

Aus der medizinischen Klinik für Rheumatologie und klinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Die Analyse der IL-4-Expressionsheterogenität
in differenzierten Th2-Zellen**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Stephan Kreher

aus Elsterwerda

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat A. Radbruch

2. Prof. Dr. rer. nat. A. Hamann

3. Prof. Dr. E. Serfling

Datum der Promotion: 01. 06.2008

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|--------|
| Abkürzungsverzeichnis | - 9 - |
| Herstellerverzeichnis | - 9 - |
| 1 Einleitung..... | - 13 - |
| 1.1 Die Differenzierung von T-Helfer-Zellen | - 14 - |
| 1.2 Die Differenzierung naiver Th-Zellen in Th1-Effektorzellen | - 16 - |
| 1.3 Die Differenzierung naiver Th-Zellen in Th2-Effektorzellen | - 17 - |
| 1.4 Die klinische Bedeutung der Th2-vermittelten Immunantwort | - 17 - |
| 1.5 Die Regulation der Interleukin-4-Expression in Th2-Zellen | - 18 - |
| 1.5.1 Signalwege und Transkriptionsfaktoren der IL-4-Expression | - 19 - |
| 1.5.1.1 Der IL-4/IL-4-Rezeptor/STAT6-Signaltransduktionsweg | - 19 - |
| 1.5.1.2 GATA-3 | - 20 - |
| 1.5.1.3 NFAT | - 21 - |
| 1.5.1.4 c-MAF | - 23 - |
| 1.5.1.5 NF- κ B | - 23 - |
| 1.5.1.6 AP1 | - 24 - |
| 1.5.1.7 Der IL2/STAT5-Signaltransduktionsweg..... | - 25 - |
| 1.5.2 Der IL-4-Promoter und cis-regulatorische Elemente des IL-4-Lokus | - 25 - |
| 1.5.3 Die epigenetische Regulation der IL-4-Expression | - 28 - |
| 1.5.4 Die stochastische Regulation der IL-4-Expression | - 31 - |
| 1.6 Fragestellung der Arbeit..... | - 32 - |
| 2 Material und Methoden | - 34 - |
| 2.1 Zusammensetzung von Medien, Puffern und Lösungen..... | - 34 - |
| 2.1.1 Molekularbiologie | - 34 - |
| 2.1.2 Zellkultur..... | - 36 - |
| 2.2 Versuchstiere | - 36 - |
| 2.3 Herstellung von Einzelzellsuspensionen..... | - 36 - |
| 2.4 Zellkultur..... | - 36 - |
| 2.5 Durchflußzytometrie | - 37 - |

| | | |
|--------|---|--------|
| 2.6 | Fluoreszenz-aktivierte Zell-Sortierung (FACS)..... | - 37 - |
| 2.7 | Isolierung naiver Th-Lymphozyten durch magnetische Zellseparation..... | - 38 - |
| 2.8 | Präparation von Antigen-präsentierenden Zellen..... | - 38 - |
| 2.9 | Stimulation und Differenzierung von Th-Zellen in vitro..... | - 39 - |
| 2.10 | Polyklonale Restimulation | - 39 - |
| 2.11 | Sortierung lebender, IL-4-sekretierender Zellen | - 40 - |
| 2.12 | Intrazelluläre Zytokinfärbungen | - 40 - |
| 2.13 | Magnetische Chromatin-Immunopräzipitation | - 41 - |
| 2.14 | Quantitative Echtzeit-PCR (LightCycler)..... | - 42 - |
| 2.15 | mRNA-Expressionsanalyse | - 44 - |
| 2.15.1 | Gesamt-RNA-Präparation | - 44 - |
| 2.15.2 | cDNA-Präparation..... | - 44 - |
| 2.16 | Genomweite mRNA-Expressionsanalyse mittels der GenChip-Micro-Array- Technologie (Affymetrix) | - 44 - |
| 2.17 | Präparation von Zellkernextrakten..... | - 45 - |
| 2.18 | Analyse der Proteinexpression mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese | - 46 - |
| | (SDS-PAGE) und Western Blot | - 46 - |
| 2.18.1 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)..... | - 46 - |
| 2.18.2 | Western Blot..... | - 47 - |
| 2.19 | Antikörper | - 47 - |
| 3 | Ergebnisse..... | - 48 - |
| 3.1 | Die magnetische Chromatin-Immunopräzipitation..... | - 48 - |
| 3.2 | Die Transkriptionsfaktorbindung am IL-4-Lokus in unstimulierten und restimulierten Th2-Zellen..... | - 51 - |
| 3.2.1 | Die Bindung von NFAT1, NFAT2, c-MAF und NF- κ B/p65 an den IL-4-Lokus | - 53 - |
| 3.2.2 | Die Bindung der Transkriptionsfaktoren SWI/SNF/Brg1, p300, GATA-3 und STAT6 an den IL-4-Lokus..... | - 54 - |

| | | |
|-------|---|------|
| 3.3 | Die Bindungskinetiken der untersuchten Transkriptionsfaktoren an den IL-4-Lokus in stimulierten Th2-Zellen | 56 - |
| 3.3.1 | Die Bindungskinetiken von NFAT1 und NFAT2 am IL-4-Promoter und an die HS Va | 58 - |
| 3.3.2 | Die Bindungskinetiken der Transkriptionsfaktoren c-MAF und NF-κB/p65 am IL-4-Promoter | 59 - |
| 3.3.3 | Die Bindungskinetiken des transkriptionellen Koaktivators p300 und des Chromatin-Remodeling-Komplexes SWI/SNF/Brg1 am IL-4-Lokus | 59 - |
| 3.3.4 | Die Bindungskinetiken der Transkriptionsfaktoren STAT6 und GATA-3 am IL-4-Lokus | 60 - |
| 3.4 | Die Rekrutierung des Transkriptionsfaktorkomplexes an den IL-4-Lokus ist von der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT abhängig..... | 62 - |
| 3.5 | Die Transkriptionsfaktorbindung am IL-4-Lokus in IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen | 65 - |
| 3.5.1 | Die epigenetische Chromatinkonfiguration des IL-4-Promoters in IL-4-produzierenden und IL-4-Nichtproduzierenden Th2-Zellen | 67 - |
| 3.5.2 | Die Bindung von NFAT1 und NFAT2 an den IL-4-Lokus in IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen | 69 - |
| 3.5.3 | Die Expression, zelluläre Lokalisation und Aktivierung von NFAT1 und NFAT2 in IL-4-produzierenden und IL-4-Nichtproduzierenden Th2-Zellen.... | 70 - |
| 3.5.4 | Die Bindung der Transkriptionsfaktoren c-MAF, NF-κB/p65, SWI/SNF/Brg1 und p300 an den IL-4-Lokus in IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen | 74 - |
| 3.5.5 | Die Bindung der Transkriptionsfaktoren STAT6 und GATA-3 an den IL-4-Lokus in IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen. | 76 - |
| 3.6 | Die Analyse des differentiellen Genexpressionsmusters zwischen IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen | 78 - |
| 4 | Diskussion | 83 - |
| 4.1 | In differenzierten Th2-Zellen bindet ein aktiver Transkriptionsfaktorkomplex restimulationsabhängig an den IL-4-Lokus | 85 - |

| | | |
|-----|---|---------|
| 4.2 | Die restimulationsabhängige Bindung des untersuchten Transkriptionsfaktor- komplexes an den IL-4-Lokus ist transient und geht zeitgleich einher mit der Initiierung und Terminierung der IL-4-Transkription | - 90 - |
| 4.3 | Die Bindung des Transkriptionsfaktorkomplexes an den IL-4-Lokus ist von der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT abhängig | - 92 - |
| 4.4 | IL-4-produzierende und IL-4-nichtproduzierende Th2-Zellen unterscheiden sich in der NFAT-abhängigen Bindung des untersuchten Transkriptionsfaktorkomplexes an den IL-4-Lokus..... | - 95 - |
| 4.5 | IL-4-produzierende und IL-4-nichtproduzierende Th2-Zellen sind durch ein differentielles Genexpressionsmuster charakterisiert | - 98 - |
| 4.6 | Ein molekulares Modell der stochastisch-determinierten IL-4-Expression..... | - 101 - |
| 5 | Zusammenfassung | - 107 - |
| 6 | Literaturverzeichnis | - 109 - |
| 7 | Anhang..... | - 118 - |
| 7.1 | Danksagung..... | - 118 - |
| 7.2 | Publikationen | - 119 - |
| 7.3 | Erklärung..... | - 120 - |
| 7.4 | Lebenslauf..... | - 121 - |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------|---|
| Abb. | Abbildung |
| APC | Antigenpräsentierende Zelle |
| bp | Basenpaare |
| Bref.A | Brefeldin A |
| BSA | bovines Serumalbumin (Rinderserumalbumin) |
| CD | Cluster of Differentiation (Differenzierungscluster) |
| ChIP | Chromatin-Immunoprecipitation |
| CNS | conserved non-coding sequence (konservierte, nicht-kodierende Region) |
| DNA | Desoxyribonucleic Acid (Deoxyribonukleinsäure) |
| EDTA | Ethylendiamin-N, N, N', N'-tetraacetat |
| FA | Formaldehyd |
| FACS | Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung |
| FCS | Fetal Calf Serum (Fötales Kälberserum) |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| GFP | Green Fluorescent Protein (Grün-fluoreszierendes Protein) |
| h | Stunde |
| H3 | Histon H3 |
| HSS | Hypersensitivitätsstelle |
| IFN | Interferon |
| IL | Interleukin |
| Iono | Ionomycin |
| Kb | Kilobase(n) |
| MACS | Magnetic Cell Sorting (Magnetische Zellsortierung) |

| | |
|----------|---|
| ME | β -Mercaptoethanol |
| MHC | Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex) |
| Min | Minute |
| NP-40 | Nonylphenylpolyethylenglycol-40 |
| OVA | Hühnerovalbumin |
| PBS | Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung) |
| PCR | Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion) |
| PE | R-Phycoerythrin |
| PMA | Phorbol-12-Myristat-13-Acetat |
| rpm | rotation per minute (Umdrehungen pro Minute) |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute |
| RT | Raumtemperatur |
| RT-PCR | Reverse-Transkriptase PCR |
| SDS | sodium dodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat) |
| T-bet | T-Box exprimiert in T-Zellen |
| TCR | T-Zell Rezeptor |
| Tg | transgen |
| Th | T Helfer |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan |
| α | Anti (Antikörper gegen) |

Herstellerverzeichnis

Affymetrix, Santa Clara, USA

AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Bandelin, Berlin, Deutschland

BD Biosciences (Becton Dickinson), Heidelberg, Deutschland

Biontix, München, Deutschland

Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Caltag Laboratories, Hamburg, Deutschland

De Novo Software, Thornhill, Kanada

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Gibco BRL, Eggenstein-Leopoldhafen, Deutschland

Greiner, Nürtingen, Deutschland

Heraeus, Hanau, Deutschland

ImmunoGlobe Antikörpertechnik GmbH, Himmelstadt, Deutschland

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Macherey-Nagel, Düren, Deutschland

Merck, Darmstadt, Deutschland

Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland

NanoDrop Technologies, Wilmington, USA

New England Biolabs (NEB), Frankfurt am Main, Deutschland

PAA, Cölbe, Deutschland

Peptid Synthese Labor, Charité, Humboldt-Universität, Berlin, Deutschland

Pharmingen, Hamburg, Deutschland

Pierce Biotechnology Inc., Rockford, USA

Qiagen, Hilden, Deutschland

R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland

Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland

Roth, Karlsruhe, Deutschland

Santa Cruz Biotechnology, Inc., Kalifornien, USA

Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Sigma, München, Deutschland

TIB Molbiol, Berlin, Deutschland

Upstate, Lake Placid, New York, USA

1 Einleitung

Das Immunsystem höherer Wirbeltiere besteht aus einem komplexen System unterschiedlicher, miteinander interagierender Zellen und Botenstoffe. Dies erlaubt eine rasche und effektive Immunreaktion gegen eine Vielzahl unterschiedlicher Pathogene wie Bakterien, Viren, Pilze, Protozoen und Würmer. Funktionell unterscheidet man eine natürliche, angeborene, nicht-adaptive Immunabwehr von einer spezifischen, erworbenen, adaptiven Immunabwehr. Beide setzen sich aus unterschiedlichen zellulären und löslichen Komponenten zusammen, die eng bei der Ausbildung einer spezifischen Immunantwort zusammenarbeiten. Der angeborene Arm des Immunsystems bildet dabei die erste Verteidigungslinie gegen viele der üblichen Mikroorganismen und spielt für die Bekämpfung häufiger bakterieller Infektionen eine tragende Rolle. Die Abwehrsysteme der nicht-adaptiven Immunität beruhen auf unveränderlichen Rezeptoren, die allgemein vorkommende Merkmale von Krankheitserregern erkennen. Die Aktivierung dieser Abwehrmechanismen löst durch eine Freisetzung bestimmter Immunbotenstoffe, den Zytokinen, eine Entzündungsreaktion aus, die im Zusammenspiel mit den Fresszellen des Immunsystems, den neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, viele Infektionen erfolgreich bekämpfen. Werden diese angeborenen Immunabwehrmechanismen durch einen pathogenen Erreger durchbrochen, kommt die erworbene, adaptive Immunabwehr zum Tragen. Die einzigartige Eigenschaft der adaptiven Immunität ist die Fähigkeit, durch eine klonale Selektion von Lymphozyten mit antigenspezifischen Rezeptoren Pathogene spezifisch zu erkennen und durch die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses einen stärkeren Schutz gegen eine erneute Infektion zu bieten. In Abhängigkeit von der Art der Infektion bildet sich eine zelluläre Immunantwort, die vor allem für die Bekämpfung intrazellulärer Mikroorganismen wichtig ist, bzw. eine humorale Immunantwort, die sich in erster Linie gegen extrazelluläre Pathogene richtet, aus. Sowohl bei der zellvermittelten als auch bei der humoralen Immunantwort spielen T-Helferzellen (Th-Zellen), die den Korezeptor CD4 exprimieren, eine entscheidende Rolle. Bei der zellulären Immunantwort aktivieren Th1-Zellen Makrophagen, die daraufhin effektiv intrazelluläre Pathogene abtöten können; bei der humoralen Immunantwort regen Th2-Zellen naive B-Zellen an, IgM zu sezernieren und lösen die Synthese anderer Antikörperisotypen wie IgG, IgA oder IgE aus. Beide Subtypen, die Th1- und die Th2-Zellen, entwickeln sich aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle, der naiven T-Helferzelle. Der Differenzierungsprozess der naiven T-Helferzelle zu ausgereiften Th1- oder Th2-Effektorzellen ist ein dynamischer und feinregulierter Prozess, der im Mittelpunkt des Zusammenspiels zwischen der zellvermittelten und der humoralen Immunantwort steht.¹⁻⁴

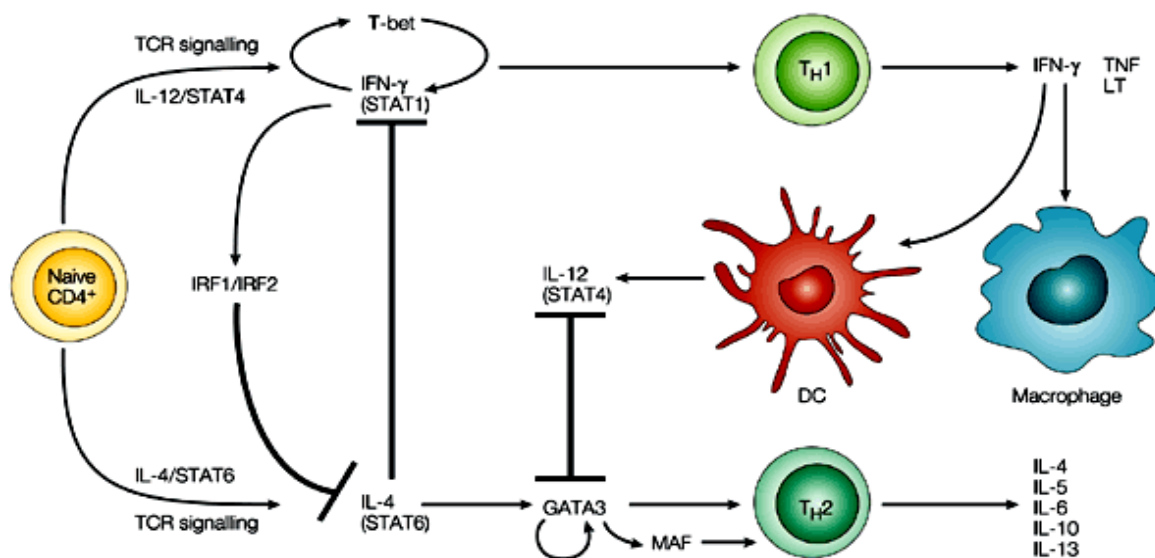
1.1 Die Differenzierung von T-Helfer-Zellen

Naive CD4⁺-T-Helferzellen unterstehen nach Aktivierung ihres T-Zell-Rezeptors (TCR) durch eine spezifische Erkennung des Peptid-MHC-Komplexes auf dendritischen Zellen einem programmierten Differenzierungsprozess (Abbildung 1). Die ausdifferenzierten Th-Effektorzellen sind dabei durch ein unterschiedliches Zytokin-Expressionsprofil charakterisiert.⁵ Th1-Zellen produzieren Interferon- γ (IFN- γ), Interleukin-2 (IL-2) und Lymphotoxin- β (LT- β), während Th2-Zellen die Zytokine Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-13 (IL-13), Interleukin-5 (IL-5), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-10 (IL-10) und Interleukin-9 (IL-9) bilden. Viele unterschiedliche Faktoren wie die Affinität des T-Zell-Rezeptors zum Antigen, verschiedene kostimulatorische Moleküle wie CD28 oder OX40, Chromatin-remodeling Faktoren und andere nicht-Zytokin Faktoren beeinflussen die Differenzierung der naiven T-Zelle in eine Th1- oder eine Th2-Zelle.

Die Aktivierung der naiven T-Zellen durch den T-Zell-Rezeptor ist dabei für die Differenzierung in Th-Effektorzellen notwendig, alleinig aber nicht ausreichend. So behalten voraktivierte naive T-Zellen ihre Fähigkeit, sich bei einer erneuten Aktivierung in Abhängigkeit von Differenzierungssignalen in Th1- oder Th2-Zellen zu entwickeln⁶⁻⁸. *In vitro* lassen sich naive T-Zellen sehr effizient mit dem entsprechenden Antigen bzw. TCR-Liganden in Anwesenheit der Zytokine IL-12 und IFN γ (Th1) bzw. IL-4 (Th2) polarisieren. Die Kombination von TCR-Aktivierung und Zytokin-Stimulation aktiviert verschiedene Signaltransduktionswege und Transkriptionsfaktoren, die synergistisch die zelluläre Differenzierung induzieren. Die Zytokine IL-12 und IL-4, die über ihre Signaltransduktionskomponenten *Signal transducer and activator of transcription 4* (STAT4) und STAT6 wirken, sind dabei Schlüsselfaktoren des Differenzierungsprozesses. Sie regulieren die Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren, die bei der Ausbildung und Aufrechterhaltung charakteristischer Genexpressionsprogramme in Th-Effektorzellen eine wesentliche Rolle spielen. Im Zuge der Differenzierung werden verschiedene Gene epigenetisch geöffnet, andere wiederum epigenetisch geschlossen. Stimulierte naive T-Zellen zeigen eine geringe Expression der Th1-Zytokine wie IFN- γ , als auch der Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13⁹. Beide Gen-Loci sind somit zu einem gewissen Ausmaß für aktivierende Transkriptionsfaktoren zugänglich. Th1-Effektorzellen haben den IFN- γ -Lokus epigenetisch geöffnet und exprimieren nach TCR-Aktivierung große Mengen an IFN- γ . Der IL-4-Lokus hingegen ist in Th1-Zellen epigenetisch geschlossen und wird nicht transkribiert. Th2-Effektorzellen zeigen ein umgedrehtes Genexpressionsmuster: der IL-4-Lokus ist epigenetisch geöffnet und wird nach TCR-Triggerung transkribiert, während der IFN- γ -Lokus geschlossen und damit nicht abgelesen wird.

Diese Änderungen der Chromatin-Struktur der Zytokingene bilden die Grundlage des Zytokingedächtnisses, die Aufrechterhaltung der charakteristischen Zytokinexpression bei allen nachfolgenden TCR-Aktivierungen.

Neuere Studien von Harrington et al. und Anderen konnten neben der Existenz CD4-positiver Th1- und Th2-Zellen sowie CD25⁺/FoxP3⁺ regulatorischer T-Zellen eine vierte Zellpopulation nachweisen, die eine eigene Untergruppe CD4-positiver T-Zellen darstellt^{10,11}. Diese IL-17-produzierenden Th17-Zellen differenzieren sich in Abhängigkeit der Faktoren TGF-β, IL-6 und IL-23 und spielen bei proinflammatorischen Immunreaktionen sowie bei der Pathogenese verschiedener Autoimmunreaktionen eine tragende Rolle¹²⁻¹⁶.



Quelle: Li-Weber et al. Nat Rev Immunol. 2003 Jul;3(7):534-43

Abbildung 1: Die Differenzierung naiver T-Helfer-Zellen (Th) in Th-Effektorzellen. Naive CD4⁺-T-Helfer-Zellen können sich in eine Th1- bzw. Th2-Effektorzelle differenzieren. Die Zytokine IL-12 und IFN γ induzieren die Polarisierung in Richtung Th1-Zelle; das Zytokin IL-4 spielt eine wichtige Rolle bei der Th2-Zellentwicklung. IL-12 aktiviert über den IL-12-Rezeptor den *Signal transducer and activator of transcription 4* (STAT4), der die Expression von IFN γ induziert. IFN γ wiederum induziert einerseits die Expression von IL-12, des IL-12-Rezeptors und des Th1-spezifischen Transkriptionsfaktors T-bet, andererseits hemmt es über die Induktion des *Interferon regulatory factors 1* (IRF1) und IRF2 die IL-4-Expression und damit die Th2-Zellentwicklung. T-bet vermittelt die epigenetische Öffnung des IFN γ -Lokus und trägt somit hauptsächlich zur Induktion der IFN γ -Expression bei. IL-4 aktiviert den *Signal transducer and activator of transcription 6* (STAT6), der die Expression des Th2-spezifischen Transkriptionsfaktors GATA3 (*GATA-binding protein 3*) vermittelt. GATA3 induziert einerseits die epigenetische Öffnung des Th2-Zytokin-Clusters und damit die Expression der Zytokine IL-4, IL-13 und IL-5, andererseits hemmt es über die Blockierung des IL-12-Signaltransduktionsweges die Expression der Th1-Zytokine. Zusätzlich können sich die IL-4-Rezeptor-STAT6- und die IL12-Rezeptor-STAT4-Signalwege durch die Verminderung der Expression von GATA3 und T-bet gegenseitig inhibieren. (DC, Dendritische Zelle; LT, Lymphotoxin; TNF, Tumornekrosefaktor)

1.2 Die Differenzierung naiver Th-Zellen in Th1-Effektorzellen

Th1-Effektorzellen zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, nach Aktivierung die Zytokine Interferon- γ (IFN- γ), Interleukin-2 (IL-2) und Lymphotoxin- β (LT- β) zu exprimieren. Die akute Interferon- γ -Expression kann dabei über zweierlei Wege induziert werden: a.) über die Triggerung des T-Zell-Rezeptors kommt es zur Aktivierung TCR-abhängiger Transkriptionsfaktoren wie NFAT und NF- κ B, die die IFN- γ -Expression induzieren und b.) die kombinierte Stimulation durch die Zytokine IL-12 und IL-18 führt zu einer NFAT-unabhängigen Expression von IFN- γ . IFN- γ selbst aktiviert Phagozyten, die über eine vermehrte Radikalbildung intrazelluläre Parasiten wie Leishmanien oder Listerien besser abtöten können. Darüber hinaus induziert es bei Makrophagen die vermehrte Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen, wodurch Fremd-Antigene verstärkt präsentiert werden können. In aktivierten B-Lymphozyten bewirkt es einen Antikörperklassenwechsel zu den komplement-bindenden und opsonisierenden Isotypen IgG2a und IgG3. Weiterhin spielt IFN- γ für die Reifung zytotoxischer CD8-T-Zellen sowie für die Potenzierung der zytolytischen Aktivität von NK-Zellen eine bedeutsame Rolle. Über die Induktion von *Interferon regulatory factor 1* (IRF1) und IRF2 hemmt es die Interleukin-4-Expression und damit die Th2-Differenzierung¹⁷.

Für die Polarisierung naiver Th-Zellen in Th1-Effektorzellen spielen die Zytokine IL-12 und IFN- γ eine wesentliche Rolle (Abb. 1). IL-12, das hauptsächlich von Antigen-präsentierenden Zellen wie dendritischen Zellen oder Makrophagen exprimiert wird, aktiviert den *Signal transducer and activator of transcription 4* (STAT4) und induziert damit die Expression von IFN- γ ¹⁸⁻²⁰. IFN- γ wiederum verstärkt die Expression von IL-12 und des IL-12-Rezeptors²¹. Über die Aktivierung des *Signal transducer and activator of transcription 1* (STAT1) induziert es den Th1-spezifischen T-box Transkriptionsfaktor T-bet²², der als einer der Hauptregulatoren der Th1-Zellentwicklung gilt. T-bet ist an der epigenetischen Öffnung des IFN- γ -Lokus beteiligt und bildet durch die Induktion der IFN- γ -Expression einen positiven Regelkreis. Zusätzlich bewirkt es die Expression der IL-12-Rezeptor- β 2-Untereinheit und macht damit die sich differenzierenden Th1-Zellen empfänglicher für den Wachstumsfaktor IL-12^{17,23-25}. Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors T-bet für die Th1-Differenzierung spiegelt sich in der Tatsache wieder, dass T-bet-Knock-out Mäuse eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber einer Infektion mit *Leishmania major*²³ sowie eine erhöhte Prädisposition gegenüber allergischen Atemwegserkrankungen zeigen²⁶.

1.3 Die Differenzierung naiver Th-Zellen in Th2-Effektorzellen

Ausdifferenzierte Th2-Effektorzellen exprimieren nach Aktivierung des T-Zell-Rezeptors das Zytokin Interleukin-4 (IL-4), das für die Modulierung vieler Th2-Effektorfunktionen maßgeblich verantwortlich ist. Es verstärkt die Expression der MHC-Klasse-II-Moleküle auf antigen-präsentierenden B-Zellen, induziert in B-Zellen den Antikörperklassenwechsel nach IgG1 und IgE und hat gleichsam eine mitogene Wirkung auf B-Zellen²⁷. Interleukin-4 ist jedoch nicht nur ein zentrales Effektormolekül differenzierter Th2-Zellen, sondern spielt bei der Induktion der Th2-Differenzierung selbst eine bedeutsame Rolle. Als initiale IL-4-Quelle für den Th2-Differenzierungsprozess kommen *in vivo* vermutlich neben bereits differenzierten Th2-Effektorzellen andere IL-4-produzierende Zellen wie NKT-Zellen, Mastzellen oder basophile Granulozyten in Betracht. Die Bindung von IL-4 an den IL-4-Rezeptor aktiviert in den naiven Th-Zellen den *Signal transducer and activator of transcription 6* (STAT6), der in den Zellkern wandert und die Expression Th2-spezifischer Gene reguliert (Abb.1). In Kombination mit TCR-abhängigen Transkriptionsfaktoren wie der *Nuclear factor of activated T cells* (NFAT) und *Nuclear factor kappa B* (NF-κB) induziert STAT6 die Expression des Th2-spezifischen Zink-Finger-Transkriptionsfaktors GATA-3, der als Hauptregulator der Th2-Zellentwicklung gilt^{28,29}. GATA-3 induziert die Ausbildung charakteristischer, epigenetischer Veränderungen der Chromatin-Struktur des IL-4-Lokus, die eine Voraussetzung für die schnelle T-Zell-Rezeptor-abhängige Reexpression der Th2-Zytokine darstellt. Somit reguliert GATA-3 über die epigenetische Öffnung des IL-4-Lokus die Expression der Gene IL-4, IL-5, und IL-13³⁰⁻³². Durch Transaktivierung des IL-5- und IL-13-Promoters induziert es direkt die Expression der Zytokine IL-5 und IL-13²⁹. Zusätzlich bewirkt es die Expression des Th2-spezifischen Transkriptionsfaktors c-MAF, der selektiv den IL-4-Promoter transaktiviert³³. Durch die Blockierung des IL-12-Signaltransduktionsweges hemmt GATA-3 die Th1-Zellentwicklung und trägt damit auf verschiedenen Wegen zur Ausbildung einer Th2-spezifischen Immunantwort bei.

1.4 Die klinische Bedeutung der Th2-vermittelten Immunantwort

In den westlichen Industrienationen leiden über 25 % der Bevölkerung an IgE-vermittelten Allergien. Th2-vermittelte Immunreaktionen spielen bei der Pathogenese dieser allergischen Entzündungsreaktionen eine zentrale Rolle. Insbesondere Interleukin-4 induziert und fördert den Th2-dominierten Entzündungsprozess, indem es (1) den IgE-Isotyp-Wechsel und die Sekretion von IgE in B-Zellen induziert³⁴, (2) die IgE-vermittelte Immunreaktion durch die verstärkte Expression der IgE-Rezeptoren auf B-Zellen und mononukleären phagozytischen

Zellen (FcεRII) sowie auf Mastzellen und basophilen Granulozyten (FcεRI) fördert, (3) zur vermehrten Muzin-Gen-Expression und bronchialen Schleimsekretion beiträgt³⁵ sowie (4) Fibroblasten und endotheliale Zellen zur vermehrten Expression inflammatorischer Zytokine, Chemokine (Eotaxin) und endothelialer Adhäsionsmoleküle (VCAM-1) anregt. Eine Dysregulation der IL-4-Expression kann somit über die vermehrte Produktion von Immunglobulin E zu Th2-vermittelten allergischen Entzündungsreaktionen wie allergen-induziertem Asthma bronchiale, allergischer Rhinitis oder anaphylaktischen Reaktionen führen^{36,37}. Diesbezüglich konnten verschiedene klinische Studien zeigen, dass eine Prädisposition zu Asthma bronchiale eng mit verschiedenen genetischen Polymorphismen der Gene für die Th2-Zytokine IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13, für den IL-4- und IL-13-Rezeptor sowie für STAT6 und GATA-3 assoziiert ist³⁸⁻⁴⁶. Bei Asthma-Patienten lassen sich zudem eine erhöhte Konzentration von IL-4 im Serum und bronchoalveolärem Sekret sowie eine erhöhte Zahl IL-4-produzierender Zellen im peripheren Blut nachweisen⁴⁷⁻⁴⁹. Das Ausmaß einer Th2-spezifischen Immunantwort sowie der damit verbundenen Sekretion verschiedener Th2-Zytokine wie IL-4, IL-5, IL-13 bzw. die Anzahl zytokinsekretierender Zellen im Rahmen der Immunantwort tragen somit wesentlich dazu bei, ob eine Th2-spezifische Immunreaktion kontrolliert und begrenzt bleibt, oder ob sich eine unkontrollierte und zum Teil generalisierende Entzündungsreaktion, z. Bsp. mit dem klinischen Erscheinungsbild des Asthma bronchiale, manifestiert.

1.5 Die Regulation der Interleukin-4-Expression in Th2-Zellen

Die zentrale Funktion von Interleukin-4 als Mediator der Th2-Differenzierung und als Effektormolekül differenzierter Th2-Zellen erfordert eine exakte und auf die verschiedenen Stimuli abgestimmte Regulation der IL-4-Expression.

Die Expression des IL-4-Gens in Th2-Zellen wird dabei in zwei unterschiedlichen Phasen reguliert. Der erste Schritt beinhaltet die epigenetische Öffnung des IL-4-Genlokus während der IL-4-abhängigen Differenzierung naiver T-Helferzellen in reife Th2-Effektorzellen. Die Kompetenz zur späteren restimulationsabhängigen IL-4-Expression ist dabei eng mit der Th2-Differenzierung und mit der Aktivität des Th2-spezifischen Transkriptionsfaktors GATA-3 verbunden. Der zweite Schritt beinhaltet die schnelle und abgestimmte IL-4-Expression und -Sekretion nach TCR-Aktivierung differenzierter Th2-Effektorzellen.

Sowohl bei der epigenetischen Öffnung als auch bei der restimulationsabhängigen Transkription des IL-4-Genlokus in Th2-Effektorzellen spielen verschiedene Signalwege und Transkriptionsfaktoren eine entscheidende Rolle.

1.5.1 Signalwege und Transkriptionsfaktoren der IL-4-Expression

1.5.1.1 Der IL-4/IL-4-Rezeptor/STAT6-Signaltransduktionsweg

Interleukin-4 selbst initiiert in Kombination mit TCR-Signaltransduktionswegen die Th2-Zellentwicklung und damit die Fähigkeit differenzierter Th2-Effektorzellen, nach Aktivierung IL-4 zu exprimieren⁵⁰. Der IL-4-Rezeptor liegt als Heterodimer, bestehend aus der IL-4R α -Kette und der gemeinsamen Zytokinrezeptor- γ -Kette (γ_c) vor und wird bereits auf naiven T-Zellen exprimiert. Die Bindung von IL-4 an den IL-4-Rezeptor führt zur Aktivierung der Janus-Kinasen Jak1 und Jak3, die verschiedene Tyrosine innerhalb der zytoplasmatischen Region der IL-4-R α -Kette phosphorylieren^{51,52}. STAT6-Monomere assoziieren daraufhin mit der IL-4-R α -Kette, werden ebenso an Tyrosinresten phosphoryliert und bilden über reziproke Src-Homologie-2-Domänen (SH2) aktive Homodimere. Diese wandern in den Zellkern und binden an STAT6-Bindungsstellen verschiedener DNA-Regionen. Die Bedeutung des IL-4/STAT6-Signaltransduktionsweges für die Initiation der Th2-Differenzierung und der IL-4-Expressionskompetenz in Th2-Effektorzellen verdeutlicht sich im Phänotyp STAT6-defizienter Mäuse⁵³⁻⁵⁵, die durch den Verlust IL-4-produzierender Th2-Effektorzellen und einer damit verbundenen Inkompetenz zur Th2-vermittelten Immunantwort charakterisiert sind. Die Überexpression eines konstitutiv aktiven STAT6-Konstruktes in aktivierten T-Zellen bzw. in Th1-Zellen führt zudem zur Öffnung des IL-4-Genlokus und zur Kompetenz der stimulationsabhängigen IL-4-Expression^{56,57}. Obwohl STAT6 an den IL-4-Promoter und an verschiedene regulatorische Regionen innerhalb des IL-4-Genlokus^{58,59} binden kann, scheint die physiologische Bedeutung von STAT6 für die Th2-Differenzierung hauptsächlich in der Funktion zu liegen, in Kombination mit TCR-Signalwegen die Expression des Th2-spezifischen Transkriptionsfaktors GATA-3 zu induzieren^{60,28,29}. Für die restimulationsabhängige IL-4-Expression in differenzierten Th2-Zellen scheint der IL-4/STAT6-Signaltransduktionsweg hingegen nur von untergeordneter Bedeutung zu sein. Differenzierte Th2-Zellen exprimieren nach Aktivierung IL-4 auch in Abwesenheit von exogenem IL-4 bzw. in Anwesenheit blockierender anti-IL-4-Antikörper.

Darüber hinaus konnten verschiedene Studien die Existenz eines IL-4/STAT6-unabhängigen Th2-Differenzierungsweges nachweisen, der auf einer IL-4/STAT6-unabhängigen Expressionsinduktion von GATA-3 und einer damit verbundenen Initiation der Th2-Differenzierung beruht^{30,61,62}.

1.5.1.2 GATA-3

Der Zink-Finger-Transkriptionsfaktor GATA-3 spielt bei der Differenzierung naiver T-Zellen in Th2-Effektorzellen und bei der Regulation der IL-4-Expression eine zentrale Rolle^{28,31,63-66}. GATA-3 wird dabei selektiv in differenzierenden Th2-Zellen durch den IL-4/STAT6-Signalweg sowie durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B induziert⁶⁷. Im Sinne eines Autoaktivierungskreises induziert es die eigene Expression und gewährleistet damit die stabile GATA-3-Expression in differenzierten Th2-Zellen⁶³. Eine Überexpression von GATA-3, entweder in transgenen Mäusen oder retroviral in primären T-Zellen, führt zu einer verstärkten Expression von IL-4 und anderen Th2-Zytokinen. Eine retrovirale Überexpression eines dominant-negativen GATA-3-Konstruktes in primären differenzierenden Th2-Zellen führt hingegen zu einer verminderten Expression der Th2-Zytokine⁶⁸.

GATA-3 bindet zum einen an den IL-5- und IL-13-Promoter und induziert direkt die Expression dieser Th2-Zytokine. Zum anderen reguliert GATA-3 die Th2-Zellentwicklung und IL-4-Expression durch die Ausbildung epigenetischer Veränderungen des IL-4-Genlokus in Form einer vermehrten Histonazetylierung, Histonmethylierung, DNA-Demethylierung und der Ausbildung des für differenzierte Th2-Zellen charakteristischen DNaseI-Hypersensitivitätsmusters des IL-4-Lokus^{30,31,66}. Diesbezüglich stellt die Aktivität von GATA-3 und die damit verbundenen induzierten Chromatinveränderungen des IL-4-Genlokus eine Grundvoraussetzung für die Kompetenz differenzierter Th2-Zellen dar, nach Aktivierung die Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 zu exprimieren. Chang et al. und Andere konnten zudem zeigen, dass GATA-3 bei der Regulation der IL-10-Expression in Th2-Zellen eine bedeutsame Rolle spielt^{69,70}.

