

# **Wichtige Faktoren für die Expression von Interleukin 9 in murinen Mastzellen**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

angefertigt im

**Institut für Immunologie**

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Fachbereich Biologie

vorgelegt von:

**Pamela Baars**

geboren am 07.02.1982

in Schweinfurt

Mainz, September 2015

D77 - Mainzer Dissertation

Dekan:

Erster Berichterstatter:

Zweiter Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 02.05.2016

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere, dass ich diese Doktorarbeit ohne Hilfe Dritter und ohne die Benutzung anderer als den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt habe. Die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Mainz, September 2015

---

(Pamela Baars)

## Danksagungen

## Publikationen

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Mastzellen	1
1.2	Aktivierung von Mastzellen	2
1.2.1	Der klassische Weg der Mastzell-Aktivierung über den FcεRI	2
1.2.2	Alternative Aktivierung der Mastzellen durch Toll-like Rezeptoren	4
1.3	Der Botenstoff Interleukin 9	7
1.4	Die Transkriptionsfaktoren der NF-κB-Familie	8
1.5	Die Proteine der NFAT-Familie	10
1.6	Zielsetzung der Arbeit	13
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>14</b>
2.1	Plastikwaren	14
2.2	Laborgeräte	14
2.3	Chemikalien	14
2.4	Kulturmedien und Puffer	15
2.4.1	Puffer und Lösungen	15
2.4.2	Medien	18
2.5	Antikörper	19
2.6	Cytokine	21
2.7	Verwendete Produktsets	22
2.8	Tiere	22
2.9	Methoden der Zellkultur	23
2.9.1	Präparation von Knochenmarkszellen	23
2.9.2	Lebendzellzahlbestimmung	24
2.10	Stimulation der Mastzellen	24
2.10.1	Stimulation mit dem IL-1-Rezeptorantagonisten Anakinra	25
2.10.2	Stimulation mittels IgE-Kreuzvernetzung	25
2.10.3	Stimulation mit dem Calcium-Ionophor Ionomycin	25
2.10.4	Stimulation mit den Kofaktoren R-LPS oder IL-1β	26
2.10.5	Inhibition von c-Rel mittels des c-Rel-Inhibitors IT-603	26

---

2.11 Durchflusszytometrie .....	27
2.11.1 Färbung der Zellen für die Durchflusszytometrie .....	27
2.12 Nachweis der Degranulation mit dem $\beta$ -Hexosaminidase-Test.....	27
2.13 Molekularbiologische Methoden .....	28
2.13.1 RNA-Präparation aus murinen BMMC .....	28
2.13.2 Lösen des RNA-Pellets .....	28
2.13.3 Konzentrationsbestimmung der RNA .....	29
2.13.4 Reverse Transkription .....	29
2.13.5 semiquantitative Realtime-PCR (qRT-PCR).....	30
2.13.6 Reportergenuntersuchungen.....	32
2.14 “Enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA) .....	33
2.14.1 ELISA zur Bestimmung der Cytokine Interleukin 9 und 6 .....	33
2.14.2 ELISA zur Messung der IL-1 $\beta$ -Konzentration.....	34
2.15 Proteinanalyse .....	35
2.15.1 Präparation von Gesamtprotein .....	35
2.15.2 Präparation von nukleärem Protein.....	35
2.15.3 Proteinbestimmung.....	35
2.15.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	36
2.15.5 Western Blot.....	36
2.15.6 Immundetektion.....	37
2.16 RNA-Interferenz.....	37
2.16.1 Bestimmung der Transfektionseffizienz.....	38
2.17 Graphen und Statistik .....	39
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>40</b>
3.1 Verglichen mit BMMC aus C57BL/6-Mäusen zeigen BMMC aus BALB/c eine gesteigerte IL-9-Produktion.....	40
3.1.1 Die Wirkung von Lipopolysaccharid auf murine BMMC .....	42
3.1.2 Die R-Form von LPS als potenter Koaktivator von BMMC.....	43
3.1.3 Blockade des IL-1-Rezeptors durch den IL-1-Rezeptorantagonisten Anakinra hemmt den Effekt von R-LPS auf die Produktion von IL-9.....	44
3.1.4 BMMC aus BALB/c zeigen eine verstärkte IL-1 $\beta$ -Expression .....	47

3.1.5	Exogenes IL-1 $\beta$ kann die IL-9-Bildung von BMMC aus C57BL/6 nicht steigern .	48
3.1.6	Vergleich der Expression von Oberflächenrezeptoren in der Durchflusszytometrie.....	50
3.1.7	Mastzellen aus beiden Mausstämmen zeigen keine Unterschiede in ihrer Fähigkeit zur Degranulation.....	51
3.1.8	Analyse der Expression einzelner Mitglieder der IL-1R/TLR-4-Signalkaskade .....	52
3.1.9	Die differentielle Expression des Transkriptionsfaktors interferon regulatory factor 4 beeinflusst die IL-9-Produktion.....	54
3.1.10	Der siRNA-vermittelte „Knockdown“ von IRF-4 beeinträchtigt die Produktion von IL-9 .....	56
3.1.11	Die Mastzell-spezifische Defizienz des Transkriptionsfaktors IRF-4. ....	58
3.1.12	Die Defizienz des Transkriptionsfaktors IRF-4 wirkt sich nicht auf die Fähigkeit zur Degranulation aus. ....	59
3.1.13	Durch die Defizienz von IRF-4 verringert sich die IL-9-Produktion.....	59
3.1.14	Die Mastzell-spezifische IRF-4-Defizienz zeigt keinen Einfluss auf die Bildung von IL-1 $\beta$ -mRNA.....	61
3.1.15	Der Transkriptionsfaktor IRF-1 wird in BALB/c verstärkt gebildet .....	61
3.1.16	Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges .....	63
3.1.17	Die Inhibition von c-Rel hemmt die Produktion von IL-9, IL-1 $\beta$ und IRF-4 und weiterer NF- $\kappa$ B-Zielgene.....	68
3.2	Untersuchungen zur Bedeutung des Transkriptionsfaktors NFATc1 für die IL-9-Produktion .....	71
3.2.1	Generierung der Mastzell-spezifischen NFATc1-Defizienz.....	71
3.2.2	Die NFATc1-defizienten BMMC exprimieren mehr IL-9 .....	72
3.2.3	NFATc1-defiziente BMMC zeigen eine erhöhte NFAT-Transkriptionsaktivität....	75
3.2.4	Die Mastzell-spezifische NFATc1-Deletion bewirkt eine Überexpression von NFATc2.....	76
3.2.5	Die Überexpression von NFATc2 ist Ursache für die verstärkte Produktion von IL-9, IRF-4 und IL-1 $\beta$ .....	78

---

3.2.6 Die systemische Defizienz des Faktors NFATc2 bewirkt eine Verringerung der Expressionen von IL-9, IRF-4 und IL-1 $\beta$ .....	86
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>89</b>
4.1 Mausstamm-spezifische Effekte der Regulation der IL-9-Expression in Mastzellen.....	89
4.2 Die Bedeutung der Transkriptionsfaktoren NFATc1 und NFATc2 für die Expression von IL-9 in Mastzellen.....	97
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>103</b>
<b>6 Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>7 Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>8 Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>VII</b>
<b>9 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>VIII</b>
<b>10 Curriculum Vitae .....</b>	<b>XX</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Mastzellen

Mastzellen sind Immunzellen der myeloiden Zellreihe, die in allen Vertebraten identifiziert werden konnten und deren Ursprung bis zu den Seescheiden (Ascidiae) zurückverfolgt werden kann [1]. Sie wurden erstmals 1878 von Paul Ehrlich beschrieben [2] und stammen von CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks ab [3]. Die früheste Vorläuferzelle der Mastzellen bezeichnet man als Promastocyte. Kennzeichnend für diese Zelle ist das Expressionsmuster von Thy-1<sup>low</sup> und c-Kit<sup>high</sup> und das Vorhandensein cytoplasmatischer Granula sowie die Präsenz von mRNA zur Bildung von Mastzellproteasen [4]. Die Vorläuferzellen verlassen das Knochenmark und zirkulieren als unreife Zellen im Blut [5]. Nach Migration in die peripheren Gewebe findet eine Differenzierung der Vorläuferzellen im lokalen Umfeld des Gewebes zu reifen funktionsfähigen Mastzellen unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren und Cytokinen statt [3], [6], [7]. Der Stammzellefaktor (SCF) stellt dabei *in vivo* den wichtigsten Wachstumsfaktor für das Wachstum und die Reifung der Mastzellen dar [8]. *In vitro* können außerdem die Cytokine IL-3 und IL-4 positiv auf die Entwicklung von Mastzellen wirken [5], [8].

Murine Mastzellen können in zwei distinkte Subtypen unterteilt werden: die Bindegewebsmastzellen (connective tissue mast cells, CTMC) und die Schleimhautmastzellen (mucosal mast cells, MMC) [9]. Beide Populationen zeigen Unterschiede in ihrer Lokalisation, den Inhaltsstoffen der Granula und ihrer Reaktion auf einzelne Stimuli [2]. CTMC finden sich hauptsächlich in der Submucosa des Intestinums, im Peritoneum und in der Haut, die MMC hingegen kommen in den Schleimhäuten der Lunge und des Gastrointestinaltraktes vor [10].

Auf ihrer Zelloberfläche exprimieren Mastzellen verschiedene Rezeptoren, die dem Erkennen diverser Liganden dienen. Darunter der Rezeptor c-Kit (CD117), eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase. Dieser Rezeptor bindet den SCF und ist somit entscheidend für die Proliferation, die Differenzierung und die Aktivität der Mastzellen [11]. Ferner besitzen die Mastzellen auf ihrer Oberfläche den hochaffinen IgE-Rezeptor FcεRI. Vermittelt durch eine Interaktion mit dem Fc-Teil<sup>1</sup> des Immunglobulins IgE kommt es zur Bindung an den FcεRI [12]. Da Mastzellen eine strategische Position an den Grenzen zwischen Körper und äußerer Umgebung einnehmen, gehören zu ihrem Rezeptorrepertoire auch Rezeptoren zur Abwehr eindringender Pathogene [2]. Dies geschieht durch die Erkennung molekularer Muster

---

<sup>1</sup> Fc-Teil: Fragment crystallisable eines Immunglobulins

(pathogen-associated molecular pattern, PAMP) auf Mikroorganismen, vermittelt durch Pattern-Recognition Receptors (PRR). Eine Gruppe dieser PRR-Rezeptoren wird von den sogenannten Toll-like Rezeptoren (TLR) gebildet [13]. Murine Mastzellen können die Rezeptoren TLR-2, -3, -4, -7 und -9 exprimieren [14], [15], [16].

## 1.2 Aktivierung von Mastzellen

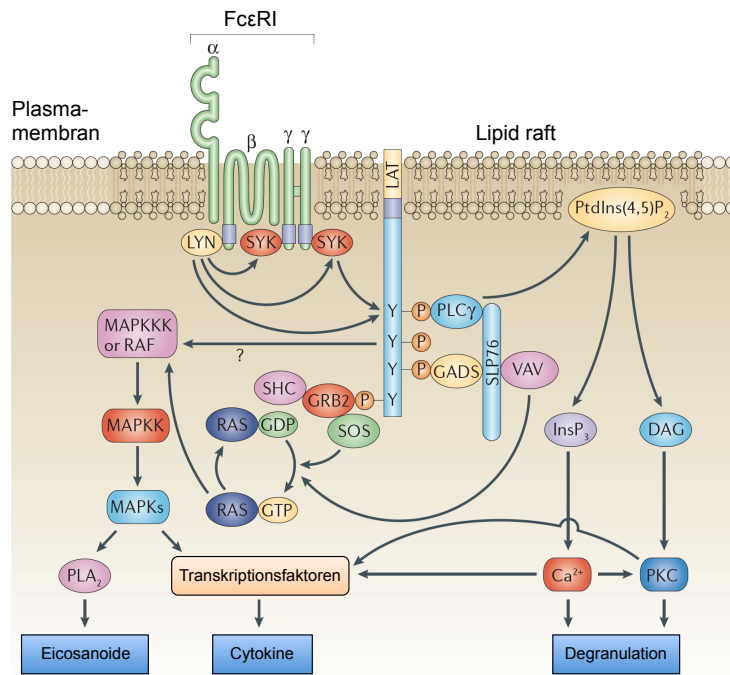
Eine Aktivierung der Mastzelle kann IgE-abhängig über den Fc $\epsilon$ RI oder IgE-unabhängig durch diverse Mechanismen, z. B. durch die den PRRs zugehörigen TLR stattfinden [2]. Als Folge der Mastzell-Aktivierung werden proinflammatorische Substanzen freigesetzt [17]. Die dabei freigesetzten Substanzen können in drei Gruppen eingeteilt werden: a) präformierte Substanzen, b) Lipidmediatoren und c) Cytokine und Chemokine. Präformierte Substanzen wie Histamin und Heparin werden in den Mastzell-eigenen Granula gespeichert und können bei Aktivierung der Mastzelle binnen weniger Minuten freigesetzt werden. Andere, wie die Lipidmediatoren Prostaglandine und Leukotriene, müssen hingegen erst aus dem Ausgangsstoff, der Arachidonsäure, *de novo* synthetisiert werden [18]. Die Mastzelle ist in der Lage, einige Cytokine vorgefertigt in den Granula zu speichern. Als Beispiel hierfür gilt der Tumornekrosefaktor alpha (TNF) [9].

### 1.2.1 Der klassische Weg der Mastzell-Aktivierung über den Fc $\epsilon$ RI

Die Aktivierung von Mastzellen durch den Fc $\epsilon$ RI gehört zu den am besten untersuchten Mechanismen der Mastzellaktivierung [2]. Der Fc $\epsilon$ RI ist Teil der Immunglobulin-Rezeptor-Superfamilie und bindet als hochaffiner Rezeptor den Fc-Teil des Immunglobulins IgE über die rezeptoreigene  $\alpha$ -Kette [6]. Auf Mastzellen wird der Fc $\epsilon$ RI als Tetramer exprimiert, bestehend aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette und aus einem Homodimer zweier durch eine Disulfidbrücke verbundener  $\gamma$ -Ketten, die für die Signalweiterleitung verantwortlich sind [19]. Nach Aggregation zweier Fc $\epsilon$ RI-Tetramere, vermittelt durch IgE-Kreuzvernetzung, werden die in den  $\gamma$ -Untereinheiten und der  $\beta$ -Kette enthaltenen ITAMs<sup>2</sup> durch die Tyrosinkinase Lyn phosphoryliert. Die von den phosphorylierten  $\gamma$ -Ketten rekrutierte Kinase Syk (spleen tyrosine kinase) aktiviert die nachfolgende Signalkaskade (siehe Abb. 1) [20].

---

<sup>2</sup> ITAMs: immunoreceptor tyrosine-based activation motifs, 18 Aminosäuren lange konservierte Sequenz im cytoplasmatischen Anteil der Rezeptor-Untereinheiten [6]



**Abb. 1: Signalkaskade des IgE-Rezeptors FcεRI in aktivierten Mastzellen.**

Zur Vereinfachung ist nur ein FcεRI-Rezeptor dargestellt. Nach der FcεRI-Aggregation wird das Adaptermolekül LAT in einem Lyn- und Syk-abhängigen Schritt phosphoryliert. LAT rekrutiert nachfolgend die cytosolischen Adaptermoleküle GRB2, GADS, SHC, SLP76, VAV, SOS und das Enzym PLCγ. Die Degranulation ist eine Folge der Aktivierung von PLCγ und PKC, vermittelt durch eine erhöhte Mobilisierung von Calcium (Ca<sup>2+</sup>). Eine Produktion von Eicosanoiden (Leukotriene, Prostaglandine) und Cytokinen erfolgt nach Aktivierung des MAPK-Weges.

[LAT (linker for activation of T cells), Syk (spleen tyrosine kinase), GRB2 (growth-factor-receptor-bound protein 2), GADS (GRB2-related adaptor protein), SHC (SRC homology 2 (SH2)-domain-containing transforming protein C), SLP76 (SH2-domain-containing leukocyte protein of 76 kDa), SOS (son of sevenless homologue), PLCγ (Phospholipase Cy), PKC (Protein kinase C), MAPK (mitogen-activated protein kinase), DAG (Diacylglycerin), InsP<sub>3</sub> (Inositol-1,4,5-trisphosphat), PLA<sub>2</sub> (Phospholipase A<sub>2</sub>), PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat); modifiziert nach [19] ].

Durch die Signalweiterleitung kommt es zu einem erhöhten Calcium-Einstrom in das Cytoplasma, resultierend in einer Aktivierung der Proteinkinase C (PKC). Diese beiden Ereignisse stellen einen essentiellen Schritt für die Degranulation der Mastzellen dar. Durch den höheren intracellulären Calcium-Gehalt werden auch Transkriptionsfaktoren der NF-κB<sup>3</sup> und der NFAT-Familie<sup>4</sup> angeschaltet, die die Synthese von Cytokinen regulieren [21]. Die Aktivierung der MAPK (mitogen-activated protein kinases) vermittelt die Bildung von Eicosanoiden wie Leukotrienen oder Prostaglandinen aus der Ausgangssubstanz Arachidonsäure, katalysiert durch das Enzym Phospholipase A<sub>2</sub> [13].

<sup>3</sup> NF-κB:

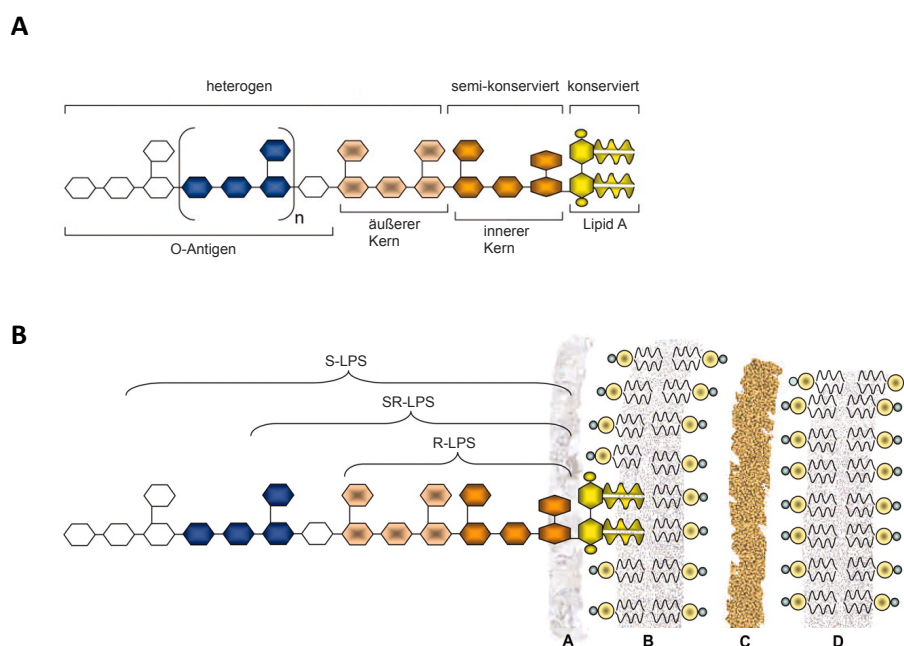
nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B cells

<sup>4</sup> NFAT:

nuclear factor of activated T cells

## 1.2.2 Alternative Aktivierung der Mastzellen durch Toll-like Rezeptoren

Die Mitglieder der TLR-Familie gehören zu den wichtigsten PRRs der Zellen [16] und wurden ursprünglich in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* als Toll-Protein identifiziert [22]. Die vielfältigen Wechselwirkungen der TLR mit ihren Liganden führen zur Aktivierung einer Signalkette. Dabei kann die Signalweiterleitung entweder über den MyD88-abhängigen<sup>5</sup> oder MyD88-unabhängigen Weg ablaufen. Eines der am besten charakterisiertesten Mitglieder der TLR-Familie ist der TLR-4-Rezeptor [23].



**Abb. 2: Aufbau der LPS-Chemotypen und ihre Verankerung in der Zellwand gramnegativer Bakterien.** (A) Lipopolysaccharide (LPS) sind aus drei verschiedenen Regionen zusammengesetzt. Die sehr variable äußere O-Kette (O-Antigen) wird aus sich wiederholenden Polysaccharideinheiten aufgebaut. Das "semi-konservierte" Mittelkernsegment aus Oligosacchariden kann in einen äußeren und einen inneren Abschnitt unterteilt werden. Der hoch konservierte Lipid A-Anker stellt den bioaktivsten Teil des LPS dar. (B) Übersicht über die verschiedenen Formen der Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien, die in ihrer Länge jeweils variieren. S-LPS: glatte (smooth) Form des LPS, aufgebaut aus Lipid A, der Kernregion und dem O-Antigen; R-LPS: raue (rough) Form des LPS, bestehend aus Lipid A und der Kernregion; SR-Form: semirauhe (semirough) Form des LPS, Kombination aus S- und R-Form.

A: Kapsel, B: äußere Lipiddoppelschicht, C: Peptidoglycanschicht, D: innere Bilipidmembran (modifiziert nach [24]).

Der Ligand für den TLR-4 ist das Lipopolysaccharid (LPS), eine wichtige strukturelle Komponente der äußeren Membran gramnegativer Bakterien. LPS stellt einen der am besten untersuchten immunstimulierend wirkenden bakteriellen Bestandteile dar und ist in der Lage, systemische Entzündung und sogar Sepsis zu induzieren [25]. Strukturell baut sich

<sup>5</sup> MyD88: myeloid differentiation factor 88

LPS aus drei Regionen auf: einer äußeren Kette (O-Antigen) aus Polysacchariden, einem Kernteil aus Oligosacchariden und das Lipid A. Dabei können sich einzelne LPS-Moleküle in der Länge unterscheiden. Die glatte Form des LPS - auch S-LPS<sup>6</sup> genannt - stellt sich aus dem Lipid A, der Kernregion und dem O-Antigen zusammen. R-LPS<sup>7</sup> fehlt das O-Antigen und das SR-LPS<sup>8</sup> stellt eine Kombination aus S- und R-Form dar (siehe Abb. 2) [24]. Das Lipid A stellt hierbei unter allen LPS-Bestandteilen den immunologisch aktivsten Anteil von LPS dar [26].

Der TLR-4 ist ein integrales Membranprotein mit einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Toll/IL-1-Rezeptor (TIR)-Domäne. Eine solche TIR-Domäne ist auch Bestandteil des Interleukin (IL) 1-Rezeptors, der IL-1 bindet [27]. IL-1 wurde erstmals 1972 als lymphocyte-activating factor (LAF) identifiziert [28]. Quellen für IL-1 sind Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen und auch Mastzellen [29]. Als proinflammatorisches Cytokin wird IL-1 als Antwort auf z. B. LPS gebildet [30], wobei die IL-1-Antwort aus zwei distinkten Molekülen - IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  - besteht [31]. Für die Bildung von IL-1 $\beta$  ist das Enzym Caspase 1 essentiell. Caspase 1 wird als Teil des NLRP3-Inflammasoms<sup>9</sup>, einem Multi-Protein-Komplex, aktiviert. Dies geschieht als Folge von zwei verschiedenen Signalen. Das erste Signal wird durch PRRs ausgelöst [30], wodurch die Bildung des inaktiven Vorläuferpeptids pro-IL-1 $\beta$  (31kDa) im Cytoplasma resultiert. Adenosintriphosphat (ATP), der natürliche Ligand für den purinergen P2X7-Rezeptor, aktiviert diesen in der Zellmembran lokalisierten Ionenkanal und bewirkt durch das ausdringende Kalium die Formierung des Inflammasoms [32]. NLRP3 rekrutiert das intrazelluläre Adapterprotein ASC<sup>10</sup>, das durch Protein-Protein-Interaktionen Caspase 1 bindet und aktiviert [33]. Aktivierte Caspase 1 wandelt anschließend das pro-IL-1 $\beta$  in die biologisch aktive Form IL-1 $\beta$  (17kDa) um [34]. Hohe Mengen an IL-1 sind mit der Entwicklung von Sepsis oder dem septischem Schock verbunden [31].

Der TLR-4-Ligand LPS wird durch das Serumprotein LPS-Binde-Protein (LBP) gebunden und dem Corezeptor CD14<sup>11</sup> präsentiert [35]. CD14 kann in membrangebundener oder löslicher Form vorliegen, jedoch besitzen murine bone marrow-derived mast cells (BMMC) nachweislich kein membrangebundenes CD14 (mCD14) [36]. Vermittelt durch CD14 wird das LPS an den TLR-4 übertragen, der zusammen mit dem extrazellulären Protein MD-2<sup>12</sup> ein Heterodimer bildet [25]. Die LPS-Bindung induziert die Dimerisierung zweier TLR-4/MD-2-Heterodimere zu einem Rezeptorkomplex, wodurch die intrazelluläre

<sup>6</sup> S-LPS: glatte (smooth) Form des LPS

<sup>7</sup> R-LPS: raue (rough) Form des LPS

<sup>8</sup> SR-LPS: semirau (semirough) Form des LPS

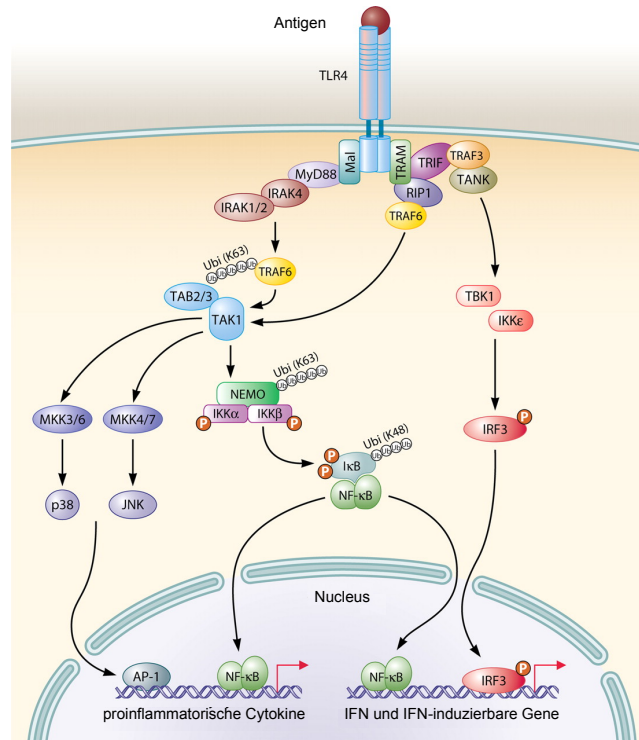
<sup>9</sup> NLRP3-Inflammasom: Inflammasom, dass das „NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3“ enthält

<sup>10</sup> ASC: apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD

<sup>11</sup> CD14: cluster of differentiation 14

<sup>12</sup> MD-2: myeloid differentiation protein 2

Signalkaskade angeschaltet wird [37]. Die Weiterleitung erfolgt über den MyD88-abhängigen oder den MyD88-unabhängigen Weg (siehe Abb. 3). Ziel der Signalkaskade ist die Bildung proinflammatorischer Cytokine bzw. die Produktion von Typ I Interferonen (IFN) [25]. Da murinen BMMC mCD14 fehlt, das für die Signalweiterleitung des MyD88-unabhängigen Weges benötigt wird, besitzen BMMC nur den MyD88-abhängigen Pfad [38].



**Abb. 3: Signalkaskade des TLR-4.**

TLR-4 aktiviert sowohl den MyD88-abhängigen als auch den MyD88-unabhängigen Signalweg. Der MyD88-abhängige Weg ist verantwortlich für die Aktivierung von NF-κB und der MAPK, die die Induktion proinflammatorischer Cytokine kontrollieren. Durch den MyD88-unabhängigen Pfad wird IRF-3 (interferon regulatory factor 3) aktiviert, das für die Induktion von IFN-β und IFN-induzierbaren Genen erforderlich ist. Darüberhinaus kommt es durch den MyD88-unabhängigen Weg ebenfalls zur Produktion von NF-κB als auch zur MAPK-Aktivierung. In BMMC fehlt der MyD88-unabhängige Aktivierungsweg jedoch, da BMMC kein mCD14 exprimieren (modifiziert nach [39]).

Die Formation des Rezeptorkomplexes führt zur Rekrutierung von Adapterproteinen mit einer TIR-Domäne, wie Mal<sup>13</sup>, MyD88 und TRAM<sup>14</sup>. Der MyD88-abhängige Weg läuft über die Aktivierung der Proteine Mal und MyD88 ab. Durch Protein-Interaktionen (Death Domains) werden IRAKs<sup>15</sup> aktiviert und MyD88 bildet zusammen mit IRAK1, -2 und -4 einen Komplex. In Verbindung mit TRAF6<sup>16</sup> aktiviert dieser MyD88-IRAK-Komplex den

<sup>13</sup> Mal: MyD88-adaptor-like protein  
<sup>14</sup> TRAM: TRIF-related adaptor molecule  
<sup>15</sup> IRAKs: interleukin 1 receptor associated kinases  
<sup>16</sup> TRAF6: TNF receptor-associated factor 6

TAK1/TAB2/3-Komplex<sup>17</sup>. Durch Autophosphorylierung aktiviertes TAK1 initiiert die MAPK-Kaskade, die wiederum durch nachgeschaltete Transkriptionsfaktoren die Expression proinflammatorischer Gene induziert. TAK1 phosphoryliert zudem den IKK-Komplex<sup>18</sup>, der durch Polyubiquitinierung aktiviert wird und darauf IκB (inhibitor of κB) phosphoryliert. IκB wird ubiquitiniert und vom Proteasom abgebaut, wodurch der Transkriptionsfaktor NF-κB freigesetzt wird. Als Folge dessen findet die Aktivierung NF-κB-regulierter Gene statt [13], [35], [40].

Der MyD88-unabhängige Pfad - auch TRIF/TRAM-Weg genannt - verläuft über das Adapterprotein TRAM, welches das Protein TRIF<sup>19</sup> aktiviert. Letzteres wiederum bindet über N-terminale Bindedomänen an die Faktoren TRAF3 und TRAF6. Vermittelt durch TRAF6 und die Kinase RIP1<sup>20</sup> kommt es nach Ubiquitinierung zur Rekrutierung der Proteinkinase TAK1, die NF-κB und MAPK aktiviert. Dies führt letztendlich zur Produktion proinflammatorischer Cytokine. Die Faktoren TRAF3 und TANK<sup>21</sup> hingegen fungieren als Brücke zur Induktion von INF-β und INF-induzierbaren Cytokinen durch Aktivierung von IRF-3 (interferon regulatory factor 3) als Folge von TBK1-<sup>22</sup> und IKKε-vermittelter Phosphorylierung [39], [41].

### 1.3 Der Botenstoff Interleukin 9

Das Th2-Cytokin Interleukin 9 (IL-9) wurde ursprünglich als Wachstumsfaktor muriner T-Zellen „p40“ beschrieben [42]. Parallel wurden in verschiedenen Arbeiten andere Aktivitäten von IL-9 beschrieben. IL-9 erhöhe die Proliferation von Mastzellkulturen in Gegenwart von IL-3 und IL-4 [43], [44]. Diese als MEA (mast cell growth-enhancing activity) bezeichnete Aktivität wurde auch in den Überständen einer murinen T-Helferzelllinie, die den Wachstumsfaktor TCGF-III (T cell growth factor III) produziert, gefunden [45]. Es stellte sich heraus, dass es sich bei p40, MEA und TCGF-III um ein und denselben Faktor handelte, der fortan als IL-9 bezeichnet wurde [42].

Das auf dem murinen Chromosom 13 liegende *il-9*-Gen kodiert für ein 14kDa großes Glykoprotein, aufgebaut aus 144 Aminosäuren und einem 18 Aminosäuren langen Signalpeptid. Hauptsächlich wird IL-9 von T-Lymphozyten gebildet [46], [47], aber Mastzellen konnten auch als eine Quelle von IL-9 identifiziert werden [48]. Auf zellulärer Ebene stellt IL-9 einen Wachstumsfaktor für Mastzellen dar. Das Cytokin IL-9 ist fähig, die Produktion

<sup>17</sup> TAK1/TAB2/3-Komplex: Komplex aus TAK1 (transforming growth factor β activated kinase 1) und TAK1-binding protein 2 und 3

<sup>18</sup> IKK-Komplex: IκappaB Kinase-Komplex aus IKKα, IKKβ und IKKγ

<sup>19</sup> TRIF: TIR-domain containing adapter-inducing interferon β

<sup>20</sup> RIP1: receptor-interacting protein 1

<sup>21</sup> TANK: TNF receptor-associated factor family member-associated nuclear factor κB activator

<sup>22</sup> TBK1: TANK-binding kinase 1

mehrerer Cytokine zu erhöhen sowie in Gegenwart des SCF die Expression von Mastzellproteasen zu induzieren [47].

Die Regulation von IL-9 betreffend ist bekannt, dass der NF- $\kappa$ B-Signalweg durch im *il-9*-Promotor befindliche NF- $\kappa$ B-Bindestellen die Transkription des *il-9*-Promotors fördern kann. Zudem kommt es durch Cyclosporin A, einem Calcineurin-Hemmer, zu einer verminderten IL-9-Produktion. Dies lässt eine Rolle für die Proteine der NFAT-Familie bezüglich der IL-9-Regulation vermuten [46]. In BMMC zeigt das Cytokin IL-1 eine positive Wirkung auf die IL-9-Expression [48], [49]. In Kombination mit LPS, IL-10 oder SCF kann dieser Einfluss durch eine synergistische Wirkung mit IL-1 sogar noch gesteigert werden [50], [51]. Auf Ebene der Transkription konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor GATA-1 essentiell für die IL-9-Produktion von BMMC ist [52]. Der Transkriptionsfaktor interferon regulatory factor 4 (IRF-4) ist bei den IL-9-produzierenden Th9-Zellen essentiell an der Funktion und Entwicklung dieser T-Zellen beteiligt [53].

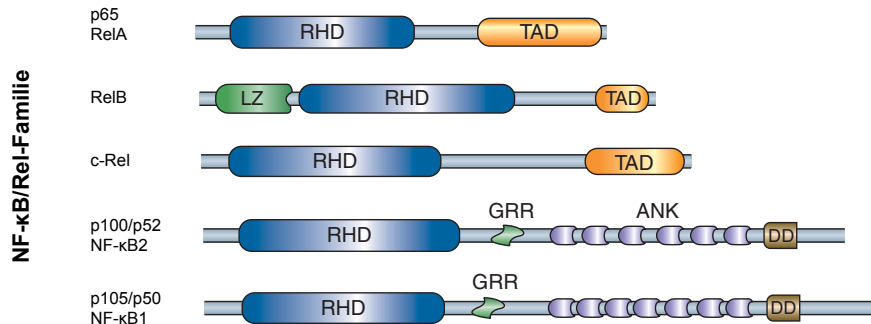
In diversen Mausmodellen wurde IL-9 als ein wichtiger Mediator in allergischen Entzündungen, wie etwa Asthma, beschrieben [54]. Bei Asthma handelt es sich um eine komplexe Erkrankung der Lunge, charakterisiert durch Obstruktion, Überempfindlichkeit und Entzündung der Atemwege [55]. Dabei zeigt IL-9 vielfältige Wirkungen, z. B. durch eine erhöhte Schleimproduktion und vermehrte subepitheliale Ablagerung von Kollagen. Darüberhinaus kommt es zum Anlocken von Entzündungszellen wie eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten und zu einer gesteigerten Atemwegsempfindlichkeit [54]. Nachweislich zeigen die aus der bronchoalveolären Lavage gewonnenen Zellen bei Asthmatikern im Vergleich zu Gesunden eine höhere Konzentration an IL-9-mRNA [46].

## 1.4 Die Transkriptionsfaktoren der NF- $\kappa$ B-Familie

Bei den NF- $\kappa$ B-Faktoren handelt es sich um eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die bei den Säugetieren aus fünf Mitgliedern besteht. Dazu gehören die Rel-Unterfamilie mit den Proteinen RelA (p65), RelB und c-Rel sowie die beiden Faktoren NF- $\kappa$ B1 (p50/p105) und NF- $\kappa$ B2 (p52/p100) [56].

Charakteristisch für alle NF- $\kappa$ B-Proteine ist die Rel-Homologie-Domäne (RHD), eine hochkonservierte N-terminale Region von etwa 300 Aminosäuren [57]. Die RHD enthält ein DNA-Bindemotiv, eine Dimerisierungs-Region und ein nukleäres Lokalisations-Signal (NLS) [58]. Alle Mitglieder der Rel-Unterfamilie besitzen zudem eine Transaktivierungsdomäne (TAD) zur Transaktivierung von Genen [59]. p105 und p100 stellen Vorläufermoleküle dar, die durch proteolytische Prozessierung zu den NF- $\kappa$ B-Proteinen p50 und p52 überführt

werden [60]. Den Faktoren p50 und p52 fehlt die TAD, wodurch diese Proteine nicht-transaktivierende Untereinheiten darstellen und nur gebunden an andere NF- $\kappa$ B-Faktoren als Dimer zur Transaktivierung beitragen können (siehe Abb. 4) [61].



**Abb. 4: Die Mitglieder der NF- $\kappa$ B-Familie.**

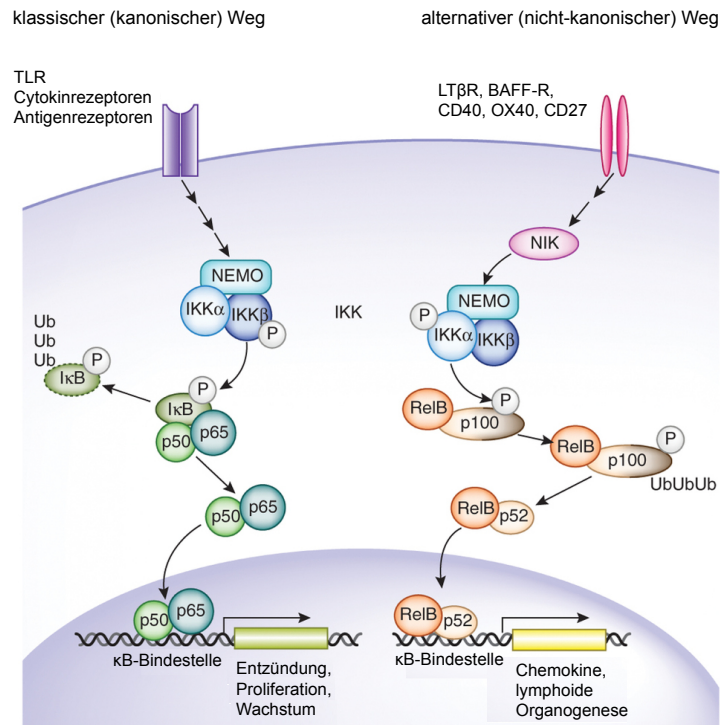
Die Familie der NF- $\kappa$ B-Proteine besteht aus den Transkriptionsfaktoren RelA, RelB, c-Rel, NF- $\kappa$ B1 (p105/p50) und NF- $\kappa$ B2 (p100/p52). Charakteristisch für die NF- $\kappa$ B-Proteine ist die Rel-Homologie-Domäne (RHD). Aus den Vorläuferproteinen p100 und p105 entstehen durch Prozessierung die reifen Proteine p52 und p50, die durch ihre Ankyrin-Repeats (ANK) auch Teil der I $\kappa$ B-Proteinfamilie sind. Die einzelnen Domänen wurden schematisch dargestellt: DD (Death Domain), GRR (Glycin-reiche Region), LZ (Leucin-Zipper), TAD (Transaktivierungsdomäne); verändert nach [57].

Im inaktiven Zustand liegen die NF- $\kappa$ B-Proteine im Cytoplasma, gebunden an I $\kappa$ B-Proteine, als Homo- oder Heterodimere vor. Als Antwort auf verschiedene extrazelluläre Stimuli kommt es zur Degradation der I $\kappa$ B-Proteine. Die freigesetzten NF- $\kappa$ B-Proteine translozieren in den Nukleus und induzieren dort die Transkription  $\kappa$ B-abhängiger Gene [60]. Die Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Signalkaskade kann über zwei distinkte Wege stattfinden: den klassischen (kanonischen) und den alternativen (nicht-kanonischen) Pfad (siehe Abb. 5).

Der klassische Aktivierungsweg wird durch die Signale von TLR, TNF oder T-Zellrezeptoren induziert [58]. Durch diverse rekrutierte Adaptermoleküle kommt es zur Aktivierung des IKK-Komplexes [62]. Die IKK $\beta$ -Untereinheit des trimeren IKK-Komplexes aus IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  und IKK $\gamma$  (NEMO<sup>23</sup>) wird phosphoryliert [63] und induziert durch eine Phosphorylierung von I $\kappa$ B-Proteinen deren Degradation durch das Ubiquitin-Proteasomen-System [64]. Durch den Abbau von I $\kappa$ B ist die NLS von NF- $\kappa$ B wieder zugänglich [65] und die Dimere - vorwiegend p50/p65-Dimere - können in den Nukleus translozieren, zur Transkriptionskontrolle von Genen des Zellzyklus und der Entzündungsreaktion [66], [64].

<sup>23</sup> NEMO:

NF- $\kappa$ B essential modulator



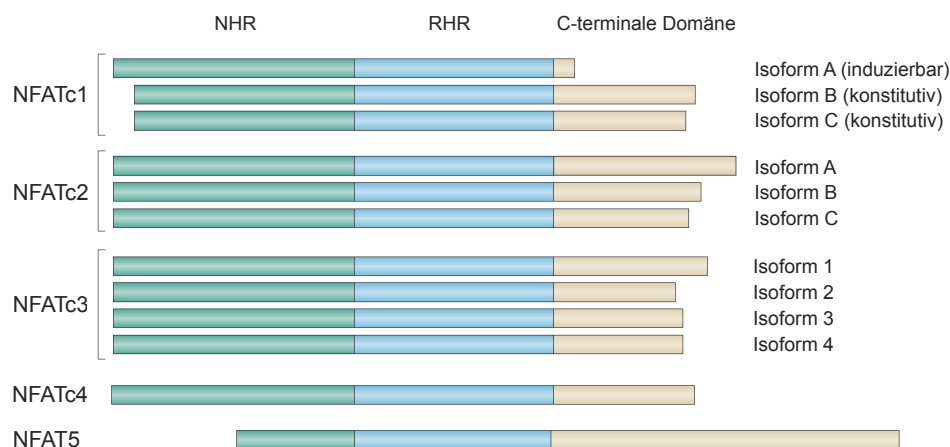
**Abb. 5: Der kanonische und nicht-kanonische Weg der NF-κB-Signalgebung.**

Der kanonische NF-κB-Weg wird durch verschiedene Signale wie Antigene, TLR-Liganden oder Cytokine wie TNF induziert. Durch Rekrutierung diverser Adapterproteine kommt es zur Aktivierung der IKKβ-Einheit des IKK-Komplexes, die an NF-κB-Dimere wie p50/p65 gebundenes IκB phosphoryliert. Die IκB-Phosphorylierung induziert eine Ubiquitinierung (Ub) von IκB, wodurch IκB Proteasomen-vermittelt degradiert wird. Freigewordenes NF-κB kann in den Nucleus translozieren und an κB-Bindestellen von Genen binden, die Funktionen bei Entzündungen, Proliferation und des Wachstums innehaben. Der nicht-kanonische Pfad, aktiviert durch Mitglieder der TNF-Cytokin-Familie, benötigt die NF-κB-inducing kinase (NIK) zur Aktivierung von IKKα des IKK-Komplexes. Anschließend wird der Vorläufer p100 (NF-κB2) phosphoryliert und es folgt die proteasomale Prozessierung des Ubiquitin-markierten p100 zu p52. Die aktivierten p52/RelB-Dimere kontrollieren Gene, deren Genexpression essentiell für die lymphatische Organogenese und zur Chemokinproduktion sind. [LTβR (Lymphotoxin β-Rezeptor), BAFF-R (BAFF-Rezeptor); modifiziert nach [62] ].

Mitglieder der TNF-Cytokin-Familie (z. B. CD40, Lymphotoxin β) bewirken eine Aktivierung des alternativen Pfades [62]. Die aktivierte NF-κB-inducing kinase (NIK) phosphoryliert die IKKα-Untereinheit [58] und führt zu einer IKKα-abhängigen Prozessierung von p100 durch das Proteasom [62]. Das entstandene p52 aktiviert das RelB/p52-Dimer und gelangt durch Translokation in den Nucleus, um dort spezifische κB-Elemente zu aktivieren [67]. Der alternative Weg kontrolliert u. a. essentielle Gene der lymphoiden Organogenese [68] .

## 1.5 Die Proteine der NFAT-Familie

Die NFAT-Familie ist eine Familie von Transkriptionsfaktoren und besteht aus den fünf Mitgliedern NFAT1 (NFATc2), NFAT2 (NFATc1), NFAT3 (NFATc4), NFAT4 (NFATc3) und dem entfernter verwandten NFAT5 [69]. Mastzellen sind in der Lage, die Faktoren NFATc1, NFATc2 und NFATc3 zu exprimieren [70], [71], [72].



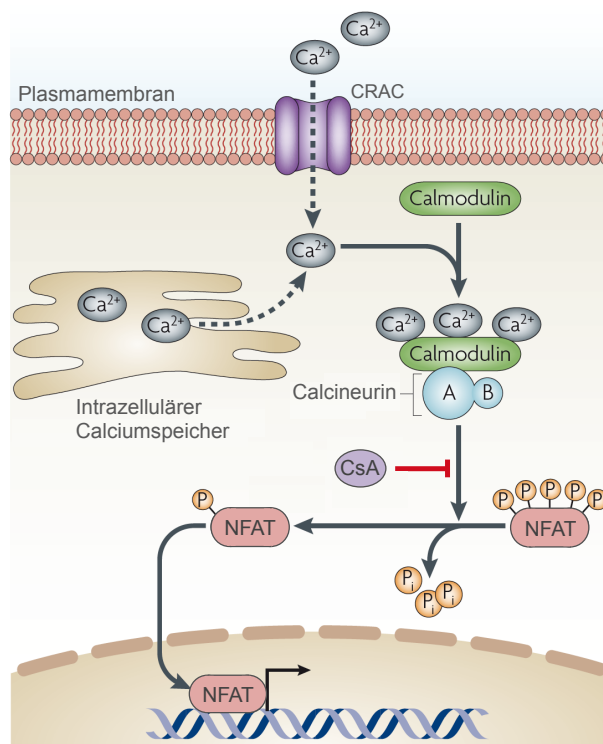
**Abb. 6: Die Familie der NFAT-Transkriptionsfaktoren.**

Schematischer Aufbau der Mitglieder der NFAT-Familie. Allen Proteinen ist die Rel-Homologie-Domäne (RHD) gemeinsam, die ein DNA-Binde-Motiv enthält. Die Faktoren NFATc1-c4 besitzen eine hochkonservierte NFAT-Homologie-Region (NHR). Durch alternatives Spleißen oder die Verwendung von unterschiedlichen Promotoren können verschiedene Isoformen der Calcium/Calcineurin-regulierten NFAT-Proteine NFATc1, NFATc2 und NFATc3 erzeugt werden. Die beiden alternativen N-terminalen Strukturen von NFATc1 werden durch zwei konstitutiv exprimierte Isoformen und durch eine induzierbare Isoform dargestellt (modifiziert nach [73]).

Bedingt durch alternatives Spleißen und durch die Steuerung unterschiedlicher Promotoren lassen sich verschiedene Isoformen der NFAT-Proteine unterscheiden (siehe Abb. 6) [73]. So wird beispielsweise das *nfatc1*-Gen durch zwei Promotoren gesteuert, dem induzierbaren Promotor P1 stromaufwärts von Exon 1 und dem konstitutiven Promotor P2 stromaufwärts von Exon 2. Mittels der Aktivität des Promotors P2 kommt es zur konstitutiven Synthese der NFATc1 $\beta$ -Isoformen ( $\beta$ B und  $\beta$ C). Der Promotor P1 induziert die Bildung der hauptsächlich vorkommenden NFATc1/ $\alpha$ A-Isoform und zweier längerer Isoformen  $\alpha$ B und  $\alpha$ C [74]. Anhand der Organisation des P1-Promotors in einen proximalen und einen distalen homologen Block, die beide DNA-Bindemotive für Transkriptionsfaktoren wie NFAT aufweisen [75], kann die Aktivität von P1 zudem mittels Autoregulation durch die Anbindung von NFAT-Faktoren über eine autokrine Rückkopplungsschleife gesteigert werden [74].

Alle NFAT-Proteine sind aus verschiedenen funktionellen Domänen aufgebaut. Gemeinsame Merkmale der NFAT-Faktoren sind eine hochkonservierte Rel-Homologie- (RHD) und eine NFAT-Homologie-Domäne (NHR). Bei der NHR handelt es sich um eine N-terminale regulatorische Domäne, die verantwortlich für die Transaktivierung und für die Bindung von Calcineurin ist und mehrere Phosphorylierungsstellen für Kinasen aufweist. Die RHD vermittelt die DNA-Bindung von Zielsequenzen [76], [77]. Bei ruhenden Zellen sind die in der NHR liegenden Phosphorylierungsstellen hyperphosphoryliert und die NFAT-Faktoren liegen inaktiv im Cytoplasma vor [78]. Eine Aktivierung der Faktoren NFATc1 bis NFATc4 erfolgt Calcium-abhängig ( $c = \text{Ca}^{2+}$ -abhängig), diejenige von NFAT5 jedoch bedingt durch osmotischen Stress [79].

Durch Bindung an Oberflächenrezeptoren, wie Rezeptor-Tyrosin-Kinasen oder G-Proteingekoppelte Rezeptoren, kommt es zur Aktivierung der Phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ). Die PLC $\gamma$  wiederum sorgt für die Bereitstellung von Inositol-1,4,5-trisphosphat (InsP $_3$ ), das an InsP $_3$ -Rezeptoren des Endoplasmatischen Retikulums bindet und einen Flux von Ca $^{2+}$  aus den intrazellulären Ca $^{2+}$ -Speichern in das Cytoplasma auslöst [78], [76]. Durch die Leerung der intrazellulären Ca $^{2+}$ -Speicher werden in der Plasmamembran CRAC-Kanäle (calcium release-activated channel) geöffnet, die einen weiteren Einstrom der Calcium-Ionen bewirken [69]. Das freie Ca $^{2+}$  bindet an Calmodulin. Der entstandene Ca $^{2+}$ -Calmodulin-Komplex bindet Calcineurin [78]. Die Serin/Threonin-spezifische Protein-Phosphatase Calcineurin dephosphoryliert die in der NHR liegenden Phosphoserine der NFAT-Faktoren [80], [76]. Durch die Dephosphorylierung wird die nukleäre Lokalisationssequenz zugänglich und die NFAT-Proteine können in den Nucleus translozieren, um die Expression von Zielgenen zu regulieren (siehe Abb. 7) [77].



