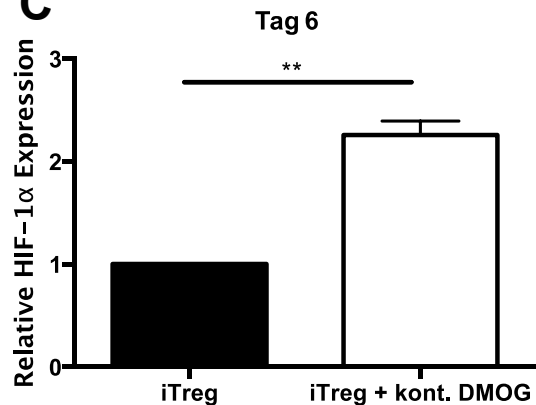
A



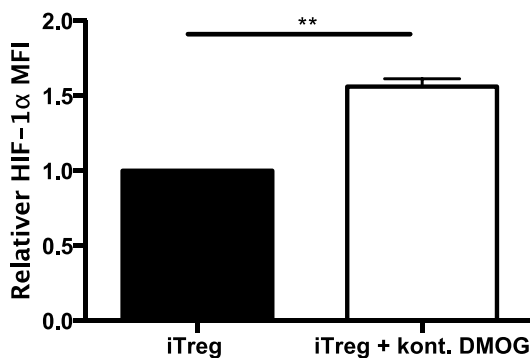
B



C



D



E

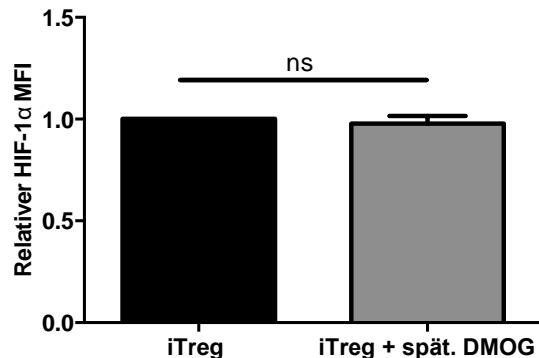


Abb. 7.9 Einfluss von DMOG auf die HIF-1 α Expression in iTregs. Die HIF-1 α Expression nach DMOG Stimulation wurde mittels Western Blots (A-C) und Durchflusszytometrie (D-E) analysiert. „spät. DMOG“ = Beginn der DMOG Stimulation an Tag 3 der Polarisation, „kont. DMOG“ = kontinuierliche DMOG Stimulation. A) Repräsentativer HIF-1 α Western Blot des Versuchs an Tag 3 der Polarisation B-C) Densitometrische Auswertung der HIF-1 α Expression von 6 unabhängigen Versuchen an Tag 3 (B) und Tag 6 (C) der iTreg Polarisation. Die Werte sind normalisiert auf die β -Aktin Werte sowie die Expression von HIF-1 α der iTregs (n=6). D-E) Durchflusszytometrie Analyse des HIF-1 α MFI an Tag 6 in den FOXP3⁺ Zellen (Normalisiert auf die unstimulierten iTregs) ohne und mit kontinuierlicher bzw. später DMOG Stimulation (n=6; ns= nicht signifikant, *p<0,05; ** p<0,01).

Die HIF-1 α Stabilisierung in iTregs durch DMOG wurde mittels Western Blot untersucht. Ab Tag 3 der Stimulation war die HIF-1 α Stabilisierung nachweisbar (**Abb. 7.9A,B und C**). Zusätzlich konnte HIF-1 α mittels Durchflusszytometrie Analyse an Tag 6 in der FOXP3⁺ Zellpopulation nachgewiesen wurde (**Abb. 7.9D**). Die HIF-1 α Stabilisierung konnte bei einer kontinuierlichen DMOG Stimulation an Tag 3 bis Tag 6 nachgewiesen werden (**Abb. 7.9D**). Für eine dauerhafte HIF-1 α Stabilisierung war eine konstante DMOG Stimulation notwendig, so führte eine an Tag 4 der Polarisation begonnenen DMOG Stimulation zu keinem stabilen HIF-1 α Signal (**Abb. 7.9E**). Die Inhibition von HIF-1 α durch PX-478 konnte ebenfalls mittels Western Blots gezeigt werden (**Abb. 7.9A**).

7.4 Der Einfluss von DMOG auf die Polarisierung von iTregs

Im Folgenden wurde der Einfluss der DMOG Stimulation auf die iTreg Differenzierung untersucht. Die kontinuierliche DMOG Stimulation führte zu einer Reduktion der Anzahl der FOXP3⁺ Zellen an Tag 6 der Polarisation (**Abb. 7.10A**). Eine späte DMOG Stimulation, begonnen an Tag 4 der Inkubation zeigte keinen Einfluss auf die iTreg Differenzierung (**Abb. 7.10B**). Die Vitalität der iTregs in Kombination mit DMOG wurde mittels *Live/Dead* und Ki67 Färbung an Tag 6 der Polarisation nachgewiesen (**Abb. 7.11**). Die Vitalität der iTregs war durch DMOG nicht signifikant beeinträchtigt, die kontinuierliche DMOG Stimulation führte zu keiner signifikanten Änderung der Ki67 Expression (**Abb. 7.11**).

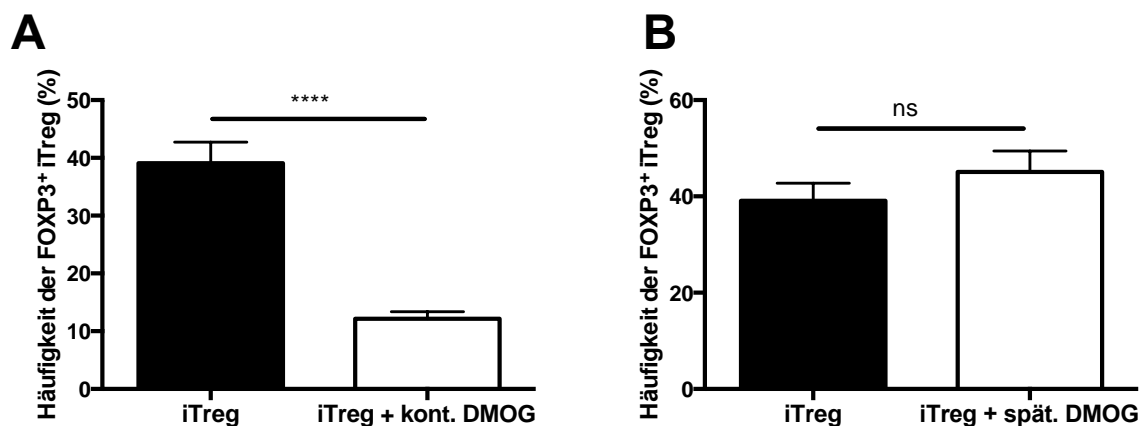


Abb. 7.10 Einfluss der DMOG Stimulation auf die iTreg Differenzierung. Durchflusszytometrie Analyse an Tag 6 über die Anzahl der FOXP3⁺ Zellen. A) Anzahl der FOXP3⁺ Zellen in Prozent ohne und mit kontinuierlicher DMOG Stimulation (n=12). B) Anzahl der FOXP3⁺ Zellen in Prozent ohne und mit später DMOG Stimulation (n=12; ns= nicht signifikant, ****p<0,0001).

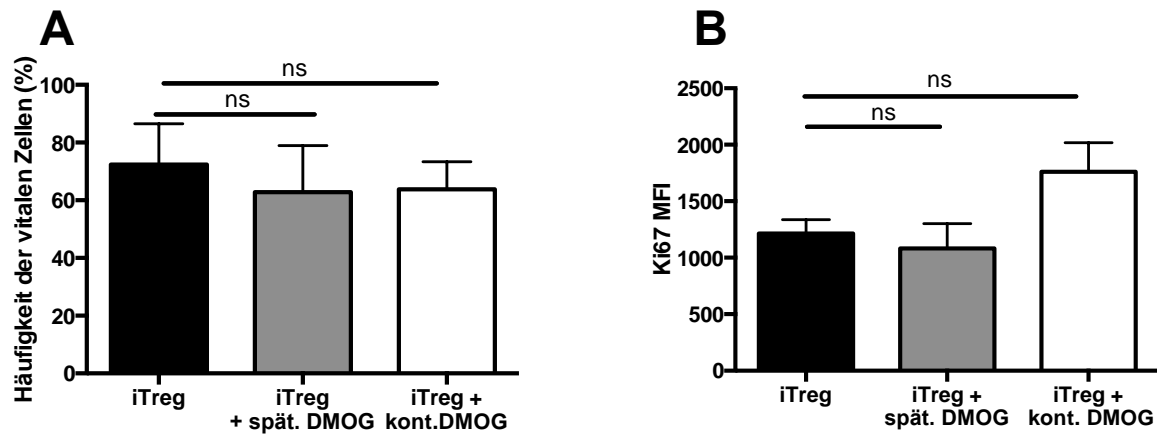


Abb. 7.11 Vitalität und Proliferation der Tregs unter DMOG Stimulation. Durchflusszytometrie Analyse der A) vitalen Zellen und des B) Ki67 MFI der FOXP3⁺ Zellen an Tag 6 der iTreg Polarisation ohne und mit DMOG Stimulation. Die DMOG Stimulation fand kontinuierlich statt (kont. DMOG) oder wurde an Tag 4 der Polarisation begonnen (spät. DMOG) (n=12; ns= nicht signifikant).

Durch eine chemische HIF-1 α Stabilisierung konnte die iTreg Differenzierung gehemmt werden.

7.5 Der Einfluss von Etx auf die HIF-1 α Stabilisierung in iTregs

Der Metabolismus hat Einfluss auf die iTreg Differenzierung. Es wurde untersucht, ob eine Inhibition der β -Oxidation zu einer Induktion von HIF-1 α und zu einer Beeinträchtigung der iTreg Polarisation führt. Zur Hemmung der β -Oxidation wurde Etx, ein irreversibler Inhibitor der Carnithin-Palmityltransferase, verwendet. Die Anwendung von Etx verhindert den Transfer von langkettigen Fettsäuren ins Mitochondrium und inhibiert so die Energiegewinnung mittels β -Oxidation [73].

Die Stimulation von Etx führte zu einem HIF-1 α Signal, das ab Tag 3 der Stimulation nachweisbar war (**Abb. 7.12**).

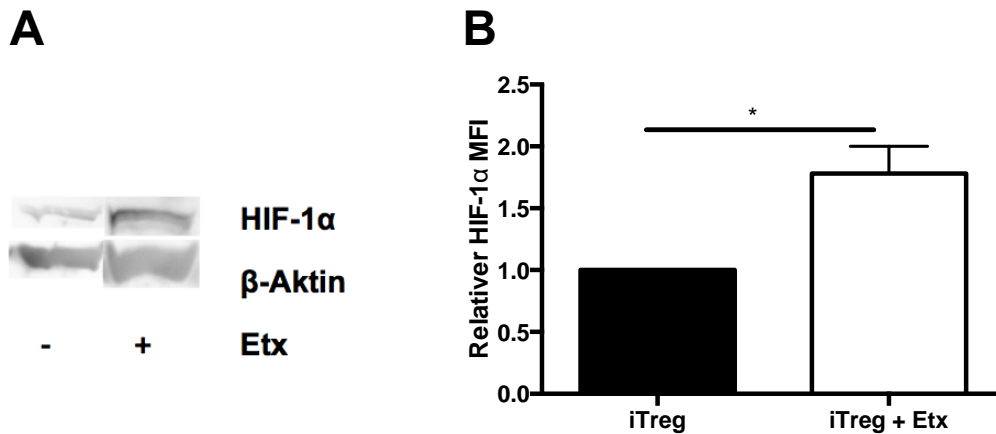


Abb. 7.12 Einfluss von Etx auf die HIF-1 α Expression in den iTregs. A) Repräsentativer Western Blot Versuch an Tag 3 der Polarisation ohne und mit Etx Stimulation. B) Analyse des HIF-1 α MFI an Tag 6 der iTreg Polarisation in den FOXP3⁺ Zellen ohne und mit Etx Stimulation untersucht mittels Durchflusszytometrie Analyse (n=6; * p<0,05).

Die mTORC1-Aktivierung wurde untersucht, um zu analysieren, ob die Etx Stimulation ähnlich wie IL-1 β zu einer mTORC1 Aktivierung führte. Es konnte keine Aktivierung des mTORC1-Signalwegs nachgewiesen werden (**Abb. 7.13A und B**). Eine Veränderung der Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs (analysiert durch eine c-rel Expression) konnte durch die Etx Stimulation nicht herbeigeführt werden (**Abb. 7.13C**).

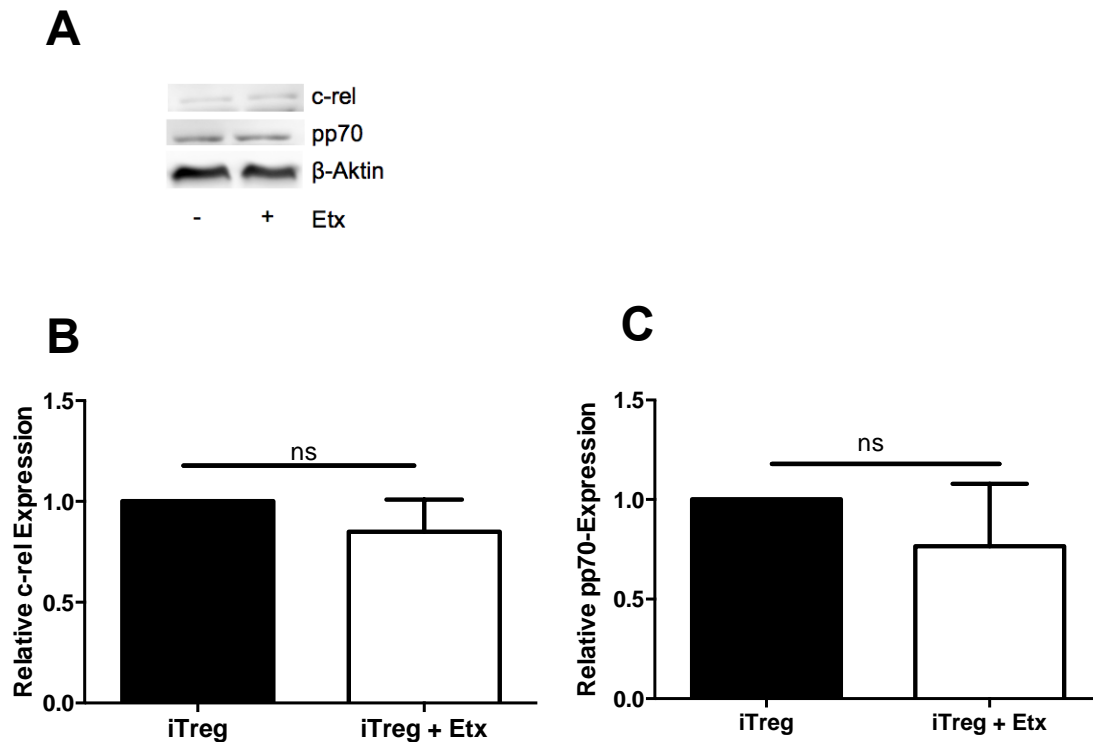


Abb. 7.13 Einfluss von Etx auf die mTORC1 und c-rel Stabilisierung. A) Repräsentativer Western Blot Versuch an Tag 3 der Polarisation ohne und mit Etx Stimulation. B-C) Densitometrische Auswertung von vier unabhängigen Versuchen. Die Werte wurden auf die β -Aktin Werte normalisiert sowie die Expression von pp70 und c-rel der iTregs ($n=4$; ns=nicht signifikant).

7.6 Der Einfluss von Etx auf die Polarisierung von iTregs

An Tag 6 der Polarisation der iTregs wurde der Einfluss von Etx auf die iTreg Differenzierung analysiert. Etx führte zu einer Reduktion der FOXP3⁺ Zellen (**Abb. 7.14A**). Die Proliferation der iTregs in Kombination mit Etx wurde mittels Ki67 Färbung an Tag 6 der Polarisation nachgewiesen (**Abb. 7.15**). Eine Kombination von PX-478 und Etx führte zu einer Beeinträchtigung der Vitalität und Proliferation. Aus diesem Grund konnte die Kombination nicht weiter analysiert werden. Die Addition von Rapamycin zu der Etx Stimulation führte nicht zu einer veränderten Anzahl der FOXP3⁺ Zellen (**Abb. 7.14B**).

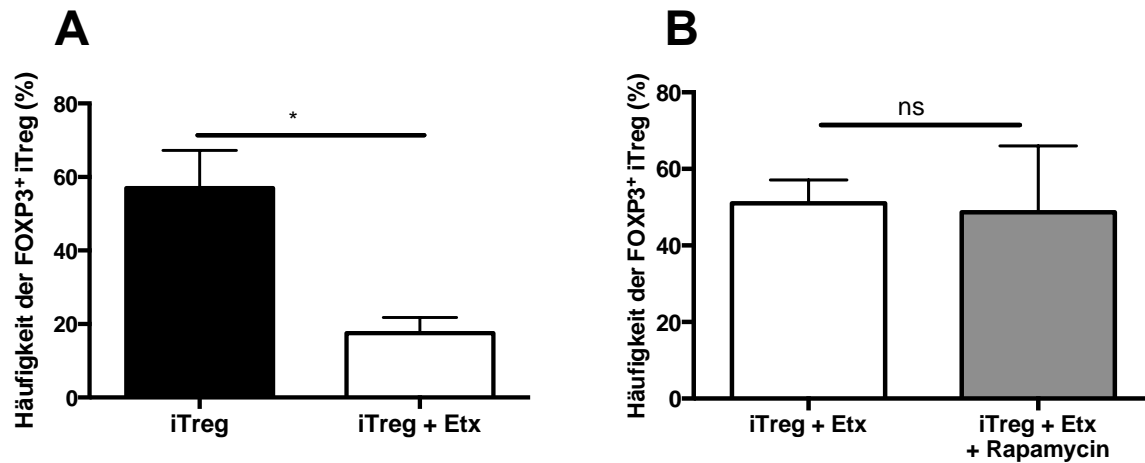


Abb. 7.14 Der Einfluss von Etx auf die iTreg Polarisation. Durchflusszytometrie Analyse an Tag 6 über die Anzahl der FOXP3⁺ Zellen. Es wurde die Anzahl der FOXP3⁺ Zellen anhand von unpolarisierten Zellen definiert. A) Anzahl der FOXP3⁺ Zellen in Prozent ohne und mit Etx Stimulation (n=6) B) Anzahl der FOXP3⁺ Zellen in Prozent mit Etx und Rapamycin Stimulation (n=6; ns= nicht signifikant, * p<0,05).

