

**Die Bedeutung von NFAT- Transkriptionsfaktoren für  
die Expression von Mastzell- Cytokinen**

**Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften**

**Am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg- Universität Mainz**

**Matthias Klein  
geb. am 20. September 1976 in Mainz**

**Mainz, 26.09.2006**

Tag der mündlichen Prüfung: 22.02.2007

## Publikationen

Teile dieser Arbeit werden veröffentlicht in:

- 1) **Specific and redundant roles for NFAT transcription factors in the expression of mast cell-derived cytokines.**

Matthias Klein, Stefan Klein-Hessling, Alois Palmethofer, Edgar Serfling, Christine Tertilt, Tobias Bopp, Valeska Heib, Marc Becker, Christian Taube, Hansjörg Schild, Edgar Schmitt, and Michael Stassen.

*Journal of Immunology* (im Druck), Sept. 2006.

Weitere Publikationen:

- 2) **p38 MAP kinase drives the expression of mast cell-derived IL-9 via activation of the transcription factor GATA-1.**

Stassen, M., M. Klein, M. Becker, T. Bopp, C. Neudorfl, C. Richter, V. Heib, S. Klein-Hessling, E. Serfling, H. Schild, and E. Schmitt.

*Molecular Immunology* (in press), 2006.

- 3) **NFATc2 and NFATc3 transcription factors play a crucial role in suppression of CD4+ T lymphocytes by CD4+ CD25+ regulatory T cells.**

Bopp, T., A. Palmethofer, E. Serfling, V. Heib, S. Schmitt, C. Richter, M. Klein, H. Schild, E. Schmitt, and M. Stassen.

*Journal of Experimental Medicine*, 201:181-187, 2005.

- 4) **Differential regulatory capacity of CD25+ T regulatory cells and preactivated CD25+ T regulatory cells on development, functional activation, and proliferation of Th2 cells.**

Stassen, M., H. Jonuleit, C. Muller, M. Klein, C. Richter, T. Bopp, S. Schmitt, and E. Schmitt.

*Journal of Immunology*, 173:267-274, 2004.

- 5) **Mast cells are crucial for early inflammation, emigration of Langerhans cells and specific CTL responses following topical application of TLR7 ligand.**

Heib V, Becker M, Warger T, Rechtsteiner G, Tertilt C, Klein M, Bopp T, Taube C, Schild H, Schmitt E, and Stassen M.

*Blood*, zur Veröffentlichung eingereicht, unter Revision.

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.	Entwicklung und Differenzierung muriner Mastzellen.....	1
2.	Rolle der Mastzellen im Immunsystem .....	3
3.	Mastzell- spezifische Aspekte der Cytokinexpression: Die Rolle der NFAT- Faktoren („nuclear factor of activated T cells“).....	6
3.1	Struktur der NFAT- Faktoren .....	7
3.2	Regulation der NFAT- Faktoren.....	8
4.	Zielsetzung der Arbeit .....	11
<b>II.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>12</b>
1.	Tiere .....	12
2.	Arbeiten mit Mauszellen.....	12
2.1	Verwendete Plastikwaren .....	12
2.2	Puffer und Reagenzien .....	13
3.	Cytokine .....	14
4.	Antikörper.....	15
4.1	Antikörper für ELISAs .....	15
4.2	Antikörper für molekularbiologische Methoden.....	16
5.	Kulturmedien .....	16
6.	Zellen .....	17
6.1	Bestimmung der Lebendzellzahl.....	17
6.1.1	Präparation von Knochenmarksmastzellen (BMMC).....	17
6.1.2	Differenzierung von BMMC aus Knochenmarksvorläuferzellen .....	18
6.2	Stimulation von Mastzellen .....	18
6.2.1	Stimulation von Mastzellen mit dem Calcium- Ionophor Ionomycin .....	18
6.2.2	Stimulation von Mastzellen durch Kreuzvernetzung der IgE- Rezeptoren .....	18
6.3	Präparation von OVA TCR transgenen T- Zellen .....	19
6.3.1	Milzzellpräparation .....	19
6.3.2	Separation von naiven CD4 <sup>+</sup> /Mel 14 <sup>high</sup> Zellen .....	19
6.3.3	Positivselektion von CD4 <sup>+</sup> Zellen .....	20
6.3.4	Entfernung der magnetischen Markierung von CD4 <sup>+</sup> Zellen .....	20
6.3.5	Positivselektion von Mel 14 <sup>high</sup> T- Zellen.....	20
6.3.6	Differenzierung der naiven (Mel 14 <sup>high</sup> ) CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	21
6.3.7	Differenzierung von Th1-Zellen.....	21
6.3.8	Stimulation von Th1 und Th2- Zellen .....	21
7.	Elektroporation von Mastzellen.....	22
7.1	Reportergenuntersuchungen mit Mastzellen .....	22

8.	RNA- Interferenz .....	23
9.	Arbeiten mit Bakterien.....	25
9.1	Bakterienstämme .....	25
9.1.1	Kulturmedien für Bakterien .....	25
9.2	Kultivierung von Bakterien .....	26
9.2.1	Selektion einzelner Bakterienklone.....	26
9.2.2	Expansion von Bakterien in Flüssigkultur .....	26
9.2.3	Aufbewahrung und Entsorgung der Bakterien.....	27
9.3	Transformation von Bakterien.....	27
10.	Nachweis der TNF $\alpha$ - Produktion .....	27
11.	ELISA („E_nzyme L_inked I_mmunosorbent A_ssay“) .....	27
11.1	ELISAs zur Bestimmung von Cytokinen .....	28
12.	Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	29
12.1	Puffer und Reagenzien für das Arbeiten mit DNA .....	29
12.2	Isolierung von Nukleinsäuren.....	30
12.2.1	Isolierung von Plasmid- DNA.....	30
12.2.2	Isolierung von RNA .....	30
12.2.3	Reverse Transkription.....	30
12.3	PCR („P_olymerase C_hain R_eaction“).....	31
12.3.1	Nachweis von DNA im Gel.....	32
12.3.2	Gelelution von DNA .....	33
12.4	Plasmide .....	33
13.	Chromatin- Immun- Präzipitation (ChIP).....	35
14.	Semiquantitative Echtzeit- PCR- Analyse (qRT- PCR).....	35
15.	Degranulationstest .....	37
<b>III.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>38</b>
1.	Vergleichende Untersuchung der Th2- Cytokinproduktion von Mastzellen aus Mäusen mit kombinierter Defizienz für NFATc2 und NFATc3.....	38
1.1	Die Aktivierung von GATA- und NF- $\kappa$ B- Faktoren wird in den NFATc2/c3- defizienten Mastzellen nicht beeinflusst. ....	41
1.2	Untersuchung der TNF $\alpha$ - Produktion von Mastzellen aus NFATc2/c3- defizienten Mäusen. ....	42
2.	Untersuchung der Cytokinproduktion von NFATc2- und NFATc3- einfach- defizienten Mäusen. ....	44
3.	Die Degranulation von Mastzellen aus NFAT- defizienten Mäusen ist unbeeinträchtigt.....	46

4.	Sind weitere Transkriptionsfaktoren der NFAT- Familie an der Regulation der IL-9-, IL-13- und TNF $\alpha$ - Expression beteiligt?.....	47
5.	Transfektion von Mastzellen mit siRNA .....	51
5.1	„Knock- down“ von NFATc2 durch Verwendung NFATc2- spezifischer siRNA. ....	52
6.	Chromatinimmunpräzipitation (ChIP).....	54
6.1	Sowohl NFATc2 als auch NFATc1 binden an den TNF $\alpha$ -, IL-13-, IL-9- Promoter. ....	55
7.	Die relative Expression von NFATc1 in Mastzellen aus Wildtyp- und NFATc2- defizienten Mäusen ist vergleichbar.....	60
7.1	Rolle von NFATc1 bei der TNF $\alpha$ -, IL-13- und IL-9- Expression .....	61
7.2	„Knock- down“ von NFATc1 durch Einsatz NFATc1 spezifischer siRNA .....	61
7.3	In Mastzellen aus NFATc2- defizienten Mäusen wird die restliche TNF $\alpha$ -und IL-13- Expression durch NFATc1- spezifische siRNA noch weiter reduziert. ....	63
8.	Die Überexpression von NFATc1 in NFATc2- defizienten Mastzellen steigert die Expression von TNF $\alpha$ und IL-13. ....	65
<b>IV.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>68</b>
<b>V.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>74</b>
<b>VI.</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>75</b>
<b>VII.</b>	<b>ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>81</b>

## **I. Einleitung**

### **1. Entwicklung und Differenzierung muriner Mastzellen**

Die Bezeichnung Mastzelle geht auf Paul Ehrlich zurück. Als Doktorand gelang es ihm 1879, solche Zellen im Bindegewebe mit Hilfe von Anilinfarbstoffen anzufärben. Die Färbeseigenschaft beruht auf den im Cytoplasma dicht aneinanderliegenden Granula, so dass die Zelle wie „gemästet“ erscheint und seitdem Mastzelle genannt wird (1). Mastzellen gehören, wie Makrophagen und Granulozyten, zu den hämatopoetischen Zellen. Mastzellvorläufer entstehen im Knochenmark, verlassen dieses im unreifen Zustand und wandern über das Blut in ihre jeweiligen Zielgewebe ein (2). Dort differenzieren sie unter dem Einfluss von Cytokinen und Gewebefaktoren zu reifen Mastzellen. Mastzellvorläuferzellen sind in der Maus definiert als Thy-1<sup>low</sup>, c-kit<sup>high</sup>, tragen aber noch nicht den hochaffinen Rezeptor für IgE (FcεRI) (3). Sowohl in der Maus als auch im Menschen gibt es zwei Hauptpopulationen von Mastzellen, Schleimhautmastzellen (murin: MMC, „mucosal type mast cells“) und Bindegewebsmastzellen (murin: CTMC, „connective tissue type mast cells“). MMC sind vor allem in Schleimhäuten, so in der Lamina propria des Gastrointestinaltraktes sowie dem Epithel und den mucosalen Schichten der Bronchien, aber auch perivaskulär um postkapilläre Venolen herum, lokalisiert. Bindegewebsmastzellen kommen in der Haut und in der Bauchhöhle (Peritoneum) vor. Somit sind Mastzellen an allen Orten des Körpers vertreten, die leicht in Kontakt mit der Umwelt und mit potentiell pathogenen Organismen kommen. Die beiden Hauptpopulationen der Mastzellen unterscheiden sich phänotypisch in ihrer Größe und Granulierung sowie in der Zusammensetzung und dem Gehalt der Granulainhaltsstoffe, was die Unterscheidung beider Zellpopulationen mittels histologischer Färbetechniken ermöglicht. Da im murinen System weder MMC noch CTMC für *in vitro*- Tests in ausreichend hoher Zahl aus den entsprechenden Geweben isoliert werden können, werden sogenannte BMMC („bone marrow-derived mast cells“) als anerkanntes *in vitro*- Äquivalent für mucosale Mastzellen verwendet. Diese Zellen werden aus Knochenmarkszellen durch eine mehrwöchige Kultur in Gegenwart von Interleukin-3 generiert (4, 5).

Der entscheidende Wachstums- und Differenzierungsfaktor für humane und murine Mastzellen ist jedoch *in vivo* der „stem cell factor“ (SCF), der Ligand des c- kit-Rezeptors, CD117 (6, 7). Mäuse mit einem Defekt im c- kit- Signalweg<sup>1</sup> entwickeln keine Mastzellen (8, 9). Man kann diese Mastzell- defizienten Mäuse durch adoptiven Transfer von *in vitro* generierten Mastzellen aus Knochenmark oder embryonalen Stammzellen rekonstituieren (10). Damit stellen diese Mäuse ein ideales System dar, um die Rolle von Mastzellen *in vivo* zu studieren.

Mastzellgranula enthalten eine Reihe von Substanzen mit pleiotroper Wirkung, darunter Proteasen und vasoaktive biogene Amine wie Histamin und Serotonin. Werden Mastzellen über einen entsprechenden Stimulus aktiviert, so können sie den Inhalt der Granula innerhalb von Minuten sezernieren. Aktivierte Mastzellen synthetisieren ebenfalls Lipidmediatoren wie Prostaglandine und Leukotriene sowie Cytokine *de novo* und setzen diese frei (9, 11).

---

<sup>1</sup> WBB6F1-W/W<sup>v</sup>-Mäuse: das mutante Kit<sup>w</sup>- Allel codiert einen c- Kit- Rezeptor ohne Transmembrandomäne, das mutante Kit<sup>w-v</sup>-Allel weist eine Punktmutation in der Tyrosinkinase-Domäne des Rezeptors auf.



**Tabelle 1: Übersicht über wichtige Mediatoren und Cytokine, die von Mastzellen nach der Aktivierung freigesetzt werden können (9, 12, 13).**

<b>Biogene Amine :</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Histamin</li> <li>➤ Serotonin</li> </ul>
<b>Lipidmediatoren :</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Prostaglandine</li> <li>➤ Leukotriene</li> </ul>
<b>Proinflammatorische Cytokine :</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Interleukin-1 (IL-1)</li> <li>➤ IL-6</li> <li>➤ Tumornekrosefaktor-<math>\alpha</math> (TNF-<math>\alpha</math>)</li> </ul>
<b>Immunsupprimierende Cytokine :</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ IL-10</li> <li>➤ Transforming growth factor-<math>\beta</math> (TGF-<math>\beta</math>)</li> </ul>
<b>Th1-Cytokine :</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ IL-2</li> <li>➤ Interferon-<math>\gamma</math> (IFN-<math>\gamma</math>)</li> <li>➤ IL-12 (p40-Kette)</li> </ul>
<b>Th2-Cytokine :</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ IL-4</li> <li>➤ IL-5</li> <li>➤ IL-9</li> <li>➤ IL-13</li> </ul>
<b>Hämatopoetische Cytokine :</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ IL-3</li> <li>➤ Granulocyten und Makrophagen "colony-stimulating factor" (GM-CSF)</li> </ul>
<b>Chemokine :</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Macrophage chemoattractant protein-1 (MCP-1)</li> <li>➤ Macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2)</li> </ul>

## 2. Rolle der Mastzellen im Immunsystem

Das prominenteste Charakteristikum von Mastzellen ist die Expression des hochaffinen Rezeptors für Immunglobulin E (IgE), Fc $\epsilon$ -RI. In der Maus exprimieren außer Mastzellen lediglich noch basophile Granulocyten diesen Rezeptor. Im Menschen ist der Fc $\epsilon$ -RI darüber hinaus auch auf Langerhans- Zellen, eosinophilen Granulocyten und Makrophagen zu finden, allerdings besitzen diese Zellen nur geringe Mengen dieses Rezeptors auf ihrer Oberfläche (14, 15). Werden im Laufe einer Th2- Immunantwort IgE- Antikörper von B- Zellen gebildet, so binden diese mit ihrem Fc- Teil mit hoher Affinität an den Fc $\epsilon$ -RI auf der Oberfläche der Mastzellen. Eine Kreuzvernetzung der IgE/ Fc $\epsilon$ -RI- Komplexe durch Antigen ist der bekannteste und am besten charakterisierte Aktivierungsmechanismus solcher „armierter“

Mastzellen und wird daher als klassische Aktivierung von Mastzellen bezeichnet. Eine derartige Stimulation ist die stärkste physiologische Aktivierung für Mastzellen und führt sowohl zur sofortigen, massiven Degranulation der Zellen als auch zur *de novo*- Synthese weiterer Mediatoren und Cytokine (siehe Tabelle 1). Aufgrund dieser Reaktionen sind Mastzellen bekannt für ihre Funktion als Effektorzellen in Th2-vermittelten allergischen Erkrankungen wie allergischer Rhinitis, Neurodermitis und Asthma (9, 16). Die Bezeichnung allergischer Reaktionen vom Typ I als Soforttyp-Allergie beruht auf der schnellen Degranulation der Mastzellen nach Allergenkontakt. Neben lokalen Reaktionen wie Juckreiz und Schwellungen kann die Degranulation der Mastzellen im Falle einer systemischen Freisetzung vasoaktiver Substanzen zu einem anaphylaktischen Schock führen. Durch die Produktion von Th2- Cytokinen und Chemokinen nach Allergenkontakt sind Mastzellen auch an der Initiation von Spätphasereaktionen allergischer Erkrankungen beteiligt (8, 9). Th2- Cytokine wie IL-9 und IL-13 sind bei allergischem Asthma u.a. an der zellulären Infiltration der Lunge, insbesondere durch eosinophile Granulocyten, der Atemwegsüberempfindlichkeit („airway hyperresponsivness“/ AHR) sowie der Mucusproduktion beteiligt (17-19). Inwieweit Mastzellen *in vivo* zu solchen Prozessen beitragen, war lange Zeit umstritten. Der Vergleich des Verlaufs von experimentellem Asthma in mastzelldefizienten Mäusen und den entsprechenden Wildtypkontrollen führte bei verschiedenen Arbeitsgruppen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Eine Arbeit der Arbeitsgruppe Galli et al. konnte jedoch nachweisen, dass die Rolle der Mastzellen in experimentell induziertem Asthma vom Immunisierungsprotokoll abhängt, mit dem die Mäuse behandelt wurden. Nach Immunisierung mit hohen Antigendosen und Adjuvans über einen kurzen Zeitraum konnte kein Unterschied in der Pathogenese des Asthmas zwischen mastzelldefizienten und Wildtypmäusen festgestellt werden. Im Falle einer Sensibilisierung der Tiere mit einem Protokoll, das die physiologischen Bedingungen eher widerspiegelt, d.h. niedrige Antigendosen ohne Adjuvans, die über einen längeren Zeitraum verabreicht werden, zeigten die mastzelldefizienten Mäuse deutlich schwächere Asthmasymptome als die Wildtypkontrollen. In diesem Asthmodell waren Mastzellen klar an der Pathogenese von allergischem Asthma beteiligt, indem sie als Verstärker der Entzündungsreaktionen fungierten (20-22). Schon seit langem ist bekannt, dass Mastzellen eine wichtige Funktion bei der Abwehr einiger extrazellulärer Parasiten wie Würmern und Zecken zukommt. In mastzelldefizienten Mäusen dauert die Expulsion von darmparasitierenden Würmern

deutlich länger als in Wildtyptieren (23). Th2- vermittelte Immunreaktionen sind primär gegen extrazelluläre Parasiten gerichtet und dieselben Mechanismen, die zu allergischen Reaktionen führen können, gehören zur Abwehrstrategie des Immunsystems gegen derartige pathogene Organismen. Daneben ist mittlerweile bekannt, dass Mastzellen außer über IgE durch eine ganze Reihe weiterer Substanzen aktiviert werden können, so u.a. über IgG (Immunglobulin G)- Antikörper, direkte Interaktionen mit T- Zellen, bakterielle Produkte, Defensine, Komplement-Faktoren, Endothelin und Adenosin (8, 24).

Andere Untersuchungen ergaben, dass Mastzellen ebenfalls Effektorzellen in Th1-vermittelten Erkrankungen wie bestimmten Autoimmunerkrankungen, z.B. experimenteller allergischer Enzephalomyelitis (EAE) und multipler Sklerose sowie bei Überempfindlichkeitsreaktionen vom verzögerten Typ („delayed type hypersensitivity, DTH“) beteiligt sind. Auch in derartigen Erkrankungen verstärken Mastzellen die Infiltration von Leukocyten in das betroffene Gewebe (12, 25).

Mastzellen besitzen neben ihrer Effektorfunktion auch immunregulatorische Eigenschaften. Diese üben sie vor allem durch die von ihnen produzierten Cytokine aus. Insbesondere zu nennen sind hier die Th2- Cytokine IL- 4, IL- 5, IL- 9 und IL-13. IL-4 ist der wichtigste Differenzierungsfaktor für Th2- Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass Mastzellen durch die Produktion von IL-4 die Differenzierung naiver CD4<sup>+</sup> T- Zellen *in vitro* zugunsten von Th2- Zellen beeinflussen können (26). Es ist also durchaus möglich, dass Mastzellen lokal die Entstehung von Th2- Zellen fördern.

IL-5 ist essentiell für die Rekrutierung von eosinophilen Granulocyten. IL-9 und IL-13 sind bei der Entwicklung der Inflammation der Atemwege, der AHR sowie der erhöhten Schleimproduktion beteiligt (18, 19).

Des weiteren wurde beschrieben, dass die unter anderem von Mastzellen produzierten Cytokine IL-4 und IL-13 die Entwicklung IgE- produzierender B-Zellen induzieren können (27, 28).

### 3. Mastzell- spezifische Aspekte der Cytokinexpression: Die Rolle der NFAT- Faktoren („nuclear factor of activated T cells“)

Wie bereits angesprochen ist die Mastzelle in der Lage, ein breites Spektrum an Cytokinen zu produzieren, welches sich größtenteils mit dem Cytokinspektrum von Th2- Zellen überschneidet. Wie an unserem Institut gezeigt werden konnte, existieren jedoch zelltypspezifische Unterschiede in der Regulation der Cytokinproduktion von Th2- Zellen und Mastzellen. So konnte am Beispiel von IL-9 unlängst von uns demonstriert werden, dass in Mastzellen der Transkriptionsfaktor GATA-1, aktiviert durch die p38 MAP- Kinase, wichtig ist für die Produktion dieses Cytokins (29). GATA-1 wird jedoch nicht in Th2- Zellen exprimiert, und die IL-9-Produktion in Th2- Zellen ist unabhängig von p38 MAP- Kinase, die zwar in beiden Zelltypen vorliegt, offensichtlich jedoch teilweise zellspezifische Aufgaben wahrnimmt. Um weitere Aspekte mastzell- spezifischer Cytokinexpression zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Analysen zur Rolle von NFAT- Faktoren in Mastzellen durchgeführt.

NFAT („nuclear factor of activated T cells“) wurde ursprünglich als Transkriptionsfaktor beschrieben, der an den humanen IL-2 Promoter bindet und diesen transaktiviert (30). Kurze Zeit darauf wurde NFAT als Ziel der Immunsuppressiva Cyclosporin A (CsA) sowie FK 506 identifiziert (31-34). Beide Immunsuppressiva sind effiziente Inhibitoren der T-Zell-Aktivierung (35). Mittlerweile zählt man zur NFAT- Familie fünf Mitglieder, welche mit NFATc1 – NFATc4 und NFAT 5 bezeichnet werden. Weitere synonyme Bezeichnungen sind gebräuchlich (siehe Tabelle 2).

	synonyme Bezeichnung
NFAT 1	NFATc2 / NFATp
NFAT 2	NFATc1 / NFATc
NFAT 3	NFATc4
NFAT 4	NFATc3 / NFATx
NFAT 5	Ton EBP / OREBP / NFATz

Tabelle 2: Zusammenstellung der verschiedenen Bezeichnungen der NFAT- Faktoren.

Rot = in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur für NFAT- Faktoren.

Die Expression von NFATc1, NFATc2 und NFATc3 wurde in einer Vielzahl von Zellen des Immunsystems, so auch in T- Zellen und Mastzellen, beschrieben (36). Demnach haben NFATc2 und NFATc3 in T- Zellen eine eher hemmende bzw. regulatorische Funktion und können sich zudem, zumindest teilweise, funktionell ersetzen. Dies wurde dadurch deutlich, dass „Knock- out“-Mäuse für NFATc2 oder NFATc3 kaum Defekte aufweisen, die Kreuzung solcher Mäuse aber NFATc2/NFATc3- defiziente Tiere hervorbringt, die letale lymphoproliferative Erkrankungen entwickeln. Diese Mäuse zeigen eine massive Vergrößerung der Milz und Lymphknoten und entwickeln schwere allergische und autoimmune Erkrankungen, darunter Blepharitis und Pneumonitis, an denen sie im Alter von 8-10 Wochen sterben (37). T- Zellen aus solchen Tieren weisen *in vitro* eine gesteigerte Proliferation sowie eine erhöhte Produktion von IL-4 auf und können zudem unabhängig von einem CD28- Kosignal aktiviert werden (38, 39).

### 3.1 Struktur der NFAT- Faktoren

Die Transkriptionsfaktoren NFATc1- NFATc4, von welchen man jeweils mehrere Isoformen kennt, besitzen eine sehr stark konservierte DNA- bindende Domäne, die strukturell eine Verwandtschaft zur DNA- bindenden Domäne der Familie der REL- Transkriptionsfaktoren aufweist. Aufgrund dieser Verwandtschaft wird die DNA- Bindedomäne der NFAT- Faktoren oft als „Rel similarity domain“ (RSD) bezeichnet. Eine weitere Gemeinsamkeit der NFAT- Faktoren ist die N- terminale Transaktivierungsdomäne (TAD-A) und die regulatorische Domäne. Die regulatorische Domäne ist durch Serin- reiche Motive (SRR) charakterisiert und liegt zwischen der N- terminalen Transaktivierungsdomäne und der RS- Domäne (Abb. 1).

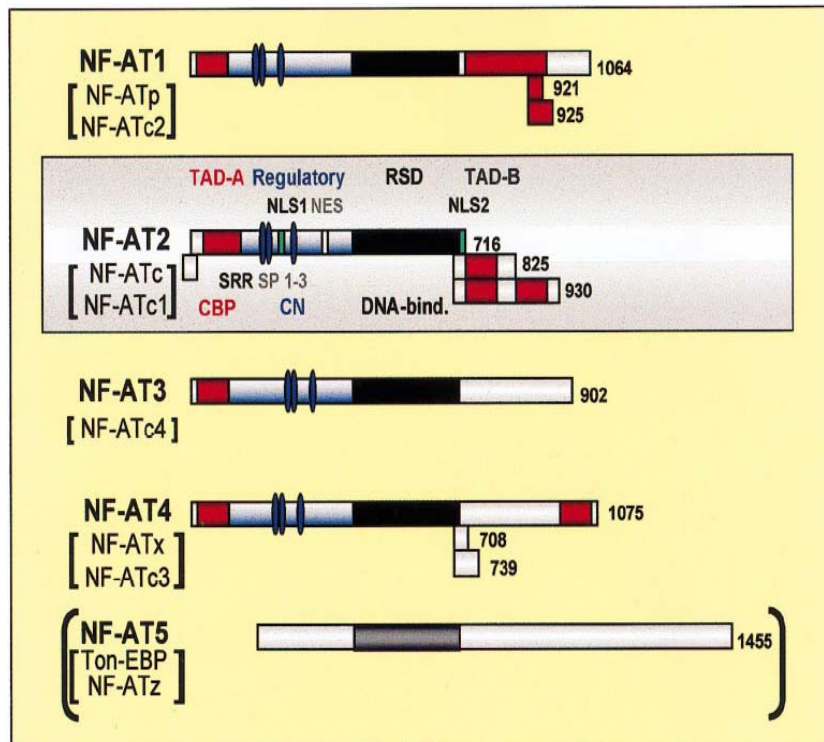


Abb. 1: Schematische Struktur der NFAT- Faktoren (aus Serfling et al., Biochim Biophys Acta 2000)

Rot = N- und C- terminale Transaktivierungsdomänen.

Schwarz = „Rel similarity domain“ (RSD), DNA- Binderegionen der NFAT- Faktoren.

Blau = Position der Serin- reichen Motive (SRR) innerhalb der regulatorischen Domäne sowie der Bindestelle für Calcineurin (CN).

Weiterhin enthält der regulatorische Bereich auch die Bindestellen für die aktivierende Phosphatase Calcineurin und weitere Kinasen, die an der Regulation von NFAT- Faktoren beteiligt sind.

### 3.2 Regulation der NFAT- Faktoren

Bis auf NFAT5, welches durch osmotischen Stress aktiviert wird, werden alle vier NFATc- Formen durch einen Calcium- Influx aktiviert (Abb.2) (40). Wie aus Abbildung 2 hervorgeht, wird in T- Zellen nach Stimulation über den T- Zell- Rezeptor die Phospholipase C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) aktiviert. Aktive PLC- $\gamma$  ist nun in der Lage, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (InsP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) zu hydrolysieren. InsP<sub>3</sub> bindet an seinen Rezeptor am endoplasmatischen Retikulum und steuert die Freisetzung von intrazellulärem Calcium. Die Erhöhung des intrazellulären Calcium- Spiegels führt durch bisher nicht

genau charakterisierte Mechanismen zur Öffnung eines calcium- abhängigen Kanals (CRAC) in der Plasmamembran, was einen anhaltenden Anstieg des intrazellulären Calcium- Spiegels durch Influx extrazellulären Calciums zur Folge hat. Calcium bindet an sein Trägermolekül Calmodulin und Calcium- gebundenes Calmodulin ist in der Lage, die Phosphatase Calcineurin zu aktivieren. Calcineurin aktiviert NFAT-Faktoren durch Dephosphorylierung und ermöglicht so die Translokation der NFAT-Faktoren in den Kern, was schließlich zur Transkription NFAT- abhängiger Gene führt (Abb.2) (41-45).

