

# Das Zeckenspeichelprotein Sialostatin L supprimiert spezifisch die IL-9 Produktion in Mastzellen

## **Dissertation**

Zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Till-Julius Brühl**  
**Geb. am 05.12.1985 in Bad Schwalbach**

**Mainz**  
**02.02.2016**

Tag der mündlichen Prüfung: 08.06.2016

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

**„Es sind die Fantasten, die die Welt in Atem halten. Nicht die Erbsenzähler.“**

**Erich Däniken**

# Inhalt

<b>1.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1.	Mastzellen.....	1
1.2.	Interleukin-9 .....	3
1.3.	Interferon Regulierender Faktor 4.....	6
1.4.	Asthma bronchiale .....	8
1.5.	Sialostatin L .....	10
1.6.	Zielsetzung der Arbeit.....	13
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>14</b>
2.1.	Chemikalien .....	14
2.2.	Geräte und Hilfsmittel .....	15
2.3.	Plastik- und Glaswaren .....	17
2.4.	Puffer .....	18
2.5.	Kits.....	22
2.6.	Tiere .....	22
2.7.	Primärzellen.....	22
2.8.	Verwendete Oligonukleotide "Primer" .....	23
2.8.1.	Primer für die Chromatin Immunpräzipitation.....	23
2.9.	Plasmide .....	23
2.10.	Antikörper .....	24
2.10.1.	Western Blot Antikörper .....	24
2.10.2.	FACS Antikörper .....	24
2.10.3.	ELISA Antikörper .....	25
2.10.4.	Chromatin- Immun- Präzipitation- Antikörper.....	26
2.11.	Arbeiten mit Zellen.....	26
2.11.1.	Zellkulturmedien und Zusätze.....	26

2.11.2.	Grundmedien .....	27
2.11.3.	Medienzusätze.....	27
2.11.4.	Fertige Zellkulturmedien .....	27
2.11.5.	Bestimmung der Lebendzellzahl.....	28
2.11.6.	Präparation von Knochenmarksmastzellen (BMMC) .....	28
2.11.7.	Differenzierung von BMMC aus Knochenmarksvorläuferzellen .....	28
2.11.8.	Stimulation von Mastzellen .....	29
2.11.9.	Degranulationsassay .....	29
2.11.10.	Elektroporation von Mastzellen.....	29
2.11.11.	Reportergenuntersuchungen mit Mastzellen .....	30
2.11.12.	Durchflusszytometrie (FACS) .....	30
2.12.	Arbeiten mit Proteinen: .....	31
2.12.1.	Proteinquantifizierung .....	31
2.12.2.	SDS-PAGE .....	31
2.12.3.	Western Blot .....	32
2.12.4.	ELISA („Enzyme Linked Immunosorbent Assay“)... ..	32
2.12.5.	Sialostatin L Präparation.....	33
2.13.	Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	33
2.13.1.	Puffer und Reagenzien für das Arbeiten mit DNA.....	33
2.13.2.	Isolierung von Nukleinsäuren.....	34
2.13.2.1.	Isolierung von Plasmid- DNA .....	34
2.13.2.2.	RNA Isolierung.....	34
2.13.2.3.	Präzipitation von Nukleinsäuren .....	34
2.13.3.	Chromatin Immuno-Präzipitation (ChIP) .....	35
2.13.4.	Agarose-Gelelektrophorese .....	36
2.13.5.	Mutagenese mit QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit .....	36
2.13.6.	Next Generation Sequencing.....	37

2.14.	<i>In vivo</i> - Asthma Experimente .....	37
2.14.1.	Experimentelles Asthma Protokoll .....	37
2.14.2.	Durchführung der bronchoalveolären Lavage.....	38
2.14.3.	Messung der Atemwegsfunktion.....	39
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>40</b>
3.1.	Sialostatin L hat keinen Einfluss auf die Degranulation und Zellvitalität von Mastzellen.....	40
3.2.	Sialostatin L supprimiert spezifisch die Produktion von Interleukin (IL)- 9. ....	41
3.3.	Sialostatin L inhibiert die Expression der <i>Il9</i> , <i>Irf4</i> und <i>Il1b</i> Gene.....	43
3.4.	Die Sialostatin L vermittelte Suppression der IL-9 Produktion in Mastzellen wird durch exogenes IL-1 $\beta$ nahezu vollständig aufgehoben .....	46
3.5.	Die IL-9 und IL-1 $\beta$ Produktion in <i>Il1r1</i> <sup>-/-</sup> und <i>Irf4</i> <sup>-/-</sup> Mastzellen ist verringert .....	47
3.6.	Eine mastzellspezifische <i>Il1r1</i> - und <i>Irf4</i> - Defizienz hat keinen Einfluss auf die Degranulation und IL-6 Produktion .....	49
3.7.	Exogenes IL-1 $\beta$ steigert die IL-9 Produktion in <i>Irf4</i> <sup>-/-</sup> Mastzellen auf das Niveau von wildtypischen Mastzellen .....	51
3.8.	Sialostatin L hat kaum Einfluss auf die IL-9 Produktion von <i>Irf4</i> <sup>-/-</sup> Mastzellen .....	53
3.9.	Der Transkriptionsfaktor IRF4 bindet und transaktiviert in Mastzellen den <i>Il9</i> und <i>Il1b</i> Promoter .....	54
3.10.	Eine mastzellspezifische <i>Irf4</i> oder <i>Il1r1</i> Defizienz verringert OVA-induzierte Eosinophilie und AHR im präklinischen murinen Asthma-Modell.....	56
3.11.	Eine therapeutische Anwendung von Sialostatin L lindert OVA induzierte Eosinophilie und AHR im murinen präklinischen Asthma-Modell.....	62
3.12.	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	66
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>68</b>
4.1.	<i>Il9</i> Regulation in Mastzellen .....	68

4.2.	<i>In vivo</i> Relevanz von mastzellproduziertem IL-9.....	75
5.	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>79</b>
6.	<b>Abstract</b> .....	<b>81</b>
7.	<b>Quellen</b> .....	<b>82</b>
8.	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>93</b>
9.	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>96</b>

# Einleitung

## 1. Einleitung

### 1.1. Mastzellen

Mastzellen sind hämatopoetische Zellen des angeborenen Immunsystems, welche sich aus pluripotenten Vorläuferzellen im Knochenmark entwickeln. Sie wurden erstmals von Paul Ehrlich beschrieben, der sie mittels Anilinfarbstoffen im Blut nachweisen konnte<sup>1</sup>. Mastzellvorläuferzellen wandern aus dem Knochenmark über das Blutsystem in ihre Zielgewebe ein, wo sie durch lokale Wachstumsfaktoren zu reifen Mastzellen terminal ausdifferenzieren. *In vivo* ist das Protein Stammzellfaktor (SCF) nicht jedoch Interleukin (IL)-3 notwendig für die Differenzierung von Mastzellen<sup>2,3</sup>. Da eine Isolation von Mastzellen aus Gewebe *ex vivo* in ausreichenden Mengen für *in vitro* Assays praktisch nicht möglich ist, werden aus dem Knochenmark *in vitro* unter dem Einfluss von SCF, IL-3 und IL-4 sogenannte Mastzellen mit Knochenmarksursprung (BMMC) generiert<sup>4-7</sup>. Im Gewebe können Mastzellen Monate bis Jahre persistieren und sich selbst erneuern. Sie sind auch im ausgereiften Zustand noch teilungsfähig und treten nicht mehr in den Blutkreislauf ein. Mastzellen sind primär in allen Organen vorzufinden, welche im direkten Kontakt mit der Umwelt stehen. Hierzu zählen die Haut sowie alle mucosalen Gewebe oder Schleimhäute<sup>8-10</sup>. Wegen ihrer strategischen Lokalisation innerhalb des Körpers, präferentiell an Kontaktflächen zur Umgebung im Bereich von Epithelien und Endothelien und einer Vielzahl von keimbahnkodierten Rezeptoren zur Erkennung von Gefahrensignalen gelten sie als Wächter des Immunsystems bzw. als erste zelluläre Verteidigungslinie bei Pathogen- oder Schadpartikelkontakt oder Verletzungen, nachdem die chemische und physiologische Epithelbarriere durchbrochen wurde<sup>11,12</sup>.

Ferner gehören Mastzellen zur Gruppe der Granulozyten innerhalb des angeborenen Immunsystems. Sie exprimieren im gereiften Zustand CD („cluster of differentiation“) 117, den c-Kit-Rezeptor für SCF (c-Kit), und den hochaffinen Rezeptor 1 alpha für Immunglobulin E (FcεR1α). Diese Kombination von CD117<sup>+</sup> und FcεR1α<sup>+</sup> ist charakteristisch für Mastzellen und unterscheidet sie eindeutig von anderen hämatopoetischen Zellen<sup>8,13</sup>. Man kann Mastzellen in zwei Subpopulationen

## Einleitung

unterteilen, welche sich unter anderem in ihrer endogenen Proteasenzusammensetzung und Lokalisation im Körper unterscheiden. Im Bereich der Haut findet man hauptsächlich Bindegewebsmastzellen (CTMC / „connective tissue type mast cells“) während die mucosalen Organe mit Schleimhautmastzellen (MMC / „mucosal type mast cells“) besetzt sind<sup>14</sup>.

Überdies ist das prominenteste Merkmal von Mastzellen die im Lichtmikroskop erkennbaren sekretorischen Granula oder sekretorischen Lysosomen. In ihnen sind vorgeformte pro- und anti-inflammatorische sowie vasoaktive Mediatoren wie Histamin, TNF- $\alpha$ , Proteasen, Heparin und Serotonin gespeichert, welche nach Stimulation innerhalb von Sekunden freigesetzt werden können<sup>15,16</sup>. Eine solche Stimulation erfolgt primär über die Quervernetzung des an den prominenten Fc $\epsilon$ R1 $\alpha$  gebundenen IgE, kann jedoch auch über Komponenten des Komplementsystems, Toxine und Neuropeptide erfolgen<sup>14</sup>. Des Weiteren produzieren Mastzellen abhängig von ihrer Aktivierung ein breites Spektrum an *de novo* synthetisierten bioaktiven Verbindungen wie etwa Prostaglandine aus dem Lipidmetabolismus, viele Cytokine wie zum Beispiel IL-9 und Chemokine. Diese Produktion kann durch verschiedene Signale ausgelöst werden, welche über eine Vielzahl von keimbahnkodierten „pathogen recognition receptors“ (PRR) („Toll like receptors“ / TLR), Complement Rezeptoren (C3aR), Chemokinrezeptoren (CCR1 / CCR3) und Cytokinrezeptoren (IL-3R, IL-4R, IL-1R1, IL-9) vermittelt werden können. Aufgrund des breiten Spektrums an sezernierten Faktoren und der Möglichkeit rapide auf verschiedene Stimuli zu reagieren, repräsentiert die Mastzelle eine wichtige Komponente einer unmittelbaren, sehr frühen Immunantwort, die sowohl die adaptive als auch die angeborene Immunität entscheidend beeinflusst<sup>10,17,18</sup>.

IgE-vermittelte allergische Reaktionen des Typ 1 werden im Wesentlichen durch Mastzellen verursacht. Dabei verursacht der Kontakt mit Antigen (Allergen) eine Kreuzvernetzung des an Fc $\epsilon$ R1 $\alpha$  gebundenen IgE auf Mastzellen. Dies bewirkt eine Aktivierung und Degranulation von Mastzellen, wodurch es zu Rötungen, Juckreiz und im Extremfall bei systemischer Aktivierung zu einem anaphylaktischem Schock kommen kann<sup>19,20</sup>. Weitere pathogene, aber auch benigne Funktionen wurden für Mastzellen auch im Zusammenhang mit anderen Erkrankungen wie Arteriosklerose, Asthma, Kontaktdermatitis, Krebs und Arthritis beschrieben. Zudem sind sie für die

## Einleitung

Erkennung von Bakterien, beim Schutz vor Vergiftungen und bei der Abwehr von Parasiten von zentraler Bedeutung<sup>18,21–23</sup>.

### 1.2. Interleukin-9

Interleukin-9 ist ein 14kD großes einkettiges Glykoprotein mit 144 Aminosäuren. Es wird primär von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, Mastzellen, eosinophilen Granulozyten und „Innate like lymphoid cells“ 2 (ILC2) produziert<sup>24</sup>. Es wurde ursprünglich als Cytokin mit wachstumsfördernder Wirkung auf T-Zelllinien nicht jedoch nativen CD4<sup>+</sup> T-Zellen und Mastzellen beschrieben und entsprechend p40, „T cell growth factor“ (TCGF) III oder „mast cell growth –enhancing activity“ (MEA) genannt<sup>25–27</sup>. Später wurde es auf Grund seiner Wirkung sowohl auf lymphoide als auch auf myeloide Zellen in Interleukin-9 umbenannt<sup>28</sup>. Anfangs wurden Th2 Zellen als primäre Quelle für IL-9 beschrieben, da diese in der Anwesenheit von IL-4 und TGF- $\beta$  große Mengen dieses Cytokins sezernieren und Interferon (IFN)- $\gamma$  diese Produktion hemmt<sup>29</sup>. Später konnte mittels spezifischer Antikörper für IL-4 und IL-9 anhand von FACS<sup>1</sup>-Analysen (Durchflusszytometrie) auf Einzell-Ebene ein IL-9 produzierender Th Subtyp identifiziert werden, welcher fortan Th9 genannt wurde<sup>30</sup>. Mastzellen produzieren nach Fc $\epsilon$ RI Quervernetzung oder Stimulation mit dem Calcium Ionophor Ionomycin ebenfalls IL-9. Diese Produktion wird durch exogenes IL-1 $\beta$  oder LPS verstärkt<sup>7,31</sup>.

Im Organismus ist IL-9 für viele physiologische aber auch pathophysiologische Vorgänge verantwortlich, da es auf Zellen innerhalb und außerhalb des hämatopoetischen Systems wirkt<sup>32</sup>. So wurde im experimentellen Asthma die Wirkung von IL-9 nicht nur auf Mastzellen sondern auch auf Becherzellen im Lungenepithel und Zellen der glatten Muskulatur in den Atemwegen bewiesen. Hier konnte bei einer Überexpression von IL-9 eine erhöhte Mucusproduktion, Gewebsveränderungen und -neubildung („tissue remodeling“), Mastozytose und Eosinophilie beobachtet werden<sup>33–36</sup>. Damit einhergehend konnte eine Blockade von IL-9 mittels spezifischen Antikörpern diese Symptomatik verringern. Hierbei beruht die Wirkung vermutlich auf einer durch IL-9 induzierten gesteigerten Produktion von IL-5, IL-13, Eotaxin und einer gesteigerten Proliferation von Becher- und glatte

---

<sup>1</sup> Fluorescence Activated Cell Sorting

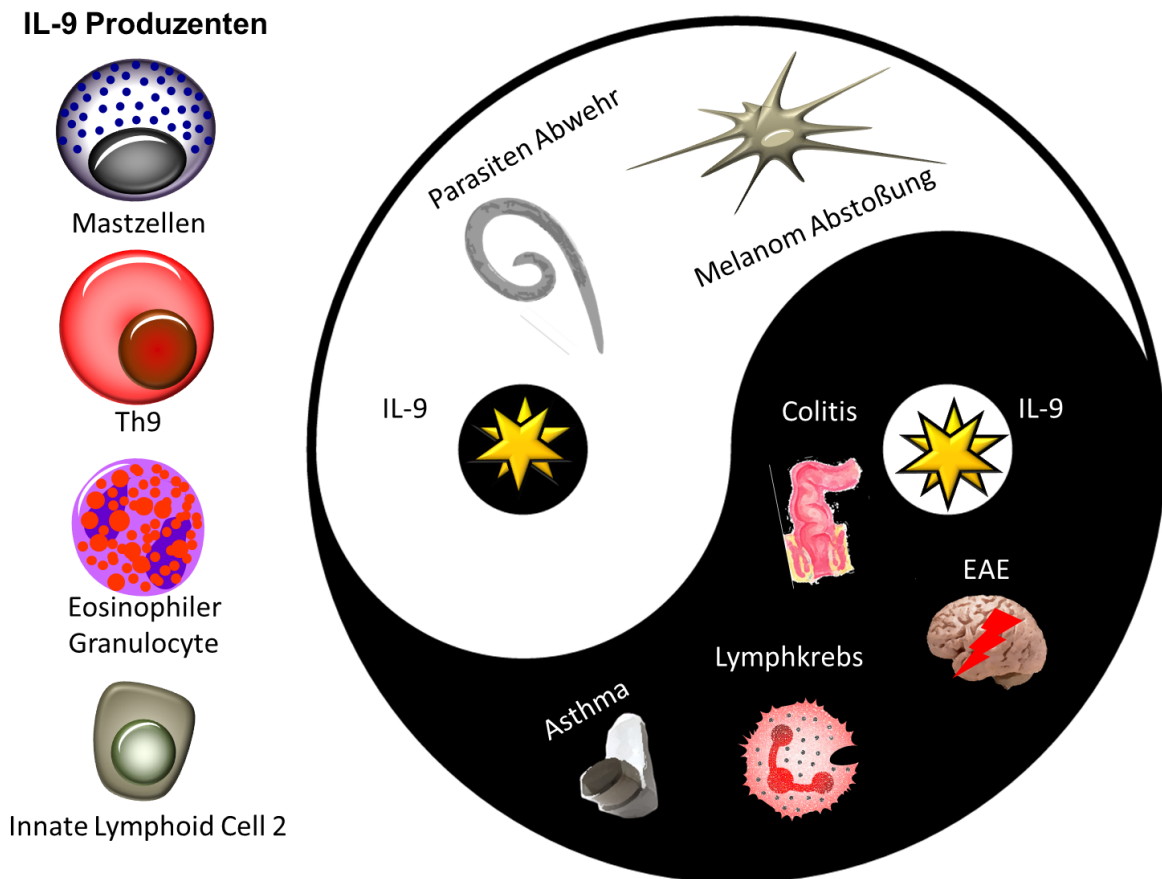
## Einleitung

Muskulatur Zellen<sup>37-39</sup>. Im Einklang hierzu konnte in Lungengewebsbiopsien von asthmatischen Patienten eine erhöhte *Il9* und *Il9r* (IL-9 Rezeptor) mRNA Expression im Vergleich zu gesundem Gewebe erfasst werden<sup>40,41</sup>. Dennoch konnten nach einer therapeutischen Blockade von IL-9 mittels des humanisierten neutralisierenden Antikörpers MEDI-528 in Patienten mit unkontrolliertem Asthma keine Linderung der Symptome beobachtet werden<sup>42</sup>. Bezüglich dieser Studie wird inzwischen angenommen, dass IL-9 in einem fortgeschrittenen Asthmastadium keine wesentliche pathogene Rolle mehr spielt, so dass seine Neutralisierung auch keinen Einfluss auf den Krankheitsverlauf hat.

Des Weiteren wurde in einem murinen Model der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) dokumentiert, dass IL-9 die Rekrutierung inflammatorischer Th17 Zellen in das Zentralnervensystem (ZNS) bewirkt. Es fördert die Expression des Chemokins CCL-20 in Astrozyten, so dass es infolge zu einer Chemoattraktion CCL-20 Rezeptor (CCR6)-exprimierender Th17 Zellen kommt. Eine Hemmung von IL-9 verursachte demgemäß eine stark verminderte Einwanderung von Th17 in das ZNS<sup>43-45</sup>. Sowohl in einem Colitis Maus Model als auch in Gewebsbiopsien von Patienten mit *Colitis ulcerosa* konnte IL-9 als pathophysiologischer Mediator mit entscheidender Funktion identifiziert werden<sup>46,47</sup>. Hingegen wurde in Maus-Darmparasiten Modellen (*Trichinella spiralis*, *Trichuris muris*) eindeutig die bedeutende protektive Rolle von IL-9 bei der Parasiten-Abwehr belegt und dessen Erfordernis bei der Produktion der Th2 Cytokine IL-4 und IL-13. Diese schützende Wirkung beruht hauptsächlich auf der Aktivierung von mucosalen Mastzellen durch IL-9. Letztere sezernieren nach Aktivierung verschiedene Mediatoren, welche eine gesteigerte Mucusproduktion, Eosinophilie und Hyperkontraktion des Darmmuskulaturgewebes nach sich zieht und eine Ausscheidung der Parasiten begünstigt<sup>39,48,49</sup>. Ferner hat IL-9 eine ambivalente Bedeutung bei Krebserkrankungen. So konnte einerseits eine konstitutive IL-9 Produktion in Hodgkin Zelllinien gefunden, IL-9 als Wachstumsfaktor für Langzeit *in vitro* T Zelllinien festgestellt und die spontane Entwicklung von lymphoblastischen Lymphomen in IL-9 transgenen Mäusen beobachtet werden. Auch „peripheral blood mononuclear cells“ (PBMC) generiert aus Patienten mit T Zell Leukämie produzieren zum überwiegenden Anteil IL-9<sup>50,51</sup>. Auf der anderen Seite wurde eindeutig belegt, dass IL-9 in murinen Melanommodellen eine protektive Wirkung hat. Hier wurden im

## Einleitung

subkutanen Melanommodell vornehmlich Mastzellen als Effektorzellen nach IL-9 Aktivierung beschrieben, während im pulmonalen Melanom Modell eine IL-9 vermittelte Rekrutierung von cytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen und CD8<sup>+</sup> dendritischen Zellen (DC) für die Melanom Abstoßung verantwortlich ist<sup>52-55</sup>.



**Abbildung 1: Physiologische und Pathophysiologische Funktionen von IL-9**

Interleukin-9 wird von Mastzellen, Th9 Zellen, eosinophilen Granulozyten und Innate Lymphoid Cells 2 produziert. Es wurde als wichtiger Faktor bei der Bekämpfung von Darmparasiten, Melanom Abstoßung, Ulcerativer Colitis, Asthma, Lymphatischem Krebs und EAE beschrieben<sup>41,43,46,48,51,56,57</sup>.

In T-Zellen wurde eine Reihe von Transkriptionsfaktoren und Cytokinen beschrieben, welche an der Regulation des Cytokins IL-9 beteiligt sind. Nach Aktivierung über den T Zelle Rezeptor (TCR) und Kostimulation mittels des IL-2 Rezeptors (IL-2R) kommt es zu einer Dephosphorylierung von Transkriptionsfaktoren der NFAT- Familie, einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B und BATF sowie der Expression des Transkriptionsfaktors IRF4, welche anschließend in den Kern translozieren können. IRF4 wurde als absolut

## Einleitung

notwendiger Transkriptionsfaktor bei der IL-9 Produktion in CD4<sup>+</sup> T-Zellen und deren Differenzierung zu Th9 Zellen beschrieben. Das Differenzierungssignal über den TCR und den IL-2R kann über die Aktivierung des IL-4 Rezeptors (IL-4R), TGF („transforming growth factor“)- $\beta$  Rezeptors (TGF- $\beta$ R), TSLP („thymic stromal lymphopoietin“) Rezeptors (TSLPR) und des IL-1 Rezeptors 1 (IL-1R1) verstärkt werden. Dies resultiert in der Expression und Aktivierung von STAT („signal transducer and activator of transcription“)5 (IL-2R) und STAT6 (IL-4R), der Expression von PU.1 und SMAD („mothers against decapentaplegic homolog“) (TGF- $\beta$ R) und einer erhöhten Expression von IRF4 sowie der Aktivierung von NF- $\kappa$ B<sup>24,58–64</sup>. Zudem ist die Regulation von IL-9 zelltypabhängig in Mastzellen und T-Zellen unterschiedlich. So wurde in Mastzellen der Transkriptionsfaktor GATA-1 („GATA-binding factor 1“) nach Phosphorylierung durch p38 als wichtiger Aktivator des *IL9* Gens beschrieben, während GATA-1 in T-Zellen nicht exprimiert wird<sup>65</sup>. Hingegen konnte NF- $\kappa$ B auch in Mastzellen als potenzierender Faktor bei der Expression von IL-9 dokumentiert werden<sup>31</sup>. Des Weiteren wurde eine gesteigerte IL-9 Produktion bei Aktivierung über Fc $\epsilon$ R1 $\alpha$  und gleichzeitiger Stimulation mit IL-10 oder Kit-Ligand (SCF) in Kombination mit IL-1 $\beta$  beobachtet, während in CD4<sup>+</sup> T-Zellen ein gegenteiliger Effekt beobachtet werden konnte<sup>60,66</sup>.

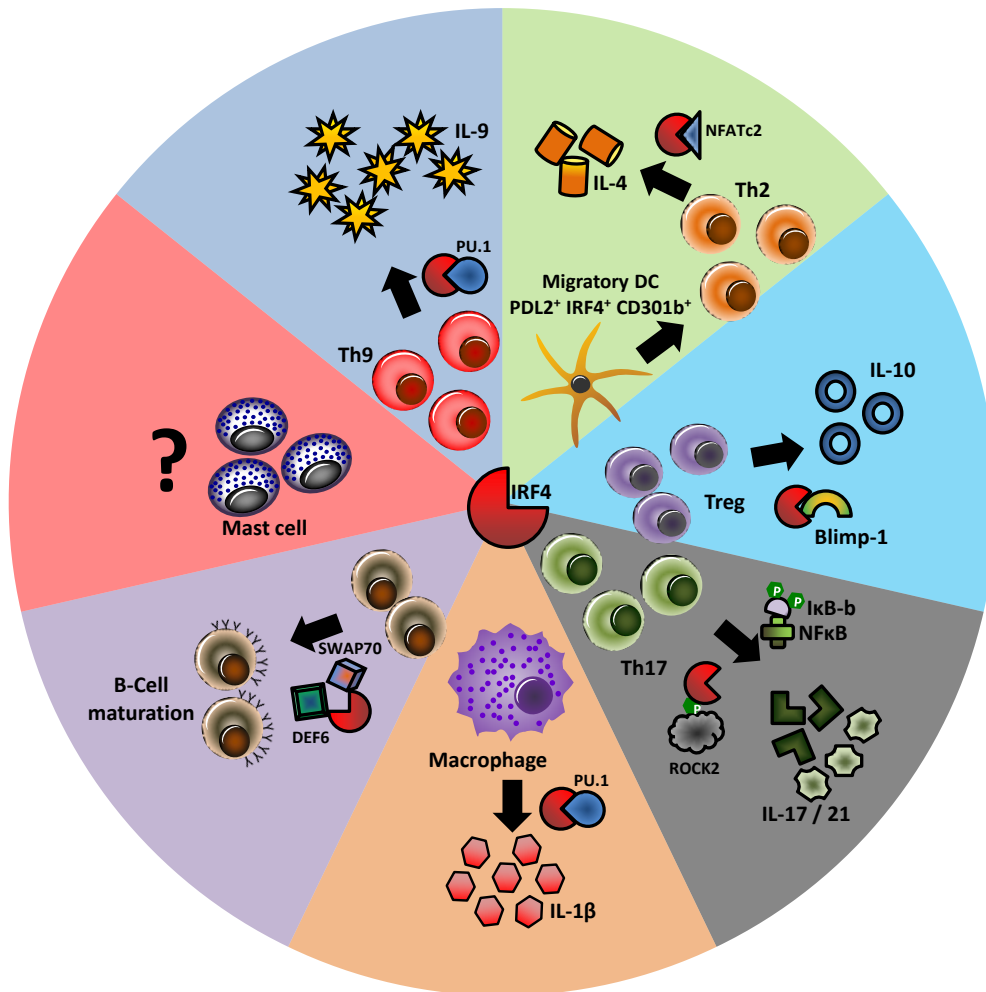
### 1.3. Interferon Regulierender Faktor 4

Es wurden bisher 9 verschiedene Transkriptionsfaktoren der Familie der „interferon-regulatory factors“ (IRF) identifiziert<sup>67</sup>. Sie wurden nach ihrer erstmals beschriebenen Funktion als Regulator der Typ I Interferone (Interferon- $\alpha/\beta$ ) beschrieben<sup>68</sup>. Alle IRF haben die gleiche DNA- Bindesequenz (5'-AANNGAAA-3'), welche per Kristall-Strukturanalyse aufgeklärt werden konnte<sup>69</sup>. Zudem werden IRFs ausschließlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert. Hier sind sie u. A. bei der B-Zell-Entwicklung, Differenzierung von DC, Aktivierung der Makrophagen und Granulozyten, dem TLR-Signalweg, der Transkription einer Reihe von pro-inflammatorischen Cytokinen, der CD8<sup>+</sup> T-Zell Funktion und der Ausdifferenzierung der unterschiedlichen Th-Subpopulationen beteiligt<sup>70</sup>. Von besonderer Bedeutung ist der Transkriptionsfaktor IRF4 auf Grund seiner pleiotropen Funktion<sup>67</sup>. Weitere Synonyme für IRF4 sind „PU.1-interaktionspartner“ (Pip), „interferon consensus sequence binding protein for activated Tcells“ (ICSAT),

## Einleitung

„multiple myeloma oncogene“ 1 (MUM1) und „lymphocyte specific IRF“ (LSIRF)<sup>71-74</sup>. IRF4 ist nur im Zellkern und nicht im Cytoplasma lokalisiert<sup>75</sup>. Wie bereits beschrieben, können *Irf4*-defiziente CD4<sup>+</sup> T-Zellen nicht zu Th9 Zellen ausdifferenzieren und produzieren kein IL-9. Außerdem entwickeln *Irf4*-defiziente Mäuse kein experimentelles Asthma<sup>59</sup>. Dieser Effekt könnte auch darauf beruhen, dass *Irf4*-defiziente Th2 Zellen eine verminderte IL-4 Produktion zeigen. Bezüglich solcher Th2-Zellen wurde als möglicher Interaktionspartner von IRF4 der Transkriptionsfaktor NFATc2 beschrieben<sup>76</sup>. Des Weiteren wurde IRF4 als notwendiger Faktor der Cytokinexpression in Th17 Zellen beschrieben. Dort wurde dokumentiert, dass IRF4 in Abhängigkeit von NFκB *de novo* synthetisiert wird und durch die Kinase ROCK2 („Rho-associated protein kinase 2“) phosphoryliert wird und dadurch in den Kern einwandert, um die Expression von IL-17 und IL-21 zu potenzieren<sup>75</sup>. In Mäusen führt ein Fehlen von IRF4 in regulatorischen T-Zellen (Treg) zu einem Th2 vermittelten autoimmunen Phänotyp<sup>77</sup>. In Tregs wurde IRF4 als wichtiger Faktor für die Ausdifferenzierung und die Expression von Blimp-1 („B lymphocyte-induced maturation protein“) identifiziert, welches an der IL-10 Expression beteiligt ist<sup>78</sup>. Außerdem wurde erst kürzlich eine IRF4<sup>+</sup> Subpopulation von DC identifiziert, welche für die Ausprägung einer Th2 Antwort absolut notwendig ist<sup>79-81</sup>. Ferner wurde in Makrophagen IRF4 als Interaktionspartner von PU.1 bei der Regulation des IL-1β Gens beschrieben<sup>82</sup>. Überdies wurde IRF4 als essentieller Faktor bei der Reifung und dem Isotypenklassenwechsel der Antikörper in B-Zellen in Verbindung mit den Faktoren SWAP70 („SWAP Switching B-Cell Complex 70kDa Subunit“) und DEF6 („Differentially expressed in FDCP 6 homolog“) beschrieben<sup>83</sup>.

## Einleitung



**Abbildung 2: Multiple Funktionen von IRF4 in unterschiedlichen hämatopoetischen Zellen**

IRF4 wurde als essentieller Faktor bei der IL-9 Produktion in  $CD4^+$  T-Zellen und bei deren Differenzierung zu Th9 beschrieben. Des Weiteren ist es als Interaktionspartner von NFATc2 an der Expression von IL-4 in  $CD4^+$  T-Zellen direkt und indirekt über eine IRF4 exprimierende, Th2 induzierende Subpopulation von DC beteiligt. In Tregs ist IRF4 für die Ausdifferenzierung und Expression von IL-10 verantwortlich, indem es Blimp-1 induziert. In Th17 Zellen wird IRF4 durch  $NF\kappa B$  angeregt, von ROCK2 phosphoryliert und ist für die Differenzierung und IL-17/21 Produktion von ausschlaggebender Bedeutung. In Makrophagen interagiert IRF4 mit PU.1 und aktiviert die Produktion von IL-1 $\beta$ . In B-Zellen ist IRF4 an der Reifung beteiligt und wird von SWAP70 und DEF6 moduliert. In Mastzellen wurde IRF4 bisher noch nicht beschrieben<sup>59,75,76,78–80,82,83</sup>.