Die funktionelle Bedeutung von GATA-3 für die Entwicklung differenzierter Th2-Zellen zeigt sich ebenso in Patienten, die aufgrund genetischer Veränderungen nur ein funktionelles GATA-3-Allel besitzen und infolge der verminderten GATA-3-Expression eine reduzierte Th2-Antwort *in vitro* und *in vivo* aufweisen⁷¹. Darüber hinaus trägt GATA-3 zur Blockierung des Th1-Differenzierungsprogrammes in Th2-differenzierenden Zellen durch Inhibition der STAT4- und IL-12R β_2 -Expression bei.

Im Gegensatz zur fundamentalen Bedeutung von GATA-3 für die epigenetische Öffnung des IL-4-Genlokus während der Th2-Differenzierung scheint GATA-3 für die akute, restimulationsabhängige IL-4-Expression differenzierter Th2-Effektorzellen nicht essentiell zu sein⁶⁴⁻⁶⁶. In konditionellen GATA-3-Knockout-Mäusen führt die Cre-vermittelte Deletion flozierter GATA-3-Allele zu einem frühen Zeitpunkt der Th2-Differenzierung zur drastischen Reduktion (~85%) der Anzahl IL-4-produzierender Zellen.

Im Gegensatz dazu führt die Deletion von GATA-3 in differenzierten Th2-Effektorzellen zwar zur Verminderung der exprimierten IL-4-Menge pro Zelle, nicht jedoch zur Verminderung der absoluten Anzahl IL-4-produzierender Th2-Zellen. In der Restimulationsphase differenzierter Th2-Zellen scheint GATA-3 somit hauptsächlich für die Feinregulation der exprimierten IL-4-Menge pro Zelle bedeutsam zu sein, nicht jedoch für die absolute Entscheidung der IL-4-Expression.

1.5.1.3 NFAT

Interleukin-4 wird in ruhenden Th2-Zellen nicht exprimiert und erst nach Aktivierung des T-Zell-Rezeptors mit dem entsprechenden Antigen massiv induziert. Die Induktion des TCR-Signaltransduktionsweges führt dabei zur Aktivierung der PhospholipaseC- γ 1⁷², die Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP₂) in Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG) spaltet. IP₃ induziert über den Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration die Aktivierung Calcineurin-abhängiger Transkriptionsfaktoren wie den *Nuclear factor of activated T cells* (NFAT).

In ruhenden Th2-Zellen liegen die NFAT-Proteine in phosphorylierter Form vor, besitzen eine geringe DNA-Bindungsaffinität und werden im Zytoplasma zurückgehalten. Die Aktivierung der T-Zellen durch den TCR/CD3-Signaltransduktionsweg führt über die Mobilisation von Calcium zur Aktivierung der Calcium-abhängigen Serin/Threonin-Phosphatase Calcineurin, die daraufhin mit NFAT-Proteinen interagiert und diese dephosphoryliert. Die dephosphorylierten NFAT-Proteine, die im Gegensatz zur phosphorylierten Form eine erhöhte DNA-Affinität besitzen, wandern im Komplex mit Calcineurin in den Zellkern und binden an verschiedene NFAT-Bindungsstellen innerhalb der Promotorbereiche oder anderer regulatorischer DNA-Regionen verschiedener Gene⁷³.

Zur Familie der NFAT-Transkriptionsfaktoren gehören: NFAT1 (NFATp oder NFATc2), NFAT2 (NFATc oder NFATc1), NFAT3 (NFATc4), NFAT4 (NFATc3 oder NFATx) sowie NFAT5 (TonEB). In Lymphozyten sind hauptsächlich NFAT1, NFAT2 und NFAT4 bedeutsam. Während NFAT1 und NFAT4 konstitutiv exprimiert werden, existieren von NFAT2 verschiedene Isoformen, von denen die Isoform B und C konstitutiv und die Isoform A erst nach T-Zell-Aktivierung exprimiert werden⁷⁴⁻⁷⁸. Die Bedeutung von NFAT1 und NFAT2 für die Th2-Zelldifferenzierung und IL-4-Expression konnten verschiedene *in-vitro*- und *in-vivo*-Studien zeigen. T-Zellen NFAT2-defizienter Mäuse sind durch eine selektive Verminderung der Th2-Zytokin-Expression insbesondere von IL-4 charakterisiert^{79,80}.

NFAT1- und NFAT2- doppeldefiziente T-Zellen zeigen einen vollständigen Verlust der stimulationsabhängigen IL-4-Expression⁸¹. Bezüglich der genetischen Deletion von NFAT1 im Mausmodell existieren gegensätzliche Studienergebnisse, ob NFAT1 eher ein Aktivator oder Repressor der IL-4-Expression ist⁸²⁻⁸⁷. Durch die Verwendung konstitutiv-aktiver NFAT1- bzw. NFAT2-Proteinkonstrukte konnte jedoch gezeigt werden, dass sowohl NFAT1 als auch NFAT2 positive Regulatoren der IL-4-Expression darstellen⁸⁸.

Innerhalb des IL-4-Lokus konnten verschiedene NFAT-Bindungsstellen identifiziert werden, darunter sechs konservierte Bindungsstellen innerhalb des IL-4-Promoters⁸⁹⁻⁹² und mehrere Bindungsstellen im Bereich eines distal des IL-4-Gens gelegenen Enhancers⁹³. Mittels Chromatin-Immunopräzipitationsanalysen konnte gezeigt werden, dass NFAT1 nur in stimulierten Th2-Zellen an den IL-4-Promoter und an den distalen Enhancer bindet⁹³. Genetisch eingefügte Mutationen innerhalb der NFAT-Bindungsstellen im IL-4-Promoter resultieren dabei in einer drastischen Reduktion der aktivierungsabhängigen IL-4-Expression⁹¹.

NFAT-Proteine können zudem mit einer Vielzahl anderer nukleärer Proteine und Transkriptionsfaktoren heterodimerisieren und damit die Transaktivierungsaktivität regulieren. So konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von NFAT mit AP1-Proteinen die koordinierte Bindung der NFAT-AP1-Komplexe am IL-4- bzw. IL-2-Promoter stabilisiert⁹⁴. Eine multimere NFAT-AP1-Bindungsstelle des IL-4-Promoters zeigte diesbezüglich eine Th2-spezifische Transaktivierungsaktivität in transgenen Reporter-Mäusen⁹⁵. Ebenso konnte gezeigt werden, dass NFAT mit dem Transkriptionsfaktor *Interferon regulatory factor-4* (IRF-4) interagieren kann und infolgedessen die IL-4-Promoteraktivität zusätzlich verstärkt wird⁹⁶⁻⁹⁸.

Der Transkriptionsaktivator p300/CBP ist zudem in der Lage, über die Bindung der Transaktivierungsdomäne von NFAT1 und NFAT2 die Transaktivierungsaktivität der NFAT-Proteine zu verstärken^{74,99}. Die Proteine p300 und CBP besitzen darüber hinaus eine intrinsische Histonazetyltransferaseaktivität und können somit neben ihrer Eigenschaft als transkriptioneller Koaktivator epigenetische Veränderungen des Chromatins i.S. von Histonazetylierungen hervorrufen. Bezüglich der IL-4-Expressionsregulation konnte gezeigt werden, dass eine Kotransfektion von NFAT1 oder NFAT2 mit p300/CBP die Transkription eines IL-4-Promoter-Konstruktes verstärkt¹⁰⁰.

Serfling et al. konnten zudem zeigen, dass NFAT2 mit GATA-3 interagieren kann und beide Transkriptionsfaktoren den IL-5-Promoter synergistisch transaktivieren¹⁰¹. Agarwal et al. konnten ebenso eine synergistische Bindungs- und Transaktivierungsaktivität beider Proteine am distalen IL-4-Enhancer nachweisen⁹³.

Ein weiterer Bindungspartner von NFAT stellt der nukleäre Faktor NIP45 (*NFAT interacting protein, 45 kDa*) dar. NIP45 besitzt selbst keine direkte Transaktivierungsaktivität, sondern potenziert vielmehr synergistisch mit NFAT und dem Th2-spezifischen Transkriptionsfaktor c-MAF die IL-4-Expression¹⁰².

1.5.1.4 c-MAF

c-MAF ist ein Th2-spezifischer Transkriptionsfaktor, der nach TCR-Aktivierung an eine konservierte c-MAF-Bindungsstelle (MARE) innerhalb des IL-4-Promoters bindet und diesen transaktiviert^{60,103}. Die Expression von c-MAF in Th2-Zellen wird durch TCR-Aktivierung und durch Signalwege des kostimulatorischen Oberflächenproteins ICOS induziert¹⁰⁴. Die transgene Überexpression von c-MAF in T-Helfer-Zellen führt zu einer vermehrten Expression von IL-4 und anderen Th2-Zytokinen sowie zu verstärkten IL-4-abhängigen Th2-Effektoreigenschaften wie der Antikörperklassenwechsel von IgG1 zu IgE und zur verminderten Expression von IFN γ ¹⁰⁵. Die genetische Deletion von c-MAF im Mausmodell führt zu einem kompletten Verlust der IL-4-Expression in Th2-Zellen, wobei die Produktion der Th2-Zytokine IL-5, IL-13 oder IL-10 unbeeinflusst bleibt³³. Neben der Induktion der TCR-abhängigen IL-4-Expression fördert c-MAF zusätzlich das IL-2-vermittelte Überleben der Th2-Zellen sowie die Expression von Differenzierungsmarkern, wie z. Bsp. CD25, in differenzierten Th2-Zellen¹⁰⁶.

1.5.1.5 NF- κ B

Die Transkriptionsfaktorfamilie der *nuclear factors* κ B spielt eine wichtige Rolle für die Vermittlung verschiedener Rezeptorsignale in der angeborenen und erworbenen Immunantwort und setzt sich aus den Proteinen p65 (RelA), c-Rel, RelB, NF- κ B1 (p50/p105) und NF- κ B2 (p52/p100) zusammen¹⁰⁷. Die Aktivierung von NF- κ B in T-Zellen wird unter anderem über den TCR-Proteinkinase θ (PKC θ)-Signalweg reguliert¹⁰⁸. In ruhenden T-Zellen werden die NF- κ B-Proteine durch Bindung an die zytoplasmatischen Proteine *Inhibitors of NF- κ B* (I κ B) in einem inaktiven Zustand im Zytoplasma zurückgehalten. Eine Stimulation des TCR führt über die Aktivierung der PKC θ zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung von I κ B-Kinasen (IKKs), die in einem Multiproteinkomplex bestehend aus IKK α , IKK β und IKK γ vorliegen. Die I κ B-Proteine werden durch den aktiven IKK-Komplex phosphoryliert, daraufhin ubiquitinyliert und proteasomal abgebaut.

Der Abbau der inhibitorischen I κ B-Moleküle induziert die nukleäre Translokation der NF- κ B-Untereinheiten, die als Hetero- oder Homodimere (z. Bsp. p65/p50-Heterodimere) die Expression verschiedener Gene aktivieren können¹⁰⁹.

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass NF- κ B bei der restimulationsabhängigen Expression von IL-4 in Th-2-Zellen beteiligt ist. Li-Weber et al. wiesen nach, dass die Proteine p65 und c-Rel an zwei verschiedene Regionen (P4-PreI und P1) innerhalb des IL-4-Promoters binden und diesen transaktivieren¹¹⁰⁻¹¹³. Diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass die Signaltransduktionskaskade der aktivierten PKC θ , die bei der Aktivierung von NF- κ B beteiligt ist, die IL-4-Expression über eben diese IL-4-Promoterelemente aktiviert¹¹⁴. Im Mausmodell führt die Expression eines konstitutiv-aktiven NF- κ B-Konstruktes zu einer verstärkten IL-4-Produktion¹¹⁵. T-Zellen transgener Mäuse, die ein transdominantes I κ B α konstitutiv exprimieren, sind durch einen Verlust der IL-4-Expression nach TCR-Aktivierung charakterisiert¹¹⁶. NF- κ B1-defiziente Mäuse zeigen zudem eine Inkompetenz zur allergisch-induzierten Hypersensitivitätsreaktion und zur Expression der Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13^{67,117}. In diesem Zusammenhang ist NF- κ B vornehmlich für die Expressionsinduktion von GATA-3 entscheidend⁶⁷. Für die stimulationsabhängige IL-4-Expression in differenzierten Th2-Effektorzellen scheint NF- κ B hingegen nicht essentiell zu sein, da die Aktivierung differenzierter Th2-Zellen unter dem NF- κ B-Inhibitor SN50 zu keiner Verminderung der IL-4-Expression und anderer Th2-Effektorfunktionen führt⁶⁷.

1.5.1.6 AP1

Die Mitglieder der Aktivator-Protein-1-Familie wie c-Jun, c-Fos und JunB werden nach TCR-Aktivierung durch den MAPK-Signaltransduktionsweg (mitogenaktivierte Proteinkinase-Signalweg) aktiviert. Mittels transgener AP1-Reporter-Mäuse konnte gezeigt werden, dass die AP1-Aktivität auch in Th2-Zellen induziert werden kann¹¹⁸ und dass vor allem die AP1-Mitglieder JunB und z. T. c-Fos im Vergleich zu Th1-Zellen in Th2-Zellen verstärkt exprimiert werden^{118,119}. Die transgene Expression von JunB in Th1-Zellen führt dabei zu einer Produktion der Th2-Zytokine IL-4 und IL-5⁹⁴. In STAT6-defizienten T-Helfer-Zellen kann eine ektope Expression von JunB die IL-4-Produktion jedoch nicht induzieren¹²⁰.

JunB-defiziente Mäuse sind durch eine verminderte Produktion der Zytokine IL-4 und IL-5 sowie durch eine verminderte Allergen-induzierte Entzündungsreaktion der Atemwege charakterisiert¹²¹. Rooney et al. und Andere konnten zudem belegen, dass eine AP1-vermittelte, verstärkte IL-4-Expression von der Interaktion von AP1-Proteinen mit dem Transkriptionfaktor NFAT abhängig ist^{92,94,110-112,119,122,123}.

1.5.1.7 Der IL2/STAT5-Signaltransduktionsweg

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass der IL-2/STAT5-Signaltransduktionsweg bei der Regulation der Th2-Differenzierung und der IL-4-Expression involviert ist^{106,124-128}. IL-2 führt über die Bindung an den IL-2-Rezeptor zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors *Signal transducer and activator of transcription 5* (STAT5), der vor allem bei der Stabilisierung der IL-4-Expression in frühen, sich differenzierenden Th2-Zellen beteiligt ist^{125,128}. Im Gegensatz zu Interleukin-4, dass die Th2-Zell-Differenzierung simultan mit der TCR-Aktivierung induziert, ist IL-2 für die frühe Differenzierungsphase nach TCR-Aktivierung entscheidend^{106,125}. Eine Antikörper-vermittelte Blockierung bzw. ein Verlust der STAT5-Aktivität in naiven T-Zellen führt auch unter optimalen Th2-induzierenden Kulturbedingungen zur vollständigen Blockierung der IL-4-Expression in restimulierten Th2-Zellen^{124,127}. Die Expression eines konstitutiv-aktiven STAT5-Konstruktes (STAT5A1*6) in differenzierenden Th2-Zellen ermöglicht eine von exogenem IL-2-unabhängige, IL-4-induzierte Th2-Zelldifferenzierung¹²⁴. Die Expression von STAT5A1*6 und GATA-3 in Th1-Zellen führt zudem zu einer synergistischen Induktion der IL-4-Expression^{124,125}.

Darüber hinaus trägt der IL-2/STAT5-Signalweg zur Th2-Zelldifferenzierung bei, indem er über eine verstärkte Expression von SOCS3 (*Suppressor of cytokine signaling 3*) die IL-12-induzierte STAT4-Aktivierung und damit die Th1-Zellentwicklung inhibiert¹²⁶.

1.5.2 Der IL-4-Promoter und cis-regulatorische Elemente des IL-4-Lokus

In verschiedenen experimentellen und bioinformatischen Analysen konnten eine Vielzahl unterschiedlicher, proximal als auch distal des IL-4-Gens gelegene DNA-Regionen identifiziert werden, die im Zusammenspiel mit dem IL-4-Promoter zur Regulation der IL-4-Transkription beitragen^{93,129-137}. Die an der IL-4-Expression beteiligten genetischen Elemente erstrecken sich dabei über einen circa 85 kb langen Chromatinbereich auf Chromosom 11 (muriner IL-4-Lokus) bzw. Chromosom 5 (humaner IL-4-Genlocus), beginnend von 3' gelegenen Introns des Rad50-Gens bis zum 3'-Ende des Kif3a-Gens. Die Anordnung der verschiedenen regulatorischen Elemente innerhalb des IL-4-Genlocus ist schematisch in Abbildung 2 dargestellt. Der IL-4-Promoter erstreckt sich über circa 400 Basenpaare 5' vom Transkriptionsstart des IL-4-Gens. Der Promoterbereich wird im Gegensatz zu naiven sowie Th1-Zellen in Th2-Zellen epigenetisch geöffnet und weist infolge der verstärkten Zugänglichkeit des Chromatins eine erhöhte Sensibilität gegenüber verschiedenen DNA-schneidenden Enzymen wie DNaseI auf.

Die IL-4-Promoterregion ist gekennzeichnet durch eine Vielzahl konservierter und für die aktivierte IL-4-Transkription wichtiger Transkriptionsfaktorbindungsstellen, darunter sechs verschiedene Bindungsstellen für NFAT (P0, P1, P2, P3, Pre-I/P4, P5) sowie Bindungsstellen für AP-1, NF- κ B (P1, Pre-I/P4), c-MAF (MARE) und STAT6. Innerhalb des IL-4-Promoters befindet sich kein DNA-Abschnitt mit Sequenzhomologie zu GATA-3-Bindungssequenzen. In Reporterstudien konnte zudem keine bzw. eine nur sehr geringe Transaktivierung des IL-4-Promoters durch GATA-3 nachgewiesen werden^{138,139}.

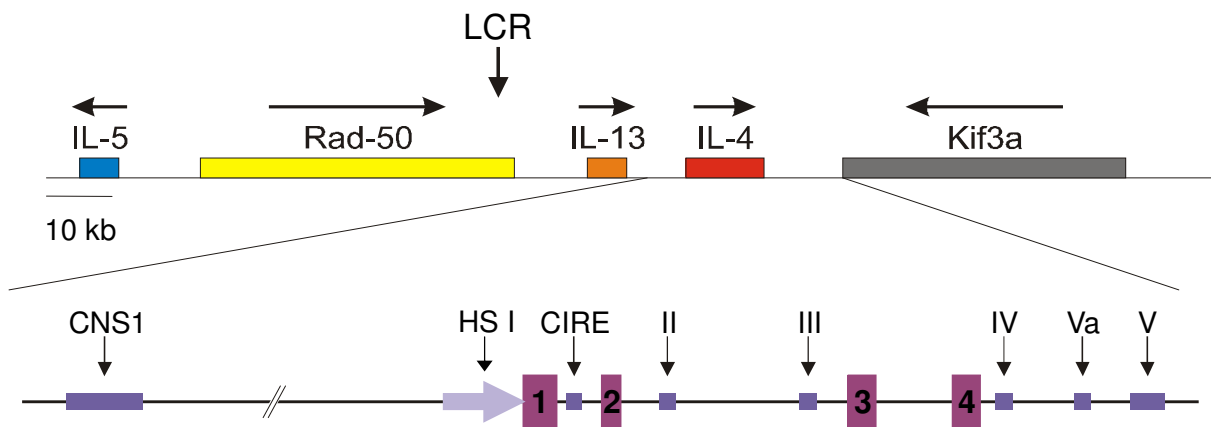


Abb. 2: Der IL-4-Genlokus, cis-regulatorische Elemente und DNaseI-Hypersensitivitätsbereiche in differenzierten Th2-Zellen. Der IL-4-Genlokus befindet sich auf Chromosom 11 (murin) bzw. Chromosom 5 (human) und erstreckt sich inklusive des IL-13-Gens sowie verschiedener cis-regulatorischer DNA-Regionen über circa 85 kb beginnend von 3' gelegenen Introns des Rad50-Gens bis zum 3'-Ende des Kif3a-Gens. In naiven Zellen sind lediglich zwei DNaseI-Hypersensitivitätsbereiche detektierbar: die HSS-III innerhalb der CNS-1-Region sowie die HS IV. In differenzierten Th2-Zellen entsteht eine Vielzahl zusätzlicher, z. T. Th2-spezifischer DNaseI-Hypersensitivitätsbereiche: LCR-A, -B, und -C in 3' gelegenen Introns des RAD50-Gens, die als genetische Einheit eine Lokuskontrollregion (LCR) für die Expression der Th2-Zytokine IL-4 und IL-13 bilden, die HSS-I/II innerhalb der CNS-1, HS I im Bereich des IL-4-Promoters, HS II und III im zweiten Intron des IL-4-Gens sowie HS V und HS Va distal des 3' Endes des IL-4-Gens. Die HS Va ist dabei nur in restimulierten Th2-Zellen detektierbar. Im ersten Intron des IL-4-Gens ist eine konservierte GATA-3-Bindungsstelle (CIRE-Region) lokalisiert, die eine Funktion bei der Ausbildung eines frühen IL-4-Expressionsgedächtnisses spielt. ➔ ...IL-4-Promoter, ■...Exon 1 bis 4, ■...cis-regulatorische Elemente und DNaseI-Hypersensitivitätsbereiche

Die Regulation der IL-4-Expression durch GATA-3 wird somit nicht durch eine direkte Transaktivierung des IL-4-Promoters, sondern vielmehr durch die epigenetische Öffnung verschiedener cis-regulatorischer DNA-Bereiche gesteuert (siehe Kapitel 1.5.3)^{32,93,133}.

Die nahe zum IL-4-Promoter, im ersten Intron des IL-4-Gens lokalisierte CIRE-Region scheint dabei eine besondere Rolle einzunehmen¹³⁵. Innerhalb eines phylogenetisch hochkonservierten DNA-Abschnittes von 17 bp sind zwei GATA-3-Bindungsstellen lokalisiert, deren spezifische strukturelle Anordnung für die Bindung von GATA-3 an die CIRE-Region notwendig ist. Tycozinski et al. konnten zeigen, dass GATA-3 in Th2-differenzierenden naiven T-Zellen und in differenzierten Th2-Zellen an diese Region binden kann und dies mit einer Th2-spezifischen Demethylierung im Bereich des ersten Introns des IL-4-Gens einhergeht. Durch Deletion der CIRE-Region und Einfügen eines grün-fluoreszierenden Reportergens (GFP) konnte die Bedeutung dieser Region für die Ausprägung des IL-4-Expressionsgedächtnisses in frühen Th2-Zellen gezeigt werden¹³⁵.

Vergleichend zur CIRE-Region zeichnen sich andere cis-regulatorische Elemente des IL-4-Genlokus ebenfalls durch eine spezieübergreifende Konservierung der DNA-Sequenz (bezeichnet als CNS, für *conserved noncoding sequence*) aus und sind darüber hinaus häufig durch eine erhöhte Zugänglichkeit für das DNA-schneidende Enzym DNaseI bzw. andere Restriktionsendonukleasen (bezeichnet als HS oder HSS, für DNaseI-Hypersensitivitätsregion) charakterisiert.

In naiven Zellen sind innerhalb des IL-4-Genlokus zwei DNaseI-Hypersensitivitätsbereiche detektierbar: die HSS-III innerhalb der CNS-1-Region sowie die HS IV (Abb. 2). Nach Aktivierung und Th2-Differenzierung entsteht eine Vielzahl zusätzlicher, z. T. Th2-spezifischer DNaseI-Hypersensitivitätsbereiche: LCR-A, -B, und -C, die als genetische Einheit eine Lokuskontrollregion für die Expression der Th2-Zytokine IL-4 und IL-13 bilden, die HSS-I/II innerhalb der CNS-1-Region, HS I im Bereich des IL-4-Promoters, HS II und III im zweiten Intron des IL-4-Gens sowie HS V und HS Va distal des 3' Endes des IL-4-Gens. Für viele dieser cis-regulatorischen Elemente konnten in verschiedenen Deletionsstudien bzw. durch transgene Überexpression im Mausmodell eine Funktion bei der Regulation der IL-4-Expression in Th2-differenzierenden T-Zellen oder differenzierten Th2-Zellen nachgewiesen werden^{32,140-143}.

Lee et al. konnten demonstrieren, dass der IL-4-Promoter selbst nur eine vergleichsweise geringe, basale Transaktivierungsaktivität besitzt³². Erst das Zusammenspiel der verschiedenen cis-regulatorischen Elemente mit dem IL-4-Promoter erlaubt eine maximale Transkription des IL-4-Gens. Spilianakis et al. konnten diesbezüglich zeigen, dass der IL-4-Promoter über weite DNA-Bereiche hinweg mit dem IL-5- und IL-13-Promoter sowie mit den cis-regulatorischen Regionen LCR, CNS-1 und HS V/Va in einem Chromatin-Kernkomplex interagiert¹⁴⁴.

Für die akute, restimulationsabhängige IL-4-Expression in Th2-Zellen scheint vor allem die circa 12 kb 3' des IL-4-Promoters lokalisierte HS Va bedeutsam zu sein, die nur nach Restimulation als DNaseI-Hypersensitivitätsregion detektierbar wird⁹³. Für die Transkriptionsregulation des IL-4-Gens übernimmt die HS-Va-Region vornehmlich die Funktion eines distal gelegenen Enhancers, der die Transaktivierungsaktivität des IL-4-Promoters um ein Vielfaches potentiert^{93,142}. Innerhalb dieser DNA-Region finden sich mehrere konservierte Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NFAT, GATA-3 und STAT6^{93,145}, wobei vor allem die synergistische Bindung von GATA-3 und NFAT für die Enhancerwirkung der HS Va notwendig zu sein scheint.

Die Bedeutung der HS Va für die Regulation der IL-4-Expression zeigt sich in HS-V/Va-deletierten Mäusen, in denen Mastzellen eine komplette Blockierung und differenzierte Th2-Zellen nach Aktivierung eine drastische Verminderung der IL-4-Expression zeigen¹⁴².

1.5.3 Die epigenetische Regulation der IL-4-Expression

Der Differenzierungsprozess naiver T-Zellen in Th2-Effektorzellen wird von massiven epigenetischen Veränderungen innerhalb des circa 85 kb umfassenden IL-4-Lokus begleitet^{1,146,147}. Diese Veränderungen der Chromatinkonfiguration bilden die Grundlage für die differentielle Chromatinzugänglichkeit verschiedener Transkriptionsfaktoren wie NFAT und damit für das unterschiedliche Zytokingenexpressionsmuster in Th2-, Th1- oder naiven T-Zellen. Epigenetische Veränderungen der Chromatinstruktur umfassen DNA-Methylierungen, kovalente posttranslationale Modifizierungen von Histonen wie Histonazetylierungen, Histonmethylierungen und Histonphosphorylierungen, das Einfügen von Linker-Histonen in das Chromatin sowie die Veränderung der Nukleosomenstruktur und -position auf dem entsprechenden DNA-Abschnitt.

DNA-Methylierungen sind mit einer kompakten, für aktivierende Transkriptionsfaktoren unzugänglichen Chromatinkonfiguration verbunden und für transkriptionell inaktive DNA-Bereiche charakteristisch. Die DNA-Methylierung findet dabei an CpG-Dinukleotiden statt und wird durch die Aktivität verschiedener DNA-Methyltransferasen wie DNMT1 (*DNA-Methyltransferase 1*) oder DNMT3 (*DNA-Methyltransferase 3*) vermittelt. Methylierte CpGs bilden durch die Assoziation mit repressorischen Methyl-CpG-Bindungsproteinen wie z. Bsp. MBD-2 (*Methyl-CpG binding domain protein 2*) oder der MeCP2-Komplex eine kompakte Heterochromatinstruktur und tragen damit zu einem stabilen, epigenetischen Silencing des entsprechenden Chromatinlokus bei.

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die DNA-Methylierung als Mechanismus des epigenetischen Silencings auch bei der Regulation der IL-4-Expression in T-Helfer-Zellen und speziell beim Silencing des IL-4-Lokus in naiven und Th1-Zellen eine wichtige Rolle spielt¹⁴⁸⁻¹⁵⁰. T-Zellen DNMT1-defizienter Mäuse zeigen eine ausgedehnte Verminderung der DNA-Methylierung des IL-4-Lokus und begleitend dazu eine erhöhte Expression von IL-4 in verschiedenen T-Zell-Linien, speziell CD8⁺-T-Zellen^{151,152}. In MBD2^{-/-}-Mäusen exprimieren selbst naive T-Zellen sowie Th1-Zellen nach Stimulation Interleukin-4¹⁵³.

In naiven T-Zellen liegen über 90 % der CpGs des IL-4-Lokus in einem methylierten Zustand vor. Im Zuge der Th2-Differenzierung kommt es zur zunehmenden DNA-Demethylierung des IL-4-Lokus, vornehmlich am 5'-Bereich (erstes und zweites Intron) des IL-4-Gens¹⁴⁹. Die passive und zellteilungsabhängige Demethylierung des IL-4-Lokus ist dabei weniger für die initiale IL-4-Expression in stimulierten naiven T-Zellen, sondern vielmehr für die restimulationsabhängige IL-4-Expression in differenzierten Th2-Zellen notwendig^{135,154}. Hutchins et al. konnten nachweisen, dass in differenzierenden Th2-Zellen vor allem die Kompetition des Transkriptionsfaktors GATA-3 mit dem Methyl-CpG-Bindungsprotein MBD2 entscheidend für die Induktion der Th2-assoziierten DNA-Demethylierung des IL-4-Lokus ist¹⁵³. Tycozinski et al. konnten diesbezüglich die bereits erwähnte hochkonservierte GATA-3-Bindungsregion im ersten Intron des IL-4-Gens (*conserved intronic response element*, CIRE) identifizieren, die in differenzierenden Th2-Zellen selektiv demethyliert wird und bei der Ausbildung eines frühen IL-4-Expressionsgedächtnisses eine wichtige Rolle spielt¹³⁵.

DNA-Histon-Interaktionen bilden als kleinste Chromatineinheit ein Nukleosom, bestehend aus einem Histonoktamer ([Histon H2A]₂, [Histon H2B]₂, [Histon H3]₂ und [Histon H4]₂) und einem DNA-Abschnitt von circa 140 Nukleotiden. Die Histonuntereinheiten werden im Zuge der epigenetischen Expressionsregulation durch verschiedene Histonmodifizierungen posttranslational azetyliert, methyliert, phosphoryliert oder ubiquitinyliert. Diese Modifizierungen werden zusammengenommen als „Histon-Code“ bezeichnet¹⁵⁵, der die transkriptionelle Zugänglichkeit des Chromatins für verschiedene Transriptionsfaktoren bestimmt.

Die Histonazetylierung wird durch verschiedene Familien von Histonazetyltransferasen (HATs)^{156,157} katalysiert und stellt, z. Bsp. als azetyliertes H3-K9/14, eine transkriptionell aktive Chromatinkonfiguration dar. Histonmethylierungen finden vorwiegend an Lysinresten statt und werden durch verschiedene Histonmethyltransferasen (HMTs) katalysiert.

Je nach Lokalisation der Lysinmethylierung und Anzahl der Methylgruppen charakterisieren Histonmethylierungen transkriptionell aktives (H3-K4 Di- oder Trimethylierung) oder transkriptionell inaktives (H3-K9 Di- oder Trimethylierung) Chromatin.

In naiven T-Zellen liegen die Histone im Bereich des IL-4-Lokus vorwiegend in einem nichtazetylierten und nichtmethylierten Zustand vor. Lediglich im Bereich des IL-4-Promoters und der HS IV lässt sich eine geringgradige H3-K9/14-Azetylierung sowie an der HS IV und V eine H3-K4-Dimethylierung nachweisen^{136,145,158-160}. Die frühe IL-4-Expression nach Aktivierung naiver T-Zellen wird dabei von einer den gesamten IL-4-Lokus umfassenden epigenetischen Öffnung des Chromatins begleitet^{129,145,158,160}. Diese epigenetisch aktive Chromatin-konfiguration wird in differenzierten Th2-Zellen stabilisiert¹⁶¹ und umfasst H3-K9/14-Azetylierungen, H3-S10-Phosphorylierungen und H3-K4-Dimethylierungen von der 5' des IL-13-Gens gelegenen HS I/CGRE-Region bis circa 6,5 kb 3' des IL-4-Gens gelegenen HS V/CNS2-Enhancer-Region^{136,158}.

Die Zugänglichkeit des Chromatins für verschiedene Transkriptionsfaktoren wird ebenso durch verschiedene Chromatin-Remodeling-Komplexe reguliert, die durch einen aktiven, ATP-verbrauchenden Prozess Nukleosomen innerhalb eines Chromatinabschnittes verschieben bzw. entfernen können^{162,163}. Vergleichend zu histonmodifizierenden Enzymen werden Chromatin-Remodeling-Komplexe über ihre chromatinbindenden Domänen oder über die Interaktion mit sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren an spezifische Chromatinbereiche rekrutiert.

In Eukaryonten existieren verschiedene Klassen von Chromatin-Remodeling-Komplexen wie der SWI/SNF(BAF)-, der ISWI-, der INO80-, der SWR- oder der Mi-2/CHD-Komplex, die in Abhängigkeit der Chromatinlokalisierung und Art der Chromatinkonfigurationsänderung die Genexpression positiv oder auch negativ beeinflussen können. DNA-Bereiche, die durch die Aktivität eines Chromatin-Remodeling-Komplexes wie SWI/SNF epigenetisch geöffnet werden, sind dabei durch eine erhöhte Sensitivität gegenüber DNA-schneidenden Enzymen wie z. Bsp. DNaseI charakterisiert. Die Vielzahl der im Zuge der Th2-Differenzierung entstehenden Th2-spezifischen DNaseI-Hypersensitivitätsbereiche innerhalb des IL-4-Lokus (siehe Kapitel 1.5.2) verdeutlicht, dass aktives Chromatin-Remodeling maßgeblich bei der Ausbildung des für Th2-Zellen charakteristischen Chromatinmusters und damit des Zytokinexpressionsmusters beteiligt ist. Diesbezüglich konnten Cai et al. zeigen, dass die ATPase-Untereinheit Brg1 des Chromatin-Remodeling-Komplexes SWI/SNF in Th2-Zellen mit verschiedenen regulatorischen Regionen des IL-4-Lokus assoziiert ist¹⁶⁴.

1.5.4 Die stochastische Regulation der IL-4-Expression

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Interleukin-4 in Th-2-Zellen monoallelisch exprimiert wird¹⁶⁵⁻¹⁶⁸. Rivière et al. verwendeten dazu Mäuse, in denen auf einem IL-4-Allel das humane CD2-Gen als Marker in den IL-4-Lokus integriert wurde¹⁶⁶. Nach Aktivierung differenzierter Th2-Zellen dieser heterozygoten Knock-in-Mäuse exprimierten jedoch nur eine Minderheit der Zellen IL-4, wobei vornehmlich nur jeweils eines der IL-4-Allele transkribiert wurde. Die Autoren schlussfolgerten, dass die Aktivierung jedes individuellen Allels einem stochastischen Prozess zugrunde liegt, bei dem die Expressionswahrscheinlichkeit eines Allels von der Aktivierungsst rke des TCR-Signaltransduktionsweges abh ngt¹⁶⁶. Hu-Li et al. analysierten diesbezüglich heterozygote Mäuse, in denen in einem IL-4-Allel ein kurzes Stück des ersten Exons und ersten Introns des IL-4-Gens durch das Gen für das Grüne Fluoreszierende Protein der Qualle (eGFP) ersetzt wurde^{167,168}. In einer in-vitro-differenzierten Th2-Population exprimierten nach Aktivierung der Zellen mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern über 80% der Zellen weder IL-4 noch GFP, 7% IL-4, 6% GFP und weniger als 1% IL-4 und GFP. In einer nachfolgenden Studie mit Wildtyp-Mäusen bestätigten die Autoren mittels RNA-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung die existierende IL-4-Expressions-heterogenität in differenzierten und stimulierten Th2-Zellen¹⁶⁹: circa 40% der Th2-Zellen zeigten keine IL-4-Expression, und unter den verbliebenen IL-4-exprimierenden Zellen war eine monoallelische IL-4-Expression über fünfmal häufiger zu detektieren als eine biallelische Expression. Die Existenz eines stochastischen Elementes bei der Regulation der IL-4-Expression wiesen Hu-Li et al. durch eine weitergehende Analyse der IL-4-exprimierenden und IL-4-nichtexprimierenden Th2-Zellen nach. Nach Aufreinigung der IL-4-produzierenden Th2-Zellen mittels der Zytokin-Matrix-Technologie und Weiterkultivierung zeigten beide Zellpopulationen, die vormals IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen, nach Aktivierung die gleiche Wahrscheinlichkeit, IL-4 zu exprimieren¹⁶⁸. Während die IL-4-mRNA-Expressionsrate in IL-4-Produzenten über 100fach höher lag als in den IL-4-Nichtproduzenten, konnten jedoch keine Unterschiede in der Expression der GATA-3- oder c-MAF-mRNA bzw. in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT1 nachgewiesen werden^{168,170}. Eine Analyse der Chromatinkonfiguration der isolierten IL-4-exprimierenden und IL-4-nichtexprimierenden Th2-Zellen ergab, dass beide Zellpopulationen die für differenzierte Th2-Zellen charakteristischen DNaseI-Hypersensitivitätsbereiche im IL-4-Promoter, im zweiten Intron des IL-4-Gens (HS II und HS III) und in der CNS-1-Region aufwiesen¹⁶⁹.