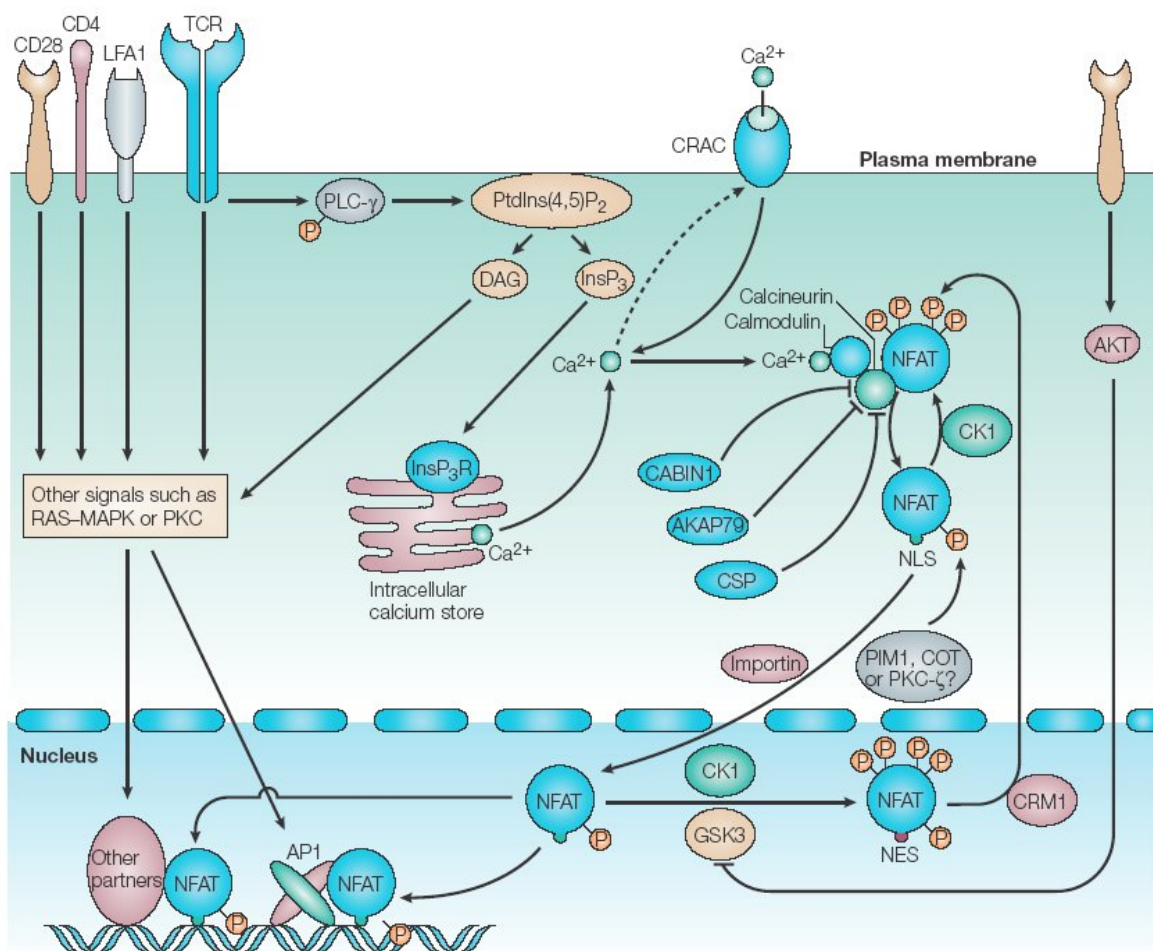


Abb. 2: Regulation der Aktivierung von NFAT-Transkriptionsfaktoren (Quelle: Macian, Nature Reviews in Immunology 2005).

Im Kern interagieren NFAT-Transkriptionsfaktoren mit einer Vielzahl weiterer Transkriptionsfaktoren. Heute kennt man einige transkriptionelle Interaktionspartner von NFAT-Proteinen sowie deren Zielpromotoren (Tabelle 3).

Transkriptionspartner	Zielpromoter	Auswirkung
AP1 (FOS, JUN)	viele Promotoren von Cytokingenen	Transaktivierung
C/ EBP	PPAR- $\gamma$ Promoter	Transaktivierung
MAF	IL-4 Promoter	Transaktivierung
EGR1 und EGR4	TNF Promoter	Transaktivierung
GATA3	IL-4 3'- Enhancer	Transaktivierung
IRF4	IL-4 Promoter	Transaktivierung
MEF2	NUR77 Promoter	Transaktivierung
OCT	IL-3 Enhancer	Transaktivierung
T-bet	IFN $\gamma$ 5' Enhancer	Transaktivierung
p21 <sup>SNFT</sup>	IL-2 Promoter	Inhibition
PPAR-g	IL-2 Promoter	Inhibition
ICER	viele Promotoren von Cytokingenen	Inhibition

Tabelle 3: Transkriptionelle Interaktionspartner von NFAT- Faktoren (adaptiert von Macian, Biochim et Biophys, 2000).

Man kennt heute auch Möglichkeiten, die Aktivierung von NFAT- Faktoren gezielt zu unterbinden. Dazu zählen die Immunsuppressiva Cyclosporin A und FK 506, welche die Aktivität der Phosphatase Calcineurin blockieren und somit indirekt negativ auf die Aktivierung der NFAT- Faktoren wirken. Weitere Inhibitoren für Calcineurin sind das calcineurin- binding- protein1 (CABIN1), das A- Kinase Ankerprotein AKAP79, sowie Mitglieder der sogenannten Calcipressine (CSP) (Abb. 2) (40, 46-49).

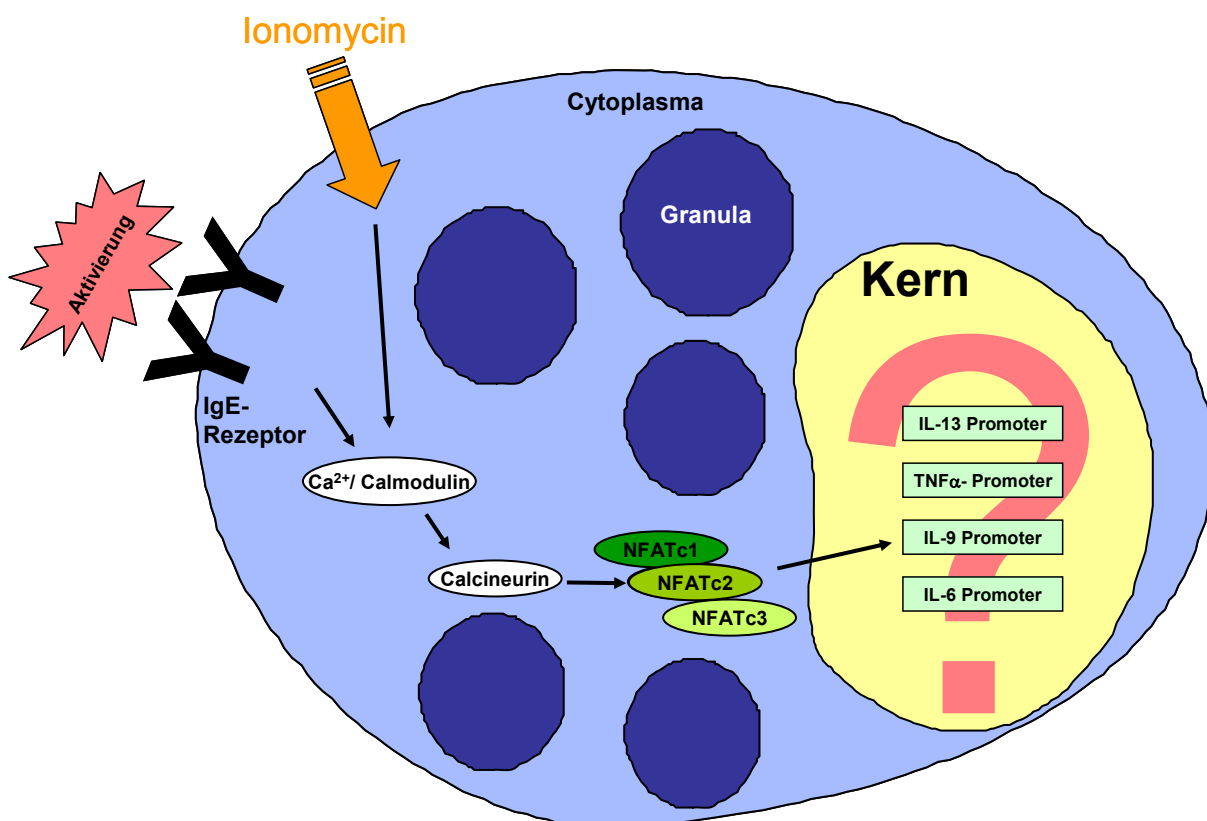
Neben der Phosphatase Calcineurin existieren weitere Regulationsmöglichkeiten der NFAT- Aktivierung. So findet man sogenannte Erhaltungs- Kinasen, die im Cytosol die Phosphorylierung von NFAT- Faktoren aufrechterhalten und so deren Translokation in den Nucleus der ruhenden Zelle verhindern. Hierzu zählt beispielsweise die Casein- Kinase 1 (CK1). Im Kern sind sogenannte Export- Kinasen zu finden (z.B. die Glykogen- Synthase- Kinase3, GSK3), welche durch Phosphorylierung von NFAT im Kern dessen Translokation zurück ins Cytosol induzieren und somit dessen Bindung an Zielpromotoren verhindern (Abb. 2).



#### 4. Zielsetzung der Arbeit

Da der größte Teil des Wissens über Transkriptionsfaktoren der NFAT- Familie mit Hilfe verschiedener Zelllinien generiert wurde, wusste man zur Beginn dieser Arbeit über deren Funktion in primären murinen Mastzellen nur sehr wenig. Lediglich eine Publikation der Arbeitsgruppe um Anjana Rao (50) konnte kürzlich eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors NFATc2 an der IL-13- Expression in murinen Mastzellen zeigen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle von NFAT- Faktoren in Mastzellen zu untersuchen. Fokussiert wurden diese Untersuchungen auf die Analyse der Funktion der in Mastzellen exprimierten NFAT- Faktoren c1- c3 bei der Regulation der Produktion der Th2- Cytokine IL-9 und IL-13, sowie der proinflammatorischen Cytokine  $TNF\alpha$  und IL-6 (Abb. 3)



**Abb. 3: Welche Rolle spielen NFAT- Faktoren in Mastzellen?**

Die Rolle der in Mastzellen exprimierten  $Ca^{2+}$ - abhängigen NFAT- Faktoren (NFATc1- NFATc3) hinsichtlich der Regulation der IL-13-,  $TNF\alpha$ -, IL-9- und IL-6- Produktion soll nach Aktivierung der Mastzellen (durch Kreuzvernetzung der IgE- Rezeptoren oder Ionomycin- Stimulus) in dieser Arbeit untersucht werden.

## **II. Material und Methoden**

### **1. Tiere**

Es wurden Mäuse des Inzuchtstammes Balb/c J verwendet. Diese Tiere wurden ursprünglich vom Zentralinstitut für Versuchstierforschung, Hannover, bezogen und im institutseigenen Tierstall weitergezüchtet. Vom Institut für Pathologie in Würzburg wurden ova- transgene Balb/c, NFATc2<sup>-/-</sup>, NFATc3<sup>-/-</sup>-und NFATc2/c3<sup>-/-</sup>- Mäuse bezogen.

### **2. Arbeiten mit Mauszellen**

Alle Arbeiten an Zellkulturen wurden an einer sterilen Werkbank (Horizontal-oder Vertikalflow) und mit sterilen Glas- bzw. Plastikgeräten durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem CO<sub>2</sub>- Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>- Gehalt in gesättigter Wasserdampfatosphäre.

#### **2.1 Verwendete Plastikwaren**

Zellkulturplatten:	24-well Flachboden, Costar 3542
	96-well Flachboden, Costar 3598
Petrischalen:	Greiner, 633102
	Falcon, 3003
Zentrifugenröhrchen:	15 ml, Greiner 188271
	50 ml, Greiner 227261
	1,5 ml Safe lock (Eppendorf)

## **2.2 Puffer und Reagenzien**

Alle Reagenzien und Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Steinheim) in p.a. (pro analysis) Qualität bezogen.

### **Glutaminlösung (Gln):**

Eine 0,2 M Stammlösung wurde mit 29,2 g/ L(+)-Glutamin (Fa. Roth, Nr. 3772) in VE-Wasser angesetzt. Die sterilfiltrierte Stammlösung wurde bei – 20°C aufbewahrt. Sie wurde den Kulturmedien im Verhältnis 1:100 zugesetzt.

### **Natriumpyruvatlösung (NaPyr):**

Eine sterile 0,1M NaPyr-Lösung (Seromed, München, Nr. L0473) wurde bei 4°C aufbewahrt und den Kulturmedien im Verhältnis 1:100 zugesetzt.

### **Fötale Kälberserum (FCS):**

Das verwendete FCS stammte von der Firma Gibco, (Charge 50G9993X). Es wurde zur Inaktivierung der Komplementkomponenten 45min bei 56°C im Wasserbad erhitzt und anschließend in Aliquoten zu 100ml bei –20°C bis zum Gebrauch aufbewahrt.

### **Rinderserumalbumin (BSA):**

BSA-Pulver (Roche, Mannheim) wurde je nach Anwendung mit PBS [1x] als 0,1 - 5%ige Lösung angesetzt, sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt.

### **Ionomycin:**

Ionomycin- Calciumsalz (aus *Streptomyces conglobatus*) wurde von der Firma Sigma (IO634) bezogen. Die Stammlösung wurde in einer Konzentration von 1,3mM in Ethanol angesetzt, 50µM Lösungen wurden aliquotiert und bei -20°C gelagert.

### Physiologische Trypanblaulösung:

Trypanblau ist ein sogenannter Vitalfarbstoff. Tote Zellen werden angefärbt, während lebende Zellen mit intakter Membran den Farbstoff nicht aufnehmen. Mit diesem Farbstoff wurde die Lebendzellzahl in Zellsuspensionen bestimmt. Zu seiner Herstellung wurden die folgenden Lösungen A und B im Verhältnis 5:1 gemischt:

Lösung A: 0,2% Trypanblau (Roth, Karlsruhe) in VE-Wasser

Lösung B: 4,25% NaCl in VE- Wasser

### PBS (phosphate buffered saline):

Es wurde eine 10- fach konzentrierte Stammlösung in VE- Wasser hergestellt:

1,4M NaCl (81,8 g/l)

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

Der pH-Wert wurde mit 10N NaOH auf 6,6 eingestellt. Der gebrauchsfertige Puffer [1x] wurde durch Verdünnung (1:10) dieser Stammlösung hergestellt, der pH-Wert betrug dann 7,2.

### Gey's Lösung (Lysepuffer):

Zur Lyse von Erythrocyten durch osmotischen Schock wurde eine 0,83%ige Ammoniumchlorid-Lösung folgender Zusammensetzung verwendet:

8,28g/l NH<sub>4</sub>Cl

1g/l KHCO<sub>3</sub>

0,037g/l EDTA

## 3. Cytokine

Die aufgeführten Cytokine wurden zur Kultivierung, Differenzierung und Stimulation muriner Mastzellen sowie als Standards im ELISA verwendet.

### Murines IL-3 (mIL-3):

Für die Kultur der in dieser Arbeit verwendeten „bone marrow derived mast cells“ (BMMC) wurde eine IL-3-Präparation verwendet, die mit Hilfe einer DEAE- Säule aus dem Kulturüberstand der Tumorzell- Linie WEHI- 3B gewonnen wurde. Ein Unit entspricht der Konzentration, die bei der IL-3- Indikatorzell- Linie DA-1 eine halbmaximale Proliferation induzieren kann.

### **Murines rekombinantes Interleukin-4 (mrIL-4)**

Aus transformierten X63Ag8-653 Myelomzellen wurde mrIL-4 gewonnen und von Prof. Dr. E. Schmitt über Affinitätschromatographie gereinigt. Eine Unit ist als Konzentration definiert, die zur halbmaximalen Proliferationssteigerung der Zell-Linie F4/4K.6 führt.

## **4. Antikörper**

### **4.1 Antikörper für ELISAs**

#### **IL-6- ELISA:**

Für die Detektion von IL-6 über ELISA wurden die Antikörper Ratte anti- Maus IL-6 und anti- Maus- IL-6- biotinyliert verwendet. Als Positivkontrolle wurde rekombinantes murines IL-6 eingesetzt. Die Antikörper sowie mrIL-6 wurden von BD Pharmingen, (Heidelberg, Deutschland) bezogen.

#### **IL-9- ELISA:**

229.4 und D9302C12bio (Ratte- bzw Hamster-anti Maus IL-9).

Der Klon 229.4 (Ratte-anti-Maus) wurde durch die Fusion von Milzzellen aus mit RP-HPLC gereinigtem mrIL-9 gewonnen. Der Klon D9302C12 (Hamster-anti-Maus) wurde von Dr. J.van Snick (Ludwig Cancer Research) zur Verfügung gestellt.

#### **IL-13- ELISA:**

Anti-Maus-IL-13 und Anti-Maus-IL-13bio. (Ratte-bzw. Ziege-anti Maus-IL-13).

Beide Antikörper und die Positivkontrolle mrIL-13 wurden bei R&D Systems GmbH, Wiesbaden (MAP413, BAF413 und 413-ML-005) bezogen.

## **4.2 Antikörper für molekularbiologische Methoden**

### **Antikörper für Chromatin- Immun- Präzipitationen:**

NFATc2 (AB1-209; ImmunoGlobe, Germany), NFATc1 (AB1-205; ImmunoGlobe), anti-Acetyl-Histon H3 (#06-599, Upstate, USA) anti- GST (sc-459, Santa Cruz Biotechnology, US).

## **5. Kulturmedien**

Die Medien wurden als Trockensubstanz von der Firma Gibco (Grand Island, USA) bezogen. Alle Medien und Puffer wurden mit vollentsalztem (Millipore-Entmineralisierungsanlage, Millipore, Molsheim,F) und durch Aktivkohle gereinigtem Wasser (VE- Wasser) angesetzt, sterilfiltriert (0,2 µm Sterilfilter) und bei 4°C aufbewahrt.

### **IMDM (Iscove´s modified Dulbecco´s medium):**

17,67 g/l IMDM Trockenpulver

3,02 g/l NaHCO<sub>3</sub>

1% Penicillin/Streptomycinlösung

5x10<sup>-5</sup>M 2-Mercaptoethanol (Serva, Heidelberg, Nr. 28625)

Phenolrot als Indikator

### **MEM (minimal essential medium):**

10,58 g/l MEM-Trockenpulver

4,77 g/l HEPES

### **Testmedium:**

IMDM

10% fötales Kälberserum (FCS)

1% Natriumpyruvatlösung

1% Glutaminlösung

### **Mastzellfutter:**

Testmedium [10%FCS] mit

20 U/ml WEHI IL-3

50 U/ml mrlL-4

200 ng/ml Kit- Ligand

## **6. Zellen**

### **6.1 Bestimmung der Lebendzellzahl**

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit physiologischer Trypanblau- Lösung verdünnt. Dabei färben sich die toten Zellen blau an, während lebende Zellen den Farbstoff aufgrund ihrer intakten Membran nicht aufnehmen. Mittels einer Neubaurzählkammer (Kammertiefe 0,1mm) wurde die Zahl der lebenden 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 ( $N \times V \times 10^4 =$  Zellzahl/ml).

#### **6.1.1 Präparation von Knochenmarksmastzellen (BMMC)**

5-10 Wochen alte Mäuse wurden durch Genickbruch getötet und die Femur- und Tibiadiaphysen der Hinterbeine steril herauspräpariert. Die Markhöhlen wurden mit Hilfe einer Spritze und den entsprechenden Kanülen (0,55x25 mm für Femur oder 0,4x12mm für Tibia) mit MEM ausgespült. Das so gewonnene, noch recht kohärente Knochenmarksgewebe wurde zunächst durch mehrmaliges Resuspendieren in eine homogene Zellsuspension zerlegt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (10 min bei 500x g) und mit einem entsprechenden Volumen an Gey's Lysepuffer behandelt, um enthaltene Erythrocyten zu lysieren. Die Reaktion wurde mit einem Überschuss an MEM gestoppt. Danach wurde die Zellsuspension über ein Zellsieb gegeben (70µm Nylon, REF 352350, BD Falcon), um gröbere Partikel und Zellschrott abzutrennen. Die Zellen wurden wieder abzentrifugiert, in einem definierten Volumen aufgenommen, und die Zellzahl wurde ermittelt.

### 6.1.2 Differenzierung von BMMC aus Knochenmarksvorläuferzellen

Die Knochenmarkszellen wurden auf eine Zellzahl von  $2-3 \times 10^6$  Zellen/ml in Kulturmedium oder KL- Kulturmedium eingestellt und in einem Volumen von jeweils 1ml in 24-well- Platten ausgesät. Jeden zweiten Tag wurden die Zellen gefüttert, indem die Hälfte des Kulturmediums durch frisches ausgetauscht wurde. In Abständen wurden die Suspensionszellen durch vorsichtiges Resuspendieren und Überführen in ein neues Well von den adhärennten Zellen abgetrennt. Dies wurde während der ersten 3 Wochen der Kultur alle 2-3 Tage durchgeführt, später bei Bedarf. Nach 4-5 Wochen waren 90-95 % der so kultivierten Zellen BMMC (bone marrow-derived mast cells), wie durch mastzellspezifische Färbungen oder durch die indirekte Messung der Expression des  $Fc\epsilon$ -RI über gebundenes IgE im FACS bestätigt werden konnte.

## 6.2 Stimulation von Mastzellen

### 6.2.1 Stimulation von Mastzellen mit dem Calcium- Ionophor Ionomycin

Mastzellen wurden geerntet, gewaschen, in Testmedium aufgenommen und durch die Zugabe von Ionomycin stimuliert. Die Endkonzentration an Ionomycin in den Testansätzen betrug bei Reporterassays  $0,5\mu\text{M}$  und bei allen anderen Ansätzen  $1\mu\text{M}$ .

### 6.2.2 Stimulation von Mastzellen durch Kreuzvernetzung der IgE- Rezeptoren

Mastzellen wurden geerntet, gewaschen, in Testmedium aufgenommen und mit  $2,5\mu\text{g/ml}$  anti-DNP-IgE für 72 Stunden präinkubiert. Nach erneutem Waschen der Zellen erfolgte die Stimulation mit  $2,5\mu\text{g/ml}$  anti-IgE (EM95.3) für 4 Stunden (IL-6 und  $\text{TNF}\alpha$ ) bzw. 48 Stunden (IL-9 und IL-13).



### **6.3 Präparation von OVA TCR<sup>2</sup> transgenen T- Zellen**

#### **6.3.1 Milzzellpräparation**

Die Mäuse wurden durch Genickbruch getötet. Alle folgenden Präparationsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Nach der Entnahme der Milz wurde das Organ in kaltem MEM aufbewahrt, dann durch ein feines Metallsieb gedrückt und die so entstandene Zellsuspension gründlich resuspendiert. Bindegewebsaggregate wurden durch zehnminütige Sedimentation und Abziehen des Überstandes mit den nicht sedimentierten Zellen entfernt. Diese wurden 10 min bei 300xg und 4°C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde zur Lyse der Erythrocyten für 1min in Gey's Lösung 1ml/1x10<sup>8</sup> Zellen resuspendiert. Die Lyse wurde durch die Zugabe von MEM + 2% FCS gestoppt, um eine Schädigung anderer Zellen zu verhindern. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellen in MEM + 2% FCS aufgenommen.

#### **6.3.2 Separation von naiven CD4<sup>+</sup>/Mel 14<sup>high</sup> Zellen**

Zur Untersuchung der Regulation der IL-9-, IL-13- und IL-4- Produktion in aktivierten Th2-Zellen wurden zunächst naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Milzzellen OVA TCR transgener Mäuse bzw. NFATc2/NFATc3- Knock out Mäuse isoliert. Die Mäuse wurden vom pathologischen Institut in Würzburg zur Verfügung gestellt. Hierzu wurde das VarioMACS- Trennsystems der Firma Miltenyi (Bergisch Gladbach) verwendet. Die Anreicherung erfolgte als sequentielle Positivselektion nach indirekter magnetischer Markierung der CD4- und Mel 14-Moleküle.

Materialien:

VarioMACS-Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (Nr. 431-02)
VS <sup>+</sup> -Trennsäulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (Nr. 413-06)
Anti-FITC- MultisortBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (Nr. 587-11)
Release-Reagenz	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (Nr. 590-11)
Streptavidin-MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (Nr. 481-01)
MACS-Puffer A	0,5% BSA / 0,01%NaN <sub>3</sub> / 5mM EDTA / PBS [1x]
MACS-Puffer B	0,5% BSA / 5mM EDTA / PBS [1x]

---

<sup>2</sup> T- Zellrezeptor, welcher spezifisch das Peptid Ovalbumin<sub>323-339</sub> gebunden an MHCII erkennt.

GK1.5-FITC (Ratte-anti-Maus CD4-FITC)

Mel 14-bio (Ratte-anti-Maus Mel 14-biotin)

Streptavidin-TRI-COLOR Caltag, San Francisco, CA, USA (No. SA1006)

MEM + 2% FCS

### 6.3.3 Positivselektion von CD4<sup>+</sup> Zellen

Gesamtmilzzellen aus 10 Mäusen wurden entsprechend 6.4.1 präpariert.  $1 \times 10^9$  Milzzellen wurden in 2ml MACS-Puffer B mit GK1.5-FITC (Ratte-anti-Maus CD4-FITC, 0,5µg/ml) resuspendiert und 10 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 5ml Puffer B zugegeben, die Zellen abzentrifugiert (500xg, 5min) und mit 5ml Puffer B gewaschen. Die Zellen wurden 15min bei 4°C mit Anti- FITC- MultisortBeads (1:10 in Puffer B, 1ml) inkubiert, abzentrifugiert und mit 2ml Puffer B resuspendiert. Verbliebene Bindegewebsaggregate und tote Zellen wurden entfernt, indem die Zellen über ein Zellsieb (70µm, Falcon) gegeben wurden. Nach Zentrifugation des Eluates wurde das Zellsediment in 5ml Puffer B resuspendiert und 1ml-weise auf eine VS<sup>+</sup>-Trennsäule (im VarioMACS-Magneten) gegeben. Die Säule wurde dreimal mit 3ml Puffer B gespült, dann aus dem Magneten entnommen und die Zellen mit 5ml Puffer B eluiert. Das Eluat wurde auf eine neue Säule aufgetragen und die Separation entsprechend wiederholt.

### 6.3.4 Entfernung der magnetischen Markierung von CD4<sup>+</sup>Zellen

Um die Anti- FITC- MultisortBeads von den Zellen abzutrennen, wurde das Eluat zentrifugiert und mit Release- Reagent (1:20 in 1ml Puffer B, 10 min, RT) inkubiert. Die Depletion noch verbliebener magnetischer Zellen erfolgte, indem die Zellen auf eine VS<sup>+</sup>-Säule gegeben wurden und mit 5ml Puffer B ungebundene Zellen eluiert wurden (ohne die Säulen aus dem Magneten zu nehmen!).

### 6.3.5 Positivselektion von Mel 14<sup>high</sup> T- Zellen

Die Zellzahl wurde bestimmt, das Eluat abzentrifugiert und das Zellsediment mit  $1 \times 10^8$  Zellen/ml in Puffer A mit Mel 14-bio (Ratte-anti-Maus-Mel 14-biotinyliert, 10µg/ml, 10min, 4°C) resuspendiert. Nach zweimaligem Waschen mit je 5ml Puffer A wurden die Zellen mit  $1 \times 10^9$  Zellen/ml in Puffer A mit Streptavidin- TRI- COLOR (0,3µg/ml, 1min, RT) inkubiert, dann wurden Streptavidin- Microbeads (1:20 in Puffer A, 1ml/ $1 \times 10^8$  Zellen) zugegeben und die Zellen weitere 10min inkubiert. Die

Zellsuspension wurde vorsichtig resuspendiert und auf eine VS<sup>+</sup>-Säule aufgetragen. Nach dreimaligem Spülen mit je 3ml Puffer A wurde die Säule aus dem Magneten genommen und die gebundenen Zellen mit 5ml Testmedium eluiert. Die erhaltenen CD4<sup>+</sup>/Mel 14<sup>high</sup> T-Zellen wurden gezählt, abzentrifugiert, mit  $1 \times 10^7$ /ml in Testmedium aufgenommen und bis zur Stimulation bei 4°C aufbewahrt.

### 6.3.6 Differenzierung der naiven (Mel 14<sup>high</sup>) CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu Th2-Zellen

Die erhaltenen CD4<sup>+</sup>/Mel 14<sup>high</sup> T-Zellen wurden auf  $1 \times 10^6$ /ml in Testmedium eingestellt. Um die Differenzierung zu Th2-Zellen zu erreichen, wurde dem Medium 2000U/ml IL-4 und 10µg/ml eines anti-IFN $\gamma$ -Antikörpers zugesetzt. Die Zellen wurden durch plattengebundene Antikörper (2µg/ml des klonotypischen Antikörpers KJ1.16.1 und 10µg/ml anti-CD28) stimuliert. Nach drei Tagen wurden die Zellen in neue Zellkulturplatten (ohne Antikörper) überführt. An den beiden darauffolgenden Tagen wurden die Zellen verdünnt und mit frischem Medium (Testmedium + 200U/ml IL-4, 100U/ml Proleukin) versehen. Zwischen Tag 5 und Tag 7 der Kultur wurden die Zellen in die Untersuchungen eingesetzt.

### 6.3.7 Differenzierung von Th1-Zellen

Zur Differenzierung von Th1-Zellen wurden 24-well-Platten mit einer Mischung aus anti-CD3-Antikörper (145-2C11, 3 µg/ml) und anti-CD28-Antikörper (37.51, 10 µg/ml) beschichtet und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Platten zweimal mit PBS [1x] gewaschen. Die frisch isolierten naiven CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen wurden in Gegenwart von 3000 U/ml rekombinantem murinen IL-12, 1000 U/ml Proleukin und 10µg/ml 11B11 (anti-IL-4 Antikörper) für 5 - 7 Tage stimuliert. Am Tag drei wurden die Zellen vom Stimulus genommen und mit Testmedium, supplementiert mit 100 U/ml Proleukin gefüttert. Am Tag 5 - 7 wurden die Zellen als Th1-Zellen eingesetzt.