**Abb. 7: Der Calcineurin-Signalweg zur Aktivierung von NFAT-Faktoren.**

Als Folge eines Stimulus erhöht sich der intrazelluläre Calcium (Ca $^{2+}$ )-Spiegel und Calmodulin bindet freies Ca $^{2+}$ . Calcineurin besteht aus zwei Untereinheiten: der katalytischen Untereinheit A und der regulatorischen Untereinheit B. Bindet Calcineurin an den Calmodulin-Ca $^{2+}$ -Komplex dephosphoryliert die Untereinheit A den Faktor NFAT. Dephosphoryliertes NFAT transloziert vom Cytoplasma in den Nucleus und kann dort als Transkriptionsfaktor diverse zelluläre Prozesse aktivieren. Die Dephosphorylierung von NFAT kann durch Cyclosporin A (CsA) gehemmt werden (modifiziert nach [81]).

Untersuchungen an den einzelnen Genen für die NFAT-Faktoren haben gezeigt, dass Verluste dieser Gene in Mäusen zu unterschiedlichen Phänotypen führen können. In

NFATc1-defizienten T-Lymphozyten kommt es beispielsweise zu einer Verminderung der Proliferation und IL-4-Produktion, was letztendlich eine Beeinträchtigung der Th2-Antworten hervorruft [82], [83]. Im Gegensatz dazu sind diese Th2-Antworten in Mäusen mit einer NFATc2-Defizienz gesteigert [84], [85], [86]. Mäuse mit einem inaktivierten *nfatc3*-Gen sind nachweislich phänotypisch unauffällig und weisen ein normales Cytokinexpressionsmuster auf [87]. Eine Doppelmutation von NFATc2 und NFATc3 hingegen führt acht bis zehn Wochen *postnatal* durch diverse Entzündungen zum Tod der betroffenen Mäuse [88], [89], [90]. Ein systemischer „Knockout“ von NFATc1 ist embryonal letal, da die Mäuse vor Tag 14,5 der Embryogenese - bedingt durch eine Herzinsuffizienz - *in utero* sterben [91], [83], [82].

Die Funktion der NFAT-Faktoren in Mastzellen betreffend wurde gezeigt, dass die Faktoren NFATc1 und NFATc2 Teil eines Mastzell-spezifischen Netzwerkes sind, das zur Expression von TNF und IL-13 beiträgt. Der Faktor NFATc3 ist dagegen für deren Produktion entbehrlich [76]. Auch die Degranulation und die IL-6-Produktion laufen unabhängig von der Aktivität der NFAT-Proteine ab [92]. In Abhängigkeit von NFAT kommt es in aktivierten Mastzellen jedoch zur Bildung des Faktors HIF-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ ) [93] und der Transkriptionsfaktor NFATc2 zeigt sich verantwortlich für die Transkriptionskontrolle des antiapoptischen Gens A1 in IgE-kreuzvernetzten Mastzellen [94].

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Regulation der IL-9-Produktion in Mastzellen ist erst in ihren Grundlagen verstanden. Basierend auf der Beobachtung, dass Mastzellen des Stammes BALB/c nach Aktivierung über ihren IgE-Rezeptor in Gegenwart von LPS weitaus größere Mengen an IL-9 produzieren können als Mastzellen des Inzuchtstammes C57BL/6, sollte ein direkter Vergleich beider Mastzelllinien helfen, zentrale Signalwege der IL-9-Produktion besser zu verstehen.

Weiterhin sollte aus der Familie der NFATc-Faktoren gezielt die Bedeutung des Transkriptionsfaktors NFATc1 für die Expression des *il-9*-Gens in murinen Mastzellen untersucht werden. Voraussetzung hierfür war zunächst die Generierung einer Mauslinie mit einer Mastzell-spezifischen NFATc1-Defizienz, da eine generelle NFATc1-Defizienz zum Absterben sich entwickelnder Embryonen *in utero* führt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Plastikwaren

Alle Plastikwaren wurden steril bezogen.

### 2.2 Laborgeräte

Die verwendeten Laborgeräte sind in Tab. 1 aufgeführt.

Tab. 1: Bezugsquellen der Laborgeräte.

Laborgeräte	Hersteller
BioMate3 UV-Vis-Spektrometer	Thermo Fisher Scientific
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Sanyo
FACS LSR II	BD Pharmingen
Gene Pulser II	BioRad
GENios	Tecan
iCycler	BioRad
Kippschüttler	Biometra
Kühlzentrifuge GS-6R Centrifuge	Beckman
Mini-PROTEAN Tetra Cell System	BioRad
Pipetboy comfort	Integra Biosciences GmbH
Pipetten	Eppendorf
Power Supply	Apelex
Schüttler KS 250 basic	IKA Labortechnik
Sterilbank Hera safe	Heraeus
Thermocycler	Biometra
Thermomixer	HLC
Tischzentrifuge Sigma 1-14K	Sigma-Aldrich
Trans-Blot Turbo Blotting System	BioRad
Wasserbad	Labotec Wiesbaden
Vortex Mixer Genie	neoLab

### 2.3 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Steinheim) in *pro analysis* (p. a.)-Qualität bezogen (siehe Tab. 2).

Tab. 2: Bezugsquellen der Chemikalien.

Chemikalien	Bezugsquelle
ABTS	Sigma-Aldrich
Anakinra (Kineret)	Swedish Orphan Biovitrum AB
Brefeldin A	Sigma-Aldrich
Albumin Fraktion V	Roth
Chloroform	Roth
Clarity Western ECL Substrate	BioRad
DEPC	Roth
DMSO	Roth
Ethanol	Roth
Fötale Kälberserum	Gibco
Glutamin	Roth
Glycin	Roth
Glycogen	Amersham Life Science
5x Hot Start Taq EvaGreen qPCR Mix (no ROX)	Axon
Ionomycin-Calciumsalz	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Roth
IT-603	Calbiochem über Merck Millipore
Milchpulver	Roth
Natrium-Pyruvat	Serva
p-Nitrophenyl-N-Acetyl-β-D-Glucosamin	Sigma-Aldrich
R-Form LPS ( <i>Salmonella minnesota</i> )	Enzo Life Science
RNA Tri-flüssig	Bio & SELL
S-Form LPS ( <i>Salmonella abortus equi</i> )	Enzo Life Science
Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase	Roche
TMB	LDN Labordiagnostik Nord GmbH & Co. KG
Triton X-100	Roth

## 2.4 Kulturmedien und Puffer

Zur Herstellung aller Puffer und Medien wurde, wenn nicht anders angegeben, vollentsalztes (Millipore-Entmineralisierungsanlage, Millipore) und durch Aktivkohle gereinigtes Wasser (VE-Wasser) verwendet. Vor Gebrauch wurden diese sterilfiltriert (0,2µm Sterilfilter) bzw. autoklaviert und anschließend bei 4°C oder -20°C aufbewahrt.

### 2.4.1 Puffer und Lösungen

#### Gey's Lysepuffer

8,29g/l NH<sub>4</sub>Cl; 1,0g/l KHCO<sub>3</sub>; 0,037g/l EDTA; pH 7,29; sterilfiltriert (0,2µm)

### **Glutaminlösung**

in 1x PBS: 200mM Glutamin; bei -20°C weggefroren; sterilfiltriert (0,2µm)

### **Glycinlösung**

0,2M Glycin; pH 10,7

### **FACS-Puffer**

in 1x PBS: 0,5% BSA; 5mM EDTA; 0,1% NaN<sub>3</sub>

### **Fötale Kälberserum (FCS)**

Das verwendete FCS (Gibco) wurde zur Inaktivierung der enthaltenen Komplementfaktoren 45min bei 56°C im Wasserbad erhitzt. Anschließend wurde das FCS in 200ml Aliquoten bei 4°C aufbewahrt. Vor dem Gebrauch wurden die Aliquote 15min bei 600xg abzentrifugiert. Für die Versuche wurden ausschließlich die Überstände eingesetzt.

### **Natrium-Citratpuffer**

0,1M Natrium-Citrat, pH 4,5

### **Natriumpyruvatlösung**

0,1M Natriumpyruvat; sterilfiltriert (0,2µm)

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

80,4g/l NaCl; 15,6g/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,2

### **Physiologische Trypanblaulösung**

Der Vitalfarbstoff Trypanblau wurde zur Bestimmung der Lebendzellzahl in Zellsuspensionen eingesetzt. Für die Herstellung einer Trypanblaulösung wurden unten stehende Lösungen A und B im Verhältnis 1:5 gemischt:

Lösung A: 0,2% Trypanblau

Lösung B: 4,25% NaCl

### **Rinderserumalbumin (BSA)**

in 1x PBS: 10% BSA

### **RNA-Aufbewahrungspuffer**

in DEPC-Wasser: 5mmol Tris; 1mM CaCl<sub>2</sub>; pH 7,5

### **Triton X-100-Lösung**

0,5% Triton X-100

**Die folgenden Puffer wurden für die Durchführung von „Enzyme-linked immunosorbent assays“ (ELISA) verwendet:**

### **Blockpuffer**

in 1x PBS: 0,1% BSA

### **Kopplungspuffer**

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

### **Substratpuffer**

40mM Citrat; 60mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 4,4 - 4,5

### **Waschpuffer**

in 1x PBS: 0,1% Tween 20

**Die folgenden Puffer wurden für die Durchführung von „Western Blots“ verwendet:**

### **SDS-Lysepuffer**

50mM Tris; 4M Harnstoff; 1% SDS; 15% Glycerin; pH 6,8

### **SDS-Ladepuffer (5x)**

8% TBS pH 7,5; 100mM Dithiothreitol; 20% SDS; 0,7% EDTA; 0,2% Bromphenolblau in Glycerin

### **SDS-Laufpuffer**

0,25M Tris; 1,9M Glycin; 1% SDS; pH 8,3

**Stripping-Puffer**

62,5mM Tris; 100mM  $\beta$ -Mercaptoethanol; 2% SDS; pH 6,8

**TBS**

10mM Tris; 150mM NaCl; pH 7,5

**TBST**

10mM Tris; 150mM NaCl; 0,1% Tween 20; pH 7,5

**Blotpuffer**

Teil des Trans-Blot Turbo RTA Transfer Kits, Nitrocellulose von BioRad (siehe Tab. 5)

**Tab. 3: Bezugsquellen der Kulturmedien und Puffer.**

Puffer/Lösungen	Bezugsquelle
FCS	Gibco
IMDM Trockenpulver	Pan-Biotech
Iscove's Modified Dulbeccos Medium (IMDM)	Sigma-Aldrich
Rinderserumalbumin	PAA
MEM	Pan-Biotech

**2.4.2 Medien****IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Eigenherstellung)**

17,67g/l IMDM Trockenpulver; 3,02g/l  $\text{NaHCO}_3$ ;  $5 \times 10^{-5}$ M  $\beta$ -Mercaptoethanol; 100l. U./l Penicillin; 100 $\mu$ g/l Streptomycin; Phenolrot als Indikator; pH 7,2

**Kit-Ligand-Mastzellfutter (KL-MZF)**

in IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium, Sigma-Aldrich): 10% FCS; 1mM Natrium-Pyruvat; 1mM Glutamin; 20U/ml IL-3; 50U/ml IL-4; 200ng/ml Kit-Ligand; 100l. U./l Penicillin; 100 $\mu$ g/l Streptomycin

**MEM (Minimal Essential Medium)**

10,58g/l MEM Trockenpulver; 4,77g/l HEPES;  $5 \times 10^{-5}$ M  $\beta$ -Mercaptoethanol 100l. U./l Penicillin; 100 $\mu$ g/l Streptomycin; sterilfiltriert (0,2 $\mu$ m)

**Testmedium mit 5% FCS (TM5)**

in IMDM: 5% FCS; 1mM Natrium-Pyruvat; 1mM Glutamin

**2.5 Antikörper****Antikörper zur Aktivierung von Mastzellen**

Anti-DNP-IgE: Klon SPE-7; Sigma-Aldrich; monoklonaler Maus-Antikörper;  
Einsatz: 1µg/ml

Anti-IgE: Klon EM95.3; monoklonaler Ratte-Anti-Maus-Antikörper;  
Einsatz: 1µg/ml

Der Antikörper wurde aus den Kulturüberständen der B-Zellhybridomlinie EM95.3 gewonnen und über eine Protein G-Säule gereinigt.

**Antikörper für die Durchflusszytometrie**

Tab. 4: Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie.

Antikörper	Fluorochrom	Klon	Bezugsquelle
Anti-CD107a	eFluor 660	eBio1D4B	eBiosciences
Anti-CD117 (c-Kit)	APC	ACK2	eBiosciences
Anti-FcεRI	PE	MAR-1	eBiosciences
Anti-CD121a (IL-1RI)	APC	JAMA-147	BioLegend
Anti-TLR-4/MD-2	PE	MTS510	eBiosciences

**Antikörper zur Bestimmung von Cytokinkonzentrationen in „Enzyme-linked immunosorbent assays“ (ELISA)****IL-1β-ELISA**

Primärantikörper: # 79110  
(Mouse IL-1β ELISA MAX Capture Antibody); BioLegend;  
Stammlösung: 0,4mg/ml; Einsatz: 2µg/ml

Sekundärantikörper: # 79111  
(Mouse IL-1 $\beta$  ELISA MAX Detection Antibody); BioLegend;  
Stammlösung: 0,4mg/ml; Einsatz: 2 $\mu$ g/ml

### IL-6-ELISA

Primärantikörper: # 554400  
(Ratte Anti-Maus IL-6, Klon MP5-20F3); BD Pharmingen;  
Stammlösung: 0,5mg/ml; Einsatz: 0,5 $\mu$ g/ml

Sekundärantikörper: # 554402  
(Ratte Anti-Maus IL-6, Klon MP5-32C11, biotinyliert)  
BD Pharmingen; Stammlösung: 0,5mg/ml; Einsatz: 0,5 $\mu$ g/ml

### IL-9-ELISA

Primärantikörper: Ratte Anti-Maus IL-9; Klon 229.4  
Stammlösung: 3mg/ml; Einsatz: 3 $\mu$ g/ml  
Der Klon 229.4 wurde durch die Fusion von Milzzellen mit  
RP-HPLC gereinigtem MIL-9 gewonnen. Der Antikörper wurde  
von Prof. Dr. E. Schmitt aufgereinigt.

Sekundärantikörper: Hamster Anti-Maus IL-9, Klon C12; biotinyliert;  
Stammlösung: 1mg/ml; Einsatz: 3 $\mu$ g/ml  
Der Klon C12 wurde von Dr. J. van Snick (Ludwig Institute for  
Cancer, Brüssel) zur Verfügung gestellt.

### Antikörper zur Detektion der Proteine mittels Western Blot

#### Primärantikörper:

Anti-IRF-4: polyklonaler Goat Anti-IRF-4, Klon M-17, # sc-6059, Santa Cruz  
Biotechnology

Anti-NFATc2: monoklonaler Mouse Anti-NFATc2, Klon 4G6-G4, # sc-7296,  
Santa Cruz Biotechnology

Anti- $\beta$ -Aktin: monoklonaler Mouse Anti- $\beta$ -Aktin-Peroxidase, Klon AC-15, # A3854,  
Sigma-Aldrich

Anti-c-Rel: Rabbit Anti-c-Rel, Klon D4Y6M, # 120707, Cell Signaling

Anti-Lamin A/C: Rabbit Anti-Lamin A/C, # 2032, Cell Signaling

**Sekundärantikörper:**

Anti-Rabbit IgG HRP-linked Antibody, # 7074, Cell Signaling

Goat Anti-Mouse IgG, # 115-035-166, Jackson ImmunoResearch

Donkey Anti-Goat IgG-HRP, # sc-2020, Santa Cruz Biotechnology

**2.6 Cytokine**

Die aufgeführten Cytokine wurden als Standards in den ELISA eingesetzt, als Stimulanz genutzt oder für die Herstellung von Kulturmedien verwendet. Falls nicht anders angegeben, wurden die Cytokine im eigenen Labor hergestellt und affin aufgereinigt.

**Murin rekombinantes Interleukin 1 $\beta$  (mrIL-1 $\beta$ )**

IL-1 $\beta$  wurde als Standard in den IL-1 $\beta$ -ELISA eingesetzt und war Teil des Mouse IL-1 $\beta$  ELISA MAX Standard Kits, # 432602 von der Firma BioLegend (siehe Tab. 5). Für Stimulationen wurde IL-1 $\beta$  direkt von BioLegend (# 575102) bezogen.

**Murin rekombinantes Interleukin 3 (mrIL-3)**

Die Gewinnung von mrIL-3 erfolgte aus den Kulturüberständen der Tumorzelllinie X63/0 mittels Zentrifugation. Eine Unit entspricht hierbei der Konzentration, bei welcher die Indikatorzelllinie DA-1 eine halbmaximale Proliferation aufzeigt.

**Murin rekombinantes Interleukin 4 (mrIL-4)**

Das murin rekombinante IL-4 wurde aus transformierten 3T3-IL-4-Zellen gewonnen. Mittels Affinitätschromatographie wurde das IL-4 gereinigt. Ein IL-4-ELISA diente zur Konzentrationsbestimmung.

**Murin rekombinantes Interleukin 6 (mrIL-6)**

mrIL-6 wurde als Standard für den IL-6-ELISA verwendet und wurde von der Firma BD Pharmingen (# 554582) bezogen.

**Murin rekombinantes Interleukin 9 (mrIL-9)**

Das murin rekombinante IL-9 wurde von Dr. J. van Snick (Ludwig Institute for Cancer, Brüssel) zur Verfügung gestellt. Die Stammlösung hatte eine Konzentration von 20ng/ml.

## Murin rekombinanter Kit Ligand (mrKL)

Die cDNA für den Kit-Liganden wurde von Dr. G. W. Bornkamm (GSF München) zur Verfügung gestellt. Der Kit-Ligand wurde in *E. coli* exprimiert und anschließend gereinigt.

## 2.7 Verwendete Produktsets

Die in Tab. 5 aufgeführten Sets wurden für die einzelnen Versuche in dieser Arbeit verwendet.

Tab. 5: Liste der eingesetzten Produktpakete.

Name des Sets	Katalognummer	Bezugsquelle
Cell Fractionation Kit - Standard	ab109719	Abcam
DC Protein Assay	500-0116	BioRad
Dual-Luciferase Reporter Assay System	E1910	Promega
Mouse IL-1 $\beta$ ELISA MAX Standard Set	432602	BioLegend
Trilencer-27 Mouse siRNA für NFATc2	18019	OriGene
Trans-Blot Turbo RTA Transfer Kit, Nitrocellulose	170-4270	BioRad

## 2.8 Tiere

Die eingesetzten Tiere entstammten dem Translational Animal Research Center (TARC) der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz. Alle Mäuse wurden zuvor unter sterilen Bedingungen („SPF“, specific pathogen free) gehalten. Folgende Mausstämme wurden verwendet:

### C57BL/6

Wildtyp-Stamm, TARC Mainz.

### BALB/c

Wildtyp-Stamm, TARC Mainz.

### *Mcpt5-Cre<sup>+</sup> Irf-4<sup>fl/fl</sup>*

Die Mäuse auf dem genetischen C57BL/6-Hintergrund wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Tobias Bopp, Institut für Immunologie, Universitätsmedizin, Johannes Gutenberg-Universität Mainz zur Verfügung gestellt.

***Mcpt5-Cre<sup>-</sup> Nfatc1<sup>fl/fl</sup>***

Wildtypstamm zu den *Mcpt5-Cre<sup>+</sup> Nfatc1<sup>Δ/Δ</sup>*, TARC Mainz, auf dem genetischen Hintergrund von C57BL/6-Mäusen.

***Mcpt5-Cre<sup>+</sup> Nfatc1<sup>Δ/Δ</sup>***

Die Mäuse mit einer Mastzell-spezifischen NFATc1-Defizienz auf dem genetischen C57BL/6-Hintergrund wurden im TARC Mainz gezüchtet. *Mcpt5-Cre*-Mäuse [95] wurden hierfür mit *Nfatc1<sup>fl/fl</sup>*-Mäusen [96] verpaart. Die *Mcpt5-Cre*-Mäuse wurden freundlicherweise von Professor Dr. Axel Roers, Institut für Immunologie, Technische Universität Dresden zur Verfügung gestellt. Herr Privat-Dozent Dr. Benno Weigmann, Medizinische Klinik 1, Universitätsklinikum Erlangen stellte freundlicherweise die *Nfatc1<sup>fl/fl</sup>*-Mäuse zur Verfügung. Die aus der Paarung (*Mcpt5-Cre* x *Nfatc1<sup>fl/fl</sup>*) resultierenden Nachkommen wurden ab der dritten Filialgeneration in die Experimente eingesetzt.

***NFATc2<sup>-/-</sup>***

Die Mäuse mit einer systemischen NFATc2-Defizienz [97] wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Edgar Schmitt, Institut für Immunologie, Universitätsmedizin, Johannes Gutenberg-Universität Mainz zur Verfügung gestellt.

## 2.9 Methoden der Zellkultur

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

### 2.9.1 Präparation von Knochenmarkszellen

Die Mäuse wurden durch Inhalation von CO<sub>2</sub> getötet. Das Fell wurde von den beiden Hinterläufen entfernt und die Beine vom Hüftgelenk abgetrennt. Tibia und Femur wurden präpariert. Zur Desinfektion wurden die Knochen mit Isopropanol abgespült und zweimal mit MEM gewaschen. Die Enden der Röhrenknochen wurden an beiden Enden mit einer Schere geöffnet und das Knochenmark wurde mit einer MEM gefüllten Spritze (Kanülengröße 0,55 x 25mm) aus den Markhöhlen gespült. Zur Homogenisierung des gewonnenen Knochenmarkgewebes wurde eine sterile Glaspipette verwendet. Durch Filtration der Zellsuspension durch ein Zellsieb (Porengröße 70µm) wurden grobe Reste wie

Knochensplitter entfernt. Das Filtrat wurde anschließend zentrifugiert (500xg, 5min) und der Überstand verworfen. Die Zugabe von 2ml Gey's Lysepuffer diente der Lyse der im Pellet enthaltenen Erythrozyten. Durch Zugabe von 8ml MEM wurde die Lyse der Erythrozyten abgebrochen. Es folgte die Bestimmung der Lebendzellzahl, gefolgt von einem weiteren Zentrifugationsschritt (500xg, 5min). Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet wurde in KL-MZF aufgenommen. Die Zellsuspension wurde auf eine 24-Loch-Kulturplatte pipettiert (Zellzahl  $2 \times 10^6$  Zellen/ml) und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> aufbewahrt. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen mit frischem KL-MZF versorgt und je nach Bedarf auf neue Kulturplatten umgesetzt. Durch das Umsetzen wurden adhärente Zellen abgeschieden. Die generierten BMDC konnten nach drei bis vier Wochen bei einer Reinheit >95% (Daten nicht gezeigt) in Versuchen eingesetzt werden.

## 2.9.2 Lebendzellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit physiologischer Trypanblau-Lösung verdünnt. Trypanblau ist ein polyanionischer Diazofarbstoff, der in tote Zellen eindringen kann und somit zur Vitalfärbung von Zellen eingesetzt werden kann [98]. Diese Zellen erscheinen für den Beobachter als blaue Zellen. Lebende Zellen können den sauren Farbstoff aufgrund ihrer intakten Zellmembran ausschließen und erscheinen im Lichtmikroskop als ungefärbte Zellen. Die Lebendzellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Kammertiefe 0,1mm) ermittelt. Aus den Einzelergebnissen, die sich aus dem Auszählen der farblosen Zellen in den vier Großquadranten (Grundfläche je 1mm<sup>2</sup>) ergab, wurde ein Mittelwert (MW) gebildet. Durch Multiplikation des MW mit dem Verdünnungsfaktor (VF), dem Gesamtvolumen (GV, in ml) und dem Kammerfaktor ( $10^4$ ) wurde die Anzahl der lebenden Zellen pro Milliliter mit unten stehender Formel (1.a) berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{MW} \times \text{VF} \times \text{GV (ml)} \times 10^4 \quad (1.a)$$

## 2.10 Stimulation der Mastzellen

Alle Stimulationen wurden in KL-MZF bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank durchgeführt. Zuvor wurden die Mastzellen geerntet, abzentrifugiert und nach Bestimmung der Lebendzellzahl auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml (ELISA) oder  $2 \times 10^6$  Zellen/ml (Western Blot, qRT-PCR) eingestellt und auf eine 24-Loch-Kulturplatte pipettiert. Darauf erfolgte die Zugabe der Stimulanzen in den angegebenen Endkonzentrationen

(siehe Tab. 6). Die Dauer der Stimulation richtete sich nach der Art des Experimentes. Für die ELISA-Untersuchungen wurden Kulturüberstände nach 4h, 20h, 24h und 48h entnommen. Die Stimulationen zur Gewinnung von cDNA für die RT-PCR erfolgten für 4h, 18h und 24h. Protein zur Analyse mittels Western Blot wurde nach 3h, 8h bzw. 18h präpariert.

**Tab. 6: Liste der eingesetzten Stimulanzen.**

Stimulanz	Endkonzentration	Bezugsquelle
Anakinra (Kineret)	5ng/ml	Swedish Orphan Biovitrum AB
Anti-DNP-IgE Klon SPE-7	1µg/ml	Sigma-Aldrich
Anti-IgE Klon EM95.3	1µg/ml	Eigenherstellung
murin rekombinantes IL-1β	5ng/ml	BioLegend
Ionomycin	1µM	Sigma-Aldrich
IT-603	50µM	Calbiochem
R-LPS	200ng/ml	Enzo Life Science

### 2.10.1 Stimulation mit dem IL-1-Rezeptorantagonisten Anakinra

Die Mastzellen in der 24-Loch-Kulturplatte wurden mit 5ng/ml Anakinra stimuliert. Anakinra ist ein rekombinanter humaner IL-1-Rezeptorantagonist, der von Swedish Orphan Biovitrum AB bezogen wurde. Die Stammlösung wurde frisch in 1x PBS verdünnt und anschließend verwendet.

### 2.10.2 Stimulation mittels IgE-Kreuzvernetzung

Vier Wochen alte Mastzellen ( $1 \times 10^6$  Zellen/ml) wurden zunächst für 48h in KL-MZF und 1µg/ml Anti-DNP-IgE präinkubiert. Zur Aktivierung der Mastzellen wurden diese durch Kreuzvernetzung der gebundenen Immunglobuline mit 1µg/ml Anti-IgE stimuliert [99].

### 2.10.3 Stimulation mit dem Calcium-Ionophor Ionomycin

Die ausplattierten Mastzellen wurden mit 1µM Ionomycin stimuliert. Bei Ionomycin handelt es sich um ein Calciumsalz aus *Streptomyces conglobatus*, dass von der Firma Sigma-Aldrich (IO634) bezogen wurde. Das Pulver wurde in Ethanol gelöst und mit TM5 auf eine

Konzentration von 50µM eingestellt. Die Stammlösung wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

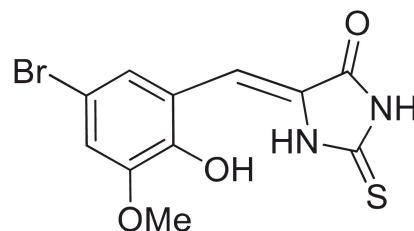
#### 2.10.4 Stimulation mit den Kofaktoren R-LPS oder IL-1β

Nach dem Ausplattieren der Mastzellen wurden diese mit dem Kofaktor R-LPS (200ng/ml) bzw. mit dem Kofaktor IL-1β (5ng/ml) stimuliert. Die Stammlösung von R-LPS wurde mit TM5 auf eine Konzentration von 50µg/ml verdünnt und bei -20°C gelagert. IL-1β wurde mit TM5 auf eine Konzentration von 5µg/ml verdünnt und ebenfalls bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

#### 2.10.5 Inhibition von c-Rel mittels des c-Rel-Inhibitors IT-603

Die Mastzellen wurden mit dem c-Rel-Inhibitor IT-603 (50µM in DMSO gelöst) für 30min im Brutschrank vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation der Mastzellen. Als Lösungsmittelkontrolle wurde pro Testansatz die gleiche Menge an DMSO eingesetzt.

IT-603 ist ein c-Rel-Inhibitor mit dem chemischen Namen [(5Z)-5-[(5-bromo-2-hydroxy-3-methoxyphenyl) methylidene]-2-sulfanylideneimidazolidin-4-one (siehe Abb. 8). Der Inhibitor wurde von der Firma Calbiochem über Merck Millipore bezogen.



**Abb. 8: Struktur des c-Rel-Inhibitors IT-603.**

Die Darstellung zeigt die chemische Struktur des c-Rel-Inhibitors IT-603 [(5Z)-5-[(5-bromo-2-hydroxy-3-methoxyphenyl) methylidene]-2-sulfanylideneimidazolidin-4-one mit einem Molekulargewicht von 329,1g/mol [100].

Der c-Rel-Inhibitor IT-603 bindet direkt aber reversibel an den Transkriptionsfaktor c-Rel. Durch die Bindung kommt es zu einer Konformationsänderung von c-Rel, die die DNA-Bindung und damit die Transkriptionsaktivität von c-Rel blockiert (Angabe gemäß den Herstellerangaben von Calbiochem).

## 2.11 Durchflusszytometrie

Mit der Durchflusszytometrie können Zellen anhand ihrer Größe, Granularität und durch die Expression bestimmter Strukturen auf der Zelloberfläche und im Zellinneren differenziert werden [101]. Durch den Einsatz Fluorochrom-markierter Antikörper, die gegen bestimmte Merkmale gerichtet sind, können einzelne Zellen innerhalb einer Zellsuspension unterschieden werden. Durch Laser werden die Fluorochrome zur Emission von Licht angeregt. Das ausgesandte Licht wird von einem Detektor erfasst.

Die durchflusszytometrischen Analysen erfolgten am LSR II der Firma BD. Für die Auswertung der erhaltenen Daten wurde die Software BD FACSDiva (BD) oder FlowJo (FlowJo Enterprise) verwendet. Alle Fluoreszenz-markierten Antikörper (siehe 2.5) wurden nach Herstellerangaben eingesetzt.

### 2.11.1 Färbung der Zellen für die Durchflusszytometrie

Die ausgewählten Antikörper wurden in einer Färbelösung aus GM-Puffer in einer den Herstellerangaben entsprechenden Konzentration eingesetzt. 50µl dieser Färbelösung wurden mit  $1 \times 10^6$  Zellen bei 4°C für 15min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit GM-Puffer gewaschen. Nach Aufnahme der Zellen in 250µl GM-Puffer erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der BMMC (CD117/FcεRI-doppeltpositive Zellen). Die untersuchten Zellen hatten eine Reinheit von >95% Mastzellen (Daten nicht gezeigt).

## 2.12 Nachweis der Degranulation mit dem β-Hexosaminidase-Test

Durch IgE-Kreuzvernetzung kommt es innerhalb kürzester Zeit zur Degranulation der Mastzellen. Dabei werden die Inhalte der Mastzell-eigenen Granula ausgeschüttet, u. a. das Enzym β-Hexosaminidase. Durch eine Farbreaktion kann die Aktivität dieses Enzyms photometrisch detektiert werden.

Mastzellen wurden für 30min mittels IgE-Kreuzvernetzung aktiviert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und zentrifugiert (500xg, 5min). Die Überstände wurden in ein separates Reaktionsgefäß überführt und die Zellpellets wurden in 500µl Triton X-100 lysiert. Es wurden jeweils 20µl der Zelllysate, der Überstände, des Triton X-100 und des KL-MZF auf eine 96-Loch-Kulturplatte pipettiert. Die Proben wurden mit 50µl Substratlösung

(1,3mg p-Nitrophenyl-N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosamin in Substratpuffer) pro Vertiefung für 90min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Durch Zugabe von 150 $\mu$ l Glycinlösung wurde die Substratreaktion abgestoppt. Die photometrische Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 410nm am GENios (Tecan).

Die Berechnung der Degranulation in Prozent erfolgte mit den unten stehenden Formeln (2.a, 2.b, 2.c):

$$\text{Extinktion Überstand (E Ü)} = \text{Extinktion Überstand Probe} - \text{Extinktion KL-MZF} \quad (2.a)$$

$$\text{Extinktion Lysat (E L)} = \text{Extinktion Lysat Probe} - \text{Extinktion Triton X-100} \quad (2.b)$$

$$\text{Degranulation [\%]} = \left[ \frac{\text{E Ü}}{\text{E Ü} + \text{E L}} \right] \times 100 \quad (2.c)$$

## 2.13 Molekularbiologische Methoden

### 2.13.1 RNA-Präparation aus murinen BMDC

Zur Isolation der zellulären Gesamt-RNA wurden die Mastzellen geerntet und zentrifugiert (500xg, 5min). Das Zellpellet wurde in 1ml RNA Tri-flüssig resuspendiert, für 5sec auf dem Vortexer gemischt und anschließend für 5min lysiert. Danach wurden 200 $\mu$ l Chloroform hinzugegeben und für 15sec gründlich gevortext, bis sich die Lösung milchig rosa verfärbte. Es folgte eine Inkubation von 5min. Nach Zentrifugation (10000xg, 10min, 4°C) der Proben wurden 500 $\mu$ l der wässrigen RNA-haltigen Phase abgenommen, in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1,5 $\mu$ l Glykogen (20mg/ml) vermischt. Die Proben wurden invertiert und für 5min inkubiert. Danach wurden 500 $\mu$ l Isopropanol hinzugefügt und erneut invertiert. Die RNA wurde für 10min bei Raumtemperatur gefällt und darauf zentrifugiert (10000xg, 10min). Das RNA-Pellet wurde zweimal mit eiskaltem 75%-igem Ethanol gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet getrocknet.

### 2.13.2 Lösen des RNA-Pellets

Für die „Knockdown-Experimente“ wurde das RNA-Pellet in 12 $\mu$ l DEPC-Wasser aufgenommen und 5min bei 60°C gelöst. Nach 2min auf Eis wurden die Proben kurz anzentrifugiert. Die gelöste RNA wurde in die Reverse Transkription überführt.

RNA-Proben für die qRT-PCR wurden in 22,5µl RNA-Aufbewahrungspuffer für 5min bei 60°C gelöst. Die Proben wurden nach 2min auf Eis anzentrifugiert und es folgte eine Konzentrationsbestimmung der RNA im Photometer.

### 2.13.3 Konzentrationsbestimmung der RNA

Die Konzentrationsbestimmung der gewonnenen RNA wurde am BioMate3 UV-Vis-Spektrometer (Thermo Fisher Scientific) bei einer Wellenlänge von 260nm durchgeführt. Für die Reverse Transkription wurden 1500ng RNA eingesetzt.

### 2.13.4 Reverse Transkription

Im Anschluss an die Isolierung der RNA folgte die Reverse Transkription. Dabei wird die gewonnene RNA in cDNA umgeschrieben. Als Primer dienten sowohl Oligo-(dT)-Primer als auch Hexanukleotide (N6-Primer). Oligo-(dT)-Primer binden an den Poly-A-Schwanz der mRNA, sodass die Reverse Transkription am 3'-Ende beginnen kann. Ausgehend von diesen Primern synthetisiert die Reverse Transkriptase die cDNA.

#### **Folgender Ansatz wurde für die Reverse Transkription eingesetzt:**

zu 1500ng RNA (in 11µl) wurden

5x M-MuLV-RT-Puffer (Fermentas)	4µl
Oligo-(dT)-Primer (100ng/ml, Fermentas)	1µl
dNTP-Mix (2'-Desoxynucleosid-5'-Triphosphat, 10mM, Thermo Fisher Scientific)	2µl
N6-Primer (20ng/ml, Roche)	1µl
M-MuLV-Reverse Transkriptase (200U, Fermentas)	1µl

pipettiert.

Die Reverse Transkription wurde in einem Gesamtvolumen von 20µl bei 42°C für 1h durchgeführt. Durch Zugabe von 80µl autoklaviertem Wasser wurde die Reaktion abgestoppt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die cDNA bei -20°C gelagert.

Für die Reverse Transkription der aus den „Knockdown-Versuchen“ isolierten RNA wurden nur Oligo-(dT)-Primer und keine N6-Primer eingesetzt. Um ein Gesamtvolumen von 20µl zu erhalten, wurde mit RNA-Aufbewahrungspuffer aufgefüllt.

### 2.13.5 semiquantitative Realtime-PCR (qRT-PCR)

Mit Hilfe der qRT-PCR ist es möglich, Nukleinsäuren nach Art einer Polymerase-Kettenreaktion zu amplifizieren und dabei in Echtzeit durch Fluoreszenzmessungen eine Quantifizierung durchzuführen. Die entstehende Fluoreszenz ist dabei proportional zur Menge der gebildeten PCR-Produkte [102]. Zur Quantifizierung wurde das Haushaltsgen *hgprt* (*Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase*) verwendet.

Die Proben wurden in Triplikaten unter Einsatz des 5x Hot Start Taq EvaGreen qPCR Mix von Axon untersucht. Der fertige Mix enthält bereits den Fluoreszenzfarbstoff EvaGreen, Puffer, eine Hot Start Taq DNA-Polymerase und MgCl<sub>2</sub>.

**Die Ansätze für jede Probe wurden nach folgendem Schema pipettiert:**

5x EvaGreen qPCR Mix	4µl
autoklaviertes H <sub>2</sub> O	12,5µl
spez. Primerpaar (je 5pmol/µl)	1µl
cDNA	2,5µl

Die PCR-Ansätze wurden in spezielle 96-Loch-Platten (96-Well PCR-Platte mit halbem Rand, 4-fach segmentiert, Axon; je 20µl) pipettiert und mit Deckeln verschlossen (8er ultraklare Deckelstreifen, Axon). Das untenstehende Programm wurde mit dem Gerät iCycler von BioRad durchgeführt:

#### Programm:

Aufwärmschritt	50°C	2min	
Initiale Denaturierung	95°C	15min	
Denaturierung	95°C	30sec	} 50 Zyklen
Annealing	57°C	30sec	
Elongation	72°C	1min	
Finale Denaturierung	95°C	1min	
Aufnahme der Schmelzkurven	95°C bis 60°C in je 0,5°C-Schritten		

**Die folgenden Primer wurden in der qRT-PCR eingesetzt:**

A20	forward:	5'-CAT CCA CAA AGC ACT TAT TGA CA-3'
	reverse:	3'-GAG TGT CGT AGC AAA GTC CTG TT-5'
c-Rel	forward:	5'-CCA GGG CAA GCT GAA CCT TA-3'
	reverse:	3'-GTG GGT GAT GTG GCA ATC C-5'
HGPRT	forward:	5'-GTT GGA TAC AGG CCA GAC TTT GTT G-3'
	reverse:	3'-GAG GGT AGG CTG GCC TAT AGG CT-5'
IL-1 $\beta$	forward:	5'-CAA CCA ACA AGT GAT ATT CTC CAT G-3'
	reverse:	3'-GAT CCA CAC TCT CCA GCT GCA-5'
IL-4	forward:	5'-GCA TGG TGG CTC AGT ACT ACG AGT A-3'
	reverse:	3'-GAA TGT ACC AGG AGC CAT ATC CAC G-5'
IL-6	forward:	5'-GCC AGA GTC CTT CAG AGA GAT AC-3'
	reverse:	3'-CCC AAC GAT TCA TAT TGT CAG-5'
IL-9	forward:	5'-CTG ATG ATT GTA CCA CAC CGT GC-3'
	reverse:	3'-GCC TTT GCA TCT CTG TCT TCT GG-5'
IRF-4	forward:	5'-ACG CTG CCC TCT TCA AGG CTT-3'
	reverse:	3'-TGG CTC CTC TCG ACC AAT TCC-5'
MD-2	forward:	5'-GAG AAG CAA CAG TGG TTC TG-3'
	reverse:	3'-CTC CTT TCA GAG CTC TGC AA-5'
MyD88	forward:	5'-CGA GTT TGT GCA GGA GAT GA-3'
	reverse:	3'-GGA TAC TGG GAA AGT CCT TC-5'
NFATc1 Exon 3	forward:	5'-TGC CTT TTG CGA GCA GTA TCT-3'
	reverse:	3'-CAG GCA AGG ATG GGC TCA TAT-5'
NFATc2	forward:	5'-ACT TCA CAG CGG AGT CCA AGG T-3'
	reverse:	3'-GGA TGT GCT TGT TCC GAT ACT CG-5'
p50	forward:	5'-GGT ATG CAC CGT AAC AGC AG-3'
	reverse:	3'-GCT TCC CTC TGT CAT CCG T-5'
p52	forward:	5'-CTG GGT GAC ACA TAC AGG AAG AC-3'
	reverse:	3'-ATA GGC ACT GTC TTC TTT CAC CTC-5'
TLR-4	forward:	5'-CAG CTT CAATGG TGC CAT CA-3'
	reverse:	3'-CTG CAA TCA AGA GTG CTG AG-5'
TRIF	forward:	5'-GTC TGT CAG GAG GTG CTC-3'
	reverse:	3'-CGT TCC GGA CAT GCT CTT TCT C-5'

TRAM	forward:	5'-ACT CTG TCA TGG GTG TTG GG-3'
	reverse:	3'-CAC TGC TCT GCT CCA CAA AA-5'

### 2.13.6 Reporter-genuntersuchungen

Bei Reporter-genuntersuchungen wird die Promotor-Aktivität eukaryotischer Gene analysiert. Dabei werden die zu untersuchenden aktiven Elemente eines Gens jeweils vor die kodierende Sequenz eines Reportergens kloniert. In diesem Fall wurden ein Minimalpromotor und die Sequenz von NFAT- bzw. von NF-κB-Bindestellen vor das Gen für die Luciferase aus dem Glühwürmchen *Photinus pyralis* eingefügt. Durch die Aktivität der NFAT- und NF-κB-Faktoren wird der Promotor aktiviert und das Gen für die Luciferase abgelesen. Anhand der Enzymaktivität im Zelllysate kann indirekt eine Aussage über die Aktivität der NFAT- bzw. der NF-κB-Promotoren getroffen werden. Durch eine Kotransfektion wurde ein weiteres Plasmid in die Zellen eingebracht. Dieses enthält das konstitutiv exprimierte *luciferase*-Gen aus der Weichkoralle *Renilla reniformis* unter der Kontrolle des *thymidinkinase*-Promoters (pRL-TK).

Mittels Elektroporation wurden IgE-beladene BMBC transfiziert. Hierfür wurden  $3 \times 10^6$  Zellen/100µl in ISCOVE mit 100µl Plasmidlösung (NFAT-Reporter: 5µg oder NF-κB-Reporter: 5µg; pRL-TK: 150ng in 100µl ISCOVE) vermischt und in Elektroporationsküvetten (4mm, BioRad) überführt. Bei einer Spannung von 290V und einer Kapazität von 600µF wurde die Transfektion mit dem Gene Pulser II der Firma BioRad durchgeführt. Nach der Transfektion wurden die Zellen in 5ml warmes KL-MZF aufgenommen und für 2h bei 37°C im Brutschrank ruhen gelassen. Nach der Ruhephase wurden die Zellen mit KL-MZF gewaschen und anschließend mit Anti-IgE bzw. Ionomycin für 18h stimuliert.

Zur Herstellung der Zellextrakte und zur Messung der Luciferaseaktivität wurde das Dual-Luciferase Reporter Assay System von Promega (siehe Tab. 5) verwendet. Die Zellen wurden mit 1ml 1x PBS gewaschen und in 50µl Passive Lysis Buffer (PLB) laut Protokoll lysiert. Die Messung der Lumineszenz wurde an einem Luminometer (TD-20/20, Promega) mit je 10µl Zellextrakt, 50µl LAR II und 50µl Stop & Glo für jeweils 10sec durchgeführt. Dabei wurde auf gleiche Zeitabstände zwischen den einzelnen Messungen der *Photinus*- und *Renilla*-Luciferase geachtet. Zur Normierung wurden die jeweiligen Messdaten über die Werte der Lumineszenz der *Renilla*-Luciferase abgeglichen.

**Verwendete Reportergenkonstrukte:****pNFAT-Luciferase (pNFAT-Luc):**

Stratagene; das Konstrukt enthält stromaufwärts vor dem Gen für die Luciferase aus *Photinus pyralis* eine TATA-Box und vier 30bp lange NFAT-Bindestellen aus dem antigen receptor response element 2 des humanen *il-2*-Promotors [103].

NFAT (4x): (GGA GGA AAA ACT GTT TCA TAC AGA AGG CGT)<sub>4</sub>

**pNF-κB-Luciferase (pTATALuc<sup>+</sup>):**

Freundlicherweise von Ralf Marienfeld (Institut für Molekulare Pathologie, Würzburg) zur Verfügung gestellt. Stromaufwärts der TATA-Box befinden sich drei NF-κB-Bindestellen des murinen c-Myb intronic enhancers vor dem Luciferase-Gen aus *Photinus pyralis* [104].

NF-κB (3x): (GGC CTC TGG AAA GTA CCT TAA ACA TA)<sub>3</sub>

**2.14 “Enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA)****2.14.1 ELISA zur Bestimmung der Cytokine Interleukin 9 und 6**

Die Bestimmung erfolgte mittels eines ELISA anhand der Sandwichmethode. Zunächst wurde eine 96-Loch-Kulturplatte (MaxiSorp, Nunc) mit dem unmarkierten Primärantikörper durch eine Inkubation bei 4°C über Nacht beschichtet. Der Primärantikörper wurde in Kopplungspuffer verdünnt (Endkonzentration: IL-9 3µg/ml; IL-6 0,5µg/ml) und jeweils 50µl davon wurden in jedes Loch pipettiert. Nachdem die Platte am nächsten Tag dreimal mit Waschpuffer gewaschen wurde, wurden freie Bindungsstellen der Platte durch eine Inkubation mit Blockpuffer abgesättigt. 50µl Blockpuffer wurden pro Vertiefung vorgelegt und für 30min bei 37°C inkubiert. Die Proben und eine definierte Positivkontrolle (jeweils 50µl) der entsprechenden Cytokine wurden in Blockpuffer 1:2 seriell verdünnt. Es folgte eine Inkubation für 1h bei 37°C. An die Waschschrte schloss sich eine einstündige Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper an (50µl pro Loch; Endkonzentration: IL-9 3µg/ml; IL-6 0,5µg/ml). Überschüssiger Antikörper wurde durch erneute Waschschrte entfernt. Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (Roche) wurde in Blockpuffer verdünnt und in die Vertiefungen pipettiert (50µl pro Loch; 0,05U/ml). Nach einer Inkubation von 10min bei 37°C und drei weiteren Waschschrten wurde die Substratlösung (1mg/ml ABTS; 2,2-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure; 50µl pro Loch) in Substratpuffer mit 0,0075% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

zugegeben. Die photometrische Messung erfolgte am GENios der Firma Tecan bei einer Wellenlänge von 410nm.

Die Auswertung der photometrischen Messung erfolgte im Tabellenkalkulationsprogramm Excel mit Hilfe eines Makros, das von S. Jin (ehemals Institut für Immunologie, Universitätsmedizin, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) entwickelt wurde.

### **2.14.2 ELISA zur Messung der IL-1 $\beta$ -Konzentration**

Zur Bestimmung der IL-1 $\beta$ -Konzentration in Zelllysaten wurde das Mouse IL-1 $\beta$  ELISA MAX Standard Set der Firma BioLegend verwendet (siehe Tab. 5). Die Reagenzien des Sets wurden nach Herstellerangaben verwendet. Es ergaben sich jedoch Änderungen bezüglich der Probenvorbereitung und der Handhabung des Probenauftrags.

#### **Probenvorbereitung:**

Die Bestimmung von IL-1 $\beta$  erfolgte in Zelllysaten stimulierter BMMC. Hierfür wurden die Mastzellen zusätzlich zur Stimulation jeweils für 4h mit Brefeldin A (1 $\mu$ g/ml) behandelt. Brefeldin A ist ein makrocyclisches Lacton, das den Abbau des Golgi-Komplexes induziert und einen retrograden Transport der Proteine vom Golgi-Apparat zum Endoplasmatischen Retikulum bewirkt. Zudem blockiert Brefeldin A die Bildung von Vesikeln und damit die Proteinsekretion [105], wodurch es zur Anhäufung von Proteinen im Cytoplasma der Mastzellen kommt. Eine Behandlung der BMMC mit Brefeldin A war notwendig, da es in vorangegangenen Untersuchungen nicht möglich war, IL-1 $\beta$  in den Kulturüberständen nachzuweisen. Möglicherweise kam es durch freigesetzte Mastzell-Proteasen zu einem Abbau des sezernierten Cytokins IL-1 $\beta$ . Daher wurden für den Nachweis von IL-1 $\beta$  Zelllysate verwendet. Die stimulierten Zellen wurden mit 500 $\mu$ l 1x PBS gewaschen und in 100 $\mu$ l Triton X-100 lysiert. Nach 5min auf Eis wurden die Lysate zentrifugiert (500xg, 5min) und als Proben in den IL-1 $\beta$ -ELISA eingesetzt.

#### **Probenauftrag:**

In jede Vertiefung der Kulturplatte wurden jeweils 50 $\mu$ l Blockpuffer pipettiert. Die vorbereiteten Zelllysate (50 $\mu$ l) und eine definierte Positivkontrolle wurden 1:2 seriell verdünnt und über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Alle weiteren Arbeiten erfolgten gemäß den Angaben des Herstellers.

Die Auswertung der erhaltenen photometrischen Daten (GENios, Tecan) erfolgte im Tabellenkalkulationsprogramm Excel mittels eines Makros von S. Jin (ehemals Institut für Immunologie, Universitätsmedizin, Johannes Gutenberg-Universität Mainz).

## 2.15 Proteinanalyse

### 2.15.1 Präparation von Gesamtprotein

Die stimulierten Mastzellen wurden in ein Reaktionsgefäß geerntet und zentrifugiert (500xg, 5min). Nach einmaligem Waschen mit 500µl 1x PBS wurden die Zellen erneut zentrifugiert (500xg, 5min). Das Zellpellet wurde in 70µl SDS-Lysepuffer lysiert und gevortext. Nach 3min bei 97°C wurden die Lysate mehrmals mit einer 1ml-Spritze durch eine Kanüle (Kanülengröße 0,4 x 12mm) gezogen.