Lediglich im Bereich der induzierbaren DNaseI-Hypersensitivitätsstelle Va zeigte sich eine circa dreifach erhöhte Chromatinzugänglichkeit in IL-4-produzierenden Th2-Zellen im Gegensatz zu IL-4-nichtproduzierenden Zellen¹⁶⁹. Dieser Unterschied bestätigte sich auch in IL-4-Produzenten und IL-4-Nichtproduzenten, die nach Aktivierung und Separation mittels der Zytokin-Matrix-Technologie aus vormals IL-4-exprimierenden Th2-Zellen hervorgingen. Die Aktivität des Va-Enhancers scheint somit bei der stochastischen Regulation der IL-4-Expression beteiligt zu sein.

1.6 Fragestellung der Arbeit

Interleukin-4 spielt als zentrales Zytokin der Th2-vermittelten Immunantwort eine wichtige Rolle bei der Regulation des IgE -Klassenwechsels sowie bei der Entwicklung und Differenzierung von Th2-Effektorzellen. In Verbindung mit anderen Th2-Zytokinen wie IL-5 und IL-13 ist es direkt an der Entstehung allergischer Erkrankungen wie Asthma bronchiale und anaphylaktischen Reaktionen beteiligt. Vor dem Hintergrund der pathologischen Folgen einer überschießenden, allergischen Entzündungsreaktionen ist die Regulation der IL-4-Expression bei der Ausbildung einer adäquaten Th2-vermittelten Immunantwort von wesentlicher Bedeutung.

Die stochastische Regulation der IL-4-Produktion könnte diesbezüglich eine effiziente Kontrolle der IL-4-Effektorfunktionen gewährleisten. Zytokine wie IL-4 agieren vornehmlich im Kontext von Zell-Zell-Interaktionen. Gerade für Effektorfunktionen wie der IgE-Klassenwechsel in B-Zellen, der auf Einzelzellebene stattfindet oder auch nicht, kann es effizienter sein, die Frequenz IgE-produzierender B-Zellen über die Anzahl IL-4-produzierender T-Helferzellen zu regulieren als über die Regulation der absoluten Menge an IL-4, die jede einzelne Th2-Zelle exprimiert¹⁷¹. Das Verständnis der zugrunde liegenden, zellbiologischen Mechanismen der stochastisch determinierten IL-4-Expression ist somit nicht nur aus zellbiologischer Sicht, sondern vor allem vor dem Hintergrund einer medizinisch-therapeutischen Interventionsmöglichkeit bei allergischen Erkrankungen von wissenschaftlichem Interesse.

Diesbezüglich konnten bisherige Studien jedoch nur wenige Hinweise liefern, welche Faktoren die stochastische IL-4-Expression in aktivierten Th2-Zellen vermitteln.

Daher war es das Ziel dieser Arbeit, die Transkriptionsfaktorbesetzung am IL-4-Lokus in IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen zu charakterisieren, um damit weitergehende Aussagen über die möglichen zellbiologischen Mechanismen der stochastisch-determinierten IL-4-Expression machen zu können.

Dazu sollte die Methode der magnetischen Chromatin-Immunopräzipitation etabliert und die Bindung der bei der IL-4-Expression involvierten Transkriptionsfaktoren NFAT1, NFAT2, NF- κ B/p65, GATA-3, c-MAF, STAT6, p300 und SWI/SNF/Brg1 an den IL-4-Promoter und an die HS Va in unstimulierten, restimulierten sowie separierten IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen untersucht werden. Eine vergleichende, genomweite RNA-Expressionsanalyse sollte darüber hinaus weitere Erkenntnisse über die möglichen zugrunde liegenden Mechanismen der stochastisch-determinierten IL-4-Expression in aktivierten Th2-Zellen liefern.

2 Material und Methoden

2.1 Zusammensetzung von Medien, Puffern und Lösungen

Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma (München), Roth (Karlsruhe) und Merck (Darmstadt) bezogen.

2.1.1 Molekularbiologie

ChIP Verdünnungspuffer

0.01% SDS

1.1% Triton X-100

1.2mM EDTA

16.7mM Tris-HCl, pH 8.1

167mM NaCl

Niedrig-Salzpuffer

0.01% SDS

1% Triton X-100

2mM EDTA

20mM Tris-HCl, pH 8.1

150mM NaCl

Hoch-Salzpuffer

0.1% SDS

1% Triton X-100

2mM EDTA

20mM Tris-HCl, pH 8.1

500mM NaCl

Lithiumchloridpuffer

0.25M LiCl

1% IGEPAL-CA630

1% Deoxycholsäure (Natriumsalz)

1mM EDTA

10mM Tris-HCl, pH 8.1

TE Puffer

10mM Tris-HCl

1mM EDTA, pH 8.0

SDS Lysis Puffer

1% SDS

10mM EDTA

50mM Tris-HCL, pH 8.1

Elutionspuffer

1% SDS

8.4 mg/ml NaHCO₃

1 % β-Mercaptoethanol

in H₂O

PBST

0,1% Tween-20

in PBS

Trenngel

375 mM Tris/HCl pH 8,8
6-12% Acrylamid/Bisacrylamid
0,1% SDS
0,075% Ammoniumpersulfat
0,05% TEMED

4 x SDS-Probenpuffer

125 mM Tris/HCl pH 6,8
50% Glycerin
6% SDS
0,01% Bromphenolblau
10% β -Mercaptoethanol

Transferpuffer

25 mM Tris
0,19 M Glycin
20 % (v/v) Methanol
0,037 % (w/v) SDS

Puffer C

20 mM Hepes pH 7,9
25% Glycerol
420 mM NaCl
1,5 mM KCL
0,2 mM EDTA
0,5 mM DTT
Protease Inhibitoren

Sammelgel

125 mM Tris/HCl pH 6,8
4% Acrylamid/Bisacrylamid
0,1% SDS
0,1% Ammoniumpersulfat
0,1% TEMED

SDS-Laufpuffer

25 mM Tris/HCl
192 mM Glycin
0,1% SDS
pH 8,3

Puffer A

10 mM Hepes pH 7,9
1,5 mM MgCl₂
10 mM KCl
0,5 mM DTT
Protease Inhibitoren

2.1.2 Zellkultur

PBS

8 g/l NaCl

0.2 g/l KCl

1.44 g/l Na₂HPO₄

PBS/BSA

0.5% (w/v) BSA in PBS

PBS/BSA/Azid

in PBS/BSA

Erylysepuffer

8.3 g/l NH₄Cl

10 mM NaHCO₃

0.1 mM EDTA

Saponinpuffer

0.5% Saponin in PBS/BSA/Azid

2.2 Versuchstiere

Für die Untersuchungen wurden DO11.10 Mäuse auf Balb/c-Hintergrund, die einen transgenen α/β -TCR, spezifisch für das Ovalbumin-Peptid 323-339, exprimieren⁸ sowie BALB/c (H-2d) Mäuse unter spezifisch pathogenen Bedingungen im Bundesinstitut für Risikobewertung in Berlin–Marienfelde gezüchtet und gehalten. Die Versuchstiere wurden im Alter von 6 – 8 Wochen durch zervikale Dislokation getötet, die Milzen sowie die mesenterialen und axillären Lymphknoten entnommen und Einzelzellsuspensionen hergestellt.

2.3 Herstellung von Einzelzellsuspensionen

Die entnommenen Milzen und Lymphknoten wurden durch ein Zellsieb mit einer Porengröße von 30 μ m (BD Biosciences) gedrückt und als vereinzelt Zellen in PBS/BSA aufgenommen. Unter Ausschluß der Erythrozyten wurde die Zellzahl mit einer Neubauer Zählkammer mikroskopisch bestimmt.

2.4 Zellkultur

Die verwendeten Zellen wurden in RPMI 1640-Medium (GibcoBRL), das zusätzlich mit 10% fötalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin, 1 mM Glutamin (alles GibcoBRL) und 0,2 mM β -Mercaptoethanol (Sigma Chemicals) versetzt wurde, in einem Inkubator (Heraeus) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

2.5 Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie ist eine Methode zur Analyse von Zellen auf Einzelzellebene anhand der Lichtstreuung und der emittierten Fluoreszenz. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten FACS-Calibur (BD Biosciences) passieren die fluoreszenzmarkierten Zellen in einem Flüssigkeitsstrom eine feine Kapillare und werden dabei einzeln an zwei Messpunkten nacheinander mit einem 488 nm Argonlaser und einem 635 nm Diodenlaser bestrahlt. Zum einen werden hierdurch geeignete Fluorochrome der markierten Zellen zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt, zum anderen wird das einfallende Licht von der Zelle gestreut, wobei das in geringem Winkel ($3^\circ - 10^\circ$) gestreute Licht als Vorwärtsstreulicht (FSC) und das um 90° reflektierte Licht als Seitwärtsstreulicht (SSC) gemessen wird. Das Vorwärtsstreulicht korreliert in erster Näherung mit der Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht mit der Granularität und der Membranfaltung. Zur Messung des von den angeregten Fluorochromen emittierten Fluoreszenzlichtes unterschiedlicher Wellenlängen stehen vier Systeme aus Bandpassfiltern und Photoröhren zur Verfügung. Über die Anregung mit dem Argonlaser können das Streulicht und die Fluoreszenzen der Wellenlängen 530 nm (FL1), 585 nm (FL2) sowie 650 nm (FL3) und über die Anregung des Diodenlasers zusätzlich die Fluoreszenz der Wellenlänge 661 nm (FL4) gemessen werden. Auf diese Weise ist bei einer großen Zahl von Zellen eine schnelle quantitative Analyse auf Einzelzellniveau aufgrund der Zellmorphologie sowie des Emissionsspektrums der Fluoreszenz-markierten Antikörper möglich. Als Fluoreszenzfarbstoffe dienen Fluoresceinisothiocyanat (FITC) (FL1), Phycoerythrin (PE) (FL2), Propidiumjodid (FL3) und Cy5 (FL4). Die Aufnahme der Daten erfolgte mit dem Programm Cellquest (BD Biosciences), die Auswertung mit der Software FCSEXPRESS (De Novo Software).

2.6 Fluoreszenz-aktivierte Zell-Sortierung (FACS)

Die zytometrische Charakterisierung von Zellen anhand ihrer Lichtstreuung und ihrer Fluoreszenz erlaubt die Sortierung nach den jeweiligen Charakteristika mittels der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung (FACS). Dabei werden die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom in einzelne Tropfen vereinzelt. In Abhängigkeit zur Fluoreszenzeigenschaft der jeweiligen Zelle werden die Flüssigkeitstropfen elektrisch geladen und aufgrund ihrer Ladung in verschiedene Röhren sortiert. Zur Sortierung wurden die Zellen einmal mit PBS/BSA gewaschen und über einen MACS-Pre-Separation-Filter (Miltenyi Biotec) gegeben. Sortiert wurde entweder am FACS Aria oder am FACSDiva (BD Biosciences).

2.7 Isolierung naiver Th-Lymphozyten durch magnetische Zellseparation

Zur Isolierung naiver Th-Lymphozyten durch magnetische Zellseparation wurde das MACS-System (Miltenyi Biotec) verwendet. Dabei werden die Zellen spezifisch mit Antikörpern markiert, welche direkt bzw. indirekt über einen Zweitantikörper an magnetische Mikrokugeln (Microbeads) konjugiert sind. Die Zellsuspension wird anschließend über eine Säule gegeben, welche sich in einem magnetischen Feld befindet. Die markierten Zellen bleiben im magnetischen Feld hängen, während unmarkierte Zellen aus der Säule gewaschen werden. Nach Entnahme der Säule aus dem Magneten können die markierten Zellen eluiert werden.

Die Isolierung naiver Th-Lymphozyten erfolgte anhand der Expression der Oberflächenmoleküle CD4 und CD62L. CD62L (L-Selektin) ist ein Oberflächenrezeptor der Selektin-Familie, der in naiven Th-Lymphozyten stark exprimiert wird und am Homing in Lymphknoten beteiligt ist. Nach Aktivierung der Lymphozyten wird die CD62L-Expression herunterreguliert. Einzelzellsuspensionen aus Lymphknoten und Milz wurden mit einem FITC-konjugierten anti-CD4-Antikörper (Klon GK1.5) markiert und zur Entfernung ungebundener Antikörper mit PBS/BSA gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit anti-FITC-Multisort-Microbeads (Miltenyi Biotec) für 15 Minuten bei 4°C inkubiert und magnetisch über eine LS-Säule (Miltenyi Biotec) separiert. Zur Abtrennung der magnetischen Kugeln wurden die Zellen mit 20 µl/ml Multisort-Release-Reagent (Miltenyi Biotec) versetzt, für 15 Minuten bei 4°C inkubiert und über eine LS-Säule gereinigt. Die CD4⁺-Zellfraktion wurde in einer Konzentration von 10⁷ Zellen / 100 µl in PBS/BSA aufgenommen, in einer Verdünnung von 1:50 mit anti-CD62L-Microbeads (Miltenyi Biotec) für 15 Minuten bei 4°C inkubiert und über eine LS-Säule separiert. Die Reinheit der CD4⁺CD62L⁺-Th-Lymphozyten wurde durch Färbung mit einem PE-konjugierten anti-CD62L-Antikörper (Klon Mel-14; Caltag Laboratories) fluoreszenz-zytometrisch kontrolliert und betrug mindestens 98%.

2.8 Präparation von Antigen-präsentierenden Zellen

Als Antigen-präsentierende Zellen (APCs) wurde die CD4-negative Fraktion aus der Sortierung naiver Th-Lymphozyten bzw. frisch präparierte Milzzellen aus Balb/c Mäusen verwendet. Zur Verhinderung der weiteren Proliferationsfähigkeit der APCs erfolgte eine Gammabestrahlung mit 30 Gy (Nuklid ¹³⁷Cs, BIOBEAM 2000, Provit 5200).

2.9 Stimulation und Differenzierung von Th-Zellen in vitro

Für die primäre Differenzierung wurden naive DO11.10 Th-Lymphozyten mit den bestrahlten APCs in einem Verhältnis von 1:5 bei einer Gesamtmenge von 3×10^6 Zellen/ml Medium in Sechs-Loch Platten mit 5ml/Loch kultiviert. Als Antigen-spezifische Stimulation wurde Ovalbumin-Peptid (323-339) (Peptidsynthese-Labor der Charite Berlin) in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ hinzugefügt. Zur Th1-Polarisierung wurden der Kultur 10 $\mu\text{g/ml}$ anti-IL-4-Antikörper (Klon 11B11) und 5 ng/ml rekombinantes IL-12 (rIL12) (R&D Systems) hinzugefügt. Für die Th2-Polarisierung wurden der Kultur 100 ng/ml IL-4 aus dem Kulturüberstand einer mit einem IL-4-Expressionsvektor transfizierten Mausmyelom-Zelllinie (P3-X63 Ag8.653)¹⁷² sowie je 10 $\mu\text{g/ml}$ anti-IL-12-Antikörper (KlonC17.8) und anti-IFN γ -Antikörper (Klon AN18.17.24) zugesetzt. Nach 6 Tagen Kultivierung wurden die Zellen geerntet und von den toten Zellen durch Dichtegradienten-Zentrifugation separiert. Dazu wurden die Zellen mit Histopaque (Sigma) unterschichtet und für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit $700 \times g$ zentrifugiert (ficollisiert). Die lebenden Zellen wurden aus der Interphase entnommen und zweimal mit PBS/BSA gewaschen. Für weitere Differenzierungsrunden wurden die Zellen erneut wie beschrieben mit APCs versetzt und unter den jeweiligen Kulturbedingungen für weitere sechs Tage kultiviert. Ab der zweiten Differenzierungswoche wurden die Kulturen zusätzlich mit 5 ng/ml rekombinatem IL-2 (R&D Systems) angesetzt.

2.10 Polyklonale Restimulation

Für die polyklonale Restimulation wurden die Zellen am Tag 6 der ersten oder zweiten Differenzierungsrunde ficollisiert und bei einer Zellkonzentration von $2 \times 10^6/\text{ml}$ für 1 – 6 Stunden mit 10 ng/ml Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und 1 $\mu\text{g/ml}$ Ionomycin bei 37°C und 5% CO_2 stimuliert. Alternativ dazu erfolgte die Restimulation mit 10 $\mu\text{g/ml}$ immobilisiertem anti-CD3-Antikörper (145-2C11) und 2 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD28-Antikörper (Klon 37.51). Die Immobilisierung des anti-CD3-Antikörpers erfolgte im Vorfeld durch eine zweistündige Inkubation des Antikörpers in der entsprechenden Konzentration in PBS in der Kulturplatte bei 37°C . Nach Absaugen des PBS wurde die Zellsuspension vorsichtig in die entsprechende Kulturplatte gegeben.

2.11 Sortierung lebender, IL-4-sekretierender Zellen

Zur Isolierung lebender, IL-4-sekretierender Zellen wurde der auf der zellulären Affinitätsmatrix-technologie basierende Maus-IL-4-Sekretionsassay (Miltenyi Biotec) verwendet. Dabei werden die Zellen mit einer Matrix, einem Konjugat aus einem anti-CD45-Antikörper und einem anti-IL-4-Antikörper, beladen. Während einer Sekretionsphase bindet das sezernierte IL-4 an die Matrix der jeweiligen Zellen, die anschließend mit einem PE-konjugierten anti-IL-4-Antikörper markiert werden. Die Separierung der Zellen erfolgt dann entweder mittels fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung am FACS oder nach Markierung mit anti-PE-beads mittels magnetischer Zellsortierung über LS-MACS-Säulen (Miltenyi Biotec).

Ein bzw. zwei Wochen alte Th2-Lymphozyten wurden nach Ficollisierung für zwei Stunden mit 10 ng/ml PMA und 1 µg/ml Ionomycin bei 37°C und 5% CO₂ restimuliert. Die Zellen wurden für 5 Minuten mit der Affinitätsmatrix (anti-CD45-anti-IL-4) beladen und zur Sekretionsphase für 45 Minuten bei 37°C in einer Zelldichte von 10⁵ Zellen/ml in RPMI inkubiert. Zur Vermeidung einer Falschmarkierung von nicht-sezernierenden Zellen infolge von Zell-Zell-Aggregationen wurde die Zellsuspension in 5-Minuten-Abständen vorsichtig geschüttelt. Im Anschluss wurden die Zellen zum Abstoppen der Sekretion mit eiskaltem PBS/BSA gewaschen. Anschließend erfolgte die Markierung der Zellen mit PE-konjugiertem anti-IL-4-Antikörper für 10 Minuten auf Eis. Die markierten Zellen wurden dann wie oben beschrieben mittels fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung anhand der Fluoreszenz im FL2-Kanal (PE) sortiert bzw. nach Markierung mit anti-PE-beads für 15 Minuten bei 4°C über LS MACS-Säulen separiert. Die Reinheit der Fraktionen wurde am Durchflusszytometer (FACSCalibur) geprüft.

2.12 Intrazelluläre Zytokinfärbungen

Zur intrazellulären Detektion der Zytokinproduktion wurden die Zellen wie unter 2.10 beschrieben mit PMA und Ionomycin bei 37°C restimuliert. Nach einstündiger Restimulation wurde der Sekretionsinhibitor Brefeldin A (Sigma) bei 5 µg/ml zugesetzt und für weitere 2 h stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und bei 2 x 10⁶/ml mit 2% Formaldehyd (Merck) in PBS für 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach einem erneuten Waschschrift mit PBS wurden die Zellen in PBS/BSA/Azid aufgenommen und bis zur Färbung bei 4°C gelagert. Zur Färbung wurden die fixierten Zellen mit dem entsprechenden fluorochrom-konjugierten Antikörper in Saponinpuffer 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit Saponinpuffer gewaschen. Nach Resuspension der Zellen in PBS/BSA/Azid erfolgte die Analyse im Durchflußzytometer.

2.13 Magnetische Chromatin-Immunopräzipitation

Die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) erlaubt die *In-Vivo*-Analyse von Protein-DNA-Interaktionen¹⁷³⁻¹⁷⁶. Dabei werden lebende Zellen mit Formaldehyd oder anderen Crosslinkern fixiert, um kovalente Kreuzvernetzungen zwischen Proteinen und DNA herzustellen. Durch anschließende Sonifizierung wird die kreuzvernetzte DNA in kleine Fragmente zerteilt. Die darauf folgende Immunopräzipitation mit einem Transkriptionsfaktor-spezifischen Antikörper erlaubt die Anreicherung von DNA-Fragmenten, die spezifisch mit dem jeweiligen Transkriptionsfaktor assoziiert sind. Nach Defixierung zur Auflösung der Kreuzvernetzungen zwischen Proteinen und DNA wird die DNA aufgereinigt und in der Echtzeit-PCR quantifiziert. Durch ein Vergleich mit der jeweiligen Ausgangsmenge an DNA (Input) lässt sich die relative Anreicherung berechnen.

Die Fixierung der Zellen erfolgte in dieser Arbeit als Einfachfixierung mit Formaldehyd (Histon-ChIPs, GATA3-ChIPs) oder als Doppelfixierung mit DSP (Pierce Biotechnology Inc.) und Formaldehyd¹⁷⁷. Die Immunopräzipitation wurde magnetisch mit dem MACS-System (Miltenyi Biotec) durchgeführt, wobei die jeweiligen Antikörper durch Protein-G- bzw. Protein-A-gekoppelte Microbeads gebunden wurden.

Circa 10^6 bis 10^7 Zellen wurden mit PBS gewaschen und für die Doppelfixierung mit 2mM DSP in PBS bei Raumtemperatur für 30 min fixiert. Die Fixierungsreaktion wurde anschließend mit 125 mM Glycin pH 8,0 für 10 min bei RT abgestoppt. Nach einem Waschschrift mit PBS erfolgte ein weiterer Fixierungsschritt mit 1 % Formaldehyd bei RT für 10 min. Wiederum wurde die Reaktion mit 125 mM Glycin pH 8,0 für 10 min bei RT gestoppt. Für die Einfachfixierung mit Formaldehyd wurden die Zellen für 10 min bei RT mit 1 % FA fixiert und die Reaktion in gleicher Weise mit 125 mM Glycin pH 8,0 gestoppt.

Die fixierten Zellen wurden nach Zentrifugation bei 2000 rpm in 50 μ l SDS-Lysispuffer aufgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert. Anschließend wurden die Proben mit 150 μ l ChIP-Verdünnungspuffer aufgefüllt und das fixierte Chromatin durch Sonifizieren mit einem Ultraschallgerät (Bandelin) bei 30 % Pulsstärke fünf mal für 10 s in Fragmente mit einer Größe von 500 bis 1000 bp geschert. Zur Entfernung des Zelldebris wurden die Proben bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand mit 300 μ l ChIP-Verdünnungspuffer aufgefüllt. Das gescherte, verdünnte Chromatin wurde zur Vermeidung von unspezifischem Hintergrund für 15 min bei 4°C mit 20 μ l Protein-G- bzw. Protein-A-Microbeads (Miltenyi Biotec) inkubiert und die Microbeads anschließend über eine μ -Säule (Miltenyi Biotec), welche zuvor mit 1 % NP-40 und ChIP-Verdünnungspuffer equilibriert wurde, im magnetischen Feld abgetrennt.

Zur Quantifizierung der DNA-Ausgangsmenge wurde vor der Immunopräzipitation 25 µl der Probe (Input) abgenommen. Die Chromatin-Immunopräzipitation erfolgte anschließend nach Zugabe von 2 µg des jeweiligen Antikörpers (Tabelle 2.3) und einer 30minütigen Inkubationsphase bei 4°C. Die spezifischen Antikörper-Chromatin-Komplexe wurden daraufhin durch Inkubation mit 20 µl Protein-A- oder Protein-G-Microbeads für 10 min bei 4°C gebunden. Zur Verminderung des unspezifischen Hintergrundes erfolgte die Zugabe von 1ml 5 %iger Magermilch in BPST und anschließender Inkubation für weitere 2 min bei 4°C. Die magnetische Separation der gebundenen Antikörper-Chromatin-Komplexe erfolgte wiederum über vorequilibrierte µ-Säulen. Die Komplexe wurden in der Säule mit je 4 x 250 µl Niedrig-Salz-, Hoch-Salz-, Lithiumchlorid- und TE-Puffer gewaschen und mit 4 x 50 µl Elutionspuffer aus der Säule eluiert. Zur Auflösung der Kreuzvernetzungen wurden die Immunopräzipitate sowie die Inputs in Elutionspuffer mit zusätzlich 200 mM NaCl über Nacht bei 65°C defixiert. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mit dem NucleoSpin Extract II Kit (Macherey-Nagel) gemäß Herstellerprotokoll. Zur Analyse von IL-4-Produzenten bzw. IL-4-Nichtproduzenten wurden die Th2-Zellen nach zweistündiger polyklonaler Restimulation (siehe 2.10) mit DSP/FA fixiert und intrazellulär mit einem PE-konjugierten anti-IL-4-Antikörper gefärbt (siehe 2.12). Nach Resuspension der angefärbten, fixierten Zellen in PBS/BSA/Azid erfolgte die Separation mittels Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung am FACSAria oder am FACSDiva (siehe 2.6) Die weitere Verarbeitung der Proben erfolgte gemäß oben beschriebenen Protokoll.

2.14 Quantitative Echtzeit-PCR (LightCycler)

Zur Quantifizierung der cDNA (siehe 2.16) sowie der Proben der Chromatin-Immunopräzipitationen (siehe 2.13) wurde das LightCycler-System mit dem FastStart DNA Master SYBR Green I-Kit (Roche Diagnostic) verwendet. Dabei lagert sich im Zuge der Polymerase-Kettenreaktion der fluoreszierende Cyanfarbstoff SYBR Green in die kleine Furche von DNA-Doppelsträngen ein. Durch diese Bindung verstärkt sich die emittierte Fluoreszenz und man erhält ein Signal, dessen Intensität direkt proportional zu der Zahl der vorhandenen DNA-Doppelstränge ist. Das emittierte Licht wird am Ende eines jeden Zyklus gemessen und nimmt infolge der Amplifizierung des entsprechenden DNA-Abschnittes exponentiell bis zum Erreichen eines Maximums zu. Die relative Menge der in der PCR eingesetzten DNA ergibt sich aus der Anzahl der Zyklen, die bis zum Erreichen der logarithmischen Amplifikationsphase (Crossing Point [CP]) benötigt wird.

Um Proben verschiedener Zellpopulationen mit eventuell unterschiedlichen DNA-Ausgangsmengen vergleichen zu können, werden die Proben auf einen spezifischen Referenzwert bezogen. Bei der Quantifizierung der cDNA wurde als Referenz und interner Standard die Quantifizierung des House-Keeping Gens HPRT (*Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase*) gebraucht, bei der Chromatin-Immunopräzipitation wurde als Referenz der Input der jeweiligen Probe verwendet (2.13). Die relative DNA-Menge ergibt sich dabei nach der Formel:

$$\text{relative DNA-Menge} = E_{(\text{Referenz})}^{\text{CP}(\text{Referenz})} / E_{(\text{Probe})}^{\text{CP}(\text{Probe})}$$

E bezeichnet die Amplifikationseffizienz des Primerpaares, die durch serielle Verdünnungsstufen und Vergleich der Crossing Points mit folgender Formel bestimmt wurde:

$$E = 10^{-1/\text{Steigung der Kurve}}$$

Eine Effizienz von zwei würde somit einer 100 %igen Effizienz und damit einer Verdopplung der DNA-Menge mit jedem PCR-Zyklus entsprechen. Für jede PCR-Reaktion wurde folgender Reaktionsansatz verwendet: 2 µl DNA, 0,5 µM von jedem Primer, 3 – 5 mM MgCl₂, 0,5 µl FastStart DNA Master SYBR Green I sowie H₂O in einem Endvolumen von 5 µl. Die jeweilige MgCl₂-Konzentration für jedes Primerpaar wurde zuvor in einer Verdünnungsreihe im Light-Cycler bestimmt und ist Tabelle 2 zu entnehmen. Die PCR erfolgte bei 9 min mit 95°C, gefolgt von 45 Zyklen mit 15 s bei 95°C, 15 s bei 60 – 67°C (Tab. 2.1) und 15 s bei 72°C. Zur Spezifitätskontrolle der PCR wurde am Ende der Reaktion die Schmelzkurve des jeweiligen PCR-Produktes bestimmt. Für jede Probe wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und der entsprechende Mittelwert aus den Einzelwerten berechnet.

| Region | Primersequenz | MgCl ₂ -Konzentration | Annealingtemperatur |
|---------------|---|----------------------------------|---------------------|
| IL-4 Promoter | 5'-GGCCAGAATAACTGACAATCT-3' 5'-GCAATGCTGGCAGAGGTC-3' | 5 mM | 65°C |
| CIRE | 5'-CACTTGAGAGAGATCATCGG-3' 5'-CCACCTCTCTAGCAACTCAG-3' | 4 mM | 65°C |
| HS Va | 5'-TGGGTCTCAGTCCAACAGA-3' 5'-CCAGGGCACTTAAACATTGC-3' | 5 mM | 65°C |
| IFNγ Promoter | 5'-TTTCAGAGAATCCCACAAGAATG-3' 5'-TCGGGATTACGTATTTTACACAAG-3' | 5 mM | 66°C |
| IL-4 mRNA | 5'-ACGGAGATGGATGTGCCAAACGTC-3' 5'-CGAGTAATCCATTTGCATGATGC-3' | 4 mM | 65°C |
| HPRT mRNA | 5'-GCTGGTGAAAAGGACCTCT-3' 5'-CACAGGACTAGAACACCTGC-3' | 4 mM | 65°C |

Tab. 2.1: Übersicht über die PCR-Primer, die in dieser Arbeit verwendet wurden

Die verwendeten Primersequenzen sind Tabelle 2.1 zu entnehmen und wurden, soweit nicht anders angegeben mit dem Programm Primer3¹⁷⁸ generiert und von der Firma TIB MolBiol, Berlin, bezogen.

2.15 mRNA-Expressionsanalyse

2.15.1 Gesamt-RNA-Präparation

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellen wurde das RNeasy-System der Firma Qiagen verwendet. Dazu wurden ca. 10^6 Zellen zweimal mit PBS/BSA gewaschen, in dem entsprechenden Lysispuffer aufgenommen und mittels der QIAshredder-Säulen (Qiagen) homogenisiert. Die anschließende RNA-Extraktion erfolgte streng nach Protokoll des Herstellers. Die Messung der extrahierten RNA erfolgte am NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer (NanoDrop Technologies).

2.15.2 cDNA-Präparation

Zur reversen Transkription und cDNA-Synthese wurde das TaqMan Reverse Transkriptionskit der Firma Applied Biosystems, Darmstadt, verwendet. 400 ng RNA wurden dazu mit 2 μ l 10x Reverse Transkriptionspuffer, 4,4 μ l 25 mM $MgCl_2$, 4 μ l 10 mM dNTPs, 0,5 μ l Random Hexamere, 0,5 μ l oligo-dTs, 0,4 μ l Rnase-Inhibitor, 0,5 μ l reverse Transkriptase und Rnase-freies H_2O zu einem Endvolumen von 20 μ l bei 25°C für 10 min, bei 48°C für 40 min und bei 95°C für 5 min inkubiert. Zur Qualitätskontrolle der cDNA sowie zur Normalisierung der Transkripte wurde das House-Keeping-Gen HPRT in der LightCycler-PCR quantifiziert.

2.16 Genomweite mRNA-Expressionsanalyse mittels der GenChip-Micro-Array-Technologie (Affymetrix)

Die Micro-Array-Technologie ist eine Methode zur genomweiten Transkriptionsanalyse von Zellen bzw. Geweben. Dabei wird die Gesamt-RNA mittels RT-PCR revers in cDNA transkribiert und durch eine anschließende In-vitro-Transkription inklusive Biotinmarkierung in biotinylierte cRNA umgewandelt. Durch einen mechanischen Zerkleinerungsprozess wird die cRNA fragmentiert und über Nacht auf dem Micro-Array hybridisiert. Im Anschluss an einen Wasch- und Markierungsschritt mit Streptavidin-Phycoerythrin und biotinyliertem Anti-Streptavidin-Antikörper erfolgt die Detektion und Quantifizierung mittels eines Hochleistungsscanners,

der die Oberfläche des Arrays abtastet und die Informationen als Grafik-Datei abspeichert. Eine Micro-Array-Software wertet diese Grafikdatei bzw. die unterschiedlich hell bzw. dunklen Grafik-Punkte des Bildes aus und kann den Hybridisierungsstatus des Arrays bzw. das Expressionsmuster daraus ableiten. In Verbindung mit einer Affymetrix-Datenbank wird dann das Bildmuster in ein Expressionsmuster, dem konkrete Gene zugeordnet sind, übersetzt.

Die Durchführung der Micro-Array-Analyse erfolgte in Zusammenarbeit mit den Labmanagern des Deutschen Rheumaforschungszentrums Berlin. Zur Isolierung der Gesamt-RNA der Zellen wurde das RNeasy-Kit der Firma Qiagen verwendet (siehe 2.16.1). Die Durchführung der Micro-Array-Analyse erfolgte streng nach dem One-Cycle GeneChip-Protokoll der Firma Affymetrix. Als Array wurde der GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix), der die Expressionsanalyse von über 34.000 charakterisierten murinen Genen umfasst, verwendet. Die Tabelle 2.2 gibt die einzelnen Teilschritte und die dazu verwendeten Analysekits (alle Affymetrix) wieder. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm dChIP¹⁷⁹.

| Teilschritte der Microarray-Analyse | Affymetrix-Kit |
|---|---------------------------------------|
| Präparation der Poly-A-RNA-Kontrollen für die One-Cycle-cDNA Synthese | GeneChip Poly-A RNA Control Kit |
| Erst-Strang-cDNA-Synthese | GeneChip One-Cycle cDNA Synthesis Kit |
| Zweit-Strang-cDNA-Synthese | GeneChip One-Cycle cDNA Synthesis Kit |
| cDNA-Reinigung | GeneChip Sample Cleanup Module |
| In-vitro-Transkription (IVT) | GeneChip IVT Labeling Kit |
| Reinigung der IVT-cRNA | GeneChip Sample Cleanup Module |
| Fragmentierung der cRNA | GeneChip Sample Cleanup Module |
| Target-Hybridisierung | GeneChip Hybridization Control Kit |

Tab. 2.2: Teilschritte und verwendete Affymetrix-Kits der GeneChip-Micro-Array-Analyse

2.17 Präparation von Zellkernextrakten

Zur Präparation von Zellkernextrakten wurden 1×10^6 Zellen mit PBS gewaschen und in 250 µl hypotonischen Puffer A, in dem zuvor eine Tablette Proteinase-Inhibitoren (Roche) gelöst wurde, aufgenommen. Nach Inkubation für 15 min auf Eis wurden die Zellen bei 2000 rpm zentrifugiert und erneut in 100 µl Puffer A aufgenommen.

Das Detergenz NP-40 wurde in einer Endkonzentration von 0,5 % dazugegeben und die Probe gemischt. Nach 5 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellkerne für 30 s bei 13.000 rpm pelletiert. Der Überstand der Probe bildete die cytoplasmatische Proteinfraction, des Kernpellet die nukleäre Proteinfraction. Die Kerne wurden anschließend erneut mit 500 µl Puffer A gewaschen und für 30 s bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 µl Puffer C aufgenommen und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C weggefroren.

2.18 Analyse der Proteinexpression mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot

Der Western Blot ermöglicht eine Identifizierung und/oder Quantifizierung spezifischer Proteine innerhalb eines Proteingemisches. Dazu werden die Proteine zuerst gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Membran transferiert. Die Proteindetektion erfolgt gewöhnlich mittels eines Antikörpers, der spezifisch an antigene Epitope des auf der Membran fixierten Zielproteins bindet (Primärantikörper). Die Detektion des unmarkierten Primärantikörpers erfolgt mit einem zweiten, speziesspezifischen, markierten Antikörper (Sekundärantikörper). Dieser bindet an den konstanten Teil des an das Protein gebundenen Primärantikörpers. An diesen Sekundärantikörper können Enzyme oder Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sein, über die die spezifische Proteinbindung visualisiert wird.

2.18.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Dafür wurde die BioRad Mini-Protean II Apparatur mit 7 x 10 cm großen und 1,5 mm dicken Gelen verwendet. Das Trenngel wurde direkt nach dem Gießen mit Isopropanol überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu erzeugen. Nach 30 min bei Raumtemperatur wurde der Alkohol durch Spülen mit Wasser entfernt, die Geloberfläche durch Tupfen mit Filterpapier getrocknet und das Sammelgel gegossen. In das Sammelgel wurde ein Kamm mit 10 Taschen eingepasst. Als Proteinproben wurden entweder Gesamtzelllysate oder die zytoplasmatische bzw. die Kernfraction nach Zellkernpräparation verwendet. Die einzelnen Proben wurden mit 4 x SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C erhitzt und auf das Gel aufgetragen. Das Gel wurde in SDS-Laufpuffer bei 100 V gefahren, bis die Bromphenolblau-Front den unteren Rand des Gels erreicht hatte. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes der Proteine wurden vorgefärbte Molekulargewichtsstandards verwendet.