### 6.3.8 Stimulation von Th1 und Th2-Zellen

Die OVA TCR transgenen Th1- und Th2-Zellen (Wildtyp oder NFATc2/NFATc3-Knock out) wurden über plattengebundene Antikörper (2µg/ml des klonotypischen Antikörpers KJ1.16.1 und 10µg/ml anti-CD28) in sterilen 96-well-Zellkulturplatten mit je  $1 \times 10^5$  Th-Zellen pro well stimuliert. Die Kulturüberstände wurden nach 24 Stunden

abgenommen und bis zur Überprüfung ihres Cytokingehaltes durch spezifische ELISAs bei -20°C aufbewahrt.

## **7. Elektroporation von Mastzellen**

Mastzellen wurden mittels Elektroporation transfiziert. Hierzu wurde ein Gene pulser II (Bio- Rad, München) sowie 4mm- Elektroporationsküvetten der Firma Peqlab (Erlangen) verwendet. Die Bedingungen für die Elektroporation mit diesem Gerät sind in der folgenden Tabelle angegeben. Die Zellen wurden auf  $2-3 \times 10^6$ / 200µl/ Küvette eingestellt und dazu in IMDM aufgenommen. Reportergenkonstrukte wurden mit einer Konzentration von 25µg/ ml, die verschiedenen Expressionsvektoren unter der Kontrolle eines CMV-Promoters mit einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt. Als Kontrollplasmid wurde das Luciferasegen aus *Renilla reniformis* unter der Kontrolle des Thymidinkinasepromoters (pRL-TK) mit einer Konzentration von 1,875µg/ml verwendet. Nach der Elektroporation wurden die Zellen in 1ml Mastzellmedium + KL aufgenommen und für 2h bei 37°C inkubiert und dann mit Ionomycin stimuliert.

	<b>Gene pulser II</b>
K ü v e t t e	4 m m
V o l u m e n	2 0 0 µ l
Z e i t	c a . 3 0 m s
S p a n n u n g	2 9 0 V
K a p a z i t ä t	6 0 0 µ F

**Tabelle 4: Bedingungen für die Elektroporation von Mastzellen**

### **7.1 Reportergenuntersuchungen mit Mastzellen**

Die mittels Elektroporation transfizierten Mastzellen wurden wie angegeben stimuliert. Nach 24h wurden die Zellen mit 50µl „passive lysis buffer“ (PLB) der Firma Promega laut Protokoll lysiert. Die Zellextrakte wurden bis zur Lumineszenzmessung auf Eis aufbewahrt. Zur Messung der Lumineszenz wurde ein Turner Luminometer (Promega) und das „Dual- Luciferase® Reporter Assay System“ der Firma Promega (Cat.# E1910) verwendet. Es wurde jeweils 10µl Zellextrakt in die Messung eingesetzt, die jeweils 10 Sekunden dauerte. Sonst wurde nach Anweisung des Herstellers verfahren. Die einzelnen Messwerte wurden entweder über die Renilla-

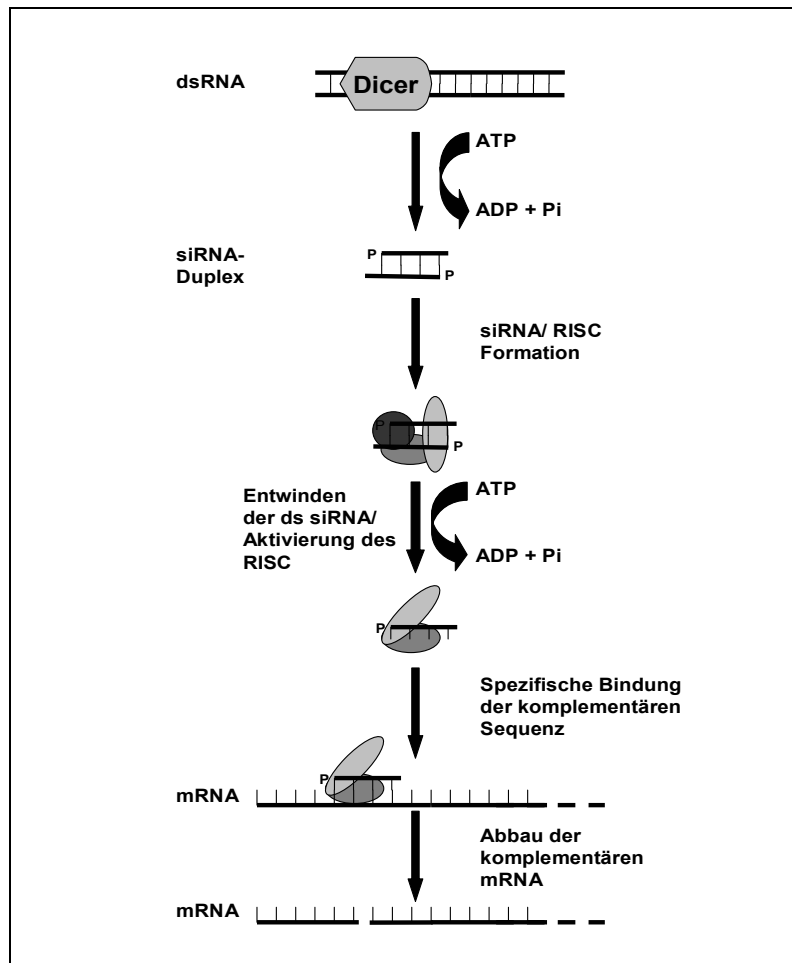
Luciferase- Werte oder mittels einer Proteinmessung nach Christian- Warburg abgeglichen (Proteinkonzentration in mg/ml =  $1,55 \times E_{280} - 0,76 \times E_{260}$ ).

### 8. RNA- Interferenz

Post- transkriptionelle Modifikationen, die zur Reduktion der Expression von Genen führen („post- transcriptional gene silencing“, PTGS), waren lange als nur in Pflanzen durchführbare, unzureichend erklärbare Phänomene bezeichnet worden. Zu den Methoden des PTGS zählt auch die „RNA interference“ (RNAi), wobei das Einschleusen doppelsträngiger RNA (dsRNA) zum sequenzspezifischen Abbau der komplementären mRNA in der Zelle führt.

Für RNAi konnten diverse biologische Funktionen nachgewiesen werden. Zu diesen gehören antivirale Verteidigung, Transposon „silencing“, Genregulation, Centromer silencing und genomisches Rearrangement.

Obwohl die genaue Wirkungsweise von RNAi noch nicht bekannt ist, geht man heute davon aus, dass lange dsRNAs durch eine in jeder Zelle vorhandene Ribonuclease, gennant „Dicer“, in kurze, 21-25mere Ribonucleotide geschnitten werden. Diese 21- bis 25mere werden als „small interfering RNA“ (siRNA) bezeichnet. Nachdem solche siRNA- Moleküle entstanden sind, lagern sie sich mit verschiedenen, zum Teil noch nicht näher charakterisierten Proteinen, zu dem so genannten „RNA- induced silencing complex“ (RISC) zusammen. Dieser RISC wird durch ATP- abhängiges Entwinden der siRNA aktiviert und bindet als Komplex aus siRNA- Einzelstrang und RISC durch sequenzspezifische Basenpaarung an seine komplementäre mRNA, was deren Abbau einleitet (Abb. 4).



**Abb. 4: Mechanismus der RNAi**

Nachdem das Enzym Dicer eine lange dsRNA in viele 21-25mere Ribonucleotide (siRNA) gespalten hat, interagieren diese siRNAs mit bisher noch nicht genauer charakterisierten Proteinen zur Ausbildung des so genannten „RNA- induced silencing complex“ (RISC). Die Helikaseaktivität des RISC entwindet unter ATP-Verbrauch die doppelsträngige siRNA (siRNA- Duplex), so dass diese als Einzelstrang siRNA an ihre einzelsträngige komplementäre mRNA in der Zelle binden kann. Die Endonukleaseaktivität des RISC spaltet nun die gebundene mRNA und leitet dadurch deren Abbau ein.

Da jedoch das Einführen von dsRNA >30 Nukleotide (nt) in Säugerzellen auch zu einer starken antiviralen Antwort führt, die unspezifische Effekte bis hin zur Apoptose der betroffenen Zelle mit sich bringt, müssen zur spezifischen Reduktion der Expression eines Gens („Knock down“) kleinere dsRNA- Moleküle verwendet werden. Elbashir et al. machten die Entdeckung, dass alleine das Einschleusen von 21mer siRNA zum Abbau ihrer komplementären mRNA führt, ohne eine antivirale Antwort zu induzieren. Dieser Abbau der komplementären mRNA und damit die spezifische Reduktion der Genexpression ist jedoch transient (51, 52). RNAi findet heutzutage immer größere Anwendungsbereiche, vor allem in der Untersuchung von

Genfunktionen, ohne ein aufwendiges und möglicherweise letales Knock-out produzieren zu müssen (53-55).

Für die Transfektion von Mastzellen mit siRNA wurde ein Gene Pulser II (BioRad, München) verwendet. Die für die Elektroporation der Mastzellen verwendeten Einstellungen sind Tabelle 4 zu entnehmen. Es wurden chemisch synthetisierte siRNAs spezifisch für NFATc2 und NFATc1 (Mm\_Nfatc2\_2\_HP siRNA und Mm\_NFATc1\_6\_HP siRNA) von Qiagen, Düsseldorf bezogen. Diese wurden in einer Konzentration von 1µM durch Elektroporation in Mastzellen eingebracht. Als Negativkontrolle wurde „scrambled negative control siRNA“ (Ambion, Huntingdon, U.K) in einer Konzentration von 1µM verwendet. Nach Elektroporation und einer Ruhephase von 20 Stunden wurden die Mastzellen mit 1µM Ionomycin stimuliert.

## 9. Arbeiten mit Bakterien

### 9.1 Bakterienstämme

#### DH5α:

DH5α ist ein Bakterienstamm mit dem Genotyp F<sup>-</sup>, φ80dlacZΔM15, recA, endA1, gyr96, thi-1, hsdR17, (r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>), supE44, relA1, deoR, Δ(lacZYA-argF)U169. Der E.Coli-Stamm DH5α wurde in dieser Arbeit für die Transformation von Plasmiden verwendet.

#### 9.1.1 Kulturmedien für Bakterien

Die verwendeten Kulturmedien wurden in VE-Wasser angesetzt und autoklaviert.

#### LB- Medium:

5g/l Hefeextrakt, 10g/l Trypton/ Pepton, 5g/l NaCl

#### LB- Agar:

LB- Medium + 15 g/l Agar (Gibco)

LB- Agar diente als fester Nährboden für die Selektion einzelner Bakterienklone.

### **Super- LB-Medium:**

25g/l Trypton/Pepton (Difco/Roth)

15g/l Hefeextrakt (Difco)

5g/l NaCl (Roth)

Super- LB- Medium diente als Standardmedium für die Kultivierung von Bakterien und wurde für Expressionskulturen verwendet.

### **Selektionsmedium:**

Super- LB- Medium oder LB- Agar mit einem Zusatz von 100µg/ ml Ampicillin.

## **9.2 Kultivierung von Bakterien**

### **9.2.1 Selektion einzelner Bakterienklone**

Die Selektion einzelner Bakterienklone erfolgte durch die Kultivierung der Bakterien auf einem festen Nährboden. Dazu wurde autoklavierter LB- Agar (1,5%) nach Abkühlen auf ca. 50°C in Petrischalen gegossen (ca. 20ml/Petrischale). Die Petrischalen wurden bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Das für die Selektion nötige Antibiotikum wurde erst direkt vor dem Ausplattieren der Bakterien ausgestrichen. Hierzu wurden pro Platte 2mg Ampicillin (Stammlösung 50mg/ml) auf die Agarplatten pipettiert und ausgestrichen. Nachdem die Platten etwas getrocknet waren, erfolgte das Ausstreichen der Bakteriensuspension. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert, anschließend einzelne Klone isoliert und zur klonalen Expansion in die Flüssigkultur eingesetzt.

### **9.2.2 Expansion von Bakterien in Flüssigkultur**

Zur Herstellung einer Übernachtskultur (Vorkultur) wurden 4ml Selektionsmedium in einem 15ml- Zentrifugenröhrchen mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 37°C und 150 Upm über Nacht geschüttelt. Zur weiteren Expansion wurde eine größere Menge 100ml Selektionsmedium in einem sterilen Erlenmeyerkolben mit 100µl der Vorkultur beimpft und erneut über Nacht kultiviert.



### 9.2.3 Aufbewahrung und Entsorgung der Bakterien

Die bewachsenen Agarplatten wurden bei 4°C aufbewahrt. Zur langfristigen Konservierung der Bakterienklone wurden Dauerkulturen angelegt. Hierzu wurde die Bakteriensuspension bis zur stationären Phase kultiviert und mit 50% Glycerin (Roth) versetzt und in Aliquoten von 1ml bei -20°C aufbewahrt. Zur Entsorgung wurden bewachsene Agarplatten autoklaviert, Flüssigkulturen durch Zugabe von Ethanol oder Isopropanol abgetötet.

### 9.3 Transformation von Bakterien

Kompetente E.Coli (DH5 $\alpha$ ) wurden von der Firma Stratagene bezogen und nach Herstellerangaben mittels Hitzeschock transformiert.

Plasmide, die mit dem „Topo Kloning Kit“ der Firma Invitrogene generiert wurden, wurden in die im Kit enthaltenen Bakterien (ebenfalls Dh5 $\alpha$ ) laut Herstellerangaben mittels Hitzeschock überführt.

## 10. Nachweis der TNF $\alpha$ - Produktion

Zum quantitativen Nachweis der TNF $\alpha$ - Produktion wurde die TNF $\alpha$ - sensitive Indikatorzelllinie WEHI-164 verwendet. Bei im Kulturüberstand vorliegendem TNF $\alpha$  sterben diese Zellen ab (Cytotoxizitätstest). Zur Bestimmung des von Mastzellen produzierten TNF $\alpha$  wurden Mastzellen für vier Stunden mit dem Calcium- Ionophor Ionomycin oder durch Kreuzvernetzung von membranständigem IgE aktiviert. Die Überstände wurden abgenommen und auf einer 96- well Platte seriell verdünnt. Als Referenz wurde ein bekannter TNF $\alpha$ - Standard mitgeführt. Die weitere Durchführung erfolgte exakt wie unter (56) angegeben.

## 11. ELISA („Enzyme Linked Immunosorbent Assay“)

Der quantitative Nachweis sezernierter Cytokine (IL-6, IL-9, IL-13) in Kulturüberständen erfolgte durch spezifische ELISAs. Die ELISAs wurden nach der Sandwichmethode (indirekt) durchgeführt. Alle Proben wurden als Verdünnungsreihe auf die ELISA- Platten aufgegeben und auf jeder Platte wurde ein bekannter Standard als Referenz zum Einstellen einer Eichgeraden mitgeführt. Die Auswertung

der photometrischen Messung erfolgte im Tabellenkalkulationsprogramm EXCEL mit Hilfe eines Makros, für dessen Entwicklung wesentlich Dr. Shen- Shu Jin (I. Medizinische Klinik und Poliklinik, Mainz) verantwortlich war.

Materialien: ImmunoReader NJ200, (Intermed, Nunc, Wiesbaden)

Puffer:

Kopplungspuffer: 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 9,2

Blockpuffer (entspricht BSA-Puffer): PBS[1x] mit 0,1 %BSA

ELISA-Waschpuffer: 0,1 % Tween 20 (Sigma, Nr. P-1379) in PBS[1x]

Substratpuffer: 40 mM Citrat  
60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 4,4

### 11.1 ELISAs zur Bestimmung von Cytokinen

Die Beschichtung der Mikrotiterplatten mit dem Primärantikörper erfolgte durch eine 24- stündige Inkubation bei 4 °C (50 µl/well). Nach Ausklopfen der Lösung und dreimaligem Waschen mit ELISA- Waschpuffer wurden freie Bindungsstellen der Mikrotiterplatten durch Zugabe von Blockpuffer (50µl/well) für 30 min bis 1h bei 37°C abgesättigt. Die Überstände und eine definierte Cytokin- Positivkontrolle wurden in BSA-Puffer 1:2 titriert (50µl/well) und für eine Stunde bei 37°C (IL-13 2h bei Raumtemperatur) in den antikörperbeschichteten Wells inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten folgte eine einstündige Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (50µl/well). Die überschüssigen Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen entfernt und das mit Peroxidase gekoppelte Streptavidin (Roche, Mannheim, Nr. 10890153) in einer Verdünnung von 1:10000 in BSA-Puffer zugegeben (50µl/well). Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C und drei weiteren Waschschritten wurde die Substratlösung (1mg/ ml ABTS; 2,2-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) in Substratpuffer mit 0,0075 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) zugegeben. Nach ca. 15min erfolgte die photometrische Auswertung bei 414nm im Immuno-Reader.

## 12. Arbeiten mit Nucleinsäuren

### 12.1 Puffer und Reagenzien für das Arbeiten mit DNA

**dNTP** (2'-Desoxynucleosid-5'-Triphosphate) wurden als Set von je 25µmol dATP, dCTP, dGTP und dTTP in einer Konzentration von 100mM (Gibco, Rockville, MD, USA oder MBI Fermentas, Vilnius, Litauen) bezogen. Es wurde eine Stammlösung mit 10mM in H<sub>2</sub>O angesetzt und bei -20°C aufbewahrt.

**DTT** (Dithiothreitol) wird zur Reduktion von Disulfidbrücken in Proteinen benutzt. Aufgrund seiner proteinstabilisierenden Wirkung ist DTT Bestandteil vieler Enzympuffer. DTT [0,1M] wurde im Set mit der M-MLV Reversen Transkriptase und dem entsprechendem Reaktionspuffer bezogen.

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

**Ethidiumbromid** wurde als 1%ige Lösung in VE- Wasser angesetzt, 10min im Ultraschallbad behandelt und bei 4°C in einer dunklen Flasche gelagert.

**Hexanukleotide** p(dN<sub>6</sub>) (Roche Mannheim): 50 OD<sub>260</sub>-Einheiten (=2mg) wurden in 1ml des folgenden Puffers angesetzt:

0,5 M Tris/HCl

0,1 M MgCl<sub>2</sub>

1 mM DTT

pH 7,5

Die resultierende Stammlösung (2µg/µl) wurde aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. Die Arbeitslösung besaß eine Konzentration von 20ng/µl.

**MgCl<sub>2</sub>** (MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O) wurde als 1M Stammlösung angesetzt und autoklaviert. Die für die PCR benötigte MgCl<sub>2</sub>-Lösung [50mM] wurde im Set mit der Taq DNA-Polymerase bezogen.

**NaCl** wurde als 5M Stammlösung angesetzt und autoklaviert.

**Oligo(dT)<sub>n</sub>** wurde von Roche Mannheim bezogen und in einer Konzentration von 100ng/ml verwendet.

**Tris/HCl** (Tris/Hydroxymethyl)-Aminomethan) wurde als 2M Stammlösung angesetzt, der pH mit konzentrierter HCl auf pH 8 eingestellt und die Lösung autoklaviert.

**TE- Puffer** dient zum Aufbewahren der DNA. Der hohe pH-Wert verbessert die Löslichkeit der DNA und das EDTA schützt die DNA vor DNase.

10 mM Tris/HCl (Stammlösung 1/500)

1 mM EDTA pH 8 (Stammlösung 1/200)

## 12.2 Isolierung von Nukleinsäuren

### 12.2.1 Isolierung von Plasmid- DNA

Zur Isolierung von Plasmid- DNA wurde ein System mit Anionenaustauscher- Säulen von Macherey & Nagel (Düren) verwendet. Hierbei kamen zwei unterschiedliche Größen zum Einsatz:

Nucleobond<sup>®</sup>AX20 für bis zu 20µg Plasmid- DNA.

Nucleobond<sup>®</sup>AX100 für bis zu 100µg Plasmid- DNA.

Um größere Mengen an Plasmid- DNA (z.B. für Reporterassays) zu isolieren, wurde das QIAfilter Maxi-System der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Es erlaubt, Plasmidmengen bis 500µg zu isolieren.

### 12.2.2 Isolierung von RNA

Die Isolierung von RNA erfolgte mit TriReagent<sup>®</sup> der Firma Molecular Research Center, Inc. Cincinnati. Es wurde nach Herstellerangaben verfahren.

### 12.2.3 Reverse Transkription

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 Starter für die

Erststrangsynthese benötigt wird. Diese Vorgehensweise garantiert, dass die Synthese der cDNA in der Nähe des 3`-Endes der mRNA beginnt. Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass die Effizienz mit zunehmendem Abstand des zu amplifizierenden Bereichs vom 3`-Ende der mRNA abnimmt. Beim Random- Priming hingegen verwendet man ein Gemisch aus Hexanukleotiden aller theoretisch denkbaren Sequenzabfolgen. Die Verwendung dieser p(dN)<sub>6</sub>-Mischung bewirkt, dass die Einzelstrangsynthese an vielen Stellen der zu kopierenden mRNA initiiert wird. Dadurch wird garantiert, dass alle mRNA- Sequenzen aus einer heterologen Population gleichmäßig in der erhaltenen Mischung von cDNA- Molekülen repräsentiert sind, weil Sequenzen vom 3`-Ende nicht, wie beim Oligo(dT)<sub>n</sub>- Priming, begünstigt werden. Ein Nachteil ist jedoch, dass meist der Anteil vollständig kopierter mRNA- Moleküle sinkt. Um die Vorteile beider Verfahren zu nutzen, wurde eine Mischung aus Oligo(dT)<sub>n</sub>- und p(dN)<sub>6</sub>-Primern verwendet:

RNA- Pellet +  
+ 2µl 10mM dNTP  
+ 1µl Oligo(dT)<sub>n</sub> [100ng/µl]  
+ 1µl p(dN)<sub>6</sub> [20ng/µl]  
+ 1µl RevertAid™ M-MuLV RT [200U/µl]  
+ 4µl 5x Puffer für M-MuLV RT  
mit DEPC- Wasser auf 20µl auffüllen.

Die reverse Transkription erfolgte bei 42°C im Wasserbad für eine Stunde.

### 12.3 PCR („Polymerase Chain Reaction“)

Bei der Polymerase- Kettenreaktion kommt es durch Wiederholung der Reaktionsfolge aus DNA- Denaturierung, Hybridisierung der Primer und der Auffüllreaktion nach jedem Reaktionsschritt zu einer Verdopplung der DNA und damit in einer Kettenreaktion zu einer exponentiellen, selektiven, etwa 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup>-fachen Anreicherung der durch die Oligonukleotide flankierten DNA-Sequenzen.

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode zur Herstellung verschiedener Reportergenkonstrukte (siehe unten) verwendet.

Zu 10µl des RT- Ansatzes wurde folgendes Gemisch zugesetzt:

2	µl	5`-und 3`-Primer [je 5pmol/ µl]
1	µl	dNTP [10mM]
5	µl	Puffer [10x]
2,5	µl	MgCl <sub>2</sub> [50mM]
0,2	µl	Taq [5U/µl]
29,3	µl	H <sub>2</sub> O

Die Reaktionen verliefen nach folgendem Temperaturprofil:

	Zyklus 1	Zyklus 2-34	Zyklus 35
Denaturierung	94°C 3 min	94°C 30 sec	94°C 30 sec
Annealing	60°C 30 sec	60°C 30 sec	60°C 30 sec
Elongation	72°C 1 min	72°C 1 min	72°C 5 min

### 12.3.1 Nachweis von DNA im Gel

Mit Ethidiumbromid können Nukleinsäuren angefärbt und in einem Gel sichtbar gemacht werden. Ethidiumbromid gehört zu den sequenzunabhängigen DNA-bindenden Substanzen, die sich zwischen einzelne Basenpaare eines doppelsträngigen DNA- Moleküls einlagern können (Interkalation). Ethidiumbromid reagiert auch mit einzelsträngigen Nukleinsäuren, doch ist der Komplex wesentlich schwächer.

Die PCR-Produkte wurden in einem 1,5%igem Agarosegel elektrophoretisch getrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele für etwa 5min mit einer 0,01%igen Ethidiumbromidlösung gefärbt und anschließend 10min mit H<sub>2</sub>O gewaschen, um das nicht gebundene Ethidiumbromid zu entfernen. Um die mit Ethidiumbromid gefärbte DNA sichtbar zu machen, wurden die Gele mit UV- Licht (250-310nm) bestrahlt. Die Ethidiumbromid- DNA- Komplexe fluoreszieren rot-orangefarbig (590 nm).

Für die Größenbestimmung der Banden wurde auf jedem Gel ein Marker mitgeführt, der DNA- Fragmente definierter Größe enthält.

### **12.3.2 Gelelution von DNA**

Zur Elution von DNA aus Agarosegelen wurde QIAEX II von Qiagen (Hilden) verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers.

## **12.4 Plasmide**

### **IL-9- Promoter-pGL-3 (Del-1):**

Der IL-9- Promoter (-610 bis +32 des 5`-Bereiches des murinen IL-9-Gens wurde mittels PCR amplifiziert. Hierzu wurden folgende Primer verwendet:

mIL- 9- Prom. for:            5'- CCGGATCCTCAAGGCCAATGCTAGC -3'

mIL- 9- Prom. rev:            5'- GTGTAAGCTTGACGGGAGTCTGGAACTC -3'

Die Sequenz wurde mittels DNA- Sequenzierung verifiziert (Genterprise, Mainz).

Über eine BamHI- und eine HindIII- Schnittstelle wurde dann der IL-9-Promoter in den promoterlosen pGL3 Basis- Luciferase- Reportergenvektor der Firma Promega (Mannheim, Deutschland) kloniert.

### **IL- 13- Promoter- pGL- 3:**

Der IL-13- Minimalpromoter CS2 (-214 bis +9 des 5'- Bereiches des murinen IL-13-Gens wurde mittels PCR amplifiziert. Hierzu wurden folgende Primer verwendet.

mIL-13- Prom. for:            5'- CCGGATCCAGAAGACACTGGTGGGCCGG - 3'

mIL-13- Prom. rev:            5'- GTGTAAGCTTGCCTTAGCCTGTTGAAGCAGC - 3'

Die Sequenz wurde mittels DNA- Sequenzierung verifiziert. Über eine BamHI- und eine HindIII- Schnittstelle wurde dann der IL-13- Promoter in den promoterlosen pGL- 3 Basis- Luciferase- Reportergenvektor der Firma Promega (Mannheim, Deutschland) kloniert.

### **GATA- abhängiges Reportergenkonstrukt:**

Um ein GATA- abhängiges Reportergenkonstrukt herzustellen, wurden zunächst die folgenden Primer am 5`-Ende phosphoryliert.

5`-AGCTTTGATAACAGAAAGTGATAACTA-3`

5`-AAGCTTAGTTATCACTTTCTGTTATCA-3`

Hierzu wurde folgender Ansatz verwendet:

1µl Oligo (=1µg Oligo)  
25µl 10x Puffer  
20µl Polynucleotid-Kinase (3U/µl)  
25µl ATP [100mM]  
ad. 250µl H<sub>2</sub>O

Die Ansätze wurden für eine Stunde bei 37°C im Wasserbad inkubiert, dann für 5 min auf 70°C erhitzt, vereinigt und mit Natriumacetat und Isopropanol unter der Zugabe von 20µg Glykogen gefällt.

Die phosphorylierten Oligonukleotide wurden anschließend in 20µl Ligationspuffer aufgenommen, auf 85°C erhitzt und langsam auf 12°C abgekühlt. Dieser Schritt führt zum Annealing der beiden Oligos. Anschließend wurden die Oligonukleotide ligiert. Hierzu wurde folgender Ansatz durchgeführt:

2µl 10x Ligationspuffer  
2µl Oligo nach Annealing  
2µl Vektor pTATALUC<sup>+</sup> [ca. 200ng], geschnitten mit HindIII  
0,5µl T4-Ligase [2,5U/µl]  
18µl H<sub>2</sub>O

Die Ansätze wurden über Nacht bei 14°C inkubiert.

Dann wurden Bakterien des Stammes *Echerichia coli* (DH5α) mit 1µl Ligationsansatz nach dem Standardprotokoll transformiert.

Nach der Transformation wurden 22 Klone mittels PCR getestet. Klon 17, der die längste Insertion mit 10 GATA- Bindestellen trägt, hat im Reportergenassay die höchste Aktivität.



### **NF-κB- abhängiges Reporterengenkonstrukt:**

Das NF-κB- abhängige Reporterengenkonstrukt (pTATALUC<sup>+</sup>(4xNF-κB) enthält drei Kopien der NF-κB- Bindestelle des murinen c-Myb intronischen Enhancers (57). Es wurde von Ralf Marienfeld (Institut für molekulare Pathologie, Würzburg, Deutschland) zu Verfügung gestellt.

### **pcDNA 3.1**

Der Vektor pcDNA 3.1 der Firma Invitrogene wurde als Kontrolle für das GATA-abhängige Reporterengenkonstrukt verwendet.

### **13. Chromatin- Immun- Präzipitation (ChIP)**

Zum Nachweis der Bindung von NFATc1 und NFATc2 an den TNF $\alpha$ -, IL-13- und IL-9- Promoter wurde die Technik der Chromatin- Immun- Präzipitation angewendet. Es wurde nach folgendem Protokoll verfahren (29).