### 2.15.2 Präparation von nukleärem Protein

Für die Präparation des nukleären Proteins wurde das Cell Fractionation Kit - Standard von Abcam (siehe Tab. 5) verwendet. Die stimulierten Zellen (insgesamt  $1 \times 10^7$  Zellen pro Ansatz) wurden geerntet und zentrifugiert (500xg, 5min, 4°C). Nach einem Waschschrift mit 1ml Puffer A wurden die Zellen in 100µl Puffer A aufgenommen, mit 100µl Puffer B homogenisiert und für 7min auf dem Schüttler inkubiert (Lyse der Zellen). Danach wurde die Probe zentrifugiert (5000xg, 1min, 4°C). Das Pellet (P1) wurde auf Eis gehalten, während der Überstand (Ü1) abgetrennt und zentrifugiert wurde (10000xg, 1min, 4°C). Der entstandene Überstand (Ü2) wurde mit Ü1 vereinigt und als cytoplasmatische Fraktion aufbewahrt. Das verbleibende Pellet P2 (enthielt Mitochondrien und Nuclei der Zellen) wurde mit 50µl Puffer A resuspendiert und mit P1 vereinigt. Es folgte die Zugabe von 50µl Puffer C. Die mittels einer Pipette homogenisierte Lösung wurde für 10min auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend erfolgten zwei Zentrifugationsschritte (5000xg, 1min, 4°C; 10000xg, 1min, 4°C) und es wurden die Überstände Ü3 und Ü4 wie oben generiert und als mitochondriale Fraktion aufbewahrt. Das vereinigte Pellet aus Pellet P3 und P4 (Nuclei der Zellen) wurde in 70µl SDS-Lysepuffer lysiert, gevortext und bei 97°C für 3min aufgeköcht. Darauf wurde das Lysat mehrmals mit Hilfe einer 1ml-Spritze durch eine Kanüle (Kanülengröße 0,4 x 12mm) gezogen. Das Lysat aus Pellet P3 und P4 wurde als nukleäre Fraktion in den Western Blot überführt.

### 2.15.3 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde mittels des DC Protein Assay Kits der Firma BioRad, # 5000116 ermittelt. Es wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren.

## 2.15.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der SDS-PAGE ist es möglich, ein komplexes Proteingemisch der Größe nach aufzutrennen. Hierfür wurde ein vertikales System nach Laemmli benutzt [106]. Es wurden Fertiggele verwendet, die einen Acrylamid-Gradienten von 4% bis 20% aufweisen. Dies erlaubt eine Auftrennung der Proteine mit hoher und niedriger Molekülmasse in einem einzigen Gel (Mini-PROTEAN TGX Gele von BioRad). Für die Gele wurde die gewünschte Proteinkonzentration (15µg für Gesamtprotein, 25µg für nukleäres Protein) mit 5x SDS-Ladepuffer versetzt und bei 95°C für 5min denaturiert. Die vorbereiteten Gele wurden mit den Proben beladen. Zur Größenbestimmung wurden 5µl eines vorgefärbten Proteinstandards (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific) mitgeführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 30mA und 200V pro Gel.

## 2.15.5 Western Blot

Der Western Blot wurde eingesetzt, um quantitative Aussagen über die Expression von Proteinen zu machen [107]. Dabei werden die Proteinbanden des SDS-Gels auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die SDS-Gele mit den aufgetrennten Proben wurden im Semi-Dry-Verfahren im "Trans-Blot Turbo Blotting System" von BioRad „geblottet“. Hierfür wurde das Trans-Blot Turbo RTA Transfer Kit, Nitrocellulose von BioRad verwendet (siehe Tab. 5) und es wurde nach Herstellerangaben verfahren. Der Proteintransfer erfolgte bei 25V und 1A für 30min. Die Nitrocellulosemembran wurde nach dem Proteintransfer für 30min zwischen zwei Filterpapieren getrocknet. Anschließend wurden die freien Bindungsstellen der Membran durch eine Inkubation für 1h in TBST mit 5% Milchpulver blockiert. Danach wurde die Membran dreimal für 5min in TBST gewaschen und mit dem Primärantikörper verdünnt in TBST und 1% BSA über Nacht bei 4°C inkubiert. Darauf wurde die Membran dreimal mit TBST für je 5min gewaschen und mit dem Sekundärantikörper verdünnt in TBST und 5% Milchpulver für 1h inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde die Nitrocellulosemembran dreimal für 5min mit TBST gewaschen. Es folgte ein Waschschrift in TBS für 5min, um das Tween 20 zu entfernen.

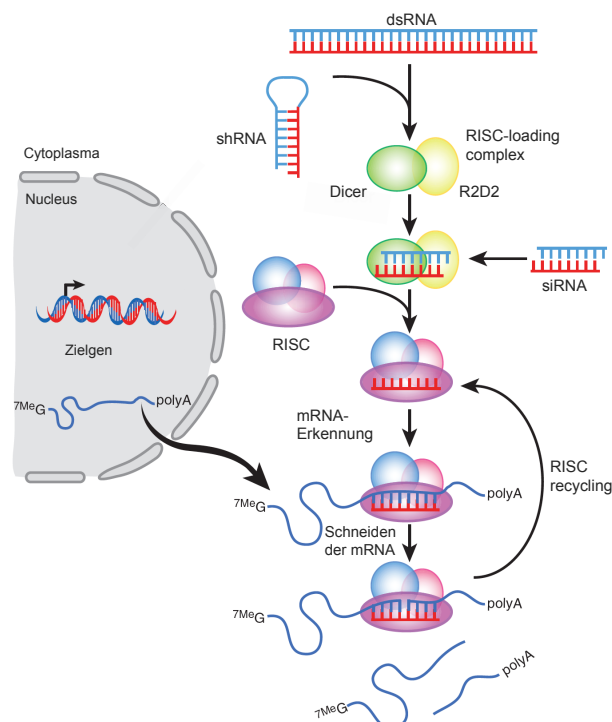
Alle durchgeführten Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten auf einem Kippschüttler der Firma Biometra. Die Primär- und Sekundärantikörper wurden nach den Angaben des Herstellers eingesetzt.

## 2.15.6 Immundetektion

Mittels Chemilumineszenz wurden die an die Nitrocellulosemembran gebundenen Proteine sichtbar gemacht. Ein Sekundärantikörper, der mit einer Peroxidase gekoppelt ist, bindet an den am Protein gebundenen Primärantikörper. In Gegenwart eines Peroxid-haltigen Puffers setzt die Peroxidase Luminol um und es kommt zur Emission von Licht einer Wellenlänge von 425nm. Die Messung der Emission erfolgte am ChemiDoc-System von BioRad mit Hilfe des Clarity Western ECL Substrate von BioRad.

## 2.16 RNA-Interferenz

Durch Einsatz der RNA-Interferenz kann man ein bestimmtes Gen stilllegen (siehe Abb. 9). Um diese Stilllegung zu erreichen, wurde eine spezifische small interfering RNA (siRNA), die gegen eine bestimmte Ziel-mRNA gerichtet ist, mittels Transfektion in die Zellen eingebracht. In diesem Fall wurde eine spezifische IRF-4-siRNA bzw. eine NFATc2-siRNA eingesetzt. Als Negativkontrolle diente die Transfektion mit einer „scrambled negative control siRNA“.



**Abb. 9: Stilllegung eines Gens durch siRNA.**

siRNA können aus längeren doppelsträngigen RNA-Molekülen (dsRNA, ~21 Nukleotide lang) oder shRNA (small hairpin RNA) entstehen. dsRNA und shRNA werden im Cytoplasma durch die Endonuklease Dicer und das dsRNA-Bindeprotein R2D2 gespalten. Die resultierenden siRNA enthalten die charakteristische 19 Nukleotide lange Duplex-Region mit einem 3'-Überhang und einer N-terminalen Phosphatgruppe. Der RISC-Komplex (RNA-induced silencing complex) bindet über das zentrale Ago2-Protein an die siRNA. Die siRNA wird entwunden und gespalten, so dass nur der Leitstrang im RISC-Komplex verbleibt. Eine Ziel-mRNA, die komplementär zur Sequenz des Leitstranges ist, wird durch die Endonuklease-Aktivität von Ago2 gespalten (modifiziert nach [108]).

Die BMMC wurden zweimal in ISCOVE gewaschen und auf  $3 \times 10^6$  Zellen/100 $\mu$ l eingestellt. Anschließend wurden sie mit 1 $\mu$ M siRNA (IRF-4-siRNA bzw. NFATc2-siRNA) in 100 $\mu$ l ISCOVE vermischt und in Elektroporationsküvetten (4mm, BioRad) überführt. Zur Negativkontrolle erfolgte eine Transfektion mit 0,5 $\mu$ M „scrambled negative control siRNA“. Die Transfektion erfolgte bei einer Spannung von 290V und einer Kapazität von 600 $\mu$ F am Gene Pulser II von BioRad. Die transfizierten BMMC wurden in 5ml warmes KL-MZF aufgenommen und für 24h im Brutschrank ruhend belassen. Darauf wurden die Zellen einmal mit KL-MZF gewaschen und mit dem Calcium-Ionophor Ionomycin stimuliert. Nach einer Stimulationsdauer von 18h wurden die Zellen geerntet und die Gesamt-RNA präpariert. Nach der Reversen Transkription wurde die generierte cDNA in der qRT-PCR analysiert.

#### **Verwendete siRNA:**

- IRF-4-siRNA:**
- Herstellung von Invitrogen
  - IRF-4-siRNA 1 aus [109]
  - Sequenz: UUG GGA AUU GUU UAA AGG CAA GU

#### **„scrambled negative control siRNA“:**

AllStars Negative Control siRNA (5nmol) # 1027280 von Qiagen

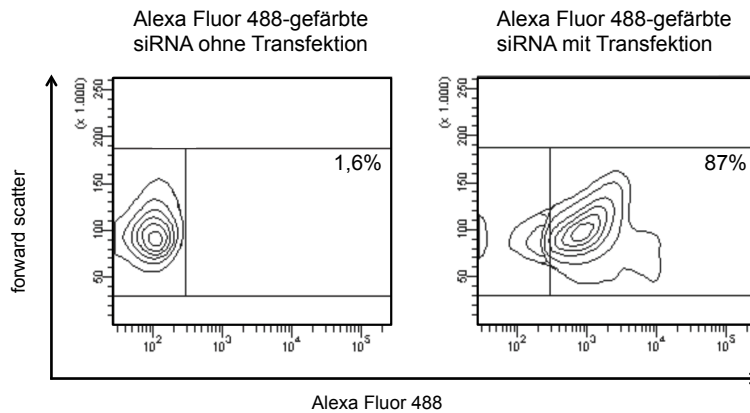
#### **NFATc2-siRNA:**

Trilencer-27 Mouse siRNA für NFATc2 # 18019 von OriGene (Set aus drei siRNA und einer „universal scrambled negative control siRNA“)

### **2.16.1 Bestimmung der Transfektionseffizienz**

Um die Effizienz der Transfektion von Mastzellen bei einer Transfektion mit einer siRNA zu bestimmen, wurde eine mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 488-markierte siRNA eingesetzt. Die BMMC wurden in ISCOVE gewaschen und auf  $3 \times 10^6$  Zellen/100 $\mu$ l eingestellt. 100 $\mu$ l der Zellsuspension wurden mit 1 $\mu$ M Alexa Fluor 488-gefärbter siRNA (AllStars Negative siRNA AF 488 (5nmol) von Qiagen # 1027284) in einem Endvolumen von 200 $\mu$ l ISCOVE vermischt. Nach Transfektion der Zellen mit dem Gene Pulser II (BioRad) bei einer Spannung von 290V und einer Kapazität von 600 $\mu$ F wurden die Zellen in 5ml warmes KL-MZF aufgenommen. Es folgte eine Ruhezeit von 2h im Brutschrank. Die Zellen wurden anschließend mit GM-Puffer gewaschen und in 250 $\mu$ l GM-Puffer aufgenommen.

Nachfolgend wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit der markierten siRNA versetzt, jedoch nicht transfiziert wurden.



**Abb. 10: Mastzellen zeigen eine gute Transfektionseffizienz.**

Mastzellen aus BALB/c wurden mittels Elektroporation mit einer Alexa Fluor 488-markierten siRNA transfiziert. Als Negativkontrolle dienten mit siRNA versetzte, nicht transfizierte BMMC. Zwei Stunden nach der Transfektion wurde die Transfektionseffizienz durchflusszytometrisch ermittelt. Aufgetragen ist die Fluoreszenzintensität des Farbstoffs Alexa Fluor 488 im Verhältnis zur Zellgröße (forward scatter). Die Darstellung ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Abb. 10 zeigt beispielhaft einen Nachweis der Transfektionseffizienz in BMMC aus BALB/c. Mit 87% transfizierten Zellen (Alexa Fluor 488-positive Zellen) zeigen BALB/c-Mastzellen eine gute Transfektionseffizienz. Auch die Mausstämme C57BL/6, *Nfatc1<sup>fl/fl</sup>* und *Nfatc1<sup>Δ/Δ</sup>* wurden auf diese Weise in ihrer Transfektionseffizienz überprüft und zeigen vergleichbare Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

## 2.17 Graphen und Statistik

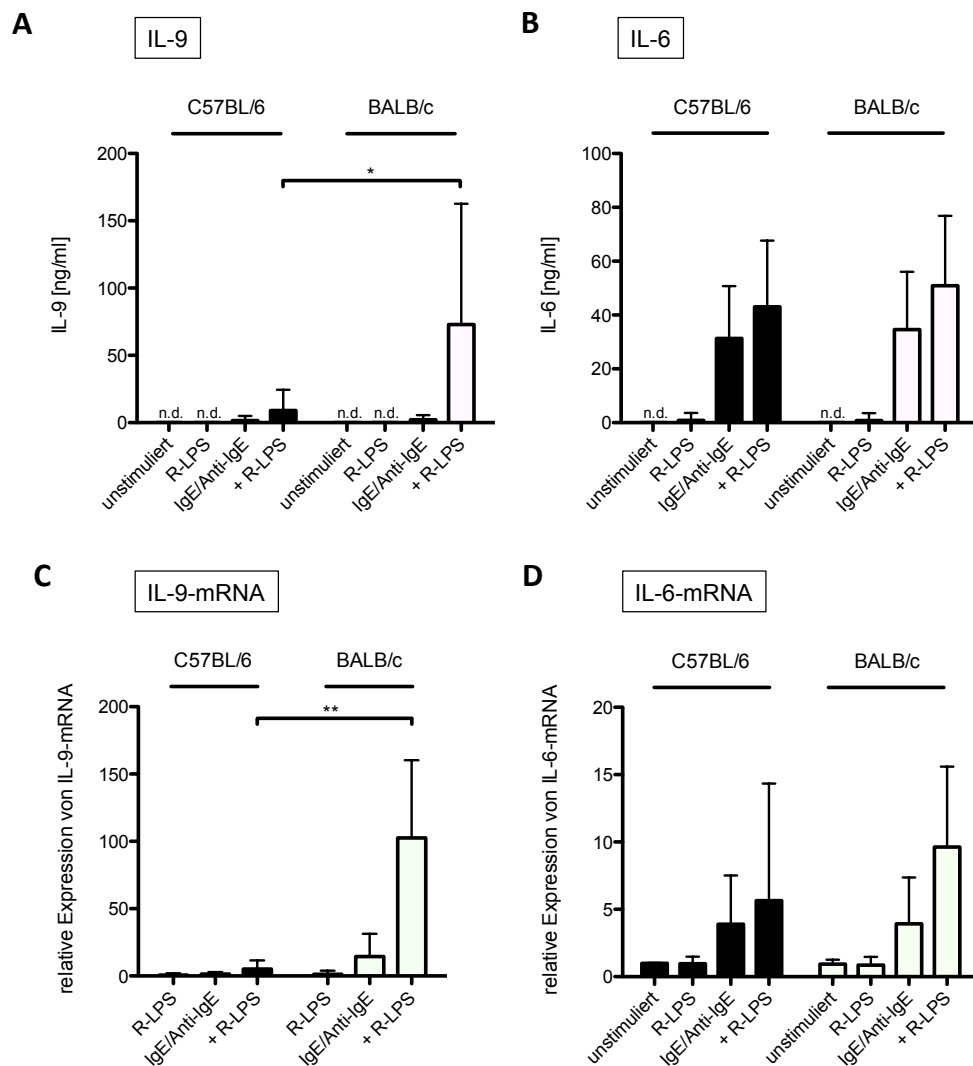
Die statistische Auswertung der Versuche erfolgte mit Hilfe des t-Testes durch das Programm GraphPad Prism 5.0a. Wahrscheinlichkeiten (p-Werte) wurden als signifikant gewertet, wenn  $p \leq 0,05$  ergab.

### 3 Ergebnisse

Die Resultate von Experimenten an Mäusen zeigen oft eine starke Abhängigkeit vom jeweiligen genetischen Hintergrund des Mausstammes. Die Mausstämme C57BL/6 und BALB/c zeigen Unterschiede hinsichtlich der Funktion der Mastzelle in der angeborenen und der adaptiven Immunantwort. Noguchi *et al.*, 2005 konnten nachweisen, dass Mastzellen aus beiden Mausstämmen nach Stimulation der IgE-beladenen Zellen mit einem Antigen Unterschiede bezüglich der Freisetzung von Mediatoren wie z. B. von Interleukin 5 zeigen [110]. Die auftretenden Differenzen können sich auch in der Verteilung der Mastzellzahlen im Gewebe widerspiegeln. So weisen BALB/c-Mäuse in einem Mausmodell für allergisches Asthma eine größere Anzahl an Lungenmastzellen im Gewebe auf, als die damit verglichenen C57BL/6-Mäuse [111]. Die Ergebnisse zeigen einen Stammunterschied der Mausstämme C57BL/6 und BALB/c hinsichtlich der Mastzellfunktion der Mäuse. Diese Differenzen können genutzt werden, um beispielsweise unterschiedliche Anfälligkeiten für allergische Reaktionen in den Mausstämmen zu induzieren.

#### 3.1 Verglichen mit BMMC aus C57BL/6-Mäusen zeigen BMMC aus BALB/c eine gesteigerte IL-9-Produktion

Ausgangspunkt für die folgenden Untersuchungen war die Beobachtung, dass BMMC aus BALB/c-Mäusen nach Stimulation mit IgE/Anti-IgE in Kombination mit dem Koaktivator R-LPS im Vergleich mit C57BL/6-Mäusen eine vermehrte IL-9-Produktion aufweisen. Es wurden IgE-aktivierte Mastzellen der Mausstämme C57BL/6 und BALB/c in An- oder Abwesenheit von LPS inkubiert. Nach Beendigung der Stimulation wurde die Konzentration von IL-9 in den Kulturüberständen mittels des ELISA-Verfahrens bestimmt. Zur Analyse der relativen Expression von IL-9-mRNA nach Präparation der cDNA wurde die qRT-PCR verwendet. Als Kontrolle diente jeweils das Cytokin IL-6.



**Abb. 11: BALB/c BMMC zeigen nach Stimulation mit IgE/Anti-IgE und R-LPS eine erhöhte IL-9-Produktion.** BMMC aus Mäusen der Stämme C57BL/6 und BALB/c wurden für 48h mit IgE (1µg/ml) präinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Anti-IgE (1µg/ml) ± R-LPS (200ng/ml) oder R-LPS alleine stimuliert. In den Kulturüberständen wurden die Konzentrationen der Cytokine **(A)** IL-9 nach 48h und **(B)** IL-6 nach 4h mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung in ng/ml (n = 15-42, \*p = 0,0159). Nach Ende der Stimulationszeit wurde die cDNA generiert und die relative Expression von **(C)** IL-9-mRNA nach 18h und **(D)** IL-6-mRNA nach 4h durch die qRT-PCR ermittelt. Als Referenzgen wurde das Haushaltsgen *hprt* (*Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase*) verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung (n = 5-14, \*\*p < 0,001).

Die IgE-Kreuzvernetzung induziert die Produktion der Cytokine IL-9 (siehe Abb. 11A, C) und IL-6 (siehe Abb. 11B, D), die bei den Mausstämmen C57BL/6 und BALB/c vergleichbar ausfällt. Das Lipopolysaccharid R-LPS wurde als Kostimulanz für die Cytokinproduktion in den Versuchen eingesetzt. R-LPS bewirkt bei C57BL/6 und BALB/c eine Erhöhung der IL-9- und IL-6-Cytokinproduktion. Die BMMC aus BALB/c zeigen bei Stimulation mit IgE/Anti-IgE in Kombination mit dem als Kofaktor dienenden R-LPS eine deutlich höhere Produktion von IL-9 als die ebenfalls untersuchten BMMC aus C57BL/6-Mäusen. Dies konnte sowohl auf Proteinebene als auch auf Ebene der cDNA nachgewiesen werden. Die alleinige Stimulation mit IgE/Anti-IgE zeigt jedoch keinen Unterschied. Da das Cytokin IL-6 keine

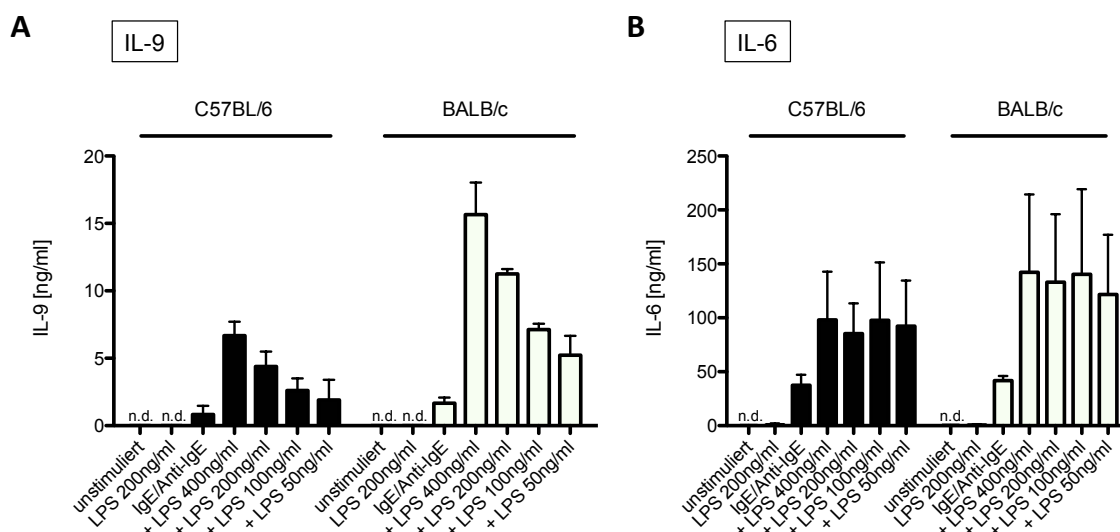
Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen Stämmen aufzeigt, wurde es für die nachfolgenden Experimente als Kontrolle verwendet.

### 3.1.1 Die Wirkung von Lipopolysaccharid auf murine BMMC

Lipopolysaccharide (LPS) bilden einen wichtigen Bestandteil der äußeren Membran der meisten gramnegativen Bakterien. Sie bestehen aus dem Lipid A, einem Kern aus Oligosacchariden und der O-spezifischen Polysaccharid-Kette. Diese Polysaccharid-Kette besteht aus sich wiederholenden Polysacchariden und fungiert als O-Antigen der Bakterien, weshalb sie auch als O-Polysaccharid bezeichnet wird.

Erkannt wird das LPS durch einen Rezeptorkomplex bestehend aus TLR-4 und MD-2<sup>24</sup> unter Zuhilfenahme des LPS-Bindeproteins und CD14<sup>25</sup> [37]. Nach Aktivierung der TLR-4-Signalkaskade kommt es zur NF- $\kappa$ B-abhängigen Produktion proinflammatorischer Cytokine [25].

Zur besseren Darstellung der Wirkung von LPS auf BMMC der Stämme C57BL/6 und BALB/c wurden mit Anti-IgE kreuzvernetzte BMMC mit verschiedenen hohen Dosen an LPS stimuliert. Anschließend erfolgte die Analyse der Kulturüberstände nach einer Stimulationszeit von 4h bzw. 48h mittels ELISA.



**Abb. 12: LPS zeigt als Kofaktor in BMMC aus BALB/c einen stärkeren Effekt auf die Synthese von IL-9 als in BMMC aus C57BL/6.**

Die generierten BMMC wurden für 48h mit IgE (1 $\mu$ g/ml) beladen. Im Anschluss daran erfolgte eine Stimulation der Zellen mit Anti-IgE (1 $\mu$ g/ml)  $\pm$  LPS oder LPS alleine in den angegebenen Konzentrationen. Mit Hilfe des ELISA wurden die Cytokinkonzentrationen in den Kulturüberständen ermittelt. Aufgetragen sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung in ng/ml von (A) IL-9 nach 48h und (B) IL-6 nach 4h (n = 3-6).

<sup>24</sup> MD-2:

myeloid differentiation protein 2

<sup>25</sup> CD14:

cluster of differentiation 14

Durch Zugabe des Koaktivators LPS zu IgE/Anti-IgE-stimulierten Proben ist eine Erhöhung der IL-9-Konzentration sichtbar. Jedoch reagieren BMMC aus BALB/c auf die Anwesenheit von LPS mit einer stärkeren Produktion von IL-9 als BMMC aus C57BL/6 es vermögen. Bei Abnahme der LPS-Menge von 400ng/ml auf 50ng/ml LPS ist eine verminderte IL-9-Produktion zu beobachten. Dieser Vorgang wird als Titrationseffekt bezeichnet (siehe Abb. 12A).

Bei IL-6 zeigt sich zwar eine erhöhte Produktion nach Zugabe von LPS zu den IgE/Anti-IgE-stimulierten Proben, jedoch ist dem verwendeten Konzentrationsbereich kein Titrationseffekt nachweisbar (siehe Abb. 12B).

### 3.1.2 Die R-Form von LPS als potenter Koaktivator von BMMC

Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien lassen sich in drei Formen unterteilen: die S-Form<sup>26</sup>, die R-Form<sup>27</sup> und die SR-Form<sup>28</sup>. Die S-Form besteht aus dem Lipid A, einer Kernregion aus Oligosacchariden und einer Kette aus sich wiederholenden Polysacchariden (O-Polysaccharid-Kette, O-Antigen). Bei der R-Form des LPS fehlt die O-Polysaccharid-Kette, während die SR-Form eine Kombination aus S- und R-Form darstellt (siehe Abb. 2) [24].

Das LPS-Bindeprotein interagiert mit LPS und transferiert dieses auf membrangebundenes oder freies CD14. Danach erfolgt der Transfer des LPS vom CD14 zum TLR-4/MD-2-Rezeptorkomplex. Die Verbindung von MD-2 mit dem Rezeptor TLR-4 ist ein notwendiger Schritt für die folgende Aktivierung der TLR-4-Rezeptorkaskade. Es entsteht ein ternärer Komplex bestehend aus TLR-4-Heterodimeren, MD-2 und LPS. Durch die Dimerisierung des Rezeptors kommt es zur Rekrutierung von Adaptermolekülen, wodurch die intrazelluläre Signalkette in Gang gerät [112].

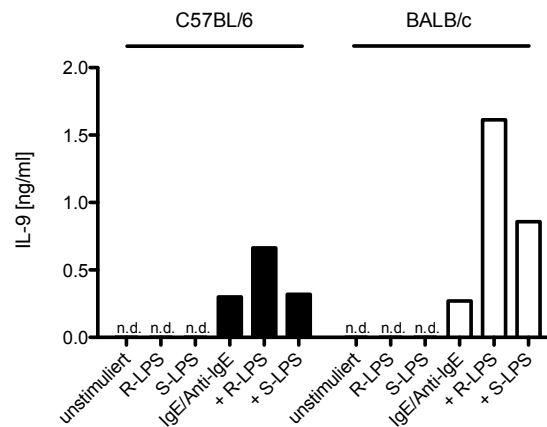
Bereits 2006 wurde publiziert, dass murine BMMC kein membrangebundenes CD14 (mCD14) exprimieren. Zur effektiven Aktivierung der Zellen benötigt die S-Form jedoch die Wirkung von mCD14 und dem LPS-Bindeprotein zusammen. Im Gegensatz dazu kann R-LPS die Zellen auch ohne vorhandenes mCD14 stimulieren. Somit ist R-LPS fähig, die BMMC stärker zu aktivieren als es S-LPS vermag [36], [113].

IgE-beladene Mastzellen wurden mit Anti-IgE und den beiden LPS-Chemotypen S- und R-LPS aktiviert, um Unterschiede in der Aktivierbarkeit der Zellen zu überprüfen. Die

---

<sup>26</sup> S-Form: smooth Form des LPS  
<sup>27</sup> R-Form: rough Form des LPS  
<sup>28</sup> SR-Form: semirough Form des LPS

Konzentrationen an IL-6 und IL-9 in den Überständen der Probenansätze wurden mittels ELISA analysiert. Für die *in vitro*-Stimulationen wurde gereinigtes S- und R-LPS aus *Salmonella abortus equi* oder aus *Salmonella minnesota* eingesetzt.



**Abb. 13: Mastzellen werden durch die R-Form des LPS stärker aktiviert.**

Die BMMC aus den Mausstämmen C57BL/6 und BALB/c wurden für 48h mit IgE (1µg/ml) präinkubiert. Danach wurden die Zellen mit Anti-IgE (1µg/ml) ± R-LPS (250ng/ml) oder S-LPS (250ng/ml) und mit R-LPS (1µg/ml) bzw. S-LPS (1µg/ml) alleine stimuliert. Nach der Stimulationsdauer wurde in den Kulturüberständen mittels ELISA die Konzentration von IL-9 nach 24h in ng/ml bestimmt.

Bei Aktivierung IgE-beladener Zellen mittels Anti-IgE bzw. durch LPS allein besteht zwischen den Stämmen kein Unterschied in der Expression von IL-9. Eine verstärkte Produktion von IL-9 ist erst nach Zugabe von LPS zu den mit Anti-IgE kreuzvernetzten Proben zu verzeichnen. Dies spricht dafür, dass die Verstärkung der IL-9-Bildung durch das zweite Signal, ausgelöst durch die Anwesenheit des Koaktivators LPS, zustande kommt. Weiterhin ist zu erkennen, dass bei Verwendung der R-Form eine höhere Produktion an IL-9 resultiert als bei Gebrauch von S-LPS (siehe Abb. 13). Dieses Ergebnis stützt die bereits publizierten Daten, dass murine BMMC stärker auf R-LPS reagieren.

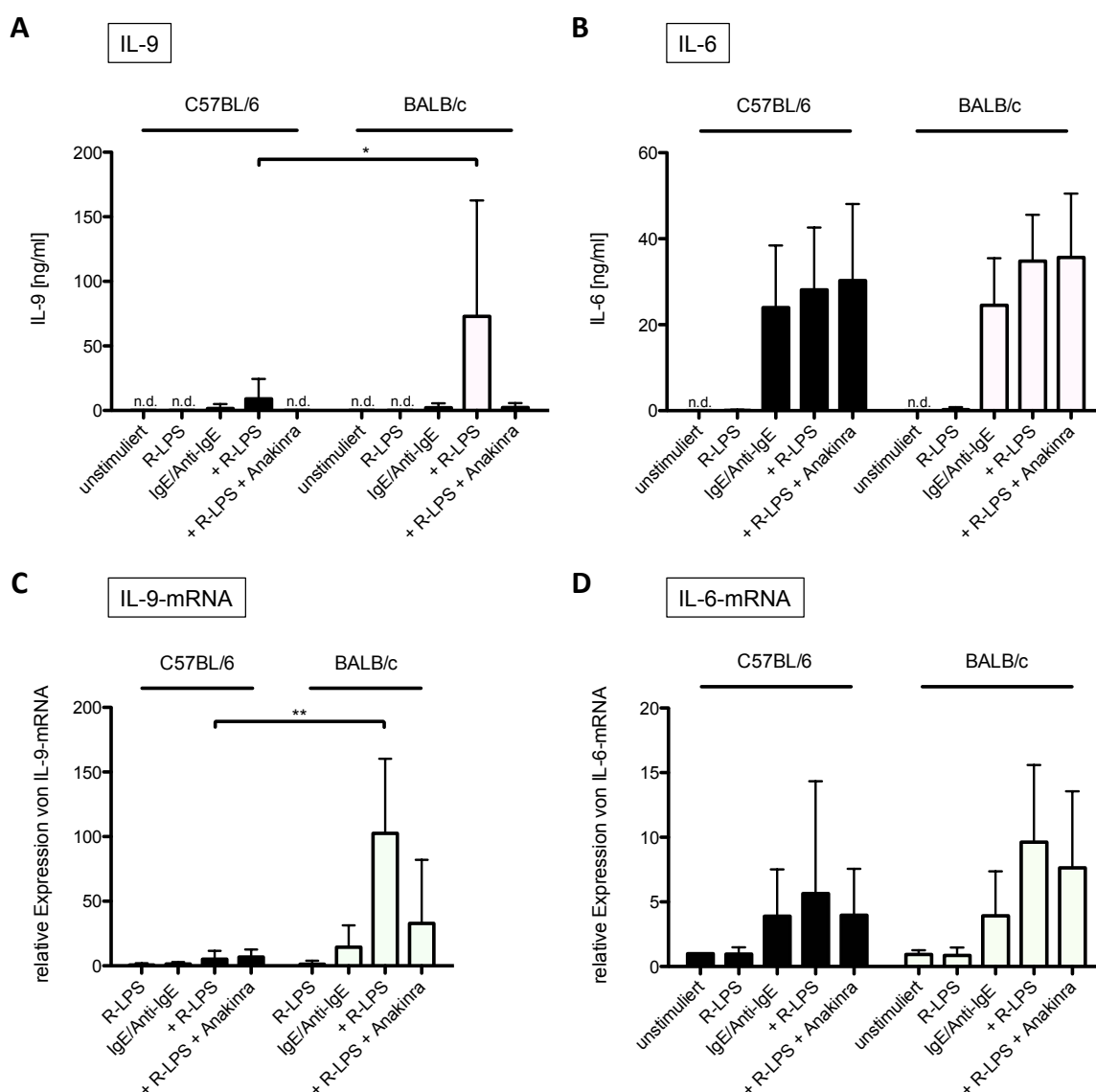
### 3.1.3 Blockade des IL-1-Rezeptors durch den IL-1-Rezeptorantagonisten Anakinra hemmt den Effekt von R-LPS auf die Produktion von IL-9

In vorangegangenen Publikationen konnte eine Abhängigkeit der IL-9-Produktion vom proinflammatorischen Cytokin IL-1 dokumentiert werden [48], [50], [51]. Bereits vor Jahren wurde IL-1 anhand seiner Eigenschaften als endogenes Pyrogen beschrieben [114]. IL-1 wird als Antwort auf verschiedene Stimuli, dazu zählen Bakterien, Viren und Cytokine, gebildet [115]. Da aktivierte BMMC den Botenstoff IL-1 produzieren können [116], sollte im

Weiteren abgeklärt werden, inwieweit sich eine Blockade von endogen produziertem IL-1 auf die IL-9-Bildung auswirkt.

Um eine Blockade der durch IL-1 ausgelösten Effekte herbeizuführen, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Zum einen könnte ein monoklonaler IL-1-Antikörper verwendet werden, der *de novo* synthetisiertes IL-1 abfängt. Es besteht zudem die Möglichkeit, einen IL-1-Rezeptorantagonisten (IL-1Ra) einzusetzen. Dieser bindet an den IL-1-Rezeptor (IL-1R) und verursacht eine kompetitive Hemmung des Rezeptors. In den Experimenten dieser Arbeit kam der rekombinante humane IL-1Ra Anakinra zur Anwendung. Anakinra ist identisch mit der natürlich vorkommenden nicht-glykosylierten Form des IL-1Ra, außer dass Anakinra ein N-terminales Methionin fehlt. Im Handel wird Anakinra unter dem Namen Kineret vertrieben und hat seinen klinischen Einsatz in der Behandlung von rheumatoider Arthritis, einer IL-1-dominierten Erkrankung. In klinischen Studien verlangsamt Anakinra signifikant das Fortschreiten dieser Erkrankung und reduziert sowohl den Knochenverschleiss als auch die Zerstörung von Knorpelsubstanz [117], [118], [119], [120].

Für die Experimente wurden die BMMC aus den Mausstämmen C57BL/6 und BALB/c in Gegenwart von Anakinra durch IgE-Kreuzvernetzung aktiviert. Als Kostimulator fungierte der bakterielle Zellwandbestandteil R-LPS. Nach der Stimulation wurden die Überstände mittels des ELISA-Verfahrens untersucht. Die gewonnene cDNA wurde in der qRT-PCR auf die mRNA-Expression von IL-9 und IL-6 analysiert. In Vorversuchen wurde eine Konzentration von 5ng/ml Anakinra als wirkungsvoll ermittelt (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 14: Der IL-1-Rezeptorantagonist Anakinra vermindert die Bildung von IL-9.**

Nach 48-stündiger Präinkubation mit IgE (1µg/ml) erfolgte eine Stimulation der BMMC mit Anti-IgE (1µg/ml) ± R-LPS (200ng/ml) ± Anakinra (5ng/ml) und R-LPS alleine. Mittels des ELISA-Verfahrens wurden die Konzentrationen von (A) IL-9 nach 48h oder (B) IL-6 nach 4h in den Kulturüberständen ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung in ng/ml (n = 4-21, \*p = 0,0159).

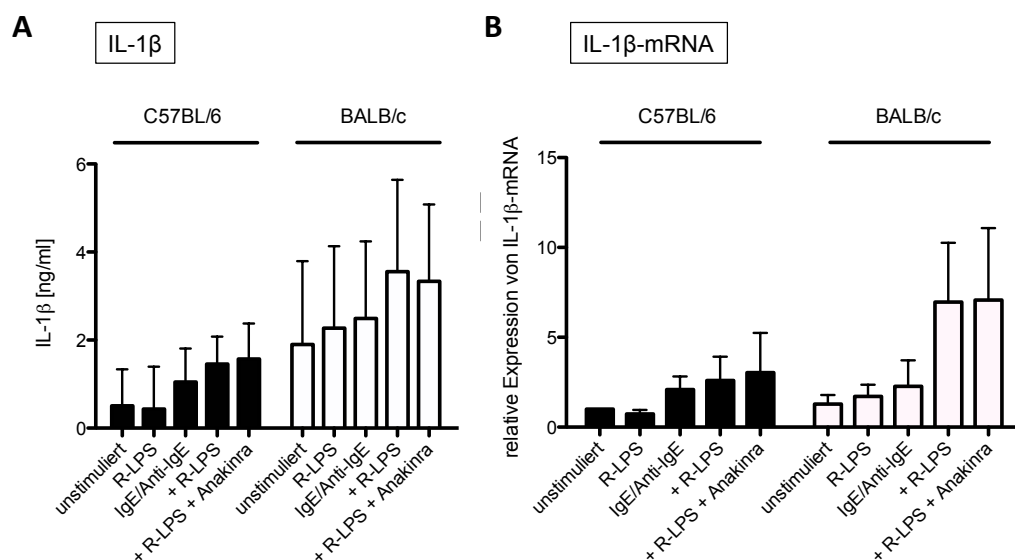
Die cDNA der Stimulationsansätze wurde generiert und anschließend in der qRT-PCR auf die relative Expression von (C) IL-9-mRNA nach 18h und (D) IL-6-mRNA nach 4h hin untersucht. Das Haushaltsgen *hgprt* wurde als Referenz verwendet. Aufgetragen wurden die Mittelwerte ± Standardabweichung von n = 3-14 (\*\*p < 0,001).

Anhand der Ergebnisse in Abb. 14 lässt sich eine Abnahme der IL-9-Konzentrationen in den mit Anakinra behandelten Proben zeigen (siehe Abb. 14A, C). Die Menge an IL-9 sinkt unter Einwirkung von Anakinra unter die durch Stimulation mit IgE/Anti-IgE provozierte Konzentration ab. Die IL-9-Produktion der zwei Mausstämme zeigt sich demzufolge sensitiv gegenüber der Wirkung von Anakinra. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der IL-1Ra Anakinra die durch das Kostimulanz R-LPS ausgelöste Verstärkung der IL-9-Expression bei beiden Mausstämmen blockieren kann. Jedoch weisen BMMC aus BALB/c eine stärkere

Reduktion der IL-9-Produktion als C57BL/6 auf. Anakinra zeigt keinen Einfluss auf die Expression des Cytokins IL-6 (siehe Abb. 14B, D).

### 3.1.4 BMCC aus BALB/c zeigen eine verstärkte IL-1 $\beta$ -Expression

BMCC aus BALB/c-Mäusen zeigen eine gesteigerte IL-9-Expression bei Stimulation der IgE-kreuzvernetzten Zellen mit dem Kofaktor R-LPS. Die Zugabe des IL-1Ra Anakinra wiederum verringert die IL-9-Produktion, was für eine IL-9-Expression in Abhängigkeit von endogen produziertem IL-1 spricht und im Folgenden geklärt werden sollte. Hierfür wurde die IL-1 $\beta$ -Expression in aktivierten BMCC mit einem spezifischen IL-1 $\beta$ -ELISA und in der qRT-PCR analysiert. Die Bestimmung der Konzentration an IL-1 $\beta$ -Protein erfolgte in Brefeldin A-behandelten Zellen, die anschließend durch Zugabe von Triton X-100 lysiert wurden. Brefeldin A ist ein Makrolid-Antibiotikum aus dem Pilz *Eupenicillium brefeldianum* [121] und sorgt für eine reversible Unterbrechung des Proteintransportes vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat. In der Zelle kommt es zur Akkumulation von Proteinen - in diesem Fall von IL-1 $\beta$  [122]. Die Brefeldin A-Behandlung war vonnöten, da es möglicherweise durch freigesetzte Mastzell-Proteasen zu einem Abbau des sezernierten Cytokins IL-1 $\beta$  kommt, wodurch der Nachweis des Proteins im Kulturüberstand nicht mehr möglich ist.



**Abb. 15: In BMCC aus BALB/c zeigt sich eine gesteigerte IL-1 $\beta$ -Synthese.**

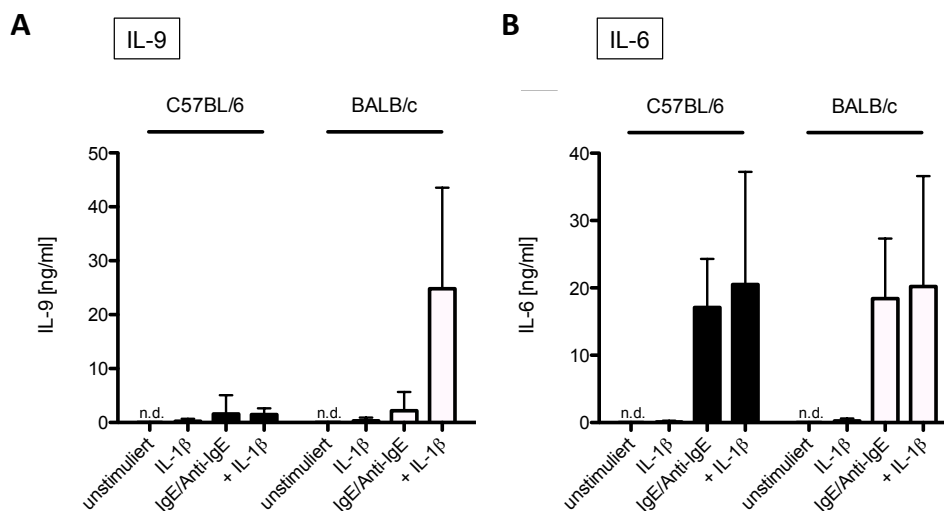
Im Anschluss an die 48-stündige Präinkubation der Mastzellen mit IgE (1 $\mu$ g/ml) folgte die Stimulation der Zellen mittels der Stimulanzen Anti-IgE (1 $\mu$ g/ml)  $\pm$  R-LPS (200ng/ml)  $\pm$  Anakinra (5ng/ml) oder R-LPS. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Proteinkonzentrationen von (A) IL- $\beta$  nach 20h in ng/ml (n = 3-5). Die Stimulationsansätze wurden jeweils für 4h mit Brefeldin A (1 $\mu$ g/ml) behandelt. Nach der Stimulation wurden Zelllysate der Ansätze erstellt und als Proben in den ELISA eingesetzt.

(B) Die cDNA der aktivierten BMCC wurde in der qRT-PCR auf die relative Expression der IL- $\beta$ -mRNA nach einer Stimulationsdauer von 18h untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von n = 4-9 Experimenten, normiert auf das Haushaltsgen *hgprt*.

Die endogene Bildung des Cytokins IL-1 $\beta$  in BMMC aus Mäusen des BALB/c-Stammes ist gegenüber C57BL/6 auf Protein- (siehe Abb. 15A) und auf mRNA-Ebene (siehe Abb. 15B) verstärkt. Durch den Kofaktor R-LPS zeigt sich eine Induktion der IL-1 $\beta$ -Expression bei beiden Populationen. Wird der IL-1-Signalweg durch Zugabe des IL-1Ra Anakinra gehemmt, zeigen sich keine Auswirkungen auf die IL-1 $\beta$ -Produktion in den BMMC. Somit gibt es keine Anzeichen für eine positive Rückkopplung der IL-1 $\beta$ -Produktion.

### 3.1.5 Exogenes IL-1 $\beta$ kann die IL-9-Bildung von BMMC aus C57BL/6 nicht steigern

In BALB/c zeigt sich eine verstärkte IL-9-Expression, die mit einer ebenso gesteigerten endogenen IL-1 $\beta$ -Produktion einhergeht. Es stellte sich daher die Frage, ob es in C57BL/6 durch Gabe von exogenem IL-1 $\beta$  zu einer Erhöhung der Expression von IL-9 kommen würde. Die BMMC wurden mit Anti-IgE kreuzvernetzt und mit IL-1 $\beta$  inkubiert. Anschließend erfolgte der Nachweis von IL-9 mittels ELISA. Das Cytokin IL-6 diente als Kontrolle.

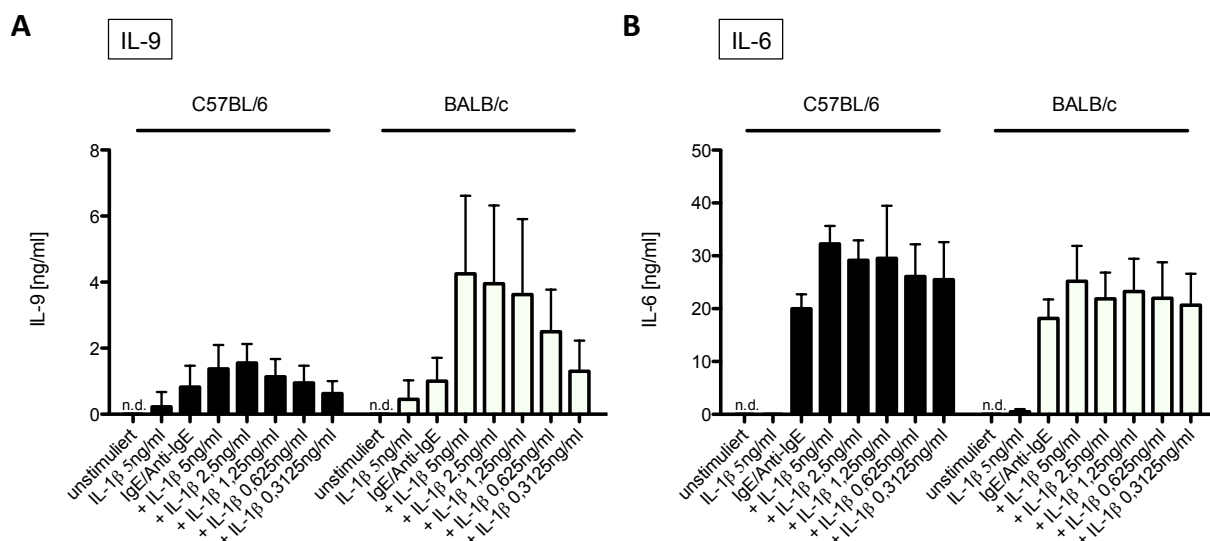


**Abb. 16: Mastzellen aus BALB/c zeigen eine stärkere Reaktion auf exogen zugeführtes IL-1 $\beta$  verglichen mit C57BL/6.**

Die mit IgE (1 $\mu$ g/ml) beladenen BMMC wurden mit Anti-IgE (1 $\mu$ g/ml)  $\pm$  IL-1 $\beta$  (5ng/ml) und IL-1 $\beta$  aktiviert. Mit Hilfe des ELISA-Verfahrens wurden **(A)** die IL-9-Konzentrationen nach 48h und **(B)** die IL-6-Konzentrationen nach 4h gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung in ng/ml (n = 3-27).

In IgE/Anti-IgE-aktivierten BMMC kommt es zur Freisetzung der Cytokine IL-6 und IL-9. Dieser Effekt verstärkt sich durch exogen zugeführtes IL-1 $\beta$ . Bei BMMC aus BALB/c zeigt sich durch Zugabe von IL-1 $\beta$  eine gesteigerte Expression von IL-9. Exogenes IL-1 $\beta$  kann die IL-9-Produktion in BMMC aus C57BL/6 kaum verstärken (siehe Abb. 16A). Beide Stämme bilden vergleichbare Mengen an IL-6 (siehe Abb. 16B).

Durch Titrationsversuche sollte der unterschiedliche Einfluss von exogen verabreichtem IL-1 $\beta$  auf die Mastzellen beider Mausstämme genauer untersucht werden. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an IL-1 $\beta$  aktiviert und der Gehalt an IL-9 bzw. IL-6 wurde in den Kulturüberständen durch das ELISA-Verfahren ermittelt.



**Abb. 17: In IgE/Anti-IgE-stimulierten BMMC kommt es durch IL-1 $\beta$  zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der IL-9-Produktion.**

Mit IgE (1 $\mu$ g/ml) beladene BMMC aus Mäusen der Stämme C57BL/6 und BALB/c wurden mit Anti-IgE (1 $\mu$ g/ml)  $\pm$  IL-1 $\beta$  und IL-1 $\beta$  in den angegebenen Konzentrationen stimuliert. Mittels ELISA wurden anschließend die Cytokine **(A)** IL-9 nach 48h und **(B)** IL-6 nach 24h Stimulation in den Kulturüberständen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung in ng/ml (n = 3-7).

Die Gabe des proinflammatorisch wirksamen Cytokins IL-1 $\beta$  bewirkt einen konzentrationsabhängigen Anstieg der IL-9-Proteinmenge. Vor allem BMMC aus dem Mausinzuchtstamm BALB/c zeigen sich sensibel gegenüber der Zufuhr von exogenem IL-1 $\beta$  (siehe Abb. 17A). Der Kofaktor IL-1 $\beta$  ruft bei C57BL/6 und BALB/c eine vergleichbare Menge an IL-6 hervor (siehe Abb. 17B).