2.18.2 Western Blot

Zum Transfer der Proteine auf Membranen wurde das Semidry-Blotverfahren eingesetzt. Dazu wurden die Graphitelektroden der Blotkammer (Pharmacia, Freiburg) mit Transferpuffer befeuchtet. Darauf wurden ein mit Transferpuffer befeuchtetes Filterpapier, anschließend die befeuchtete Hybond-ECL-Membran C (Amersham-Buchler, Braunschweig), das Gel und wiederum ein befeuchtetes Filterpapier aufgelegt. Die Proteine wurden aus dem Gel auf die in Richtung Anode liegende Membran geblottet. Der Transfer erfolgte 60 min lang bei $0,8 \text{ mA/cm}^2$ und Raumtemperatur. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation mit 5% (w/v) Milchpulver in PBST für 1 h bei Raumtemperatur abgesättigt und der Blot dreimal mit PBST gewaschen. Der Primärantikörper (GATA-3 HG-3-31, NFAT c2/p, NFATc1) wurde in 1% Milchpulver in PBST 1:1000 verdünnt und der Blot unter Schütteln für mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur mit dem Antikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 min mit PBST erfolgte die Markierung mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper (Verdünnung 1:2000 in PBST) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Blot wiederum dreimal für je 10 min mit PBST gewaschen. Zur Detektion der spezifischen Bindung wurden gleiche Teile der Detektionsreagenzien A und B (Renaissance-Kit, NEN, Bad Homburg v.d.H.) gemischt, der Blot darin für eine Minute inkubiert und anschließend auf Röntgenfilmen exponiert.

2.19 Antikörper

| Antikörper | Isotyp | Art.-Nr./Klon | Vertrieb |
|-------------------|----------------------------|---------------|------------------------------------|
| acetyl-Histon H3 | Kaninchen, polyklonal, IgG | 06-599 | Upstate |
| methyl-Histon H3 | Kaninchen, Antiserum | 06-866 | Upstate |
| c-MAF | Kaninchen, polyclonal, IgG | sc-7866 | Santa Cruz Biotechnology, Inc., |
| GATA-3 | Maus, monoklonal, IgG | sc-268 | Santa Cruz Biotechnology, Inc., |
| RNA-Polymerase-II | Kaninchen, polyklonal, IgG | sc-899 | Santa Cruz Biotechnology, Inc. |
| NFAT c2/p | Kaninchen, polyklonal, IgG | AB1-209 | ImmunoGlobe Antikörpertechnik GmbH |
| NFAT c1 | Kaninchen, polyklonal, IgG | AB1-205 | ImmunoGlobe Antikörpertechnik GmbH |
| NFκB p65 | Ziege, polyklonal, IgG | sc-372 | Santa Cruz Biotechnology, Inc. |
| p300 | Kaninchen, polyklonal, IgG | sc-585 | Santa Cruz Biotechnology, Inc. |
| SNFβ/Brg1 | Kaninchen, Antiserum | 07-478 | Upstate |
| Tubulin (DM1A) | Maus, monoklonal, IgG | CP06 | Calbiochem |
| Stat6 | Kaninchen, polyklonal, IgG | Sc-981 | Santa Cruz Biotechnology, Inc. |
| IL-4-PE | Ratte, IgG | 11B11 | BD Biosciences |
| IFNγ-FITC | Ratte, IgG | AN.18.17.24 | BD Biosciences |

Tab. 2.3: Übersicht über die Antikörper, die in dieser Arbeit verwendet wurden

3 Ergebnisse

3.1 Die magnetische Chromatin-Immunopräzipitation

Zur Analyse der DNA-Bindung verschiedener Transkriptionsfaktoren an den IL-4-Lokus wurde zunächst die Methode der magnetischen Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) etabliert. Die Anwendung dieser Methode in Primärzellen stellt im Gegensatz zur Anwendung in Zelllinien insofern eine Schwierigkeit dar, da als Ausgangsmaterial meist eine heterogene Zellpopulation vorliegt, in dem eventuell nur in einer Subpopulation der Zellen der jeweilige Transkriptionsfaktor an bestimmte DNA-Regionen bindet. Darüber hinaus ist zumindest bei der Anwendung von aufgereinigten Subpopulationen die Zellzahl auf wenige Millionen begrenzt.

Um eine effiziente Isolierung und Aufreinigung von wenigen präzipitierten Protein-DNA-Komplexen zu gewährleisten, wurde das magnetische Präzipitations- und Aufreinigungssystem der Firma Miltenyi Biotec verwendet. Dabei wird der jeweilige Antikörper-gebundene Protein-DNA-Komplex über Protein-G- oder -A-gekoppelte magnetische Mikrobeads gebunden, in einem starken Magnetfeld über eine Säule gewaschen und aufgereinigt. Dies vermeidet die im Gegensatz zur herkömmlichen Agarose- oder Sepharose-Präzipitation notwendigen, aufwendigen Waschschrte in kleinen Eppendorfgefäßen, bei denen Probenmaterial vor allem bei der Anwendung geringerer Ausgangsmengen verloren gehen kann. Die Abbildung 3.1 stellt die verschiedenen Arbeitsschritte der magnetischen Chromatin-Immunopräzipitation schematisch dar. Dabei wurden die lebenden Zellen unter den jeweiligen Stimulationsbedingungen mit einem bipolaren Crosslinker fixiert. Ein Crosslinker besitzt zumeist reaktive Aldehydgruppen, die mit Amino- und Iminogruppen von Proteinen (zum Beispiel die Seitenketten der Aminosäuren Lysin und Arginin) und DNA (zum Beispiel die Base Cytosin) kovalente Bindungen eingehen. Somit werden Proteine und in diesem Fall Transkriptionsfaktoren, die an bestimmte DNA-Bereiche gebunden sind, mit der DNA vernetzt. Als gängige Fixierungsreagenz wird häufig Formaldehyd verwendet, das Proteine untereinander bzw. Proteine mit DNA über einen Abstand bis zu 2 Ångström fixiert. Zur Optimierung der Fixierungseffizienz wurde bei der magnetischen Chromatin-Immunopräzipitation eine Doppelfixierung mit Formaldehyd und DSP (Dithiobissuccinimidylpropionat, Pierce Biotechnology Inc.) entwickelt. DSP ist ein homobifunktionaler membrangängiger Crosslinker, deren amino-reaktive N-Hydroxysuccinimidestergruppen über einen 8-Kohlenstoffatome-langen Spacer getrennt sind. Damit besitzt DSP im Gegensatz zu Formaldehyd die Eigenschaft, Moleküle über einen Abstand von über 10 Ångström miteinander zu vernetzen.

Durch die Kombination der beiden Fixierungsreagenzien wurde es möglich, dass Kofaktoren wie z. Bsp. p300/CBP, die über Protein-Protein-Interaktionen indirekt an bestimmte DNA-Regionen binden bzw. Transkriptionsfaktoren wie z. Bsp. NFAT, die eine niedrige DNA-Affinität besitzen, effizient an die DNA zu fixieren und die relative Anreicherung der untersuchten DNA-Region nach Präzipitation mit einem spezifischen Antikörper zu analysieren.

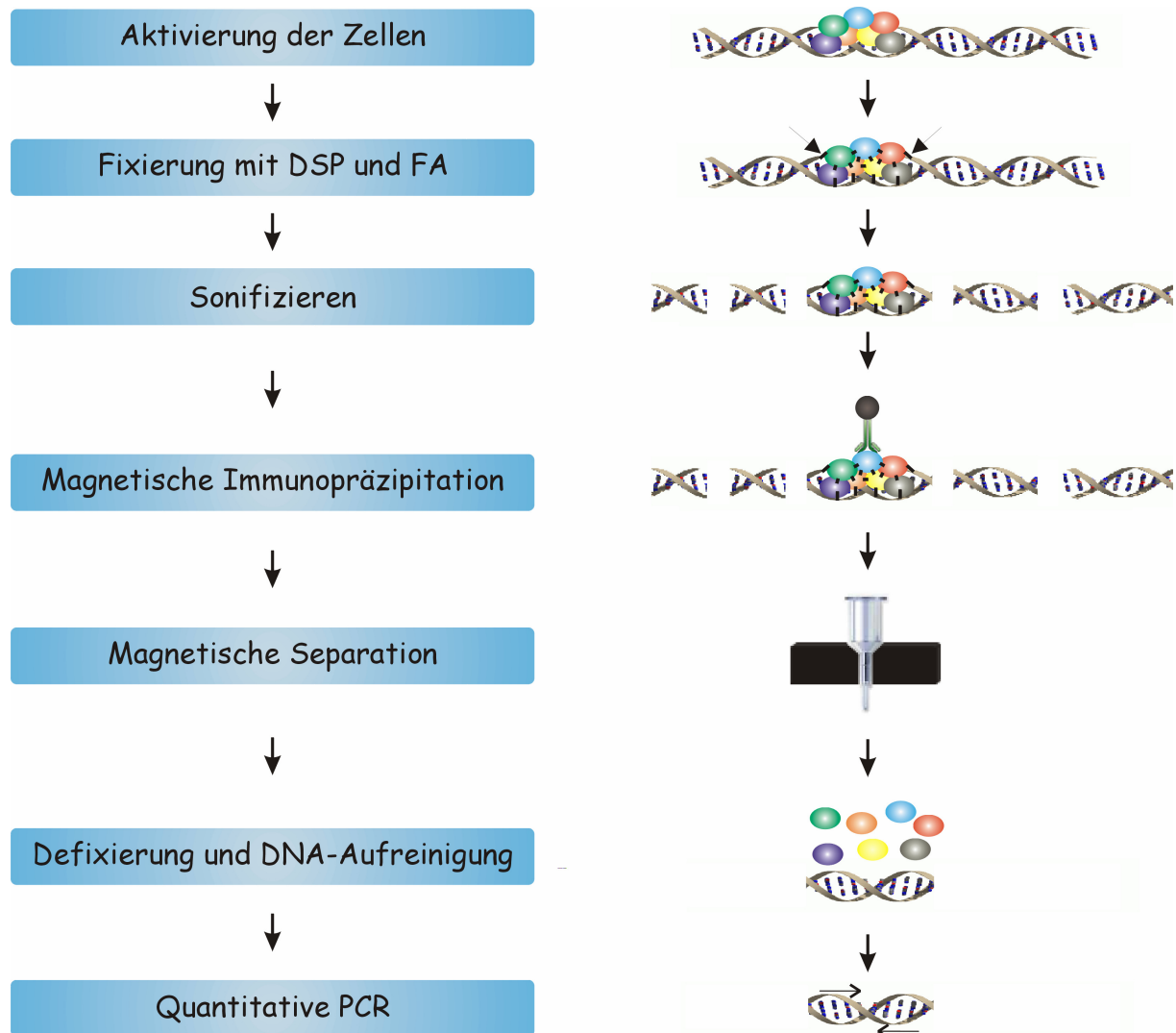


Abb. 3.1: Schema der magnetischen Chromatin-Immunopräzipitation mit DSP/FA-Doppelfixierung. Die Zellen wurden dabei unter ruhenden oder stimulierten Bedingungen mit den Crosslinkern DSP und Formaldehyd (FA) fixiert. Nach mechanischer Zerkleinerung der DNA in 500 bis 1000 Basenpaare große DNA-Fragmente wurden die Protein-DNA-Komplexe mit spezifischen Antikörpern gegen die jeweiligen Transkriptionsfaktoren präzipitiert. Über die Bindung an Protein-A/G-Mikrobeads wurden die Antikörpergebundenen Komplexe im magnetischen Feld isoliert. Nach Defixierung und Aufreinigung der präzipitierten DNA-Fragmente wurde die Anreicherung des IL-4-Promoters, der CIRE-Region, der HS Va und als Negativkontrolle des IFN γ -Promoters mittels quantitativer LightCycler-PCR analysiert.

Nach Lyse der fixierten Zellen wurde das Chromatin mit einem Sonifikator zerkleinert. Die Scherung des Chromatins wurde dabei mit einer Intensität durchgeführt, dass die Größe der erhaltenen DNA-Fragmente, die entscheidend für die Auflösung und Diskriminierung zwischen zwei oder mehreren nahe beieinander lokalisierten DNA-Regionen ist, zwischen 500 und 1000 Basenpaaren betrug. Dies wurde in Vorversuchen und Nachweis der entsprechenden Fragmentgrößen mittels Ethidiumbromid-haltigen Agarose-Gelelektrophoresen überprüft (Daten nicht gezeigt). Die Protein-DNA-Komplexe wurden anschließend mit einem gegen den jeweiligen Transkriptionsfaktor gerichteten, spezifischen Antikörper präzipitiert und nach Bindung an Protein-A- oder -G-gekoppelte Mikrobeads über eine Säule im Magnetfeld aufgereinigt. Nach verschiedenen Waschschritten mit Niedrigsalz-, Hochsalz-, Litiumchlorid und einem Tris-EDTA-Puffer wurden die aufgereinigten Komplexe von der Säule eluiert und bei 65°C defixiert. Nach Aufreinigung der präzipitierten DNA-Fragmente wurde die Anreicherung der jeweiligen DNA-Regionen in der quantitativen LightCycler-PCR bestimmt.

Die relative Anreicherung eines DNA-Abschnittes wurde aus dem Verhältnis der absoluten Anreicherung des Präzipitates zum Input einer jeden Probe berechnet. Der Input wurde vor der Präzipitation entnommen und spiegelte den jeweiligen Chromatin-Ausgangsgehalt der Probe wieder. Zur qualitativen oder auch quantitativen Analyse der relativen Anreicherung einer bestimmten DNA-Sequenz erfolgte der Vergleich mit einer externen bzw. internen Negativkontrolle. Die externe Kontrolle stellt die Analyse der relativen Anreicherung der gleichen DNA-Region aber in einem unterschiedlichen Zellsystem bzw. unter unterschiedlichen Stimulations- oder Kulturbedingungen dar, in denen der Transkriptionsfaktor nicht an die jeweilige Region binden sollte. Zur Analyse der Transkriptionsfaktorbesetzung des IL-4-Promoters und der HS Va in restimulierten Th2-Zellen wurde als externe Kontrolle die relative Anreicherung dieser Regionen in ruhenden, unstimulierten Th2-Zellen verwendet.

Neben der externen Kontrolle wurde als Vergleich zusätzlich eine interne Kontrolle in den untersuchten Zellen durchgeführt. Die interne Negativkontrolle stellt die relative Anreicherung einer DNA-Sequenz dar, an die der jeweilige Transkriptionsfaktor aufgrund einer fehlenden Bindungsstelle oder infolge fehlender Chromatinzugänglichkeit nicht bindet. Im Vergleich zur relativen Anreicherung des IL-4-Promoters und der HS Va wurde dafür die relative Anreicherung des IFN γ -Promoters herangezogen, der aufgrund repressiver Chromatinveränderungen in Th2-Zellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren vermindert zugänglich ist.

3.2 Die Transkriptionsfaktorbindung am IL-4-Lokus in unstimulierten und restimulierten Th2-Zellen

Zur Analyse der Transkriptionsfaktorbesetzung am IL-4-Promoter und der HS Va in differenzierten Th2-Zellen wurde eine *In-vitro*-Th2-Differenzierung naiver T-Zellen mit nachfolgender magnetischer Chromatin-Immunopräzipitation der differenzierten Th2-Zellen durchgeführt. Das experimentelle Schema ist in der Abbildung 3.2 dargestellt.

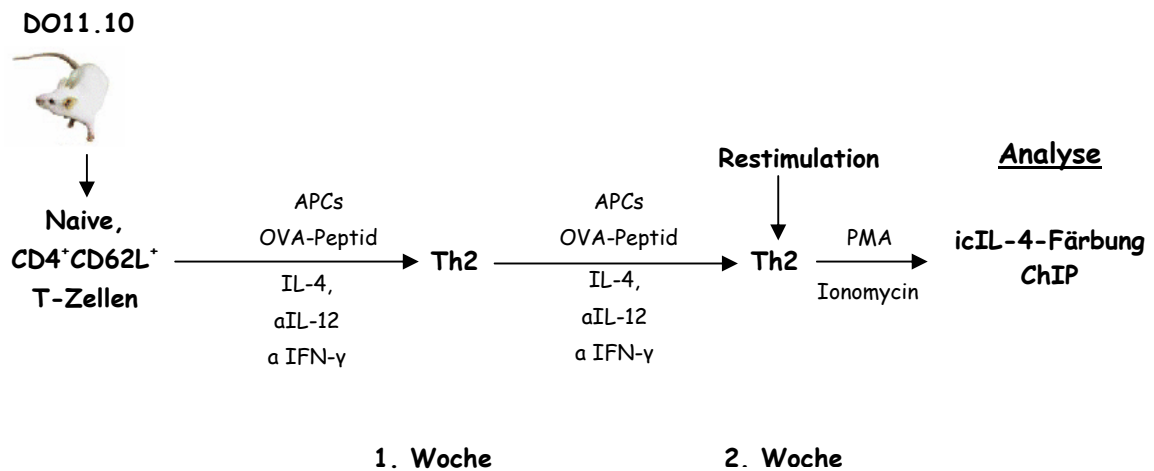


Abb. 3.2: *In-vitro*-Th2-Differenzierung muriner, naiver T-Zellen und anschließende Analyse der Transkriptionsfaktorbindung an den IL-4-Lokus mittels Chromatin-Immunopräzipitation. Aus Lymphknoten und Milzzellen wurden CD4/CD62L-positive, naive T-Zellen isoliert und für jeweils zweimal eine Woche mit Antigen-präsentierenden Zellen (APC) und dem DO11.10-spezifischen Antigen Ovalbumin-Peptid stimuliert. Für die Th2-Differenzierung wurde der Zellkultur das Th2-induzierende Zytokin IL-4 sowie zur Hemmung der Th1-Differenzierung die Antikörper anti-IL-12 und anti-IFN-γ zugegeben. Nach zwei Wochen wurden die differenzierten Th2-Zellen mit PMA/Ionomycin restimuliert und zur intrazellulären IL-4-Färbung sowie zur magnetischen Chromatin-Immunopräzipitation weiterverwendet.

Für die Th2-Differenzierung wurden naive CD4⁺CD62L⁺ Lymphozyten aus Lymphknoten und Milzen von 6 bis 8 Wochen alten DO11.10-Mäusen isoliert und für zwei Wochen unter Th2-Bedingungen mit IL-4, anti-IL-12- und anti-IFN_γ-Antikörpern kultiviert. Nach Abtrennung der toten Zellen durch Ficollisierung wurden unstimulierte sowie aktivierte Th2-Lymphozyten, die für drei Stunden mit PMA/Ionomycin restimuliert wurden, entsprechend dem DSP/FA-Fixierungsprotokoll fixiert. Nach Lyse der Zellen und mechanischer Fragmentierung des Chromatins wurde die Bindung der RNA-Polymerase-II sowie der Transkriptionsfaktoren NFAT1, NFAT2, c-MAF, p65, GATA-3, STAT6, SWI/SNF/BRG1 und p300 mittels der magnetischen Chromatin-Immunopräzipitation und anschließender Quantifizierung in der LightCycler-PCR analysiert.

Die Messung der restimulationsabhängigen IL-4-Expression erfolgte durch eine intrazelluläre Färbung gegen Interleukin-4 und anschließender Analyse im Durchflußzytometer. Die Abbildung 3.3a zeigt zunächst die IL-4-/IFN γ -Doppelfärbung in unstimulierten und restimulierten Th2-Zellen. Nach dreistündiger Aktivierung der Zellen mit PMA/Ionomycin waren etwa 40% der Zellen positiv für IL-4. Die ausgebliebene stimulationsabhängige IFN γ -Expression belegte die Th2-Differenzierung der Zellen und die damit verbundene Inkompetenz zur Expression der Th1-Zytokine.

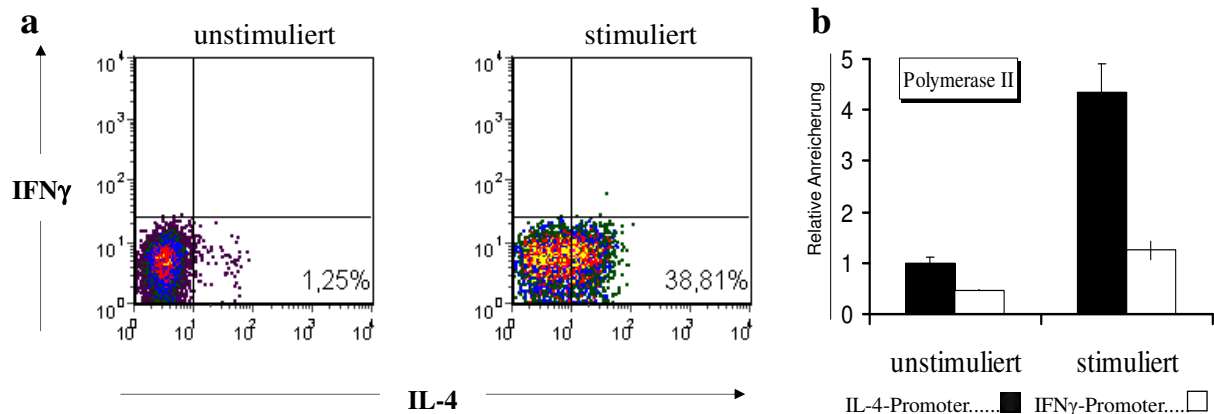


Abb. 3.3: Die Interleukin-4-Expression (a) und Bindung der RNA-Polymerase-II (b) am IL-4- und IFN γ -Promoter in zwei Wochen alten, unstimulierten und restimulierten Th2-Lymphozyten.

Naive Lymphozyten wurden für zwei Wochen unter Th2-Bedingungen mit IL-4 und anti-IL12-/anti-IFN γ -Antikörpern kultiviert und nach dreistündiger Restimulation mit PMA/Ionomycin mit Formaldehyd fixiert. Der Nachweis IL-4-positiver Zellen erfolgte mittels intrazellulärer Färbung mit einem Phycoerythrin-(PE)-konjugierten anti-IL-4-Antikörper sowie als Kontrolle mit einem FITC-konjugierten anti-IFN γ -Antikörper. Die Bindung der RNA-Polymerase-II wurde nach FA/DSP-Fixierung mittels der magnetischen Chromatin-Immunopräzipitation mit einem anti-RNA-Polymerase-II-Antikörper analysiert. Die relative Anreicherung stellt das Verhältnis der präzipitierten DNA-Menge bezogen auf die Anreicherung des IL-4-Promoters der unstimulierten Probe sowie normalisiert zum Input einer jeden Probe dar. Die Graphen zeigen ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen, die Standardabweichung ergibt sich aus den Replikaten der quantitativen PCR.

Auf Chromatinebene spiegelte sich die restimulationsabhängige IL-4-Expression in der unterschiedlichen Assoziation der RNA-Polymerase-II mit dem IL-4-Promoter wieder (Abb. 3.3b). Während in unstimulierten, ruhenden Th2-Zellen der IL-4-Promoter nach Chromatin-Immunopräzipitation nicht vermehrt angereichert wurde und die RNA-Polymerase somit nicht mit dem IL-4-Promoter assoziiert war, konnte nach dreistündiger Restimulation eine über vierfache Anreicherung des IL-4-Promoters im Gegensatz zur unstimulierten Probe bzw. zum IFN γ -Promoter nachgewiesen werden.

3.2.1 Die Bindung von NFAT1, NFAT2, c-MAF und NF- κ B/p65 an den IL-4-Lokus

Nach Präzipitation von NFAT1 bzw. NFAT2 (Abb. 3.4) zeigte sich eine restimulationsabhängige Anreicherung sowohl des IL-4-Promoters als auch der Va-Enhancer-Region. Bei NFAT1 lag die relative Anreicherung der HS Va im Vergleich zum IL-4-Promoter geringfügig höher. Bei NFAT2 ließ sich darüber hinaus bereits in unstimulierten Th2-Zellen eine geringfügige Mehranreicherung des IL-4-Promoters im Vergleich zum IFN γ -Promoter nachweisen. Im Gegensatz zum IL-4-Promoter und Va-Enhancer zeigte sich in restimulierten Th2-Zellen keine spezifische Anreicherung des IFN γ -Promoters.

Bezüglich der DNA-Bindungsaktivität des Th2-spezifischen Transkriptionsfaktors c-MAF konnten Arbeiten von Kim et al. im Elektromobilitätsassay zeigen, dass c-MAF an eine konservierte c-MAF-Consensussequenz (MARE) innerhalb des IL-4-Promoters bindet und bezüglich der IL-4-Expression eine Transaktivierungsaktivität am IL-4-Promoter vermittelt (siehe Kapitel 1.5.1.4). Die Chromatin-Immunoprecipitation von c-MAF (Abb. 3.4) bestätigte diese Ergebnisse, wobei eine spezifische, restimulationsabhängige Anreicherung des IL-4-Promoters um mehr als das Zehnfache gegenüber der unstimulierten Probe detektiert werden konnte. Die HS Va sowie der IFN γ -Promoter wurden hingegen nicht vermehrt angereichert.

Die Rekrutierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B an den IL-4-Lokus wurde durch Präzipitation des Proteins p65 untersucht. p65 bindet als Heterodimer zusammen mit p50 innerhalb regulatorischer DNA-Regionen an NF- κ B-Consensussequenzen. Vergleichend zu c-MAF zeigte sich nach Präzipitation von p65 in restimulierten Th2-Zellen eine spezifische, circa sechsfache Mehranreicherung des IL-4-Promoters, nicht jedoch der HS Va bzw. des IFN γ -Promoters.

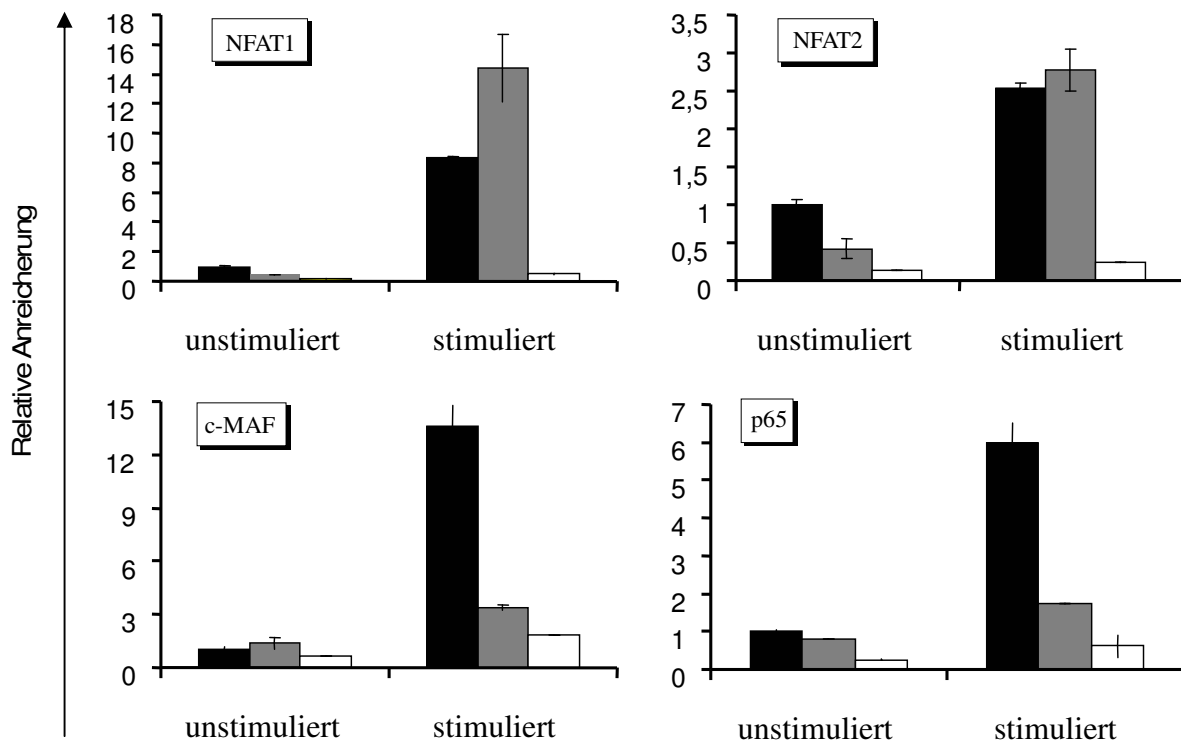


Abb. 3.4: Die Bindung der Transkriptionsfaktoren NFAT1, NFAT2, c-MAF und p65 an den IL-4-Lokus in unstimulierten und restimulierten Th2-Lymphozyten. Zwei Wochen alte Th2-Zellen wurden unstimuliert sowie nach dreistündiger PMA/Ionomycin-Stimulation mit DSP/FA fixiert und die DNA-Bindung der jeweiligen Transkriptionsfaktoren an den IL-4-Promoter (●), die HS Va (●) sowie an den IFN γ -Promoter (○) mittels der magnetischen Chromatin-Immunopräzipitation untersucht. Die relative Anreicherung stellt das Verhältnis der präzipitierten DNA-Menge bezogen auf die Anreicherung des IL-4-Promoters der unstimulierten Probe sowie normalisiert zum Input einer jeden Probe dar. Die Graphen zeigen ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen, die Standardabweichung ergibt sich aus den Replikaten der quantitativen PCR.

3.2.2 Die Bindung der Transkriptionsfaktoren SWI/SNF/Brg1, p300, GATA-3 und STAT6 an den IL-4-Lokus

Zur Analyse der DNA-Bindung des SWI/SNF-Komplexes in unstimulierten und restimulierten Th2-Zellen wurde die Chromatin-Immunopräzipitation gegen das Protein Brg1 durchgeführt. Brg1 ist ein Kernbestandteil des SWI/SNF-Komplexes und besitzt zugleich die ATPase-Untereinheit für die Energiebereitstellung des ATP-abhängigen Chromatin-Remodelings. Aus der Abbildung 3.5 geht hervor, dass an der HS Va ein über fünffacher Unterschied der relativen Anreicherung in den restimulierten Zellen im Vergleich zur unstimulierten Probe detektiert werden konnte. Im Gegensatz dazu wurde der IL-4-Promoter nach Restimulation nur geringfügig mehr angereichert (zweifach) als in der unstimulierten Probe.

Der Chromatin-Remodeling-Komplex SWI/SNF ist somit restimulationsabhängig mit dem IL-4-Lokus und hier, im Einklang mit der restimulationsabhängigen Öffnung des Va-Enhancers, vorwiegend mit der HS Va assoziiert.

Der Transkriptionsfaktor p300 fungiert im Rahmen der transkriptionellen Genregulation als direkter transkriptioneller Koaktivator und kann gleichsam durch seine intrinsische Azetyltransferase-Aktivität eine Änderung der epigenetischen Chromatinkonfiguration vermitteln. Die Abbildung 3.5 zeigt, dass p300 restimulationsabhängig sowohl am IL-4-Promoter als auch an der HS Va gebunden war. Nach Chromatin-Immunopräzipitation mit einem p300-spezifischen Antikörper betrug die relative Anreicherung am IL-4-Promoter das 2,5fache und an der HS Va etwa das Fünffache der unstimulierten Probe. Vergleichend zum IFN γ -Promoter konnte am IL-4-Promoter bereits eine circa zehnfache Mehranreicherung in unstimulierten Th2-Zellen detektiert werden. p300 scheint somit bereits in unstimulierten Th2-Zellen zum Teil mit dem IL-4-Lokus assoziiert zu sein und wird nach Aktivierung vermehrt an den IL-4-Promoter bzw. die HS Va rekrutiert.

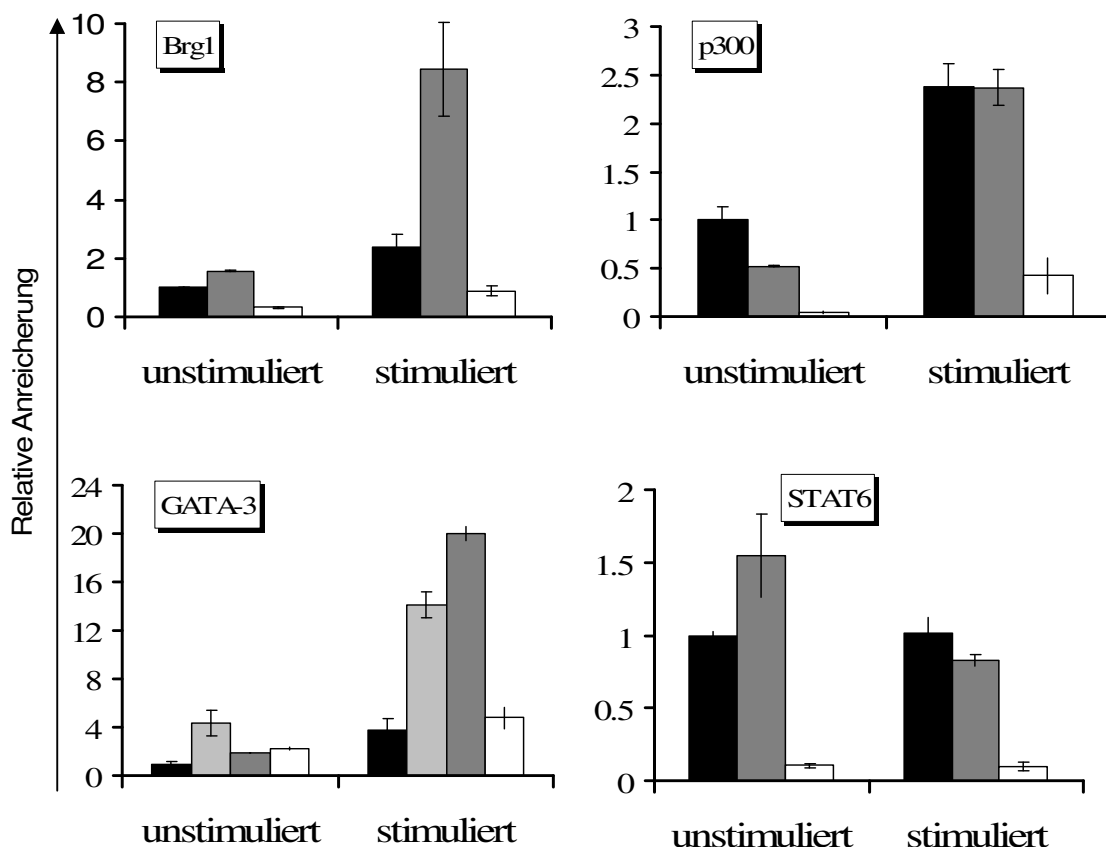


Abb. 3.5: Die Bindung der Transkriptionsfaktoren Brg1, p300, GATA-3 und STAT6 an den IL-4-Lokus in unstimulierten und restimulierten Th2-Lymphozyten. In Analogie zur Abbildung 3.4 wurde die DNA-Bindung der jeweiligen Transkriptionsfaktoren an den IL-4-Promoter (●), die CIRE-Region (●), die HS Va (●) sowie an den IFN γ -Promoter (○) in zwei Wochen alten, unstimulierten sowie restimulierten Th2-Zellen mittels der magnetischen Chromatin-Immunopräzipitation untersucht.

In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass der Th2-spezifische Transkriptionsfaktor GATA-3 mit der HS Va, nicht jedoch mit dem IL-4-Promoter assoziiert ist. Tykocinski et al. konnten eine konservierte GATA-3-Bindungsstelle im ersten Intron des IL-4-Gens (CIRE) charakterisieren, die eine Rolle bei der Ausbildung des IL-4-Gedächtnisses in frühen Th2-Zellen spielt. In der Abbildung 3.5 sind die relativen Anreicherungen der Regionen IL-4-Promoter, CIRE, HS Va und IFN γ -Promoter nach Chromatin-Immunopräzipitation von GATA-3 dargestellt. Dabei bestätigte sich die restimulationsabhängige Bindung von GATA3 an die CIRE-Region und an die HS Va, nicht jedoch an den IL-4- und IFN γ -Promoter. Die relative Anreicherung der CIRE-Region bzw. der HS Va war dabei in den stimulierten Th2-Zellen verglichen mit der unstimulierten Probe etwa vierfach bzw. zehnfach erhöht. Die Anreicherungen des IL-4- und IFN γ -Promoters entsprachen nach Restimulation etwa dem Niveau der unstimulierten Probe. Für den Transkriptionsfaktor STAT6 zeigte sich sowohl in unstimulierten als auch in restimulierten Th2-Zellen eine erhöhte relative Anreicherung am IL-4-Promoter und an der HS Va. Verglichen zum IFN γ -Promoter, der als Negativkontrolle herangezogen wurde, ließ sich eine über zehnfach erhöhte Anreicherung am IL-4-Promoter und an der HS Va nachweisen. STAT6 ist somit bereits in ruhenden, unstimulierten als auch in aktivierten Th2-Zellen mit dem IL-4-Lokus assoziiert.

3.3 Die Bindungskinetiken der untersuchten Transkriptionsfaktoren an den IL-4-Lokus in stimulierten Th2-Zellen

Wie in Kapitel 3.2 beschrieben, konnte durch Chromatin-Immunopräzipitationsanalysen gezeigt werden, dass in differenzierten Th2-Zellen ein Komplex aus RNA-Polymerase-II, NFAT1, NFAT2, c-MAF, NF- κ B/p65, GATA-3, SWI/SNF/Brg1 und p300 restimulationsabhängig an den IL-4-Lokus bindet. Im Gegensatz dazu ist der Transkriptionsfaktor STAT6 sowohl in unstimulierten als auch in restimulierten Th2-Zellen mit dem IL-4-Lokus assoziiert.

Verschiedene Arbeiten konnten zeigen, dass aktivierte Th2-Zellen das Zytokin IL-4 nur für einen kurzen Zeitraum exprimieren¹⁸⁰. Bereits nach wenigen Stunden wird die Transkription von IL-4 terminiert und die Zelle bleibt im Folgenden temporär refraktär gegenüber wiederholten Stimulationen.