Folgende Primer wurden verwendet:

TNF $\alpha$  Promoter for: 5'-TTT CAG TTC TCA GGG TCC TAT ACA A-3'

TNF $\alpha$  Promoter rev: 5'-TGT GCA GAC GGC CGC CTT TAT AG-3' (322 bp Produkt)

IL-13 Promoter for: 5'-ACC AAA GTG ATG ACG CCT CA-3'

IL-13 Promoter.rev.: 5'-CCT GCC CAA AGG GTG ACA-3' (300 bp Produkt)

IL-6 Promoter for: 5'-GTA TGT GTG TGT CGT CTG TCA-3'

IL-6 Promoter rev: 5'-GAC TCA TGG GAA AAT CCC ACA-3' (327 bp Produkt)

IL-9 Promoter for: 5'- GAT TCT CAC AAC CAG AAT TCC TGC-3'

IL-9 Promoter rev: 5'- CTA CCA GCA TCT TCC AGT CTA GC-3'

### **14. Semiquantitative Echtzeit- PCR- Analyse (qRT- PCR)**

Die semiquantitative Real- Time PCR Analyse (qRT- PCR) ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren beruhend auf dem Prinzip der

herkömmlichen Polymerase- Kettenreaktion. Zusätzlich bietet sie die Möglichkeit der Quantifizierung. Wie der Name Real- Time aussagt, wird bei der qRT- PCR am Ende oder während jedes Zyklus eine Quantifizierung durchgeführt. Diese erfolgt durch Fluoreszenzmessungen. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der gebildeten PCR- Produkte zu, wodurch eine Quantifizierung möglich wird. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde Absolute SYBR<sup>®</sup> Green fluorescein (ABgene, Hamburg) verwendet.

In den in dieser Arbeit durchgeführten Real- Time PCRs wurden die relativen mRNA- Expressionen von IL-6, IL-9, IL-13, TNF $\alpha$ , NFATc1 und NFATc2 in Triplikaten unter Verwendung eines iCyclers (Bio-Rad, München) bestimmt.

Folgende Primer wurden verwendet:

HGPRT for: 5'- GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTTG -3'  
HGPRT rev: 5'- GAGGGTAGGCTGGCCTATAGGCT -3'

EF1 $\alpha$  for: 5'- GATTACAGGGACATCTCAGGCTG -3'  
EF1 $\alpha$  rev: 5'- TATCTCTTCTGGCTGTAGGGTGG -3'

TNF $\alpha$  for: 5'- GGTCGAATCTGGCTGGAGCGG -3'  
TNF $\alpha$  rev: 5'- GGTAGGTGCAGGACCGGTGGG -3'

IL-9 for: 5'- CTGATGATTGTACCACACCGTGC -3'  
IL-9 rev: 5'- GCCTTTGCATCTCTGTCTTCTGG -3'

IL-6 for: 5'- GCCAGAGTCCTTCAGAGAGATAC -3'  
IL-6 rev: 5'- CCCAACGATTCATATTGTCAG -3'

IL-13 for: 5'- GGAGCTGAGCAACATCACACA -3'  
IL-13 rev: 5'- GGCCTGTAGATGGCATTGCA -3'

NFATc1 for: 5'- TGC CCT TGA CTG GCA GCT CC -3'  
NFATc1 rev: 5'- AAT GAA CAG CTG TAG CGT GAG -3'

NFATc2 for: QuantiTect<sup>®</sup> Primer Assay Mm\_NFATc2\_SG (Qiagen, Düsseldorf)

Die relativen Expressionen wurden auf die Expression der Haushaltsgene HGPRT und EF1 $\alpha$  normalisiert.

### **15. Degranulationstest**

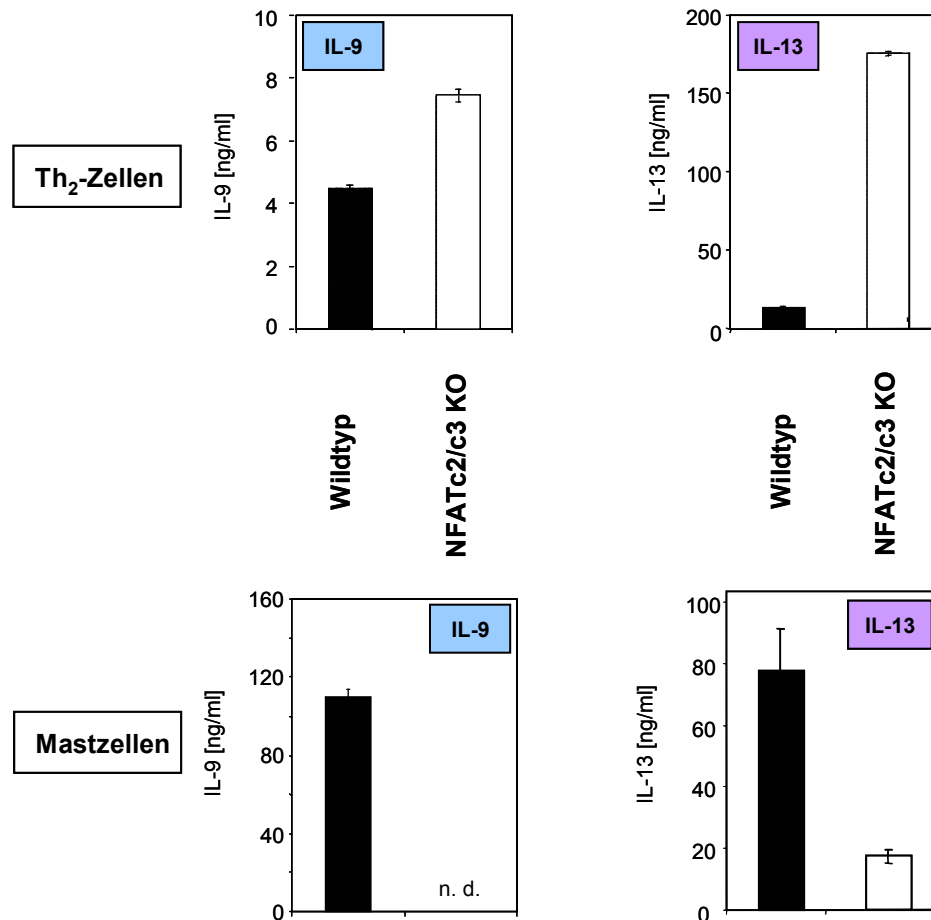
Das Enzym  $\beta$ - Hexosaminidase ist in Mastzell- Granula gespeichert und wird bei einer Degranulation der Mastzelle freigesetzt.

- 1)  $10^5$  BMMC (für 72h mit 2,5 $\mu$ g/ml IgE präinkubiert) wurden in einer 96 well Platte in einem Volumen von 200 $\mu$ l mit 2,5 $\mu$ g/ml anti- IgE für 30min bei 37°C aktiviert.
- 2) Nach Ernten und Zentrifugation der Zellen wurde der Überstand abgenommen und aufbewahrt. Das Zellpellet wurde in 200 $\mu$ l 0,5% Triton X-100 lysiert.
- 3) 20 $\mu$ l des Überstandes und 20 $\mu$ l des korrespondierenden Lysates wurden separat in eine neue 96 well Platte pipettiert und 50 $\mu$ l der  $\beta$ - Hexosaminidase Substrat-Lösung (3mg/ml p-nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosamine in 0.1 M Na-citrate, pH 4.5) zugegeben und 90min bei 37°C inkubiert. 20 $\mu$ l der 0,5% Triton X-100- Lösung und 20 $\mu$ l vom Kulturmedium wurden als Referenz verwendet (Leerwerte).
- 4) Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 150 $\mu$ l 0,2M Glycin- Lösung (pH 10,7) gestoppt. Die Messung erfolgte im Immuno- Reader bei einer Wellenlänge von 405nm.
- 5) Es wurden die Werte der optischen Dichte (nach Abzug der Leerwerte) für Zelllysat und Überstand addiert, um die totale Enzymaktivität zu erhalten (100%). Die Degranulation wurde wie folgt berechnet:  $OD_{\text{Überstand}} \times 100\% / (OD_{\text{Überstand}} + OD_{\text{Lysat}})$ .

### **III. Ergebnisse**

#### **1. Vergleichende Untersuchung der Th2- Cytokinproduktion von Mastzellen aus Mäusen mit kombinierter Defizienz für NFATc2 und NFATc3**

Durch eine Kooperation mit Prof. E. Serfling, Institut für Pathologie der Universität Würzburg, bestand im Rahmen dieser Arbeit die Möglichkeit, die Th2-Cytokinproduktion von T- Zellen und Mastzellen aus Tieren mit kombinierter Defizienz für NFATc2 und NFATc3 vergleichend zu untersuchen. Hierzu wurden zunächst naive T- Zellen aus den Milzen isoliert und in Gegenwart von IL-4 primär stimuliert. Dieses klassische Protokoll bewirkt die Differenzierung der naiven T- Zellen zu Th2- Zellen. Nach 6 Tagen wurden die Zellen erneut für 16 Stunden mit anti- CD3 und anti- CD28 stimuliert und die Menge der gebildeten Cytokine IL-9 und IL-13 im Kulturüberstand mittels ELISA bestimmt (Abb. 5). Parallel zur Analyse der IL-9- und IL-13- Produktion in Th2- Zellen wurde auch deren Produktion in Mastzellen untersucht. Über die Expression beider NFAT- Faktoren in Mastzellen und deren Einfluss auf die Th2- Cytokinproduktion war bislang wenig bekannt. Die Mastzellen wurden in diesem Versuch durch Zugabe des Calcium- Ionophors Ionomycin aktiviert (Abb. 5).



**Abb. 5: Vergleich der IL-9- und IL-13- Produktion von Th<sub>2</sub>- Zellen und Mastzellen aus Wildtyp und NFATc2/c3- defizienten Mäusen.**

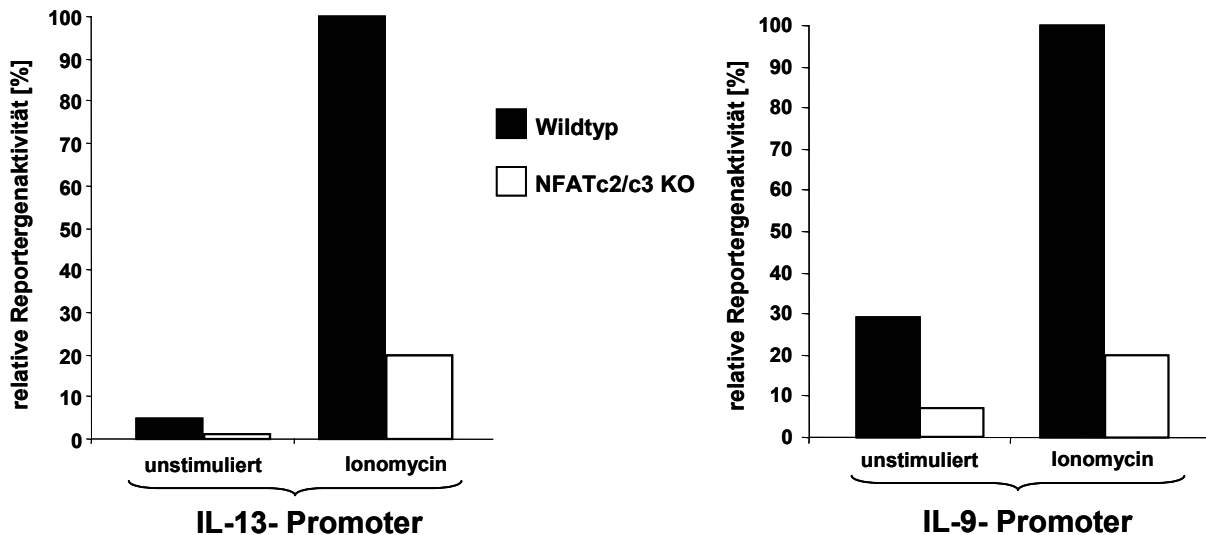
Th<sub>2</sub>- Zellen wurden mit  $\alpha$ CD3 und  $\alpha$ CD28 für 16 Stunden stimuliert. Mastzellen wurden mit dem Calcium- Ionophor Ionomycin für 48 Stunden stimuliert. Die Cytokinproduktion wurde mittels ELISA bestimmt. n.d. = nicht detektierbar

**Th<sub>2</sub>- Zellen aus NFATc2/c3- doppeldefizienten Tieren weisen im Vergleich Th<sub>2</sub>- Zellen aus Wildtyp- Mäusen eine erhöhte Cytokinproduktion auf, wohingegen Mastzellen aus solchen Mäusen eine stark verminderte IL-9- und IL-13- Produktion zeigen.**

Wie aus Abbildung 5 hervorgeht, zeigen Th<sub>2</sub>- Zellen aus NFATc2/c3- defizienten Mäusen im Vergleich zu Th<sub>2</sub>- Zellen aus Wildtyp- Mäusen eine erhöhte IL-9- Produktion und eine stark erhöhte IL-13- Produktion. Überraschenderweise zeigen Mastzellen aus NFATc2/c3- defizienten Mäusen eine stark reduzierte Produktion von IL-9 und IL-13 verglichen mit Mastzellen aus Wildtyp- Mäusen.

Um dieses Ergebnis auf Ebene der Cytokingen- Promotoren zu verifizieren, wurde die Aktivität der Promotoren mit Hilfe von Reporterassays in Mastzellen aus Wildtyp bzw. NFATc2/c3- defizienten Mäusen untersucht. Hierzu wurden diese Mastzellen mit einem IL-13- Reporterassay oder einem IL-9-

Reporter-genkonstrukt transfiziert und über Nacht entweder so belassen oder mit 0,5µM Ionomycin stimuliert (Abb. 6).



**Abb. 6: Die Aktivität des IL-13- und IL-9- Promoters ist in Mastzellen aus NFATc2/c3- defizienten Mäusen, verglichen mit Mastzellen aus Wildtyp- Mäusen, stark verringert.**

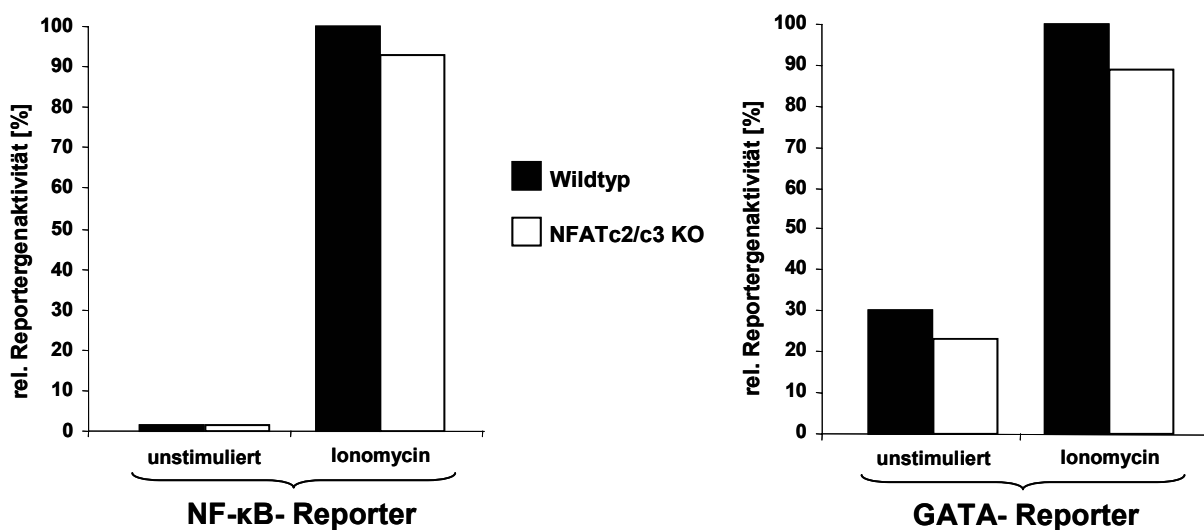
Mastzellen aus Wildtyp- oder NFATc2/c3- defizienten Mäusen wurden mit dem IL-13- oder dem IL-9- Reporter-genkonstrukt transfiziert und entweder so belassen oder mit 0,5µM Ionomycin für 16 Stunden stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurde die Reporter-genaktivität mittels Luminometer bestimmt (siehe Material und Methoden, Abschnitt 7.1). Der Wert der mit Ionomycin stimulierten Mastzellen aus Wildtyp- Mäusen ist jeweils 100% gesetzt und die Werte der übrigen Ansätze wurden auf diesen Wert bezogen.

Aus Abbildung 6 geht hervor, dass die Aktivität des IL-13- und des IL-9- Promoters in Mastzellen aus NFATc2/c3- defizienten Mäusen, verglichen mit Mastzellen aus Wildtyp- Mäusen, drastisch verringert ist.

Zusammenfassend sprechen diese Ergebnisse dafür, dass NFATc2 und NFATc3 eine wichtige Rolle bei der Produktion von Th2- Cytokinen in Mastzellen spielen, die ihrer Funktion in Th2- Zellen diametral gegenüber steht.

## 1.1 Die Aktivierung von GATA- und NF- $\kappa$ B- Faktoren wird in den NFATc2/c3- defizienten Mastzellen nicht beeinflusst.

Um ausschließen zu können, dass möglicherweise Defekte in anderen für die Produktion von IL-9 und IL-13 wichtigen Signalwegen bestehen, wurde die Aktivierung der NF- $\kappa$ B- und GATA- Faktoren in Mastzellen aus NFATc2/c3-defizienten Tieren untersucht. Dazu wurden Mastzellen mit einem NF- $\kappa$ B- oder GATA- abhängigem Reporterengenkonstrukt transfiziert und anschließend stimuliert. Das Reporterengenkonstrukt für NF- $\kappa$ B besteht aus einem Minimalpromoter (TATA-Box) vor einem Luciferasegen, in dessen 5'- Bereich lediglich drei NF- $\kappa$ B-Bindestellen liegen. Beim GATA- Reporterengenkonstrukt liegen zehn GATA-Bindestellen vor dem Minimalpromoter (TATA-Box) und dem Luciferasegen. Dies bedeutet, dass das Luciferasegen nur abgelesen wird, wenn aktiviertes NF- $\kappa$ B oder GATA gebunden hat. Man kann also mit Hilfe dieses Konstruktes sehr einfach die Aktivierung von NF- $\kappa$ B- bzw. GATA- Faktoren messen.



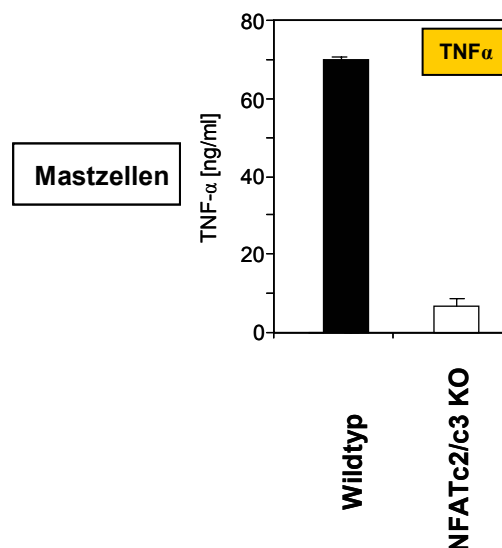
**Abb. 7:** Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B- und GATA- Faktoren ist in den NFATc2/c3- defizienten Mastzellen nicht beeinträchtigt.

Mastzellen aus Wildtyp- oder NFATc2/c3- defizienten Mäusen wurden entweder mit dem NF- $\kappa$ B- oder dem GATA- abhängigen Reporterengenkonstrukt transfiziert und entweder so belassen oder für 16 Stunden mit 0,5 $\mu$ M Ionomycin stimuliert. Die relative Reporteraktivität wurde durch ein Luminometer bestimmt. Der Wert der mit Ionomycin stimulierten Mastzellen aus Wildtyp- Mäusen ist jeweils 100% gesetzt und die Werte der übrigen Ansätze wurden auf diesen Wert bezogen.

Wie in Abbildung 7 zu erkennen ist, verläuft die Aktivierung von NF- $\kappa$ B- und GATA-Faktoren in Mastzellen aus Wildtyp- bzw. NFATc2/c3- defizienten Mäusen vergleichbar.

## 1.2 Untersuchung der TNF $\alpha$ - Produktion von Mastzellen aus NFATc2/c3-defizienten Mäusen.

Das Arsenal von Mastzellen produzierter Cytokine umfasst nicht nur die Th2-Cytokine IL-9 und IL-13, welche eine bedeutende Rolle bei allergischen Entzündungen einnehmen, sondern auch die Produktion des proinflammatorischen Cytokins TNF $\alpha$  (17, 19, 58). Das Besondere hierbei ist, dass Mastzellen in der Lage sind, präformiertes TNF $\alpha$  in ihren Granula zu speichern, dieses innerhalb von Minuten als Antwort auf einen Stimulus zu sezernieren und somit entscheidend an der Initiierung lebensrettender anti- mikrobieller Reaktionen beteiligt sind (59-61). Um die TNF $\alpha$ - Produktion von Mastzellen aus NFATc2/c3- defizienten Mäusen zu untersuchen, wurden Mastzellen aus solchen Tieren und Wildtyp- Mäusen generiert, für vier Stunden stimuliert und der Überstand in einen Cytotoxizitätstest (siehe Material und Methoden) zum Nachweis der TNF $\alpha$ - Produktion eingesetzt (Abb. 8a).



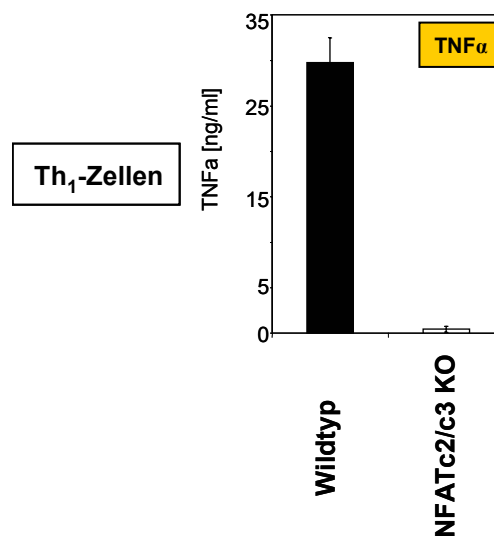
**Abb. 8a: Mastzellen aus NFATc2/c3- defizienten Mäusen zeigen im Vergleich zu Mastzellen aus Wildtyp-Mäusen eine stark beeinträchtigte TNF $\alpha$ - Produktion.**

Mastzellen aus Wildtyp- und NFATc2/c3- defizienten Mäusen wurden für vier Stunden mit Ionomycin stimuliert. Die Cytokinproduktion wurde in einem Cytotoxizitätstest zum Nachweis der TNF $\alpha$ - Produktion bestimmt.



Wie in Abbildung 8a zu sehen, ist die Produktion von  $\text{TNF}\alpha$  von NFATc2/c3-defizienten Mastzellen stark reduziert.

Wie aus Abbildung 5 hervorgeht, zeigen Th2- Zellen aus NFATc2/c3- defizienten Mäusen, verglichen mit Th2- Zellen aus Wildtyp- Mäusen, eine erhöhte Produktion von IL-9 und IL-13. In Mastzellen scheint die Produktion dieser Cytokine gegenläufig reguliert zu sein. Um zu untersuchen, ob eine solche Beobachtung auch für die Produktion von  $\text{TNF}\alpha$  zutrifft, wurden aus primären T- Zellen durch Stimulation in Gegenwart von IL-12 und IL-2 Th1- Zellen generiert. Diese sind, im Gegensatz zu Th2- Zellen, in der Lage, das proinflammatorische Cytokin  $\text{TNF}\alpha$  zu produzieren. Wie aus Abbildung 8b zu erkennen ist, zeigen Th1- Zellen aus NFATc2/c3- defizienten Mäusen im Vergleich zu Th1- Zellen aus Wildtyp- Mäusen eine drastisch reduzierte Produktion von  $\text{TNF}\alpha$ .



**Abb. 8b:** Th1- Zellen aus NFATc2/c3- defizienten Mäusen zeigen eine sehr stark verminderte  $\text{TNF}\alpha$ -Produktion verglichen mit Th1- Zellen aus Wildtyp- Mäusen.

Th1- Zellen wurden für 24 Stunden über ihren T- Zellrezeptor stimuliert und die  $\text{TNF}\alpha$ - Produktion wurde in einem Cytotoxizitätstest bestimmt.

Zusammenfassend sprechen die Abbildungen 8a und 8b dafür, dass Mastzellen und Th1- Zellen aus NFATc2/c3- defizienten Mäusen sehr stark in der  $\text{TNF}\alpha$ - Produktion beeinträchtigt sind. Die Beobachtung, dass sich die kombinierte Defizienz von NFATc2 und NFATc3 in Th2- Zellen und Mastzellen hinsichtlich der IL-9- und IL-13-

Produktion gegensätzliche Folgen hat (siehe Abb. 5), trifft für die  $\text{TNF}\alpha$ - Produktion von Mastzellen und Th1- Zellen nicht zu.

### **2. Untersuchung der Cytokinproduktion von NFATc2- und NFATc3-einfach- defizienten Mäusen.**

Um zu untersuchen, ob der Transkriptionsfaktor NFATc2 oder NFATc3 oder eine Kombination beider Transkriptionsfaktoren die Produktion von IL-9, IL-13 und  $\text{TNF}\alpha$  regulieren, wurden Mastzellen aus Mäusen generiert, die für NFATc2 (NFATc2KO) oder für NFATc3 (NFATc3KO) oder für beide Transkriptionsfaktoren (NFATc2/c3KO) defizient sind. Die Mastzellen aus diesen Mäusen wurden einerseits mit IgE präinkubiert, was die Zellen mit IgE absättigt sowie die Expression der IgE-Rezeptoren auf den Mastzellen verstärkt, und dann mit anti- IgE stimuliert. Alternativ wurden die Zellen mit dem Calcium- Ionophor Ionomycin aktiviert (Abb. 9).

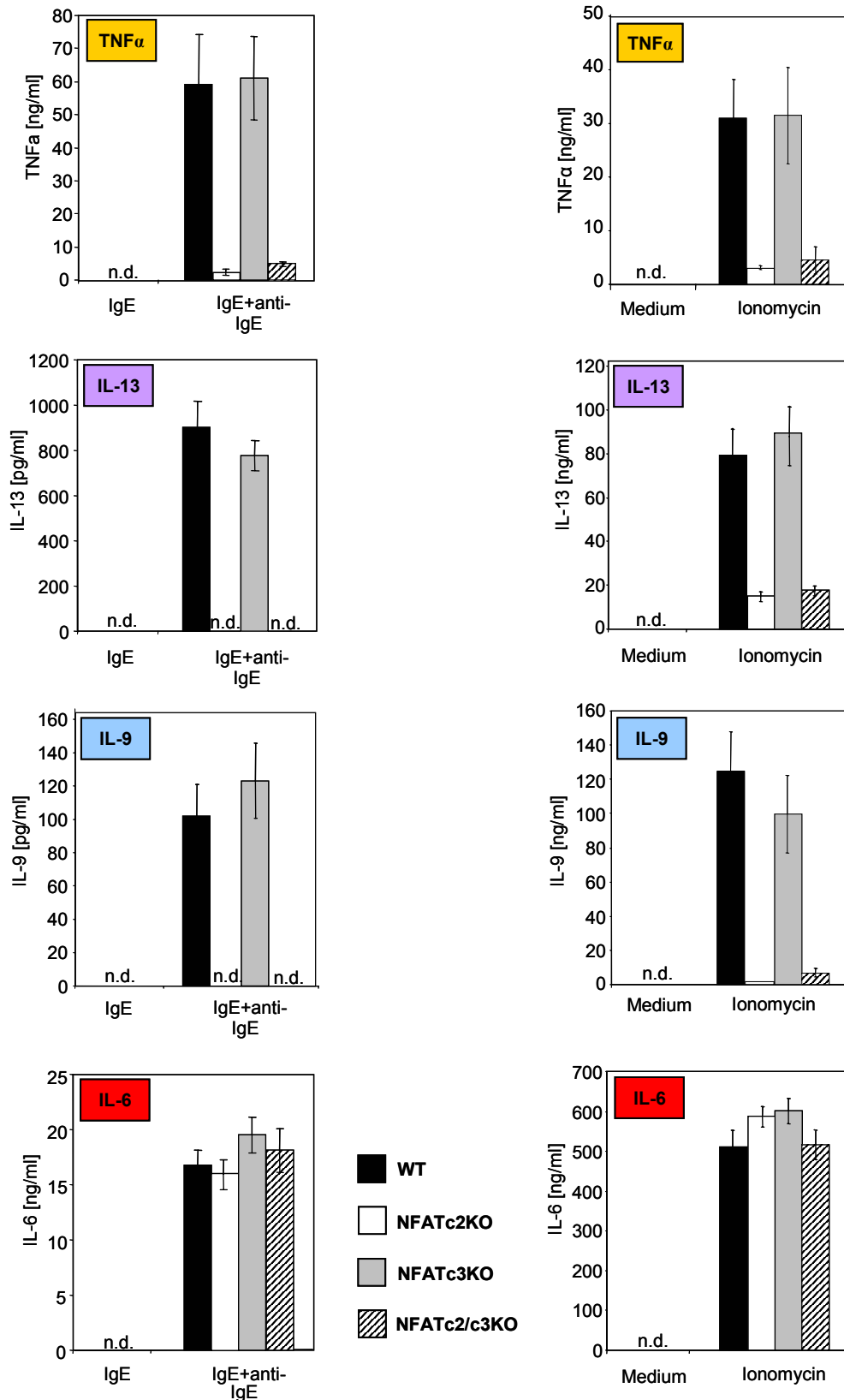


Abb. 9: Der Transkriptionsfaktor NFATc2 ist essentiell an der IL-9-, IL-13- und TNFα- Produktion von Mastzellen beteiligt, wohingegen NFATc3 keinen Einfluss auf die Expression dieser zeigt. Die IL-6- Produktion ist nicht von diesen NFAT- Faktoren abhängig.

Mastzellen aus Wildtyp-, NFATc2KO-, NFATc3KO- und NFATc2/c3KO- Mäusen wurden zum Nachweis der IL-9-, IL-13- und IL-6- Produktion für 48 Stunden, zum Nachweis der TNF $\alpha$ - Produktion für 4 Stunden entweder mit Ionomycin oder durch Kreuzvernetzung der membranständigen IgE-Rezeptoren aktiviert. Die IL-9-, IL-13- und die IL-6 Produktion wurde mittels ELISA bestimmt, die Produktion von TNF $\alpha$  durch einen Bioassay. n.d. = nicht detektierbar.