### 1.4. Asthma bronchiale

Asthma bronchiale ist eine der häufigsten chronischen Erkrankungen weltweit. In entwickelten Ländern liegt die Prävalenz für Erwachsene bei schätzungsweise 10 % und ist bei Kindern höher als 10 %<sup>84</sup>. Asthma zeichnet sich durch eine Verengung der Atemwege aus, die im Gegensatz zu COPD (Chronisch obstruktive Lungenerkrankung) variabel und reversibel ist. Bei Asthma kommt es zu einer

## Einleitung

chronischen Entzündung des Atemtraktes, welche sich durch eine erhöhte Produktion von vielen proinflammatorischen Cytokinen, Chemokinen, Adhäsionsmolekülen, Proteasen und Rezeptoren auszeichnet. Weitere Charakteristika dieser Erkrankung sind eine erhöhte Mucusproduktion, periphere Wassereinlagerungen durch eine pulmonale Hypertonie, Atemwegsüberempfindlichkeit (AHR) und die Verdickung der Basalmembran unterhalb des Atemwegsepithels<sup>85</sup>. Hierbei verursacht bei atopischem Asthma, welches 95% aller asthmatischen Erkrankungen ausmacht, die Inhalation von harmlosen exogenen Substanzen (Allergenen) diese Symptomatik<sup>86</sup>.

Bei der Entstehung dieser allergischen Atemwegserkrankung spielt ein komplexes Netzwerk von Zellen der angeborenen und adaptiven Immunität sowie Zellen außerhalb des hämatopoetischen Systems eine Rolle. Ursprünglich wurden lediglich Th2 Zellen als Effektorzellen für die Symptomatik des Asthma verantwortlich gemacht, da diese während der Erkrankung in der Lunge akkumulieren und eine Vielzahl an verschiedenen Cytokinen wie IL-4, IL-5, und IL-13 sezernieren können, welche nachweislich zu den pathophysiologischen Symptomen beitragen<sup>87,88</sup>. Später wurde eine eigenständige Subpopulation an CD4<sup>+</sup> T-Zellen identifiziert, welche exklusiv große Mengen IL-9 nicht jedoch IL-4 produziert. Diese Th Subpopulation wurde fortan Th9 genannt und wurde als prominentester Mediator in murinem experimentellem Asthma angesehen<sup>29,30,89</sup>. Hier konnte mittels neutralisierenden Antikörpern gegen IL-9 eine verringerte Inflammation der Atemwege und AHR demonstriert werden<sup>90,91</sup>. In Studien mit IL-9 defizienten Mäusen entwickelten diese jedoch ähnliche Asthma Symptome wie wildtypische Mäuse, was auf eine redundante Rolle dieses Cytokins auf die Entwicklung von Asthma hindeutet<sup>92</sup>. Hingegen hatte eine Überexpression von IL-9 in den Lungen von Transgenen Mäusen eine Atemwegsinfektion und Mastzell-Akkumulation zur Folge<sup>36</sup>. Ferner konnten in bronchoalveolarer Flüssigkeit von Patienten mit schwerem und chronischem Asthma verstärkt das Cytokin IL-17A und IL-17F nachgewiesen werden. Dies deutet auf den Einfluss von Th17 Zellen auf die Asthmasymptomatik in einem fortgeschrittenen Stadium hin<sup>93,94</sup>. So konnte eindeutig dargelegt werden, dass eine Kombination aus IL-4 und IL-17 ein chronisches inflammatorisches Milieu erzeugt und somit Epithelzellen morphologisch verändern kann<sup>94</sup>. Dafür sprechen auch Beobachtungen aus präklinischen Asthma-Modellen, die zeigen, dass das Schema

## Einleitung

der Immunisierung und das Allergen selbst einen bedeutenden Einfluss auf die Ausprägung des experimentellen Asthmas und die Produktion der Leitcytokine haben. So führt eine Immunisierung in Abwesenheit von Adjuvants mit einem definierten Allergen wie Ovalbumin hauptsächlich zu Asthmasymptomen, die von Th2/Th9-Zellen, Mastzellen und eosinophilen Granulocyten verursacht werden. Hingegen mündet die Immunisierung mit einem komplexen Allergen wie Hausstaubmilbenextrakt überwiegend in einem durch Th17 Zellen und neutrophile Granulocyten vermitteltem experimentellen Asthma-Phänotyp<sup>95</sup>.

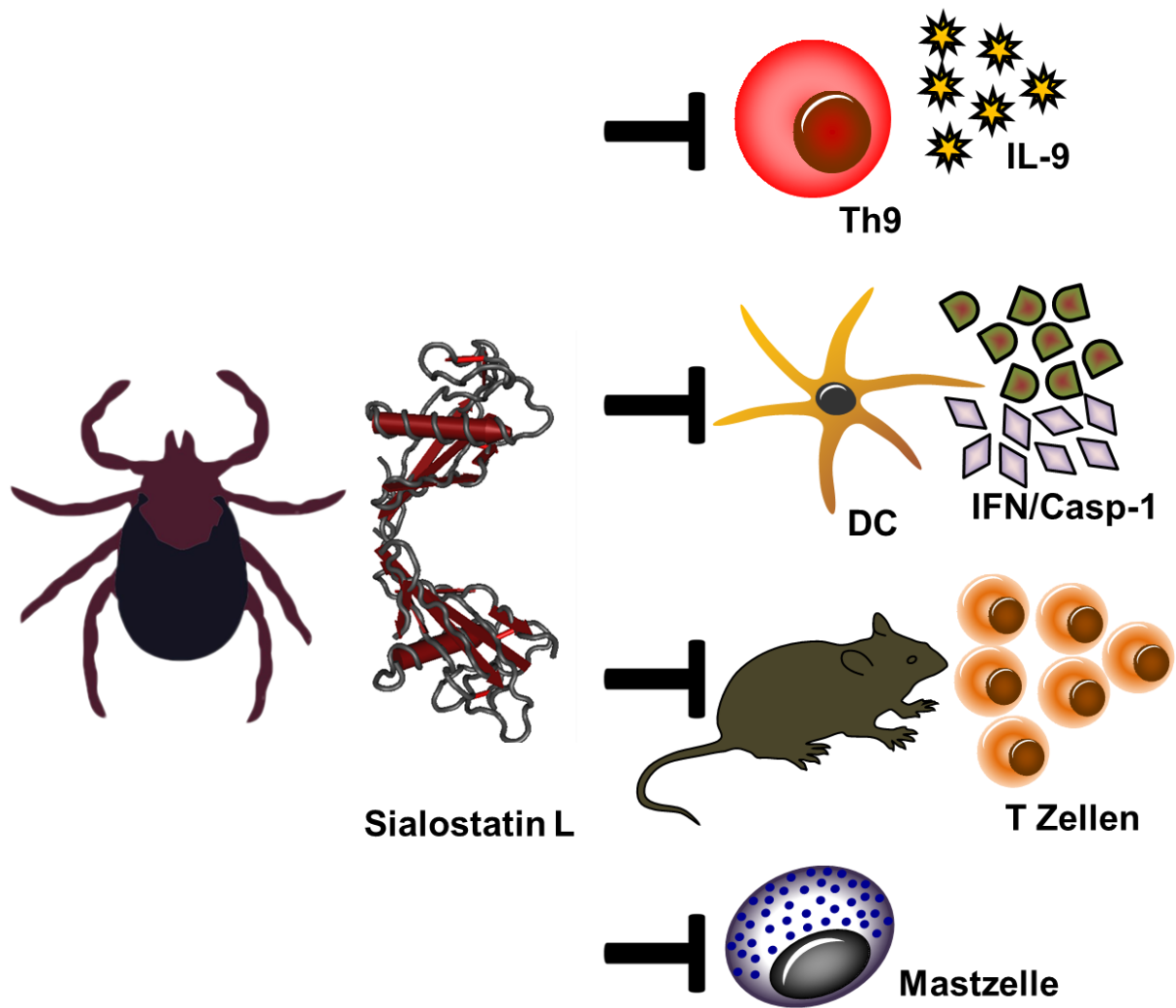
### 1.5. Sialostatin L

Schildzecken wie z.B. der gemeine Holzbock (*Ixodes ricinus*) oder die Hirschzecke (*Ixodes scapularis*) müssen für ihre Blutmahlzeit für mehrere Tage mit inserierten Mundwerkzeugen eng an ihrem Wirt anhaften. Während dieser Zeit muss die Zecke die Entstehung einer Immunreaktion und in deren Folge eine Abstoßungsreaktion verhindern. Hierbei hat die Co-Evolution von Zecken und Vertebraten zu der Entstehung von mehreren Strategien geführt, welche die Immunabwehr umgehen sollen. Darunter fällt die Sezernierung von Speichel in die Bissstelle. Zeckenspeichel enthält eine Reihe von vasoaktiven, antiinflammatorischen, immunmodulierenden und antihämostatischen Komponenten<sup>96,97</sup>. In Zecken der Art *Ixodes scapularis* ist Sialostatin L eine dieser im Speichel vorkommenden immunsuppressiven Komponenten. Sie wurde erstmals von der Arbeitsgruppe um Michalis Kotsyfakis beschrieben und auf ihre immunsuppressiven Eigenschaften hin untersucht. Bei Sialostatin L handelt es sich um ein 12,5 kDa großes Protein mit zwei Disulfidbrücken, welches aufgrund seiner konservierten Cystatin Domäne zu den sezernierten Cystatinen der Gruppe 2 gezählt wird. Es kommt vorrangig als Monomer vor, kann aber auch dimerisieren. Es besitzt als Dimer je eine Doppelhelix und drei Beta Faltblattstrukturen. Cystatine sind phylogenetisch hochkonservierte Proteine und werden in den meisten Organismen von Protozoen über Pflanzen bis hin zu Vertebraten produziert. Cystatine sind reversible Inhibitoren von Papain-ähnlichen Cystein Proteasen. Papain Proteasen gelten als wichtiger Bestandteil von Lysosomen. Die Namensgebung stammt von der erstmaligen Beschreibung des Sialostatin L als Inhibitor der Cathepsine und hier vorrangig des Cathepsin L<sup>98,99</sup>.

## Einleitung

Seit der ersten Beschreibung von Sialostatin L konnte in mehreren Studien eine immunsuppressive Wirkung dieses Cystatins auf verschiedene Immunzellen nachgewiesen werden. In initialen Versuchen konnte eine Immunisierung von Meerschweinchen gegen Sialostatin L sowohl die von Zecken aufgenommene Blutmenge als auch die Anzahl an saugenden Zecken signifikant reduzieren<sup>100</sup>. In weiterführenden Versuchen konnte eine immunsuppressive Wirkung von Sialostatin L bezüglich dendritischer Zellen nachgewiesen werden. In mit Sialostatin L behandelten dendritischen Zellen war die Expression der Reifungsmarker CD80/86 reduziert, während die lysosomale Proteindegradation nicht beeinflusst war<sup>101</sup>. Ferner konnte Sialostatin L in Mäusen die Proliferation von antigenspezifischen T-Zellen, die nach Immunisierung mit Antigen und Adjuvant erfolgt, stark inhibieren. Des Weiteren moduliert Sialostatin L die Produktion von IFN- $\beta$  und Caspase-1 von dendritischen Zellen und begünstigt so die Infektion mit zeckenspezifischen Pathogenen wie *Borrelia spirochetes* und *Anaplasma phagocytophilum*<sup>102-104</sup>. Auch ein immunmodulierender Einfluss des Sialostatin L auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen und deren Differenzierung zu Th9 Zellen und Produktion von IL-9 konnte *in vivo* und *in vitro* in unserem Institut nachgewiesen werden<sup>105</sup>. Auf Grund der Lokalisation von Mastzellen direkt unter der Haut ist ein Einfluss von Sialostatin L auf diese anzunehmen. Auch wurde ein Zusammenhang von Zeckenimmunität und Mastzellen schon mehrfach belegt<sup>106,107</sup>.

## Einleitung



**Abbildung 3: Wirkung von Sialostatin L auf Immunzellen**

Sialostatin wird von Zecken durch Einspülung des Speichels dem befallenen Wirt permanent infundiert. Sialostatin L inhibiert die Differenzierung von T-Zellen zu Th9 Zellen und die Produktion von IL-9. DC werden in ihrer Produktion von IFN und Caspase-1 supprimiert. *In vivo* reprimiert Sialostatin L die antigenspezifische Proliferation von T-Zellen. Der Einfluss von Sialostatin L auf Mastzellen wurde bisher nicht analysiert<sup>98,101-103,105</sup>.

## Einleitung

### 1.6. Zielsetzung der Arbeit

Sialostatin L wurde als immunsuppressives Protein im Speichel von Zecken identifiziert. Mastzellen sind aufgrund ihrer strategischen Lokalisation im Bereich von Epi- und Endothelien und bedingt durch ihr Repertoire an Oberflächenrezeptoren dazu prädestiniert, einen Zeckenbiss zu erkennen und eine primäre Entzündungsreaktion auszulösen. Deshalb war anzunehmen, dass sie ein bevorzugtes Ziel des Immun-Suppressors SialostatinL darstellen und somit war es Gegenstand dieser Arbeit die immunmodulatorischen Eigenschaften von Sialostatin L auf die Effektorfunktionen und Cytokinproduktion von Mastzellen zu untersuchen. Des Weiteren sollte das therapeutische Potential von Sialostatin L hinsichtlich der Behandlung von Asthma unter Verwendung eines murinen präklinischen Asthma-Modells analysiert werden.

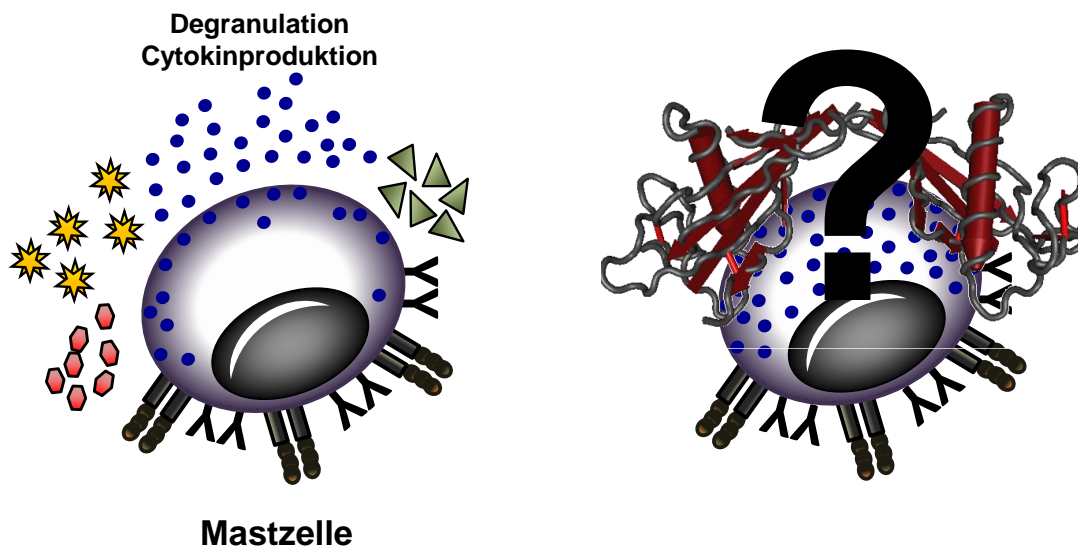


Abbildung 4: Fragestellung der Arbeit

Mastzellen sezernieren nach Stimulation ein breites Spektrum an Cytokinen und anderen Mediatoren. Der Einfluss des Zeckenspeichelproteins Sialostatin L auf diese Effektorfunktionen ist bisher unbekannt.

## Material und Methoden

### 2. Material und Methoden

#### 2.1. Chemikalien

Standardchemikalien wurden von Roth (Karlsruhe, Deutschland), Fluka (Buchs, Schweiz) oder Sigma (Buchs, Schweiz) in p.a. („*pro analysis*“) Qualität bezogen: ABTS, Acrylamid/bisacrylamid 1:29 (Rotiphorese Gel-40), Ammoniumhydrogenphosphat, Ammoniumperoxisulfat, BSA, Bromphenolblau, DTT (99%), Chloroform, EDTA, Ethanol, Essigsäure, Formaldehyd, Glycin, Glycerin, Glycogen, Harnstoff, Ionomycin, Isopropanol, Magermilchpulver, Magnesiumchlorid, Methanol (99,8%), Natriumazid, Natriumchlorid, Natriumhydrogenphosphat, Paraformaldehyd, Phosphorsäure, R-LPS, Salzsäure, Saponin, Sucrose, SDS, TEMED, Tris Base, Tris-HCl, Tween20.

mIL-9 Standard

affinitätsgereinigtes, natives IL-9,  
Mainz, Deutschland

mrInterleukin- 1 $\beta$

R&D Systems, Minneapolis  
Deutschland

## Material und Methoden

### 2.2. Geräte und Hilfsmittel

2100 Bioanalyzer®	Agilent, Santa Clara, USA
Analytische Waage, CP64	Sartorius, Göttingen, Deutschland
BioPhotometer plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Bioruptor® plus	Diagenode, Seraing, Belgien
Bunsen Brenner, Fireboy eco	Integra Bioscience, Chur, Schweiz
CO <sub>2</sub> –Inkubatoren, Hera cell 150	Heraeus, Hanau, Deutschland
Einfriergefäß, Nalgene	Thermo, Karlsruhe, Deutschland
ELISA-Reader, Spectra Fluor Plus	Tecan, Crailsheim, Deutschland
ECL-Substrat Super Signal West Femto (#34096)	Thermo, Karlsruhe, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop, IX81F	Olympus, Hamburg, Deutschland
Gel Dokumentationssystem, ChemiDoc XRS	BioRad, München, Deutschland
Gene Pulser II	BioRad, München, Deutschland
Heizblock, Rotilabo® - Block Heater H250	Roth, Karlsruhe, Deutschland
iCycler	BioRad, München, Deutschland
Kryoröhrchen	Merck, Darmstadt, Deutschland
Laminar flow, MSC-Advantage	Thermo, Karlsruhe, Deutschland
Luminometer TD20/20	Turner-Designs, Sunnyvale, USA
Marker SM1812 Page Ruler™ Protein Ladders Plus Prestained (10-250kDa)	Thermo, Karlsruhe, Deutschland
Mikropipette	Gilson, Middleton, USA
Mikroskop, CKX41	Olympus, Hamburg, Deutschland

## Material und Methoden

MiSeq Desktop Sequencer	Illumina, San Diego, USA
Multipipette	Dunn Labortechnik GmbH
Netzteil, EPS 3500 XL	Amersham Pharmacia Uppsala, Schweden
Nitrocellulosemembran, Roti-NC 0,2 µm	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PAGE-Equipment (1D-PAGE), Mini-PROTEAN®	BioRad, München, Deutschland
Präparierbesteck	Hammacher, Solingen, Deutschland
PVDF Membran, Immobilion®-P, 0,45 µm	Millipore, Billerica, USA
pH Meter, CG 840	Schott, Mainz, Deutschland
Schwenkinkubator, Shaker DRS-12	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
Semi-dry Apparatur, Transblot SD	BioRad, München, Deutschland
Ultraschallbad,	Schalltec, Mörfelden-Walldorf, Deutschland
Ultraschallzerstäuber NE-U17	Omron, Kyoto, Japan
Vortexer	VWR, Darmstadt, Deutschland
Waage, 1202 Sartorius	Sartorius, Göttingen, Germany
Wasserbad, WB22	Preiss-Daimler, Grumbach, Deutschland
Whatman-Papier	Whatman, München, Deutschland
Zählkammer, Neubauer Counting Chamber	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifugen:	
Biofuge <i>fresco</i>	Heraeus, Hanau, Deutschland
Multifuge 3L-R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Galaxy mini	VWR, Darmstadt, Deutschland

## Material und Methoden

### 2.3. Plastik- und Glaswaren

Multi-Flex®-Tips (0,5 - 200 µl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Elektroporationsküvette 4mm	BioRad, München, Deutschland
Reaktions tubes (0,5; 1,5; 2 ml)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Reaktions tubes LowBind (0,5 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktions tubes (0,5; 1,5; 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reagenzgefäße (15; 50 ml)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Gummihandschuhe	Maimed, Neuenkirchen, Deutschland
Petrischale	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
UNITIPS® (10, 200, 1000 µl)	High tech lab, Warsaw, Polen
96-Well V-Boden Platte	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
96-Well Suspensionsplatte	
96-Well Gewebekulturplatte	
48-Well-Gewebekulturplatte	
24-Well Gewebekulturplatte	
6-Well Suspensionsplatte	
6-Well Gewebekulturplatte	
96-Well (Maxisorb, für ELISA)	Nunc/Thermo, Karlsruhe, Deutschland
Zellsieb 0,45µm	Greiner, Frickenhausen, Deutschland

## Material und Methoden

### 2.4. Puffer

Block Puffer (Western Blot, FK2)	5 % Milchpulver in TBS-T / 5% BSA in TBS-T
Block Puffer (ELISA):	PBS[1x] mit 0,1 %BSA
10 X Blot Puffer	250 mM Tris; 1,9 M Glycin
1 X Blot Puffer	200 ml Methanol 700 ml dH <sub>2</sub> O 100 ml 10 X Blotpuffer 400 µl 10 % (w/v) SDS in dH <sub>2</sub> O
Rinderserumalbumin (BSA)	10% (w/v) BSA 0,2 µm sterilfiltriert
Elektrophorese Puffer	25 mM Tris HCl 190 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
FACS Puffer	PBS 1 % BSA 0,02 % Natrium Acid
GM- Puffer (Großer MACS- Puffer)	PBS 0,5%BSA 5 mM EDTA 0,1 % NaN <sub>3</sub>

## Material und Methoden

Gey's Lysepuffer	8,29 g/l NH <sub>4</sub> Cl 1 g/l KHCO <sub>3</sub> 0,037 g/l EDTA pH: 7,4
Harnstoff Puffer	0,1 M Tris 8 M Urea pH mit HCl auf 8,5 einstellen.
Kopplungspuffer	0,1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 9,2
5 X Lade Puffer	40 % (w/v) Glycerin 6,82 % (w/v) Tris Base 6,66 % (w/v) Tris HCl 8 % (w/v) SDS 0,06 % (w/v) EDTA 0,075 % (w/v) Serva Blau G250 (Bromphenolblau) 0,025% (w/v) Bromphenolrot
MEM (Minimal Essential Medium)	MEM Trockenpulver 1 % Penicillin/Streptomycin 50 µM -Mercaptoethanol 2 % FCS
Natrium-Pyruvatlösung	0,1M in dH <sub>2</sub> O sterilfiltriert (0,2 µM)

## Material und Methoden

Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	0,8 % (w/v) NaCl 0,02 % (w/v) KCl 0,142 % (w/v) Dinatriumhydrogenphosphat 0,027 % (w/v) Kaliumhydrogenphosphat
Sammelgel Puffer	0,5 M Tris-HCl (pH = 6,8)
Sammelgel	0,5 ml Acrylamid 40% 1:29 1,2 ml Sammelgel Puffer 3,2 ml dH <sub>2</sub> O 50 µl SDS (10% w/v) 25 µl APS (10% w/v) 5 µl TEMED
SDS-PAGE Elektrophorese Puffer	25 mM Tris 190 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
Substratpuffer (ELISA)	40 mM Zitronensäure 60 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 4,4
TBS mit Tween 20 (TBS-T)	TBS mit 1 % (w/v) Tween 20
TE-Puffer	10 mM Tris 1 mM EDTA (pH: 8) in dH <sub>2</sub> O autoklaviert

## Material und Methoden

Trenngel Puffer	1,5 M Tris-HCl (pH = 8,6)
Trenngel	2,5 ml Acrylamid 40% 2,5 ml Trenngel Puffer 4,8 ml dH <sub>2</sub> O 100 µl SDS (10% w/v) 50 µl APS (10% w/v) 10 µl TEMED
Tris gepufferte Salzlösung (TBS)	150 mM NaCl 12,7 mM Tris auf pH 7,4 eingestellt
Trypanblau Lösung	0,05 % (w/v) Trypanblau 140 mM NaCl 10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Waschpuffer (ELISA)	0,1 % Tween 20 in PBS[1x]

## Material und Methoden

### 2.5. Kits

660 nm Protein Assay	Thermo, Karlsruhe, Deutschland
QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies, Kronberg, Deutschland
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega, Mannheim, Deutschland
TRI Reagent®	Thermo, Darmstadt, Deutschland
SimpleChIP® Enzymatic Chromatin IP Kit (Magnetic Beads)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland
PureLink™ HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit Quick Plasmid Miniprep Kit	Thermo, Darmstadt, Deutschland

### 2.6. Tiere

Mäuse des Stammes C57BL/6 wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) erworben und im TARC („Translational Animal Research Center“, Mainz Deutschland) gezüchtet. *Irf4*-defiziente Mäuse auf einem C57BL/6 Hintergrund wurden von Prof. Magdalena Huber (Marburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt<sup>108</sup>. *Il1a/b*- und *Il1r1*- defiziente Mäuse auf einem genetischen C57BL/6 Hintergrund wurden von Prof. Esther von Stebut-Borschitz (Mainz, Deutschland) zur Verfügung gestellt<sup>109,110</sup>. Des Weiteren wurden mastzelllose Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> Mäuse auf dem C57BL/6 Hintergrund in dem TARC gezüchtet und ursprünglich von Prof. Marcus Maurer importiert (Charite, Berlin, Deutschland)<sup>111</sup>. Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Experimente zwischen 4 und 14 Wochen alt und wurden zuvor unter sterilen Bedingungen gehalten. Alle Versuche wurden im Einklang mit den Institutionsrichtlinien durchgeführt.

### 2.7. Primärzellen

Die verwendeten Primärzellen in dieser Arbeit waren murine Knochenmarkszellen, welche *in vitro* zu BMDC („bone marrow-derived mast cells“) differenziert wurden.

## Material und Methoden

### 2.8. Verwendete Oligonukleotide “Primer”

#### 2.8.1. Primer für die Chromatin Immunpräzipitation

*Il9 prom* (-285 to -265).for: 5'-TTTTAAAGGGGGTTGGGGCT-3'

*Il9 prom* (-174 to -194).rev: 5'-AGGCTGTCTTATGCCAGGAA-3'

*Il1 prom* (-1222 to -1202).for: 5'-GCTCCCTCAGCTTAAGCACA-3'

*Il1 prom* (-1034 to -1054).rev: 5'-ATCGTGGTGGAAATGGGCAT-3'

### 2.9. Plasmide

IL-9 - Promoter-pGL-3 (*Il9 prom*):

Der *Il9* Promoter (-610 bis +32 des 5`-Bereiches des murinen *Il9* -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, Deutschland).

Über eine BamHI- und eine HindIII- Schnittstelle wurde dann der IL-9-Promoter in den promoterlosen pGL3 Basis- Luciferase- Reporter-genvektor der Firma Promega (Mannheim, Deutschland) kloniert. Das Plasmid wurde *Il9 prom* genannt.

## Material und Methoden

IL-1b – Promoter-pGL-3 (*Il1b prom*)

Der *Il1b* Promoter (-758 bis -1308 des 5'-Bereiches des murinen *Il1b* Gens) wurde mittels PCR amplifiziert. Es wurden folgende Primer verwendet:

mIL-1b- Prom. for: 5'-CCGGATCCGAAGTGCGTGTCTCTCC-3'

mIL-1b- Prom. rev: 5'-GTGTAAGCTTAGAGGATCCCAGATGAGC-3'

Über eine BamHI- und eine HindIII- Schnittstelle wurde dann der *Il1b*-Promoter in den promoterlosen pGL3 Basis- Luciferase- Reporter-genvektor der Firma Promega (Mannheim, Deutschland) kloniert. Das Plasmid wurde *Il1b prom* genannt.

pcDNA3.1 Thermo, Darmstadt, Deutschland

In pcDNA3.1 wurde das *Irf4* Gen unter Kontrolle des CMV- Promoter geklont.

## 2.10. Antikörper

### 2.10.1. Western Blot Antikörper

Ziege anti-IRF-4 (M-17) : sc-6059 Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg,  
Polyklonal IgG Deutschland

Esel anti-Ziege IgG-HRP: sc-2020 Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg,  
Deutschland

Anti-β-Aktin-HRP, AC-15 Sigma-Aldrich, Buchs, Schweiz  
A3854

### 2.10.2. FACS Antikörper

anti-Maus IL-9, PE, Ratte IgG1κ, BioLegend GmbH, Fell, Deutschland  
RM9A4 514103

## Material und Methoden

Anti-Maus IL-1 beta Pro-form APC, Ratte IgG1 $\kappa$ , NJTEN3	eBioscience, Frankfurt, Deutschland 17-7114
Ratte IgG1 $\kappa$ Isotypenkontrolle APC Deutschland	eBioscience, Frankfurt, 17-4301
Ratte IgG1 $\kappa$ Isotypenkontrolle PE	eBioscience, Frankfurt, Deutschland 12-4301
Anti-Maus CD121a (IL-1R1), PE, Armenian Hamster IgG, JAMA-147	BioLegend GmbH, Fell, Deutschland 113505
Anti-Maus CD117 (c-Kit), APC, Ratte IgG2b $\kappa$ , ACK2	eBioscience, Frankfurt, Deutschland 17-1172-81
Anti-Maus Fc $\epsilon$ R1 $\alpha$ , PE, Armenian Hamster IgG, MAR1	eBioscience, Frankfurt, Deutschland 12-5898-81
Armenian Hamster IgG, Isotypenkontrolle, PE	eBioscience, Frankfurt, Deutschland 12-4888
Armenian Hamster IgG, Isotypenkontrolle, APC	eBioscience, Frankfurt, Deutschland 17-4888
Ratte IgG2 $\kappa$ Isotypenkontrolle APC Deutschland	eBioscience, Frankfurt, 17-4031

### 2.10.3. ELISA Antikörper

#### IL-9:

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

Der Klon 229.4 entstand durch die Fusion von Milzzellen einer mit mIL-9 immunisierten Ratte mit Myelomzellen.

Stammlösung 3 mg/ml

## Material und Methoden

2°Antikörper: D9302C12 bio (Hamster-anti-Maus IL-9 biotinyliert)  
Der Klon D9302C12 wurde von Dr. J van Snick (Ludwig Institute for Cancer Research, Brüssel, Belgien) zur Verfügung gestellt.  
Stammlösung 1mg/ml

### IL-6:

1°Antikörper: Ratte-anti-Maus IL-6 (BD Pharmingen, Heidelberg)  
Stammlösung 0,5 mg/ml

2° Antikörper: Ratte-anti-Maus IL-6 biotinyliert  
(BD Pharmingen, Heidelberg)  
Stammlösung 0,5 mg/ml

### 2.10.4. Chromatin- Immun- Präzipitation- Antikörper

Normales Ziegen IgG: sc-2028 Santa Cruz Biotechnology,  
Heidelberg, Deutschland

Ziege anti-IRF-4 (M-17): sc-6059 Santa Cruz Biotechnology,  
Polyklonal IgG Heidelberg, Deutschland

## 2.11. Arbeiten mit Zellen

Alle Arbeiten wurden steril ausgeführt.

### 2.11.1. Zellkulturmedien und Zusätze

Die Medien wurden als Pulver von der Firma PAN Biotech (Aidenbach, Deutschland) bezogen. Vor Gebrauch wurden alle Medien steril filtriert (0,2 µm) und anschließend bei 4°C aufbewahrt.

## Material und Methoden

### 2.11.2. Grundmedien

IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium; eigene Herstellung: Institut für Immunologie, Mainz, Deutschland
MEM	Minimal Essential Medium, eigene Herstellung: Institut für Immunologie, Mainz, Deutschland

### 2.11.3. Medienzusätze

FCS Fötales Kälberserum	wechselnde Anbieter, (2012-2015) Thermo, Darmstadt, Deutschland
Glutamin $\geq$ 99 %, CELLPURE <sup>®</sup>	Carl Roth, GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumpyruvat	Thermo, Darmstadt, Deutschland
Penicillin $\geq$ 96 %	Serva, Heidelberg, Deutschland
Streptomycin $\geq$ 720 U/mg	Serva, Heidelberg, Deutschland
rKit-Ligand	Eigene Herstellung: Institut für Immunologie, Mainz
mIL-3	Eigene Herstellung: Institut für Immunologie, Mainz
mrIL-4	Eigene Herstellung: Institut für Immunologie, Mainz

### 2.11.4. Fertige Zellkulturmedien

Testmedium 10 (TM10)	IMDM, 10% v/v FCS, 2mM L-Glutamin, 1mM Pyruvat, 100U/ml Penicillin, 100mg/ml Streptomycin
Mastzell-Medium	TM10, 20U/ml murines (m)IL-3, 50U/ml mIL-4, 200ng/ml KL.