Daher stellte sich die Frage, ob die restimulationsabhängige Assoziation des Transkriptionsfaktorkomplexes an den IL-4-Lokus ebenfalls zeitlich begrenzt ist und inwieweit die Assoziation und Dissoziation des Transkriptionsfaktorkomplexes bzw. einzelner Transkriptionsfaktoren mit der Initiation und Termination der IL-4-Transkription einhergehen.

Um dieser Frage nachzugehen, wurden zwei Wochen alte Th2-Zellen mit PMA/Ionomycin über einen Zeitraum von sechs Stunden stimuliert und die Transkriptionsfaktorbesetzung am IL-4-Lokus nach den Zeitpunkten 1, 2, 3, 4 und 6 Stunden mittels magnetischer Chromatin-Immunopräzipitation untersucht.

Die Abbildung 3.6 zeigt zunächst die IL-4-mRNA-Expressionskinetik sowie die Assoziation der RNA-Polymerase-II mit dem IL-4-Promoter in zwei Wochen alten, restimulierten Th2-Zellen. Bereits nach zweistündiger Stimulation war ein geringfügiger Anstieg der IL-4-mRNA-Expression detektierbar. Die maximale Expressionsrate zeigte sich nach einer dreistündigen Stimulationsdauer. Nach vier und sechs Stunden verminderte sich die Expressionsrate wiederum, blieb aber im Vergleich mit der unstimulierten Probe auf einem erhöhten Niveau. Der Zeitverlauf der IL-4-mRNA-Expressionsrate ging parallel einher mit der Assoziation und Dissoziation der RNA-Polymerase-II am IL-4-Promoter. Bereits nach zwei Stunden Stimulation zeigte sich eine deutliche Anreicherung der IL-4-Promoterregion. Die maximale Anreicherung wurde ebenso nach dreistündiger Stimulation erreicht und näherte sich über den weiteren Stimulationszeitraum wieder dem Basallevel der unstimulierten Probe an.

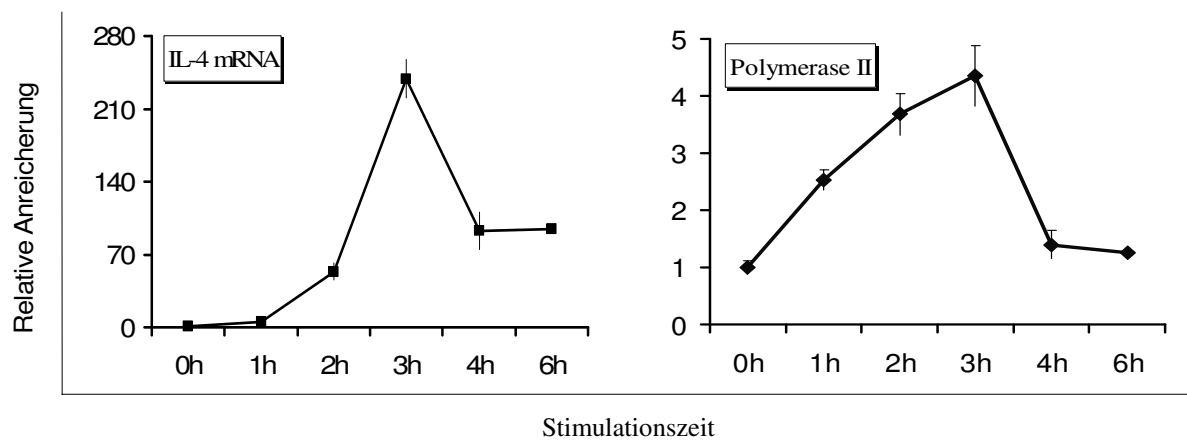


Abb. 3.6: Die IL-4-mRNA-Expressionskinetik und Assoziation der RNA-Polymerase-II am IL-4-Promoter während der Restimulationsphase von Th2-Zellen. Zwei Wochen alte Th2-Zellen wurden mit PMA/Ionomycin für insgesamt sechs Stunden restimuliert und nach den Zeitpunkten 1h, 2h, 3h, 4h und 6h untersucht. Die Quantifizierung der IL-4-mRNA-Expression erfolgte mittels quantitativer LightCycler-PCR nach Extraktion der mRNA und Umschreibung in cDNA. Die Assoziation der RNA-Polymerase-II mit dem IL-4-Promoter wurde mittels magnetischer Chromatin-Immunopräzipitation detektiert. Die relative Anreicherung ist zum Input der jeweiligen Probe normalisiert und bezieht sich auf die unstimulierte Probe zum Zeitpunkt 0h.

3.3.1 Die Bindungskinetiken von NFAT1 und NFAT2 am IL-4-Promoter und an die HS Va

Der Transkriptionsfaktor NFAT1 zeigte ein nahezu konkordantes Bindungsverhalten am IL-4-Promoter und an der HS Va (Abb.3.7). Bereits nach zweistündiger Restimulation reicherten sich beide Regionen vermehrt gegenüber der unstimulierten Probe und gegenüber dem IFN γ -Promoter an. Die maximale Anreicherung zeigte sich nach drei Stunden Restimulation, wobei der Maximalwert an der HS Va höher lag als am IL-4-Promoter. Nach sechsstündiger Restimulation war keine spezifische Anreicherung des L-4-Promoters oder der HS Va mehr nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt war NFAT1 somit vollständig vom IL-4-Lokus abdissoziiert.

Die DNA-Besetzung des Transkriptionsfaktors NFAT2 glich der von NFAT1, wobei jedoch nach zweistündiger Restimulation noch keine spezifische Anreicherung beider Regionen zu verzeichnen war. Die maximale Anreicherung konnte wie bei NFAT1 sowohl am IL-4-Promoter als auch an der HS Va nach dreistündiger Restimulation detektiert werden. Nach längeren Stimulationszeiten fiel diese wieder auf das Niveau der unstimulierten Probe ab.

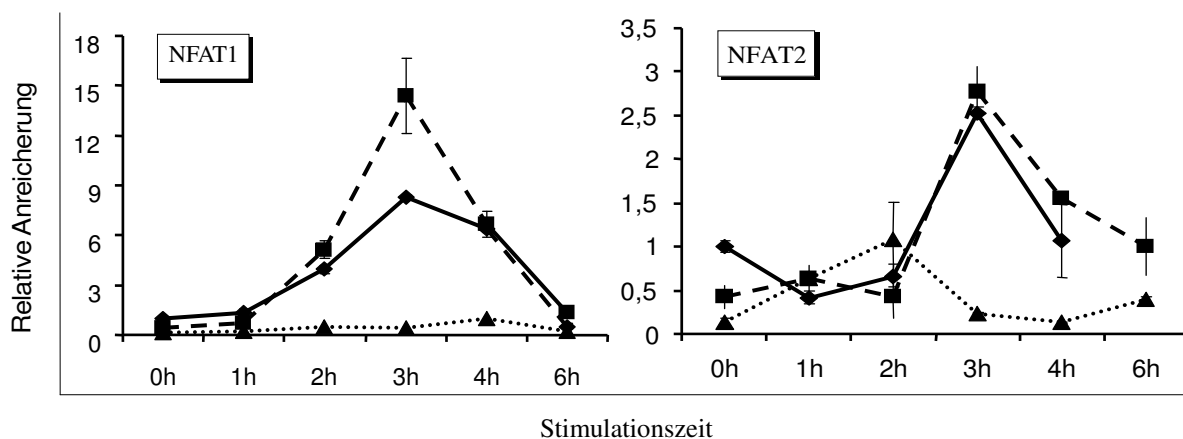


Abb. 3.7: Die Bindungskinetiken der Transkriptionsfaktoren NFAT1 und NFAT2 an den IL-4-Lokus. Zwei Wochen alte Th2-Zellen wurden im Vergleich zu unstimulierten Zellen sechs Stunden mit PMA/Ionomycin restimuliert. Nach stündlichen Zeitintervallen wurden die Zellen mit DSP/FA fixiert und die DNA-Bindung von NFAT1 und NFAT2 an den IL-4-Promoter (—◆—), die HS Va (---■---) sowie an den IFN γ -Promoter (.....▲.....) mittels der magnetischen Chromatin-Immunopräzipitation untersucht. Die relative Anreicherung stellt das Verhältnis der präzipitierten DNA-Menge bezogen auf die Anreicherung des IL-4-Promoters der unstimulierten Probe sowie normalisiert zum Input einer jeden Probe dar. Die Graphen zeigen ein repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Versuchen, die Standardabweichung ergibt sich aus den Replikaten der quantitativen PCR.

3.3.2 Die Bindungskinetiken der Transkriptionsfaktoren c-MAF und NF- κ B/p65 am IL-4-Promoter

Wie in Abbildung 3.4 gezeigt werden konnte, bindet der Transkriptionsfaktor c-MAF restimulationsabhängig nur an den IL-4-Promoter, nicht jedoch an die HS Va. Die Analyse der DNA-Bindungskinetik (Abb. 3.8) zeigte auch hier eine temporäre Assoziation. Mit zunehmender Stimulationsdauer stieg die relative Anreicherung des IL-4-Promoters stetig an, erreichte nach dreistündiger Stimulation das Maximum und fiel nach längeren Stimulationszeiten bis zum Sechsstunden-Wert wieder auf das Ausgangsniveau ab.

Die Bindungsaktivität von NF- κ B/p65 an den IL-4-Promoter erreichte bereits nach zweistündiger Stimulation den Maximalwert. Zum Drei-Stunden-Wert war im Vergleich zur unstimulierten Probe nur noch eine geringfügige Anreicherung des IL-4-Promoters zu verzeichnen, die sich nach sechsstündiger Stimulation wieder dem Ausgangswert der unstimulierten Probe angenähert hatte.

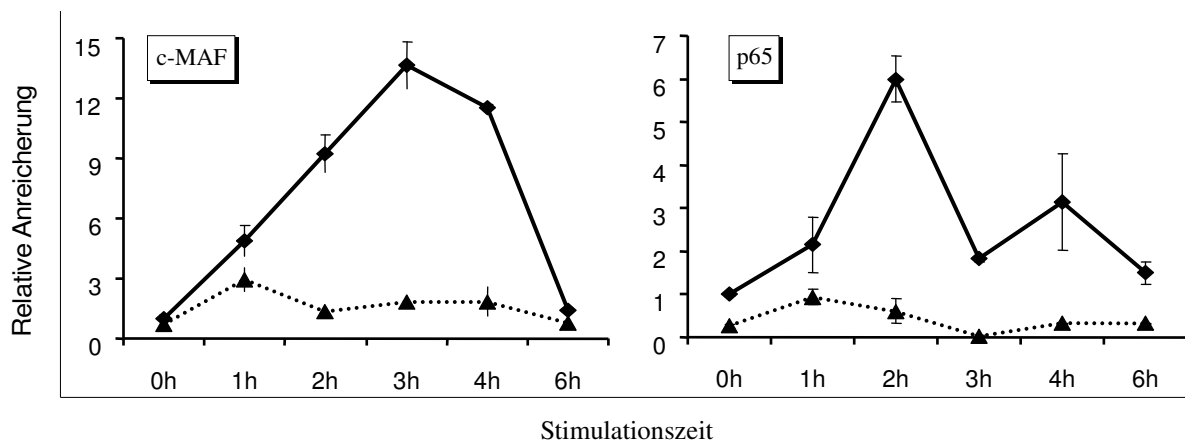


Abb. 3.8: Die Bindungskinetiken der Transkriptionsfaktoren c-MAF und p65 am IL-4-Promoter. In Analogie zur Abbildung 3.7 sind die relativen Anreicherungen des IL-4-Promoters (—◆—) und vergleichend dazu des IFN γ -Promoters (---▲---) nach Chromatin-Immunopräzipitation der Proteine c-MAF und p65 über den Stimulationszeitraum von sechs Stunden dargestellt.

3.3.3 Die Bindungskinetiken des transkriptionellen Koaktivators p300 und des Chromatin-Remodeling-Komplexes SWI/SNF/Brg1 am IL-4-Lokus

In Analogie zu den Transkriptionsfaktoren NFAT1, NFAT2, c-MAF und NF- κ B/p65 konnte für p300 ebenso eine temporäre Assoziation mit dem IL-4-Promoter und der HS Va nachgewiesen werden (Abb. 3.9). Auch hier lag die maximale Anreicherung am IL-4-Promoter nach dreistündiger Restimulation.

Die Anreicherung der HS Va war hingegen gering verzögert. Die maximale Anreicherung wurde hier erst nach vier Stunden Stimulation erreicht. Darüber hinaus konnte im Vergleich zum IFN γ -Promoter bereits eine geringfügige Bindungsaktivität in der unstimulierten Probe am IL-4-Promoter und an der HS Va detektiert werden.

Wie aus der Abbildung 3.5 bereits hervorging, ist der Chromatin Remodeling Komplex SWI/SNF vornehmlich mit der HS Va assoziiert. Die Analyse der Bindungskinetik von Brg1 an die HS Va zeigte, dass die Assoziation des SWI/SNF/Brg1-Komplexes mit der HS Va ebenso zeitlich begrenzt ist. Die maximale Anreicherung konnte wiederum nach dreistündiger Stimulation detektiert werden (Abb. 3.9).

Nach späteren Stimulationszeitpunkten zeigte sich eine kontinuierliche Verminderung der relativen Anreicherung, die nach sechs Stunden etwa das Niveau des Zwei-Stunden-Wertes angenommen hatte.

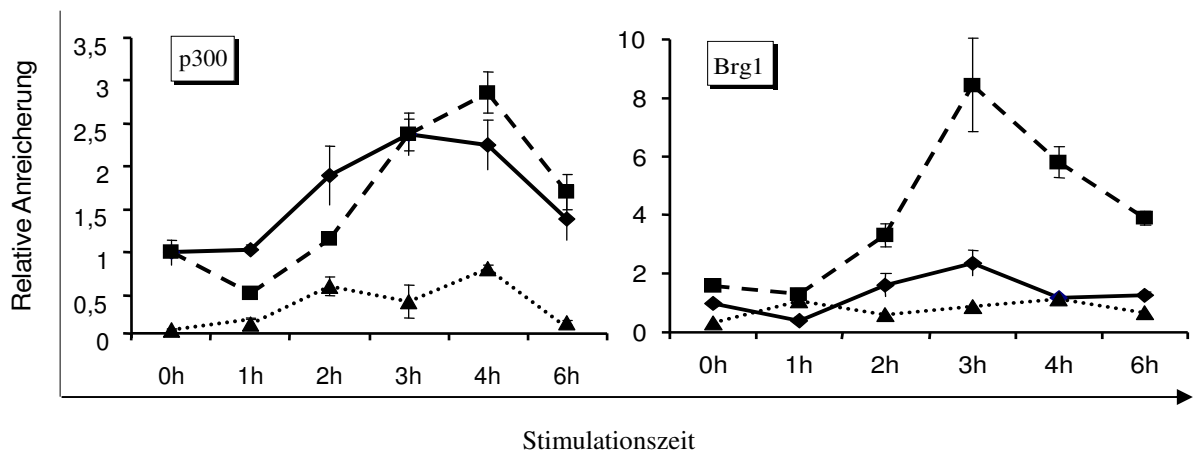


Abb. 3.9: Die Bindungskinetiken der Transkriptionsfaktoren p300 und Brg1 an den IL-4-Lokus. In Analogie zur Abbildung 3.7 sind die relativen Anreicherungen des IL-4-Promoters (—◆—), der HS Va (---■---) und vergleichend dazu des IFN γ -Promoters (···▲···) nach Chromatin-Immunopräzipitation der Proteine p300 und Brg1 über den Stimulationszeitraum von sechs Stunden dargestellt.

3.3.4 Die Bindungskinetiken der Transkriptionsfaktoren STAT6 und GATA-3 am IL-4-Lokus

Im Gegensatz zu den Transkriptionsfaktoren NFAT1, NFAT2, c-MAF, p65, p300 und Brg1 zeigte sich für den Transkriptionsfaktor STAT6 bereits in unstimulierten Th2-Zellen eine Assoziation mit dem IL-4-Promoter und der HS Va (Vgl. Abbildung 3.5). Die Analyse der STAT6-Bindungskinetik, dargestellt in der Abbildung 3.10, ergab, dass STAT6 über den gesamten Stimulationszeitraum an beide Regionen des IL-4-Lokus gebunden war.

An der HS Va ließ sich dabei im Stimulationszeitraum von einer Stunde bis drei Stunden eine geringfügige Verminderung der relativen Anreicherung nachweisen.

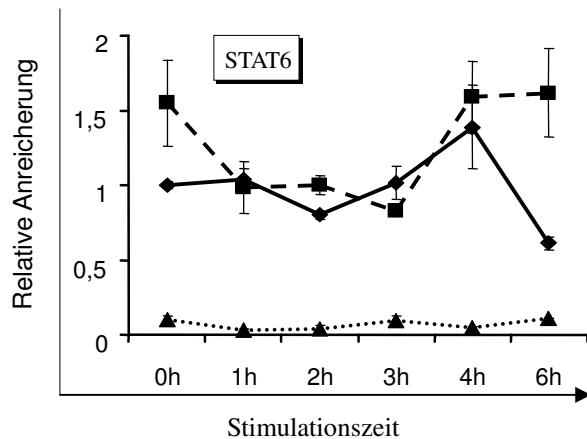


Abb. 3.10: Die Bindungskinetik des Transkriptionsfaktors STAT6 an den IL-4-Lokus.

In Analogie zur Abbildung 3.7 ist die relative Anreicherung des IL-4-Promoters (—◆—), der HS Va (---■---) und vergleichend dazu des IFN γ -Promoters (.....▲.....) nach Chromatin-Immunopräzipitation von STAT6 über den Stimulationszeitraum von sechs Stunden dargestellt. Die relative Anreicherung ist angegeben als das Verhältnis der präzipitierten DNA-Menge normalisiert zum Input einer jeden Probe und zur Anreicherung des IL-4-Promoters der unstimulierten Probe.

Die Analyse des Bindungsverhaltens von GATA3 an der CIRE-Region zeigte eine im Gegensatz zu den übrigen untersuchten Transkriptionsfaktoren progrediente Zunahme der GATA-3-Bindungsaktivität über den gesamten Stimulationszeitraum (Abb. 3.11). Nach sechsstündiger Restimulation wurde die CIRE-Region im Vergleich zur unstimulierten Probe circa sechsmal mehr angereichert. Um einen längeren Stimulationszeitraum erfassen zu können, wurden die Zellen mit immobilisiertem anti-CD3-Antikörper und anti-CD28-Antikörper für insgesamt 48 Stunden restimuliert. Nach 48stündiger Stimulation ließ sich eine circa zehnfache Anreicherung gegenüber der unstimulierten Probe nachweisen. GATA-3 ist somit im Vergleich zu den übrigen untersuchten Transkriptionsfaktoren über einen längeren Stimulationszeitraum mit dem IL-4-Lokus assoziiert.

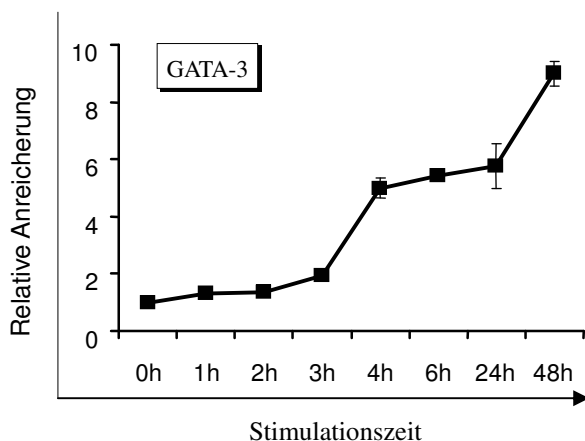


Abb. 3.11: Die Bindungskinetik des Transkriptionsfaktors GATA-3 an der CIRE-Region.

Ruhende, unstimulierte Th2-Zellen wurden mit immobilisierten anti-CD3-Antikörpern und anti-CD28-Antikörpern für insgesamt 48 Stunden restimuliert und die Bindung von GATA-3 an die CIRE-Region mittels Chromatin-Immunopräzipitation zu den angegebenen Zeitintervallen analysiert. Die relative Anreicherung wurde zur unstimulierten Probe sowie zum Input einer jeden Probe normalisiert.

3.4 Die Rekrutierung des Transkriptionsfaktorkomplexes an den IL-4-Lokus ist von der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT abhängig

Verschiedene Arbeiten konnten zeigen, dass der Transkriptionsfaktor NFAT unerlässlich für die restimulationsabhängige Vermittlung der IL-4-Expression ist (siehe Kapitel 1.5.1.3). Eine Inhibition der aktivierungsinduzierten Dephosphorylierung von NFAT durch den Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin A führt diesbezüglich zu einer kompletten Blockierung der IL-4-Expression.

Daraus ergab sich die Frage, ob NFAT als zentraler Vermittler der restimulationsabhängigen IL-4-Expression die Rekrutierung des gesamten Transkriptionsfaktorkomplexes an den IL-4-Lokus initiiert oder ob NFAT eher unabhängig von anderen Transkriptionsfaktoren eine für die Transkription des IL-4-Gens unerlässliche, direkte Transaktivierungsaktivität am IL-4-Promoter vermittelt.

Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden zwei Wochen alte Th2-Zellen in Gegenwart von 25 nMol des spezifischen NFAT-Inhibitors BTP1 (3,5-Bistrifluoromethylpyrazole-1) restimuliert und die Assoziation der einzelnen Transkriptionsfaktoren an den IL-4-Promoter mittels der magnetischen Chromatin-Immunoprecipitation untersucht. BTP1 ist ein Pyrazolderivat, das im Gegensatz zu den vergleichsweise unspezifischen Calcineurin-Inhibitoren CyclosporinA oder FK506 selektiv die aktivierungsinduzierte Translokation von NFAT in den Zellkern verhindert, ohne dabei die Aktivierung anderer Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B oder AP-1 zu beeinflussen¹⁸¹.

Die Abbildung 3.12 zeigt die intrazelluläre IL-4-Färbung in BTP1-behandelten und unbehandelten, restimulierten Th2-Zellen. Während in unbehandelten, restimulierten Th2-Zellen circa 34 % der Zellen Interleukin-4-positiv waren, ließ sich in Zellen, die in Anwesenheit von BTP1 restimuliert wurden, keine IL-4-Expression nachweisen.

Die Analyse der Promoterbesetzung unter den jeweiligen Stimulationsbedingungen ist in der Abbildung 3.13 dargestellt. Korrelierend zu der fehlenden IL-4-Expression in BTP1-behandelten Zellen zeigte sich keine Assoziation der RNA-Polymerase-II mit dem IL-4-Promoter. Wie erwartet, konnte auch für NFAT1 eine BTP1-abhängige Inhibition der NFAT-Bindung nachgewiesen werden. Die relative Anreicherung des IL-4-Promoters in BTP1-behandelten, restimulierten Th2-Zellen entsprach dabei etwa dem Niveau der unstimulierten Probe.

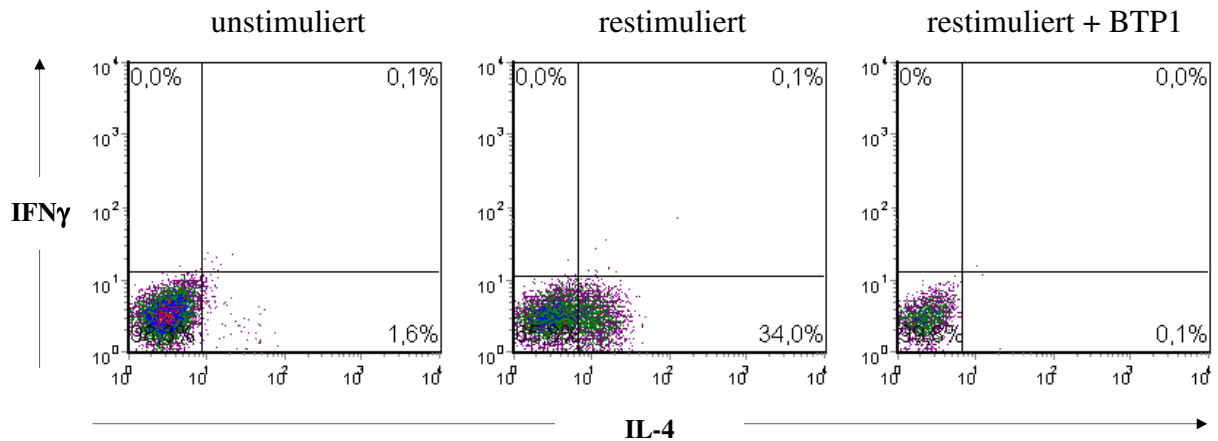


Abb. 3.12: Die Blockierung der aktivierungsinduzierten IL-4-Expression mit dem NFAT-Inhibitor BTP1. Zwei Wochen alte Th2-Lymphozyten wurden zur Induktion der IL-4-Expression für drei Stunden mit PMA/Ionomycin behandelt. Die Blockierung der NFAT-Aktivierung erfolgte durch Zugabe von 25 nMol BTP1 während der gesamten Stimulationsphase. Zur Analyse der IL-4-Expression wurden die Zellen nach Formaldehydfixierung und Permeabilisierung in Saponinpuffer mittels intrazellulärer Färbung mit einem PE-konjugierten anti-IL-4-Antikörper sowie als Kontrolle mit einem FITC-konjugierten anti-IFN γ -Antikörper gefärbt und im FACS analysiert.

Aus der Abbildung 3.13 geht ebenso hervor, dass die DNA-Bindungsaktivität der Transkriptionsfaktoren c-MAF und NF- κ B/p65 vollständig durch den NFAT-Inhibitor BTP1 blockiert werden konnte. Die circa sechsfach (p65) bzw. etwa neunfach (c-MAF) erhöhten relativen Anreicherungen am IL-4-Promoter fielen bei Stimulation unter BTP1 auf das Ausgangsniveau der unstimulierten Probe ab.

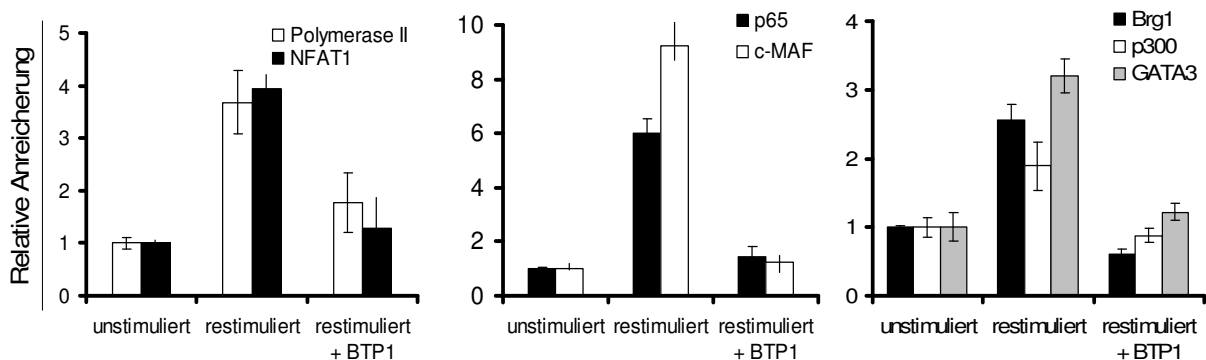


Abb. 3.13: Die Bindung des Transkriptionsfaktorkomplexes an den IL-4-Lokus ist von der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT abhängig. Zwei Wochen alte Th2-Zellen wurden unbehandelt, bzw. in Anwesenheit von 25 nMol BTP1, mit PMA/Ionomycin restimuliert und mit DSP/Formaldehyd fixiert. Nach Chromatin-Immunopräzipitation der jeweiligen Proteine wurde die relative Anreicherung der Regionen IL-4-Promoter (Polymerase II, NFAT, p65, c-MAF, p300), CIRE-Region (GATA-3) und HS Va (Brg1) mittels quantitativer LightCycler-PCR analysiert.

Zur Klärung der Frage, ob die restimulationsabhängige Bindung des Chromatin-Remodeling-Komplexes SWI/SNF an den IL-4-Lokus ebenfalls von der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT abhängt, wurde die Bindung von Brg1 an der HS Va in BTP1-behandelten, restimulierten Th2-Zellen untersucht (Abb. 3.13). Auch hier zeigte sich eine vollständige, BTP1-vermittelte Blockierung der Brg1-Bindung. Die relative Anreicherung der HS Va in den mit BTP1-behandelten, restimulierten Th2-Zellen entsprach dabei dem Niveau der unstimulierten Probe. Die aktivierungsinduzierte Bindung von Brg1 und die vermutlich damit verbundene chromosomale Öffnung des Va-Enhancers durch den SWI/SNF-Komplex ist somit direkt von der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT abhängig.

Verschiedene Arbeiten konnten zeigen, dass NFAT Interaktionen mit p300/CBP eingehen kann (siehe Kapitel 1.5.1.3). Die Chromatin-Immunopräzipitation von p300 in BTP1-behandelten und unbehandelten, restimulierten Th2-Zellen zeigte, dass die Bindung von p300 an den IL-4-Promoter durch BTP1 vollständig inhibiert werden kann (Abb. 3.13). Die relative Anreicherung der stimulierten Probe war unter BTP1-Behandlung mit der unstimulierten Probe vergleichbar. Der transkriptionelle Koaktivator p300 wird somit ebenfalls NFAT-abhängig an den IL-4-Promoter rekrutiert.

Wie bereits in Abbildung 3.5 gezeigt werden konnte, bindet GATA-3 restimulationsabhängig an die CIRE-Region im ersten Intron des IL-4-Gens. Eine Stimulation der Zellen in Anwesenheit von BTP1 führte auch hier zum nahezu vollständigen Verlust der DNA-Bindungsaktivität von GATA-3. Die relative Anreicherung der BTP1-behandelten, restimulierten Probe entsprach dabei dem Niveau der unstimulierten Probe (Abb. 3.13).

Die Analyse der Transkriptionsfaktorbindung in mit BTP1-behandelten, aktivierten Th2-Zellen zeigte somit, dass der Transkriptionsfaktor NFAT als zentraler Initiator der aktivierungsinduzierten IL-4-Expression die Assemblierung des Transkriptionsfaktorkomplexes an den IL-4-Lokus vermittelt. Eine Blockierung der restimulationsabhängigen Translokation von NFAT in den Zellkern durch den Inhibitor BTP1 führt dabei zu einer vollständigen Blockade der c-MAF-, NF- κ B/p65-, Brg1-, p300- und GATA-3-Bindung an den IL-4-Lokus.

3.5 Die Transkriptionsfaktorbindung am IL-4-Lokus in IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen

Guo et al. und Andere konnten zeigen, dass nach Restimulation differenzierter Th2-Zellen nur ein Teil der Zellen Interleukin-4 exprimiert^{166,169,170}. Trennt man diese Zellen mittels der Zytokin-Matrix-Technologie in die Subpopulationen der IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Zellen auf und führt beide Zellpopulationen in getrennten Kulturen weiter, dann besitzen beide Zellgruppen bei folgenden Restimulationen das gleiche Potential, IL-4 zu exprimieren. Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass diesem Phänomen der IL-4-Expressionsheterogenität ein stochastischer Prozess zu Grunde liegt¹⁷¹.

Eine Analyse der Chromatinbesetzung der verschiedenen Transkriptionsfaktoren in den einzelnen, nach der IL-4-Expression getrennten Zellpopulationen sollte dabei klären, welche Faktoren differentiell an den IL-4-Lokus binden und damit für die IL-4-Expressionsheterogenität verantwortlich sein könnten. Dafür wurde ein experimentelles Setting entwickelt, das die Durchführung der magnetischen Chromatin-Immunopräzipitation und Analyse der Transkriptionsfaktorbesetzung in sortierten IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen erlaubt. Das experimentelle Vorgehen ist schematisch in der Abbildung 3.14 dargestellt.

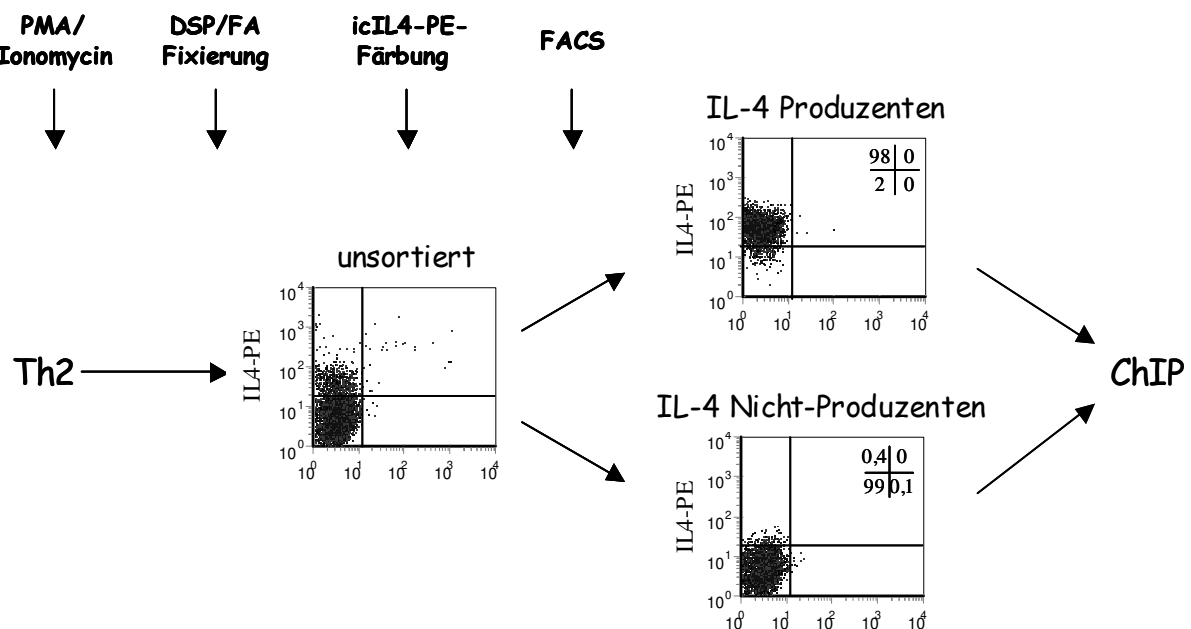


Abb. 3.14: Schematische Übersicht zur Transkriptionsfaktorbindungsanalyse in IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen. Zwei Wochen alte Th2-Zellen wurden für drei Stunden mit PMA/Ionomycin restimuliert, mit DSP/Formaldehyd doppelfixiert und nach intrazellulärer Markierung mit einem Phycoerythrin-konjugierten Anti-IL-4-Antikörper mittels FACS in IL-4-Produzenten (IL-4-PE positiv) und IL-4-Nichtproduzenten (IL-4-PE negativ) getrennt. Die Zellen wurden nach der Sortierung in Lysispuffer aufgenommen und für die magnetische Chromatin-Immunopräzipitation weiterverarbeitet. Die Piktogramme zeigen beispielhaft die prozentuale Verteilung IL-4-PE-positiver und -negativer Zellen vor und nach Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung.

Naive Th2-Zellen wurden dafür für zwei Wochen in Richtung Th2-Differenzierung in Anwesenheit von rekombinantem IL-4, anti-IL12- und anti-IFN γ -Antikörpern kultiviert, für drei Stunden mit PMA/Ionomycin restimuliert und entsprechend dem Fixationsprotokoll für die magnetische Chromatin-Immunopräzipitation mit DSP und Formaldehyd fixiert. Die fixierten Zellen wurden anschließend in Saponinpuffer permeabilisiert und mit einem PE-konjugierten anti-IL-4-Antikörper intrazellulär markiert. Die Subpopulationen der IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Zellen wurden im Anschluss durch Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung getrennt, in Lysepuffer aufgenommen und weiter nach dem Protokoll der Chromatin-Immunopräzipitation verarbeitet.

Zur vorausgehenden Analyse des IL-4-mRNA-Expressionslevels in IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen wurde zur Trennung beider Zellpopulationen der IL-4-Sekretions-Assay verwendet. Dabei wurden die Zellen nach Restimulation mit einer Matrix, einem Fusionsantikörper aus anti-CD45 und anti-IL-4, markiert. In der folgenden Sekretionsphase erfolgte die autokrine Bindung des sezernierten IL-4 an die Matrix und nachfolgende Detektion der Zellen mit einem zweiten, PE-konjugierten Anti-IL-4-Antikörper. Zur Isolierung lebender IL-4-Produzenten (IL-4-PE positiv) und IL-4-Nichtproduzenten (IL-4-PE negativ) kam entweder die direkte Sortierung im FACS oder die magnetische Separation (MACS) nach Markierung der Zellen mit einem über magnetische Beads gekoppelten Anti-PE-Antikörper zum Einsatz. Die Zellen wurden nach Sortierung direkt zur mRNA-Expressionsanalyse weiterverarbeitet.

Die Abbildung 3.15 zeigt zunächst die relative Expression der IL-4-mRNA sowie die Bindung der RNA-Polymerase-II an den IL-4-Promoter in unstimulierten, sowie restimulierten IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen.

Bezüglich der IL-4-mRNA-Expression zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen IL-4-Produzenten und IL-4-Nichtproduzenten. IL-4-produzierende Zellen wiesen eine um den Faktor 184 höhere IL-4-mRNA-Expressionsrate auf als IL-4-Nichtproduzenten. Vergleichend zur unstimulierten Probe konnte keine vermehrte IL-4-mRNA-Expression in den IL-4-Nichtproduzenten nachgewiesen werden. Dies bestätigte frühere Studien von Guo et al. und unterstreicht, dass das Phänomen der IL-4-Expressionsheterogenität in restimulierten Th2-Zellen auf transkriptionaler Ebene reguliert wird.

