

# **Molekulare Charakterisierung der *IL9* Genexpression in T-Helfer Typ 9 Zellen**

## **Dissertation**

Zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“  
im Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

angefertigt im Institut für Immunologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Valérie Staudt  
Geboren am 23.09.1983 in Merzig

Mainz, Juni 2014



Erstgutachter:

Zweitgutachter:

Tag der mündlichen Prüfung: 16.09.2014



<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	Das Immunsystem.....	1
1.2	T-Lymphozyten.....	2
1.3	Th <sub>9</sub> -Zellen.....	5
1.4	Interleukin-9.....	7
1.5	Asthma bronchiale.....	8
1.6	Das maligne Melanom.....	9
1.7	Der Transkriptionsfaktor „interferon-regulatory factor 4“ (IRF4).....	10
1.8	Der Transkriptionsfaktor Nuklear factor of activated T cells c2; cytoplasmic, calcineurin-dependent 2 (NFATc2).....	12
1.9	Ziel der Arbeit.....	15
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>17</b>
2.1	Plastikwaren.....	17
2.2	Tiere.....	17
2.3	Zelllinien.....	17
2.4	Chemikalien.....	18
2.5	Kulturmedien und Puffer.....	19
2.6	Zytokine.....	21
2.7	Lösungen und Reagenzien.....	22
2.7.1	Reagenzien für die Anreicherung von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen <i>ex vivo</i> .....	22
2.7.2	ELISA- Reagenzien.....	23
2.7.3	Reagenzien für die Isolierung der Gesamt-RNA aus T-Zellen.....	24
2.7.4	Reagenzien für die reverse Transkription (RT).....	24
2.7.5	Reagenzien für die Durchführung der quantitativen realtime-PCR (qRT-PCR) . .....	25
2.7.6	Reagenzien für die Reportergenanalyse.....	25
2.8	Antikörper und Beads.....	25
2.8.1	Antikörper und Beads zur Anreicherung von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen <i>ex vivo</i> mittels MACS.....	25
2.8.2	Antikörper zur Zellsortierung von naiven CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	26
2.8.3	Antikörper zur Bestimmung von Zytokinkonzentrationen (ELISA).....	26
2.8.4	Antikörper für die FACS-Analyse.....	27

2.8.5	Antikörper zur Stimulation von T-Zellen <i>ex vivo</i> .....	27
2.8.6	Antikörper für <i>in vivo</i> Experiment .....	27
2.9	Verbrauchsmaterialien .....	28
2.10	Laborgeräte.....	29
2.11	Methoden der Zellkultur.....	29
2.11.1	Bestimmung der Lebendzellzahl.....	29
2.11.2	Kultur von B16F10 luc-Melanomzellen .....	29
2.12	Anreinigung von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen <i>ex vivo</i> .....	30
2.12.1	Anreinigung muriner CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	30
2.12.2	Stimulation der naiven CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	33
2.12.3	Beschichtung von Kulturplatten.....	33
2.13	Durchflusszytometrie .....	33
2.14	Interleukin-spezifische ELISA .....	35
2.15	Transfektion .....	36
2.16	Reportergen-Assay .....	37
2.17	Molekularbiologische Methoden.....	38
2.17.1	Präparation der Gesamt-RNA .....	38
2.17.2	Reverse Transkription der mRNA in cDNA .....	38
2.17.3	Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	39
2.17.4	Verwendete Oligonukleotide („Primer“) .....	40
2.18	<i>In vivo</i> -Experimente zur Untersuchung asthmatischer Symptome am Mausmodell	40
2.18.1	Immunisierung der Versuchtiere und Versuchsaufbau .....	41
2.18.2	Durchführung der bronchoalveolären Lavage.....	42
2.18.3	Erstellen von Zytospins .....	43
2.18.4	Gewinnung des Serums .....	43
2.18.5	Lungenfunktionsmessung.....	44
2.19	<i>In vivo</i> -Experimente zur Analyse der Melanomentwicklung am Mausmodell.....	48
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>51</b>
3.1	Der Transkriptionsfaktor IRF4 bindet und aktiviert den murinen <i>Il9</i> Promotor in Th <sub>9</sub> -Zellen.....	51
3.2	IRF4 kooperiert mit PU.1 um den murinen <i>Il9</i> Promotor zu transaktivieren .....	52
3.3	NFATc2 hemmt die <i>Il9</i> Promotoraktivität in Th <sub>9</sub> -Zellen.....	53

3.4	Untersuchung der IL-9-Produktion NFATc2-defizienter Th <sub>9</sub> -Zellen im Vergleich zu wildtypischen Th <sub>9</sub> -Zellen .....	55
3.4.1	NFATc2-defiziente CD4 <sup>+</sup> -Zellen weisen eine verstärkte IL-9-Sekretion nach Primärstimulation unter Th <sub>9</sub> -polarisierenden Bedingungen auf.....	55
3.4.2	NFATc2-defiziente Th <sub>9</sub> -Zellen exprimieren verstärkt intrazellulär IL-9 .....	56
3.5	Die Auswirkung einer NFATc2-Defizienz in der Pathogenese des murinen Asthma bronchiale .....	57
3.5.1	NFATc2-defiziente Tiere zeigen einen erhöhten Atemwegswiderstand .....	58
3.5.2	Die NFATc2-Defizienz führt zu höheren absoluten Zellzahlen in der BAL ...	59
3.5.3	NFATc2-defiziente Tiere zeigen eine verstärkte pulmonale Inflammation.....	61
3.5.4	NFATc2-defiziente Tiere zeigen eine erhöhte Zytokin-Konzentrationen in der BAL .....	62
3.5.5	Analyse der Sensibilisierung mittels Nachweis von OVA-spezifischen Antikörpern.....	63
3.6	Die Auswirkung einer NFATc2-Defizienz in der Pathogenese des murinen Asthma bronchiale nach IL-9-Neutralisation .....	64
3.6.1	Die Neutralisation von IL-9 reduziert den Atemwegswiderstand.....	65
3.6.2	Die Neutralisation von IL-9 inhibiert die pulmonale Inflammation .....	66
3.6.3	Die Neutralisation von IL-9 inhibiert die pulmonale Eosinophilie.....	68
3.6.4	Einfluss der Neutralisation von IL-9 auf die Bildung von OVA-spezifischen Immunglobulinen in NFATc2-defizienten und WT Mäusen.....	69
3.7	Auswirkung einer gesteigerten IL-9-Produktion durch die NFATc2-Defizienz auf die adaptive anti-Tumor Immunantwort .....	70
3.7.1	Die NFATc2-Defizienz hat eine protektive Wirkung durch die Inhibition der Melanomzellproliferation.....	70
3.7.2	Die NFATc2-Defizienz führt zu einer gesteigerten IL-9-Produktion in den Milzzellen.....	72
3.7.3	Die NFATc2-Defizienz führt zu einer gesteigerten IL-9-Produktion in den Lymphknoten .....	73
3.7.4	Die Applikation des IL-9-neutralisierenden Antikörpers führt zu einem verstärkten Tumorwachstum .....	74
3.8	Drainierende Lymphknotenzellen der NFATc2-defizienten Tiere weisen eine verstärkte IL-9-Produktion auf.....	76

<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>79</b>
4.1	Molekulargenetische Analyse der <i>IL9</i> Genregulation in Th <sub>9</sub> -Zellen .....	79
4.2	Physiologische Funktion von Th <sub>9</sub> -generiertem IL-9 .....	85
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>95</b>
<b>6</b>	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>97</b>
<b>7</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>99</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>101</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>105</b>
<b>10</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>113</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem schützt unseren Körper vor Pathogenen und ist in der Lage entartete Körperzellen zu beseitigen. Evolutionär hat sich das Immunsystem über einen Zeitraum von mehr als Hundert Millionen Jahren entwickelt und viele Verteidigungsstrategien hervorgebracht. Bereits Prokaryoten weisen durch das Vorhandensein von Restriktionsendonukleasen die Fähigkeit auf, sich gegen Bakteriophagen zu verteidigen. Auch einzellige Eukaryoten, wie die Amöbe, sind in der Lage Feinde zu eliminieren, indem sie diese durch Phagozytose verschlingen.

Das Immunsystem lässt sich in zwei große Domänen aufteilen, zum einen in das angeborene und zum anderen das adaptive Immunsystem.

Die phylogenetisch ältere, angeborene Immunität ist die erste Instanz gegen eindringende Pathogene. Sie ist die vorherrschende Verteidigungsstrategie bei Invertebraten, jedoch auch bei Vertebraten von immenser Bedeutung. Diese Immunantwort greift direkt am Infektionsort, besitzt allerdings kein immunologisches Gedächtnis (Defensine, natürliche Antikörper uvm.). Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems gehören Mastzellen, Granulozyten, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Makrophagen und dendritische Zellen. Zur Pathogenerkennung und – Beseitigung weisen diese Zellen spezielle Rezeptoren auf, welche spezifische, repetitive Struktur motive von Pathogenen erkennen können. Diese Mustererkennungsrezeptoren werden als „Pattern recognition receptors“ (PRRs) bezeichnet. Zu ihnen zählen unter anderem die „Toll-like Rezeptoren“, welche je nach Rezeptorspezifität mikrobielle Nukleinsäuremotive oder Bestandteile der grampositiven und gramnegativen, bakteriellen Zellwand erkennen. Diese Struktur motive werden als „Pathogen associated moleculare pattern“ (PAMPs) bezeichnet.

Die Zellen des angeborenen Immunsystems halten Infektionen in Schach, und können diese unter Umständen beseitigen, noch bevor die adaptive Immunität eingreift. Vor allem Makrophagen und dendritische Zellen, sind in der Lage Antigene aufzunehmen, diese zu prozessieren und schließlich an ihrer Oberfläche an Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC: „major histocompatibility complex“) gebunden zu präsentieren. Diese Zellen fungieren als Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität und leiten eine adaptive Immunreaktion ein.

Die adaptive Immunantwort bietet einen Schutz gegen Pathogene, die der Verteidigung durch die angeborene Immunität entgehen konnten. Sie ist wesentlich spezifischer als die Angeborene und weist zudem durch das immunologische Gedächtnis einen Langzeitschutz gegen ein bestimmtes Antigen auf. Zu den Zellen des adaptiven Immunsystems zählen die antikörperbildenden B-Zellen und die T-Lymphozyten. Die B-Zellen reifen im Knochenmark heran und sind nach spezifischer Antigenerkennung in der Lage Immunglobuline (IgGs) zu sezernieren und sind somit für die humorale Immunität von Bedeutung. Die im Thymus reifenden T-Zellen sind Träger der zellulären Immunantwort. Bereits kieferlose Vertebraten wie das Neunauge weisen lymphozytenähnliche Zellen auf. Knorpelfische sind evolutionär gesehen, die ersten Lebewesen, bei denen ausdifferenzierte T- und B-Zellen zu finden sind. Ausgeprägte B- und T-Zellantworten sind allerdings erst bei Vertebraten zu finden und machen das sogenannte adaptive Immunsystem aus.

## 1.2 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten sind Immunzellen, die sich aus lymphoiden Vorläuferzellen im Thymus entwickeln. Sie wandern als Prä-Thymozyten aus dem Knochenmark oder der fetalen Leber in den Thymus ein. Hier differenzieren sie sich und entwickeln den spezifischen T-Zell-Rezeptor und unterlaufen ein Selektionsprogramm. Dabei sichert die Positivselektion, dass nur solche T-Zellen überleben, welche in der Lage sind mit entsprechenden MHC-Rezeptoren zu interagieren. Durch die Negativselektion wird sichergestellt, dass autoreaktive T-Lymphozyten, die körpereigene Peptide im Kontext mit MHC mit hoher Affinität binden, beseitigt werden. Am Ende dieser Prozesse liegen einfach positive T-Lymphozyten vor, die als Oberflächenmarker entweder CD4 oder CD8 tragen.

Bei CD8<sup>+</sup> T-Zellen handelt es sich um zytotoxische T-Lymphozyten (CTL), welche ihr Antigen in Verbindung mit MHC-Klasse-I-Molekülen erkennen. Diese T-Zellen besitzen die Fähigkeit virusinfizierte Körperzellen zu erkennen<sup>1</sup>. Auch Tumorzellen können erkannt und eliminiert werden. Ihr zytotoxisches Potential besteht darin, Perforine und Granzyme abzusondern und die Zielzelle auf diesem Weg durch Apoptose zu töten<sup>2</sup>. Des Weiteren konnte eine Beteiligung von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen an der Pathogenese der Autoimmunkrankheit Multiple Sklerose (MS) nachgewiesen werden<sup>3,4</sup>.

Zu den CD4<sup>+</sup> T-Zellen gehören die T-Helferzellen, welche ihr Antigen in Kombination mit MHC-Klasse-II-Molekülen erkennen. CD4<sup>+</sup> T-Zellen verlassen den Thymus als naive Zellen und können in den sekundären, lymphatischen Organen in verschiedene Subpopulationen differenzieren. Die zuerst beschriebenen T-Helferzellen sind die Th<sub>1</sub>- und Th<sub>2</sub>-Subpopulationen<sup>5</sup>. Th<sub>1</sub>-Zellen sind in der Lage, intrazelluläre Pathogene, wie zum Beispiel *Toxoplasma gondii* und *Mycobacterium tuberculosis*, zu bekämpfen und im Zuge einer Immunantwort Makrophagen zu aktivieren<sup>6-8</sup>. Diese Makrophagenaktivierung erfolgt hauptsächlich durch die IFN- $\gamma$ -Produktion dieser Zellen<sup>9</sup>. An der Differenzierung zur Th<sub>1</sub>-Subpopulation sind der Transkriptionsfaktor „Signal Transducer and Activator of Transcription“ STAT4 und das Zytokin Interleukin-12 (IL-12), welches von Antigen-präsentierenden Zellen produziert wird, maßgeblich beteiligt<sup>10,11</sup>. Beide spielen eine wichtige Rolle für die IFN- $\gamma$ -Produktion. IFN- $\gamma$  wiederum ist in der Lage die Transkriptionsfaktoren STAT1 und T-bet zu aktivieren und so die Differenzierung zur Th<sub>1</sub>-Subpopulation voranzutreiben<sup>12,13</sup>. Neben IFN- $\gamma$  produzieren Th<sub>1</sub>-Zellen weitere Zytokine, wie auch IL-2<sup>5</sup>, welches einen wichtigen Wachstumsfaktor für T-Zellen darstellt. Th<sub>2</sub>-Zellen produzieren selbst IL-4, -5, und -13. Sie leisten Hilfe für die humorale Immunantwort und spielen aber auch eine Rolle bei allergischen Erkrankungen und der Bekämpfung von extrazellulären Pathogenen wie zum Beispiel *Fasciola hepatica*<sup>6,14-16,17</sup>. Die Th<sub>2</sub>-Zelldifferenzierung wird durch die Anwesenheit von IL-4 und die Transkriptionsfaktoren STAT6 und GATA-3 begünstigt<sup>18,19</sup>. Auch eine Rolle des Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktors Dec2 konnte für die Th<sub>2</sub>-Differenzierung nachgewiesen werden<sup>20</sup>.

Eine weitere Subpopulation der T-Helferzellen stellen die Th<sub>17</sub>-Zellen dar. Diese zeichnen sich durch die Produktion der Zytokine IL-17A und IL-17F aus, sind aber auch in der Lage IL-22, IL-21, GM-CSF und den Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) zu produzieren<sup>21-23</sup>. Diese Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Ausprägung der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) und der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA). Beide Krankheitsbilder zeigen in der Abwesenheit von IL-17 im Mausmodell einen wesentlich mildereren Krankheitsverlauf<sup>24</sup>. Auch sind Th<sub>17</sub>-Zellen entscheidend an der Abwehr von bakteriellen und fungoiden Pathogenen wie zum Beispiel von *Klebsiella pneumoniae* und *Cryptococcus neoformans* beteiligt<sup>25,26</sup>. Im Asthma bronchiale spielen die IL-17-produzierenden Zellen vor allem bei der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten eine wesentliche Rolle.

Die Differenzierung zur Th<sub>17</sub>-Zelle wird durch den „Orphan Nuclear Receptor ROR $\gamma$ t“ vorangetrieben<sup>27,28</sup>. Es ist allerdings beschrieben, dass eine ROR $\gamma$ -Defizienz nicht gänzlich zur Unterdrückung der Th<sub>17</sub>-Zelldifferenzierung führt. Entsprechend konnte ROR $\alpha$  als ein weiterer wichtiger Faktor für die Th<sub>17</sub>-Differenzierung identifiziert werden<sup>29</sup>. Auch der Transkriptionsfaktor „interferon-regulatory factor 4“ (IRF4 = Interferon regulatorischer Faktor 4) ist maßgeblich an der Th<sub>17</sub>-Differenzierung beteiligt<sup>30</sup>.

Human konnte eine weitere T-Helferzellsubpopulation beschrieben werden, welche sich durch die Expression des Zytokins IL-22 auszeichnet und entsprechend als Th<sub>22</sub>-Zelle bezeichnet wurde<sup>31,32</sup>. Hierbei handelt es sich um die Epidermis infiltrierende Zellen, welche vor allem bei Patienten mit chronisch, entzündlichen Hautveränderungen zu finden sind. Es konnten allerdings auch regenerative Wirkungen von IL-22 beschrieben werden. Unter anderem ist es in epidermale Wundheilungsprozesse involviert<sup>31,32</sup>.

Zu den CD4<sup>+</sup> T-Zellen gehören auch die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen (Tregs). Tregs sind für Induktion und Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz von essentieller Bedeutung<sup>33,34</sup>. Bei diesem Mechanismus werden autoaggressive T-Zellen, welche der Negativselektion entkommen konnten, supprimiert. Eine Treg-Defizienz führt entsprechend zur Entwicklung von Autoimmunkrankheiten<sup>35</sup>. Die regulatorischen T-Zellen lassen sich in natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen (nTregs) und induzierte regulatorische T-Zellen (iTregs) unterscheiden<sup>36</sup>. Während die nTregs im Thymus entstehen, differenzieren induzierte regulatorische T-Zellen in der Peripherie. Diese iTregs lassen sich wiederum in Typ-1 regulatorische T-Zellen (Tr1) und die sogenannten Th<sub>3</sub>-Zellen unterteilen. Während Tr1-Zellen Th<sub>1</sub>- und Th<sub>2</sub>-vermittelte Erkrankungen durch Inhibition antigenpräsentierender Zellen vor allem über die IL-10-Produktion beeinflussen, sind Th<sub>3</sub>-Zellen unter anderem in der Lage die Induktion von autoimmuner Enzephalomyelitis durch starke TGF- $\beta$ -Produktion zu unterdrücken<sup>37,38</sup>. Zudem spielen Th<sub>3</sub> Zellen eine entscheidende Rolle bei der oralen Toleranz gegenüber Lebensmittelantigenen.

Eine weitere erst kürzlich beschriebene Subpopulation an CD4<sup>+</sup> T-Zellen stellen die Th<sub>9</sub>-Zellen dar, welche in Anwesenheit von IL-2, IL-4 und TGF- $\beta$  verstärkt IL-9 produzieren<sup>39</sup>.

### 1.3 Th<sub>9</sub>-Zellen

Bereits 1994 wurden CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen beschrieben, welche nach Stimulation und in Anwesenheit von IL-4 und TGF-β1 das proinflammatorische Zytokin IL-9 produzieren. Die IL-9-Produktion wird durch die Anwesenheit von IL-4 ermöglicht, während IFN-γ den IL-9-fördernden Effekt von IL-4 nachweislich hemmen kann<sup>39</sup>. *In vivo* konnte allerdings auch ein IL-4-unabhängiger Weg der IL-9-Expression beschrieben werden<sup>40</sup>. Zusammen mit TGF-β ist auch das proinflammatorische Zytokin IL-1 in der Lage die IL-9-Expression in Th<sub>9</sub>-Zellen zu steigern und die IL-9-fördernde Wirkung von IL-4 zu ersetzen<sup>41</sup>. Realtime-PCR-Experimente konnten zeigen, dass die Anwesenheit von rekombinantem IL-9 im Zellkulturmedium zu einer verstärkten IL-9-mRNA-Expression führt und somit eine autokrine, positive Rückkopplung für die IL-9-Produktion vorliegt<sup>42</sup>. Während die oben genannten Zytokine die IL-9-Produktion durch Th<sub>9</sub>-Zellen fördern, übt das IL-17-fördernde Zytokin IL-23 eine inhibitorische Wirkung auf die IL-9-Produktion aus<sup>43</sup>. Th<sub>9</sub>-Zellen können sich nicht nur aus naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen differenzieren, sie können unter dem Einfluss von TGF-β auch aus bereits zu Th<sub>2</sub> differenzierten Zellen entstehen<sup>42</sup>. Neben IL-9 ist auch eine IL-10-Produktion dieser Zellen beschrieben<sup>44</sup>. Eine Koexpression von IL-9 mit anderen Th<sub>2</sub>-typischen Zytokinen, wie IL-4, IL-5, IL-13, sowie dem Th<sub>1</sub>-typischen IFN-γ oder IL-17A (Th<sub>17</sub>-Zellen) konnte nicht nachgewiesen werden<sup>42, 45</sup>. Erste Hinweise zur Annahme, dass es sich bei Th<sub>9</sub>-Zellen um eine eigenständige T-Helferzellsubpopulation handelt, lieferten Versuche, bei denen naive, CD4<sup>+</sup>-T-Zellen unter den typischen Th<sub>1</sub>-, Th<sub>2</sub>-, Th<sub>17</sub>-, iTreg- oder Th<sub>9</sub>-Differenzierungsbedingungen stimuliert wurden. Hier konnte eine intrazelluläre IL-9-Produktion nur bei Th<sub>9</sub>-Zellen detektiert werden<sup>42</sup>. Untermuert wurde dies durch die Beobachtung, dass weder T-bet, GATA-3, FoxP3 noch der Transkriptionsfaktor RORγt bei der Differenzierung zum Th<sub>9</sub>-Phänotyp mitwirken<sup>42</sup>. Als entscheidender Transkriptionsfaktor für die Th<sub>9</sub>-Differenzierung konnte der „interferon-regulatory factor 4“ (IRF4 = Interferon regulatorischer Faktor 4) identifiziert werden. IRF4 ist in der Lage an den *IL9* Promotor in Th<sub>9</sub>-Zellen zu binden und ihn *in trans* zu aktivieren<sup>45</sup>. Dieser Transkriptionsfaktor ist prinzipiell in der Lage mit dem Transkriptionsfaktor PU.1 zu interagieren<sup>46</sup>. In der Tat konnte auch PU.1 als ein transkriptioneller Aktivator der IL-9-Expression in Th<sub>9</sub>-Zellen beschrieben werden<sup>47</sup>. Auch der Transkriptionsfaktor STAT6 („Signal Transducers and Activators of Transkription 6“) spielt eine Rolle bei der Transkription des *IL9* Gens<sup>48</sup>. Weiter konnte auch das T-Zell-

kostimulatorische Molekül OX40 (CD134) als Induktor der Th<sub>9</sub>-Differenzierung ermittelt werden<sup>49</sup>.

Th<sub>9</sub>-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese des murinen Asthma bronchiale. So zeigen Mäuse, denen Th<sub>9</sub>-Zellen zusammen mit einem neutralisierenden IL-9-Antikörper verabreicht wurden, eine mildere Ausprägung asthmatischer Symptome als nach dem Transfer von Th<sub>2</sub>-Zellen in Kombination mit diesem Antikörper<sup>45</sup>. In einem Infektionsmodell unter Verwendung von Helminthen konnte gezeigt werden, dass die IL-9-Produktion *in vivo* von der Anwesenheit von TGF-β abhängt und somit maßgeblich durch Th<sub>9</sub>-Zellen hervorgerufen wird. Entsprechend zeigen Mäuse mit einem dominant negativen Rezeptor für TGF-β nicht nur eine geringere IL-9-Produktion, sondern auch eine deutlich höhere Nematodenbelastung im Darm, als vergleichbare wildtypische Tiere<sup>42</sup>. Th<sub>9</sub>-Zellen sind auch an der Entstehung von Autoimmunerkrankungen des zentralen Nervensystems beteiligt. In einem murinen Modell der multiplen Sklerose (EAE) konnte gezeigt werden, dass Th<sub>9</sub>-Zellen nach adoptivem Transfer in der Lage sind eine EAE zu induzieren. Dabei zeigt sich eine Schwere im Ausprägungsgrad, wie sie auch durch Th<sub>17</sub>- oder Th<sub>1</sub>-Zellen hervorgerufen werden kann<sup>50</sup>.

Es ist bekannt, dass Polymorphismen im *IL9* Gen in Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko zur Entwicklung eines kutanen, malignen Melanoms stehen<sup>51</sup>. Entsprechend konnte gezeigt werden, dass Th<sub>9</sub>-Zellen eine wichtige Rolle bei der anti-Tumorimmunität spielen. So konnte in einem Tiermodell mit B16F10-Melanomzellen gezeigt werden, dass ein adoptiver Transfer von Th<sub>9</sub>-Zellen im Vergleich zu Th<sub>0</sub>-Zellen, welche nicht durch die Zugabe exogener Zytokine polarisiert wurden, das Tumorwachstum verzögert und sich so positiv auf die Überlebensrate der Versuchstiere auswirken kann<sup>52</sup>. Auch die Applikation von rekombinantem IL-9 (rIL-9) führt zu einem verlangsamten Tumorwachstum. Dieser Effekt wird als T- und B-Zellunabhängig beschrieben, während die Anwesenheit von Mastzellen für diese Immunität unerlässlich ist<sup>52</sup>. Weitere Publikationen bestätigen die antitumorale Wirkung von Th<sub>9</sub>-Zellen. So zeigen Experimente eines Lungenmelanom-Modells, dass die Applikation von IL-9-produzierenden Th<sub>9</sub>-Zellen einer Lungenmetastasierung sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch entgegenwirkt<sup>53</sup>. In diesem Zusammenhang geht man davon aus, dass Th<sub>9</sub>-Zellen die Expression des Chemokins *Ccl20* im Tumorgewebe verstärkt. Auf diese Weise sind Th<sub>9</sub>-Zellen in der

Lage zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch eine Ccl20/Ccr6-abhängige DC-Rekrutierung zu aktivieren<sup>53</sup>.

## 1.4 Interleukin-9

Bei Interleukin-9 (IL-9) handelt es sich um ein einkettiges Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 32-39kDa<sup>54</sup>. Auf Proteinebene besteht eine 55%ige Homologie zwischen humanem und murinen IL-9<sup>55</sup>. Dabei kann das murine Protein aktiv auf humanen Zellen sein, nicht aber *vice versa*<sup>56</sup>. IL-9 ist ein multifunktionales Zytokin, welches in der Lage ist, Immunreaktionen positiv und negativ zu beeinflussen. Es wird sowohl von angeborenen lymphoiden Zellen („innate lymphoid cells“ = ILCs), aktivierten Mastzellen, als auch von aktivierten T-Zellen produziert<sup>57-59</sup>. IL-9 hat im Laufe der Zeit unterschiedliche Bezeichnungen erhalten. Zunächst wurde es unter dem Namen P40 bekannt und wurde schließlich aufgrund seines wachstumsfördernden Einflusses auf bestimmte T-Zelllinien und fetale Thymozyten auch als „T cell growth factor III“ (TCGFIII) bezeichnet<sup>59-61</sup>. Weiter übt IL-9 einen wachstumsfördernden Einfluss auf Mastzellen aus, weshalb es auch als „Mast cell growth enhancing activity“ (MEA) bezeichnet wurde<sup>62</sup>. IL-9 fördert auch die Produktion von IL-6 und bestimmten Mastzell-Proteasen<sup>63,64</sup>. Weiter konnte gezeigt werden, dass IL-9 einen proliferationsfördernden Einfluss auf Erythrozyten-Vorläuferzellen ausübt und die IL-4-induzierte IgE- und IgG1-Produktion durch B-Zellen positiv beeinflusst<sup>65-67</sup>. Auch wird die murine hippocampale Neurogenese durch IL-9 gefördert, da hier die Expression von neurofilamentären Proteinen verstärkt stattfindet<sup>68</sup>.

IL-9 kommt bei Infektionskrankheiten mit Nematoden eine Schlüsselfunktion zum Schutz des Wirtes zu. So konnte in IL-9-transgenen Mäusen nachgewiesen werden, dass durch eine konstitutive IL-9-Expression sowohl spezifisches IgG1 gegen die Parasiten gebildet wird, als auch eine starke Mastozytose hervorgerufen wird, um die Parasitenbelastung zu minimieren<sup>69</sup>. Weiter trägt IL-9 im Rahmen einer murinen *Trichuris spiralis*-Infektion dazu bei, dass die intestinale Muskelkontraktion stimuliert wird und fördert somit die Abwehr im Rahmen bestimmter Nematodeninfektionen<sup>70</sup>.

IL-9 spielt in der Onkogenese eine wichtige Rolle. So fördert es murin die Proliferation von T-Zell-Lymphomen und ist im humanen System bei der Entwicklung von Hodgkin-Lymphomen und malignen, anaplastischen Lymphomen beteiligt<sup>71,72</sup>.

Letztere weisen selbst eine starke IL-9-Produktion auf und zeigen eine starke Expression des IL-9-Rezeptors<sup>73</sup>. In Hodgkin-Zelllinien konnte weiter gezeigt werden, dass IL-9 durch eine autokrine Verstärkungsschleife fördernd auf die IL-9-Produktion wirkt<sup>74</sup>. IL-9 kann aber auch eine protektive Wirkung im Rahmen einer Tumorabwehr nachgesagt werden. So stehen Polymorphismen im *IL9* Gen in direktem Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko für ein kutanes, malignes Melanom (siehe 1.3)<sup>51</sup>.

Murin und human wird das *IL9* Gen in einem direkten Zusammenhang mit Asthma bronchiale gehandelt<sup>75</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass Asthmapatienten im Vergleich zu Kontrollgruppen, eine erhöhte Anzahl IL-9-exprimierender Zellen aufweisen und auch die Immunoreaktivität des IL-9-Rezeptors in Asthmapatienten am stärksten ausgeprägt ist<sup>76</sup>. In transgenen Tieren führt eine konstitutive IL-9-Expression zu einer starken Ausprägung asthmatischer Symptome wie zum Beispiel einer eosinophilen und lymphozytären Entzündung, einer verstärkten Mukussekretion, der verstärkten Bildung von Th<sub>2</sub>-Zytokinen und der Ausprägung einer pulmonalen Mastozytose<sup>77</sup>.

## 1.5 Asthma bronchiale

Bei Asthma handelt es sich um eine komplexe Erkrankung, welche sowohl mit chronischen Atemwegsentzündungen, als auch mit Überempfindlichkeitsreaktionen der Atemwege (AHR; „airway hyperresponsiveness“) in Zusammenhang steht<sup>52</sup>. Es gibt mehrere Faktoren, die bei der Entstehung von Asthma bronchiale mitwirken. So scheint neben der genetischen Prädisposition auch der Kontakt mit bestimmten Allergenen und virale Infektionen eine wichtige Rolle zu spielen<sup>53-55</sup>. An der Entstehung von asthmatischen Entzündungen sind neben den Eosinophilen Granulozyten, auch Mastzellen und CD4<sup>+</sup> T-Zellen beteiligt<sup>56;57</sup>. Mastzellen exprimieren auf ihrer Zelloberfläche den hochaffinen IgE-Rezeptor (FcεRI). Durch Kreuzvernetzung dieser Rezeptoren, setzen Mastzellen Histamine, Leukotriene, Prostaglandine und weitere Mediatoren frei, welche unter anderem zu erhöhter Schleimproduktion und Muskelkontraktion führen<sup>58</sup>. Auch die Produktion von IL-13 durch Mastzellen hat einen Einfluss auf die Entstehung von Überempfindlichkeitsreaktionen der Atemwege<sup>59</sup>. Durch die Sekretion von bestimmten Chemokinen, sind Mastzellen in der Lage weitere Zellen zum



Entzündungsort zu leiten<sup>60</sup>. Anhand von Mastzell-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass Mastzellen wichtig für die Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten sind<sup>61;62</sup>. Durch die Degranulation im Rahmen einer Eosinophilie, werden das Eosinophile kationische Protein (EPC) und das „Major basic protein“ (MBP) freigesetzt<sup>58</sup>. Beide wirken zytotoxisch auf die Atemwegsepithelien. Auch T-Zellen produzieren chemotaktische Moleküle, welche ebenfalls eosinophile Granulozyten, zum Entzündungsort leiten<sup>58</sup>. Unter den CD4<sup>+</sup> T-Zellen spricht man neben den Th<sub>9</sub>-Zellen vor allem den Th<sub>2</sub>-Zellen eine tragende Rolle bei der Entstehung von asthmatischen Symptomen zu. Dies ist durch die Zytokine begründet, die durch diese T-Helferzellen produziert werden<sup>52</sup>. Aus den Sekreten einer bronchioalveolären Lavage (BAL) können die typischen Th<sub>2</sub>-Zytokine IL-4, IL-5, IL13 und IL-9 nachgewiesen werden<sup>63</sup>. Wie oben bereits erwähnt, nimmt das *IL9* Gen eine Schlüsselfunktion bei der Entstehung von Asthma bronchiale ein<sup>50</sup>. Der wichtige Einfluss von IL-9 auf die Entwicklung von asthmatischen Erkrankungen wird dadurch gestützt, dass in Bronchialbiopsien bei Asthmapatienten Zellen gefunden wurden, die eine starke IL-9-mRNA-Expression aufweisen<sup>64;65</sup>. Entsprechend trägt auch das von Th<sub>9</sub>-Zellen produzierte IL-9 zur Ausprägung von Asthma bronchiale bei<sup>45</sup>. Untermuert wird diese Beobachtung dadurch, dass Th<sub>9</sub>-Zellen aus atopischen Patienten eine wesentlich stärkere IL-9-Sekretion aufweisen, als die Th<sub>9</sub>-Zellen von nichtatopischen Kontrollpersonen<sup>78</sup>. Weiter konnte auch eine verstärkte Anwesenheit von zirkulierenden Th<sub>9</sub>-Zellen bei allergischen Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden<sup>79</sup>. Sowohl murin, als auch human konnte nachgewiesen werden, dass das thymische stromale Lymphopoietin (TSLP), welches durch Epithelzellen im asthmatischen Bronchialgewebe gebildet wird, die IL-9-Produktion von Th<sub>9</sub>-Zellen verstärkt und so in der Lage ist die Th<sub>9</sub>-vermittelte Atemwegsentzündung zu fördern<sup>80</sup>.

## 1.6 Das maligne Melanom

Bei dem malignen Melanom handelt es sich um eine von Melanozyten ausgehende, hochaggressive Hautkrebsform mit hohem Metastasierungspotenzial<sup>81</sup>. Auch aufgrund der stark ausgeprägten Chemoresistenz der Melanomzellen, zählt das maligne Melanom zu den am häufigsten tödlich verlaufenden Hautkrankheiten<sup>82</sup>. Im Vergleich zu anderen Krebsarten weist das Melanom eine stark steigende Inzidenz

auf<sup>83</sup>. Männer und Frauen sind hierbei gleich stark betroffen, wobei Frauen im Durchschnitt deutlich früher erkranken<sup>81</sup>. Die operative Entfernung des Primärtumors stellt den ersten Therapieansatz für den Patienten dar. Dabei ist die Früherkennung von erheblicher Bedeutung<sup>83</sup>. Postoperativ kommen sowohl Interferontherapien (IFN- $\alpha$ ), als auch die Behandlung mit IL-2 zum Einsatz<sup>81</sup>. Diese und weitere Behandlungen konnten bislang jedoch nur unwesentlich die Überlebensrate der betroffenen Patienten verlängern<sup>82</sup>. Daher ist es von großer Bedeutung neue therapeutische *Targets* zu identifizieren um neue Behandlungsmöglichkeiten zu etablieren. Hierbei ist es hilfreich, Signalwege ausfindig zu machen, welche die Melanombildung nicht nur initiieren, sondern auch die Metastasierung steuern. Experimente im murinen Modell zeigen, dass das Th<sub>9</sub>-generierte IL-9, sowohl prophylaktisch, als auch therapeutisch eine antitumorale Wirkung bei der Melanomentwicklung aufweist<sup>53</sup>.

## 1.7 Der Transkriptionsfaktor „interferon-regulatory factor 4“ (IRF4)

Der Transkriptionsfaktor IRF4 ist eines von neun Mitgliedern der IRF-Familie<sup>84,85</sup>. IRF4 wird in lymphoiden Zellen, wie B- und T-Zellen und auch in Makrophagen exprimiert<sup>86,87</sup>.