Wie in Abbildung 9 zu erkennen ist, zeigen Mastzellen aus NFATc3- defizienten Mäusen keinen Unterschied in der IL-9-, IL-13- und TNF $\alpha$ - Produktion im Vergleich zu Mastzellen aus Wildtyp- Mäusen. Interessanterweise führt allein die Defizienz für den Transkriptionsfaktor NFATc2 zu einer stark reduzierten Produktion der Cytokine IL-9, IL-13 und TNF $\alpha$ . Die Produktion des Cytokins IL-6 ist in NFAT- defizienten Mastzellen nicht beeinträchtigt, sondern mit der Cytokinproduktion von Mastzellen aus Wildtyp- Mäusen vergleichbar.

### **3. Die Degranulation von Mastzellen aus NFAT- defizienten Mäusen ist unbeeinträchtigt.**

Die Aktivierung von NFAT- Faktoren ist von einer Erhöhung des intrazellulären Calcium- Spiegels abhängig. Ein solcher Anstieg der Ca<sup>2+</sup>- Konzentration ist auch notwendig für die Degranulation von Mastzellen. Über einen entsprechenden Stimulus aktivierte Mastzellen sind in der Lage, innerhalb weniger Minuten die in ihren Granula gespeicherten Substanzen zu sezernieren. Um eine mögliche Funktion von NFAT- Faktoren bei der Degranulation von Mastzellen zu untersuchen, wurden Mastzellen aus Wildtyp-, NFATc2- defizienten, NFATc3- defizienten und NFATc2/c3- doppel-defizienten Mäusen generiert, mit IgE präinkubiert und entweder so belassen oder mit anti- IgE stimuliert. Als Maß für die Degranulation dient die Freisetzung des Enzyms  $\beta$ - Hexosaminidase, welches nach Stimulation der Mastzelle aus den Granula freigesetzt wird und in einer enzymatischen Reaktion nachgewiesen werden kann.

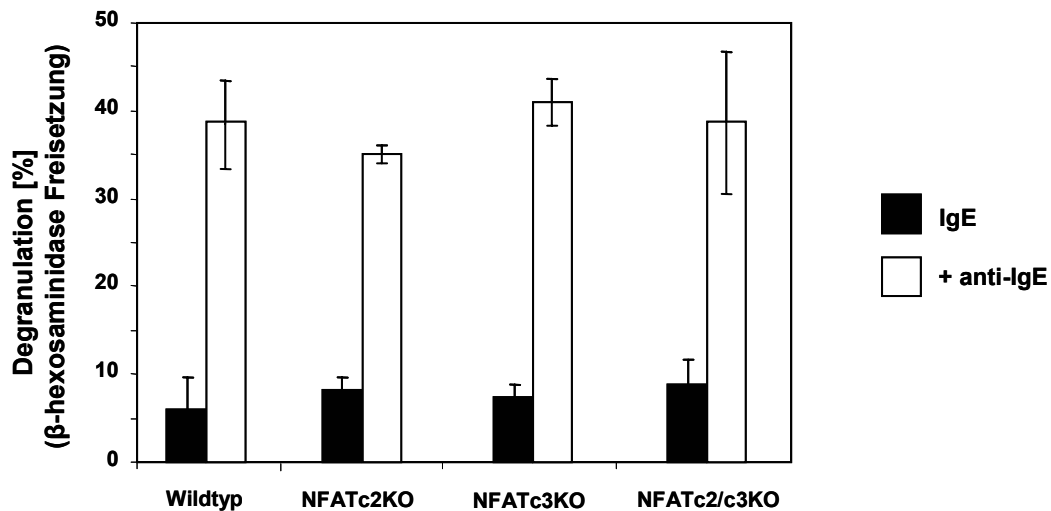
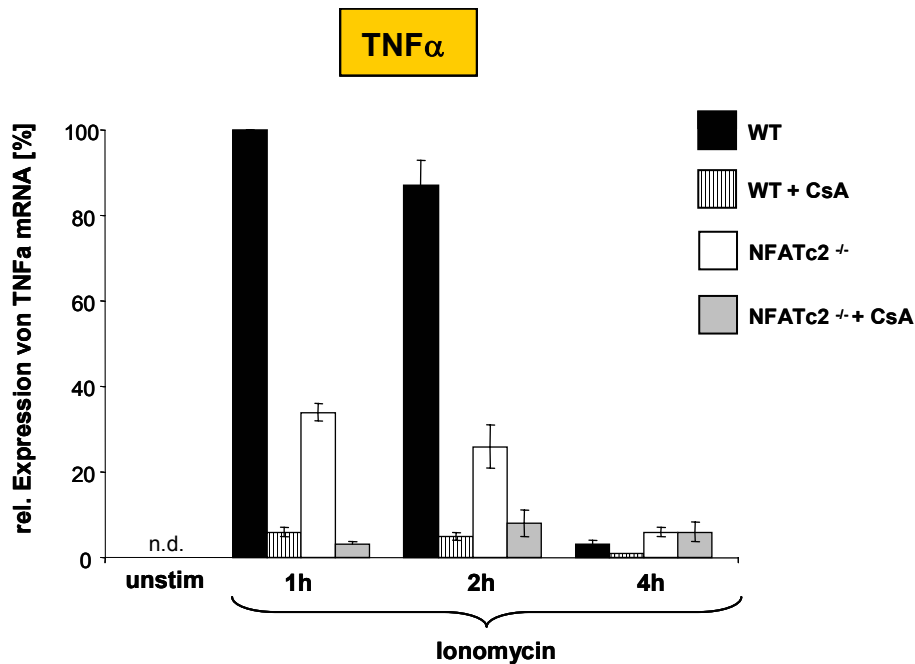


Abb. 10: Die Degranulation von Mastzellen aus NFATc2-, NFATc3- und NFATc2/c3- defizienten Mäusen ist, verglichen mit Mastzellen aus Wildtyp- Mäusen, nicht beeinträchtigt.

Wie aus Abbildung 10 zu entnehmen ist, haben die Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NFATc3 keinen Einfluss auf die Degranulation von Mastzellen.

#### 4. Sind weitere Transkriptionsfaktoren der NFAT- Familie an der Regulation der IL-9-, IL-13- und TNF $\alpha$ - Expression beteiligt?

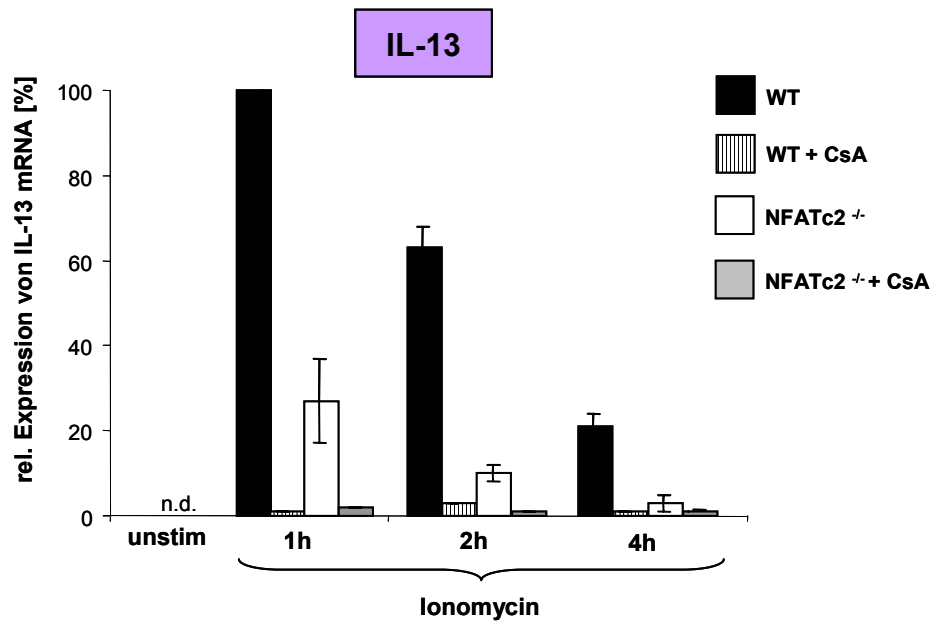
Um den Einfluss von NFATc2 auf die Expression von IL-9, IL-13 und TNF $\alpha$  detaillierter zu analysieren, wurde zunächst die Regulation der Produktion dieser Cytokine auf mRNA- Ebene untersucht. Hierzu wurden Mastzellen aus Wildtyp- und NFATc2- defizienten Mäusen generiert und über verschieden lange Zeiträume mit dem Calcium- Ionophor Ionomycin stimuliert. Ein Teil der Ansätze wurde vor und während der Stimulation mit dem Immunsuppressivum Cyclosporin A (CsA) behandelt. Cyclosporin A ist ein Inhibitor der Phosphatase Calcineurin und wirkt somit in indirekter Weise hemmend auf die NFAT- Aktivierung. Es ist demnach mit Cyclosporin A möglich, die Aktivierung aller Ca<sup>2+</sup>- abhängigen NFAT- Faktoren in der Mastzelle zu unterbinden. Nach Isolierung der mRNA und reverser Transkription wurde die relative Expression von IL-9- mRNA, IL-13- mRNA und TNF $\alpha$ - mRNA durch quantitative Echtzeit- PCR- Analysen ermittelt (Abbildung 11a-c).



**Abb. 11a:** Die relative Expression von  $\text{TNF}\alpha$ - mRNA ist in Mastzellen aus  $\text{NFATc2}$ - defizienten Mäusen stark verringert und wird durch Cyclosporin A weiter gesenkt.

Mastzellen von Wildtyp- und  $\text{NFATc2}$ - defizienten Mäusen wurden entweder so belassen oder mit Ionomycin über verschiedene Zeiträume mit und ohne Einsatz von Cyclosporin A stimuliert. Nach Isolation der RNA und reverser Transkription wurde die relative  $\text{TNF}\alpha$ - Expression durch quantitative Echtzeit- PCR- Analyse ermittelt. n.d. = nicht detektierbar.

Wie aus Abbildung 11a zu entnehmen, ist in Mastzellen aus Wildtyp- Mäusen die maximale Expression von  $\text{TNF}\alpha$  bereits nach einer Stunde erreicht und nimmt mit zunehmender Stimulationsdauer ab. In Mastzellen aus  $\text{NFATc2}$ - defizienten Mäusen ist die Expression von  $\text{TNF}\alpha$ - mRNA stark reduziert. Durch den Einsatz von Cyclosporin A wird die Expression von  $\text{TNF}\alpha$  unabhängig von der Stimulationsdauer weiter gesenkt. Unstimulierte Mastzellen exprimieren keine  $\text{TNF}\alpha$ - mRNA. Dies ist zunächst insofern überraschend, da das Potential von Mastzellen in Mausmodellen mit akuten bakteriellen Entzündungen darin besteht, lebensrettende Entzündungen zu initiieren, was darauf zurückgeführt wird, dass Mastzellen in der Lage sind, präformiertes  $\text{TNF}\alpha$  in ihren Granula zu speichern und dieses innerhalb von Minuten zu sezernieren. Es konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch keine konstitutive  $\text{TNF}\alpha$ - mRNA Expression nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis wird durch frühere Beobachtungen unterstützt, wonach  $\text{TNF}\alpha$  in BMMC („bone marrow derived mast cells“) nicht konstitutiv produziert und in Granula gespeichert wird (56, 59, 62).

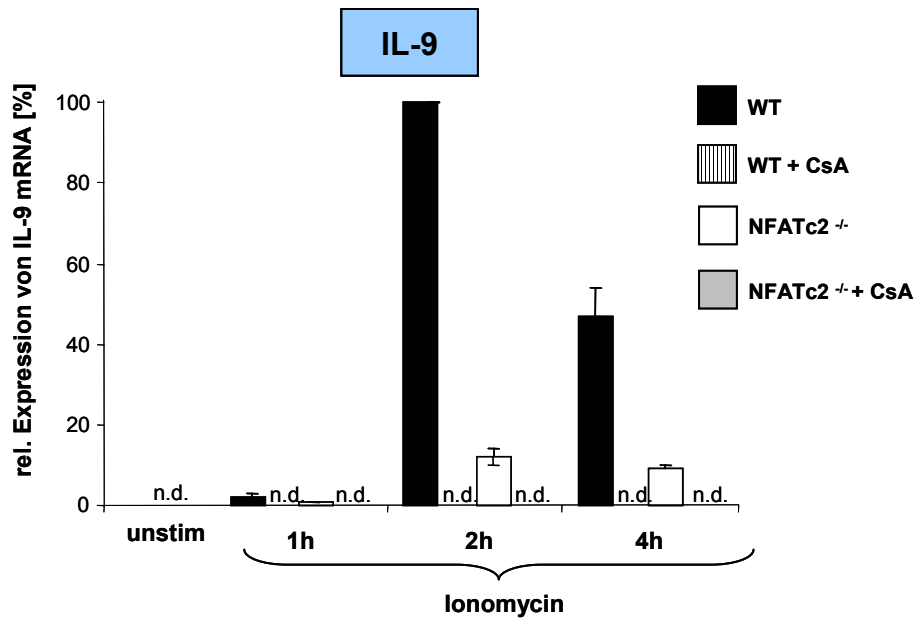


**Abb. 11b: Relative Expression der IL-13- mRNA von Wildtyp- und NFATc2- defizienten Mastzellen.**

Mastzellen von Wildtyp- und NFATc2- defizienten Mäusen wurden entweder so belassen oder mit Ionomycin über verschiedene Zeiträume mit und ohne Einsatz von Cyclosporin A stimuliert. Nach Isolation der RNA und reverser Transkription wurde die relative TNF $\alpha$ - Expression durch quantitative Echtzeit- PCR- Analyse ermittelt. n.d. = nicht detektierbar.

**Die relative Expression von IL-13- mRNA ist in Mastzellen aus NFATc2- defizienten Mäusen stark reduziert, jedoch noch sensitiv gegenüber Cyclosporin A.**

Ebenso wie die TNF $\alpha$ - Expression erreicht auch die IL-13- Expression (Abbildung 11b) nach einer Stunde Stimulation ihren Höchstwert und nimmt mit fortschreitender Dauer der Stimulation wieder ab. Die IL-13- mRNA- Expression ist in Mastzellen aus NFATc2- defizienten Mäusen stark vermindert und kann durch den Einsatz von Cyclosporin A weiter gesenkt werden.



**Abb. 11c: Relative Expression der IL-9- mRNA von Wildtyp- und NFATc2- defizienten Mastzellen.**

Mastzellen von Wildtyp- und NFATc2- defizienten Mäusen wurden entweder so belassen oder mit Ionomycin über verschiedene Zeiträume mit und ohne Einsatz von Cyclosporin A stimuliert. Nach Isolation der RNA und reverser Transkription wurde die relative TNF $\alpha$ - Expression durch quantitative Echtzeit- PCR- Analyse ermittelt. n.d. = nicht detektierbar.

**Verglichen mit Wildtyp- Mastzellen ist die IL-9- mRNA- Expression in NFATc2- defizienten Mastzellen stark vermindert.**

Die stärkste Expression der IL-9- mRNA (Abbildung 11c) erfolgt zwei Stunden nach der Aktivierung mit Ionomycin. NFATc2 spielt auch bei der IL-9- Expression eine bedeutende Rolle, da diese in Mastzellen aus NFATc2- defizienten Mäusen drastisch reduziert und sensitiv gegenüber Cyclosporin A ist.

Zusammenfassend geht aus den Abbildungen 11a-c hervor, dass der Transkriptionsfaktor NFATc2 auf Transkriptionsebene entscheidenden Einfluss auf die Expression von TNF $\alpha$ , IL-13 und IL-9 hat. Die Expression ist in Mastzellen aus NFATc2- defizienten Tieren, verglichen mit Mastzellen aus Wildtyp- Mäusen, stark reduziert. Interessanterweise wird die restliche Expression der TNF $\alpha$ -, IL-13- und IL-9- mRNA in Mastzellen aus NFATc2- defizienten Mäusen durch den Einsatz von Cyclosporin A weiter gesenkt. In Anbetracht der Tatsache, dass NFATc2- defiziente Mastzellen sensitiv auf Cyclosporin A reagieren, stellte sich die Frage, ob an der Regulation der TNF $\alpha$ -, IL-13- und IL-9- Expression noch weitere CsA- sensitive Transkriptionsfaktoren beteiligt sind. Nachdem sich bereits herausgestellt hatte, dass

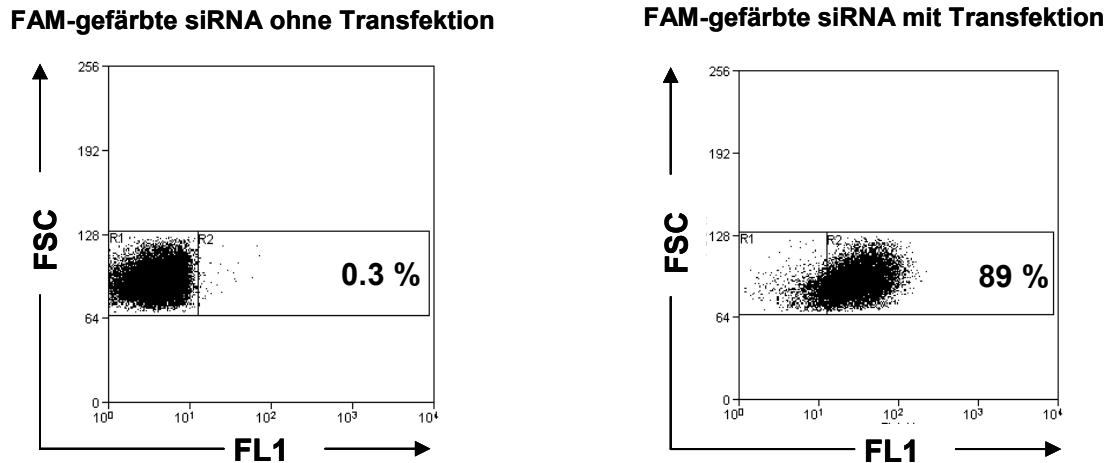


NFATc3 nicht an der Produktion dieser Cytokine beteiligt ist (siehe Abb. 9), war NFATc1 ein hierfür in Frage kommender Kandidat. Es ist jedoch nicht möglich, Mastzellen aus NFATc1- defizienten Mäusen zu generieren, da solche Mäuse aufgrund von schweren Entwicklungsdefekten im Embryonalstadium (insbesondere der Herzklappen) sehr früh im Uterus sterben (63, 64). Um trotzdem die Rolle von NFATc1 in Mastzellen hinsichtlich der Cytokinproduktion näher untersuchen zu können, wurde die Technik der RNA- Interferenz (RNAi) angewendet.

Grundlage dieser Technik ist, dass 21- 25 bp grosse RNA- Moleküle („small interfering RNA“, siRNA) nach sequenzspezifischer Bindung an ihre komplementäre Ziel- mRNA deren Abbau einleiten (für Einzelheiten siehe Material und Methoden Abschnitt 8).

### **5. Transfektion von Mastzellen mit siRNA**

Eine der geeignetsten Methoden zur Transfektion von primären Zellen ist die Elektroporation. Hierbei werden durch ein elektrisches Feld mikroskopische Poren in der Membran der Zellen erzeugt, die Molekülen, Ionen und Wasser die Diffusion in die Zelle erlauben. Da in unserem Institut ein Elektroporationsprotokoll zum Einbringen von Plasmid- DNA in Mastzellen entwickelt worden war, wurde versucht, dieses Protokoll auf die Transfektion von Mastzellen mit siRNA zu übertragen. Um die Effizienz der Transfektion von Mastzellen mit siRNA zu bestimmen, wurde eine mit dem Farbstoff FAM (6- Carboxyfluorescein) gefärbte siRNA verwendet. Diese wurde zu den Zellen gegeben. Die Mastzellen wurden entweder so belassen oder mittels Elektroporationsgerät mit dieser siRNA transfiziert. Eine Stunde nach Elektroporation wurde die Transfektionseffizienz durch FACS- Analyse ermittelt.



**Abb. 12: Mastzellen lassen sich sehr gut mit siRNA transfizieren.**

FAM- gefärbte siRNA wurde zu Mastzellen gegeben und diese entweder so belassen oder mit dem Elektroporationsgerät Gene Pulser II (BioRad) transfiziert. Zwei Stunden nach Transfektion wurde die Transfektionseffizienz durch FACS- Analyse ermittelt.

FSC = „forward scatter“, ein Maß für die Zellgröße.

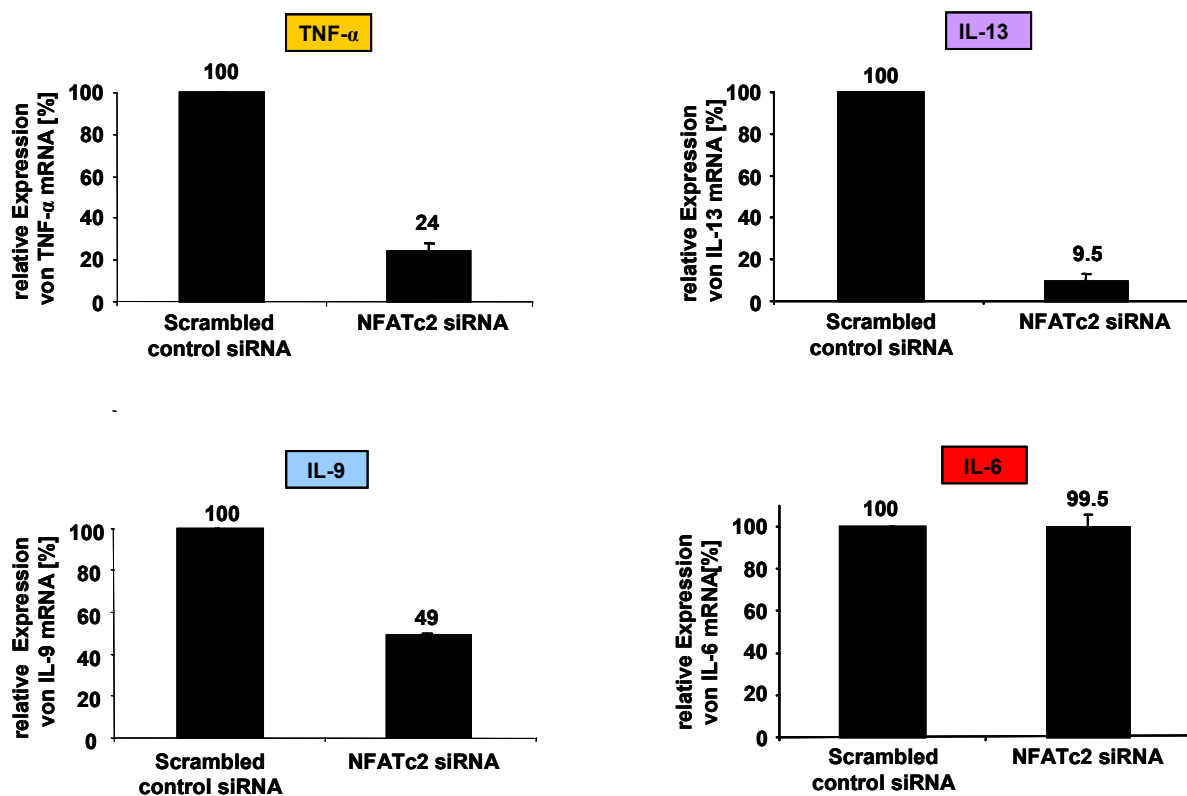
FL1 = Fluoreszenz des Farbstoffes.

Wie in Abbildung 12 zu erkennen ist, ist die Effizienz einer Transfektion von Mastzellen mit siRNA mit 89% siRNA positiven Zellen sehr hoch. Diese Prozedur wird von ca. 60% der Mastzellen überlebt (Daten nicht gezeigt).

### 5.1 „Knock- down“ von NFATc2 durch Verwendung NFATc2- spezifischer siRNA.

Um die Prozedur der RNAi zu überprüfen, wurde zunächst der Versuch unternommen, die mRNA für NFATc2 in Wildtyp- Mastzellen zu eliminieren mit dem Ziel, Ergebnisse zu erhalten, die vergleichbar sind mit denjenigen, die durch Verwendung von NFATc2- defizienten BMMC zustande kamen.

Hierzu wurde NFATc2- spezifische siRNA in Mastzellen aus Wildtyp- Mäusen mittels Elektroporation eingebracht. Als Negativ- Kontrolle wurde eine unspezifische siRNA („scrambled control siRNA“) verwendet. Nach einer Ruhephase von 16- 20 Stunden wurden die Zellen mit Ionomycin für zwei Stunden stimuliert. Nach Isolierung der RNA und reverser Transkription wurde die relative Expression der IL-9-, IL-13-, IL-6- und TNF $\alpha$ - mRNAs mittels quantitativer Echtzeit- PCR- Analyse bestimmt (Abb. 13).

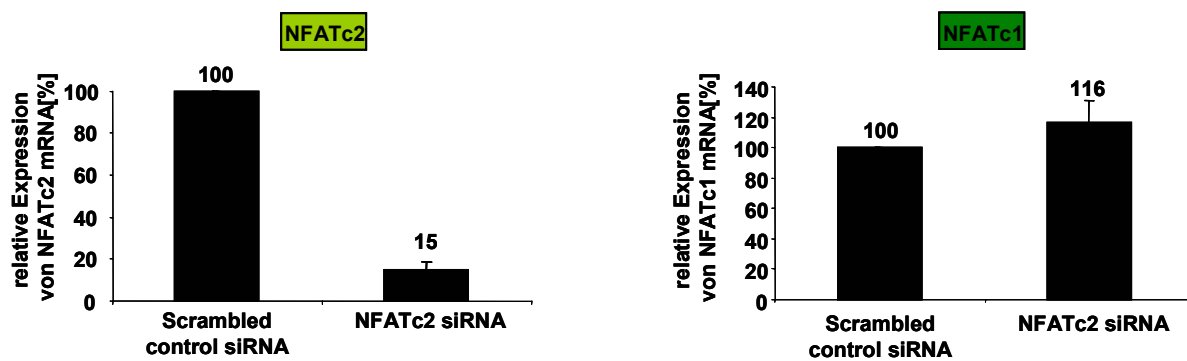


**Abb. 13:** Die Transfektion von Mastzellen mit spezifischer siRNA gegen NFATc2 führt zu einer stark verminderten Expression von TNF $\alpha$ , IL-13 und IL-9. Die IL-6- Expression bleibt unbeeinträchtigt.

Die siRNA wurde mittels Elektroporation in Mastzellen aus Wildtyp- Mäusen eingebracht. Nach 16 Stunden wurden die Zellen für 1 Stunde (TNF $\alpha$ - mRNA) bzw. 4h (IL-13-, IL-9- und IL-6- mRNA) mit Ionomycin stimuliert und die relative Expression durch quantitative Echtzeit- PCR- Analyse ermittelt. Die Expression der mit unspezifischer siRNA („scrambled control siRNA“) transfizierten Mastzellen wurde willkürlich auf 100% gesetzt.

Abbildung 13 zeigt deutlich, dass die Transfektion von Mastzellen aus Wildtyp- Mäusen mit spezifischer siRNA gegen NFATc2 zu einer starken Reduktion der TNF $\alpha$ -, IL-13- und IL-9- Expression führt. Auf die relative Expression von IL-6 hat ein „Knock- down“ von NFATc2 keinerlei Einfluss.

Um auszuschließen, dass die verwendete siRNA gegen NFATc2 unspezifisch, das heißt nicht nur zum Abbau der mRNA für NFATc2 führt, sondern womöglich Einfluss auf die Genexpression anderer NFAT- Faktoren nimmt, wurden Mastzellen mit siRNA gegen NFATc2 transfiziert und die relative Expression von NFATc2 und eines weiteren NFAT- Faktors, NFATc1, durch quantitative Echtzeit- PCR- Analyse ermittelt (Abb. 14).



**Abb. 14:** Die NFATc2 spezifische siRNA reduziert stark die Expression von NFATc2, wohingegen sie auf die Expression von NFATc1 keinen Einfluss nimmt.

Die siRNA wurde mittels Elektroporation in Mastzellen aus Wildtyp- Mäusen eingebracht. Nach 16 Stunden wurden die Zellen für 4 Stunden mit Ionomycin stimuliert und die relative Expression von NFATc1 und NFATc2 durch quantitative Echtzeit- PCR- Analyse ermittelt. Die Expression der mit unspezifischer siRNA („scrambled control siRNA“) transfizierten Mastzellen wurde willkürlich auf 100% gesetzt.