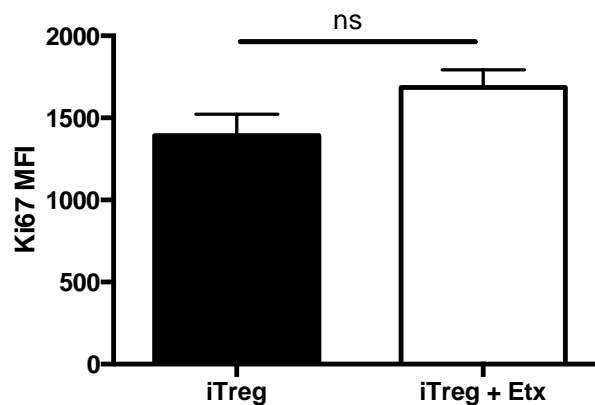


Abb. 7.15 Expression von Ki67 in iTregs unter Etx Stimulation. Durchflusszytometrie Analyse des Ki67 MFI an Tag 6 der iTreg Polarisation mit und ohne Etx Stimulation (n=6; ns= nicht signifikant.).

7.7 Der Einfluss der HIF-1 α Induktion auf die Zytokinproduktion der iTregs

Das HIF-1 α Level der iTregs wurde mit dem von iTh17 und Tcon Zellen verglichen, um die unterschiedliche Expression in den beiden T-Zellsubpopulationen zu untersuchen. Die Analyse des HIF-1 α Levels mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. iTregs wiesen ein höheres HIF-1 α Level als Tcons auf (**Abb. 7.16A**). Im Vergleich zu iTh17 Zellen war das HIF-1 α Level in iTregs allerdings geringer (**Abb. 7.16B**).

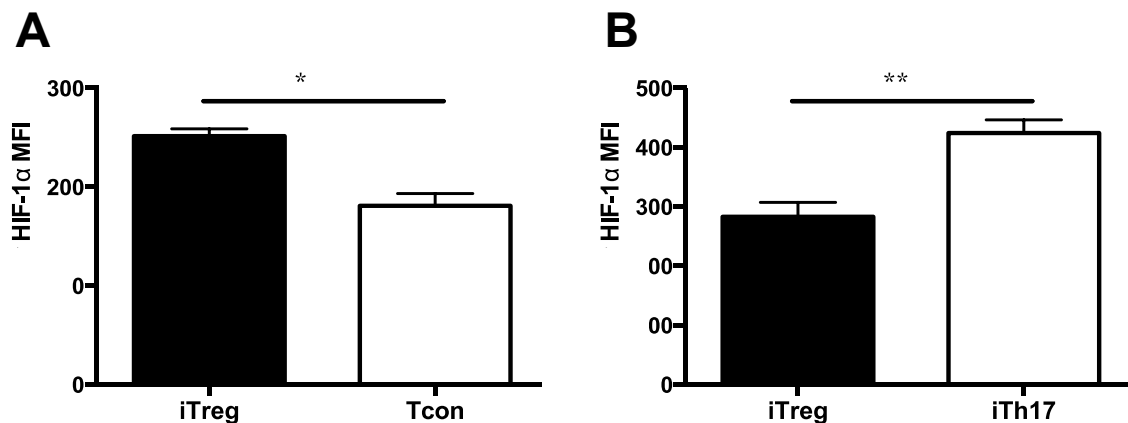


Abb. 7.16 HIF-1 α -Expression in Tregs im Vergleich zu Tcons und Th17 Zellen. A) HIF-1 α MFI an Tag 6 der Inkubation in aktivierten Tcons und iTregs B) HIF-1 α MFI an Tag 6 der Inkubation in aktivierten iTregs und iTh17 Zellen mittels Durchflusszytometrie Analyse untersucht. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde das *Gate* auf die gesamten Zellen gelegt (n=6; * p<0,05, ** p<0,01)

Um nachzuweisen, ob eine induzierte HIF-1 α Expression in iTregs zu einer pro-inflammatorischen Zytokinproduktion und damit zu einem veränderten inflammatorischen Profil führte, wurde die Zytokinproduktion der iTregs in Folge der HIF-1 α Stabilisierung analysiert. Der Einfluss von IL-1 β , DMOG und Etx wurden untersucht.

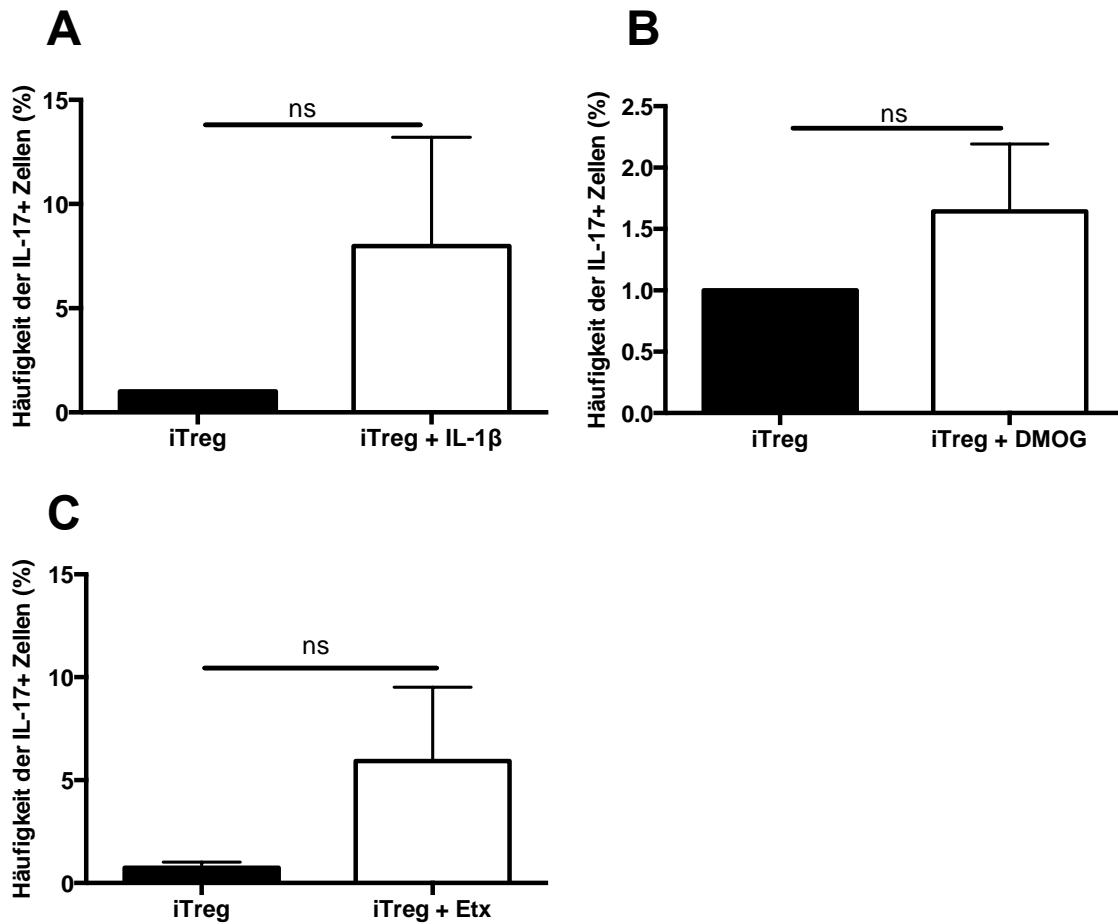


Abb. 7.17 Anzahl der IL-17+ Zellen nach HIF-1 α Stabilisierung. Durchflusszytometrie Analyse der Anzahl der IL-17+ Zellen an Tag 6 der Polarisation. Vergleich von A) IL-1 β (n=6) B) DMOG (n=6) und C) Etx Stimulation (n=4; ns=nicht signifikant).

Die Anzahl der IL-17+ Zellen wurde durch die HIF-1 α Induktion nicht signifikant verändert (**Abb. 7.17**).

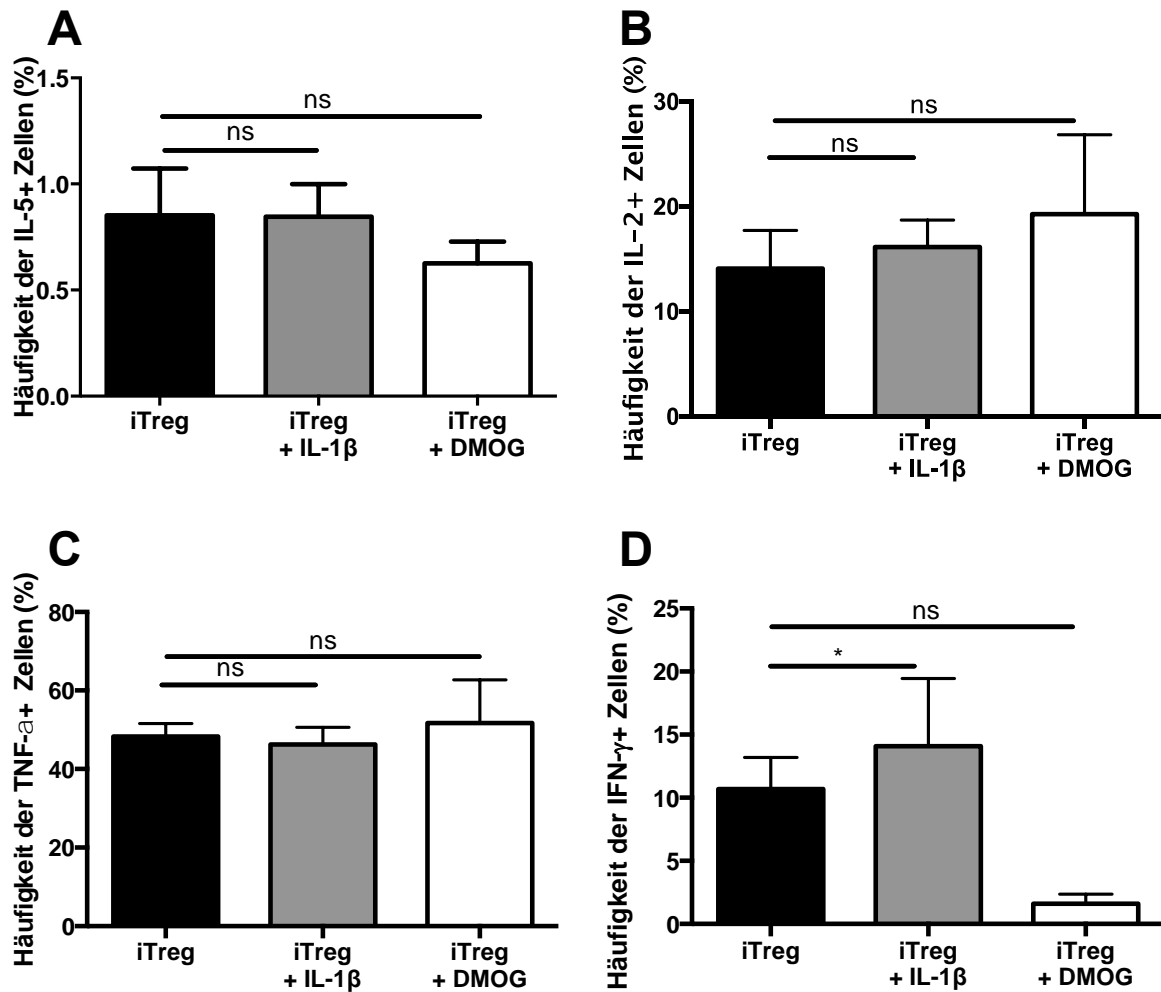


Abb. 7.18 Zytokinproduktion der iTregs nach HIF-1 α Stabilisierung. Durchflusszytometrie Analyse der A) IL-5, B) IL-2, C) TNF- α und D) IFN- γ Produktion in den iTreg polarisierten Zellen an Tag 6 der Polarisation jeweils bei DMOG, IL-1 β oder ohne zusätzliche Stimulation. (n=5; ns=nicht signifikant; * p<0,05). Statistische Analyse mittels ANOVA. Experimente durchgeführt von Cesar Ruenda.

Die HIF-1 α Stabilisierung führte zu keinem veränderten Zytokinprofil der iTregs (**Abb. 7.17**, **Abb. 7.18**). Lediglich die IFN- γ Produktion wurde durch IL-1 β signifikant gesteigert. Die Inhibition des IFN- γ -Rezeptors führte nicht zu einer veränderten Differenzierung der iTregs [94].

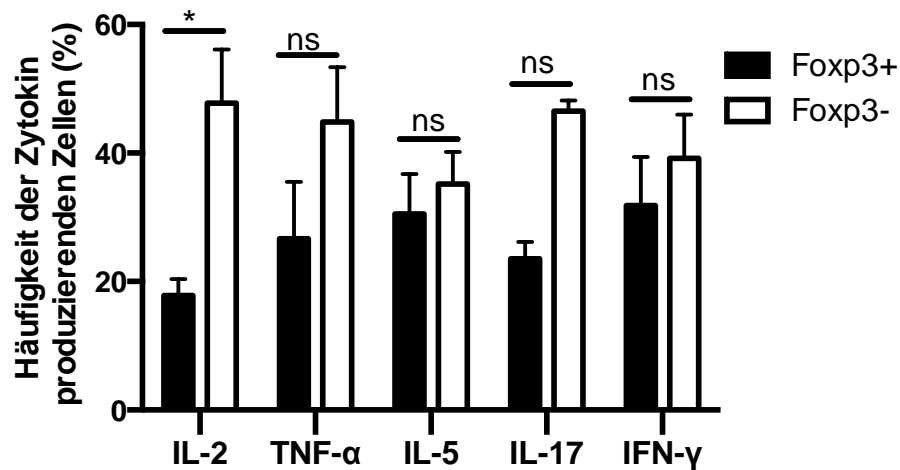


Abb. 7.19 Zytokinproduktion der FOXP3⁺ Population im Vergleich zur FOXP3⁻ Population unter Treg Polarisationsbedingungen. Durchflusszytometrie Analyse der IL-2, TNF- α , IL-5, IL-17 und IFN- γ Produktion in FOXP3⁺ im Vergleich zu FOXP3⁻ Zellen unter iTreg polarisierenden Bedingungen Zellen an Tag 6 (n=6; ns=nicht signifikant; * p<0,05). Experimente durchgeführt von Cesar Ruenda.

Des Weiteren wurde die Zytokinproduktion der FOXP3⁺ Population im Vergleich zur Zytokinproduktion der FOXP3⁻ Population der Zellen an Tag 6 der Treg Polarisierung untersucht. Die Populationen zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Produktion von TNF- α , IL-5, IL-17 und IFN- γ (**Abb.7.19**). Die IL-2 Expression war in den FOXP3⁺ Zellen signifikant niedriger, als in den FOXP3⁻ Zellen (**Abb.7.19**).

7.8 Der Einfluss der HIF-1 α Induktion in Tcons und FOXP3⁻ Zellen

Um zu untersuchen, ob der Einfluss der HIF-1 α Induktion iTreg spezifisch ist, wurde der Einfluss der unterschiedlichen HIF-1 α induzierenden Stimuli in Tcons und FOXP3⁻ Zellen untersucht.

7.8.1 Die HIF-1 α Expression in FOXP3⁻ Zellen

Die kontinuierliche Stimulation der Zellen mit DMOG führte ebenfalls in den FOXP3⁻ Zellen unter iTreg Polarisierung an Tag 6 zu einer Induktion von HIF-1 α (**Abb. 7.20A**). Die Stimulation der Zellen mit IL-1 β , Etx oder PX-478 führte zu keiner Veränderung der HIF-1 α Expression in den FOXP3⁻ Zellen (**Abb. 7.20B, C und D**).