## Material und Methoden

### **2.11.5. Bestimmung der Lebendzellzahl**

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde eine definierte Menge der Zellsuspension mit physiologischer Trypanblau- Lösung verdünnt. Dabei färben sich tote Zellen blau an, während lebende Zellen aufgrund ihrer intakten Membran ungefärbt bleiben. Mittels einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zahl der lebenden Zellen lichtmikroskopisch bestimmt. Nach Auszählen von 4x4 Einzelquadraten ergibt die ermittelte Zahl (N) durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor (V) und dem Kammerfaktor ( $10^4$ ) die Anzahl der lebenden Zellen pro Milliliter ( $N \times V \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$ ).

### **2.11.6. Präparation von Knochenmarksmastzellen (BMMC)**

5-14 Wochen alte Mäuse wurden durch CO<sub>2</sub>-Begasung getötet und Femur und Tibia der Hinterbeine steril präpariert. Das Knochenmark wurde mit Hilfe einer Spritze (10ml) und Kanülen (0,55x25 mm) mit MEM oder 1xPBS + 1% FCS ausgespült. Das kohärente Knochenmarksgewebe wurde zunächst mehrfach resuspendiert, um eine homogene Zellsuspension zu erhalten. Die Zellen wurden abzentrifugiert (10 min bei 500x g) und mit einem entsprechenden Volumen (1ml pro Maus) Gey's Lysepuffer behandelt, um Erythrozyten zu lysieren. Die Reaktion wurde mit einem Überschuss an PBS abgestoppt. Anschließend wurde die Suspension über ein Zellsieb (0,45µm) gegeben, um Knochenpartikel und Gewebereste abzutrennen. Im Anschluss wurden die Zellen zentrifugiert und in Mastzellfutter aufgenommen (10ml pro Maus)<sup>19,65</sup>.

### **2.11.7. Differenzierung von BMMC aus Knochenmarksvorläuferzellen**

Die Knochenmarkszellen wurden in Mastzellfutter aufgenommen und in einem Volumen von jeweils 1 ml in beschichtete 24-well- Gewebekulturplatten ausgesät. Jeden zweiten Tag wurden die Zellen gefüttert und umgesetzt, indem die Hälfte des Mastzellfutters durch frisches ausgetauscht wurde. Durch vorsichtiges Resuspendieren und Überführen in eine neue Kavität wurden adhärenente Zellen abgetrennt. Dies wurde während der ersten 3-4 Wochen der Kultur alle 2-3 Tage durchgeführt. Nach 4-5 Wochen waren mindestens 95 % der so kultivierten Zellen

## Material und Methoden

BMMC („bone marrow derived mast cells“). Dies wurde durch mastzellspezifische Färbungen auf FcεR1α und CD117 im FACS bestätigt.

### 2.11.8. Stimulation von Mastzellen

Mastzellen wurden geerntet, gewaschen, in TM 10% aufgenommen und durch die Zugabe von Ionomycin stimuliert. Die Endkonzentration an Ionomycin in den Testansätzen betrug 0,5µM, 0,75µM oder 1µM (je nach der biologischen Aktivität der verwendeten Ionomycin- Präparation). Zusätzlich wurden die Zellen in An- oder Abwesenheit von mrlL-1β (300pg/ml) und Sialostatin L in verschiedenen Konzentrationen (1,5; 3,0; 6,0 µM) stimuliert.

Ionomycin simuliert *in vitro* die Stimulation über den FcεR1α, indem es einen Calcium Influx in das Cytoplasma verursacht.

### 2.11.9. Degranulationsassay

Mastzellen wurden über Nacht mit 2,5µg/ml IgE-anti-DNP (SPE-7, Eigene Herstellung) sensibilisiert und anschließend mit 1µg/ml anti-IgE für 30 min. (EM95.3, Eigene Herstellung) in Tyrode Lösung aktiviert<sup>112,113</sup>. Die Zellen wurden in 0,5% Triton X-100 aufgenommen. Je drei 20µl Aliquots des Zelllysates und korrespondierendem Überstand wurden auf eine 96-Well Mikrotiterplatte überführt. Im Anschluss daran wurden je 50µl Substratlösung (1,3mg/ml *p*-nitrophenyl-*N*-acetyl-β-*D*-glucosamine in 0,1M Natriumcitratpuffer (pH 4,5)) zugegeben und die Platte für 60 min. bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 150µl 0,2M Glycinlösung (pH 10,7) abgestoppt. Die Extinktion wurde bei 410nm im Spektrometer gemessen. Die Ergebnisse wurden als Prozent β-Hexosaminidase Sekretion in das Medium errechnet(%Degranulation).

### 2.11.10. Elektroporation von Mastzellen

Mastzellen wurden mittels Elektroporation transfiziert. Hierzu wurde der Gen Pulser II (BioRad, Darmstadt, Deutschland) sowie 4mm- Elektroporationsküvetten der Firma BioRad verwendet. Die Mastzellen wurden in einem Volumen von 200µl bei 290V und 600µF für ca. 30ms behandelt. Die Zellen wurden auf  $2 \times 10^6$ / 200µl/ Küvette eingestellt und dazu in IMDM ohne Serum aufgenommen. Reportergenkonstrukte

## Material und Methoden

wurden mit einer Konzentration von 8µg/ Ansatz, die verschiedenen Expressionsvektoren unter der Kontrolle eines CMV-Promoters mit einer Konzentration von 4µg/ Ansatz eingesetzt. Als interner Standard wurde die Luciferase aus *Renilla reniformis* unter der Kontrolle des Thymidinkinasepromoters (pRL-Tk) mit einer Konzentration von 300ng/ Ansatz verwendet. Nach der Elektroporation wurden die Zellen in 1ml Mastzellmedium aufgenommen und für 2h bei 37°C im CO<sup>2</sup>-Inkubator inkubiert und anschließend in Mastzellfutter stimuliert.

### 2.11.11. Reporter-genuntersuchungen mit Mastzellen

Die transfizierten Mastzellen wurden mit 0,5 oder 0,375µM Ionomycin über Nacht stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit 50µl „passive lysis buffer“ (PLB) der Firma Promega laut Protokoll lysiert. Die Zellysate wurden bis zur Lumineszenzmessung auf Eis aufbewahrt. Zur Messung der Lumineszenz wurde ein Luminometer (Turner-Design, TD20/20) und das „Dual-Luciferase® Reporter Assay System“ (Promega, Mannheim, Deutschland) verwendet. Es wurde jeweils 10µl Zellextrakt in die Messung eingesetzt. Die Messung wurde jeweils 10 Sekunden bei 60% Signalstärke durchgeführt. Wenn nicht anders erwähnt, wurde nach Anweisung des Herstellers verfahren. Die einzelnen Messwerte wurden über die Renilla- Luciferase-Werte normalisiert.

### 2.11.12. Durchflusszytometrie (FACS<sup>2</sup>)

Zellen können anhand ihrer Größe und Granularität, sowie der Expression verschiedener Oberflächenproteine unterschieden werden. Um Zellen nach diesen Kriterien zu analysieren, bedient man sich der Durchflusszytometrie. Diese Methode beruht auf der Emission und Streuung von optischen Signalen durch Zellen beim Passieren eines Laserstrahls. Hierbei werden die Zellen in einer Lösung durch eine Kapillare gesaugt und passieren im Sensormodul einzeln verschiedene Laserstrahlen mit definierten Wellenlängen. Aus dem hierbei emittierten Licht können verschiedene Zelleigenschaften abgeleitet werden. Das Streulicht wird durch Zellgröße, die Struktur der Zellmembran sowie intrazelluläre Bestandteile beeinflusst. Zwei Parameter sind hierfür von Bedeutung. Zum einen das Vorwärtsstreulicht FSC

---

<sup>2</sup> „Fluorescence Activated Cell Sorting“, synonym für Durchflusszytometrie; geschützte Handelsmarke der Firma Becton Dickinson (BD)

## **Material und Methoden**

(„forward scatter“), das durch Beugung des Lichts hervorgerufen wird. Dieses dient als Maß für die Zellgröße. Zum anderen das Seitwärtsstreulicht SSC („side scatter“), welches durch die Brechung des Lichts hervorgerufen wird. Dieses dient als Maß für die Granularität der Zellen. Zudem kann die Probe vorher mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern, die gegen bestimmte Merkmale gerichtet sind (z.B. CD117), gefärbt werden.

Die Mastzellen wurden 4 Stunden vor der Fixierung mit dem Golgi-Inhibitor Monensin (eBioscience) behandelt. Die Permeabilisierung und Fixierung erfolgte mit dem „Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set“ (eBioscience) nach Angaben des Herstellers.

### **2.12. Arbeiten mit Proteinen:**

#### **2.12.1. Proteinquantifizierung**

Die Proteinquantifizierung wurde mittels Pierce 660 nm Protein Assay von Thermo nach Herstellerangaben durchgeführt.

Dazu wurden in einer 96-Well-Platte je 10 µl der Proben bzw. des Standards [0 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,5 ; 0,75 ; 1 ; 1,5 ; 2 µg/µl BSA in PBS] mit 150 µl der Pierce Reagenz gemischt und die Absorption bei 660 nm in einem Tecan-Reader gemessen. Die Quantifizierung wurde in Excel durchgeführt.

#### **2.12.2. SDS-PAGE**

Die SDS-PAGE („sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis“) ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer relativen Molekülmasse. Durch Erhitzen und Zugabe von 1,4 Dithiothreitol (DTT) werden Disulfidbrücken, Tertiär- und Sekundärstrukturen von Proteinen aufgebrochen und Proteine in lineare Form gebracht. SDS überdeckt die Eigenladung des Proteins und erzeugt eine negative Gesamtladung. Die Proteine wandern bei Spannung zur Anode. Das Polyacrylamid Trenngel wirkt dabei wie ein Sieb. Kleine Proteine wandern schneller hindurch, große langsamer. Das Sammelgel besitzt nur niedrigere Konzentration

## **Material und Methoden**

Acrylamid und einen anderen pH-Wert. Hierdurch werden die Proteine der einzelnen Proben auf gleichem Niveau vor dem Trenngel gesammelt.

Die Lyse der Zellen erfolgte bei 4°C im Bioruptor (Diagenode) mit der Einstellung „high“ in 5 Zyklen (30sec Puls / 30sec ohne Puls). Die Proteinproben wurden in 4X Ladepuffer zu einer einfachen Endkonzentration des Puffers verdünnt, 5 Minuten bei 95°C erhitzt und im Anschluss daran im Gel aufgetrennt.

### **2.12.3. Western Blot**

Um Proteine nach Auftrennung durch eine SDS-PAGE spezifisch durch Antikörper nachweisen zu können, wurden die Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran transferiert. Um Proteine sichtbar zu machen, die auf einer Membran gebunden sind, bedient man sich der spezifischen Antikörperbindung und Chemilumineszenz. Antikörper mit Spezifität für ein bestimmtes zu untersuchendes Epitop binden diesen. Anschließend wird mittels eines Zweitantikörpers gekoppelt mit dem Enzym Meerrettichperoxidase („horseradish peroxidase“, HRP) gegen die Spezies des Erstantikörpers angewendet. Die HRP besitzt enzymatische Fähigkeiten und setzt das Substrat (Clarity™ Western ECL Blotting Substrate / BioRad) Luminol mit Wasserstoffperoxid zu 3-Aminophthalat um, das daraufhin Licht einer Wellenlänge von 425nm emittiert. Licht dieser Wellenlänge wurde mit dem ChemiDoc XRS+ von Bio-Rad gemessen. Die Aufnahmen wurden über das Computerprogramm QuantityOne oder ImageLab4 (BioRad) bearbeitet.

### **2.12.4. ELISA („Enzyme Linked Immunosorbent Assay“)**

Der quantitative Nachweis sezernerter Cytokine (IL-9/IL-6) 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 Erstellen einer Eichgeraden mitgeführt. Die Auswertung der photometrischen Messung erfolgte in Excel (Microsoft Corp., Redmont, WA, USA) mit Hilfe eines Makros, für dessen Entwicklung wesentlich S. Jin (Institut für Immunologie, Universität Mainz) verantwortlich war.

## Material und Methoden

### 2.12.5. Sialostatin L Präparation

Sialostatin L wurde in *Escherichia coli* exprimiert und durch die Arbeitsgruppe um Michalis Kotsyfakis gereinigt wie bereits beschrieben<sup>98</sup>. Die Reinigung von Endotoxinen wurde durch die Firma Arvys Proteins (Stamford, USA) durchgeführt. Es wurden näherungsweise  $<3 \times 10^{-14}$ g Endotoxin/ $\mu$ g Protein mittels einem sensitiven fluoreszenzbasiertem Endotoxinassay ermittelt (PyroGene recombinant factor C endotoxin detection system, Lonza Biologics, Basel, Schweiz)

### 2.13. Arbeiten mit Nukleinsäuren

#### 2.13.1. Puffer und Reagenzien für das Arbeiten mit DNA

**dNTP** (2'-Desoxynucleosid-5'-Triphosphate) wurden als Set von je 25 $\mu$ mol dATP, dCTP, dGTP und dTTP in einer Konzentration von 100mM (MBI Fermentas/ Thermo, Karlsruhe, Deutschland) 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.

**Hexanukleotide** p(dN<sub>6</sub>) (Roche, Mannheim, Deutschland): 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 Stammlösung (2 $\mu$ g/ $\mu$ l) wurde aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. Die Arbeitslösung besaß eine Konzentration von 20ng/ $\mu$ l.

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

## **Material und Methoden**

**SYBR Green.** Es wurden der SYBR® Green ER™ qPCR SuperMix for iCycler der Firma Thermo verwendet.

**Tris/HCl** (Tris/Hydroxymethyl)-Aminomethan) wurde als 10nM Lösung angesetzt, der pH mit konzentrierter HCl auf pH 8 eingestellt und die Lösung autoklaviert.

### **2.13.2. Isolierung von Nukleinsäuren**

#### **2.13.2.1. Isolierung von Plasmid- DNA**

Zur Isolierung von Plasmid- DNA wurde ein System mit Anionenaustauscher- Säulen von Thermo (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Hierbei kamen zwei unterschiedliche Größen zum Einsatz:

PureLink™ HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit

PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit

#### **2.13.2.2. RNA Isolierung**

Es wurden  $1-2 \times 10^6$  Zellen mit 500 x g für 5min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen in 1000µl TRI-Reagent (Thermo, Darmstadt, Deutschland) resuspendiert. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -70°C aufbewahrt. Die RNA-Extraktion erfolgte nach Angaben des TRI-Reagent Herstellers.

#### **2.13.2.3. Präzipitation von Nukleinsäuren**

Die Präzipitation mit Ethanol oder Isopropanol ist ein einfaches Verfahren, um RNA oder DNA zu präzipitieren. Die DNA- oder RNA-Lösung wurde zunächst entweder mit 1 Volumen Isopropanol oder mit 3 Volumen Ethanol + 0,1-0,2 Volumen Natriumacetat- Lösung (3M, pH 5,2) versetzt und gut durchmischt. Bei der Präzipitation von RNA wurde standardgemäß 30µg Glykogen zugesetzt und kopräzipitiert. Für DNA- Lösungen erfolgte die Präzipitation für mindestens 60 min bei -20° C, während RNA- Lösungen für mindestens 2 Stunden bei -20°C präzipitiert wurden. Nach der Inkubation wurden die Präzipitate durch Zentrifugation für 15 min bei 14000 Upm sedimentiert. Die präzipitierte DNA oder RNA wurde mit 1000µl 70% Ethanol in DEPC-H<sub>2</sub>O bei RNA oder autoklaviertem H<sub>2</sub>O bei DNA (auf -20°C gekühlt)

## Material und Methoden

gewaschen und erneut bei 14000 Upm für 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgezogen, die DNA oder RNA an der Luft getrocknet und anschließend in TE- Puffer (DNA) oder DEPC-H<sub>2</sub>O (RNA) aufgenommen. Die Konzentration der Nucleinsäuren wurde photometrisch (BioPhotometer plus, Eppendorf) oder mit dem Qubit® RNA HS Assay Kit (Thermo) bestimmt. Die Präparate wurden bei -20°C aufbewahrt. Die Qualität der RNA-Proben wurde mit Qubit (Thermo) und dem 2100 BioAnalyzer mit dem „Agilent RNA 6000 Nano Kit“ (Agilent) gemessen. Nur RNA mit einem „RNA Integrity Number“ (RIN) Wert von über 8 wurde verwendet.

### 2.13.3. Chromatin Immuno-Präzipitation (ChIP)

Es wurde das SimpleChIP® Enzymatic Chromatin IP Kit (Magnetic Beads) #9003 (New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland) verwendet. Die Chromatin-Immuno-Präzipitation (ChIP) wird genutzt, um *in vivo* Protein-DNA-Interaktionen in einer Zelle nachzuweisen. Nach Fixierung der Zellen mittels Formaldehyd wird die DNA mittels enzymatischer Reaktion oder Sonifizierung in gleich große Fragmente mit einer Größe von ca. 200 bp (Nucleosom) verdaut. Anschließend erfolgt die Immuno-Präzipitation der Protein-DNA-Komplexe mittels eines spezifischen Antikörpers gegen das Protein, dessen Bindung an die DNA untersucht werden soll. Nach dem Eluieren der Chromatin-Fragmente werden die Protein- DNA- Quervernetzungen durch Inkubation bei 95°C und durch Zugabe einer Protease gelöst. Nach Fällung der DNA wird eine PCR mit spezifischen Primern zum Nachweis der Promoter-DNA durchgeführt. In dieser Arbeit wurde das „High Cell ChIP Kit“ mit Protein G-beschichteten magnetischen „Beads“ (Diagenode) verwendet. Für die Chromatin Immunopräzipitation wurden  $2 \times 10^7$  Mastzellen für 24h mit 1µM Ionomycin stimuliert. Die Mastzellen wurden mittels 37%iger Formaldehyd-Lösung in PBS in einem Volumen von 50 ml zu einer Endkonzentration von 1% bei Raumtemperatur für 7 Minuten fixiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Glycin zu einer Endkonzentration von 125 mM abgestoppt. Die Isolation der Kerne erfolgte nach Angaben des Herstellers (Diagenode). Die Chromatinscherung wurde in Anwesenheit eines Protease Inhibitor Cocktails (Roche) bei 4°C im Bioruptor Plus für 10 Zyklen (30sec Puls / 30sec ohne Puls) auf der Einstellung „High“ durchgeführt. Dies resultierte in Chromatinfragmenten mit einer durchschnittlichen Länge von 100-500bp. Es wurde mit anti-IRF4 Antikörper (M-17,

## Material und Methoden

Santa Cruz Biotechnology) oder als Isotypen- Kontrolle mit normalem-Ziegenantikörper (Santa Cruz Biotechnology) nach Angaben des Herstellers präzipitiert. Im Anschluss daran wurde mit der präzipitierten DNA eine konventionelle PCR (35 Zyklen) durchgeführt und die Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen.

### **2.13.4. Agarose-Gelelektrophorese**

Unter einer Elektrophorese versteht man die Bewegung geladener Moleküle in einem elektrischen Feld. Anhand dieser Methode ist es möglich Makromoleküle wie DNA ihrer Größe nach aufzutrennen. Es wurde ein Gel aus Agarose verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Dimer aus D-Galaktose und 3,6-anhydro-L-Galactose. Je nach Konzentration des Gels wandern die DNA-Fragmente unterschiedlich schnell. Zur DNA-Auftrennung wurden 1,5%ige Agarosegele mit TBE-Puffer hergestellt. Das Agarosepulver wird zusammen mit dem TBE-Puffer in der Mikrowelle zum Sieden erhitzt, bis sich das Pulver vollständig gelöst hat. Um die DNA im Gel sichtbar zu machen, wurden pro 100 ml Agarosegel, 2 µl Ethidiumbromid zugesetzt. Bei Ethidiumbromid handelt es sich um einen roten Phenanthridin-Farbstoff, der in die DNA interkaliert. Das Gel wurde in eine horizontale Elektrophoresekammer mit einem integrierten Kamm für die Probenfächer gegossen. Die DNA-Proben wurden mit Ladebuffer versehen und in die Fächer geladen. Die Auftrennung der DNA im Agarosegel erfolgte bei 100V im Laufpuffer (1xTBE). Nach der elektrophoretischen Auftrennung konnten die DNA-Banden unter UV-Licht mit dem Geldoc (BioRad) ausgewertet werden.

### **2.13.5. Mutagenese mit QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit**

Die Mutagenese wurde nach Angaben des Herstellers (Agilent Technologies, Kronberg, Deutschland) mit dem unter 2.9. angegebenen IL-9- pGL3 basic und IL-1b- pGL3 basic Plasmid (*IL9 prom* / *IL1b prom*) durchgeführt. Alle Reagenzien wurden mitgeliefert.

## Material und Methoden

### 2.13.6. Next Generation Sequencing

Für die Präparation der cDNA-Libraries wurden 5µg Total RNA mit einem RIN von mindestens 8 verwendet. Hierzu wurden alle Reagenzien von Illumina nach Angaben des Herstellers gebraucht. Für die Sequenzierung wurden ebenfalls alle Reagenzien und Kits von Illumina bezogen und im MiSeq Instrument nach Angaben des Herstellers gemessen. Im Anschluss daran wurden die Daten mit dem Programm CLC Genomics Workbench (Qiagen) ausgewertet.

### 2.14. *In vivo*- Asthma Experimente

#### 2.14.1. Experimentelles Asthma Protokoll

10 bis 12 Wochen alte C57BL/6 oder Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> Mäuse wurden mit 20µg OVA in 100µl PBS *i.p.* (Grade V, Sigma-Aldrich) an Tag 1 und 14 sensibilisiert. Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> Mäuse wurden 30 Tage vor Versuchsbeginn mit  $5 \times 10^6$  Mastzellen intravenös adoptiv transferiert. Als Kontrolltiere dienten nicht rekonstituierte Tiere. An drei aufeinanderfolgenden Tagen 2 Wochen nach der letzten Immunisierung (Tag 27-29) wurden die Tiere für 20 min mit 30 ml einer 1%igen OVA PBS Lösung mittels eines Ultraschall Zerstäuber (NE-U17; Omron) gereizt. 10µg Sialostatin L wurde *i.v.* und 500ng IL-9 *i.n.* 30 min. vor jeder Reizung appliziert. 24h nach der letzten Reizung wurde die bronchoalveoläre Lavage genommen und Atemwegsüberempfindlichkeit gemessen.

Die Experimente wurden mit der Hilfe von Dr. Sebastian Reuter (III. Med., Mainz, Deutschland) durchgeführt.

## Material und Methoden

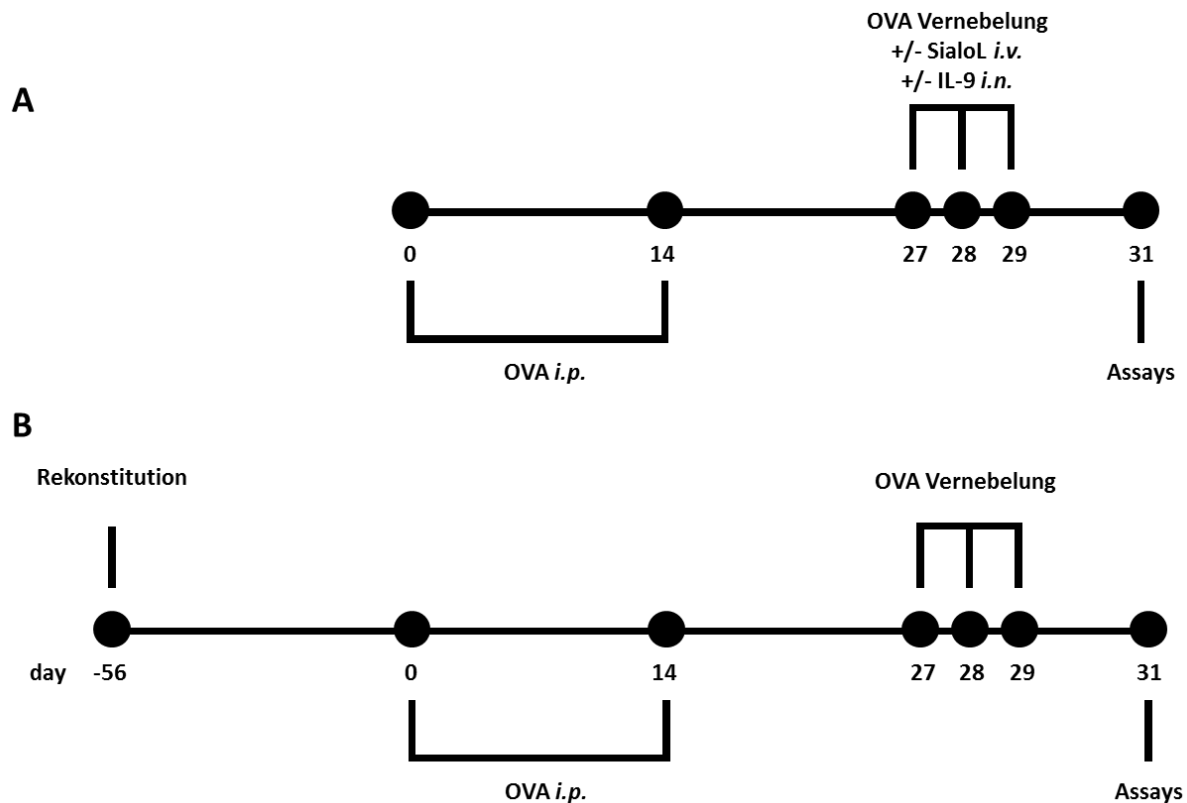


Abbildung 5: Versuchsanordnung der in vivo Experimente

(A) C57BL/6 Mäuse wurden an Tag 0 und 14 mit 20µg OVA in 100µl PBS *i.p.* immunisiert. Anschließend wurden die Tiere an Tag 27-29 mit 30ml einer 1%igen OVA Saline mit einem Ultraschallzerstäuber provoziert. 30 min. vor jeder Provokation wurden die Tiere mit 10µg Sialostatin L *i.v.* oder 500ng IL-9 *intranasal* oder einer Kombination von Beidem behandelt. 24h nach der letzten Reizung wurde die Atemwegsüberempfindlichkeit gemessen und die BAL genommen. Nicht sensibilisierte Tiere dienten als Kontrolle. (B) Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> Mäuse wurden 30 Tage vor Versuchsbeginn mit je  $5 \times 10^6$  Mastzellen adoptiv transferiert. An Tag 0 und 14 wurden die Mäuse mit 20µg OVA in 100µl PBS *i.p.* immunisiert. Anschließend wurden die Tiere an Tag 27-29 mit 30ml einer 1%igen OVA Saline mit einem Ultraschallzerstäuber provoziert. 24h nach der letzten Reizung wurde die Atemwegsüberempfindlichkeit gemessen und die BAL genommen. Nicht rekonstituierte Tiere dienten als Kontrolle.

### 2.14.2. Durchführung der bronchoalveolären Lavage

Nach der Messung der Atemwegsfunktion wurde die Lunge durch einen Trachealtubus mit 1ml PBS gespült. Die absolute Lebendzellzahl wurde lichtmikroskopisch wie in Abschnitt 2.11.7 beschrieben bestimmt. Ein Teil der Zellen wurde auf Objektträger zentrifugiert und mit dem Hemacolor Set (Merck, Darmstadt, Deutschland) fixiert und gefärbt. Die Cytospins wurden lichtmikroskopisch ausgewertet und die absolute Zellzahl an Makrophagen, Lymphozyten, Neutrophilen und Eosinophilen bestimmt.

## Material und Methoden

### **2.14.3. Messung der Atemwegsfunktion**

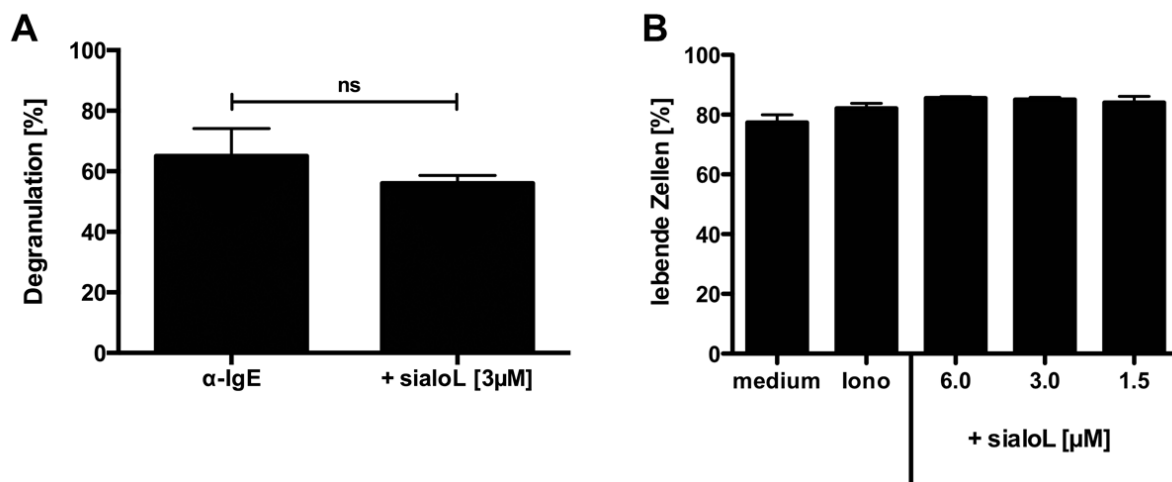
Die Messung des Atemwegswiderstandes wurde an narkotisierten, intubierten und mechanisch beatmeten Mäusen durchgeführt (flexiVent, SCIREQ, Montreal, Canada) in Anwesenheit von verschiedenen Dosen des Bronchokonstriktors Methacholin (0; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 mg/ml) durchgeführt. Die Vernebelungen wurden alle 15 Sekunden durchgeführt, bis eine Plateau Phase erreicht wurde. Der Atemwegswiderstand wurde als Prozentuale Veränderung im Verhältnis zur nicht gereizten Lunge dargestellt.

## Ergebnisse

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Sialostatin L hat keinen Einfluss auf die Degranulation und Zellvitalität von Mastzellen

Die Degranulation, also das Ausschütten von bioaktiven Mediatoren innerhalb von Sekunden nach Aktivierung, zählt zu den Primärfunktionen von Mastzellen. Aus diesem Grund wurde zunächst der Einfluss von Sialostatin L auf die Degranulation von Mastzellen untersucht. Außerdem wurde die Vitalität der Mastzellen nach Sialostatin L Behandlung überprüft, um einen zytotoxischen Effekt von Sialostatin L ausschließen zu können. Hierzu wurden Mastzellen mit Ionomycin in An- oder Abwesenheit von verschiedenen Konzentrationen Sialostatin L stimuliert und wie in Material und Methoden beschrieben die Vitalität mittels Durchflusszytometrie und die Degranulation mittels  $\beta$ -Hexosaminidase Freisetzung ermittelt.



**Abbildung 6: Sialostatin L hat keinen Einfluss auf die Degranulation und Zellvitalität von Mastzellen**

Die Mastzellen wurden mit Ionomycin [Iono, 0,75 $\mu$ M] in An- oder Abwesenheit von verschiedenen Konzentrationen von Sialostatin L [1,5; 3,0; 6,0 $\mu$ M] für 24 h stimuliert. Die Mastzelldegranulation wurde nach Sensibilisierung mit IgE und Quervernetzung mit anti-IgE wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt (A). Im Anschluss daran wurde mittels FACS die Zellvitalität durch Färbung mit „Fixable Viability Dye“ (eBioscience) gemessen (B). Gezeigt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten ( $\pm$ SD). ns  $p > 0,05$  ungepaarter t-Test.