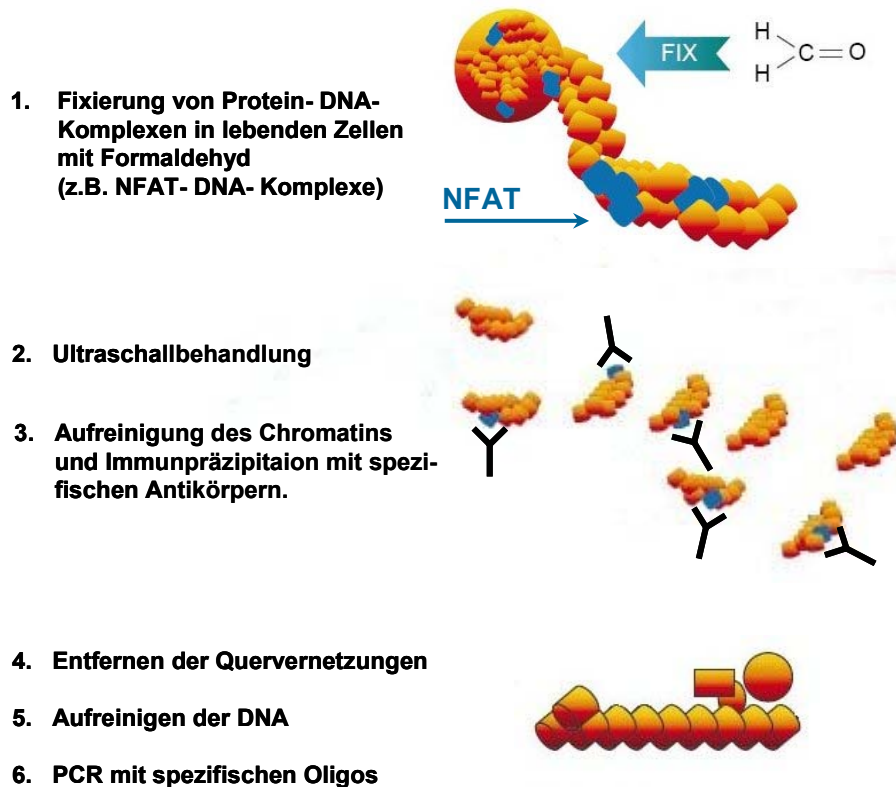
Wie aus Abbildung 14 hervorgeht, reduziert die eingesetzte siRNA gegen NFATc2 spezifisch die Expression von NFATc2 mRNA im Vergleich zur Transfektion von Mastzellen mit funktionsloser („scrambled control siRNA“) siRNA. Die Expression von NFATc1 wird durch den Einsatz NFATc2 spezifischer siRNA nicht beeinträchtigt.

Zusammenfassend stellt die Methode der siRNA- vermittelten RNA- Interferenz ein geeignetes Mittel dar, um die Funktion einzelner Faktoren in BMMC zu untersuchen. Der siRNA- vermittelte „Knock- down“ von NFATc2 in Wildtyp- BMMC lieferte bezüglich der Expression der untersuchten Cytokine (IL-13,  $TNF\alpha$ , IL-9 und IL-6) Ergebnisse, die denjenigen entsprachen, die durch Verwendung von BMMC aus NFATc2- defizienten Mäusen erhalten worden waren. Auf den siRNA- vermittelten „Knock- down“ von NFATc1 wird zu einem späteren Zeitpunkt in dieser Arbeit eingegangen (siehe Kap. 7.2).

## 6. Chromatinimmunpräzipitation (ChIP)

Durch die Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) ist es möglich, die Bindung von Proteinen an spezifische DNA- Fragmente nachzuweisen. Zunächst werden Protein-DNA- Komplexe hierbei chemisch vernetzt. Die Immunpräzipitation erfolgt durch

Antikörper, welche spezifisch für den Proteinanteil des Komplexes sind. Nach Entfernung der Quervernetzungen und Aufreinigung der DNA wird die präzipitierte DNA mit spezifischen Oligonukleotiden durch PCR nachgewiesen (Abbildung 15).



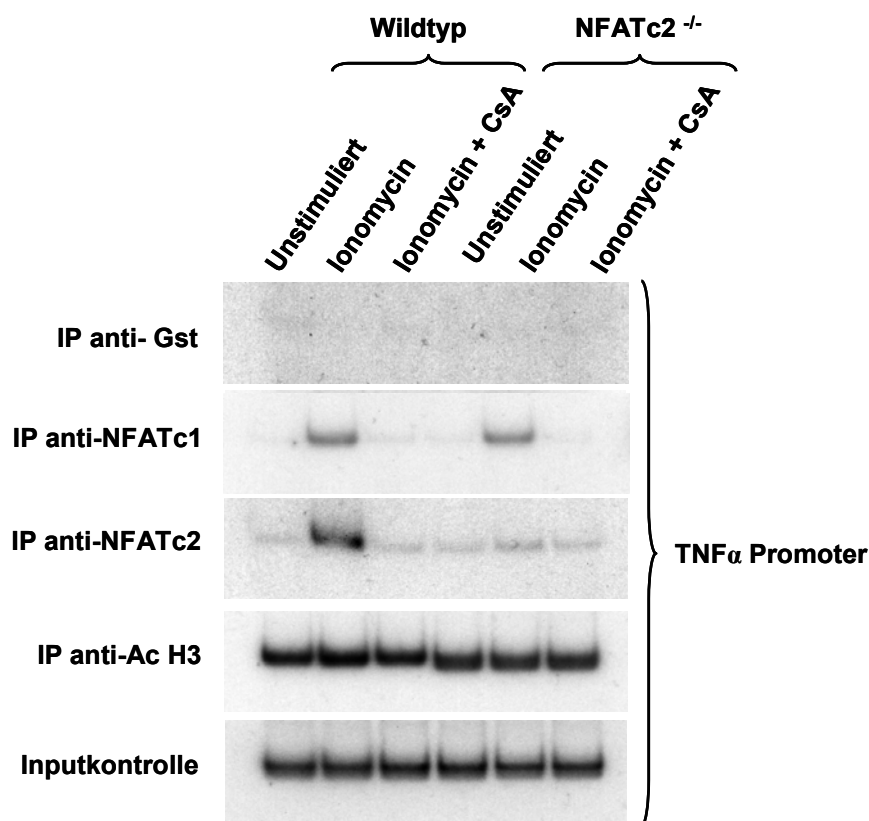
Adaptiert von TIBS,  
März 2000: 99-104

Abb. 15: Methodik der Chromatinimmunpräzipitation (ChIP).

### 6.1 Sowohl NFATc2 als auch NFATc1 binden an den $\text{TNF}\alpha$ -, IL-13-, IL-9-Promoter.

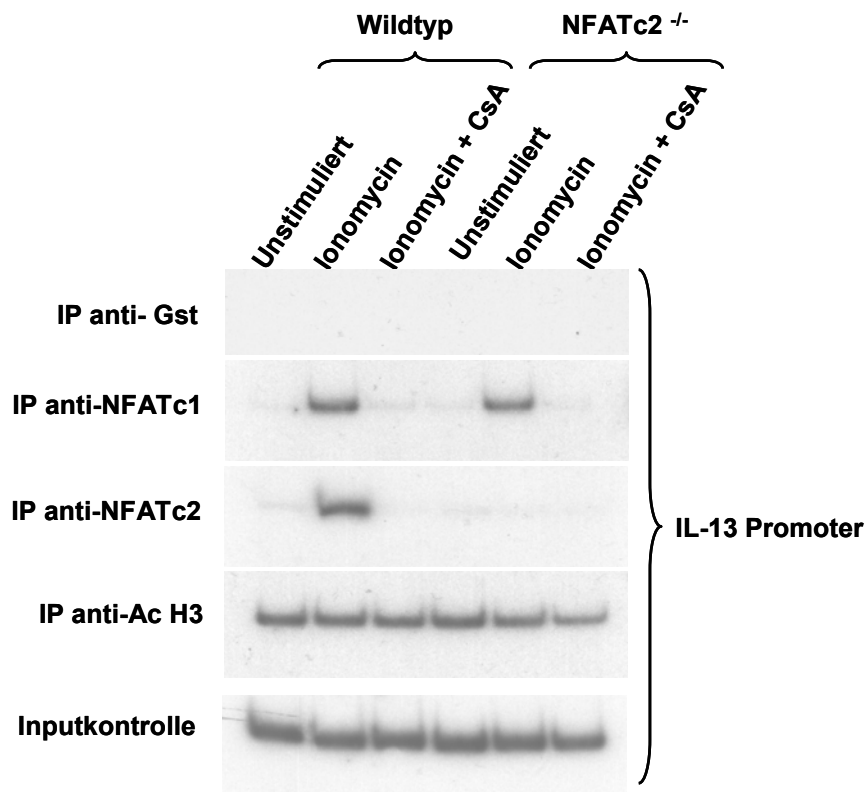
Um zu untersuchen, ob der Transkriptionsfaktor NFATc2 direkt an Promoterregionen des IL-13-,  $\text{TNF}\alpha$ -, IL-6- und IL-9- Gens bindet, wurden ChIP- Analysen durchgeführt. Wie in Abbildung 16a-c gezeigt, bindet NFATc2 an die Promoterregionen aller drei Gene nach Stimulation der Mastzellen. Die Bindung wird komplett unterbunden durch Einsatz von Cyclosporin A. Als Kontrolle wurde eine Immunpräzipitation mit dem

Chromatin von Mastzellen aus NFATc2- defizienten Mastzellen durchgeführt. Wie erwartet, ist in solchem Chromatin ebenfalls keine Bindung von NFATc2 nachzuweisen. Interessanterweise konnte durch die ChIP- Analyse eine Bindung von NFATc1 an die Promoterregionen des  $TNF\alpha$ -, IL-13- und des IL-9- Gens, sowohl in Chromatin aus Wildtyp- als auch NFATc2- defizienten Mäusen, gezeigt werden. Die Bindung von NFATc1 kann, ebenso wie die Bindung von NFATc2, durch Cyclosporin A (CsA) verhindert werden. Als zusätzliche Kontrolle wurde untersucht, ob diese NFAT- Faktoren an den IL-6- Promoter binden. Wie erwartet, binden weder NFATc1 noch NFATc2 an Promoterregionen des IL-6- Gens (Abb. 16d).



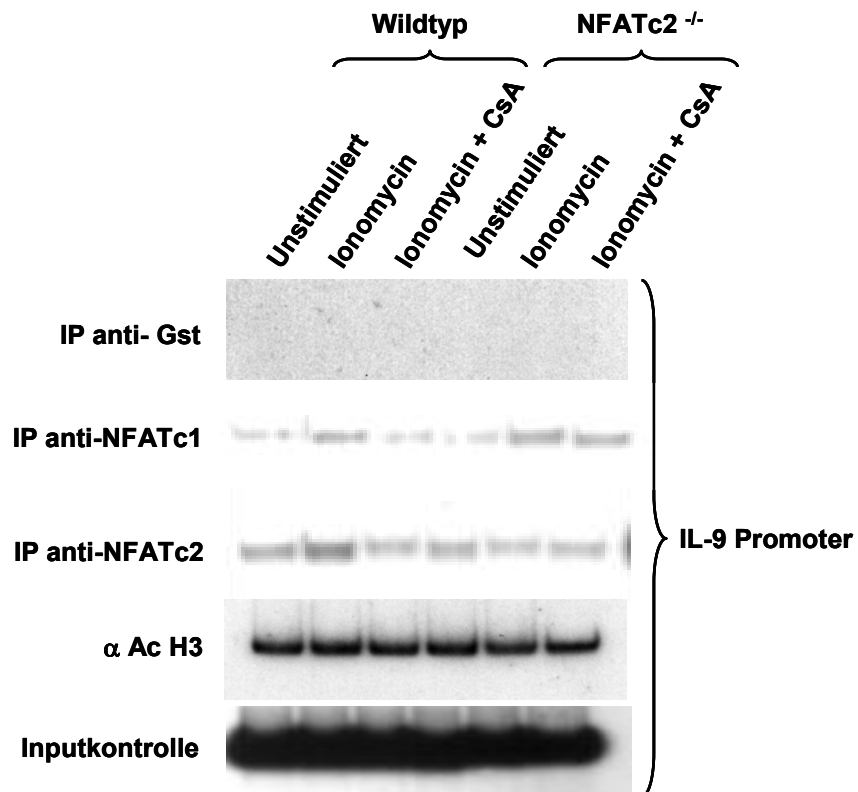
**Abb. 16a: Die Transkriptionsfaktoren NFATc1 und NFATc2 binden an den  $TNF\alpha$ - Promoter.**

ChIP mit Mastzellen aus Wildtyp- und NFATc2- defizienten Mäusen. Mastzellen aus Wildtyp- und NFATc2- defizienten Mäusen wurden entweder so belassen oder mit Ionomycin für 4 Stunden stimuliert. In manchen Ansätzen wurden die Zellen vor der Stimulation 30 Minuten mit Cyclosporin A (CsA) präinkubiert. Nach der Stimulation wurden Protein- DNA- Komplexe mit Formaldehyd fixiert und mit spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert. Nach Aufreinigung der Präzipitate wurde eine PCR mit spezifischen Oligos für den  $TNF\alpha$ - Promoter durchgeführt. IP = Immunpräzipitation.



**Abb.16b: Sowohl NFATc1 als auch NFATc2 binden an den IL-13- Promoter.**

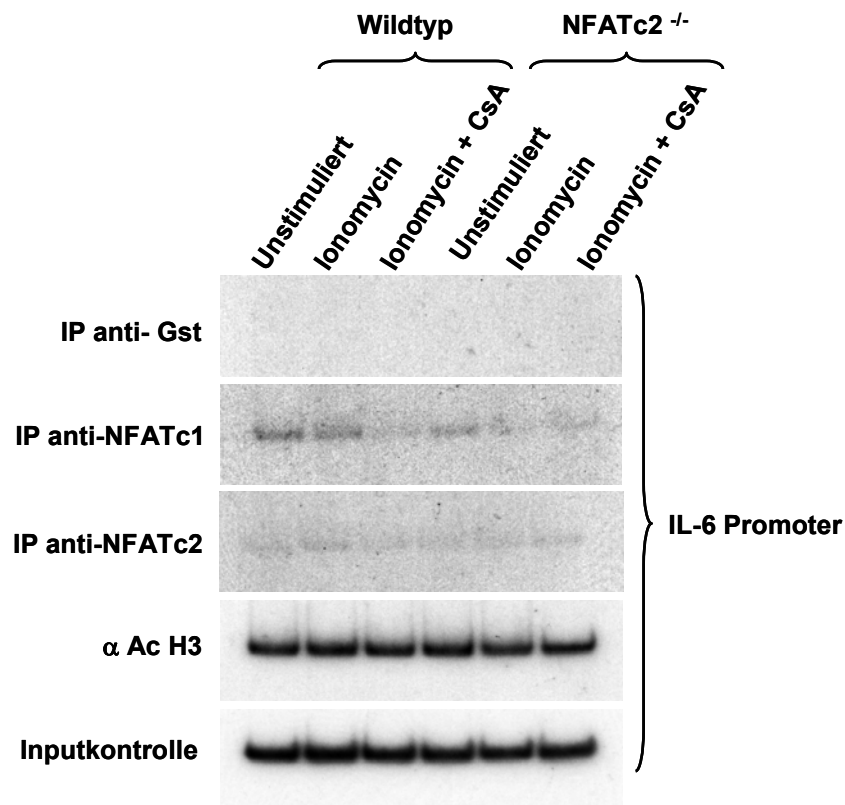
ChIP mit Mastzellen aus Wildtyp- und NFATc2- defizienten Mäusen. Mastzellen aus Wildtyp- und NFATc2- defizienten Mäusen wurden entweder so belassen oder mit Ionomycin für 4 Stunden stimuliert. In manchen Ansätzen wurden die Zellen vor der Stimulation 30 Minuten mit Cyclosporin A (CsA) präinkubiert. Nach der Stimulation wurden Protein- DNA- Komplexe mit Formaldehyd fixiert und mit spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert. Nach Aufreinigung der Präzipitate wurde eine PCR mit spezifischen Oligos für den IL-13- Promoter durchgeführt. IP = Immunpräzipitation.



**Abb. 16c: Über eine direkte Bindung von NFATc1 und NFATc2 an den IL-9- Promoter kann aufgrund des hohen Hintergrunds keine Aussage gemacht werden.**

ChIP mit Mastzellen aus Wildtyp- und NFATc2- defizienten Mäusen. Mastzellen aus Wildtyp- und NFATc2- defizienten Mäusen wurden entweder so belassen oder mit Ionomycin für 4 Stunden stimuliert. In manchen Ansätzen wurden die Zellen vor der Stimulation 30 Minuten mit Cyclosporin A (CsA) präinkubiert. Nach der Stimulation wurden Protein- DNA- Komplexe mit Formaldehyd fixiert und mit spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert. Nach Aufreinigung der Präzipitate wurde eine PCR mit spezifischen Oligos für den IL-9- Promoter durchgeführt. IP = Immunpräzipitation.





**Abb. 16d: Weder NFATc1 noch NFATc2 binden an den IL-6- Promoter.**

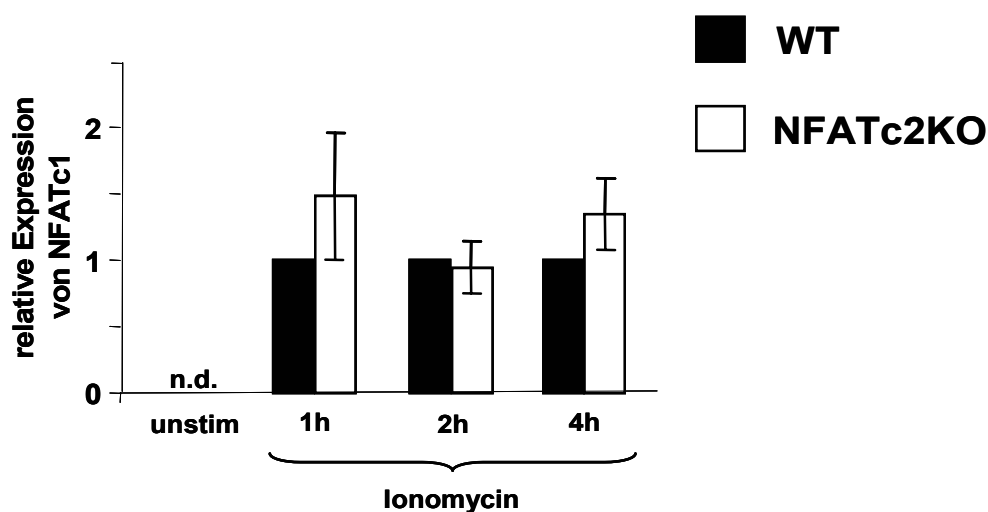
ChIP mit Mastzellen aus Wildtyp- und NFATc2- defizienten Mäusen. Mastzellen aus Wildtyp- und NFATc2- defizienten Mäusen wurden entweder so belassen oder mit Ionomycin für 4 Stunden stimuliert. In manchen Ansätzen wurden die Zellen vor der Stimulation 30 Minuten mit Cyclosporin A (CsA) präinkubiert. Nach der Stimulation wurden Protein- DNA- Komplexe mit Formaldehyd fixiert und mit spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert. Nach Aufreinigung der Präzipitate wurde eine PCR mit spezifischen Oligos für den IL-6- Promoter durchgeführt.

Neben den Immunpräzipitationen mit spezifischen Antikörpern zum Nachweis von NFATc1 und NFATc2 wurde als Negativkontrolle mit einem Antikörper gegen Glutathion- S- Transferase (anti- GST) präzipitiert. Als Positivkontrolle diente ein Antikörper gegen acetyliertes Histon H3. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl NFATc1 als auch NFATc2 nach Stimulation der Mastzellen an die Promotoren des  $TNF\alpha$ - und IL-13- Gens binden (Abb. 16a und 16b), nicht jedoch an den IL-6- Promoter (Abb. 16d). Über die Bindung beider NFAT- Faktoren an den IL-9- Promoter lässt sich aufgrund des hohen Hintergrunds nur schwerlich eine Aussage treffen (Abb. 16c). Die Bindung von NFATc1 und NFATc2 wird durch den Einsatz von Cyclosporin A in allen Ansätzen unterbunden. Da die Behandlung von NFATc2- defizienten Mastzellen mit Cyclosporin A zu einer weiteren Reduktion der bereits stark verminderten IL-13- und  $TNF\alpha$ - Expression führt (Abb. 11a und b),

lassen die ChIP- Ergebnisse die Vermutung zu, dass auch NFATc1 an der Expression von IL-13 und TNF $\alpha$  beteiligt ist. Ob es sich hier um eine Redundanz der genannten NFAT- Faktoren handelt, oder aber ob diese kooperativ die Expression von TNF $\alpha$  und IL-13 regulieren, kann durch diese Versuche nicht eindeutig geklärt werden.

### 7. Die relative Expression von NFATc1 in Mastzellen aus Wildtyp- und NFATc2- defizienten Mäusen ist vergleichbar

Um zu untersuchen, ob neben NFATc2 möglicherweise der Transkriptionsfaktor NFATc1 an der Regulation der TNF $\alpha$ -, IL-13- und IL-9- Expression beteiligt ist, wurde in einem Vorversuch zunächst die Expression von NFATc1 in Mastzellen aus Wildtyp- Mäusen mit Mastzellen aus NFATc2- defizienten Mäusen verglichen (Abbildung 17).



**Abb. 17: Die induzierbare Expression von NFATc1 in Wildtyp- und NFATc2- defizienten Mastzellen ist vergleichbar.**

Mastzellen aus Wildtyp- und NFATc2- defizienten Mäusen wurden entweder so belassen oder über verschieden lange Zeiträume mit Ionomycin stimuliert. Nach Isolation der RNA und reverser Transkription wurde die relative NFATc1- Expression durch quantitative Echtzeit- PCR- Analyse ermittelt. Die Werte der Expression von NFATc1 in Mastzellen aus Wildtyp- Mäusen sind jeweils 1 gesetzt. n.d. = nicht detektierbar.

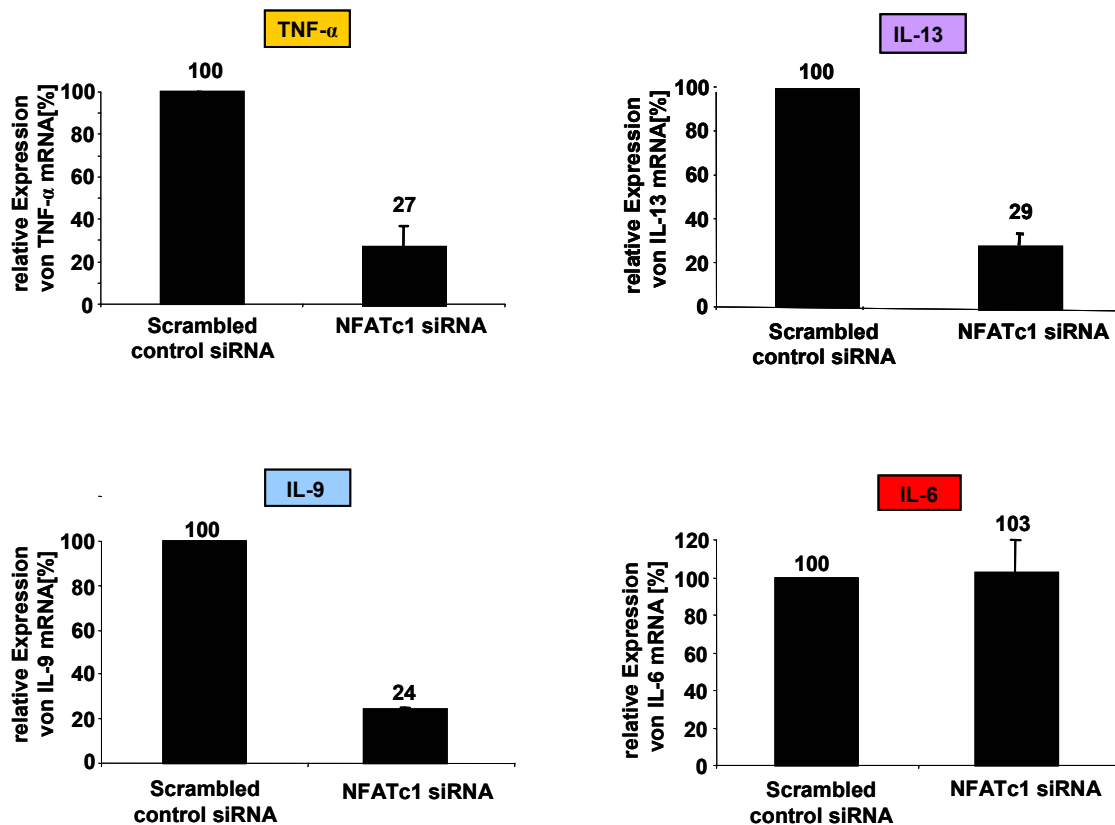
Wie aus Abbildung 17 hervorgeht, besteht in Mastzellen aus Wildtyp- und NFATc2-defizienten Mäusen hinsichtlich der relativen Expression von NFATc1 kein Unterschied.

### **7.1 Rolle von NFATc1 bei der TNF $\alpha$ -, IL-13- und IL-9- Expression**

Wie aus Abbildung 16 a-c hervorgeht, binden sowohl NFATc1 als auch NFATc2 an den TNF $\alpha$ -, IL-13- Promotor und eventuell an den IL-9 Promotor. In Abbildung 11a-c wurde gezeigt, dass das Fehlen von NFATc2 in Mastzellen zwar eine Reduktion der TNF $\alpha$ -, IL-13- und IL-9- Expression bewirkt, dass aber die verbleibende mRNA-Expression dieser Cytokine immer noch sensitiv gegenüber Cyclosporin A ist. Die Folgerung daraus ist, dass weitere NFAT- Faktoren an der Regulation der TNF $\alpha$ -, IL-13- und IL-9- Produktion beteiligt sein könnten. Da das Fehlen von NFATc3 keinen Einfluss auf die Produktion dieser Cytokine hat (Abb. 9) und die ChIP- Analysen eine direkte Bindung von NFATc1 an zumindest den IL-13- und TNF $\alpha$ - Promotor zeigen, stellte der Transkriptionsfaktor NFATc1 ein geeignetes Ziel für weitere Untersuchungen dar. Wie schon erwähnt, sterben NFATc1- defiziente Mäuse sehr früh im Uterus (63, 64). Es ist deshalb nicht möglich, Mastzellen aus dem Knochenmark solcher Mäuse zu generieren. Es wurde deshalb auf die Technik der RNA- Interferenz zurückgegriffen.

### **7.2 „Knock- down“ von NFATc1 durch Einsatz NFATc1 spezifischer siRNA**

Um die Rolle von NFATc1 bei der Expression von TNF $\alpha$ , IL-13 und IL-9 detaillierter zu studieren, wurde in Mastzellen aus Wildtyp- Mäusen siRNA gegen NFATc1 durch Elektroporation eingebracht und danach die relative Expression dieser Cytokin-mRNAs mittels quantitativer- Echtzeit- PCR- Analyse ermittelt (Abbildung 18).

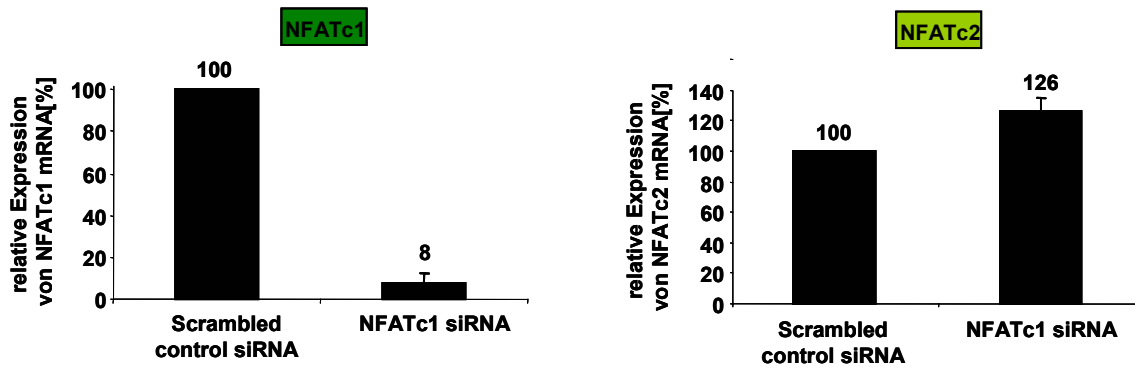


**Abb. 18:** „Knock-down“ von NFATc1 geht mit einer starken Beeinträchtigung der TNF $\alpha$ -, IL-13- und IL-9-Expression einher.

Mastzellen von Wildtyp- Mäusen wurden mit siRNA gegen NFATc1 transfiziert und nach 16h für 1 Stunde (TNF $\alpha$ - mRNA) bzw. 4 Stunden (IL-13-, IL-9- und IL-6- mRNA) mit Ionomycin stimuliert. Die relative Expression wurde durch quantitative Echtzeit- PCR- Analyse ermittelt. Die Expression der mit unspezifischer siRNA transfizierten Mastzellen („scrambled control siRNA“) wurde auf 100% gesetzt.

Wie aus Abbildung 18 hervorgeht, zeigen Mastzellen, die mit siRNA gegen NFATc1 transfiziert wurden, eine stark verminderte Expression von TNF $\alpha$ -, IL13- und IL-9- mRNA. Auf die IL-6- Expression hat NFATc1 keinen Einfluß.

Um auszuschließen, dass die verwendete siRNA gegen NFATc1 auch die Expression von NFATc2 unterdrückt, wurden Mastzellen aus Wildtyp- Mäusen mit NFATc1- spezifischer siRNA transfiziert und die relative Expression von NFATc1 und NFATc2 durch qRT- PCR untersucht (Abbildung 19).