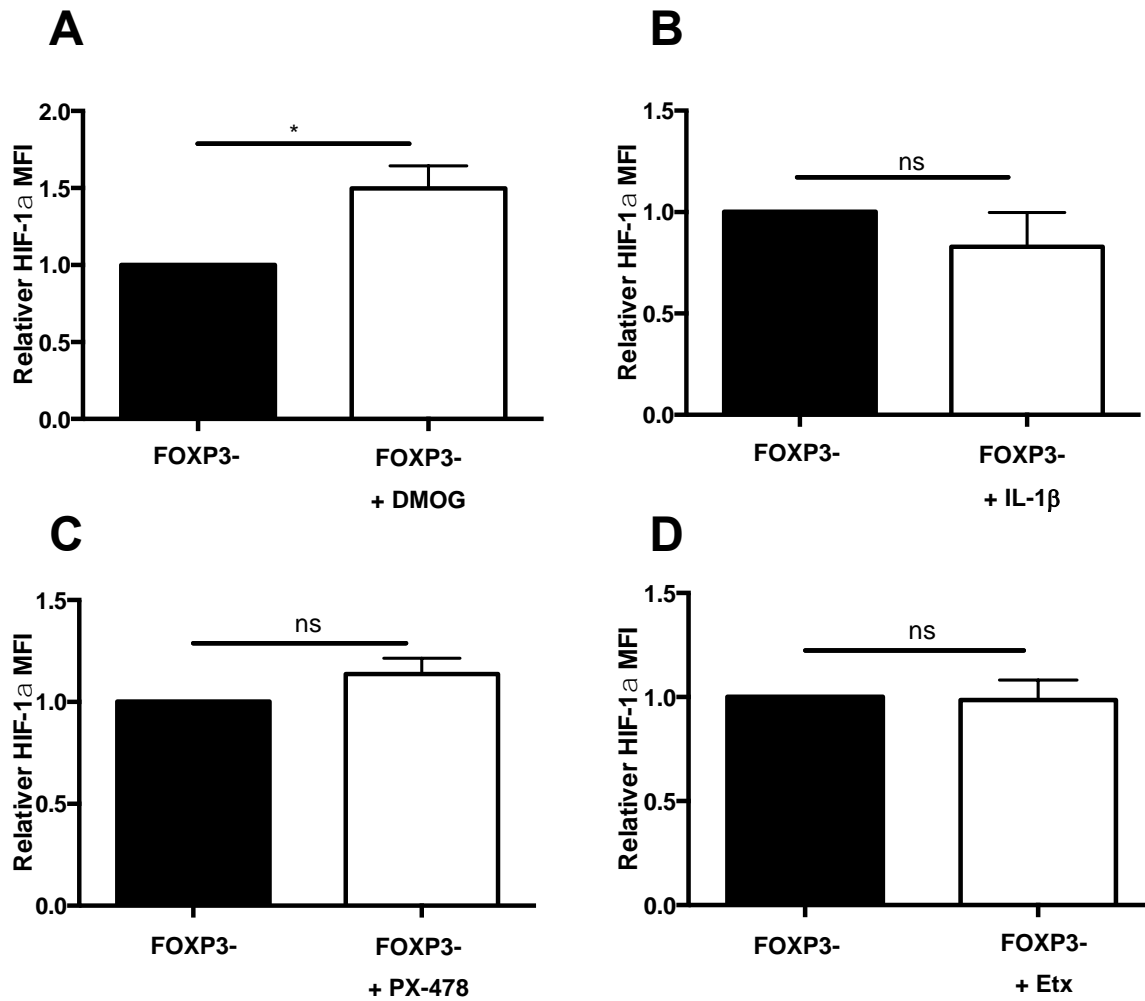


Abb. 7.20 HIF-1 α Expression in FOXP3⁻ Zellen. A)-D) Der HIF-1 α MFI an Tag 6 der Inkubation in den FOXP3⁻ Zellen inkubiert unter iTreg Konditionen untersucht mittels Durchflusszytometrie Analyse. Die Zellen wurden stimuliert mit A) kontinuierlich DMOG, B) IL-1 β , C) PX-478 und D) Etx (n=6; ns=nicht signifikant, * p<0,05).

7.8.2 Die HIF-1 α und FOXP3 Expression in Tcons

Die Stimulation von aktivierten Tcons mit DMOG, IL-1 β und Etx führte an Tag 6 der Inkubation zur keiner signifikanten Veränderung der HIF-1 α und FOXP3 Expression (Abb. 7.21, Abb. 7.22).

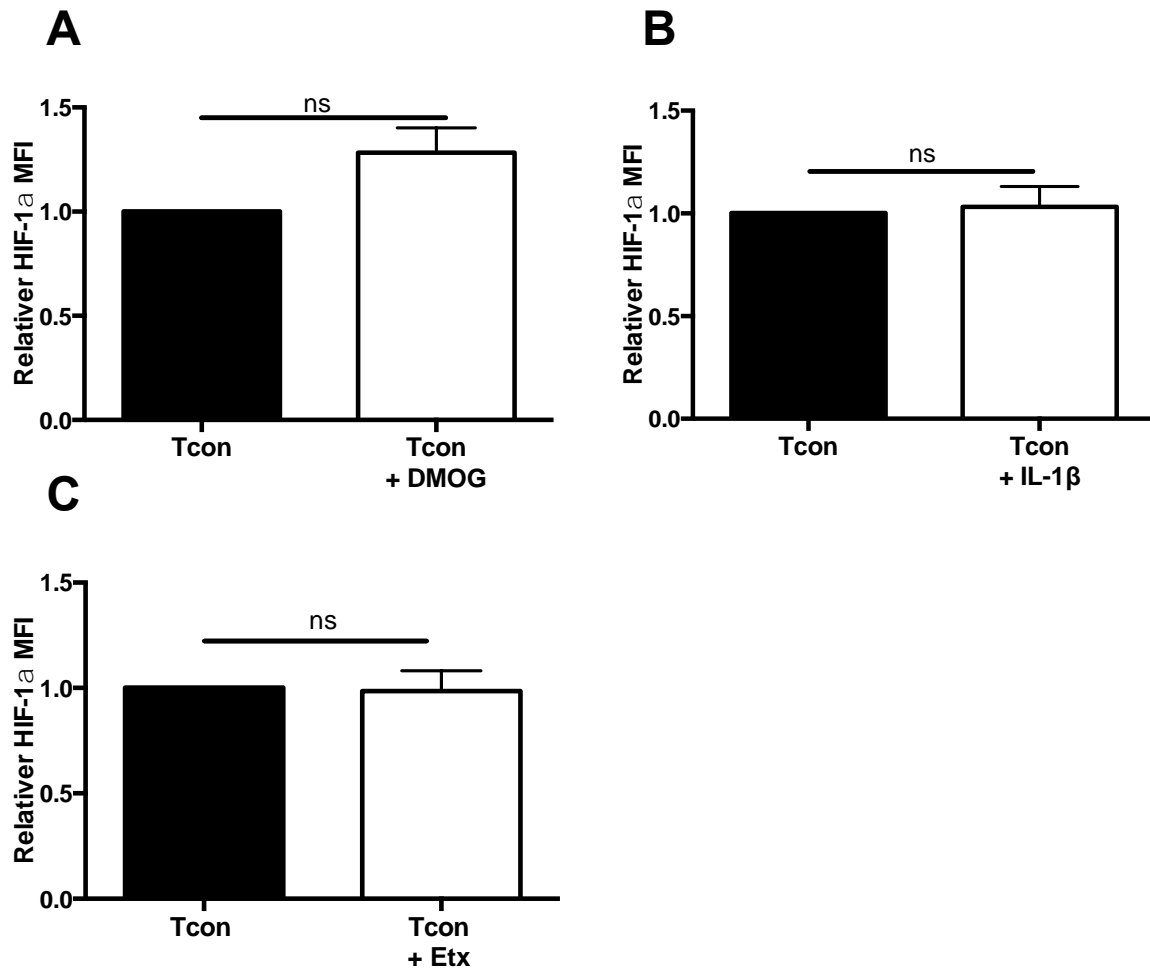


Abb. 7.21 HIF-1 α Stabilisierung in Tcons. A)-C) Der HIF-1 α MFI an Tag 6 der Tcons untersucht mittels Durchflusszytometrie Analyse. Die Zellen wurden stimuliert mit A) kontinuierlich DMOG, B) IL-1 β , C) Etx (n=6; ns=nicht signifikant).

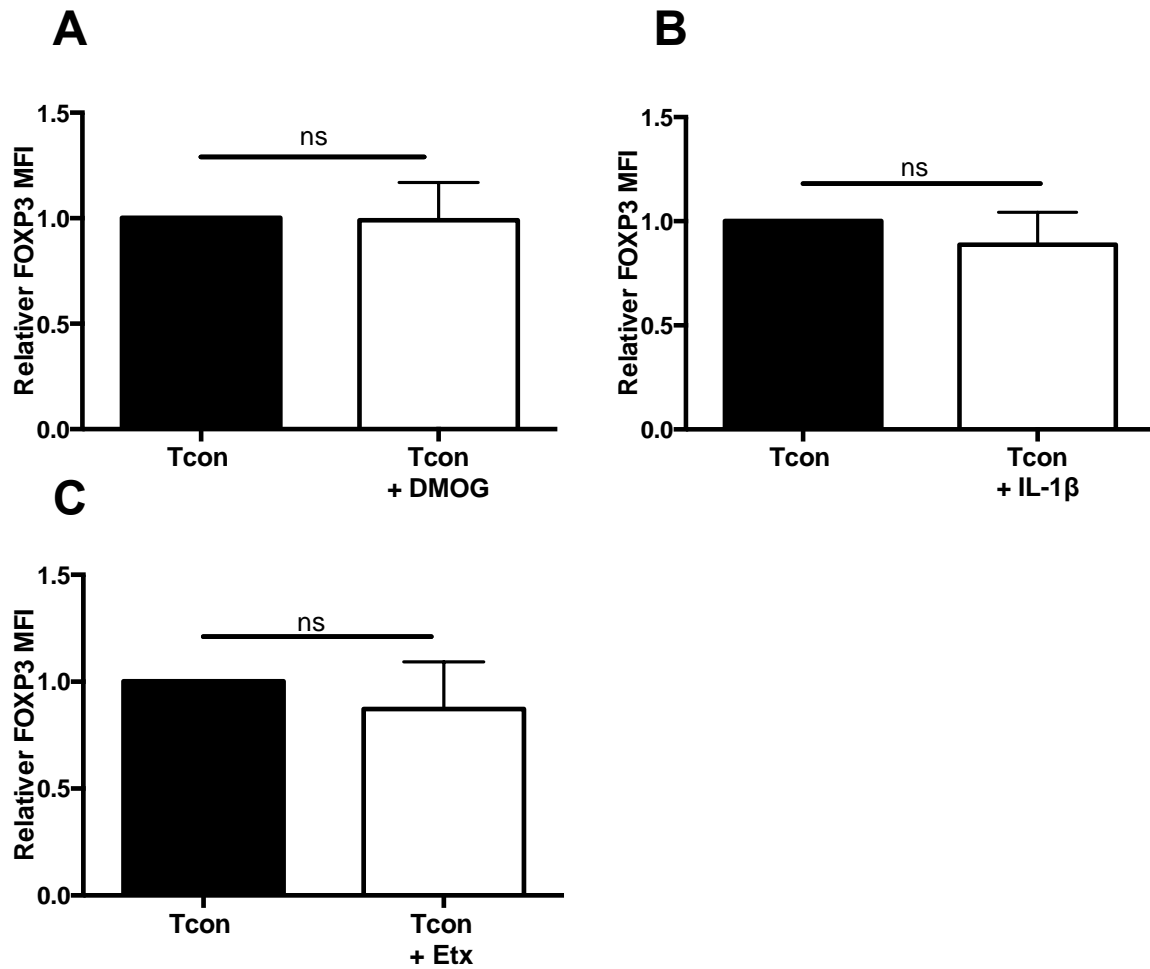


Abb. 7.22 FOXP3 Expression in Tcons. A)-C) Der FOXP3 MFI an Tag 6 der Tcons untersucht mittels Durchflusszytometrie Analyse. Die Zellen wurden stimuliert mit A) kontinuierlich DMOG, B) IL-1 β , C) Etx (n=6; ns=nicht signifikant).

7.9 Der Einfluss der HIF-1 α Induktion auf den iTreg Metabolismus

Die HIF-1 α Stabilisierung spielt eine wesentliche Rolle in der Adaptation des Zellmetabolismus. Um die Unterschiede im Stoffwechsel der HIF-1 α Stabilisierung, IL-1 β Stimulation und Inhibierung der β -Oxidation differenzierter zu analysieren, wurde die mitochondriale Respiration der iTregs untersucht.

7.9.1 Die mitochondriale Respiration

Die Stabilisierung von HIF-1 α durch kontinuierliche DMOG Stimulation führte zu einer Reduktion der mitochondrialen Respiration an Tag 1 der Polarisierung (**Abb. 7.23**).

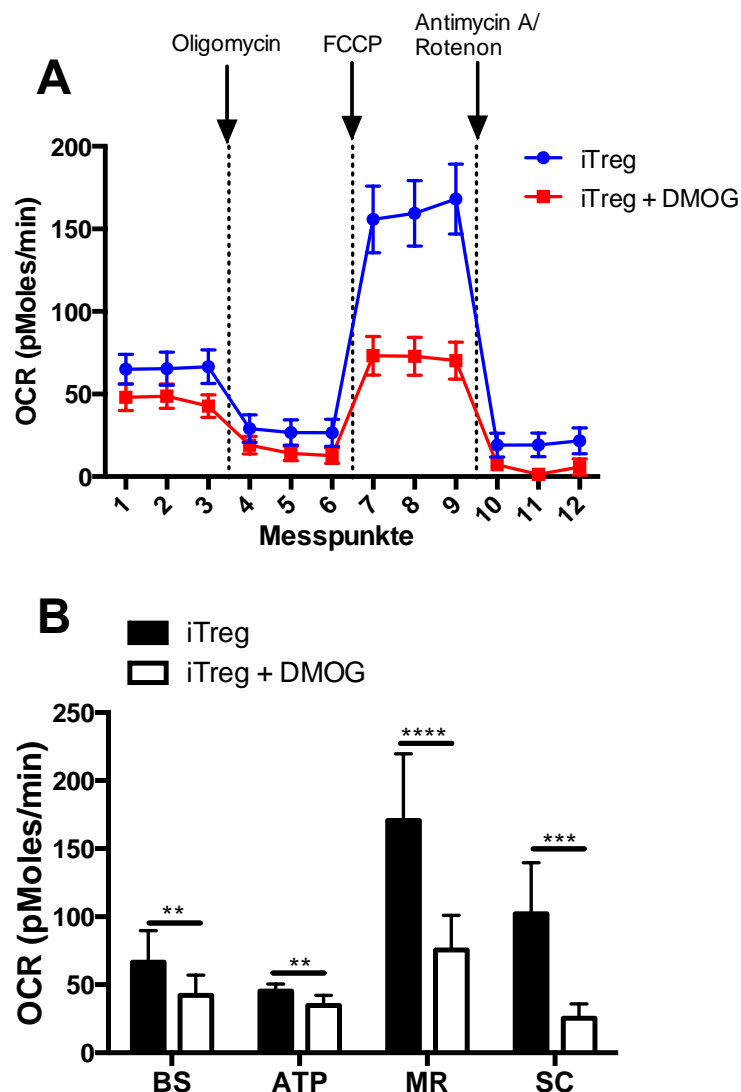


Abb. 7.23 Einfluss von DMOG auf die mitochondriale Respiration. Die Analyse erfolgte nach 24-stündiger Aktivierung der Zellen mit anti-CD3/anti-CD28 *Beads* sowie ohne und mit 24 h Vorinkubation mit DMOG A) Ergebnis der OCR von 3 unabhängigen *mito-stress* test Versuchen, dargestellt sind die 12 Messpunkte über die Zeit (n=3). B) OCR dreier unabhängiger Experimente (n=3; **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001).

Da der IL-1 β Rezeptor im Zuge der Zellaktivierung auf den Tregs hochreguliert wird, wurden die Zellen 48 h mit antiCD3/anti-CD28 *Beads* aktiviert (**Abb. 7.5**). Die mitochondriale Respiration nach IL-1 β Stimulation wurde an Tag 3 der iTreg Polarisation untersucht. Die IL-1 β Stimulation führte lediglich zu einer geringen, aber signifikanten Abnahme der Reservekapazität und der maximalen Respiration der iTregs (**Abb. 7.24**).

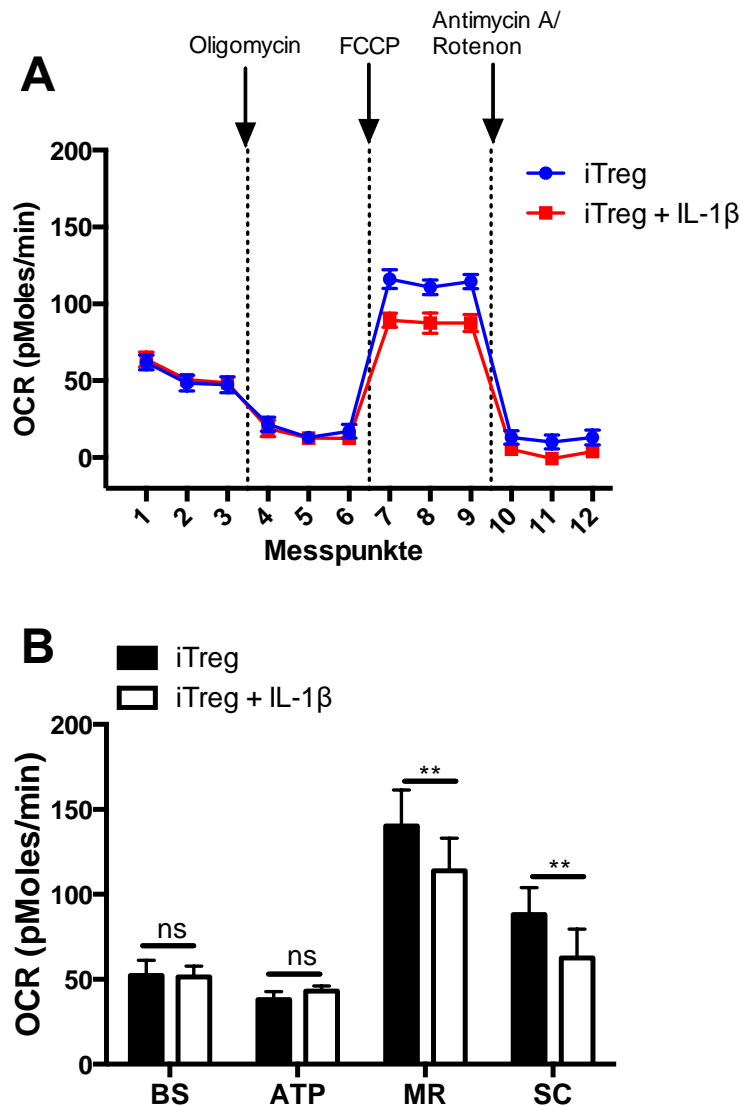


Abb. 7.24 Einfluss von IL-1 β auf die mitochondriale Respiration. Die Analyse der mitochondrialen Respiration erfolgte nach 48-stündiger Aktivierung der Zellen mit anti-CD3/anti-CD28 *Beads* mit und ohne IL-1 β Stimulation A) Ergebnis der OCR von 3 unabhängigen *mito-stress* test Versuchen, dargestellt sind die 12 Messpunkte über die Zeit (n=3). B) OCR dreier unabhängiger Experimente (n=3; ns= nicht signifikant, **p<0,01).