Eine Stimulation der Mastzellen in Anwesenheit von Sialostatin L hat keinen Einfluss auf deren Degranulation (Abb. 6A). Außerdem wirkt Sialostatin L nicht toxisch auf Mastzellen (Abb. 6B). Dies schließt einen unspezifischen toxischen Effekt oder eine

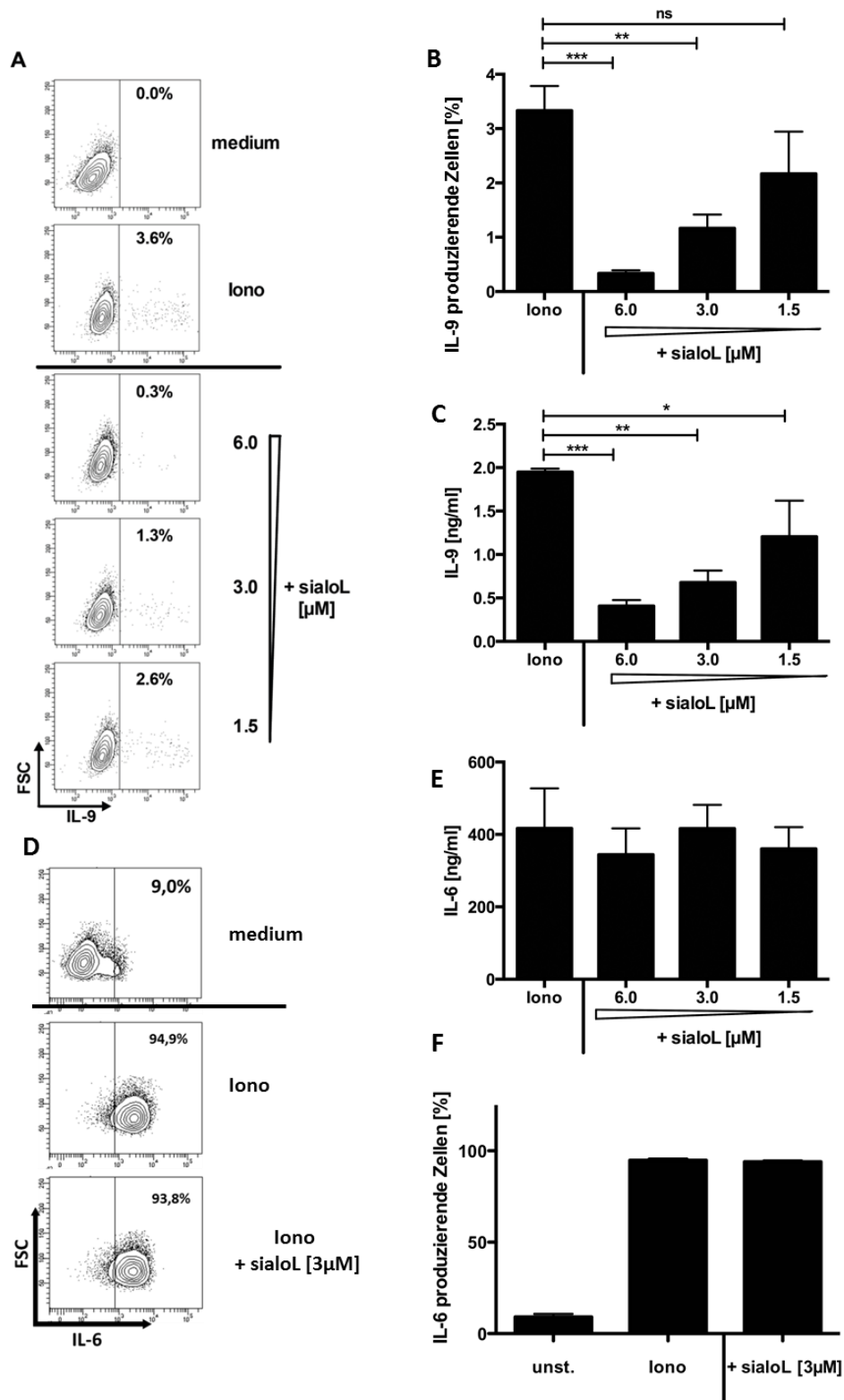
## **Ergebnisse**

komplette, unspezifische Hemmung der Mastzellen durch Sialostatin L aus. In folgenden Versuchen wurde deshalb der Einfluss von Sialostatin L auf die Cytokinsekretion von IL-6 und IL-9 durch Mastzellen untersucht.

### **3.2. Sialostatin L supprimiert spezifisch die Produktion von Interleukin (IL)- 9.**

Um einen möglichen Einfluss von Sialostatin L auf die Cytokinproduktion von Mastzellen zu untersuchen, wurden Mastzellen in An- oder Abwesenheit von verschiedenen Konzentrationen des Zeckenspeichelproteins Sialostatin L mit Ionomycin stimuliert und sowohl in den Kulturüberständen mittels ELISA als auch auf Einzelzellebene die Cytokinproduktion von IL-6 und IL-9 im Durchflusszytometer untersucht.

# Ergebnisse



**Abbildung 7: Sialostatin L inhibiert die Produktion von IL-9.**

Die Mastzellen wurden mit Ionomycin [Iono, 0,75μM] in An- oder Abwesenheit von verschiedenen Konzentrationen von Sialostatin L [1,5; 3,0; 6,0μM] stimuliert. Die IL-9 Produktion wurde mittels Durchflusszytometrie (A,B) oder ELISA (C) nach 48h Stimulation gemessen. Die IL-6 Produktion wurde mittels Durchflusszytometrie (E,F) nach 6h Stimulation oder ELISA (D) nach 24h Stimulation gemessen. Abgebildet ist

## Ergebnisse

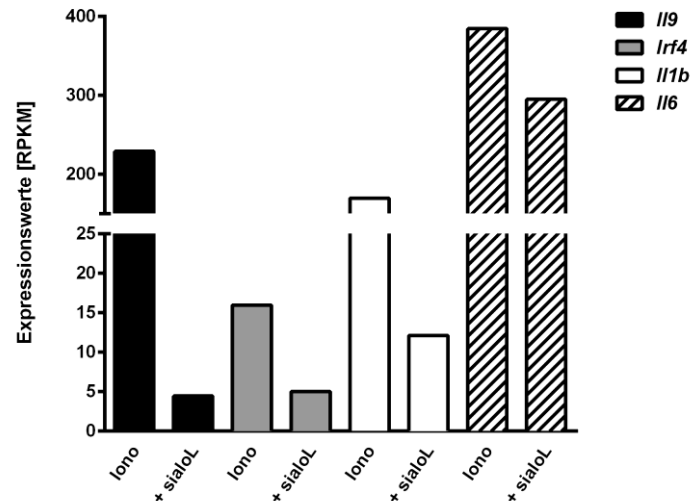
außer bei A und D (ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Versuchen mit gleichem Ergebnis) der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten ( $\pm$ SD). ns  $p > 0,05$ ; \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $\leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ; ungepaarter t-Test.

Wie in Abbildung 7 A, B und C erkennbar, hat Sialostatin L eine inhibierende Wirkung auf die Produktion von IL-9 in Mastzellen auf Einzelzellebene und im Kulturüberstand. Hingegen hat Sialostatin L keinen Einfluss auf die Produktion des proinflammatorischen Cytokins IL-6 auf Einzelzellebene und im Kulturüberstand (Abb. 7 D, E und F). Experimente, bei denen Mastzellen nach Sensibilisierung mit IgE durch Quervernetzung des Fc $\epsilon$ R1 $\alpha$  in An- oder Abwesenheit von Sialostatin L stimuliert wurden, erbrachten ähnliche Ergebnisse (Nicht gezeigt). Daraus geht hervor, dass Sialostatin L selektiv die Produktion von IL-9 in Mastzellen supprimiert. Hingegen bleiben andere Effektorfunktionen wie Degranulation, IL-6 Produktion oder Zellvitalität unbeeinflusst. In weiterführenden Versuchen wurde eine Konzentration von 3 $\mu$ M Sialostatin L verwendet, da ab dieser Konzentration bereits eine signifikante Hemmung des mastzellproduzierten IL-9 von mehr als 50 Prozent gemessen werden konnte. In den folgenden Experimenten wurde das Transkriptom von Mastzellen in An- und Abwesenheit von Sialostatin L untersucht, um einen möglichen Mechanismus der Sialostatin L vermittelten Suppression der IL-9 Produktion in Mastzellen aufzudecken.

### **3.3. Sialostatin L inhibiert die Expression der *Il9*, *Irf4* und *Il1b* Gene.**

Um nähere Einblicke in die Sialostatin L vermittelte spezifische Suppression der IL-9 Produktion in Mastzellen zu erhalten, wurden Mastzellen in An- oder Abwesenheit von Sialostatin L mit Ionomycin für 24h stimuliert. Im Anschluss daran wurde Gesamt-RNA aus den Zellen extrahiert und vergleichendes „Next Generation Sequencing“ durchgeführt.

## Ergebnisse

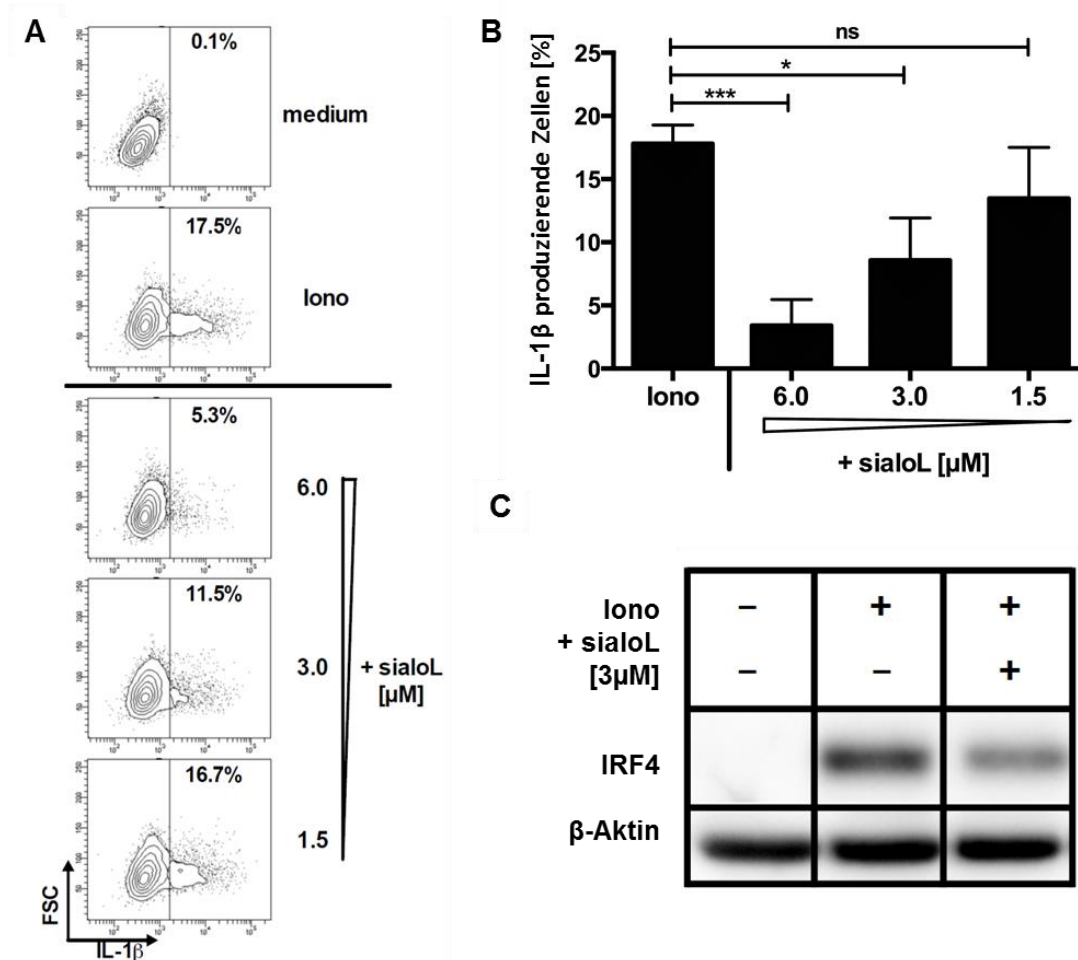


**Abbildung 8: Sialostatin L inhibiert die Expression von *IL9*, *Irf4* und *IL1b*, nicht jedoch *IL6***

Die Mastzellen wurden mit Ionomycin [I, 1  $\mu$ M] für 24h in der An- oder Abwesenheit von Sialostatin L [+sialoL, 3  $\mu$ M] stimuliert. Die Gesamt-RNA-Isolation, „Library“ Präparation und RNA-Sequenzierung wurden wie in Material und Methode beschrieben durchgeführt. Die Anzahl der Transkripte wurde nach Alignment zum RPKM normalisiert („number of reads which map per kilobase of exon model per million mapped reads for each transcript“). Gezeigt ist ein einzelnes Experiment.

Eine Behandlung von Mastzellen mit Sialostatin L führt nicht nur zu einer reduzierten Expression von *IL9*, auch die Expression der *IL1b* und *Irf4* Gene ist stark supprimiert. Hingegen wird die *IL6* mRNA Expression nur marginal beeinflusst (Abb. 8). In früheren Arbeiten wurde bereits demonstriert, dass IRF4 für die Entwicklung von Th9 Zellen und die Produktion von IL-9 in CD4<sup>+</sup> T-Zellen wichtig ist<sup>59</sup>. Auch eine gesteigerte IL-9 Produktion nach zusätzlicher Stimulation von Mastzellen mit IL-1 wurde bereits beschrieben<sup>7</sup>. Um die NGS-Daten auch auf Proteinebene zu bestätigen, wurde die Expression von IL-1 $\beta$  im Durchflusszytometer und IRF4 im Western Blot in An- oder Abwesenheit von Sialostatin L untersucht.

## Ergebnisse



**Abbildung 9: Sialostatin L inhibiert die Produktion von IL-1 $\beta$  und Expression von IRF4 auf Proteinebene**

Die Mastzellen wurden für 24h mit Ionomycin [lono; 0,75 $\mu$ M] in An- oder Abwesenheit von verschiedenen Konzentrationen von Sialostatin L [+sialoL; 1,5; 3,0; 6,0 $\mu$ M] stimuliert. Die IL-1 $\beta$  Produktion wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen (A,B). Die IRF4 Expression wurde durch Immunoblot Analysen mit  $\beta$ -Aktin als Ladekontrolle ermittelt (C). A und C zeigen ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Versuchen mit gleichem Ergebnis. In B wird der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten ( $\pm$ SD) dargestellt. ns  $p > 0,05$ ; \* $p \leq 0,05$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ; ungepaarter t-Test.

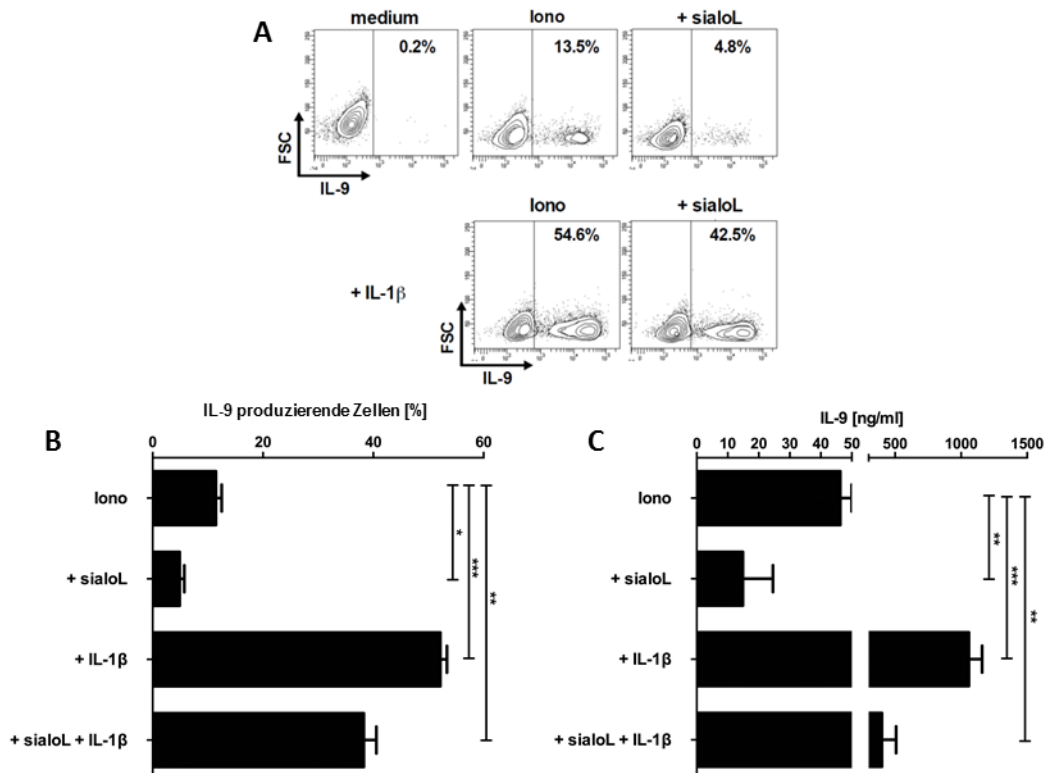
Auch auf Proteinebene konnte der inhibierende Effekt von Sialostatin L auf die Produktion von IL-1 $\beta$  und die Expression von IRF4 in Mastzellen bestätigt werden (Abb. 9 A,B,C). Diese Ergebnisse lassen die Hypothese zu, dass in Mastzellen die Produktion von IL-9 durch eine auto- und parakrine Wirkung von *de novo* synthetisiertem IL-1 $\beta$  potenziert und initiiert wird. Des Weiteren liegt die Vermutung nahe, dass die Sialostatin L vermittelte Inhibition von IL-9 durch die verminderte Expression von IL-1 $\beta$  und IRF4 begründet ist. In den folgenden Versuchen wurde deshalb der Einfluss von IL-1 $\beta$  auf die IL-9 Produktion bei gleichzeitiger Behandlung

## Ergebnisse

von Mastzellen mit Sialostatin L untersucht, um einen möglichen kausalen Zusammenhang zu klären.

### 3.4. Die Sialostatin L vermittelte Suppression der IL-9 Produktion in Mastzellen wird durch exogenes IL-1 $\beta$ nahezu vollständig aufgehoben

Wie in den vorangegangenen Abschnitten dargelegt, inhibiert Sialostatin L die Produktion des Cytokins IL-1 $\beta$  und des Transkriptionsfaktors IRF4, die im Zusammenhang mit der Steuerung der Produktion von IL-9 bereits beschrieben wurden. Aus diesem Grund wurden in den folgenden Versuchen Mastzellen in An- und Abwesenheit von Sialostatin L und exogenem IL-1 $\beta$  stimuliert und die Produktion von IL-9 im ELISA und Durchflusszytometer gemessen.



**Abbildung 10: Die Sialostatin L vermittelte Suppression der IL-9 Produktion in Mastzellen wird durch exogenes IL-1 $\beta$  nahezu vollständig aufgehoben.**

Es wurden Mastzellen mit Ionomycin [lono; 0,75 $\mu$ M] in An- oder Abwesenheit von Sialostatin L [+sialoL; 3,0 $\mu$ M] oder mrIL-1 $\beta$  [+IL-1 $\beta$ ; 300pg/ml] für 48h stimuliert. Die IL-9 Produktion wurde mittels Durchflusszytometrie (A,B) oder ELISA (C) gemessen.

## Ergebnisse

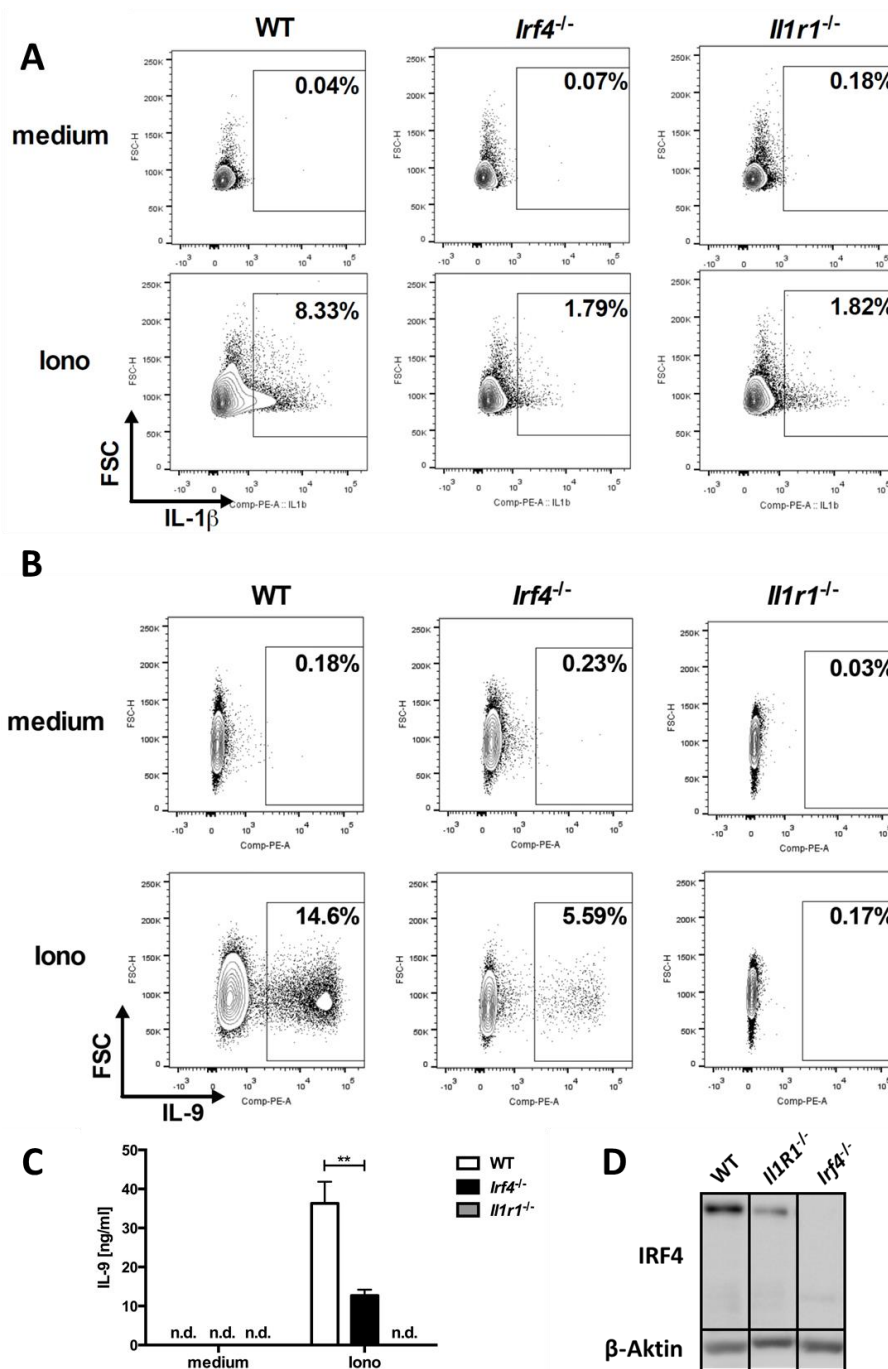
Außer in A (ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Versuchen mit gleichem Ergebnis) wird der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten ( $\pm$ SD) dargestellt. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ; ungepaarter t-Test.

Aus Abbildung 10 geht hervor, dass im Einklang mit bereits publizierten Daten die IL-9-Produktion in Mastzellen durch exogenes IL-1 $\beta$  potenziert wird. Zusätzlich wird deutlich, dass durch exogenes IL-1 $\beta$  die Suppression der IL-9 Produktion durch Sialostatin L zu einem großen Teil aufgehoben wird. Dies bestätigt die Hypothese, dass die Hemmung der IL-9 Produktion durch Sialostatin L indirekt durch eine Hemmung der IL-1 $\beta$  Produktion vermittelt wird. Diese Inhibition der IL-1 $\beta$  Produktion könnte auch auf einer Sialostatin L-vermittelten Suppression des Transkriptionsfaktors IRF4 begründet sein. Dieser Verdacht beruht auf Beobachtungen von Toda et. al. in denen der Transkriptionsfaktor IRF4 an der Regulation des *Il1b* Locus in Monozyten beteiligt ist. Außerdem konnte die Arbeitsgruppe von Chung eine gesteigerte Expression von IRF4 in CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit IL-6 und IL-1 messen<sup>114,115</sup>. Aus diesem Grund wurde in den nächsten Versuchen die Produktion von IL-9 und IL-1 $\beta$  in IRF4-defizienten (*Irf4*<sup>-/-</sup>) und IL-1-Rezeptor 1-defizienten (*Il1r1*<sup>-/-</sup>) Mastzellen nach Ionomycin Stimulus genauer untersucht.

### **3.5. Die IL-9 und IL-1 $\beta$ Produktion in *Il1r1*<sup>-/-</sup> und *Irf4*<sup>-/-</sup> Mastzellen ist verringert**

Um die vorangegangenen Ergebnisse weiter zu bestätigen und die Regulation der IL-9 Produktion in Mastzellen detaillierter zu beschreiben, wurden *Il1r1*- und *Irf4*- defiziente und wildtypische Mastzellen mit Ionomycin stimuliert und die Produktion der Cytokine IL-9 und IL-1 $\beta$  im Durchflusszytometer und ELISA sowie die Expression des Transkriptionsfaktors IRF4 im Western Blot bestimmt.

## Ergebnisse



**Abbildung 11: *Il1r1*- und *Irf4*-defiziente Mastzellen weisen eine verringerte Produktion der Cytokine IL-9 und IL-1 $\beta$  im Vergleich zu Wildtyp Mastzellen auf. Die Expression des Transkriptionsfaktors IRF4 ist in *Il1r1*-defizienten Mastzellen verringert.**

WT, *Il1r1*<sup>-/-</sup> und *Irf4*<sup>-/-</sup> Mastzellen wurden mit Ionomycin [1 $\mu$ M] stimuliert. Die IL-9 Produktion wurde mittels FACS (B) und ELISA (C) nach 48 Stunden gemessen. Die IL-1 $\beta$  Produktion wurde mittels FACS (A) und die IRF4 Expression im Immunoblot (D) nach 24 Stunden Stimulation ermittelt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus drei (A) oder fünf (B,D) unabhängigen Versuchen mit demselben Ergebnis. In C ist der Mittelwert aus fünf unabhängigen Experimenten ( $\pm$ SD) gezeigt. \*\* $\leq 0,01$ ; ungepaarter t-Test.

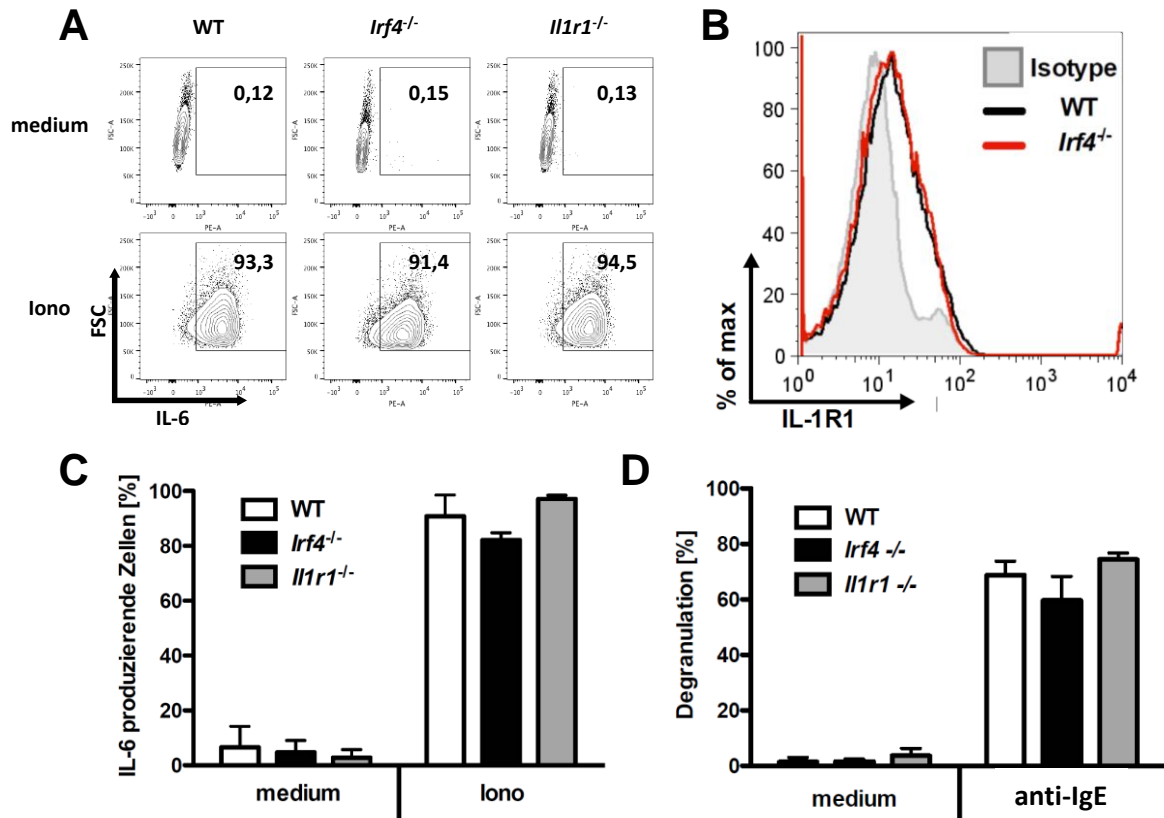
## Ergebnisse

*Il1r1*- defiziente Mastzellen produzieren nach Stimulation mit Ionomycin kein IL-9 (Abb. 11B,C). Auch die IL-1 $\beta$  Produktion ist im Vergleich zu wildtypischen Mastzellen stark reduziert (Abb. 11A). In Korrelation hierzu ist die Expression des Transkriptionsfaktors IRF4 stark reduziert (Abb. 11D). Dies bestätigt die Vermutung, dass die IL-9 Produktion und IRF4 Expression durch eine auto- und parakrine Produktion von IL-1 $\beta$  gesteigert wird. Übereinstimmend zu diesen Beobachtungen produzieren *Irf4*<sup>-/-</sup> Mastzellen weniger IL-9 und weniger IL-1 $\beta$  im Vergleich zu wildtypischen Mastzellen (Abb. 11A,B,C). In weiterführenden Versuchen wurden andere Effektorfunktionen der *Irf4*- und *Il1r1*- defizienten Mastzellen untersucht, um einen allgemeinen Defekt ausschließen zu können.

### **3.6. Eine mastzellspezifische *Il1r1*- und *Irf4* Defizienz hat keinen Einfluss auf die Degranulation und IL-6 Produktion**

In den folgenden Versuchen wurde die Degranulation, IL-6 Produktion und IL-1R1 Expression der *Irf4*- und *Il1r1*- defiziente Mastzellen untersucht, um einen ubiquitären Defekt ausschließen zu können. Hierzu wurden *Irf4*- und *Il1r1*- defiziente Mastzellen mit IgE sensibilisiert und mit anti-IgE quervernetzt, um deren Degranulation zu überprüfen. Die IL-6 Produktion nach Ionomycin Stimulus wurde per Durchflusszytometrie bestimmt. Außerdem wurde in *Irf4*-defizienten Mastzellen die Expression des IL-1R1 im Durchflusszytometer gemessen, um eine mögliche Unempfindlichkeit gegenüber IL-1 $\beta$  aufgrund einer fehlenden Rezeptorexpression auszuschließen.

## Ergebnisse



**Abbildung 12: Eine mastzellspezifische *Il1r1*- und *Irf4*- Defizienz hat keinen Einfluss auf die Degranulation und IL-6 Produktion**

WT, *Il1r1*<sup>-/-</sup> und *Irf4*<sup>-/-</sup> defiziente Mastzellen wurden mit Ionomycin [Iono, 0,75µM] für 6h Stunden stimuliert. Die IL-6 Produktion (A,C) und IL-1R1 Expression (B) wurden mittels FACS bestimmt. Die Mastzelldegranulation wurde nach Sensibilisierung mit IgE und Quervernetzung mit anti-IgE wie in Material und Methoden beschrieben gemessen (C). Gezeigt ist außer bei A und B (ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Versuchen mit gleichem Ergebnis) der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten (±SD).