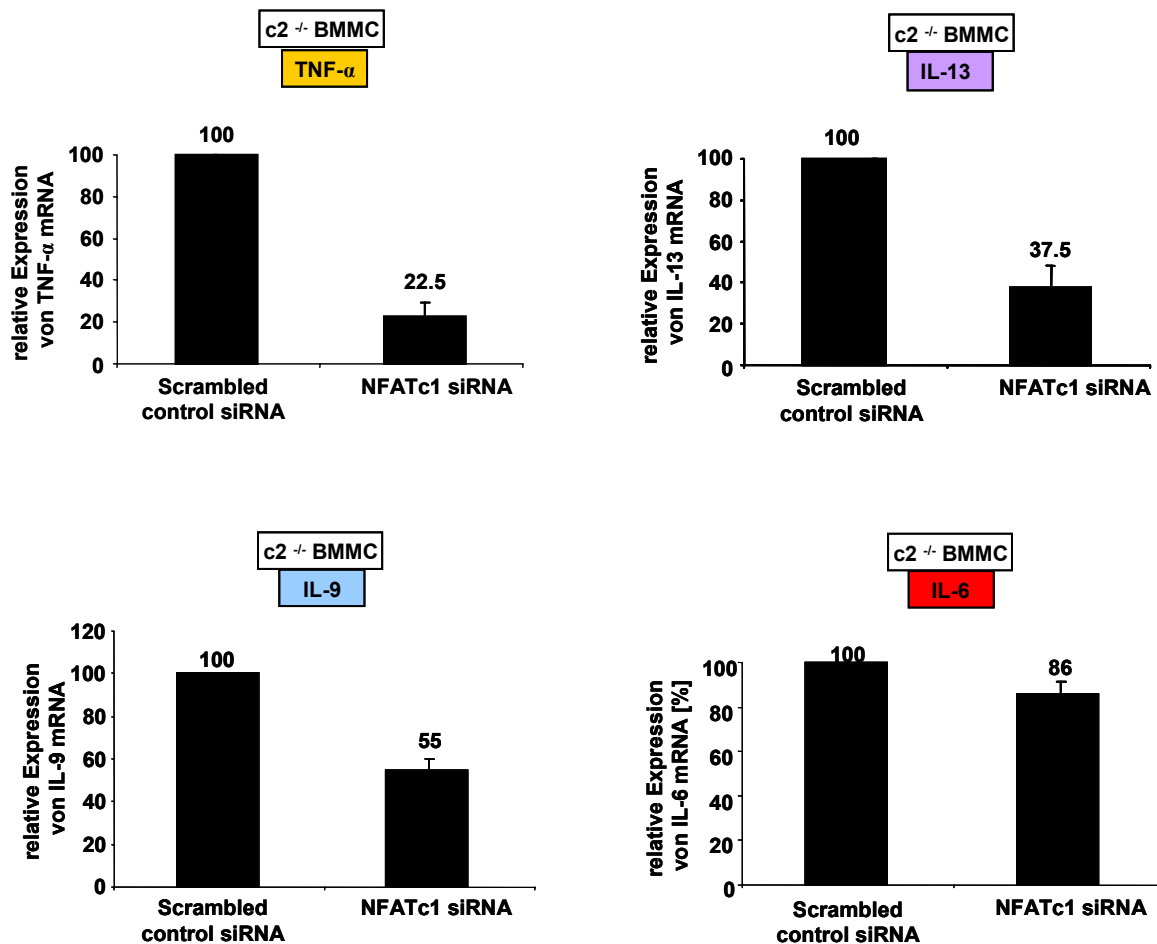
**Abb. 19:** NFATc1- spezifische siRNA reduziert spezifisch die Expression von NFATc1, wohingegen sie auf die Expression von NFATc2 keinen Einfluss nimmt.

Die siRNA wurde mittels Elektroporation in Mastzellen aus Wildtyp- Mäusen eingebracht. Nach 16 Stunden wurden die Zellen für 4 Stunden mit Ionomycin stimuliert und die relative Expression von NFATc1 und NFATc2 durch quantitative Echtzeit- PCR- Analyse ermittelt. Die Expression der mit unspezifischer siRNA („scrambled control siRNA“) transfizierten Mastzellen wurde auf 100% gesetzt.

Wie in Abbildung 19 zu erkennen, reduziert die verwendete siRNA gegen NFATc1 spezifisch die Expression von NFATc1, wohingegen die Expression von NFATc2 nicht beeinflusst wird.

### 7.3 In Mastzellen aus NFATc2- defizienten Mäusen wird die restliche TNF $\alpha$ - und IL-13- Expression durch NFATc1- spezifische siRNA noch weiter reduziert.

Um zu untersuchen, ob die zwar niedrige aber noch messbare Expression von TNF $\alpha$ , IL-13 und IL-9 in Mastzellen aus NFATc2- defizienten Mäusen (siehe Abb. 7a-c) auf NFATc1 zurückzuführen ist, wurden Mastzellen aus NFATc2- defizienten Mäusen mit siRNA gegen NFATc1 transfiziert und die relative Expression der mRNAs für TNF $\alpha$ , IL-13, IL-6 und IL-9 durch qRT- PCR ermittelt (Abb. 20).



**Abb. 20:** NFATc1 ist ebenfalls für die Expression der TNF $\alpha$ - und IL-13- mRNA in NFATc2- defizienten Mastzellen verantwortlich.

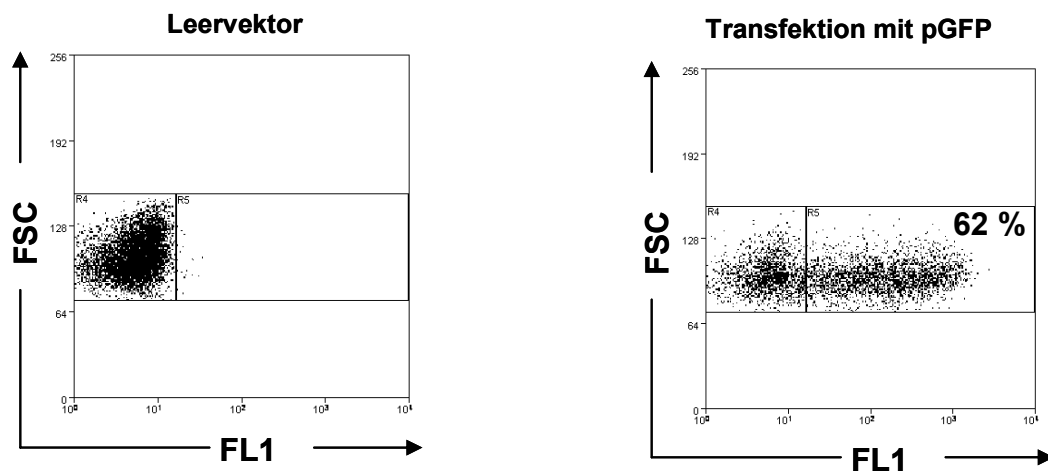
Mastzellen aus NFATc2- defizienten Mäusen wurden mit siRNA gegen NFATc1 transfiziert. Nach 16 Stunden wurden die Zellen für 1 Stunde (TNF $\alpha$ - mRNA) bzw. 4 Stunden (IL-13-, IL-9- und IL-6- mRNA) mit Ionomycin stimuliert und die relative Expression von TNF $\alpha$ -, IL-13-, IL-9- und IL-6- mRNA mittels qRT-PCR ermittelt.

In Abbildung 20 ist zu erkennen, dass nach Transfektion von NFATc2- defizienten Mastzellen mit siRNA gegen NFATc1 die restliche Expression von TNF $\alpha$ -, IL-9- und IL-13- mRNA in diesen Mastzellen weiter gesenkt wird. Die IL-9- Expression ist nur um etwa 50% verringert, was darauf hindeuten könnte, dass außer NFATc1 und NFATc2 noch weitere Transkriptionsfaktoren an der Regulation der IL-9- Expression beteiligt sind. Als Kontrolle wurde die Expression von IL-6 ermittelt. Diese ist von NFATc1 unabhängig.

## 8. Die Überexpression von NFATc1 in NFATc2- defizienten Mastzellen steigert die Expression von $\text{TNF}\alpha$ und IL-13.

Um mehr über eine mögliche Redundanz beider NFAT- Faktoren hinsichtlich der  $\text{TNF}\alpha$ , IL-13- und IL-9- Expression zu erfahren, wurde untersucht, ob eine Überexpression von NFATc1 in NFATc2- defizienten Mastzellen zu einer Steigerung der Expression von  $\text{TNF}\alpha$ , IL-13 und IL-9 führt.

Hierzu wurden Mastzellen aus NFATc2- defizienten Mäusen mit einem Expressionsvektor für die induzierbare Isoform von NFATc1, NFATc1/A genannt, transfiziert (Abb. 22). Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurden in einem Vorversuch Mastzellen mit einem Expressionsvektor für pGFP transfiziert. Mittels FACS- Analyse wurde die Effizienz der Transfektion nach 24 Stunden ermittelt (Abb. 21).



**Abb. 21: Mastzellen lassen sich gut mit Expressionsvektoren transfizieren.**

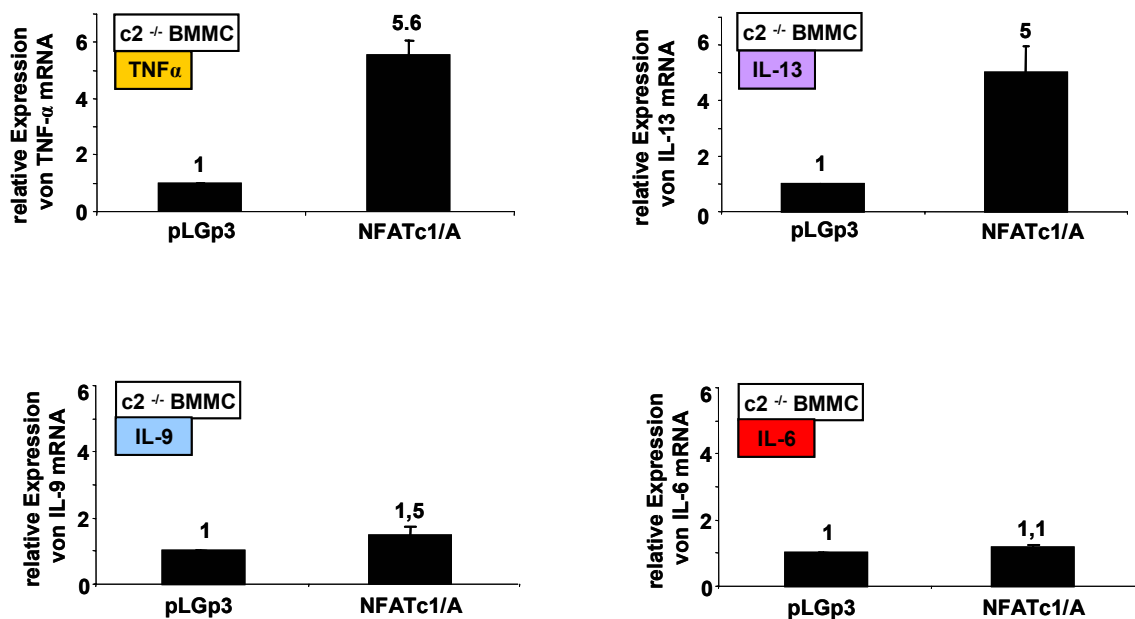
Mastzellen wurden mit dem Expressionsvektor pGFP bzw. dem Leervektor über Elektroporation transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurde die Effizienz der Transfektion durch FACS- Analyse ermittelt.

FSC = „forward scatter“, ein Maß für die Zellgröße.

FL1 = Fluoreszenz des Farbstoffes.

Aus Abbildung 21 geht hervor, dass 62% der in den Transfektionsansatz eingesetzten Mastzellen pGFP („green fluorescent protein“) exprimieren. Aufgrund der guten Transfektionseffizienz wurden Mastzellen aus NFATc2- defizienten

Mäusen mit einem Expressionsvektor für NFATc1/A -eine Isoform von NFATc1, die nach Aktivierung der Zellen produziert wird- transfiziert und über Ionomycin stimuliert. Anschließend wurde die relative Expression über qRT- PCR bestimmt. Als Kontrolle wurde der „leere“ Expressionsvektor pLGp3 verwendet (Abb. 22).



**Abb. 22: Überexpression von NFATc1 führt zu gesteigerter Expression der TNF $\alpha$ - und IL-13- mRNA.**  
 NFATc2- defiziente Mastzellen wurden mit der induzierbaren Isoform NFATc1/A bzw. mit dem Leervektor pLGp3 über Elektroporation transfiziert. Nach einer Ruhephase von 20 Stunden wurden die Zellen für 1 Stunde (TNF $\alpha$ ) bzw. 4 Stunden (IL-13, IL-9, IL-6) mit Ionomycin stimuliert und die relative Expression von TNF $\alpha$ -, IL-13-, IL-9- und IL-6- mRNA mittels qRT- PCR ermittelt.

Wie aus Abbildung 22 hervorgeht, führt die Überexpression von NFATc1/A in Mastzellen aus NFATc2- defizienten Mäusen zu einer gesteigerten Expression von TNF $\alpha$  und IL-13 verglichen mit dem Ansatz, in welchem Mastzellen mit dem „Leervektor“ (pLGp3) transfiziert wurden. Wie erwartet, bewirkt eine Überexpression von NFATc1 keine Steigerung der Expression von IL-6. Die Expression von IL-9 kann durch NFATc1/A nur marginal gesteigert werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass der Transkriptionsfaktor NFATc1, ebenso wie NFATc2, essentiell an der Expression von TNF $\alpha$ , IL-9 und IL-13 beteiligt ist, wohingegen die IL-6- Expression weder von NFATc1 noch NFATc2 beeinflusst



wird. Für die Expression von  $\text{TNF}\alpha$ , IL-13 und IL-9 ist ein hoher Spiegel an NFAT-Faktoren offensichtlich Voraussetzung, unabhängig davon, ob dieser Spiegel von NFATc1 oder NFATc2 oder von einer Kombination beider Faktoren bereitgestellt wird.

## **IV. Diskussion**

Die Mastzelle ist in der Lage, ein breites Spektrum an Cytokinen zu produzieren, welches sich größtenteils mit dem Cytokinspektrum von Th2- Zellen überschneidet. Konservativ betrachtet ist die Mastzelle vermutlich dadurch in der Lage, Th2- Reaktionen lokal zu verstärken. Eine modernere Deutung zielt jedoch eher darauf ab, dass die Mastzelle auf Grund der Vielfalt der von ihr produzierten Cytokine auch essentielle modulatorische bzw. regulatorische Funktionen ausübt (65, 66). Auf diesem Hintergrund basiert das Interesse an zellspezifischen Prozessen, die zur Produktion von Mastzell- Cytokinen beitragen und die auch am Institut für Immunologie seit mehreren Jahren erforscht werden. Hierbei stehen insbesondere Untersuchungen über die Regulation der IL-9- Produktion im Vordergrund, ein Th2- Cytokin, welches auch von aktivierten Mastzellen in großen Mengen gebildet werden kann (67). Dabei zeigte sich, dass die Produktion von IL-9 und IL-13 in Th2- Zellen und Mastzellen völlig unterschiedlich reguliert wird.

Prinzipiell können solche Unterschiede bezüglich der Regulation der Cytokinproduktion verschiedener Zelltypen mehrere Ursachen haben:

- 1) Die Zellen reagieren auf unterschiedliche Signale, da sie sich in der Expression spezifischer Rezeptoren unterscheiden.

Beispielhaft hierfür ist die starke kostimulatorische Wirkung von bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) auf die Produktion von IL-9 und IL-13 von Mastzellen, die den entsprechenden Rezeptor, Toll- like- Rezeptor 4 (TLR4), auf ihrer Oberfläche tragen (68).

- 2) Zelltyp- spezifische Transkriptionsfaktoren sind an der Cytokinexpression beteiligt.

Ebenfalls am Beispiel von IL-9 konnte unlängst von uns gezeigt werden, dass in Mastzellen der Transkriptionsfaktor GATA-1, aktiviert durch die p38 MAP- Kinase, wichtig ist für die Produktion dieses Cytokins (29). GATA-1 wird jedoch nicht in Th2 -Zellen exprimiert, folglich ist die IL-9 Produktion in Th2- Zellen unabhängig von p38 MAP- Kinase, die zwar in beiden Zelltypen vorliegt, offensichtlich jedoch, zumindest teilweise, zellspezifische Aufgaben wahrnimmt.

- 3) Unterschiedliche regulatorische DNA-Sequenzen wirken auf die Cytokingen-Expression.

Mittels „DNase- Hypersensitivity“<sup>3</sup>- und Reporterstudien wurde eine 670 bp umfassende Sequenz im zweiten Intron des IL-4 Gens entdeckt, die einen Mastzell- spezifischen „Enhancer“ als positives regulatorisches Element enthält, an welches Transkriptionsfaktoren der GATA- Familie sowie PU.1 und STAT-Faktoren binden können (69, 70). Durch Arbeiten an unserem Institut<sup>4</sup> konnte in diesem Rahmen ebenfalls gezeigt werden, dass sich die Chromatinstruktur des IL-9 Gens, gemessen durch „DNase- Hypersensitivity“ Analysen, von aktivierten Th2- Zellen und Mastzellen unterscheidet, was auf die unterschiedliche Nutzung regulatorischer DNA- Elemente hindeutet.

- 4) Zelltyp-spezifische Funktionen definierter Transkriptionsfaktoren.

Dieser Punkt lieferte schließlich die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegende Fragestellung. Ausgehend von der Beobachtung, dass Th2- Zellen aus Mäusen mit einer kombinierten Defizienz für die Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NFATc3 eine überschießende Produktion von Cytokinen (IL-4, IL-9, IL-13) aufweisen, andererseits die Produktion dieser Cytokine in Mastzellen aus solchen Tieren stark gehemmt ist, sollte die Bedeutung und Funktion dieser Transkriptionsfaktoren auch in Mastzellen näher untersucht werden.

Zunächst stellte sich heraus, dass lediglich NFATc2, nicht jedoch NFATc3, für die beobachteten Phänomene, d.h. starke Beeinträchtigung der Produktion von IL-9, IL-13 und TNF $\alpha$ , verantwortlich ist. Obwohl NFATc3 in Mastzellen exprimiert wird, kann diesem Faktor -bezüglich der in dieser Arbeit gemessenen Parameter- keine spezifische Funktion in der Mastzelle zugeordnet werden.

Durch Verwendung des Calcineurin- Inhibitors Cyclosporin A zeigte sich, dass die in NFATc2- defizienten Mastzellen schon drastisch reduzierte Produktion der Cytokin-mRNAs noch weiter reduziert werden konnte. Dies legte die Vermutung nahe, dass

---

<sup>3</sup> Diese Technik basiert darauf, dass DNA- Bereiche, an denen Transkription stattfindet oder an die Transkriptionsfaktoren binden, aufgrund reduzierter „Packungsdichte“ der DNA empfindlich sind gegenüber DNaseI. Durch Kombination von DNaseI- und Restriktionsenzym- Behandlung lassen sich solche Bereiche durch „Southern blotting“ nachweisen und kartieren.

<sup>4</sup> Reineke, T. 2002. Untersuchungen zum Methylierungsstatus und zur Chromatinstruktur des IL-9-Promoters in murinen Mastzellen und T-Helfer-Zellen. Inauguraldissertation, Institut für Immunologie, Mainz.

ein weiteres, ebenfalls in Mastzellen exprimiertes Mitglied der NFAT- Familie, NFATc1, an der Expression dieser Cytokingene mitwirkt. Tatsächlich zeigten Chromatin- Immunpräzipitations - Experimente, dass sowohl NFATc2 als auch NFATc1 nach Aktivierung der Zellen an die entsprechenden Promotoren binden. Als wertvolle interne Kontrolle für dieses und alle anderen Experimente erwies sich die **Expression von IL-6** als gänzlich unabhängig von NFAT- Faktoren. IL-6 gehört zur großen Gruppe von hauptsächlich proinflammatorisch wirksamen Cytokinen, deren Expression in besonderem Maße von einer weiteren Familie von Transkriptionsfaktoren abhängt, den NF- $\kappa$ B Faktoren (71, 72). Interessanterweise weisen NFAT und NF- $\kappa$ B Faktoren gemeinsame Strukturmerkmale im Bereich ihrer etwa 300 Aminosäuren umfassenden DNA- Bindedomänen auf, der sogenannten „Rel similarity domain“ (RSD), was sie zu Mitgliedern einer gemeinsamen Überfamilie macht (73). In einzelnen Fällen wurde berichtet, dass NFAT und NF- $\kappa$ B Faktoren sogar gleiche Bindungsstellen besetzen können; in solchen Fällen binden NFAT- Faktoren als Dimere (74-76). Ungeachtet ihrer Verwandtschaft unterscheiden sich NFAT und NF- $\kappa$ B Faktoren jedoch bezüglich ihrer Aktivierung. Während (bis auf NFAT5; siehe Einleitung) Calcium/Calcineurin- Komplexe durch Dephosphorylierung von NFAT zu dessen Aktivierung beitragen, ist für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B ein großer Kinasekomplex notwendig, der durch Phosphorylierung inhibitorischer (I- $\kappa$ B) Untereinheiten deren Abbau im Proteasom einleitet und somit aktive NF- $\kappa$ B Faktoren im Cytosol freisetzt (77).

Im Gegensatz zu IL-6 stellte sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit heraus, dass die **Expression von TNF $\alpha$** , welches wie IL-6 auch ein proinflammatorisches Cytokin ist, stark von NFATc1 und NFATc2 reguliert wird. Frühere Arbeiten belegen zusätzlich eine wichtige Funktion für NF- $\kappa$ B Faktoren für die TNF $\alpha$ - Expression, so dass beide Familien der Transkriptionsfaktoren für die Produktion von TNF $\alpha$  essentiell sind und über eigene Bindungsstellen im Gen verfügen (76, 78, 79). Bezüglich der **Expression von IL-13** konnte bislang eine Beteiligung von NF- $\kappa$ B nicht zweifelsfrei bewiesen werden. Die starke kostimulatorische Wirkung von bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) auf die IL-13 Produktion aktivierter Mastzellen legte zunächst eine Mitwirkung von NF- $\kappa$ B nahe, ein Hemmstoff der NF- $\kappa$ B Aktivierung beeinträchtigte jedoch die Expression des Cytokins nur marginal (68). In Einklang mit kürzlich publizierten Daten kann jedoch davon ausgegangen werden, dass NFAT- Faktoren essentiell für die Produktion von Mastzell- IL-13 sind (50).

Eine frühere Arbeit zeigte, dass die **Expression von IL-9** in Mastzellen stark von der Aktivierung von NF- $\kappa$ B Faktoren abhängt und konnte 3 Bindestellen für NF- $\kappa$ B im Promoterbereich des Genes nachweisen (68). Computeranalysen zeigen, dass sich zusätzliche potentielle Bindestellen für NFAT- Faktoren im Bereich des IL-9-Promoters vorhersagen lassen, erlauben jedoch keinen Rückschluss auf deren tatsächliche Funktion. Die IL-9- Produktion erwies sich in NFATc2- defizienten BMMC als stark beeinträchtigt, ebenso führten der siRNA- vermittelte „knock- down“ von NFATc1 und NFATc2 zu einer markanten Reduktion der IL-9- Expression. Im Gegensatz dazu lies sich im CHIP eine Bindung beider NFAT- Faktoren im Bereich des proximalen IL-9- Promoters nicht zweifelsfrei nachweisen. Möglicherweise binden also NFAT- Faktoren außerhalb des untersuchten proximalen Promoterbereichs oder die Wirkung der NFAT- Faktoren auf die Expression des IL-9- Gens ist indirekter Natur, durch Beeinflussung der Produktion von anderen Cytokinen, die positiv auf die IL-9- Bildung zurückwirken. In diesem Zusammenhang wurde bereits gezeigt, dass IL-1, IL-10 und SCF, welche alle von aktivierten Mastzellen gebildet werden können, positiv auf die Expression von IL-9 wirken (80). Durch Überexpression der NFAT- Isoform c1/A konnte, im Gegensatz zu IL-13 und TNF $\alpha$ , die Expression der IL-9- mRNA in NFATc2- defizienten BMMC kaum gesteigert werden. Dies könnte in erster Linie dafür sprechen, dass die IL-9- Expression nicht direkt von NFAT- Faktoren abhängt, da in diesen Experimenten die Produktion der endogenen IL-9- mRNA gemessen wurde, was somit die Regulation des ganzen Genes widerspiegelt. In den Überexpressionsexperimenten wurden die Zellen jedoch nur wenige Stunden stimuliert, somit könnte diese Zeit für die Produktion weiterer endogener Faktoren mit positivem autokrinen Einfluß auf die Bildung von IL-9 nicht ausreichend gewesen sein. Grundsätzlich führt die Überexpression von NFAT- Faktoren zur schnellen Apoptose der betreffenden Zellen. Einzige bislang bekannte Ausnahme hiervon bildet NFATc1/A, eine Isoform, die nach Aktivierung der Zellen produziert wird und auf welche bei den Überexpressionsexperimenten im Rahmen dieser Arbeit zurückgegriffen werden musste (81). Nicht ausgeschlossen werden kann jedoch, dass NFATc1/A nicht in der Lage ist, an den IL-9- Promoter zu binden. Prinzipiell weisen zwar alle NFAT- Faktoren stark konservierte DNA- Bindedomänen auf, wodurch sie an eine gemeinsame DNA- Kern -Sequenz (GGAAA) binden können. Es mehren sich aber

bislang unpublizierte Hinweise, dass einzelne NFAT- Familienmitglieder bestimmte Sequenzvariationen bevorzugen (E. Serfling, persönliche Mitteilung).

Zusammenfassend zeigte sich also, dass in aktivierten Mastzellen die Produktion von  $\text{TNF}\alpha$  und IL-13 zweifelsfrei von NFATc1 und NFATc2 direkt reguliert wird, der direkte Einfluss dieser Faktoren auf die IL-9- Expression bleibt jedoch unklar.

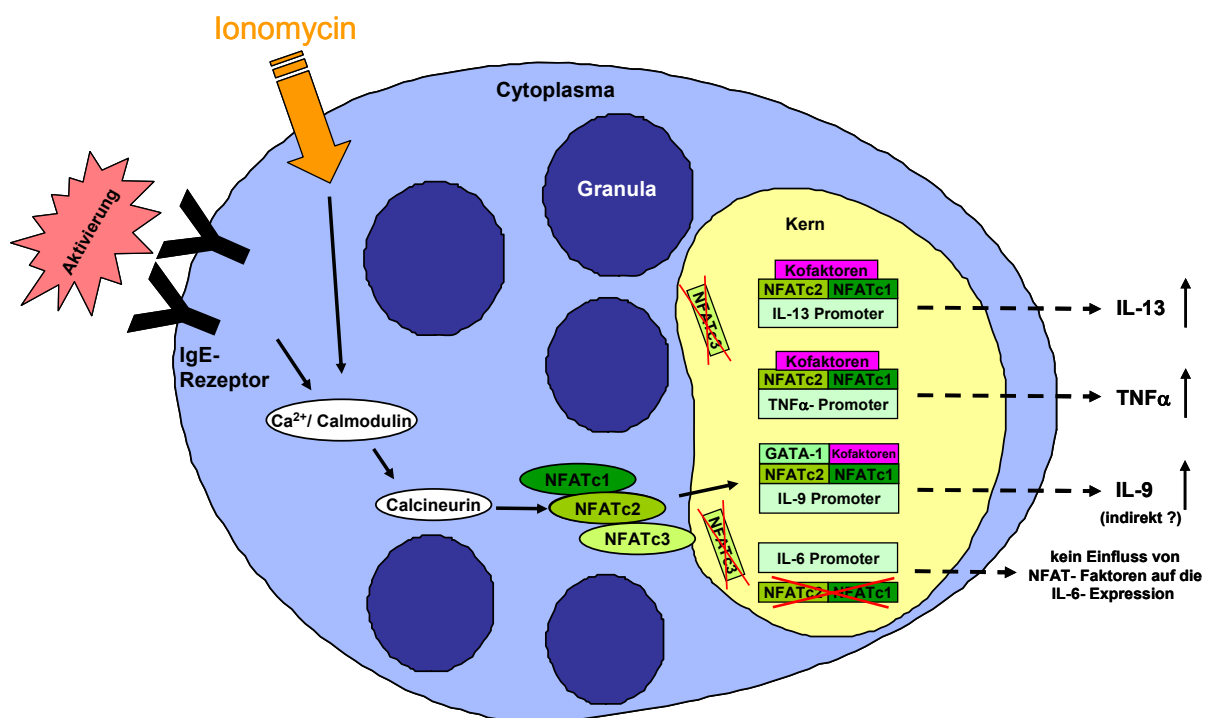
Die Frage, warum sich die Defizienz von NFAT- Faktoren in Mastzellen und Th2- Zellen bezüglich der Expression der Cytokine IL-9 und IL-13 unterschiedlich auswirkt, kann bislang nur spekulativ beantwortet werden. Wahrscheinlich kann davon ausgegangen werden, dass Kooperationspartner der NFAT- Moleküle für die beobachtete Zelltyp- spezifische Wirkung von NFAT verantwortlich sind. Die Entdeckung der NFAT- Faktoren zeigte zunächst, dass ein Komplex aus NFATc2 und dem Transkriptionsfaktor AP-1<sup>5</sup> transaktivierend auf den IL-2 Promoter in T- Zellen wirkt. Nach heutigem Wissen ist AP-1 ein wichtiger Kooperationspartner für NFAT, was sich oft auch in einer zusammengesetzten Bindungssequenz auf Ebene der DNA darstellt, in welcher die Kernsequenzen für NFAT und AP-1 direkt benachbart sind (GGAAAxxxxTGAxTCA). Derart zusammengesetzte Bindungsstellen finden sich in einer Vielzahl von Genen, welche bekanntermaßen NFAT- abhängig exprimiert werden (Serfling et al. „NFAT transcription factors in control of peripheral T cell tolerance“. *Eur J Immunol*, im Druck). AP-1 ist jedoch nicht der einzig bekannte Kooperationspartner der NFAT- Faktoren (siehe Tabelle Einleitung). Weitere Faktoren, die wie AP-1 zur Familie der „basic region- leucine zipper“- Proteine gehören und mit NFAT- Proteinen interagieren können sind c-Maf, ICER und p21SNFT. Während c-Maf/NFAT- Komplexe die Aktivität des IL-4- Promoters verstärken (82), wirken Komplexe aus ICER, p21SNFT und FoxP3 mit NFAT als Repressoren der Transkription (83-87). Weitere Kooperationspartner für NFAT sind Egr- und GATA- Transkriptionsfaktoren, welche die Transkription einiger Gene zusammen mit NFAT positiv beeinflussen (50, 88-91). Abhängig vom jeweiligen Bindungs- Kooperationspartner können NFAT- Faktoren somit sowohl transaktivierend als auch hemmend auf die Genexpression wirken. Neueste Untersuchungen zeigen, dass NFAT auch ohne Partner an Promoteren von Zielgenen binden kann. Eine wichtige Beobachtung in diesem Zusammenhang war, dass dadurch Gene angeschaltet werden, die für die Induktion von Anergie wichtig

---

<sup>5</sup> AP-1 liegt konstitutiv im Zellkern vor, entweder als Homodimer des Faktors Jun oder als Heterodimer aus Jun und Fos. Die Aktivierung von AP-1 erfolgt durch Phosphorylierung.

sind. Anergie, als wichtiger Bestandteil der peripheren Toleranz, bezeichnet die funktionelle Ruhigstellung von T-Zellen, ausgelöst durch fehlende kostimulatorische Signale während der Aktivierung über den T- Zell- Rezeptor oder durch Behandlung von T- Zellen mit dem Calcium- Ionophor Ionomycin.