Die mitochondriale Respiration der iTregs wurde nach Inhibition der β -Oxidation untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der β -Oxidation die mitochondriale Respiration in ähnlicher Weise wie die DMOG Stimulation

beeinflusste (**Abb. 7.25**). Die basale Respiration, die ATP Produktion, die maximale Respiration und die Reservekapazität wurde durch die β -Oxidation Inhibition signifikant reduziert (**Abb. 7.25**).

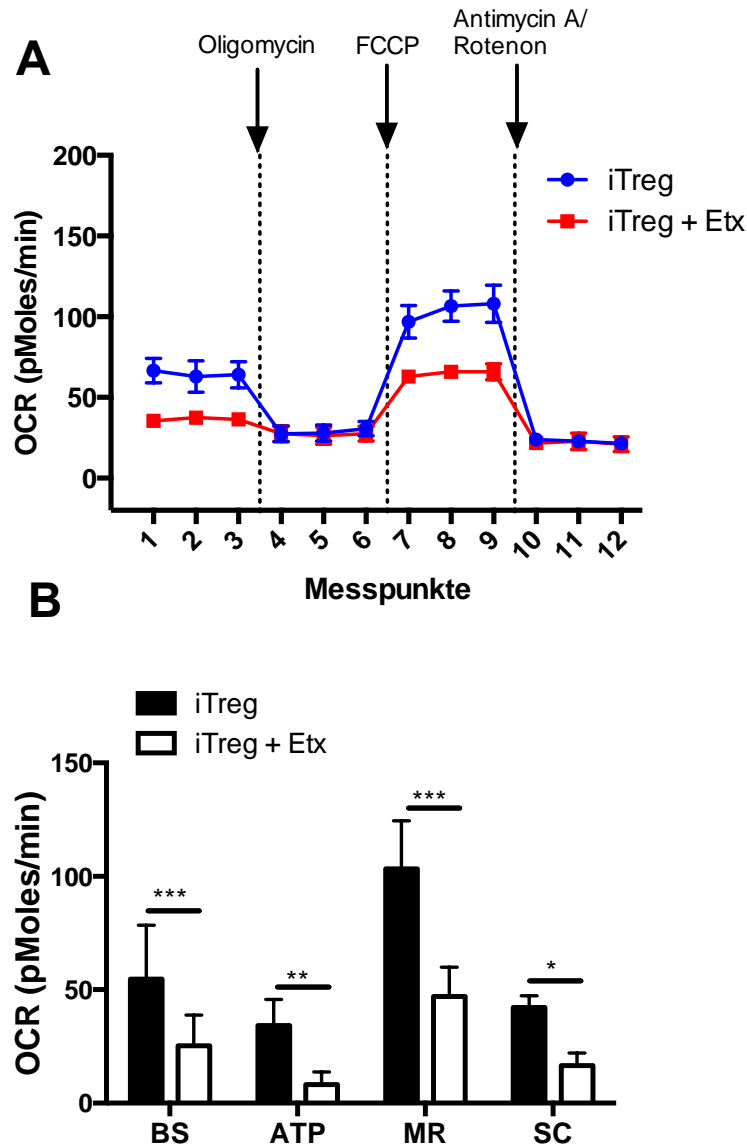


Abb. 7.25 Einfluss von Etz auf die mitochondriale Respiration. Die Analyse erfolgte nach 24-stündiger Aktivierung der Zellen mit anti-CD3/anti-CD28 *Beads* sowie ohne und mit 24 h Vorinkubation mit Etz A) Ergebnis der OCR von 3 unabhängigen *mito-stress test* Versuchen, dargestellt sind die 12 Messpunkte über die Zeit (n=3). B) OCR dreier unabhängiger Experimente (n=3; * p<0,05; **p<0,01, ***p<0,001).

Um zu untersuchen, ob die Inhibition von HIF-1 α einen Einfluss auf die mitochondriale Respiration hat, wurde der Sauerstoffverbrauch der iTregs nach PX-478 Stimulation an Tag 1 untersucht. Eine veränderter OCR konnte durch PX-478 nicht nachgewiesen werden (**Abb. 7.26**).

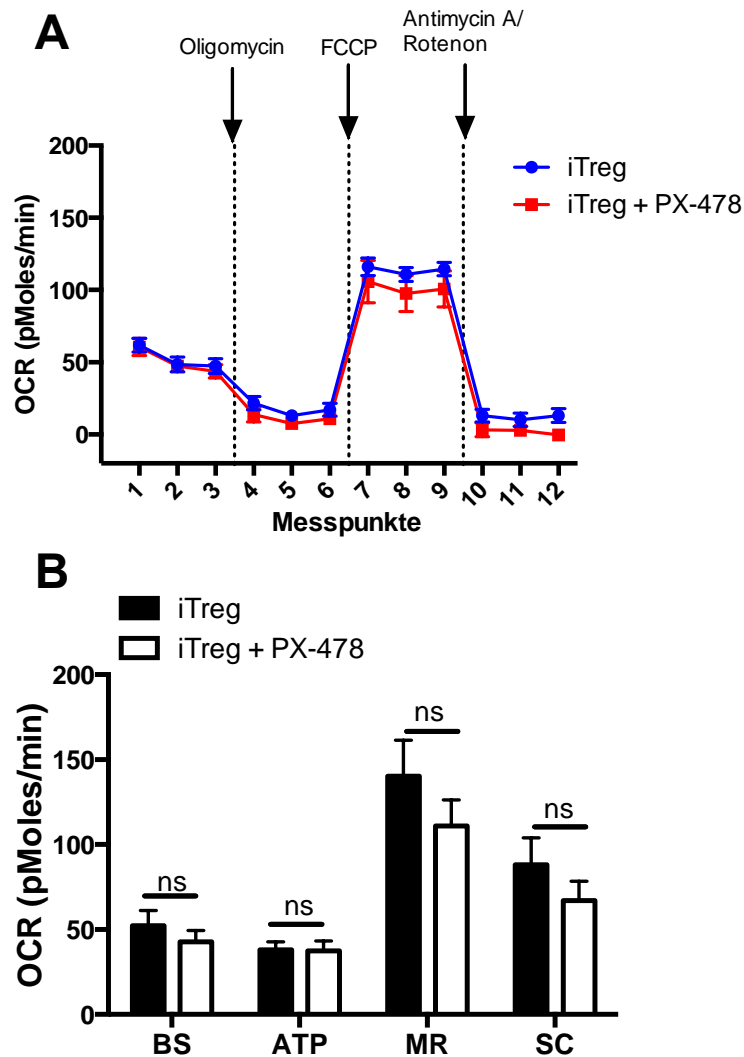


Abb. 7.26 Einfluss von PX-478 auf die mitochondriale Respiration. Die Analyse erfolgte nach 24 h Aktivierung der Zellen mit anti-CD3/anti-CD28 *Beads* sowie ohne und mit 24 h Vorinkubation mit PX-478 A) Ergebnis der OCR von 3 unabhängigen *mito-stress test* Versuchen, dargestellt sind die 12 Messpunkte über die Zeit (n=3). B) OCR dreier unabhängiger Experimente (n=3; ns= nicht signifikant).

7.9.2 Die Beeinflussung des Glukosemetabolismus

Um den geringen Einfluss von IL-1 β auf die mitochondriale Respiration von der HIF-1 α Induktion zu differenzieren, wurde der glykolytische Stoffwechselweg der Zellen näher untersucht. Zunächst wurde die Glut-1 Expression mittels Durchflusszytometrie Analysen an Tag 6 der iTreg Polarisation nach HIF-1 α Induktion und IL-1 β Stimulation untersucht.

Die HIF-1 α Induktion durch eine kontinuierliche DMOG Stimulation führten zu einer signifikanten Erhöhung der Glut-1 Expression (**Abb. 7.27B**). Interessanterweise

fürte die Stimulation mit IL-1 β zu einer deutlichen Reduktion der Glut-1 Expression auf den iTregs (**Abb. 7.27A**).

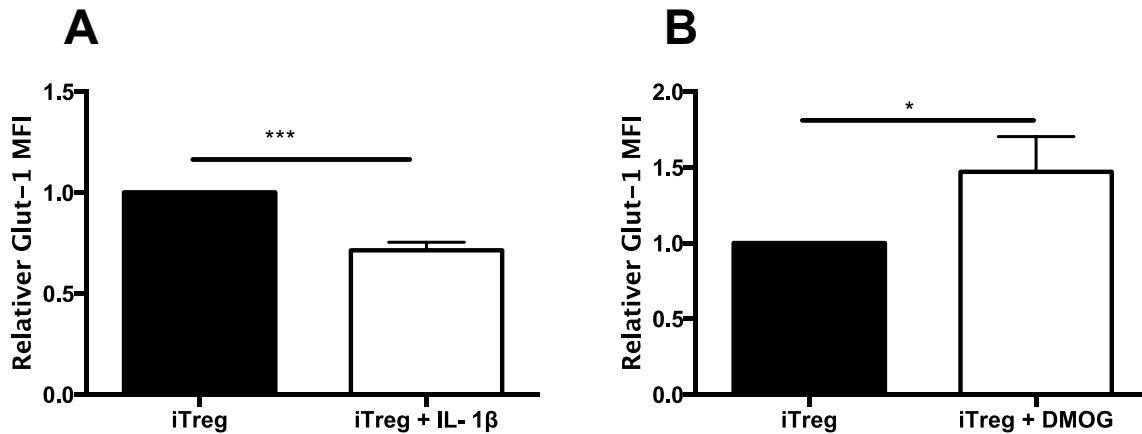


Abb. 7.27 Glut-1 Expression in iTregs nach HIF-1 α Induktion. Durchflusszytometrie Analyse der Glut-1 Expression an Tag 6 der Polarisation in den FOXP3⁺ iTregs. Verglichen wurde die Expression von Glut-1 in iTregs mit iTregs unter kontinuierlicher IL-1 β (A) oder kontinuierlicher DMOG (B) Stimulation. Die Ergebnisse wurden auf iTreg normalisiert (n=12; * p<0,05; ***p<0,001).

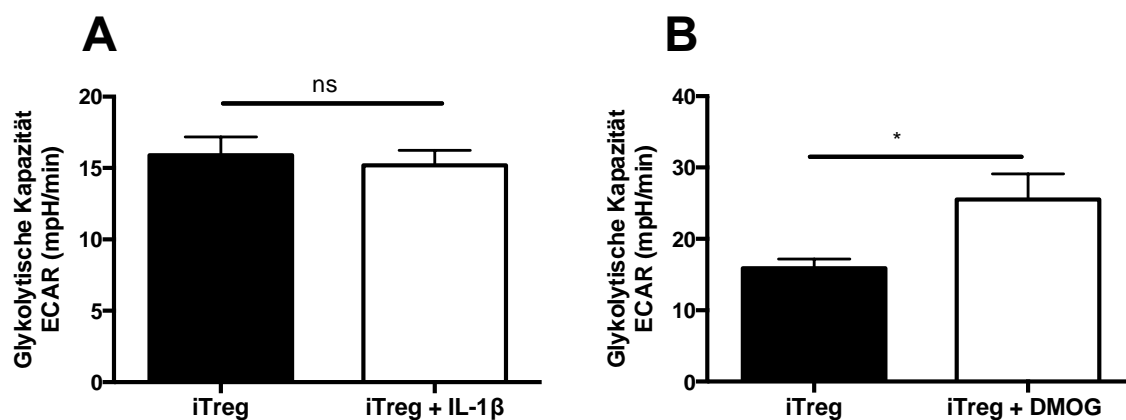


Abb. 7.28 Einfluss der HIF-1 α Induktion und IL-1 β Stimulation auf die glykolytische Kapazität der iTregs. Vergleich der glykolytischen Kapazität von iTreg nach 24 h bzw- 48 h Stimulation mit A) DMOG oder B) IL-1 β (n=3; ns= nicht signifikant, *p<0,05).

Um die Unterschiede der Beeinflussung von IL-1 β Stimulation und HIF-1 α Induktion durch DMOG auf die Glut-1 Expression zu differenzieren, wurde die Beeinflussung des glykolytischen Metabolismus in der frühen iTreg Polarisation untersucht. Mit Hilfe des XFe24 Analyzers wurde die glykolytische Kapazität der iTregs nach 24 h bzw. 48 h Stimulation mit DMOG oder IL-1 β analysiert (**Abb. 7.28**). Es konnte gezeigt werden, dass DMOG Stimulation die glykolytische Kapazität der iTregs signifikant erhöht, während IL-1 β keinen Einfluss auf die glykolytische Kapazität hatte (**Abb. 7.28**).

8 Diskussion

8.1 IL-1 β ist ein wichtiger Inhibitor der iTreg Differenzierung

IL-1 β spielt eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie von Autoimmunerkrankungen und chronisch entzündlichen Prozessen. Bei einigen Erkrankungen dient das im Blut messbare IL-1 β als ein Marker für die Krankheitsaktivität der Patienten und eine spezifische Blockade von IL-1 β kann zur Remission der Erkrankung führen [95]–[97].

Der IL-1 β Rezeptor ist erforderlich, um das pro-inflammatorische Signal weiterzuleiten. Der Rezeptor wird auf Tcons und iTregs nach der Aktivierung über den TCR gleichermaßen hochreguliert (**Abb. 7.5**). Für iTregs wurde hier zudem gezeigt, dass dies unabhängig von der Anwesenheit von IL-1 β geschieht. An Tag 6 der Polarisation war die Anzahl der FOXP3⁺ Zellen durch eine IL-1 β Stimulation signifikant verringert (**Abb. 7.4**). Diese Ergebnisse sind im Einklang mit vorherigen Studien, die zeigen konnten, dass der IL-1Rezeptor auf Tregs stark exprimiert wird und IL-1 β in murinen Tregs die Umwandlung von FOXP3⁺ Zellen in FOXP3⁻ Zellen herbeiführte [64].

Die Daten dieser Arbeit zeigen erstmalig, dass die Inhibition der iTreg Differenzierung durch IL-1 β HIF-1 α vermittelt ist (**Abb. 7.1**). Die IL-1 β vermittelte HIF-1 α Induktion wurde bereits in nicht-hämatopoetischen Zellen nachgewiesen, konnte bislang aber nicht für CD4⁺ Zellen gezeigt werden [98]. Neben der Stabilisierung von HIF-1 α auf Proteinebenen, konnten eine Induktion von HIF-1 α und HIF-1 α *target genes* auf mRNA Ebene nachgewiesen werden [94]. Der IL-1 β Effekt konnte HIF-1 α direkt zugeordnet werden, da er durch HIF-1 α Inhibition aufgehoben werden konnte (**Abb. 7.4, Abb. 7.7**). Durch Messung der Proliferation und Vitalität der iTregs, stellten wir sicher, dass der Effekt nicht durch Toxizität oder Hemmung der Zellproliferation herbeigeführt wurde (**Abb. 7.6**). Um auszuschließen, dass der Effekt über HIF-1 β vermittelt wird, wurden die HIF-1 β Level in den unterschiedlichen Konditionen mittels Western Blot gemessen (Daten nicht dargestellt). Es konnte gezeigt werden, dass HIF-1 β nicht durch IL-1 β stabilisiert wurde [94].

Eine wichtige Erkenntnis der Versuche war außerdem, dass die HIF-1 α Induktion durch IL-1 β in iTregs mTORC1 vermittelt war (**Abb. 7.2, Abb. 7.4**). Die negative Rolle von mTORC1 auf die iTreg Differenzierung konnte bereits in Studien mit Mäusezellen nachgewiesen werden. Dabei konnte die mTORC1 Aktivierung über

unterschiedliche Stimuli erfolgen, wie die TCR-Aktivierung, CD28-Stimulation oder die Zytokinrezeptor-Stimulation [99]. In Tregs ist der mTORC1-Signalweg relativ gering aktiviert. Allerdings konnte nachgewiesen werden, dass der Signalweg über eine oszillierende Aktivität die Proliferation von Tregs unterstützt [100]. Im Gegensatz dazu inhibiert eine dauerhafte mTORC1-Aktivierung die Treg Differenzierung und Funktion [101],[102]. In dieser Arbeit konnte der negative Einfluss der konstanten Aktivierung des mTORC1-Signalwegs durch die IL-1 β Stimulation in den iTregs nachgewiesen werden (**Abb. 7.2, Abb. 7.4.**). Durch die Hemmung des mTORC1 Signalwegs mittels Rapamycin wurde die HIF-1 α Induktion durch IL-1 β verhindert (**Abb. 7.2**). Dieser Versuch zeigt die direkte Abhängigkeit des HIF-1 α Signals vom mTORC1 Signalweg. Über das HIF-1 α Signal hinaus, war auch die IL-1 β vermittelte Hemmung der iTreg Polarisation direkt mTORC1 abhängig. Durch die Kombination von IL-1 β und Rapamycin, konnten wir nachweisen, dass für die Inhibition der iTreg Polarisation durch IL-1 β ein mTORC1 Signal erforderlich ist (**Abb. 7.8**).

Die Verbindung des mTORC1 und HIF-1 α Signalwegs, die in der Arbeit nachgewiesen werden konnte, wurde bereits für Th17 Zellen beschrieben. mTORC1 ist notwendig für die HIF-1 α Induktion in den Th17 Zellen [91]. Die neue Komponente dieser Studie besteht in der Verbindung des IL-1 β Signals mit mTORC1 und HIF-1 α . Die IL-1 β vermittelte HIF-1 α Induktion in nicht-hämatopoetischen Zellen wird NF- κ B-abhängig vermittelt [67],[103],[104]. Wir konnten in unseren Versuchen nicht nachweisen, dass die HIF-1 α Induktion durch IL-1 β abhängig vom NF- κ B Signalweg stattfand (**Abb. 7.3**). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die IL-1 β vermittelte HIF-1 α Induktion in CD4⁺ Zellen über einen anderen Signalweg als in nicht-hämatopoetischen Zellen vermittelt wird. Die Ergebnisse zeigen, dass ähnlich wie in Th17 Zellen die HIF-1 α Induktion mTORC1 abhängig ist.