**Abb.1: Struktur des Interferon regulatorischen Faktors 4 (IRF4)** (Quelle: Lohoff, Nature Reviews Immunology 2005). Grün: regulatorische Domäne; blau: DNA-Bindedomäne; hellblau: Heterodimerisierungsdomäne; gelb: Repressionsdomäne.

Das IRF4-Protein besteht aus 450 AS und kann grob in eine DNA-Bindedomäne (DBD) (blaue Struktur in Abb.1) und eine regulatorische Domäne (grüne Struktur in Abb.1) aufgeteilt werden. Die DBD zeichnet sich durch ein typisches Motiv von 5 Tryptophanresten aus, welche die Bindung an sogenannte „IFN-stimulated response elements“ (ISRE) vermitteln<sup>88</sup>. Die C-terminale IRF-assoziierte Domäne 1 (IAD1) zeichnet sich durch starke Konservierung aus und gewährleistet eine Heterodimerisierung von IRF4 mit anderen IRF-Familienmitgliedern. Eine

Repressionsdomäne (gelbe Struktur in Abb.1) hat eine autoinhibitorische Funktion und bewirkt, dass IRF4 alleine nur schwach an die DNA binden kann<sup>89</sup>.

Aufgrund seiner Eigenschaft mit dem Transkriptionsfaktor PU.1 zu interagieren, ist IRF4 auch unter dem Namen PU.1-Interaktionspartner (Pip) bekannt. Weiter wurde der Transkriptionsfaktor als „Interferon Konsensussequenz-Bindeprotein für aktivierte T-Zellen“ (ICSAT) und Lymphozytenspezifisches IRF (LSIRF) benannt<sup>90,91</sup>.

IRF4 wird auch als multiples Myelom-Onkogen 1 (MUM1) bezeichnet. Dies ist darauf zurückzuführen, dass sich durch chromosomale Aberationen, wie Translokationsprozesse und einer daraus resultierenden IRF4-Überexpression, human multiple Myelome (Plasmozytome) entwickeln können<sup>92</sup>. IRF4 spielt auch für die allgemeine Entwicklung von B- und T-Zellen eine bedeutende Rolle. Entsprechend zeigen IRF4-defiziente Tiere einen reduzierten Immunglobulinlevel im Serum und die T-Lymphozyten zeigen in Bezug auf Zytotoxizität eine Funktionseinschränkung<sup>93</sup>. Der Transkriptionsfaktor wirkt in B-Zellen bei Differenzierung zu Plasmazellen mit<sup>94</sup>. Weiter weisen IRF4-defiziente B-Zellen einen gestörten Immunglobulin-Klassenwechsel auf. Entsprechend spielt IRF4 eine maßgebliche Rolle bei Rekombinationsprozessen, die den Klassenwechsel steuern<sup>94</sup>. In T-Zellen wird der Transkriptionsfaktor spezifisch nach einer Stimulation über den T-Zellrezeptor (TCR) induziert<sup>95</sup>. *In vitro*-Studien zeigen weiter, dass IRF4 schließlich auch für die T-Zellproliferation und die T-Zelldifferenzierung von Bedeutung ist<sup>93</sup>. Eine IRF4-Defizienz äußert sich auch in einer fehlenden zytotoxischen T-Zellantwort. Entsprechend kommt es zu Beeinträchtigungen im Rahmen von Infektionen mit dem „Lymphocytären Choriomeningitis Virus“ (LCMV), bei der Tumorabwehr, sowie bei „Transplantat-gegen-Wirt-Reaktionen“ (GVHD = „Graft-versus-host disease“)<sup>93</sup>. Auch der Einfluss von IRF4 auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen ist beschrieben. Hier wirkt eine IRF4-Defizienz verstärkend auf die Apoptosesensitivität der T-Zellen<sup>96</sup>. IRF4 ist ein unerlässlicher Transkriptionsfaktor für die Ausdifferenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in verschiedene T-Helferzellsubpopulationen. So übt IRF4 Einfluss auf die Differenzierung der Th<sub>17</sub>-Zellen<sup>30</sup>. *In vivo* wird diese Beobachtung dadurch gestützt, dass eine IRF4-Defizienz in einem Modell zur TNBS-induzierten Kolitis mit einer reduzierten IL-17A-Produktion einhergeht<sup>97</sup>. Während die Th<sub>1</sub>-Differenzierung durch die IRF-Transkriptionsfaktoren IRF1 und IRF2 induziert wird<sup>98-101</sup>, wird die Th<sub>2</sub>-Differenzierung und -Zytokinexpression wiederum durch IRF4, reguliert<sup>102,103</sup>. So bindet der Transkriptionsfaktor IRF4 in Th<sub>2</sub>-

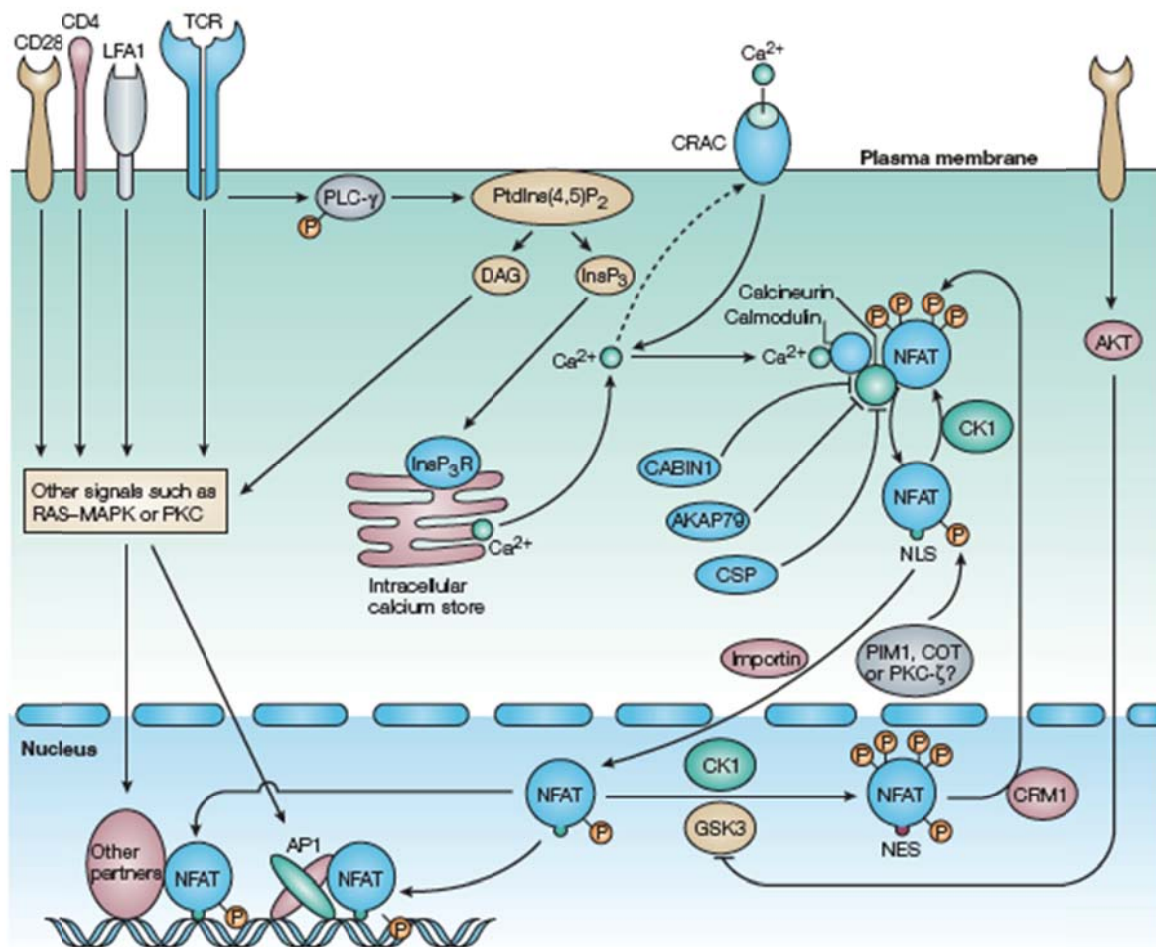
Zellen sowohl den *Il4*, als auch den *Il10* Promotor<sup>104</sup>. Eine retrovirale Transduktion von IRF4 in Th<sub>2</sub>-Zellen ruft dementsprechend eine verstärkte IL-4- und IL-10-Expression hervor, während weitere Th<sub>2</sub>-Zytokine wie IL-5 und IL-13 unverändert bleiben. Im Hinblick auf die IL-9-Expression in Th<sub>2</sub>-Zellen konnte in diesem Zusammenhang eine Hemmung durch die retrovirale IRF4-Transduktion hervorgerufen werden, so dass IRF4 nicht als transkriptioneller Aktivator für die IL-9-Produktion in Th<sub>2</sub>-Zellen angesehen werden kann<sup>104</sup>. Im Gegensatz dazu konnte in Th<sub>9</sub>-Zellen gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor hier an den *Il9* Promotor bindet und ihn *in trans* aktiviert<sup>45</sup>. *In vivo* wird diese Beobachtung dadurch untermauert, dass IRF4-defiziente Tiere im Asthmodell nicht in der Lage sind, eine Eosinophilie auszubilden und entsprechend vor einer Inflammation geschützt sind<sup>45</sup>. Auch human konnte im Hinblick auf die allergische Rhinitis gezeigt werden, dass IRF4 einen entscheidenden Einfluss auf die Ausprägung von Allergien ausübt. So ist eine gesteigerte IRF4-Expression in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei entsprechenden Patienten zu beobachten<sup>105</sup>.

## **1.8 Der Transkriptionsfaktor Nuclear factor of activated T cells c2; cytoplasmic, calcineurin-dependent 2 (NFATc2)**

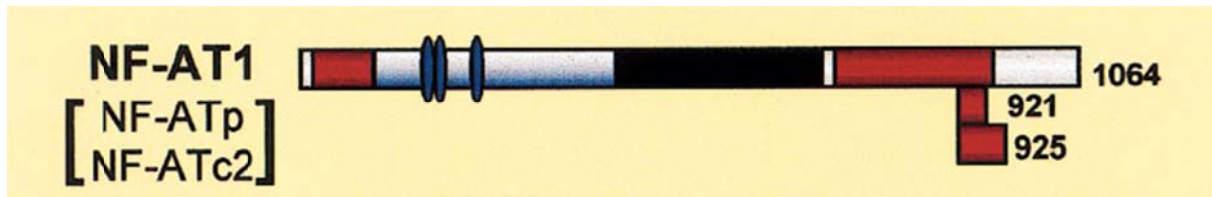
NFAT-Proteine sind Transkriptionsfaktoren, welche eine wichtige Rolle bei der Zelldifferenzierung spielen und Prozesse des Zellzyklus und der Apoptose regulieren können<sup>106</sup>. Die Familie der NFAT-Proteine besteht aus insgesamt fünf Mitgliedern (NFATc1, NFATc2, NFATc3, NFATc4 und NFAT5). Die Proteine NFATc1-NFATc3 werden in Zellen des Immunsystems, wie Mastzellen und T-Zellen exprimiert<sup>107</sup>. Zusammen mit NFATc3 ist der Faktor NFATc4 im perivaskulären Gewebe exprimiert und wirkt regulierend bei der Angiogenese<sup>108</sup>. NFAT5 ist ein osmosensitiver Transkriptionsfaktor und spielt in der Niere eine wichtige Rolle. Er wirkt hier regulatorisch in Bezug auf hypo- und hypertonen Stress<sup>109</sup>. NFAT5 weist als einziges Familienmitglied keine Calcineurinbindedomäne auf<sup>109</sup>. NFATc1-NFATc4 können jedoch entsprechend durch einen Calcium-Influx aktiviert werden. Dies spielt im Rahmen der T-Helferzellaktivierung eine entscheidende Rolle<sup>110</sup>.

Nach Aktivierung über den TCR, kommt es zur Aktivierung der Phospholipase C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ), welche im aktivierten Zustand wiederum Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (InsP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG)

hydrolysieren kann (siehe Abb.2). Durch Bindung von  $\text{InsP}_3$  an seinen Rezeptor am endoplasmatischen Retikulum, kommt es zur intrazellulären Calciumfreisetzung. Ein Anstieg des intrazellulären Calciumlevels führt wiederum zur Öffnung von Calciumkanälen in der zellulären Plasmamembran, wodurch extrazelluläres Calcium einströmen kann. In den Zellen dient Calmodulin als Trägermolekül für dieses Calcium. Eine solche Bindung führt weiter zur Aktivierung der Proteinphosphatase Calcineurin. Calcineurin führt zur Dephosphorylierung von NFAT-Proteinen, wodurch schließlich der Translokationsprozess von NFAT-Faktoren aus dem Zytoplasma in den Zellkern reguliert wird. Erst jetzt können NFAT-Faktoren mit weiteren transkriptionellen Aktivatoren interagieren und die Genaktivierung an einem entsprechenden Promotor in Gang setzen<sup>110</sup> (siehe Abb.2). Diese Translokationsprozesse werden durch Cyclosporin A und FK506 unterbunden<sup>111,112</sup>.



**Abb.2: Regulation der NFAT-Aktivierung** (Quelle: Macian, Nature Reviews Immunology 2005).



**Abb.3: Struktur des Transkriptionsfaktors NFATc2** (Quelle: Serfling, Biochimica et Biophysica Acta 2000). Schwarz: DNA-Bindedomäne; rot: Transaktivierungsdomänen; blau/grau: regulatorische Domäne mit serinreichen Motiven.

NFAT-Transkriptionsfaktoren weisen eine starke Konservierung in Bezug auf die DNA-Bindedomäne (Abb.3 schwarzer Balken) auf. Hier besteht eine Verwandtschaft zur Familie der REL-Transkriptionsfaktoren, weswegen diese Domäne den Namen „Rel-similarity domain“ (RSD) erhalten hat<sup>106</sup>. Weiter sind C- und N-terminale Transaktivierungsdomäne (TAD-A, TAD-B) zu finden ( Abb.3 rote Balken)<sup>113</sup>. Die regulatorische Domäne weist serinreiche Motive auf (SRR) und liegt zwischen N-terminaler Transaktivierungsdomäne und der RSD. Hier sind Phosphorylierungs- und Bindestellen für die Phosphatase Calcineurin lokalisiert<sup>106</sup>.

NFAT-Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Differenzierung und Zytokinproduktion von T-Helferzellsubpopulationen. So wurde NFAT ursprünglich als Aktivator für den humanen *IL2* Promotor beschrieben und ist so auch Angriffspunkt im Rahmen von immunsuppressiven Therapien, um hier einer unerwünschten T-Zellaktivierung entgegen zu wirken<sup>114–116</sup>. NFAT-Faktoren können die Genregulation entweder über einen direkten Einfluss auf die Chromatinstruktur (Remodelling) beeinflussen, oder die Transkription selbst initiieren<sup>110</sup>.

Der Transkriptionsfaktor NFATc2 (NFAT1) ist auch unter dem Namen NFATp bekannt<sup>110</sup>. Es existieren 3 verschiedene Isoformen dieses Transkriptionsfaktors<sup>113</sup>. Eine Defizienz des NFATc2-Proteins zeichnet sich im Immunsystem phänotypisch durch eine ausgeprägte Splenomegalie (Vergrößerung der Milz), Thymusinvolution und eine gesteigerte Anzahl peripherer Lymphozyten aus<sup>110,113,117</sup>. Weiter neigen NFATc2-defiziente Tiere zu verstärkter Ausprägung von allergischen Entzündungen, welche mit einer Akkumulation von Eosinophilen und gesteigertem IgE-Level im Serum der Tiere einhergeht<sup>118</sup>. In Mastzellen ist die Anwesenheit von NFATc2 unerlässlich für eine effektive TNF $\alpha$ - und IL-13-Produktion<sup>119</sup>. Für die Entwicklung zur Th<sub>1</sub>-Subpopulation aus naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist bekannt, dass eine NFATc2-Defizienz im Rahmen eines IL-4-, GATA-3- und cMaf-unabhängigen Mechanismus zu einer stark eingeschränkten IFN- $\gamma$ -Expression führt<sup>120</sup>. In Th<sub>2</sub>-Zellen steuert

NFATc2 zusammen mit dem Protein IRF4 die Produktion von IL-4 und IL-10<sup>121,122</sup>. Auch für die selektive IL-21-Expression in Th<sub>2</sub>-Zellen konnte die Bedeutung des Transkriptionsfaktors durch den Nachweis einer direkten Bindung an den *IL21* Promotor untermauert werden<sup>123</sup>.

## **1.9 Ziel der Arbeit**

Ziel dieser Doktorarbeit war es, die transkriptionelle Kontrolle der *IL9* Genexpression in Th<sub>9</sub>-Zellen mit Fokus auf den Transkriptionsfaktor NFATc2 zu analysieren und die (patho-)physiologische Wirkung von Th<sub>9</sub>-generiertem IL-9 in zwei *in vivo* Mausmodellen (Asthma, Tumor) unter Verwendung von NFATc2-defizienten Tieren aufzuklären.





## 2 Material und Methoden

### 2.1 Plastikwaren

Alle Plastikwaren wurden steril bezogen.

### 2.2 Tiere

Für die *in vitro* und *in vivo* Experimente wurden Mäuse des Wildtyp-Stammes C57BL/6 (BL6) und der Knockout-Stamm NFATc2-Glm verwendet. Bei Letzteren wurde das Exon, welches für die 47 Aminosäuren umfassende Rel-Domäne kodiert durch eine Neomycin-Resistenz-Kassette ersetzt<sup>124</sup>. Des Weiteren wurden IRF4-*knockout* Mäuse<sup>93</sup>, und dazugehörige BL6-Geschwistertiere verwendet. Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Experimente zwischen 4 und 16 Wochen alt und wurden zuvor unter spezifiziert pathogenfreien Bedingungen (SPF) und künstlichem Tag-Nacht-Zyklus gehalten.

### 2.3 Zelllinien

#### **B16F10 luc**

Für die *in vivo*-Experimente (Melanom-Experimente) wurde eine B16F10-Zelllinie verwendet<sup>125</sup>. Die B16F10 luc-Zellen eignen sich dazu, nach intraperitonealer Injektion von Luziferin, die Tumorzellen schon sehr früh zu detektieren. Dieser Mechanismus fand in dieser Arbeit allerdings keine Anwendung. Die Melanomzellen werden in Testmedium 5% FCS in einer 6 Well Platte kultiviert. Um die adhärenenten Zellen im Rahmen der Zellkultur zu verdünnen, werden die Zellen für 20 min auf Eis inkubiert um diese von der Platte zu lösen. Vor der subkutanen Applikation wurden die Zellen trypsinisiert um sie von der Zellkulturplatte zu lösen. Hierzu wurde zunächst der Zellkulturüberstand entfernt. Schließlich wurden die Zellen mit 1,5 ml Trypsin-EDTA 0,25% von der Platte gelöst. Nach 2-minütiger Inkubation wurde die Reaktion mit Testmedium 5% FCS (Zellkulturüberstand der Zelllinie) abgestoppt. Vor der Verwendung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und schließlich auf die gewünschte Zellzahl eingestellt.

## 2.4 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma (Steinheim, Deutschland) in p.a. („pro analysis“) Qualität bezogen.

Bezugsliste: Chemikalien

Chemikalie	Quelle
2-Propanol p.a.	Roth
ABTS	Sigma
BrefeldinA	eBioscience
Chloroform	Roth
Ethanol 99% p.a.	Roth
Formaldehyd 37% p.a.	Roth
Glycin 99% p.a.	Roth
Glykogen	Sigma
Hemacolor® Färbekit	Merck
Hepes	BioWest (Nuaille, Frankreich)
Imject® Alum	Thermo Scientific
Ionomycin	Sigma
Isofluran	Abbott
Ketamin	Ratiopharm
KHCO <sub>3</sub> (Kalium-Hydrogen-Carbonat)	Roth
Mitomycin C	Sigma
Monensin	eBioscience
NaCl (Natriumchlorid)	Roth
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (di- Natriumhydrogenphosphat)	Roth
NaN <sub>3</sub> (Natriumacid)	Roth
Narkoren	Merial
NH <sub>4</sub> Cl (Ammoniumchlorid)	Roth
Ovalbumin (Albumin, Chicken Egg) Grade V	Sigma
PMA	Sigma
Rompun	Bayer

Tris	Roth
TritonX	Roth
Trypsin-EDTA	Gibco (Life Technologies)
Tween 20	Roth
Zitronensäure	Roth

## 2.5 Kulturmedien und Puffer

Die Kulturmedien wurden als Pulver von der Firma PAN Biotech bezogen. Nach dem Ansetzen wurden alle Medien sterilfiltriert (0,2 µM) und anschließend bei 4°C aufbewahrt.

Bezugsliste: Medien und Zusätze

Medium/ Zusatz	Quelle
β-Mercaptoethanol	Sigma
BSA	Roth
Has	CSL Behring
EDTA	Roth
FCS	Vitromex
L-Glutamin	Roth
Natrium-Pyruvat	Serva
Penicillin/Streptomycin	Serva

**EDTA** („disodium ethylenediamine tetracetic acid“) wurde als 0,5 M Stammlösung angesetzt. Der pH wurde mit 10 M NaOH auf pH 8 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung autoklaviert.

### Fötales Kälberserum (FCS)

Das verwendete FCS wurde zur Inaktivierung der Komplementkomponenten 45 Minuten bei 56°C im Wasserbad erhitzt und anschließend in 100 ml Aliquoten bei 4°C aufbewahrt. Vor der Verwendung wurde das FCS 25 Minuten bei 600 x g abzentrifugiert. Nur die Überstände wurden verwendet.

### **Gey's Lysepuffer**

Zum Lysieren von Erythrozyten durch einen osmotischen Schock wurde eine 0,83%ige Ammoniumchlorid-Lösung folgender Zusammensetzung eingesetzt, welche auf 37°C vorgewärmt wird:

in VE-Wasser

8,29 g/l	NH <sub>4</sub> Cl
1 g/l	KHCO <sub>3</sub>
0,037 g/l	EDTA

pH: 7,4

### **GM- Puffer** (Großer MACS- Puffer)

in PBS

0,5%	BSA
5 mM	EDTA
0,1%	NaN <sub>3</sub>

### **MEM (Minimal Essential Medium)**

MEM Trockenpulver

1%	Penicillin/Streptomycin
50 µM	β-Mercaptoethanol
2%	FCS

### **Natrium-Pyruvatlösung**

0,1 M in VE-Wasser

sterilfiltriert (0,2 µM)

### **PBS ("Phosphate Buffered Saline")**

in VE- Wasser

1,4 M NaCl	(81,8 g/l)
0,1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	(15,6 g/l)

pH 7,2

**Rinderserumalbumin (BSA)**

Es wurde ein 10%ige Lösung in PBS angesetzt. Diese wurde sterilfiltriert (0,2 µM) und bei 4°C aufbewahrt.

**Testmedium (TM5, T-Zell-Medium)**

Iscove's Medium

1%	Penicillin/Streptomycin
50 µM	β-Mercaptoethanol
1%	Natrium-Pyruvat,
1%	L-Glutamin
5%	FCS

**TE-Puffer**

10 mM	Tris
1 mM	EDTA (pH: 8)

in H<sub>2</sub>O  
autoklaviert

**Th<sub>9</sub>-Differenzierungsmedium**

300 U/ml IL-4  
5 µg/ml anti-IL-6 (D6906B4.M)  
5 µg/ml anti-IFN-γ (XMG1.2)  
4 ng/ml pTGF-β  
In Testmedium

**2.6 Zytokine**

Die aufgeführten Zytokine wurden als Standards in den Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) und als Zusätze zu den Stimulationsansätzen naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen, sowie für deren Differenzierung eingesetzt. Die Zytokine wurden, wenn nicht anders angegeben, im eigenen Labor hergestellt und affin aufgereinigt.

### **Murin rekombinantes Interleukin 4 (mr-IL-4)**

mr-IL-4 wurde aus den Überständen von mit IL-4 cDNA transfizierten Myelomzellen X63Ag8-653 aufgereinigt. Das rekombinante IL-4 wurde *via* Affinitätschromatografie aufgereinigt.

### **Porcine Transforming Growth Factor Beta 1 (pTGF- $\beta$ 1)**

TGF- $\beta$  wurde von der Firma R&D Systems (Minneapolis, USA) bezogen und in 4mM HCl mit 0,1% BSA rekonstituiert.

### **Proleukin**

Rekombinantes, humanes IL-2 (Proleukin), wurde von der Firma Novartis Pharma GmbH (Nürnberg) bezogen.

## **2.7 Lösungen und Reagenzien**

### **Physiologische Trypanblaulösung**

Der Vitalfarbstoff Trypanblau kann in tote Zellen eindringen und lässt diese im Lichtmikroskop blau erscheinen, während vitale Zellen durch ihn nicht angefärbt werden können. Trypanblau wurde zur Bestimmung der Lebendzellzahl in Zellsuspensionen eingesetzt. Zur Herstellung wurden folgende Lösungen A und B im Verhältnis 1:5 gemischt:

Lösung A: 0,2% Trypanblau (Fa. Sigma) in VE-Wasser, sterilfiltriert (0,2  $\mu$ M)

Lösung B: 4,25% NaCl

### **2.7.1 Reagenzien für die Anreinigung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen ex vivo**

**2-Propanol 99,8% p.a.**

### **GM-Puffer**

siehe Medien und Puffer

**MEM + 2% FCS**

siehe Medien und Puffer

**PBS + 0,5% BSA**

PBS siehe Medien und Puffer

**MicroBeads**

Es wurden Streptavidin- (SA-) MicroBeads der Firma Milteny, Bergisch Gladbach verwendet.

**Testmedium**

siehe Medien und Puffer

**2.7.2 ELISA- Reagenzien**

**ABTS**

**Blockpuffer**

PBS

1% BSA

0,2% Tween 20

**Kopplungspuffer**

0,1M  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$

pH 9,2

**Substratpuffer**

40mM Zitronensäure

**Waschpuffer**

PBS

0,1% Tween 20

### **2.7.3 Reagenzien für die Isolierung der Gesamt-RNA aus T-Zellen**

#### **TRI-Reagent**

TRI-Reagent (Total RNA Isolating Reagent) wurde von der Firma ABgene bezogen.

#### **Chloroform**

Roti<sup>®</sup>- Chloroform/Isoamylalkohol

#### **Glykogen**

Für die RNA-Präparation wurde eine Glykogenlösung (20 µg/µl) in 1%igem DEPC-Wasser angesetzt und 3 Tage bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Glykogen aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

#### **2-Propanol p.a.**

#### **75% Ethanol in DEPC-H<sub>2</sub>O**

Aus 99%igem Ethanol in p.a. Qualität wurde mit DEPC-H<sub>2</sub>O eine 75% Lösung hergestellt und bei -20°C aufbewahrt und so gekühlt eingesetzt.

### **2.7.4 Reagenzien für die reverse Transkription (RT)**

#### **5x Puffer**

Fa. Fermentas

#### **DEPC-Wasser**

Deionisiertes Wasser wurde über Nacht mit 0,1% (v/v) DEPC gerührt und anschließend autoklaviert.

#### **dNTPs (2'-Desoxynucleosid-5'-Triphosphate)**

Es wurde eine 10 mM Stocklösung in H<sub>2</sub>O angesetzt und bei -20°C aufbewahrt.

#### **Hexanukleotide (N<sub>6</sub>)**

Ausgehend von einer Stammlösung einer Konzentration von 2 µg/µl wurde eine Arbeitslösung einer Konzentration von 2 ng/µl angesetzt, die bei -20°C aufbewahrt wurde.



### **Oligo(dT)<sub>18</sub>**

Die Oligo(dT)<sub>18</sub> wurden von MBI Fermentas bezogen und bei -20°C aufbewahrt. Eingesetzt wurde eine Lösung der Konzentration von 100 ng/ml.

### **Reverse Transkriptase**

Revert Aid™ M-MuLV Reverse Transkriptase 200 U/μl (Fa. Fermentas) wurde bei -20°C aufbewahrt.

## **2.7.5 Reagenzien für die Durchführung der quantitativen realtime-PCR (qRT-PCR)**

### **H<sub>2</sub>O**

Für die qRT-PCR wurde autoklaviertes Wasser verwendet.

### **spezielle Oligonukleotide („Primer“)**

(siehe „verwendete Oligonukleotide“)

Die Oligonukleotide wurden bei -20°C aufbewahrt.

### **SYBR Green**

Es wurde der SYBR® Green ER™ qPCR SuperMix der Firma Invitrogen verwendet.

## **2.7.6 Reagenzien für die Reporteranalyse**

Zur Reporteranalyse wurde das Dual\_Luciferase® Reporter Assay System der Firma Promega verwendet.

## **2.8 Antikörper und Beads**

### **2.8.1 Antikörper und Beads zur Anreinigung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen *ex vivo* mittels MACS**

#### **H129.19-bio**

Ratte-anti-Maus CD4 biotinyliert, 200 μg/ml in GM-Puffer.

Der Antikörper wurde aus Kulturüberständen des Klon H129.19<sup>88</sup> gewonnen und biotinyliert.

### Streptavidin MicroBeads (SA-MicroBeads)

Die MicroBeads wurden von der Firma Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach) bezogen.

### 2.8.2 Antikörper zur Zellsortierung von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Antikörper	Fluorofor	Quelle
anti-CD44 (IM7)	APC	eBioscience
anti-CD62L (MEL-14)	PE	BioLegend
Anti-CD25 (3C7)	Alexa Flour® 488	eBioscience

### 2.8.3 Antikörper zur Bestimmung von Zytokinkonzentrationen (ELISA)

#### IL-9-ELISA

1° Antikörper: 229.4 (Ratte-anti-Maus IL-9)

Stammlösung: 3 mg/ml

Der Klon 229.4 wurde von Dr. E. Schmitt generiert<sup>39</sup>.

2° Antikörper: C12 (Hamster-anti-Maus IL-9)

biotinyliert

Stammlösung: 1 mg/ml

Der Klon C12 und murin rekombinanes IL-9 (mr-IL-9) wurden von Dr. J. van Snick (Ludwig Institute for Cancer, Brüssel) zur Verfügung gestellt.

#### IL-5-ELISA

Zur Bestimmung der IL-5-Konzentration wurde das "Mouse IL-5 ELISA Set" (BD OptEIA™) verwendet.

#### IL-13-ELISA

Sowohl der Primärantikörper, als auch der biotinylierte Sekundärantikörper sowie rmlL-13 für die Positivkontrolle wurden von der Firma R&D Systems bezogen.

### 2.8.4 Antikörper für die FACS-Analyse

Antikörper	Fluorofor	Quelle
anti-Maus IL-9	APC	Biolegend
Ratte IgG1, κ Isotyp Kontrolle	APC	Biolegend

Zur Kompensation wurden Kompensationsbeads (BD CompBeads) anti-Ratte / anti-Hamster Ig, κ verwendet.

### 2.8.5 Antikörper zur Stimulation von T-Zellen *ex vivo*

#### 37.51 (Hamster-anti-Maus CD28)

Der Klon 37.51 wurde von Dr. J.P. Allison durch Dr. G. Leclercq (Universität Gent, Belgien) zur Verfügung gestellt. Die Kulturüberstände wurden mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  gefällt. Dann wurde der Antikörper Protein G gereinigt.

#### 145-2C11 (Ratte-anti-Maus CD3ε)

Der Klon 145-2C11 wurde von Dr. J. A. Bluestone (Ben May Institute, Department of Pathology, Chicago, IL, USA) zur Verfügung gestellt.

#### XMG1.2 (Ratte-anti-Maus IFN-γ)

Der Klon XMG1.2 wurde von Dr. A. O'Garra (DNAX Research Institute, Palo Alto, CA, USA) zur Verfügung gestellt und zur Neutralisierung von endogen gebildetem IFN-γ zur Zellkultur gegeben. Der Antikörper wurde zur Differenzierung von Th<sub>9</sub>-Zellen eingesetzt.

#### D6906B4.M (Ratte-anti-Maus IL-6)

Der Klon D6906B4.M wurde von Dr. J. van Snick (Ludwig Institute for Cancer, Brüssel) zur Verfügung gestellt.

### 2.8.6 Antikörper für *in vivo* Experiment

Für die intranasale Applikation im Rahmen der Asthma-Experimente und für die intraperitoneale Applikation im Rahmen der Melanom-Experimente, wurde ein Ratte-anti-Maus IL-9-Antikörper (MM9C1) oder als Isotypkontrolle Immunglobulin aus der

Ratte verwendet.

Das Hybridom wurde von Dr. J. van Snick (Ludwig Institute for Cancer, Brüssel) zur Verfügung gestellt.

## 2.9 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
15 ml Röhrchen	Greiner
50 ml Röhrchen	Greiner
6 Well Platten	Greiner
24 Well Platten	Greiner
48 Well Platten	Greiner
96 Well Rundboden-Platten	Greiner
96 Well Spitzboden-Platten	Greiner
96 Well Platten Deckel	Greiner
96 Well Platten (Maxisorb, für ELISA)	Nunc
Abdeckplatten (steril)	Greiner
Cell Strainer (Zellsiebe) 40 µm	BD
Disposable Cuvettes	Promega
FACS-Röhrchen	Greiner
Macs Separation Columns	Miltenyi Biotec
Petrischale (Größe 94/16)	Greiner
Pasteurpipetten	VWR International
Präparierbesteck Schere, Pinzetten etc.	Hammacher, Solingen
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
RNAse-freie Pipettenspitzen (0,1-10 µl, 10-200 µl, 10-1000 µl)	Roth
Spritzen (1ml, 2 ml, 5 ml)	Omnifix
Kanülen (0,4 x 12 mm)	Braun
Sterilfilter (2 µm)	Roth

## 2.10 Laborgeräte

Gerät	Quelle
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Heraeus
Zellsortierer ARIA II	Becton Cickinson (BD)
Durchflusszytometer FACS LSR	Becton Dickinson (BD)
ICycler	Biorad
Luminometer	Turner-Designs
Nucleofector	AMAXA
Photometer Spectra Fluor Plus	Tecan
Pipetboy comfort	Integra Biosciences GmbH
Sterilbank Hera safe	Heraeus
Zentrifugen:	
Tischzentrifuge, Biofuge pico	Heraeus
Megafuge 1.0R	Heraeus

## 2.11 Methoden der Zellkultur

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden an einer sterilen Werkbank und mit sterilen Glas- bzw. Plastikmaterialien und Geräten durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt.

### 2.11.1 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit physiologischer Trypanblau-Lösung verdünnt. Dabei färben sich die toten Zellen blau. Lebende Zellen können den Farbstoff aufgrund ihrer intakten Membran nicht aufnehmen und erscheinen im Lichtmikroskop ungefärbt. Mittels einer Neubauer-Zählkammer (Kammertiefe 0,1 mm) wurde die Zahl der vitalen (=ungefärbten) Zellen bestimmt. Nach Auszählen von 16 Einzelquadraten ergibt die ermittelte Zahl (N) durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor (V) und dem Kammerfaktor ( $10^4$ ) die Anzahl der lebenden Zellen pro Milliliter ( $N \times V \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$ ).

### 2.11.2 Kultur von B16F10 luc-Melanomzellen

Siehe 2.3 Zelllinien

## 2.12 Anreinigung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen *ex vivo*

### 2.12.1 Anreinigung muriner CD4<sup>+</sup> T-Zellen

#### Vorbereiten der Separationssäulen

Die Separationssäulen wurden gründlich mit 2-Propanol gespült und anschließend einmal mit PBS + 0,5% BSA gespült.