Eine *Il1r1*<sup>-/-</sup> oder *Irf4*<sup>-/-</sup> Defizienz in Mastzellen hat keinen Einfluss auf primäre Effektorfunktionen wie IL-6 Produktion oder Degranulation. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Signaltransduktionskaskade, die durch den IL-1R1 ausgelöst wird, essentiell für die Expression von IL-9 ist und eine beträchtliche Wirkung auf die Expression von IL-1β hat. Die Regulation der Degranulation und IL-6 Produktion scheint dagegen unabhängig von einem IL-1β-induzierten Signal zu sein. Im Einklang hierzu konnte keine verminderte IL-1R1 Expression auf *Irf4*-defizienten Mastzellen gemessen werden, wodurch eine mögliche Unempfindlichkeit gegenüber IL-1β ausgeschlossen werden kann. Um zu überprüfen, ob die verminderte IL-9 Produktion in *Irf4*-defizienten Mastzellen auf die limitierte Eigenproduktion von IL-1β

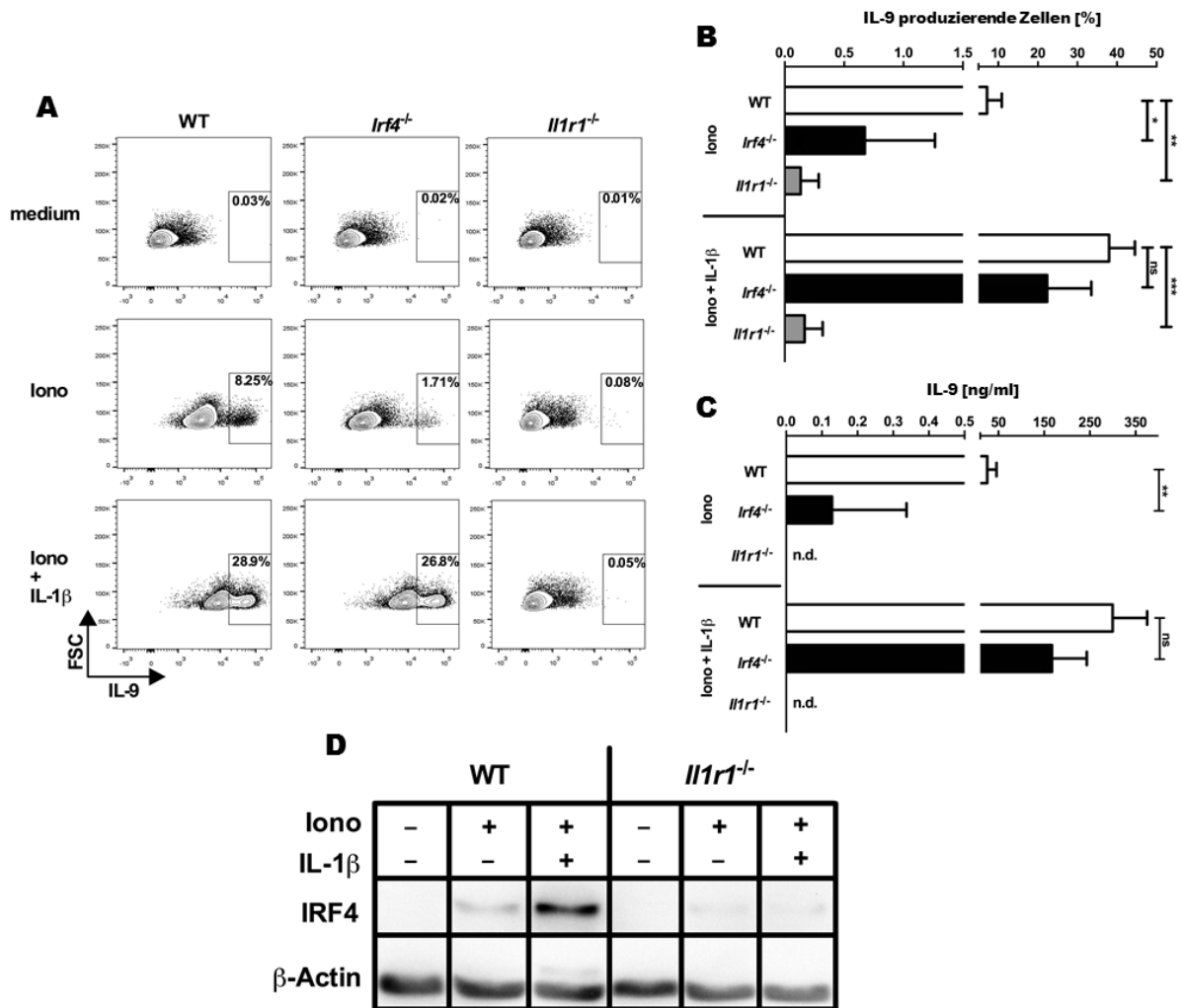
## Ergebnisse

zurückzuführen ist, wurden in weiterführenden Versuchen *Irf4*- und *Il1r1*- defiziente Mastzellen mit Ionomycin und IL-1 $\beta$  stimuliert und die Produktion von IL-9 gemessen.

### **3.7. Exogenes IL-1 $\beta$ steigert die IL-9 Produktion in *Irf4*<sup>-/-</sup> Mastzellen auf das Niveau von wildtypischen Mastzellen**

WT, *Irf4*- und *Il1r1*- defiziente Mastzellen wurden mit Ionomycin und IL-1 $\beta$  stimuliert und die IL-9 Produktion in Überständen per ELISA und auf Einzelzellebene im FACS gemessen. Zusätzlich wurde die IRF4 Expression im Western Blot ermittelt. Hiermit sollte untersucht werden, ob die verminderte IL-9 Produktion in *Irf4*- defizienten Mastzellen auf deren verminderte IL-1 $\beta$  Produktion zurückzuführen ist.

## Ergebnisse



**Abbildung 13:** Die reduzierte IL-9 Produktion in *Irf4*<sup>-/-</sup> Mastzellen kann durch exogenes IL-1β zum Teil aufgehoben werden. Die IRF4 Expression wird durch exogenes IL-1β gesteigert

WT, *Il1r1*- und *Irf4*- defiziente Mastzellen wurden mit Ionomycin [Iono, 0,75μM] in An- oder Abwesenheit von IL-1β [300pg/ml] oder Sialostatin L [3μM] für 48 Stunden stimuliert. Die IL-9 Produktion wurde per Durchflusszytometrie (A und B) und mittels ELISA (C) gemessen. Die IRF4 Expression wurde im Western Blot erhoben (D). Gezeigt ist außer bei A und D (ein repräsentatives Experiment aus 3 oder 4 unterschiedlichen Versuchen mit gleichem Ergebnis) der Mittelwert aus mindestens 3 verschiedenen Versuchen (±SD). ns p>0,05; \*p≤0,05; \*\*≤0,01; \*\*\*p≤0,001; ungepaarter t-Test.

*Il1r1* defiziente Mastzellen produzieren kein IL-9 und reagieren auch nicht auf die zusätzliche Stimulation mit IL-1β. Dies spricht für die absolute Notwendigkeit eines Signals über den IL-1R1 für die Produktion von IL-9 in Mastzellen (Abb. 13A bis C). Im Einklang hierzu konnte eine gesteigerte IRF4 Expression nach Stimulation mit Ionomycin und IL-1β in wildtypischen und eine reduzierte Expression in *Il1r1*<sup>-/-</sup> Mastzellen nachgewiesen werden (Abb. 13D). Die reduzierte IL-9 Produktion von *Irf4*- defizienten Mastzellen kann durch exogenes IL-1β fast vollständig

## Ergebnisse

wiederhergestellt werden. Dies bestätigt die Hypothese, dass die verminderte IL-9 Produktion von *Irf4* defizienten Mastzellen auf die verminderte IL-1 $\beta$  Produktion zurückzuführen ist.

In folgenden Versuchen wurden *Irf4*<sup>-/-</sup> Mastzellen in An- oder Abwesenheit von Sialostatin L stimuliert und die Produktion von IL-9 ermittelt, um den Einfluss von Sialostatin L auf die Produktion von IL-9 durch die Hemmung der Expression des Transkriptionsfaktors IRF4 zu prüfen.

### 3.8. Sialostatin L hat kaum Einfluss auf die IL-9 Produktion von *Irf4*<sup>-/-</sup> Mastzellen

WT und *Irf4*<sup>-/-</sup> Mastzellen wurden in An- oder Abwesenheit von Sialostatin L und IL-1 $\beta$  mit Ionomycin stimuliert und die IL-9 Produktion im Durchflusszytometer gemessen. Damit sollte geklärt werden, ob die Sialostatin L vermittelte Suppression von mastzellproduziertem IL-9 auf einer Hemmung der Expression des Transkriptionsfaktors IRF4 beruht.

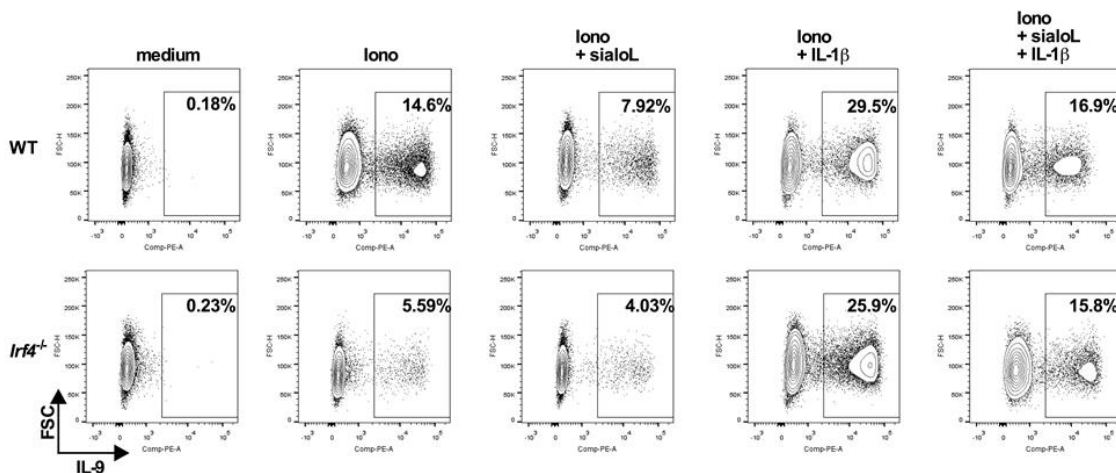


Abbildung 14: Sialostatin L hat kaum Einfluss auf die IL-9 Produktion von *Irf4*<sup>-/-</sup> Mastzellen

WT und *Irf4*<sup>-/-</sup> Mastzellen wurden mit Ionomycin [Iono, 0,75 $\mu$ M] in An- oder Abwesenheit von IL-1 $\beta$  [300pg/ml] oder Sialostatin L [3 $\mu$ M] für 48 Stunden stimuliert. Die IL-9-Produktion wurde per Durchflusszytometrie gemessen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus zwei unterschiedlichen Versuchen mit gleichem Ergebnis.

Sialostatin L hat kaum Einfluss auf die IL-9 Produktion von *Irf4*<sup>-/-</sup> Mastzellen (Abb. 14). Auch nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  kann Sialostatin L die Produktion von IL-9 nur zum Teil hemmen. Dies bekräftigt die Annahme, dass

## Ergebnisse

Sialostatin L die IL-9 Produktion indirekt über die Hemmung von IRF4 und somit IL-1 $\beta$  supprimierte.

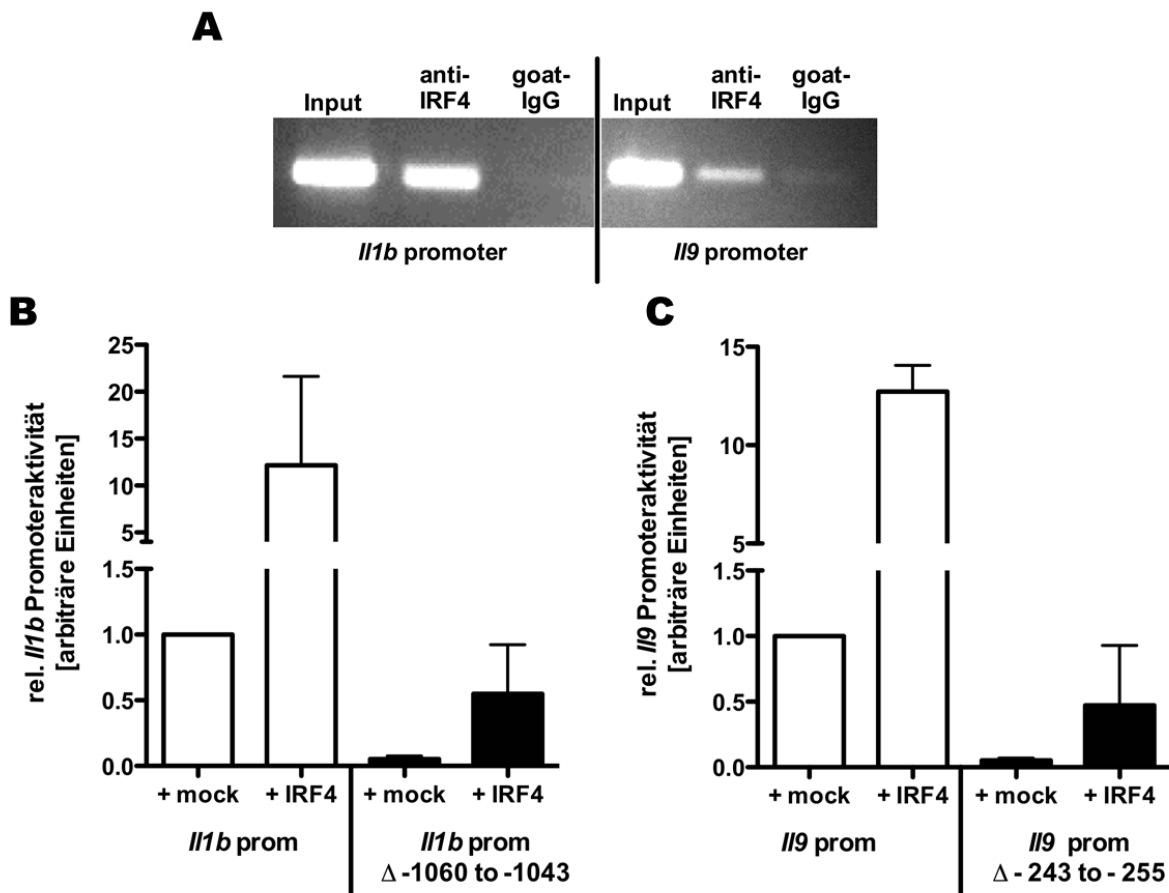
Folglich scheint der Transkriptionsfaktor IRF4 maßgeblich an der initialen Regulation der Cytokine IL-9 und IL-1 $\beta$  beteiligt zu sein. Aus diesem Grund wurde in den folgenden Versuchen unter Zuhilfenahme von Reporter-gen- und Chromatin Immunpräzipitations (ChIP)-Analysen der Einfluss des Transkriptionsfaktors IRF4 auf die *Il9* und *Il1b* Regulation eingehend untersucht.

### **3.9. Der Transkriptionsfaktor IRF4 bindet und transaktiviert in Mastzellen den *Il9* und *Il1b* Promoter**

In den vorangegangenen Abschnitten wurde dargelegt, dass die Expression des Transkriptionsfaktor IRF4 durch Sialostatin L in Mastzellen reduziert wird und damit einhergehend eine supprimierte IL-9 und IL-1 $\beta$  Produktion gemessen wurde. Zudem konnte im Einklang hiermit eine reduzierte IL-9 und IL-1 $\beta$  Produktion in *Irf4*<sup>-/-</sup> Mastzellen beobachtet werden, während die IL-6 Produktion und Degranulation von Mastzellen weitestgehend unbeeinflusst blieben und *Il1r1*<sup>-/-</sup> Mastzellen kein IL-9 sezernierten. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass Sialostatin L einen geringen Einfluss auf die Produktion von IL-9 in *Irf4*-defizienten Mastzellen hat. Zusammenfassend liegt die Vermutung nahe, dass der Transkriptionsfaktor IRF4 maßgeblich an der initialen IL-9 und IL-1 $\beta$  Regulation beteiligt ist und dass für die Produktion von IL-9 eine positive Rückkopplung durch IL-1 $\beta$  notwendig ist. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde eine ChIP (Chromatin Immunpräzipitation) Analyse durchgeführt, indem Mastzellen mit Ionomycin für 24h stimuliert, anschließend mit Formaldehyd fixiert wurden, Chromatin extrahiert und unter Zuhilfenahme von IRF4 spezifischen Antikörpern IRF4-gebundenes Chromatin extrahiert wurde. Im Anschluss daran wurde mit „Primern“/Oligonukleotiden, die spezifisch für mögliche IRF4 Bindestellen innerhalb des *Il9* und *Il1b* Promoters sind, eine PCR mit den präzipitierten Chromatinfragmenten durchgeführt. Als Negativkontrolle diente eine Präzipitation mit unspezifischen Antikörpern, welche denselben Isotyp wie der verwendete IRF4 Antikörper hatten. Zusätzlich wurden Reporter-genanalysen durchgeführt. Hierzu wurde das Dual Luciferase Assay System von Promega

## Ergebnisse

verwendet. Mastzellen wurden mit *Il9* oder *Il1b* Promoter- Luciferase Reporter in Kombination entweder mit einem für IRF4 codierenden oder korrespondierenden Leervektor transfiziert. Als Kontrolle dienten *Il9* oder *Il1b* Promoter-Luciferase Reporter mit mutierten IRF4 Bindestellen. Im Anschluss daran erfolgte eine Stimulation mit Ionomycin über Nacht mit anschließender Zelllyse. Als interne Kontrolle zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurde ein Plasmid co-transfiziert, welches für eine andere Luciferase unter der Kontrolle des Thymidin-Kinase Promoters codiert.



**Abbildung 15: Der Transkriptionsfaktor IRF4 bindet und transaktiviert den *Il9* und *Il1b* Promoter**

Die Mastzellen wurden für 24h mit Ionomycin [1 $\mu$ M] stimuliert. Im Anschluss daran wurden die IRF4 Bindung an den *Il9* und *Il1b* Promoter per ChIP-Analyse verifiziert (A). Mastzellen wurden mit *Il9* (*Il9* prom) oder *Il1b* (*Il1b* Prom) Promoter-Luciferase Reporter oder Promoter Luciferase Reporter mit mutierten IRF4 Bindestellen (*Il9* prom  $\Delta$  -243 to -255/ *Il1b* prom  $\Delta$  -1060 to -1043) in Kombination entweder mit einem für IRF4 codierenden (+ IRF4) oder korrespondierenden Leervektor (+ mock) transfiziert. Im Anschluss wurden die Mastzellen für 16h mit Ionomycin [0,5 $\mu$ M] stimuliert und Zelllysate und Lumineszenzmessung wie in Material und Methode beschrieben durchgeführt (B,C). A zeigt ein repräsentatives Experiment von vier verschiedenen Versuchen mit gleichem Ergebnis und in B und C wird der Mittelwert aus drei oder fünf verschiedenen Experimenten ( $\pm$ SD) dargestellt.

## Ergebnisse

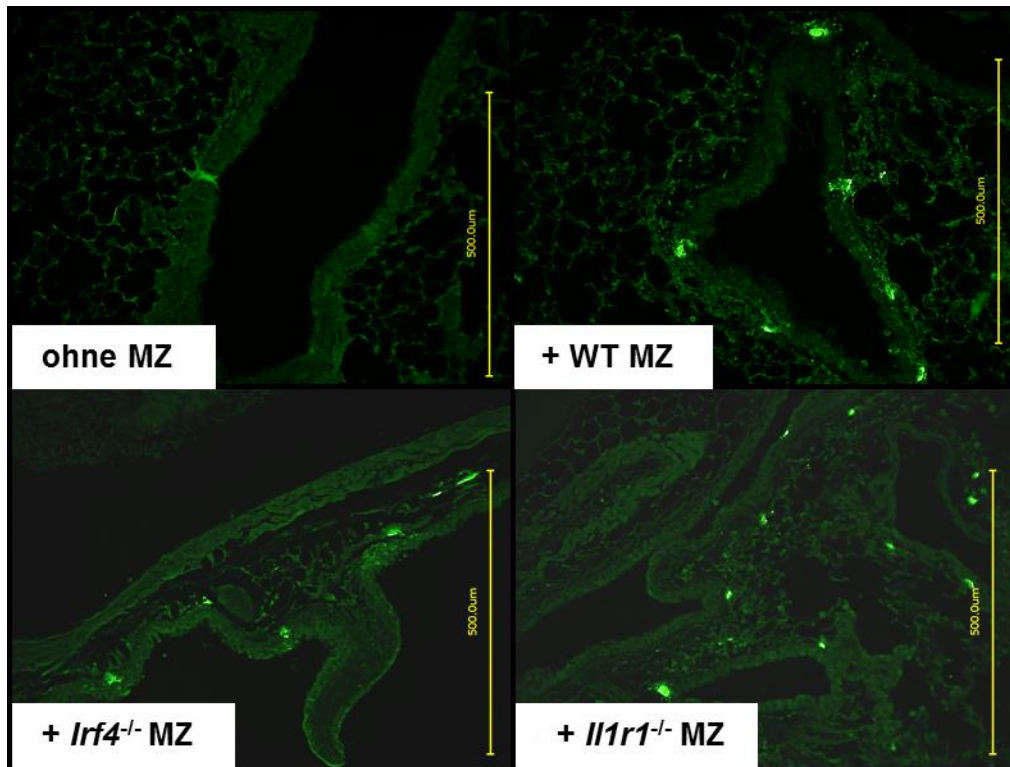
Abbildung 15A bestätigt die Hypothese, dass IRF4 direkt an der Regulation der *Ii9* und *Ii1b* Gene beteiligt ist, da hier eine direkte Bindung an die Promotoren nachgewiesen werden konnte. Eine Überexpression des Transkriptionsfaktors IRF4 führte, wie in Abbildung 15 C und D zu erkennen, zu einer gesteigerten *Ii9* und *Ii1b* Promoteraktivität. Zudem konnten innerhalb des *Ii9* und *Ii1b* Promoters mögliche IRF4 Bindestellen per *in silico* Analyse identifiziert werden. Nach Deletion dieser Stellen war die *Ii9* und *Ii1b* Promoteraktivität deutlich reduziert und auch nach Überexpression des Transkriptionsfaktors IRF4 kaum gesteigert und geringer als die Aktivität der wildtypischen Promotoren ohne Überexpression.

Um die Relevanz dieser Daten auch *in vivo* zu überprüfen, wurde in den nächsten Abschnitten Sialostatin L im experimentellen murinen Asthma Modell therapeutisch angewandt. Zudem wurden mastzelldefiziente *Kit*<sup>W-sh/W-sh</sup> Mäuse mit WT, *Irf4*<sup>-/-</sup> oder *Ii1r1*<sup>-/-</sup> Mastzellen rekonstituiert, um anschließend die Bedeutsamkeit einer mastzellspezifischen Defizienz im experimentellen murinen Asthma Modell zu klären.

### **3.10. Eine mastzellspezifische *Irf4* oder *Ii1r1* Defizienz verringert OVA-induzierte Eosinophilie und AHR im präklinischen murinen Asthma-Modell**

Um die Relevanz der *in vitro* Daten auch *in vivo* testen zu können, wurden mastzelldefiziente *Kit*<sup>W-sh/W-sh</sup> Mäuse wie in Material und Methode beschrieben mit WT, *Irf4*<sup>-/-</sup> oder *Ii1r1*<sup>-/-</sup> Mastzellen rekonstituiert. Die mastzelldefizienten *Kit*<sup>W-sh/W-sh</sup> Mäuse wurden anschließend zusammen mit den rekonstituierten Tieren mittels eines präklinischen Asthma-Modells vergleichend analysiert. Zu diesem Zweck wurden die Tiere mit Ovalbumin sensibilisiert und später an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit Ovalbumin vernebelt bzw. provoziert. Zwei Tage nach der letzten Provokation wurden die Lungenfunktion nach Provokation mittels Metacholin überprüft und die Lunge mit PBS gespült, um infiltrierende Zellen zu extrahieren. Außerdem wurden Lungenschnitte angefertigt und mit Avidin gefärbt, um die Rekonstitution mit Mastzellen nachzuweisen. Siehe auch Abschnitt 2.14.1. Abbildung 5.

## Ergebnisse

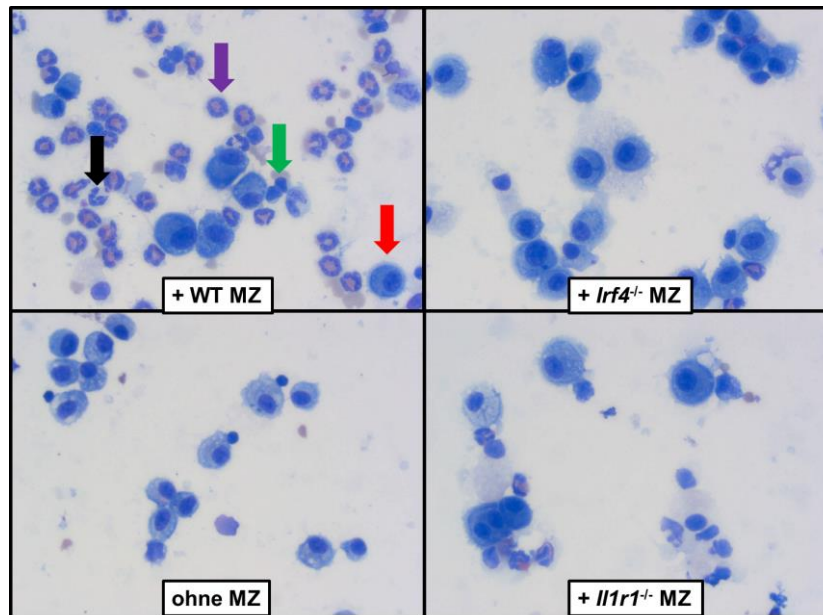


**Abbildung 16:**  $\text{Kit}^{\text{W-sh/W-sh}}$  Mäuse werden unabhängig vom Genotyp der adoptiv transferierten Mastzellen rekonstituiert.

$\text{Kit}^{\text{W-sh/W-sh}}$  Mäuse wurden 30 Tage vor Versuchsbeginn mit jeweils  $5 \times 10^6$  WT,  $\text{Irf4}^{-/-}$ ,  $\text{Il1r1}^{-/-}$  rekonstituiert (+ WT MZ; +  $\text{Irf4}^{-/-}$  MZ; +  $\text{Il1r1}^{-/-}$  MZ). Nicht-rekonstituierte  $\text{Kit}^{\text{W-sh/W-sh}}$  Tiere dienten als Kontrolle (ohne MZ). Zwei Tage nach der letzten Provokation mit Ovalbumin wurden die Lungen der Tiere herauspräpariert und mit Roti-Histofix 4% (Roth) fixiert. Im Anschluss daran wurden Schnitte angefertigt und mit Avidin-Alexa 488 wie in Material und Methode beschrieben gefärbt. Avidin bindet mit hoher Affinität an Heparin, wodurch Mastzellen, welche viel Heparin gespeichert haben, angefärbt werden und im Fluoreszenzmikroskop grün leuchten. Gezeigt ist ein repräsentativer Lungenschnitt (n=5 Mäuse).

Aus Abbildung 16 geht hervor, dass die Rekonstitution der Mäuse mit Mastzellen erfolgreich war und die Rekonstitution unabhängig vom Genotyp der verwendeten Mastzellen ist. In den nächsten Versuchen wurde die Zusammensetzung der die Lunge infiltrierenden Zellen nach Sensibilisierung und Provokation mit Ovalbumin (OVA) ermittelt. Hierzu wurden die Lungen der Mäuse 24 Stunden nach der letzten Provokation mit PBS gespült, die Gesamtzellzahl ausgezählt und ein Teil der Zellen auf einem Objektträger zentrifugiert, fixiert und mit Hämacytometer (Merck) gefärbt und ausgezählt. Die Auswertung erfolgte an einem Lichtmikroskop.

## Ergebnisse

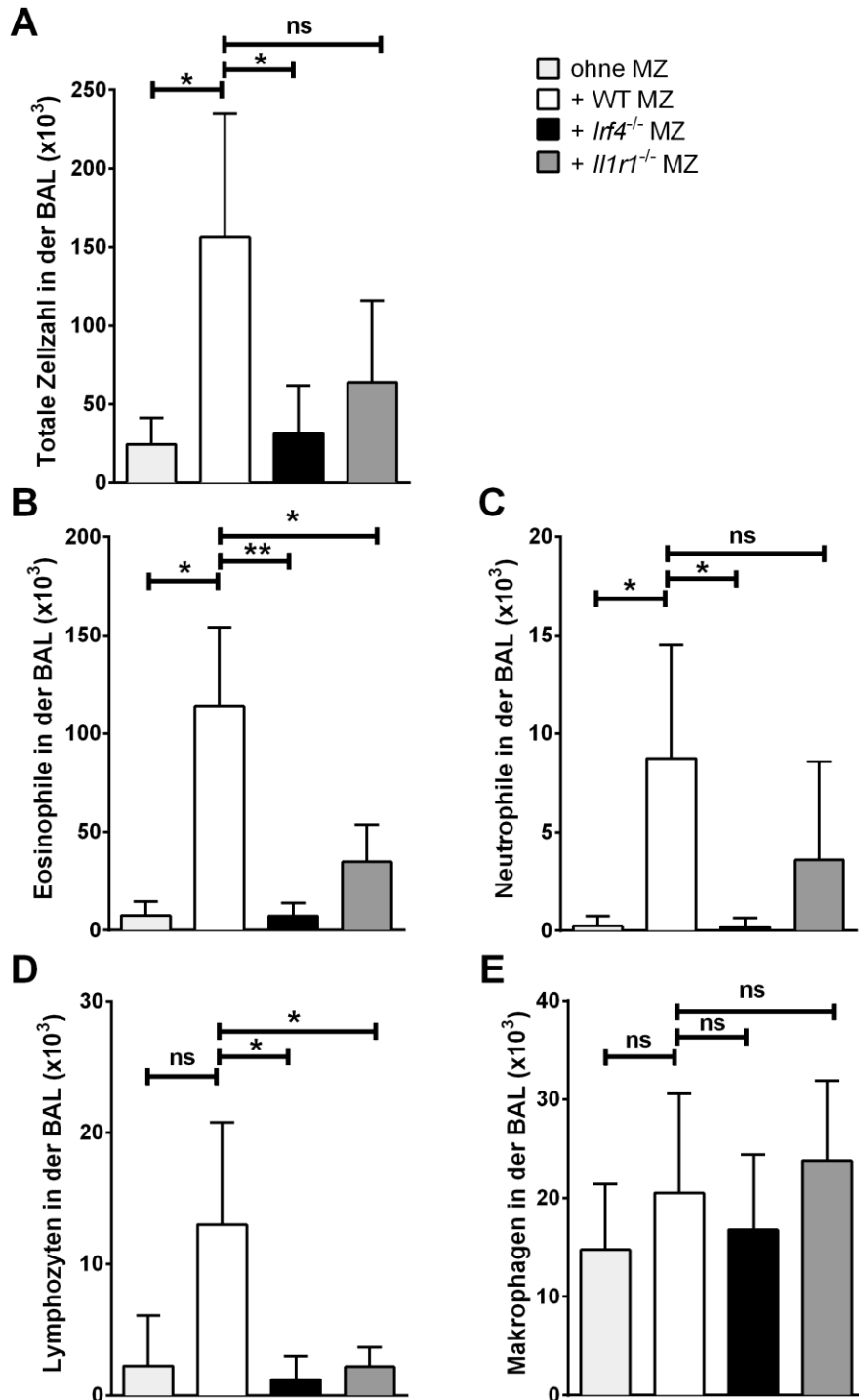


**Abbildung 17: Eine mastzellspezifische *Irf4* oder *Il1r1* Defizienz reduziert den Influx von eosinophilen Granulozyten in die Lunge nach Sensibilisierung und Provoaktion mit OVA**

Mastzelllose  $\text{Kit}^{\text{W-sh/W-sh}}$  Mäuse wurden mit *Irf4*<sup>-/-</sup>, *Il1r1*<sup>-/-</sup> oder WT Mastzellen rekonstituiert (+ WT MZ; + *Irf4*<sup>-/-</sup> MZ; + *Il1r1*<sup>-/-</sup> MZ). Nicht-rekonstituierte  $\text{Kit}^{\text{W-sh/W-sh}}$  Tiere dienten als Kontrolle (ohne MZ). 8 Wochen nach Rekonstitution wurden die Tiere mit OVA immunisiert und im Anschluss provoziert. Die Zahl und Morphologie der infiltrierenden Zellen in der bronchio-alveolären Lavage (BAL) wurde 24h nach der letzten Provokation gemessen. Gezeigt ist ein repräsentativer „Cytopspin“ mit neutrophilen Granulozyten (schwarzer Pfeil), Makrophagen (roter Pfeil), Lymphozyten (grüner Pfeil) und eosinophilen Granulozyten (lila Pfeil) (n=5 Mäuse).

Der adoptive Transfer von wildtypischen Mastzellen in mastzellose Mäuse geht einher mit einer verstärkten Infiltration von Zellen in die Lunge nach Provokation mit OVA im Vergleich zu nicht rekonstituierten Mäusen. Hierbei werden primär eosinophile Granulozyten rekrutiert (Abb. 17). Eine Rekonstitution mit *Irf4*<sup>-/-</sup> oder *Il1r1*<sup>-/-</sup> Mastzellen führt zu keiner erhöhten Anzahl an die Lunge infiltrierenden Zellen im Vergleich zu mastzelllosen Mäusen. Im Weiteren wurden die bronchoalveoläre Lavage (BAL) aller Tiere analysiert, um die Gesamtzellzahlen der eosinophilen Granulozyten, Lymphocyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten zu bestimmen.