8.2 HIF-1 α Stabilisierung mittels DMOG und Etx hemmt die iTreg Polarisation

Der negative Einfluss der HIF-1 α Stabilisierung auf die iTreg Polarisierung konnte bereits in vielen Studien mit murinen Zellen nachgewiesen werden. Wir untersuchten zwei weitere Wege, um eine HIF-1 α Induktion in den humanen iTregs herbeizuführen. Wir wählten einen klassischen chemischen HIF-1 α Stabilisierer DMOG, dessen HIF-1 α induzierendes Potenzial in T-Zellen wir in Vorstudien bereits nachgewiesen hatten [90],[105]. Auch in den iTregs war es uns möglich durch kontinuierliche DMOG Stimulation HIF-1 α zu induzieren (**Abb. 7.9**). Interessanterweise führte eine DMOG

Stimulation zu Beginn oder Ende der Polarisation nicht zu einem messbaren HIF-1 α Signal (Daten nicht dargestellt). Vergleichbar mit Vorstudien in Mäusezellen, hemmte die HIF-1 α Induktion die Polarisierung der human iTregs (**Abb. 7.10**). Um zu überprüfen, dass die Reduktion nicht über eine toxische oder proliferationshemmende Wirkung erfolgte, haben wir die Vitalität und Ki67 Expression der Zellen gemessen (**Abb. 7.11**). Mit Hilfe dieser Versuche konnten wir folglich zeigen, dass die direkte Stabilisierung von HIF-1 α auch in humanen iTregs einen hemmenden Einfluss hat.

Einige Studien beleuchten den negativen Einfluss der Hemmung der β -Oxidation auf die iTreg Polarisierung [73],[91]. Wir wollten analysieren, ob diese Hemmung möglicherweise ebenfalls HIF-1 α vermittelt wird. Um dies zu überprüfen haben wir die β -Oxidation mit Etx inhibiert. Der Metabolismus der Zellen stellt sich nach Etx Gabe auf glykolytische Stoffwechselwege um. Interessanterweise konnten wir nachweisen, dass HIF-1 α durch Etx induziert wird (**Abb. 7.12**). Um mögliche Parallelen zum IL-1 β vermittelten HIF-1 α Signal zu untersuchen, analysierten wir die Aktivität des mTORC1 und NF- κ B Signalweg. Im Gegensatz zu IL-1 β führte Etx zu keiner erhöhten Aktivierung der Signalkaskaden (**Abb. 7.13**). Wie erwartet wurde durch Etx die iTreg Polarisierung gehemmt (**Abb. 7.14**) ohne die Vitalität und Proliferation der Zellen zu beeinträchtigen (**Abb. 7.15**). Bedauerlicherweise war die Kombination aus Etx und PX-478 toxisch für die Zellen, so dass eine HIF-1 α Abhängigkeit der Hemmung der iTreg Polarisierung durch Etx nicht direkt gezeigt werden konnte. Die Ergebnisse lassen allerdings den Schluss zu, dass das HIF-1 α Signal für die Hemmung verantwortlich ist.

Als Schlussfolgerung aus den Experimenten lässt sich zusammenfassen, dass HIF-1 α durch unterschiedliche Stimuli in iTregs induziert werden kann und unabhängig vom Stimulus zu einer Inhibition der iTreg Polarisation führt. HIF-1 α scheint folglich ein wichtiger negativer Einflussfaktor der humanen iTreg Polarisation zu sein.

Im physiologischen Kontext einer Entzündungsreaktion könnte dies bedeuten, dass HIF-1 α als ein wichtiges hemmendes Signal für die Auflösung einer Entzündungsreaktion fungiert. Erst wenn die pro-inflammatorischen Signale und damit auch die HIF-1 α Expression wegfallen, ist eine Differenzierung der Tregs möglich, die anti-inflammatorischen Signale überwiegen und die Entzündung wird unter anderem durch Tregs beendet. Pathophysiologisch ist vorstellbar, dass im

Rahmen von chronischen Entzündungsprozessen HIF-1 α konstitutiv stabilisiert wird, so dass eine Polarisierung der iTregs nicht möglich ist und das Beenden der Entzündungsreaktion nicht erfolgen kann. HIF-1 α könnte folglich die Schlüsselrolle in der Balance der entzündlichen Reaktion spielen.

8.3 HIF-1 α Stabilisierung hat keinen Einfluss auf die Zytokinproduktion in iTregs

Eine IL-1 β Stimulation kann in differenzierten nTregs eine IL-17 Produktion herbeiführen. Dieser Mechanismus konnte sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* nachgewiesen werden [64],[106]. Die IL-17-Produktion konnte nur in der Treg Subpopulation induziert und durch IL-1 β Rezeptorantagonisten sowie Hemmung des NF- κ B Signalwegs antagonisiert werden [64]. Des Weiteren soll HIF-1 α für die IL-17 Produktion in Th17 notwendig sein [28]. Wie in **Abb. 7.17** gezeigt, konnte eine signifikant erhöhte IL-17 Produktion in den iTregs in dieser Arbeit nicht detektiert werden, weder durch IL-1 β , noch durch andere HIF-1 α induzierenden Stimuli. Eine gesteigerte IL-17 Produktion war von Tag 1 bis Tag 6 in den iTregs nicht nachweisbar, eine Tendenz war allerdings erkennbar. Somit könnte eine transiente IL-17 Produktion aufgetreten sein, die schwierig zu detektieren ist. Die Studien, die einen Effekt auf die IL-17 Produktion durch HIF-1 α herbeiführen konnten, verwendeten HIF-1 α *knockout*-Modelle oder fügten APCs in die Polarisierungskonditionen hinzu [19],[107],[108]. APCs könnten eine Quelle von IL-23 sein [107]. IL-23 stabilisiert und erhält die IL-17 Produktion in Th17 Zellen [19],[108]. Für eine stabile IL-17 Produktion in den iTregs wäre eine IL-23 Stimulation möglicherweise notwendig gewesen. Da die experimentellen Bedingungen, die eine Induktion von IL-17 zeigen, allerdings so verschieden zu den hier verwendeten Konditionen waren, ist eine Vergleichbarkeit schwierig. In Vorstudien konnten wir allerdings zeigen, dass eine HIF-1 α Inhibition auch die IL-17 Produktion von humanen Th17 Zellen negativ beeinflusst. Dies geschah ohne Änderung des ROR γ t Levels [105]. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass eine Verbindung zwischen der HIF-1 α Stabilisierung und der IL-17 Produktion in humanen Th17 Zellen besteht. Im Gegensatz dazu konnte dieser Zusammenhang in humanen iTregs nicht bewiesen werden. Allerdings konnte ein erhöhtes HIF-1 α Level in den iTh17 Zellen im Vergleich zu den iTreg Zellen nachgewiesen werden, was auf eine größere Relevanz der HIF-1 α Induktion in iTh17 im Vergleich zu iTregs hindeuten könnte (**Abb. 7.16**).

Um zu untersuchen, ob HIF-1 α das inflammatorische Profil der iTregs in eine andere Richtung als die Th17 Polarisierung verändert hatte, wurden die Expression weiterer Zytokine in den iTregs untersucht. Erstaunlicherweise konnte durch die HIF-1 α Induktion keine Veränderung der Zytokinproduktion der iTregs nachgewiesen werden (**Abb. 7.17, Abb. 7.18**). Um die Zytokinproduktion in den einzelnen Subpopulationen zu untersuchen, wurden die FOXP3⁺ Zellen mit den FOXP3⁻ Zellen verglichen. Der prozentuelle Anteil der Zytokin positiven Zellen war für die unterschiedlichen Zytokine in beiden Subpopulationen nicht signifikant verschieden (**Abb. 7.19**). Lediglich der Anteil der IL-2⁺ Zellen war in der FOXP3⁻ signifikant erhöht (**Abb. 7.19**). Die veränderte Zytokinproduktion könnte –vergleichbar zur IL-17 Produktion– transient aufgetreten oder zu einem späteren oder früheren Zeitpunkt detektierbar gewesen sein. Ungeklärt bleibt zudem, ob die iTregs trotz gleichgebliebener Zytokinproduktion ihre Funktionalität verändert haben. Die reduzierte Häufigkeit der FOXP3⁺ Zellen weist darauf hin, dass die iTregs ihre regulatorische Funktion quantitativ verändert haben könnten (**Abb. 7.4, Abb. 7.7, Abb. 7.14**). Für die Analyse der qualitativen regulatorischen Funktion der iTregs wären Ko-Kulturen mit Effektorzellen notwendig. Mit Hilfe der Ko-Kultur könnte nachgewiesen werden, ob die HIF-1 α Induktion in den iTregs die Hemmung der Funktion der Effektorzellen beeinflusst. Der Nachweis der Hemmung könnte anhand der Zytokinproduktion der Effektorzellen, sowie der Differenzierung der Effektorzellen analysiert werden. Auf diese Art und Weise könnte überprüft werden, ob die HIF-1 α Induktion in iTregs eine veränderte Reaktion der pro-inflammatorischen Immunzellen herbeiführt und damit die Antwort der Immunzellen im Rahmen eines inflammatorischen Prozesses weitreichend verändert.

Wir konnten die Relevanz von HIF-1 α für die iTreg Polarisierung nachweisen. Um zu überprüfen, ob dieser Effekt auf iTreg beschränkt ist, untersuchten wir den Einfluss der HIF-1 α Expression in FOXP3⁻ und Tcon Zellen. Überraschenderweise führte keiner der Stimuli in den FOXP3⁻ Zellen oder Tcon Zellen zu einer HIF-1 α Induktion (**Abb. 7.21, Abb. 7.20**). Aktivierte humane Zellen exprimieren transient FOXP3. Aufgrund dieser Tatsache könnte man argumentieren, dass nur die aktivierten Zellen in Lage sind HIF-1 α zu exprimieren und deshalb das Signal in den FOXP3⁻ nicht detektierbar ist. Allerdings fehlte die HIF-1 α Induktion auch in den Tcons, wobei hierbei das HIF-1 α Signal in der gesamten Population also mutmaßlich auch in den aktivierten Zellen gemessen wurde (**Abb. 7.21**). Das HIF-1 α Signal könnte in diesen Populationen ganz fehlen. Wahrscheinlicher erscheint aber, dass das HIF-1 α Signal

in diesen Zellen einer anderen Dynamik unterliegt und möglicherweise transient erfolgt. HIF-1 α hat eine sehr kurze Halbwertszeit und könnte bereits nach kurzer Zeit wieder abgebaut werden. Es wäre möglich, dass das HIF-1 α Signal zu einem früheren Zeitpunkt messbar gewesen wäre. Unabhängig von HIF-1 α Signal führten die Stimuli nicht zu einer Veränderung des FOXP3 Signals in den Zellen (**Abb. 7.22**). Die Ursache dafür könnte die geringe Relevanz und/oder Expression von FOXP3 in diesen Zellen sein oder die andere Dynamik des Signalwegs.

8.4 Die Änderung des Metabolismus durch HIF-1 α Induktion ist abhängig vom jeweiligen Stimulus

Zusätzlich zu inflammatorischen Signalen spielt der Zellmetabolismus eine wesentliche Rolle in der Regulation der iTreg Differenzierung und Funktion. Die reziproke Interaktion zwischen Metabolismus und Immunsystem wird als „Immunometabolismus“ bezeichnet [109],[110]. Damit wird die Abhängigkeit der Immunantwort vom metabolischen Profil der Immunzellen beziehungsweise dem Angebot von Nahrungsbestandteilen beschrieben. Dass der Ernährungszustand eines Menschen mit der Funktion des Immunsystem korreliert, deuten epidemiologische Beobachtungen an. Diese zeigen, dass in westlichen Nationen Adipositas, Autoimmunerkrankungen, Tumorerkrankungen und chronische Entzündungen zunehmen [111]. Weitere Studien konnten nachweisen, dass der Ernährungszustand die Proliferation, die Aktivität und die Autoreaktivität von T-Zellen beeinflussen kann [112],[113]. Ein Beispiel für eine solche Beeinflussung ist Leptin, das von Adipozyten und Tregs selbst produziert wird und in übergewichtigen Personen erhöht sein kann [114]. Es spielt eine wesentliche Rolle in der Regulierung der Nahrungsaufnahme, der Regulation des Körpergewichts und des Glukosemetabolismus. Über den Leptinrezeptor wird die Aktivität der Teffs insbesondere der Th1 und Th17 Zellen gefördert und die der Tregs inhibiert [112],[115]. Es konnte nachgewiesen werden, dass im Fettgewebe adipöser Mäuse eine Verringerung der FOXP3⁺ Zellen vorlag [102]. Diese Erkenntnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass der Metabolismus und das Nahrungsangebot die Funktion und Balance des Immunsystems beeinflusst.

Der Zellmetabolismus kann die Funktion und Differenzierung von T-Zellen zudem direkt beeinflussen [7],[28],[73]. Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der β -Oxidation zur verringerten iTreg Differenzierung führte [7],[73]. Vergleichbar zu den

vorherigen Daten konnte in dieser Arbeit die Hemmung der iTreg Differenzierung durch Inhibition der β -Oxidation mittels Etx in humanen iTregs nachgewiesen werden (**Abb. 7.14**). Erstmals konnte gezeigt werden, dass durch die Inhibition der β -Oxidation in iTregs nicht nur die Differenzierung gehemmt, sondern zusätzlich HIF-1 α stabilisiert wurde (**Abb. 7.12**). Im Gegensatz dazu hatte die Induktion von HIF-1 α durch IL-1 β nur geringe Auswirkung auf die mitochondriale Respiration der iTregs (**Abb. 7.24**). Der glykolytische Metabolismus, der anhand der glykolytischen Reservekapazität und der Glut-1 Expression analysiert wurde, wurde durch IL-1 β an Tag 6 nicht verändert (**Abb. 7.27, Abb. 7.28**). Der geringe Effekt von IL-1 β auf den Zellmetabolismus könnte ausreichend sein, um die iTreg Differenzierung zu hemmen. Es wäre allerdings auch möglich, dass die IL-1 β vermittelte Inhibition der iTreg Differenzierung unabhängig vom Zellmetabolismus abläuft. Die Bedeutung des Metabolismus in der frühen iTreg Differenzierung konnte allerdings durch die DMOG und Etx Stimulation nachgewiesen werden. Beide Stimulantien reduzierten die mitochondriale Respiration signifikant (**Abb. 7.23, Abb. 7.25**). Interessanter Weise konnte die Änderung des iTreg Metabolismus durch DMOG und Etx Stimulation nachgewiesen werden bevor HIF-1 α induziert bzw. stabilisiert wurde (**Abb. 7.23, Abb. 7.25**). Die Reduktion der mitochondrialen Respiration konnte an Tag 1 der Polarisation gemessen werden, während ein stabiles HIF-1 α Signal ab Tag 3 detektierbar war (**Abb. 7.9, Abb. 7.12**). Für eine direkte HIF-1 α unabhängige Beeinflussung des Metabolismus sprechen Daten, die an Tumorzellen erhoben wurden. Es konnte nachgewiesen werden, dass sich der Zellmetabolismus durch DMOG Stimulation vor der HIF-1 α Induktion veränderte [116]. Der Einfluss von DMOG auf den Metabolismus war unabhängig von der HIF-1 α Induktion und möglicherweise unter anderen über die kompetitive Hemmung der α -Ketoglutarat Dehydrogenase vermittelt. Die Hemmung der mitochondrialen Respiration durch DMOG führte in den Tumorzellen zu einer kompensatorischen Induktion der glykolytischen Stoffwechselwege [116].

Die frühen Änderungen des Zellmetabolismus könnten hauptverantwortlich für die Inhibition der iTreg Differenzierung sein und der Zellmetabolismus und/oder die HIF-1 α Induktion könnten sich reziprok beeinflussen. Die reziproke Beeinflussung des Metabolismus und des HIF-1 α Levels konnte durch die Hemmung des Lipidstoffwechsels in den iTregs gezeigt werden (**Abb. 7.12**). Neben der Verringerung der FOXP3⁺ Zellen an Tag 6 der Polarisation, konnte über die

Veränderung des Metabolismus HIF-1 α induziert werden (**Abb. 7.12, Abb. 7.14**). Die HIF-1 α Induktion war dabei unabhängig von mTORC1 und NF- κ B (**Abb. 7.13**).

Ein weiterer Unterschied der unterschiedlichen Stimuli liegt darin, an welchem Punkt HIF-1 α stabilisiert bzw. induziert wurde. DMOG führt zu einer Stabilisierung durch Inhibition des Abbaus von HIF-1 α , während für IL-1 β eine transkriptionelle HIF-1 α Stabilisierung beschrieben wurde. Diese Unterschiede könnten einen Einfluss auf die Wirkung von HIF-1 α auf das metabolische Profil und die Funktion der iTregs haben. Allgemein konnten wir in vorherigen Versuchen nachweisen, dass die transkriptionelle Aktivierung von HIF-1 α in CD4⁺ T-Zellen eine entscheidende Rolle spielt [90].

Alternativ oder zusätzlich zu dem metabolischen Profil, könnte die Inhibition der iTreg Differenzierung durch HIF-1 α durch eine direkte Interaktion zwischen HIF-1 α und FOXP3 vermittelt sein.

Dang *et al.* schlugen für diese Interaktion folgenden Mechanismus vor. Die HIF-1 α Stabilisierung führt zu einer Bindung von HIF-1 α an FOXP3. Die Interaktion zwischen HIF-1 α und FOXP3 führt dazu, dass FOXP3 vom VHLp erkannt wird. FOXP3 wird ubiquitiniert und im Proteasom abgebaut (**Abb. 8.1**).

Inwiefern die Inhibition von FOXP3 durch HIF-1 α durch direkte Interaktion stattfindet, wurde in dieser Studie nicht untersucht. Es ist denkbar, dass die direkte Interaktion und die Beeinflussung des iTreg Metabolismus parallel ablaufen können.