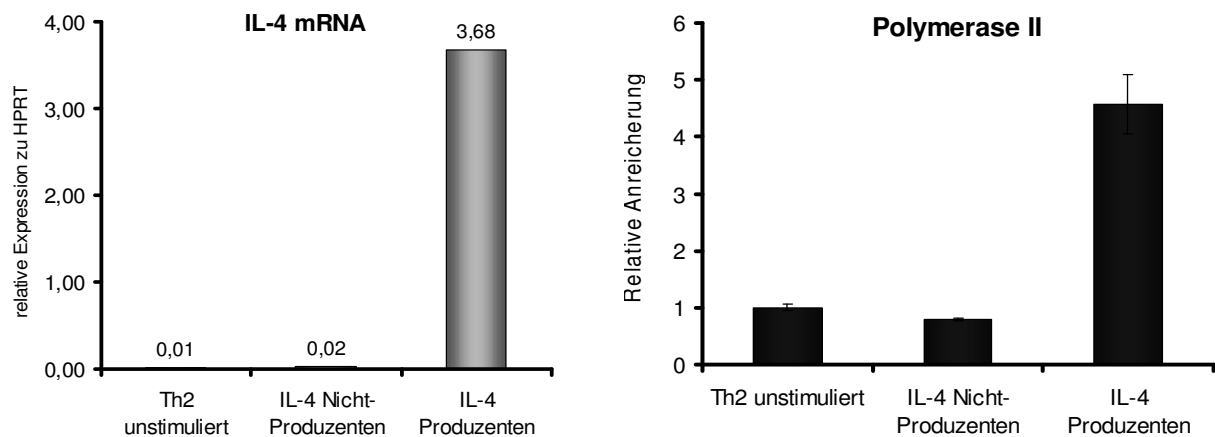


Abb. 3.15: Die IL-4-mRNA-Expression sowie die Bindung der RNA-Polymerase-II an den IL-4-Promoter in sortierten, IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen. Für die Analyse der IL-4-mRNA-Expression wurden zwei Wochen alte Th2-Zellen für drei Stunden mit PMA/Ionomycin restimuliert und die IL-4-Produzenten und IL-4-Nicht-Produzenten mit dem IL-4-Sekretionsassay getrennt. Für die Analyse der DNA-Assoziation der RNA-Polymerase-II wurde nach dem Schema der Abb. 3.14 vorgegangen. Die relative Anreicherung stellt das Verhältnis der präzipitierten DNA-Menge bezogen auf die Anreicherung des IL-4-Promoters der unstimulierten Probe sowie normalisiert zum Input einer jeden Probe dar. Die Graphen zeigen ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen, die Standardabweichung ergibt sich aus den Replikaten der quantitativen PCR.

Vergleichend dazu spiegelte die Assoziation der RNA-Polymerase-II am IL-4-Promoter die differenzielle IL-4-Transkription in den sortierten Populationen wieder (Abb. 3.15). Eine Bindung der Polymerase-II konnte nur in den IL-4-Produzenten nachgewiesen werden, wobei vergleichend zu den IL-4-Nichtproduzenten eine über fünffach erhöhte relative Anreicherung des IL-4-Promoters detektiert werden konnte. Die relative Anreicherung in den IL-4-Nicht-Produzenten entsprach dem Niveau der unstimulierten Probe.

3.5.1 Die epigenetische Chromatinkonfiguration des IL-4-Promoters in IL-4-produzierenden und IL-4-Nichtproduzierenden Th2-Zellen

Die differentielle Bindung der RNA-Polymerase-II am IL-4-Promoter in IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen warf die Frage auf, ob die für differenzierte Th2-Zellen charakteristische, erhöhte Chromatinzugänglichkeit im Bereich des IL-4-Promoters auch in den IL-4-Nichtproduzenten nachgewiesen werden kann, bzw. ob eine eventuell nur in den IL-4-Nichtproduzenten vorliegende restriktive Chromatinkonfiguration am IL-4-Promoter für die fehlende Assoziation der RNA-Polymerase-II verantwortlich ist.

Um dieser Frage nachzugehen, wurde die Histon-H3-Azetylierung und -H3-Methylierung im Promoterbereich des IL-4-Gens in IL-4-produzierenden und –nichtproduzierenden Th2-Zellen mittels der magnetischen Chromatin-Immunopräzipitation untersucht.

Wie aus der Abbildung 3.16 hervorgeht, ließ sich in unstimulierten Th2-Zellen im Vergleich zu naiven T-Zellen eine erhöhte Histon-H3-Azetylierung, jedoch keine erhöhte Histon-H3-Methylierung nachweisen. Nach Aktivierung differenzierter Th2-Zellen konnte im Vergleich zu den unstimulierten Th2-Zellen eine zusätzlich erhöhte H3-Azetylierung als auch erhöhte H3-Methylierung detektiert werden. IL-4-Produzenten wiesen dabei eine geringfügig höhere H3-Azetylierung am IL-4-Promoter auf als IL-4-Nichtproduzenten (circa 1,5facher Unterschied der relativen Anreicherung). Die H3-Methylierung unterschied sich in den sortierten Zellpopulationen hingegen kaum.

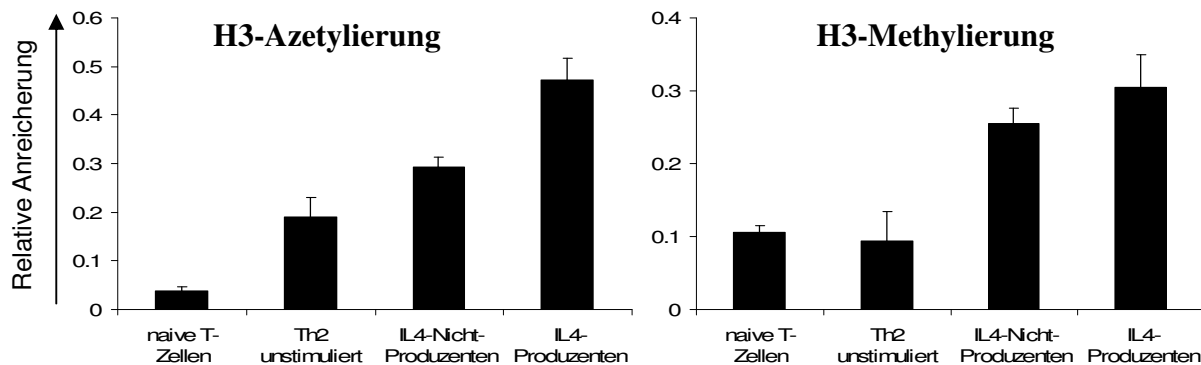


Abb. 3.16 Die epigenetische Chromatinkonfiguration des IL-4-Promoters in IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen. Naive CD4/CD62L-positive T-Zellen, unstimulierte sowie IL-4-produzierende und IL-4-nichtproduzierende Th2-Zellen wurden mit FA fixiert und Chromatin-Immunopräzipitationen mit Antikörpern, die spezifisch gegen acetyliertes und methyliertes (Lys4) Histon H3 gerichtet sind, durchgeführt. Die Analyse der relativen Anreicherung erfolgte durch quantitative LightCycler-PCR.

Somit konnte gezeigt werden, dass auch IL-4-Nichtproduzenten im Vergleich zu naiven T-Zellen durch eine erhöhte epigenetische Chromatinzugänglichkeit des IL-4-Promoters gekennzeichnet sind. Bezüglich der aktivierungsinduzierten, erhöhten Histon-H3-Azetylierung zeigten IL-4-Nichtproduzenten im Vergleich zu den IL-4-Produzenten jedoch eine leicht verminderte H3-Azetylierung.

3.5.2 Die Bindung von NFAT1 und NFAT2 an den IL-4-Lokus in IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen

Wie in Abbildung 3.13 gezeigt wurde, ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT für die Rekrutierung der RNA-Polymerase-II an den IL-4-Promoter und damit für die Initiation der IL-4-Transkription unablässig. Daraus ergab sich die Frage, ob die Transkriptionsfaktoren der NFAT-Familie, NFAT1 und NFAT2, in IL-4-Produzenten und IL-4-Nichtproduzenten differentiell mit dem IL-4-Lokus assoziiert sind.

Die folgende Analyse der Bindung von NFAT1 und NFAT2 an den IL-4-Promoter und an der HS Va in IL-4-produzierenden und –nichtproduzierenden Th2-Zellen ist in der Abbildung 3.17 dargestellt.

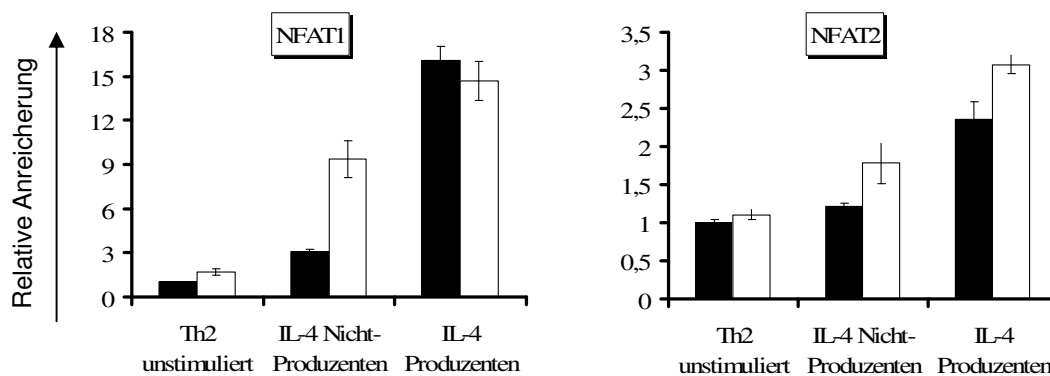


Abb. 3.17: Die Bindung von NFAT1 und NFAT2 an den IL-4-Lokus in IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen. Die Chromatin-Immunopräzipitationen der Faktoren NFAT1 und NFAT2 wurden analog dem Schema der Abbildung 3.14 durchgeführt und die relativen Anreicherungen der Regionen IL-4-Promoter (■) und der HS Va (□) mittels quantitativer PCR bestimmt.

Dabei zeigte sich, dass NFAT1 und NFAT2 am IL-4-Promoter differentiell nur in den IL-4-produzierenden Th2-Zellen gebunden war. In den IL-4-Nichtproduzenten reicherte sich der IL-4-Promoter lediglich dreifach mehr an als in der unstimulierten Probe. Die IL-4-Produzenten zeigten hingegen eine über 15fache Mehranreicherung im Vergleich zur unstimulierten Probe. Somit lag die relative Anreicherung des IL-4-Promoters in den IL-4-produzierenden Th2-Zellen circa fünffach höher als in den IL-4-Nichtproduzenten. An der HS Va hingegen zeigte sich auch in den IL-4-Nichtproduzenten eine deutliche Mehranreicherung gegenüber der unstimulierten Probe, wobei die relative Anreicherung etwa zwei Drittel der Anreicherung der IL-4-Produzenten erreichte.

Vergleichend dazu zeigte auch NFAT2 eine differentielle Bindung am IL-4-Lokus in IL-4-produzierenden im Gegensatz zu IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen. Die relative Anreicherung des IL-4-Promoters bzw. der HS Va in den IL-4-Produzenten lag dabei circa doppelt so

hoch wie in den IL-4-Nichtproduzenten. Bei der HS Va zeigte sich im Gegensatz zum IL-4-Promoter wiederum eine geringfügige Mehranreicherung in den IL-4-Nichtproduzenten gegenüber der unstimulierten Probe.

Die Transkriptionsfaktoren NFAT1 und NFAT2 sind demnach nur in den IL-4-Produzenten, nicht aber in den IL-4-Nichtproduzenten mit dem IL-4-Promoter assoziiert. An der HS Va ließ sich hingegen eine zumindest verringerte DNA-Bindungsaktivität in den IL-4-Nichtproduzenten nachweisen.

3.5.3 Die Expression, zelluläre Lokalisation und Aktivierung von NFAT1 und NFAT2 in IL-4-produzierenden und IL-4-Nichtproduzierenden Th2-Zellen

Um der Frage nachzugehen, ob die fehlende bzw. verringerte DNA-Bindungsaktivität von NFAT am IL-4-Promoter bzw. an der HS Va auf ein vermindertes NFAT-Expressionslevel in den IL-4-Nichtproduzenten zurückzuführen ist, wurde die Proteinexpression von NFAT1 und NFAT2 in beiden Zellpopulationen analysiert.

Dafür wurden zwei Wochen alte Th2-Zellen für drei Stunden mit PMA/Ionomycin restimuliert und IL-4-produzierende und –nichtproduzierende Zellen mittels des IL-4-Sekretionsassays getrennt. Von den Zellpopulationen wurden anschließend Gesamtzellextrakte gewonnen und die Expression der Transkriptionsfaktoren NFAT1 und NFAT2 im Western Blot verglichen (Abb. 3.17).

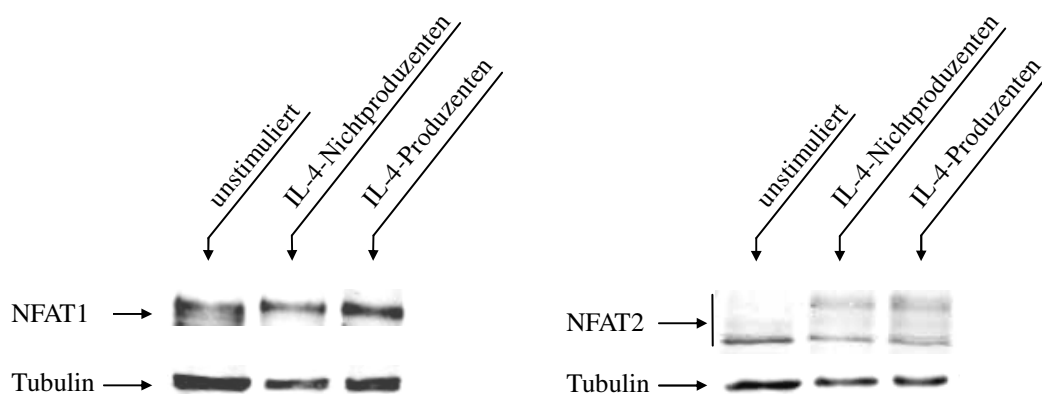


Abb. 3.17: Die Proteinexpression von NFAT1 und NFAT2 in IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen. Zwei Wochen alte Th2-Zellen wurden für drei Stunden mit PMA/Ionomycin restimuliert und mittels des IL-4-Sekretionsassays in IL-4-produzierende und IL-4-nichtproduzierende Zellen getrennt. Nach Herstellung von Gesamtzellextrakten wurde die Expression von NFAT1 und NFAT2 sowie als Ladungskontrolle α Tubulin durch Färbung mit spezifischen Antikörpern im Western Blot-Verfahren analysiert.

Dabei zeigte sich, dass sowohl NFAT1 als auch NFAT2 zu gleichen Anteilen in IL-4-Produzenten und IL-4-Nichtproduzenten exprimiert waren. Während NFAT1 dabei konstitutiv sowohl in unstimulierten als auch in restimulierten Th2-Zellen detektiert wurde, konnten von NFAT2 verschiedene Isoformen nachgewiesen werden, die jeweils konstitutiv bzw. stimulationsabhängig exprimiert wurden (Abb. 3.17).

Ein unterschiedliches Expressionslevel der NFAT-Faktoren in den sortierten Zellpopulationen konnte demnach nicht zur Erklärung der unterschiedlichen NFAT-Bindung in IL-4-Produzenten und IL-4-Nichtproduzenten herangezogen werden.

Um einen eventuellen Unterschied in der restimulationsabhängigen Aktivierung und nukleären Translokation von NFAT in den sortierten Zellpopulationen zu untersuchen, wurde eine fluoreszenzmikroskopische Analyse der zellulären NFAT-Lokalisation durchgeführt. Dafür wurden sortierte IL-4-Produzenten und IL-4-Nichtproduzenten mit Methanol fixiert und mit spezifischen Antikörpern gegen NFAT1 und NFAT2 markiert. Nach Inkubation mit FITC-konjugierten Anti-IgG-F(ab)₂-Fragmenten wurde die Lokalisation der beiden NFAT-Proteine, NFAT1 und NFAT2, im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die begleitende DAPI-Kernfärbung erlaubte dabei eine Diskrimination zwischen dem DAPI-negativen Zytoplasmabereich und dem DAPI-gefärbten Zellkernbereich. Nach Abgleich der Farbintensitäten durch eine zuvor durchgeführte Isotypkontrolle wurden die jeweiligen Färbungen mit dem Programm MetaVue™ analysiert.

Die Abbildung 3.18 zeigt eine repräsentative Auswahl NFAT1- bzw. NFAT2- /DAPI-gefärbter unstimulierter sowie IL-4-produzierender und IL-4-nichtproduzierender Th2-Zellen. Die NFAT-Proteine sind dabei rot, der Kernbereich durch DAPI-Färbung blau dargestellt.

In ruhenden, unstimulierten Th2-Zellen zeigte sich eine Rotfärbung des Zytoplasmasaumes, die den Kernbereich nahezu aussparte. Die Proteine NFAT1 und NFAT2 waren in unstimulierten Th2-Zellen somit vollständig im Zytoplasma lokalisiert. Bei NFAT2 handelte es sich dabei vermutlich um die konstitutiv-exprimierte Isoform, die bereits im Western-Blot nachgewiesen werden konnte (Vgl. Abb. 3.17). Nach dreistündiger Restimulation und Sortierung der IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen wurde eine Veränderung des Färbemusters sichtbar. Die NFAT-Färbungen (rot) überlagerten sich jeweils mit der DAPI-Kernfärbung (blau). Ein spezifischer roter Zytoplasmasaum wie in den unstimulierten Th2-Zellen konnte dabei nicht mehr detektiert werden. Das Färbemuster, die Farbintensität und die Überlagerung der NFAT1- bzw. NFAT2-Färbung mit der DAPI-Kernfärbung waren bei den IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen im Vergleich mit den IL-4-Produzenten nahezu identisch.

Die Transkriptionsfaktoren NFAT1 und NFAT2 waren somit in beiden sortierten Zellpopulationen aktiviert und im Zellkern lokalisiert. Die iso-intense nukleäre NFAT-Färbung in IL-4-Produzenten und IL-4-Nichtproduzenten bestätigte damit die Western-Blot-Analyse und zeigte zudem keine Unterschiede in der absoluten, kernlokalisierten NFAT-Menge.

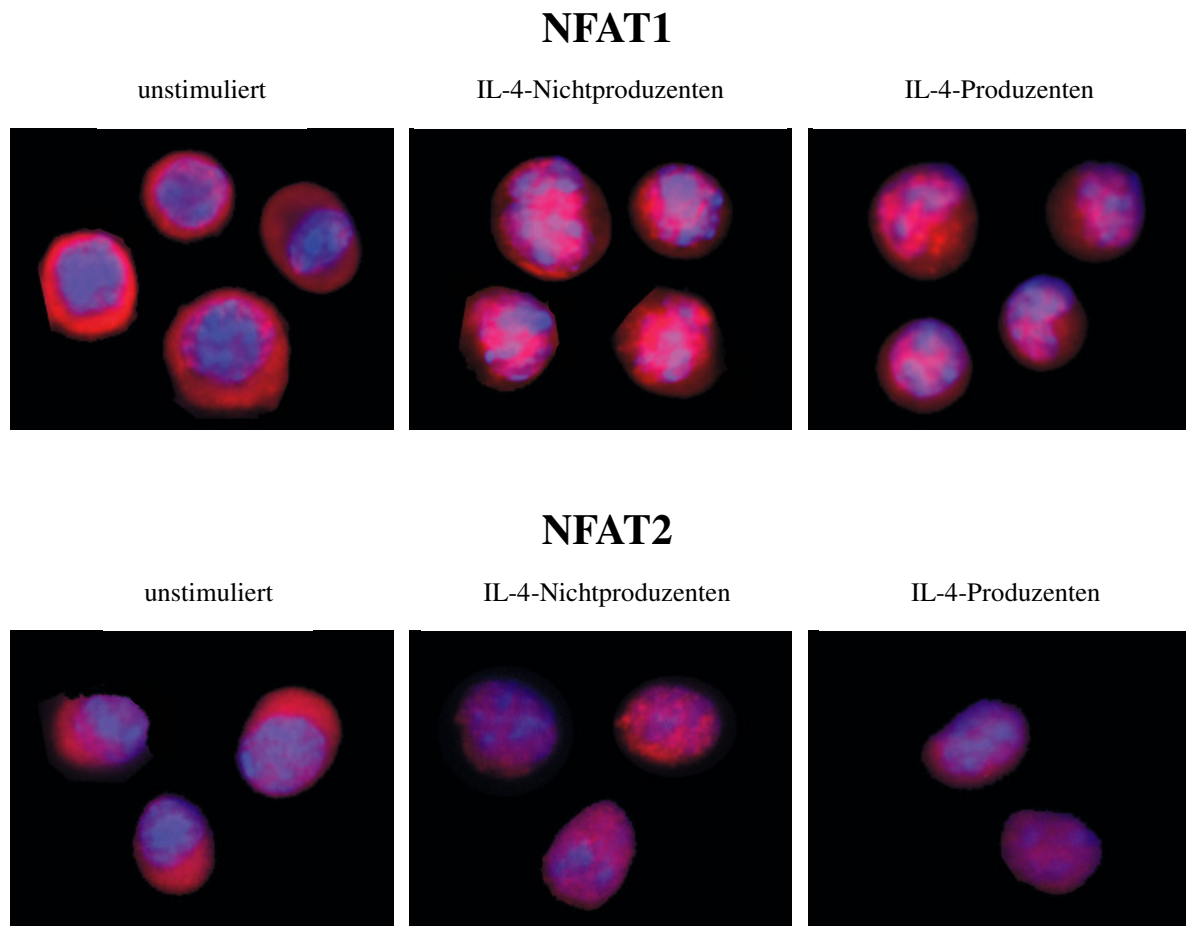


Abb 3.18: Zytoplasma-Kern-Lokalisation von NFAT1 und NFAT2 in unstimulierten sowie IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen (rot: NFAT1 bzw. NFAT2; blau: DAPI-Kernfärbung). Zwei Wochen alte Th2-Zellen wurden für drei Stunden mit PMA/Ionomycin stimuliert, anschließend mit Formaldehyd fixiert und nach intrazellulärer Färbung mit einem anti-IL-4-PE-Antikörper im FACS in IL-4-PE-positive und IL-4-PE-negative Zellen getrennt. Die sortierten Zellpopulationen wurden anschließend mit Methanol permeabilisiert und mit spezifisch gegen die Proteine NFAT1 und NFAT2 gerichteten Antikörpern gefärbt. In einem zweiten Färbeschritt wurden die Zellen mit FITC-konjugierten Anti-IgG-F(ab)₂-Fragmenten markiert. Zur Darstellung des Zellkernes wurden die Zellen zusätzlich mit DAPI angefärbt. Die Analyse der Zytoplasma-Kern-Lokalisation von NFAT1 und NFAT2 erfolgte durch fluoreszenzmikroskopische Analyse, wobei die Färbungen um die jeweiligen Intensitäten der vorausgegangenen Isotypkontrollfärbungen reduziert wurden.

Die Tatsache, dass NFAT1 und NFAT2 in IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen in gleichem Maße exprimiert und in aktiver Form im Zellkern lokalisiert waren, ließ auf eine auf die IL-4-Region begrenzte Inhibierung der NFAT-Bindung in den IL-4-Nichtproduzenten schließen. Um dies zu überprüfen, wurde die Bindung von NFAT an die Promoterregionen der NFAT-abhängigen Gene CD40L, CD25 und IL-2 analysiert.

Die Abbildung 3.19 zeigt vergleichend zum IL-4-Promoter die relativen Anreicherungen der Promoterregionen in unstimulierten sowie IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen.

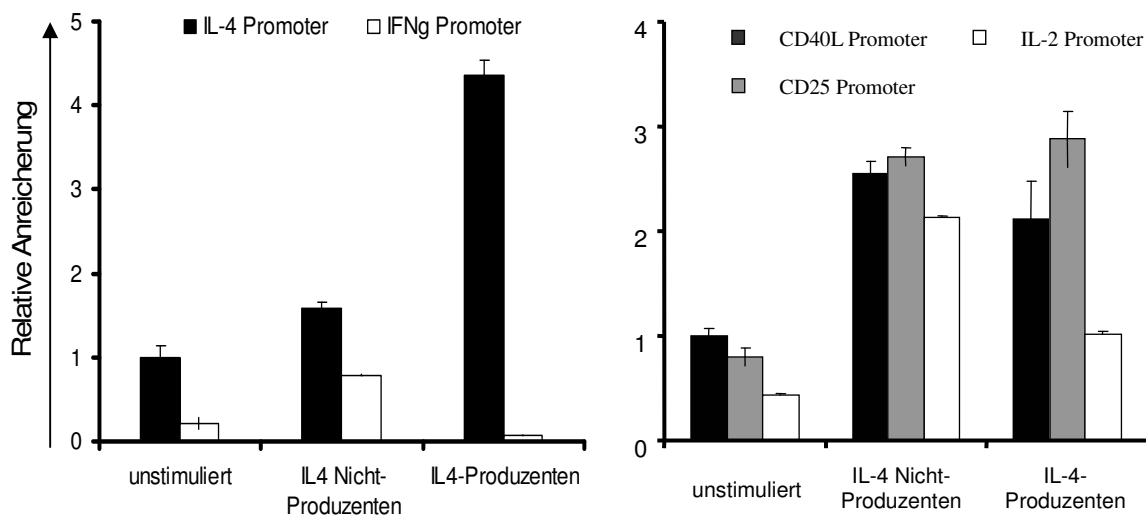


Abb. 3.19: Die Bindung von NFAT1 an den IL-4-Promoter, den IFN γ -Promoter sowie an die Promoterregionen der NFAT-abhängigen Gene CD40L, CD25 und IL-2 in unstimulierten sowie IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen. Zwei Wochen alte Th2-Zellen wurden für drei Stunden mit PMA/Ionomycin restimuliert, anschließend mit DSP/Formaldehyd fixiert und analog dem Schema der Abbildung 3.14 in IL-4-produzierende und IL-4-nichtproduzierende Th2-Zellen getrennt. Nach Chromatin-Immunopräzipitation von NFAT1 wurden die relativen Anreicherungen der jeweiligen Promoterbereiche in der quantitativen PCR analysiert.

Dabei zeigte sich, dass im Gegensatz zum IL-4-Promoter eine NFAT1-Bindung an den Promoterbereichen der Gene CD40L, CD25 und IL-2 auch in den IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen detektiert werden konnte (Abb. 3.19). Die relative Anreicherung des IL-2-Promoters in den IL-4-Nichtproduzenten lag dabei sogar höher als in den IL-4-Produzenten.

Dies belegt, dass NFAT auch in den IL-4-Nichtproduzenten transkriptionell aktiv ist und *in vivo* an regulatorische DNA-Regionen bindet.

Die fehlende NFAT-Bindungsaktivität am IL-4-Promoter und z. T. an der HS Va in den IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen ist somit regional auf den IL-4-Lokus begrenzt.

Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass NFAT bei gleicher Expression und gleichem Aktivierungsstatus eine differentielle Bindungsaktivität am IL-4-Lokus in IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen aufweist. Dabei ist am IL-4-Promoter nahezu keine Bindung von NFAT1 und NFAT2 in den IL-4-Nichtproduzenten detektierbar, während sich bei der HS Va im Vergleich zur unstimulierten Probe eine Mehranreicherung in der Chromatin-Immunoprecipitation nachweisen lässt.

3.5.4 Die Bindung der Transkriptionsfaktoren c-MAF, NF- κ B/p65, SWI/SNF/Brg1 und p300 an den IL-4-Lokus in IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen

Wie in Abbildung 3.13 gezeigt werden konnte, ist die Bindung der Transkriptionsfaktoren c-MAF, NF κ B/p65, p300 und SWI/SNF/Brg1 an den IL-4-Lokus von der Restimulation der Zellen und der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT abhängig. Vor dem Hintergrund der fehlenden NFAT-Bindung am IL-4-Lokus in den IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen stellte sich die Frage, ob die genannten Faktoren ebenfalls differentiell mit dem IL-4-Lokus assoziiert sind. Daher wurde die Bindung des charakterisierten Transkriptionsfaktorkomplexes an den IL-4-Lokus in IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen gemäß dem experimentellen Vorgehen nach Abbildung 3.14 untersucht.

Die Abbildung 3.20 stellt die relativen Anreicherungen des IL-4-Promoters und der HS Va nach Chromatin-Immunoprecipitation von c-MAF, p65, Brg1 und p300 in den jeweiligen sortierten Zellpopulationen dar.

Am IL-4-Promoter zeigte sich vergleichend zu NFAT1 und NFAT2 sowohl für c-MAF als auch für p65 ein differentielles Bindungsverhalten zwischen den IL-4-produzierenden und den IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen. Während bei c-MAF die relative Anreicherung des IL-4-Promoters in den IL-4-Produzenten vergleichend zu den IL-4-Nichtproduzenten vierfach und bei p65 circa dreifach erhöht war, reicherte sich die Promoterregion in den IL-4-Nichtproduzenten jeweilig nur geringfügig mehr an als in der unstimulierten Probe.

Der Chromatin-Remodeling-Komplex SWI/SNF/Brg1 war in gleichem Maße differentiell an die HS Va gebunden. Während sich in den IL-4-Nichtproduzenten eine circa zweifach erhöhte relative Anreicherung im Vergleich zur unstimulierten Probe zeigte, konnte in den IL-4-Produzenten eine etwa vierfache Mehranreicherung zur unstimulierten Probe nachgewiesen werden.

Für den Transkriptionsfaktor p300 konnte ebenfalls eine differentielle DNA-Bindungsaktivität am IL-4-Lokus nachgewiesen werden. Das differentielle Bindungsverhalten von p300 war dabei mit dem von NFAT1 vergleichbar. Der IL-4-Promoter reicherte sich in den IL-4-nichtproduzierenden Zellen nur geringfügig mehr als in der unstimulierten Probe an. Die relative Anreicherung in den IL-4-Produzenten war hingegen verglichen mit den IL-4-Nichtproduzenten um den Faktor drei erhöht. Im Gegensatz dazu konnte an der HS Va in beiden sortierten Populationen eine deutliche Mehranreicherung im Vergleich zur unstimulierten Probe detektiert werden, wobei die relative Anreicherung in den IL-4-Nichtproduzenten geringfügig niedriger lag als in den IL-4-Produzenten.

Somit konnte gezeigt werden, dass in den IL-4-nichtproduzierenden Zellen die NFAT-abhängige Rekrutierung der Transkriptionsfaktoren c-MAF, NF- κ B/p65, SWI/SNF/Brg1 sowie p300 an den IL-4-Promoter bzw. an die HS Va ebenfalls aufgehoben bzw. stark vermindert ist.

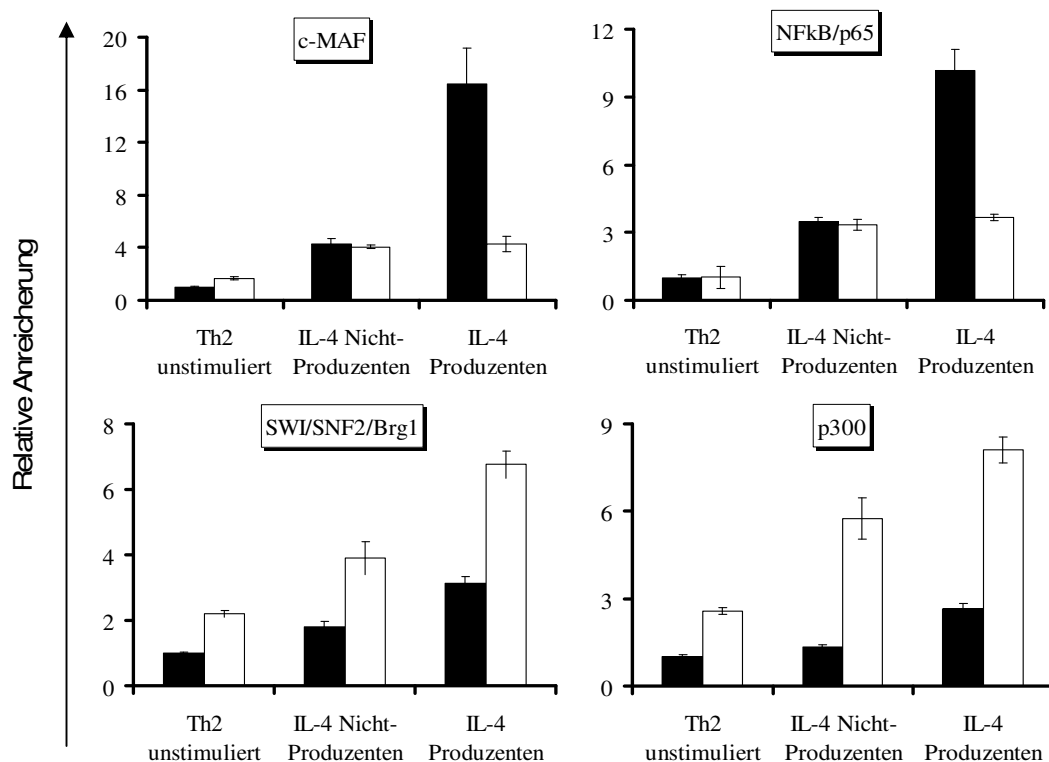


Abb. 3.20: Die Bindung der Transkriptionsfaktoren c-MAF, p65, Brg1 und p300 an den IL-4-Promoter und an die HS Va in unstimulierten sowie IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen. Zwei Wochen alte Th2-Zellen wurden für drei Stunden mit PMA/Ionomycin restimuliert, anschließend mit DSP/Formaldehyd fixiert und nach intrazellulärer IL-4-Färbung in IL-4-produzierende und IL-4-nichtproduzierende Th2-Zellen getrennt. Nach Chromatin-Immunopräzipitation der einzelnen Proteine wurden die relativen Anreicherungen des IL-4-Promoters (■) und der HS Va (□) in der quantitativen PCR analysiert.

3.5.5 Die Bindung der Transkriptionsfaktoren STAT6 und GATA-3 an den IL-4-Lokus in IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen.

Für den Transkriptionsfaktor STAT6, konnte, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, eine T-Zell-Rezeptor-unabhängige Bindung an den IL-4-Promoter und an die HS Va detektiert werden. Die Untersuchung der STAT6-Bindung in IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen zeigte sowohl am IL-4-Promoter als auch an der HS Va eine vergleichbare Bindungsaktivität (Abb. 3.21).

Im Vergleich zur unstimulierten Probe konnte in beiden sortierten Populationen wiederum nur eine geringfügige Mehranreicherung nachgewiesen werden. STAT6 ist somit bereits in unstimulierten Th2-Zellen mit dem IL-4-Lokus assoziiert und bindet in IL-4-produzierenden sowie IL-4-nichtproduzierenden Zellen in gleichem Maße an den IL-4-Promoter bzw. die HS Va.

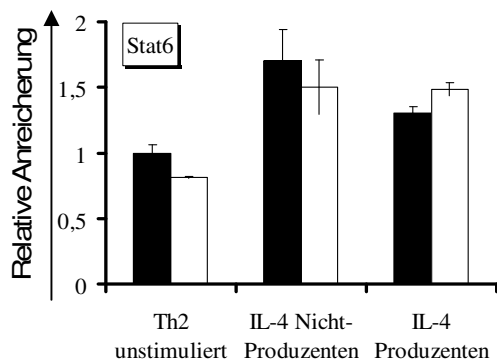


Abb. 3.21: Die Bindung von STAT6 an den IL-4-Promoter und an die HS Va in unstimulierten sowie IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen. Zwei Wochen alte Th2-Zellen wurden für drei Stunden mit PMA/Ionomycin restimuliert und anschließend mit DSP/Formaldehyd fixiert. Nach Chromatin-Immunopräzipitation von STAT6 wurden die relativen Anreicherungen des IL-4-Promoters (■) und der HS Va (□) in der quantitativen PCR analysiert.

Für den Th2-spezifischen Transkriptionsfaktor GATA-3 konnten verschiedene Studien zeigen, dass GATA-3 nur in den IL-4-produzierenden Th2-Zellen an regulatorische Regionen des IL-4-Lokus bindet. Um dies zu überprüfen, wurde die Bindung von GATA-3 an die CIRE-Region und an die HS Va in sortierten IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen analysiert. Vor dem Hintergrund des protrahierten Bindungsverhaltens von GATA-3 an den IL-4-Lokus (Vgl. Abb. 3.11) erfolgte die Analyse der DNA-Bindungsaktivität von GATA-3 nach dreistündiger sowie nach 24stündiger Stimulationsdauer. Dafür wurden stimulierte Th2-Zellen mittels der Zytokin-Matrix-Technologie in IL-4-Produzenten und IL-4-Nichtproduzenten getrennt und für weitere 24 Stunden mit Anti-CD3- und Anti-CD28-Antikörpern restimuliert.

Die Abbildung 3.22 zeigt zunächst im Western Blot die nukleäre GATA-3-Proteinmenge in unstimulierten, IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen sowie in unstimulierten Th1-Zellen. Als Ladungskontrolle wurde zusätzlich das Kernprotein Lamin B nachgewiesen.