## Ergebnisse



**Abbildung 18: Eine mastzellspezifische *lrf4* oder *il1r1* Defizienz reduziert den Influx von eosinophilen Granulozyten in die Lunge nach Provokation mit OVA.**

Mastzelllose Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> Mäuse wurden mit *lrf4*<sup>-/-</sup>, *il1r1*<sup>-/-</sup> oder WT Mastzellen rekonstituiert (+ WT MZ; + *lrf4*<sup>-/-</sup> MZ; + *il1r1*<sup>-/-</sup> MZ). Nicht-rekonstituierte Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> Tiere dienten als Kontrolle (ohne MZ). 8 Wochen nach Rekonstitution wurden die Tiere mit OVA immunisiert und im Anschluss provoziert. Die Zahl und Morphologie der infiltrierenden Zellen in der bronchio-alveolären Lavage (BAL) wurde 24h nach der letzten Provokation gemessen. In A ist die totale Zellzahl der infiltrierenden Zellen dargestellt, weiter ist die absolute Zellzahl der Eosinophilen (B), der Neutrophilen (C),

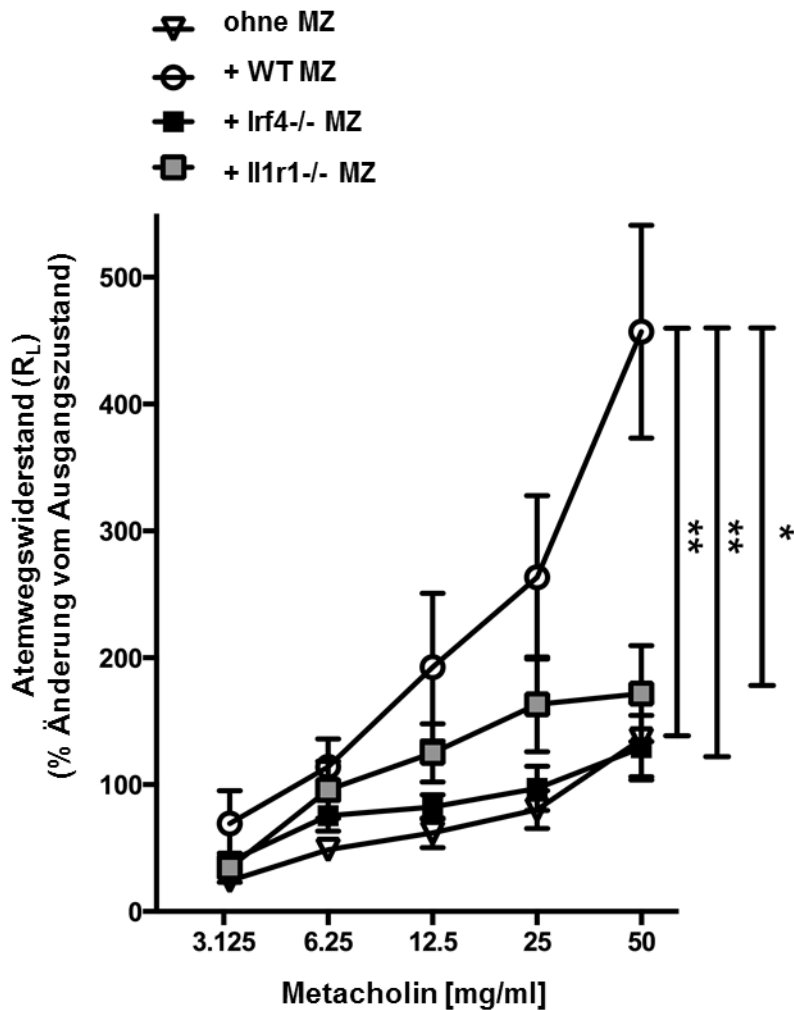
## Ergebnisse

Lymphozyten (D) und Makrophagen (E) dargestellt. Es wird der Mittelwert ( $\pm$ SD) aus einem repräsentativen Versuch von drei unterschiedlichen Versuchen mit gleichem Ergebnis gezeigt. (n=5 Mäuse) ns  $p>0,05$ ; \* $p\leq 0,05$ ; \*\* $\leq 0,01$ ; ungepaarter t-Test.

Eine Rekonstitution von mastzellosen  $\text{Kit}^{\text{W-sh/W-sh}}$  Mäusen mit wildtypischen Mastzellen führt nach Sensibilisierung und Provokation zu einer starken Zellinfiltration der Lunge, während nicht rekonstituierte Tiere und Tiere nach adoptivem Transfer von  $\text{Irf4}^{-/-}$  oder  $\text{Il1r1}^{-/-}$  Mastzellen kaum zelluläre Lungeninfiltrate aufwiesen (Abb. 18A). Hierbei wird die Lunge präferentiell von eosinophilen Granulocyten infiltriert (Abb. 18B). Auch die Gesamtzellzahl der neutrophilen Granulocyten und Lymphocyten ist in den mit wildtypischen Mastzellen rekonstituierten Mäusen im Vergleich erhöht. Jedoch ist die Gesamtzellzahl dieser Zellen deutlich geringer als die Anzahl der eosinophilen Granulocyten (Abb. 18 B, C und D). Demnach werden eosinophile Granulocyten durch das mastzellproduzierte IL-9 in die Lunge nach Provokation mit Allergen rekrutiert. Diese Annahme wird weiter bestätigt, da eine Rekonstitution mit  $\text{Irf4}^{-/-}$  oder  $\text{Il1r1}^{-/-}$  Mastzellen, welche kaum IL-9 produzieren, kaum Einfluss auf die Infiltration dieser Zellen im Vergleich zu nicht-rekonstituierten Tieren hat. Die Menge der alveolaren Makrophagen ist unabhängig von der Rekonstitution mit Mastzellen und in allen Gruppen gleich ausgeprägt (Abb. 18E). Demnach scheint die IL-9 und IL-1 $\beta$  Produktion durch Mastzellen für die Rekrutierung von Makrophagen nicht notwendig zu sein.

Eine weitere wesentliche Folge von experimentellem Asthma ist eine Atemwegsüberempfindlichkeitsreaktion (AHR / „*airway hyperresponsivness*“). Hierzu wurden dieselben Versuchstiere narkotisiert und intubiert. Der Atemwegswiderstand, welcher als Maß für die AHR dient, wurde nach Provokation mit verschiedenen Dosen des Bronchokonstriktors Methacholin gemessen.

## Ergebnisse



**Abbildung 19: Mastzellspezifische Defizienz in *Irf4* und *Il1r1* reduziert den Atemwegwiderstand der Lunge nach Provokation mit OVA und Metacholin.**

Mastzelllose Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> Mäuse wurden mit *Irf4*<sup>-/-</sup>, *Il1r1*<sup>-/-</sup> oder WT Mastzellen rekonstituiert (+ WT MZ; + *Irf4*<sup>-/-</sup> MZ; + *Il1r1*<sup>-/-</sup> MZ). Nicht-rekonstituierte Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> Tiere dienten als Kontrolle (ohne MZ). 8 Wochen nach Rekonstitution wurden die Tiere mit OVA immunisiert und im Anschluss provoziert. Der Atemwegwiderstand wurde 24h nach der letzten Provokation mit OVA gemessen, indem die Versuchstiere narkotisiert, intubiert und mit steigenden Dosen des Bronchokonstriktors Methacholin beatmet wurden. Der Atemwegwiderstand wurde mittels flexiVent-System (Scireq) bestimmt. Es wird der Mittelwert (±SD) aus einem repräsentativen Versuch von drei unterschiedlichen Versuchen mit gleichem Ergebnis gezeigt. (n=5 Mäuse) ns p>0,05; \*p≤0,05; \*\*≤0,01; ungepaarter t-Test.

Nach Reizung mit Metacholin wiesen Versuchstiere, welche zuvor mit wildtypischen Mastzellen rekonstituiert wurden, einen höheren Atemwegwiderstand auf als nicht-rekonstituierte Mäuse oder Tiere, welche zuvor *Irf4*<sup>-/-</sup> oder *Il1r1*<sup>-/-</sup> Mastzellen adoptiv transferiert bekamen. Der adoptive Transfer von *Irf4*<sup>-/-</sup> Mastzellen hatte keinen Einfluss auf den Atemwegwiderstand im Vergleich zu mastzelllosen Mäusen.

## Ergebnisse

Die Rekonstitution von *Il1r1<sup>-/-</sup>* Mastzellen steigert den Atemwegswiderstand geringfügig im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abb. 18). Damit scheint auch *in vivo* die verminderte IL-9 und IL-1 $\beta$  Produktion von *Irf4<sup>-/-</sup>* oder *Il1r1<sup>-/-</sup>* Mastzellen für eine Reduktion der Asthmasymptomatik verantwortlich zu sein und mastzellproduziertes IL-9 eine entscheidende Rolle bei der Ausprägung der AHR bei Asthma zu haben.

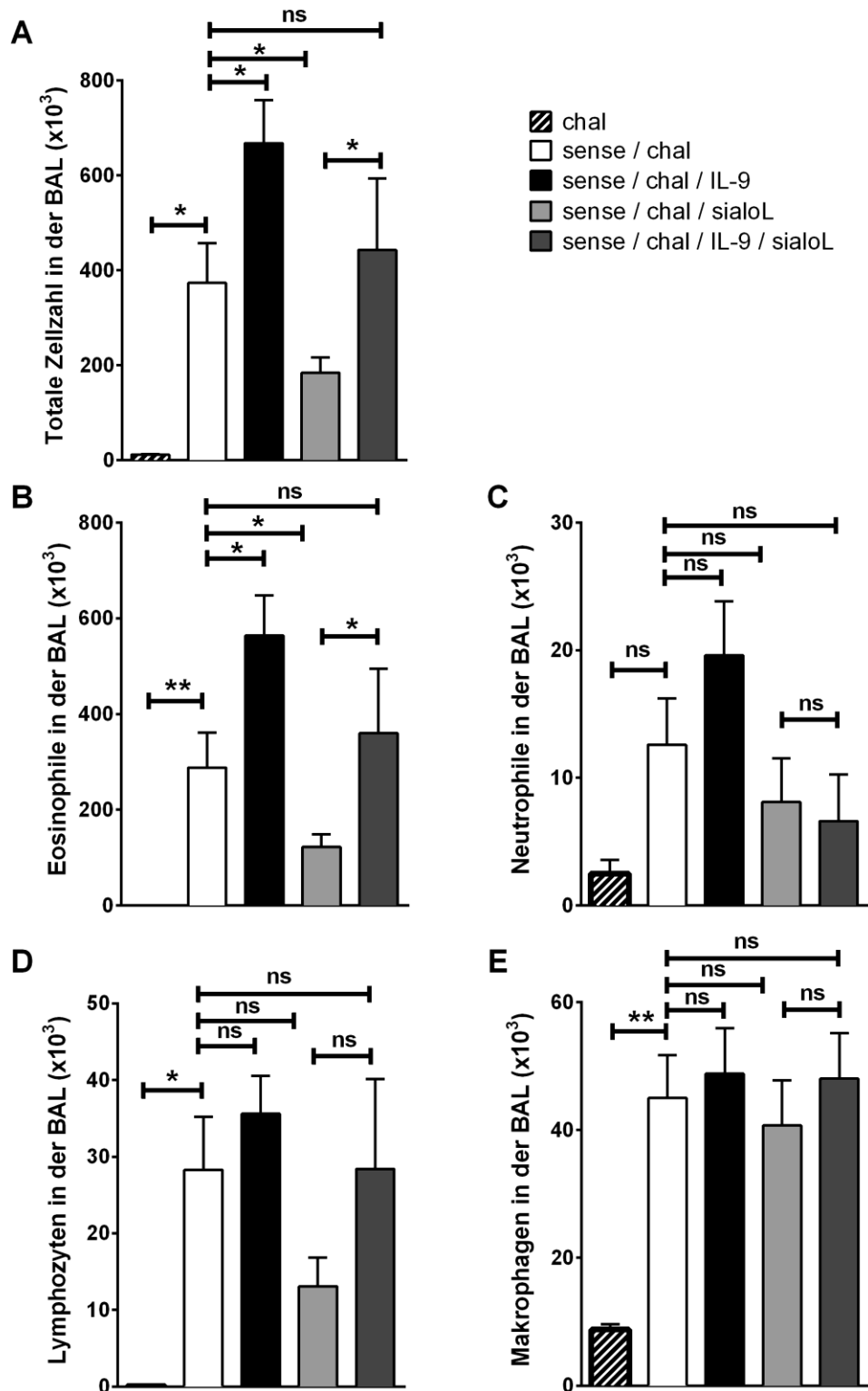
Da Sialostatin L präferentiell die Produktion von IL-9 durch Mastzellen reduziert, wurde in weiterführenden Versuchen Sialostatin L zur Behandlung von experimentellem präklinischem murinen Asthma eingesetzt, um sein therapeutisches Potenzial zu überprüfen.

### **3.11. Eine therapeutische Anwendung von Sialostatin L lindert OVA induzierte Eosinophilie und AHR im murinen präklinischen Asthma-Modell.**

Wildtypische C57BL/6 Mäuse wurden wie in Material und Methode beschrieben mit Ovalbumin *i.p.* immunisiert und im Anschluss daran an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit Ovalbumin provoziert und wie in Abschnitt 2.14.1. Abbildung 5 dargelegt behandelt. Unsensibilisierte Tiere dienten als Kontrolle. Zwei Tage nach der letzten Provokation wurden die Lungenfunktion nach Provokation mittels Metacholin überprüft und die Lunge mit PBS gespült, um infiltrierende Zellen zu extrahieren und zu bestimmen.

Die Zellen der BAL wurden gezählt, auf einen Objektträger zentrifugiert, fixiert und anschließend mit Hämacolor Set (Merck) gefärbt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Lichtmikroskops.

## Ergebnisse



**Abbildung 20:** Eine therapeutische Anwendung von Sialostatin L lindert Eosinophilie im experimentellen Asthma.

C57BL/6 Mäuse wurden mit OVA immunisiert und im Anschluss provoziert. Die Mäuse wurden in Abwesenheit (sense/chal) oder Anwesenheit von Sialostatin L *i.v.* (sense/chal/sialoL) oder bei Gabe von IL-9 *i.n.* (sense/chal/IL-9) oder bei gleichzeitiger Gabe von IL-9 *i.n.* und Sialostatin L *i.v.* (sense/chal/IL-9/sialoL) mit OVA provoziert.

## Ergebnisse

Unsensibilisierte Mäuse dienten als Kontrolle. Die Zahl und Morphologie der infiltrierenden Zellen in der BAL wurde 24h nach der letzten Provokation gemessen. In A ist die Totale Zellzahl der infiltrierenden Zellen dargestellt, weiter ist die absolute Zellzahl der Eosinophilen (B), Neutrophilen (C), Lymphozyten (D) und Makrophagen (E) dargestellt. Es wird der Mittelwert ( $\pm$ SD) aus einem repräsentativen Versuch von drei unterschiedlichen Versuchen mit gleichem Ergebnis gezeigt. (n=5 Mäuse) ns  $p>0,05$ ; \* $p\leq 0,05$ ; \*\* $\leq 0,01$ ; ungepaarter t-Test.

Wie in Abbildung 20 zu sehen, können in der BAL von nicht sensibilisierten Kontrolltieren kaum infiltrierende Zellen nachgewiesen werden, welche präferentiell alveoläre Makrophagen sind. Eine Provokation mit Ovalbumin nach Sensibilisierung führt zu einer starken Zellinfiltration in die Lunge mit eosinophilen Granulocyten (sense/chal). Die zusätzliche intranasale Gabe von IL-9 führt zu einer vermehrten Rekrutierung von eosinophilen Granulocyten (sense/chal/IL-9). Hingegen bleibt die Gesamtzellzahl der Lymphocyten, Makrophagen und neutrophilen Granulocyten weitestgehend unbeeinflusst. Somit scheint die intranasale Gabe von IL-9 präferentiell nur auf eosinophile Granulocyten chemotaktisch zu wirken. Eine Behandlung mit Sialostatin L kann die Gesamtzahl der infiltrierenden Zellen und einhergehend damit die Menge an eosinophilen Granulocyten deutlich reduzieren (sense/chal/sialoL). Die Gabe von IL-9 bei gleichzeitiger Behandlung mit Sialostatin L kann den Sialostatin L vermittelten Effekt auf die Rekrutierung der eosinophilen Granulocyten vollständig aufheben (sense/chal/IL-9/sialoL) (Abb. 20A). Dies lässt die Vermutung zu, dass die Reduktion der Infiltration von eosinophilen Granulocyten in die Lunge nach Behandlung mit Sialostatin L auf die Supprimierung der Produktion von IL-9 zurückzuführen ist. Im Weiteren wurde der Einfluss von Sialostatin L auf die Ausprägung der AHR untersucht.

Zur Messung dieser wurden wiederum dieselben Versuchstiere narkotisiert und intubiert. Der Atemwegswiderstand, welcher als Maß für die AHR dient, wurde nach Provokation mit verschiedenen Dosen des Bronchokonstriktors Methacholin gemessen.

## Ergebnisse

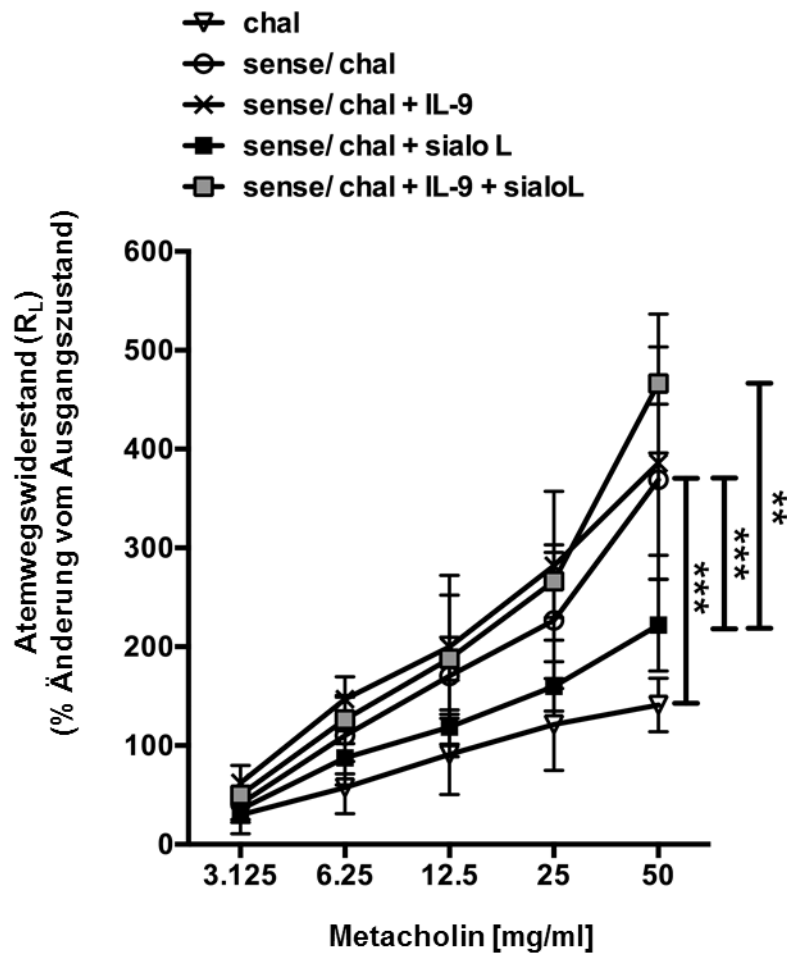


Abbildung 21: Eine therapeutische Behandlung mit Sialostatin L reduziert den Atemwegswiderstand der Lunge nach Provokation mit OVA und Metacholin.

C57BL/6 Mäuse wurden mit OVA immunisiert und im Anschluss provoziert. Die Mäuse wurden in Abwesenheit (sense/chal) oder Anwesenheit von Sialostatin L *i.v.* (sense/chal/sialoL) oder bei Gabe von IL-9 *i.n.* (sense/chal/IL-9) oder bei gleichzeitiger Gabe von IL-9 *i.n.* und Sialostatin L *i.v.* (sense/chal/IL-9/sialoL) mit OVA provoziert. Unsensibilisierte Mäuse dienten als Kontrolle. Der Atemwegswiderstand wurde 24h nach der letzten Provokation mit OVA gemessen, indem die Versuchstiere narkotisiert, intubiert und mit steigenden Dosen des Bronchokonstriktors Methacholin beatmet wurden. Der Atemwegswiderstand wurde mittels flexiVent-System (Scireq) erhoben. Es wird der Mittelwert ( $\pm$ SD) aus einem repräsentativen Versuch von drei unterschiedlichen Versuchen mit gleichem Ergebnis gezeigt. (n=5 Mäuse) \*\* $\leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ; ungepaarter t-Test.

Nicht sensibilisierte Mäuse reagieren kaum auf die Provokation mit Metacholin, da keine Entzündungsreaktion in der Lunge stattgefunden hat und dadurch das Lungenepithel weniger sensibel auf diesen Muskarinrezeptoragonisten reagiert. Sensibilisierte Mäuse hingegen reagieren stark mit einem erhöhtem Atemwegswiderstand auf eine Provokation mit Metacholin. Diese Reaktion wird

## Ergebnisse

durch die Gabe von IL-9 nicht weiter gesteigert, da die endogene Produktion von IL-9 offenbar für eine Reaktion schon ausreichend ist (sense/chal/IL-9). Eine Behandlung der Mäuse mit Sialostatin L hingegen reduziert die Reaktion auf Metacholin deutlich (sense/chal/sialoL). Hierbei fällt auf, dass dieser Sialostatin L vermittelte Effekt durch die Gabe von IL-9 wieder vollständig aufgehoben wird. Demnach scheint die Produktion von IL-9 in der Lunge auch ein essentieller Faktor bei der Ausprägung einer AHR bei präklinischem murinem Asthma zu sein.

### 3.12. Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend stellte sich heraus, dass Sialostatin L spezifisch die Produktion von IL-9 hemmt. Die IL-6 Expression sowie die Degranulation und Zellvitalität von Mastzellen werden nicht beeinflusst (Abb. 6, 7 und 8). Unter Zuhilfenahme von „Next Generation Sequencing“ konnte ein potentieller Mechanismus der Sialostatin L vermittelten IL-9 Hemmung und folglich eine mögliche Regulation des *Il9* Gens in Mastzellen näher aufgedeckt werden (Abb. 9). Es konnte der Transkriptionsfaktor IRF4 als primäres Ziel („Target“) von Sialostatin L identifiziert werden. Reportergergestudien und ChIP-Analysen konnten eindeutig die direkte transaktivierende Bindung des Transkriptionsfaktors IRF4 an die *Il1b* und *Il9* Promotoren belegen (Abb. 14). In Übereinstimmung hiermit hatte eine mastzellspezifische *Irf4*- Defizienz eine deutlich reduzierte IL-9 und IL-1 $\beta$  Produktion zur Folge, welche durch exogen zugeführtes IL-1 $\beta$  wieder aufgehoben werden konnte (Abb. 12-14). Im Einklang hierzu konnte keine IL-9 Produktion in *Il1r1*<sup>-/-</sup> Mastzellen detektiert werden (Abb. 12-14). Demnach scheint eine autokrine positive Rückkopplung durch IL-1 $\beta$ , welche initial essentiell von IRF4 abhängig ist, für die Produktion von IL-9 in Mastzellen verantwortlich zu sein. Des Weiteren konnten die Ergebnisse im murinen präklinischem Asthma-Modell bestätigt werden. Die Rekonstitution von mastzelllosen Mäusen mit wildtypischen Mastzellen hatte eine gesteigerte Eosinophilie und AHR nach Sensibilisierung und anschließender Provokation zur Folge, während eine Rekonstitution mit *Irf4*<sup>-/-</sup> oder *Il1r1*<sup>-/-</sup> Mastzellen keine Steigerung der genannten Symptome im Vergleich zu nicht-rekonstituierten Kontrolltieren nach sich zog (Abb. 16-18). Ferner führte eine therapeutische Gabe

## **Ergebnisse**

von Sialostatin L im murinen Asthma zu einer Verbesserung der Symptomatik. Diese Linderung beruhte auf der Supprimierung des mastzellproduzierten IL-9, da der durch Sialostatin L vermittelte Effekt durch die intranasale Gabe von IL-9 aufgehoben werden konnte (Abb. 19,20). Somit könnte der hier zu Grunde liegende Mechanismus als Basis für die Entwicklung von neuen therapeutischen Strategien zur Behandlung von Asthma und anderen IL-9 vermittelten Erkrankungen dienen, welche in den folgenden Abschnitten diskutiert werden.

### 4. Diskussion

#### 4.1. //9 Regulation in Mastzellen

Mastzellen sezernieren nach Stimulation eine Reihe von vorgeformten Mediatoren, bioaktiven Substanzen aus dem Lipidmetabolismus und *de novo* synthetisierten Cytokinen und Chemokinen<sup>116,117</sup>. Hierbei kann die Mastzelle je nach Stimulus gezielt nur bestimmte Mediatoren produzieren, um gerichtet auf die Art des Fremdpartikels zu reagieren<sup>15</sup>. Hierzu besitzt die Mastzelle eine Reihe von Oberflächenrezeptoren. Zu den prominentesten zählt der hochaffine Fc  $\epsilon$  Rezeptor 1  $\alpha$  für IgE (Fc $\epsilon$ R1 $\alpha$ ) der vor allem mit Typ 1 Allergien in Verbindung gebracht wird. Eine Quervernetzung des an den Rezeptor gebundenen IgE auf der Oberfläche von Mastzellen kann zu einer Degranulation derselben führen. Dadurch kommt es zu einer sofortigen Ausschüttung von vorgeformten Mediatoren wie Histamin oder auch TNF- $\alpha$  im Menschen, welche wiederum durch ihre vasoaktive Wirkung Rötungen und Schwellungen verursachen<sup>117</sup>. Die Mastzelle kann zusätzlich noch über verschiedene Cytokinrezeptoren wie etwa den IL-1R1 für IL-1, den IL-4 Rezeptor oder PRRs wie zum Beispiel TLR-4 aktiviert werden. Dies führt sowohl zu einer Modulation der Cytokinproduktion als auch zu einer Degranulation. So produzieren Mastzellen nach Stimulation über den IgE Rezeptor eine Reihe von *de novo* synthetisierten Cytokinen wie IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 und TNF- $\alpha$ <sup>23,118–122</sup>.

Wurde die Mastzelle zusätzlich zur Quervernetzung des Fc $\epsilon$ R1 $\alpha$  mit IL-1 $\beta$  oder LPS stimuliert, konnte eine gesteigerte Sezernierung der Cytokine IL-9 und IL-13, nicht jedoch der Cytokine IL-4, IL-6 und TNF- $\alpha$  und keine Änderung in der Degranulation dokumentiert werden<sup>119,122</sup>. Dies lässt darauf schließen, dass für die Expression letzterer Cytokine initial ein ähnliches Signal notwendig ist, aber bei der Feinregulation andere Transkriptionsfaktoren oder Phosphorylierungssignale eine Rolle spielen. Eine Quervernetzung des Fc $\epsilon$ R1 $\alpha$  oder Aktivierung mit Ionomycin hat ähnlich wie eine Aktivierung des TCR hauptsächlich ein kalziumabhängiges Signal zur Folge<sup>123,124</sup>. Hierbei werden Transkriptionsfaktoren der NFAT („nuclear factor of activated T cells“) Familie, zu denen NFATc1-4 zählt, abhängig von Calreticulin und Calcineurin dephosphoryliert und können in den Kern einwandern und verschiedene Gene aktivieren. In Mastzellen konnte mittels ChIP eine direkte Bindung von NFATc2

## Diskussion

und NFATc1 an die Promotoren von IL-13 und TNF- $\alpha$  nachgewiesen werden<sup>120</sup>. NFATc2 ist bereits als Interaktionspartner von IRF4 bei der Expression von IL-4 beschrieben<sup>76</sup>. Auch wurde NFATc2 im Zusammenhang mit der *Il9* Genregulation z.B. als Chromatinmodulator des *Il9* Promoter in murinen CD4<sup>+</sup> T-Zellen beschrieben<sup>125</sup>. In dieser Arbeit konnte bewiesen werden, dass eine Aktivierung von Mastzellen durch Ionomycin oder IgE Quervernetzung alleine zu einer *de novo* Synthese des Transkriptionsfaktors IRF4 führte (Abb. 9 / nicht gezeigt). Diese Expression war nach zusätzlicher Stimulation mit IL-1 $\beta$  oder LPS noch gesteigert und korrelierte mit der IL-9 Produktion (Abb. 13 / nicht gezeigt). So wäre eine Interaktion von IRF4 mit NFATc2 am *Il9* Promoter denkbar, da beide Transkriptionsfaktoren ein ähnliches DNA-Bindemotiv besitzen. Dies steht mit Beobachtungen, wonach die *Irf4*, *Il9* und *Il1b* Expression in NFATc2<sup>-/-</sup> Mastzellen deutlich reduziert ist, im Einklang (unpublizierte Daten). Interessanterweise scheint die *Il9*-Genregulation in CD4<sup>+</sup> T-Zellen unterschiedlich zu sein. So wurde eine gesteigerte IL-13 und IL-9 Produktion nach primärer Stimulation mit anti-CD3/28 in NFATc2<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu wildtypischen Kontrollen gemessen<sup>120</sup>.

Denkbar wäre auch der Einfluss von anderen Transkriptionsfaktoren, welche bereits als Interaktionspartner von IRF4 beschrieben wurden. So konnte in Makrophagen eine Interaktion von IRF4 mit dem Transkriptionsfaktor der ETS („E26 transformation-specific“)-Familie PU.1 bei der Regulation des *Il1b* Locus beschrieben werden<sup>82</sup>. In dieser Arbeit konnte IRF4 als initial essentieller Faktor für die Produktion von IL-1 $\beta$  in Mastzellen belegt werden, da *Irf4*<sup>-/-</sup> Mastzellen nach Ionomycin Stimulation kein IL-9 produzierten und dieser Effekt durch exogenes IL-1 $\beta$  kompensiert werden konnte. Eine transaktivierende Interaktion von IRF4 mit PU.1 am *Il9* oder *Il1b* Promoter scheint aber eher unwahrscheinlich, denn in vorläufigen Reporteranalysen mit einem *Il9* Promoter-Luciferase Konstrukt konnte nach Überexpression von PU.1 eine verringerte *Il9* Promoteraktivität in Mastzellen gemessen werden. Dies stimmt mit Studien überein, in denen PU.1 die Bindung von GATA-1 an DNA durch die Bildung eines GATA-1/PU.1 Heterodimers inhibieren konnte<sup>126,127</sup>. Mastzellen stellen einen der wenigen Zelltypen des Immunsystems dar, welcher sowohl GATA-1 („GATA-binding factor 1“) als auch PU.1 exprimiert (National Center for Biotechnology Information's Gene Expression Omnibus; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE66966>). In Mastzellen

## Diskussion

mündet eine Aktivierung in einer Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors GATA-1 durch die MAP-Kinase („mitogen-activated protein“) p38. Diese Phosphorylierung führt schließlich zu einer Aktivierung des *Il9* Promoters durch GATA-1<sup>65</sup>. So könnte eine Expression von PU.1 in Mastzellen zu einer reduzierten GATA-1 vermittelten Transkription von *Il9* mRNA führen. GATA-1 wird in CD4<sup>+</sup> T-Zellen nicht exprimiert. Entsprechend konnte in CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine gegenteilige Funktion von PU.1 bei der *Il9* Regulation und der Differenzierung von Th9 Zellen festgestellt werden. PU-1-defiziente *Sfp1*<sup>-/-</sup> („Split Finger Protein 1“) CD4<sup>+</sup> T-Zellen produzierten entsprechend weniger IL-9 und konnten nicht zu Th9 Zellen ausdifferenzieren<sup>60</sup>. Auch in Patienten mit ulcerativer Colitis konnte im Darm mehr PU.1 im Vergleich zu gesunden Patienten histologisch nachgewiesen werden<sup>46</sup>. Entsprechend führte eine Inhibierung der p38 MAP-Kinase mit dem spezifischen Inhibitor SB203580 zu einer deutlich reduzierten IL-9 Produktion in Mastzellen nicht jedoch in CD4<sup>+</sup> T-Zellen<sup>65</sup>. Ferner wird PU.1 durch TGF- $\beta$  in CD4<sup>+</sup> T-Zellen induziert<sup>128</sup>. In Mastzellen hingegen verursacht eine Aktivierung über den TGF- $\beta$  Rezeptor eine reduzierte Expression des Fc $\epsilon$ R1 $\alpha$ <sup>129</sup>. Somit wäre eine Stimulation der Mastzellen über den Fc $\epsilon$ R1 $\alpha$  erschwert. Hingegen würde möglicherweise ein Signal über den TGF- $\beta$  Rezeptor die Öffnung des *Il9* Locus durch die Rekrutierung von SMAD2/3 als Chromatinmodulator nach sich ziehen, wie bereits in Th9 Zellen beschrieben<sup>62,63</sup>. Dies wiederum könnte auch in Mastzellen die Produktion von IL-9 begünstigen. Zudem sind Mastzellen selbst in der Lage nach Stimulation TGF- $\beta$  zu sezernieren, wodurch eine weitere positive Rückkopplung denkbar wäre<sup>14</sup>.