Es wäre pathophysiologisch denkbar, dass die beiden Mechanismen je nach Kontext eine unterschiedliche Bedeutung haben. So wäre es denkbar, dass in einem hypoxischen Milieu die Umstellung des metabolischen Profils und die HIF-1 α Stabilisierung sich gegenseitig bedingen, um das Überleben der Zellen zu gewährleisten. Die Zellen, deren Funktion stärker von aeroben Stoffwechselwegen abhängig ist, reagieren vulnerabler auf eine solche Umstellung und werden durch die HIF-1 α Expression in ihrer Proliferation und Differenzierung gehemmt.

Im Rahmen von pro-inflammatorischen Signalen könnte der von Dang *et al.* beschriebene Vorgang der FOXP3 Degradation von vorrangiger Bedeutung sein. Die pro-inflammatorischen Signale beeinträchtigen die Treg Differenzierung direkt, obwohl genug Sauerstoff und Nährstoffe im umgebenden Milieu vorhanden sind.

Im pathophysiologischen Vorgang der Entzündung findet anders als *in vitro* meist eine Kombination von einer hypoxischen und einer pro-inflammatorischen Stimulation von HIF-1 α statt, so dass FOXP3 durch beide Mechanismen gehemmt bzw. degradiert werden könnte.

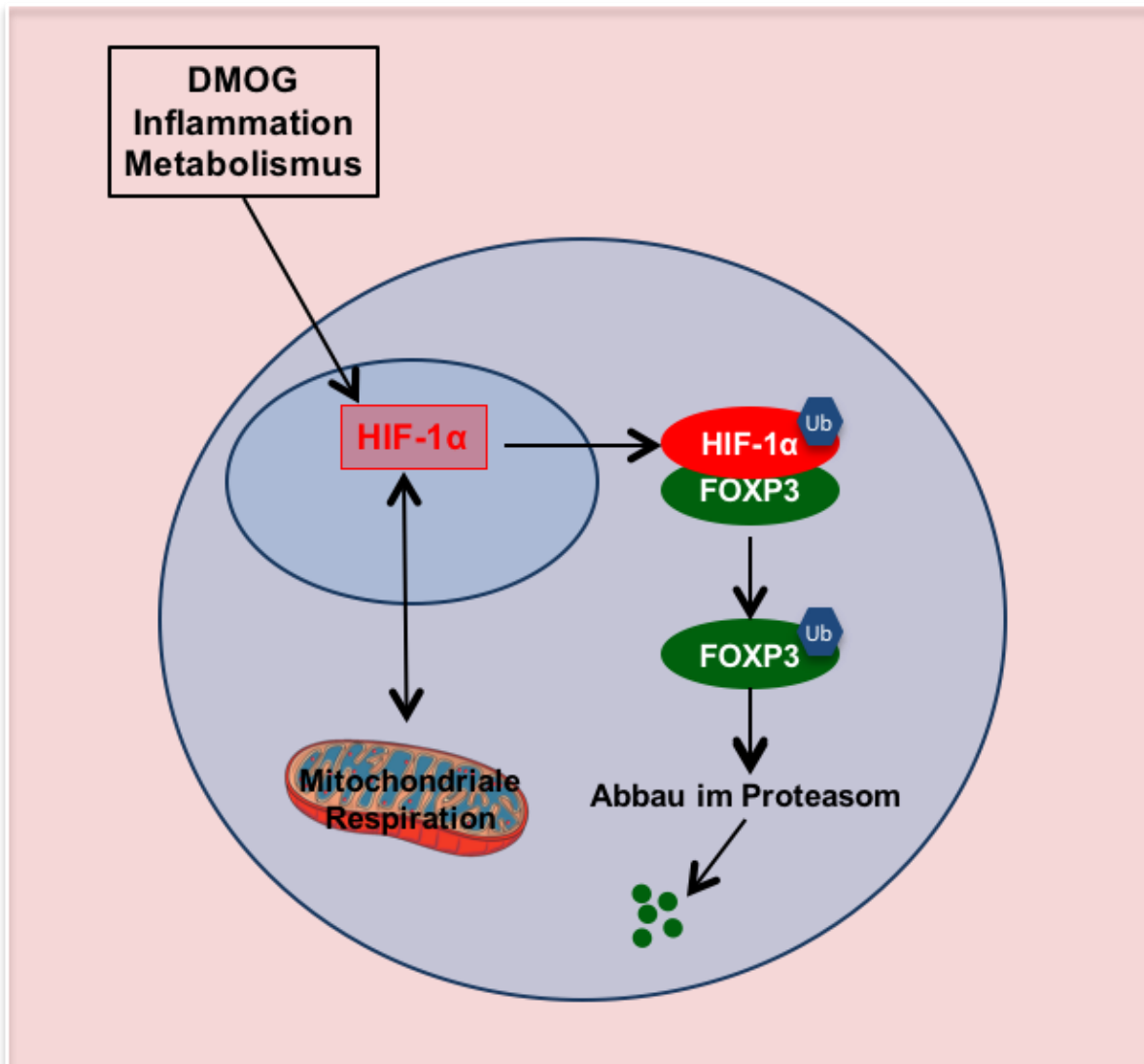


Abb. 8.1 Interaktion zwischen HIF-1 α und FOXP3. HIF-1 α wird über unterschiedliche Mechanismen aktiviert. HIF-1 α bindet direkt an FOXP3. FOXP3 wird über Ubiquitinierung für den Abbau im Proteasom markiert (nach Dang *et al.* 2009; Ub: Ubiquitinin).

8.5 Bedeutung und Ausblick

Für die Inhibition der iTreg Differenzierung scheint es unerheblich zu sein, welcher Stimulus HIF-1 α induziert (**Abb. 8.1**). Die Stimuli haben allerdings unterschiedliche Einflüsse auf die induzierten Signalwege und den Zellmetabolismus. Der Zellmetabolismus und HIF-1 α scheinen sich gegenseitig zu beeinflussen, wobei HIF-1 α ein wichtiger Faktor in der Weiterleitung von entzündlichen und metabolischen Signalen zu sein scheint. HIF-1 α könnte als spezifischer Angriffspunkt für die selektive Beeinflussung der iTreg Differenzierung unter HIF-1 α -induzierenden Bedingungen dienen. In Abwesenheit von inflammatorischen oder anderen HIF-1 α induzierenden Bedingungen führt eine HIF-1 α Inhibition nicht zur Veränderung der iTreg Differenzierung (**Abb. 7.4**). Diese Erkenntnis macht die selektive Inhibition der iTreg Polarisation z.B. unter entzündlichen Bedingungen möglich. Die Inhibition von HIF-1 α könnte darüber hinaus allerdings viele andere Immunzellen negativ beeinflussen, da HIF-1 α eine wesentliche und sehr divergente Rolle in verschiedenen Immunzellen spielt. Für die selektive Hemmung in iTregs ist die Erforschung des genauen Mechanismus der Interaktion von HIF-1 α und FOXP3 notwendig, um eine Inhibition von HIF-1 α als sichere therapeutische Strategie zu ermöglichen. Dass über die Beeinflussung der iTreg Differenzierung und Proliferation Autoimmunerkrankungen therapiert werden können, konnte in unterschiedlichen Studien gezeigt werden.

Im Zuge der aktuellen Versuche über den Einfluss der HIF-1 α Stabilisierung auf den Metabolismus und die Differenzierung von humanen iTregs, bleiben einige Fragen offen und bieten Ansatzpunkte für weitere Studien (**Abb. 8.2**).

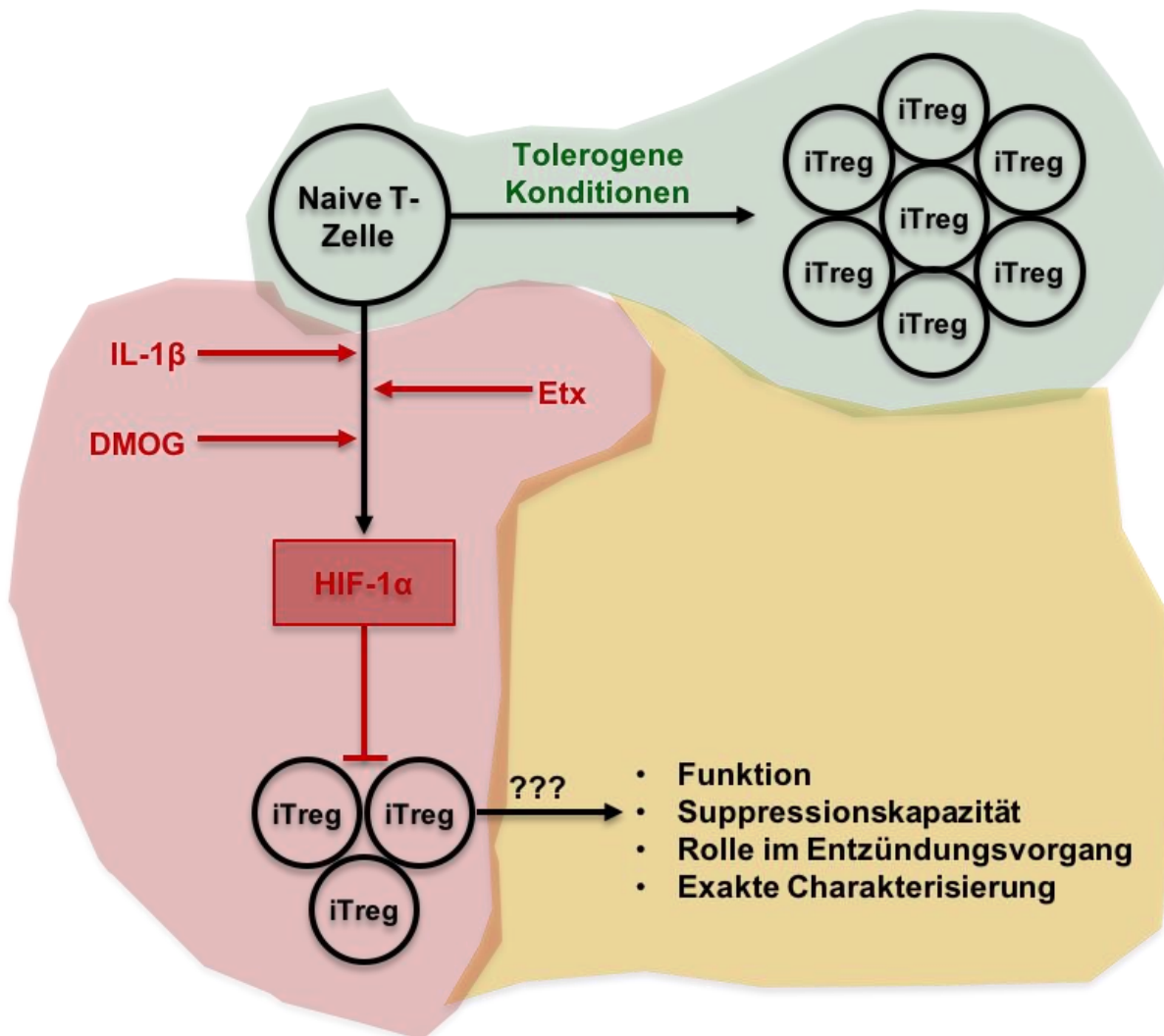


Abb. 8.2 Der Einfluss der HIF-1 α Induktion auf die iTreg Differenzierung. Unter iTreg Polarisationsbedingung wird HIF-1 α in naiven T-Zellen nicht hochreguliert und es entwickeln sich iTregs. Unter HIF-1 α induzierenden Bedingungen wird die iTreg Differenzierung gehemmt.

Es stellt sich die Frage welche Funktion die iTregs, die HIF-1 α induzieren in einem entzündlichen Prozess haben. Erfüllen sie weiterhin suppressive Aufgaben oder übernehmen sie eine Effektorfunktion? Es bleibt bislang ungeklärt, ob sich durch die HIF-1 α Induktion die suppressive Kapazität der iTregs verändert hat. Es wäre denkbar, dass die Kapazität der iTregs die Effektorzellen und die Entzündungsreaktionen zu inhibieren, reduziert ist. Pathophysiologisch stellt sich die Frage welche Rolle die HIF-1 α Induktion in den iTregs spielt. Die iTregs sind im Zuge von Entzündungsreaktionen häufig HIF-1 α induzierenden Bedingungen ausgesetzt. Die Inhibition ihrer Entwicklung könnte ein Anzeichen dafür sein, dass eine Entzündungsreaktion noch nicht abgeschlossen ist und das Beenden der

Immunreaktion durch die iTregs noch nicht erforderlich ist. HIF-1 α würde so als negatives *Feedback* für die iTreg Differenzierung fungieren. Die HIF-1 α Induktion könnte allerdings auch für die Entstehung von pathologischen Entzündungsvorgängen verantwortlich sein und bei der Entstehung von Erkrankungen eine Rolle spielen. Um die Funktion der iTregs besser darstellen zu können, wäre eine exakte Charakterisierung der iTregs erforderlich. Obwohl gezeigt werden konnte, dass sich die Zytokinproduktion der iTregs an Tag 6 der Polarisation nicht signifikant verändert hatte, wäre eine Analyse der Expression der unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren sinnvoll. So könnte untersucht werden, ob die iTregs sich in eine andere T-Zellsubklasse differenziert haben. Um die zentrale Rolle von HIF-1 α in der iTreg Differenzierung weiter herauszuarbeiten, wäre es wichtig die Rolle von HIF-1 α im Rahmen von anderen inhibitorischen Signalen der iTreg Differenzierung zu untersuchen. Möglicherweise ist die Inhibition der iTreg Differenzierung durch andere Zytokine wie IL-6 und TNF- α ebenfalls HIF-1 α vermittelt.

Allgemein spielen pro-inflammatorische Zytokine eine negative Rolle in der Aktivierung und Proliferation von iTregs [117],[118]. Wichtige pro-inflammatorische Zytokine sind neben IL-1 β IL-6 und TNF- α . Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Deletion von IL-6 die iTreg Differenzierung unterstützt, während eine TNF- α Stimulation die Proliferation und Funktion von Tregs inhibiert [117],[118]. Durch die Gabe des TNF- α Inhibitors Infliximab konnte die Funktion der Tregs wiederhergestellt werden und darüber hinaus der Anteil an Tregs im peripherem Blut erhöht werden [119]. Auch konnte gezeigt werden, dass IL-6 die Funktion der Tregs und ihre Polarisierung aus naiven CD4⁺ Zellen im Zuge von entzündlichen Prozessen negativ beeinflusst [28],[120],[121]. Die IL-6 Stimulation führte neben der Suppression der iTreg Polarisation zur verstärkten Differenzierung von Th17 Zellen und damit zur Beeinflussung der inflammatorischen Antwort. Außerdem führten IL-6 und TNF- α in nicht-hämopoetischen und murinen T-Zellen zu einer HIF-1 α Induktion [28],[98]. Die IL-6 und TNF- α vermittelte Hemmung der iTreg Differenzierung könnte also ebenfalls HIF-1 α vermittelt ablaufen. Die Rolle von HIF-1 α oder die mögliche Induktion von HIF-1 α in Tregs durch andere pro-inflammatorische Zytokine wurde in Rahmen dieser Studien nicht untersucht.

Der Einfluss von HIF-1 α auf die T-Zelldifferenzierung könnte sich auf weitere Subklassen der CD4⁺ Zellen ausdehnen. Der positive Einfluss von HIF-1 α auf die Th17 Differenzierung wurde bereits in murinen T-Zellen beschrieben. Der Einfluss von HIF-1 α auf die Th1 und Th2 Entwicklung ist allerdings in humanen CD4⁺ Zellen noch relativ ungeklärt. Um ein umfassendes Bild der Rolle von HIF-1 α in der Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen zu bekommen, wäre diese Untersuchung des Effekts von HIF-1 α in unterschiedlichen T-Zellsubklassen sinnvoll.

Eine weitere ungeklärte Frage ergibt sich aus der gegenseitigen Beeinflussung von HIF-1 α und dem metabolischen Profil. Der Zusammenhang könnte durch die Beeinflussung des Metabolismus über die Bereitstellung an Nahrungsbestandteilen im Polarisations-Versuch untersucht werden. Durch die Variation der Glukose- und Lipidkonzentration im Medium unter HIF-1 α -induzierenden und -hemmenden Bedingungen, könnte untersucht werden, ob die Hemmung der iTreg Differenzierung durch HIF-1 α direkt vom Metabolismus abhängig ist. Das Entfernen von Glukose und/oder die hohe Konzentration von Lipiden könnte die Umstellung des Metabolismus trotz HIF-1 α Induktion verhindern und möglicherweise den Einfluss auf die iTreg Polarisation verändern.

9 Literaturverzeichnis

1. **Murphy K.** *Janeway's Immunobiology*. 8th ed. Garland Science 2012
2. **Medzhitov R, Janeway CA.** Innate immunity: Impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 1997; **9**:4–9.
3. **Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA.** Positive and negative selection of T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2003; **21**:139–176.
4. **Barbi J, Pardoll D, Pan F.** Metabolic control of the Treg/Th17 axis. *Immunol. Rev.* 2013; **252**:52–77.
5. **Frauwirth KA, Thompson CB.** Regulation of T lymphocyte metabolism. *J. Immunol.* 2004; **172**:4661–4665.
6. **Jacobs SR, Herman CE, Maciver NJ, Wofford JA, Wieman HL, Hammen JJ, Rathmell JC.** Glucose uptake is limiting in T cell activation and requires CD28-mediated Akt-dependent and independent pathways. *J. Immunol.* 2008; **180**:4476–4486.
7. **MacIver NJ, Michalek RD, Rathmell JC.** Metabolic regulation of T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 2013; **31**:259–83.
8. **Wise DR, DeBerardinis RJ, Mancuso A, Sayed N, Zhang X-Y, Pfeiffer HK, Nissim I, Daikhin E, Yudkoff M, McMahon SB, Thompson CB.** Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008; **105**:18782–18787.
9. **Dang C V, Le A, Gao P.** MYC-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities. *Clin. Cancer Res.* 2009; **15**:6479–6483.
10. **Wang R, Dillon CP, Shi LZ, Milasta S, Carter R, Finkelstein D, McCormick LL, Fitzgerald P, Chi H, Munger J, Gren DR.** The Transcription Factor Myc Controls Metabolic Reprogramming upon T Lymphocyte Activation. *Immunity.* 2011; **35**:871–882.
11. **Garboczi DN, Ghosh P, Utz U, Fan QR, Biddison WE, Wiley DC.** Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature.* 1996; **384**:134–141.
12. **Margulies DH.** Interactions of TCRs with MHC-peptide complexes: A quantitative

basis for mechanistic models. *Curr. Opin. Immunol.* 1997; **9**:390–395.