Erwartungsgemäß ließ sich in den Th1-Zellen keine GATA-3-Expression nachweisen. Unstimulierte Th2-Zellen sowie IL-4-produzierende und IL-4-nichtproduzierende Zellen zeigten hingegen eine isointense GATA-3-Bande bei vergleichbarer Expression von Lamin B. Der Transkriptionsfaktor GATA-3 ist somit in gleichen Mengen im Kern der IL-4-Produzenten und IL-4-Nichtproduzenten vorhanden.

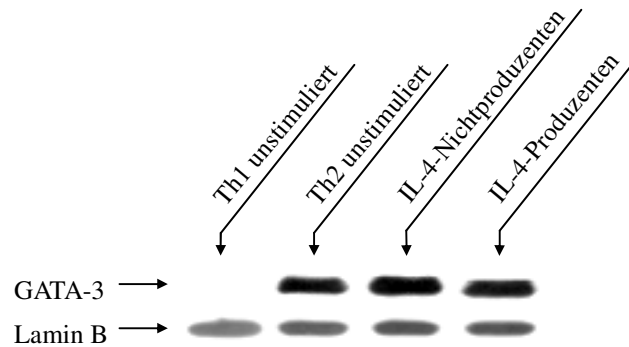


Abb. 3.22: Die GATA-3-Expression in unstimulierten Th1-, Th2- sowie in IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen. Zwei Wochen alte Th2-Zellen wurden für drei Stunden mit PMA/Ionomycin restimuliert und mit der Zytokin-Matrix-Technologie in IL-4-produzierende und IL-4-nichtproduzierende Th2-Zellen getrennt. Nach Extraktion der nukleären Proteinfractionen wurde die GATA-3-Proteinexpression im Western-Blot mit einem GATA-3-spezifischen Antikörper vergleichend zu unstimulierten Th1- und Th2-Zellen bestimmt. Zur Kontrolle der isogenen Proteinbeladung wurde zusätzlich das nukleäre Kernprotein Lamin B gefärbt.

Die Analyse der DNA-Bindungsaktivität von GATA-3 an der CIRE- und HS-Va-Region zu den jeweiligen Stimulationszeiten ist in der Abbildung 3.23 dargestellt. Daraus geht hervor, dass GATA-3 sowohl nach dreistündiger als auch nach 24stündiger Stimulationsdauer in IL-4-Produzenten und in IL-4-Nichtproduzenten mit dem IL-4-Lokus assoziiert war. Die CIRE-Region reicherte sich nach dreistündiger Stimulation in beiden sortierten Populationen circa fünffach mehr an als in der unstimulierten Probe.

Bezüglich der Bindung von GATA-3 an die HS Va ließ sich nach dreistündiger Restimulation ebenfalls eine vermehrte relative Anreicherung in IL-4-Produzenten und IL-4-Nichtproduzenten nachweisen. In IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen lag die relative Anreicherung sogar geringfügig niedriger als in den IL-4-Nichtproduzenten. Nach 24stündiger Restimulation zeigte sich ein ähnliches Resultat. Sowohl die CIRE-Region als auch die HS Va wurden in beiden Zellpopulationen vermehrt angereichert. Auch hier lag die relative Anreicherung beider Regionen in den IL-4-Produzenten geringfügig niedriger als in den IL-4-Nichtproduzenten.

Die Analyse der GATA-3-Bindung an der CIRE-Region und an der HS Va nach dreistündiger als auch nach 24stündiger Restimulation zeigte somit eindeutig, dass GATA-3 nicht wie beschrieben differentiell nur in den IL-4-produzierenden Th2-Zellen an den IL-4-Lokus bindet, sondern unabhängig von der stimulationsabhängigen IL-4-Expression mit dem IL-4-Lokus assoziiert ist.

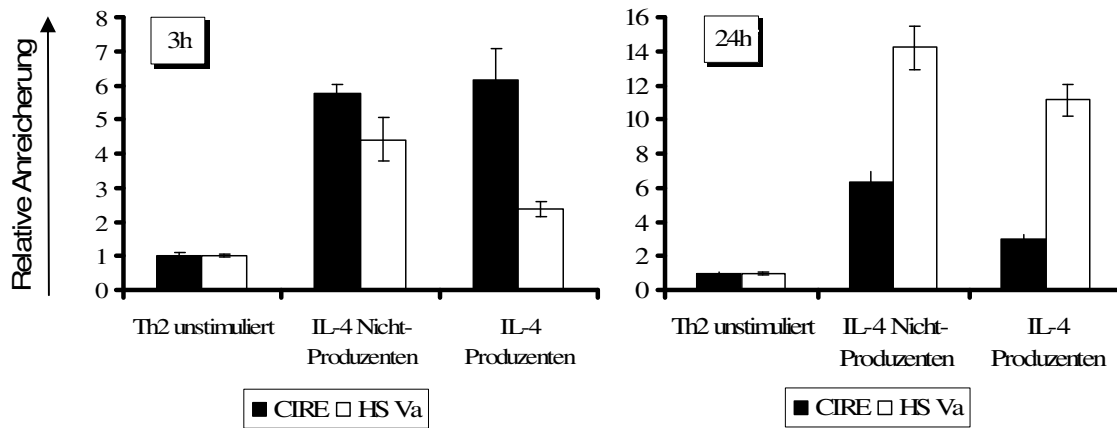


Abb. 3.23: Die Bindung von GATA-3 an die CIRE-Region und an die HS Va in unstimulierten sowie IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen. Zwei Wochen alte Th2-Zellen wurden zum einen für drei Stunden mit PMA/Ionomycin restimuliert und nach Fixierung mit Formaldehyd und intrazellulärer IL-4-Färbung in IL-4-Produzenten und IL-4-Nichtproduzenten getrennt. Zum anderen wurden für drei Stunden mit PMA/Ionomycin restimulierte Th2-Zellen mittels der Zytokin-Matrix-Technologie in IL-4-produzierende und IL-4-nichtproduzierende Th2-Zellen getrennt und für weitere 24 Stunden mit immobilisierten Anti-CD3-Antikörpern und Anti-CD28-Antikörpern restimuliert. Nach Chromatin-Immunopräzipitation von GATA-3 wurden die relativen Anreicherungen der CIRE-Region (■) und der HS Va (□) in der quantitativen PCR analysiert.

3.6 Die Analyse des differentiellen Genexpressionsmusters zwischen IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen

Während der Differenzierung naiver T-Zellen zu Th1- bzw. Th2-Effektorzellen findet eine massive Veränderung des zellulären Genexpressionsmusters statt. Viele dieser Gene kodieren dabei für Transkriptionsfaktoren bzw. transkriptionelle Regulatoren, die direkt oder indirekt bei der Ausbildung des für differenzierte Th1-/Th2-Effektorzellen charakteristischen Zytokingenexpressionsmusters involviert sind (siehe Kapitel 1). Die differentielle Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren, Zelloberflächenrezeptoren und Signaltransduktionsfaktoren bestimmt somit den Differenzierungsstatus sowie das Verhalten der Zellen auf verschiedenste exogene Stimuli. Vor diesem Hintergrund sollte das differentielle Genexpressionsmuster IL-4-produzierender und IL-4-nichtproduzierender Th2-Zellen charakterisiert werden, um weitere Anhaltspunkte für die zellbiologischen Grundlagen der IL-4-Expressionsheterogenität, insbesondere der zugrunde liegenden Mechanismen der fehlenden NFAT-Bindung am IL-4-Promoter in den IL-4-Nichtproduzenten, zu gewinnen.

Dafür wurden zwei Wochen alte, stimulierte Th2-Zellen mittels des IL-4-Sekretionsassays in IL-4-produzierende und IL-4-nichtproduzierende Zellen getrennt und eine, das komplette Genom umfassende, Genexpressionsanalyse mit der Affymetrix-Microarray-Technologie durchgeführt.

Die Hybridisierung der cRNA erfolgte dabei auf dem Affymetrix-Array MG_430 2.0, der die Analyse von über 34.000 charakterisierten Mausgenen umfasst. Die Expressionanalysen wurden in Triplikaten mit drei voneinander unabhängigen Th2-Kulturen durchgeführt und das differentielle Genexpressionsmuster mit dem Programm dChip¹⁷⁹ analysiert.

Die Abbildung 3.24 zeigt dazu die graphische Darstellung differentiell exprimierter Gene der jeweiligen Triplikate der IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen. Der Analyse wurden die Kriterien (a.) ein mindestens zweifacher mittlerer Expressionsunterschied zwischen IL-4-Produzenten und IL-4-Nichtproduzenten, (b.) eine mittlere Expressionsrate der jeweiligen Gene ≥ 200 und (c.) ein signifikantes Ergebnis mit einem p-Wert (t-Test) $\leq 0,05$ zugrunde gelegt.

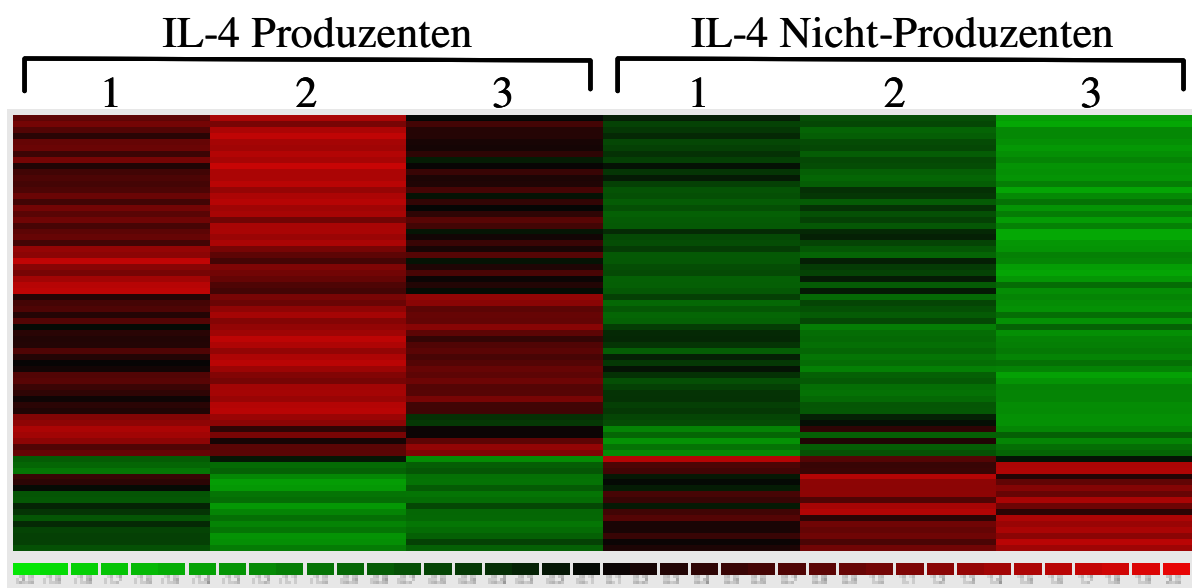


Abb. 3.24: Das Genclustergramm differentiell exprimierter Gene zwischen IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen. Zwei Wochen alte Th2-Zellen wurden für drei Stunden mit PMA/Ionomycin restimuliert und mittels des IL-4-Sekretionsassays in IL-4-Produzenten und IL-4-Nichtproduzenten getrennt. Die Charakterisierung des differentiellen Genexpressionsprofils in beiden Zellpopulationen erfolgte mit dem Affymetrix-Microarray MG_430 2.0 und anschließender Analyse mit dem Programm dChip. Als Auswertungskriterien wurden ein relativer Unterschied ≥ 2 , ein mittleres Genexpressionsniveau ≥ 200 und ein p-Wert $\leq 0,05$ zugrunde gelegt. Die farbigen horizontalen Linien repräsentieren jeweils ein differentiell exprimiertes Gen. Rote Linien symbolisieren eine relative Überexpression grüne Linien eine relative Unterexpression in Bezug zur Vergleichsgruppe.

Insgesamt konnte 68 Gene identifiziert werden, die zwischen den IL-4-Produzenten und IL-4-Nichtproduzenten differentiell exprimiert waren. Davon waren 52 Gene in den IL-4-produzierenden Zellen und 16 Gene in den IL-4-nichtproduzierenden Zellen im Vergleich zur Gegengruppe relativ überexprimiert. Das Clustergramm der Abbildung 3.24 zeigt, dass sich die einzelnen Triplikate einer Gruppe untereinander nur geringfügig im Expressionsstatus unterschieden, sehr wohl aber im Vergleich mit der entsprechenden Kontrollgruppe.

Die Tabellen 3.1 und 3.2 listen die entsprechenden Gene geordnet nach dem differentiellen Expressionsunterschied in IL-4-Produzenten im Vergleich zu IL-4-Nichtproduzenten auf.

| Affimetrix-Nr. | Gen | rel. Unterschied | p-Wert (t-Test) | IL4 - | IL4+ |
|----------------|---|------------------|-----------------|---------|---------|
| 1449864 at | interleukin 4 | 21,29 | 0,044118 | 222,33 | 4732,71 |
| 1450566 at | interleukin 3 | 15,19 | 0,043068 | 97,7 | 1484,24 |
| 1451191 at | cellular retinoic acid binding protein II | 5,25 | 0,04147 | 180,91 | 949,76 |
| 1451452 a at | regulator of G-protein signaling 16 | 5,13 | 0,040747 | 111,31 | 571,18 |
| 1421688 a at | chemokine (C-C motif) ligand 1 | 4,97 | 0,012054 | 994,59 | 4944,67 |
| 1432459 a at | repressor of GATA | 4,9 | 0,02707 | 243,66 | 1193,34 |
| 1420499 at | GTP cyclohydrolase 1 | 4 | 0,041266 | 264,14 | 1057,28 |
| 1426875 s at | sulfiredoxin 1 homolog (S. cerevisiae) | 3,64 | 0,011056 | 639,48 | 2324,59 |
| 1417995 at | protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 (lymphoid) | 3,41 | 0,009075 | 835,48 | 2851,24 |
| 1424704 at | runt related transcription factor 2 | 3,38 | 0,023809 | 336,55 | 1137,97 |
| 1449990 at | interleukin 2 | 3,21 | 0,021721 | 132,42 | 425,1 |
| 1418394 a at | CD97 antigen | 3,2 | 0,011288 | 198,43 | 635,26 |
| 1451584 at | hepatitis A virus cellular receptor 2 | 3,12 | 0,0051 | 362,78 | 1131,16 |
| 1428336 at | 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 1 | 3,06 | 0,015654 | 186,29 | 569,84 |
| 1438511 a at | RIKEN cDNA 1190002H23 gene | 2,96 | 0,020243 | 340,97 | 1008,55 |
| 1434591 at | RIKEN cDNA 4732460K03 gene | 2,88 | 0,008712 | 130,12 | 374,18 |
| 1420802 at | interleukin 13 | 2,8 | 0,008968 | 338,49 | 947,73 |
| 1448788 at | Cd200 antigen | 2,77 | 0,042413 | 383,19 | 1060,83 |
| 1421588 at | tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14 | 2,74 | 0,033627 | 181,29 | 496,16 |
| 1448407 at | RIKEN cDNA 4632428N05 gene | 2,72 | 0,044246 | 527,3 | 1432,8 |
| 1426623 a at | Rho GTPase activating protein 17 | 2,68 | 0,012419 | 223,61 | 599,61 |
| 1449835 at | programmed cell death 1 | 2,66 | 0,014926 | 286,75 | 763,77 |
| 1424990 at | RIKEN cDNA D730049H07 gene | 2,62 | 0,034783 | 387,17 | 1015,54 |
| 1438045 at | early endosome antigen 1 | 2,54 | 0,045701 | 399,76 | 1014,62 |
| 1419083 at | tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11 | 2,5 | 0,044218 | 343,46 | 860,21 |
| 1429536 at | RIKEN cDNA 2310040C09 gene | 2,45 | 0,008207 | 212,95 | 520,99 |
| 1436858 at | muscleblind-like 2 | 2,44 | 0,04877 | 224,65 | 548,9 |
| 1454731 at | myosin X | 2,43 | 0,004469 | 195,76 | 475,55 |
| 1426243 at | cystathionase (cystathionine gamma-lyase) | 2,34 | 0,024415 | 243,26 | 569,94 |
| 1419029 at | ERO1-like (S. cerevisiae) | 2,31 | 0,020361 | 2127,71 | 4910,23 |
| 1450272 at | tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8 | 2,28 | 0,002218 | 431,05 | 981,83 |
| 1417695 a at | sterol O-acyltransferase 1 | 2,25 | 0,00675 | 952,41 | 2140,28 |
| 1422528 a at | zinc finger protein 36, C3H type-like 1 | 2,25 | 0,03106 | 300,59 | 675,98 |
| 1417405 at | START domain containing 3 | 2,22 | 0,013687 | 196,16 | 434,63 |
| 1418518 at | furin (paired basic amino acid cleaving enzyme) | 2,21 | 0,020525 | 1211,24 | 2680,29 |
| 1422079 at | protein kinase C, eta | 2,2 | 0,017644 | 607,39 | 1336,06 |
| 1455149 at | SH3 multiple domains 2 | 2,16 | 0,011218 | 183,81 | 396,41 |
| 1452389 at | tumor necrosis factor receptor superfamily, member 7 | 2,16 | 0,021089 | 441,93 | 956,71 |
| 1437396 at | cAMP responsive element binding protein 3-like 2 | 2,15 | 0,012644 | 232,33 | 498,86 |
| 1425456 a at | mitogen activated protein kinase kinase 3 | 2,15 | 0,012081 | 642,47 | 1378,38 |
| 1422758 at | carbohydrate sulfotransferase 2 | 2,13 | 0,02598 | 293,84 | 627,3 |
| 1417621 at | nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1 | 2,1 | 0,019173 | 635,77 | 1333,6 |
| 1452716 at | RIKEN cDNA 5730469M10 gene | 2,1 | 0,038138 | 537,72 | 1129,25 |
| 1417609 at | ubiquitin-conjugating enzyme E2A, RAD6 homolog (S. cerevisiae) | 2,1 | 0,026177 | 324,14 | 680,21 |
| 1455599 at | expressed sequence A1850995 | 2,07 | 0,010758 | 440,94 | 911,02 |
| 1416893 at | RIKEN cDNA 3110001A13 gene | 2,07 | 0,01355 | 2001,05 | 4142,99 |
| 1425326 at | ATP citrate lyase | 2,06 | 0,021753 | 537,95 | 1110,79 |
| 1429028 at | dedicator of cytokinesis 11 | 2,06 | 0,027059 | 885,17 | 1826,01 |
| 1419357 at | RIKEN cDNA 5830446M03 gene | 2,05 | 0,034678 | 477,56 | 978,76 |
| 1423064 at | DNA methyltransferase 3A | 2,04 | 0,033468 | 347,06 | 709 |
| 1420818 at | src-like adaptor | 2,04 | 0,02794 | 811,24 | 1653,56 |
| 1422053 at | inhibin beta-A | 2,01 | 0,045173 | 1095,51 | 2200,59 |

Tab. 3.1: Differentiell überexprimierte Gene in IL-4-produzierenden im Vergleich zu IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen. Angegeben ist die Affymetrix-Accession-Nummer, der offizielle Name des Gens, der relative Unterschied des Expressionniveaus in IL-4-Produzenten im Vergleich zu IL-4-Nichtproduzenten, der p-Wert sowie die mittlere Expressionsrate der Triplikate der IL-4-Produzenten und IL-4-Nichtproduzenten.

| Affimetrix-Nr. | Gen | rel. Unterschied | p-Wert (t-Test) | IL4 - | IL4+ |
|----------------|--|------------------|-----------------|---------|---------|
| 1450504_a_at | sestrin 3 | -4,41 | 0,035449 | 869,58 | 197,25 |
| 1433771_at | interferon inducible GTPase 2 | -3,69 | 0,044216 | 513,75 | 139,3 |
| 1418507_s_at | special AT-rich sequence binding protein 1 | -3,28 | 0,047342 | 880,52 | 268,78 |
| 1416111_at | T-cell specific GTPase | -2,96 | 0,046336 | 2970,02 | 1002,09 |
| 1454788_at | Epstein-Barr virus induced gene 2 | -2,83 | 0,020503 | 846,4 | 299,59 |
| 1448436_a_at | suppressor of cytokine signaling 1 | -2,69 | 0,008875 | 561,81 | 209,04 |
| 1455990_at | IBR domain containing 3 | -2,43 | 0,025552 | 1237,49 | 509,95 |
| 1427911_at | suppressor of cytokine signaling 2 | -2,38 | 0,026697 | 727,54 | 306,22 |
| 1449109_at | RIKEN cDNA 2610307O08 gene | -2,29 | 0,033266 | 366,8 | 160,06 |
| 1432478_a_at | kinesin family member 23 | -2,23 | 0,009459 | 364,8 | 163,59 |
| 1450446_a_at | ADP-ribosylation factor-like 7 | -2,22 | 0,020307 | 388,17 | 175,02 |
| 1437356_at | interferon regulatory factor 1 | -2,22 | 0,038612 | 1915,32 | 862,81 |
| 1449009_at | CD83 antigen | -2,11 | 0,019424 | 749,21 | 355,22 |
| 1436182_at | RIKEN cDNA D130043N08 gene | -2,08 | 0,029798 | 650,38 | 312,7 |
| 1417793_at | RIKEN cDNA 5730446C15 gene | -2,05 | 0,004869 | 1387,47 | 677,46 |
| 1449303_at | 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 3 | -2,03 | 0,042821 | 1499,13 | 738,39 |

Tab. 3.2: Differentiell unterexprimierte Gene in IL-4-produzierenden im Vergleich zu IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen. Angegeben ist die Affymetrix-Accession-Nummer, der offizielle Name des Gens, der relative Unterschied des Expressionniveaus in IL-4-Produzenten im Vergleich zu IL-4-Nichtproduzenten, der p-Wert sowie die mittlere Expressionsrate der Triplikate der IL-4-Produzenten und IL-4-Nichtproduzenten.

Die am stärksten in den IL-4-Produzenten differentiell exprimierten Gene waren neben *Interleukin-4* (21fach) *Interleukin-3* (19fach), *Cellular retinoic acid binding protein II* (5fach), *Regulator of G-protein signaling 16* (5fach), *Chemokine ligand 1* (5fach), *Repressor of GATA* (5fach) sowie *GTP cyclohydrolase 1* (4fach).

Die am stärksten in den IL-4-Nichtproduzenten differentiell exprimierten Gene waren *Sestrin 3* (5fach), *Interferon inducible GTPase 2* (4fach), *Special AT-rich sequence binding protein 1* (3fach) sowie *T-cell specific GTPase* (3fach).

Neben *Interleukin-4* konnten weitere differentiell exprimierte Zytokingene detektiert werden. Darunter befanden sich das bereits erwähnte *Interleukin-3*, *Interleukin-2* sowie *Interleukin-13*. Während *IL-3* eine hohe Koregulation mit *IL-4* aufwies (15facher Unterschied zwischen IL-4-Produzenten und IL-4-Nichtproduzenten), zeigte sich für die Zytokingene *IL-2* und *IL-13* nur eine geringfügige differentielle Expressionsrate (circa dreifacher Unterschied).

Unter den Genen, die in IL-4-produzierenden Th2-Zellen überexprimiert waren, sind verschiedene Faktoren zu finden, die als Signaltransduktionskomponenten (wie *Cellular retinoic acid binding protein II*, *Regulator of G-protein signaling 16*, *Repressor of GATA*, *GTP cyclohydrolase 1*, *Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22*, *Mitogen activated protein kinase kinase 3*, *cAMP responsive element binding protein 3-like 2*, *Src-like adaptor*) bzw. als Transkriptionsfaktoren (*Runt related transcription factor 2*, *Zinc finger protein 36*, *C3H type-like 1*, *NFATc1*) indirekt bzw. direkt die Genexpression verschiedener Gene regulieren können.

Andere identifizierte Faktoren sind als Enzyme oder Enzymregulatoren (wie *ATP citrate lyase*, *Dedicator of cytokinesis 11*, *Ubiquitin-conjugating enzyme E2A*, *Carbohydrate sulfotransferase 2*, *Furin*, *Sterol O-acyltransferase 1*, *ERO1-like*, *Cystathionase*, *1-Acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 1*, *Sulfiredoxin 1 homolog*) in verschiedensten Bereichen des zellulären Stoffwechsels involviert oder nehmen als membranständige bzw. intrazelluläre Rezeptoren oder deren Liganden (wie *CD97 antigen*, *Hepatitis A virus cellular receptor 2*, *Cd200 antigen*, *Tumor necrosis factor [ligand] superfamily member 14*, *Tumor necrosis factor [ligand] superfamily member 8*, *Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 7*, *Chemokine [C-C motif] ligand 1*) an verschiedenen Zell-zu-Zell-Kommunikationswegen teil. Unter den Genen, die in den IL-4-Nichtproduzenten differentiell überexprimiert waren, konnten verschiedene Faktoren identifiziert werden, die (1.) eine wichtige Funktion bei der zellulären Signalübermittlung bzw. bei der Inhibition und Blockierung verschiedener Signalwege (wie *Interferon inducible GTPase 2*, *T-cell specific GTPase*, *Epstein-Barr virus induced gene 2*, *Suppressor of cytokine signaling 1*, *Suppressor of cytokine signaling 2*) einnehmen, (2.) als Transkriptionsfaktoren bzw. transkriptionale Regulatoren (*Interferon regulatory factor 1*, *Special AT-rich sequence binding protein 1*) die Genexpression verschiedener Gene direkt oder indirekt beeinflussen können bzw. (3.) als Enzyme (wie *ADP-ribosylation factor-like 7*, *1-Acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 3*) in verschiedenen zellulären Stoffwechselprozessen involviert sind.

Durch die genomweite Analyse des Genexpressionsmusters von IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen konnten somit insgesamt 68 verschiedene, differentiell exprimierte Gene identifiziert werden, die im Rahmen weitergehender Untersuchungen als Kandidaten für eine direkte oder indirekte Vermittlung der IL-4-Expressionsheterogenität in Frage kommen.

4 Diskussion

Differenzierte T-Helfer-Zellen koordinieren über die Produktion verschiedener Zytokine die Immunantwort gegen eine Vielzahl intrazellulärer und extrazellulärer Pathogene. Th1-Zellen exprimieren nach Stimulation über den T-Zell-Rezeptor die Zytokine IFN- γ , Interleukin-2 und Lymphotoxin- β und vermitteln darüber eine zelluläre Immunantwort gegen intrazelluläre Mikroorganismen. Th2-Zellen produzieren nach Aktivierung die Th2-Zytokine Interleukin-4, IL-5 und IL-13 und spielen bei der humoralen Immunantwort vor allem gegen extrazelluläre Pathogene eine bedeutende Rolle.

Das Zytokin Interleukin-4 steht dabei im Mittelpunkt Th2-assoziiierter Immunreaktionen. Zum einen induziert es über die Aktivierung des IL-4-Rezeptor/STAT6-Signaltransduktionsweges direkt die Differenzierung naiver T-Zellen in Th2-Effektorzellen, zum anderen vermittelt es z. Bsp. über die Induktion des IgE-Antikörperklassenwechsels in B-Zellen wichtige Th2-Effektorfunktionen. Eine Dysregulation der IL-4-Expression führt dabei häufig zur vermehrten Produktion von IgE und zu überschießenden Th2-vermittelten Immunreaktionen. Diese können sich beispielsweise klinisch in Form von allergen-induziertem Asthma bronchiale, allergischer Rhinitis oder anaphylaktischen Reaktionen manifestieren.

Um einerseits eine adäquate Immunantwort gegen extrazelluläre Pathogene zu gewährleisten, aber gleichzeitig das Risiko einer überschießenden Th2-Immunantwort zu minimieren, muss die Expression des IL-4-Gens einer fein abgestimmten Regulation unterliegen.

Die Regulation der IL-4-Expression findet dabei auf verschiedenen Ebenen statt. Der erste Schritt umfasst die Differenzierung naiver, CD4-positiver T-Zellen in differenzierte Th2-Effektorzellen. Während der Aktivierungsphase naiver T-Zellen wird über den IL-4-Rezeptor/STAT6-Signalweg der Transkriptionsfaktor GATA-3 exprimiert, der eine massive Veränderung der epigenetischen Chromatinkonfiguration des IL-4-Lokus induziert und damit die Voraussetzung zur Kompetenz der aktivierungsabhängigen IL-4-Expression in differenzierten Th2-Effektorzellen schafft. In einem zweiten Schritt wird die akute Transkription des IL-4-Gens in differenzierten Th2-Zellen über die Aktivierung des T-Zell-Rezeptor-Signaltransduktionsweges reguliert. Hierbei sind eine Vielzahl verschiedener Transkriptionsfaktoren wie NFAT, NF- κ B oder c-MAF beteiligt.

Bezüglich der restimulationsabhängigen IL-4-Expression in differenzierten Th2-Zellen besteht eine weitere Ebene der Regulation: aktivierte Th2-Zellen exprimieren IL-4 vorwiegend monoallelisch und nur mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit. Ein Großteil der Zellen innerhalb einer aktivierten Th2-Zellpopulation zeigt keine Expression von IL-4.

Nach einer weiteren Kultivierung der IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen exprimieren wiederum beide Zellpopulationen IL-4 mit der gleichen Wahrscheinlichkeit. Diesbezüglich konnten Guo et al. zeigen, dass sowohl IL-4-Produzenten als auch IL-4-Nichtproduzenten die für differenzierte Th2-Zellen charakteristischen Chromatinveränderungen im Bereich des IL-4-Lokus aufweisen und gleiche Mengen des Th2-spezifischen Transkriptionsfaktors GATA-3 sowie c-MAF exprimieren¹⁶⁹. Darüber hinaus konnte durch die Expressionsanalyse verschiedener Aktivierungsmarker wie CD69 oder CD25 ein äquipotenter Aktivierungsstatus in den IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen nachgewiesen werden¹⁶⁹.

Zum tiefer gehenden Verständnis des Phänomens der IL-4-Expressionsheterogenität in differenzierten Th2-Zellen fehlten jedoch wissenschaftliche Erkenntnisse über die zugrunde liegenden zellbiologischen Mechanismen.

Daher war es das Ziel dieser Arbeit, die Transkriptionsfaktorbesetzung am IL-4-Lokus in IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen zu analysieren, um damit detailliertere Informationen über den molekularen Transkriptionsstatus des IL-4-Gens in den einzelnen Zellpopulationen zu erhalten.

Schwerpunktmäßig wurde dabei auf die Transkriptionsfaktoren der NFAT-Familie NFAT1 und NFAT2, NF- κ B/p65, c-MAF, den transkriptionellen Koaktivator p300, GATA-3, STAT6 sowie auf den Chromatin-Remodeling-Komplex SWI/SNF eingegangen.

Als experimentelles Modell wurde ein etabliertes *In-vitro*-Differenzierungssystem verwendet, das die zellbiologische Analyse muriner, *in-vitro*-differenzierter Th2-Zellen erlaubt. Naive CD4-positive T-Zellen aus DO11.10-Mäusen wurden mit dem spezifischen Antigenpeptid in Anwesenheit Antigen-präsentierender Zellen sowie des Zytokins IL-4 und der blockierenden Antikörper anti-INF- γ und anti-IL-12 für zwei Wochen in Richtung Th2 differenziert. Die ruhenden Th2-Zellen wurden anschließend mit PMA/Ionomycin restimuliert und mittels des IL-4-Sekretionsassays bzw. nach Fixierung und intrazellulärer IL-4-Färbung durch Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung in die Subpopulationen der IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen getrennt.

Zur Analyse der Transkriptionsfaktorbindung an den IL-4-Lokus wurde die Methode der magnetischen Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) etabliert. Diese Methode erlaubt eine qualitative als auch quantitative Aussage über die *in-vivo*-Besetzung verschiedener Transkriptionsfaktoren bzw. transkriptioneller Kofaktoren an definierte DNA-Bereiche. Lebende Zellen werden dabei mit einem chemischen Crosslinker behandelt, um reversible, kovalente Bindungen zwischen Transkriptionsfaktoren und den assoziierten DNA-Bereichen zu induzieren.

Eine Immunopräzipitation gegen einen bestimmten Transkriptionsfaktor führt zur spezifischen Anreicherung der mit dem Faktor assoziierten DNA-Bereiche, die nach Aufreinigung mittels quantitativer PCR analysiert werden können. Zur Optimierung dieser Methode für die Anwendung in Primärzellen wurde einerseits die Effizienz der Kreuzvernetzung durch die Kombination von zwei verschiedenen Crosslinkern erhöht, sowie andererseits durch die Anwendung eines magnetischen Präzipitations- und Isolierungssystems die Verlustrate der präzipitierten Protein-DNA-Komplexe im Rahmen der extensiven Waschschrte minimiert. In die Analyse der Transkriptionsfaktorbesetzung wurden als relevante DNA-Regionen innerhalb des IL-4-Lokus der IL-4-Promoter sowie die distal des IL-4-Gens gelegene HS Va eingeschlossen. Der IL-4-Promoter bildet als zentrale regulatorische Kernregion der IL-4-Transkription einen Chromatinkomplex mit verschiedenen distal des IL-4-Gens gelegenen cis-regulatorischen Regionen und ist gleichsam Ort der Assemblierung des RNA-Polymerase-II-Transkriptionskomplexes. Die HS Va ist eine 3' des IL-4-Promoters gelegene DNA-Region, die als Enhancer die IL-4-Transkription regulatorisch beeinflusst^{93,142}. Im Rahmen früherer Studien konnte bereits gezeigt werden, dass IL-4-produzierende Th2-Zellen im Vergleich zu IL-4-nichtproduzierenden Zellen eine erhöhte Chromatin-Zugänglichkeit innerhalb dieser Region aufweisen⁹³. Als Negativkontrolle der Chromatin-Immunopräzipitationsanalysen wurde der IFN- γ -Promoter herangezogen, der in Th2-Zellen in einer epigenetisch geschlossenen Chromatinkonfiguration vorliegt und für aktivierende Transkriptionsfaktoren wie NFAT vermindert zugänglich ist^{140,145}.

4.1 In differenzierten Th2-Zellen bindet ein aktiver Transkriptionsfaktor-komplex restimulationsabhängig an den IL-4-Lokus

Zur systematischen Analyse der Transkriptionsfaktorbesetzung am IL-4-Lokus wurde zunächst die Bindung der genannten Transkriptionsfaktoren an den IL-4-Promoter und an die HS Va in unstimulierten, ruhenden sowie aktivierten Th2-Zellen untersucht.

Die Abbildung 4.1 stellt die Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungen schematisch dar. In unstimulierten Th2-Zellen konnte alleinig eine Assoziation des Transkriptionsfaktors STAT6 mit dem IL-4-Promoter und der HS Va nachgewiesen werden. Die RNA-Polymerase-II sowie die Transkriptionsfaktoren NFAT1, NFAT2, c-MAF, p65, GATA-3, Brg1 und p300 zeigten dem entgegen eine restimulationsabhängige Rekrutierung an den IL-4-Lokus.

Für NFAT1, NFAT2 und p300 konnten sowohl eine Bindung am IL-4-Promoter als auch an der HS Va nachgewiesen werden. Dies zeigte sich in ähnlicher Weise für die Bindung von GATA-3 an der CIRE-Region und der HS Va.

Die Transkriptionsfaktoren c-MAF und NF- κ B/p65 waren hingegen restimulationsabhängig nur mit dem IL-4-Promoter assoziiert.

Im Vergleich dazu konnte eine Bindung des Chromatin-Remodeling-Komplexes SWI/SNF, nachgewiesen durch die Präzipitation der ATPase-Untereinheit Brg1, nur an der HS Va detektiert werden.

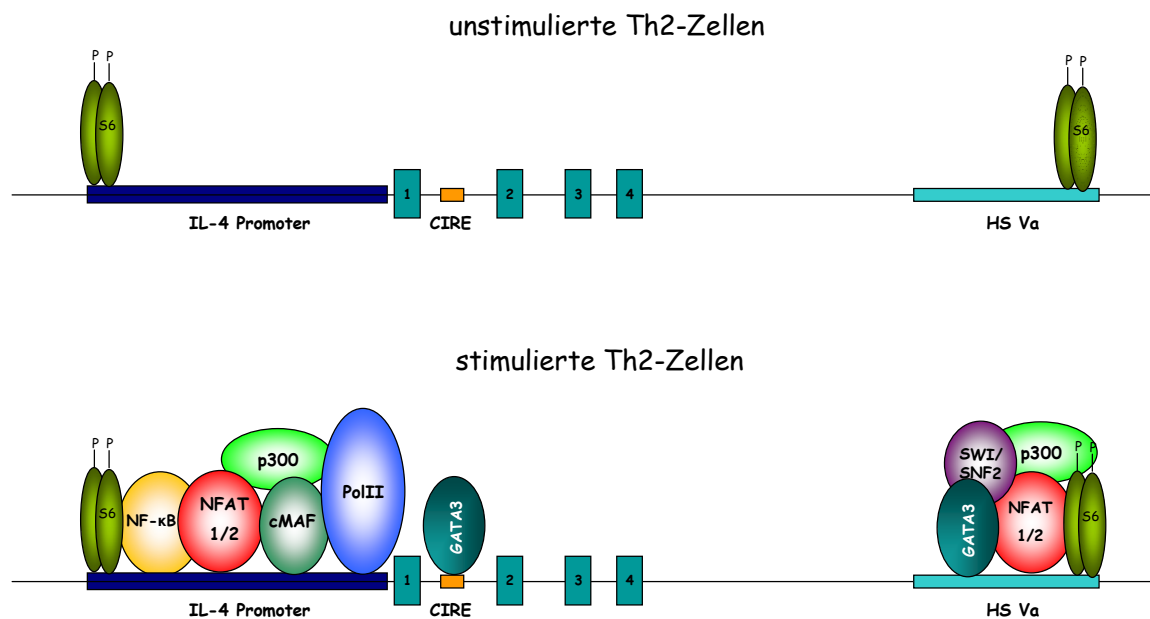


Abb. 4.1: Die schematische Darstellung der Transkriptionsfaktorbesetzung am IL-4-Promoter und an der HS Va in ruhenden und aktivierten Th2-Zellen.