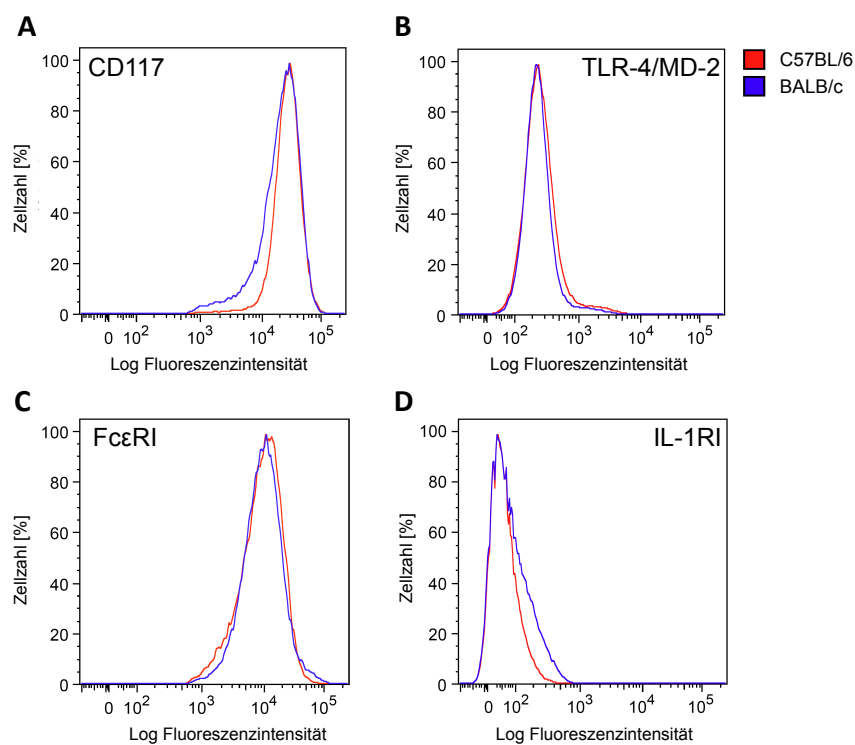
**Fazit:**

- BMMC aus BALB/c weisen nach Stimulation mit den Kofaktoren R-LPS oder IL-1 $\beta$  in IgE-kreuzvernetzten BMMC eine gesteigerte IL-9-Expression auf.
- Nach Blockade des IL-1-Signalweges durch Anakinra sinkt die Expression von IL-9.
- Die endogene IL-1 $\beta$ -Expression ist in BMMC aus BALB/c im Vergleich zu C57BL/6 erhöht.
- Durch Zufuhr von exogenem IL-1 $\beta$  kann die IL-9-Produktion in C57BL/6 nicht kompensiert werden.

### 3.1.6 Vergleich der Expression von Oberflächenrezeptoren in der Durchflusszytometrie

Um zu untersuchen, ob die unterschiedliche Responsibilität der Mastzellen aus den beiden Mausstämmen auf Unterschiede in der Expression der beteiligten Rezeptoren zurückzuführen ist, wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt.

Ruhende Mastzellen wurden mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern angefärbt und in der Durchflusszytometrie betrachtet. Mittels der durchflusszytometrischen Untersuchung wurden BMMC auf die Expression des hochaffinen IgE-Rezeptors untersucht. Weiterhin wurde CD117, der Rezeptor für den Kit-Liganden oder auch Stammzellfaktor, analysiert. Mit Hilfe der Antikörper konnten ebenfalls die Oberflächenrezeptoren für LPS und IL-1 $\beta$ , TLR-4/MD-2<sup>29</sup> und der IL-1-Rezeptor Typ I (IL-1RI) angefärbt werden.



**Abb. 18: C57BL/6 und BALB/c BMMC zeigen keine Unterschiede in der Expression wichtiger Rezeptoren.** Nach vierwöchiger Kultur wurden ruhende BMMC der Stämme C57BL/6 und BALB/c durchflusszytometrisch auf die Expression von (A) CD117, (B) TLR-4/MD-2, (C) FcεRI und (D) des IL-1RI untersucht. Für die Versuche wurden spezifische Fluoreszenz-markierte Antikörper (Anti-CD117-APC, Anti-TLR-4/MD-2-PE, Anti-FcεRI-PE, Anti-IL-1RI-APC) verwendet. Gezeigt sind logarithmische Darstellungen der Fluoreszenzintensitäten im Verhältnis zu den aufgenommenen Zellzahlen (% des Maximums).

<sup>29</sup> MyD88:

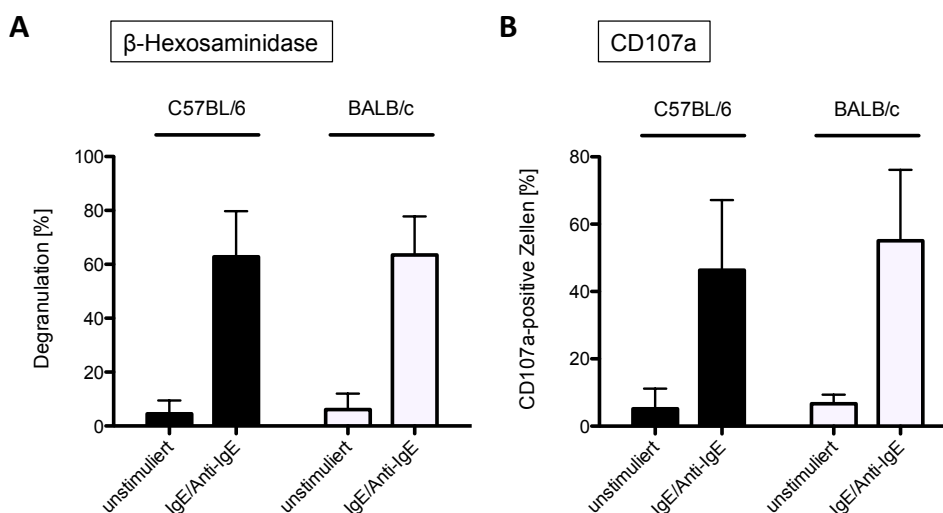
myeloid differentiation primary response gene 88

In Abb. 18 sind die Daten der durchflusszytometrischen Analyse der Rezeptorexpression dargestellt. Es zeigen sich bei allen untersuchten Rezeptoren ähnliche Expressionsmuster. Folglich lassen sich keine Stamm-spezifischen Unterschiede zwischen C57BL/6 und BALB/c feststellen (siehe Abb. 18). Die Erhöhung der IL-9-Produktion in BALB/c wird daher nicht durch ein verändertes Rezeptorvorkommen beeinflusst.

### **3.1.7 Mastzellen aus beiden Mausstämmen zeigen keine Unterschiede in ihrer Fähigkeit zur Degranulation**

Zur Kontrolle der Funktionalität der Mastzellen wurde im folgenden Schritt die Degranulation geprüft. Hierfür wurde das Ausmaß der Degranulation indirekt über die Messung einer Farbreaktion, katalysiert durch das bei der Degranulation freigesetzte Enzym  $\beta$ -Hexosaminidase, ermittelt. Die Zellen wurden nach einer Präinkubation mit IgE über eine Anti-IgE-vermittelte Kreuzvernetzung aktiviert. Anhand einer speziellen Formel (siehe 2.12) wurde die Degranulation in Prozent berechnet. Ein spezifischer Farbstoff-gekoppelter Antikörper gegen das Lysosomen-assoziierte Membranprotein 1 (LAMP-1, CD107a) wurde als unabhängiger Nachweis der Degranulation in der Durchflusszytometrie eingesetzt.

LAMP-1 stellt neben LAMP-2 (CD107b) eine Hauptkomponente der lysosomalen Proteinmembran dar. In ruhenden Zellen befindet sich CD107a auf der Innenseite der Granula. Kommt es zur Aktivierung der Mastzellen und damit zur Degranulation, fusionieren die Membranen der Granula mit der Plasmamembran. CD107a wird auf die Aussenseite der Plasmamembran transportiert und kann durchflusszytometrisch nachgewiesen werden [123].



**Abb. 19: Die Mastzellen beider Mausstämme zeigen keine Unterschiede in ihrer Fähigkeit zur Degranulation.**

Mit IgE (1  $\mu$ g/ml) beladene BMMC wurden für 30min mit Anti-IgE (1  $\mu$ g/ml) stimuliert. **(A)** Mittels einer Farbreaktion wurde die Aktivität des Enzyms  $\beta$ -Hexosaminidase in den Stimulationsansätzen gemessen. Das Ausmaß der Degranulation wurde mit einer speziellen Formel berechnet und als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung in Prozent angegeben (n = 5). [Extinktion (Überstand) / [Extinktion (Überstand) + Extinktion (Lysat)]  $\times$  100%

**(B)** Die Zellen wurden mit Anti-CD107a-APC angefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Die Graphik zeigt den prozentualen Anteil CD107a-positiver Zellen in den einzelnen Ansätzen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung in Prozent (n = 5).

Sowohl mittels der Farbreaktion (siehe Abb. 19A), als auch durch die Fluoreszenz-Markierung (siehe Abb. 19B) konnten keine differierenden Werte der Degranulation zwischen den beiden BMMC-Populationen gemessen werden.

### 3.1.8 Analyse der Expression einzelner Mitglieder der IL-1R/TLR-4-Signalkaskade

Durch Zugabe von IL-1 $\beta$  oder des TLR-4-Liganden R-LPS konnte ein Stamm-spezifischer Anstieg der IL-9-Produktion in BMMC aus BALB/c-Mäusen gezeigt werden. Durchflusszytometrisch stellten sich keine Unterschiede in der Expression des TLR-4/MD-2 oder des IL-1RI dar. Infolgedessen wurden im nächsten Schritt die Expressionen einzelner Mitglieder der IL-1R/TLR-4-Signaltransduktion genauer betrachtet.

Der TLR-4-Signalweg kann in zwei Wege unterteilt werden: der MyD88-abhängige<sup>30</sup> und der MyD88-unabhängige Weg. Durch den MyD88-abhängigen Pfad kommt es zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1<sup>31</sup>, wodurch nachfolgend die Expression proinflammatorischer Cytokine induziert wird. Der MyD88-unabhängige Weg wird durch die

<sup>30</sup> MyD88:

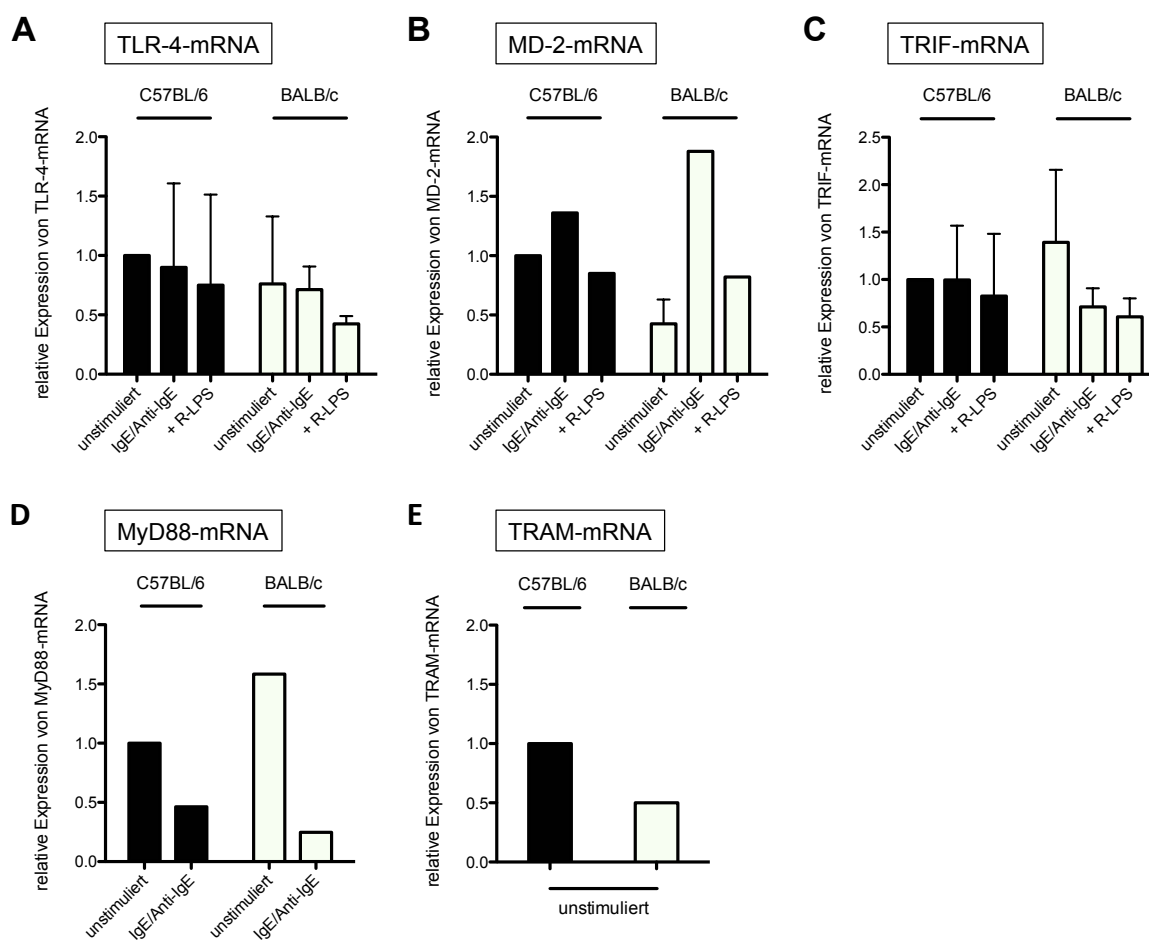
myeloid differentiation primary response gene 88

<sup>31</sup> AP-1:

activator protein 1

Adapterproteine TRIF<sup>32</sup> und TRAM<sup>33</sup> (TRIF/TRAM-Weg) vermittelt und führt zur Aktivierung von IRF-3<sup>34</sup>, vermittelt durch die Typ I Interferone INF- $\alpha$  und INF- $\beta$  [23]. Allerdings konnte in murinen Mastzellen lediglich der MyD88-abhängige Aktivierungsweg nachgewiesen werden [38].

Die cDNA von ruhenden bzw. aktivierten BMMC wurde in der qRT-PCR auf die mRNA-Expression der Signalmoleküle MD-2, TRIF, MyD88 und TRAM analysiert. Zudem wurde zusätzlich die Expression der TLR-4-mRNA bestimmt.



**Abb. 20: Zwischen den Mausstämmen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression wichtiger Signalmoleküle des IL-1R/TLR-4-Rezeptorsignalweges.**

Nach einer Präinkubation mit IgE (1  $\mu$ g/ml) für 48h wurden BMMC aus C57BL/6 und BALB/c mit Anti-IgE (1  $\mu$ g/ml)  $\pm$  R-LPS (200ng/ml) für 24h aktiviert oder ruhend belassen. Daraufhin wurde die cDNA präpariert und die Expression von (A) TLR-4-mRNA, (B) MD-2-mRNA, (C) TRIF-mRNA, (D) MyD88-mRNA und von (E) TRAM-mRNA in der qRT-PCR bestimmt. Zur Normierung wurde das Haushaltsgen *hprt* eingesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (n = 2-4).

<sup>32</sup> TRIF: TIR-domain containing adaptor-inducing interferon  $\beta$   
<sup>33</sup> TRAM: TRIF-related adaptor molecule  
<sup>34</sup> IRF-3: interferon regulatory factor 3

Die Mastzellen aus C57BL/6 und BALB/c weisen eine vergleichbare Expression der einzelnen Signalmoleküle der MyD88-abhängigen TLR-4-Signalkaskade auf (siehe Abb. 20). Somit gibt es keine Hinweise für eine veränderte Signalweiterleitung in den beiden Populationen.

Fazit:

- Beide Mausstämme zeigen keine Unterschiede bezüglich der Rezeptorexpression von CD117, TLR-4/MD-2, FcεRI und IL-1RI.
- Die Degranulation zeigt keine Beeinträchtigung.
- Die Analyse der IL-1R/TLR-4-Signalkaskade ergab keine Unterschiede in der Expression der Signalmoleküle TLR-4, MD-2, TRIF, MyD88 und TRAM.

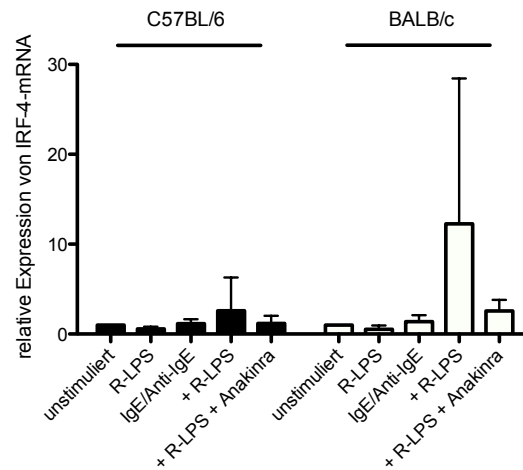
→ Variierende Expressionsniveaus von Rezeptoren oder Signalmolekülen des IL-1R/TLR-4-Signalweges sind ursächlich nicht an der verstärkten IL-9-Expression beteiligt. Daher wurde auf Ebene der Transkriptionsfaktoren nach einem Unterschied zwischen Mastzellen aus C57BL/6- und BALB/c-Mäusen gesucht.

### 3.1.9 Die differentielle Expression des Transkriptionsfaktors

#### interferon regulatory factor 4 beeinflusst die IL-9-Produktion

Die Familie der interferon regulatory factors (IRF) besteht aus neun Mitgliedern, IRF-1 bis IRF-9. Funktionell handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, die eine wichtige Rolle in der Regulation der angeborenen und adaptiven Immunantwort einnehmen [124]. Die Expression der IRF ist dabei auf Zellen des Immunsystems wie Lymphozyten, Dendritische Zellen und Makrophagen beschränkt [125].

In einer bereits publizierten Studie konnte gezeigt werden, dass IRF-4 an den *il-9*-Promotor in CD4<sup>+</sup> Th9-Zellen bindet und wichtig für die IL-9-Produktion dieser Zellen ist [126]. Deshalb sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob IRF-4 auch an der Expression von IL-9 in Mastzellen beteiligt ist. Zunächst wurde die mRNA-Expression von IRF-4 in IgE-aktivierten Mastzellen der Stämme C57BL/6 und BALB/c verglichen.

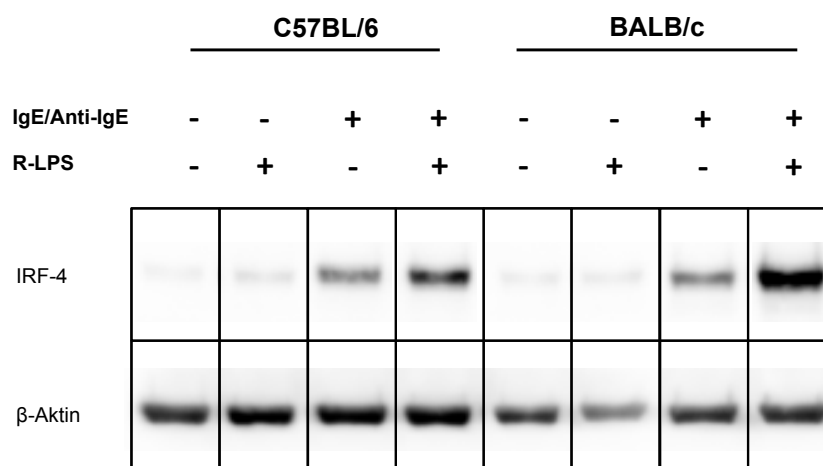


**Abb. 21: Die Expression der IRF-4-mRNA ist abhängig von endogenem IL-1 $\beta$  und verstärkt in Mastzellen aus BALB/c-Mäusen.**

An die 48-stündige Beladung der Mastzellen mit IgE (1 $\mu$ g/ml) schloss sich eine Stimulation der Zellen mit Anti-IgE (1 $\mu$ g/ml)  $\pm$  R-LPS (200ng/ml)  $\pm$  Anakinra (5ng/ml) und R-LPS alleine an. Nach Synthese der cDNA erfolgte die Bestimmung der Expression von IRF-4-mRNA mittels qRT-PCR, normiert auf die Expression des Gens *hgprt*. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung nach einer Stimulationsdauer von 18h (n = 3-6).

In BALB/c-Mastzellen zeigt sich eine höhere Expression von IRF-4-mRNA nach Aktivierung der Zellen mit IgE/Anti-IgE und dem Kofaktor R-LPS im Vergleich zu Mastzellen aus C57BL/6-Mäusen. Es fällt auf, dass sich durch Verwendung des IL-1Ra Anakinra die IRF-4-mRNA-Produktion bei beiden Stämmen reduziert (siehe Abb. 21). Die erhaltenen Ergebnisse legen eine Abhängigkeit der IRF-4-Regulation durch endogenes IL-1 $\beta$  nahe.

Im nächsten Schritt wurde die Bildung von IRF-4 auf Proteinebene untersucht. Nach Stimulation der BMMC folgte die Protein-Präparation. 15 $\mu$ g des gewonnenen Gesamtproteins wurden im Western Blot eingesetzt. Der chemilumineszente Nachweis fand mittels eines spezifischen Anti-IRF-4-Antikörpers statt. Das Strukturprotein  $\beta$ -Aktin wurde als interne Referenz der aufgetragenen Proteinmengen angefärbt.



**Abb. 22: Verstärkte Expression von IRF-4 in BMMC aus BALB/c.**

Auf die Präinkubation der BMMC aus Mäusen der Stämme C57BL/6 und BALB/c mit IgE (1 µg/ml, 48h) folgte eine Stimulation der Zellen für 18h. Als Stimulanzien wurden Anti-IgE (1 µg/ml) ± R-LPS (200ng/ml) oder R-LPS alleine verwendet. Aus den Zellen wurde Gesamtprotein gewonnen und mittels Western Blot (15 µg Protein) analysiert. Die Anfärbung von IRF-4 erfolgte mit einem spezifischen Anti-IRF-4-Antikörper durch Chemilumineszenz. Als Beladungskontrolle diente β-Aktin. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten.

Die Daten des Western Blots spiegeln die Ergebnisse der qRT-PCR wider (siehe Abb. 22). IgE-kreuzvernetzte Mastzellen aus dem Mausstamm BALB/c bilden nach Stimulation mit R-LPS mehr IRF-4 als C57BL/6. In ruhenden bzw. ausschließlich mit R-LPS aktivierten BMMC ist hingegen nur eine sehr geringe Proteinproduktion nachweisbar.

Somit konnte für die Mastzellen aus BALB/c eine mit der gesteigerten IL-9-Produktion einhergehende Überexpression von IRF-4 gezeigt werden. Diese gesteigerte IRF-4-Bildung scheint eine Abhängigkeit von IL-1β zu besitzen, da es in Gegenwart des IL-1Ra Anakinra zu einer verminderten Expression von IRF-4 kommt. Im Folgenden wurde untersucht, ob die IRF-4-Expression in BMMC Einfluss auf die Produktion von IL-9 hat. Als Methode der Wahl wurde der „Knockdown“ der mRNA durch den Einsatz von siRNA<sup>35</sup> gewählt.

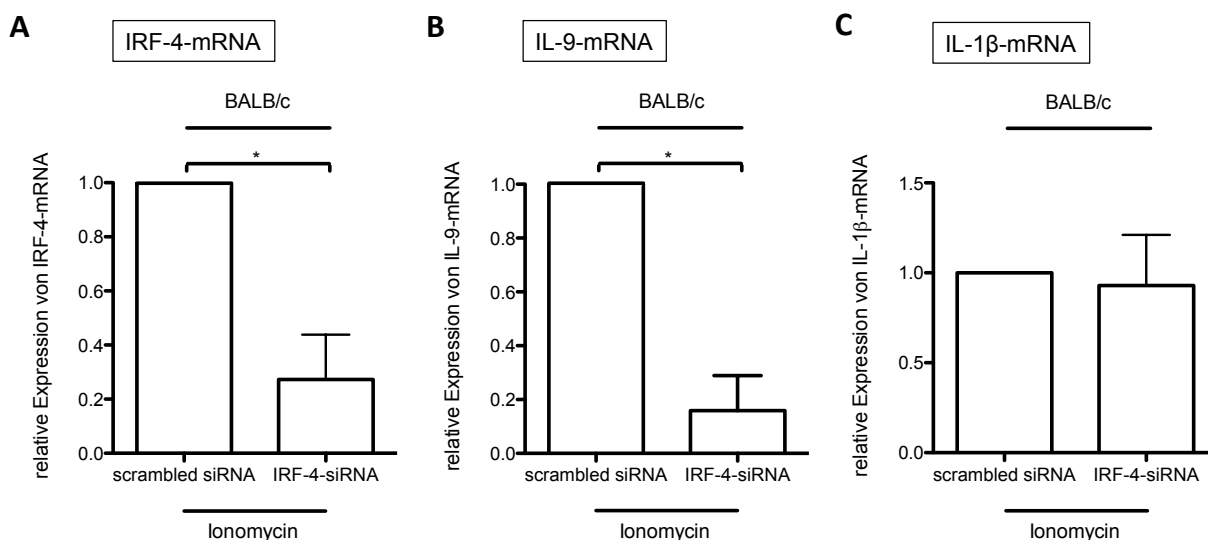
### 3.1.10 Der siRNA-vermittelte „Knockdown“ von IRF-4 beeinträchtigt die Produktion von IL-9

Im Folgenden wurde die Genexpression von *irf-4* auf Ebene der RNA durch die Verwendung von RNA-Interferenz vorübergehend unterbunden. Dabei wird eine siRNA in die Zellen eingeschleust und es kommt zur Sequenz-spezifischen Stilllegung (posttranskriptionelles Gen-Silencing) eines Gens auf mRNA-Ebene [108].

<sup>35</sup> siRNA:

small interfering RNA

Ruhende Mastzellen wurden mit einer spezifischen IRF-4-siRNA (siRNA 1 aus [109]) transfiziert. Zur Kontrolle fand eine Transfektion mit „scrambled negative control siRNA“ statt. Nach 24h Ruhezeit wurden die transfizierten BMMC mit Ionomycin aktiviert. Die Analyse der cDNA erfolgte mittels qRT-PCR. Die RNA des Haushaltsgens *hgprt*<sup>36</sup> wurde zur Normalisierung herangezogen. Die Effizienz der Transfektion wurde durch eine Fluoreszenz-markierte siRNA überprüft (siehe 2.16.1).



**Abb. 23: Der „Knockdown“ von IRF-4 bewirkt eine Verminderung der IL-9-mRNA-Expression.**

BMMC aus BALB/c wurden mit einer spezifischen IRF-4-siRNA oder „scrambled negative control siRNA“ transfiziert. Nach 24h wurden die Zellen mit Ionomycin (1μM) für 18h stimuliert. Die cDNA wurde auf die relative Expression von (A) IRF-4-mRNA, (B) IL-9-mRNA und (C) IL-1β-mRNA mittels qRT-PCR analysiert. Die Expressionsdaten wurden mit Hilfe der RNA des Haushaltsgens *hgprt* normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung (n = 8-18, \*p < 0,001).

Der transiente „Knockdown“ von IRF-4 (siehe Abb. 23A) hat eine signifikante Reduktion der relativen Expression von IL-9-mRNA bei BALB/c BMMC zur Folge (siehe Abb. 23B). Die ebenfalls untersuchte mRNA des *il-1β*-Gens zeigt keine Veränderungen (siehe Abb. 23C).

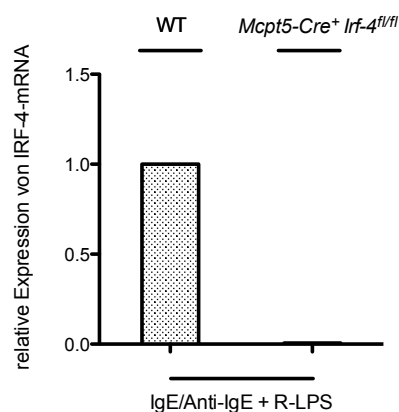
Mit Hilfe der „Knockdown-Versuche“ konnte eine Abhängigkeit der IL-9-Produktion von dem Transkriptionsfaktor IRF-4 in Mastzellen beschrieben werden. Jedoch kommt es nach „IRF-4-Knockdown“ nicht zu einer verringerten Expression von IL-1β, was für eine direkte Wirkung von IRF-4 auf die IL-9-Produktion spricht.

<sup>36</sup> *hgprt*:

*Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase*

### 3.1.11 Die Mastzell-spezifische Defizienz des Transkriptionsfaktors IRF-4.

Die Resultate der vorangegangenen Versuche dokumentieren eine IRF-4-Überexpression in Mastzellen aus BALB/c, die zu einer gesteigerten IL-9-Produktion nach Stimulation mit R-LPS in aktivierten BMMC führt. Im Laufe der vorliegenden Arbeit ergab sich die Möglichkeit, die durch Einsatz von siRNA erhaltenen Resultate mit Hilfe gentechnisch veränderter Mäuse zu überprüfen. Hierfür konnten Mäuse mit einer Mastzell-spezifischen IRF-4-Defizienz verwendet werden. Zur Generierung dieser Mäuse wurde der Mausstamm *Mcpt5-Cre* auf C57BL/6-Hintergrund mit *Irf-4<sup>fl/fl</sup>*-Mäusen verpaart. Die *Mcpt5-Cre*-Mäuse besitzen ein Gen für die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des *Mastzellprotease (Mcpt) 5*-Promotors [95]. *Mcpt5* wird vorwiegend in Bindegewebsmastzellen exprimiert, konnte jedoch auch in BMMC nachgewiesen werden. Bei den *Irf-4<sup>fl/fl</sup>*-Mäusen wurde das *irf-4*-Gen stromaufwärts der Promotorregion und stromabwärts des Transkriptionsstartpunktes im zweiten Exon mit loxP-Erkennungssequenzen markiert. Durch gezieltes Herausschneiden der loxP-Signalsequenzen durch die Cre-Rekombinase kann anschließend in den Bindegewebsmastzellen kein funktionales IRF-4 mehr gebildet werden [127]. Die aus der Verpaarung erhaltenen *Mcpt5-Cre<sup>+</sup> Irf-4<sup>fl/fl</sup>*-Mäuse haben daher eine IRF-4-Defizienz in den generierten BMMC.

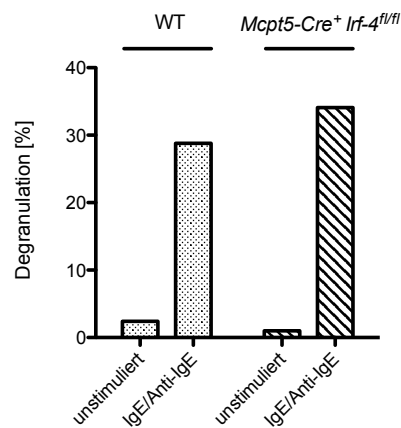


**Abb. 24: BMMC aus *Mcpt5-Cre<sup>+</sup> Irf-4<sup>fl/fl</sup>*-Mäusen weisen eine Defizienz des Transkriptionsfaktors IRF-4 auf.** Auf eine Präinkubation der Mastzellen mit IgE (1µg/ml) folgte eine Stimulation der Zellen mit Anti-IgE (1µg/ml) und R-LPS (200ng/ml). An die Stimulation schloss sich die Synthese der cDNA an. Die generierte cDNA wurde in der qRT-PCR auf die relative Expression von IRF-4-mRNA nach einer Stimulationsdauer von 18h untersucht. Als Referenzgen wurde das Haushaltsgen *hprt* verwendet.

Abb. 24 zeigt den vollständigen Verlust des Transkriptionsfaktors IRF-4 in aktivierten Mastzellen, ermittelt anhand der relativen Expression von IRF-4-mRNA in aktivierten BMMC durch die qRT-PCR.

### 3.1.12 Die Defizienz des Transkriptionsfaktors IRF-4 wirkt sich nicht auf die Fähigkeit zur Degranulation aus.

Durch die eingebrachten loxP-Sequenzen kommt es nach Expression der Cre-Rekombinase zu einer Defizienz des Transkriptionsfaktors IRF-4 in Mastzellen (siehe Abb. 24). Um zu überprüfen, ob sich der Verlust von IRF-4 negativ auf die Degranulation der Mastzellen auswirkt, wurden diese für 30min mit IgE/Anti-IgE stimuliert.

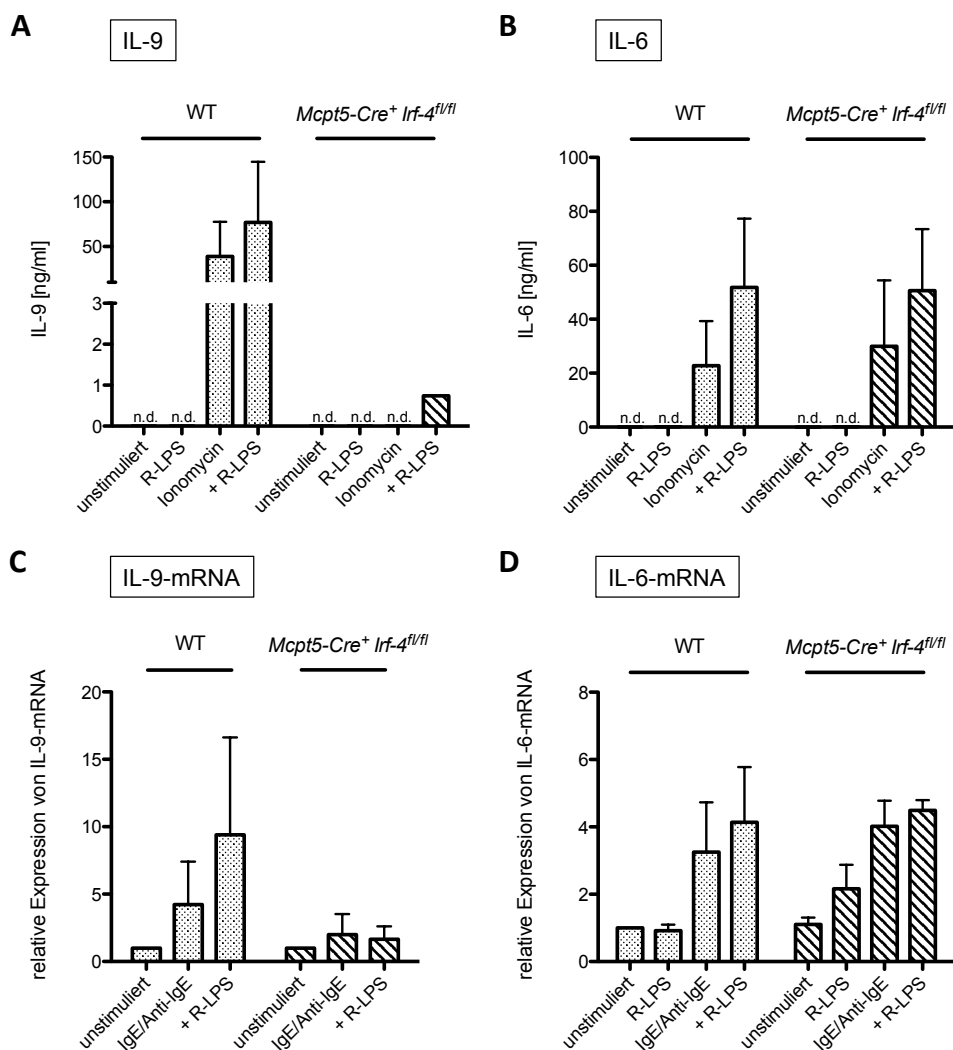


**Abb. 25: Die Mastzell-spezifische IRF-4-Defizienz hat keinen Einfluss auf die Degranulation.** Präinkubierte BMMC (IgE 1µg/ml, 48h) wurden für 30min mit Anti-IgE (1µg/ml) stimuliert. Anschließend wurde in den Stimulationsansätzen mittels Farbreaktion die Aktivität des Enzyms β-Hexosaminidase gemessen. Die Graphik zeigt die Anzahl an degranulierten Zellen in Prozent. Das Ausmaß der Degranulation wurde mit folgender Formel berechnet: (Extinktion (Überstand) / [Extinktion (Überstand) + Extinktion (Lysat)] x 100%).

Es können keine Unterschiede in der Degranulation ausgemacht werden (siehe Abb. 25). Die Mastzellen aus den *Mcpt5-Cre<sup>+</sup> Irf-4<sup>fl/fl</sup>*-Mäusen zeigen somit keine Mängel in ihrer Fähigkeit zu degranulieren.

### 3.1.13 Durch die Defizienz von IRF-4 verringert sich die IL-9-Produktion

Als nächstes wurde die Auswirkung der genetischen IRF-4-Defizienz auf die IL-9-Expression bestimmt. Kulturüberstände bzw. cDNA stimulierter Mastzellen wurden hierfür sowohl mittels ELISA als auch in der qRT-PCR untersucht.



**Abb. 26: Der Transkriptionsfaktor IRF-4 ist wichtig für die IL-9-Produktion.**

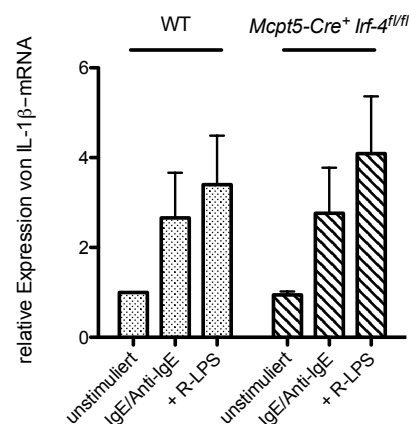
Mastzellen aus *Mcpt5-Cre<sup>+</sup> Irf-4<sup>fl/fl</sup>* und aus dem Wildtyp wurden mit Ionomyacin (1  $\mu$ M)  $\pm$  R-LPS (200ng/ml) und R-LPS alleine aktiviert. In den Kulturüberständen der Stimulationsansätze wurden die Konzentrationen der Cytokine **(A)** IL-9 nach 48h und **(B)** IL-6 nach 4h mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung in ng/ml (n = 2-3).

Die Mastzellen wurden für 48h mit IgE (1  $\mu$ g/ml) präinkubiert und danach mit Anti-IgE (1  $\mu$ g/ml)  $\pm$  R-LPS (200ng/ml) oder R-LPS stimuliert. Nach der cDNA-Präparation erfolgte die Bestimmung der relativen Expression von **(C)** IL-9-mRNA nach 18h und **(D)** IL-6-mRNA nach 4h in der qRT-PCR. Die Normierung der Daten erfolgte anhand des Haushaltsgens *hgprt*. Die Graphik zeigt die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von n = 2-3 Experimenten.

Die Ergebnisse in Abb. 26A und C zeigen eine Verminderung der IL-9-Expression in IRF-4-defizienten BMMC. Im ELISA kann nur nach Kostimulation mit R-LPS noch eine geringe IL-9-Bildung nachgewiesen werden (siehe Abb. 26A), während die IL-6-Produktion sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene nicht beeinflusst wird (siehe Abb. 26B, D).

### 3.1.14 Die Mastzell-spezifische IRF-4-Defizienz zeigt keinen Einfluss auf die Bildung von IL-1 $\beta$ -mRNA

Abschließend erfolgte die Analyse der IL-1 $\beta$ -mRNA in den verwendeten IRF-4-defizienten Mastzellen nach Aktivierung mit IgE/Anti-IgE in Verbindung mit dem Kostimulanz R-LPS mittels qRT-PCR.



**Abb. 27: Die Defizienz des Transkriptionsfaktors IRF-4 wirkt sich nicht auf die Expression von IL-1 $\beta$  aus.** Die BMMC wurden für 48h mit IgE (1 $\mu$ g/ml) präinkubiert. Hiernach schloss sich eine Aktivierung der Mastzellen mit Anti-IgE (1 $\mu$ g/ml)  $\pm$  R-LPS (200ng/ml) an. Nach Ende der Stimulationszeit wurde die cDNA generiert und die relative Expression von IL-1 $\beta$ -mRNA nach 18h per qRT-PCR ermittelt. Als Referenzgen wurde das Haushaltsgen *hprt* verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (n = 2-4).

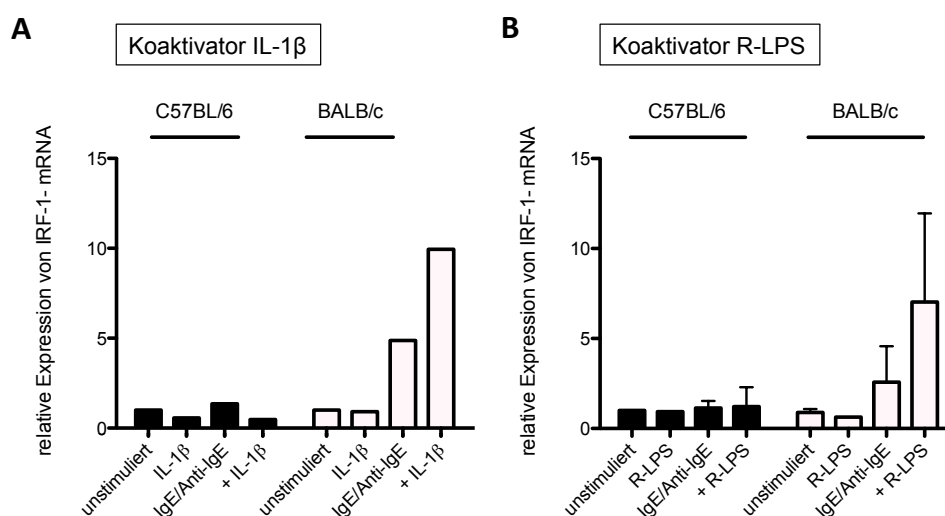
Die ermittelten relativen Expressionen der IL-1 $\beta$ -mRNA sind zwischen Wildtyp und *Mcpt5-Cre<sup>+</sup> Irf-4<sup>fl/fl</sup>* vergleichbar (siehe Abb. 27).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Mastzell-spezifische IRF-4-Defizienz nachweislich zu einer verminderten IL-9-Expression in den BMMC führt. Jedoch bleibt die Produktion der Cytokine IL-6 und IL-1 $\beta$  sowie die Degranulation unbeeinflusst. Die durch Einsatz der IRF-4-defizienten BMMC erhaltenen Ergebnisse untermauern damit die bereits in BALB/c ermittelte Rolle des Transkriptionsfaktors IRF-4 bezüglich der Regulation des Cytokins IL-9. Eine verstärkte Expression von IRF-4 zieht eine gesteigerte IL-9-Expression in Mastzellen aus BALB/c nach sich.

### 3.1.15 Der Transkriptionsfaktor IRF-1 wird in BALB/c verstärkt gebildet

In den vorangegangenen Untersuchungen zeigte sich eine höhere Expression des Transkriptionsfaktors IRF-4 in BALB/c, die sich positiv auf die IL-9-Produktion auswirkt.

Neben IRF-4 wurde auch der Faktor IRF-1 überprüft. In Th9-Zellen konnte gezeigt werden, dass IRF-1 Teil eines Signalweges ist, der letztlich zur Expression des Cytokins IL-9 führt. Bei Stimulation der Th9-Zellen mit dem proinflammatorischen Cytokin IL-1 $\beta$  wird die Phosphorylierung von STAT1 (Signal Transducers and Activators of Transcription 1) induziert, wodurch sich die Expression von IRF-1 erhöht. IRF-1 wiederum bindet an drei IRF-1-Bindestellen im *il-9*-Promotorbereich, was eine Erhöhung der IL-9-Expression bewirkt [128]. Im Folgenden wurde die relative Expression von IRF-1-mRNA in stimulierten BMMC beider Mausstämme mittels qRT-PCR analysiert.



**Abb. 28: Der Transkriptionsfaktor IRF-1 wird in BMMC aus BALB/c vermehrt exprimiert.**

Die BMMC wurden für 48h mit IgE (1 $\mu$ g/ml) präinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Anti-IgE (1 $\mu$ g/ml)  $\pm$  IL-1 $\beta$  (5ng/ml) oder  $\pm$  R-LPS (200ng/ml) und mit IL-1 $\beta$  oder R-LPS alleine aktiviert. Die relative Expression von (A) IRF-1-mRNA mit dem Koaktivator IL-1 $\beta$  und (B) IRF-1-mRNA mit dem Koaktivator R-LPS wurde nach einer Stimulationszeit von 18h mittels qRT-PCR untersucht. Die dargestellten Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von n = 3 Experimenten wurden durch Einsatz des Referenzgens *hgprt* normiert.

Nach Stimulation der BMMC aus BALB/c mit IgE/Anti-IgE und IL-1 $\beta$  kommt es in diesen Zellen zu einer verstärkten Expression von IRF-1-mRNA im Gegensatz zu BMMC aus C57BL/6 (siehe Abb. 28A). Gleiches zeigt sich bei Stimulation der Zellen mit dem Koaktivator R-LPS. BALB/c bilden gegenüber C57BL/6 vermehrt IRF-1-mRNA (siehe Abb. 28B).

## Fazit:

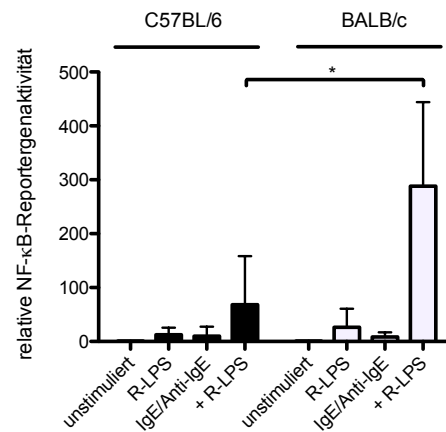
- BMMC aus BALB/c weisen eine höhere Expression des Transkriptionsfaktors IRF-4 auf.
- Der „Knockdown“ von IRF-4 in BALB/c verringert die IL-9-Expression, während die IL-1 $\beta$ -Expression unbeeinträchtigt bleibt.
- Mittels der Mastzell-spezifischen IRF-4-Defizienz konnte gezeigt werden, dass es bei Wegfall von IRF-4 zu einer Verringerung der IL-9-Expression kommt.
- Die Expression von IL-6 und IL-1 $\beta$  wird durch die IRF-4-Defizienz nicht beeinflusst, ebenso die Degranulation.
- BALB/c zeigen eine vermehrte Expression des Transkriptionsfaktors IRF-1, wodurch die IL-9-Expression ebenfalls positiv beeinflusst werden könnte.

→ Der Transkriptionsfaktor IRF-4 zeigt eine positive Wirkung auf die Expression von IL-9, jedoch nicht auf die Expression von IL-1 $\beta$ .

### 3.1.16 Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges

Aus den bisher gezeigten Daten lässt sich ableiten, dass eine erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors IRF-4 in BMMC aus BALB/c-Mäusen eine Ursache für die gesteigerte Produktion von IL-9 in diesen Zellen ist. Die Expression von IRF-4 wird von NF- $\kappa$ B-Faktoren kontrolliert, welche auch direkten Einfluss auf die Produktion von IL-9 nehmen [129], [51], [130]. Aus diesem Grund wurde im Folgenden die Aktivität und Expression der NF- $\kappa$ B-Faktoren in Mastzellen aus beiden Mausinzuchtstämmen miteinander verglichen.

BMMC aus C57BL/6 und BALB/c wurden mit einem NF- $\kappa$ B-Reportergenkonstrukt (pTATALuc<sup>+</sup> (3x NF- $\kappa$ B), [104]) transfiziert, welches eine TATA-Box vor dem *luciferase*-Gen aus *Photinus pyralis* enthält. Stromaufwärts der TATA-Box befinden sich drei NF- $\kappa$ B-Bindungsstellen. Bindet NF- $\kappa$ B an diese  $\kappa$ B-Bindestellen wird der Promotor aktiviert und das Gen für die Luciferase wird abgelesen. Dies ermöglicht es, die Aktivität der NF- $\kappa$ B-Faktoren nachzuweisen. Ein anderes Plasmid (pRL-TK), das ein zweites, konstitutiv exprimiertes *luciferase*-Gen (aus *Renilla reniformis*) enthält, wurde zum Ausgleich unterschiedlicher Transfektionseffizienzen mit in die Zellen eingebracht.



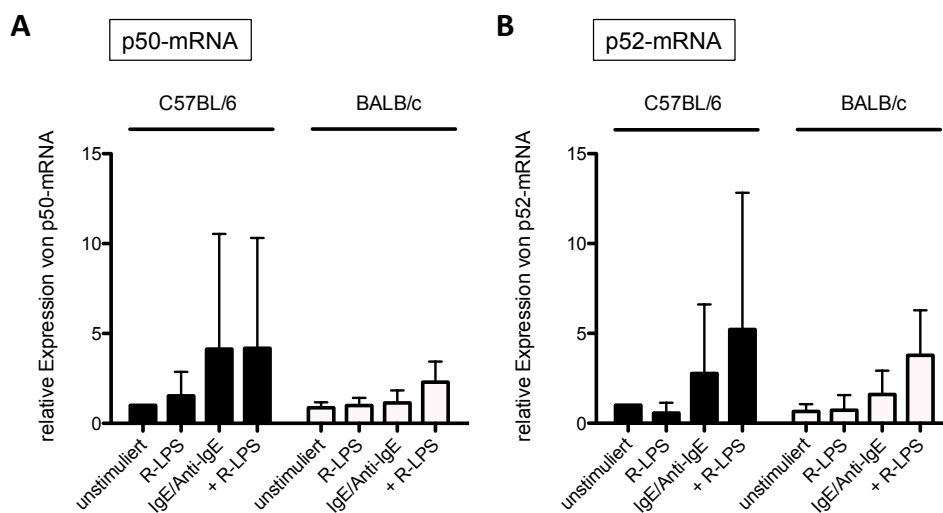
**Abb. 29: In BALB/c-Mastzellen ist eine höhere NF-κB-Aktivität nachweisbar.**

Mit IgE (1 µg/ml, 48h) beladene BMMC wurden mittels Elektroporation mit einem NF-κB-Reportergenkonstrukt (pTATALuc<sup>+</sup>, 5 µg) und einem konstitutiv aktiven Kontrollplasmid (pRL-TK, 150ng) transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit Anti-IgE (1 µg/ml) ± R-LPS (200ng/ml) oder R-LPS alleine über Nacht stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurden die NF-κB-abhängigen und die konstitutiven Luciferase-Aktivitäten gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung der relativen normierten NF-κB-Reportergenaktivität. Die Werte der unstimulierten Proben wurden jeweils auf eins gesetzt und alle Werte der anderen Ansätze wurden darauf bezogen (n = 4-8, \*p = 0,0211).

Werden BMMC aus C57BL/6 und BALB/c durch IgE-Kreuzvernetzung oder durch den Kostimulator R-LPS aktiviert, zeigen die Zellen eine vergleichbare Aktivität der NF-κB-Faktoren untereinander. Eine Stimulation mit einer Kombination aus IgE/Anti-IgE und R-LPS lässt jedoch eine überschießende Verstärkung der NF-κB-Aktivität in BALB/c erkennen (siehe Abb. 29). Somit reagieren BALB/c-Mastzellen auf den Einfluss des Koaktivators R-LPS empfindlicher als BMMC aus C57BL/6. Da das Reportergenkonstrukt nicht spezifisch für eines der fünf Proteine der NF-κB-Familie ist, kann nur eine generell höhere Aktivität nachgewiesen werden. Folgend wurde daher die Expression einzelner NF-κB-Faktoren mittels qRT-PCR bestimmt.