#### Milz-Präparation und Herstellung einer Zellsuspension

- Maus/Mäuse mittels CO<sub>2</sub>-Begasung abtöten
- abgetötete Maus/Mäuse mit Isopropanol sterilisieren
- 8 ml MEM+2% FCS in eine Petrischale vorlegen
- Milzen entnehmen und in ein Milzsieb in einer Petrischale geben
- Milz mittels einer 1 ml Spitze zerreiben
- Milzsieb mit gestopfter Pasteurpipette spülen
- Milzsuspension gründlich mit einer Pasteurpipette resuspendieren
- in 14 ml Röhrchen überführen und die Petrischale mit MEM + 2% FCS spülen und ebenfalls in das Röhrchen überführen
- 10 Minuten die Bindegewebsstückchen absetzen lassen
- Überstand mittels gestopfter Pasteurpipette in ein neues Falcon überführen
- bei 600 x g und 4°C für 10 Minuten zentrifugieren
- den Überstand absaugen und verwerfen
- Lyse der Erythrozyten:
  - 1 ml/Milz im 37°C Wasserbad vorgewärmten Gey's Lysepuffer zu dem Zellpellet geben
  - 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- Stoppen der Reaktion durch die Zugabe der zweifache Menge an MEM + 2% FCS
- durch ein Zellsieb in ein 50 ml Röhrchen überführen
- spülen des Röhrchens mit 2 ml MEM + 2% FCS
- Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer zählen
- 10 Minuten bei 600 x g und 4°C zentrifugieren
- auf 1 x 10<sup>8</sup> Zellen/ml in GM einstellen

### Anreinigung der murinen CD4<sup>+</sup> T-Zellen

- 0,5 µg/ml des Antikörper H129.19 bio zugeben
- 20 Minuten bei 4°C inkubieren
- Zweimal mit 10 ml kaltem GM-Puffer waschen
- Zellen auf 1 x 10<sup>8</sup> Zellen/ml in GM einstellen
- SA-Beads (1:20) zugeben
- 20 Minuten bei 4°C inkubieren
- Zellen in GM-Puffer auf maximal 5 x 10<sup>8</sup> Zellen in 5 ml einstellen
- Zellsuspension milliliterweise über die sich im Magnetfeld befindliche Säule geben (max. 5 x 10<sup>8</sup> Zellen pro Säule)
- Röhrchen mit 2 ml GM-Puffer spülen und komplett auf die Säule geben
- Säule mit 2 x 3 ml GM-Puffer spülen
- Säule aus dem Magnetfeld nehmen und mit 5 ml GM-Puffer mit Stempel eluieren
- den Vorgang mit dem Eluat über eine 2. Säule wiederholen
- Zellen mittels einer Neubauer-Kammer zählen

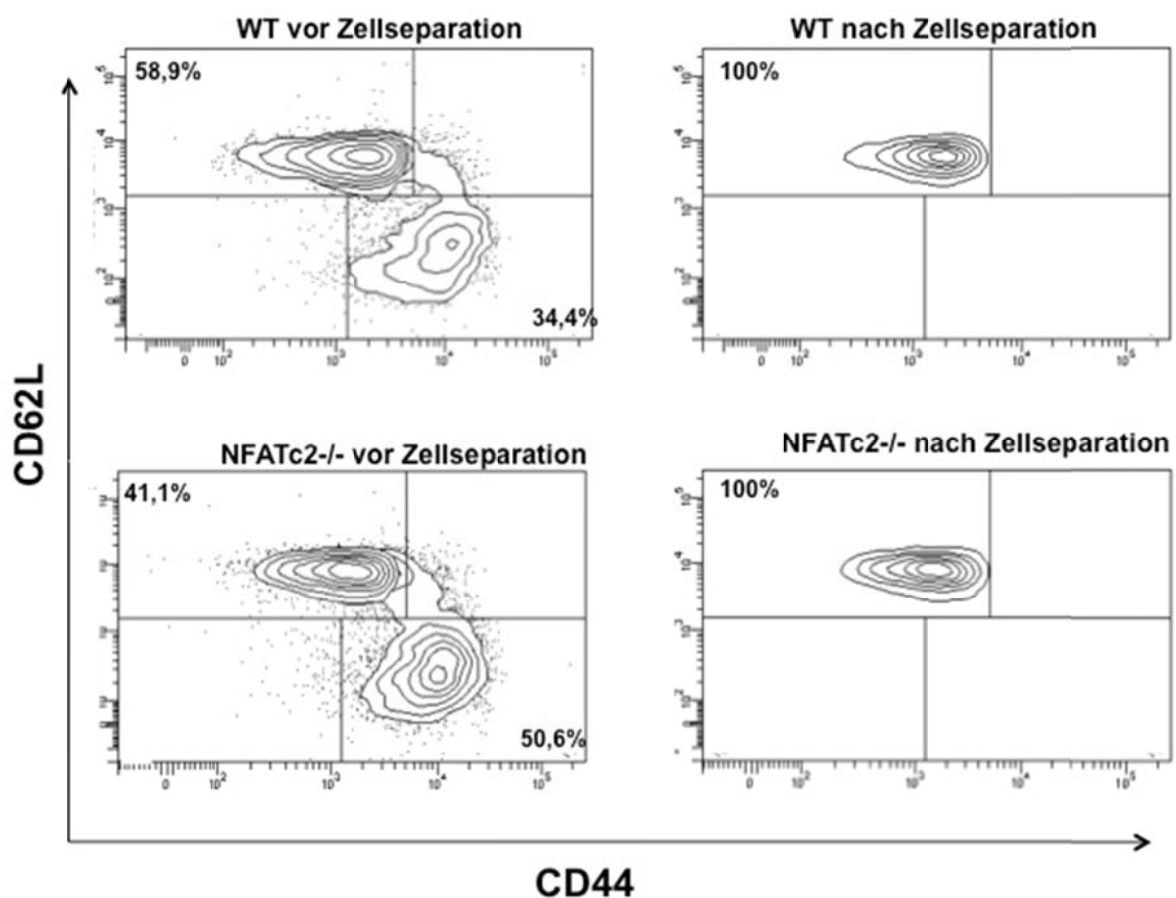
### Durchflusszytometrische Zellseparation von CD4<sup>+</sup> CD44<sup>low</sup>CD62L<sup>high</sup> T-Zellen mittels FACS

Die Methode der Durchflusszytometrie dient nicht nur der Identifizierung und Charakterisierung von Zellpopulationen anhand spezifischer Eigenschaften. Es ist auch möglich Zellen anhand von Fluoreszenzmarkierung aufzutrennen. Zu dieser Zellseparation wurde der BD FACS Aria™ II verwendet und die Messdaten wurden mittels BD FACS Diva™ Software (BD Bioscience) erfasst.

Der Mechanismus beruht darauf, dass der Zellflüssigkeitsstrahl einen Laserstrahl passiert. Die Kanüle durch welche die Zellflüssigkeit gezogen wird, wird zur Vibration gebracht. Dadurch wird der kontinuierliche Zellflüssigkeitsstrom unterbrochen und in einzelne Tropfen, welche jeweils eine einzelne Zelle enthalten, aufgeteilt. Die Einzeltropfen mit entsprechender Streuung und Fluoreszenzmarkierung erhalten je nach Eigenschaft eine positive oder negative Ladung und können schließlich mit Hilfe eines elektrischen Felds entsprechend aufgetrennt werden.

Um aus den CD4<sup>+</sup> T-Zellen die naiven Zellen zu separieren und CD25<sup>+</sup> T-Zellen zu eliminieren wurde die oben genannte Methode angewandt. Hierzu wurden die zuvor angereinigten CD4<sup>+</sup> T-Zellen fluoreszenzmarkiert. Um die aktivierten T-Zellen zu

identifizieren wurden die Zellen mittels eines anti-CD44 Antikörper (eBioscience) gefärbt. Um die CD25<sup>+</sup> T-Zellen aus dem Zellgemisch zu entfernen, wurden die Zellen mittels anti-CD25 Antikörper (eBioscience) gefärbt. Da nur naive T-Zellen zur T-Helferzellendifferenzierung verwendet werden sollten, wurden die zuvor aufgereinigten CD4<sup>+</sup> T-Zellen schließlich mittels anti-CD62L Antikörper (BioLegend) gefärbt. Die Färbung erfolgte für 15 min bei 4°C. Im Anschluss wurden die Zellen 2x gewaschen und zur Zellsortierung filtriert und schließlich auf 1 x 10<sup>7</sup> Zellen/ml in GM-Puffer eingestellt.



**Abb. 4: Durchflusszytometrische Zellseparation von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD44<sup>low</sup>CD62L<sup>high</sup> T-Zellen.** Die mittels MACS vorgereinigten CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus wildtypischen Mäusen und NFATc2<sup>-/-</sup> -Tieren enthalten unterschiedliche Mengen an voraktivierten T-Zellen. Daher wurden die T-Zellen mittels Zellseparation weiter gereinigt, um nur naive T-Zellen für die Zellkultur verwenden zu können. Unter den CD4<sup>+</sup> T-Zellen, welche aus NFATc2-defizienten Tieren isoliert wurden, sind 50% bereits voraktiviert und müssen für die Zelldifferenzierung aus dem Zellgemisch entfernt werden. Unter den wildtypischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen sind nur ca. 35% bereits voraktiviert und fast 60% der Zellen stellen naive T-Zellen dar.



## 2.12.2 Stimulation der naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen

### Antikörper-vermittelte Stimulation von murinen CD4<sup>+</sup>TZ

CD4<sup>+</sup>TZ können *in vitro* durch eine Antikörper-vermittelte (anti-CD3) Kreuzvernetzung der TCRs stimuliert werden. Um eine optimale Stimulation zu erreichen, benötigen T-Zellen ein zweites, kostimulatorisches Signal. Dieses wurde durch anti-CD28 Antikörper vermittelt. Für die Stimulation muriner CD4<sup>+</sup>TZ wurden Zellkulturplatten mit anti-CD3 (4 µg/ml) und anschließend mit anti-CD28 (4 µg/ml) beschichtet. Diese Methode kann sowohl zur Primärstimulation angewandt werden, als auch zu einer sekundären Stimulation (Restimulation) genutzt werden.

### 2.12.3 Beschichtung von Kulturplatten

- 500 µl / Well anti-CD3 in PBS (bei einer 24-Well Platte)
- 30 Minuten im Brutschrank inkubieren (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)
- mit ungestopfter Pasteurpipette absaugen
- 1 ml PBS/Well zugeben und absaugen
- 500 µl/Well anti-CD28 in PBS
- 30 Minuten im Brutschrank inkubieren
- absaugen und mit 1 ml PBS/Well waschen

### Restimulation von murinen CD4<sup>+</sup>TZ mittels Ionomycin und PMA

Vor allem um intrazellulär produzierte Zytokine, welche in nur geringen Mengen in der Zelle vorliegen zu detektieren, wurde eine Restimulation mit Phorbolmyristataacetat (PMA) und Ionomycin durchgeführt. Ionomycin sorgt für einen intrazellulären Anstieg des Calcium-Levels, während PMA die Proteinkinase C aktiviert. Diese antigenunspezifische Aktivierung erfolgte für 3-5h mit einer Endkonzentration von 1µM Ionomycin und 20ng/ml PMA.

## 2.13 Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie können Zellen anhand ihrer Größe und Granularität unterschieden werden. Weiter ist es möglich Zellen anhand spezifischer Oberflächenproteine zu unterscheiden. Die Analyse beruht auf der Emission von optischen Signalen durch Zellen nachdem sie einen Laserstrahl einzeln passieren.

Hierbei kommt es zur Lichtemission, woraus sich verschiedene Zelleigenschaften ableiten lassen. Zellgröße, Struktur der Zellmembran sowie intrazelluläre Bestandteile beeinflussen das Streulicht. Zwei Parameter spielen hierbei eine Rolle. Durch das Vorwärtsstreulicht FSC (Forward Scatter) wird die Beugung des Lichts hervorgerufen, was wiederum Aufschluss über die Zellgröße gibt. Durch das Seitwärtsstreulicht SSC (Side Scatter), wird eine Brechung des Lichts hervorgerufen. Hierdurch kann eine Aussage über die Granularität der Zellen getroffen werden. Die zu analysierenden Zellen können auch mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern, die gegen bestimmte Merkmale gerichtet sind (z.B. CD44), gefärbt werden und anhand dieser Merkmale schließlich sortiert werden. Es ist auch möglich intrazelluläre Proteine (z.B. IL-9) anzufärben und somit die Zytokinexpression direkt innerhalb der Zellen nachzuweisen.

### **Intrazellulärfärbung muriner T-Zellen**

Pro Färbung wurden mindestens  $5 \times 10^5$  Zellen eingesetzt. Um ein Sekretieren der intrazellulären Proteine zu verhindern, wurde in den letzten vier Stunden der Stimulation Brefeldin A oder Monensin ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) zu den Zellen gegeben. Hierdurch wurde ein Zerfall des Golgi-Apparates herbeigeführt und die sekretorischen Proteine wurden im Endoplasmatischen Retikulum angereichert<sup>126</sup>. Nach dieser Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$ , wurden die Zellen geerntet und einmal mit 2 ml 1xPBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Dies erfolgte durch Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  Fixierungs-/Permeabilisierungs-Arbeitslösung aus dem murinen FoxP3-Färbekit von eBiosciences. Die Fixierungs-/Permeabilisierungs-Arbeitslösung wurde dabei stets frisch und gemäß Herstellerangaben hergestellt. Fixierung und Permeabilisierung erfolgte für mindestens 30 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  im Kühlschrank. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit je 2 ml 1x Permeabilisierungspuffer gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte die Antikörperfärbung. Die Antikörper wurden wie folgt eingesetzt:

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>
anti-Maus IL-9 APC	1:100
Ratte IgG1, $\kappa$ Isotypkontrolle APC	1:100

Die Antikörperfärbung erfolgte für 30 Minuten in einem Volumen von 100 µl verdünnt in 1x Permeabilisierungspuffer bei 4°C im Kühlschrank. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 1x Permeabilisierungspuffer gewaschen. Es folgte jeweils ein Waschschrift mit GM-Puffer. Schließlich wurden die Zellen in 100 µl GM-Puffer für die Messung aufgenommen.

## **2.14 Interleukin-spezifische ELISA**

Der ELISA ist eine quantitative, analytische Methode um die Konzentration sezernierter Proteine (z.B. Zytokine oder Antikörper) im Zellkulturüberstand zu ermitteln. Die ELISA wurden nach der Sandwichmethode (indirekt) durchgeführt.

Zunächst erfolgte die Beschichtung der 96 Well Maxisorb Platten mittels Primärantikörper in einem Kopplungspuffer für mindestens 1h bei 37°C.

Nach dreimaligem Waschen mit ELISA-Waschpuffer wurden noch freie Bindungsstellen in den Platten durch Zugabe von Blockpuffer (100 µl/Well) für 30 Minuten bei 37°C abgesättigt. Dann wurden die zu analysierenden Proben in einer Verdünnungsreihe auf die ELISA-Platten aufgetragen (50 µl/Well). Zusätzlich wurde auf jeder Platte eine bekannte Standard-Konzentration als Referenz zum Erstellen einer Eichgerade, wie auch eine Negativkontrolle ohne Protein mitgeführt. Die Proben wurden für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach drei Waschschriften wurde der biotinylierte Sekundärantikörper (50 µl/Well) zugegeben und wiederum für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die überschüssigen Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen entfernt und das mit Peroxidase gekoppelte Streptavidin (Boehringer Mannheim) in einer Verdünnung von 1:10000 in Block-Puffer zugegeben (50 µl/Well). Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C und anschließendem dreimaligem Waschen wurden 50 µl/Well Substratlösung (ABTS = 2,2-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)) 1 mg/ml in Citratpuffer + 0,0075% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) zugegeben. Die photometrische Auswertung erfolgte nach ca. 20 Minuten bei 414 nm. Die Auswertung der photometrischen Messung erfolgte im Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Microsoft Corp., Redmont, WA, USA) mit Hilfe eines Makros, dass größtenteils von S.Jin (Institut für Immunologie, Universität-Mainz) entwickelt wurde.

ELISA	Konzentration der Primärantikörper	Konzentration der biotinylierten Sekundärantikörper
Interleukin 5	Nicht angegeben (IL-5 ELISA Set (BD))	Nicht angegeben (IL-5 ELISA Set (BD))
Interleukin 9	229.4 (1 µg/ml)	C12 bio (1 µg/ml)
Interleukin 13	Nicht angegeben (R&D Systems)	Nicht angegeben (R&D Systems)

## 2.15 Transfektion

Unter einer Transfektion versteht man das Einbringen von Fremd-DNA oder -RNA in eine Eukaryontenzelle. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Transfektion von Plasmid-DNA durch Elektroporation mit dem Nucleofector Device der Firma Amaxa. Die Plasmid-DNA musste vor der Transfektion mit der Nucleofector Solution auf die gewünschte Konzentration verdünnt werden (Einsatz von 2,5 µg Plasmid). Für einen nachfolgenden Dual-Luciferase Reporter Assay wurden die Zellen zusätzlich mit den Expressionsvektoren für die *Renilla*-Luciferase (300 ng) und die Firefly-Luciferase (IL-9-Promotor; 10 µg) co-transfiziert.

Es wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

- Zellen ( $2 \times 10^6$ ) 5 Minuten bei RT und 1000 x g zentrifugieren
- Pellet in 90 µl Nucleofector Solution resuspendieren
- 15 µl verdünnte Plasmid-DNA zugeben
- Transfer der Lösung in die Amaxa Küvette
- Behandlung im Elektroporationsgerät
- Zugabe von 1 ml vorgewärmtem Erholungsmedium
- Überführung mit der Amaxa Plastikpipette in eine 24-well Platte
- Zellen 1-2 Stunden bei 37°C inkubieren („Erholungsphase“ der Zellen)
- T-Zellen: Amaxa Medium durch zuvor aufbewahrtes Th<sub>9</sub>-Medium ersetzen und mit anti-CD3/CD28 Antikörpern bis zur Weiterbehandlung stimulieren

## 2.16 Reporter-Gen-Assay

Dual Reporter-Gen-Systeme werden genutzt, um die Promoter-Aktivität eukaryotischer Gene zu untersuchen. Hierbei ist es möglich sowohl Expression und Analyse zweier unabhängiger Reporterenzyme in einem Versuchsansatz zu analysieren. Bei einem Reporter-Gen-Assay werden die zu untersuchenden aktiven Elemente eines Gens, Promotor und/oder Enhancer vor die kodierende Sequenz eines Reportergens kloniert. Es wurde das Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System von Promega verwendet. Hier wurde zum einen mit der 61kDa Luciferase des Glühwürmchens *Photinus pyralis* und zum anderen mit der 36kDa Luciferase der Seefeder *Renilla reniformis* gearbeitet. Durch die Transfektion wurde in die Zellen zum einen ein Vektor eingebracht, welcher den IL-9-Promotor vor dem Gen für die *Photinus*-Luciferase trägt. Ein anderer Vektor enthält einen CMV-Promotor mit dem nachgeschalteten Gen des Transkriptionsfaktors. (z.B. IRF4). Wird durch die Überexpression des betreffenden Gens der IL-9-Promotor aktiviert, so kann die *Photinus*-Luciferase zum Leuchten gebracht werden. Durch die Koftransfektion eines weiteren Reporter Plasmids, dass durch den *Herpes simplex* Virus Thymidin-Kinase (HSV-TK) Promoter konstitutiv *Renilla*- (*Renilla reniformis*) Luciferase exprimiert, wird die Störanfälligkeit des Systems minimiert, da die Firefly-Luciferaseaktivität durch die *Renilla*-Luciferaseaktivität normalisiert wird.

Die Plasmide wurden aus *E.coli* Glycerol-Stocks mittels Pure Ling HiPure Plasmid Maxiprep Kit (Invitrogen) isoliert und in TE-Puffer als Stocklösung bei -20°C aufbewahrt. Als Transfektionsmethode wurde die Nucleofektion, eine elektroporationsbasierte Transfektionsmethode gewählt. Hierfür wurde ein spezielles Mouse T Cell Nucleofektor<sup>®</sup> Kit (AMAXA) verwendet.

eingesetzte Plasmidmenge:

IL-9-Promotorplasmid:	10 µg
Plasmid-DNA	2,5 µg
pRL-TK (konstitutive <i>Renilla</i> -Expression)	300 ng

Bei der Durchführung des Reporter-Gen-Assays wurde nach Herstellerangaben verfahren.

## 2.17 Molekularbiologische Methoden

### 2.17.1 Präparation der Gesamt-RNA

- 1-2 x 10<sup>6</sup> Zellen in 1 ml TriReagent (total RNA Isolation Reagent, enthält Phenol) aufnehmen
- 200 µl Chloroform (Roti) dazu und durch gründliches Schütteln durchmischen
- 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- 15 Minuten bei 12500 x g und 4°C zentrifugieren
- obere, durchsichtige, wässrige Phase abnehmen und mit 1,5 µl Glykogen (20 µg/ml) versetzen
- gut durchmischen
- 500 µl Isopropanol in p.a. Qualität dazugeben
- 10 Minuten inkubieren
- 10 Minuten bei 12500 x g und 4°C zentrifugieren
- zweimal waschen mit je 1 ml eiskaltem Ethanol (jeweils bei 8000 x g und 4°C abzentrifugieren)
- RNA lufttrocknen lassen und in 20 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufnehmen

### 2.17.2 Reverse Transkription der mRNA in cDNA

Beim Oligo(dT)<sub>n</sub>-Priming entsteht durch die Reaktion des Oligo(dT)<sub>n</sub> mit dem Poly(A)-Schwanz des mRNA-Moleküls ein kurzer doppelsträngiger Nukleinsäurebereich, der von der reversen Transkriptase als Startpunkt für die DNA-Synthese benötigt wird. Durch diese Vorgehensweise beginnt die Synthese der cDNA in der Nähe des 3`-Endes der mRNA. Nachteilig bei dieser Methode ist jedoch die abnehmende Effizienz mit zunehmendem Abstand des zu amplifizierenden Bereichs vom 3`-Ende. Beim Random-Priming hingegen verwendet man ein Gemisch aus Hexanucleotiden aller theoretisch denkbaren Sequenzabfolgen. Die Verwendung dieser p(dN)<sub>6</sub>- Mischung führt zur Initiation der Einzelstrangsynthese an diversen Stellen der zu kopierenden mRNA. Hierdurch sind alle mRNA-Sequenzen aus einer heterologen Population gleichmäßig in der erhaltenen Mischung von cDNA-Molekülen enthalten, da hier nicht die Sequenzen in der Nähe des 3`-Ende begünstigt werden. Nachteilig ist hier jedoch der geringere Anteil vollständig kopierter mRNA-Moleküle. Um die Vorteile beider Verfahren zu nutzen, wurde eine Mischung aus Oligo(dT)<sub>n</sub>- und p(dN)<sub>6</sub>-Primern verwendet.

Es wurde folgender Master-Mix angesetzt

5x Puffer	4 µl
dNTPs	2 µl
p(dN) <sub>6</sub> (20 ng/µl)	1 µl
Oligo(dT) <sub>n</sub> (100 ng/µl)	1 µl
mRNA	300 ng
M-MLV Reverse Transkriptase	1 µl

Der Reaktionsansatz wurde auf ein Endvolumen von 20 µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die mRNA wurde für eine Stunde im 42°C Wasserbad inkubiert, um die mRNA in cDNA umzuschreiben.

### 2.17.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion kommt es durch die Wiederholung der Reaktionszyklen, bestehend aus DNA-Denaturierung, „Primerhybridisierung“ und Elongation nach jedem Reaktionsschritt zu einer Verdopplung der DNA. Diese Kettenreaktion führt zu einer exponentiellen und selektiven Anreicherung der durch die Oligonukleotide flankierenden DNA-Sequenzen. Im Zuge dieser Arbeit wurden quantitative realtime-PCRs (qRT-PCR) durchgeführt. Hierzu wurde die murine mRNA in Triplikaten unter Verwendung von SYBR Green in einem iCycler amplifiziert. Die erhaltenen Werte wurden anhand der ermittelten Werte für das „Housekeeping-Gen“ HGPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-transferase) normalisiert. Hieraus ergaben sich die Werte für die relativen mRNA-Expressionen.

#### Ansatz für Triplikate (3,2-facher Ansatz)

28,8 µl	autoklaviertes H <sub>2</sub> O
40 µl	SYBR-Green
8 µl	cDNA
3,2 µl	spezifische Oligonukleotide (Arbeitslösung 5 pM)

Die Ansätze wurden jeweils gut durchmischt. Von jedem Ansatz wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt (jeweils 25 µl).

#### **2.17.4 Verwendete Oligonukleotide („Primer“)**

Die Oligonukleotide zum Nachweis verschiedener cDNAs mittels qRT-PCR („Primer“) wurden von den Firmen Metabion (Martinsried) und Biomers.net (Ulm) bezogen und bei –20°C aufbewahrt. Die Oligonukleotide wurden in einer Konzentration von 5 pmol/µl eingesetzt.

HGPRT forward: 5'-GTT GGA TAC AGG CCA GAC TTT GTT G-3'

HGPRT reverse: 5'GAG GGT AGG CTG GCC TAT AGG CT-3'

mIL-9 forward: 5'-CTG ATG ATT GTA CCA CAC CGT GC-3'

mIL-9 reverse: 5'-GCC TTT GCA TCT CTG TCT TCT GG-3'

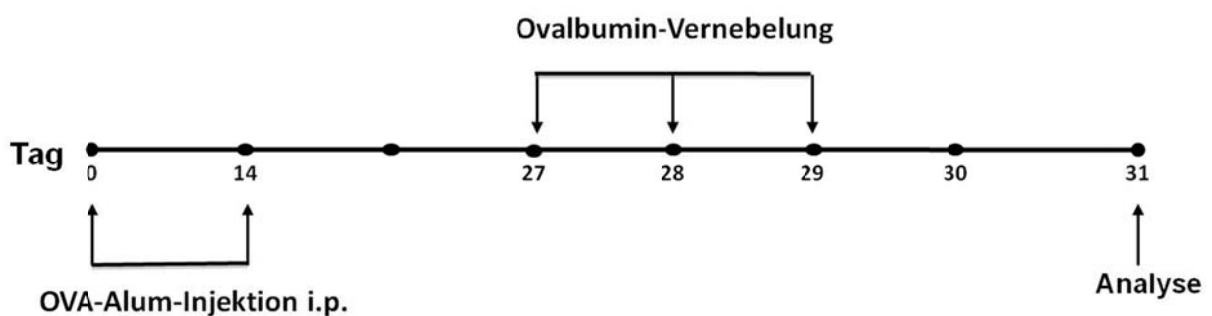
#### **2.18 *In vivo*-Experimente zur Untersuchung asthmatischer Symptome am Mausmodell**

Bei Asthma bronchiale handelt es sich um eine humane Erkrankung, welche in der vorliegenden Arbeit unter Zuhilfenahme eines murinen Tiermodells untersucht wurde. Um die Übertragbarkeit dieses komplexen Krankheitsbildes so realistisch wie möglich zu gestalten, wurde neben der Lungenfunktion auch die Atemwegsentszündung untersucht.

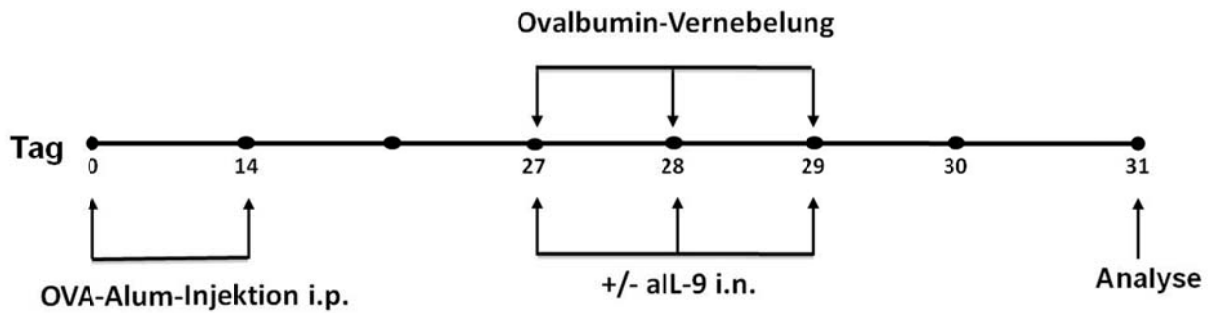


### 2.18.1 Immunisierung der Versuchstiere und Versuchsaufbau

Die Tiere wurden jeweils an Tag 0 und an Tag 14 mit OVA-Alum intraperitoneal immunisiert. Die Kontrolltiere blieben hierbei unsensibilisiert. An den Tagen 27, 28 und 29 wurden die Versuchstiere mit dem Antigen Ovalbumin für 30 Minuten über die Atemwege vernebelt. In den Versuchen, in denen ein neutralisierender Antikörper gegen IL-9 verabreicht wurde, wurden 150 $\mu$ g von diesem 30 Minuten vor der Verneblung intranasal appliziert. Die intranasale Antikörperapplikation wurde von den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Buhl/Reuter durchgeführt. Ein Tag nach der letzten Ovalbuminverneblung wurden die Experimente durchgeführt. Es wurden Atemwegswiderstand nach Methacholin-Provokation gemessen und die Bronchoalveoläre Lavage durchgeführt. Die Zellen der Bronchoalveolären Lavage wurden durchflusszytometrisch auf die Anwesenheit von eosinophilen Granulozyten getestet. Weiter wurde die Bronchoalveoläre Lavage herangezogen, um die zelluläre Zusammensetzung genauer zu untersuchen und auf die Anwesenheit der Zytokine IL-9, IL-13 und IL-5 zu überprüfen.



**Abb. 5: Versuchsanordnung der *in vivo* Experimente ohne neutralisierenden aIL-9 Antikörper (Asthma bronchiale).** Es wurden 12 Versuchstiere eingesetzt. An den Tagen 0 und 14 wurden die Tiere mit dem Antigen Ovalbumin inklusive dem Adjuvant Aluminiumhydroxid (Alum) immunisiert. Ab dem 27. Versuchstag erfolgte an drei aufeinanderfolgenden Tagen die Ovalbuminverneblung. Am 31. Versuchstag wurde der Atemwegswiderstand nach Methacholin-Provokation gemessen, sowie eine HE-Färbung von Zytospins aus der BAL angefertigt. Die Zellen der BAL wurden durchflusszytometrisch untersucht.



**Abb. 6: Versuchsanordnung des Asthma bronchiale-Experiments mit neutralisierendem Antikörper gegen IL-9.** Es wurden 25 Versuchstiere eingesetzt. An den Tagen 0 und 14 wurden die Tiere mit dem Antigen Ovalbumin inklusive dem Adjuvant Alum immunisiert. Ab dem 27. Versuchstag wurden die Versuchstiere an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit dem Antigen Ovalbumin vernebelt. 30 min zuvor erfolgte die anti-IL-9-Behandlung. Am 31. Versuchstag wurde der Atemwegswiderstand nach Methacholin-Provokation gemessen, sowie eine HE-Färbung von Zytospins aus der BAL angefertigt.

### 2.18.2 Durchführung der bronchoalveolären Lavage

Die bronchoalveoläre Lavage (BAL) dient dazu, die zelluläre Zusammensetzung der Atemwege genauer zu untersuchen. Anhand der Zelldifferenzierung der BAL kann eine Aussage über eine eventuell bestehende Atemwegsinflammation getroffen werden.

- Vorherige Betäubung der Versuchstiere (Narkosen)
- Fell mit Ethanol anfeuchten
- Schnitt von Kinn bis Schlüsselbein vornehmen
- Haut stumpf wegpräparieren
- Speicheldrüsen und *Musculus sternohyoideus* vorsichtig auseinanderziehen (→Luftröhre wird sichtbar)
- Tracheaumschließendes Gewebe aufritzen und vorsichtig entfernen
- Trachea vorsichtig mit geeigneter Pinzette anheben und durch Querschnitt zur Hälfte öffnen
- Tubus einführen und mittels chirurgischem Knoten fixieren
- 1 ml PBS mittels Spritze langsam via Tubus in die Lunge geben
- PBS sofort langsam wieder mittels Spritze entnehmen
- Gewonnene BAL (ca 800-900 µl) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß geben
- Zentrifugation bei 1200 U/min und 4°C für 10 Minuten

- Überstände in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen
- Bei -80°C bis zur Weiterverwendung einfrieren
- Zellen in 200 µl PBS resuspendieren und bis zur Weiterverwendung auf Eis lagern

### **2.18.3 Erstellen von Zytospins**

Um die Zellen der BAL näher mikroskopisch zu charakterisieren und eine Aussage über eine vorhandene Inflammation zu machen, wurden Zytospins angefertigt.

- 100 µl der BAL-Zellsuspension (max.  $10^5$ -Zellen) über Trichter auf Objektträger bringen
- Zentrifugation für 10 Minuten bei 900 U/min in Zytofuge („Spotten“)
- Trocknen für mindestens 10 Minuten (max. 24h)
- Zellen mittels des Hemacolor® (IVD)-Kit auf den Zytospins fixieren
- HE-Färbung: Schnitte für jeweils eine Sekunde fünfmal in Lösung 1, 2 und 3 halten
- Zwischen den Schritten Objektträger ordentlich abtropfen lassen
- Zytospins mit Puffer nach Weise abspülen
- Lichtmikroskopische Untersuchung der Präparate

### **2.18.4 Gewinnung des Serums**

Den Versuchstieren wurde Blut entnommen, um daraus das Serum zu gewinnen. Aus dem Serum wurden die OVA-spezifischen Antikörperkonzentrationen mittels ELISA ermittelt.

- Bauchraum der narkotisierten Tiere öffnen
- Punktion der *Vena cava caudalis*
- Entnommenes Blut gerinnen lassen
- Blutklumpen entfernen
- Zentrifugation für 10 min bei 9200g
- Überstand/Serum bis zur Analyse wegfrieren

Die ELISA wurden von der Arbeitsgruppe Buhl/Reuter der dritten medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

### **2.18.5 Lungenfunktionsmessung**

Um den Phänotyp der Atemwegsinflammation der Versuchstiere näher charakterisieren zu können, wurde neben der BAL-Analyse noch eine weitere Methode angewandt. Mittels Lungenfunktionsmessung wurde die Atemwegshyperreagibilität (AHR) und somit auch eine funktionelle Veränderung der Lungenfunktion nach Atemwegsprovokation mittels Methacholin getestet.

Allgemein können hierbei sowohl invasive Methoden als auch nicht-invasive Techniken angewandt werden. Nicht-invasive Techniken haben den großen Vorteil, dass wiederholte Messungen am gleichen Tier möglich sind und die Handhabung recht einfach ist. Da es sich hierbei aber um eine äußere Messung der Lungenfunktion handelt, hat die nicht-invasive Methode allerdings den Nachteil, dass keine direkte Messung der Lungenmechanik vorgenommen werden kann. Dadurch kann keine Aussage darüber getroffen werden in welchem Ausmaß die Widerstände der oberen Atemwege zur Änderungen des Atemwegwiderstandes beitragen. Auch Stärke und Lokalisierung der Bronchokonstriktion können nicht analysiert werden.

In dieser Arbeit wurde die sogenannte invasive Technik angewandt. Hiermit kann eine direkte Aussage über Änderungen der Lungenfunktion getroffen werden. Dabei können selbst geringste Änderungen der Lungenmechanik detektiert werden. Hierfür ist es nötig die Versuchstiere zu narkotisieren und einen Tubus intratracheal einzuführen, über den die Tiere mechanisch beatmet werden. Die Messung mittels Tubus bietet dabei den Vorteil, dass Veränderungen in den oberen Atemwegen außen vor bleiben und somit Fehlanalysen minimiert werden können.

Nachteilig ist hierbei, dass die Durchführung der Tracheostomie chirurgischer Expertise bedarf. Weiter sind wiederholte Messungen nicht durchführbar.

Es können physikalische Messgrößen wie der pulmonale Widerstand ( $R_L$ ) oder die dynamische Compliance ( $C_{dyn}$ ) bestimmt und somit reproduzierbare und aussagekräftige Daten produziert werden.

Unter dem pulmonalen Widerstand versteht man die Summe des Atemwegswiderstandes ( $R_{aw}$ ) und des Gewebewiderstandes ( $R_{ti}$ ), welche bei

normaler Atemrate vergleichbar sind. Er gibt somit Verengung der Atemwege und die Viskosität des Lungengewebes wieder. Der Lungenwiderstand  $R_L$  ist als Quotient der Druckdifferenz zur Flusddifferenz definiert:

$$R_L = \Delta P_{TP} / \Delta F$$

Mit der dynamischen Compliance wird die elastische Dehnbarkeit der Lunge beschrieben. Sie gibt das Verhältnis einer definierten Änderung des Lungenvolumens ( $\Delta V$ ) bei einer Änderung des transpulmonalen Drucks ( $\Delta P_{PT}$ ) wieder:

$$C_{dyn} = \Delta V_T / \Delta P_{TP}$$

Um  $R_L$  und  $C_{dyn}$  bestimmen zu können, ist es notwendig den transpulmonalen Druck und Fluss zu messen. Durch geeignete Umformung einer Gleichung aus Bewegung zu Druckmessung, Fluss und Volumen lassen sich dynamische Compliance und Lungenwiderstand errechnen.

$$P_{TP} = V \times R_L + V_T / C_{dyn}$$

$P_{TP}$  = transpulmonaler Druck (in der Maus: transrespiratorischer Druck)

$V_T$  = Tidalvolumen

$V$  = Tidalatemfluss

### 2.18.5.1 Invasive Messungen mittels flexiVent-System

Die Atemwegsüberempfindlichkeit wurde mittels invasiver Messung, die mit Hilfe des flexiVent der Firma Scireq (Montreal, Kanada) durchgeführt wurde, bestimmt. Bei dem flexiVent-System handelt es sich um eine Kombination aus mechanischer Beatmung und ständiger online Analyse der Atemmechanik. Mittels der "Forced Oscillation"-Technik (FOT) werden Meßparameter wie Lungenwiderstand und Compliance bestimmt. In der FOT wird mittels eines computergesteuerten Kolbens ein oszillierendes Signal generiert. Durch das Signal wird in der Lunge ein charakteristisches, messbares Schwingungsmuster erzeugt. Setzt man den absoluten Druckunterschied mit dem absoluten Volumenunterschied in Verhältnis, so erhält man die sogenannte Impedanz. Der Druck wird mittels Druckfühler gemessen,

das Volumen wird durch den computergesteuerten Ventilator vorgegeben. Applikationen des Bronchoskonstriktors Methacholin, führen zu einem Druckanstieg und somit auch zur Zunahme der Impedanz. Mittels der Impedanz lässt sich eine komplexe Lungenfunktionsgleichung erstellen, das sogenannte Konstante-Phase-Modell, mit dem sich detailliert Veränderungen der Lungenmechanik berechnen lassen. Der Frequenzraum der Impedanz besteht aus zwei Größen. Diese sind der Widerstand (R) und die Reaktanz (X). Die Reaktanz beschreibt die Compliance (1/Elastanz), die die Dehnbarkeit des Lungengewebes widerspiegelt.