13. **Weiss A, Littman DR.** Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell.* 1994; **76**:263–274.

14. **Zhu J, Paul WE.** Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res.* 2010; **20**:4–12.

15. **O’Shea JJ, Paul WE.** Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science.* 2010; **327**:1098–1102.

16. **Buck MD, O’Sullivan D, Pearce EL.** T cell metabolism drives immunity. *J. Exp. Med.* 2015:1–16.

17. **Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH.** A Novel Transcription Factor, T-bet, Directs Th1 Lineage Commitment. *Cell.* 2000; **100**:655–669.

18. **Zhou L, Chong MMW, Littman DR.** Plasticity of CD4+ T Cell Lineage Differentiation. *Immunity.* 2009; **30**:646–655.

19. **Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK.** Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature.* 2008; **453**:1051–1057.

20. **Stockinger B, Veldhoen M.** Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr. Opin. Immunol.* 2007; **19**:281–286.

21. **Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B.** TGF- β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity.* 2006; **24**:179–189.

22. **Marks BR, Nowyhed HN, Choi J-Y, Poholek AC, Odegard JM, Flavell RA, Craft J.** Thymic self-reactivity selects natural interleukin 17-producing T cells that can regulate peripheral inflammation. *Nat. Immunol.* 2009; **10**:1125–1132.

23. **Kurebayashi Y, Nagai S, Ikejiri A, Koyasu S.** Recent advances in understanding the molecular mechanisms of the development and function of Th17 cells. *Genes Cells.* 2013; **18**:247–65.

24. **Khader SA, Gaffen SL, Kolls JK.** Th17 cells at the crossroads of innate and adaptive immunity against infectious diseases at the mucosa. *Mucosal Immunol.* 2009; **2**:403–411.

25. **Doreau A, Belot A, Bastid J, Riche B, Trescol-Biemont M-C, Ranchin B,**

- Fabien N, Cochat p, Pouteil-Noble C, Trolliet P, Durieu I, Tebib J, Kassai B, Ansieau S, Puisieux A, Eliaou JF, Bonnefoy-Bérard N.** Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Nat. Immunol.* 2009; **10**:778–785.
26. **Lin Y, Ritchea S, Logar A, Slight S, Messmer M, Rangel-Moreno J, Guglani L, Alcorn JF, Strawbridge H, Park SM, Onishi R, Nyugen N, Walter MJ, Pociask D, Randall TD, Gaffen SL, Iwakura Y, Kolls JK, Khader SA.** Interleukin-17 Is Required for T Helper 1 Cell Immunity and Host Resistance to the Intracellular Pathogen *Francisella tularensis*. *Immunity.* 2009; **31**:799–810.
27. **Kurebayashi Y, Nagai S, Ikejiri A, Koyasu S.** Recent advances in understanding the molecular mechanisms of the development and function of Th17 cells. *Genes Cells.* 2013; **18**:247–65.
28. **Dang EV, Barbi J, Yang H-Y, Jinasena D, Yu H, Zheng Y, Bordman Z, Fu J, Kim Y, Yen H-R, Luo W, Zeller K, Shimoda L, Topalian SL, Semenza GL, Dang CV, Pardoll DM, Pan F.** Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. *Cell.* 2011; **146**:772–84.
29. **Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY.** Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 2003; **4**:330–336.
30. **Kang N, Tang L, Li X, Wu D, Li W, Chen X, Cui L, Ba D, He W.** Identification and characterization of Foxp3(+) gammadelta T cells in mouse and human. *Immunol. Lett.* 2009; **125**:105–113.
31. **Lin L, Hron JD, Peng SL.** Regulation of NF- κ B, Th activation, and autoinflammation by the forkhead transcription factor Foxo3a. *Immunity.* 2004; **21**:203–213.
32. **Carlsson P, Mahlapuu M.** Forkhead Transcription Factors: Key Players in Development and Metabolism. 2002; **23**:1–23.
33. **Liu J, Lluís A, Illi S, Layland L, Olek S, von Mutius E, Schaub B.** T regulatory cells in cord blood-FOXP3 demethylation as reliable quantitative marker. *PLoS One.* 2010; **5**.
34. **Curotto de Lafaille MA, Kutchukhidze N, Shen S, Ding Y, Yee H, Lafaille JJ.** Adaptive Foxp3⁺ Regulatory T Cell-Dependent and -Independent Control of Allergic Inflammation. *Immunity.* 2008; **29**:114–126.

35. **Schwartz RH.** Natural regulatory T cells and self-tolerance. *Nat. Immunol.* 2005; **6**:327–330.
36. **Apostolou I, Sarukhan A, Klein L, von Boehmer H.** Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat. Immunol.* 2002; **3**:756–763.
37. **Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Holenbeck AE, Lerman MA, Najj A, Caton AJ.** Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat. Immunol.* 2001; **2**:301–306.
38. **Modigliani Y, Bandeira A, Coutinho A.** A model for developmentally acquired thymus-dependent tolerance to central and peripheral antigens. *Immunol. Rev.* 1996; **149**:155–120.
39. **Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, Shimizu J, Takahashi T, Nomura T.** Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol. Rev.* 2006; **212**:8–27.
40. **Tsun A, Chen Z, Li B.** Romance of the three kingdoms: RORgammat allies with HIF1alpha against FoxP3 in regulating T cell metabolism and differentiation. *Protein Cell.* 2011; **2**:778–81.
41. **Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M.** Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell.* 2008; **133**:775–787.
42. **Piccirillo C a.** Regulatory T cells in health and disease. *Cytokine.* 2008; **43**:395–401.
43. **Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ.** How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* 2008; **8**:523–532.
44. **Hawrylowicz CM, O’Garra A.** Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat. Rev. Immunol.* 2005; **5**:271–283.
45. **Fahlen L, Read S, Gorelik L, Hurst SD, Coffman RL, Flavell RA, Powrie F.** T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med.* 2005; **201**:737–746.
46. **Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F.** An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* 1999; **190**:995–1004.
47. **Kursar M, Koch M, Mittrücker H-W, Nouailles G, Bonhagen K, Kamradt T,**

- Kaufmann SHE.** Cutting Edge: Regulatory T cells prevent efficient clearance of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 2007; **178**:2661–2665.
48. **Jankovic D, Kullberg MC, Feng CG, Goldszmid RS, Collazo CM, Wilson M, Wynn TA, Kamanaka M, Flavell RA, Sher A.** Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *J. Exp. Med.* 2007; **204**:273–283.
49. **Anderson CF, Oukka M, Kuchroo VJ, Sacks D.** CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *J. Exp. Med.* 2007; **204**:285–297.
50. **Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, Cross R, Sehy D, Blumberg RS, Vignali DAA.** The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature.* 2007; **450**:566–569.
51. **de la Rosa M, Rutz S, Dorninger H, Scheffold A.** Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol.* 2004; **34**:2480–2488.
52. **Zarek PE, Huang CT, Lutz ER, Kowalski J, Horton MR, Linden J, Drake CG, Powell JD.** A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood.* 2008; **111**:251–259.
53. **Kobie JJ, Shah PR, Yang L, Rebhahn JA, Fowell DJ, Mosmann TR.** T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. *J. Immunol.* 2006; **177**:6780–6786.
54. **Oderup C, Cederbom L, Makowska A, Cilio CM, Ivars F.** Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology.* 2006; **118**:240–249.
55. **Lu L-F, Lind EF, Gondek DC, Bennett KA, Gleeson MW, Pino-Lagos K, Scott ZA, Coyle AJ, Reed JL, Van Snick J, Strom TB, Zheng XX, Noelle RJ.** Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. *Nature.* 2006; **442**:997–1002.
56. **Serra P, Amrani A, Yamanouchi J, Han B, Thiessen S, Utsugi T, Verdaguer J, Santamaria P.** CD40 Ligation Releases Immature Dendritic Cells from the Control of Regulatory CD4+CD25+ T Cells. *Immunity.* 2003; **19**:877–889.

57. **Zhao D-M, Thornton AM, DiPaolo RJ, Shevach EM.** Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood.* 2006; **107**:3925–3932.
58. **Gondek DC, Lu L-F, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ.** Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J. Immunol.* 2005; **174**:1783–1786.
59. **Van Der Vliet HJJ, Nieuwenhuis EE.** IPEX as a result of mutations in FOXP3. *Clin. Dev. Immunol.* 2007; **2007**.
60. **Torgerson TR.** Regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Springer Semin. Immunopathol.* 2006; **28**:63–76.
61. **Levings MK, Allan S, d’Hennezel E, Piccirillo CA.** Functional Dynamics of Naturally Occurring Regulatory T Cells in Health and Autoimmunity. *Adv. Immunol.* 2006; **92**:119–155.
62. **Miyara M, Amoura Z, Parizot C, Badoual C, Dorgham K, Trad S, Nochy D, Debré P, Piette J-C, Gorochov G.** Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 2005; **175**:8392–8400.
63. **Tran DQ, Andersson J, Hardwick D, Bebris L, Illei GG, Shevach EM.** Selective expression of latency-associated peptide (LAP) and IL-1 receptor type I/II (CD121a/CD121b) on activated human FOXP3+ regulatory T cells allows for their purification from expansion cultures. *Blood.* 2009; **113**:5125–5133.
64. **Li L, Kim J, Boussiotis VA.** IL-1 β -mediated signals preferentially drive conversion of regulatory T cells but not conventional T cells into IL-17-producing cells. *J. Immunol.* 2010; **185**:4148–4153.
65. **Dinarello CA.** Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J. Exp. Med.* 2005; **201**:1355–1359.
66. **Rivest S, Lacroix S, Vallières L, Nadeau S, Zhang J, Laflamme N.** How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 2000; **223**:22–38.
67. **Scholz CC, Cavadas MAS, Tambuwala MM, Hams E, Rodríguez J, Kriegsheim A von, Cotter P, Bruning U, Fallon PG, Cheong A, Cummins EP, Taylor CT.** Regulation of IL-1 β -induced NF- κ B by hydroxylases links key hypoxic and inflammatory signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013; **110**:18490–

18495.

68. **Dinarello CA.** A clinical perspective of IL-1 β as the gatekeeper of inflammation. *Eur. J. Immunol.* 2011; **41**:1203–1217.

69. **Chung Y, Chang SH, Martinez GJ, Yang XO, Nurieva R, Kang HS, Ma L, Watowich SS, Jetten AM, Tian Q, Dong C.** Critical Regulation of Early Th17 Cell Differentiation by Interleukin-1 Signaling. *Immunity.* 2009; **30**:576–587.

70. **Koenen HJPM, Smeets RL, Vink PM, van Rijssen E, Boots AMH, Joosten I.** Human CD25^{high}Foxp3^{pos} regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. *Blood.* 2008; **112**:2340–52.

71. **Maciver NJ, Jacobs SR, Wieman HL, Wofford JA, Coloff JL, Rathmell JC.** Glucose metabolism in lymphocytes is a regulated process with significant effects on immune cell function and survival. *J. Leukoc. Biol.* 2008; **84**:949–957.

72. **Zeng H, Chi H.** The interplay between regulatory T cells and metabolism in immune regulation. *Oncoimmunology.* 2013; **2**:e26586.

73. **Michalek RD, Gerriets V a, Jacobs SR, Macintyre AN, MacIver NJ, Mason EF, Sullivan S, Nichols AG, Rathmell JC.** Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4⁺ T cell subsets. *J. Immunol.* 2011; **186**:3299–303.

74. **Powell JD, Delgoffe GM.** The Mammalian Target of Rapamycin: Linking T Cell Differentiation, Function, and Metabolism. *Immunity.* 2010; **33**:301–311.

75. **Pan F, Barbi J, Pardoll DM.** Hypoxia-inducible factor 1: A link between metabolism and T cell differentiation and a potential therapeutic target. *Oncoimmunology.* 2012; **1**:510–515.

76. **Caldwell CC, Kojima H, Lukashev D, Armstrong J, Farber M, Apasov SG, Sitkovsky M V.** Differential effects of physiologically relevant hypoxic conditions on T lymphocyte development and effector functions. *J. Immunol.* 2001; **167**:6140–6149.

77. **Semenza GL.** Hypoxia-inducible factor 1: Oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol. Med.* 2001; **7**:345–350.

78. **Dehne N, Brüne B.** HIF-1 in the inflammatory microenvironment. *Exp. Cell Res.* 2009; **315**:1791–1797.

79. **Brüne B, Zhou J.** Nitric oxide and superoxide: Interference with hypoxic

signaling. *Cardiovasc. Res.* 2007; **75**:275–282.

80. **Gerald D, Berra E, Frapart YM, Chan DA, Giaccia AJ, Mansuy D, Pouysségur J, Yaniv M, Metcha-Grigoriou F.** JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress. *Cell.* 2004; **118**:781–794

81. **Frede S, Freitag P, Otto T, Heilmaier C, Fandrey J.** The proinflammatory cytokine interleukin 1beta and hypoxia cooperatively induce the expression of adrenomedullin in ovarian carcinoma cells through hypoxia inducible factor 1 activation. *Cancer Res.* 2005; **65**:4690–4697.

82. **De Ponti C, Carini R, Alchera E, Nitti MP, Locati M, Albano E, Cairo G, Tacchini L.** Adenosine A2a receptor-mediated, normoxic induction of HIF-1 through PKC and PI-3K-dependent pathways in macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 2007; **82**:392–402.

83. **Zinkernagel AS, Johnson RS, Nizet V.** Hypoxia inducible factor (HIF) function in innate immunity and infection. *J. Mol. Med.* 2007; **85**:1339–1346.

84. **Blouin CC, Pagé EL, Soucy GM, Richard DE.** Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: Implication of hypoxia-inducible factor 1 α *Blood.* 2004; **103**:1124–1130.

85. **Semenza GL.** Review series HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. 2013; **123**.

86. **Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda LA, Tan YS, Baek JH, Wesley JB, Gonzalez FJ, Semenza GL.** Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J. Biol. Chem.* 2008; **283**:10892–10903.

87. **Semenza GL.** Hypoxia-inducible factor 1: Regulator of mitochondrial metabolism and mediator of ischemic preconditioning. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 2011; **1813**:1263–1268.

88. **McNamee EN, Korn Johnson D, Homann D, Clambey ET.** Hypoxia and hypoxia-inducible factors as regulators of T cell development, differentiation, and function. *Immunol. Res.* 2013; **55**:58–70.

89. **Nakamura H, Makino Y, Okamoto K, Poellinger L, Ohnuma K, Morimoto C, Tanaka H.** TCR engagement increases hypoxia-inducible factor-1 alpha protein synthesis via rapamycin-sensitive pathway under hypoxic conditions in human peripheral T cells. *J. Immunol.* 2005; **174**:7592–7599.

90. **Bollinger T, Bollinger A, Gies S, Feldhoff L, Solbach W, Rupp J.** Transcription regulates HIF-1 α expression in CD4⁺ T cells. *Immunol. Cell Biol.* 2015;1–5.
91. **Shi LZ, Wang R, Huang G, Vogel P, Neale G, Green DR, Chi H.** HIF1 α -dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells. *J. Exp. Med.* 2011; **208**:1367–1376.
92. **Cummins EP, Seeballuck F, Keely SJ, Mangan NE, Callanan JJ, Fallon PG, Taylor CT.** The Hydroxylase Inhibitor Dimethylallylglycine Is Protective in a Murine Model of Colitis. *Gastroenterology.* 2008; **134**.
93. **Ward JBJ, Lawler K, Amu S, Taylor CT, Fallon PG, Keely SJ.** Hydroxylase inhibition attenuates colonic epithelial secretory function and ameliorates experimental diarrhea. *FASEB J.* 2011; **25**:535–43.
94. **Feldhoff LM, Rueda CM, Moreno-Fernandez ME, Sauer J, Jackson CM, Chougnet CA, Rupp J.** IL-1 β induced HIF-1 α inhibits the differentiation of human FOXP3⁺ T cells. *Sci. Rep.* 2017; **7**:465.
95. **Pascual V, Allantaz F, Arce E, Punaro M, Banchereau J.** Role of interleukin-1 (IL-1) in the pathogenesis of systemic onset juvenile idiopathic arthritis and clinical response to IL-1 blockade. *J. Exp. Med.* 2005; **201**:1479–86.
96. **Eastgate J, Wood N, Di Giovine F, Symons J, Grinlinton F, Duff G.** CORRELATION OF PLASMA INTERLEUKIN 1 LEVELS WITH DISEASE ACTIVITY IN RHEUMATOID ARTHRITIS. *Lancet.* 1988; **332**:706–709.
97. **Lequerré T, Quartier P, Rosellini D, Alaoui F, De Bandt M, Mejjad O, Kone-Paut I, Michel M, Dernis E, Khellaf M, Lima N, Job-Deslandre C, Fautrel B, Le Let X, Sibillia J, Société Francophone pour la Rhumatologie et les Maladies Inflammatoires en Pédiatrie.** Interleukin-1 receptor antagonist (anakinra) treatment in patients with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis or adult onset Still disease: preliminary experience in France. *Ann. Rheum. Dis.* 2008; **67**:302–8.
98. **Hellwig-Bürgel T, Rutkowski K, Metzen E, Fandrey J, Jelkmann W.** Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood.* 1999; **94**:1561–1567.
99. **Han JM, Patterson SJ, Levings MK.** The Role of the PI3K Signaling Pathway in CD4⁺ T Cell Differentiation and Function. *Front. Immunol.* 2012; **3**.