### 3.1.16.1 Expression einzelner NF-κB-Faktoren

Die NF-κB-Proteine p50 und p52 haben keine Transaktivierungsdomäne und fungieren daher primär als nicht-transaktivierende Untereinheiten bei der Bindung an die DNA der Zielsequenzen [61]. Im Folgenden sollte überprüft werden, ob der Mausstamm C57BL/6 eine veränderte Expression der NF-κB-Faktoren p50 und p52 aufweist. Durch Stimulation der Mastzellen aus den Mausstämmen C57BL/6 und BALB/c mittels Anti-IgE-vermittelter Kreuzvernetzung in Verbindung mit R-LPS und anschließender cDNA-Präparation wurden die Expressionen der mRNA für p50 und p52 in der qRT-PCR untersucht.

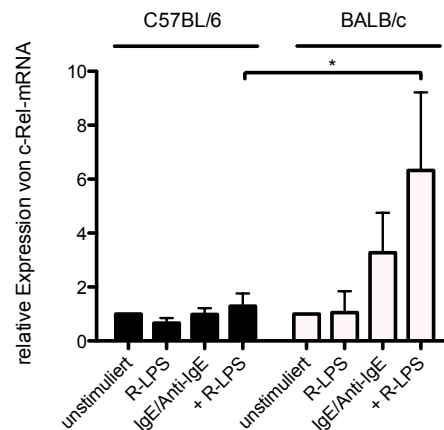


**Abb. 30: Die Transkriptionsfaktoren p50 und p52 zeigen bei C57BL/6 nach 18h eine leichte Erhöhung ihrer Expression.**

Im Anschluss an die Präinkubation der Mastzellen mit IgE (1µg/ml) für 48h erfolgte eine Stimulation der Zellen mit Anti-IgE (1µg/ml) ± R-LPS (200ng/ml) oder R-LPS alleine. Nach einer Stimulationsdauer von 18h wurde die cDNA präpariert. Die relative Expression von **(A)** p50-mRNA und **(B)** p52-mRNA nach 18h wurde mit Hilfe der qRT-PCR analysiert. Das Gen *hgprt* diente hierbei als Referenzgen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung (n = 3-5).

Die nicht-transaktivierenden NF-κB-Faktoren p50 und p52 weisen nach 18h Stimulation verglichen mit BALB/c eine höhere Expression in C57BL/6 auf (siehe Abb. 30).

In den folgenden Experimenten wurden die Funktionen des Transkriptionsfaktors c-Rel hinsichtlich der IL-9-Regulation bestimmt. Der Faktor c-Rel ist ebenfalls Teil der NF-κB-Familie und wurde zuerst als Onkogen beschrieben [131]. Durch die vorhandene Transaktivierungsdomäne wirkt c-Rel aktivierend auf die Expression NF-κB-regulierter Gene [59], [60]. Hinzu kommt, dass c-Rel in seiner Expression selbst durch im Promotorbereich vorhandene NF-κB-Bindestellen reguliert wird [132]. In murinen B-Zellen zeigte sich zudem, dass c-Rel durch Autoregulation seinen eigenen Promotor aktiviert [133], [134]. Für die Untersuchung der relativen mRNA-Expression wurden die BMBC mit IgE/Anti-IgE und R-LPS aktiviert und danach die cDNA analysiert.

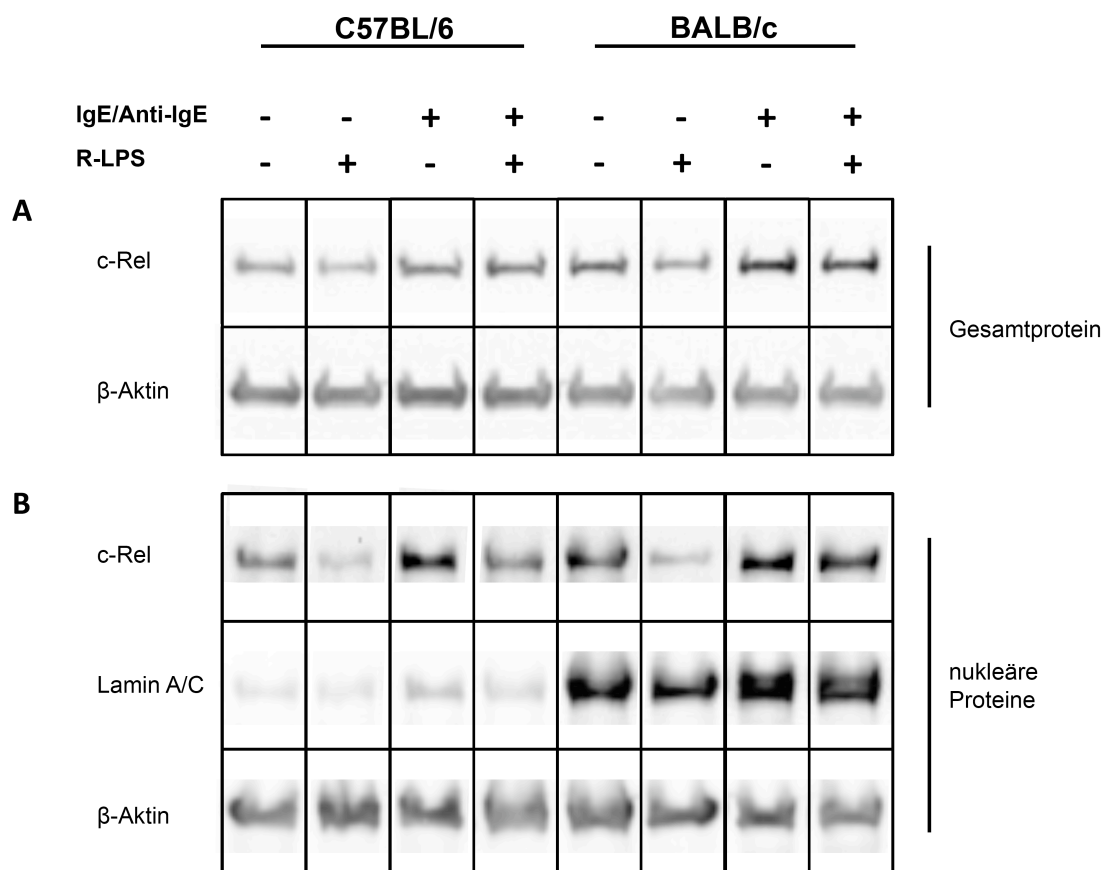


**Abb. 31: Der Transkriptionsfaktor c-Rel wird in Mastzellen aus BALB/c verstärkt gebildet.**

Die aus den Mausstämmen C57BL/6 und BALB/c generierten BMMC wurden für 48h mit IgE (1µg/ml) beladen. Darauf wurde eine Stimulation der Zellen mit Anti-IgE (1µg/ml), R-LPS (200ng/ml) oder mit einer Kombination der beiden Stimulanzen durchgeführt. In der qRT-PCR wurden die relativen Expressionswerte der c-Rel-mRNA nach 4h ermittelt, indem die Daten auf das Referenzgen *hgprt* normiert wurden. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (n = 3-4, \*p = 0,0407).

BALB/c zeigen nach 4h eine höhere c-Rel-Expression als C57BL/6 (siehe Abb. 31). Für die anderen Faktoren der Rel-Unterfamilie, RelA und RelB, ergaben sich keine Unterschiede der Expression zwischen den Mausstämmen (Daten nicht gezeigt).

Anschließend folgte die Untersuchung der c-Rel-Bildung auf Proteinebene. Hierfür wurde Gesamtprotein und nukleäres Protein aus den Stimulationsansätzen der untersuchten BMMC gewonnen und mittels Western Blot analysiert. Als Beladungskontrolle wurde das Strukturprotein  $\beta$ -Aktin verwendet, das sowohl im Cytoplasma als auch im Nukleus zu finden ist [135]. Zudem wurde das im Nukleus vorkommende Protein Lamin A/C als Ladungskontrolle der nukleären Proteine eingesetzt.



**Abb. 32: Im Nucleus von BALB/c BMMC wird im Vergleich zu C57BL/6 der Transkriptionsfaktor c-Rel stärker exprimiert.**

Mastzellen aus C57BL/6 und BALB/c inkubierten in Gegenwart von IgE (1µg/ml) für 48h. Im Anschluss wurden die Zellen mit den Stimulanzen Anti-IgE (1µg/ml) ± R-LPS (200ng/ml) oder R-LPS alleine für 8h aktiviert. **(A)** Nach der Stimulation wurde das Gesamtprotein isoliert und 15µg Protein im Western Blot aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit einem Anti-c-Rel-Antikörper mittels Chemilumineszenz. Als Beladungskontrolle fungierte β-Aktin. **(B)** An die Stimulation der BMMC schloss sich die Präparation der nukleären Proteine an. 25µg der nukleären Proteine wurden mittels Western Blot aufgetragen und mit einem spezifischen Antikörper gegen c-Rel detektiert. Zur internen Kontrolle dienten Antikörper gegen Lamin A/C und β-Aktin. Dargestellt sind repräsentative Western Blots aus neun bzw. sechs unabhängigen Experimenten.

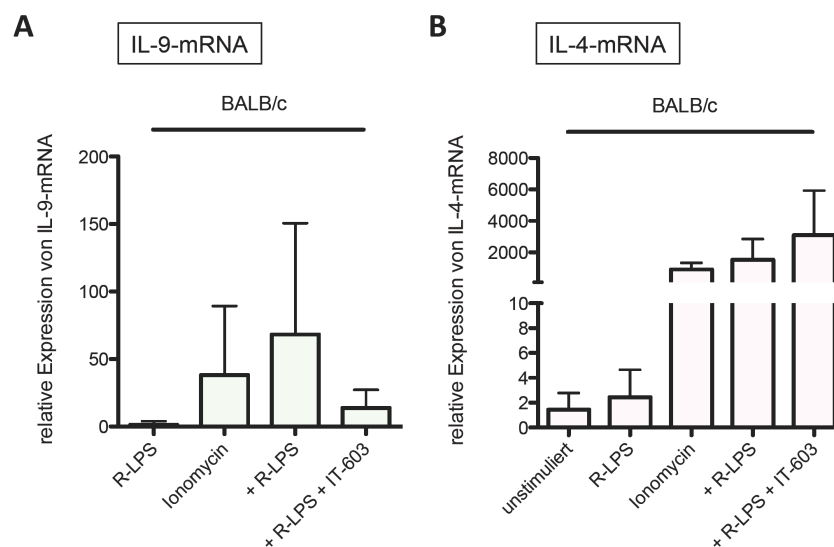
Im Western Blot ist in zellulären Lysaten von BMMC aus BALB/c nach Stimulation der Zellen mit IgE/Anti-IgE allein und in Kombination mit dem Koaktivator R-LPS eine höhere Menge an c-Rel nachweisbar (siehe Abb. 32A). Dies geht einher mit einem Anstieg der c-Rel-Menge im Nucleus von BALB/c-Mastzellen (siehe Abb. 32B). Das Strukturprotein Lamin A/C erwies sich hierbei als ungeeignete Ladungskontrolle, weshalb parallel das Strukturprotein β-Aktin nachgewiesen wurde.

Die verstärkte Expression von c-Rel in BMMC aus BALB/c legt die Vermutung nahe, dass es zu einer gesteigerten Expression NF-κB-abhängiger Gene kommt. Zu diesen Genen zählen IRF-4, c-Rel und IL-1β.

### 3.1.17 Die Inhibition von c-Rel hemmt die Produktion von IL-9, IL-1 $\beta$ und IRF-4 und weiterer NF- $\kappa$ B-Zielgene

Durch die vorangegangenen Versuche konnte eine verstärkte Expression des Transkriptionsfaktors und NF- $\kappa$ B-Familienmitglieds c-Rel gezeigt werden. Folgend wurde daher die Auswirkung der Inhibition des Faktors c-Rel analysiert. Zu diesem Zweck wurde ein neuartiger c-Rel-Inhibitor, IT-603<sup>37</sup>, verwendet. IT-603 bindet direkt aber reversibel an den Transkriptionsfaktor c-Rel, wodurch eine Konformationsänderung bewirkt wird, die die DNA-Bindung und die Transkriptionsaktivität von c-Rel blockiert<sup>38</sup>. Mit Hilfe des Inhibitors gelang es, die c-Rel-Aktivität in T-Zellen zu hemmen [100].

Da bereits 2001 eine Bindung von c-Rel an die drei im murinen *il-9*-Promotor lokalisierten NF- $\kappa$ B-Bindestellen (NF- $\kappa$ B1 - 3) dokumentiert werden konnte [51], wurde zunächst der Einfluss der c-Rel-Inhibition auf die IL-9-Expression untersucht. BMMC des Mausstammes BALB/c wurden mit dem c-Rel-Inhibitor IT-603 für eine halbe Stunde vorinkubiert und anschließend mit dem Calcium-Ionophor Ionomycin und dem Kofaktor R-LPS aktiviert. Mit der qRT-PCR wurde die Expression von IL-9 verfolgt. Als Kontrolle wurde das NF- $\kappa$ B-unabhängige Cytokin IL-4 nachgewiesen.



**Abb. 33: Die Hemmung des Transkriptionsfaktors c-Rel durch den c-Rel-Inhibitor IT-603 geht mit einer Verminderung der IL-9-Expression einher.**

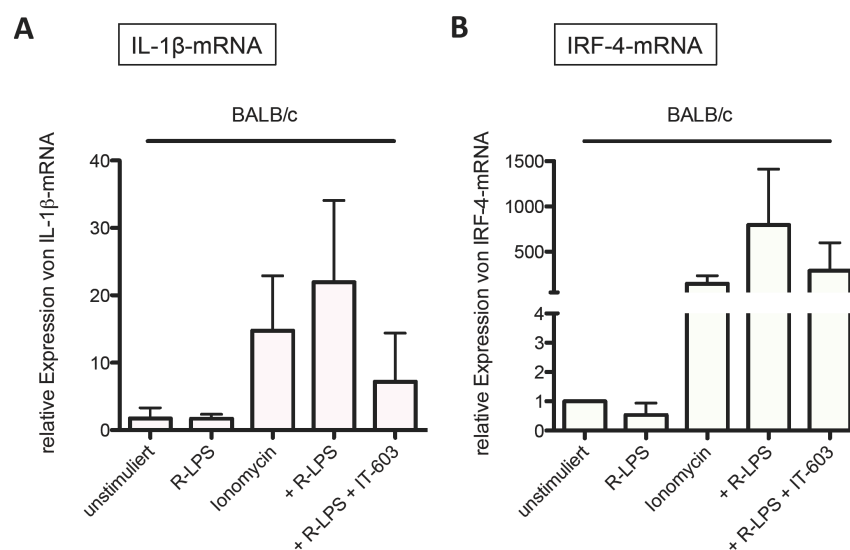
Die Mastzellen wurden mit dem c-Rel-Inhibitor IT-603 (50 $\mu$ M) für 30min vorinkubiert. Danach folgte eine Aktivierung der Zellen mit Ionomycin (1 $\mu$ M)  $\pm$  R-LPS oder R-LPS ausschließlich. Mit Hilfe der qRT-PCR wurde die aus den Stimulationsansätzen gewonnene cDNA auf die Anwesenheit der **(A)** IL-9-mRNA nach 18h und der **(B)** IL-4-mRNA nach 4h untersucht. Eine Normierung der Daten erfolgte mit Hilfe des Haushaltsgens *hgprt*. Aufgezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der relativen Expressionswerte (n = 3-7).

<sup>37</sup> IT-603: [(5Z)-5-[(5-bromo-2-hydroxy-3-methoxyphenyl)methylidene]-2-sulfanylidene-imidazolidin-4-one

<sup>38</sup> Angabe gemäß den Herstellerangaben von Calbiochem

BALB/c zeigen eine verstärkte IL-9-mRNA-Expression in Ionomycin-stimulierten BMMC. Die Anwesenheit von R-LPS, das als Kostimulanz fungiert, ruft eine Verstärkung der bereits erhöhten mRNA-Expression hervor. Eine Blockade des NF- $\kappa$ B-Faktors c-Rel durch Einsatz des c-Rel-Inhibitors IT-603 reduziert die gesteigerte IL-9-Expression (siehe Abb. 33A). Die IL-4-Produktion wird durch die Inhibition von c-Rel nicht beeinflusst (siehe Abb. 33B).

Zusätzlich wurden auch die mRNA-Expressionen der anderen in BALB/c erhöhten Gene, IL-1 $\beta$  und IRF-4, unter der c-Rel-Inhibition bestimmt. In der qRT-PCR wurde die cDNA der Stimulationsansätze eingehender betrachtet.



**Abb. 34: Die Inhibition von c-Rel hat auch eine Abnahme der IL-1 $\beta$ - und IRF-4-mRNA-Expression zur Folge.**

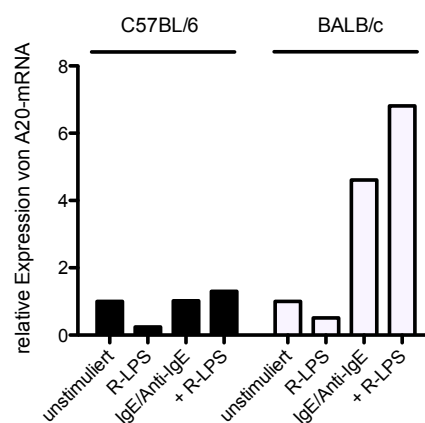
Der 30-minütigen Präinkubation der BMMC aus dem Mausstamm BALB/c mit dem c-Rel-Inhibitor IT-603 (50 $\mu$ M) folgte die Aktivierung der BMMC mit Ionomycin (1 $\mu$ M)  $\pm$  R-LPS (200ng/ml) oder R-LPS für 18h. Die cDNA wurde präpariert und auf die relative Expression der **(A)** IL-1 $\beta$ -mRNA und der **(B)** IRF-4-mRNA in der qRT-PCR untersucht. Zur Normierung wurde das Gen *hgprt* eingesetzt. Es wurden die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt (n = 3-6).

In BMMC aus BALB/c sind erhöhte Expressionen von IL-1 $\beta$ - und IRF-4-mRNA nachweisbar (siehe Abb. 34). Die Inhibition des NF- $\kappa$ B-Proteins c-Rel beeinflusst die Genexpression von IL-1 $\beta$  und IRF-4. Nach Einwirkung von IT-603 weist BALB/c ein geringeres Expressionsmuster auf, wobei die Reduktion bei IL-1 $\beta$  (siehe Abb. 34A) stärker ausfällt als bei IRF-4 (siehe Abb. 34B). Dies verdeutlicht die wegfallende Wirkung von c-Rel auf die beiden c-Rel-Zielgene IL-1 $\beta$  und IRF-4.

Abschließend lässt sich sagen, dass sich die bei BALB/c beobachtete IL-9-Überexpression durch eine direkte Wirkung des in BALB/c erhöhten NF- $\kappa$ B-Proteins c-Rel erklären lässt. Dieser Faktor ist in der Lage, durch eine indirekte Wirkung über das Cytokin IL-1 $\beta$  und den Transkriptionsfaktor IRF-4 zusätzlich auf die IL-9-Expression einzuwirken. Eine Blockade von c-Rel durch den c-Rel-Inhibitor IT-603 ruft daher eine Abnahme von IL-9, IL-1 $\beta$  und IRF-4 hervor.

Neben IRF-4 und c-Rel wurden auch andere NF- $\kappa$ B-abhängige Gene auf ihre Expression untersucht. Darunter das proinflammatorische Cytokin Tumornekrosefaktor (TNF) und das Gen für die miRNA<sup>39</sup> miR-146a, die beide in BMMC aus BALB/c, verglichen mit den BMMC aus C57BL/6, eine verstärkte Expression aufweisen (Daten nicht gezeigt).

Das cytoplasmatische Zinkfinger-Protein A20 (TNFAIP3<sup>40</sup>) wurde ebenfalls untersucht. Hierfür wurde präparierte cDNA stimulierter BMMC beider Mausstämme in der qRT-PCR analysiert.



**Abb. 35: Das durch NF- $\kappa$ B-regulierte Gen A20 zeigt in BALB/c eine Überexpression.**

Die aus C57BL/6 und BALB/c generierten BMMC präinkubierten für 48h mit IgE (1 $\mu$ g/ml). Hiernach wurde eine Stimulation der Zellen mit Anti-IgE (1 $\mu$ g/ml)  $\pm$  R-LPS (200ng/ml) oder R-LPS durchgeführt. Nach einer Stimulationsdauer von 18h wurde die cDNA der einzelnen Ansätze präpariert und als Probe in die qRT-PCR eingesetzt. Aufgezeigt ist die relative Expression der A20-mRNA, ermittelt anhand des Referenzgens *hprt*.

Mastzellen aus BALB/c-Mäusen weisen eine Expressionserhöhung der A20-mRNA auf. In IgE-kreuzvernetzten BMMC kommt es zu einer verstärkten Bildung der A20-mRNA, die durch den Koaktivator R-LPS noch gesteigert wird (siehe Abb. 35).

<sup>39</sup> miRNA:

microRNA

<sup>40</sup> TNFAIP3:

Tumor necrosis factor alpha-induced protein 3

## Fazit:

- BMMC aus BALB/c besitzen eine höhere NF-κB-Aktivität nach Stimulation der IgE-kreuzvernetzten Zellen mit dem Kofaktor R-LPS.
  - In C57BL/6 ist eine leichte Erhöhung der Expression der nicht-transaktivierenden NF-κB-Faktoren p50 und p52 zu erkennen.
  - Das Protein c-Rel zeigt in BMMC aus BALB/c-Mäusen eine gesteigerte Expression.
  - Durch Inhibition von c-Rel sinken die Expressionen der IL-9-, IL-1β- und IRF-4-mRNA ab.
  - Das NF-κB-regulierte Gen für A20 ist in BALB/c ebenfalls erhöht.
- Der NF-κB-Faktor c-Rel wirkt direkt auf die IL-9-Expression in BALB/c. Vermittelt durch eine indirekte Wirkung von c-Rel auf IRF-4 und IL-1β kommt es zu einer zusätzlichen Verstärkung der IL-9-Produktion.

## 3.2 Untersuchungen zur Bedeutung des Transkriptionsfaktors NFATc1 für die IL-9-Produktion

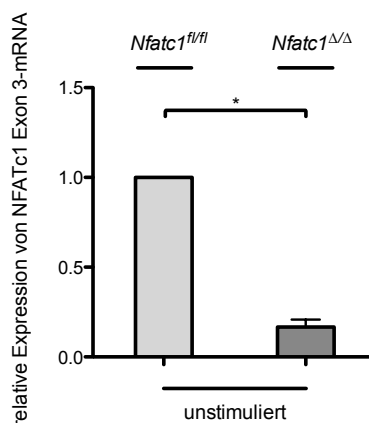
Die NFAT-Familie<sup>41</sup> ist eine Familie von Transkriptionsfaktoren und besteht aus den fünf Mitgliedern NFATc1, NFATc2, NFATc3, NFATc4 und dem entfernter verwandten NFAT5 [90]. Untersuchungen an den einzelnen Genen für die NFAT-Faktoren haben gezeigt, dass Verluste dieser Gene in Mäusen zu unterschiedlichen Phänotypen führen können. Im Folgenden sollten die Funktionen des Faktors NFATc1 in Mastzellen untersucht werden. Ein systemischer „Knockout“ von NFATc1 ist jedoch embryonal letal. Infolgedessen wurden Mäuse auf dem genetischen C57BL/6-Hintergrund mit einer Mastzell-spezifischen Defizienz des Transkriptionsfaktors NFATc1 eingesetzt.

### 3.2.1 Generierung der Mastzell-spezifischen NFATc1-Defizienz

Um Mäuse mit einer Mastzell-spezifischen Defizienz des Transkriptionsfaktors NFATc1 zu generieren, wurde das Cre/loxP-System verwendet. Hierfür wurden *Mcpt5-Cre*-Mäuse eingesetzt, die eine Cre-Rekombinase unter Kontrolle des *mcpt5*-Promotors exprimieren [95]. *Mcpt5-Cre*-Mäuse wurden mit *Nfatc1<sup>fl/fl</sup>*-Mäusen verpaart, welche flankierende loxP-Signalsequenzen um das Exon 3 von NFATc1 aufweisen. Das Exon 3 kodiert für die DNA-Bindedomäne des Transkriptionsfaktors NFATc1 [96]. Die aus dieser Mauszucht (*Mcpt5-Cre* x *Nfatc1<sup>fl/fl</sup>*) resultierenden Nachkommen mit dem Genotyp *Mcpt5-Cre<sup>neg</sup> Nfatc1<sup>fl/fl</sup>* wurden als Wildtyp verwendet und werden fortan *Nfatc1<sup>fl/fl</sup>* bezeichnet. Cre-positive Nachkommen (*Mcpt5-Cre<sup>pos</sup> Nfatc1<sup>Δ/Δ</sup>*) exprimieren in Mastzellen die Rekombinase Cre, die

<sup>41</sup> NFAT: nuclear factor of activated T cells

eine Deletion der loxP-flankierten Gensequenz des Exons 3 hervorruft. Das Enzym Mcpt5 wird auch in BMMC exprimiert, daher konnte davon ausgegangen werden, dass auch in diesen Zellen eine Deletion des Zielgens stattfindet. Der Nachweis der Mastzell-spezifischen Deletion erfolgte in ruhenden BMMC mittels qRT-PCR.



**Abb. 36: *Nfatc1<sup>Δ/Δ</sup>* zeigen eine Mastzell-spezifische Deletion des Transkriptionsfaktors NFATc1.**

Nach vierwöchiger Kultur wurden ruhende Mastzellen von *Nfatc1<sup>fl/fl</sup>* und *Nfatc1<sup>Δ/Δ</sup>* mit spezifischen Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle CD117 und FcεRI angefärbt. Die doppeltpositiven Zellen (CD117<sup>+</sup>, FcεRI<sup>+</sup>) wurden daraufhin mittels Fluorescence activated cell sorting (FACS) isoliert. Nach der cDNA-Präparation wurde diese auf die Expression von NFATc1 Exon 3-mRNA untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung (n = 3, \*p = 0,004) bezogen auf das Haushaltsgen *hgprt*.

Die generierten BMMC wurden mittels FACS<sup>42</sup> isoliert. Anschließend wurde die gewonnene cDNA auf die relative Expression des Exons 3 von *Nfatc1* analysiert. Abb. 36 zeigt einen signifikanten Rückgang der mRNA-Expression von Exon 3. Im Vergleich zum Wildtyp kommt es zu einer Verminderung von 83%. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Cre-Rekombinase in fast allen Zellen das Exon 3 deletiert hat und somit der Genort funktionsunfähig wurde. Dementsprechend werden die Cre-positiven Mäuse nachfolgend als *Nfatc1<sup>Δ/Δ</sup>* bezeichnet.

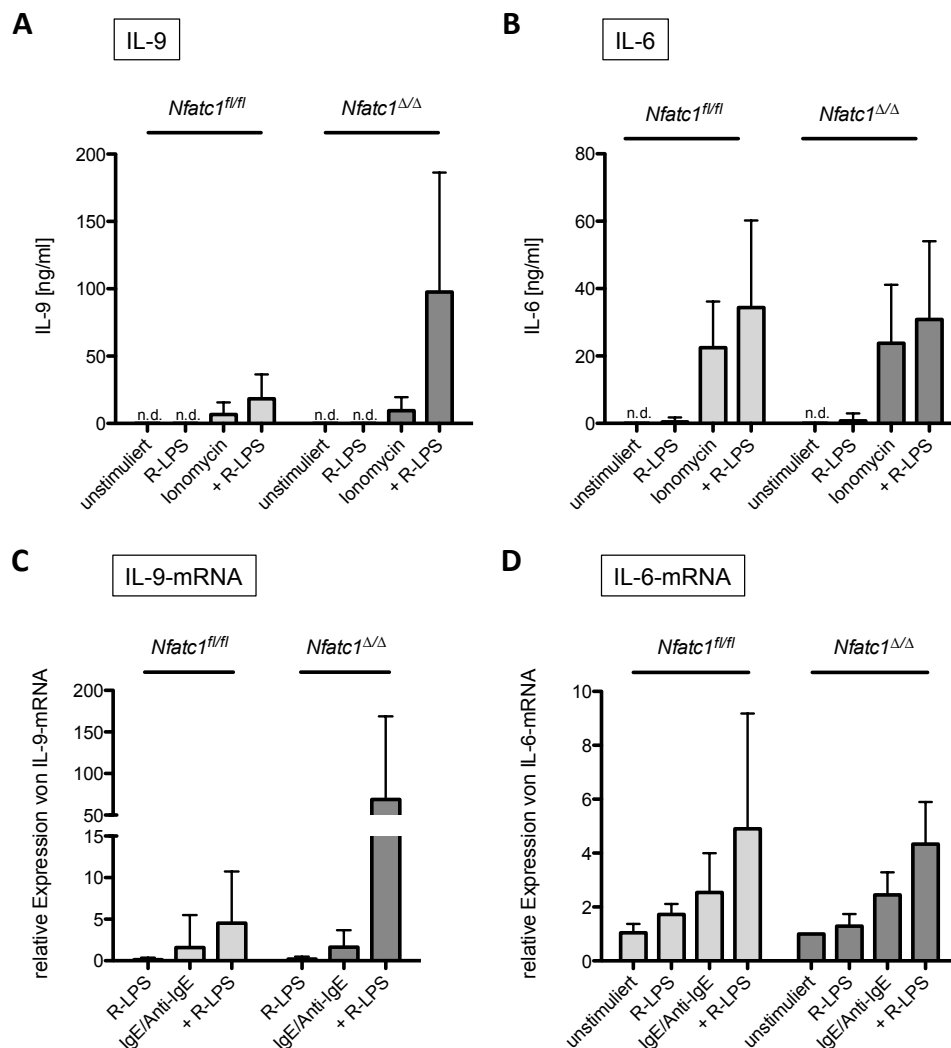
### 3.2.2 Die NFATc1-defizienten BMMC exprimieren mehr IL-9

Anhand vorangegangener Untersuchungen war bereits bekannt, dass die NFAT-Faktoren NFATc1 und NFATc2 an der Regulation von TNF, IL-9 und IL-13 beteiligt sind. Der IL-6-Expression konnte keine Abhängigkeit in Bezug auf die NFAT-Aktivität nachgewiesen werden [136]. Daher wurde zunächst die Expression von IL-6 bestimmt. Zusätzlich erfolgte eine Analyse der IL-9-Produktion. Für den Proteinnachweis mittels ELISA erfolgte eine Stimulation der Zellen mittels des Calcium-Ionophors Ionomycin in Kombination mit dem

<sup>42</sup> FACS:

Fluorescence activated cell sorting

Koaktivator R-LPS. Weiterhin wurde aus IgE-beladenen und mit Anti-IgE kruzvernetzten BMMC, nach Kostimulation mit R-LPS, cDNA präpariert. Die cDNA wurde in der qRT-PCR eingesetzt.



**Abb. 37: Nach Stimulation mit IgE/Anti-IgE und R-LPS zeigen NFATc1-defiziente Mastzellen eine gesteigerte IL-9-Bildung.**

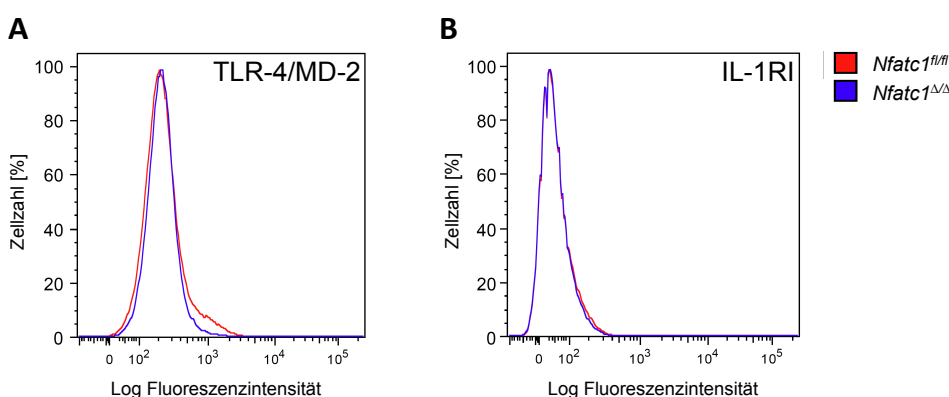
BMMC aus Mäusen der Stämme *Nfatc1<sup>fl/fl</sup>* und *Nfatc1<sup>ΔΔΔ</sup>* wurden mit Ionomycin (1μM) ± R-LPS (200ng/ml) und R-LPS aktiviert. In den Kulturüberständen wurden die Konzentrationen der Cytokine **(A)** IL-9 nach 48h und **(B)** IL-6 nach 4h mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung in ng/ml (n = 6-23).

Mastzellen wurden für 48h mit IgE (1μg/ml) präinkubiert. Anschließend erfolgte eine Stimulation der Zellen mit Anti-IgE (1μg/ml) ± R-LPS (200ng/ml) oder R-LPS. Nach Ende der Stimulationszeit wurde die cDNA präpariert und auf die relative Expression von **(C)** IL-9-mRNA nach 18h und **(D)** IL-6-mRNA nach 4h per qRT-PCR untersucht. Für die Normalisierung wurde das Haushaltsgen *hprt* herangezogen. Die Graphiken zeigen die Mittelwerte ± Standardabweichung von n = 3-12 Experimenten.

NFATc1-defiziente Mastzellen weisen eine erhöhte IL-9-Expression bei Stimulation mit IgE/Anti-IgE und R-LPS auf. Findet lediglich eine Kreuzvernetzung der BMMC statt, bilden beide Stämme eine vergleichbare Menge an IL-9 (siehe Abb. 37A, C). Diese Tatsache spricht dafür, dass die Erhöhung der Konzentration an IL-9, ähnlich wie bei den Stämmen C57BL/6 und BALB/c, durch die Kostimulation mit R-LPS verursacht wird. Die Expression

von IL-6 ist, entsprechend früherer Daten, durch die NFATc1-Defizienz nicht beeinflusst (siehe Abb. 37B, D).

Zur Kontrolle wurde die Expression relevanter Rezeptoren für die Erkennung von LPS (TLR-4/MD-2) und dem Cytokin IL-1 $\beta$  (IL-1-Rezeptor Typ I, IL-1RI) untersucht, um auszuschließen, dass die erhöhte IL-9-Expression NFATc1-defizienter Mastzellen durch eine veränderte Rezeptorexpression hervorgerufen wird. Ruhende Zellen wurden mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gegen die Rezeptoren TLR-4 (Anti-TLR-4/MD-2) und IL-1RI (Anti-IL-1RI) angefärbt und in der Durchflusszytometrie untersucht.



**Abb. 38: Die Mastzell-spezifische NFATc1-Deletion zeigt keinen Einfluss auf die Rezeptorexpression von TLR-4/MD-2 und IL-1RI.**

Ruhende Mastzellen der Stämme *Nfatc1<sup>fl/fl</sup>* und *Nfatc1<sup>ΔΔ</sup>* wurden mit spezifischen Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle TLR-4/MD-2 und IL-1RI (IL-1-Rezeptor Typ I) angefärbt. In der Durchflusszytometrie erfolgte die Bestimmung der Expression von (A) TLR-4/MD-2 und (B) IL-1RI. Die Graphik zeigt eine logarithmische Darstellung der Fluoreszenzintensität der jeweiligen Oberflächenmoleküle im Verhältnis zur aufgenommenen Zellzahl (% des Maximums).

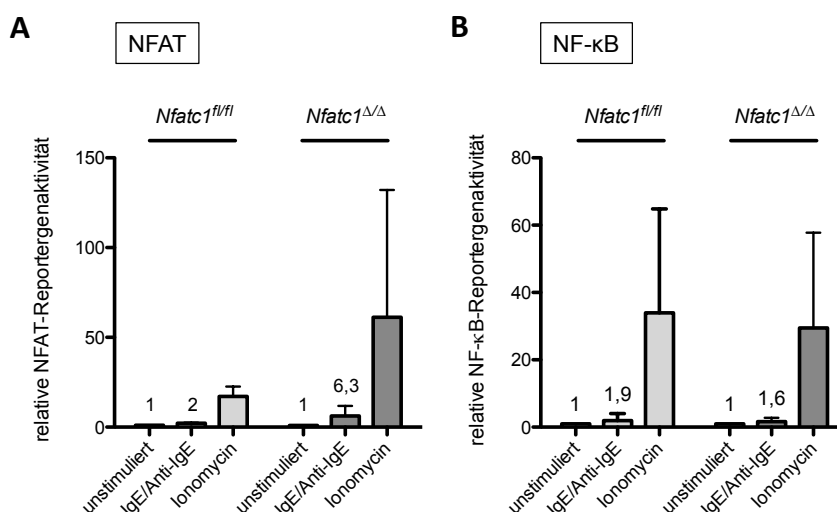
Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie zeigen keine Unterschiede in der Expression der Oberflächenmoleküle TLR-4/MD-2 (siehe Abb. 38A) und des IL-1RI (siehe Abb. 38B). Somit sind keine Stamm-spezifischen Veränderungen der Rezeptorexpression bei den beiden Mausstämmen vorhanden.

Fazit:

- NFATc1-defiziente BMMC exprimieren nach IgE-Kreuzvernetzung und Stimulation mit R-LPS mehr IL-9 als der Wildtyp.
- Das Cytokin IL-6 wird von der Mastzell-spezifischen NFATc1-Defizienz nicht beeinträchtigt.
- Es zeigen sich keine Unterschiede in der Expression der Oberflächenrezeptoren TLR-4/MD-2 und IL-1RI.

### 3.2.3 NFATc1-defiziente BMMC zeigen eine erhöhte NFAT-Transkriptionsaktivität

Für die IL-9-Produktion muriner Mastzellen ist u. a. die Präsenz der Transkriptionsfaktoren NFATc1 und NFATc2 wichtig. Auf Grund dessen und der in *Nfatc1*<sup>ΔΔ</sup> beobachteten verstärkten IL-9-Expression wurde eine Aktivitätsuntersuchung der NFAT-Faktoren durchgeführt. Hierfür wurde ein NFAT-Reportergenkonstrukt (pNFAT-Luc) durch Transfektion in die Zellen von *Nfatc1*<sup>ΔΔ</sup> und dem Wildtyp eingebracht. Nach Stimulation der Zellen wurde die Aktivität der NFAT-Faktoren indirekt über die Messung der Lumineszenz ermittelt. Das hierfür eingesetzte pNFAT-Luc-Plasmid enthält stromaufwärts vor dem *luciferase*-Gen (aus *Photinus pyralis*) einen Minimalpromotor bestehend aus einer TATA-Box. Zusätzlich wurden vier NFAT-Bindestellen aus dem ARRE-2<sup>43</sup> des humanen *il-2*-Promotors einbracht [103]. Zum Ausgleich unterschiedlicher Transfektionseffizienzen wurde bei der Transfektion ein zusätzliches Plasmid mit einem anderen *luciferase*-Gen (aus *Renilla reniformis*) unter dem konstitutiv aktiven Promotor der Thymidin-Kinase (pRL-TK) eingebracht und zur Normierung der Ergebnisse verwendet. Zudem ist zu beachten, dass an die NFAT-Bindestellen des Plasmids pNFAT-Luc sowohl NFATc1 als auch NFATc2 andocken und damit die Transkription forcieren können. Zur Kontrolle wurde zusätzlich die NF-κB-Reportergenaktivität (pTATALuc<sup>+</sup>) untersucht.



**Abb. 39: Trotz der NFATc1-Defizienz ist in *Nfatc1*<sup>ΔΔ</sup> eine gesteigerte NFAT-Aktivität messbar.**

Unter Verwendung der Elektroporation wurden IgE-beladene Mastzellen mit einem NFAT- (pNFAT-Luc, 5μg) oder einem NF-κB-Reportergenkonstrukt (pTATALuc<sup>+</sup>) transfiziert. Zur Quantifizierung wurde das konstitutiv aktive Kontrollplasmid pRL-TK (150ng) mitgeführt. Nach einer Ruhephase erfolgte eine Aktivierung der transfizierten BMMC mit Anti-IgE (1μg/ml) und Ionomycin (1μM) über Nacht. In den erstellten Zelllysaten wurde anschließend die Luciferase-Aktivität bestimmt. Die Darstellung zeigt die Mittelwerte ± Standardabweichung der (A) relativen NFAT- und (B) NF-κB-Reportergenaktivität bezogen auf die unstimulierten Proben (n = 6-8).

<sup>43</sup> ARRE-2:

antigen receptor response element 2

In ruhenden Mastzellen ist nur eine minimale NFAT-Aktivität erkennbar. Nach Stimulation der Zellen mit IgE/Anti-IgE oder Ionomycin kommt es durch den ausgelösten Calcium-Einstrom zur Aktivierung der NFAT-Proteine. Die Aktivität in NFATc1-defizienten BMMC ist bei beiden Stimulanzen stets höher als die vom Wildtyp gezeigte NFAT-Aktivität (siehe Abb. 39A). Die Ergebnisse des NF- $\kappa$ B-Reporters zeigen, dass sich die NFATc1-Defizienz nicht auf die Aktivität der NF- $\kappa$ B-Faktoren auswirkt, beide Mausstämmen weisen eine vergleichbare Reporteraktivität auf (siehe Abb. 39B).

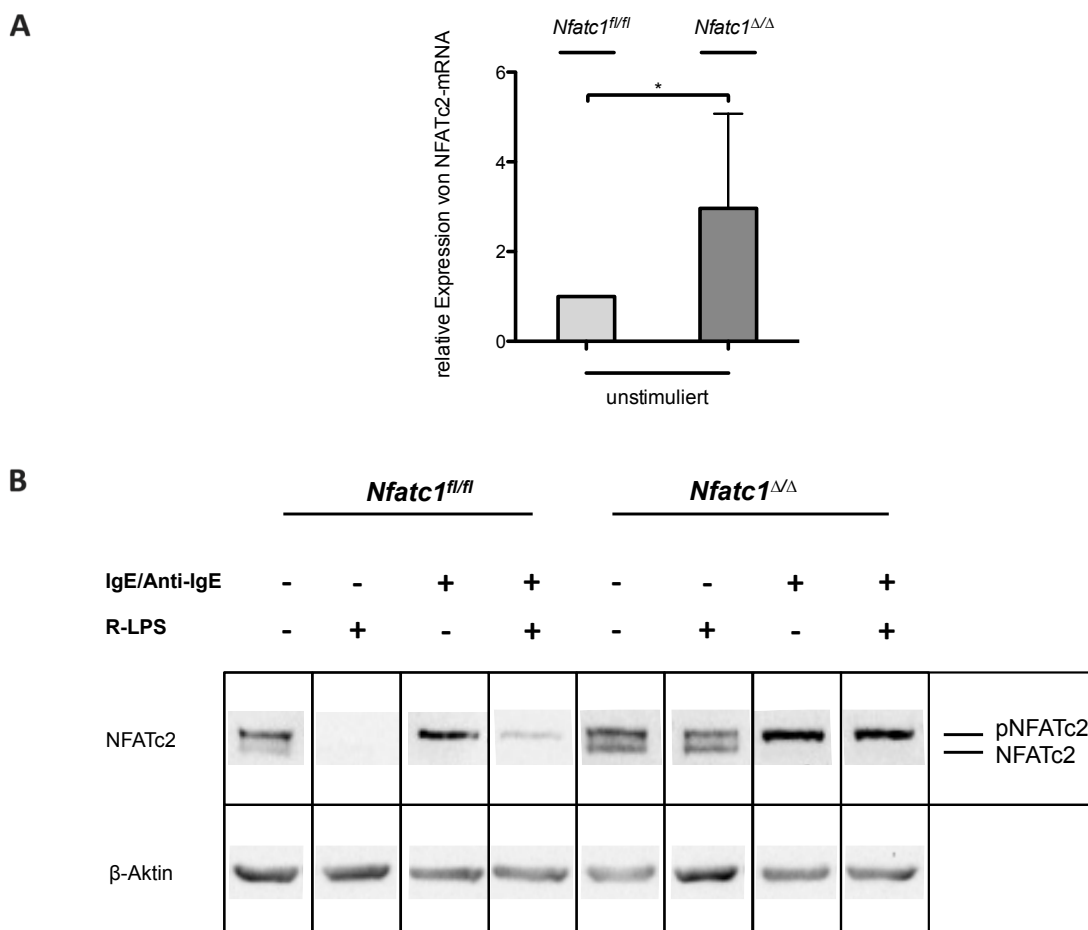
Da das NFAT-Reporterplasmid von NFATc1 und NFATc2 gleichermaßen aktiviert werden kann, deuten die erhaltenen Resultate darauf hin, dass die NFATc1-Defizienz eine Auswirkung auf die Expression des Faktors NFATc2 oder anderer NFAT-Faktoren haben könnte.

Da sich bereits bei BALB/c eine Abhängigkeit der IL-9-Produktion von dem NF- $\kappa$ B-Faktor c-Rel gezeigt hatte, wurde die Expression von c-Rel auch in den NFATc1-defizienten BMMC mittels qRT-PCR bestimmt. Es zeigte sich jedoch kein Unterschied in der relativen Expression der c-Rel-mRNA verglichen mit den Wildtypzellen (Daten nicht gezeigt).

### **3.2.4 Die Mastzell-spezifische NFATc1-Deletion bewirkt eine Überexpression von NFATc2**

Die Ergebnisse des NFAT-Reporters lassen auf eine veränderte NFAT-Aktivität in den NFATc1-defizienten Mastzellen schließen. Der eingesetzte NFAT-Reporter kann sowohl den Faktor NFATc1 als auch NFATc2 binden. Eine Bindung von NFATc3 ist ebenfalls denkbar. Da sich jedoch gezeigt hatte, dass der Transkriptionsfaktor NFATc3 keine Rolle bei der Produktion von TNF, IL-6 und IL-13 spielt und wohl auch nicht bei der Expression von IL-9 [136], wurde das Augenmerk auf den NFAT-Faktor NFATc2 gerichtet.

Aus diesem Grund wurde die Expression von NFATc2 in ruhenden BMMC auf Ebene der mRNA analysiert. Zur Kontrolle der qRT-PCR-Daten wurden Proteindaten erhoben. Das Gesamtprotein aktivierter Mastzellen wurde im Western Blot mit einem spezifischen NFATc2-Antikörper angefärbt. Das Strukturprotein  $\beta$ -Aktin diente in diesem Fall als Beladungskontrolle.



**Abb. 40: In den NFATc1-defizienten BMMC kommt es zu einer NFATc2-Überexpression.**

(A) cDNA ruhender BMMC wurde präpariert und in der qRT-PCR analysiert. Die Abbildung zeigt die relative Expression von NFATc2-mRNA, normiert auf das Referenzgen *hgprt*. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 15$ ,  $*p = 0,0117$ ).

(B) Mastzellen aus *Nfatc1<sup>fl/fl</sup>* und *Nfatc1<sup>ΔΔ</sup>* wurden nach der Präinkubation mit IgE (1 $\mu$ g/ml, 48h) für 3h aktiviert. Für die Aktivierung wurden die Stimulanzen Anti-IgE (1 $\mu$ g/ml) und R-LPS (200ng/ml) verwendet. Das Gesamtprotein der Stimulationsansätze wurde gewonnen und mittels Western Blot wurden 15 $\mu$ g Protein aufgetrennt. Der Nachweis von NFATc2 erfolgte mittels Chemilumineszenz unter Verwendung eines spezifischen Anti-NFATc2-Antikörpers nach einer Stimulationsdauer von 3h. Eine Anfärbung von  $\beta$ -Aktin (Anti- $\beta$ -Aktin-Antikörper) diente der Beladungskontrolle. Der gezeigte Western Blot stellt ein repräsentatives Ergebnis aus vier unabhängigen Experimenten dar.

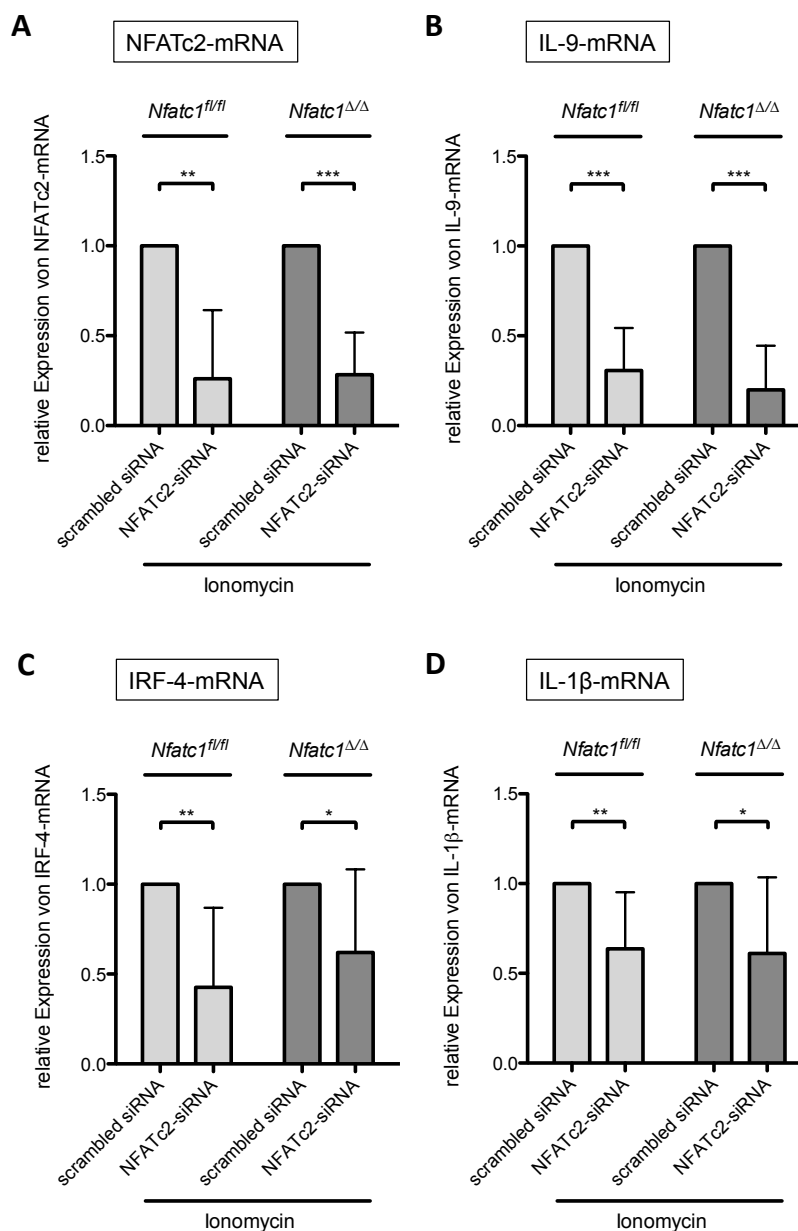
Die NFATc2-mRNA-Expression ruhender BMMC aus *Nfatc1<sup>ΔΔ</sup>* ist im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht (siehe Abb. 40A). Im Western Blot zeigen sich beim Nachweis von NFATc2 zwei voneinander abgrenzbare Banden. Die obere Bande entspricht der phosphorylierten, inaktiven Form von NFATc2 (pNFATc2), während die untere die nicht phosphorylierte, aktive Form (NFATc2) darstellt [137]. NFATc1-defiziente BMMC weisen im Gegensatz zum Wildtyp einen höheren Gehalt der aktiven und inaktiven Form von NFATc2 auf (siehe Abb. 40B).