Zu Beginn einer Lungenfunktionsmessung wurde die Steuerungssoftware geöffnet. Über diese werden Ventilationsparameter eingestellt, Verneblung und Messung gesteuert und die Datenpunkte gesammelt. Mittels eines Hilfsprogramms wurden alle Routineeinstellungen vorgenommen. Hierzu gehören, die Auswahl des Templates, Eingabe des Experimentators und der Versuchsreihe, Bezeichnung des zu analysierenden Tieres und die Kalibrierung des Zylinder- und Atemwegsdruckmessers. In den Templates wurden Grundeinstellungen festgehalten wie; Art des Tieres, Beatmungseinstellungen, Messoptionen und Skriptfunktionen. Für die Versuche wurde eine auf die Messung von Mäusen optimierte Programmvorlage verwendet.

Eine Eichung des Zylinder- und Atemwegsdrucks wurde einmalig vor Experimentbeginn durchgeführt. Mittels eines Barometers wurden dem Gerät zwei definierte Druckpunkte vorgegeben. Als erster Punkt wurde 0 cm H<sub>2</sub>O gewählt. Zur Festlegung des zweiten Meßpunktes wurde das Barometer an die Apparatur angeschlossen und eine Wassersäule von 20 cm H<sub>2</sub>O eingestellt. Darauf folgend wurde der Tubus geeicht. Um auszuschließen, dass Widerstände, die durch den Tubus bedingt sind, in die Analyse einkalkuliert werden, wurde diese Eichung vor der Messung jeder Maus durchgeführt. Der Tubus wurde hierzu an die Apparatur angeschlossen und den Aufforderungen des Hilfsprogramms gefolgt. Nach Durchführung dieser Voreinstellungen wurde die Messung begonnen.

### **Vorgehensweise**

- Narkotisieren der Versuchstiere zur Unterdrückung des Schmerzempfindens und Blockade der Eigenatmung (Pentobarbital; 1:5 in PBS; 5µl/ Gramm Körpergewicht i.p.)
- Tubus intratracheal einführen

- Anschließen an Messapparatur
- Beatmung der Mäuse wurde mit einer Frequenz von 120 Atemzügen/Minute und einem Tidalvolumen von 10 ml/kg in der Standardeinstellung durchgeführt
- Positiver endexpiratorischer Druck (PEEP) auf 5 cm H<sub>2</sub>O einstellen
- Alle 15 Sekunden mittels "Snapshot-150"-Analyse Lungenwiderstand und Compliance bestimmen
- Werte so lange bestimmen, bis ein Maximalwert oder eine Plateauphase erreicht wird
- Erste Verneblung nach dem Messen des Leerwertes (1 ml PBS als Kontrolle und später Methacholin in seriell aufsteigenden Dosen von 6,25 mg/ml PBS bis 100 mg/ml)
- Zum Vernebeln Beatmungsfrequenz auf 60 Züge/Minute reduzieren und Tidalvolumen auf 30 ml/kg erhöhen
- Lunge wird kurzfristig gebläht
- Vernebelung für 10 Sekunden
- Nach Verneblung wieder auf Standardbeatmung umschalten und bis zum Erreichen der Maximalwerte Widerstand und die Compliance analysieren
- Nach der Messung jedes Tieres Vernebler mit destilliertem Wasser waschen und die Verbindungsstücke unter Druckluft ausblasen.

### **Auswertung**

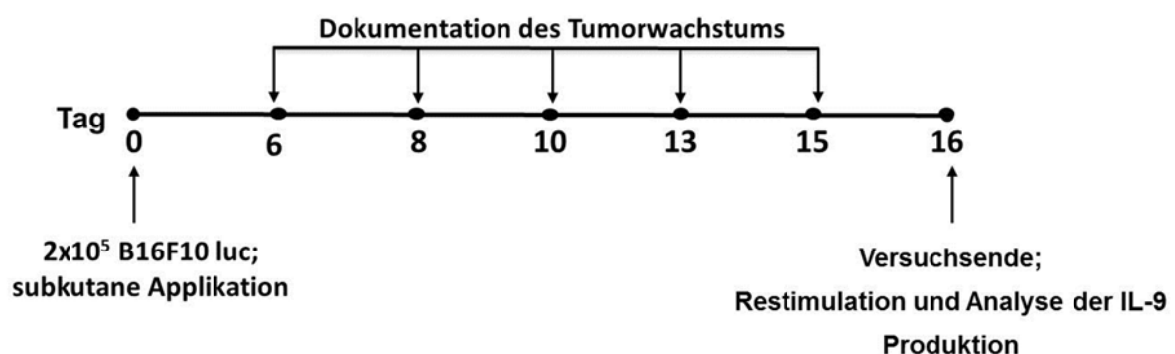
Die Experimente wurden mittels Excel ausgewertet. Der maximale Widerstandswert, bzw. minimalste Compliancewert zu jeder PBS-Kontrolle und Methacholindosis wurde aus den Rohdaten bestimmt und in eine Tabelle übertragen. Es wurde der prozentuelle Anstieg des Widerstandes, bzw. der prozentuelle Abfall der Compliance nach Reizung mit Methacholin im Vergleich zur PBS-Kontrolle bestimmt.

## 2.19 *In vivo*-Experimente zur Analyse der Melanomentwicklung am Mausmodell

Um die Rolle des Transkriptionsfaktors NFATc2 für die Expression IL-9 im Rahmen der Melanomentwicklung zu untersuchen, wurden *in vivo* Versuche am Mausmodell durchgeführt.

### 2.19.1.1 Versuchsaufbau

NFATc2-*knockout* Tieren und wildtypischen Kontrollen wurden Tumorzellen der B16F10 luc-Zelllinie appliziert. Das Tumorwachstum wurde über die Zeit (siehe einzelne Abbildungen zur Versuchsanordnung Abb.5 und 6) beobachtet und dokumentiert. Am Ende des Versuchs wurden den Tieren sowohl die tumor-drainierenden Lymphknoten, als auch die Milz entnommen. Die Zellen wurden antikörpervermittelt restimuliert und auf die IL-9-Expression hin untersucht.

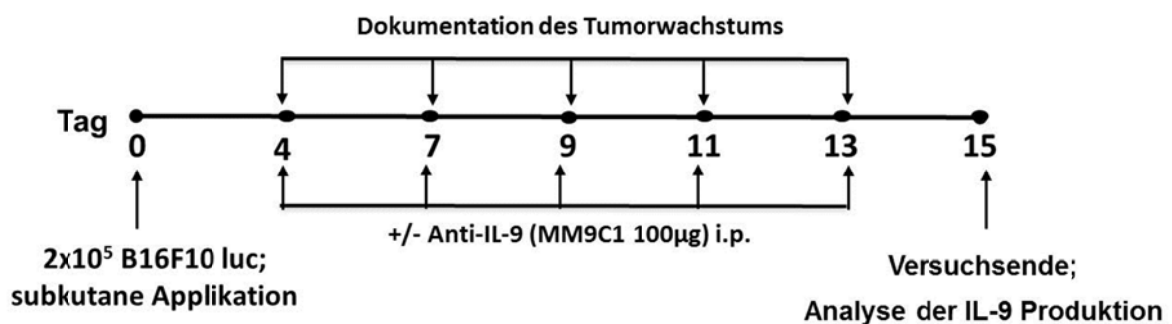


**Abb. 7: Versuchsanordnung der murinen *in vivo* Melanomexperimente.** Es wurden 13 Versuchstiere eingesetzt (6 Wildtypiere und 7 NFATc2-defiziente Tiere). Den Versuchstieren wurden jeweils  $2 \times 10^5$  B16F10 luc-Melanomzellen in einem Volumen von 50  $\mu$ l PBS subkutan verabreicht. Im folgenden Verlauf wurde das Tumorwachstum beobachtet und die Tumorgroße wurde gemessen. Nach 16 Tagen wurde der Versuch beendet und den Tieren wurden sowohl Milz, als auch die tumor-drainierenden Lymphknoten entnommen und mittels plattengebundenem aCD3/aCD28 für 24h restimuliert. Schließlich wurde die IL-9-Produktion analysiert.



### 2.19.1.2 Versuchsaufbau des Melanomversuchs mit IL-9 Neutralisation

Beiden Versuchsgruppen wurden die Tumorzellen der B16F10 luc-Zelllinie appliziert. Das Tumorstadium wurde über die Zeit beobachtet und dokumentiert. Zusätzlich wurde ein IL-9-neutralisierender Antikörper (MM9C1) intraperitoneal verabreicht. Am Versuchsende wurden den Tieren sowohl die tumor-drainierenden Lymphknoten, als auch die Milz entnommen. Die Zellen wurden antikörpervermittelt restimuliert und auf die Expression von IL-9 hin untersucht.



**Abb. 8: Versuchsanordnung der murinen *in vivo* Melanomexperimente mit Antikörper-Applikation.** Es wurden 24 Versuchstiere eingesetzt (12 Wildtyp-tiere (+/- anti-IL-9) und 12 NFATc2-defiziente Tiere (+/- anti-IL-9)). Den Versuchstieren wurden jeweils  $2 \times 10^5$  B16F10 luc-Melanomzellen in einem Volumen von 50 µl PBS subkutan verabreicht. Im folgenden Verlauf wurde das Tumorstadium beobachtet und dokumentiert. Vor jeder Messung wurde den entsprechenden Tieren ein neutralisierender Antikörper für IL-9 i.p. (100µg/100µl PBS) appliziert. Nach 15 Tagen wurde der Versuch beendet. Milz und tumor-drainierende Lymphknoten wurden entnommen und mittels plattengebundenem aCD3/aCD28 restimuliert. Nach 72h wurde die IL-9-Produktion analysiert.

### 2.19.1.3 Subkutane Applikation der Melanomzellen und Versuchsverlauf

Den Versuchstieren wurden jeweils  $2 \times 10^5$  B16F10 luc-Melanomzellen in PBS in einem Volumen von 50µl subkutan in die rechte Flanke injiziert. Die Injektionsstelle wurde hierfür rasiert. Für die Tumorapplikation wurden die Tiere mit Ketamin und Xylazin betäubt (100mg/kg Körpergewicht Ketamin und 2,5-5 mg/kg Körpergewicht Xylazin).

Im Versuchsverlauf wurde das Tumorstadium beobachtet und die Tumorstöße gemessen. Zur detaillierten Tumormessung wurden die Tiere mit Forene über die

Atemwege narkotisiert. Die Tiere wurden ab einem messbaren Tumordurchmesser von 2cm<sup>2</sup> abgetötet.

Wurde im Versuch ein neutralisierender Antikörper gegen IL-9 verwendet, wurde jeweils 100µg des Antikörpers in einem Volumen von 100µl in PBS verdünnt und intraperitoneal appliziert.

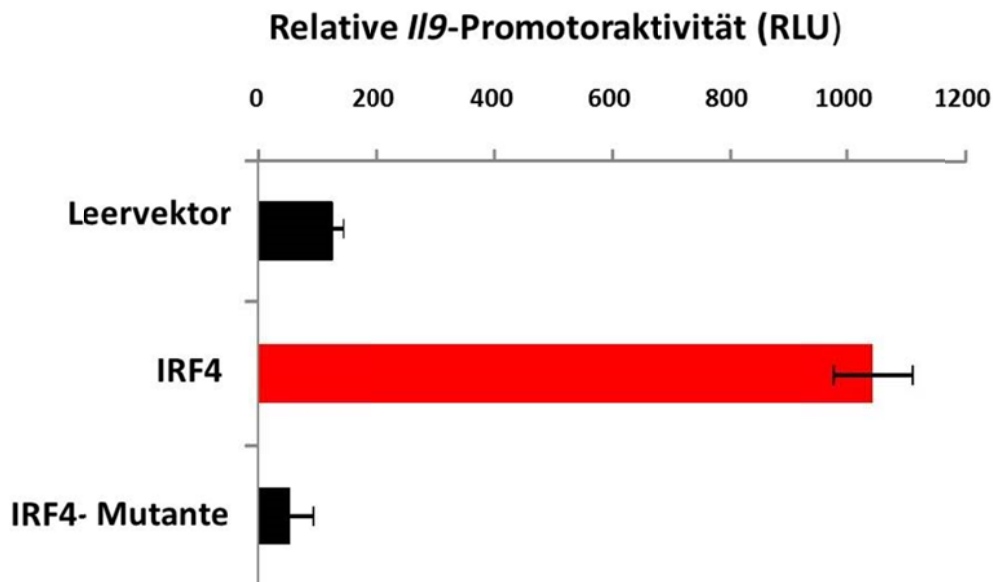
#### **2.19.1.4 Stimulation von Milz- und Lymphknotenzellen**

Am Versuchsende wurden die Tiere abgetötet. Die drainierenden Lymphknoten und die Milz wurden entnommen. Sowohl die Lymphknotenzellen, als auch die Milzzellen wurden für 24h/72h mittels plattengebundenen anti-CD3 und anti-CD28 –Antikörpern (4 µg/ml) stimuliert. Hierzu wurden die Zellen auf 8 x10<sup>6</sup>/ml eingestellt. Aus den Zellkulturüberständen wurde schließlich die IL-9-Sekretion mittels spezifischem IL-9-ELISA ermittelt. Aus den Zelllysaten wurde RNA isoliert und die relative IL-9-mRNA-Expression wurde mittels quantitativer Realtime-PCR ermittelt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Der Transkriptionsfaktor IRF4 bindet und aktiviert den murinen *IL9* Promotor in $Th_9$ -Zellen

Der Transkriptionsfaktor IRF4 ist ein unerlässlicher Aktivator für die IL-4-Produktion in  $Th_2$ -Zellen und die IL-17-Expression in  $Th_{17}$ -Zellen<sup>30,104</sup>. Um zu untersuchen, ob IRF4 auch in der Lage ist, die Aktivität des *IL9* Gens zu beeinflussen, wurde in früheren Arbeiten ein Dual-Luciferase™ Reporter Assay durchgeführt. Hierzu wurden  $CD4^+$  T-Zellen entweder mit einem IRF4-kodierenden Plasmid oder einem Plasmid in welchem die sogenannte regulatorische Domäne des Transkriptionsfaktors deletiert ist (IRF4  $\Delta$ RD) transfiziert. Als Kontrolle diente ein entsprechender Leervektor. Die Transfektion erfolgte in Kombination mit einem *IL9* Reporterkonstrukt sowie mit einem Plasmid welches die *Renilla*-Luciferase konstitutiv exprimiert (siehe Material und Methode S.36+37). Nach Stimulation mittels plattengebundenem anti-CD3 und anti-CD28, wurde die Aktivität des *IL9* Promotors in relativen Lichteinheiten am Luminometer gemessen.

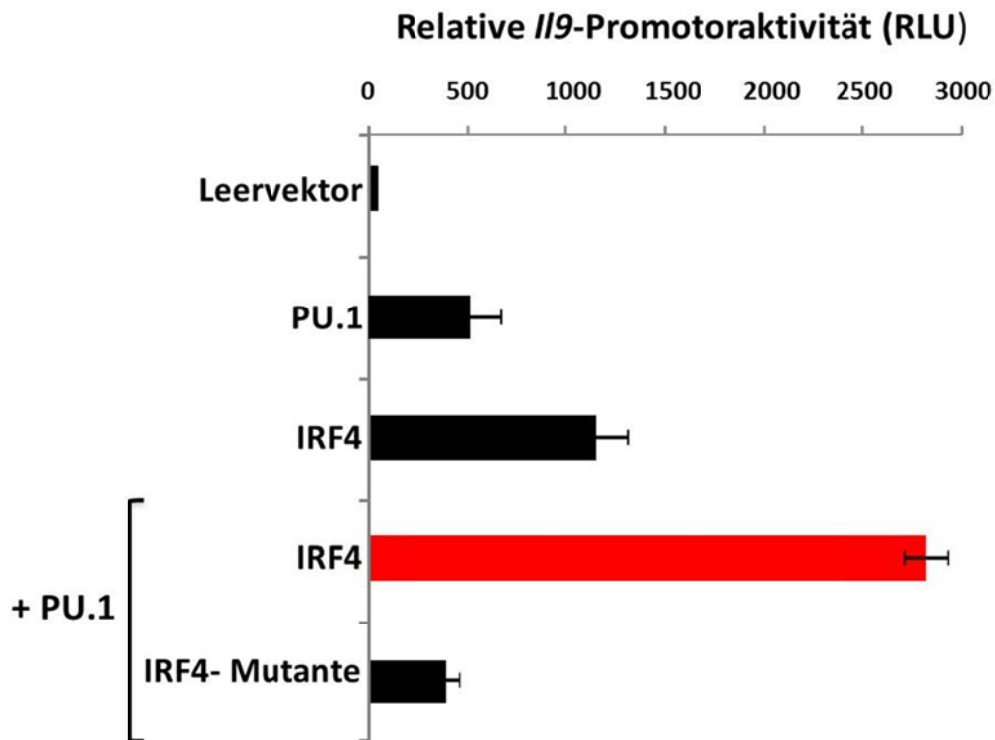


**Abb.9: Dual-Luciferase™ Reporter Assay zur Bestimmung der *IL9* Promotoraktivität nach IRF4-Überexpression.** Es wurden  $2 \times 10^6$   $CD4^+$  T-Zellen entweder mit einem IRF4-, eine IRF4-Mutante (IRF4  $\Delta$ RD-Expressionsvektor) oder dem entsprechenden pcDNA-Leervektor transfiziert (siehe Material und Methoden S.36+37). Nach einer 24 stündigen Stimulation, mittels anti-CD3/anti-CD28, wurden die Zellen lysiert. Die *IL9* Promotoraktivität wurde in relativen Lichteinheiten (RLU = *relative light units*) bestimmt.

Abbildung 9 kann entnommen werden, dass die Überexpression des IRF4-Proteins im Vergleich zur Transfektion mit dem Leervektor zu einem starken Anstieg der *IL9* Promotoraktivität führt. Die Überexpression der defekten IRF4-Variante, welche nicht in der Lage ist mit weiteren Faktoren zu interagieren, zeigt im direkten Vergleich zur Leervektorkontrolle eine reduzierte *IL9* Promotoraktivität. Der Transkriptionsfaktor IRF4 muss demnach mit weiteren Faktoren interagieren können, um den murinen *IL9* Promotor in vollem Umfang zu aktivieren.

### **3.2 IRF4 kooperiert mit PU.1 um den murinen *IL9* Promotor zu transaktivieren**

IRF4 wurde aufgrund seiner Fähigkeit den Transkriptionsfaktor PU.1 zu binden als PU.1-Interaktionspartner (Pip) bezeichnet<sup>90</sup>. Weiter wurde beschrieben, dass neben IRF4 auch der Transkriptionsfaktor PU.1 die IL-9-Expression in Th<sub>9</sub>-Zellen fördert<sup>47</sup>. Um zu untersuchen, ob eine Überexpression dieses Transkriptionsfaktors ebenfalls die Aktivität des *IL9* Gens beeinflusst, wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit einem PU.1 exprimierenden Plasmid transfiziert. Die Transfektion erfolgte alleine oder in Kombination mit den in 3.1 genannten Ansätzen. Die Zellen wurden zusätzlich mit einem *IL9* Reporterkonstrukt sowie mit einem Plasmid welches zur konstitutiven Expression der *Renilla*-Luciferase führt, transfiziert. Nach Stimulation wurde die Aktivität des *IL9* Promotors in relativen Lichteinheiten am Luminometer gemessen.



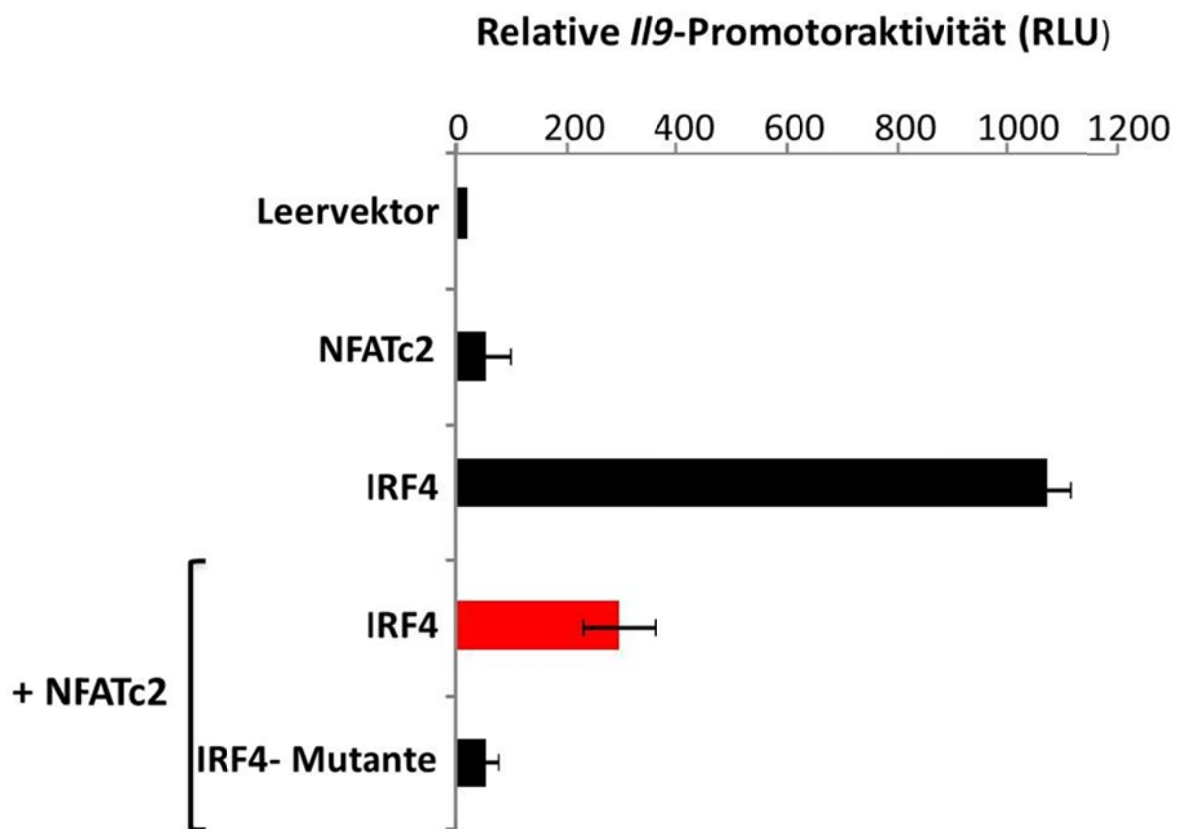
**Abb.10: Dual-Luciferase™ Reporter Assay zur Bestimmung der I/9 Promotoraktivität nach Überexpression von PU.1.** Es wurden  $2 \times 10^6$  CD4<sup>+</sup> T-Zellen entweder mit einem IRF4-, einem IRF4  $\Delta$ RD-Expressionsvektor oder dem entsprechenden pcDNA-Leervektor transfiziert. Zusätzlich wurde das PU.1-Protein alleine oder in Kombination mit dem IRF4- oder dem IRF4  $\Delta$ RD-Expressionsvektor überexprimiert. Nach einer 4 stündigen Stimulation wurden die Zellen lysiert. Die I/9 Promotoraktivität wurde in relativen Lichteinheiten (RLU = *relative light units*) bestimmt.

Die Überexpression von PU.1 ist in der Lage den I/9 Promotor zu aktivieren, jedoch nicht in dem Ausmaß, wie es die IRF4-Überexpression tut. Die Kotransfektion von IRF4 zusammen mit PU.1 führt zur stärksten I/9 Promotoraktivität, während die dominante negative Variante IRF4  $\Delta$ RD zusammen mit einer PU.1-Überexpression im Vergleich zur einfachen IRF4- oder PU.1-Überexpression eine beeinträchtigte Promotoraktivierung zur Folge hat. Eine direkte Interaktion zwischen IRF4 und PU.1 ist demnach in der Lage die I/9 Promotoraktivität positiv zu beeinflussen.

### 3.3 NFATc2 hemmt die I/9 Promotoraktivität in Th<sub>9</sub>-Zellen

Ein weiterer Interaktionspartner von IRF4 ist der Transkriptionsfaktor NFATc2, welcher in Synergie mit cMAF die I/4 Promotoraktivität in Th<sub>2</sub>-Zellen fördert<sup>121</sup>. Um zu untersuchen, ob der Transkriptionsfaktor NFATc2 ebenfalls in der Lage ist, die

Aktivität des *I/9* Gens zu beeinflussen, wurden  $CD4^+$  T-Zellen entweder mit einem für IRF4-kodierenden Plasmid, einer NFATc2-kodierenden Variante oder mit einem entsprechenden Leervektor transfiziert. Es erfolgte ebenfalls eine Koftransfektion des NFATc2-kodierenden Plasmids mit dem IRF4-Plasmid oder der defekten Variante. Auch hier wurden die Zellen in Kombination mit einem *I/9* Reporterkonstrukt sowie mit einem Plasmid welches zur konstitutiven Expression der *Renilla*-Luciferase verwendet werden kann, transfiziert. Nach Stimulation wurde die Aktivität des *I/9* Promotors in relativen Lichteinheiten am Luminometer gemessen.



**Abb.11: Dual-Luciferase™ Reporter Assay zur Bestimmung der *I/9* Promotoraktivität nach Überexpression von NFATc2.** Es wurden  $2 \times 10^6$   $CD4^+$  T-Zellen entweder mit einem IRF4-, einem IRF4  $\Delta$ RD-Expressionsvektor oder dem entsprechenden pcDNA-Leervektor transfiziert. Zusätzlich wurde das NFATc2-Protein alleine oder in Kombination mit dem IRF4- oder dem IRF4  $\Delta$ RD-Expressionsvektor überexprimiert. Nach einer 4 stündigen Stimulation wurden die Zellen lysiert. Die *I/9* Promotoraktivität wurde in relativen Lichteinheiten (RLU = *relative light units*) bestimmt.

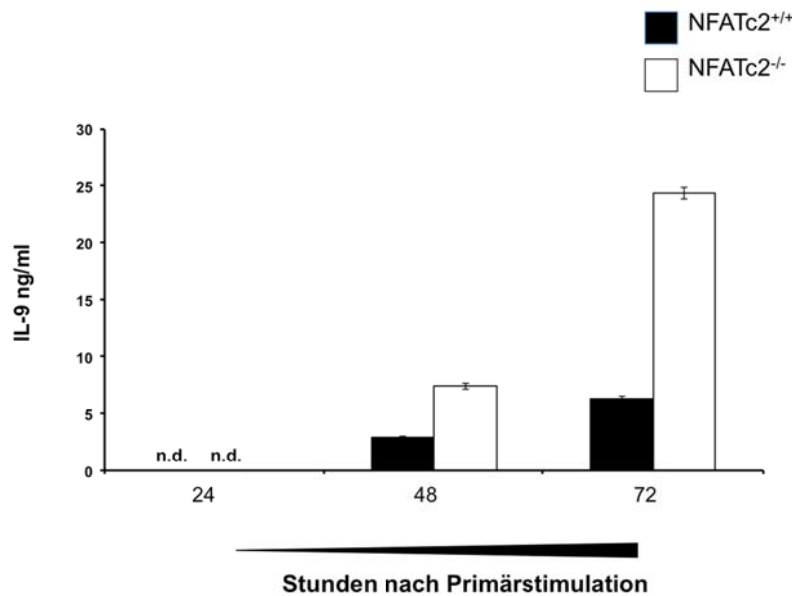
Abbildung 11 zeigt, dass die Überexpression des NFATc2-Proteins im Vergleich zur Transfektion mit dem Leervektor zu keinem nennenswerten Anstieg der *I/9* Promotoraktivität führt. Die Überexpression von NFATc2 in Kombination mit IRF4 führt zu einer starken Reduktion der IRF4-induzierten *I/9* Promotoraktivität. Die

NFATc2-Transfektion gemeinsam mit der deletierten IRF4-Variante, welche nicht in der Lage ist mit weiteren Faktoren zu interagieren, zeigt im direkten Vergleich eine reduzierte Promotoraktivität mit Werten, wie sie mit der NFATc2-Überexpression alleine erzielt werden. Der Transkriptionsfaktor NFATc2 ist hier nicht in der Lage die Expression des *Il9* Gens positiv zu beeinflussen, sondern wirkt stark inhibierend auf die IRF4-induzierte *Il9* Promoteraktivität.

### **3.4 Untersuchung der IL-9-Produktion NFATc2-defizienter Th<sub>9</sub>-Zellen im Vergleich zu wildtypischen Th<sub>9</sub>-Zellen**

#### **3.4.1 NFATc2-defiziente CD4<sup>+</sup>-Zellen weisen eine verstärkte IL-9-Sekretion nach Primärstimulation unter Th<sub>9</sub>-polarisierenden Bedingungen auf**

Die oben gezeigten Ergebnisse lassen erkennen, dass der Transkriptionsfaktor NFATc2 eher inhibierend als förderlich für die IL-9-Expression der T-Zellen ist. Um die Rolle von NFATc2 für die IL-9-Expression in Th<sub>9</sub>-Zellen genauer zu untersuchen, wurden naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen von wildtypischen Mäusen (NFATc2<sup>+/+</sup>) oder NFATc2-defizienten Tieren (NFATc2<sup>-/-</sup>) zu Th<sub>9</sub>-Zellen differenziert und hinsichtlich ihrer IL-9-Sekretion nach Primärstimulation untersucht. Die Kulturüberstände wurden mittels IL-9-spezifischem ELISA (siehe Material und Methoden S.35) nach 24h, 48h und 72h analysiert.



**Abb. 12: Die NFATc2-Defizienz führt in Th<sub>9</sub>-Zellen zu einer erhöhten IL-9-Produktion.** CD4<sup>+</sup> T-Zellen der NFATc2-defizienten Tiere (NFATc2<sup>-/-</sup>) und der entsprechenden Wildtypen (NFATc2<sup>+/+</sup>) wurden über einen Zeitraum von 72h unter Th<sub>9</sub>-Differenzierungsbedingungen stimuliert. Mittels IL-9-spezifischem ELISA wurde die IL-9-Sekretion der Th<sub>9</sub>-Zellen nach 24h, 48h und 72h untersucht. Zellkulturüberstände in denen kein IL-9 detektiert werden konnte, wurden mit n.d. (nicht detektierbar) betitelt.

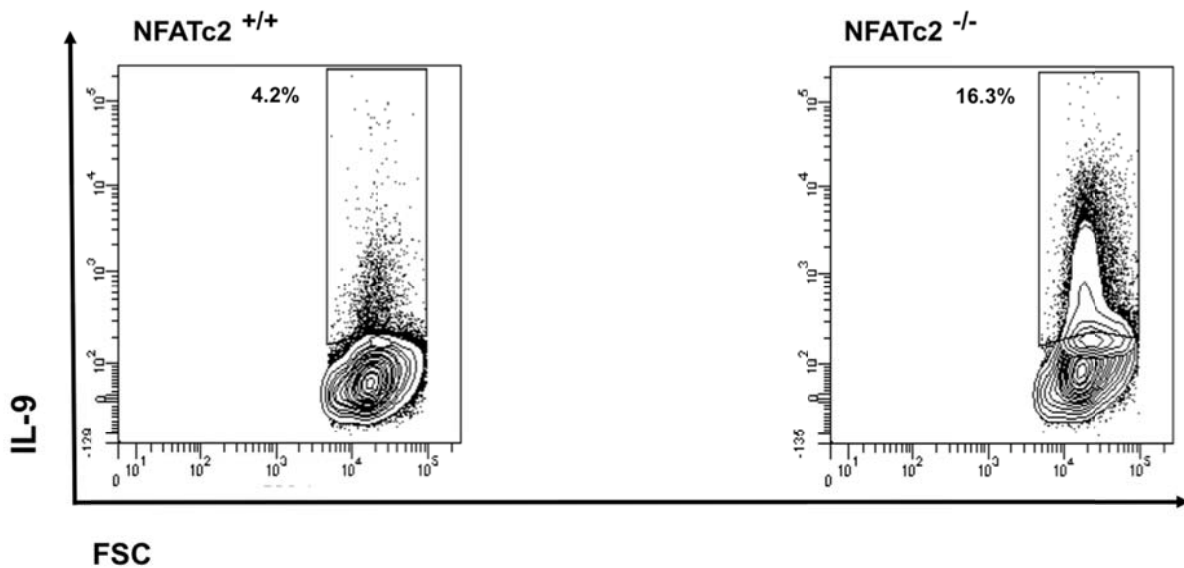
Die erste IL-9-Sekretion kann bei beiden Zelltypen nach 48h Primärstimulation im Zellkulturüberstand detektiert werden. NFATc2-defiziente Th<sub>9</sub>-Zellen weisen gegenüber den wildtypischen Zellen eine stark gesteigerte IL-9-Produktion auf.

### 3.4.2 NFATc2-defiziente Th<sub>9</sub>-Zellen exprimieren verstärkt intrazellulär IL-9

Um die IL-9-Produktion der Th<sub>9</sub>-Zellen weiter zu analysieren, wurden naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen für 72h unter Th<sub>9</sub>-Differenzierungsbedingungen stimuliert. An Tag 3 wurden die Zellen ohne Stimulation weiterkultiviert und in entsprechendem Medium verdünnt. An Tag 5 wurden die Zellen für 24h mittels anti-CD3 und anti-CD28 in Medium ohne Zytokinzusatz restimuliert. Um die Zellen auf eine intrazelluläre IL-9-Expression hin durchflusszytometrisch zu untersuchen, wurden die Zellen in den letzten 4h mit Monensin behandelt, um den intrazellulären Transport zu hemmen und eine Anreicherung von IL-9 am rauen Endoplasmatischen Retikulum (rER) zu ermöglichen. Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und schließlich mit einem IL-9-



spezifischen Antikörper oder einer entsprechenden Isotypkontrolle gefärbt. Die Zellen wurden mittels FACS<sup>1</sup>-Analyse untersucht.



**Abb. 13: Die NFATc2-Defizienz führt in Th<sub>9</sub>-Zellen zu einer erhöhten IL-9-Produktion.** Th<sub>9</sub>-Zellen wurden für 24h ohne Zytokinzusatz restimuliert. Die letzten 4h der Stimulation erfolgten unter Zugabe des Sekretionsinhibitors Monensin. Die Zellen wurden schließlich fixiert, permeabilisiert und mit einem spezifischen Antikörper gegen IL-9 intrazellulär gefärbt, um durchflusszytometrisch untersucht werden zu können.

Aus Abbildung 13 wird ersichtlich, dass 4,2% der NFATc2-kompetenten (NFAT<sup>+/+</sup>) Th<sub>9</sub>-Zellen intrazellulär IL-9 produzieren. NFATc2-defiziente Th<sub>9</sub>-Zellen (NFATc2<sup>-/-</sup>) hingegen weisen mit 16,3% positiven Ereignissen annähernd die 4-fache Zahl IL-9-produzierender T-Zellen auf.