100. **Procaccini C, De Rosa V, Galgani M, Abanni L, Calì G, Porcellini A, Carbone F, Fontana S, Horvath TL, La Cava A, Matarese G.** An Oscillatory Switch in mTOR Kinase Activity Sets Regulatory T Cell Responsiveness. *Immunity*. 2010; **33**:929–941.
101. **Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, Bahrami J, Dorfman R, Wang Y, Zielenski J, Mastronardi F, Maezawa Y, Drucker DJ, Engleman E, Winer D, Dosch H-M.** Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat. Med.* 2009; **15**:921–929.
102. **Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, Lee J, Goldfine AB, Benoist C, Shelson S, Mathis D.** Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat. Med.* 2009; **15**:930–939.
103. **Jung YJ, Isaacs JS, Lee S, Trepel J, Neckers L.** IL-1beta-mediated up-regulation of HIF-1alpha via an NFkappaB/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. *FASEB J.* 2003; **17**:2115–2117.
104. **Yamaguchi J, Tanaka T, Eto N, Nangaku M.** Inflammation and hypoxia linked to renal injury by CCAAT/enhancer-binding protein δ . *Kidney Int.* 2015; **88**:262–75.
105. **Bollinger T, Gies S, Naujoks J, Feldhoff L, Bollinger A, Solbach W, Rupp J.** HIF-1 α - and hypoxia-dependent immune responses in human CD4+CD25high T cells and T helper 17 cells. *J. Leukoc. Biol.* 2014; **96**:1–8.
106. **Kallapur SG, Presicce P, Senthamaraikannan P, Alvarez M, Tarantal AF, Miller LM, Jobe AH, Chougnet CA.** Intra-amniotic IL-1 β induces fetal inflammation in rhesus monkeys and alters the regulatory T cell/IL-17 balance. *J. Immunol.* 2013; **191**:1102–9.
107. **Napolitani G, Rinaldi A, Bertoni F, Sallusto F, Lanzavecchia A.** Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat. Immunol.* 2005; **6**:769–76.
108. **Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, CUA DJ.** IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* 2005; **201**:233–40.
109. **Navab M, Gharavi N, Watson AD.** Inflammation and metabolic disorders. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2008; **11**:459–464.

110. **Rathmell JC.** Metabolism and autophagy in the immune system: immunometabolism comes of age. *Immunol. Rev.* 2012; **249**:5–13.
111. **Maury E, Brichard SM.** Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2010; **314**:1–16.
112. **Galgani M, Procaccini C, De Rosa V, Carbone F, Chieffi P, La Cava A, Matarese G.** Leptin modulates the survival of autoreactive CD4+ T cells through the nutrient/energy-sensing mammalian target of rapamycin signaling pathway. *J. Immunol.* 2010; **185**:7474–7479.
113. **Hasenkrug KJ.** The Leptin Connection: Regulatory T Cells and Autoimmunity. *Immunity.* 2007; **26**:143–145.
114. **La Cava A, Matarese G.** The weight of leptin in immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2004; **4**:371–379.
115. **Matarese G, Procaccini C, De Rosa V, Horvath TL, La Cava A.** Regulatory T cells in obesity: the leptin connection. *Trends Mol. Med.* 2010; **16**:247–256.
116. **Zhdanov A V, Okkelman IA, Collins FWJ, Melgar S, Papkovsky DB.** A novel effect of DMOG on cell metabolism: direct inhibition of mitochondrial function precedes HIF target gene expression. *Biochim. Biophys. Acta.* 2015; **1847**:1254–1266.
117. **Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK.** Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature.* 2006; **441**:235–8.
118. **Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, Wilson M, Shevach EM, Lipsky PE.** TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. *Blood.* 2006; **108**:253–61.
119. **Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg DA, Mauri C.** Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J. Exp. Med.* 2004; **200**:277–285.
120. **Wan S, Xia C, Morel L.** IL-6 produced by dendritic cells from lupus-prone mice inhibits CD4+CD25+ T cell regulatory functions. *J. Immunol.* 2007; **178**:271–279.
121. **Kimura A, Kishimoto T.** IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. *Eur. J. Immunol.* 2010; **40**:1830–1835.

10 Abbildungs- und Tabellenverzeichnisverzeichnis

10.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 4.1 Umstellung des T-Zellmetabolismus nach der TCR Stimulierung..	10
Abb. 4.2 Die Rolle von CD4 ⁺ Zellen während der Inflammation.	13
Abb. 6.1 Darstellung der <i>Gating</i> -Strategie der FOXP3 ⁺ Zellen.	31
Abb. 6.2 Austestung unterschiedlicher TGF- β Konzentrationen.	31
Abb. 6.3 Austestung unterschiedlicher TGF- β Konzentrationen.	32
Abb. 6.4 Schematische Darstellung des „mito stress test“ zur Ermittlung der mitochondrialen Respiration.	35
Abb. 6.5 Schematische Darstellung des " <i>glycolytic stress test</i> " zur Ermittlung der zellulären Glykolyse mittels extrazellulärer Azidifikation.	36
Abb. 7.1 Die Induktion von HIF-1 α durch IL-1 β in iTregs.	38
Abb. 7.2 Der Einfluss des mTORC1 Signalwegs auf die IL-1 β vermittelte HIF-1 α Induktion.	39
Abb. 7.3 Einfluss der IL-1 β Stimulation auf die c-rel Expression in iTregs.	40
Abb. 7.4 Inhibition der iTreg Polarisation unter IL-1 β Stimulation.	41
Abb. 7.5 Expression des IL-1 Rezeptors.	41
Abb. 7.6 Vitalität und Proliferation der iTregs unter IL-1 β Stimulation.	42
Abb. 7.7 Einfluss der HIF-1 α Inhibition auf die iTreg Differenzierung unter IL-1 β Stimulation.	42
Abb. 7.8 Einfluss der mTORC1 Inhibition auf die iTreg Differenzierung unter IL-1 β Stimulation.	43
Abb. 7.9 Einfluss von DMOG auf die HIF-1 α Expression in iTregs.	44
Abb. 7.10 Einfluss der DMOG Stimulation auf die iTreg Differenzierung.	45
Abb. 7.11 Vitalität und Proliferation der Tregs unter DMOG Stimulation.	46
Abb. 7.12 Einfluss von Etx auf die HIF-1 α Expression in den iTregs.	47
Abb. 7.13 Einfluss von Etx auf die mTORC1 und c-rel Stabilisierung.	48
Abb. 7.14 Der Einfluss von Etx auf die iTreg Polarisation.	49
Abb. 7.15 Expression von Ki67 in iTregs unter Etx Stimulation.	49
Abb. 7.16 HIF-1 α -Expression in Tregs im Vergleich zu Tcons und Th17 Zellen.	50
Abb. 7.17 Anzahl der IL-17 ⁺ Zellen nach HIF-1 α Stabilisierung.	51
Abb. 7.18 Zytokinproduktion der iTregs nach HIF-1 α Stabilisierung.	52

10. Abbildungs- und Tabellenverzeichnisverzeichnis

Abb. 7.19 Zytokinproduktion der FOXP3 ⁺ Population im Vergleich zur FOXP3 ⁻ Population unter Treg Polarisationsbedingungen.....	53
Abb. 7.20 HIF-1 α Expression in FOXP3 ⁻ Zellen.	54
Abb. 7.21 HIF-1 α Stabilisierung in Tcons.	55
Abb. 7.22 FOXP3 Expression in Tcons..	56
Abb. 7.23 Einfluss von DMOG auf die mitochondriale Respiration.....	57
Abb. 7.24 Einfluss von IL-1 β auf die mitochondriale Respiration.....	58
Abb. 7.25 Einfluss von Etx auf die mitochondriale Respiration.....	59
Abb. 7.26 Einfluss von PX-478 auf die mitochondriale Respiration.	60
Abb. 7.27 Glut-1 Expression in iTregs nach HIF-1 α Induktion.....	61
Abb. 7.28 Einfluss der HIF-1 α Induktion und IL-1 β Stimulation auf die glykolytische Kapazität der iTregs.	61
Abb. 8.1 Interaktion zwischen HIF-1 α und FOXP3..	70
Abb. 8.2 Der Einfluss der HIF-1 α Induktion auf die iTreg Differenzierung.	72

10.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Antikörper für die Zellsortierung	28
Tabelle 2: Übersicht der verwendete Durchflusszytometrie -Antikörper	30
Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Westernblot- Antikörper.....	33

11 ANHANG

11.1 Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Jan Rupp für die Möglichkeit die Dissertation in seiner Forschungsgruppe absolviert haben zu dürfen. Die hervorragende wissenschaftliche Betreuung der Doktorarbeit und seine Förderung ermöglichten mir einen sehr guten Einblick in das wissenschaftliche Arbeiten. Seine ausgesprochen gute Unterstützung und konstruktive Kritik haben besonders zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Vielen Dank!

Bei Prof. Claire Chougnat möchte ich mich für die lehrreiche und spannende Zeit, die ich in ihrem Labor verbringen durfte, bedanken. Ihre konstruktiven wissenschaftlichen Ratschläge und ihre tolle Unterstützung waren stets sehr hilfreich.

Bei den Verantwortlichen des IRTG1911, Prof. Dr. med. Jörg Köhl und Prof. Dave Hildemann, möchte ich mich für die Chance bedanken, meine Arbeit im Rahmen des Stipendiumprogramms absolviert haben zu dürfen.

Dr. Yves Laumonier danke ich für sein Mentoring im Rahmen des IRTG1911 Programms und seine hilfreichen Diskussionen und Ratschläge.

Bei Herrn Prof. Dr. Solbach möchte ich mich dafür bedanken, dass ich die Arbeit im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene beginnen konnte.

Tilman Vollbrandt und Constanze Siggel danke ich für die Hilfe bei der Zellsortierung und bei den Durchflusszytometrie Analysen.

Kristin Wischnat danke ich für die ausgesprochen gute Unterstützung im Labor. Ihre sehr kompetente Einarbeitung, ermöglichte mir einen guten Start in das Arbeiten im Labor. Ihr offenes Ohr und hilfreichen Ratschläge erleichterten mir die Arbeit ungemein und halfen mir so manches Problem zu lösen.

Maria Fields und Cesar Rueda danke ich für die lehrreiche und ausgesprochen schöne Zeit in Cincinnati. Zusätzlich danke ich Cesar Rueda für die Durchführung von einigen Experimenten.

Meinen Kollegen Inga Kaufhold, Nadja Käding, Dirk Friedrich, Larissa Schuchardt, Siegfried Pätzmann, Anke Hellberg, Julia Pagel, Casey Wells und Hesham Shehata danke ich für die hilfreichen Ratschläge, Unterstützung in schwierigen Zeiten und witzigen Momenten im Labor.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Eltern, Schwestern und Freunden für die Unterstützung und stete Begleitung durch die Hochs und Tiefs meiner Arbeit bedanken. Ganz besonders möchte ich mich bei Yannic Bartsch für seinen Rückhalt und seine wissenschaftliche Kritik an der Arbeit bedanken. Vielen Dank ohne Eure tolle Unterstützung und Euren Rückhalt, wäre mir vieles schwerer gefallen.

Zum Schluss möchte ich mich bei den zahlreichen Blutspendern bedanken, ohne die die Arbeit gar nicht möglich gewesen wäre.

11.2 Lebenslauf**Personenangaben**

Name Lea Marie Feldhoff
 Nationalität deutsch
 Geburtsdatum 23.12.1988

**Ausbildung**

November 2017 Approbation zur Ärztin
 2013- 2014 Promotionssemester
 Klinik für Infektiologie und Mikrobiologie, Universität zu
 Lübeck (ehemals Institut für Med. Mikrobiologie und
 Hygiene)
 Division of Cellular and Molecular Immunology, Cincinnati
 Children's Hospital, Ohio, USA
 August 2011 1. medizinisches Staatsexamen, Universität zu Hamburg
 2008 Abitur, Freie Waldorfschule zu Lübeck

Stipendien

2013-2014 Promotionsstipendium des „*international Research Training
 Group 1911*“ (unterstützt von der Deutschen
 Forschungsgesellschaft)
 2015 Reisestipendium der Freunde und Förderer der Universität
 zu Lübeck

11.3 Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

IL-1 β induced HIF-1 α inhibits the differentiation of human FOXP3⁺ T cells.

Science Reports, 28.03.2017, 7:465

Feldhoff LM, Rueda CM, Moreno-Fernandez ME, Sauer J, Jackson CM, Chougnet CA, Rupp J.

Differentiation of regulatory Treg (Treg) in the periphery is critical to control inflammatory processes. Although polarization of inducible Treg (iTreg) often occurs in an inflammatory environment, the effects exerted by inflammation on human iTreg differentiation have not been extensively studied. We observed that IL-1 β significantly reduced the frequency of FOXP3⁺ T cells under iTreg-polarizing conditions. Mechanistically, we show that IL-1 β activated mTORC1 and downstream upregulated hypoxia inducible factor-1 (HIF-1 α) expression. Using specific inhibitors, we demonstrated that both steps were critical in the deleterious effect of IL-1 β on Treg differentiation. Chemical stabilization of HIF-1 α by Dimethyloxalylglycine (DMOG) also significantly impaired iTreg differentiation. Interestingly, while IL-1 β -treated cells exhibited only minor changes in metabolism, DMOG treatment decreased iTreg mitochondrial respiration and increased their glycolytic capacity. In conclusion, exposure to inflammatory stimuli profoundly inhibits human Treg differentiation HIF-1 α dependent, suggesting that targeting HIF-1 α could be a strategy to foster iTreg differentiation in an inflammatory milieu. However, IL-1 β deleterious effect does not appear to be completely driven by metabolic changes. These data thus suggest that several mechanisms contribute to the regulation of iTreg differentiation, but the timing and respective requirement for each pathway vary depending on the milieu in which iTreg differentiate.

Interferon Regulatory Factor 4 controls Th1 cell effector function and metabolism

Science Reports, 20. Oktober 2016, 6:35521

Mahnke J, Schumacher V, Ahrens S, Käding N, Feldhoff LM, Huber M, Rupp J, Raczkowski F, Mittrücker HW.

The transcription factor Interferon Regulatory Factor 4 (IRF4) is essential for TH2 and TH17 cell formation and controls peripheral CD8⁺ T cell differentiation. We used *Listeria monocytogenes* infection to characterize the function of IRF4 in TH1 responses. IRF4^{-/-} mice generated only marginal numbers of listeria-specific TH1 cells. After transfer into infected mice, IRF4^{-/-} CD4⁺ T cells failed to differentiate into TH1 cells as indicated by reduced T-bet and IFN- γ expression, and showed limited proliferation. Activated IRF4^{-/-} CD4⁺ T cells exhibited diminished uptake of the glucose analog 2-NBDG, limited oxidative phosphorylation and strongly reduced aerobic glycolysis. Insufficient metabolic adaptation contributed to the limited proliferation and TH1 differentiation of IRF4^{-/-} CD4⁺ T cells. Our study identifies IRF4

as central regulator of TH1 responses and cellular metabolism. We propose that this function of IRF4 is fundamental for the initiation and maintenance of all TH cell responses.

Transcription regulates HIF-1 α expression in CD4+ T cells.

Immunology and Cell Biology. 07. Juli 2015, 1:109-13

Bollinger T., Bollinger A., Gies S., Feldhoff L., Solbach W., Rupp J.

The transcription factor hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) mediates the metabolic adaptation of cells to hypoxia and T-helper cell fate. However, HIF-1 α regulation in CD4+ T cells (T cells) remains elusive. Here we observed that depletion of oxygen (O₂ less than or equal to 2%) alone was not sufficient to induce HIF-1 α expression in T cells. However, when hypoxic T cells were stimulated, HIF-1 α was expressed and this was dependent on nuclear factor- κ B- and nuclear factor of activated T cell (NFAT)-mediated transcriptional upregulation of Hif-1 α mRNA. HIF-1 α upregulation could be blocked by drugs inhibiting NF- κ B, NFAT or mammalian target of rapamycin precluding CD4+ T-cell stimulation or translation in T cells, as well as by blocking transcription. CD3, CD28, phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) or ionomycin-stimulated T cells did not express HIF-1 α under normoxic conditions. In conclusion, regulation of HIF-1 α expression in CD4+ T cells in hypoxia gravely relies on its transcriptional upregulation and subsequent enhanced protein stabilization.

HIF-1 α - and hypoxia-dependent immune responses in human CD4+CD25^{high} T cells and T helper 17 cells.

Journal of Leukocyte Biology. 2014 August, 96:1–8.

Bollinger T., Gies S., Naujoks J., Feldhoff L., Bollinger A., Solbach W., Rupp J.

The central oxygen sensitive transcription factor HIF-1 α has been implicated in the differentiation of n(T(reg)) and Th17 cells and to orchestrate metabolic changes of activated T cells. However, data on the functional relevance of HIF-1 α and Hox, in general, for nT(reg)-suppressive activity and T cell function in primary human cells are still missing. Therefore, we analyzed the effect of Hox and HIF-1 α on human T(res), n(Treg), and Th17 cells. Under Hox, nT(reg)-mediated suppression of T(res) proliferation, CD25 expression, and secretion of IFN- γ were significantly reduced, whereas expression levels of VEGF, TNF- α , and IL-10 were significantly increased. In contrast to observations in mice, Th17 lineage commitment, as determined by ROR γ t expression, was not affected by activation or inhibition of HIF-1 α expression using DMOG or YC-1 treatment, respectively. Nevertheless, the secretion of IL-17A was increased by DMOG and reduced by YC-1 under Th17-skewing conditions in a dose- dependent manner. In conclusion, Hox and HIF-1 α substantially influence human T cell-mediated immune responses by modulation of nT(reg)-suppressive function and IL-17A secretion by Th17 cells.

Posterpräsentation:

Lea Marie Feldhoff, Cesar M. Rueda, Maria E. Moreno-Fernandez, Claire A. Chougnnet, Jan Rupp (2015). *The impact of HIF-1 α stabilization on the differentiation and metabolism of human iTregs.* 4th *European Congress of Immunology* in Wien. Die Reise wurde durch ein Reisestipendium der Freunde und Förderer der Universität zu Lübeck finanziert.