Zusammengenommen muss also davon ausgegangen werden, dass zellspezifische Aktivitäten von NFAT- Faktoren durch das Vorhandensein (oder Fehlen) potentieller Kooperationspartner in besonderem Maße beeinflusst werden können. Dies könnte die Ursache der dieser Arbeit zugrunde liegenden Beobachtung sein, dass die Expression der Cytokine IL-9 und IL-13 in NFAT- defizienten Th2- Zellen stark erhöht, in entsprechenden Mastzellen jedoch extrem erniedrigt ist.



**Abb. 23: Zusammenfassende Übersicht der Funktionen von NFAT- Faktoren auf die Expression der in dieser Arbeit untersuchten Cytokine.**

Die Expression von IL-13 und TNF $\alpha$  wird sowohl von NFATc1 als auch von NFATc2 kontrolliert. Im Bereich des proximalen IL-9- Promoters konnte eine Bindung von NFAT- Faktoren nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden. Der Einfluss von NFAT- Faktoren auf die Expression des IL-9- Gens könnte somit auch indirekter Natur sein. Denkbar ist die NFAT- abhängige Produktion von Mediatoren, die ihrerseits die IL-9- Expression befördern. Für die zellspezifischen Phänomene der Expressionsregulation (verglichen mit Th2- Zellen) könnten zelltyp- spezifische Kofaktoren für NFAT verantwortlich sein. Bezogen auf die IL-9- Expression ist der Transkriptionsfaktor GATA-1 ein möglicher Kandidat. Die Expression von IL-6 zeigte sich als gänzlich unabhängig von NFAT- Faktoren. NFATc3 hat keine Funktion hinsichtlich der Expression von TNF $\alpha$ , IL-13, IL-9 und IL-6.

## **V. Zusammenfassung**

Die Mastzelle hat als Auslöser bzw. Verstärker von Entzündungsreaktionen vielfältigen Einfluss auf Immunreaktionen. Durch die Produktion entzündungsfördernder Cytokine wie  $\text{TNF}\alpha$  und IL-6 ist sie wichtig für die Initiation schneller Entzündungsreaktionen im Rahmen der angeborenen Immunantwort, während Cytokine wie IL-9 und IL-13 an der Entstehung und Aufrechterhaltung chronischer Entzündungen beteiligt sind. Diese sind gefürchtete Konsequenzen von Erkrankungen des atopischen Formenkreises.

Die Expression von NFAT- Faktoren („nuclear factor of activated T cells“) wurde in einer Vielzahl von Zellen des Immunsystems, so auch in T- Zellen und Mastzellen, beschrieben. Durch Untersuchungen von Th2- Zellen und Mastzellen aus Mäusen, welche für die Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NFATc3 defizient waren, zeigte sich zunächst, dass das Fehlen dieser Faktoren in Th2- Zellen zu einer gesteigerten IL-9- und IL-13- Produktion führt. Im Gegensatz dazu war die Produktion dieser Cytokine in Mastzellen aus NFATc2/c3- defizienten Mäusen stark beeinträchtigt. Ziel dieser Arbeit bestand deshalb darin, die Bedeutung von NFAT- Faktoren für die Expression von IL-9 und IL-13, sowie von  $\text{TNF}\alpha$  und IL-6 in Mastzellen zu untersuchen. Es konnte anhand von Chromatinimmunpräzipitationen und siRNA- Experimenten gezeigt werden, dass die Faktoren NFATc1 und NFATc2 -nicht jedoch NFATc3- essentiell an der Regulation der Expression von  $\text{TNF}\alpha$  und IL-13 beteiligt sind, wohingegen sie keinerlei Einfluss auf die IL-6- Expression ausüben.

Die Bedeutung von NFAT- Faktoren für die IL-9- Expression in Mastzellen konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht eindeutig beantwortet werden. Zwar erwies sich die IL-9- Produktion in NFATc2- defizienten Mastzellen als stark beeinträchtigt, ebenso führten der siRNA- vermittelte „Knock- down“ von NFATc1 und NFATc2 zu einer Reduktion der IL-9- Expression, jedoch konnte in Chromatinimmunpräzipitationen die Bindung beider NFAT- Faktoren nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden. Möglicherweise ist der Einfluss der NFAT- Faktoren auf die Expression des IL-9- Gens indirekter Natur, indem NFAT- abhängige Mediatoren produziert werden, welche ihrerseits positiv auf die IL-9- Produktion zurückwirken.

Für die beobachtete unterschiedliche Expressionsregulation von IL-9 und IL-13 in Th2- Zellen und Mastzellen könnten zelltyp- spezifische Kooperationspartner der NFAT- Moleküle verantwortlich sein.



## VI. Literatur

1. Crivellato, E., C. Beltrami, F. Mallardi, and D. Ribatti. 2003. Paul Ehrlich's doctoral thesis: a milestone in the study of mast cells. *Br.J.Haematol.* 123:19-21.
2. Chen, C. C., M. A. Grimaldeston, M. Tsai, I. L. Weissman, and S. J. Galli. 2005. Identification of mast cell progenitors in adult mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102:11408-11413.
3. Rodewald, H. R., M. Dessing, A. M. Dvorak, and S. J. Galli. 1996. Identification of a committed precursor for the mast cell lineage. *Science* 271:818-822.
4. Razin, E., R. L. Stevens, F. Akiyama, K. Schmid, and K. F. Austen. 1982. Culture from mouse bone marrow of a subclass of mast cells possessing a distinct chondroitin sulfate proteoglycan with glycosaminoglycans rich in N-acetylgalactosamine-4,6-disulfate. *J.Biol.Chem.* 257:7229-7236.
5. Ihle, J. N., J. Keller, S. Oroszlan, L. E. Henderson, T. D. Copeland, F. Fitch, M. B. Prystowsky, E. Goldwasser, J. W. Schrader, E. Palaszynski, M. Dy, and B. Lebel. 1983. Biologic properties of homogeneous interleukin 3. I. Demonstration of WEHI-3 growth factor activity, mast cell growth factor activity, p cell-stimulating factor activity, colony-stimulating factor activity, and histamine-producing cell-stimulating factor activity. *J.Immunol.* 131:282-287.
6. Austen, K. F. and J. A. Boyce. 2001. Mast cell lineage development and phenotypic regulation. *Leuk.Res.* 25:511-518.
7. Li, L. and S. A. Krilis. 1999. Mast-cell growth and differentiation. *Allergy* 54:306-312.
8. Stassen, M., L. Hultner, and E. Schmitt. 2002. Classical and alternative pathways of mast cell activation. *Crit Rev.Immunol.* 22:115-140.
9. Metcalfe, D. D., D. Baram, and Y. A. Mekori. 1997. Mast cells. *Physiol.Rev.* 77:1033-1079.
10. Tsai, M., J. Wedemeyer, S. Ganiatsas, S. Y. Tam, L. I. Zon, and S. J. Galli. 2000. In vivo immunological function of mast cells derived from embryonic stem cells: an approach for the rapid analysis of even embryonic lethal mutations in adult mice in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97:9186-9190.
11. Bradding, P., Y. Okayama, P. H. Howarth, M. K. Church, and S. T. Holgate. 1995. Heterogeneity of human mast cells based on cytokine content. *J.Immunol.* 155:297-307.
12. Biedermann, T., M. Kneilling, R. Mailhammer, K. Maier, C. A. Sander, G. Kollias, S. L. Kunkel, L. Hultner, and M. Rocken. 2000. Mast cells control neutrophil recruitment during T cell-mediated delayed-type hypersensitivity reactions through tumor necrosis factor and macrophage inflammatory protein 2. *J.Exp.Med.* 192:1441-1452.
13. Galli, S. J., J. R. Gordon, and B. K. Wershil. 1991. Cytokine production by mast cells and basophils. *Curr.Opin.Immunol.* 3:865-872.
14. Kinet, J. P. 1999. The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology. *Annu.Rev.Immunol.* 17:931-972.
15. Novak, N., S. Kraft, and T. Bieber. 2001. IgE receptors. *Curr.Opin.Immunol.* 13:721-726.
16. Kaliner, M. A. M. D. D. 1992. The mast cell in health and disease. Marcel Dekker, New York, Basel, Hong Kong.
17. Renaud, J. C. 2001. New insights into the role of cytokines in asthma. *J.Clin.Pathol.* 54:577-589.

18. Temann, U. A., G. P. Geba, J. A. Rankin, and R. A. Flavell. 1998. Expression of interleukin 9 in the lungs of transgenic mice causes airway inflammation, mast cell hyperplasia, and bronchial hyperresponsiveness. *J.Exp.Med.* 188:1307-1320.
19. Wills-Karp, M., J. Luyimbazi, X. Xu, B. Schofield, T. Y. Neben, C. L. Karp, and D. D. Donaldson. 1998. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science* 282:2258-2261.
20. Williams, C. M. and S. J. Galli. 2000. Mast cells can amplify airway reactivity and features of chronic inflammation in an asthma model in mice. *J.Exp.Med.* 192:455-462.
21. Taube, C., X. Wei, C. H. Swasey, A. Joetham, S. Zarini, T. Lively, K. Takeda, J. Loader, N. Miyahara, T. Kodama, L. D. Shultz, D. D. Donaldson, E. H. Hamelmann, A. Dakhama, and E. W. Gelfand. 2004. Mast cells, Fc epsilon RI, and IL-13 are required for development of airway hyperresponsiveness after aerosolized allergen exposure in the absence of adjuvant. *J.Immunol.* 172:6398-6406.
22. Taube, C., A. Dakhama, and E. W. Gelfand. 2004. Insights into the pathogenesis of asthma utilizing murine models. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 135:173-186.
23. Maizels, R. M. and M. J. Holland. 1998. Parasite immunology: pathways for expelling intestinal helminths. *Curr.Biol.* 8:R711-R714.
24. Stassen, M., L. Hultner, C. Muller, and E. Schmitt. 2002. Mast cells and inflammation. *Arch.Immunol.Ther.Exp (Warsz.)* 50:179-185.
25. Secor, V. H., W. E. Secor, C. A. Gutekunst, and M. A. Brown. 2000. Mast cells are essential for early onset and severe disease in a murine model of multiple sclerosis. *J.Exp.Med.* 191:813-822.
26. Huels, C., T. Germann, S. Goedert, P. Hoehn, S. Koelsch, L. Hultner, N. Palm, E. Rude, and E. Schmitt. 1995. Co-activation of naive CD4+ T cells and bone marrow-derived mast cells results in the development of Th2 cells. *Int.Immunol.* 7:525-532.
27. Gauchat, J. F., S. Henchoz, G. Mazzei, J. P. Aubry, T. Brunner, H. Blasey, P. Life, D. Talabot, L. Flores-Romo, J. Thompson, and . 1993. Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils. *Nature* 365:340-343.
28. Pawankar. 2001. Mast cells as orchestrators of the allergic reaction: the IgE-IgE receptor network.
29. Stassen, M., M. Klein, M. Becker, T. Bopp, C. Neudorfl, C. Richter, V. Heib, S. Klein-Hessling, E. Serfling, H. Schild, and E. Schmitt. 2006. p38 MAP kinase drives the expression of mast cell-derived IL-9 via activation of the transcription factor GATA-1. *Mol.Immunol.* Apr. 29 (Epub ahead of print).
30. Shaw, J. P., P. J. Utz, D. B. Durand, J. J. Toole, E. A. Emmel, and G. R. Crabtree. 1988. Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science* 241:202-205.
31. Emmel, E. A., C. L. Verweij, D. B. Durand, K. M. Higgins, E. Lacy, and G. R. Crabtree. 1989. Cyclosporin A specifically inhibits function of nuclear proteins involved in T cell activation. *Science* 246:1617-1620.
32. Randak, C., T. Brabletz, M. Hergenrother, I. Sobotta, and E. Serfling. 1990. 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.* 9:2529-2536.
33. Mattila, P. S., K. S. Ullman, S. Fiering, E. A. Emmel, M. McCutcheon, G. R. Crabtree, and L. A. Herzenberg. 1990. The actions of cyclosporin A and FK506 suggest a novel step in the activation of T lymphocytes. *EMBO J.* 9:4425-4433.

34. Brabletz, T., I. Pietrowski, and E. Serfling. 1991. 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.* 19:61-67.
35. Liu, J. 1993. FK506 and cyclosporin, molecular probes for studying intracellular signal transduction. *Immunol.Today* 14:290-295.
36. Solymar, D. C., S. Agarwal, C. H. Bassing, F. W. Alt, and A. Rao. 2002. A 3' enhancer in the IL-4 gene regulates cytokine production by Th2 cells and mast cells. *Immunity.* 17:41-50.
37. Ranger, A. M., M. R. Hodge, E. M. Gravallesse, M. Oukka, L. Davidson, F. W. Alt, F. C. de la Brousse, T. Hoey, M. Grusby, and L. H. Glimcher. 1998. Delayed lymphoid repopulation with defects in IL-4-driven responses produced by inactivation of NF-ATc. *Immunity.* 8:125-134.
38. Ranger, A. M., M. Oukka, J. Rengarajan, and L. H. Glimcher. 1998. Inhibitory function of two NFAT family members in lymphoid homeostasis and Th2 development. *Immunity.* 9:627-635.
39. Rengarajan, J., B. Tang, and L. H. Glimcher. 2002. NFATc2 and NFATc3 regulate T(H)2 differentiation and modulate TCR-responsiveness of naive T(H) cells. *Nat.Immunol.* 3:48-54.
40. Macian, F. 2005. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat.Rev.Immunol.* 5:472-484.
41. Klee, C. B., H. Ren, and X. Wang. 1998. Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J.Biol.Chem.* 273:13367-13370.
42. Clipstone, N. A. and G. R. Crabtree. 1992. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 357:695-697.
43. Serfling, E., F. Berberich-Siebelt, S. Chuvpilo, E. Jankevics, S. Klein-Hessling, T. Twardzik, and A. Avots. 2000. The role of NF-AT transcription factors in T cell activation and differentiation. *Biochim.Biophys.Acta* 1498:1-18.
44. Crabtree, G. R. and E. N. Olson. 2002. NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* 109 Suppl:S67-S79.
45. Hogan, P. G., L. Chen, J. Nardone, and A. Rao. 2003. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* 17:2205-2232.
46. Coghlan, V. M., B. A. Perrino, M. Howard, L. K. Langeberg, J. B. Hicks, W. M. Gallatin, and J. D. Scott. 1995. Association of protein kinase A and protein phosphatase 2B with a common anchoring protein. *Science* 267:108-111.
47. Sun, L., H. D. Youn, C. Loh, M. Stolow, W. He, and J. O. Liu. 1998. Cabin 1, a negative regulator for calcineurin signaling in T lymphocytes. *Immunity.* 8:703-711.
48. Klauck, T. M., M. C. Faux, K. Labudda, L. K. Langeberg, S. Jaken, and J. D. Scott. 1996. Coordination of three signaling enzymes by AKAP79, a mammalian scaffold protein. *Science* 271:1589-1592.
49. Esau, C., M. Boes, H. D. Youn, L. Tatterson, J. O. Liu, and J. Chen. 2001. Deletion of calcineurin and myocyte enhancer factor 2 (MEF2) binding domain of Cabin1 results in enhanced cytokine gene expression in T cells. *J.Exp.Med.* 194:1449-1459.
50. Monticelli, S., D. C. Solymar, and A. Rao. 2004. Role of NFAT proteins in IL13 gene transcription in mast cells. *J Biol.Chem.* 279:36210-36218.

51. Elbashir, S. M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, and T. Tuschl. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411:494-498.
52. Elbashir, S. M., W. Lendeckel, and T. Tuschl. 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15:188-200.
53. McManus, M. T. and P. A. Sharp. 2002. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat.Rev.Genet.* 3:737-747.
54. Dillin, A. 2003. The specifics of small interfering RNA specificity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100:6289-6291.
55. Tuschl, T. 2002. Expanding small RNA interference. *Nat.Biotechnol.* 20:446-448.
56. Stassen, M., C. Muller, C. Richter, C. Neudorfl, L. Hultner, S. Bhakdi, I. Walev, and E. Schmitt. 2003. The streptococcal exotoxin streptolysin O activates mast cells to produce tumor necrosis factor alpha by p38 mitogen-activated protein kinase- and protein kinase C-dependent pathways. *Infect.Immun.* 71:6171-6177.
57. Suhasini, M., C. D. Reddy, E. P. Reddy, J. A. DiDonato, and R. B. Pilz. 1997. cAMP-induced NF-kappaB (p50/relB) binding to a c-myb intronic enhancer correlates with c-myb up-regulation and inhibition of erythroleukemia cell differentiation. *Oncogene* 15:1859-1870.
58. Hauber, H. P., C. Bergeron, and Q. Hamid. 2004. IL-9 in allergic inflammation. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 134:79-87.
59. Gordon, J. R. and S. J. Galli. 1990. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-alpha/cachectin. *Nature* 346:274-276.
60. Echtenacher, B., D. N. Mannel, and L. Hultner. 1996. Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature* 381:75-77.
61. Malaviya, R., T. Ikeda, E. Ross, and S. N. Abraham. 1996. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature* 381:77-80.
62. Gordon, J. R. and S. J. Galli. 1991. Release of both preformed and newly synthesized tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)/cachectin by mouse mast cells stimulated via the Fc epsilon RI. A mechanism for the sustained action of mast cell-derived TNF-alpha during IgE-dependent biological responses. *J.Exp.Med.* 174:103-107.
63. de la Pompa, J. L., L. A. Timmerman, H. Takimoto, H. Yoshida, A. J. Elia, E. Samper, J. Potter, A. Wakeham, L. Marengere, B. L. Langille, G. R. Crabtree, and T. W. Mak. 1998. Role of the NF-ATc transcription factor in morphogenesis of cardiac valves and septum. *Nature* 392:182-186.
64. Ranger, A. M., M. J. Grusby, M. R. Hodge, E. M. Gravallesse, F. C. de la Brousse, T. Hoey, C. Micanin, H. S. Baldwin, and L. H. Glimcher. 1998. The transcription factor NF-ATc is essential for cardiac valve formation. *Nature* 392:186-190.
65. Stassen, M., L. Hultner, and E. Schmitt. 2002. Classical and alternative pathways of mast cell activation. *Crit Rev.Immunol.* 22:115-140.
66. Galli, S. J., S. Nakae, and M. Tsai. 2005. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat.Immunol.* 6:135-142.
67. Hultner, L., S. Kolsch, M. Stassen, U. Kaspers, J. P. Kremer, R. Mailhammer, J. Moeller, H. Broszeit, and E. Schmitt. 2000. In Activated Mast Cells, IL-1 Up-Regulates the Production of Several Th2-Related Cytokines Including IL-9. *J Immunol* 164:5556-5563.

68. Stassen, M., C. Muller, M. Arnold, L. Hultner, S. Klein-Hessling, C. Neudorfl, T. Reineke, E. Serfling, and E. Schmitt. 2001. IL-9 and IL-13 production by activated mast cells is strongly enhanced in the presence of lipopolysaccharide: NF-kappa B is decisively involved in the expression of IL-9. *J.Immunol.* 166:4391-4398.
69. Henkel, G., D. L. Weiss, R. McCoy, T. Deloughery, D. Tara, and M. A. Brown. 1992. A DNase I-hypersensitive site in the second intron of the murine IL-4 gene defines a mast cell-specific enhancer. *J.Immunol.* 149:3239-3246.
70. Hural, J. A., M. Kwan, G. Henkel, M. B. Hock, and M. A. Brown. 2000. An intron transcriptional enhancer element regulates IL-4 gene locus accessibility in mast cells. *J.Immunol.* 165:3239-3249.
71. Zhu, Z., W. Tang, A. Ray, Y. Wu, O. Einarsson, M. L. Landry, J. Gwaltney, Jr., and J. A. Elias. 1996. Rhinovirus stimulation of interleukin-6 in vivo and in vitro. Evidence for nuclear factor kappa B-dependent transcriptional activation. *J.Clin.Invest* 97:421-430.
72. Marquardt, D. L. and L. L. Walker. 2000. Dependence of mast cell IgE-mediated cytokine production on nuclear factor-kappaB activity. *J Allergy Clin Immunol* 105:500-505.
73. Serfling, E., F. Berberich-Siebelt, A. Avots, S. Chuvpilo, S. Klein-Hessling, M. K. Jha, E. Kondo, P. Pagel, J. Schulze-Luehrmann, and A. Palmetshofer. 2004. NFAT and NF-kappaB factors-the distant relatives. *Int.J Biochem.Cell Biol.* 36:1166-1170.
74. Jin, L., P. Sliz, L. Chen, F. Macian, A. Rao, P. G. Hogan, and S. C. Harrison. 2003. An asymmetric NFAT1 dimer on a pseudo-palindromic kappa B-like DNA site. *Nat.Struct.Biol.* 10:807-811.
75. Giffin, M. J., J. C. Stroud, D. L. Bates, K. D. von Koenig, J. Hardin, and L. Chen. 2003. Structure of NFAT1 bound as a dimer to the HIV-1 LTR kappa B element. *Nat.Struct.Biol.* 10:800-806.
76. Macian, F., C. Garcia-Rodriguez, and A. Rao. 2000. Gene expression elicited by NFAT in the presence or absence of cooperative recruitment of Fos and Jun. *EMBO J.* 19:4783-4795.
77. Ghosh, S. and M. Karin. 2002. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 109 Suppl:S81-S96.
78. Pelletier, C., N. Varin-Blank, J. Rivera, B. Iannascoli, F. Marchand, B. David, A. Weyer, and U. Blank. 1998. Fc epsilonRI-mediated induction of TNF-alpha gene expression in the RBL-2H3 mast cell line: regulation by a novel NF-kappaB-like nuclear binding complex. *J.Immunol.* 161:4768-4776.
79. Esensten, J. H., A. V. Tsytsykova, C. Lopez-Rodriguez, F. A. Ligeiro, A. Rao, and A. E. Goldfeld. 2005. NFAT5 binds to the TNF promoter distinctly from NFATp, c, 3 and 4, and activates TNF transcription during hypertonic stress alone. *Nucleic Acids Res.* 33:3845-3854.
80. Stassen, M., M. Arnold, L. Hultner, C. Muller, C. Neudorfl, T. Reineke, and E. Schmitt. 2000. Murine bone marrow-derived mast cells as potent producers of IL-9: costimulatory function of IL-10 and kit ligand in the presence of IL-1. *J Immunol.* 164:5549-5555.
81. Chuvpilo, S., E. Jankevics, D. Tyrsin, A. Akimzhanov, D. Moroz, M. K. Jha, J. Schulze-Luehrmann, B. Santner-Nanan, E. Feoktistova, T. Konig, A. Avots, E. Schmitt, F. Berberich-Siebelt, A. Schimpl, and E. Serfling. 2002. Autoregulation of NFATc1/A expression facilitates effector T cells to escape from rapid apoptosis. *Immunity.* 16:881-895.
82. Ho, I. C., M. R. Hodge, J. W. Rooney, and L. H. Glimcher. 1996. The proto-oncogene c-maf is responsible for tissue-specific expression of interleukin-4. *Cell* 85:973-983.
83. Bodor, J., A. L. Spetz, J. L. Strominger, and J. F. Habener. 1996. cAMP inducibility of transcriptional repressor ICER in developing and mature human T lymphocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93:3536-3541.

84. Bodor, J. and J. F. Habener. 1998. Role of transcriptional repressor ICER in cyclic AMP-mediated attenuation of cytokine gene expression in human thymocytes. *J.Biol.Chem.* 273:9544-9551.
85. Bower, K. E., R. W. Zeller, W. Wachsman, T. Martinez, and K. L. McGuire. 2002. Correlation of transcriptional repression by p21(SNFT) with changes in DNA.NF-AT complex interactions. *J.Biol.Chem.* 277:34967-34977.
86. Wu, Y., M. Borde, V. Heissmeyer, M. Feuerer, A. D. Lapan, J. C. Stroud, D. L. Bates, L. Guo, A. Han, S. F. Ziegler, D. Mathis, C. Benoist, L. Chen, and A. Rao. 2006. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* 126:375-387.
87. Schubert, L. A., E. Jeffery, Y. Zhang, F. Ramsdell, and S. F. Ziegler. 2001. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J.Biol.Chem.* 276:37672-37679.
88. Rengarajan, J., P. R. Mittelstadt, H. W. Mages, A. J. Gerth, R. A. Kroczeck, J. D. Ashwell, and L. H. Glimcher. 2000. Sequential involvement of NFAT and Egr transcription factors in FasL regulation. *Immunity.* 12:293-300.
89. Decker, E. L., C. Skerka, and P. F. Zipfel. 1998. The early growth response protein (EGR-1) regulates interleukin-2 transcription by synergistic interaction with the nuclear factor of activated T cells. *J.Biol.Chem.* 273:26923-26930.
90. Decker, E. L., N. Nehmann, E. Kampen, H. Eibel, P. F. Zipfel, and C. Skerka. 2003. Early growth response proteins (EGR) and nuclear factors of activated T cells (NFAT) form heterodimers and regulate proinflammatory cytokine gene expression. *Nucleic Acids Res.* 31:911-921.
91. Klein-Hessling, S., M. K. Jha, B. Santner-Nanan, F. Berberich-Siebelt, T. Baumruker, A. Schimpl, and E. Serfling. 2003. Protein kinase A regulates GATA-3-dependent activation of IL-5 gene expression in Th2 cells. *J.Immunol.* 170:2956-2961.

## VII. Abkürzungen

$\alpha$	anti
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2- Azino- bis(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure)
Ag	Antigen
AKAP79	A- Kinase Ankerprotein
bio	biotinyliert
BMMC	bone marrow derived mast cells
bp	Basenpaar
BSA	bovine serum albumin
CABIN1	calcineurin-binding Protein 1
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
CK1	Casein- Kinase 1
CMV	Cytomegalivirus
CsA	Cyclosporin A
CSP	Calcipressine
CTMC	connective tissue type mast cell
dATP	2'- Desoxy- Adenosin- 5'- Triphosphat
dCTP	2'-Desoxy-Cytidin-5'-Triphosphat
DAG	Diacylglycerol
DEAE	Diethylaminoethyl
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	2'- Desoxy- Guanosin-5'- Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'- Desoxynucleosid- 5'- Triphosphat
ds	doppelsträngig
DTH	"delayed type hypersensitivity"
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'- Desoxy- Thymidin-5'-Triphosphat
E	Extinktion
EDTA	disodium ethylenediamine tetraacetic acid
ELISA	enzyme linked immunosorbend assay
F	Farad
FAM	6- Carboxyfluorescein (Farbstoff)
FACS	"fluorescence activated cell sorter"
FCS	fetal calf serum
Fc $\epsilon$ RI	hochaffiner Rezeptor für IgE- Antikörper
FITC	Fluoreszein-5-isothiocyanat
FL-1	Fluoreszenzkanal 1 im FACS
FSC	„forward scatter“, Maß für die Zellgröße
GSK3	Glykogen-Synthase 3
GTC	Guadiniumthiocyanat
h	human
HGPRT	Hypoxanthin- Guanin- Phosphoribosyl-Transferase
HSS	hypersensitive Stellen
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
IMDM	Iscove`s modifies Dubeccos`s medium
InsP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IP	Immunpräzipitation
IVT	<i>in vitro</i> Translation
kb	Kilobase
KO	knock out
l	Liter
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar
MACS	magnetic activated cell sorter
Mel-14	auf naiven Th-Zellen stark exprimiertes Oberflächenantigen
MEM	minimal essential medium
min	Minute
MMC	mucosal type mast cell
M-MLV	moloney murine leukemia virus
mr	murin rekombinant
mRNA	messenger RNA
mut	Mutante
n.d.	nicht detektierbar
N	normale
NFAT	nuclear factor of activated T- cells
NF- $\kappa$ B	„nuclear factor $\kappa$ B“

NP-40	Nonidet P-40
OD	optische Dichte
OVA	Ovalbumin
p.a.	pro analysis
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PLC- $\gamma$	Phospholipase c- $\gamma$
PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>	Phosphatidyl- Inositol-4,5-bisphosphat
qRT-PCR	quantitative reall-time PCR
RISC	„RNA induced silencing complex“
RNA	Ribonukleinsäure
RSD	„Rel similarity domain“
RT	Reverse Transkriptase
SDS	sodium dodecyl sulfate
siRNA	„small interference RNA“
SRR	serin- reiche Motive
T4	Bakteriophage T4
TAD-A	Terminale Transaktivierungsdomäne der NFAT- Faktoren
Taq	Thermus aquaticus DNA-Polymerase
TCR	T cell receptor
TE	Tris- EDTA
tg	transgen
TGF	transforming growth factor
Th	T-Helferzelle
TLR	„Toll like receptor“
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
VE	voll entsalzt
WT	Wildtyp
x g	Vielfaches der Erdgeschwindigkeit