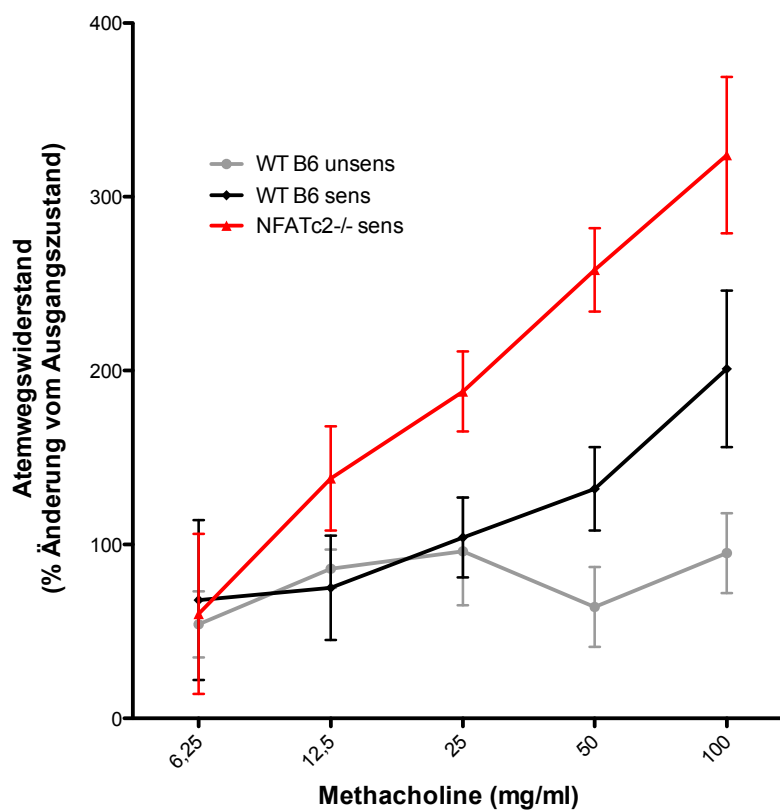
### 3.5 Die Auswirkung einer NFATc2-Defizienz in der Pathogenese des murinen Asthma bronchiale

Es ist bekannt, dass das Th<sub>9</sub>-generierte IL-9 einen fördernden Einfluss auf die Ausprägung des murinen Asthma bronchiale hat<sup>45</sup>. Da NFATc2-defiziente Th<sub>9</sub>-Zellen eine verstärkte IL-9-Produktion aufweisen, sollte untersucht werden, ob NFATc2-defiziente Tiere durch diese IL-9-Expression auch verstärkt asthmatische Symptome, wie einen erhöhten Atemwegswiderstand oder eine verstärkte pulmonäre Inflammation aufweisen.

<sup>1</sup> **Fluorescence Activated Cell Sorting**, synonym zu Durchflusszytometrie; geschützte Handelsmarke der Firma Becton Dickinson (BD)

### 3.5.1 NFATc2-defiziente Tiere zeigen einen erhöhten Atemwegswiderstand

Die Versuchstiere wurden an Tag 0 und Tag 14 intraperitoneal mit Ovalbumin und dem Adjuvans Aluminiumhydroxid (Alum) immunisiert. An den Tagen 27, 28 und 29 wurden die Tiere über die Atemwege mit Ovalbumin vernebelt, um die Immunreaktion in der Lunge auszulösen. An Tag 31 wurden die Tiere hinsichtlich der Ausprägung asthmatischer Symptome untersucht (siehe Abb.5). Hierzu wurden die Mäuse narkotisiert und intubiert. Folgend wurde der Atemwegswiderstand nach Methacholin-Provokation mittels invasivem flexiVent-System untersucht (siehe Material und Methoden S.44-47).

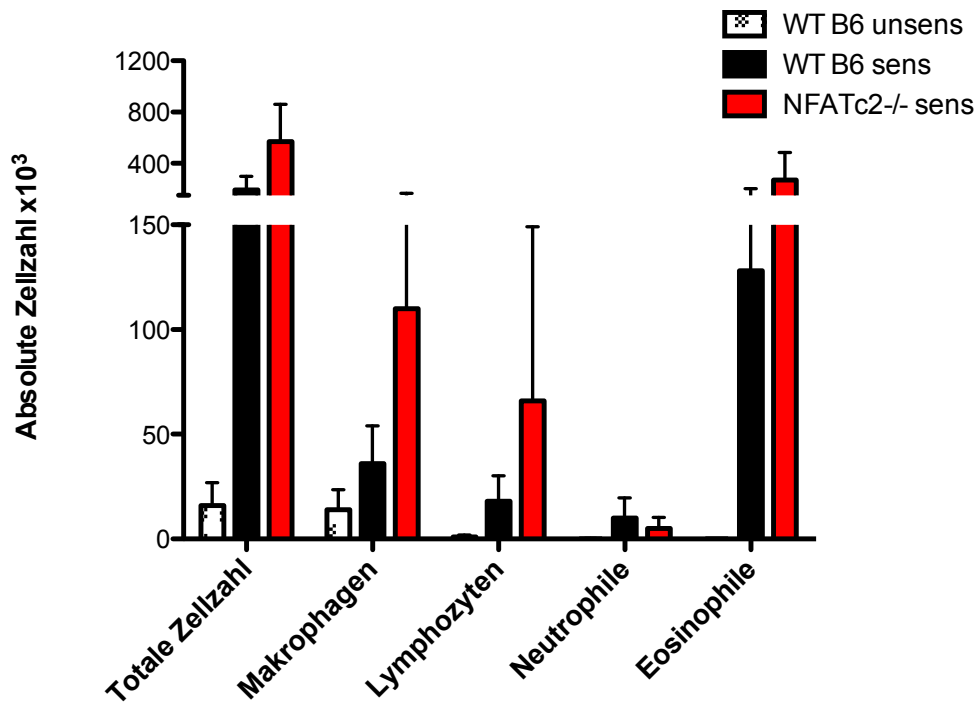


**Abb. 14: NFATc2-defiziente Tiere zeigen einen erhöhten Atemwegswiderstand nach Methacholin-Provokation.** Die Sensibilisierung der Versuchstiere erfolgte durch OVA Alum-Injektion i. p. an den Tagen 0 und 14. Die Tiere wurden an den Tagen 27, 28, 29 über die Atemwege durch OVA Inhalation provoziert. Zur Ermittlung des Atemwegswiderstands wurden die Versuchstiere narkotisiert, intubiert und mit steigenden Dosen des Bronchokonstriktors Methacholin beatmet. Der Atemwegswiderstand wurde mittels flexiVent-System untersucht.

Die unsensibilisierten Kontrolltiere (WT B6 unsens) zeigen entsprechend der Erwartung kaum eine Änderung zum Ausgangszustand. Sowohl bei den wildtypischen Versuchstieren, als auch bei den NFATc2-defizienten Tieren ist ein dosisabhängiger Anstieg des Atemwegwiderstands nach Methacholin-Provokation zu beobachten. Allerdings weisen NFATc2-defiziente Tiere einen wesentlich stärkeren Anstieg des Atemwegwiderstandes auf als die sensibilisierten Wildtypiere. Aufgrund einer eingeschränkten Verfügbarkeit an NFATc2-defizienten Tieren, wurden in diesem Experiment keine unsensibilisierten NFATc2-defizienten Tiere mitgeführt. Dass sich diese jedoch wie die unsensibilisierten Wildtypkontrollen verhalten wird im Folgeexperiment ersichtlich (siehe Abb.19).

### **3.5.2 Die NFATc2-Defizienz führt zu höheren absoluten Zellzahlen in der BAL**

Um die absoluten Zellzahlen in den Bronchien der Versuchstiere zu ermitteln, wurde nach der Bestimmung des Atemwegwiderstands auch eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) durchgeführt (siehe Material und Methoden S.42). Es wurden Zytopins hergestellt, welche mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung gefärbt wurden. Hierbei färbt Hämatoxylin basophile Zellstrukturen an, wodurch der Zellkern bläulich gefärbt wird. Durch die Eosinfärbung können acidophile Strukturen, wie Protein rötlich angefärbt werden (Eosinophile Granulozyten). Die Zellpräparate der BAL wurden lichtmikroskopisch analysiert.

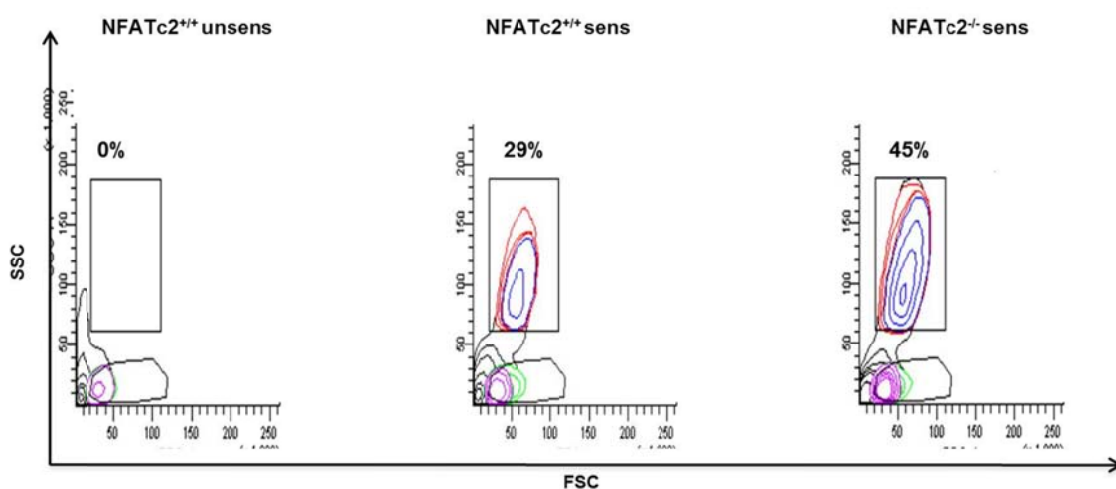


**Abb.15: Erhöhte Zellzahlen in der bronchoalveolären Lavage bei den NFATc2-defizienten Tieren.** Aus den BAL-Sekreten wurden Zytospins angefertigt und mittels Hämalaun, welches aus Hämatoxylin aufbereitet wird, und Eosin gefärbt. Die Zellzahlen wurden lichtmikroskopisch ermittelt. Es wurden jeweils 200 Zellen pro Präparat ausgezählt. Angegeben sind Mittelwert + Standardabweichung.

Unsensibilisierte, wildtypische Kontrolltiere weisen in allen Fällen die geringsten Zellzahlen auf. Die BAL setzt sich hier vor allem aus Alveolarmakrophagen zusammen. Im Vergleich zu den unsensibilisierten Kontrollen, weisen die sensibilisierten Wildtypen einen Anstieg bei allen Zelltypen auf. Hier sind neben den Alveolarmakrophagen auch inflammatorische Zellen, wie neutrophile Granulozyten, Lymphozyten und eosinophile Granulozyten zu finden. Der Hauptbestandteil der BAL setzt sich hier aus Eosinophilen zusammen. Die BAL der NFATc2-defizienten Tiere weisen im Hinblick auf Makrophagen, Lymphozyten und Eosinophilen einen Anstieg im Vergleich zum sensibilisierten Wildtyp auf. Lediglich die Anzahl der Neutrophilen ist hier leicht reduziert. Zusammenfassend wird dieser Zusammenhang in der Anzahl der totalen Zellen wiedergespiegelt. Auch hier weisen die NFATc2-defizienten Tiere die höchste Zellzahl auf, während bei den unsensibilisierten Kontrollen die geringste Zellzahl zu detektieren ist.

### 3.5.3 NFATc2-defiziente Tiere zeigen eine verstärkte pulmonale Inflammation

Da die IL-9-Produktion in direktem Zusammenhang mit der Rekrutierung eosinophiler Granulozyten ins Lungengewebe gebracht wird, wurde die Anwesenheit von Granulozyten, die sich aufgrund ihrer charakteristischen Größe und Granulierung detektieren lassen, durchflusszytometrisch bestimmt. Wie in Abb.15 ersichtlich wird, sind kaum Neutrophile Granulozyten vorhanden, sodass es sich hier überwiegend um Eosinophile Granulozyten handelt.

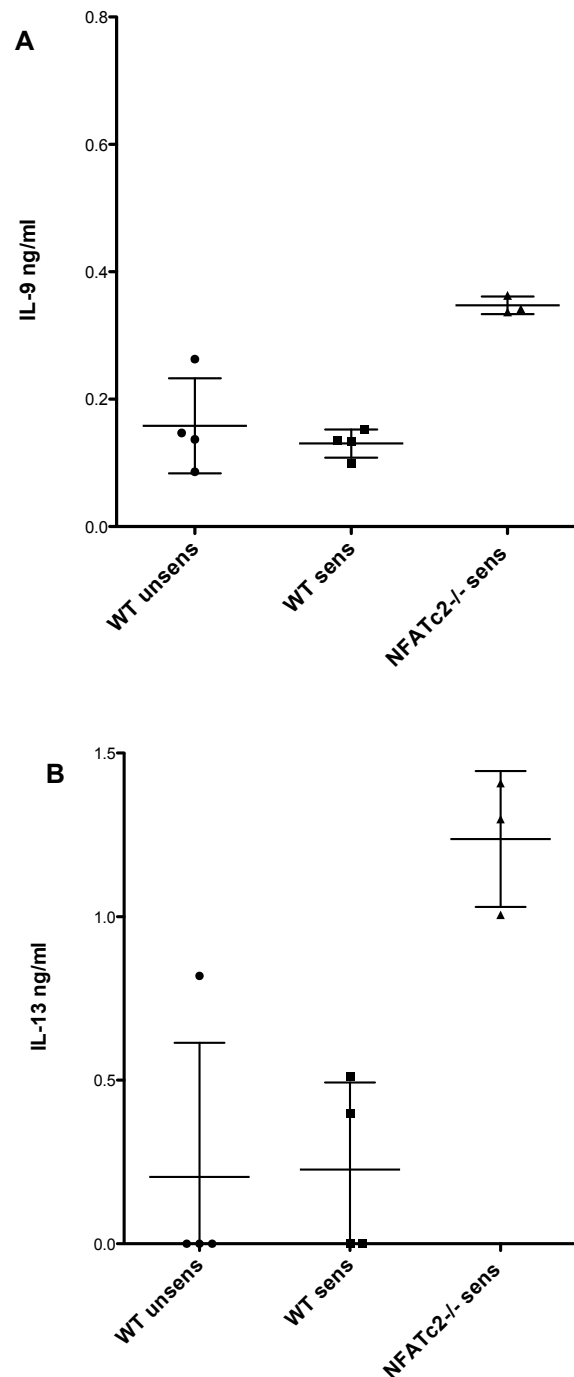


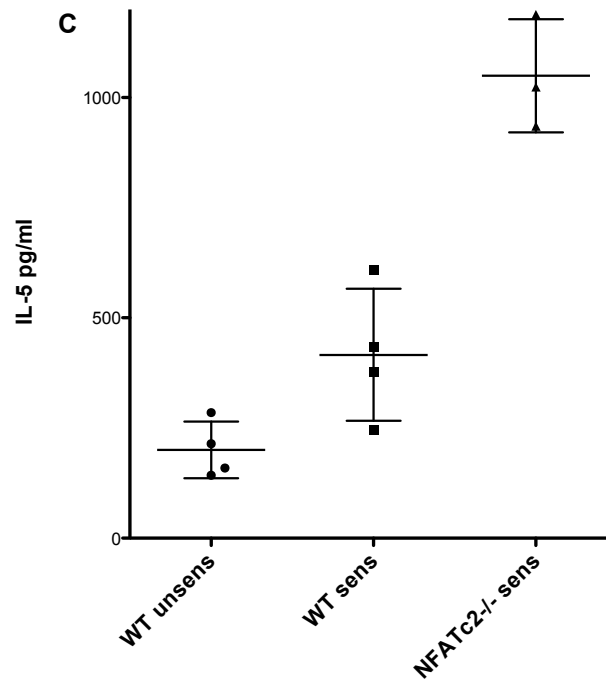
**Abb.16: Die BAL NFATc2-defizienter Mäuse weist eine erhöhte Zahl inflammatorischer Zellen auf.** Die Zellen der entnommenen BAL wurden durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Granulozyten der unsensibilisierten Wildtypkontrollen (NFATc2<sup>+/+</sup> unsens), der sensibilisierten Wildtypen (NFATc2<sup>+/+</sup> sens) und der sensibilisierten NFATc2-defizienten Tiere (NFATc2<sup>-/-</sup>).

Die durchflusszytometrische Analyse der BAL-Zellen zeigt, dass die unsensibilisierten Kontrolltiere (NFATc2<sup>+/+</sup> unsens) im Hinblick auf eine Eosinophilie vollkommen gesund sind. Wildtypische, sensibilisierte Tiere (NFATc2<sup>+/+</sup> sens) weisen mit 29% im Vergleich hierzu eine beträchtliche Anzahl dieser inflammatorischen Zellen auf. NFATc2-defiziente Tiere (NFATc2<sup>-/-</sup> sens) zeigen mit 45% die ausgeprägteste Eosinophilie, verbunden mit den stärksten asthmatischen Symptomen.

### 3.5.4 NFATc2-defiziente Tiere zeigen eine erhöhte Zytokin-Konzentrationen in der BAL

Unter der Zuhilfenahme spezifischer ELISA (IL-9, IL-5, IL-13) wurde die BAL der Versuchstiere weiter analysiert und die Anwesenheit der inflammatorischen Zytokine IL-9, IL-13 und IL-5 untersucht, welche charakteristisch für allergisches Asthma sind.





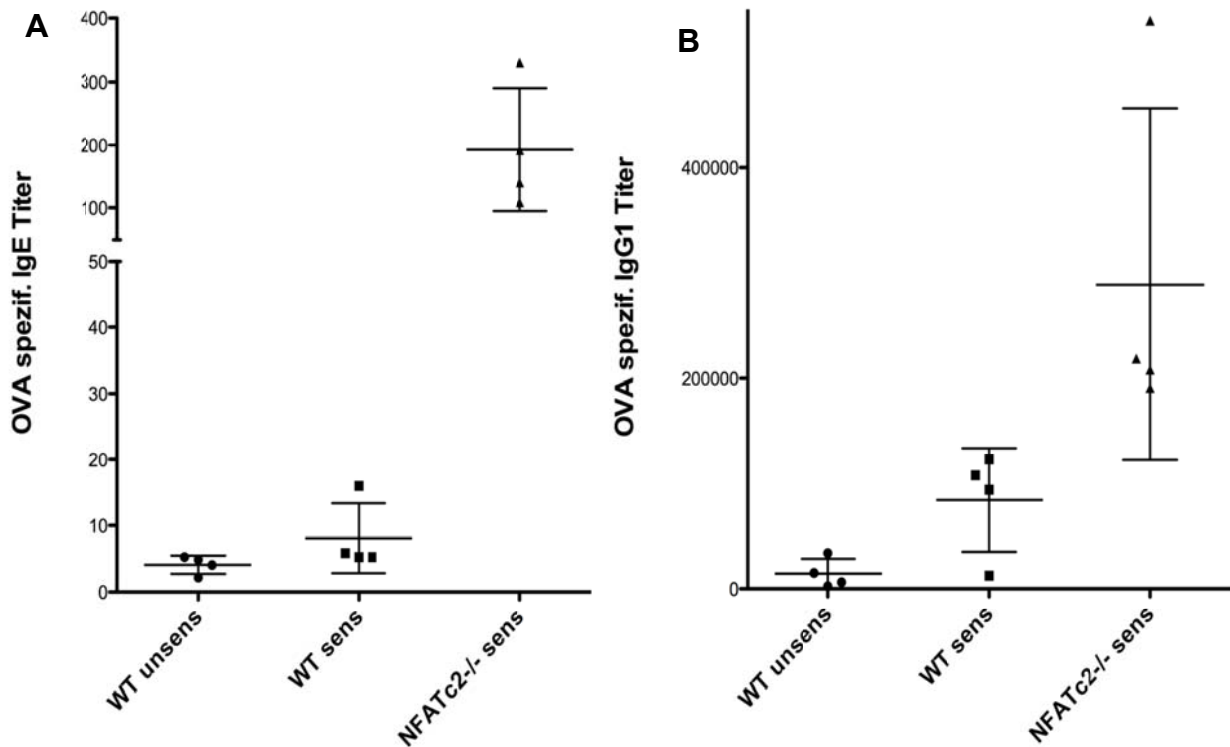
**Abb.17: NFATc2-defiziente Tiere zeigen eine erhöhte Zytokinkonzentrationen in der bronchoalveolären Lavage.** Die BAL der Versuchstiere wurde entnommen. Um die zellulären Bestandteile zu entfernen, wurde die BAL zentrifugiert (121g). Mit den Überständen wurde jeweils ein spezifischer ELISA (IL-9, IL-13 oder IL-5) durchgeführt.

Sowohl die unsensibilisierten Kontrollen, als auch die sensibilisierten Wildtypen zeigen eine geringe IL-9- und IL-13-Konzentration in der BAL. Bei den NFATc2-defizienten Tieren kann in beiden Fällen eine verstärkte Zytokinproduktion im Vergleich zu den anderen Gruppen detektiert werden.

Im Fall der IL-5-Konzentration weisen die unsensibilisierten Kontrollen die geringsten Werte in der BAL auf. Die sensibilisierten, wildtypischen Versuchstiere zeigen einen leichten Anstieg an IL-5 in der BAL. Bei den NFATc2-defizienten Tieren können auch hier die höchsten IL-5-Werte im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen detektiert werden.

### 3.5.5 Analyse der Sensibilisierung mittels Nachweis von OVA-spezifischen Antikörpern

Die Seren der Versuchstiere wurden auf die Anwesenheit der antigen-(OVA-) spezifischen Immunglobuline IgE und IgG1 untersucht. Hierdurch kann eine Aussage darüber getroffen werden, ob die einzelnen Versuchsgruppen nach der Sensibilisierung vergleichbare systemische B- und T-Zellantworten entwickeln.



**Abb.18: Die Seren der NFATc2-defizienten Tiere zeigen die höchsten OVA-spezifischen Immunglobulintiter.** 24 Stunden nach der letzten Provokation über die Atemwege wurden mit Hilfe eines ELISA die OVA spezifischen Titer der Immunglobuline IgE und IgG1 in den Seren der Versuchstiere bestimmt. Abbildung A zeigt die Titer an OVA-spezifischem IgE und Abbildung B zeigt die OVA-spezifischen IgG1-Titer.

Die Sensibilisierung und Provokation mit Ovalbumin führt zu einer Sensibilisierung aller Versuchstiere. In allen Fällen weisen die Seren der NFATc2-defizienten Tiere den höchsten Titer auf. Die sensibilisierten Wildtypkontrollen weisen im Vergleich zu den unsensibilisierten Tieren erhöhte IgE- (A) und IgG1-Level (B) auf.

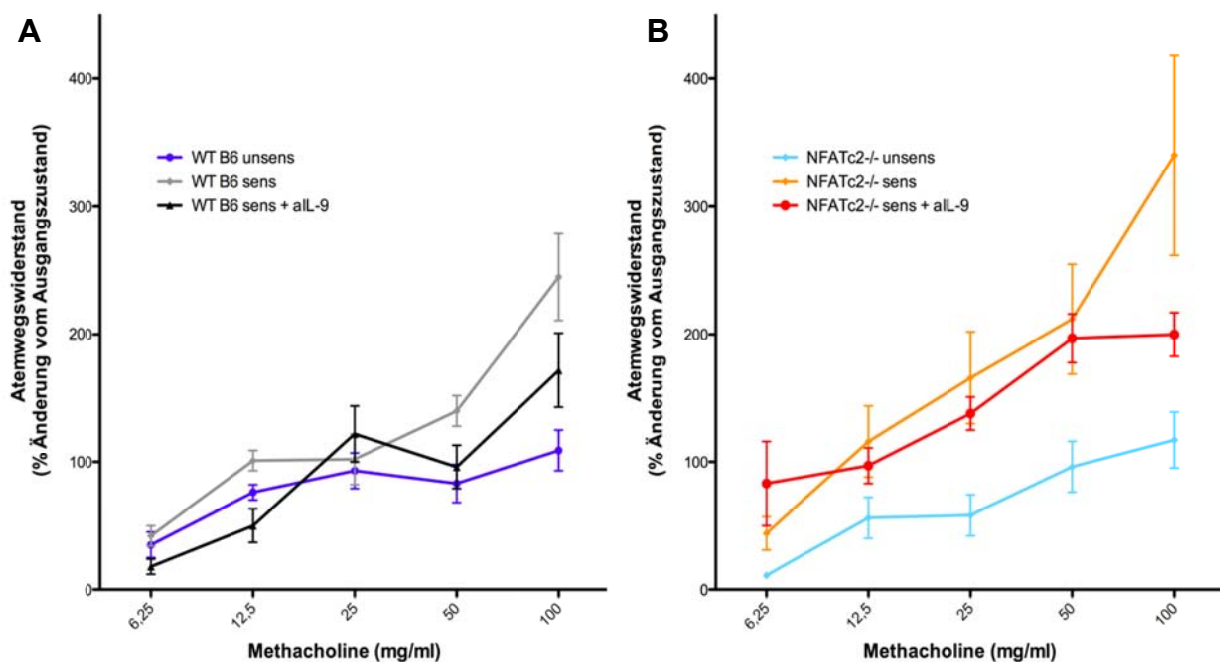
### 3.6 Die Auswirkung einer NFATc2-Defizienz in der Pathogenese des murinen Asthma bronchiale nach IL-9-Neutralisation

Es konnte gezeigt werden, dass Th<sub>9</sub>-generiertes IL-9 maßgeblich an der Pathogenese des murinen Asthma bronchiale beteiligt ist<sup>45</sup>. Da die NFATc2-defizienten Th<sub>9</sub>-Zellen eine gesteigerte IL-9-Expression aufweisen, wurden die Versuchstiere im folgenden Experiment mit einem IL-9-neutralisierenden Antikörper (aIL-9) behandelt (siehe Abb.6), um einen kausalen Zusammenhang zwischen NFATc2-Defizienz, erhöhter IL-9-Produktion und verschlimmerten Asthmasymptomen zu belegen.



### 3.6.1 Die Neutralisation von IL-9 reduziert den Atemwegswiderstand

Die Versuchstiere wurden narkotisiert und intubiert. Der Atemwegswiderstand wurde nach der Gabe steigender Dosen des Bronchokonstriktors Methacholin analysiert. In diesem Versuch wurde zusätzlich ein IL-9-neutralisierender Antikörper (MM9C1) intranasal, jeweils 30 min vor der Verneblung mit Ovalbumin verabreicht (siehe Abb.6).



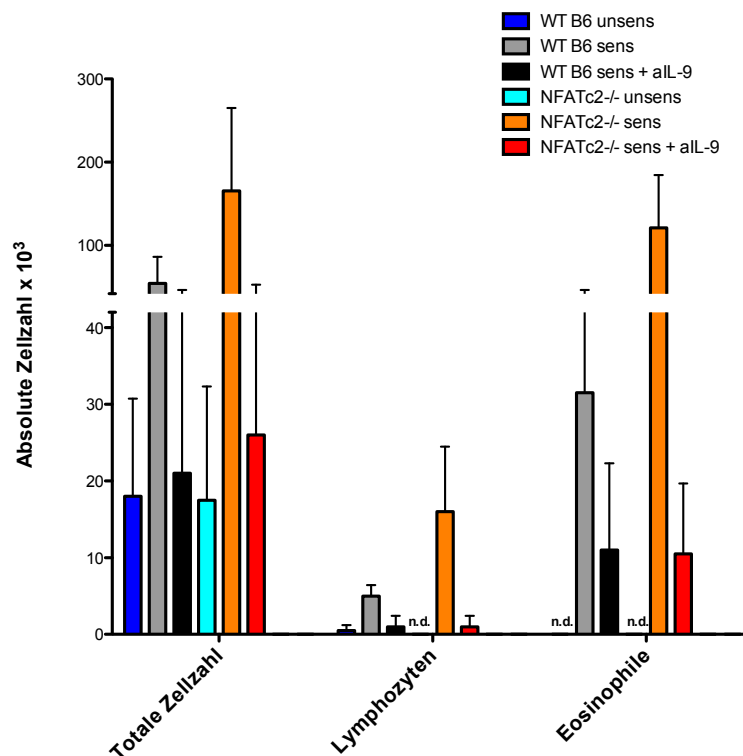
**Abb.19: Die Neutralisation von IL-9 führt zu einem reduzierten Atemwegswiderstand nach Methacholin-Provokation.** Die Sensibilisierung der Versuchstiere erfolgte durch OVA Alum-Injektion i. p. an den Tagen 0 und 14. Die Tiere wurden an den Tagen 27, 28, 29 über die Atemwege durch OVA Inhalation provoziert. Jeweils 30 min vor der Provokation wurde der IL-9-neutralisierende Antikörper MM9C1 (150 µg/Applikation) intranasal verabreicht. Die Versuchstiere wurden narkotisiert, intubiert und mit steigenden Dosen des Bronchokonstriktors Methacholin beatmet. Der Atemwegswiderstand wurde mittels flexiVent-System untersucht.

Sowohl die unsensibilisierten Wildtypen, als auch die unbehandelten NFATc2-defizienten Tiere zeigen entsprechend der Erwartung praktisch keine Änderung zum Ausgangszustand. Bei allen weiteren Gruppen ist ein dosisabhängiger Anstieg des Atemwegswiderstands nach Methacholin-Provokation zu beobachten. NFATc2-defiziente Tiere weisen den stärksten Atemwegswiderstand auf (B), während bei den sensibilisierten Wildtypentieren (A) ein deutlich geringerer Anstieg im Vergleich zu den NFATc2-defizienten Tieren zu detektieren ist. In beiden Fällen führt die Applikation

des neutralisierenden Antikörpers gegen IL-9 zu einer Verminderung des Atemwegswiderstandes nach Methacholin-Provokation, wobei allerdings nicht das Niveau der Kontrolltiere erreicht wird.

### 3.6.2 Die Neutralisation von IL-9 inhibiert die pulmonale Inflammation

Um die absoluten Zellzahlen in den Bronchien der Versuchstiere zu ermitteln, wurde nach der Bestimmung des Atemwegswiderstands auch die bronchoalveoläre Lavage (BAL) durchgeführt (siehe Material und Methoden S.42). Die Zellen der Lavage wurden fixiert. Es erfolgte eine Differentialfärbung mit anschließender, lichtmikroskopischer Analyse der zellulären Zusammensetzung.



**Abb.20: Die Blockade von IL-9 infolge der MM9C1-Applikation führt zu einer Reduktion inflammatorischer Zellen in der BAL.** Aus den BAL-Sekreten wurden Zytospins angefertigt und mittels Hämalaun, welches aus Hämatoxylin aufbereitet wird, und Eosin gefärbt. Die Zellzahlen wurden lichtmikroskopisch ermittelt. Es wurden jeweils 200 Zellen pro Präparat ausgezählt. Wurden keine Zellen eines entsprechenden Zelltyps detektiert, so wurde dies mit n.d. (= nicht detektierbar) vermerkt. Angegeben sind Mean- und SD-Werte.

Betrachtet man sich die totalen Zellzahlen, so zeigen sowohl die sensibilisierten Wildtypen, als auch die sensibilisierten NFATc2-defizienten Tiere die höchsten

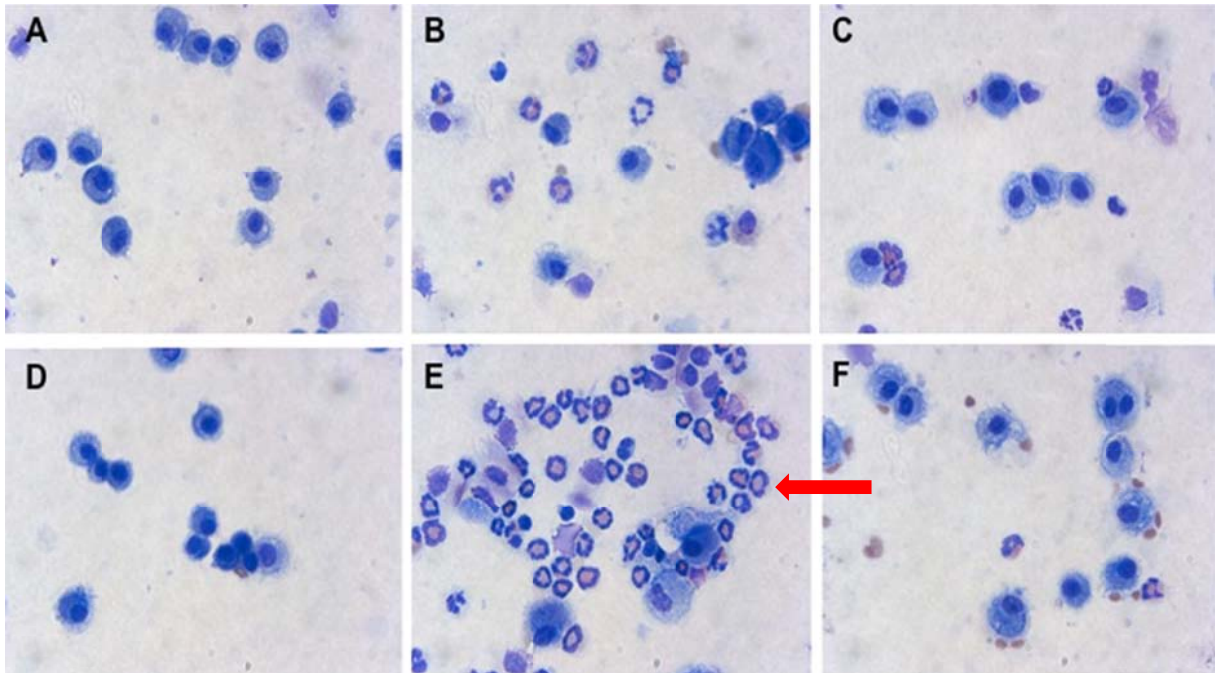
Werte. Eine Neutralisation von IL-9 führt in allen Fällen zu einer Reduktion der Gesamtzellzahl fast bis auf das Niveau der unsensibilisierten Tiere.

Die höchste absolute Zahl an Lymphozyten weist die BAL der NFATc2-defizienten Tiere auf. Die IL-9 Neutralisation führt hier zu einer Reduktion an Lymphozyten, liegt jedoch auch nach Antikörperapplikation noch über dem Wildtypniveau. Auch im Falle der wildtypischen Kontrollen führt eine Neutralisation von IL-9 zu einer verminderten absoluten Anzahl an Lymphozyten. Die unsensibilisierten Tiere zeigen kaum (Wildtyp) oder gar keine (NFATc2-*knockout*) Lymphozyten in der BAL.

Der Hauptbestandteil der BAL setzt sich hier aus eosinophilen Granulozyten zusammen. Die BAL der NFATc2-defizienten Tiere zeigt im Vergleich zu den Wildtypen eine erhöhte absolute Zahl an Eosinophilen. Die IL-9-Neutralisation führt in beiden Fällen zu einer starken Reduktion der absoluten Zellzahl, fällt bei den NFATc2-defizienten Tieren jedoch stärker aus.

### 3.6.3 Die Neutralisation von IL-9 inhibiert die pulmonale Eosinophilie

Um die Anzahl der eosinophilen Granulozyten in den Bronchien der Versuchstiere detaillierter zu untersuchen, wurden nach bronchoalveolärer Lavage Zytospin-Präparate angefertigt und diese mittels Hämatoxylin-Eosin angefärbt und lichtmikroskopisch ausgewertet.