Des Weiteren konnte in murinen Mastzellen dokumentiert werden, dass eine Aktivierung über den IL-1R1 oder TLR-4 über MyD88 („Myeloid differentiation primary response gene 88“) und TRAF („TNF receptor associated factor“) zu einer NF $\kappa$ B und AP-1 vermittelten Aktivierung der *Il9* und *Il13* Gene führt<sup>119</sup>. Eine Aktivierung von TRIF („TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ “) findet in Mastzellen nicht statt<sup>130</sup>. Eine Stimulation mit IL-1 $\beta$  oder LPS alleine induzierte keine IL-9 Produktion. Ebenso konnte in dieser Arbeit eine verringerte *Irf4* Expression und keine IL-9 Produktion in *Il1r1*<sup>-/-</sup> Mastzellen nach Ionomycin Stimulation beobachtet werden (Abb. 12). Somit scheint das IL-1 Signal über den IL-1R1 essentiell für die Produktion von IL-9 in Mastzellen zu sein. Um die Produktion von IL-9 in Mastzellen zu induzieren, benötigen Mastzellen demnach ein Calcium vermitteltes und ein MyD88

## Diskussion

abhängiges Signal. Diese Hypothese unterstützt die Beobachtung, dass *Il1r1*<sup>-/-</sup> Mastzellen nach Stimulation mit Ionomycin und zusätzlich LPS wieder IL-9 sezernierten (Daten nicht gezeigt). Hierbei kompensiert das Signal über den TLR4 abhängig von MyD88 durch LPS stimuliert die fehlende Stimulation des IL-1R1. TLR-4 und der IL-1R1 haben die gleiche intrazelluläre Signaltransduktionskaskade in Mastzellen<sup>131</sup>.

Für die beobachtete IL-9 Produktion nach alleiniger Stimulation mit Ionomycin scheint die durch IRF4 induzierte endogene IL-1 $\beta$  Expression verantwortlich zu sein (Abb. 11). Hierfür spricht die Feststellung, dass *Il1a/b*<sup>-/-</sup> Mastzellen nach Stimulation mit Ionomycin alleine kein IL-9 produzieren (Daten nicht gezeigt). Dieser Phänotyp konnte jedoch nach Stimulation mit Ionomycin und exogenem IL-1 $\beta$  wieder aufgehoben werden (Daten nicht gezeigt). Somit könnte eine positive autokrine Rückkopplung von IL-1 $\beta$  für die Produktion von IL-1 $\beta$ , IL-9 und IRF4 in Mastzellen absolut notwendig sein. Diese Beobachtungen stimmen mit Studien überein, in denen eine positive autokrine Rückkopplung von mastzellproduziertem IL-9 essentiell von endokrin produziertem IL-1 $\beta$  abhängig war<sup>132</sup>. Ferner konnte in Monozyten, EL4-6.1 Thymom Zellen und Endothelzellen eine positive autokrine Rückkopplung von IL-1 $\beta$  belegt werden<sup>114,133,134</sup>. Auch in CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnte nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  eine gesteigerte IL-9 Produktion nachgewiesen werden, jedoch sezernierten *Il1r1*<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen vergleichbare Mengen IL-9, wenn sie unter Th9 Bedingungen kultiviert wurden<sup>54</sup>. Entsprechend scheint das IL-1 $\beta$  vermittelte Signal absolut notwendig für die IL-9 Regulation in Mastzellen, nicht jedoch in CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu sein.

In einer anderen Studie konnte der durch STAT1 induzierte Transkriptionsfaktor IRF1 als essentieller Faktor für die IL-1 $\beta$  vermittelte Steigerung der IL-9 Produktion in Th9 Zellen ausgemacht werden. Ferner konnte eine direkte Bindung und Transaktivierung von IRF1 an dem *Il9* und *Il21* Promoter festgestellt werden<sup>54</sup>. Auch hier könnte eine unterschiedliche IL-9 Regulation zwischen Mastzellen und CD4<sup>+</sup> T-Zellen vorliegen. So wurde keine gesteigerte Expression von IRF4 nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  in Th9 Zellen festgestellt werden, wie es bereits für Th17 Zellen nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  beschrieben wurde und in dieser Arbeit für Mastzellen dokumentiert werden konnte<sup>115</sup>. Der genannte Transkriptionsfaktor IRF1, induziert durch IFN- $\gamma$ , wurde in

## Diskussion

CD4<sup>+</sup> T-Zellen als Repressor der *IL4* Transkription beschrieben<sup>135</sup>. Da bei der Regulation von *IL4* auch IRF4 als erforderlicher Faktor beschrieben wurde, wäre ein supprimierender Einfluss von IRF1 auf die Sekretion von IL-9 in Th9 oder Mastzellen denkbar. So könnten IRF1 und IRF4 kompetitiv um Bindungsstellen innerhalb des *IL9* Promoters oder um mögliche Interaktionspartner konkurrieren, da die Transkriptionsfaktoren der IRF-Familie die gleiche DNA-Bindesequenz aber unterschiedliche Proteininteraktionsdomänen aufweisen, mit anderen Transkriptionsfaktoren oder Histonmodulierern interagieren können und eine kompetitive Hemmung zwischen den verschiedenen IRFs bereits belegt werden konnte<sup>136,137</sup>. Erste Reporteranalysen am *IL9* Promoter konnten einen supprimierenden Effekt von IRF1 auf die *IL9* Promoteraktivität in Mastzellen bestätigen. Ferner konnte die IL-9 Produktion in *Irf1*<sup>-/-</sup> Mastzellen nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  nicht supprimiert werden. In wildtypischen Mastzellen hatte eine Stimulation mit IFN- $\gamma$  eine Reduktion der IL-9 Produktion zur Folge (unpublizierte Daten).

Des Weiteren wäre ein Einfluss der Transkriptionsfaktoren der AP-1 Familie in Kooperation mit IRF4 bei der Regulation von IL-9 in Mastzellen denkbar. So wurde in Th9 Zellen ein regulatorisches Netzwerk von Transkriptionsfaktoren der BATF Familie mit IRF4 als notwendig für die *IL9* Regulation beschrieben<sup>138</sup>. Auch in Mastzellen wird der Transkriptionsfaktor BATF nach Stimulation exprimiert und könnte somit als Interaktionspartner von IRF4 an der Regulation von IL-9 beteiligt sein. Ferner konnten *in silico* Untersuchungen am CNS1 („conserved sequence 1“) des *IL9* Promoters mehrere Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren der AP-1 Familie identifiziert werden<sup>64</sup>.

Überdies wurde der Einfluss von IL-10 und Kit-Ligand (SCF) auf die IL-9 Produktion von Mastzellen untersucht. In dieser Studie konnte nach Stimulation mit IL-10 oder Kit-Ligand in Kombination mit IL-1 $\beta$  eine gesteigerte IL-9 Produktion und *IL9* Promoteraktivität in Mastzellen beobachtet werden. IL-10 und Kit-Ligand alleine hatten nur einen geringen Einfluss auf die *IL9* mRNA Expression. Jedoch konnte hier die potenzierende Wirkung von mastzellproduziertem IL-10 auf die IL-9 Produktion belegt werden. Eine Stimulation von Mastzellen in Anwesenheit von neutralisierendem Antikörper gegen IL-10 hatte entsprechend eine Reduktion der IL-9 Produktion zur Folge<sup>66</sup>. Auch Th9 Zellen können nach Stimulation IL-10

## Diskussion

produzieren. Die Differenzierung von Th9 Zellen in Anwesenheit von IL-10-Antikörpern hatte jedoch eine gesteigerte IL-9 Produktion zur Folge<sup>60</sup>. Demzufolge scheint auch hier eine differentielle Regulation des *Il9* Locus in Abhängigkeit von IL-10 in Mastzellen und CD4<sup>+</sup> T-Zellen vorzuliegen. An dieser Stelle könnte der Transkriptionsfaktor IRF4 abhängig vom Interaktionspartner eine entscheidende Rolle spielen. So wurde IRF4 bei der Regulation des *Il10* Locus in regulatorischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Verbindung mit dem Transkriptionsfaktor Blimp-1 beschrieben<sup>78</sup>. Interessanterweise scheint IRF4 auch in Th2 Zellen an den *Il10* Promoter zu binden, jedoch wird hier im Gegensatz zum *Il9* Promoter die Bindung durch PU.1 nicht potenziert sondern inhibiert. So produzierten *Sfpi1*<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Transduktion mit IRF4 unter Th2 induzierenden Bedingungen mehr IL-10 im Vergleich zu CD4<sup>+</sup> T-Zellen, welche mit Leervektor transfiziert wurden<sup>139</sup>. Kultiviert unter Th9 begünstigenden Bedingungen, produzierten *Sfpi1*<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen ohne Transduktion mit IRF4 jedoch vergleichbare Mengen IL-10<sup>60</sup>. Dennoch könnte die Interaktion von PU.1 und IRF4 für die differentielle Regulation nach Stimulation mit IL-10 in Mastzellen und CD4<sup>+</sup> T-Zellen verantwortlich sein.

Schließlich bedarf es bei der Aufklärung der IL-9 Regulation in Mastzellen weiterer detaillierter Analysen. Hierbei könnte die Aufklärung des Wirkmechanismus von Sialostatin L neue Einblicke in die Regulation von IL-9 ergeben. Vorläufige Versuche unter zu Hilfenahme eines Sialostatin L- spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpers konnten zeigen, dass Sialostatin L direkt an der Oberfläche von Mastzellen bindet. Demnach ist denkbar, dass Sialostatin L entweder einen inhibitorischen Oberflächenrezeptor aktiviert, dessen Signal spezifisch die IRF4 Expression und anschließende IL-1 $\beta$  und/oder IL-9 Produktion supprimiert, oder durch Bindung an andere Oberflächenrezeptoren deren Aktivierung verhindert. Zusätzlich kann man in weiteren Versuchen bei gleichzeitiger Verwendung anderer fluorophor-gekoppelter Antikörper den Rezeptor oder andere an Sialostatin L bindende Faktoren identifizieren und im Fluoreszenzmikroskop lokalisieren. Eine weitere Möglichkeit zur Identifizierung anderer an der Regulation beteiligter Faktoren ist eine Immunpräzipitation mit Sialostatin L spezifischem Antikörper nach Stimulation und Fixierung von Mastzellen in An- oder Abwesenheit von Sialostatin L und anschließender Auftragung im Western Blot oder massenspektroskopischer Analyse der Präzipitate. Somit könnte man Sialostatin L bindende Faktoren identifizieren und

## Diskussion

auf deren Basis neue Mechanismen der Cytokinregulation oder Therapieansätze für IL-9 vermittelte Krankheiten entwickeln.

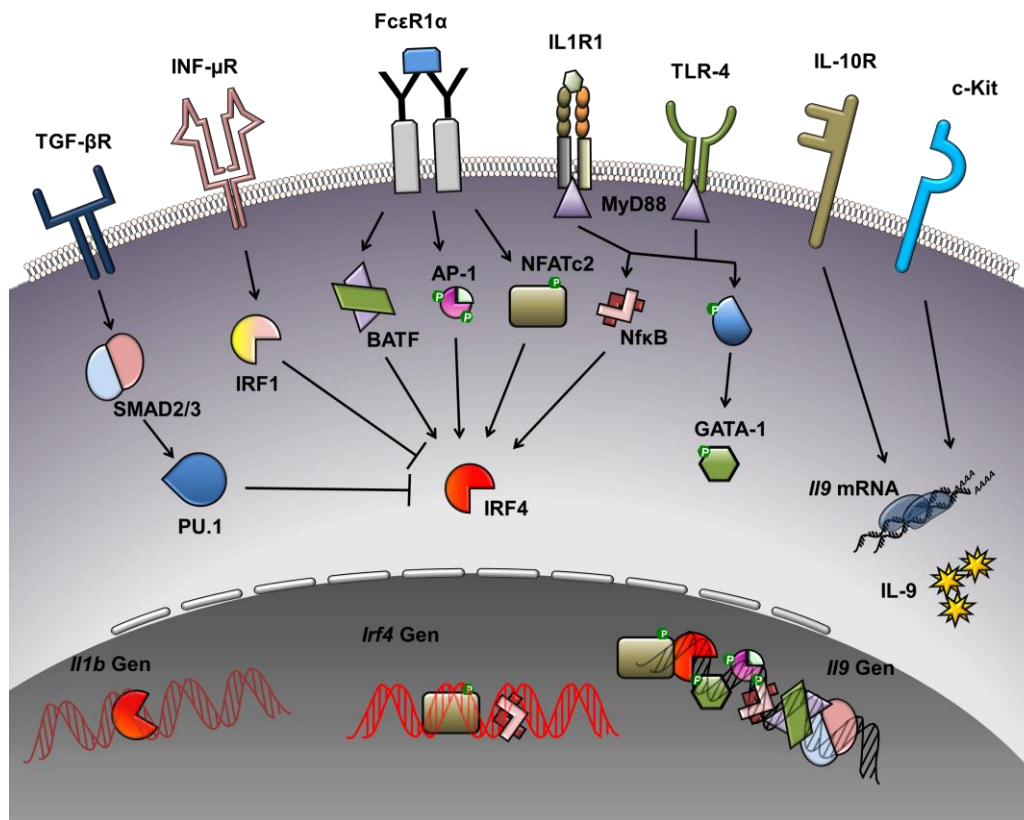


Abbildung 22: Modell der IL-9 Regulation in Mastzellen

Eine Stimulation der Mastzelle über den FcεR1 mündet in einer Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors NFATc2 und einer Expression von BATF/AP-1 und IRF4. NFATc2 transloziert in den Nukleus, öffnet zum einen den *Il9* Locus und bindet möglicherweise den *Irf4* Promoter. IRF4 wird *de novo* synthetisiert und wandert in den Kern und bindet direkt und transaktiviert den *Il1b* und *Il9* Locus. Das *de novo* synthetisierte IL-1β aktiviert den IL-1R1 und führt über MyD88 zu einer Phosphorylierung von p38 und GATA-1 sowie einer Aktivierung von NfκB. NfκB und GATA-1 aktivieren die *Il9* mRNA Transkription und steigern die IRF4 Expression. BATF/AP-1 können mit IRF4 interagieren und die Produktion von IL-9 potenzieren. Eine Stimulation über den IL-10R oder c-Kit in Kombination mit IL-1β führen zu einer gesteigerten IL-9 Produktion, indem die *Il9* mRNA Stabilität erhöht wird. Die Aktivierung des IFN-μR könnte eine Expression von IRF1 nach sich ziehen, welches wiederum die Bindung von IRF4 an die *Il1b* und *Il9* Promotoren inhibieren könnte. In Anwesenheit von TGF-β könnte der Transkriptionsfaktor PU.1 exprimiert, welcher die Bindung von GATA-1 und IRF4 an den *Il9* Promoter hemmen könnte, und die Aktivierung von SMAD2/3 induziert werden, welche wiederum den *Il9* Locus durch Chromatinmodulation öffnen könnten.

## Diskussion

### 4.2. *In vivo* Relevanz von mastzellproduziertem IL-9

Zecken sind obligat blutsaugende Ektoparasiten von verschiedenen Vertebraten. Hierbei nehmen Zecken der Gattung *Ixodidae* über mehrere Tage ihre Blutmahlzeit zu sich. Dazu müssen sie die epidermale Barriere der Haut verletzen und verursachen demzufolge Schaden an Kapillaren und kleinen Blutgefäßen<sup>140</sup>. Der Wirt würde daraufhin unter normalen Umständen mit einer primären Entzündungsreaktion reagieren, welche eine Rekrutierung von inflammatorischen Zellen, Vasokonstriktion, Blutkoagulation und später eine starke adaptive Immunantwort nach sich ziehen würde. Die Co-Evolution von Zecken und Wirbeltieren hat daher zu einer Vielzahl von immunsuppressiven und immunmodulatorischen Komponenten im Zeckenspeichel geführt. Zecken injizieren mit ihrem Speichel einen Cocktail verschiedener Proteine, welche spezifisch bestimmte Elemente des Immunsystems verändern und unterdrücken können<sup>96</sup>. Daher bietet es sich an, die immunsuppressive Wirkung dieser Substanzen zu analysieren, um neue Therapieansätze zur Behandlung von allergischem oder autoimmunen Erkrankungen entwickeln zu können<sup>141</sup>. Darüber hinaus konnten in den letzten Jahren große therapeutische Fortschritte durch die Inhibierung der angeborenen Immunität, welche hauptsächlich für die primären Entzündungssymptome verantwortlich ist, beispielsweise bei rheumatoider Arthritis erreicht werden<sup>142,143</sup>. Aus diesem Grund wurde das Zeckenspeichel Protein Sialostatin L in dieser Arbeit hinsichtlich der immunmodulatorischen Eigenschaften auf Mastzellen des angeborenen Immunsystems untersucht.

Es stellte sich heraus, dass Sialostatin L indirekt die Produktion der Cytokine IL-9 und IL-1 $\beta$  in Mastzellen hemmt ohne dabei deren Zellvitalität oder Fähigkeit zur Degranulation und IL-6 Produktion zu beeinflussen (Abb. 6;7). Weiterführende Versuche unter Zuhilfenahme von „Next Generation Sequencing“ ließen auf einen möglichen Mechanismus der Sialostatin L vermittelten Hemmung von IL-9 über die Supprimierung von IRF4 schließen (Abb. 8).

Ferner sind Mastzellen für viele Effektorfunktionen bei einer Reihe von physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen verantwortlich, bei denen außerdem Interleukin-9 und -1 $\beta$  eine entscheidende Rolle zugesprochen wurde. In diesem Rahmen wurde durch mehrere Studien stichhaltig eine bedeutungsvolle Funktion von IL-9 bei der Abwehr von Melanomen beschrieben. Hier wurden im

## Diskussion

subkutanen Melanom Modell überwiegend Mastzellen als Effektorzellen nach IL-9 Aktivierung beschrieben, während im pulmonalen Melanom Modell eine IL-9 vermittelte Rekrutierung von cytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen und CD8<sup>+</sup> dendritischen Zellen (DC) basierend auf der Expression von CCL-20 und CCR6 für die Melanom Abstoßung verantwortlich ist<sup>52-55</sup>. Eine Hemmung von IL-9 mittels eines neutralisierenden Antikörpers führte hier zu einem gesteigerten Melanomwachstum und einer verringerten Überlebensrate. In Übereinstimmung hierzu mündete ein Transfer von IL-9 produzierenden Th9 Zellen zu einem verringerten Melanomwachstum und einer gesteigerten Überlebensrate<sup>56</sup>. Außerdem besitzt IL-9 eine protektive Funktion bei der Ausscheidung von Würmern der Gattung *Trichuris muris* und *spiralis* sowie *Nippostrongylus brasiliensis* in Mäusen<sup>49,144</sup>. Hier wirkt IL-9 vermutlich primär auf die glatte Muskulatur des Darms, wo es die Kontraktion anregt. Zudem werden durch IL-9 vermehrt Eosinophile in das Darmlumen rekrutiert und die Mucusproduktion verstärkt, wodurch eine Expulsion der Parasiten begünstigt wird.

Hingegen konnte in dieser Arbeit dokumentiert werden, dass mastzellproduziertes IL-9 entscheidend bei der Ausprägung des experimentellen präklinischen murinen Asthmas beteiligt ist. Hier hatte eine Rekonstitution mit wildtypischen Mastzellen eine gesteigerte Eosinophilie und AHR im Vergleich zu nicht-rekonstituierten Kontrolltieren zur Folge. Außerdem bewirkte der adoptive Transfer von *Il1r1*<sup>-/-</sup> Mastzellen in mastzelllose Mäuse nur eine geringe Steigerung der Symptomatik im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abb. 16;17,18). *Il1r1*<sup>-/-</sup> Mastzellen produzieren vergleichbare Mengen der Asthma fördernden Cytokine wie IL-4 und IL-13 nach Stimulation mit Ionomycin *in vitro* (nicht gezeigt). Auch die Sekretion anderer Asthma fördernder Botenstoffe wie Eotaxin, einigen Chemokinen oder des Inhaltes der Mastzell Granula ist in *Il1r1*<sup>-/-</sup> oder *Irf4*<sup>-/-</sup> unverändert (nicht gezeigt). Demnach ist es sehr wahrscheinlich, dass die IL-1 $\beta$  und IL-9 Sekretion von wildtypischen Mastzellen für die erhöhte Eosinophilie und AHR in dem untersuchten murinen präklinischen Asthmamodell verantwortlich sind.

Die therapeutische Behandlung mit Sialostatin L hatte eine deutliche Linderung der Asthmasymptomatik zur Folge (Abb. 19;20). Die Annahme, dass IL-9 einen zentralen, die Asthmasymptomatik auslösenden und erhaltenden Faktor darstellt, wird dadurch gestützt, dass eine intranasale Gabe von IL-9 den Asthma-lindernden

## Diskussion

Einfluss von Sialostatin L völlig aufhob (Abb. 19;20). Hingegen scheint es unwahrscheinlich, dass diese Wirkung von Sialostatin L auf die IL-9 Produktion von Mastzellen alleine für die gemessenen eindrucksvollen Phenotypen verantwortlich ist. Dies bestätigen Beobachtungen in denen *Il9* – defiziente Mäuse eine AHR und Eosinophilie auf wildtypischem Niveau entwickelten<sup>92</sup>. Auch erste klinische Studien zur Behandlung von chronischem unkontrolliertem Asthma mit dem IL-9-neutralisierenden Antikörper MEDI-528 konnten entgegen den Erwartungen keine signifikante Verbesserung der Asthma-Symptomatik erzielen<sup>42,145</sup>. Es ist also damit zu rechnen, dass Sialostatin L *in vivo* neben IL-9 noch weitere Asthma-induzierende und erhaltende Mechanismen supprimieren kann. Hierzu zählen sicherlich der bereits beschriebene hemmende Einfluss von Sialostatin L auf die Proliferation und Cytokinproduktion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen oder auf die Reifung von DC, welche beide für die Ausprägung einer adaptiven Immunantwort essentiell sind<sup>100,101,104</sup>.

Auch die in dieser Arbeit beobachtete Reduktion der IRF4 Expression in Mastzellen nach Behandlung mit Sialostatin L geht mit Beobachtungen einher, wonach in asthmatischen Patienten verglichen mit gesunden Probanden eine deutlich erhöhte IRF4 Expression in PBMC („peripheral blood mononuclear cells“) gemessen wurden<sup>146</sup>. Demnach könnte die systemische therapeutische Gabe von Sialostatin L im verwendeten präklinischen murinen Asthma-Modell eine Reduktion der IRF4 Expression in vielen Zellen zur Folge haben. Diese verminderte IRF4 Expression in anderen Zellen des Immunsystems könnte ebenfalls zu der Verbesserung der Asthmasymptomatik beitragen. So konnte gezeigt werden, dass IRF4 nicht nur für die Entwicklung von naiven T-Zellen zu Th9 Zellen und deren IL-9 Produktion von zentraler Bedeutung ist und *Irf4*-defiziente Mäuse kein Asthma entwickeln<sup>59</sup>. Ferner wurde IRF4 bereits bei der Regulation weiterer asthmafördernder Cytokine wie IL-4 in T-Zellen als essentieller Transkriptionsfaktor beschrieben<sup>76</sup>. Demnach könnte die systemische Gabe von Sialostatin L neben der supprimierten Proliferation von T-Zellen auch zu einer reduzierten IL-4 und IL-9 Produktion führen. Dies würde ebenfalls eine Linderung der Asthmasymptome erklären. Ferner könnte Sialostatin L die IRF4 Expression in DC hemmen. Dies hätte zur Folge, dass der beschriebene IRF4<sup>+</sup> Subtyp der DC, welcher für die Ausprägung einer effektiven Th2 Antwort notwendig ist, in seiner Funktion gehindert wird<sup>147</sup>. Dadurch könnte sich keine

## Diskussion

effektive Th2 vermittelte Immunantwort ausbilden, welche bei dem verwendeten OVA induzierten murinen präklinischen akuten Asthma-Modell charakteristisch ist<sup>148</sup>.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Sialostatin L die Expression des Transkriptionsfaktors IRF4 hemmt und somit die initiale IL-1 und IL-9 Produktion von Mastzellen supprimiert. Im murinen präklinischen Asthma konnte durch die Behandlung mit Sialostatin L eine Verbesserung der Asthmasymptomatik erreicht werden, welche jedoch sehr wahrscheinlich nicht monokausal auf die Wirkung auf mastzellproduziertes IL-9 zurückzuführen ist. Die weitere Aufklärung des Mechanismus von Sialostatin L auf Mastzellen und anderen Immunzellen in verschiedenen *in vivo* und *in vitro* Modellen könnte in jedem Fall zur Entwicklung von Wirkstoffen und Therapien für asthmatische und allergische Erkrankungen beitragen.

### 5. Zusammenfassung

Mastzellen nehmen auf Grund ihrer Fähigkeit ein breites Spektrum an biologisch hochaktiven Substanzen zu sezernieren und ihrer strategischen Lage im Körper im Bereich von Epi- und Endothelien eine wichtige Schlüsselfunktion in der Vermittlung von angeborenen und adaptiven Immunantworten ein. Deshalb wird Mastzellen eine entscheidende Rolle bei der Erkennung von Zeckenbissen zugesprochen. Ziel dieser Arbeit war es folglich, die immunmodulatorischen und immunsuppressiven Eigenschaften des im Zeckenspeichel vorhandenen Proteins Sialostatin L auf die Effektorfunktionen und Cytokinproduktion von Mastzellen zu untersuchen. In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass Sialostatin L die Produktion von IL-9 in Mastzellen hemmt, während die IL-6 Produktion, Degranulation und Zellvitalität nicht beeinflusst wird. Außerdem konnte unter Zuhilfenahme von „Next Generation Sequencing“ eine verringerte *Irf4* und *Il1b* Expression in Anwesenheit von Sialostatin L in Mastzellen nach Aktivierung festgestellt werden. In Übereinstimmung hierzu wiesen *Irf4*<sup>-/-</sup> und *Il1r1*<sup>-/-</sup> Mastzellen eine verringerte IL-9 und IL-1β Produktion auf. Dies deutete auf einen entscheidenden Einfluss von IL-1β und IRF4 auf die *Il9* Regulation in Mastzellen hin. Ferner deckten ChIP („chromatin immune precipitation“) Analysen eine direkte Bindung von IRF4 an die *Il9* und *Il1b* Loci auf. Zusätzlich konnten Reporterstudien unter Verwendung von *Il9* und *Il1b* Promoter-Luciferase Reportern und Promoter-Luciferase Reportern mit mutierten IRF4 Bindestellen die essentielle transaktivierende Funktion von IRF4 an den *Il9* und *Il1b* Promotern bestätigen. Diese Beobachtungen wiesen darauf hin, dass die Sialostatin L vermittelte Hemmung von mastzellproduziertem IL-9 hauptsächlich auf einer Suppression der IRF4 Expression beruht, welche zu einer verringerten IL-1β Produktion führt. Daher könnte vermutlich eine IL-1β induzierte positive Rückkopplung in einer gesteigerten IL-9, IRF4 und IL-1β Expression in Mastzellen resultieren. Dementsprechend ergab eine mastzellspezifische *Irf4* oder *Il1r1* Defizienz sowie eine Behandlung mit Sialostatin L eine signifikante Reduktion der Atemwegsüberempfindlichkeitsreaktion (AHR) und Eosinophilie in einem murinen präklinischem experimentellen Asthma Modell. Somit könnte die Aufklärung des Mechanismus der Sialostatin L-vermittelten Immunsuppression die Basis für die Entwicklung neuer Strategien zur Behandlung von Asthma oder anderer IL-9- und mastzellabhängigen Erkrankungen darstellen. Dessen ungeachtet kann das Verständnis der zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen der *Il9* Regulation in Mastzellen nicht als vollständig angesehen werden.

## Zusammenfassung

### Abbildung 23: Neues Modell der IL9 Regulation in Mastzellen

(A) Bisheriges Modell der IL9 Regulation in Mastzellen. (B) Neues Modell der IL9 Regulation in Mastzellen und Einfluss von Sialostatin L. Eine Stimulation der Mastzelle über den FcεR1 mündet in einer Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors NFATc2. NFATc2 transloziert in den Nukleus, öffnet zum einen den IL9 Lokus und bindet möglicherweise den *Irf4* Promoter. IRF4 wird *de novo* synthetisiert und wandert in den Kern und bindet direkt und transaktiviert den *IL1b* und *IL9* Lokus. Das *de novo* synthetisierte IL-1β aktiviert den IL-1R1 und führt über MyD88 zu einer Phosphorylierung von p38 und GATA-1 sowie einer Aktivierung von NfκB. NfκB und GATA-1 aktivieren die IL9 mRNA Transkription und steigern die IRF4 Expression. Dies führt zu einer gesteigerten IL-9 Produktion. Sialostatin L inhibiert die initiale Expression des Transkriptionsfaktors IRF4 und supprimiert somit die Produktion von IL-1β und IL-9.

## Abstract

### 6. Abstract

Mast cells are thought by virtue of their ability to produce a broad variety of biologically highly active mediators and their strategic distribution within the body to play key roles in adaptive and innate immune responses. Accordingly, mast cells might play a prominent role in sensing tick bites. Therefore, the aim of this thesis was to investigate the immunomodulatory or immunosuppressive capacities of the tick salivary protein Sialostatin L on mast cell effector functions and cytokine production. In this work, it was demonstrated that Sialostatin L restrains IL-9 production by mast cells, whereas cell viability, degranulation and *Il6* expression remain unaffected. In addition, “next generation sequencing” revealed a strongly reduced expression of *Il1b* and *Irf4* in the presence of Sialostatin L. Consistently, *irf4*- and *Il1r1*- deficient mast cells showed diminished IL-9 production, indicating the importance of IRF4 and IL-1 $\beta$  in the regulation of the *Il9* gene in mast cells. Further, ChIP (chromatin immune precipitation) analysis uncovered direct binding of IRF4 to the *Il1b* and *Il9* loci. In addition, reporter gene studies by the use of *Il9* and *Il1b* promoter-luciferase reporter or promoter-luciferase reporter with mutated potential IRF4-binding sites displayed the transactivating capacities of IRF4 at the *Il9* and *Il1b* promoter. These observations proposed the Sialostatin L mediated suppression of mast cell-derived IL-9 mainly by preventing the Expression of IRF4 leading to a diminished IL-1 $\beta$  production. Thus, it can be assumed that an IL-1 $\beta$  mediated positive feedback loop might result in an enhanced IL-9, IRF4 and IL-1 $\beta$  expression in mast cells. Correspondingly, mast cell-specific deficiency in IRF4 or IL-1R1 as well as treatment with Sialostatin L caused a significant improvement of airway hyperresponsiveness (AHR) or Eosinophilia in a murine ovalbumin induced experimental asthma model. Hence, the elucidation of the mechanisms underlying the immunosuppressive potency of sialostatin L could be the basis for the development of new treatment strategies for allergic asthma or other IL-9 and mast cell mediated diseases. However, the complete understanding of the detailed molecular mechanisms underlying *Il9* gene regulation in mast cells remains to be fully explored.