## Fazit:

- BMMC aus NFATc1-defizienten Mäusen zeigen eine höhere Aktivität der NFAT-Faktoren.
- Die Aktivität der NF- $\kappa$ B-Proteine ist bei *Nfatc1<sup>f/f</sup>* und *Nfatc1<sup>ΔΔ</sup>* vergleichbar.
- NFATc1-defiziente Mastzellen weisen eine gesteigerte NFATc2-Expression auf.

### 3.2.5 Die Überexpression von NFATc2 ist Ursache für die verstärkte Produktion von IL-9, IRF-4 und IL-1 $\beta$

Die Mastzell-spezifische NFATc1-Defizienz löst durch einen unbekanntem Mechanismus eine Überexpression von NFATc2 aus. Durch eine Stilllegung von NFATc2 sollte geklärt werden, ob die verstärkte IL-9-Expression auf eine Überexpression von NFATc2 zurückzuführen ist. Da sich in dieser Dissertation bei BMMC aus BALB/c bereits eine Abhängigkeit der IL-9-Produktion von den Faktoren IRF-4 und IL-1 $\beta$  nachweisen ließ, wurde zusätzlich deren mRNA-Expression untersucht. Mittels Transfektion wurde eine spezifische NFATc2-siRNA (siRNA 2, siRNA-Kit von OriGene) in die BMMC eingebracht. Die transfizierten Zellen wurden mit dem Calcium-Ionophor Ionomycin aktiviert und die generierte cDNA wurde in der qRT-PCR untersucht. Als Kontrolle diente die Transfektion der Mastzellen mit einer „universal scrambled negative control siRNA“. Durch die Verwendung einer Fluoreszenz-markierten siRNA konnte gezeigt werden, dass sich Mastzellen gut transfizieren lassen (siehe 2.16.1).



**Abb. 41: Durch einen spezifischen „NFATc2-Knockdown“ kommt es zur verringerten Expression von IL-9, IRF-4 und IL-1β.**

Mastzellen aus Mäusen der Stämme *Nfatc1<sup>fl/fl</sup>* und *Nfatc1<sup>ΔΔ</sup>* wurden mittels Elektroporation mit einer spezifischen NFATc2-siRNA oder mit einer „universal scrambled negative control siRNA“ transfiziert. Es folgte eine Ruhephase von 24h. Daraufhin wurden die Zellen für eine Dauer von 18h mit Ionomycin (1μM) aktiviert. An die Präparation der cDNA schloss sich die Analyse der relativen Expressionen der **(A)** NFATc2-mRNA, **(B)** IL-9-mRNA, **(C)** IRF-4-mRNA und **(D)** IL-1β-mRNA per qRT-PCR an. Unter Verwendung des Haushaltsgens *hgprt* erfolgte eine Normierung der Ergebnisse, die als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt sind (n = 7-9, \*p ≤ 0,0363, \*\*p ≤ 0,0069, \*\*\*p ≤ 0,0005).

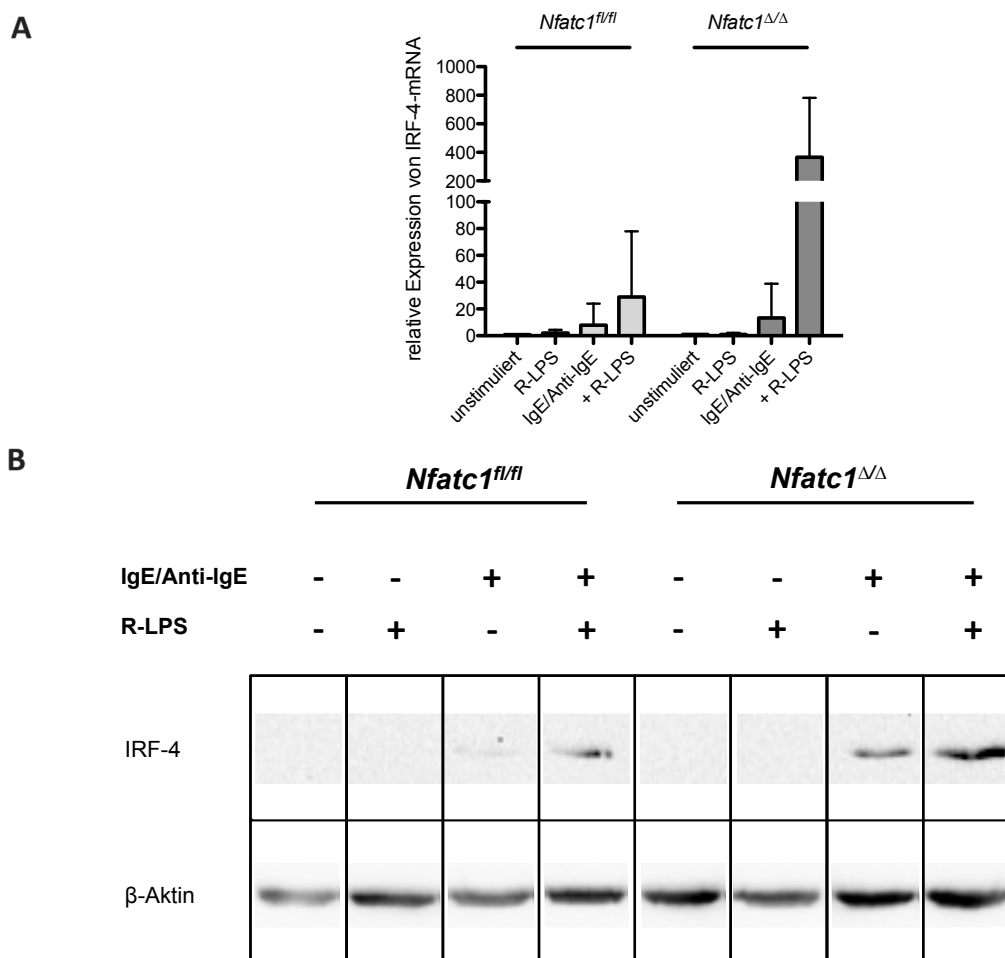
Ein „Knockdown“ von NFATc2 hat ein signifikantes Abfallen der IL-9-mRNA-Produktion in beiden Mausstämmen zur Folge (siehe Abb. 41B). Bei IRF-4 und IL-1β kommt es nach dem Verlust der NFATc2-Funktion ebenfalls zu einem Absinken der mRNA-Expression (siehe Abb. 41C, D).

Das verwendete siRNA-Kit von OriGene enthielt noch zwei andere siRNA. Mit diesen siRNA konnten die Ergebnisse der Transfektion mit siRNA 2 in gleicherweise reproduziert werden (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend lässt sich erkennen, dass eine Mastzell-spezifische Defizienz des NFAT-Faktors NFATc1 in murinen BMMC eine Kompensationsreaktion durch den Transkriptionsfaktor NFATc2 nach sich zieht. Die dadurch entstandene NFATc2-Überexpression geht mit einer gesteigerten IL-9-Expression einher. „Knockdown-Versuche“ verdeutlichen die von NFATc2 verursachte positive Wirkung auf die Produktion von IL-9, da bei Verlust von NFATc2 eine erniedrigte IL-9-Expression resultiert. Zudem zeigt das Experiment eine verminderte Expression des Transkriptionsfaktors IRF-4 und des Cytokins IL-1 $\beta$ .

### **3.2.5.1 Die NFATc2-Überexpression bewirkt eine gesteigerte IRF-4-Produktion**

Da der Transkriptionsfaktor IRF-4 bereits bei BALB/c eine entscheidende Rolle bezüglich der IL-9-Expression gespielt hatte, sollte geprüft werden, ob NFATc1-defiziente BMMC ebenfalls eine gesteigerte IRF-4-Expression besitzen. Mastzellen wurden hierfür durch Kreuzvernetzung aktiviert. Anschließend wurde die Expression von IRF-4 in der qRT-PCR bzw. im Western Blot analysiert.



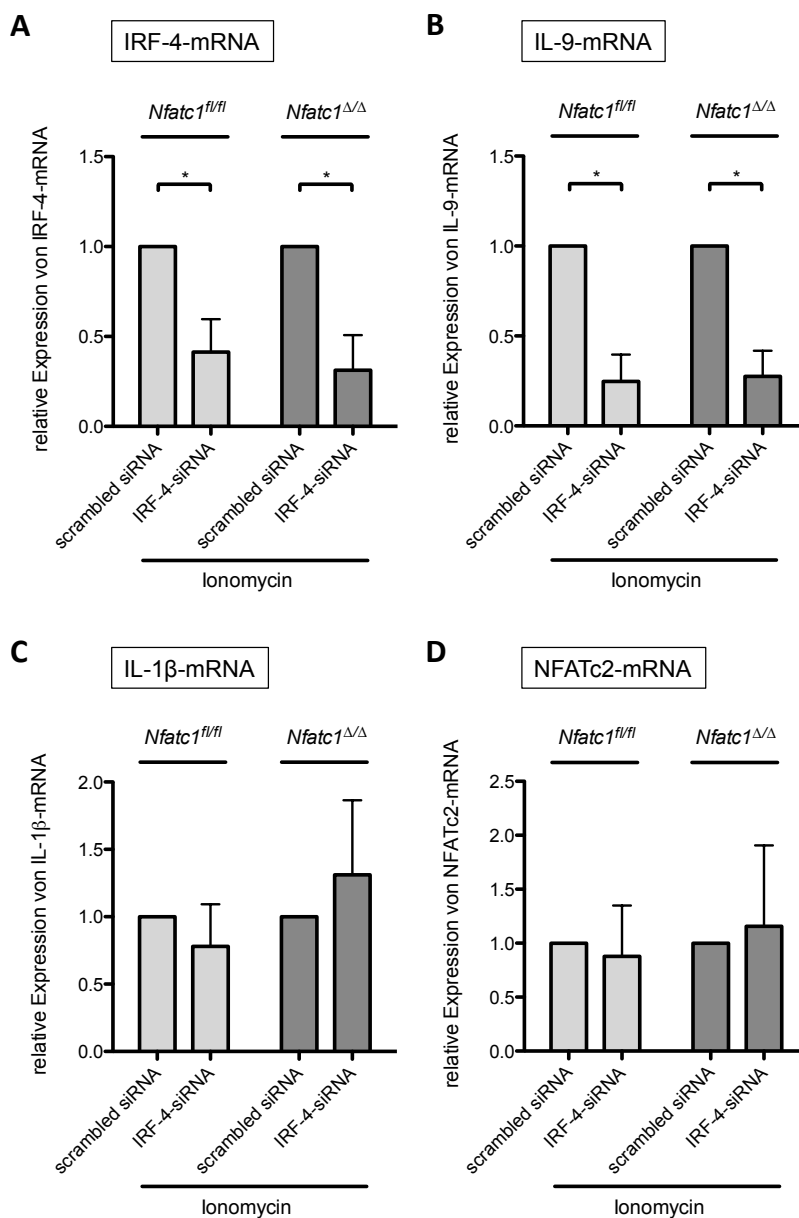
**Abb. 42: Der Transkriptionsfaktor IRF-4 ist in *Nfatc1<sup>ΔΔ</sup>* verstärkt exprimiert.**

Nach einer 48-stündigen Beladung der Mastzellen mit IgE (1 $\mu$ g/ml) erfolgte die Stimulation der BMMC mit Anti-IgE (1 $\mu$ g/ml)  $\pm$  R-LPS (200ng/ml) oder R-LPS alleine. Nach Präparation der cDNA wurde die Expression von (A) IRF-4-mRNA mittels qRT-PCR nach einer Stimulationsdauer von 18h ermittelt. Zur Normierung wurde die Expression des Gens *hprt* herangezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (n = 3-6). (B) Nach Stimulationsende wurde das Gesamtprotein der Stimulationsansätze isoliert. 15 $\mu$ g des gewonnenen Gesamtproteins wurden als Probenaufrag in den Western Blot überführt. Die Detektion von IRF-4 nach 18h geschah unter Verwendung eines spezifischen Anti-IRF-4-Antikörpers mittels Chemilumineszenz. Eine Anfärbung mit Anti- $\beta$ -Aktin diente als Beladungskontrolle. Der dargestellte Blot stellt ein repräsentatives Ergebnis aus vier unabhängigen Experimenten dar.

Bei alleiniger Stimulation mittels IgE/Anti-IgE kommt es in beiden Mastzell-Populationen zu einer vergleichbaren Bildung des Transkriptionsfaktors IRF-4. NFATc1-defiziente BMMC weisen jedoch nach Kostimulation mit R-LPS in IgE-kreuzvernetzten BMMC eine IRF-4-Überexpression auf. Dies zeigt sich sowohl auf mRNA- (siehe Abb. 42A) als auch auf Protein-Ebene (siehe Abb. 42B).

### **3.2.5.2 Durch einen „Knockdown“ von IRF-4 reduziert sich die IL-9-Expression**

Mit Hilfe der Sequenz-spezifischen RNA-Interferenz, katalysiert durch eine IRF-4-siRNA (siRNA 1 aus [109]), sollte der transiente „Knockdown“ von IRF-4 provoziert werden. Dabei kommt es durch Transfektion der Zellen mit einer spezifischen IRF-4-siRNA zur Degradation der Ziel-mRNA. Daraufhin kann kein funktionales IRF-4-Protein gebildet werden. Die Transfektion der Zellen diente zur Überprüfung der Auswirkungen einer IRF-4-Blockade auf die IL-9-Expression. Zur Kontrolle wurden die BMMC mit einer „scrambled negative control siRNA“ transfiziert. An die Ruhezeit schloss sich eine Aktivierung der transfizierten Mastzellen mit dem Calcium-Ionophor Ionomycin an. Die Expression der mRNA für IRF-4 und IL-9 wurde in der qRT-PCR ermittelt. Zusätzlich wurde auch die IL-1 $\beta$ - und NFATc2-mRNA-Expression analysiert. Durch vorangegangene Versuche mittels einer Fluoreszenz-markierten siRNA konnte eine gute Transfektionsrate der BMMC nachgewiesen werden (siehe 2.16.1).



**Abb. 43: Der „Knockdown“ von IRF-4 hat eine Verminderung der IL-9-mRNA-Expression zur Folge.**

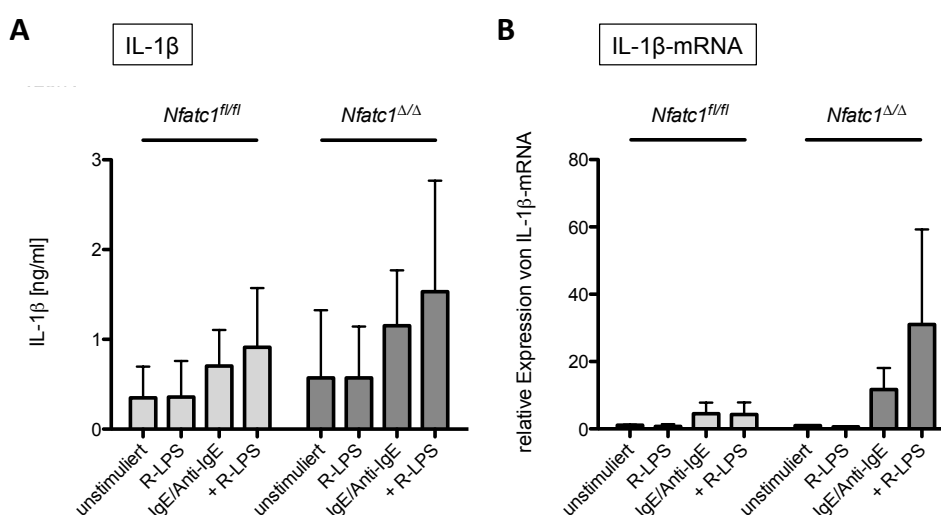
Mastzellen aus den Mausstämmen *Nfatc1<sup>fl/fl</sup>* und *Nfatc1<sup>ΔΔ</sup>* wurden mit einer spezifischen IRF-4-siRNA transfiziert. Als Kontrolle wurde eine Transfektion der Zellen mit einer „scrambled negative control siRNA“ durchgeführt. An eine 24-stündige Ruhephase schloss sich eine Stimulation der transfizierten BMMC mit Ionomycin (1μM) an. Nach Präparation der cDNA wurde in der qRT-PCR die relative Expression von (A) IRF-4-mRNA, (B) IL-9-mRNA, (C) IL-1β-mRNA und (D) NFATc2-mRNA nach einer Stimulationszeit von 18h analysiert. Mit Hilfe des Haushaltgens *hgprt* wurden die Ergebnisse normiert und als Mittelwerte ± Standardabweichung aufgetragen (n = 10-25, \*p < 0,001).

Die im „Knockdown“ eingesetzte spezifische IRF-4-siRNA bewirkt ein signifikantes Abfallen der IRF-4-mRNA-Expression (siehe Abb. 43A). Infolgedessen kann von einem Erfolg des Experiments ausgegangen werden. Durch den „IRF-4-Knockdown“ kommt es zu einer Reduktion der IL-9-mRNA-Produktion (siehe Abb. 43B). Die IL-1β-Expression zeigt sich unbeeinflusst (siehe Abb. 43C). Demzufolge verdeutlicht der Verlust der IRF-4-Funktion eine Abhängigkeit der IL-9-Produktion von der Wirkung des Transkriptionsfaktors IRF-4. Ein Zusammenhang zwischen IL-1β und IRF-4 konnte nicht gezeigt werden, da es im Hinblick

auf den Verlust von IRF-4 zu keiner Veränderung der IL-1 $\beta$ -mRNA kommt. Dies gilt auch für den Transkriptionsfaktor NFATc2. Ein „Knockdown“ von IRF-4 hat keinen Einfluss auf die Expression von NFATc2 (siehe Abb. 43D).

### 3.2.5.3 Verstärkte IL-1 $\beta$ -Expression durch die kompensatorische Wirkung von NFATc2

BMMC aus BALB/c-Mäusen zeigen eine gesteigerte IL-1 $\beta$ -Konzentration, die sich positiv auf die IL-9-Produktion der Mastzellen auswirkt. Es lag daher die Vermutung nahe, dass NFATc1-defiziente Mastzellen ebenfalls mehr IL-1 $\beta$  bilden können. Um dies zu überprüfen, wurde die IL-1 $\beta$ -Expression aktivierter Mastzellen auf Protein- und mRNA-Ebene bestimmt.



**Abb. 44: Die IL-1 $\beta$ -Expression NFATc1-defizienter BMMC ist erhöht.**

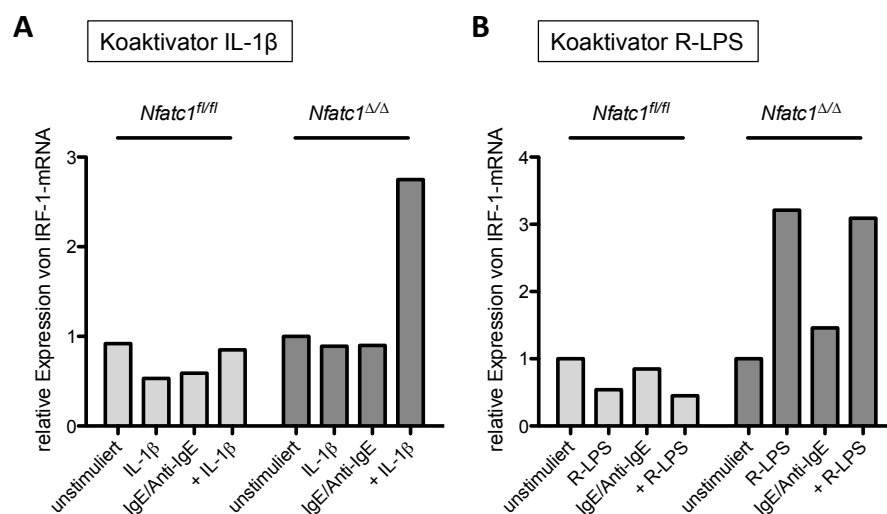
Nach der IgE-Beladung (1 $\mu$ g/ml, 48h) erfolgte die Stimulation der Zellen mit den Stimulanzen Anti-IgE (1 $\mu$ g/ml)  $\pm$  R-LPS (200ng/ml) oder R-LPS alleine. **(A)** Nach einer Stimulationszeit von 20h wurde in Brefeldin A-behandelten Zelllysaten (4h, 1 $\mu$ g/ml) die Konzentration von IL-1 $\beta$  in ng/ml mittels ELISA bestimmt. Aufgezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (n = 6-7).

**(B)** Aus den aktivierten BMMC wurde cDNA generiert und in der qRT-PCR auf die relative Expression von IL-1 $\beta$ -mRNA nach 18h überprüft. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von n = 3-6 Experimenten.

BMMC NFATc1-defizienter Mäuse zeigen bei IgE-Kreuzvernetzung eine höhere IL-1 $\beta$ -Produktion als der Wildtyp. Durch Zugabe des Kostimulator R-LPS erhöht sich die IL-1 $\beta$ -Expression nochmals (siehe Abb. 44A). Gleiches zeigt sich auf Ebene der mRNA. Die Menge der IL-1 $\beta$ -mRNA ist in BMMC mit einer Mastzell-spezifischen Defizienz des Transkriptionsfaktors NFATc1 höher als im ebenfalls untersuchten Wildtyp (siehe Abb. 44B).

### 3.2.5.4 Gesteigerte IRF-1-Expression durch die Wirkung von NFATc2 und IL-1 $\beta$

In NFATc1-defizienten BMMC zeigte sich ein verstärktes Expressionsmuster von IL-9, IRF-4 und IL-1 $\beta$ , induziert durch eine gesteigerte NFATc2-Wirkung. Da es bereits in BALB/c zu einer verstärkten Expression des auf das Cytokin IL-9 einwirkenden Transkriptionsfaktors IRF-1 kommt, sollte überprüft werden, ob dies auch auf die NFATc1-defizienten Mastzellen zutrifft. Daher wurden BMMC beider Stämme mit IgE/Anti-IgE und IL-1 $\beta$  bzw. R-LPS stimuliert. Die aus den Zellen generierte cDNA wurde in der qRT-PCR auf die Expression von IRF-1-mRNA untersucht.



**Abb. 45: Der Transkriptionsfaktor IRF-1 wird in NFATc1-defizienten BMMC vermehrt exprimiert.**

Mit IgE (1 $\mu$ g/ml, 48h) beladene BMMC wurden mit Anti-IgE (1 $\mu$ g/ml)  $\pm$  IL-1 $\beta$  (5ng/ml) bzw.  $\pm$  R-LPS (200ng/ml) oder IL-1 $\beta$  bzw. R-LPS alleine aktiviert. Anschließend wurde die RNA präpariert und durch Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Mit Hilfe der qRT-PCR wurden die relativen Expressionen der **(A)** IRF-1-mRNA bei Stimulation mit dem Koaktivator IL-1 $\beta$  und der **(B)** IRF-1-mRNA mit dem Koaktivator R-LPS nach 18h bestimmt.

In NFATc1-defizienten BMMC kommt es bei Stimulation mit IgE/Anti-IgE in Kombination mit dem Koaktivator IL-1 $\beta$  (siehe Abb. 45A) bzw. mit dem Kofaktor R-LPS (siehe Abb. 45B) im Gegensatz zu C57BL/6 zu einer gesteigerten Expression von IRF-1-mRNA.

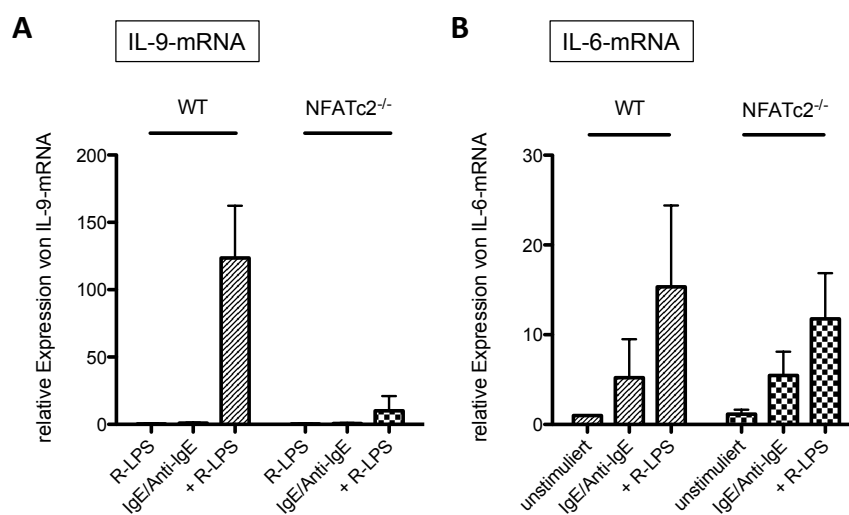
## Fazit:

- Durch den „Knockdown“ des Faktors NFATc2 kommt es in NFATc1-defizienten BMMC zu einer verringerten Expression von IL-9, IRF-4 und IL-1 $\beta$ .
  - Die NFATc2-Überexpression bewirkt eine erhöhte Bildung des Transkriptionsfaktors IRF-4.
  - Der „Knockdown“ von IRF-4 bewirkt eine verminderte IL-9-Expression, während IL-1 $\beta$  und NFATc2 nicht beeinflusst werden.
  - Durch die NFATc2-Wirkung kommt es auch zu einer Erhöhung der IL-1 $\beta$ -Produktion in den NFATc1-defizienten Mastzellen.
  - NFATc1-defiziente BMMC exprimieren verstärkt den Transkriptionsfaktor IRF-1.
- Die NFATc1-Defizienz ruft durch eine kompensatorische Wirkung durch NFATc2 die erhöhte Expression von IL-9, IRF-4, IL-1 $\beta$  und IRF-1 hervor.

### 3.2.6 Die systemische Defizienz des Faktors NFATc2 bewirkt eine Verringerung der Expressionen von IL-9, IRF-4 und IL-1 $\beta$

Zur weiteren Abklärung der Funktion des Transkriptionsfaktors NFATc2 wurden NFATc2-defiziente Mäuse auf dem genetischen BALB/c-Hintergrund eingesetzt. Diese NFATc2<sup>-/-</sup>-Mäuse haben eine Null-Mutation von NFATc2, d. h. die Mäuse können kein funktionstüchtiges NFATc2 produzieren. Um die Null-Mutation von NFATc2 zu generieren, wurde ein 47 Aminosäuren großer Bereich eines Exons ausgewählt, der für eine Protein-Domäne von NFATc2, die hochkonservierte Rel-Homologiedomäne, codiert. Dieser Bereich wurde durch Insertion einer Neomycin-Resistenz-Kassette ersetzt [97].

Aus den bisherigen Daten ist eine Induktion der IL-9-Produktion durch eine kompensatorische Wirkung des Transkriptionsfaktors NFATc2 in NFATc1-defizienten BMMC deutlich geworden. Nun stellte sich die Frage, welche Auswirkungen ein systemischer Verlust von NFATc2 auf die Regulation des Cytokins IL-9 haben würde. Ein hohes Niveau an NFATc2 führt zu gesteigerten IL-9-Spiegeln, daher sollte ein Mangel des Transkriptionsfaktors NFATc2 eine Verminderung der IL-9-Expression nach sich ziehen. Zur Überprüfung dessen wurden BMMC von NFATc2<sup>-/-</sup> in der qRT-PCR untersucht. Die Expression des Cytokins IL-6 wurde als Kontrolle eingesetzt.

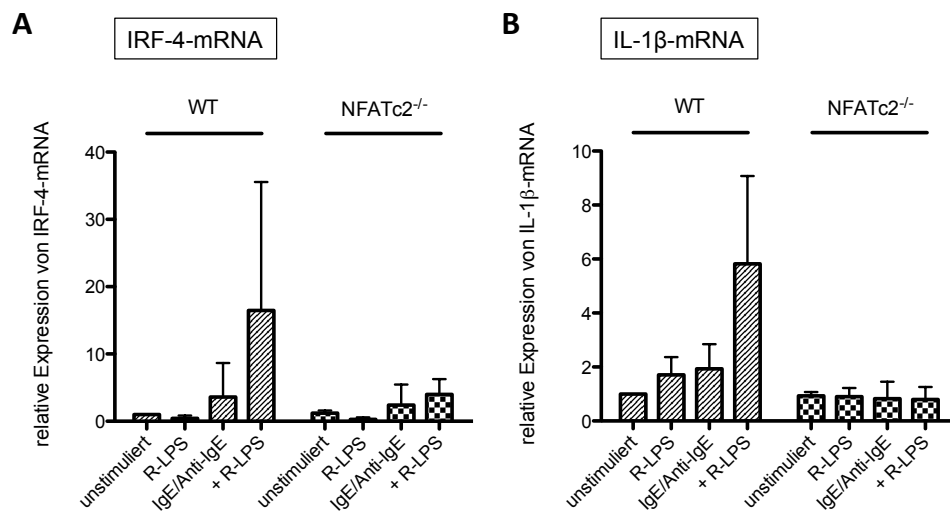


**Abb. 46: BMMC aus NFATc2<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigen eine verminderte Expression von IL-9-mRNA.**

IgE-beladene Mastzellen (1µg/ml, 48h) wurden mit Anti-IgE (1µg/ml) ± R-LPS (200ng/ml) oder R-LPS stimuliert. Die generierte cDNA wurde in der qRT-PCR auf die relativen Expressionen von **(A)** IL-9-mRNA nach 18h und **(B)** IL-6-mRNA nach 4h untersucht. Die Graphik zeigt die Mittelwerte ± Standardabweichung normiert auf das Haushaltsgen *hgprt* (n = 3-6).

Die vorangegangene Vermutung bestätigend, kommt es durch die Defizienz von NFATc2 zu einer Verringerung der IL-9-Expression in NFATc2<sup>-/-</sup> verglichen mit dem Wildtypstamm. Letzterer zeigt bei Stimulation mit dem Koaktivator R-LPS in IgE-kreuzvernetzten BMMC eine IL-9-mRNA-Expression, deren Niveau vom NFATc2-defizienten Stamm nicht erreicht werden kann (siehe Abb. 46A). Die IL-6-Produktion wird durch den Verlust des Transkriptionsfaktors NFATc2 nicht beeinflusst. Beide Mausstämmen zeigen eine vergleichbare Expression von IL-6-mRNA (siehe Abb. 46B).

In den NFATc1-defizienten Mäusen kam es durch die gesteigerte Expression von NFATc2 zu einer Erhöhung der Produktion des Transkriptionsfaktors IRF-4 und des proinflammatorischen Cytokins IL-1β. Daher sollte hier ebenfalls geprüft werden, ob sich aus dem Verlust von NFATc2 ein Rückgang der Produktion besagter Mediatoren ergab. BMMC aus NFATc2<sup>-/-</sup> und dem Wildtyp wurden nach Kreuzvernetzung durch Anti-IgE-Antikörper mit R-LPS stimuliert. Eine Analyse der cDNA erfolgte mittels der qRT-PCR nach einer Stimulationszeit von 18h.



**Abb. 47: Verminderung der IRF-4- und IL-1β-Expression als Folge des „Knockouts“ von NFATc2.**

Nach vierwöchiger Kultur wurden die Mastzellen für 48h mit IgE (1µg/ml) präinkubiert. Hiernach folgte eine Stimulation der Zellen mit Anti-IgE (1µg/ml) ± R-LPS (200ng/ml) und R-LPS für 18h. Die generierte cDNA wurde als Probe in der qRT-PCR eingesetzt. Die Graphik verdeutlicht die Mittelwerte ± Standardabweichung der **(A)** IRF-4-mRNA- und **(B)** IL-1β-mRNA-Expression normiert auf die relative Expression des Haushaltsgens *hgprt* (n = 3-5).

Fehlt der Transkriptionsfaktor NFATc2, kommt es in den murinen Mastzellen zu einer Veränderung der Expressionen von IRF-4 und IL-1β. BMMC aus NFATc2<sup>-/-</sup> bilden verglichen mit dem Wildtyp geringere Mengen des Transkriptionsfaktors IRF-4 (siehe Abb. 47A). Die IL-1β-mRNA-Expression reduziert sich in den NFATc2-defizienten Mastzellen ebenfalls (siehe Abb. 47B).

Fazit:

- Ein systemischer Verlust von NFATc2 sorgt für eine verringerte IL-9-, IRF-4- und IL-1β-Expression.
- NFATc2 zeigt Interaktionen mit IRF-4 und IL-1β.

→ Die durch den Einsatz der NFATc2<sup>-/-</sup>-Mäuse gewonnenen Ergebnisse untermauern die durch Untersuchung der NFATc1-defizienten Mastzellen erhaltenen Resultate.

Abschließend zeigen NFATc1-defiziente BMMC eine NFATc2-Überexpression bei Stimulation der Anti-IgE-kreuzvernetzten Mastzellen mit dem Koaktivator R-LPS. Der Transkriptionsfaktor NFATc2 wirkt direkt auf die Expression des Cytokins IL-9 und verstärkt diese. Durch eine indirekte Wirkung von NFATc2 auf die Expression der Transkriptionsfaktoren IRF-4 und IRF-1 und des proinflammatorischen Cytokins IL-1β kommt es zusätzlich zur Steigerung der IL-9-Produktion. „Knockdown“-Experimente verdeutlichen die positive Wirkung von NFATc2 und IRF-4 auf die IL-9-Produktion in NFATc1-defizienten BMMC. Die Produktion von IL-6 ist indessen von der NFATc1-Defizienz unbeeinflusst.

## 4 Diskussion

### 4.1 Mausstamm-spezifische Effekte der Regulation der IL-9-Expression in Mastzellen

Die Regulation der Expression des Cytokins **IL-9** in murinen Mastzellen ist bislang ungenügend verstanden. Ziel dieser Dissertation war es, die zu Grunde liegenden Mechanismen in BMMC genauer zu beleuchten. IL-9 wurde ursprünglich als Cytokin identifiziert, das in der Hauptsache von Th2-Lymphozyten gebildet wird [138]. Im Jahr 2008 wurde eine neue Subpopulation der T-Helferzellen beschrieben [139], [140] die aus naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Gegenwart von IL-4 und des transforming growth factor  $\beta$  (TGF  $\beta$ ) entstehen. Vermittelt durch die Transkriptionsfaktoren IRF-4 und PU.1 bilden diese Zellen vorzugsweise das Cytokin IL-9 [141]. Da diese IL-9-produzierenden Zellen neben IL-9 und IL-10 keine weiteren Th2-Cytokine produzieren [142], können sie von den Th2-Zellen als eigene Zellpopulation abgegrenzt werden und wurden dementsprechend als Th9-Zellen benannt [143]. Seit Entdeckung der Th9-Zellen zählt IL-9 nicht mehr zu den Th2-Cytokinen im klassischen Sinne.

Im Rahmen dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass aus BALB/c generierte BMMC nach Stimulation größere Mengen an IL-9 produzieren, als solche des Mausstammes C57BL/6 (siehe Abb. 11A, C). Werden BMMC durch eine Antigen-vermittelte Kreuzvernetzung (Signal 1) der mastzelleigenen Fc $\epsilon$ RI-Rezeptoren aktiviert, zeigen beide Mausstämmen eine vergleichbare IL-9-Expression. Auf alleinige Stimulation der Zellen mit dem Koaktivator R-LPS (Signal 2) wird kein IL-9 gebildet. Kommt es jedoch zu einer Kombination von Signal 1 und Signal 2, exprimieren BMMC aus BALB/c deutlich mehr IL-9 als die gleichbehandelten BMMC aus C57BL/6. Das Cytokin IL-6 zeigt keine Expressionsunterscheide zwischen den Mausstämmen, weshalb es als Kontrolle eingesetzt wurde (siehe Abb. 11B, D). Ziel war es, die molekularen Ursachen der in BALB/c verstärkten IL-9-Expression aufzuklären.

Über die Transkriptionskontrolle von IL-9 war seit längerem bekannt, dass das proinflammatorische Cytokin **IL-1** eine positive Wirkung auf die Expression des Cytokins IL-9 in aktivierten Mastzellen aus BALB/c-Mäusen besitzt [48]. Dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Nach Stimulation IgE-beladener Zellen mit dem Koaktivator R-LPS bilden BMMC aus BALB/c verglichen mit C57BL/6 sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene mehr IL-1 $\beta$  (siehe Abb. 15). Das von Mastzellen sezernierte IL-1 bindet auf autokrinem Wege an den zugehörigen IL-1-Rezeptor (IL-1R) auf der Zelloberfläche. Der IL-1R ist - wie der LPS-Rezeptor TLR-4 auch - Teil der IL-1R/Toll-like

Rezeptor-Superfamilie und kann in zwei Typen unterschieden werden: Typ I und Typ II (IL-1RI, IL-1RII) [144]. Die beiden Rezeptoren binden mit unterschiedlicher Affinität die Cytokine IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  und darüberhinaus den IL-1-Rezeptorantagonisten (IL-1Ra). IL-1RII bindet zwar IL-1, jedoch kommt es nicht zu einer Signalweiterleitung, da der Rezeptor die Aktivität seiner Liganden inhibiert und damit die Formation des IL-1-Rezeptorkomplexes negativ beeinflusst [145]. Durch Bindung von IL-1 an den IL-1RI kommt es hingegen zu einer Konformationsänderung des IL-1RI, wodurch das IL-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP) an den IL-1RI bindet. Dadurch formiert sich der als Heterodimer vorliegende IL-1-Rezeptorkomplex. Als zentrales Element der Signalweiterleitung steht am Ende die Aktivierung von NF- $\kappa$ B [146].

**Anakinra** ist ein Antagonist der IL-1-Aktivität. Durch Bindung von Anakinra an den IL-1RI unterbleibt die Bindung des IL-1RAcP [147], [148]. Durch den Einsatz des IL-1Ra Anakinra konnte die positive Wirkung von endogenem IL-1 $\beta$  auf die IL-9-Expression verdeutlicht werden. Werden BMMC aus BALB/c mit Anakinra behandelt, erfolgt eine Drosselung der IL-9-Produktion in IgE/Antigen-aktivierten Mastzellen nach Stimulation mit R-LPS (siehe Abb. 14A, C). Da sich für das endogene IL-1 $\beta$  eine wichtige Rolle für die IL-9-Regulation herauskristallisiert hatte, sollte sich durch Zugabe von **exogenem IL-1 $\beta$**  eine Steigerung der IL-9-Produktion ergeben. Die Zugabe von exogenem IL-1 $\beta$  zeigte jedoch bei C57BL/6 wenig Einfluss auf die IL-9-Produktion (siehe Abb. 16A). IgE-kreuzvernetzte BMMC aus C57BL/6-Mäusen bilden im Vergleich zu BMMC aus BALB/c nach Gabe von IL-1 $\beta$  kaum IL-9. Somit lässt sich die IL-9-Produktion durch exogenes IL-1 $\beta$  in C57BL/6 nicht steigern, weshalb es einen weiteren limitierenden Faktor der IL-9-Expression in C57BL/6 geben muss.

Im Folgenden wurde die Expression einzelner Mitglieder der **IL-1/TLR-4-Signalkaskade** untersucht. Mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen wurden die Rezeptoren für IL-1 $\beta$  (IL-1RI) und LPS (TLR-4/MD-2) auf der Zelloberfläche analysiert. Es konnten keine Expressionsunterschiede der Oberflächenrezeptoren IL-1RI und TLR-4/MD-2 zwischen den beiden Mausstämmen C57BL/6 und BALB/c ermittelt werden (siehe Abb. 18B, D). Die in der Durchflusszytometrie erhaltenen Ergebnisse bestätigen bereits publizierte Daten, nach denen BMMC aus C57BL/6 und BALB/c ein vergleichbares Expressionsmuster des TLR-4 auf der Zelloberfläche aufweisen [149]. Gleiches ergab sich für die Expression von CD117 und des hochaffinen IgE-Rezeptors Fc $\epsilon$ RI. C57BL/6 und BALB/c weisen keine Unterschiede in der Expression von CD117 und Fc $\epsilon$ RI auf der Zelloberfläche auf (siehe Abb. 18A, C). Zusätzlich wurde die Expression der Adaptermoleküle MD-2, TRIF, MyD88 und TRAM in der qRT-PCR analysiert. Auch hier zeigen sich vergleichbare Expressionsmuster zwischen C57BL/6 und BALB/c (siehe Abb. 20). Somit können weder Expressionsunterschiede der Oberflächenrezeptoren noch einzelner Adaptermoleküle des IL-1R/TLR-4-Signalweges für

die gesteigerte IL-9-Produktion von BMMC aus BALB/c verantwortlich gemacht werden. Neben den an der Signalweiterleitung beteiligten Adaptermolekülen wurde auch das transmembrane regulatorische Protein SIGIRR (Single Ig IL-1-related receptor) näher betrachtet, das ebenfalls der Familie der IL-1R/Toll-like Rezeptoren zugehörig ist [145]. SIGIRR fungiert als negativer Regulator des IL-1R/TLR-4-Signalweges, indem SIGIRR die Heterodimerisierung des IL-1-Rezeptorkomplexes unterbindet. Zusätzlich konkurriert SIGIRR mit MyD88 und IRAK um die Bindung an die TIR-Domänen, was eine Minderung der Signalweiterleitung und damit eine reduzierte NF- $\kappa$ B-Bildung zur Folge hat [150]. Eine hohe Expression des Proteins SIGIRR könnte daher die Signalweiterleitung stark inhibieren, wodurch die verminderten IL-9-Werte in C57BL/6 zu erklären wären. Entgegen den Erwartungen zeigen C57BL/6 gegenüber BALB/c jedoch keine erhöhte SIGIRR-Expression. Stattdessen ist die Expression der SIGIRR-mRNA in BMMC aus BALB/c deutlich erhöht (Daten nicht gezeigt), weshalb eine negative Regulation der IL-9-Expression durch SIGIRR in C57BL/6 ausgeschlossen werden kann.

Frühere Arbeiten an Th9-Zellen verdeutlichen eine entscheidende Rolle des Transkriptionsfaktors **IRF-4** an der Entwicklung und Funktion dieser IL-9-produzierenden T-Zellen [126], [151]. Der Faktor IRF-4 ist Teil der interferon regulatory factor (IRF)-Familie und wird maßgeblich von Immunzellen exprimiert [125]. Allen Mitgliedern der IRF-Familie ist eine hochkonservierte N-terminale DNA-Bindedomäne gemeinsam, die eine Helix-Turn-Helix-Struktur aus fünf Tryptophan-Resten aufweist. Am C-Terminus besitzen die IRF (außer IRF-1 und IRF-2 [152]) eine regulatorische Domäne, die für die Transaktivierung und Bindung von Transkriptionsfaktoren oder anderen Faktoren der IRF-Familie verantwortlich ist [153]. Die Bildung von IRF-4 wird nicht wie bei den anderen IRF durch Interferone gesteuert, sondern durch diverse mitogene Stimuli, wie z. B. LPS, oder durch die Aktivierung von Antigenrezeptoren angeregt. Diese Stimuli schalten den NF- $\kappa$ B-Signalweg an, der den *irf-4*-Promotor durch NF- $\kappa$ B-Heterodimere aktiviert [125]. Der *irf-4*-Promotor enthält neben NF- $\kappa$ B-Bindestellen [154], [155] auch Bindestellen für den Transkriptionsfaktor PU.1 [156], [157] und für IRF-4 selbst. Dies deutet darauf hin, dass das IRF-4-Protein ein positives Rückkopplungssignal für die eigene Genexpression darstellen könnte [158].

Neu gebildetes IRF-4 bindet - vermittelt durch die DNA-Bindedomäne - an sogenannte Interferon-stimulated Response Elements (ISRE) im Promotorbereich IRF-regulierter Gene (Konsensussequenz: 5'-AANNGAAA-3') [159]. Anhand von Realtime- und Western Blot-Daten konnte eine gesteigerte Expression des Transkriptionsfaktors IRF-4 in BALB/c nach Stimulation der IgE-kreuzvernetzten BMMC mit dem Kofaktor R-LPS nachgewiesen werden (siehe Abb. 21, Abb. 22), die zur erhöhten IL-9-Produktion der BMMC beiträgt. Die gesteigerte IRF-4-Produktion weist eine Abhängigkeit vom proinflammatorischen Cytokin

IL-1 $\beta$  auf, da durch die Wirkung des IL-1Ra Anakinra eine verminderte IRF-4-Expression resultiert (siehe Abb. 21). Mittels einer spezifischen IRF-4-siRNA konnte eine transiente Stilllegung des *irf-4*-Gens erreicht werden. Durch den Verlust der IRF-4-Proteinfunktion kommt es in BMMC aus BALB/c zu einer Reduktion der IL-9-Expression (siehe Abb. 23B), was eine Abhängigkeit der IL-9-Regulation vom Transkriptionsfaktor IRF-4 verdeutlicht. Die IL-1 $\beta$ -Expression indessen zeigt sich von dem „IRF-4-Knockdown“ unbeeinflusst (siehe Abb. 23C). Somit konnte anhand der Versuche mit dem IL-1Ra Anakinra zwar eine Beeinflussung des Transkriptionsfaktors IRF-4 durch das Cytokin IL-1 $\beta$  aufgezeigt werden, eine Wirkung von IRF-4 auf IL-1 $\beta$  konnte jedoch nicht festgestellt werden. Die Vermutung liegt nahe, dass durch Bindung des vermehrt exprimierten Transkriptionsfaktors IRF-4 an den *il-9*-Promotor eine Transaktivierung des Promotors mit einer gesteigerten Expression von IL-9 einhergeht. Kürzlich publizierte Daten, die eine Bindung von IRF-4 an den murinen *il-9*-Promotor in BMMC nachweisen konnten [160], bestätigen diese These.

Durch die Verwendung eines Mausstammes mit einer **Mastzell-spezifischen IRF-4-Defizienz** (*Mcpt5-Cre<sup>+</sup> Irf-4<sup>fl/fl</sup>*, siehe Abb. 24) konnte die essentielle Rolle des Transkriptionsfaktors IRF-4 an der IL-9-Regulation validiert werden. In IRF-4-defizienten BMMC kommt es nach Stimulation der Zellen, verglichen mit dem Wildtyp, zu einer reduzierten IL-9-Expression (siehe Abb. 26A, C). Währenddessen wird die Produktion von IL-6 und IL-1 $\beta$  von der IRF-4-Defizienz nicht beeinträchtigt (siehe Abb. 26B, D; Abb. 27).

Eine mögliche Erklärung für die verminderte Produktion von IRF-4 in C57BL/6 könnte die Variation der Expression der microRNA **miR-125b** liefern. MicroRNAs sind kleine nicht-kodierende RNA-Moleküle mit einer Länge von 19-25 Nukleotiden, die die Genexpression durch Degradation oder eine inhibierte Translation der Ziel-mRNA regulieren [161]. Durch funktionelle und genetische Analysen konnte gezeigt werden, dass miR-125b durch Repression auf mRNA- und Protein-Ebene den Transkriptionsfaktor IRF-4 inhibiert [162]. Durch Reportergenuntersuchungen konnte eine Bindung der miR-125b an den 3' UTR<sup>44</sup> von IRF-4 nachgewiesen werden [163]. Weitere Untersuchungen in Bezug auf die Expression dieser microRNA könnten klären, ob miR-125b in C57BL/6 verstärkt gebildet wird und eine Repression von IRF-4 bewirkt, wodurch sich die in C57BL/6 beobachtete verminderte IL-9-Produktion ergibt.

IRF-4 kann mit verschiedenen anderen Transkriptionsfaktoren interagieren, darunter der ETS-Faktor<sup>45</sup> **PU.1**. Der Transkriptionsfaktor PU.1 ist ein richtungsweisender Regulator der Myelopoese und wird vorherrschend in Zellen der hämatopoetischen Linie exprimiert. PU.1 bindet an das DNA-Motif 5'-GGAA-3' und rekrutiert anschließend den Faktor IRF-4. Die

---

<sup>44</sup> UTR:

untranslated region, Randbereiche der mRNA, welche nicht für Proteine codieren

<sup>45</sup> ETS-Faktor:

E-twenty six-Faktor

Bindung von PU.1 an die DNA ist hierbei abhängig von der spezifischen Phosphorylierung eines Serins (Ser148) in der PEST-Region<sup>46</sup> von PU.1 [164], [165]. Durch Protein-Protein-Interaktionen zwischen den DNA-Bindedomänen von IRF-4 und PU.1 und durch Interaktion der phosphorylierten PEST-Region von PU.1 mit der regulatorischen Domäne von IRF-4 kommt es zur Bildung eines stabilen ternären Komplexes zusammen mit der DNA [125], [166], [124]. Eine vermehrte Expression von PU.1 in BMMC aus BALB/c könnte die Wirkung von IRF-4 verstärken, konnte jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Der Transkriptionsfaktor IRF-4 interagiert durch seinen C-Terminus auch mit dem NFAT-Faktor **NFATc2**. IRF-4 und NFATc2 binden beispielsweise an IRF-Bindestellen im *il-4*-Promotor, die mit NFAT-Bindestellen überlappen und es kommt zusammen mit dem Transkriptionsfaktor c-maf zu einer synergistischen Transaktivierung des *il-4*-Promotors [159]. Auch in BMMC aus BALB/c konnte eine signifikant erhöhte NFATc2-Expression nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Weiterführende Experimente könnten überprüfen, ob der oben beschriebene Synergismus zwischen IRF-4 und NFATc2 auch in BMMC vorliegt und zur erhöhten IL-9-Expression beiträgt. Zusätzlich zu NFATc2 wurde auch der Faktor NFATc1 überprüft. Die NFATc1-Expression wird von zwei verschiedenen Promotoren reguliert: a) dem induzierbaren P1-Promotor und b) dem konstitutiv aktiven P2-Promotor. Es wurde die Expression ausgehend von beiden Promotoren analysiert und es fanden sich vergleichbare Expressionmuster der beiden Isoformen in C57BL/6 und BALB/c (Daten nicht gezeigt).