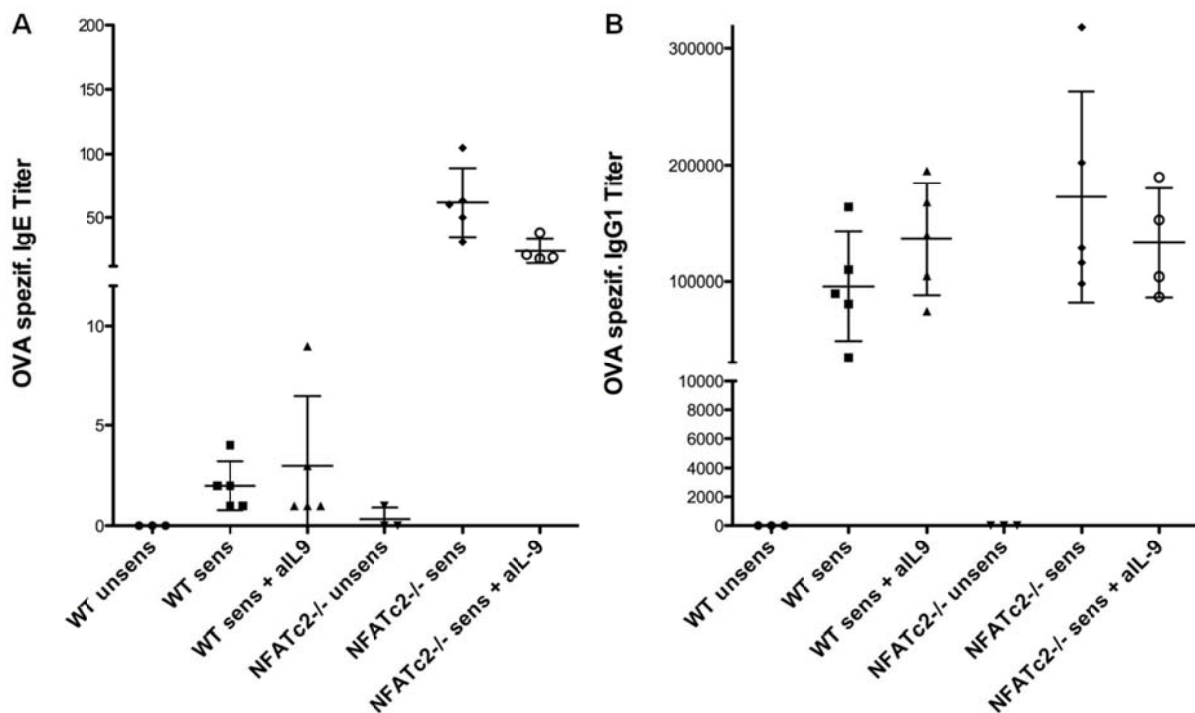


**Abb.21: Die Neutralisation von IL-9 hemmt die Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten in die Lunge.** Aus den Sekreten der BAL wurden Zytospinpräparate angefertigt und mit Hämalaun und Eosin angefärbt. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Beispiel. A = WT unsensibilisiert; B = WT sensibilisiert; C = WT sensibilisiert + aIL-9; D = NFATc2<sup>-/-</sup> unsensibilisiert; E = NFATc2<sup>-/-</sup> sensibilisiert; F = NFATc2<sup>-/-</sup> sensibilisiert + aIL-9. Der rote Pfeil markiert die Eosinophilen Granulozyten.

In Abbildung 21 ist zu erkennen, dass die unsensibilisierten Versuchstiere keinerlei pulmonale Inflammation aufweisen und lediglich Alveolarmakrophagen zu sehen sind (A und D). Abbildung B und E zeigen jeweils sensibilisierte Beispiele mit Inflammation in Form von Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten (siehe roter Pfeil). Hierbei ist zu erkennen, dass die NFATc2-defizienten Tiere (E) eine wesentlich stärkere Ausprägung einer Eosinophilie aufweisen, als die Wildtypen (B). Die Applikation des IL-9-neutralisierenden Antikörpers führt sowohl bei den wildtypischen Tieren (C), als auch bei den NFATc2-defizienten Tieren (F) zu einer reduzierten Eosinophilierekrutierung.

### 3.6.4 Einfluss der Neutralisation von IL-9 auf die Bildung von OVA-spezifischen Immunglobulinen in NFATc2-defizienten und WT Mäusen

Die Seren der Versuchstiere wurden auch hier auf die Anwesenheit der antigenspezifischen Immunglobuline IgE und IgG1 untersucht.



**Abb.22: Die Seren der NFATc2-defizienten Tiere zeigen die höchsten OVA-spezifischen Titer.** 24 Stunden nach der letzten Provokation über die Atemwege wurden mit Hilfe eines ELISA die OVA spezifischen Titer der Immunglobuline IgE und IgG1 aus den Seren der Versuchstiere bestimmt. Abbildung A zeigt die Titer an OVA-spezifischem IgE und Abbildung B zeigt die OVA-spezifischen IgG1-Titer.

Die Immunisierung und Provokation mit Ovalbumin führt zu einer Sensibilisierung der Versuchstiere. In allen Fällen weisen die Seren der NFATc2-defizienten Mäuse den höchsten Titer auf. Die sensibilisierten Wildtypkontrollen weisen im Vergleich zu den unsensibilisierten Tieren erhöhte IgE- (A) IgG1-Level (B) auf. Die all-9-Applikation wirkt sich bei den NFATc2-*knockout* Tieren, nicht jedoch bei den Wildtypen, reduzierend auf die OVA-spezifische Antikörperproduktion aus.

### **3.7 Auswirkung einer gesteigerten IL-9-Produktion durch die NFATc2-Defizienz auf die adaptive anti-Tumor Immunantwort**

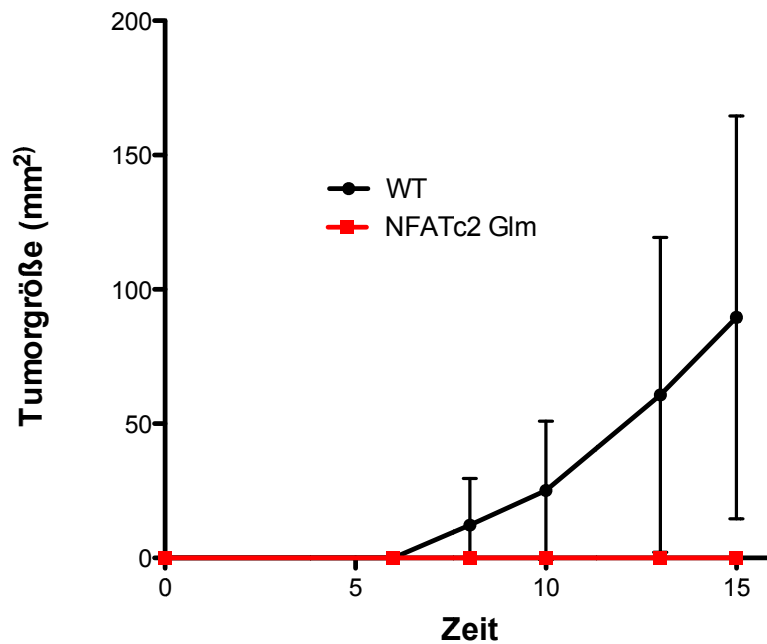
Während die proinflammatorischen Eigenschaften von IL-9 im Asthma-Modell eine Krankheits-induzierende und –verschlimmernde Wirkung haben, wirkt es hingegen in verschiedenen Tumormodellen protektiv. So konnte gezeigt werden, dass Th<sub>9</sub>-generiertes IL-9 antitumorale Aktivität in einem murinen Melanommodell aufweist<sup>53</sup>. Eine erhöhte IL-9-Produktion durch NFATc2-defiziente Th<sub>9</sub>-Zellen, im Vergleich zu wildtypischen Zellen sollte deshalb zu einer verbesserten Inhibition eines malignen Melanoms führen.

#### **3.7.1 Die NFATc2-Defizienz hat eine protektive Wirkung durch die Inhibition der Melanomzellproliferation.**

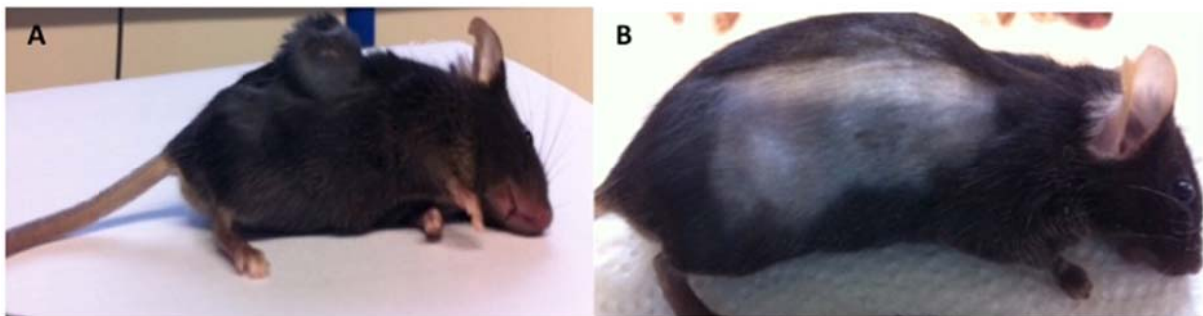
Den Versuchstieren wurden jeweils  $2 \times 10^5$  B16F10 luc<sup>2</sup>-Melanomzellen (siehe Abb.7) in einem Volumen von 50 µl PBS subkutan in die rechte Flanke appliziert. Hierzu wurden die Versuchstiere narkotisiert und die entsprechende Hautstelle rasiert. Die Tumorgroße wurde im Versuchsverlauf mehrmals bestimmt (siehe Abb. 23). Nach 16 Tagen wurde der Versuch aufgrund der starken Tumorentwicklung in den WT Kontrolltieren beendet.

---

<sup>2</sup> B16F10 luc: Mausmelanomzelllinie, die stabil Luciferase exprimiert, so dass sie alternativ zur Größenmessung *in vivo* nach Applikation von Luciferin detektiert werden kann. Von dieser Möglichkeit wurde in der vorliegenden Arbeit allerdings kein Gebrauch gemacht.



**Abb.23: Zeitlicher Verlauf des Tumorwachstums nach B16F10 luc-Melanom-Applikation.** Den Versuchstieren wurden jeweils  $2 \times 10^5$  B16F10 luc-Melanomzellen in einem Volumen von  $50 \mu\text{l}$  PBS subkutan appliziert. Das Tumorwachstum wurde an den Tagen 6, 8, 10, 13 und 15 nach Versuchsbeginn protokolliert. In der Abbildung wurden die Mittelwerte mit der entsprechenden Standardabweichung angegeben.

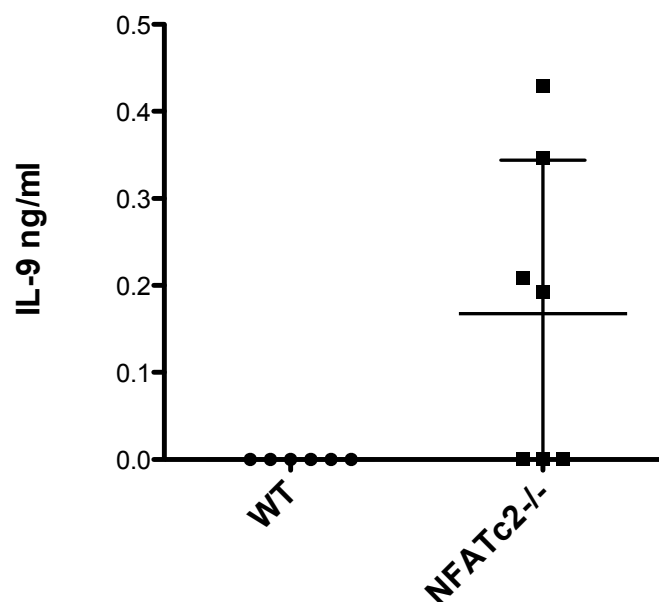


**Abb.24: NFATc2-defiziente Mäuse zeigen kein Tumorwachstum.** Den Versuchstieren wurden jeweils  $2 \times 10^5$  B16F10 luc-Melanomzellen in einem Volumen von  $50 \mu\text{l}$  PBS subkutan appliziert. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Beispiel aus jeder Versuchsgruppe.

Wie aus Abbildungen 23 und 24 ersichtlich wird, zeigen die wildtypischen Kontrolltiere nach Inokulation der Melanomzellen im Laufe des Versuchs ein ausgeprägtes Tumorwachstum. Im Gegensatz dazu zeigte keines der NFATc2-defizienten Tiere einen detektierbaren Tumor.

### 3.7.2 Die NFATc2-Defizienz führt zu einer gesteigerten IL-9-Produktion in den Milzzellen

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Resistenz zur Tumorentwicklung und einer verstärkten IL-9-Produktion zu untersuchen, wurden den Versuchstieren am Versuchsende (Tag 16) Milz und tumor-drainierenden Lymphknoten (inguinale Lymphknoten) entnommen und mittels anti-CD3/CD28 für 24h polyklonal stimuliert. Die IL-9-Produktion von Milz- und Lymphknotenzellen wurde mittels IL-9-spezifischen ELISA und quantitativer RT-PCR unter Zuhilfenahme spezifischer Oligonukleotide analysiert.



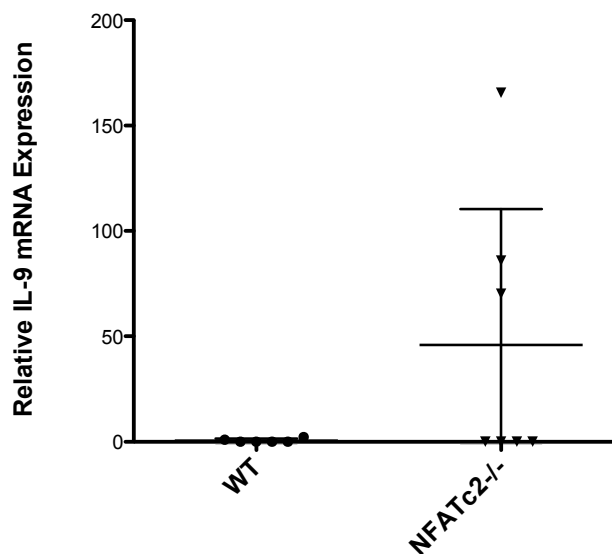
**Abb.25: Bestimmung der IL-9-Produktion der Milzzellen der Versuchstiere nach Applikation von B16F10 luc-Melanomzellen.** Die Milzen der Versuchstiere wurden an Tag 16 entnommen. Nach einer Erylyse wurden auf  $8 \times 10^6$ /ml im 48-Wellformat (500 $\mu$ l) für 48h mittels plattengebundenem anti-CD3/CD28 stimuliert. Die Zellkulturüberstände wurden mittels IL-9-spezifischem ELISA auf die Anwesenheit von IL-9 untersucht.

Abbildung 25 ist zu entnehmen, dass durch die Milzzellen der wildtypischen Versuchstiere kein IL-9 produziert wurde. Lediglich die Zellen der NFATc2 *knockout*-Tiere, welche in der Lage waren das Tumorwachstum vollständig zu unterdrücken, sezernierten teilweise (4 von 7 Tieren) IL-9.



### 3.7.3 Die NFATc2-Defizienz führt zu einer gesteigerten IL-9-Produktion in den Lymphknoten

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der gesteigerten Tumorabwehr und einer IL-9-Produktion zu untersuchen, wurden auch die tumordrainierenden Lymphknoten entnommen und ebenfalls mittels anti-CD3/CD28 für 24h stimuliert. Hier wurde die IL-9-Produktion mittels quantitativer RT-PCR untersucht.



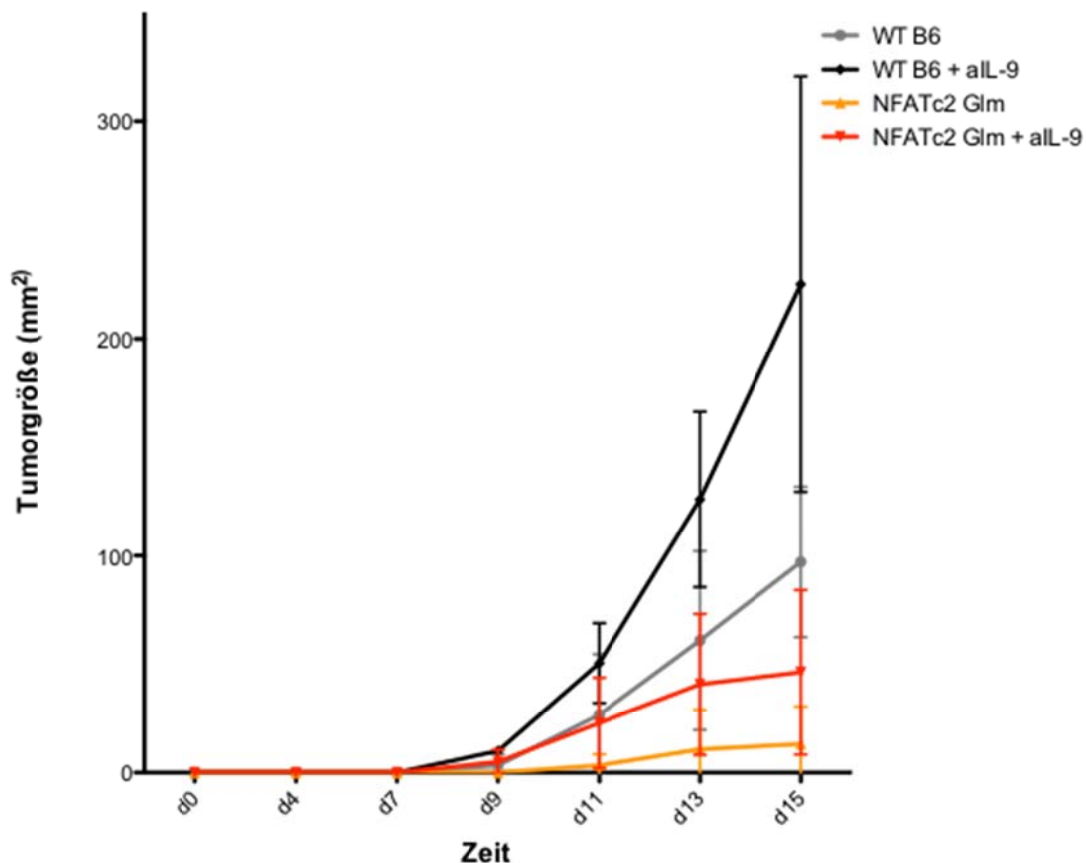
**Abb.26: Bestimmung der IL-9-Expression der Lymphknotenzellen der Versuchstiere nach Applikation von B16F10 luc-Melanomzellen.** Den Versuchstieren wurde der drainierende Lymphknoten (inguinaler Lymphknoten) entnommen. Es wurden  $2 \times 10^6$  Zellen in einem Volumen von 200  $\mu$ l für 24h mittels plattengebundenem anti-CD3/CD28 stimuliert. Die relative IL-9 mRNA-Expression wurde mittels quantitativer RT-PCR ermittelt.

Abbildung 26 zeigt, dass die Zellen der tumor-drainierenden Lymphknoten der wildtypischen Versuchstiere keine IL-9-mRNA-Expression aufweisen. Lediglich Zellen einiger (3 von 7 Tiere) NFATc2-defizienter Tiere, welche in der Lage waren das Tumorstadium vollständig zu unterdrücken, weisen eine nachweisbare IL-9-Expression auf.

### 3.7.4 Die Applikation des IL-9-neutralisierenden Antikörpers führt zu einem verstärkten Tumorwachstum

Um den Zusammenhang zwischen IL-9-Produktion und Tumorabwehr weiter zu untermauern, wurde in einem weiteren Melanomversuch mit B16F10 luc-Zellen ein IL-9-neutralisierender Antikörper (MM9C1) eingesetzt.

Hierzu wurden den Versuchstieren jeweils  $2 \times 10^5$  B16F10 luc-Melanomzellen in einem Volumen von 50  $\mu$ l PBS subkutan in die rechte Flanke appliziert. Zuvor wurden die Versuchstiere narkotisiert und die entsprechende Hautstelle wurde rasiert. Die Tumorgröße wurde im Versuchsverlauf mehrmals bestimmt (siehe Abb. 27). Den Versuchstieren wurden zu allen Messzeitpunkten 100 $\mu$ g des IL-9-neutralisierenden Antikörpers MM9C1 intraperitoneal appliziert. Nach 15 Tagen wurde der Versuch aufgrund der starken Tumorentwicklung beendet.

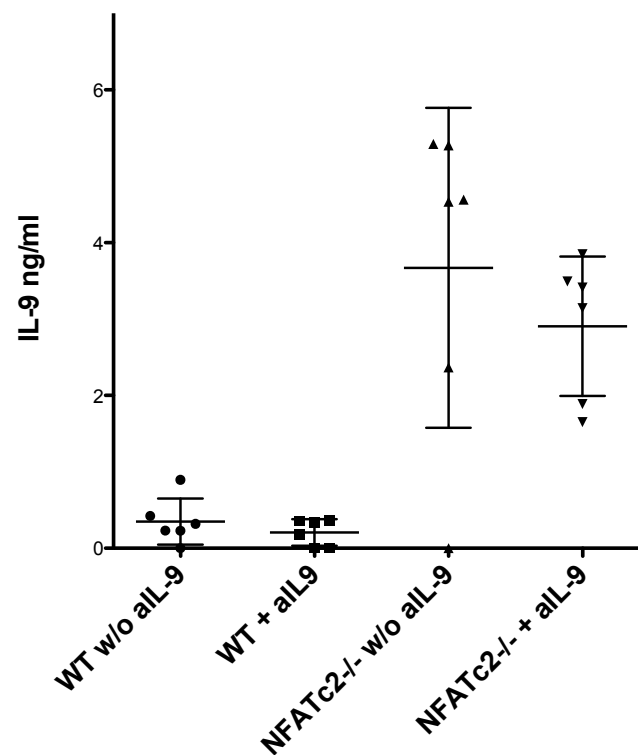


**Abb.27: Die Neutralisation von IL-9 verstärkt das Tumorwachstum.** Den Versuchstieren wurden jeweils  $2 \times 10^5$  B16F10 luc-Melanomzellen in einem Volumen von 50  $\mu$ l PBS subkutan appliziert. Das Tumorwachstum wurde an den Tagen 4, 7, 9, 11, 13 und 15 nach Versuchsbeginn protokolliert. Gleichzeitig wurden an den Tagen 4, 7, 9, 11 und 13 100 $\mu$ g des IL-9-neutralisierenden Antikörpers MM9C1 intraperitoneal appliziert. In der Abbildung wurden die Mittelwerte mit der entsprechenden Standardabweichung angegeben.

Bei allen Versuchstieren wird eine Vergrößerung des Tumors im Versuchsverlauf beobachtet. Das stärkste Tumorstadium kann bei wildtypischen Tieren beobachtet werden, welche zusätzlich mit dem IL-9-neutralisierenden Antikörper (aIL-9) behandelt wurden. Im Vergleich hierzu ist das Tumorstadium bei den wildtypischen Kontrolltieren ohne Antikörperapplikation deutlich geringer. Das geringste Tumorstadium ist bei den NFATc2-defizienten Tieren zu beobachten, welche nicht mit dem Antikörper behandelt wurden. Diese Gruppe konnte die Tumorentwicklung am stärksten unterdrücken. Die IL-9-Neutralisation führt bei den NFATc2-defizienten Tieren wiederum zu einer ausgeprägteren, dem WT annähernden Tumorentwicklung. Das Wildtypniveau wird hier dennoch nicht erreicht. In beiden Versuchsgruppen verstärkt sich das Tumorstadium nach IL-9-Neutralisation.

### 3.8 Drainierende Lymphknotenzellen der NFATc2-defizienten Tiere weisen eine verstärkte IL-9-Produktion auf

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der verbesserten Tumor-spezifischen Immunantwort und einer erhöhten IL-9-Produktion zu untersuchen, wurden auch hier die tumordrainierenden Lymphknoten der Versuchstiere entnommen und mittels plattengebundenem anti-CD3/CD28 für 72h stimuliert. Hier wurde die IL-9-Produktion mittels IL-9-spezifischem ELISA analysiert.



**Abb.28: Die Lymphknotenzellen der NFATc2-defizienten Tiere zeigen eine erhöhte IL-9-Produktion.** Die tumor-drainierenden Lymphknoten der Versuchstiere wurden an Tag 15 (Versuchsende) entnommen. Entsprechend der Angaben in Material und Methoden wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt.  $2 \times 10^6$  Zellen pro ml wurden für 72h mittels plattengebundenem anti-CD3/CD28 stimuliert. Die Zellkulturüberstände wurden mittels IL-9-spezifischem ELISA auf die Anwesenheit von IL-9 untersucht.

Abbildung 28 ist zu entnehmen, dass prinzipiell alle Versuchstiere in der Lage sind IL-9 zu produzieren. Die Lymphozyten der wildtypischen Versuchstiere weisen hierbei die geringste IL-9-Produktion auf. Lediglich die Zellen der NFATc2-defizienten Tiere, welche im Vergleich ein reduziertes Tumorwachstum zeigen, weisen eine gesteigerte IL-9-Expression auf. Die Applikation des neutralisierenden Antikörpers gegen IL-9

führt bei den Versuchstieren zu keiner signifikanten Verminderung der IL-9-Produktion der isolierten Lymphknotenzellen.



## 4 Diskussion

### 4.1 Molekulargenetische Analyse der *IL9* Genregulation in Th<sub>9</sub>-Zellen

Die Stimulation von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen unter verschiedenen Differenzierungsbedingungen, bringt verschiedene T-Helferzellsubpopulationen hervor. Hierbei spielen nicht nur Zell-Zell-Kontakte und rezeptorvermittelte Interaktionen, sondern auch das vorliegende Zytokinmilieu eine wichtige Rolle. Im Rahmen der adaptiven Immunität sind verschiedene T-Helferzellsubpopulationen in der Lage, die Immunantwort angepasst an verschiedene Pathogene zu modulieren, um diese effizient abzuwehren. Diese Wandlungsfähigkeit im Rahmen von Immunreaktionen setzt eine gewisse Flexibilität in der transkriptionellen Kontrolle voraus.

Lange Zeit wurde angenommen, dass eine bereits ausdifferenzierte T-Helferzellsubpopulation samt ihrer sogenannten „Master-Transkriptionsfaktoren“ und den jeweils charakteristischen Zytokinprofilen in sich stabil bleibt. Tatsächlich scheint es allerdings so zu sein, dass bereits ausdifferenzierte T-Helferzellen entsprechend ihrer vorliegenden Umweltbedingungen eine Variabilität aufweisen und zu einem anderen Phänotyp wechseln können, um Immunreaktionen anzupassen. So können sowohl bereits ausdifferenzierte Th<sub>2</sub>-Zellen kombinierte Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub>-Funktionen ausüben, indem sie zusätzlich zu IL-4 auch IFN- $\gamma$  produzieren und auch Th<sub>17</sub>-Zellen sind in der Lage in eine IFN- $\gamma$ -produzierenden, Th<sub>1</sub>-ähnliche Population überzugehen<sup>127,128</sup>. Bei Th<sub>9</sub>-Zellen handelt es sich um einen IL-9-produzierenden Phänotyp<sup>39</sup>. Je nach Bedingungen ist auch hier eine gewisse Flexibilität zu beobachten. So sind CD4<sup>+</sup> T-Zellen, welche unter den typischen Th<sub>9</sub>-Bedingungen stimuliert werden auch in der Lage einen IFN- $\gamma$ -produzierenden Phänotyp auszubilden<sup>129</sup>, obwohl sowohl IL-4, als auch TGF- $\beta$  als Inhibitor für die Th<sub>1</sub>-Differenzierung beschrieben sind<sup>130,131</sup>. Für diese alternative Th<sub>1</sub>-Differenzierung ist die Anwesenheit von endogenem IFN- $\gamma$  von Bedeutung. Weiter kann dieser Th<sub>1</sub>-Phänotyp durch die Anwesenheit von IL-12 gefördert werden<sup>129</sup>. Die T-Helferzellplastizität wird auch durch die Tatsache untermauert, dass sich der Th<sub>2</sub>-

Phänotyp durch die Anwesenheit von TGF- $\beta$  zu dem Th<sub>9</sub>-Phänotyp umprogrammieren lässt<sup>42</sup>.

IRF4 wurde als essentieller Aktivator für die *IL9* Genexpression in Th<sub>9</sub>-Zellen beschrieben. Allerdings muss der Transkriptionsfaktor weitere Faktoren rekrutieren, um den murinen *IL9* Promotor in vollem Umfang zu aktivieren (siehe Abb.9). Da IRF4 nicht nur für die IL-9-Expression in Th<sub>9</sub>-Zellen, sondern auch für die IL-4-Expression in Th<sub>2</sub>-Zellen und die IL-17-Produktion in Th<sub>17</sub>-Zellen von essentieller Bedeutung ist, stellt sich die Frage, ob der Kooperationspartner von IRF4 an dem jeweiligen Promotor darüber entscheidet, welcher T-Helfersubtyp sich ausprägt bzw. welches T-Helfersubtyp-spezifische Zytokin vorrangig gebildet wird. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass auch der Transkriptionsfaktor PU.1 als treibender Faktor für die IL-9-Expression in Th<sub>9</sub> Zellen angesehen werden kann<sup>47</sup>. In der Tat ist eine Interaktion der beiden Proteine beschrieben und PU.1 ist prinzipiell in der Lage mit IRF4 einen Komplex zu bilden und so IRF4 zur DNA-Bindung zu rekrutieren.

Reporteranalysen zeigen, dass eine PU.1-Überexpression alleine zu einer Aktivierung der *IL9* Promotoraktivität führt, die im Vergleich zur singulären IRF4-Überexpression leicht vermindert ist. Eine Überexpression von IRF4 in Kombination mit dem PU.1 Protein ruft die stärkste *IL9* Promotoraktivität hervor (Abb.10). Dies deutet darauf hin, dass eine direkte Interaktion von PU.1 und IRF4 am murinen *IL9* Promotor in Th<sub>9</sub>-Zellen möglich ist. Verstärkt wird diese Annahme durch die Beobachtung, dass eine Transfektion von PU.1 in Kombination mit einer IRF4-Variante, welche nicht in der Lage ist mit weiteren Transkriptionsfaktoren wie PU.1 zu interagieren, zu einer stark verminderten *IL9* Promotoraktivität führt. Es ist beschrieben, dass die Funktion des Transkriptionsfaktors PU.1 im Gegensatz zu IRF4 vor allem in bereits ausdifferenzierten Th<sub>9</sub>-Zellen von Bedeutung ist, wohingegen IRF4 auch maßgeblich für die primäre IL-9-Expression in Th<sub>9</sub>-Zellen ist<sup>45</sup>. Allgemein ist der Transkriptionsfaktor PU.1 in der Lage, Histonacetylasen zu rekrutieren, welche den *IL9* Locus öffnen und den Promotor so für die Transkription freigeben<sup>132</sup>. In den Versuchen dieser Arbeit wird durch die Transfektion der T-Zellen die zeitliche Expression der Transkriptionsfaktoren, wie sie *in vivo* vorliegt, nicht nachempfunden. Das heißt, dass hier PU.1 gleichzeitig mit IRF4 exprimiert wird, während *in vivo* die stärkste Expression von PU.1 und IRF4 wahrscheinlich zu verschiedenen Zeitpunkten in der Th<sub>9</sub>-Zelle vorliegt. Daher ist es denkbar, dass für die primäre Differenzierungsphase andere Transkriptionsfaktoren mit IRF4



interagieren, um die IL-9-Expression in entstehenden (Tag 3 nach Primäraktivierung) Th<sub>9</sub>-Zellen zu fördern und PU.1 hier eine untergeordnete Rolle spielt. Eine direkte Interaktion von PU.1 mit IRF4 in Th<sub>9</sub>-Zellen wurde bislang noch nicht beschrieben. Zudem gibt es Publikationen, die eine Beteiligung von IRF4 für die *IL9* Genexpression untermauern, gleichzeitig jedoch eine Beteiligung von PU.1 nicht nachweisen konnten<sup>133</sup>.

Der Transkriptionsfaktor NFATc2 reguliert die Zytokinproduktion und Differenzierung verschiedener T-Helferzellsubpopulationen<sup>120,122,134</sup>. Im Rahmen des Th<sub>2</sub>-Differenzierungsprogramms ist beschrieben, dass IRF4 direkt mit dem Transkriptionsfaktor NFATc2 interagieren kann und so die IL-4-Expression in diesen Zellen vorantreibt<sup>121</sup>. Hierbei geht man davon aus, dass IRF4 die NFATc2-gesteuerte Transkription verstärkt, da das Protein alleine in Reporterexperimenten keine nennenswerte Steigerung der *IL4* Promotoraktivität hervorrufen kann. Eine Überexpression von NFATc2 konnte in dieser Arbeit nicht zu einer gesteigerten Aktivierung des *IL9* Promotors führen (Abb.11). Daher kann man davon ausgehen, dass NFATc2 nicht als Interaktionspartner von IRF4 in Th<sub>9</sub>-Zellen im Hinblick auf die IL-9-Produktion fungiert. Vielmehr scheint die Anwesenheit von NFATc2 die IL-9-Expression zu stören. Eine potentielle Bindung von NFATc2 an den murinen *IL9* Promotor ist denkbar, da hierfür geeignete Bindestellen vorliegen<sup>135</sup>. Da die IL-9-Produktion in NFATc2-defizienten Th<sub>9</sub>-Zellen jedoch sowohl nach Primär-, als auch nach Sekundärstimulation stark erhöht ist (Abb.12 + 13), könnte es sogar sein, dass NFATc2 durch Bindung am Promotor Bindestellen für weitere, IL-9-fördernde Transkriptionsfaktoren besetzt und dadurch die IL-9-Produktion inhibiert. Weiter ist denkbar, dass NFATc2 in Th<sub>9</sub>-Zellen selbst Interaktionen mit IRF4-Bindungspartnern eingeht und diese somit davon abhält, mit IRF4 am *IL9* Promotor zu interagieren. Allgemein sind NFAT-Proteine in der Lage mit verschiedensten weiteren Transkriptionsfaktoren zu interagieren. So sind neben Interaktionen mit ICER, T-bet und MAF auch Interaktionen mit OCT, EGR1, EGR4 und AP1 beschrieben<sup>110</sup>. In Bezug auf Th<sub>9</sub>-Zellen, konnte gezeigt werden, dass diese den Transkriptionsfaktor c-Maf exprimieren, allerdings konnte gezeigt werden, dass dieser die *IL9* Promotoraktivität in Th<sub>9</sub>-Zellen nachweislich hemmt<sup>48</sup>. NFATc2 ist als Interaktionspartner von GATA-Proteinen am murinen *IL13* Promotor in Mastzellen von Bedeutung, wobei eine synergistische Interaktion beider Transkriptionsfaktoren vermutet wird<sup>136</sup>. In der humanen Zelllinie HEK-293 kann NFATc2 mit GATA-2

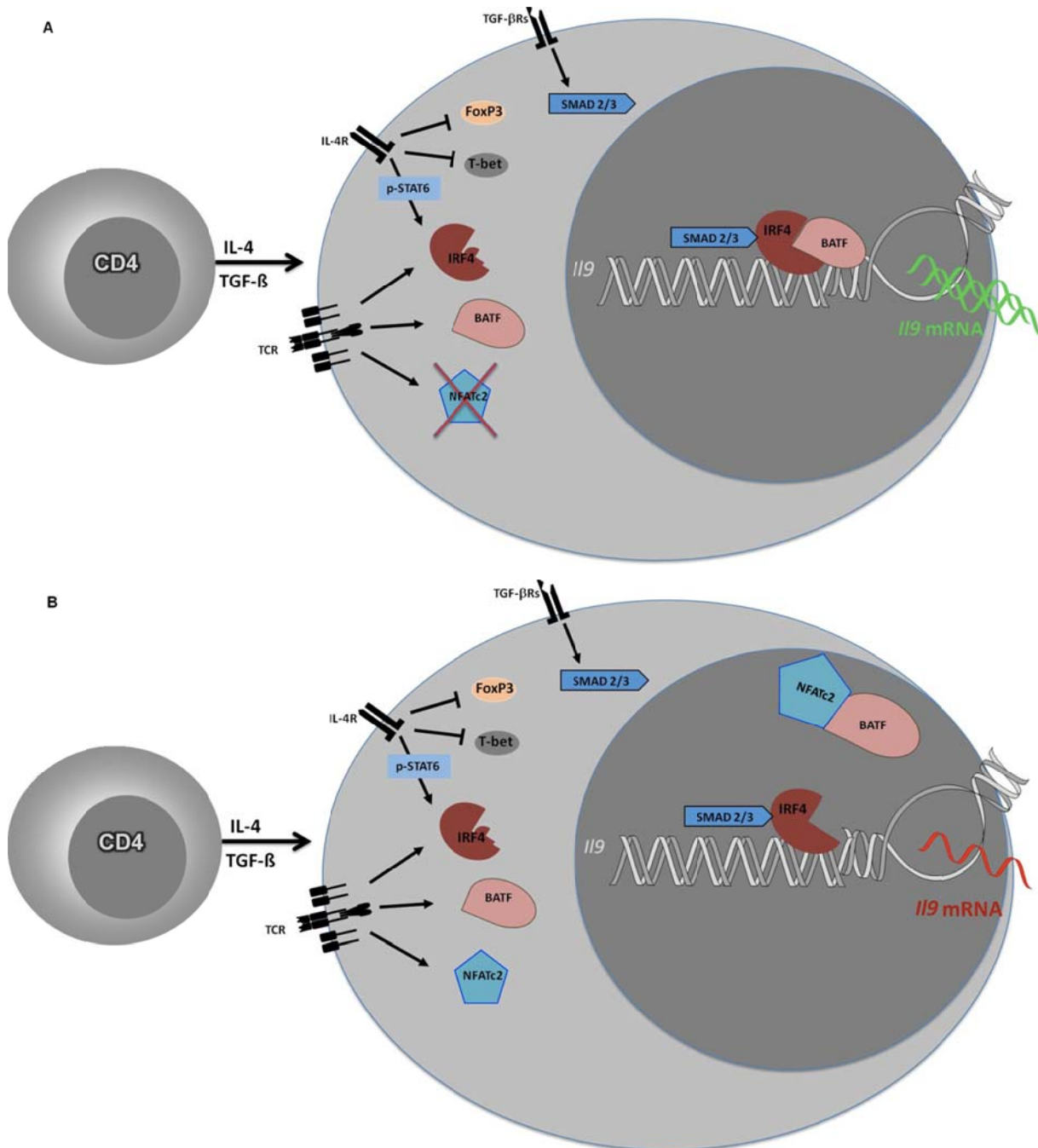
interagieren. Prinzipiell kann eine Interaktion hier darauf beruhen, dass die Zinkfinger der GATA-Proteine mit der C-terminalen Domäne der NFAT-Rel-Region interagieren<sup>136</sup>.