### 7. Quellen

1. Ehrlich, P. Beiträge für Theorie und Praxis der histologischen Färbung. *Leipzig Univ.* (1878).
2. Huang, E. *et al.* The hematopoietic growth factor KL is encoded by the Sl locus and is the ligand of the c-kit receptor, the gene product of the W locus. *Cell* **63**, 225–33 (1990).
3. Lantz, C. S. *et al.* Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites. *Nature* **392**, 90–3 (1998).
4. Karimi, K., Redegeld, F. a, Heijdra, B. & Nijkamp, F. P. Stem cell factor and interleukin-4 induce murine bone marrow cells to develop into mast cells with connective tissue type characteristics in vitro. *Exp. Hematol.* **27**, 654–62 (1999).
5. Ihle, J. N. *et al.* 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 . *J. Immunol.* **131**, 282–7 (1983).
6. Lee, J. C., Hapel, A. J. & Ihle, J. N. Constitutive production of a unique lymphokine (IL 3) by the WEHI-3 cell line. *J. Immunol.* **128**, 2393–8 (1982).
7. Hültner, L. *et al.* In activated mast cells, IL-1 up-regulates the production of several Th2-related cytokines including IL-9. *J. Immunol.* **164**, 5556–63 (2000).
8. Shefler, I., Salamon, P., Hershko, A. Y. & Mekori, Y. A. Mast cells. *Physiol. Rev.* **77**, 1033–1079 (1997).
9. Chen, C.-C., Grimbaldston, M. A., Tsai, M., Weissman, I. L. & Galli, S. J. Identification of mast cell progenitors in adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 11408–13 (2005).
10. Kawakami, T. & Galli, S. J. Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 773–86 (2002).
11. Galli, S. J., Maurer, M. & Lantz, C. S. Mast cells as sentinels of innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **11**, 53–9 (1999).
12. Kumar, V. & Sharma, a. Mast cells: emerging sentinel innate immune cells with diverse role in immunity. *Mol. Immunol.* **48**, 14–25 (2010).
13. Metzger, H. The receptor with high affinity for IgE. *Immunol. Rev.* **125**, 37–48 (1992).
14. Abraham, S. N. & St John, A. L. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 440–52 (2010).

## Anhang

15. Wernersson, S. & Pejler, G. Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nat. Rev. Immunol.* (2014). doi:10.1038/nri3690
16. Walsh, L. J., Trinchieri, G., Waldorf, H. A., Whitaker, D. & Murphy, G. F. Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor alpha, which induces endothelial leukocyte adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 4220–4 (1991).
17. Otsuka, a & Kabashima, K. Mast cells and basophils in cutaneous immune responses. *Allergy* **70**, 131–40 (2015).
18. Da Silva, E. Z. M., Jamur, M. C. & Oliver, C. *Mast cell function: a new vision of an old cell.* *J. Histochem. Cytochem.* **62**, 698–738 (2014).
19. Kalesnikoff, J. & Galli, S. J. Antiinflammatory and immunosuppressive functions of mast cells. *Methods Mol. Biol.* **677**, 207–20 (2011).
20. De Vries, V. C. *et al.* Mast cell degranulation breaks peripheral tolerance. *Am. J. Transplant* **9**, 2270–80 (2009).
21. Reber, L. L., Marichal, T. & Galli, S. J. New models for analyzing mast cell functions in vivo. *Trends Immunol.* **33**, 613–25 (2012).
22. Metz, M. *et al.* Mast cells can enhance resistance to snake and honeybee venoms. *Science* **313**, 526–30 (2006).
23. Grimbaldston, M. a, Nakae, S., Kalesnikoff, J., Tsai, M. & Galli, S. J. Mast cell-derived interleukin 10 limits skin pathology in contact dermatitis and chronic irradiation with ultraviolet B. *Nat. Immunol.* **8**, 1095–104 (2007).
24. Schmitt, E., Klein, M. & Bopp, T. Th9 cells, new players in adaptive immunity. *Trends Immunol.* **35**, 61–8 (2014).
25. Hültner, L. *et al.* Mast cell growth-enhancing activity (MEA) is structurally related and functionally identical to the novel mouse T cell growth factor P40/TCGFIII (interleukin 9). *Eur. J. Immunol.* **20**, 1413–6 (1990).
26. Schmitt, E., Van Brandwijk, R., Van Snick, J., Siebold, B. & Rude, E. TCGF III/P40 is produced by naive murine CD4+ T cells but is not a general T cell growth factor. *Eur. J. Immunol.* **19**, 2167–70 (1989).
27. Uyttenhove, C., Simpson, R. J. & Van Snick, J. Functional and structural characterization of P40, a mouse glycoprotein with T-cell growth factor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 6934–8 (1988).
28. Donahue, R. E., Yang, Y. C. & Clark, S. C. Human P40 T-cell growth factor (interleukin-9) supports erythroid colony formation. *Blood* **75**, 2271–5 (1990).

## Anhang

29. Schmitt, E. *et al.* IL-9 production of naive CD4<sup>+</sup> T cells depends on IL-2, is synergistically enhanced by a combination of TGF-beta and IL-4, and is inhibited by IFN-gamma. *J. Immunol.* **153**, 3989–96 (1994).
30. Dardalhon, V. *et al.* IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3<sup>+</sup> T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> Foxp3(-) effector T cells. *Nat. Immunol.* **9**, 1347–55 (2008).
31. Stassen, M. *et al.* 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**, 4391–8 (2001).
32. Goswami, R. & Kaplan, M. H. A brief history of IL-9. *J. Immunol.* **186**, 3283–8 (2011).
33. Kearley, J. *et al.* IL-9 governs allergen-induced mast cell numbers in the lung and chronic remodeling of the airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **183**, 865–75 (2011).
34. Campillo-Navarro, M. *et al.* Mast Cells in Lung Homeostasis: Beyond Type I Hypersensitivity. *Curr. Respir. Med. Rev.* **10**, 115–123 (2014).
35. Sehra, S. *et al.* TH9 cells are required for tissue mast cell accumulation during allergic inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1–9 (2015).  
doi:10.1016/j.jaci.2015.01.021
36. Temann, U. A., Geba, G. P., Rankin, J. A. & Flavell, R. A. Expression of interleukin 9 in the lungs of transgenic mice causes airway inflammation, mast cell hyperplasia, and bronchial hyperresponsiveness. *J. Exp. Med.* **188**, 1307–20 (1998).
37. Zhou, Y., McLane, M. & Levitt, R. C. Th2 cytokines and asthma. Interleukin-9 as a therapeutic target for asthma. *Respir. Res.* **2**, 80–4 (2001).
38. Kung, T. T. *et al.* Effect of anti-mIL-9 antibody on the development of pulmonary inflammation and airway hyperresponsiveness in allergic mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **25**, 600–5 (2001).
39. Licona-Limón, P. *et al.* Th9 Cells Drive Host Immunity against Gastrointestinal Worm Infection. *Immunity* **39**, 744–757 (2013).
40. Yamasaki, A. *et al.* IL-9 induces CCL11 expression via STAT3 signalling in human airway smooth muscle cells. *PLoS One* **5**, e9178 (2010).
41. Shimbara, A. *et al.* IL-9 and its receptor in allergic and nonallergic lung disease: increased expression in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **105**, 108–15 (2000).
42. Oh, C. K. *et al.* A randomized, controlled trial to evaluate the effect of an anti-interleukin-9 monoclonal antibody in adults with uncontrolled asthma. *Respir. Res.* **14**, 93 (2013).

## Anhang

43. Li, H., Nourbakhsh, B., Ciric, B., Zhang, G.-X. & Rostami, A. Neutralization of IL-9 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by decreasing the effector T cell population. *J. Immunol.* **185**, 4095–100 (2010).
44. Zhou, Y. *et al.* IL-9 promotes Th17 cell migration into the central nervous system via CC chemokine ligand-20 produced by astrocytes. *J. Immunol.* **186**, 4415–21 (2011).
45. Murugaiyan, G., Beynon, V., Pires Da Cunha, A., Joller, N. & Weiner, H. L. IFN- $\gamma$  limits Th9-mediated autoimmune inflammation through dendritic cell modulation of IL-27. *J. Immunol.* **189**, 5277–83 (2012).
46. Gerlach, K. *et al.* TH9 cells that express the transcription factor PU.1 drive T cell-mediated colitis via IL-9 receptor signaling in intestinal epithelial cells. *Nat. Immunol.* **15**, 676–86 (2014).
47. Gerlach, K., McKenzie, A. N., Neurath, M. F. & Weigmann, B. IL-9 regulates intestinal barrier function in experimental T cell-mediated colitis. *Tissue barriers* **3**, e983777 (2015).
48. Faulkner, H., Renaud, J. C., Van Snick, J. & Grencis, R. K. Interleukin-9 enhances resistance to the intestinal nematode *Trichuris muris*. *Infect. Immun.* **66**, 3832–40 (1998).
49. Khan, W. I. *et al.* Modulation of intestinal muscle contraction by interleukin-9 (IL-9) or IL-9 neutralization: correlation with worm expulsion in murine nematode infections. *Infect. Immun.* **71**, 2430–8 (2003).
50. Merz, H. *et al.* Interleukin-9 expression in human malignant lymphomas: unique association with Hodgkin's disease and large cell anaplastic lymphoma. *Blood* **78**, 1311–7 (1991).
51. Renaud, J. C., Kermouni, A., Vink, A., Louahed, J. & Van Snick, J. Interleukin-9 and its receptor: involvement in mast cell differentiation and T cell oncogenesis. *J. Leukoc. Biol.* **57**, 353–60 (1995).
52. Lu, Y. *et al.* Th9 cells promote antitumor immune responses in vivo. *J. Clin. Invest.* **122**, 4160–71 (2012).
53. Park, J. *et al.* Murine Th9 cells promote the survival of myeloid dendritic cells in cancer immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* **63**, 835–45 (2014).
54. Végran, F. *et al.* The transcription factor IRF1 dictates the IL-21-dependent anticancer functions of TH9 cells. *Nat. Immunol.* **15**, 758–66 (2014).
55. Lu, Y. *et al.* Tumor-specific IL-9-producing CD8<sup>+</sup> Tc9 cells are superior effector than type-I cytotoxic Tc1 cells for adoptive immunotherapy of cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 6–11 (2014). doi:10.1073/pnas.1317431111

## Anhang

56. Purwar, R. *et al.* Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9-producing T cells. *Nat. Med.* **18**, 1248–53 (2012).
57. Turner, J.-E. *et al.* IL-9-mediated survival of type 2 innate lymphoid cells promotes damage control in helminth-induced lung inflammation. *J. Exp. Med.* (2013). doi:10.1084/jem.20130071
58. Chen, N., Lu, K., Li, P., Lv, X. & Wang, X. Overexpression of IL-9 induced by STAT6 activation promotes the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **7**, 2319–23 (2014).
59. Staudt, V. *et al.* Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells. *Immunity* **33**, 192–202 (2010).
60. Chang, H.-C. *et al.* The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nat. Immunol.* **11**, 527–34 (2010).
61. Yao, W. *et al.* Interleukin-9 is required for allergic airway inflammation mediated by the cytokine TSLP. *Immunity* **38**, 360–72 (2013).
62. Wang, A. *et al.* Cutting Edge: Smad2 and Smad4 Regulate TGF- $\beta$ -Mediated IL9 Gene Expression via EZH2 Displacement. *J. Immunol.* **191**, 4908–12 (2013).
63. Tamiya, T. *et al.* Smad2/3 and IRF4 play a cooperative role in IL-9-producing T cell induction. *J. Immunol.* **191**, 2360–71 (2013).
64. Perumal, N. B. & Kaplan, M. H. Regulating IL9 transcription in T helper cells. *Trends Immunol.* **32**, 146–50 (2011).
65. Stassen, M. *et al.* p38 MAP kinase drives the expression of mast cell-derived IL-9 via activation of the transcription factor GATA-1. *Mol. Immunol.* **44**, 926–33 (2007).
66. Stassen, M. *et al.* 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**, 5549–55 (2000).
67. Shaffer, A. L., Emre, N. C. T., Romesser, P. B. & Staudt, L. M. IRF4: Immunity. Malignancy! Therapy? *Clin. Cancer Res.* **15**, 2954–61 (2009).
68. Miyamoto, M. *et al.* Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements. *Cell* **54**, 903–13 (1988).
69. Fujii, Y. *et al.* Crystal structure of an IRF-DNA complex reveals novel DNA recognition and cooperative binding to a tandem repeat of core sequences. *EMBO J.* **18**, 5028–41 (1999).

## Anhang

70. Honda, K., Takaoka, A. & Taniguchi, T. Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity* **25**, 349–60 (2006).
71. Mamane, Y. *et al.* Interferon regulatory factors: the next generation. *Gene* **237**, 1–14 (1999).
72. Iida, S. *et al.* Deregulation of MUM1/IRF4 by chromosomal translocation in multiple myeloma. *Nat. Genet.* **17**, 226–30 (1997).
73. Matsuyama, T. *et al.* Molecular cloning of LSIRF, a lymphoid-specific member of the interferon regulatory factor family that binds the interferon-stimulated response element (ISRE). *Nucleic Acids Res.* **23**, 2127–36 (1995).
74. Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, A. & Tanaka, N. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 623–55 (2001).
75. Biswas, P. S. *et al.* Phosphorylation of IRF4 by ROCK2 regulates IL-17 and IL-21 production and the development of autoimmunity in mice. *J. Clin. Invest.* **120**, 3280–95 (2010).
76. Rengarajan, J. *et al.* Interferon regulatory factor 4 (IRF4) interacts with NFATc2 to modulate interleukin 4 gene expression. *J. Exp. Med.* **195**, 1003–12 (2002).
77. Zheng, Y. *et al.* Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses. *Nature* **458**, 351–6 (2009).
78. Cretney, E. *et al.* The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **12**, 304–11 (2011).
79. Williams, J. W. *et al.* Transcription factor IRF4 drives dendritic cells to promote Th2 differentiation. *Nat. Commun.* **4**, 2990 (2013).
80. Gao, Y. *et al.* Control of T helper 2 responses by transcription factor IRF4-dependent dendritic cells. *Immunity* **39**, 722–32 (2013).
81. Ulges, A. *et al.* Protein kinase CK2 enables regulatory T cells to suppress excessive TH2 responses in vivo. *Nat. Immunol.* **16**, 267–75 (2015).
82. Marecki, S., Riendeau, C. J., Liang, M. D. & Fenton, M. J. PU.1 and multiple IFN regulatory factor proteins synergize to mediate transcriptional activation of the human IL-1 beta gene. *J. Immunol.* **166**, 6829–38 (2001).
83. Biswas, P. S. *et al.* Dual regulation of IRF4 function in T and B cells is required for the coordination of T-B cell interactions and the prevention of autoimmunity. *J. Exp. Med.* Epub (2012). doi:10.1084/jem.20111195

## Anhang

84. Farahani, R., Sherkat, R., Hakemi, M. G., Eskandari, N. & Yazdani, R. Cytokines (interleukin-9, IL-17, IL-22, IL-25 and IL-33) and asthma. *Adv. Biomed. Res.* **3**, 127 (2014).
85. Barnes, P. J. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 183–192 (2008).
86. Fahy, J. V. Type 2 inflammation in asthma--present in most, absent in many. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 57–65 (2015).
87. Webb, D. C. *et al.* Integrated signals between IL-13, IL-4, and IL-5 regulate airways hyperreactivity. *J. Immunol.* **165**, 108–13 (2000).
88. Galli, S. J., Tsai, M. & Piliponsky, A. M. The development of allergic inflammation. *Nature* **454**, 445–54 (2008).
89. Stassen, M., Schmitt, E. & Bopp, T. From interleukin-9 to T helper 9 cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1247**, 56–68 (2012).
90. Kung, T. T. *et al.* Effect of anti-mIL-9 antibody on the development of pulmonary inflammation and airway hyperresponsiveness in allergic mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **25**, 600–5 (2001).
91. Cheng, G. *et al.* Anti-interleukin-9 antibody treatment inhibits airway inflammation and hyperreactivity in mouse asthma model. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **166**, 409–16 (2002).
92. McMillan, S. J., Bishop, B., Townsend, M. J., McKenzie, A. N. & Lloyd, C. M. The absence of interleukin 9 does not affect the development of allergen-induced pulmonary inflammation nor airway hyperreactivity. *J. Exp. Med.* **195**, 51–7 (2002).
93. Chesné, J. *et al.* IL-17 in severe asthma. Where do we stand? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **190**, 1094–101 (2014).
94. Ji, X. *et al.* IL4 and IL-17A provide a Th2/Th17-polarized inflammatory milieu in favor of TGF- $\beta$ 1 to induce bronchial epithelial-mesenchymal transition (EMT). *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **6**, 1481–92 (2013).
95. Meyer-Martin, H., Reuter, S. & Taube, C. Mouse models of allergic airway disease. *Methods Mol. Biol.* **1193**, 127–41 (2014).
96. Kazimírová, M. & Štibrániová, I. Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **3**, 43 (2013).
97. Ribeiro, J. M. C. *et al.* An annotated catalog of salivary gland transcripts from Ixodes scapularis ticks. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **36**, 111–29 (2006).

## Anhang

98. Kotsyfakis, M. *et al.* Antiinflammatory and immunosuppressive activity of sialostatin L, a salivary cystatin from the tick *Ixodes scapularis*. *J. Biol. Chem.* **281**, 26298–307 (2006).
99. Kotsyfakis, M., Horka, H., Salat, J. & Andersen, J. F. The crystal structures of two salivary cystatins from the tick *Ixodes scapularis* and the effect of these inhibitors on the establishment of *Borrelia burgdorferi* infection in a murine model. *Mol. Microbiol.* **77**, 456–70 (2010).
100. Kotsyfakis, M. *et al.* Cutting edge: Immunity against a “silent” salivary antigen of the Lyme vector *Ixodes scapularis* impairs its ability to feed. *J. Immunol.* **181**, 5209–12 (2008).
101. Sá-Nunes, A. *et al.* The immunomodulatory action of sialostatin L on dendritic cells reveals its potential to interfere with autoimmunity. *J. Immunol.* **182**, 7422–9 (2009).
102. Chen, G. *et al.* The tick salivary protein sialostatin L2 inhibits caspase-1-mediated inflammation during *Anaplasma phagocytophilum* infection. *Infect. Immun.* **82**, 2553–64 (2014).
103. Lieskovská, J. *et al.* Tick salivary cystatin sialostatin L2 suppresses IFN responses in mouse dendritic cells. *Parasite Immunol.* **37**, 70–8 (2015).
104. Lieskovská, J. *et al.* Tick sialostatins L and L2 differentially influence dendritic cell responses to *Borrelia spirochetes*. *Parasit. Vectors* **8**, 275 (2015).
105. Horka, H. *et al.* The tick salivary protein sialostatin L inhibits the Th9-derived production of the asthma-promoting cytokine IL-9 and is effective in the prevention of experimental asthma. *J. Immunol.* **188**, 2669–76 (2012).
106. Steeves, E. B. & Allen, J. R. Tick resistance in mast cell-deficient mice: histological studies. *Int. J. Parasitol.* **21**, 265–8 (1991).
107. Matsuda, H. *et al.* Necessity of IgE antibodies and mast cells for manifestation of resistance against larval *Haemaphysalis longicornis* ticks in mice. *J. Immunol.* **144**, 259–62 (1990).
108. Mittrücker, H. W. *et al.* Requirement for the transcription factor LSIRF/IRF4 for mature B and T lymphocyte function. *Science* **275**, 540–3 (1997).
109. Horai, R. *et al.* Production of mice deficient in genes for interleukin (IL)-1alpha, IL-1beta, IL-1alpha/beta, and IL-1 receptor antagonist shows that IL-1beta is crucial in turpentine-induced fever development and glucocorticoid secretion. *J. Exp. Med.* **187**, 1463–75 (1998).
110. Glaccum, M. B. *et al.* Phenotypic and functional characterization of mice that lack the type I receptor for IL-1. *J. Immunol.* **159**, 3364–71 (1997).

## Anhang

111. Geissler, E. N., McFarland, E. C. & Russell, E. S. Analysis of pleiotropism at the dominant white-spotting (W) locus of the house mouse: a description of ten new W alleles. *Genetics* **97**, 337–61 (1981).
112. Eshhar, Z., Ofarim, M. & Waks, T. Generation of hybridomas secreting murine reagenic antibodies of anti-DNP specificity. *J. Immunol.* **124**, 775–80 (1980).
113. Baniyash, M. & Eshhar, Z. Inhibition of IgE binding to mast cells and basophils by monoclonal antibodies to murine IgE. *Eur. J. Immunol.* **14**, 799–807 (1984).
114. Toda, Y. *et al.* Autocrine induction of the human pro-IL-1beta gene promoter by IL-1beta in monocytes. *J. Immunol.* **168**, 1984–91 (2002).
115. Chung, Y. *et al.* Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity* **30**, 576–87 (2009).
116. Galli, S. J. *et al.* Mast cells as “tunable” effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 749–786 (2005).
117. Gordon, J. R. & Galli, S. J. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-alpha/cachectin. *Nature* **346**, 274–6 (1990).
118. Reber, L. L. *et al.* Contribution of mast cell-derived interleukin-1 $\beta$  to uric acid crystal-induced acute arthritis in mice. *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)* **66**, 2881–91 (2014).
119. Stassen, M. *et al.* 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**, 4391–8 (2001).
120. Klein, M. *et al.* Specific and redundant roles for NFAT transcription factors in the expression of mast cell-derived cytokines. *J. Immunol.* **177**, 6667–74 (2006).
121. Hart, P. H. Regulation of the inflammatory response in asthma by mast cell products. *Immunol. Cell Biol.* **79**, 149–53 (2001).
122. Hultner, L. *et al.* In Activated Mast Cells, IL-1 Up-Regulates the Production of Several Th2-Related Cytokines Including IL-9. *J. Immunol.* **164**, 5556–5563 (2000).
123. Gilfillan, A. M. & Tkaczyk, C. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 218–30 (2006).
124. Macian, F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 472–84 (2005).
125. Jash, A. *et al.* Nuclear factor of activated T cells 1 (NFAT1)-induced permissive chromatin modification facilitates nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)-mediated interleukin-9 (IL-9) transactivation. *J. Biol. Chem.* **287**, 15445–57 (2012).

## Anhang

126. Zhang, P. *et al.* PU.1 inhibits GATA-1 function and erythroid differentiation by blocking GATA-1 DNA binding. *Blood* **96**, 2641–8 (2000).
127. Walsh, J. C. *et al.* Cooperative and Antagonistic Interplay between PU.1 and GATA-2 in the Specification of Myeloid Cell Fates. *Immunity* **17**, 665–676 (2002).
128. Goswami, R. & Kaplan, M. H. Gcn5 is required for PU.1-dependent IL-9 induction in Th9 cells. *J. Immunol.* **189**, 3026–33 (2012).
129. Gomez, G. *et al.* TGF-beta 1 inhibits mast cell Fc epsilon RI expression. *J. Immunol.* **174**, 5987–93 (2005).
130. Keck, S. *et al.* Absence of TRIF signaling in lipopolysaccharide-stimulated murine mast cells. *J. Immunol.* **186**, 5478–88 (2011).
131. O'Neill, L. A. J. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunol. Rev.* **226**, 10–8 (2008).
132. Wiener, Z., Falus, A. & Toth, S. IL-9 increases the expression of several cytokines in activated mast cells, while the IL-9-induced IL-9 production is inhibited in mast cells of histamine-free transgenic mice. *Cytokine* **26**, 122–30 (2004).
133. Fratelli, M. *et al.* Autocrine interleukin-1 beta regulates both proliferation and apoptosis in EL4-6.1 thymoma cells. *Blood* **85**, 3532–7 (1995).
134. Cozzolino, F. *et al.* Interleukin 1 is an autocrine regulator of human endothelial cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 6487–91 (1990).
135. Elser, B. *et al.* IFN-gamma represses IL-4 expression via IRF-1 and IRF-2. *Immunity* **17**, 703–12 (2002).
136. Negishi, H. *et al.* Negative regulation of Toll-like-receptor signaling by IRF-4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 15989–94 (2005).
137. Tamura, T., Yanai, H., Savitsky, D. & Taniguchi, T. The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 535–84 (2008).
138. Jabeen, R. *et al.* Th9 cell development requires a BATF-regulated transcriptional network. *J. Clin. Invest.* **123**, 4641–53 (2013).
139. Ahyi, A.-N. N., Chang, H.-C., Dent, A. L., Nutt, S. L. & Kaplan, M. H. IFN regulatory factor 4 regulates the expression of a subset of Th2 cytokines. *J. Immunol.* **183**, 1598–606 (2009).
140. Anderson, J. F. & Magnarelli, L. a. Biology of ticks. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **22**, 195–215, v (2008).

## Anhang

141. Rüter, C. & Hardwidge, P. R. “Drugs from bugs”: bacterial effector proteins as promising biological (immune-) therapeutics. *FEMS Microbiol. Lett.* **351**, 126–32 (2014).
142. Singh, J. A. *et al.* Biologics for rheumatoid arthritis: an overview of Cochrane reviews. *Cochrane database Syst. Rev.* CD007848 (2009).  
doi:10.1002/14651858.CD007848.pub2
143. Chen, Y. *et al.* A systematic review of the effectiveness of adalimumab, etanercept and infliximab for the treatment of rheumatoid arthritis in adults and an economic evaluation of their cost-effectiveness. *Health Technol. Assess.* **10**, iii–iv, xi–xiii, 1–229 (2006).
144. Faulkner, H., Humphreys, N., Renaud, J. C., Van Snick, J. & Grecis, R. Interleukin-9 is involved in host protective immunity to intestinal nematode infection. *Eur. J. Immunol.* **27**, 2536–40 (1997).
145. Parker, J. M. *et al.* Safety profile and clinical activity of multiple subcutaneous doses of MEDI-528, a humanized anti-interleukin-9 monoclonal antibody, in two randomized phase 2a studies in subjects with asthma. *BMC Pulm. Med.* **11**, 14 (2011).
146. Chen, X., Gao, Y.-D. & Yang, J. Elevated interferon regulatory factor 4 levels in patients with allergic asthma. *J. Asthma* **49**, 441–9 (2012).
147. Persson, E. K. *et al.* IRF4 transcription-factor-dependent CD103(+)CD11b(+) dendritic cells drive mucosal T helper 17 cell differentiation. *Immunity* **38**, 958–69 (2013).
148. Licona-Limón, P., Kim, L. K., Palm, N. W. & Flavell, R. a. TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells. *Nat. Immunol.* **14**, 536–42 (2013).

### 8. Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	anti
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure)
AHR	Airway hyperresponsiveness
Ag	Antigen
AP-1	Aktivator Protein 1
APS	Ammoniumpersulfat
BAL	Bronchoalveolare Lavage
BCR	B-Zell Rezeptor
bio	biotinyliert
Blimp	B lymphocyte-induced maturation protein
BMMC	bone marrow derived mast cells
bp	Basenpaar
BSA	bovine serum albumin
C	Complement
Casp	Caspase
CCR	Chemokinrezeptor
c-Kit	c-Kit-Rezeptor für SCF
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
ChIP	Chromatin Immuno-Präzipitation
CMV	Cytomegalivirus
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CTMC	connective tissue type mast cell
dATP	2'-Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxy-Cytidin-5'-Triphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	2'-Desoxy-Guanosin-5'-Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-Triphosphat
Dr	Doktor
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxy-Thymidin-5'-Triphosphat
E.coli	Escherichia Coli
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	disodium ethylenediamine tetraacetic acid

## Anhang

ELISA	enzyme linked immunosorbend assay
F	Farad
FACS	Fluorescence activated cell sorting
Fc	fragment crystallizable
FCS	fetal calf serum
FcεRI	hochaffiner Rezeptor für IgE-Antikörper
FITC	Fluoreszein-5-isothiocyanat
GATA	GATA-binding factor 1
GTC	Guadiniumthiocyanat
h	human
ICSAT	Interferon Konsensussequenz-Bindeprotein für aktivierte T-Zellen
IFN	Interferon
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
IL9 prom	Interleukin- 9 Promoter + Leervektor
ILC	Innate like lymphoid cell
IMDM	Iscove`s modifies Dubeccos`s medium
IRF	Interferon regulatory factor
kb	Kilobase
KO	knock out
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
LSIRF	lymphozytenspezifisches IRF
M	molar
MACS	magnetic activated cell sorter
MEA	mast cell growth-enhancing activity
MEM	minimal essential medium
min	Minute
MMC	mucosal type mast cell
mr	murin rekombinant
mRNA	messenger RNA
MUM	multiple myeloma oncogene
mut	Mutante
MyD	Myeloid differentiation primary response gene
N	normal
NFAT	nuclear factor of activated T- cells
NF-κB	„nuclear factor κB“
OD	optische Dichte
OVA	Ovalbumin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

## Anhang

PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
Pip	PU.1-Interaktionspartner
Prof	Professor
R	Rezeptor
ROCK	Rho-associated protein kinase
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SCF	Stammzellefaktor
SDS	sodium dodecyl sulfate
SMAD	Mothers against decapentaplegic homolog
T4	Bakteriophage T4
Taq	Thermus aquaticus DNA-Polymerase
TCR	T cell receptor
TE	Tris- EDTA
tg	transgen
TGF	transforming growth factor
Th	T-Helferzelle
Tk	Thymidin Kinase
TLR	„Toll like receptor“
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF	TNF receptor associated factor
Tris	Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan
TSLP	thymic stromal lymphopoietin
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
VE	voll entsalzt
WT	Wildtyp
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
ZNS	Zentralnervensystem

## 9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Physiologische und Pathophysiologische Funktionen von IL-9.....	5
Abbildung 2: Multiple Funktionen von IRF4 in unterschiedlichen hämatopoetischen Zellen.....	8
Abbildung 3: Wirkung von Sialostatin L auf Immunzellen .....	12
Abbildung 4: Fragestellung der Arbeit .....	13
Abbildung 5: Versuchsanordnung der in vivo Experimente .....	38
Abbildung 6: Sialostatin L hat keinen Einfluss auf die Degranulation und Zellvitalität von Mastzellen.....	40
Abbildung 7: Sialostatin L inhibiert die Produktion von IL-9.....	42
Abbildung 8: Sialostatin L inhibiert die Expression von <i>Il9</i> , <i>Irf4</i> und <i>Il1b</i> , nicht jedoch <i>Il6</i> .....	44
Abbildung 9: Sialostatin L inhibiert die Produktion von IL-1 $\beta$ und Expression von IRF4 auf Proteinebene .....	45
Abbildung 10: Die Sialostatin L vermittelte Suppression der IL-9 Produktion in Mastzellen wird durch exogenes IL-1 $\beta$ nahezu vollständig aufgehoben.....	46
Abbildung 11: <i>Il1r1</i> <sup>-</sup> und <i>Irf4</i> <sup>-</sup> defiziente Mastzellen weisen eine verringerte Produktion der Cytokine IL-9 und IL-1 $\beta$ im Vergleich zu Wildtyp Mastzellen auf. Die Expression des Transkriptionsfaktors IRF4 ist in <i>Il1r1</i> <sup>-</sup> defizienten Mastzellen verringert. ....	48
Abbildung 12: Eine mastzellspezifische <i>Il1r1</i> <sup>-</sup> und <i>Irf4</i> <sup>-</sup> Defizienz hat keinen Einfluss auf die Degranulation und IL-6 Produktion .....	50
Abbildung 13: Die reduzierte IL-9 Produktion in <i>Irf4</i> <sup>-</sup> Mastzellen kann durch exogenes IL-1 $\beta$ zum Teil aufgehoben werden. Die IRF4 Expression wird durch exogenes IL-1 $\beta$ gesteigert .....	52
Abbildung 14: Sialostatin L hat kaum Einfluss auf die IL-9 Produktion von <i>Irf4</i> <sup>-</sup> Mastzellen.....	53
Abbildung 15: Der Transkriptionsfaktor IRF4 bindet und transaktiviert den <i>Il9</i> und <i>Il1b</i> Promoter.....	55
Abbildung 16: Kit <sup>W-sh/W-sh</sup> Mäuse werden unabhängig vom Genotyp der adoptiv transferierten Mastzellen rekonstituiert.....	57

Abbildung 17: Eine mastzellspezifische <i>Irf4</i> oder <i>Il1r1</i> Defizienz reduziert den Influx von eosinophilen Granulozyten in die Lunge nach Sensibilisierung und Provoaktion mit OVA .....	58
Abbildung 18: Eine mastzellspezifische <i>Irf4</i> oder <i>Il1r1</i> Defizienz reduziert den Influx von eosinophilen Granulozyten in die Lunge nach Provokation mit OVA. ....	59
Abbildung 19: Mastzellspezifische Defizienz in <i>Irf4</i> und <i>Il1r1</i> reduziert den Atemwegswiderstand der Lunge nach Provokation mit OVA und Metacholin. ....	61
Abbildung 20: Eine therapeutische Anwendung von Sialostatin L lindert Eosinophilie im experimentellen Asthma. ....	63
Abbildung 21: Eine therapeutische Behandlung mit Sialostatin L reduziert den Atemwegswiderstand der Lunge nach Provokation mit OVA und Metacholin. ....	65
Abbildung 22: Modell der IL-9 Regulation in Mastzellen .....	74
Abbildung 23: Neues Modell der IL9 Regulation in Mastzellen .....	80