Neben IRF-4 wurde auch der Transkriptionsfaktor **IRF-1**, ein weiteres Mitglied der IRF-Familie, untersucht. Typische Auslöser der IRF-1-Expression sind Interferone, das proinflammatorische Cytokin IL-1, Viren oder doppelsträngige RNA [167], [168]. Laut einer Publikation aus dem Jahr 2014 soll IRF-1 zusammen mit IL-1 und STAT1 Teil einer Signalkette sein, die zur Expressionserhöhung von IL-9 in Th9-Zellen führt. IL-1 bedingt dabei die Phosphorylierung des Faktors STAT1, der darauf an den *irf-1*-Promotor bindet und die IRF-1-Expression begünstigt. IRF-1 wiederum reguliert die Expression von IL-9 durch Bindung an IRF-1-Bindestellen im *il-9*-Promotor [128]. Diese auch als IRF-E bezeichneten Bindestellen mit der Konsensussequenz 5'-G(A)AAAG/CT/CGAAAG/CT/C-3' ermöglichen die Regulation der Genaktivität [169]. Entsprechend der erhöhten IL-1 $\beta$ -Werte wird in BMMC aus BALB/c die IRF-1-Expression durch Zugabe des Kofaktors IL-1 $\beta$  bzw. R-LPS in BALB überexprimiert (siehe Abb. 28), was eine Beteiligung von IRF-1 an der gesteigerten IL-9-Expression nahe legt. Die Expression von STAT1 ist indessen bei beiden Mausstämmen vergleichbar (Daten nicht gezeigt). In humanen Zellen konnten bereits

---

<sup>46</sup> PEST-Region: Prolin-Glutamat-Serin-Threonin-reiche Region

NF- $\kappa$ B-Bindestellen im *irf-1*-Promotor nachgewiesen werden [170], [171], [172], was auf eine Regulation der IRF-1-Expression durch NF- $\kappa$ B-Faktoren schließen lässt. Zudem ist IRF-1 nachweislich in der Lage, mit den NF- $\kappa$ B-Faktoren p50, p65 und c-Rel zu interagieren [173], [174], [175]. Einen Aspekt für weitere Arbeiten über die Funktion von IRF-1 könnte die Analyse der Gegenregulation von IRF-1 und dem Transkriptionsfaktor IRF-4 liefern. Unveröffentlichte Arbeiten am Institut für Immunologie der Universitätsmedizin Mainz haben gezeigt, dass die IL-9-Expression in BMMC aus dem Inzuchtstamm C57BL/6, die mit einem den IL-9-Promotor-tragenden Plasmid transfiziert wurden, durch Zugabe von IRF-1 vermindert wurde. Das Gegenteil trat durch Gabe des Faktors IRF-4 auf, hier kam es zu einer Erhöhung der IL-9-Produktion (persönliche Mitteilung von Dr. M. Klein).

Da es sich bei IL-1 und LPS um starke Aktivatoren des NF- $\kappa$ B-Weges handelt und es in BALB/c zu einer vermehrten Expression diverser NF- $\kappa$ B-Zielgene kommt, wurde die Aktivität der **NF- $\kappa$ B-Faktoren** mittels Reportergergenuntersuchungen ermittelt. Zudem konnte die Bindung der Faktoren p50, p65 und c-Rel an den *il-9*-Promotor mittels EMSA<sup>47</sup> bereits für Mastzellen beschrieben werden [51]. Die Reportergergenuntersuchungen weisen eine erhöhte Aktivität der NF- $\kappa$ B-Faktoren in BMMC aus BALB/c auf (siehe Abb. 29). Dies deckt sich mit bereits publizierten Daten, aus denen hervorgeht, dass Makrophagen aus BALB/c eine prominentere NF- $\kappa$ B-Aktivität besitzen, die über einen längeren Zeitraum aktiv ist verglichen mit C57BL/6 [176]. Um auszuschließen, dass es bei C57BL/6 bedingt durch eine verstärkte negative Regulation zu einer verminderten NF- $\kappa$ B-Aktivität kommt, wurde die Expression verschiedener regulatorischer Moleküle, die den NF- $\kappa$ B-Weg negativ beeinflussen wie CYLD<sup>48</sup>, A20, COMMD1<sup>49</sup> und die microRNAs miR-155 und miR146a analysiert. Allein bei A20 und miR-146a zeigten sich Unterschiede zwischen C57BL/6 und BALB/c. Entgegen der Erwartung, BMMC aus C57BL/6 würden eine höhere Expression an regulatorischen Molekülen aufweisen, sind die Expression von A20 (siehe Abb. 35) und miR-146a (Daten nicht gezeigt) jedoch in BMMC aus BALB/c erhöht, was einer vermehrten negativen Regulation in C57BL/6 widerspricht.

Da das eingesetzte NF- $\kappa$ B-Reportergergen nur eine generelle Aussage über die NF- $\kappa$ B-Faktoren erlaubt, wurde die Expression einzelner Mitglieder der NF- $\kappa$ B-Familie in der qRT-PCR untersucht. Allen voran das Protein **c-Rel**, das als Teil der NF- $\kappa$ B-Familie in fast allen Zellen gebildet wird [177]. Die Transkriptionsfaktoren der NF- $\kappa$ B-Familie spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von Immunantworten, Entzündungen, Wachstum und Apoptose. Charakteristisch für diese Proteine ist eine N-terminale Rel-Homologie-Domäne, die für die DNA-Bindung, die Dimerisierung und die Bindung von I $\kappa$ B verantwortlich ist.

---

<sup>47</sup> EMSA: Electrophoretic Mobility Shift Assay

<sup>48</sup> CYLD: Cyldromatosis

<sup>49</sup> COMMD1: copper metabolism (Murr1) domain containing 1

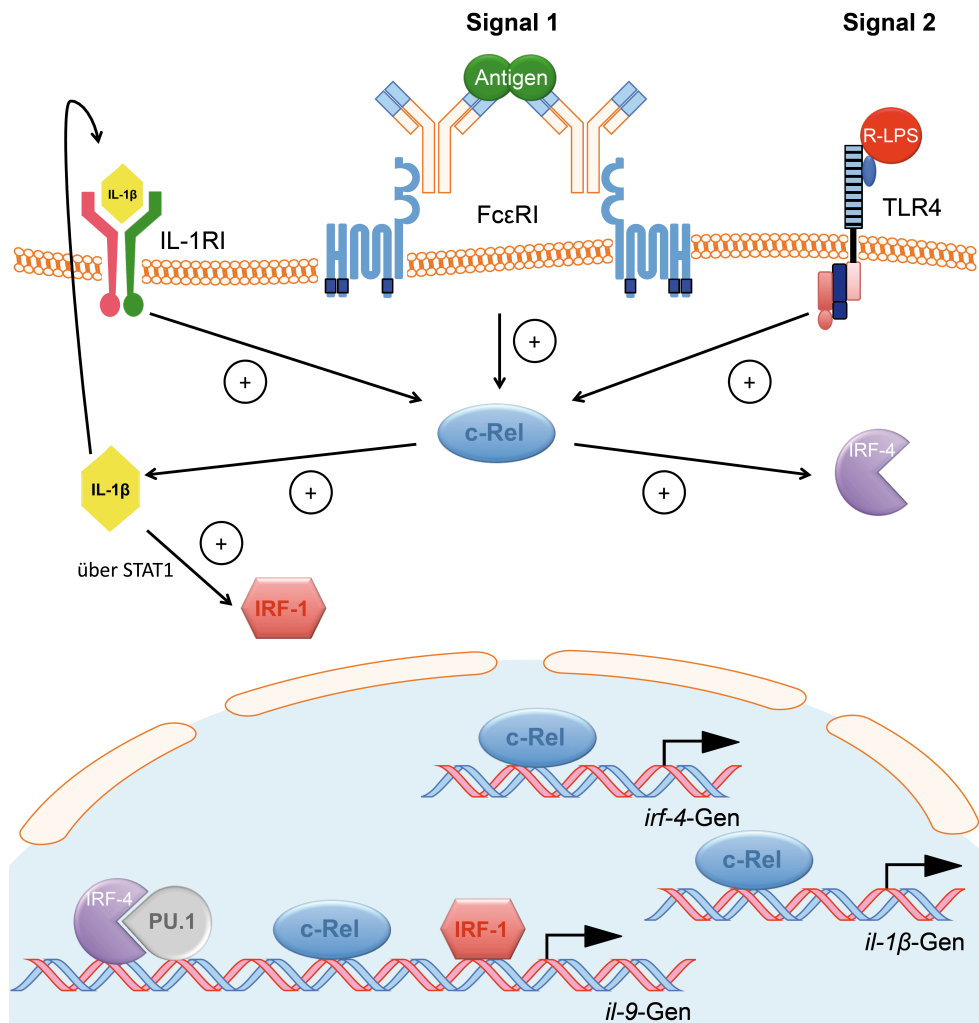
Zudem enthält diese Domäne das Signal für die nukleäre Translokation. Im Falle von c-Rel kommt ferner eine Transaktivierungsdomäne hinzu, deren Aktivität durch eine Stimulations-induzierte Phosphorylierung noch gesteigert werden kann [59]. Die Expression von c-Rel wird durch NF- $\kappa$ B-Bindestellen im Promotorbereich von NF- $\kappa$ B-Faktoren und durch Autoregulation von c-Rel selbst reguliert [133], [134], [132].

Ursprünglich wurde c-Rel als zelluläres Homolog des Onkogens v-rel, einem Retrovirus bei Vögeln, identifiziert [178]. Im inaktiven Zustand liegt c-Rel, wie alle NF- $\kappa$ B-Faktoren, als Dimer gebunden an spezifische Inhibitoren (I $\kappa$ B $\alpha$ ) im Cytoplasma vor. Durch diverse Stimuli wird I $\kappa$ B $\alpha$ , vermittelt durch den IKK-Komplex<sup>50</sup>, phosphoryliert, ubiquitinyliert und anschließend Proteasomen-vermittelt degradiert [177]. Durch den Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$  wird das nukleäre Translokationssignal frei, das NF- $\kappa$ B-Dimer kann in den Nukleus translozieren und dort die Genaktivität von NF- $\kappa$ B-Zielgenen beeinflussen [59]. Im Nukleus bindet c-Rel an eine Zielsequenz (5'-NGGRN(A/T)TTCC-3'), die von der Konsensus-NF- $\kappa$ B-Bindestelle etwas differiert [179].

Mastzellen aus Mäusen des BALB/c-Stammes weisen eine verstärkte Expression von c-Rel auf (siehe Abb. 31). Mittels Western Blot-Daten konnte zudem im Nukleus von BMMC aus BALB/c eine erhöhte c-Rel-Menge ausgemacht werden (siehe Abb. 32). Die mit der gesteigerten IL-9-Produktion einhergehende erhöhte c-Rel-Expression legt einen Zusammenhang zwischen der Menge an IL-9 und c-Rel nahe, da im murinen *il-9*-Promotor drei Bindestellen für c-Rel nachgewiesen werden konnten [51]. Zur Überprüfung der Rolle von c-Rel an der Regulation des Interleukins IL-9 wurde ein c-Rel-Inhibitor verwendet. Der Inhibitor **IT-603** bedingt eine Konformationsänderung von c-Rel und führt damit zu einer Blockade der Transaktivierung [100]. Durch Blockade von c-Rel mittels IT-603 konnte gezeigt werden, dass der Faktor c-Rel maßgeblich an der Regulation von IL-9 beteiligt ist. Wird die Aktivität von c-Rel blockiert, kommt es zu einer verminderten IL-9-Expression (siehe Abb. 33A). Auch die Expression des proinflammatorischen Cytokins IL-1 $\beta$  und die des Transkriptionsfaktors IRF-4 - einem c-Rel-Zielgen [129] - sinkt durch die Inhibition von c-Rel ab (siehe Abb. 34).

---

<sup>50</sup> IKK-Komplex: IkappaB Kinase-Komplex, der I $\kappa$ B phosphoryliert



**Abb. 48: Mechanismus der IL-9-Regulation in BMMC aus BALB/c.**

In IgE-kreuzvernetzten BMMC aus BALB/c kommt es nach Stimulation mit dem Koaktivator R-LPS zur vermehrten Expression des Transkriptionsfaktors c-Rel. Der NF-κB-Faktor c-Rel wiederum steigert die Expression des Cytokins IL-1β und des Transkriptionsfaktors IRF-4. Über STAT1 kommt es vermittelt durch IL-1β zur Produktion des Transkriptionsfaktors IRF-1. Die gebildeten Faktoren c-Rel, IRF-4 und IRF-1 binden an den *il-9*-Promotor und sind positiv an der Regulation der IL-9-Expression beteiligt.

Zusammenfassend konnte die positive Wirkung von c-Rel auf die Produktion von IL-9, IL-1β und IRF-4 nachgewiesen werden (siehe Abb. 48). Durch verstärkte Expression des NF-κB-Faktors c-Rel kommt es nachfolgend zu erhöhten IL-1β- und IRF-4-Werten, die wiederum auf die IL-9-Expression einwirken. Dabei ist zu beachten, dass die IRF-4-Expression von IL-1β abhängig ist. Durch welche Faktoren die gesteigerte c-Rel-Expression letztendlich ausgelöst wird, bleibt jedoch bis jetzt unklar und könnte der Anstoß für weitere Untersuchungen bezüglich der Regulation der IL-9-Expression in BMMC des Maustammes BALB/c sein.

## 4.2 Die Bedeutung der Transkriptionsfaktoren NFATc1 und NFATc2 für die Expression von IL-9 in Mastzellen

Die Faktoren der **NFAT-Familie** wurden als Transkriptionsfaktoren beschrieben, die die T-Zell-Antwort nach Antigenrezeptorbindung regulieren [180]. Murine Mastzellen exprimieren die Transkriptionsfaktoren NFATc1, NFATc2 und NFATc3 [70], [71], [72]. Anhand von Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass der NFAT-Faktor NFATc3 in Bezug auf die Produktion der Cytokine TNF und IL-13 in Mastzellen entbehrlich ist. Die Faktoren NFATc1 und NFATc2 hingegen spielen eine essentielle Rolle bei der Kontrolle dieser gerade genannten Cytokine [92]. Die **Regulation der NFAT-Faktoren** - allen voran NFATc1 in Mastzellen - ist bislang wenig erforscht. Durch die Koexistenz unterschiedlich regulierter Isoformen, die teils verschiedene Zielgene transaktivieren, wird die Untersuchung der Funktionen dieser NFAT-Faktoren an der Genregulation erschwert. Zudem können einige NFAT-Faktoren in ihrer Funktion durch andere NFAT-Faktoren ersetzt werden, so dass ihre Funktion kompensiert wird [181].

Zur weiteren Aufklärung der NFAT-Funktionen in Mastzellen sollte daher in der vorliegenden Arbeit die Rolle und Funktion des NFAT-Faktors **NFATc1** in BMMC durch den Wegfall der NFATc1-Funktion untersucht werden. Da ein systemischer Verlust der Genfunktion von NFATc1 durch Defekte in der kardialen Morphogenese ein Fehlen der Aorten- und Pulmonalklappen bedingt, sterben die NFATc1-defizienten Embryonen *in utero* [182]. Daher wurden zur Untersuchung der NFATc1-Funktion in Mastzellen Mäuse mit einem geflochtenen *nfatc1*-Gen [96] mit *Mcpt5-Cre*<sup>+</sup>-Mäusen gekreuzt, die eine Cre-Rekombinase in Mastzellen exprimieren. Die aus der Kreuzung entstammenden Nachkommen (*Mcpt5-Cre*<sup>+</sup> *Nfatc1*<sup>ΔΔ</sup>) weisen eine **Mastzell-spezifische NFATc1-Defizienz** auf (siehe Abb. 36). Da die Beteiligung von NFATc1 an der Regulation von TNF, IL-9 und IL-13 bereits vermutet wurde [136], wurde die Produktion von IL-9 und des NFAT-unabhängigen Cytokins IL-6 analysiert. Die NFATc1-defizienten BMMC zeigen eine durch den Einfluss des als Koaktivators fungierenden R-LPS bedingte Erhöhung der Expression von **IL-9**, die in diesem Maße auch in BMMC aus BALB/c beobachtet werden konnte. Eine Kombination von Signal 1 (IgE/Anti-IgE) und Signal 2 (R-LPS) weist eine Steigerung der IL-9-Expression in aktivierten NFATc1-defizienten BMMC verglichen mit dem Wildtyp auf. Werden die Zellen jedoch durch Signal 1 oder durch Signal 2 alleine stimuliert, bilden die Mastzellen aus dem Wildtyp und den NFATc1-defizienten Mäusen eine vergleichbare Menge an IL-9 (siehe Abb. 37A, C). Das Cytokin IL-6 ist von der NFATc1-Defizienz unbeeinflusst (siehe Abb. 37B, D). Ebenso konnten mittels Durchflusszytometrie keine Unterschiede in der Rezeptorexpression von

TLR-4/MD-2 und IL-1RI auf der Zelloberfläche der BMMC ausgemacht werden (siehe Abb. 38).

Da durch siRNA-vermittelte „Knockdown“-Versuche gezeigt werden konnte, dass NFATc1 an der Regulation der IL-9-Expression beteiligt ist [136], wurde die **Aktivität der NFAT-Faktoren** mittels Reporter-genuntersuchungen ermittelt. Die NFATc1-Defizienz bewirkt eine erhöhte Aktivität der NFAT-Faktoren, gezeigt durch gesteigerte Aktivitäten eines NFAT-Reporters in NFATc1-defizienten BMMC (siehe Abb. 39A). Die Aktivität der ebenfalls untersuchten NF- $\kappa$ B-Faktoren zeigt keinen Unterschied zwischen dem Wildtyp und den NFATc1-defizienten Mastzellen (siehe Abb. 39B). Somit ist die Aktivität der NF- $\kappa$ B-Proteine nicht beeinträchtigt, was durch eine vergleichbare Expression des NF- $\kappa$ B-Faktors c-Rel in den BMMC beider Mausstämme verdeutlicht wird (Daten nicht gezeigt).

Ursache der erhöhten NFAT-Aktivität in der Reporter-genanalyse ist eine vermehrte Expression des Faktors **NFATc2** in NFATc1-defizienten BMMC (siehe Abb. 40). NFATc2 kompensiert vermutlich, zumindest teilweise, die Funktionen des Faktors NFATc1 in Mastzellen. Die kompensatorische Wirkung von NFATc2 könnte durch im C-Terminus von NFATc2 vorhandene Sumoylierungsstellen<sup>51</sup> [183] und durch Sequenzhomologien der für die DNA-Bindung von Zielsequenzen verantwortlichen Rel-Homologie-Domäne zwischen NFATc1 und NFATc2 von 72% ermöglicht werden [184], wodurch NFATc2 als Transkriptionsfaktor für die NFATc1-Zielgene fungieren kann. Weiterhin verdeutlicht die Tatsache, dass NFATc1 und NFATc2 beide in der Lage sind, die IL-4-Expression in Th2-Zellen zu regulieren [185], dass die Proteine die Funktionen des jeweils anderen NFAT-Faktors übernehmen können. Diese Tatsache wird durch Experimente an NFAT-defizienten Mäusen weiter untermauert, bei denen durch Gabe von MOG (Myelin-Oligodendrocyten-Glycoprotein) eine EAE<sup>52</sup> induziert wird. Die NFAT-Faktoren NFATc1 und NFATc2 sind an der Induktion einer EAE im Mausmodell beteiligt und können ihre Funktionen gegenseitig übernehmen. Daher überrascht es nicht, dass eine Defizienz von NFATc1 oder NFATc2 den Verlauf der EAE bei den Mäusen verbessert, während bei einer Doppel-Defizienz von NFATc1 und NFATc2 in den Mäusen überhaupt keine EAE mehr ausgelöst werden kann [186].

NFATc2 wird in Effektorlymphocyten konstitutiv exprimiert [187] und kann hierbei sowohl als Monomer als auch als Dimer mit anderen Transkriptionsfaktoren an die DNA binden. Durch

---

<sup>51</sup> Sumoylierungsstellen: Lysine an Position 684 und 897 im C-Terminus von NFATc2, an denen das SUMO (small ubiquitin-like modifier)-Protein ähnlich der Ubiquitylierung, vermittelt durch SUMO-aktivierende E1-Enzyme, SUMO-konjugierende E2-Enzyme und durch SUMO-E3-Ligasen, gebunden wird. Diese Form der posttranslationalen Modifikation kann die Aktivität der NFAT-Faktoren, z. B. von NFATc1 (Lysine an Position 702 und 914) und NFATc2 positiv oder negativ beeinflussen [183], [194], [195].

<sup>52</sup> EAE: experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis, murines Modell für Multiple Sklerose

Bindung an NFAT-Bindestellen, die keine Kooperation mit dem Transkriptionsfaktor AP-1 benötigen, kommt es durch NFATc2 als Monomer beispielsweise zur Expression von Genen, die bei der Anergie und der Erschöpfung<sup>53</sup> („Exhaustion“) von T-Zellen involviert sind [188], [189]. Zudem kann NFATc2 in T-Zellen nachweislich die Expression von NFATc1 steigern, indem NFATc2 an die NFAT-Bindestelle im P1-Promotor des *nfatc1*-Gens bindet [190]. Die Expression von NFATc2 kann auf Ebene der Transkription durch einen Transkriptionsrepressor, dem IRF-2-Bindeprotein 2 (IRF-2BP2), gehemmt werden. IRF-2BP2 interagiert mit dem C-Terminus von NFATc2 und verhindert dadurch die Transaktivierung von NFAT-abhängigen Genen wie z. B. *il-4* und *il-2* in CD4<sup>+</sup> T-Zellen [191].

Durch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Sequenz-spezifische RNA-Interferenz mit Hilfe einer **NFATc2-siRNA** konnte gezeigt werden, dass die vermehrte Expression des Transkriptionsfaktors NFATc2 die Ursache für die erhöhte IL-9-Expression in den NFATc1-defizienten Mastzellen ist. Der Verlust von NFATc2 führt zu einer reduzierten IL-9-Produktion (siehe Abb. 41B). Die beobachtete gesteigerte Expression von NFATc2 kann durch einen bereits für CD4<sup>+</sup> T-Zellen beschriebenen Synergismus zwischen NFATc2 und NF-κB zur Verstärkung der IL-9-Expression erklärt werden. Die Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NF-κB kooperieren hierbei miteinander, indem NFATc2 an den *il-9*-Promotor bindet und eine transkriptionell aktive Chromatinstruktur am *Locus* des *il-9*-Promotors induziert. Diese durch NFATc2 ausgelöste Chromatin-Modifikation erleichtert NF-κB-Faktoren den Zugang zum Promotor, um diesen nach Bindung zu transaktivieren [192]. Dieser Mechanismus könnte auch erklären, weshalb NFATc2 zwar wichtig für die IL-9-Produktion in Mastzellen ist, eine direkte Bindung von NFATc2 an mögliche Bindestellen des etwa 600bp umfassenden Promotorbereichs nicht nachgewiesen werden konnte (persönliche Mitteilung von Priv.-Doz. Dr. M. Stassen). Durch einfache Reporter-genuntersuchungen nach Transfektion mit Plasmiden, wie im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt, lassen sich solche Phänomene jedoch nicht untersuchen. Die Kooperation zwischen NFATc2 und NF-κB könnte erklären, weshalb es nach Signal 1 (IgE-Rezeptor) keine Unterschiede in der IL-9-Produktion zwischen Wildtyp und NFATc2<sup>-/-</sup> gibt, sondern sich erst bei der Kombination von Signal 1 und Signal 2 (TLR-4) Unterschiede ergeben (siehe Abb. 46A). Köck *et al.*, 2014 konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass NFATc2 am *il-4*-Promotor mit dem NF-κB-Faktor p65 zusammenarbeitet. In Th2-Zellen ist NFATc2 für die Rekrutierung von p65 und anderen Transkriptionsfaktoren am *il-4*-Promotor verantwortlich und trägt zur Bildung eines Komplexes aus Transkriptionsfaktoren bei, die den Promotor transaktivieren [193].

---

<sup>53</sup> Erschöpfung: Funktionsverlust der aktivierten, Antigen-spezifischen T-Zellen mit anschließender Deletion

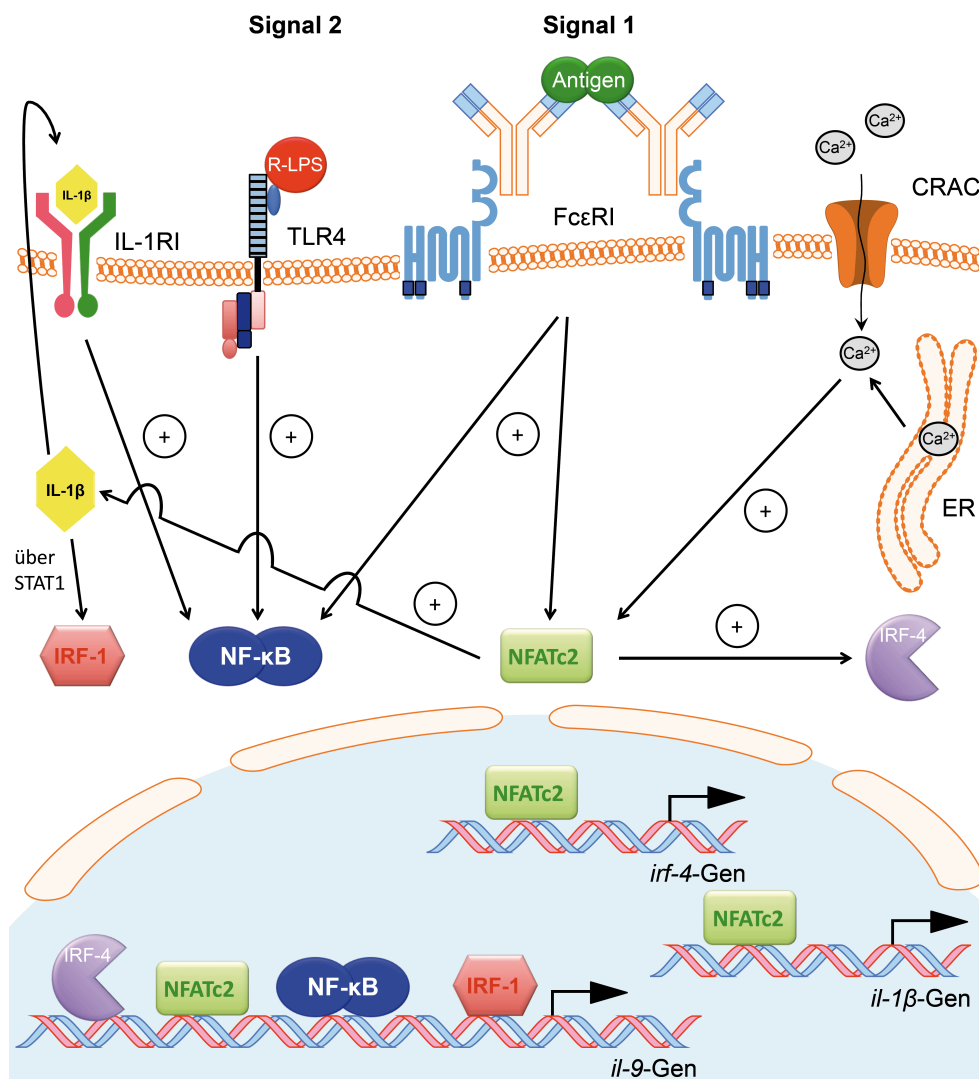
Anhand von Mäusen, die eine **systemische NFATc2-Defizienz** (NFATc2<sup>-/-</sup>) aufweisen, konnte die essentielle Rolle, die NFATc2 in Bezug auf die IL-9-Regulation einnimmt, weiter analysiert werden. Durch die systemische Defizienz des NFAT-Faktors NFATc2 kommt es zu einem Absinken der Expression für IL-9, während sich die IL-6-Produktion in diesen Mastzellen normal verhält (siehe Abb. 46). Eine Erklärung für die niedrigen IL-9-Werte nach Stimulation der IgE-kreuzvernetzten Zellen mit R-LPS kann der oben beschriebene Synergismus zwischen NFATc2 und dem NF-κB-Protein p65 liefern [192]. Da NFATc2 fehlt, bindet nur noch p65 an den *il-9*-Promotor und transaktiviert diesen weit weniger erfolgreich als es durch den Synergismus zusammen mit NFATc2 der Fall wäre. Auch die Expressionen von IRF-4 und IL-1β werden durch die NFATc2-Defizienz beeinflusst. So kommt es verglichen mit dem Wildtyp in NFATc2<sup>-/-</sup> zu verringerten Expressionen von IRF-4 und IL-1β (siehe Abb. 47). Dies verdeutlicht zusätzlich die essentielle Funktion von NFATc2 an der Regulation der beiden Faktoren IRF-4 und IL-1β.

Von der gesteigerten NFATc2-Expression in Abwesenheit von NFATc1 ist auch der Transkriptionsfaktor **IRF-4** betroffen, ein bekannter Interaktionspartner von NFATc2 [159]. Durch den „NFATc2-Knockdown“ kommt es zur Drosselung der IRF-4-Produktion. Somit lässt sich eine positive Abhängigkeit der IRF-4-Expression vom Faktor NFATc2 nachweisen (siehe Abb. 41C). Dies erklärt auch die höhere Expression von IRF-4 in den NFATc1-defizienten BMMC (siehe Abb. 42). Wie bereits bei BALB/c nachgewiesen, beeinflusst IRF-4 die IL-9-Expression im positiven Sinne, so auch in Mastzellen mit einer NFATc1-Defizienz. Durch den Einsatz einer spezifischen IRF-4-siRNA konnte gezeigt werden, dass der Verlust von IRF-4 eine reduzierte IL-9-Expression zur Folge hat (siehe Abb. 43B). Zwar wird die IRF-4-Expression von NFATc2 beeinflusst (siehe Abb. 41), eine gegenseitige Einflussnahme von IRF-4 und NFATc2 konnte jedoch nicht beobachtet werden, da ein Verlust von IRF-4 keine Veränderung der NFATc2-Expression nach sich zieht (siehe Abb. 43D).

Neben IRF-4 wird auch das proinflammatorische Cytokin **IL-1β** in den NFATc1-defizienten BMMC verstärkt produziert. Diese höhere IL-1β-Expression zeigt sich abhängig von der Expression von NFATc2, da es durch Verlust von NFATc2 zu einer Reduktion der IL-1β-Expression kommt (siehe Abb. 41D). Eine Abhängigkeit vom Faktor IRF-4 konnte für IL-1β jedoch nicht nachgewiesen werden (siehe Abb. 43C).

Da sich in BMMC aus BALB/c gezeigt hatte, dass IL-1β über STAT1 und **IRF-1** eine positive Wirkung auf die IL-9-Produktion ausübt, wurde die Expression dieser Faktoren auch in NFATc1-defizienten BMMC untersucht. Es zeigt sich, dass es in den IgE-kreuzvernetzten Mastzellen durch den Kofaktor IL-1β bzw. R-LPS ebenfalls zu einer vermehrten Expression

von IRF-1 kommt (siehe Abb. 45). Die STAT1-Expression ist indessen nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 49: Kompensatorische Wirkung von NFATc2 auf die IL-9-Produktion NFATc1-defizienter Mastzellen.** Nach der Kreuzvernetzung der FcεRI-Rezeptoren (Signal 1) auf der Zelloberfläche der BMMC und Stimulation mit dem Kofaktor R-LPS (Signal 2) kommt es vermittelt durch eine kompensatorische Wirkung des NFAT-Faktors NFATc2 zu einer Steigerung der Expression des Cytokins IL-1β und des Transkriptionsfaktors IRF-4. IL-1β wiederum vermittelt über STAT1 die Bildung des Transkriptionsfaktors IRF-1. Zusammen binden NFATc2, IRF-4 und IRF-1 an den *il-9*-Promotor und transaktivieren diesen. Dabei kommt es zu einer möglichen Kooperation von NFATc2 und NF-κB. NFATc2 bindet an den *il-9*-Promotor und induziert durch eine Chromatin-Modifikation eine aktive Chromatinstruktur, die es NF-κB erleichtert den Promotor zu transaktivieren [CRAC (calcium release-activated channel), ER (Endoplasmatisches Retikulum)].

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete *Mcpt5-Cre<sup>+</sup> Nfatc1<sup>ΔΔ</sup>*-Modell erlaubt abschließend keine Aussage über die Funktion von NFATc1 in murinen Mastzellen. Der NFAT-Faktor NFATc2 übernimmt in diesem Mausmodell durch eine kompensatorische Wirkung die Funktion von NFATc1, wodurch eine Aussage über die Funktion von NFATc1 innerhalb der Mastzelle nicht möglich ist. Stattdessen kommt es in Folge der erhöhten NFATc2-Expression zu einer verstärkten Produktion von IL-9. Weiterhin zeigt sich in Abhängigkeit von NFATc2

eine gesteigerte Expression des Transkriptionsfaktors IRF-4 und des Cytokins IL-1 $\beta$ , die wiederum eine positive Wirkung auf die IL-9-Expression ausüben (siehe Abb. 49). Durch welche Ursachen die erhöhte NFATc2-Expression in Abwesenheit des Transkriptionsfaktors NFATc1 ausgelöst wird, ist weiterhin unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

## 5 Zusammenfassung

Interleukin 9 ist ein Cytokin mit pleiotropen Aufgaben innerhalb des Immunsystems. Neben seiner protektiven Rolle in Hinblick auf die Tumorummunologie und die Immunität gegen intestinale Parasiten, wie z. B. Nematoden, wird IL-9 auch eine proinflammatorische Funktion bei verschiedenen Krankheiten zuteil. Zu den IL-9-abhängigen Erkrankungen zählen u. a. allergisches Asthma, entzündliche Darmerkrankungen und Infektionen mit dem Respiratorischen Synzytial-Virus. Außer Mastzellen bilden auch Th9-Zellen das Cytokin IL-9. Auf zellulärer Ebene fungiert IL-9 als Wachstumsfaktor für Mastzellen und kann in aktivierten Mastzellen die Produktion verschiedener Cytokine induzieren.

Vergleichende Untersuchungen über die Aktivierung von Mastzellen verschiedener Mausstämmen durch proinflammatorische Signale, wie das Lipopolysaccharid R-LPS, zeigen eine erhöhte IL-9-Expression in Mastzellen aus BALB/c-Mäusen, verglichen mit Mäusen des genetischen C57BL/6-Hintergrundes. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Ursache für die gesteigerte Expression des Cytokins IL-9 eine verstärkte Expression des NF- $\kappa$ B-Proteins c-Rel ist, das als Transkriptionsfaktor die IL-9-Produktion direkt verstärkt. Die höhere c-Rel-Aktivität bedingt außerdem eine Steigerung der Expression der Transkriptionsfaktoren IRF-4 und IRF-1 und des proinflammatorischen Cytokins IL-1 $\beta$ , die wiederum positiv auf die Transkription von IL-9 einwirken. Somit liegt in BMMC aus BALB/c-Mäusen ein Netzwerk aus Signalwegen vor, die, in Abhängigkeit von der Aktivität des NF- $\kappa$ B-Faktors c-Rel, eine positive Verstärkung der Expression des Cytokins IL-9 bewirken.

Verschiedene Vorarbeiten an murinen Mastzellen konnten Transkriptionsfaktoren der NFAT-Familie bereits als wichtige Faktoren für die Produktion von IL-9 identifizieren. Durch den Einsatz eines Mausmodells mit einer Mastzell-spezifischen NFATc1-Defizienz sollte die Funktion des Faktors NFATc1 in Mastzellen analysiert werden. Durch einen kompensatorischen Effekt von NFATc2 kommt es nach Stimulation mit dem Kofaktor R-LPS zu erhöhten IL-9-Werten in den IgE-kreuzvernetzten Mastzellen. Von der gesteigerten NFATc2-Wirkung sind auch die Transkriptionsfaktoren IRF-4 und IRF-1 betroffen, sowie das proinflammatorische Cytokin IL-1 $\beta$ . Die erhaltenen Resultate zeigen, dass das gewählte Mausmodell zur Untersuchung der Funktion des NFAT-Faktors NFATc1 in Mastzellen nicht geeignet ist, da es zu einer kompensatorischen Übernahme der Aufgaben von NFATc1 durch den Transkriptionsfaktor NFATc2 kommt.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABTS	2,2-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
APC	Allophycocyanin
AP-1	activator protein 1
ASC	apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
BALB/c	Mausinzuchtstamm
BMMC	bone marrow-derived mast cells
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
C57BL/6	C57 black 6 Mausinzuchtstamm
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	complementary DNA
CRAC	calcium release-activated channel
Cre	Cre-Rekombinase
CsA	Cyclosporin A
CTMC	connective tissue-type mast cell
CYLD	Cylindromatosis
DAG	Diacylglycerin
d. h.	das heisst
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNP	2,4-Dinitrophenol
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-Triphosphat
dsRNA	doppelsträngige RNA
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
ETS-Faktor	E-twenty six-Faktor
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
Fc	Fragment crystallisable
FcεRI	hochaffiner Rezeptor für IgE-Antikörper
FCS	fetal calf serum
FSC	Forward Scatter
GADS	GRB2-related adaptor protein
GRB2	growth-factor-receptor-bound protein 2
GV	Gesamtvolumen
h	Stunden
<i>hgprt</i>	<i>Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase</i>
HIF-1α	hypoxia-inducible factor 1α
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
InsP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IKKα	IκB Kinase α
IκB	IκappaB, NF-κB-Inhibitor
IL	Interleukin
IRAKs	interleukin 1 receptor associated kinases
IRF	interferon regulatory factor
ISRE	Interferon-stimulated Response Element
ITAMs	immunoreceptor tyrosine-based activation motifs
I. U.	International Unit
kDa	Kilodalton
KL	Kit-Ligand
l	Liter
LAT	linker for activation of T cells

LBP	LPS-Binde-Protein
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
Mal	MyD88-adaptor-like protein
MAPK	mitogen-activated protein kinase
Mcpt5	Mastzell-Protease 5
Mcpt5-Cre	Cre-Rekombinase unter dem <i>Mcpt5</i> -Promotor
MD-2	myeloid differentiation protein 2
MEM	minimal essential medium
µF	Mikrofarad
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
mA	Milliampere
mg	Milligramm
ml	Milliliter
min	Minuten
miRNA	microRNA
miR-146a	microRNA 146a
MMC	mucosal mast cell
MOG	Myelin-Oligodendrocyten-Glycoprotein
mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert
MyD88	myeloid differentiation factor 88
n. d.	nicht detektierbar
NEMO	NF-κB essential modulator
NFAT	nuclear factor of activated T cells
NF-κB	nuclear factor 'kappa light chain enhancer' of activated B cells
ng	Nanogramm
NHR	NFAT-Homologie-Region
NIK	NF-κB-inducing kinase
NLRP3	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3
NLS	nukleäres Lokalisations-Signal
nm	Nanometer
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
PEST-Region	Prolin-Glutamat-Serin-Threonin-reiche Region
PKC	Proteinkinase C
PLA2	Phospholipase A2
PLCy	Phospholipase Cy
PRR	Pattern-Recognition Receptors
PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
qRT-PCR	semiquantitative Realtime-PCR
RIP1	receptor-interacting protein 1
RISC	RNA-induced silencing complex
R-LPS	raue (rough) Form des LPS
RNA	Ribonukleinsäure
SCF	Stem Cell Factor
sec	Sekunde
SHC	SRC homology 2 (SH2)-domain-containing transforming protein C
shRNA	small hairpin RNA
SIGIRR	Single Ig IL-1-related receptor
siRNA	small interfering RNA
SLP76	SH2-domain-containing leukocyte protein of 76 kDa
S-LPS	glatte (smooth) Form des LPS
SOS	son of sevenless homologue
SPF	Specific pathogen free
SR-LPS	semirough Form des LPS

---

SUMO	small ubiquitin-like modifier
Syk	spleen tyrosine kinase
Tab.	Tabelle
TAB	TAK1-binding protein
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAK1	transforming growth factor $\beta$ activated kinase 1
TANK	TNF receptor-associated factor family member-associated nuclear factor $\kappa$ B activator
TARC	Translational Animal Research Center
TBK1	TANK-binding kinase 1
TGF- $\beta$	transforming growth factor $\beta$
TIR-Domäne	Toll/IL-1R-Domäne
TLR	Toll-like Receptor
TNF	Tumornekrosefaktor alpha
TNFAIP3	Tumor necrosis factor alpha-induced protein 3
TRAF6	TNF receptor-associated factor 6
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TRIF	TIR-domain containing adaptor-inducing interferon $\beta$
U	Unit
u. a.	unter anderem
UTR	untranslated region
V	Volt
VE	voll entsalzt
VF	Verdünnungsfaktor
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung
z. B.	zum Beispiel

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Signalkaskade des IgE-Rezeptors Fc $\epsilon$ RI in aktivierten Mastzellen. ....	3
Abb. 2: Aufbau der LPS-Chemotypen und ihre Verankerung in der Zellwand gramnegativer Bakterien. ....	4
Abb. 3: Signalkaskade des TLR-4. ....	6
Abb. 4: Die Mitglieder der NF- $\kappa$ B-Familie. ....	9
Abb. 5: Der kanonische und nicht-kanonische Weg der NF- $\kappa$ B-Signalgebung. ....	10
Abb. 6: Die Familie der NFAT-Transkriptionsfaktoren. ....	11
Abb. 7: Der Calcineurin-Signalweg zur Aktivierung von NFAT-Faktoren. ....	12
Abb. 8: Struktur des c-Rel-Inhibitors IT-603. ....	26
Abb. 9: Stilllegung eines Genes durch siRNA. ....	37
Abb. 10: Mastzellen zeigen eine gute Transfektionseffizienz. ....	39
Abb. 11: BALB/c BMMC zeigen nach Stimulation mit IgE/Anti-IgE und R-LPS eine erhöhte IL-9-Produktion. ....	41
Abb. 12: LPS zeigt als Kofaktor in BMMC aus BALB/c einen stärkeren Effekt auf die Synthese von IL-9 als in BMMC aus C57BL/6. ....	42
Abb. 13: Mastzellen werden durch die R-Form des LPS stärker aktiviert. ....	44
Abb. 14: Der IL-1-Rezeptorantagonist Anakinra vermindert die Bildung von IL-9. ....	46
Abb. 15: In BMMC aus BALB/c zeigt sich eine gesteigerte IL-1 $\beta$ -Synthese. ....	47
Abb. 16: Mastzellen aus BALB/c zeigen eine stärkere Reaktion auf exogen zugeführtes IL-1 $\beta$ verglichen mit C57BL/6. ....	48
Abb. 17: In IgE/Anti-IgE-stimulierten BMMC kommt es durch IL-1 $\beta$ zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der IL-9-Produktion. ....	49
Abb. 18: C57BL/6 und BALB/c BMMC zeigen keine Unterschiede in der Expression wichtiger Rezeptoren. ....	50
Abb. 19: Die Mastzellen beider Mausstämmen zeigen keine Unterschiede in ihrer Fähigkeit zur Degranulation. ....	52
Abb. 20: Zwischen den Mausstämmen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression wichtiger Signalmoleküle des IL-1R/TLR-4-Rezeptorsignalweges. ....	53
Abb. 21: Die Expression der IRF-4-mRNA ist abhängig von endogenem IL-1 $\beta$ und verstärkt in Mastzellen aus BALB/c-Mäusen. ....	55
Abb. 22: Verstärkte Expression von IRF-4 in BMMC aus BALB/c. ....	56
Abb. 23: Der "Knockdown" von IRF-4 bewirkt eine Verminderung der IL-9-mRNA-Expression. ....	57

Abb. 24: BMMC aus <i>Mcpt5-Cre<sup>+</sup> Irf-4<sup>fl/fl</sup></i> -Mäusen weisen eine Defizienz des Transkriptionsfaktors IRF-4 auf. ....	58
Abb. 25: Die Mastzell-spezifische IRF-4-Defizienz hat keinen Einfluss auf die Degranulation. ....	59
Abb. 26: Der Transkriptionsfaktor IRF-4 ist wichtig für die IL-9-Produktion. ....	60
Abb. 27: Die Defizienz des Transkriptionsfaktors IRF-4 wirkt sich nicht auf die Expression von IL-1 $\beta$ aus. ....	61
Abb. 28: Der Transkriptionsfaktor IRF-1 wird in BMMC aus BALB/c vermehrt exprimiert. ....	62
Abb. 29: In BALB/c-Mastzellen ist eine höhere NF- $\kappa$ B-Aktivität nachweisbar. ....	64
Abb. 30: Die Transkriptionsfaktoren p50 und p52 zeigen bei C57BL/6 nach 18h eine leichte Erhöhung ihrer Expression. ....	65
Abb. 31: Der Transkriptionsfaktor c-Rel wird in Mastzellen aus BALB/c verstärkt gebildet. ..	66
Abb. 32: Im Nukleus von BALB/c BMMC wird im Vergleich zu C57BL/6 der Transkriptionsfaktor c-Rel stärker exprimiert. ....	67
Abb. 33: Die Hemmung des Transkriptionsfaktors c-Rel durch den c-Rel-Inhibitor IT-603 geht mit einer Verminderung der IL-9-Expression einher. ....	68
Abb. 34: Die Inhibition von c-Rel hat auch eine Abnahme der IL-1 $\beta$ - und IRF-4-mRNA-Expression zur Folge. ....	69
Abb. 35: Das durch NF- $\kappa$ B-regulierte Gen A20 zeigt in BALB/c eine Überexpression. ....	70
Abb. 36: <i>Nfatc1<sup><math>\Delta\Delta</math></sup></i> zeigen eine Mastzell-spezifische Deletion des Transkriptionsfaktors NFATc1. ....	72
Abb. 37: Nach Stimulation mit IgE/Anti-IgE und R-LPS zeigen NFATc1-defiziente Mastzellen eine gesteigerte IL-9-Bildung. ....	73
Abb. 38: Die Mastzell-spezifische NFATc1-Deletion zeigt keinen Einfluss auf die Rezeptorexpression von TLR-4/MD-2 und IL-1RI. ....	74
Abb. 39: Trotz der NFATc1-Defizienz ist in <i>Nfatc1<sup><math>\Delta\Delta</math></sup></i> eine gesteigerte NFAT-Aktivität messbar. ....	75
Abb. 40: In den NFATc1-defizienten BMMC kommt es zu einer NFATc2-Überexpression. ..	77
Abb. 41: Durch einen spezifischen „NFATc2-Knockdown“ kommt es zur verringerten Expression von IL-9, IRF-4 und IL-1 $\beta$ . ....	79
Abb. 42: Der Transkriptionsfaktor IRF-4 ist in <i>Nfatc1<sup><math>\Delta\Delta</math></sup></i> verstärkt exprimiert. ....	81
Abb. 43: Der „Knockdown“ von IRF-4 hat eine Verminderung der IL-9-mRNA-Expression zur Folge. ....	83
Abb. 44: Die IL-1 $\beta$ -Expression NFATc1-defizienter BMMC ist erhöht. ....	84
Abb. 45: Der Transkriptionsfaktor IRF-1 wird in NFATc1-defizienten BMMC vermehrt exprimiert. ....	85

---

Abb. 46: BMMC aus NFATc2 <sup>-/-</sup> -Mäusen zeigen eine verminderte Expression von IL-9-mRNA. ....	87
Abb. 47: Verminderung der IRF-4- und IL-1β-Expression als Folge des „Knockouts“ von NFATc2. ....	88
Abb. 48: Mechanismus der IL-9-Regulation in BMMC aus BALB/c. ....	96
Abb. 49: Kompensatorische Wirkung von NFATc2 auf die IL-9-Produktion NFATc1-defizienter Mastzellen. ....	101

## 8 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Bezugsquellen der Laborgeräte. ....	14
Tab. 2: Bezugsquellen der Chemikalien. ....	15
Tab. 3: Bezugsquellen der Kulturmedien und Puffer. ....	18
Tab. 4: Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie. ....	19
Tab. 5: Liste der eingesetzten Produktpakete. ....	22
Tab. 6: Liste der eingesetzten Stimulanzen. ....	25

## 9 Literaturverzeichnis

- [1] G. W. Wong, L. Zhuo, K. Kimata, B. K. Lam, N. Satoh, and R. L. Stevens, "Ancient origin of mast cells," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 451, no. 2, pp. 314–318, 2014.
- [2] C. L. Weller, S. J. Collington, T. Williams, and J. R. Lamb, "Mast cells in health and disease.," *Clin. Sci. (Lond).*, vol. 120, no. 11, pp. 473–484, 2011.
- [3] M. Juremalm and G. Nilsson, "Chemokine Receptor Expression by Mast Cells," *Chem. Immunol. Allergy*, vol. 87, pp. 130–144, 2005.
- [4] M. Stassen, L. Hültner, and E. Schmitt, "Classical and alternative pathways of mast cell activation.," *Crit. Rev. Immunol.*, vol. 22, no. 2, pp. 115–140, 2002.
- [5] V. Kumar and A. Sharma, "Mast cells: Emerging sentinel innate immune cells with diverse role in immunity," *Mol. Immunol.*, vol. 48, no. 1–3, pp. 14–25, 2010.
- [6] S. Klemm and J. Ruland, "Inflammatory signal transduction from the Fc epsilon RI to NF-kappa B.," *Immunobiology*, vol. 211, no. 10, pp. 815–820, 2006.
- [7] T. C. Theoharides, K. D. Alysandratos, A. Angelidou, D. A. Delivanis, N. Sismanopoulos, B. Zhang, S. Asadi, M. Vasiadi, Z. Weng, A. Miniati, and D. Kalogeromitros, "Mast cells and inflammation," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, vol. 1822, no. 1, pp. 21–33, 2012.
- [8] H. R. Rodewald and T. B. Feyerabend, "Widespread Immunological Functions of Mast Cells: Fact or Fiction?," *Immunity*, vol. 37, no. 1, pp. 13–24, 2012.
- [9] V. Heib, M. Becker, C. Taube, and M. Stassen, "Advances in the understanding of mast cell function," *Br. J. Haematol.*, vol. 142, no. 5, pp. 683–694, 2008.
- [10] E. Z. M. da Silva, M. C. Jamur, and C. Oliver, "Mast Cell Function: A New Vision of an Old Cell.," *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 62, no. 10, pp. 698–738, 2014.
- [11] S. J. Zoog, A. Itano, E. Trueblood, E. Pacheco, L. Zhou, X. Zhang, J. Ferbas, G. Y. Ng, and G. Juan, "Antagonists of CD117 (cKit) signaling inhibit mast cell accumulation in healing skin wounds," *Cytom. Part A*, vol. 75, no. 3, pp. 189–198, 2009.
- [12] T. W. Chang and Y. Y. Shiung, "Anti-IgE as a mast cell-stabilizing therapeutic agent," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 117, no. 6, pp. 1203–1212, 2006.
- [13] K. Newton and V. M. Dixit, "Signaling in innate immunity and inflammation," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 4, no. 3, p. a006049, 2012.
- [14] V. Supajatura, H. Ushio, A. Nakao, S. Akira, K. Okumura, C. Ra, and H. Ogawa, "Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity.," *J. Clin. Invest.*, vol. 109, no. 10, pp. 1351–1359, 2002.
- [15] H. Matsushima, N. Yamada, H. Matsue, and S. Shimada, "TLR3-, TLR7-, and TLR9-mediated production of proinflammatory cytokines and chemokines from murine connective tissue type skin-derived mast cells but not from bone marrow-derived mast cells.," *J. Immunol.*, vol. 173, no. 1, pp. 531–541, 2004.
- [16] Y. Okayama, "Mast cell-derived cytokine expression induced via Fc receptors and Toll-like receptors," *Chem. Immunol. Allergy*, vol. 87, pp. 101–110, 2005.
- [17] U. Blank and J. Rivera, "The ins and outs of IgE-dependent mast-cell exocytosis," *Trends Immunol.*, vol. 25, no. 5, pp. 266–273, 2004.