Es besteht die Möglichkeit, dass andere Transkriptionsfaktoren mit IRF4 interagieren können, um die IL-9-Expression in Th<sub>9</sub>-Zellen zu fördern. Sequenzanalysen konnten zeigen, dass im CNS1 des murinen //9 Promotors neben IRF4 auch Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren PU.1, GATA-3, STATs (wie zum Beispiel STAT5 und STAT6), NF $\kappa$ B und für AP1 vorliegen<sup>135,137</sup>. Der Transkriptionsfaktor BATF (B cell, activating transcription factor-like) stellt ein Mitglied der AP-1-Familie dar. In der Tat ist die Expression des Transkriptionsfaktors BATF, welcher neben IRF4 für die Th<sub>17</sub>-Differenzierung wichtig ist<sup>30,138</sup>, für das Th<sub>9</sub>-Differenzierungsprogramm von entscheidender Bedeutung<sup>139</sup>. BATF-defiziente Th<sub>9</sub>-Zellen zeigen demnach eine eingeschränkte IL-9-Expression, differenzieren allerdings auch nicht in andere T-Helferzellsubpopulationen. Eine BATF-Defizienz wirkt auch inhibitorisch auf die Expression von GATA-3 und des IL-9-fördernden Transkriptionsfaktors IRF4. Retrovirale Transduktionsversuche konnten zeigen, dass eine Kotransduktion von IRF4 und BATF zu einem starken Anstieg in der IL-9-Expression führt<sup>139</sup>. Hierbei reduziert eine IRF4-Defizienz eine optimale BATF-Bindung an den //9 Promotor und *vice versa*. In der Tat konnte schließlich eine Interaktion mit IRF4 zur Bindung an den //9 Locus in Th<sub>9</sub>-Zellen beschrieben werden<sup>139</sup>. Da NFAT-Proteine prinzipiell in der Lage sind mit AP1 zu interagieren<sup>110</sup>, ist es denkbar, dass NFATc2 die IL-9-Produktion inhibiert, indem es mit BATF direkt interagiert und somit von einer Interaktion mit IRF4 am murinen //9 Promotor abhält. Eine NFATc2-Bindung an den Promotor könnte auch dazu führen, dass BATF selbst nicht mehr binden kann.

Für die Differenzierung zum Th<sub>9</sub>-Phänotyp ist neben IL-2, die Anwesenheit von TGF- $\beta$  und IL-4 unerlässlich. TGF- $\beta$  hat in Bezug auf die T-Helferzelldifferenzierung einen pleiotropen Effekt. So differenzieren CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Anwesenheit von IL-2 und TGF- $\beta$  zu induzierten regulatorischen T-Zellen, während IL-6 zusammen mit TGF- $\beta$  die Th<sub>17</sub>-Zelldifferenzierung unterstützt. Es konnte gezeigt werden, dass TGF- $\beta$  die Differenzierung zu Th<sub>17</sub>-Zellen ermöglicht, indem es die Expression der Transkriptionsfaktoren GATA-3 oder T-bet unterdrückt und damit die Differenzierung zu Th<sub>2</sub> (GATA-3) und Th<sub>1</sub> (T-bet) inhibiert wird<sup>140</sup>. TGF- $\beta$  scheint die IL-9-Produktion dahingehend zu fördern, dass die Proteine Smad2 und Smad3 zum //9 Promotor rekrutiert werden. Smad2 und Smad3 binden den //9 Promotor jedoch nicht, sondern

verstärken hier vielmehr die Bindung von IRF4 und aktivieren die IRF4-vermittelte Transkription vor allem auch durch Histonmodifikation<sup>133</sup>.

IL-4 nimmt im Rahmen der *IL9* Genexpression Einfluss auf Faktoren, welche die Th<sub>9</sub>-Differenzierung sowohl positiv, als auch negativ beeinflussen. So ist IL-4 zum einen wichtig, um die Transkriptionsfaktoren T-bet und FoxP3 zu inhibieren und somit eine Polarisation zur Th<sub>1</sub>-Zelle oder zur regulatorischen T-Zelle zu verhindern<sup>48</sup>. Weiter ist IL-4 in der Lage den Transkriptionsfaktor STAT6 zu aktivieren, welcher wiederum maßgeblich daran beteiligt ist, dass IRF4 induziert wird, um den *IL9* Promotor zu aktivieren<sup>48</sup>. Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass IRF4, PU.1, STAT6, Smad2/3 und BATF förderlich für die IL-9-Produktion in Th<sub>9</sub>-Zellen sind, während ein positiver Einfluss von NFATc2 auf die IL-9-Expression in diesen Zellen ausgeschlossen werden kann (siehe Abb. 29).



**Abb.29: Übersicht der transkriptionellen Regulation der Th<sub>9</sub>-Differenzierung in An- und Abwesenheit von NFATc2 (Quelle: Schmitt et al., Trends in Immunology, 2014; abgewandelt).** (A) Th<sub>9</sub>-Zellen entwickeln sich in der Anwesenheit von IL-4 und TGF-β aus naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Über den IL-4 Rezeptor werden die Transkriptionsfaktoren T-bet und FoxP3 inhibiert, so dass die Differenzierung zur Th<sub>1</sub>- oder Treg-Subpopulation unterdrückt wird. Der IL-4-Signalweg führt weiter dazu, dass der Transkriptionsfaktor STAT6 rekrutiert und phosphoryliert wird, was zur Steigerung der Transkription von IRF4 führt. IRF4 bindet und aktiviert den murinen *I19* Promotor. Der TGF-β-Signalweg induziert die Rekrutierung von Smad2/3 zum *I19* Promotor. Diese Proteine binden den Genpromotor selbst nicht, verstärken jedoch die IRF4-Bindung an den Promotor und führen zur Histonmodifikation. IRF4 interagiert mit dem Transkriptionsfaktor BATF, um den *I19* Promotor in vollem Umfang zu aktivieren. (B) Die Antigen-spezifische Aktivierung einer CD4<sup>+</sup> T-Zelle ist für die T-Helferzell-differenzierung unerlässlich. Die TZR-Stimulation führt dazu, dass der Transkriptionsfaktor

NFATc2 nach Dephosphorylierung durch Calcineurin in den Zellkern wandert, und hier Einfluss auf die Genexpression nimmt. Im Falle der Th<sub>9</sub>-Differenzierung könnte NFATc2 den Transkriptionsfaktor BATF binden und diesen so daran hindern mit IRF4 zu interagieren um die IL-9-Produktion zu fördern. Die Anwesenheit des NFATc2-Proteins hemmt somit die IL-9-Produktion in Th<sub>9</sub>-Zellen.

## 4.2 Physiologische Funktion von Th<sub>9</sub>-generiertem IL-9

Th<sub>9</sub>-Zellen spielen bei der Nematodenabwehr für den Wirt eine wichtige Rolle<sup>42</sup>. Dies konnte anhand von *in vivo*-Studien nachgewiesen werden, in denen CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Mäusen, welche aufgrund eines dominant negativen TGF-β-Rezeptors nicht in der Lage waren den IL-9-produzierenden Phänotyp auszubilden, eine stärkere gastrointestinale Helminthenbelastung aufwiesen. Hier wirkt die Anwesenheit von Th<sub>9</sub>-Zellen somit protektiv für den Wirt<sup>42</sup>.

In der Pathogenese des Asthma bronchiale, hingegen führt eine verstärkte IL-9-Produktion zu einer Verschlimmerung der asthmatischen Symptome<sup>45</sup>. So äußert sich eine IL-9-Überexpression in einer verstärkten Mastzellakkumulation in den Bronchien und führt zur Ausprägung einer eosinophilen Entzündung einhergehend mit einer verstärkten Expression von Mucin-Genen und einer erhöhten Hyperreagibilität<sup>77,141</sup>. Da es sich bei Mastzellen um starke IL-9-Produzenten des angeborenen Immunsystems handelt, kann der IL-9-Effekt hierdurch weiter verstärkt werden<sup>58</sup>. Neben der IL-9-Produktion üben Mastzellen ihre asthmaprovozierende Wirkung vor allem auch durch eine verstärkte Histaminfreisetzung, sowie durch eine verstärkte Prostaglandin- und Leukotrienbildung aus<sup>142</sup>.

Es ist bekannt, dass NFATc2-defiziente Tiere allgemein gesteigerte Immunantworten in Bezug auf Infektion und Allergie aufweisen<sup>118,143</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass eine NFATc2-Defizienz in diesem Zusammenhang mit einer gesteigerten Eosinophilenrekrutierung, erhöhter Atemwegsüberempfindlichkeit, sowie mit einem stark angestiegenen IgE-Level im Serum einhergeht<sup>143,144</sup>. Die gesteigerte allergische Entzündungsreaktion, einhergehend mit der Rekrutierung eosinophiler Granulozyten basiert hier im wesentlichen auf Th<sub>2</sub>-abhängigen Effekten. Die Autoren konnten in diesem Zusammenhang eine gesteigerte *I/I4*-Expression detektieren. Hier wurde allerdings entsprechend kein Zusammenhang mit dem Th<sub>9</sub>-generierten IL-9 hergestellt.

Die Experimente dieser Arbeit zeigen, dass in einem Modell des murinen Asthma bronchiale NFATc2-Defiziente Tiere im Vergleich zu wildtypischen Kontrollen einen

erhöhten Atemwegswiderstand nach Methacholin-Provokation zeigen, sowie eine gesteigerte Anzahl an inflammatorischen Zellen, wie eosinophile Granulozyten und Lymphozyten, in der Lunge aufweisen (Abb.14, 15, 16). Eine Beteiligung von neutrophilen Granulozyten konnte hier nicht nachgewiesen werden. Da die inflammatorischen Effekte hier vermutlich zum größten Teil durch die verstärkte IL-9-Produktion der NFATc2-defizienten Zellen hervorgerufen werden, ist die Abwesenheit einer Neutrophilie nachvollziehbar, da sie durch die Anwesenheit von Th<sub>17</sub>-Zellen induziert wird<sup>145</sup>.

In der Literatur wird die NFATc2-Defizienz in Zusammenhang mit einer gesteigerten Th<sub>2</sub>-Antwort gebracht<sup>146</sup>. Diese T-Helferzellsubpopulation produziert die asthmafördernden Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13<sup>147</sup>. IL-4 spielt hier eine wichtige Rolle für den Isotypenwechsel von IgM zu IgE<sup>148,149</sup>.

Auch in vorliegender Arbeit konnte gezeigt werden, dass NFATc2-defiziente und sensibilisierte Tiere erhöhte Ig-Titer aufweisen (Abb.18). Dies spricht dafür, dass hier eine gesteigerte Th-Zellantwort vorliegt. Die IgE- und IgG1-Titer werden durch die Zytokine IL-4 und IL-13 beeinflusst, welche einen Isotypenwechsel von IgM induzieren. In der Tat konnte in der BAL der NFATc2-defizienten Tiere tatsächlich eine erhöhte IL-13- und IL-5-Sekretion nachgewiesen werden (Abb.17). Die intranasale IL-9-Neutralisation, führt weder bei den wildtypischen Kontrolltieren, noch bei den NFATc2-defizienten Tieren zu einer nennenswerten Reduktion der Ig-Titer (Abb.22). Dies beruht wahrscheinlich darauf, dass der „Klassenswitch“ zu IgG1 und IgE bereits lange vor der Antikörper-vermittelten Blockade von IL-9 an Tag 27, während der Sensibilisierungsphase stattgefunden hat.

Mastzellen, die wiederum den hochaffinen IgE-Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche tragen, können durch die Anwesenheit von IgE sehr schnell nach Antigenexposition degranulieren und proinflammatorische Mediatoren, wie Histamin, Prostaglandin oder proinflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$  freisetzen<sup>150</sup>. Diese Mediatorenfreisetzung führt unter anderem wiederum dazu, dass antigenpräsentierende Zellen (APC) zu den Lymphknoten wandern, wo sie schließlich mit den Zellen des adaptiven Immunsystems interagieren können<sup>150</sup>. So können Mastzellen die antigenabhängige Entzündung in der Pathogenese des Asthma bronchiale lokal verstärken.

Th<sub>2</sub>-generiertes IL-5 wird als wichtiger Faktor für die Proliferation von eosinophilen Vorläuferzellen betrachtet<sup>151</sup>. Entsprechend wirkt Th<sub>2</sub>-generiertes IL-5 chemotaktisch

in Bezug auf die Rekrutierung eosinophiler Granulozyten in die Lunge. Das Zytokin wirkt in diesem Zusammenhang synergistisch mit dem Chemokin Eotaxin<sup>152,153</sup>. Auch ist IL-5 maßgeblich an der Ausprägung einer bronchialen Hyperreagibilität beteiligt<sup>154</sup>. In IL-4-defizienten Mäusen kann eine IL-5-Applikation sogar eine fehlende Atemwegsüberempfindlichkeit wiederherstellen<sup>155</sup>. Das pleiotrope Zytokin IL-13 hat im Asthma bronchiale einen direkten Effekt auf die Lungenepithelzellen und wirkt hier stark fördernd auf die Mukusproduktion. Zusätzlich verstärkt es die Eotaxin-Produktion<sup>156</sup>. Es wird neben den Th<sub>2</sub>-Zellen auch von Mastzellen produziert<sup>157</sup>. Hier wird ein indirekter Effekt von IL-9 beschrieben, welcher darauf beruht, dass IL-9 durch Induktion von IL-13 in Lungenepithelzellen Asthma-Symptome vermitteln kann<sup>77</sup>. Da in der BAL der NFATc2-defizienten Versuchstiere neben IL-9 auch verstärkt IL-13 detektiert werden konnte, ist es möglich, dass die gesteigerte IL-13-Produktion hier die IL-9-vermittelten Symptome weiter verstärkt.

Ursprünglich wurde angenommen, dass das proinflammatorische Zytokin IL-9, unter anderem von Th<sub>2</sub>-Zellen sekretiert wird<sup>147</sup>. Das *IL9* Gen wird auch als „Asthma-Gen“ bezeichnet und stellt ein Risikofaktor für die Entwicklung von Asthma in Bezug auf bronchiale Hyperreagibilität und Atopie dar<sup>75</sup>. Die asthmafördernde Wirkung von Th<sub>2</sub>-Zellen scheint hier jedoch nicht hauptsächlich in der IL-9-Produktion dieser Zellen begründet zu sein. So zeigen Experimente, in denen T-Zellose Mäusen Th<sub>2</sub>- und Th<sub>9</sub>-Zellen in Kombination mit einem IL-9-neutralisierenden Antikörper verabreicht wurden, dass eine Th<sub>2</sub>-basierte IL-9-Neutralisation kaum zu einer Verbesserung der asthmatischen Symptome führt. Wird hingegen Th<sub>9</sub>-generiertes IL-9 neutralisiert, so zeigt sich hier ein kurativer Effekt in Hinblick auf Mukusproduktion, Atemwegswiderstand und Eosinophilenbelastung in der Lunge der Versuchstiere<sup>45</sup>. Somit stellen die Th<sub>9</sub>-Zellen in der Pathogenese des Asthma bronchiale unter den T-Helferzellen, die Haupt-IL-9-Produzenten dar, während Th<sub>2</sub>-Zellen offensichtlich – zumindest im verwendeten Asthma-Modell – kaum physiologisch relevante Mengen produzieren.

Auch in vorliegender Arbeit ist der stärker ausgeprägte Krankheitsverlauf der NFATc2-defizienten Tiere auf die verstärkte IL-9-Produktion zurückzuführen. Dies wurde anhand von Neutralisationsversuchen bestätigt. Entsprechend führt eine Applikation des IL-9-neutralisierenden Antikörpers MM9C1 zu einer Reduktion des Atemwegswiderstands, sowie zu einer Reduktion in der Eosinophilenzahl in der BAL der entsprechenden Versuchstiere (Abb.19, 20, 21). IL-9 fördert die Ausbildung von

asthmatischen Symptomen im Krankheitsverlauf. So ist beschrieben, dass im Rahmen einer chronisch allergischen Entzündung IL-9 auch die Anzahl an Mastzellen in der Lunge erhöht<sup>158</sup>. Eine IL-9-Neutralisation schützt zusätzlich vor pathologischen Umbauprozessen der Atemwege, dem sogenannten „airway remodeling“. Im Zuge dieser Umbauprozesse werden elastische Fasern des Lungengewebes durch Kollagenfilamente ersetzt, wodurch es zu einer Verdickung der Bronchialwände kommt und sich die Lungenfunktion weiter verschlechtert. Neben Kollagen können im Zuge des „Remodelings“ auch weitere extrazelluläre Matrixproteine wie Fibronectin und Tenascin abgelagert werden<sup>158</sup>. Weiter fördert IL-9 während des Gewebeumbaus die Expression von TGF- $\beta$ , welches beispielsweise durch Lungenepithelzellen produziert wird<sup>158</sup>. Da die Anwesenheit von TGF- $\beta$  dazu führen kann, dass Th<sub>2</sub>-Zellen zu Th<sub>9</sub>-Zellen programmiert werden können<sup>42</sup>, könnte dies weiter zu einer verstärkten IL-9-Sekretion führen und das Krankheitsbild autokrin weiter verschlimmern.

Dies könnte auch den gesteigerten IL-9-Effekt in den NFATc2-defizienten Tieren noch weiter erhöhen, da diese Tiere allgemein zu einer gesteigerten Th<sub>2</sub>-Antwort neigen. Hier könnte TGF- $\beta$  somit zur verstärkten Th<sub>9</sub>-Differenzierung bzw. Th<sub>9</sub>-Umprogrammierung aus bereits anwesenden Th<sub>2</sub>-Zellen führen und den in dieser Arbeit beschriebenen IL-9-Effekt weiter verstärken.

Neben den Th<sub>9</sub>-Zellen, sind weitere IL-9-produzierende Zellen beschrieben, welche einen asthmafördernden Einfluss durch IL-9-Expression ausüben können. Kürzlich wurde publiziert, dass auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen, analog zu Th<sub>9</sub>-Zellen, in der Lage sind, in Anwesenheit von TGF- $\beta$  und IL-4 verstärkt IL-9 zu produzieren<sup>159</sup>. Auch hier ist die IL-9-Expression von den Transkriptionsfaktoren STAT6 und IRF4 abhängig und es konnte gezeigt werden, dass solche CD8<sup>+</sup> Tc9-Zellen maßgeblich die Th<sub>2</sub>-vermittelte Atemwegsentzündung fördern<sup>159</sup>. Neben dem Krankheitsbild des Asthma bronchiale spielen die IL-9-produzierenden Tc9-Zellen auch human eine wichtige Rolle bei atopischen Erkrankungen. So konnte die verstärkte Anwesenheit von humanen Tc9-Zellen im peripheren Blut von Patienten mit einer chronisch, atopischen Dermatitis nachgewiesen werden. Da der Fokus in dieser Arbeit auf Th<sub>9</sub>-Zellen lag, kann keine Aussage darüber getroffen werden, wie sich die NFATc2-Defizienz auf die IL-9-Produktion in Tc9-Zellen auswirkt und welchen Einfluss dies auf die Ausprägung von asthmatischen Symptomen haben könnte.



Hinsichtlich Mastzell-generiertem IL-9 zeigen präliminäre Ergebnisse, dass im Gegensatz zu Th<sub>9</sub>-Zellen, eine NFATc2-Defizienz in Mastzellen zu einer Reduktion der IL-9-Expression führt (Daten nicht gezeigt). Dies untermauert die wichtige Rolle der NFATc2-defizienten Th<sub>9</sub>-Zellen im Asthma weiter, da die IL-9-Produktion hier sogar die verminderte IL-9-Produktion durch Mastzellen ausgleichen könnte. Die Krankheits-verschlimmernde Wirkung von IL-9 in der Pathogenese des Asthma bronchiale ist inzwischen allgemein anerkannt. Die Pharmaindustrie hat deshalb mittlerweile einen humanisierten, monoklonalen Antikörper gegen IL-9 entwickelt, der bereits in einer Phase2a-Studie erstmals zum Einsatz beim Patienten kam. Hier konnte nachweislich gezeigt werden, dass der Antikörper MEDI-528 prinzipiell subkutan bei moderatem Asthma eingesetzt werden könnte<sup>160</sup>. In der folgenden Phase2b-Studie mit Probanden mit unkontrolliertem moderatem bis schwerem Asthma, zeigte sich jedoch, dass die IL-9-Neutralisation zusätzlich zu einer bereits bestehenden anti-Asthmamedikation keine wesentlichen Verbesserungen für den Patienten bringt<sup>161</sup>. Dies deutet darauf hin, dass eine IL-9-Neutralisation alleine eventuell nicht ausreicht, um starkes Asthma zu verbessern. Hier könnte auch IL-13 die IL-9-Effekte kompensieren<sup>162</sup>. Daher wäre eventuell eine Kombination beider Antikörper ein Ansatz zur Asthmatherapie bei schwerem, unkontrollierbarem Asthma. Weiter ist denkbar, dass das IL-9, welches nach Zell-Zell-Kontakt gebildet wird, nach Sezernierung an der immunologischen Synapse nicht frei zugänglich ist und als Folge dessen die IL-9-Effekte nur unzureichend mittels Antikörper inhibiert werden können<sup>163</sup>.

Zwei kürzlich veröffentlichte Publikationen deuten darauf hin, dass Th<sub>9</sub>-Zellen eine wichtige Rolle im Rahmen einer protektiven anti-Tumor-Immunantwort spielen könnten. So zeigen Experimente, dass der adoptive Transfer von Th<sub>9</sub>-Zellen in einem Modell mit B16F10-Tumorzellen zu einer anti-Tumorantwort führt<sup>52</sup>. Diese Beobachtung konnte auch in einem Modell der Lungenmetastasierung untermauert werden, da hier die Neutralisation des proinflammatorischen IL-9 zu einer Verschlimmerung der Krankheitsbildes führt<sup>53</sup>.

Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine gesteigerte Tumorabwehr mit einer erhöhten IL-9-Expression einhergeht. Entsprechend wirkt die NFATc2-Defizienz verzögernd auf das Melanomwachstum. In einem Experiment waren die *knockout*-Tiere in der Lage das Tumorwachstum ohne Ausnahme komplett (Abb.23 + 24) und in einem anderen Experiment stark zu inhibieren (Abb.27). Die restimulierten

Milz- und Lymphknotenzellen der Versuchstiere, die das Tumorwachstum komplett unterdrücken konnten, weisen zumindest zum Teil eine gesteigerte IL-9-Produktion im Vergleich zu den erkrankten Versuchstieren auf (Abb.25 + 26).

Bei den Versuchstieren handelt es sich um eine komplette NFATc2-Defizienz. Entsprechend sind nicht nur die T-Zellen betroffen und prinzipiell können weitere Effekte nicht ausgeschlossen werden. Daher war es von großer Bedeutung die IL-9-Abhängigkeit in diesem System weiter zu untermauern. Dass dieser anti-Tumoreffekt tatsächlich in der gesteigerten IL-9-Produktion des NFATc2-defizienten Tiere begründet liegt, wird dadurch gestärkt, dass eine Neutralisation von IL-9 durch i.p.-Applikation eines entsprechenden Antikörpers, wiederum zu einem verstärkten Tumorwachstum führt (Abb.27). Die IL-9-Neutralisation führt in den NFATc2-defizienten Tieren allerdings nicht dazu, dass im Bezug auf das Tumorwachstum das Wildtypniveau erreicht wird. Dies könnte dadurch begründet sein, dass die NFATc2-defizienten Th<sub>9</sub>-Zellen so große Mengen an IL-9 produzieren, dass diese *in vivo* nicht mehr völlig neutralisiert werden können.

Die gesteigerte IL-9-Antwort in den NFATc2-*knockout* Tieren könnte dazu führen, dass zum einen im Tumorgewebe lokal verstärkt das Chemokin CCL20 exprimiert wird und hierdurch die Tumorabwehr über CCL20-vermittelte Rekrutierung von dendritischen Zellen und aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen bewerkstelligt wird<sup>53</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen, welche auf ihrer Oberfläche den CCL20-Rezeptor CCR6 tragen in den Tumor infiltrieren. Diese CD8<sup>+</sup> T-Zellen können mittels ihres zytotoxischen Potentials eine Zerstörung der Tumorzellen herbeiführen. Th<sub>9</sub>-Zellen können hier als Helferzellen fungieren und unterstützend dabei wirken CD8<sup>+</sup> T-Zellen über eine CCL20/CCR6-abhängige DC-Rekrutierung zu aktivieren, sodass eine tumorspezifische, zytotoxische Antwort in den tumor-drainierenden Lymphknoten ausgelöst wird<sup>53</sup>. Während in diesem Modell eine antitumorale Wirkung von Mastzellen ausgeschlossen wird, zeigen weitere Experimente mit Mastzell-defizienten Tieren, dass der IL-9-vermittelte anti-Tumoreffekt in der Anwesenheit von Mastzellen begründet liegt<sup>52</sup>. In der Tat wurde IL-9 bereits als Wachstumsfaktor für Mastzellen beschrieben<sup>62</sup>. Eine tragende Rolle von Mastzellen bei der Tumorabwehr ist denkbar, da Mastzellen im Rahmen einer Entzündungsreaktion sowohl die Migration, als auch die Aktivierung von dendritischen Zellen fördern. Entsprechend können diese dann Tumorantigene aufnehmen und prozessieren (Kreuzpräsentation

mittels MHC I)<sup>3</sup> und eine zytotoxische Reaktion durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen initiieren<sup>164</sup>. Human konnte gezeigt werden, dass Patienten mit malignen Tumoren auf die Anwesenheit bakterieller Endotoxine mit einer gesteigerten antitumoralen Antwort reagieren<sup>165</sup>. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass solche proinflammatorischen, bakteriellen Substanzen sehr schnell die Bildung sogenannter endogener Pyrogene induzieren, zu denen auch das Zytokin IL-1 gehört. IL-1 ist wiederum nachweislich in der Lage die IL-9-Produktion durch T-Zellen und Mastzellen zu fördern<sup>41,62</sup>.

Bei der Behandlung von Melanomen kommen verschiedenste Methoden zum Einsatz. Operative Eingriffe reichen von der Exzision des Primärtumors, bis hin zur Lymphknoten-Dissektion. Als postoperative Therapien kommen auch Chemotherapeutika zum Einsatz. Allerdings zeichnen sich maligne Melanome durch eine starke Apoptoseresistenz aus, welche mit einer gesteigerten Chemoresistenz einhergeht<sup>82</sup>. Ein weiteres Problem des malignen Melanoms stellt die hohe Metastasierungsrate dar. Vor allem hier gibt es noch keinen Therapieansatz, welcher die Überlebensrate von betroffenen Patienten wesentlich verlängern kann<sup>83</sup>. Aufgrund dieser begrenzten Verfügbarkeit an adäquaten Therapien, könnte die Förderung der IL-9-Produktion von Th<sub>9</sub>-Zellen hier einen innovativen Ansatzpunkt für eine verbesserte Behandlungsstrategie bieten.

Allgemein handelt sich bei einer Antitumorantwort immer auch um eine Autoimmunreaktion<sup>166</sup>. Im Falle des malignen Melanoms ist eine typische Begleiterscheinung das Krankheitsbild der Vitiligo („Weißfleckenkrankheit“), welche sich dadurch auszeichnet, dass die Patienten pigmentfreie Hautflecken aufweisen, da bei dieser Autoimmunreaktion die Melanozyten zerstört werden. Es besteht eine positive Korrelation zwischen dem Auftreten der Vitiligo und der Überlebensrate metastasierender Melanompatienten. Ebenso konnte man nachweisen, dass Vitiligopatienten melanomspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen aufweisen, welche neben den normalen Melanozyten auch Melanomzellen erkennen können<sup>166</sup>. Diese Autoimmunreaktion stellt für den betroffenen Patienten allerdings kein der Tumorbelastung vergleichbares Risiko dar und kann auch nur transient auftreten. In jedem Fall weist sie darauf hin, dass eine Immunreaktion gegen Tumorzellen

---

<sup>3</sup>Kreuzpräsentation: DC sind in der Lage endozytierte (Glyco-)Proteine, die normalerweise assoziiert mit MHC II präsentiert werden, auch als (Glyco-)Peptid gebunden an MHC I zu präsentieren, wodurch CD8<sup>+</sup> T-zellen aktiviert werden können.

induziert wurde. In diesem Zusammenhang spielt auch IL-9 eine wichtige Rolle. So zeigen Experimente mit Mäusen, denen ein B16-Melanom appliziert wurde eine gesteigerte Antitumorantwort, wenn ihnen IL-9-produzierende CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Tc9) im Vergleich zu Tc1-Zellen (CD8<sup>+</sup> T-Zellen ohne IL-9-Produktion) adoptiv transferiert wurden<sup>167</sup>. Begleitend zur Tumorregression konnte hier auch die Ausprägung einer Vitiligo nachgewiesen werden. Dies untermauert das prinzipiell klinische Potential von IL-9 in Bezug auf die Melanomtherapie weiter.

Eine systemische Behandlung von Melanompatienten mit IL-9 sollte jedoch kritisch betrachtet werden, da das Protein stark inflammatorische Eigenschaften besitzt und stark asthmaprovozierendes Potenzial aufweist<sup>45</sup>. Bei einer solchen IL-9-Applikation könnte ein reduziertes Tumorwachstum entsprechend mit starken Inflammationen einhergehen. Weiter kann IL-9 als potenter Wachstumsfaktor für weitere IL-9-produzierende Zellen, wie auch Mastzellen wirken<sup>62</sup>. Diese Mastzellen wiederum könnten die Tumorangiogenese fördern und somit das Tumorwachstum und eine mögliche Metastasierung positiv beeinflussen<sup>168,169</sup>. Die Angiogenese wird hier durch die Freisetzung verschiedenster Faktoren wie TGF- $\beta$ , TNF $\alpha$ , Chymase und Tryptase gefördert<sup>170</sup>. Allerdings können Mastzellen auch eine kurative Wirkung bei einer Tumorerkrankung entfalten, die maßgeblich von ihrer Aktivierung und der daraus resultierenden Mediatorenfreisetzung abhängt. Um Tumorzellen zu bekämpfen sind Mastzellen zum einen in der Lage weitere Zellen wie Makrophagen, NK-Zellen und CD3<sup>+</sup> T-Zellen zu rekrutieren, welche das Tumorwachstum hemmen. Weiter ist beschrieben, dass die Anwesenheit von TNF $\alpha$ , IL-6 und IL-1 das Wachstum von Melanomen supprimiert<sup>170</sup>.

Das multifunktionale, proinflammatorische Zytokin IL-9 kann also sowohl einen heilsamen als auch einen schädlichen Einfluss auf Immunreaktionen ausüben. So kann IL-9 tolerante Milieubedingungen schaffen und inhibitorisch in Bezug auf autoaggressive Immunreaktionen wirken, indem es die suppressiven Eigenschaften von regulatorischen T-Zellen und Mastzellen fördert<sup>43,171</sup>. Weiter kann IL-9 jedoch die Ausprägung allergischer Reaktionen stark fördern und somit eine unangemessene, überschießende Immunreaktion gegen mehr oder weniger ungefährliche Antigene herbeiführen<sup>45</sup>. Andererseits wurde für IL-9 sowohl eine prophylaktische, als auch eine therapeutische Wirkung in einem experimentalen B16-Melanom-Modell beschrieben<sup>53</sup>. Entsprechend dieser Ergebnisse, wurde in der vorliegenden Arbeit gefunden, dass NFATc2-defiziente Th<sub>9</sub>-Zellen eine erhöhte IL-9-Produktion

aufweisen. Dies führte einerseits zu verschlimmerten allergischen Reaktionen und andererseits zu einer kurativen anti-Melanom Immunreaktion. Dies macht nochmals deutlich, dass eine gewisse Balance im Immunsystem unabdingbar ist, um überschießende Immunreaktionen zu verhindern (Asthma), während gleichzeitig eine wirkungsvolle anti-Tumorreaktion generiert wird.

Insgesamt, lassen all diese Daten klar erkennen, dass die systemische Applikation von pleiotropen Zytokinen wie IL-9 in Analogie zu Erfahrungen, die bereits mit anderen Zytokinen wie IL-2 und TNF- $\alpha$  gemacht wurden, eine Vielzahl von unerwünschten Nebenwirkungen hervorrufen kann<sup>172</sup>. Einwirkdauer, Konzentration und Lokalisation haben darauf sicher einen wesentlichen Einfluss. Weitere detaillierte Analysen der Produktion und Bioaktivität von IL-9 werden notwendig sein, um in Zukunft, das zweifellos vorhandene therapeutische Potential dieses Zytokins ausschöpfen zu können. Ein erfolgversprechender Schritt in diese Richtung ist zum Beispiel, dass ein IL-9-Expressionsvektor in Vesikel verpackt wird, welche dann zielgerichtet über entsprechende monoklonale Antikörper an Tumor-assoziierte Oberflächenmoleküle binden und von diesen aufgenommen werden, so dass IL-9 nur lokal im Tumormilieu in hoher Konzentration auftritt. Präliminäre Experimente zeigen, dass stabilisierte IL-9 mRNA nach Elektroporation zu einer massiven Produktion von IL-9 in Tumorzelllinien führt (Natascha Stergiou; nicht publiziert). In zukünftigen Experimenten wird die „Targetingstrategie“ ausgearbeitet werden, so dass solche Tumorzellen auch *in vivo* möglichst selektiv von einem IL-9-Expressionsvektor erreicht werden können.



## 5 Zusammenfassung

CD4<sup>+</sup> T-Zellen können in verschiedene T-Helferzellsubpopulationen differenzieren. Dabei hängt es von verschiedensten Milieubedingungen ab, welche Subpopulation sich ausprägt, damit die CD4<sup>+</sup> T-Zelle durch die Sekretion verschiedenster Zytokine ihre Funktion im Immunsystem wahrnehmen kann.

Bei der Th<sub>9</sub>-Subpopulation handelt es sich um einen IL-9-produzierenden Phänotyp, welcher sich in der Anwesenheit von TGF-β und IL-4 entwickelt<sup>39</sup>. Als treibender Transkriptionsfaktor für diese Subpopulation wurde das Protein IRF4 beschrieben<sup>45</sup>. Da dieser Transkriptionsfaktor auch für die Differenzierung weiterer Subpopulationen, wie Th<sub>2</sub>- und Th<sub>17</sub>-Zellen von Bedeutung ist<sup>30,121</sup>, stellte sich die Frage, welcher Interaktionspartner von IRF4 darüber entscheidet, welcher Subtyp sich entwickelt. Deshalb wurde in dieser Arbeit der Transkriptionsfaktor NFATc2 als möglicher Interaktionspartner für IRF4 am murinen *IL9* Promotor untersucht. Allerdings zeigten Reportergeranalysen, dass NFATc2 die IL-9-Produktion in Th<sub>9</sub>-Zellen inhibiert anstatt sie zu fördern. Th<sub>9</sub>-Zellen aus NFATc2-defizienten Tieren zeigen folglich im Vergleich zu wildtypischen Th<sub>9</sub>-Zellen sowohl nach Primär- als auch nach Restimulation eine verstärkte IL-9-Produktion. Der Faktor NFATc2 kann somit als transkriptioneller Aktivator für die IL-9-Expression in Th<sub>9</sub>-Zellen ausgeschlossen werden. *In vivo* wurden diese Beobachtungen dadurch untermauert, dass NFATc2-defiziente Tiere im Rahmen des Asthma bronchiale zu einer verstärkten pulmonalen Inflammation neigen und auch einen erhöhten Atemwegswiderstand nach Methacholin-Provokation aufweisen. Diese asthmatischen Symptome konnten durch Applikation eines neutralisierenden Antikörpers für IL-9 wesentlich gemildert werden. In einem B16F10-Melanommodell konnten NFATc2-defiziente Tiere gegenüber dem Wildtyp eine verbesserte anti-Tumorantwort ausprägen. Nach Gabe eines IL-9-neutralisierenden Antikörpers, wurde dieser Effekt wiederum gemildert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass IRF4 nicht mit NFATc2 am murinen *IL9* Promotor interagiert, um die IL-9-Expression in Th<sub>9</sub>-Zellen zu fördern. Eine NFATc2-Defizienz resultiert sogar in einer gesteigerten IL-9-Produktion, womit ein inhibitorischer Einfluss von NFATc2 in Bezug auf die IL-9-Expression in Th<sub>9</sub>-Zellen nachgewiesen werden konnte.