- [18] S. Reuter, A. Heinz, M. Sieren, R. Wiewrodt, E. W. Gelfand, M. Stassen, R. Buhl, and C. Taube, "Mast cell-derived tumour necrosis factor is essential for allergic airway disease.," *Eur. Respir. J.*, vol. 31, no. 4, pp. 773–82, 2008.
- [19] A. M. Gilfillan and C. Tkaczyk, "Integrated signalling pathways for mast-cell activation.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 6, no. 3, pp. 218–230, 2006.
- [20] K. D. Stone, C. Prussin, and D. D. Metcalfe, "IgE, mast cells, basophils, and eosinophils," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 125, no. 2, pp. S73–S80, 2010.
- [21] D. Alvarez-Errico, E. Lessmann, and J. Rivera, "Adapters in the organization of mast cell signaling," *Immunol. Rev.*, vol. 232, no. 1, pp. 195–217, 2009.
- [22] R. Medzhitov, P. Preston-Hurlburt, and C. A. Janeway, "A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity.," *Nature*, vol. 388, no. 6640, pp. 394–397, 1997.
- [23] S. Murad, "Toll-Like Receptor 4 in Inflammation and Angiogenesis: A Double-Edged Sword," *Front. Immunol.*, vol. 5, pp. 1–5, 2014.
- [24] D. R. Dixon and R. P. Darveau, "Lipopolysaccharide heterogeneity: innate host responses to bacterial modification of lipid a structure.," *J. Dent. Res.*, vol. 84, no. 7, pp. 584–595, 2005.
- [25] Y.-C. Lu, W.-C. Yeh, and P. S. Ohashi, "LPS/TLR4 signal transduction pathway.," *Cytokine*, vol. 42, no. 2, pp. 145–151, 2008.
- [26] B. S. Park, D. H. Song, H. M. Kim, B.-S. Choi, H. Lee, and J.-O. Lee, "The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex.," *Nature*, vol. 458, no. 7242, pp. 1191–1195, 2009.
- [27] S. Akira and K. Takeda, "Toll-like receptor signalling.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 4, no. 7, pp. 499–511, 2004.
- [28] I. Gery and B. H. Waksman, "Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. I. The responding cell," *J. Exp. Med.*, vol. 136, no. 1, pp. 143–155, 1972.
- [29] M. G. Netea, F. L. van de Veerdonk, J. W. M. van der Meer, C. A. Dinarello, and L. A. B. Joosten, "Inflammasome-Independent Regulation of IL-1-Family Cytokines," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 33, no. 1, pp. 49–77, 2015.
- [30] M. Kuhny, T. Hochdörfer, C. Ayata, M. Idzko, and M. Huber, "CD39 is a negative regulator of P2X7-mediated inflammatory cell death in mast cells," *Cell Commun. Signal.*, vol. 12, no. 1, p. 40, 2014.
- [31] T. G. Carlsen, P. Kjærsgaard, T. L. Jørgensen, R. Foldbjerg, M. L. Nielsen, T. B. G. Poulsen, K. Zabieglo, G. Christiansen, and S. Birkelund, "Interleukin-1 $\alpha$  activation and localization in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes and macrophages," *J. Immunol. Methods*, vol. 422, pp. 59–71, 2015.
- [32] M. Stoffels, R. Zaal, N. Kok, J. W. M. van der Meer, C. A. Dinarello, and A. Simon, "ATP-Induced IL-1 $\beta$  specific Secretion: True Under Stringent Conditions," *Front. Immunol.*, vol. 6, p. 54, 2015.
- [33] S. Mariathasan and D. M. Monack, "Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 7, no. 1, pp. 31–40, 2007.
- [34] W. P. Arend, G. Palmer, and C. Gabay, "IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines," *Immunol. Rev.*, vol. 223, no. 1, pp. 20–38, 2008.
- [35] M. Avila and C. Gonzalez-Espinosa, "Signaling through Toll-like receptor 4 and mast cell-dependent innate immunity responses," *IUBMB Life*, vol. 63, no. 10, pp. 922–929, 2011.
- [36] M. Huber, C. Kalis, S. Keck, Z. Jiang, P. Georgel, X. Du, L. Shamel, S. Sovath, S. Mudd, B. Beutler, C. Galanos, and M. A. Freudenberg, "R-form LPS, the master key to the activation of TLR4/MD-2-positive cells," *Eur. J. Immunol.*, vol. 36, no. 3, pp. 701–711, 2006.

- [37] S. H. Rhee, "Lipopolysaccharide : Basic Biochemistry, Intracellular Signaling, and Physiological Impacts in the Gut," *Intest. Res.*, vol. 12, no. 2, pp. 90–95, 2014.
- [38] S. Keck, I. Müller, G. Fejer, I. Savic, S. Tchaptchet, P. J. Nielsen, C. Galanos, M. Huber, and M. A. Freudenberg, "Absence of TRIF signaling in lipopolysaccharide-stimulated murine mast cells.," *J. Immunol.*, vol. 186, no. 9, pp. 5478–5488, 2011.
- [39] T. H. Mogensen, "Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 22, no. 2, pp. 240–273, 2009.
- [40] M. Avila, A. Martinez-Juarez, A. Ibarra-Sanchez, and C. Gonzalez-Espinosa, "Lyn kinase controls TLR4-dependent IKK and MAPK activation modulating the activity of TRAF-6/TAK-1 protein complex in mast cells," *Innate Immun.*, vol. 18, no. 4, pp. 648–660, 2012.
- [41] H. Sandig and S. Bulfone-Paus, "TLR signaling in mast cells: Common and unique features," *Front. Immunol.*, vol. 3, pp. 1–13, 2012.
- [42] L. Hültner, C. Druez, J. Moeller, C. Uyttenhove, E. Schmitt, E. Rüde, P. Dörmer, and J. Van Snick, "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.*, vol. 20, no. 6, pp. 1413–1416, 1990.
- [43] J. Moeller, L. Hültner, E. Schmitt, and P. Dörmer, "Partial purification of a mast cell growth-enhancing activity and its separation from IL-3 and IL-4.," *J. Immunol.*, vol. 142, no. 10, pp. 3447–3451, 1989.
- [44] L. Hültner, J. Moeller, E. Schmitt, G. Jäger, G. Reisbach, J. Ring, and P. Dörmer, "Thiol-sensitive mast cell lines derived from mouse bone marrow respond to a mast cell growth-enhancing activity different from both IL-3 and IL-4.," *J. Immunol.*, vol. 142, no. 10, pp. 3440–3446, 1989.
- [45] J. Moeller, L. Hültner, E. Schmitt, M. Breuer, and P. Dörmer, "Purification of MEA, a mast cell growth-enhancing activity, to apparent homogeneity and its partial amino acid sequencing.," *J. Immunol.*, vol. 144, no. 11, pp. 4231–4234, 1990.
- [46] R. Goswami and M. H. Kaplan, "A brief history of IL-9.," *J. Immunol.*, vol. 186, no. 6, pp. 3283–3288, 2011.
- [47] M. Stassen, E. Schmitt, and T. Bopp, "From interleukin-9 to T helper 9 cells," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1247, no. 1, pp. 56–68, 2012.
- [48] L. Hültner, S. Kölsch, M. Stassen, U. Kaspers, J. P. Kremer, R. Mailhammer, J. Moeller, H. Broszeit, and E. Schmitt, "In activated mast cells, IL-1 up-regulates the production of several Th2-related cytokines including IL-9.," *J. Immunol.*, vol. 164, no. 11, pp. 5556–5563, 2000.
- [49] E. Schmitt, H. U. Beuscher, C. Huels, P. Monteyne, R. van Brandwijk, J. van Snick, and E. Ruede, "IL-1 serves as a secondary signal for IL-9 expression.," *J. Immunol.*, vol. 147, no. 11, pp. 3848–3854, 1991.
- [50] M. Stassen, M. Arnold, L. Hültner, C. Müller, C. Neudörfl, T. Reineke, and E. Schmitt, "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.*, vol. 164, no. 11, pp. 5549–5555, 2000.
- [51] M. Stassen, C. Müller, M. Arnold, L. Hültner, S. Klein-Hessling, C. Neudörfl, T. Reineke, E. Serfling, and E. Schmitt, "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.*, vol. 166, no. 7, pp. 4391–4398, 2001.
- [52] M. Stassen, M. Klein, M. Becker, T. Bopp, C. Neudörfl, C. Richter, V. Heib, S. Klein-Hessling, E. Serfling, H. Schild, and E. Schmitt, "p38 MAP kinase drives the expression of mast cell-derived IL-9 via activation of the transcription factor GATA-1," *Mol. Immunol.*, vol. 44, no. 5, pp. 926–933, 2007.
- [53] E. Schmitt, M. Klein, and T. Bopp, "Th9 cells, new players in adaptive immunity," *Trends Immunol.*, vol. 35, no. 2, pp. 61–68, 2014.

- [54] J. Kearley, J. S. Erjefalt, C. Andersson, E. Benjamin, C. P. Jones, A. Robichaud, S. Pegorier, Y. Brewah, T. J. Burwell, L. Bjermer, P. A. Kiener, R. Kolbeck, C. M. Lloyd, A. J. Coyle, and A. A. Humbles, "IL-9 governs allergen-induced mast cell numbers in the lung and chronic remodeling of the airways," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 183, no. 7, pp. 865–875, 2011.
- [55] C. K. Oh, D. Raible, G. P. Geba, and N. A. Molfino, "Biology of the interleukin-9 pathway and its therapeutic potential for the treatment of asthma," *Inflamm. Allergy Drug Targets*, vol. 10, no. 3, pp. 180–186, 2011.
- [56] C. Wietek and L. A. J. O'Neill, "Diversity and regulation in the NF- $\kappa$ B system," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 32, no. 7, pp. 311–319, 2007.
- [57] A. Oeckinghaus and S. Ghosh, "The NF- $\kappa$ B family of transcription factors and its regulation," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 1, no. 4, pp. 1–14, 2009.
- [58] S. Rigoglou and A. G. Papavassiliou, "The NF- $\kappa$ B signalling pathway in osteoarthritis," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 45, no. 11, pp. 2580–2584, 2013.
- [59] A. Antonsson, K. Hughes, S. Edin, and T. Grundström, "Regulation of c-Rel nuclear localization by binding of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 23, no. 4, pp. 1418–1427, 2003.
- [60] M. Richard, J. Louahed, J. B. Demoulin, and J. C. Renaud, "Interleukin-9 regulates NF- $\kappa$ B activity through BCL3 gene induction," *Blood*, vol. 93, no. 12, pp. 4318–4327, 1999.
- [61] E. Courtine, F. Pène, N. Cagnard, J. Toubiana, C. Fitting, J. Brocheton, C. Rousseau, S. Gerondakis, J. D. Chiche, F. Ouaz, and J. P. Mira, "Critical role of cRel subunit of NF- $\kappa$ B in sepsis survival," *Infect. Immun.*, vol. 79, no. 5, pp. 1848–1854, 2011.
- [62] S. Gerondakis, T. S. Fulford, N. L. Messina, and R. J. Grumont, "NF- $\kappa$ B control of T-cell development," *Nat. Immunol.*, vol. 15, no. 1, pp. 15–25, 2014.
- [63] S.-C. Sun, "Non-canonical NF- $\kappa$ B signaling pathway," *Cell Res.*, vol. 21, no. 1, pp. 71–85, 2011.
- [64] S. M. Wuerzberger-Davis, Y. Chen, D. T. Yang, J. D. Kearns, P. W. Bates, C. Lynch, N. C. Ladell, M. Yu, A. Podd, H. Zeng, T. T. Huang, R. Wen, A. Hoffmann, D. Wang, and S. Miyamoto, "Nuclear Export of the NF- $\kappa$ B Inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$  Is Required for Proper B Cell and Secondary Lymphoid Tissue Formation," *Immunity*, vol. 34, no. 2, pp. 188–200, 2011.
- [65] M. Johannessen, F. Askarian, M. Sangvik, and J. E. Sollid, "Bacterial interference with canonical NF $\kappa$ B signalling," *Microbiol. (United Kingdom)*, vol. 159, pp. 2001–2013, 2013.
- [66] D. P. Nguyen, J. Li, S. S. Yadav, and A. K. Tewari, "Recent insights into NF- $\kappa$ B signalling pathways and the link between inflammation and prostate cancer," *BJU Int.*, vol. 114, no. 2, pp. 168–176, 2014.
- [67] J. Su, T. Zhang, J. Tyson, and L. Li, "The interleukin-1 receptor-associated kinase M selectively inhibits the alternative, instead of the classical NF $\kappa$ B pathway," *J. Innate Immun.*, vol. 1, no. 2, pp. 164–174, 2009.
- [68] A. Hoffmann and D. Baltimore, "Circuitry of nuclear factor kappaB signaling," *Immunol. Rev.*, vol. 210, pp. 171–186, 2006.
- [69] M. Mancini and A. Toker, "NFAT proteins: emerging roles in cancer progression," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 9, no. 11, pp. 810–820, 2009.
- [70] D. C. Solymar, S. Agarwal, C. H. Bassing, F. W. Alt, and A. Rao, "A 3' enhancer in the IL-4 gene regulates cytokine production by Th2 cells and mast cells," *Immunity*, vol. 17, no. 1, pp. 41–50, 2002.
- [71] H. Turner, M. Gomez, E. Mckenzie, A. Kirchem, A. Lennard, and D. A. Cantrell, "Rac-1 Regulates Nuclear Factor of Activated T Cells," *J. Exp. Med.*, vol. 188, no. 3, pp. 527–537, 1998.
- [72] S. Monticelli, D. C. Solymar, and A. Rao, "Role of NFAT proteins in IL13 gene transcription in mast cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 35, pp. 36210–36218, 2004.

- [73] F. Macian, "NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 5, no. 6, pp. 472–484, 2005.
- [74] E. Serfling, F. Berberich-Siebelt, and A. Avots, "NFAT in lymphocytes: a factor for all events?," *Sci. STKE*, vol. 2007, no. 398, p. pe42, 2007.
- [75] R. Rudolf, R. Busch, A. K. Patra, K. Muhammad, A. Avots, J. C. Andrau, S. Klein-Hessling, and E. Serfling, "Architecture and expression of the Nfatc1 gene in lymphocytes," *Front. Immunol.*, vol. 5, pp. 21–24, 2014.
- [76] M. R. Müller and A. Rao, "NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 10, no. 9, pp. 645–656, 2010.
- [77] J.-J. Qin, S. Nag, W. Wang, J. Zhou, W.-D. Zhang, H. Wang, and R. Zhang, "NFAT as cancer target: Mission possible?," *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*, vol. 1846, no. 2, pp. 297–311, 2014.
- [78] T. Minami, "Calcineurin-NFAT activation and DSCR-1 auto-inhibitory loop: How is homeostasis regulated?," *J. Biochem.*, vol. 155, no. 4, pp. 217–226, 2014.
- [79] M. Hock, M. Vaeth, R. Rudolf, A. K. Patra, D. A. T. Pham, K. Muhammad, T. Pusch, T. Bopp, E. Schmitt, R. Rost, F. Berberich-Siebelt, D. Tyrstin, S. Chuvpilo, A. Avots, E. Serfling, and S. Klein-Hessling, "NFATc1 induction in peripheral T and B lymphocytes.," *J. Immunol.*, vol. 190, no. 5, pp. 2345–53, 2013.
- [80] A. Vandewalle, E. Tourneur, M. Bens, C. Chassin, and C. Werts, "Calcineurin/NFAT signaling and innate host defence: a role for NOD1-mediated phagocytic functions.," *Cell Commun. Signal.*, vol. 12, no. 1, p. 8, 2014.
- [81] W. J. Steinbach, J. L. Reedy, R. A. Cramer, J. R. Perfect, and J. Heitman, "Harnessing calcineurin as a novel anti-infective agent against invasive fungal infections.," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 5, no. 6, pp. 418–430, 2007.
- [82] H. Yoshida, H. Nishina, H. Takimoto, L. E. M. Marengère, A. C. Wakeham, D. Bouchard, Y. Y. Kong, T. Ohteki, A. Shahinian, M. Bachmann, P. S. Ohashi, J. M. Penninger, G. R. Crabtree, and T. W. Mak, "The transcription factor NF-ATc1 regulates lymphocyte proliferation and Th2 cytokine production," *Immunity*, vol. 8, no. 1, pp. 115–124, 1998.
- [83] A. M. Ranger, M. R. Hodge, E. M. Gravallesse, M. Oukka, L. Davidson, F. W. Alt, F. C. de la Brousse, T. Hoey, M. Grusby, and L. H. Glimcher, "Delayed lymphoid repopulation with defects in IL-4-driven responses produced by inactivation of NF-ATc," *Immunity*, vol. 8, no. 1, pp. 125–134, 1998.
- [84] J. P. B. Viola, A. Kiani, P. T. Bozza, and A. Rao, "Regulation of allergic inflammation and eosinophil recruitment in mice lacking the transcription factor NFAT1: role of interleukin-4 (IL-4) and IL-5.," *Blood*, vol. 91, no. 7, pp. 2223–2230, 1998.
- [85] S. Xanthoudakis, J. P. Viola, K. T. Shaw, C. Luo, J. D. Wallace, P. T. Bozza, D. C. Luk, T. Curran, and A. Rao, "An enhanced immune response in mice lacking the transcription factor NFAT1.," *Science*, vol. 272, no. 5263, pp. 892–895, 1996.
- [86] K. J. Erb, T. Twardzik, A. Palmethofer, G. Wohlleben, U. Tatsch, and E. Serfling, "Mice Deficient in Nuclear Factor of Activated T-Cell Transcription Factor c2 Mount Increased Th2 Responses after Infection with *Nippostrongylus brasiliensis* and Decreased Th1 Responses after Mycobacterial Infection," *Infect. Immun.*, vol. 71, no. 11, pp. 6641–6647, 2003.
- [87] M. Oukka, I. C. Ho, F. C. de la Brousse, T. Hoey, M. J. Grusby, and L. H. Glimcher, "The transcription factor NFAT4 is involved in the generation and survival of T cells," *Immunity*, vol. 9, no. 3, pp. 295–304, 1998.
- [88] A. M. Ranger, M. Oukka, J. Rengarajan, and L. H. Glimcher, "Inhibitory function of two NFAT family members in lymphoid homeostasis and Th2 development.," *Immunity*, vol. 9, no. 5, pp. 627–635, 1998.
- [89] J. Rengarajan, B. Tang, and L. H. Glimcher, "NFATc2 and NFATc3 regulate T(H)2 differentiation and modulate TCR-responsiveness of naïve T(H)cells.," *Nat. Immunol.*, vol. 3, no. 1, pp. 48–54, 2002.

- [90] T. Bopp, A. Palmetshofer, E. Serfling, V. Heib, S. Schmitt, C. Richter, M. Klein, H. Schild, E. Schmitt, and M. Stassen, "NFATc2 and NFATc3 transcription factors play a crucial role in suppression of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes by CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells.," *J. Exp. Med.*, vol. 201, no. 2, pp. 181–187, 2005.
- [91] R. Berland and H. H. Wortis, "Normal B-1a cell development requires B cell-intrinsic NFATc1 activity.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 23, pp. 13459–13464, 2003.
- [92] M. Klein, S. Klein-Hessling, A. Palmetshofer, E. Serfling, C. Tertilt, T. Bopp, V. Heib, M. Becker, C. Taube, H. Schild, E. Schmitt, and M. Stassen, "Specific and redundant roles for NFAT transcription factors in the expression of mast cell-derived cytokines.," *J. Immunol.*, vol. 177, no. 10, pp. 6667–6674, 2006.
- [93] A. Walczak-Drzewiecka, M. Ratajewski, W. Wagner, and J. Dastyk, "HIF-1 Is Up-Regulated in Activated Mast Cells by a Process That Involves Calcineurin and NFAT," *J. Immunol.*, vol. 181, no. 3, pp. 1665–1672, 2008.
- [94] E. Ullerås, M. Karlberg, C. M. Westerberg, J. Alfredsson, S. Gerondakis, A. Strasser, and G. Nilsson, "NFAT but not NF-κB is critical for transcriptional induction of the prosurvival gene A1 after IgE receptor activation in mast cells," *Blood*, vol. 111, no. 6, pp. 3081–3089, 2008.
- [95] J. Scholten, K. Hartmann, A. Gerbaulet, T. Krieg, W. Müller, G. Testa, and A. Roers, "Mast cell-specific Cre/loxP-mediated recombination in vivo," *Transgenic Res.*, vol. 17, no. 2, pp. 307–315, 2008.
- [96] A. O. Aliprantis, Y. Ueki, R. Sulyanto, A. Park, K. S. Sigrist, S. M. Sharma, M. C. Ostrowski, B. R. Olsen, and L. H. Glimcher, "NFATc1 in mice represses osteoprotegerin during osteoclastogenesis and dissociates systemic osteopenia from inflammation in cherubism," *J. Clin. Invest.*, vol. 118, no. 11, pp. 3775–3789, 2008.
- [97] M. R. Hodge, A. M. Ranger, F. C. De La Brousse, T. Hoey, M. J. Grusby, and L. H. Glimcher, "Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice," *Immunity*, vol. 4, no. 4, pp. 397–405, 1996.
- [98] V. L. Mosiman, B. K. Patterson, L. Canterero, and C. L. Goolsby, "Reducing cellular autofluorescence in flow cytometry: An in situ method," *Commun. Clin. Cytom.*, vol. 30, no. 3, pp. 151–156, 1997.
- [99] M. Baniyash and Z. Eshhar, "Inhibition of IgE binding to mast cells and basophils by monoclonal antibodies to murine IgE.," *Eur. J. Immunol.*, vol. 14, no. 9, pp. 799–807, 1984.
- [100] Y. Shono, A. Z. Tuckett, S. Ouk, H. C. Liou, G. Altan-Bonnet, J. J. Tsai, J. E. Oyler, O. M. Smith, M. L. West, N. V. Singer, E. Doubrovina, D. Pankov, C. V. Undhad, G. F. Murphy, C. Lezcano, C. Liu, R. J. O'Reilly, M. R. M. van den Brink, and J. L. Zakrzewski, "A small-molecule c-Rel inhibitor reduces alloactivation of T cells without compromising antitumor activity," *Cancer Discov.*, vol. 4, no. 5, pp. 578–591, 2014.
- [101] M. Brown and C. Wittwer, "Flow cytometry: Principles and clinical applications in hematology," *Clin. Chem.*, vol. 46, no. 8 (B), pp. 1221–1229, 2000.
- [102] B. Holzapfel and L. Wickert, "Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete," *Biol. unserer Zeit*, vol. 37, no. 2, pp. 120–126, 2007.
- [103] S. Puri, B. S. Magenheimer, R. L. Maser, E. M. Ryan, C. A. Zien, D. D. Walker, D. P. Wallace, S. J. Hempson, and J. P. Calvet, "Polycystin-1 activates the calcineurin/NFAT (nuclear factor of activated T-cells) signaling pathway," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 53, pp. 55455–55464, 2004.
- [104] M. Suhasini, C. D. Reddy, E. P. Reddy, J. A. DiDonato, and R. B. Pilz, "cAMP-induced NF-kappaB (p50/relB) binding to a c-myc intronic enhancer correlates with c-myc up-regulation and inhibition of erythroleukemia cell differentiation.," *Oncogene*, vol. 15, no. 15, pp. 1859–1870, 1997.
- [105] R. G. Shao, T. Shimizu, and Y. Pommier, "Brefeldin A is a potent inducer of apoptosis in human cancer cells independently of p53.," *Exp. Cell Res.*, vol. 227, no. 2, pp. 190–196, 1996.
- [106] U. K. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.," *Nature*, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685, 1970.

- [107] H. Towbin, T. Staehelin, and J. Gordon, "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 76, no. 9, pp. 4350–4354, 1979.
- [108] M. Dominska and D. M. Dykxhoorn, "Breaking down the barriers: siRNA delivery and endosome escape.," *J. Cell Sci.*, vol. 123, no. Pt 8, pp. 1183–1189, 2010.
- [109] A. Brüstle, S. Heink, M. Huber, C. Rosenplänter, C. Stadelmann, P. Yu, E. Arpaia, T. W. Mak, T. Kamradt, and M. Lohoff, "The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4.," *Nat. Immunol.*, vol. 8, no. 9, pp. 958–966, 2007.
- [110] J. Noguchi, E. Kuroda, and U. Yamashita, "Strain difference of murine bone marrow-derived mast cell functions.," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 78, no. 3, pp. 605–611, 2005.
- [111] M. M. Gueders, G. Paulissen, C. Crahay, F. Quesada-Calvo, J. Hacha, C. Van Hove, K. Tournoy, R. Louis, J. M. Foidart, A. Noël, and D. D. Cataldo, "Mouse models of asthma: A comparison between C57BL/6 and BALB/c strains regarding bronchial responsiveness, inflammation, and cytokine production," *Inflamm. Res.*, vol. 58, no. 12, pp. 845–854, 2009.
- [112] F. Peri, M. Piazza, V. Calabrese, G. Damore, and R. Cighetti, "Exploring the LPS/TLR4 signal pathway with small molecules.," *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 38, no. 5, pp. 1390–1395, 2010.
- [113] M. A. Freudenberg, S. Tchaptchet, S. Keck, G. Fejer, M. Huber, N. Schütze, B. Beutler, and C. Galanos, "Lipopolysaccharide sensing an important factor in the innate immune response to Gram-negative bacterial infections: Benefits and hazards of LPS hypersensitivity," *Immunobiology*, vol. 213, no. 3–4, pp. 193–203, 2008.
- [114] K. N. Murray, A. R. Parry-Jones, and S. M. Allan, "Interleukin-1 and acute brain injury," *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 9, pp. 1–17, 2015.
- [115] C.-J. Hsieh, K. Hall, T. Ha, C. Li, G. Krishnaswamy, and D. S. Chi, "Baicalein inhibits IL-1 $\beta$ - and TNF- $\alpha$ -induced inflammatory cytokine production from human mast cells via regulation of the NF- $\kappa$ B pathway," *Clin. Mol. Allergy*, vol. 5, p. 5, 2007.
- [116] T. C. Theoharides, D. Kempuraj, M. Tagen, P. Conti, and D. Kalogeromitros, "Differential release of mast cell mediators and the pathogenesis of inflammation," *Immunol. Rev.*, vol. 217, no. 1, pp. 65–78, 2007.
- [117] S. B. Abramson and A. Amin, "Blocking the effects of IL-1 in rheumatoid arthritis protects bone and cartilage.," *Rheumatology (Oxford)*, vol. 41, no. 9, pp. 972–980, 2002.
- [118] J. Petrasek, S. Bala, T. Csak, D. Lippai, K. Kodys, V. Menashy, M. Barrieau, S. Y. Min, E. A. Kurt-Jones, and G. Szabo, "IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent alcoholic steatohepatitis in mice," *J. Clin. Invest.*, vol. 122, no. 10, pp. 3476–3489, 2012.
- [119] S. Cohen, E. Hurd, J. Cush, M. Schiff, M. E. Weinblatt, L. W. Moreland, J. Kremer, M. B. Bear, W. J. Rich, and D. McCabe, "Treatment of rheumatoid arthritis with anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, in combination with methotrexate: Results of a twenty-four-week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial," *Arthritis Rheum.*, vol. 46, no. 3, pp. 614–624, 2002.
- [120] C. B. Confavreux and R. D. Chapurlat, "Systemic bone effects of biologic therapies in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis," *Osteoporos. Int.*, vol. 22, no. 4, pp. 1023–1036, 2011.
- [121] H. L. Kim and J. Kochevar, "Isolation of brefeldin A.," *Gen. Pharmacol.*, vol. 26, no. 2, pp. 363–364, 1995.
- [122] S. Rajamahanty, C. Alonzo, S. Aynehchi, M. Choudhury, and S. Konno, "Growth inhibition of androgen-responsive prostate cancer cells with brefeldin A targeting cell cycle and androgen receptor.," *J. Biomed. Sci.*, vol. 17, no. 1, p. 5, 2010.
- [123] E. L. Eskelinen, "Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy," *Mol. Aspects Med.*, vol. 27, no. 5–6, pp. 495–502, 2006.

- [124] M. Huber and M. Lohoff, "IRF4 at the crossroads of effector T-cell fate decision," *Eur. J. Immunol.*, vol. 44, no. 7, pp. 1886–1895, 2014.
- [125] A. L. Shaffer, N. C. Tolga Emre, P. B. Romesser, and L. M. Staudt, "IRF4: Immunity. Malignancy? Therapy?," *Clin. Cancer Res.*, vol. 15, no. 9, pp. 2954–2961, 2009.
- [126] V. Staudt, E. Bothur, M. Klein, K. Lingnau, S. Reuter, N. Grebe, B. Gerlitzki, M. Hoffmann, A. Ulges, C. Taube, N. Dehzad, M. Becker, M. Stassen, A. Steinborn, M. Lohoff, H. Schild, E. Schmitt, and T. Bopp, "Interferon-Regulatory Factor 4 Is Essential for the Developmental Program of T Helper 9 Cells," *Immunity*, vol. 33, no. 2, pp. 192–202, 2010.
- [127] U. Klein, S. Casola, G. Cattoretti, Q. Shen, M. Lia, T. Mo, T. Ludwig, K. Rajewsky, and R. Dalla-Favera, "Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination.," *Nat. Immunol.*, vol. 7, no. 7, pp. 773–782, 2006.
- [128] F. Végran, H. Berger, R. Boidot, G. Mignot, M. Bruchard, M. Dosset, F. Chalmin, C. Rébé, V. Dérangère, B. Ryffel, M. Kato, A. Prévost-Blondel, F. Ghiringhelli, and L. Apetoh, "The transcription factor IRF1 dictates the IL-21-dependent anticancer functions of TH9 cells.," *Nat. Immunol.*, vol. 15, no. 8, pp. 758–766, 2014.
- [129] E. J. Cadera, F. Wan, R. H. Amin, H. Nolla, M. J. Lenardo, and M. S. Schlissel, "NF-kappaB activity marks cells engaged in receptor editing.," *J. Exp. Med.*, vol. 206, no. 8, pp. 1803–1816, 2009.
- [130] H. Shindo, K. Yasui, K. Yamamoto, K. Honma, K. Yui, T. Kohno, Y. Ma, K. J. Chua, Y. Kubo, H. Aihara, T. Ito, T. Nagayasu, T. Matsuyama, and H. Hayashi, "Interferon regulatory factor-4 activates IL-2 and IL-4 promoters in cooperation with c-Rel," *Cytokine*, vol. 56, no. 3, pp. 564–572, 2011.
- [131] R. J. Grumont, I. B. Richardson, C. Gaff, and S. Gerondakis, "rel/NF-kappa B nuclear complexes that bind kB sites in the murine c-rel promoter are required for constitutive c-rel transcription in B-cells.," *Cell Growth Differ.*, vol. 4, no. 9, pp. 731–743, 1993.
- [132] M. Hannink and H. M. Temin, "Structure and autoregulation of the c-rel promoter.," *Oncogene*, vol. 5, no. 12, pp. 1843–1850, 1990.
- [133] L. Lombardi, P. Ciana, C. Cappellini, D. Trecca, L. Guerrini, A. Migliazza, A. T. Maiolo, and A. Neri, "Structural and functional characterization of the promoter regions of the NFKB2 gene.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 23, no. 12, pp. 2328–2336, 1995.
- [134] R. Hrdlicková, J. Nehyba, A. Roy, E. H. Humphries, and H. R. Bose, "The relocalization of v-Rel from the nucleus to the cytoplasm coincides with induction of expression of *Ikba* and *nfkB1* and stabilization of  $\text{IkB-}\alpha$ .," *J. Virol.*, vol. 69, no. 1, pp. 403–413, 1995.
- [135] B. T. Bettinger, D. M. Gilbert, and D. C. Amberg, "Actin up in the nucleus.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 5, no. 5, pp. 410–415, 2004.
- [136] M. Klein, "Die Bedeutung von NFAT-Transkriptionsfaktoren für die Expression von Mastzell-Cytokinen," 2006.
- [137] M. Podtschaske, U. Benary, S. Zwinger, T. Höfer, A. Radbruch, and R. Baumgrass, "Digital NFATc2 activation per cell transforms graded T cell receptor activation into an all-or-none IL-2 expression," *PLoS One*, vol. 2, no. 9, p. e935, 2007.
- [138] F. Végran, L. Apetoh, and F. Ghiringhelli, "Th9 Cells: A Novel CD4 T-cell Subset in the Immune War against Cancer.," *Cancer Res.*, vol. 75, no. 3, pp. 475–479, 2015.
- [139] V. Dardalhon, A. Awasthi, H. Kwon, G. Galileos, W. Gao, R. A. Sobel, M. Mitsdoerffer, T. B. Strom, W. Elyaman, I.-C. Ho, S. Khoury, M. Oukka, and V. K. Kuchroo, "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<sup>-</sup> effector T cells.," *Nat. Immunol.*, vol. 9, no. 12, pp. 1347–1355, 2008.
- [140] M. Veldhoen, C. Uyttenhove, J. van Snick, H. Helmsby, A. Westendorf, J. Buer, B. Martin, C. Wilhelm, and B. Stockinger, "Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset.," *Nat. Immunol.*, vol. 9, no. 12, pp. 1341–1346, 2008.

- [141] M. Kaplan, "Th9 cells: differentiation and disease," *Immunol. Rev.*, vol. 252, no. 1, pp. 104–115, 2013.
- [142] M. Akdis, "The cellular orchestra in skin allergy; are differences to lung and nose relevant?," *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 10, no. 5, pp. 443–451, 2010.
- [143] P. Soroosh and T. A. Doherty, "Th9 and allergic disease," *Immunology*, vol. 127, no. 4, pp. 450–458, 2009.
- [144] R. Kakkar and R. T. Lee, "The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker.," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 7, no. 10, pp. 827–840, 2008.
- [145] C. Garlanda, F. Riva, E. Bonavita, S. Gentile, and A. Mantovani, "Decoys and regulatory 'receptors' of the il-1/toll-like receptor superfamily," *Front. Immunol.*, vol. 4, pp. 1–13, 2013.
- [146] S. Ali, M. Huber, C. Kollewe, S. C. Bischoff, W. Falk, and M. U. Martin, "IL-1 receptor accessory protein is essential for IL-33-induced activation of T lymphocytes and mast cells.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 47, pp. 18660–18665, 2007.
- [147] A. So and N. Busso, "A magic bullet for gout?," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 68, no. 10, pp. 1517–1519, 2009.
- [148] Y. Cao, Y. Jiao, L. Wang, Y. Huang, A. Postlethwaite, J. Stuart, A. Kang, R. W. Williams, and W. Gu, "Anakinra as an interleukin 1 receptor antagonist, complicated genetics and molecular impacts- from the point of view of mouse genomics," *Int. Immunopharmacol.*, vol. 13, no. 1, pp. 28–36, 2012.
- [149] G. Li, J. Domenico, Y. Jia, J. J. Lucas, and E. W. Gelfand, "NF- $\kappa$ B-dependent induction of cathelicidin-related antimicrobial peptide in murine mast cells by lipopolysaccharide," *Int. Arch. Allergy Immunol.*, vol. 150, no. 2, pp. 122–132, 2009.
- [150] C. Garlanda, F. Riva, E. Bonavita, and A. Mantovani, "Negative regulatory receptors of the IL-1 family," *Semin. Immunol.*, vol. 25, no. 6, pp. 408–415, 2013.
- [151] T. Tamiya, K. Ichiyama, H. Kotani, T. Fukaya, T. Sekiya, T. Shichita, K. Honma, K. Yui, T. Matsuyama, T. Nakao, S. Fukuyama, H. Inoue, M. Nomura, and A. Yoshimura, "Smad2/3 and IRF4 play a cooperative role in IL-9-producing T cell induction.," *J. Immunol.*, vol. 191, no. 5, pp. 2360–71, 2013.
- [152] C. R. Escalante, A. L. Brass, J. M. R. Pongubala, E. Shatova, L. Shen, H. Singh, and A. K. Aggarwal, "Crystal structure of PU.1/IRF-4/DNA ternary complex," *Mol. Cell*, vol. 10, no. 5, pp. 1097–1105, 2002.
- [153] J. Nehyba, R. Hrdličková, and H. R. Bose, "Dynamic evolution of immune system regulators: The history of the interferon regulatory factor family," *Mol. Biol. Evol.*, vol. 26, no. 11, pp. 2539–2550, 2009.
- [154] S. Sharma, N. Grandvaux, Y. Mamane, P. Genin, N. Azimi, T. Waldmann, and J. Hiscott, "Regulation of IFN regulatory factor 4 expression in human T cell leukemia virus-I-transformed T cells.," *J. Immunol.*, vol. 169, no. 6, pp. 3120–3130, 2002.
- [155] R. J. Grumont and S. Gerondakis, "Rel induces interferon regulatory factor 4 (IRF-4) expression in lymphocytes: modulation of interferon-regulated gene expression by rel/nuclear factor kappaB.," *J. Exp. Med.*, vol. 191, no. 8, pp. 1281–1292, 2000.
- [156] A. Grossman, H. W. Mittrücker, J. Nicholl, A. Suzuki, S. Chung, L. Antonio, S. Suggs, G. R. Sutherland, D. P. Siderovski, and T. W. Mak, "Cloning of human lymphocyte-specific interferon regulatory factor (hLSIRF/hIRF4) and mapping of the gene to 6p23-p25.," *Genomics*, vol. 37, no. 2, pp. 229–233, 1996.
- [157] T. Matsuyama, A. Grossman, H. W. Mittrücker, D. P. Siderovski, F. Kiefer, T. Kawakami, C. D. Richardson, T. Taniguchi, S. K. Yoshinaga, and T. W. Mak, "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.*, vol. 23, no. 12, pp. 2127–2136, 1995.
- [158] A. Lehtonen, V. Veckman, T. Nikula, R. Lahesmaa, L. Kinnunen, S. Matikainen, and I. Julkunen, "Differential expression of IFN regulatory factor 4 gene in human monocyte-derived dendritic cells and macrophages.," *J. Immunol.*, vol. 175, no. 10, pp. 6570–6579, 2005.

- [159] J. Rengarajan, K. A. Mowen, K. D. McBride, E. D. Smith, H. Singh, and L. H. Glimcher, "Interferon regulatory factor 4 (IRF4) interacts with NFATc2 to modulate interleukin 4 gene expression.," *J. Exp. Med.*, vol. 195, no. 8, pp. 1003–1012, 2002.
- [160] M. Klein, T.-J. Brühl, V. Staudt, S. Reuter, N. Grebe, B. Gerlitzki, M. Hoffmann, T. Bohn, A. Ulges, N. Stergiou, J. de Graaf, M. Lower, C. Taube, M. Becker, T. Hain, S. Dietzen, M. Stassen, M. Huber, M. Lohoff, A. Campos Chagas, J. Andersen, J. Kotal, H. Langhansova, J. Kopecky, H. Schild, M. Kotsyfakis, E. Schmitt, and T. Bopp, "Tick Salivary Sialostatin L Represses the Initiation of Immune Responses by Targeting IRF4-Dependent Transcription in Murine Mast Cells," *J. Immunol.*, vol. 195, no. 2, pp. 621–631, 2015.
- [161] D. P. Bartel, "MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function," *Cell*, vol. 116, no. 2, pp. 281–297, 2004.
- [162] A. Y.-L. So, R. Sookram, A. A. Chaudhuri, A. Minisandram, D. Cheng, C. Xie, E. L. Lim, Y. Garcia Flores, S. Jiang, J. T. Kim, C. Keown, P. Ramakrishnan, and D. Baltimore, "Dual mechanisms by which MiR-125b represses IRF4 to induce myeloid and B cell leukemias.," *Blood*, vol. 124, no. 9, pp. 1502–1512, 2014.
- [163] M. Gururajan, C. L. Haga, S. Das, C. M. Leu, D. Hodson, S. Josson, M. Turner, and M. D. Cooper, "MicroRNA 125b inhibition of B cell differentiation in germinal centers," *Int. Immunol.*, vol. 22, no. 7, pp. 583–592, 2010.
- [164] S. Marecki, C. J. Riendeau, M. D. Liang, and M. J. Fenton, "PU.1 and multiple IFN regulatory factor proteins synergize to mediate transcriptional activation of the human IL-1 beta gene.," *J. Immunol.*, vol. 166, no. 11, pp. 6829–6838, 2001.
- [165] A. L. Brass, A. Q. Zhu, and H. Singh, "Assembly requirements of PU.1-Pip (IRF-4) activator complexes: Inhibiting function in vivo using fused dimers," *EMBO J.*, vol. 18, no. 4, pp. 977–991, 1999.
- [166] T. Tamura, H. Yanai, D. Savitsky, and T. Taniguchi, "The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis.," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 26, pp. 535–584, 2008.
- [167] S. Kirchhoff and H. Hauser, "Cooperative activity between HER oncogenes and the tumor suppressor IRF-1 results in apoptosis.," *Oncogene*, vol. 18, no. 25, pp. 3725–3736, 1999.
- [168] K. B. Harikumar, J. W. Yester, M. J. Surace, C. Oyeniran, M. M. Price, W.-C. Huang, N. C. Hait, J. C. Allegood, A. Yamada, X. Kong, H. M. Lazear, R. Bhardwaj, K. Takabe, M. S. Diamond, C. Luo, S. Milstien, S. Spiegel, and T. Kordula, "K63-linked polyubiquitination of transcription factor IRF1 is essential for IL-1-induced production of chemokines CXCL10 and CCL5.," *Nat. Immunol.*, vol. 15, no. 3, pp. 231–8, 2014.
- [169] A. Rettino and N. M. Clarke, "Genome-wide Identification of IRF1 Binding Sites Reveals Extensive Occupancy at Cell Death Associated Genes," *J. Carcinog. Mutagen.*, vol. Specific I, pp. S6–009, 2013.
- [170] S. H. Sims, Y. Cha, M. F. Romine, P. Q. Gao, K. Gottlieb, and A. B. Deisseroth, "A novel interferon-inducible domain: structural and functional analysis of the human interferon regulatory factor 1 gene promoter.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 13, no. 1, pp. 690–702, 1993.
- [171] H. Harada, E. Takahashi, S. Itoh, K. Harada, T. A. Hori, and T. Taniguchi, "Structure and regulation of the human interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2 genes: implications for a gene network in the interferon system.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 14, no. 2, pp. 1500–1509, 1994.
- [172] A. Moschonas, M. Kouraki, P. G. Knox, E. Thymiakou, D. Kardassis, and A. G. Eliopoulos, "CD40 induces antigen transporter and immunoproteasome gene expression in carcinomas via the coordinated action of NF-kappaB and of NF-kappaB-mediated de novo synthesis of IRF-1.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 28, no. 20, pp. 6208–6222, 2008.
- [173] E. Loda and R. Balabanov, "Interferon regulatory factor 1 regulation of oligodendrocyte injury and inflammatory demyelination," *Rev. Neurosci.*, vol. 23, no. 2, pp. 145–152, 2012.

- [174] M. Sgarbanti, A. L. Remoli, G. Marsili, B. Ridolfi, A. Borsetti, E. Perrotti, R. Orsatti, R. Ilari, L. Sernicola, E. Stellacci, B. Ensoli, and A. Battistini, "IRF-1 is required for full NF-kappaB transcriptional activity at the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat enhancer.," *J. Virol.*, vol. 82, no. 7, pp. 3632-3641, 2008.
- [175] M. F. Stein, S. Lang, T. H. Winkler, A. Deinzer, S. Erber, D. M. Nettelbeck, E. Naschberger, R. Jochmann, M. Stürzl, R. K. Slany, T. Werner, A. Steinkasserer, and I. Knippertz, "Multiple interferon regulatory factor and NF-kB sites cooperate in mediating cell-type- and maturation-specific activation of the human CD83 promoter in dendritic cells.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 33, no. 7, pp. 1331-44, 2013.
- [176] L. S. Oliveira, N. M. G. P. de Queiroz, L. V. S. Veloso, T. G. Moreira, F. S. Oliveira, M. B. H. Carneiro, A. M. Faria, L. Q. Vieira, S. C. Oliveira, and M. F. Horta, "A defective TLR4 signaling for IFN- $\beta$  expression is responsible for the innately lower ability of BALB/c macrophages to produce NO in response to LPS as compared to C57BL/6," *PLoS One*, vol. 9, no. 6, p. e98913, 2014.
- [177] T. Blank and M. Prinz, "NF-kB signaling regulates myelination in the CNS.," *Front. Mol. Neurosci.*, vol. 7, p. 47, 2014.
- [178] F. Köntgen, R. J. Grumont, A. Strasser, D. Metcalf, R. Li, D. Tarlinton, and S. Gerondakis, "Mice lacking the c-rel proto-oncogene exhibit defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin-2 expression," *Genes Dev.*, vol. 9, no. 16, pp. 1965-1977, 1995.
- [179] T. D. Gilmore and S. Gerondakis, "The c-Rel Transcription Factor in Development and Disease," *Genes Cancer*, vol. 2, no. 7, pp. 695-711, 2011.
- [180] M. Vaeth, C. A. Bäuerlein, T. Pusch, J. Findeis, M. Chopra, A. Mottok, A. Rosenwald, A. Beilhack, and F. Berberich-Siebelt, "Selective NFAT targeting in T cells ameliorates GvHD while maintaining antitumor activity," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 112, no. 4, pp. 1125-1130, 2015.
- [181] K. Urso, A. Alfranca, S. Martínez-Martínez, A. Escolano, I. Ortega, A. Rodríguez, and J. M. Redondo, "NFATc3 regulates the transcription of genes involved in T-cell activation and angiogenesis," *Blood*, vol. 118, no. 3, pp. 795-803, 2011.
- [182] A. M. Ranger, M. J. Grusby, M. R. Hodge, E. M. Gravallesse, F. C. de la Brousse, T. Hoey, C. Mickanin, H. S. Baldwin, and L. H. Glimcher, "The transcription factor NF-ATc is essential for cardiac valve formation.," *Nature*, vol. 392, no. 6672, pp. 186-190, 1998.
- [183] Y. Terui, N. Saad, S. Jia, F. McKeon, and J. Yuan, "Dual role of sumoylation in the nuclear localization and transcriptional activation of NFAT1," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 27, pp. 28257-28265, 2004.
- [184] S. Chuvpilo, E. Jankevics, D. Tyrsin, A. Akimzhanov, D. Moroz, M. K. Jha, J. Schulze-Luehrmann, B. Santner-Nanan, E. Feoktistova, T. König, A. Avots, E. Schmitt, F. Berberich-Siebelt, A. Schimpl, and E. Serfling, "Autoregulation of NFATc1/A expression facilitates effector T cells to escape from rapid apoptosis," *Immunity*, vol. 16, no. 6, pp. 881-895, 2002.
- [185] S. Monticelli and A. Rao, "NFAT1 and NFAT2 are positive regulators of IL-4 gene transcription," *Eur. J. Immunol.*, vol. 32, no. 10, pp. 2971-2978, 2002.
- [186] L. Dietz, F. Frommer, A.-L. Vogel, M. Vaeth, E. Serfling, A. Waisman, M. Buttmann, and F. Berberich-Siebelt, "NFAT1 deficit and NFAT2 deficit attenuate EAE via different mechanisms," *Eur. J. Immunol.*, vol. 45, no. 5, pp. 1377-1389, 2015.
- [187] E. Serfling, A. Avots, S. Klein-Hessling, R. Rudolf, M. Vaeth, and F. Berberich-Siebelt, "NFATc1/ $\alpha$ A: The other Face of NFAT Factors in Lymphocytes," *Cell Commun. Signal.*, vol. 10, no. 1, p. 16, 2012.
- [188] G. J. Martinez, R. M. Pereira, T. Äijö, E. Y. Kim, F. Marangoni, M. E. Pipkin, S. Togher, V. Heissmeyer, Y. C. Zhang, S. Crotty, E. D. Lamperti, K. M. Ansel, T. R. Mempel, H. Lähdesmäki, P. G. Hogan, and A. Rao, "The Transcription Factor NFAT Promotes Exhaustion of Activated CD8<sup>+</sup> T Cells," *Immunity*, vol. 42, no. 2, pp. 265-278, 2015.
- [189] B. Bengsch and E. J. Wherry, "The Importance of Cooperation: Partnerless NFAT Induces T Cell Exhaustion," *Immunity*, vol. 42, no. 2, pp. 203-205, 2015.

- [190] B. Zhou, R. Q. Cron, B. Wu, A. Genin, Z. Wang, S. Liu, P. Robson, and H. Scott Baldwin, "Regulation of the murine Nfatc1 gene by NFATc2," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 12, pp. 10704–10711, 2002.
- [191] F. R. G. Carneiro, R. Ramalho-Oliveira, G. P. Mognol, and J. P. B. Viola, "Interferon regulatory factor 2 binding protein 2 is a new NFAT1 partner and represses its transcriptional activity.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 31, no. 14, pp. 2889–2901, 2011.
- [192] A. Jash, A. Sahoo, G. C. Kim, C. S. Chae, J. S. Hwang, J. E. Kim, and S. H. Im, "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.*, vol. 287, no. 19, pp. 15445–15457, 2012.
- [193] J. Köck, S. Kreher, K. Lehmann, R. Riedel, M. Bardua, T. Lischke, M. Jargosch, C. Haftmann, H. Bendfeldt, F. Hatam, M. Mashreghi, R. Baumgrass, A. Radbruch, and H.-D. Chan, "Nuclear Factor of Activated T Cells Regulates the Expression of Interleukin-4 in Th2 Cells in an All-or-none Fashion," *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 39, pp. 26752–26761, 2014.
- [194] A. Nayak, J. Glöckner-Pagel, M. Vaeth, J. E. Schumann, M. Buttmann, T. Bopp, E. Schmitt, E. Serfling, and F. Berberich-Siebelt, "Sumoylation of the transcription factor NFATc1 leads to its subnuclear relocalization and interleukin-2 repression by histone deacetylase," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 16, pp. 10935–10946, 2009.
- [195] C. M. Hickey, N. R. Wilson, and M. Hochstrasser, "Function and Regulation of SUMO Proteases," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 13, no. 12, pp. 755–766, 2013.

## 10 Curriculum Vitae