## 6 Abstract

CD4<sup>+</sup> T cells have the potential to differentiate into different T helper cell subsets. Depending on environmental conditions during CD4<sup>+</sup> T cell activation distinct subpopulations develop that differ from each other by specific signature cytokines. Th<sub>9</sub> cells develop in the presence of IL-4 and TGF-β and secrete high amounts of IL-9<sup>39</sup>. The transcription factor IRF4 was identified to be crucial for *Il9* expression of this subpopulation<sup>45</sup>. IRF4 is also of importance for Th<sub>2</sub>- and Th<sub>17</sub> cell differentiation<sup>30,121</sup>. These findings raised the question which physical interaction partner of IRF4 ensures that especially Th<sub>9</sub> cells develop.

In this thesis the transcription factor NFATc2 was analysed as a potential interaction partner of IRF4 that binds to the murine *Il9* promoter in Th<sub>9</sub> cells. Reporter gene analyses revealed that NFATc2 inhibits IL-9 production in Th<sub>9</sub> cells instead of promoting it. According to these findings and compared to wildtype, Th<sub>9</sub> cells of NFATc2 deficient mice exhibit an enhanced IL-9 production after primary as well as second stimulation. Hence, the transcription factor NFATc2 can be excluded as a transcriptional activator for *Il9* expression in Th<sub>9</sub> cells. *In vivo* experiments confirmed these observations since NFATc2 deficient mice show strongly enhanced asthmatic symptoms evidenced by an enhanced pulmonary inflammation as well as elevated airway hyperresponsiveness after methacholine provocation. These asthmatic symptoms were substantially diminished by application of an IL-9-neutralizing antibody. Using a B16F10 mouse melanoma model demonstrate an improved tumor immunity by NFATc2 deficient mice compared to wildtype mice. Application of an IL-9-neutralising antibody diminished this effect again.

Summarized it can be concluded that the transcription factor NFATc2 is not the crucial interaction partner of IRF4 at the *Il9* promoter to further enhance *Il9* expression in Th<sub>9</sub> cells. On the contrary the NFATc2 deficiency results in a strongly enhanced IL-9 production whereby it is proofed that the presence of the transcription factor NFATc2 has an inhibitory effect on *Il9* expression in Th<sub>9</sub> cells.



## **7 Danksagung**



## 8 Abkürzungen

ABTS	2,2-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure)
AK	Antikörper
AS	Aminosäuren
BAL	Bronchoalveolare Lavage
-bio	biotinyliert
BL6	C57BL/6, Mausstamm
BMMC	Bone Marrow Derived Mast Cells
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Complementary DNA
CD4 <sup>+</sup> TZ	konventionelle CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> T- Zelle
ChIP	Chromatin Immunopräzipitation
CIA	Collagen-Induced Arthritis
CTL	Cytotoxischer T-Lymphozyt
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EPC	Eosinophilic Cationic Protein
FACS	Fluorescence Activated Cell Sort
FCS	Fetal Calf Serum (fötales Kälberserum)
FcεRI	Hochaffiner Rezeptor für IgE-Antikörper
FITC	Fluorescein-Isocyanat
FOXP3	Forkhead Box Protein 3
FSC	Forward Scatter, Maß für Zellgröße
GATA3	Transkriptionsfaktor aus der GATA-Familie
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
HGPRT	Hypoxanthin-Guaninphosphoribosyltransferase
HSV-TK	<i>Herpes simplex</i> Thymidin- Kinase
ICSAT	IRF Consensus Sequence binding protein for Activated T cells

---

IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Iono	Ionomycin
IRF	Interferon regulatorischer Faktor
iTregs	induzierte regulatorische T- Zellen
KO	Knockout
l	Liter
LAR II	Luciferase Assay Reagent II
LPS	Lipopolysaccharid
LSIRF	Lymphocyte specific IRF
MACS	Magnetic Activated Cell Sorter
MBP	Major basic protein
MEA	Mast cell growth-enhancing activity
MEM	Minimal Essential Medium
min	Minute
MMC	Mucosal Type Mast Cell
mr	Murin rekombinant
mRNA	Messenger RNA
MUM1	Multiple myeloma oncogene-1
NFAT	Nuclear Factor of Activated T-cells
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor $\kappa$ B
nTreg	natürlich vorkommende Regulatorische T- Zellen
OVA	Ovalbumin
p.a.	pro analysis
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PAS	Periodic Acid Schiff
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate- Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
PEEP	Positiver endexpiratorischer Druck
Pip	PU.1-Interaktionspartner
PMA	Phorbol Myristate Acetate

---

PRP	Pattern recognition receptors
qRT-PCR	quantitative Realtime- PCR
RAG	“recombination activating genes”, Rekombinase zur V(D)J-Rekombination
RLU	Relative Light Units
RNA	Ribonukleinsäure
ROR $\gamma$ t	Retinoic orphan receptor $\gamma$ t, Transkriptionsfaktor
RT	Reverse Transkription
SA	Streptavidin
SDS	Sodiumdodecylsulfat
siRNA	Small Interfering RNA
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TBE	Tris Borat EDTA
T-bet	T box expressed in T cells
TCGFIII	T cell growth factor III
TCR	T Cell Rezeptor ( T- Zell Rezeptor)
TE	Tris-EDTA
TGF- $\beta$	Tumor growth factor $\beta$
pTGF- $\beta$	porcine TGF- $\beta$
Th	T-Helferzelle
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure
TM	Testmedium
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Regulatorische T- Zellen
TZ	T- Zellen
V	Volt
VE	voll entsalzt
WT	Wildtyp





## 9 Literaturverzeichnis

1. Van Lier, R. A. W., ten Berge, I. J. M. & Gamadia, L. E. Human CD8(+) T-cell differentiation in response to viruses. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 931–9 (2003).
2. Kaech, S. M. & Wherry, E. J. Heterogeneity and cell-fate decisions in effector and memory CD8+ T cell differentiation during viral infection. *Immunity* **27**, 393–405 (2007).
3. Goverman, J., Perchellet, A. & Huseby, E. S. The role of CD8(+) T cells in multiple sclerosis and its animal models. *Curr. Drug Targets. Inflamm. Allergy* **4**, 239–45 (2005).
4. Friese, M. a & Fugger, L. Pathogenic CD8(+) T cells in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **66**, 132–41 (2009).
5. Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. a & Coffman, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986. *J. Immunol.* **175**, 5–14 (2005).
6. Miller, C. M. D. *et al.* Immunological interactions between 2 common pathogens, Th1-inducing protozoan *Toxoplasma gondii* and the Th2-inducing helminth *Fasciola hepatica*. *PLoS One* **4**, e5692 (2009).
7. Cooper, A. M. *et al.* The role of interleukin-12 in acquired immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunology* **84**, 423–32 (1995).
8. Glimcher, L. H. & Murphy, K. M. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev.* **14**, 1693–711 (2000).
9. Kaufmann, S. H., Ladel, C. H. & Flesch, I. E. T cells and cytokines in intracellular bacterial infections: experiences with *Mycobacterium bovis* BCG. *Ciba Found. Symp.* **195**, 123–32; discussion 132–6 (1995).
10. Sinigaglia, F., D'Ambrosio, D., Panina-Bordignon, P. & Rogge, L. Regulation of the IL-12/IL-12R axis: a critical step in T-helper cell differentiation and effector function. *Immunol. Rev.* **170**, 65–72 (1999).
11. Gately, M. K. *et al.* The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 495–521 (1998).
12. Szabo, S. J. *et al.* A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* **100**, 655–69 (2000).
13. Afkarian, M. *et al.* T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naïve CD4+ T cells. *Nat. Immunol.* **3**, 549–57 (2002).
14. Arthur, R. P. & Mason, D. T cells that help B cell responses to soluble antigen are distinguishable from those producing interleukin 2 on mitogenic or allogeneic stimulation. *J. Exp. Med.* **163**, 774–86 (1986).
15. Paliard, X. *et al.* Simultaneous production of IL-2, IL-4, and IFN-gamma by activated human CD4+ and CD8+ T cell clones. *J. Immunol.* **141**, 849–55 (1988).
16. Mosmann, T. R. & Coffman, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* **7**, 145–73 (1989).
17. Seder, R. A. & Paul, W. E. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 635–73 (1994).
18. Hebenstreit, D., Wirnsberger, G., Horejs-Hoeck, J. & Duschl, A. Signaling mechanisms, interaction partners, and target genes of STAT6. *Cytokine Growth Factor Rev.* **17**, 173–88 (2006).
19. Zhu, J., Yamane, H., Cote-Sierra, J., Guo, L. & Paul, W. E. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Res.* **16**, 3–10 (2006).
20. Yang, X. O. *et al.* Requirement for the basic helix-loop-helix transcription factor Dec2 in initial TH2 lineage commitment. *Nat. Immunol.* **10**, 1260–6 (2009).
21. Liang, S. C. *et al.* Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J. Exp. Med.* **203**, 2271–9 (2006).
22. Langrish, C. L. *et al.* IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* **201**, 233–40 (2005).
23. Infante-Duarte, C., Horton, H. F., Byrne, M. C. & Kamradt, T. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J. Immunol.* **165**, 6107–15 (2000).
24. Nakae, S., Nambu, A., Sudo, K. & Iwakura, Y. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J. Immunol.* **171**, 6173–7 (2003).
25. Happel, K. I. *et al.* Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. *J. Exp. Med.* **202**, 761–9 (2005).
26. Kleinschek, M. A. *et al.* IL-23 enhances the inflammatory cell response in *Cryptococcus neoformans* infection and induces a cytokine pattern distinct from IL-12. *J. Immunol.* **176**, 1098–106 (2006).
27. Chen, Z., Laurence, A. & O'Shea, J. J. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. *Semin. Immunol.* **19**, 400–8 (2007).
28. Ivanov, I. I. *et al.* The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$ mat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* **126**, 1121–33 (2006).

29. Yang, X. O. *et al.* T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity* **28**, 29–39 (2008).
30. Brüstle, A. *et al.* The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat. Immunol.* **8**, 958–66 (2007).
31. Trifari, S., Kaplan, C. D., Tran, E. H., Crellin, N. K. & Spits, H. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat. Immunol.* **10**, 864–71 (2009).
32. Eyerich, S. *et al.* Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J. Clin. Invest.* **119**, 3573–85 (2009).
33. Maloy, K. J. & Powrie, F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat. Immunol.* **2**, 816–22 (2001).
34. Sakaguchi, S. *et al.* Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol. Rev.* **182**, 18–32 (2001).
35. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. & Toda, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* **155**, 1151–64 (1995).
36. Bluestone, J. A. & Abbas, A. K. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 253–7 (2003).
37. Van Roon, J. a G., Bijlsma, J. W. J. & Lafeber, F. P. J. G. Diversity of regulatory T cells to control arthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **20**, 897–913 (2006).
38. Jonuleit, H., Schmitt, E. & Alerts, E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J. Immunol.* **171**, 6323–7 (2003).
39. Schmitt, E. *et al.* IL-9 production of naive CD4+ T cells depends on IL-2, is synergistically enhanced by a combination of TGF-beta and IL-4, and is inhibited by IFN-gamma. *J. Immunol.* **153**, 3989–96 (1994).
40. Monteyne, P. *et al.* IL-4-independent regulation of in vivo IL-9 expression. *J. Immunol.* **159**, 2616–23 (1997).
41. Uyttenhove, C., Brombacher, F. & Van Snick, J. TGF- $\beta$  interactions with IL-1 family members trigger IL-4-independent IL-9 production by mouse CD4(+) T cells. *Eur. J. Immunol.* **40**, 2230–5 (2010).
42. Veldhoen, M. *et al.* Transforming growth factor-beta “reprograms” the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat. Immunol.* **9**, 1341–6 (2008).
43. Elyaman, W. *et al.* IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3+ natural regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 12885–90 (2009).
44. Dardalhon, V. *et al.* IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nat. Immunol.* **9**, 1347–55 (2008).
45. Staudt, V. *et al.* Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells. *Immunity* **33**, 192–202 (2010).
46. Yee, a *et al.* Cooperative interaction between the DNA-binding domains of PU.1 and IRF4. *J. Mol. Biol.* **279**, 1075–83 (1998).
47. Chang, H.-C. *et al.* The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nat. Immunol.* **11**, 527–34 (2010).
48. Goswami, R. *et al.* STAT6-dependent regulation of Th9 development. *J. Immunol.* **188**, 968–75 (2012).
49. Xiao, X. *et al.* OX40 signaling favors the induction of T(H)9 cells and airway inflammation. *Nat. Immunol.* **13**, 981–90 (2012).
50. Jäger, A., Dardalhon, V., Sobel, R. A., Bettelli, E. & Kuchroo, V. K. Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *J. Immunol.* **183**, 7169–77 (2009).
51. Yang, X. R. *et al.* Identification of modifier genes for cutaneous malignant melanoma in melanoma-prone families with and without CDKN2A mutations. *Int. J. Cancer* **125**, 2912–7 (2009).
52. Purwar, R. *et al.* Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9-producing T cells. *Nat. Med.* **18**, 1248–1253 (2012).
53. Lu, Y. *et al.* Th9 cells promote antitumor immune responses in vivo. *J. Clin. Invest.* **122**, 4160–71 (2012).
54. Uyttenhove, C., Simpson, R. J. & Van Snick, J. Functional and structural characterization of P40, a mouse glycoprotein with T-cell growth factor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 6934–8 (1988).
55. Renaud, J. C. *et al.* Human P40/IL-9. Expression in activated CD4+ T cells, genomic organization, and comparison with the mouse gene. *J. Immunol.* **144**, 4235–41 (1990).
56. Renaud, J. C. *et al.* Interleukin-9. *Int. Rev. Exp. Pathol.* **34 Pt A**, 99–109 (1993).
57. Wilhelm, C. *et al.* An IL-9 fate reporter demonstrates the induction of an innate IL-9 response in lung inflammation. *Nat. Immunol.* **12**, 1071–7 (2011).

58. Hültner, L. *et al.* In activated mast cells, IL-1 up-regulates the production of several Th2-related cytokines including IL-9. *J. Immunol.* **164**, 5556–63 (2000).
59. Schmitt, E., Van Brandwijk, R., Van Snick, J., Siebold, B. & Rude, E. TCGF III/P40 is produced by naive murine CD4+ T cells but is not a general T cell growth factor. *Eur. J. Immunol.* **19**, 2167–70 (1989).
60. Van Snick, J. *et al.* Cloning and characterization of a cDNA for a new mouse T cell growth factor (P40). *J. Exp. Med.* **169**, 363–8 (1989).
61. Suda, T., Murray, R., Fischer, M., Yokota, T. & Zlotnik, A. Tumor necrosis factor-alpha and P40 induce day 15 murine fetal thymocyte proliferation in combination with IL-2. *J. Immunol.* **144**, 1783–7 (1990).
62. Hültner, L. *et al.* Mast cell growth-enhancing activity (MEA) is structurally related and functionally identical to the novel mouse T cell growth factor P40/TCGFIII (interleukin 9). *Eur. J. Immunol.* **20**, 1413–6 (1990).
63. Eklund, K. K., Ghildyal, N., Austen, K. F. & Stevens, R. L. Induction by IL-9 and suppression by IL-3 and IL-4 of the levels of chromosome 14-derived transcripts that encode late-expressed mouse mast cell proteases. *J. Immunol.* **151**, 4266–73 (1993).
64. Hültner, L. & Moeller, J. Mast cell growth-enhancing activity (MEA) stimulates interleukin 6 production in a mouse bone marrow-derived mast cell line and a malignant subline. *Exp. Hematol.* **18**, 873–7 (1990).
65. Birner, A., Hültner, L., Mergenthaler, H. G., van Snick, J. & Dörmer, P. Recombinant murine interleukin 9 enhances the erythropoietin-dependent colony formation of human BFU-E. *Exp. Hematol.* **20**, 541–5 (1992).
66. Bourette, R. P., Royet, J., Mouchiroud, G., Schmitt, E. & Blanchet, J. P. Murine interleukin 9 stimulates the proliferation of mouse erythroid progenitor cells and favors the erythroid differentiation of multipotent FDCP-mix cells. *Exp. Hematol.* **20**, 868–73 (1992).
67. Petit-Frere, C., Dugas, B., Braquet, P. & Mencia-Huerta, J. M. Interleukin-9 potentiates the interleukin-4-induced IgE and IgG1 release from murine B lymphocytes. *Immunology* **79**, 146–51 (1993).
68. Mehler, M. F., Rozental, R., Dougherty, M., Spray, D. C. & Kessler, J. A. Cytokine regulation of neuronal differentiation of hippocampal progenitor cells. *Nature* **362**, 62–5 (1993).
69. Faulkner, H., Humphreys, N., Renaud, J. C., Van Snick, J. & Grecis, R. Interleukin-9 is involved in host protective immunity to intestinal nematode infection. *Eur. J. Immunol.* **27**, 2536–40 (1997).
70. Khan, W. I. *et al.* Modulation of intestinal muscle contraction by interleukin-9 (IL-9) or IL-9 neutralization: correlation with worm expulsion in murine nematode infections. *Infect. Immun.* **71**, 2430–8 (2003).
71. Renaud, J. C., Kermouni, A., Vink, A., Louahed, J. & Van Snick, J. Interleukin-9 and its receptor: involvement in mast cell differentiation and T cell oncogenesis. *J. Leukoc. Biol.* **57**, 353–60 (1995).
72. Merz, H. *et al.* Interleukin-9 expression in human malignant lymphomas: unique association with Hodgkin's disease and large cell anaplastic lymphoma. *Blood* **78**, 1311–7 (1991).
73. Houssiau, F. A. *et al.* Human T cell lines and clones respond to IL-9. *J. Immunol.* **150**, 2634–40 (1993).
74. Gruss, H. J., Brach, M. A., Drexler, H. G., Bross, K. J. & Herrmann, F. Interleukin 9 is expressed by primary and cultured Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Cancer Res.* **52**, 1026–31 (1992).
75. Nicolaidis, N. C. *et al.* Interleukin 9: a candidate gene for asthma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 13175–80 (1997).
76. Shimbara, A. *et al.* IL-9 and its receptor in allergic and nonallergic lung disease: increased expression in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **105**, 108–15 (2000).
77. Temann, U.-A., Laouar, Y., Eynon, E. E., Homer, R. & Flavell, R. A. IL9 leads to airway inflammation by inducing IL13 expression in airway epithelial cells. *Int. Immunol.* **19**, 1–10 (2007).
78. Yao, W., Tepper, R. S. & Kaplan, M. H. Predisposition to the development of IL-9-secreting T cells in atopic infants. *J. Allergy Clin. Immunol.* **128**, 1357–1360.e5 (2011).
79. Jones, C. P., Gregory, L. G., Causton, B., Campbell, G. A. & Lloyd, C. M. Activin A and TGF- $\beta$  promote T(H)9 cell-mediated pulmonary allergic pathology. *J. Allergy Clin. Immunol.* **129**, 1000–10.e3 (2012).
80. Yao, W. *et al.* Interleukin-9 is required for allergic airway inflammation mediated by the cytokine TSLP. *Immunity* **38**, 360–72 (2013).
81. Jürgen Meyer, Wolfgang E Fleig, Mathias Pletz, Werner-J Mayet, Peter Mertens, Otto-Albrecht Müller, Michael Pfeifer, Norbert Weiss, O. B. *Rationelle Diagnostik und Therapie in der Inneren Medizin.* 248 (Urban & Fischer in Elsevier, 2012).
82. Orgaz, J. L. & Sanz-Moreno, V. Emerging molecular targets in melanoma invasion and metastasis. *Pigment Cell Melanoma Res.* **26**, 39–57 (2013).
83. Maio, M. Melanoma as a model tumour for immuno-oncology. *Ann. Oncol.* **23 Suppl 8**, viii10–4 (2012).
84. Mamane, Y. *et al.* Interferon regulatory factors: the next generation. *Gene* **237**, 1–14 (1999).

85. Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, a & Tanaka, N. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 623–55 (2001).
86. Marecki, S., Atchison, M. L. & Fenton, M. J. Differential expression and distinct functions of IFN regulatory factor 4 and IFN consensus sequence binding protein in macrophages. *J. Immunol.* **163**, 2713–22 (1999).
87. Marecki, S. & Fenton, M. J. The role of IRF-4 in transcriptional regulation. *J. Interferon Cytokine Res.* **22**, 121–33 (2002).
88. Lohoff, M. & Mak, T. W. Roles of interferon-regulatory factors in T-helper-cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 125–35 (2005).
89. Liu, X., Nurieva, R. I. & Dong, C. Transcriptional regulation of follicular T-helper (Tfh) cells. *Immunol. Rev.* **252**, 139–45 (2013).
90. Eisenbeis, C. F., Singh, H. & Storb, U. Pip, a novel IRF family member, is a lymphoid-specific, PU.1-dependent transcriptional activator. *Genes Dev.* **9**, 1377–1387 (1995).
91. Yamagata, T. *et al.* A novel interferon regulatory factor family transcription factor, ICSAT/Pip/LSIRF, that negatively regulates the activity of interferon-regulated genes. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 1283–94 (1996).
92. Iida, S. *et al.* Deregulation of MUM1/IRF4 by chromosomal translocation in multiple myeloma. *Nat. Genet.* **17**, 226–30 (1997).
93. Mittrucker, H.-W. *et al.* Requirement for the Transcription Factor LSIRF/IRF4 for Mature B and T Lymphocyte Function. *Science (80-. )*. **275**, 540–543 (1997).
94. Klein, U. *et al.* Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nat. Immunol.* **7**, 773–82 (2006).
95. Matsuyama, T. *et al.* Molecular cloning of LSIRF, a lymphoid-specific member of the interferon regulatory factor family that binds the interferon-stimulated response element (ISRE). *Nucleic Acids Res.* **23**, 2127–36 (1995).
96. Lohoff, M. *et al.* Enhanced TCR-induced apoptosis in interferon regulatory factor 4-deficient CD4(+) Th cells. *J. Exp. Med.* **200**, 247–53 (2004).
97. Mudter, J. *et al.* IRF4 selectively controls cytokine gene expression in chronic intestinal inflammation. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. **57**, 369–76
98. Giese, N. A. *et al.* Interferon (IFN) consensus sequence-binding protein, a transcription factor of the IFN regulatory factor family, regulates immune responses in vivo through control of interleukin 12 expression. *J. Exp. Med.* **186**, 1535–46 (1997).
99. Lohoff, M. *et al.* Interferon regulatory factor-1 is required for a T helper 1 immune response in vivo. *Immunity* **6**, 681–9 (1997).
100. Lohoff, M. *et al.* Deficiency in the transcription factor interferon regulatory factor (IRF)-2 leads to severely compromised development of natural killer and T helper type 1 cells. *J. Exp. Med.* **192**, 325–36 (2000).
101. Taki, S. *et al.* Multistage regulation of Th1-type immune responses by the transcription factor IRF-1. *Immunity* **6**, 673–9 (1997).
102. Hu, C.-M., Jang, S. Y., Fanzo, J. C. & Pernis, A. B. Modulation of T cell cytokine production by interferon regulatory factor-4. *J. Biol. Chem.* **277**, 49238–46 (2002).
103. Lohoff, M. *et al.* Dysregulated T helper cell differentiation in the absence of interferon regulatory factor 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 11808–12 (2002).
104. Ahyi, A.-N. N., Chang, H.-C., Dent, A. L., Nutt, S. L. & Kaplan, M. H. IFN regulatory factor 4 regulates the expression of a subset of Th2 cytokines. *J. Immunol.* **183**, 1598–606 (2009).
105. Bruhn, S. *et al.* Increased expression of IRF4 and ETS1 in CD4+ cells from patients with intermittent allergic rhinitis. *Allergy* **67**, 33–40 (2012).
106. Faget, D. V., Lucena, P. I., Robbs, B. K. & Viola, J. P. B. NFAT1 C-terminal domains are necessary but not sufficient for inducing cell death. *PLoS One* **7**, e47868 (2012).
107. Solymar, D. C., Agarwal, S., Bassing, C. H., Alt, F. W. & Rao, A. A 3' enhancer in the IL-4 gene regulates cytokine production by Th2 cells and mast cells. *Immunity* **17**, 41–50 (2002).
108. Horsley, V. & Pavlath, G. K. NFAT: ubiquitous regulator of cell differentiation and adaptation. *J. Cell Biol.* **156**, 771–4 (2002).
109. Halterman, J. A., Kwon, H. M. & Wamhoff, B. R. Tonicity-independent regulation of the osmosensitive transcription factor TonEBP (NFAT5). *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **302**, C1–8 (2012).
110. Macian, F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 472–84 (2005).
111. Schreiber, S. L. & Crabtree, G. R. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol. Today* **13**, 136–42 (1992).
112. Sigal, N. H. & Dumont, F. J. Cyclosporin A, FK-506, and rapamycin: pharmacologic probes of lymphocyte signal transduction. *Annu. Rev. Immunol.* **10**, 519–60 (1992).

113. Serfling, E. *et al.* The role of NF-AT transcription factors in T cell activation and differentiation. *Biochim. Biophys. Acta* **1498**, 1–18 (2000).
114. Shaw, J. P. *et al.* Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science* **241**, 202–5 (1988).
115. Randak, C., Brabletz, T., Hergenröther, M., Sobotta, I. & Serfling, E. Cyclosporin A suppresses the expression of the interleukin 2 gene by inhibiting the binding of lymphocyte-specific factors to the IL-2 enhancer. *EMBO J.* **9**, 2529–36 (1990).
116. Brabletz, T., Pietrowski, I. & Serfling, E. The immunosuppressives FK 506 and cyclosporin A inhibit the generation of protein factors binding to the two purine boxes of the interleukin 2 enhancer. *Nucleic Acids Res.* **19**, 61–7 (1991).
117. Schuh, K. *et al.* Retarded thymic involution and massive germinal center formation in NF-ATp-deficient mice. *Eur. J. Immunol.* **28**, 2456–66 (1998).
118. Xanthoudakis, S. *et al.* An enhanced immune response in mice lacking the transcription factor NFAT1. *Science* **272**, 892–5 (1996).
119. Klein, M. *et al.* Specific and redundant roles for NFAT transcription factors in the expression of mast cell-derived cytokines. *J. Immunol.* **177**, 6667–74 (2006).
120. Kiani, A. *et al.* Regulation of interferon-gamma gene expression by nuclear factor of activated T cells. *Blood* **98**, 1480–8 (2001).
121. Rengarajan, J. *et al.* Interferon regulatory factor 4 (IRF4) interacts with NFATc2 to modulate interleukin 4 gene expression. *J. Exp. Med.* **195**, 1003–12 (2002).
122. Lee, C.-G. *et al.* A distal cis-regulatory element, CNS-9, controls NFAT1 and IRF4-mediated IL-10 gene activation in T helper cells. *Mol. Immunol.* **46**, 613–621 (2009).
123. Mehta, D. S., Wurster, A. L., Weinmann, A. S. & Grusby, M. J. NFATc2 and T-bet contribute to T-helper-cell-subset-specific regulation of IL-21 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 2016–21 (2005).
124. Hodge, M. R. *et al.* Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice. *Immunity* **4**, 397–405 (1996).
125. Fidler, I. J. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Res.* **35**, 218–24 (1975).
126. Prydz, K., Hansen, S. H., Sandvig, K. & van Deurs, B. Effects of brefeldin A on endocytosis, transcytosis and transport to the Golgi complex in polarized MDCK cells. *J. Cell Biol.* **119**, 259–72 (1992).
127. Bending, D. *et al.* Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice. *J. Clin. Invest.* **119**, 565–72 (2009).
128. Hegazy, A. N. *et al.* Interferons direct Th2 cell reprogramming to generate a stable GATA-3(+)T-bet(+) cell subset with combined Th2 and Th1 cell functions. *Immunity* **32**, 116–28 (2010).
129. Lingnau, K. *et al.* IL-4 in combination with TGF-beta favors an alternative pathway of Th1 development independent of IL-12. *J. Immunol.* **161**, 4709–18 (1998).
130. Brocke, S. *et al.* Treatment of experimental encephalomyelitis with a peptide analogue of myelin basic protein. *Nature* **379**, 343–6 (1996).
131. Nagelkerken, L., Gollob, K. J., Tielemans, M. & Coffman, R. L. Role of transforming growth factor-beta in the preferential induction of T helper cells of type 1 by staphylococcal enterotoxin B. *Eur. J. Immunol.* **23**, 2306–10 (1993).
132. Goswami, R. & Kaplan, M. H. Gcn5 is required for PU.1-dependent IL-9 induction in Th9 cells. *J. Immunol.* **189**, 3026–33 (2012).
133. Tamiya, T. *et al.* Smad2/3 and IRF4 play a cooperative role in IL-9-producing T cell induction. *J. Immunol.* **191**, 2360–71 (2013).
134. Rengarajan, J., Tang, B. & Glimcher, L. H. NFATc2 and NFATc3 regulate T(H)2 differentiation and modulate TCR-responsiveness of naïve T(H) cells. *Nat. Immunol.* **3**, 48–54 (2002).
135. Perumal, N. B. & Kaplan, M. H. Regulating Il9 transcription in T helper cells. *Trends Immunol.* **32**, 146–50 (2011).
136. Monticelli, S., Solymar, D. C. & Rao, A. Role of NFAT proteins in IL13 gene transcription in mast cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 36210–8 (2004).
137. Liao, W. *et al.* Opposing actions of IL-2 and IL-21 on Th9 differentiation correlate with their differential regulation of BCL6 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 3508–13 (2014).
138. Schraml, B. U. *et al.* The AP-1 transcription factor Batf controls T(H)17 differentiation. *Nature* **460**, 405–9 (2009).
139. Jabeen, R. *et al.* Th9 cell development requires a BATF-regulated transcriptional network. *J. Clin. Invest.* (2013). doi:10.1172/JCI69489
140. Das, J. *et al.* Transforming growth factor beta is dispensable for the molecular orchestration of Th17 cell differentiation. *J. Exp. Med.* **206**, 2407–16 (2009).

141. Louahed, J. *et al.* Interleukin-9 upregulates mucus expression in the airways. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **22**, 649–56 (2000).
142. Turner, H. & Kinet, J. P. Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI. *Nature* **402**, B24–30 (1999).
143. Karwot, R. *et al.* Protective role of nuclear factor of activated T cells 2 in CD8+ long-lived memory T cells in an allergy model. *J. Allergy Clin. Immunol.* **121**, 992–9.e6 (2008).
144. Viola, J. P., Kiani, A., Bozza, P. T. & Rao, A. Regulation of allergic inflammation and eosinophil recruitment in mice lacking the transcription factor NFAT1: role of interleukin-4 (IL-4) and IL-5. *Blood* **91**, 2223–30 (1998).
145. Newcomb, D. C. & Peebles, R. S. Th17-mediated inflammation in asthma. *Curr. Opin. Immunol.* **25**, 755–60 (2013).
146. Erb, K. J. *et al.* Mice deficient in nuclear factor of activated T-cell transcription factor c2 mount increased Th2 responses after infection with *Nippostrongylus brasiliensis* and decreased Th1 responses after mycobacterial infection. *Infect. Immun.* **71**, 6641–7 (2003).
147. Ray, A. & Cohn, L. Th2 cells and GATA-3 in asthma: new insights into the regulation of airway inflammation. *J. Clin. Invest.* **104**, 985–93 (1999).
148. Coffman, R. L. *et al.* B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells. *J. Immunol.* **136**, 4538–41 (1986).
149. Bacharier, L. B. & Geha, R. S. Molecular mechanisms of IgE regulation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **105**, S547–58 (2000).
150. Taube, C. & Stassen, M. Mast cells and mast cell-derived factors in the regulation of allergic sensitization. *Chem. Immunol. Allergy* **94**, 58–66 (2008).
151. Tomaki, M. *et al.* Eosinophilopoiesis in a murine model of allergic airway eosinophilia: involvement of bone marrow IL-5 and IL-5 receptor alpha. *J. Immunol.* **165**, 4040–50 (2000).
152. Nakajima, H. *et al.* CD4 + T-Lymphocytes and Interleukin-5 Mediate Antigen-induced Eosinophil Infiltration into the Mouse Trachea. *Am. Rev. Respir. Dis.* **146**, 374–377 (1992).
153. Collins, P. D., Marleau, S., Griffiths-Johnson, D. A., Jose, P. J. & Williams, T. J. Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo. *J. Exp. Med.* **182**, 1169–74 (1995).
154. Hogan, S. P., Koskinen, A., Matthaei, K. I., Young, I. G. & Foster, P. S. Interleukin-5-producing CD4+ T cells play a pivotal role in aeroallergen-induced eosinophilia, bronchial hyperreactivity, and lung damage in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **157**, 210–8 (1998).
155. Hamelmann, E. *et al.* Interleukin (IL)-5 but not immunoglobulin E reconstitutes airway inflammation and airway hyperresponsiveness in IL-4-deficient mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **23**, 327–34 (2000).
156. Zhu, Z. *et al.* Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J. Clin. Invest.* **103**, 779–88 (1999).
157. Taube, C., Dakhama, A. & Gelfand, E. W. Insights into the pathogenesis of asthma utilizing murine models. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **135**, 173–86 (2004).
158. Kearley, J. *et al.* IL-9 governs allergen-induced mast cell numbers in the lung and chronic remodeling of the airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **183**, 865–75 (2011).
159. Visekruna, A. *et al.* Tc9 cells, a new subset of CD8(+) T cells, support Th2-mediated airway inflammation. *Eur. J. Immunol.* **43**, 606–18 (2013).
160. Parker, J. M. *et al.* Safety profile and clinical activity of multiple subcutaneous doses of MEDI-528, a humanized anti-interleukin-9 monoclonal antibody, in two randomized phase 2a studies in subjects with asthma. *BMC Pulm. Med.* **11**, 14 (2011).
161. Oh, C. K. *et al.* A randomized, controlled trial to evaluate the effect of an anti-interleukin-9 monoclonal antibody in adults with uncontrolled asthma. *Respir. Res.* **14**, 93 (2013).
162. McMillan, S. J., Bishop, B., Townsend, M. J., McKenzie, A. N. & Lloyd, C. M. The absence of interleukin 9 does not affect the development of allergen-induced pulmonary inflammation nor airway hyperreactivity. *J. Exp. Med.* **195**, 51–7 (2002).
163. Kupfer, A., Mosmann, T. R. & Kupfer, H. Polarized expression of cytokines in cell conjugates of helper T cells and splenic B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 775–9 (1991).
164. Heib, V. *et al.* Mast cells are crucial for early inflammation, migration of Langerhans cells, and CTL responses following topical application of TLR7 ligand in mice. *Blood* **110**, 946–53 (2007).
165. NAUTS, H. C., SWIFT, W. E. & COLEY, B. L. The treatment of malignant tumors by bacterial toxins as developed by the late William B. Coley, M.D., reviewed in the light of modern research. *Cancer Res.* **6**, 205–16 (1946).
166. Byrne, K. T. & Turk, M. J. New perspectives on the role of vitiligo in immune responses to melanoma. *Oncotarget* **2**, 684–94 (2011).

167. Lu, Y. *et al.* Tumor-specific IL-9-producing CD8+ Tc9 cells are superior effector than type-I cytotoxic Tc1 cells for adoptive immunotherapy of cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 2265–70 (2014).
168. Soucek, L. *et al.* Mast cells are required for angiogenesis and macroscopic expansion of Myc-induced pancreatic islet tumors. *Nat. Med.* **13**, 1211–8 (2007).
169. Starkey, J. R., Crowle, P. K. & Taubenberger, S. Mast-cell-deficient W/W<sup>v</sup> mice exhibit a decreased rate of tumor angiogenesis. *Int. J. Cancer* **42**, 48–52 (1988).
170. Dyduch, G., Kaczmarczyk, K. & Okoń, K. Mast cells and cancer: enemies or allies? *Pol. J. Pathol.* **63**, 1–7 (2012).
171. Eller, K. *et al.* IL-9 production by regulatory T cells recruits mast cells that are essential for regulatory T cell-induced immune suppression. *J. Immunol.* **186**, 83–91 (2011).
172. Rosenberg, S. A. IL-2: The First Effective Immunotherapy for Human Cancer. *J. Immunol.* **192**, 5451–5458 (2014).