Die aktivierungsunabhängige Bindung des Transkriptionsfaktors STAT6 an den IL-4-Promoter und an die HS Va in ruhenden sowie aktivierten Th2-Zellen unterstreicht frühere Studien von Avni et al. sowie Lee et al.^{129,145} und steht im Einklang mit der Regulation der STAT6-Bindungsaktivität. Die Bindung von IL-4 an den IL-4-Rezeptor aktiviert die Proteine Jak1 und Jak3, die im Zytoplasma lokalisierte STAT6-Monomere phosphorylieren. Diese bilden daraufhin aktive Homodimere, wandern in den Zellkern und binden als aktiver Transkriptionsfaktor an STAT6-Consensussequenzen. Da zur Differenzierung naiver Th-Lymphozyten in Th2-Zellen der Zellkultur rekombinantes IL-4 zugegeben wurde, ist es wahrscheinlich, dass durch diese exogene Stimulation STAT6 nahezu konstitutiv-aktiv im Zellkern lokalisiert ist und an entsprechende DNA-Bereiche binden kann. Eigene Untersuchungen zur nukleären Lokalisation von STAT6 in

ruhenden sowie aktivierten Th2-Zellen belegten diese Vermutung (Daten nicht gezeigt).

Die STAT6-Bindung am IL-4-Promoter und der HS Va in ruhenden Th2-Zellen demonstriert zugleich die Tatsache, dass der IL-4-Promoter und speziell die HS Va unabhängig von einer aktivierungsinduzierten Veränderung der Chromatinkonfiguration für STAT6 zugänglich ist.

Die restimulationsabhängige Bindung von NFAT an den IL-4-Promoter und an die HS Va steht im Einklang mit den Regulationsmechanismen der NFAT-Bindungsaktivität. NFAT wird in unstimulierten ruhenden Lymphozyten in einer phosphorylierten Form im Zytoplasma zurückgehalten und erst durch eine TCR-getriggerte Calciumfreisetzung durch Calcineurin dephosphoryliert. Die dephosphorylierte Form wandert in den Zellkern und kann dort an spezifische DNA-Bereiche binden. Verschiedene Studien konnten im Rahmen von Chromatin-Immunopräzipitationsanalysen bereits eine restimulationsabhängige Bindung von NFAT1 an verschiedene Regionen des IL-4-Lokus, darunter auch den IL-4-Promoter und die HS Va, nachweisen^{93,140}. Die hier erstmals gezeigte redundante Bindung von NFAT1 und NFAT2 an NFAT-Bindungsstellen innerhalb des IL-4-Promoters und der HS Va lässt auf eine funktionelle Redundanz beider Faktoren für die IL-4-Expression schließen. Untersuchungen von Peng et al. an NFAT1/NFAT2-Knockout-Mäusen⁸¹ sowie von Monticelli et al., die durch die Verwendung konstitutiv-aktiver NFAT1- bzw. NFAT2-Proteinkonstrukte eine Funktion beider Faktoren als positive Regulatoren der IL-4-Transkription nachweisen konnten⁸⁸, belegen diese Vermutung.

Innerhalb des IL-4-Promoters und der HS Va existieren mehrere konservierte NFAT-Bindungsstellen⁸⁹⁻⁹². Mutationen innerhalb dieser Bindungsstellen führten in Promoterstudien zu einer drastischen Reduktion der Transaktivierungsaktivität eines IL-4-Reporter-Konstruktes^{90,91}. Die hier verwendete Methode der Chromatin-Immunopräzipitation lässt aufgrund der generierten DNA-Fragmentgrößen von 500-1000 bp jedoch keine Rückschlüsse auf die Bindung von NFAT1 und NFAT2 an spezifische Bindungsstellen innerhalb der untersuchten DNA-Regionen zu. Daher muss offen bleiben, ob NFAT1 und NFAT2 die gleichen Bindungsstellen innerhalb des IL-4-Promoters bzw. der HS Va besetzen können und eventuell sogar um die DNA-Bindung konkurrieren, oder ob beide Faktoren unterschiedliche Affinitäten zu unterschiedlichen Bindungsstellen besitzen und infolgedessen unabhängig voneinander an den IL-4-Promoter bzw. die HS Va binden.

Die restimulationsabhängige Bindung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B/p65 und c-MAF an den IL-4-Promoter bestätigt frühere Arbeiten von Li-Weber et al. und Ho et al.^{60,113}. Li-Weber et al. konnten in aktivierten Jurkat-Zellen eine Bindung des Proteins p65 an den IL-4-Promoter und darüber hinaus eine NF- κ B-vermittelte Aktivierung eines IL-4-Promoter-Reporterkonstruktes nachweisen¹¹³.

Ho et al. demonstrierten die *in-vitro*-Bindung von c-MAF an die MARE-Sequenz des IL-4-Promoters mittels des Elektromobilitätsshiftassays (EMSA) und konnten gleichsam eine c-MAF/NFAT-abhängige Transaktivierungsaktivität am IL-4-Promoter nachweisen^{60,105}. Die in dieser Arbeit durchgeführten Chromatin-Immunopräzipitationen von p65 und c-MAF zeigten weiterführend dazu die restimulationsabhängige *In-vivo*-Bindung beider Transkriptionsfaktoren an den IL-4-Promoter in differenzierten und aktivierten, murinen Th2-Zellen. Die fehlende Bindungsaktivität von c-MAF und p65 an der HS Va erklärt sich dabei durch das Fehlen potentieller, konservierter c-MAF- und NF- κ B-Bindungsstellen innerhalb des Va-Enhancers.

Am IFN- γ -Promoter als Negativkontrolle konnte ebenfalls keine c-MAF-Bindungsaktivität in aktivierten Th2-Zellen nachgewiesen werden. Diese Tatsache ist insofern relevant, da Ho et al. durch eine transgene Überexpression von c-MAF in differenzierten Th1-Zellen eine IL-4-unabhängige Repressorfunktion von c-MAF für die IFN- γ -Transkription nachweisen konnten¹⁰⁵. Die fehlende c-MAF-Bindungsaktivität am IFN- γ -Promoter in differenzierten Th2-Zellen schließt diesbezüglich eine repressorische Wirkung vermittelt durch eine direkte Bindung von c-MAF an den IFN- γ -Promoter aus.

Die restimulationsabhabhängige Bindung von GATA-3 an die CIRE-Region sowie die HS Va bestätigt frühere Untersuchungen von Tykocinski et al. und Agarwal et al.^{93,135}. Die fehlende GATA3-Bindungsaktivität am IL-4-Promoter kann auch hier durch das Fehlen einer potentiellen GATA-3-Bindungsstelle innerhalb des Promoterbereiches erklärt werden.

Cai et al. konnten in Chromatin-Immunopräzipitationsanalysen hingegen zeigen, dass GATA-3 bereits in ruhenden Th2-Zellen mit dem IL-4-Lokus assoziiert ist¹⁶⁴. Entgegen den in dieser Arbeit durchgeführten Bindungsanalysen in primären Th2-Zellen verwendeten Cai et al. jedoch die immortalisierte Th2-Zelllinie D10.G4.1. Daher besteht die Möglichkeit, dass verschiedene Signalwege, wie z. Bsp. der p38-MAPK-Signaltransduktionsweg, der zur Aktivierung der GATA-3-Bindungsaktivität führt^{182,183}, in der Zelllinie D10.G4.1 konstitutiv aktiv sind und damit zur Assoziation von GATA-3 mit dem IL-4-Lokus in ruhenden Th2-Zellen beitragen. Eine direkte Übertragung der Erkenntnisse von Cai et al. auf die Situation in primären Th2-Zellen ist daher nur eingeschränkt möglich.

Die aktivierungsinduzierte IL-4-Expression in differenzierten Th2-Zellen ist mit einem transienten Umbau der Chromatinkonfiguration im Bereich des Va-Enhancers verbunden. Agarwal et al. konnten diesbezüglich zeigen, dass die Sensitivität dieser Region gegenüber dem DNA-verdauenden Enzym DNaseI Th2-spezifisch und nur in restimulierten Th2-Zellen zu detektieren ist⁹³.

Vor diesem Hintergrund lässt der in dieser Arbeit gezeigte Nachweis der aktivierungsabhängigen Bindung des Chromatin-Remodeling-Komplexes SWI/SNF eine wichtige Funktion dieses Komplexes bei der restimulationsabhängigen epigenetischen Öffnung der HS Va vermuten.

Eine erhöhte Bindungsaktivität des SWI/SNF-Komplexes am IL-4-Promoter konnte bei den durchgeführten Brg1-Präzipitationen nicht detektiert werden. Dies steht im Einklang mit den bisherigen Erkenntnissen über die epigenetische Chromatinkonfiguration des IL-4-Promoters in naiven T-Zellen sowie differenzierten Th2-Zellen. Im Gegensatz zur HS Va wird der IL-4-Promoter bereits bei der frühen Th2-Differenzierung von naiven T-Zellen epigenetisch geöffnet und unterliegt in differenzierten Th2-Zellen unabhängig vom Aktivierungsstatus keiner weiteren Veränderung der Chromatinkonfiguration^{131,132}.

Zur weitergehenden Klärung der Funktion des SWI/SNF-Komplexes bei der aktivierungsinduzierten IL-4-Expression in differenzierten Th2-Zellen müssen weiterführende Untersuchungen erfolgen. Zhang et al. konnten bereits die Rolle von Brg1 als positiver Regulator der IFN γ -Expression in differenzierten Th1-Zellen demonstrieren¹⁸⁴. Einen ersten Anhaltspunkt würde beispielsweise die experimentelle Überexpression eines dominant-negativen Brg1-Konstruktes^{185,186} in differenzierten Th2-Zellen und nachfolgender Analyse der Auswirkungen auf die stimulationsabhängige IL-4-Expression liefern. Die Analyse der Chromatinzugänglichkeit der HS Va in dn-Brg1-exprimierenden Th2-Zellen würde darüber hinaus eine Aussage über die Rolle des SWI/SNF-Komplexes bei der epigenetischen Öffnung der HS Va zulassen.

Im Rahmen der Charakterisierung des Transkriptionsfaktorkomplexes konnte erstmals in einem *In-vivo*-Assay gezeigt werden, dass der transkriptionelle Koaktivator p300 restimulationsabhängig mit dem IL-4-Promoter und der HS Va assoziiert ist. Sisk et al. wiesen bereits mittels eines IL-4-Reporter-Assays eine transaktivierende Eigenschaft von p300/CBP am IL-4-Promoter nach, die durch die Koexpression mit NFAT1 oder NFAT2 zusätzlich verstärkt wurde¹⁰⁰. Die hier aufgezeigte Assoziation von p300 mit dem IL-4-Lokus stellt eine wichtige funktionelle Verbindung zwischen der Bindung sequenzspezifischer Transkriptionsfaktoren wie NFAT und der Rekrutierung der basalen Transkriptionsmaschinerie am IL-4-Promoter dar.

Verschiedene Arbeiten konnten diesbezüglich zeigen, dass p300 einerseits über die Transaktivierungsdomäne mit NFAT-Proteinen direkt interagieren kann und andererseits über die Interaktion mit Proteinen des Transkriptionsinitiationskomplexes wie TBP, TFIIB, TFIIE und TFIIIF die Rekrutierung der RNA-Polymerase-II vermittelt^{99,187,188}.

Da p300 neben der Transaktivierungsaktivität zusätzlich auch eine intrinsische Histonazetyltransferaseaktivität besitzt, könnte eine weitere Funktion von p300 in der Azetylierung der Histone H3 und H4 im Bereich des IL-4-Promoters und der HS Va liegen. Vor diesem Hintergrund erscheint es interessant, dass bereits in unstimulierten Th2-Zellen sowohl am IL-4-Promoter als auch an der HS Va eine geringfügige DNA-Bindung von p300 nachgewiesen werden konnte.

Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass vor allem im Zuge der Th2-Differenzierung naiver T-Zellen der gesamte IL-4-Lokus einer vermehrten H3/H4-Azetylierung unterliegt^{145,158,160}. Diesbezüglich konnten eigene Untersuchungen an frühen, sich differenzierenden Th2-Zellen ebenfalls eine p300-Bindungsaktivität am IL-4-Promoter und der HS Va nachweisen (Daten nicht gezeigt). P300/CBP scheint daher nicht nur als transkriptioneller Koaktivator der IL-4-Transkription in differenzierten Th2-Zellen sondern auch bei der epigenetischen Öffnung des IL-4-Lokus in der frühen Th2-Differenzierungsphase beteiligt zu sein.

Weiterführende Untersuchungen müssen diesbezüglich die Funktion von p300/CBP bei der Induktion und Aufrechterhaltung der für differenzierte Th2-Zellen charakteristischen Histon-H3/H4-Azetylierung im Bereich des IL-4-Lokus beleuchten.

4.2 Die restimulationsabhängige Bindung des untersuchten Transkriptionsfaktorkomplexes an den IL-4-Lokus ist transient und geht zeitgleich einher mit der Initiierung und Terminierung der IL-4-Transkription

Die Bindungsanalyse über den Stimulationszeitraum von sechs Stunden zeigte, dass die schnelle Reexpression von IL-4 nach Aktivierung ruhender Th2-Zellen auf einer schnellen Bindung des Transkriptionsfaktorkomplexes an den IL-4-Lokus beruht. Bereits nach einer zwei- bis dreistündigen Stimulationsdauer konnte die maximale DNA-Bindungsaktivität der Transkriptionsfaktoren NFAT1, NFAT2, c-MAF, NF- κ B, p300 und Brg1 detektiert werden. Nach längeren Stimulationszeiten verringerte sich die Assoziation der Transkriptionsfaktoren zunehmend und erreichte nach sechs Stunden das Niveau der unstimulierten Probe.

Bezüglich der Bindungskinetiken von NFAT1, NFAT2 und p300 konnten keine Unterschiede zwischen dem IL-4-Promoter und der HS Va nachgewiesen werden. Die transkriptionelle Beset-

zung beider Regionen nach Aktivierung ruhender Th2-Zellen erfolgt somit nahezu zeitgleich. Die transiente Bindung des Transkriptionsfaktorkomplexes ging zeitgleich einher mit der Assoziation der RNA-Polymerase-II und der Initiierung und Terminierung der IL-4-Transkription. Dies lässt einen direkten Zusammenhang zwischen der Rekrutierung des Transkriptionsfaktorkomplexes und der Induktion der IL-4-Expression vermuten.

Die Tatsache, dass sich die IL-4-mRNA-Expressionsrate nach einer sechsstündigen Stimulationsdauer noch nicht vollständig dem Niveau der unstimulierten Probe angeglichen hatte, ist durch einen verzögerten Abbau der IL-4-mRNA zu erklären.

Die Transkriptionsfaktoren STAT6 und GATA-3 zeigten ein von den übrigen untersuchten Faktoren abweichendes Bindungsverhalten. Für STAT6 konnte eine nahezu gleich bleibende DNA-Bindungsaktivität am IL-4-Lokus über den gesamten Stimulationszeitraum gezeigt werden. Der IL-4/IL-4-R/STAT6-Signaltransduktionsweg ist somit durch die exogene IL-4-Stimulation nahezu maximal aktiviert, da auch das von den Th2-Zellen in der Restimulationsphase exprimierte, endogene IL-4 zu keiner weiteren Steigerung der STAT6-Bindungsaktivität am IL-4-Promoter bzw. an der HS Va führte.

Für GATA-3 wurde eine mit steigender Stimulationsdauer zunehmende Bindungsaktivität an der CIRE-Region nachgewiesen. Selbst nach einer 24- bis 48-stündigen Stimulationsdauer zeigte sich eine noch zunehmende DNA-Bindungsaktivität an der CIRE-Region. Dies geht einher mit eigenen Untersuchungen der GATA-3-Bindung am IL-4-Lokus während der primären Th2-Differenzierungsphase naiver T-Zellen. Auch in diesem Fall zeigte sich eine progrediente und über mehrere Tage anhaltende GATA-3-Assoziation an der CIRE bzw. an der HS Va (Daten nicht gezeigt).

Untersuchungen von Hutchins et al., Makar et al. und Tykocinski et al. lassen eine wichtige Bedeutung von GATA-3 bei der Öffnung des IL-4-Lokus durch eine Kompetition und Verdrängung verschiedener repressorischer, DNA-bindender Proteine wie MBD-2 (*Methyl-CpG binding domain protein 2*) oder DNMT1 (*DNA-Methyltransferase-1*) vermuten^{135,150,153}. Diese Kompetition kann effektiv nur in proliferierenden Th2-Zellen stattfinden, da DNA-Methyltransferasen wie DNMT1 ihre Funktion vorwiegend während der replikativen DNA-Neusynthese im Rahmen der S-Phase des Zellzyklus ausüben^{189,190}. Richter et al. und andere konnten diesbezüglich zeigen, dass nach Aktivierung und Th2-Differenzierung naiver T-Zellen der Eintritt der Zellen in die S-Phase des ersten Zellzyklus eine Grundvoraussetzung für die IL-4-Expression darstellt^{191,192}.

Aus der progredienten DNA-Bindungsaktivität und der konzeptionellen Rolle von GATA-3 als Kompetitor repressorischer, DNA-bindender Proteine lässt sich die daher die Vermutung ableiten, dass GATA-3 während der gesamten Proliferationsphase aktivierter, naiver T- bzw. differenzierter Th2-Zellen mit dem IL-4-Lokus assoziiert ist und diesen durch Konkurrenz mit MBD-2 oder DNMT1 epigenetisch öffnet bzw. offen hält.

4.3 Die Bindung des Transkriptionsfaktorkomplexes an den IL-4-Lokus ist von der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT abhängig

Zahlreiche Studien konnten bereits zeigen, dass die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT1 und NFAT2 unerlässlich für die aktivierungsinduzierte IL-4-Expression in differenzierten Th2-Zellen ist (siehe Kap 1.5.1.3). Die Frage, ob die NFAT-Faktoren dabei eine für die Transkription des IL-4-Gens unerlässliche, direkte Transaktivierungsaktivität vermitteln oder vielmehr als zentraler Regulator der IL-4-Expression den gesamten Transkriptionsfaktorkomplex an den IL-4-Lokus rekrutieren bzw. diesen an der DNA stabilisieren, konnte bisher nur unzureichend geklärt werden.

Durch die Verwendung des spezifischen NFAT-Inhibitors BTP1 konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass die restimulationsabhängige Rekrutierung des Transkriptionsfaktorkomplexes an den IL-4-Lokus nahezu komplett NFAT-abhängig vermittelt wird. Die Bindung der RNA-Polymerase-II sowie der Transkriptionsfaktoren NF- κ B/p65, c-MAF, GATA-3, p300 und SWI/SNF/Brg1 an den IL-4-Lokus war in BTP1-behandelten, aktivierten Th2-Zellen nahezu vollständig aufgehoben.

Die BTP1-vermittelte Blockierung der NF- κ B/p65-Bindung am IL-4-Promoter erscheint zunächst überraschend, da BTB1 im Gegensatz zu den unspezifischen Calcineurin-Inhibitoren CyclosporinA und FK506 spezifisch die Translokation von NFAT in den Zellkern blockiert und die Aktivierung anderer Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B oder AP1 unberührt lässt¹⁸¹. Li-Weber et al. konnten jedoch zeigen, dass NF- κ B an die Regionen P1 und P4-PreI innerhalb des IL-4-Promoters bindet und zusammen mit NFAT eine synergistische Transaktivierungsaktivität vermittelt¹¹⁰. Die DNA-Regionen P1 und P4-PreI stellen zugleich konservierte NFAT-Bindungsstellen innerhalb der IL-4-Promoterregion dar^{90,91}. Daraus lässt sich ableiten, dass NF- κ B entweder nur im Komplex mit NFAT-Proteinen an den IL-4-Lokus binden kann, oder dass die Bindung von NFAT an den IL-4-Promoter und eine eventuell damit verbundene Verdrängung repressorischer Proteine eine Grundvoraussetzung für die Bindung von NF- κ B an den IL-4-Promoter darstellt.

Das et al. konnten durch eine Blockierung der NF- κ B-Aktivität mit dem Inhibitor SN50 zeigen, dass die restimulationsabhängige IL-4-Expression in differenzierten Th2-Zellen auch in Abwesenheit der NF- κ B-Bindungsaktivität auftritt⁶⁷. Daraus lässt sich schließen, dass die für die IL-4-Expression essentielle NFAT-Aktivität am IL-4-Promoter auch unabhängig von NF- κ B aktivierungsabhängig induziert werden kann.

Die NFAT-abhängige Bindung des Transkriptionsfaktors c-MAF an den IL-4-Promoter unterstreicht Untersuchungen von Ho et al., die eine Assoziation von c-MAF mit NFAT1 sowie eine synergistische Transaktivierungsaktivität von c-MAF und NFAT1 am IL-4-Promoter nachweisen konnten⁶⁰. Diesbezüglich muss jedoch offen bleiben, ob im Umkehrschluß NFAT unabhängig von der c-MAF-Bindungsaktivität an den IL-4-Promoter binden kann. Untersuchungen an c-MAF-Knock-out-Mäusen konnten zeigen, dass die Aktivität von c-MAF unentbehrlich für die aktivierungsinduzierte IL-4-Expression in differenzierten Th2-Zellen ist³³. Eine direkte Schlussfolgerung, dass die Bindung von NFAT am IL-4-Promoter c-MAF-abhängig reguliert wird, lassen diese Erkenntnisse allerdings nicht zu.

Die Erkenntnis, dass die Bindung von GATA-3 an die CIRE-Region von der NFAT-Aktivität abhängig ist, innerhalb der CIRE-Region jedoch keine sequenzspezifische Bindungsstelle für NFAT existiert, lässt auf eine direkte Interaktion beider Faktoren schließen. Serfling et al. konnten diesbezüglich eine Interaktion sowie eine synergistische Transaktivierungsaktivität von NFAT2 und GATA-3 am IL-5-Promoter nachweisen¹⁰¹. Agarwal et al. konnten dies in ähnlicher Weise für die HS Va demonstrieren⁹³. Bestätigt wird diese Vermutung von Tykocinski et al., die im Elektromobilitätsshiftassay eine Assoziation von NFAT mit GATA-3 an der CIRE-Region nachweisen konnten (Daten nicht publiziert). In eigenen Untersuchungen konnte mittels Chromatin-Immunopräzipitation ebenfalls eine Bindung von NFAT an der CIRE-Region detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Eine daraus abzuleitende Schlussfolgerung ist insofern jedoch schwierig, da die räumliche Nähe der CIRE-Region zum IL-4-Promoter zu einem falschen positiven Ergebnis der NFAT-Chromatin-Immunopräzipitation führen kann.

Die BTP1-vermittelte Blockierung der p300-Bindung am IL-4-Lokus steht im Einklang mit Untersuchungen von Avots et al. und Garcia-Rodriguez et al., die eine Interaktion von p300 mit der Transaktivierungsdomäne der NFAT-Proteine nachweisen konnten^{99,193}. Mittels verschiedener Reporterassays konnten Garcia-Rodriguez et al. zudem zeigen, dass die Transaktivierungsaktivität von NFAT1 direkt über die Rekrutierung des transkriptionellen Koaktivators p300/CBP vermittelt wird¹⁹³. Die NFAT-Abhängigkeit der p300-Assoziation am IL-4-Lokus bestätigt somit das konzeptionelle Modell, dass NFAT nach Aktivierung differenzierter Th2-Zellen sequenzspezifisch an den IL-4-Promoter bindet und über die Rekrutierung von p300/CBP die Assoziation des

Polymerase-II-Transkriptionsinitiationskomplexes vermittelt.

Im Rahmen der Bindungsanalyse von p300 am IL-4-Lokus konnte zugleich demonstriert werden, dass p300 im direkten Vergleich mit dem IFN- γ -Promoter auch in unstimulierten Th2-Zellen (also NFAT-unabhängig) eine geringfügige DNA-Bindungsaktivität am IL-4-Promoter und an der HS Va besitzt. Diesbezüglich konnten Gingras et al. zeigen, dass p300/CBP über die Bindung der Transaktivierungsdomäne mit STAT6 interagieren kann¹⁹⁴. Da für STAT6 eine aktivierungsunabhängige Bindung am IL-4-Lokus in ruhenden Th2-Zellen nachgewiesen wurde, könnte die in unstimulierten Th2-Zellen detektierte, geringfügige p300-Bindungsaktivität über die Assoziation mit STAT6 zustande kommen.

Die BTP1-vermittelte Inhibition der Brg1-Bindung an der HS Va demonstriert, dass Faktoren der NFAT-Familie die DNA-Rekrutierung des SWI/SNF-Komplexes vermitteln können. Prinzipiell kann eine DNA-Assoziation des SWI/SNF-Komplexes auf zweierlei Wegen initiiert werden. Zum einen kann Brg1 über die Bromodomäne direkt an azetylierte Lysinreste der Histonproteine binden, zum anderen können BAF-Untereinheiten des SWI/SNF-Komplexes mit anderen sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren interagieren und darüber an bestimmte DNA-Regionen rekrutiert werden^{195,196}. Eine direkte Interaktion der NFAT-Proteine mit Faktoren des SWI/SNF-Komplexes ist bisher nicht beschrieben worden. Untersuchungen von Agarwal et al. konnten diesbezüglich jedoch zeigen, dass die restimulationsabhängige epigenetische Öffnung des Va-Enhancers NFAT-abhängig reguliert wird⁹³. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass zur restimulationsabhängigen Öffnung der HS Va die Proteinneusynthese eines weiteren Faktors notwendig ist¹⁶⁹. Dies steht im Einklang mit einer möglichen Involvierung des Transkriptionsfaktors NFAT2, von dem die Isoform NFAT2A erst nach Aktivierung ruhender Th2-Zellen exprimiert wird^{77,78}. Vor dem Hintergrund der hier gezeigten NFAT-abhängigen Bindung der ATPase-Untereinheit Brg1 an die HS Va lässt sich somit postulieren, dass NFAT nach Aktivierung ruhender Th2-Zellen an spezifische NFAT-Bindungsstellen innerhalb der Va-Region bindet und über die Interaktion mit Untereinheiten des SWI/SNF-Komplexes die epigenetische Öffnung der HS Va induziert.

4.4 IL-4-produzierende und IL-4-nichtproduzierende Th2-Zellen unterscheiden sich in der NFAT-abhängigen Bindung des untersuchten Transkriptionsfaktorkomplexes an den IL-4-Lokus

Die Analyse der Transkriptionsfaktorbesetzung am IL-4-Promoter und an der HS Va in aktivierten, IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen zeigte eine differentielle Bindung des untersuchten Transkriptionsfaktorkomplexes. Die Abbildung 4.2 stellt die Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungen zusammenfassend dar.

Für die RNA-Polymerase-II sowie die Transkriptionsfaktoren NFAT1, NFAT2, c-MAF, NF- κ B/p65 und p300 konnte eine Bindung am IL-4-Promoter ausschließlich in IL-4-produzierenden Th2-Zellen nachgewiesen werden.

An der HS Va zeigte sich ebenso eine differentielle Bindung der Faktoren NFAT1, NFAT2, p300 und SWI/SNF/Brg1. Vergleichend mit unstimulierten Th2-Zellen konnte hierbei jedoch auch in den IL-4-Nichtproduzenten eine leicht erhöhte Bindungsaktivität der untersuchten Transkriptionsfaktoren demonstriert werden.

Die Transkriptionsfaktoren STAT6 und GATA-3 waren im Gegensatz dazu sowohl in IL-4-produzierenden als auch in IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen mit dem IL-4-Promoter bzw. der CIRE-Region und der HS Va assoziiert.

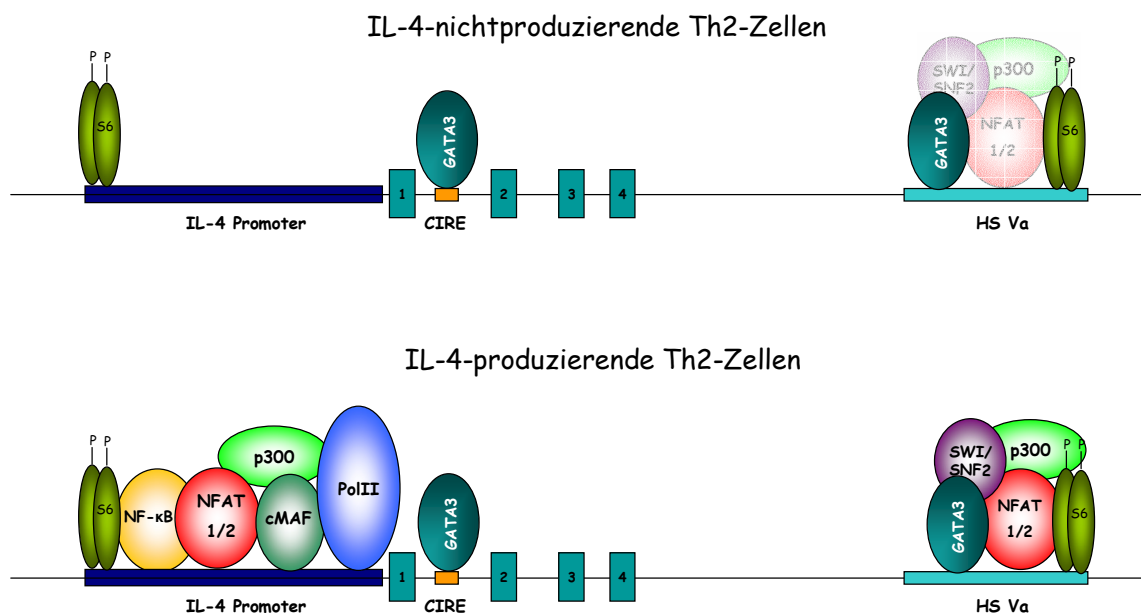


Abb. 4.2: Die schematische Darstellung der Transkriptionsfaktorbesetzung am IL-4-Promoter und an der HS Va in aktivierten, IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen.

Durch eine Analyse der epigenetischen Histonmodifizierungen im Bereich der IL-4-Promoterregion konnte zudem eine leicht erhöhte Histon-H3-Azetylierung in den IL-4-produzierenden Th2-Zellen gezeigt werden.

Die fehlende NFAT1/2-Bindung am IL-4-Lokus in IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen erklärt die in diesen Zellen vorliegende IL-4-Expressionsdefizienz. Zahlreiche Studien konnten diesbezüglich die zentrale Bedeutung der NFAT-Proteine für die restimulationsabhängige Expression des IL-4-Gens herausstellen^{79-81,83}. Eine fehlende Transaktivierungsaktivität von NFAT am IL-4-Promoter führt unweigerlich zu einem Verlust der IL-4-Transkription⁸¹.

Der Verlust der NFAT-Bindungsaktivität am IL-4-Lokus in den IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen ist dabei weder auf eine geringere NFAT-Expression, noch auf eine im Vergleich zu den IL-4-produzierenden Th2-Zellen verringerte NFAT-Aktivierung zurückzuführen. Sowohl im Western Blot als auch in der Immunfluoreszenzfärbung konnte in IL-4-Produzenten als auch in IL-4-Nichtproduzenten eine vergleichbare NFAT1- und NFAT2-Proteinexpression und nukleäre Lokalisation beider Faktoren nachgewiesen werden.

Diese Erkenntnisse stehen somit im Einklang mit Untersuchungen von Guo et al., die bereits eine äquivalente Lokalisation von NFAT1 in IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen demonstrieren konnten¹⁶⁹. Die in beiden Zellpopulationen gezeigte, nahezu gleichstarke NFAT1-Bindung an den Promotoren der NFAT-abhängigen Zielgene CD40L, IL-2 und CD25 im Vergleich zur differentiellen Bindung am IL-4-Promoter verdeutlicht dabei, dass NFAT auch in den IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen generell aktiv ist und an NFAT-spezifische Consensusmotive innerhalb regulatorischer DNA-Regionen bindet.

Die im Vergleich zu den IL-4-Nichtproduzenten differentielle Bindung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B/p65, c-MAF, p300 und SWI/SNF/Brg1 in den IL-4-Produzenten lässt sich durch die demonstrierte NFAT-Abhängigkeit der Transkriptionsfaktorbindungen erklären. Die fehlende NFAT-Bindung in den IL-4-Nichtproduzenten führt dabei zu einem nahezu kompletten Verlust der Rekrutierung von p65, c-MAF und p300 an den IL-4-Promoter. In diesem Zusammenhang könnte die in den IL-4-produzierenden Th2-Zellen vorliegende, erhöhte Histon-H3-Azetylierung auf die differentielle Bindung von p300 an den IL-4-Promoter und die damit verbundene differentielle Histonazetyltransferaseaktivität zurückzuführen sein.

Der Nachweis der im Gegensatz zu ruhenden Th2-Zellen geringfügig erhöhten NFAT-Bindungsaktivität an der HS Va in den IL-4-Nichtproduzenten erklärt die ebenfalls geringfügige Assoziation der Transkriptionsfaktoren p300 und SWI/SNF/Brg1.

Die differentielle Bindung von NFAT, p300 und Brg1 an der HS Va in ruhenden, IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen steht dabei im Einklang mit der von Guo et al. gezeigten, unterschiedlichen Chromatinöffnung der HS Va. Im Vergleich zu IL-4-Nichtproduzenten sind IL-4-produzierende Th2-Zellen durch eine circa zwei bis dreifach erhöhte Chromatinzugänglichkeit an der HS Va charakterisiert¹⁶⁹.

Daher ist anzunehmen, dass sich die differentielle NFAT-Bindung an der HS Va und die damit verbundene differentielle Assoziation und Aktivität des Chromatin-Remodeling-Komplexes SWI/SNF direkt in der Veränderung der Chromatinkonfiguration dieser Region widerspiegeln.

Die gezeigte STAT6-Bindung am IL-4-Promoter und an der HS Va in ruhenden sowie stimulierten, IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen verdeutlicht, dass der IL-4/IL-4-R/STAT6-Signaltransduktionsweg in den analysierten Th2-Zellen unabhängig vom Stimulationszustand und unabhängig von der IL-4-Expression aktiviert ist. Eine entscheidende Rolle von STAT6 als Determinante der stochastischen IL-4-Expression ist daher eher unwahrscheinlich. Untersuchungen von Löhning et al. ergaben in diesem Zusammenhang, dass das IL-4-Expressiongedächtnis in differenzierten Th2-Zellen IL-4-unabhängig vermittelt wird und selbst eine Blockierung der IL-4/IL-4-R-Signalkette durch Zugabe inhibitorischer Anti-IL-4-Antikörper in die Zellkultur die stochastisch determinierte IL-4-Expression nicht beeinflusst¹⁸⁰. Die funktionelle Bedeutung von STAT6 scheint somit vielmehr in der Induktion der Th2-Differenzierung und der Expressionsinduktion des Transkriptionsfaktors GATA-3 zu liegen^{27,28}.

Bezüglich der gezeigten, nichtdifferentiellen Bindung von GATA-3 an der CIRE- und HS-Va-Region in IL-4-produzierenden sowie IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen widersprechen die hier gezeigten Analysen Untersuchungen von Tykocinski et al. und Cheng et al., die eine differentielle Bindung von GATA-3 an beide Regionen nur in IL-4-produzierenden Th2-Zellen nachweisen konnten^{135,197}. Bei der Interpretation dieser Daten ist jedoch zu berücksichtigen, dass in beiden Untersuchungen, im Gegensatz zu den in dieser Arbeit verwendeten zwei Wochen alten Th2-Zellen, Zellen analysiert wurden, die jeweils nur für wenige Tage *in-vitro*-differenziert wurden. Während eines frühen Zeitpunktes der Th2-Zelldifferenzierung besteht durchaus die Möglichkeit, dass die IL-4-Expressionsheterogenität der Zellen auf einen unterschiedlichen Differenzierungszustand und somit auf eine unterschiedliche GATA-3-Bindungsaktivität am IL-4-Lokus zurückzuführen ist.

Die in dieser Arbeit gezeigte, massive GATA-3-Expression, nukleäre Lokalisation und DNA-Bindung an der CIRE- und der HS-Va-Region sowohl in IL-4-Produzenten als auch in IL-4-Nichtproduzenten unterstreicht dabei den terminalen Differenzierungsgrad der analysierten Zellen und verdeutlicht zugleich, dass GATA-3 als Determinante der stochastischen IL-4-Expressionsregulation eine untergeordnete Rolle spielt. Dies wird durch Untersuchungen von Zhu et al. an konditionellen GATA-3-Knock-out-Mäusen bestätigt⁶⁵. Eine konditionelle Deletion von GATA-3 in differenzierten Th2-Zellen führt zwar zu einer drastischen Reduktion der Expression der Zytokine IL-5 und IL-13, jedoch zu keiner Veränderung der prozentualen IL-4-Expressionsrate. In diesem Zusammenhang könnte jedoch eine Redundanz von STAT6 und GATA-3 bei der Aufrechterhaltung der für differenzierte Th2-Zellen charakteristischen Chromatinveränderungen im Bereich des IL-4-Lokus eine wichtige Rolle spielen. Untersuchungen von Tykocinski et al. konnten bereits auf eine mögliche funktionelle Redundanz beider Faktoren bei der Ausbildung eines frühen IL-4-Expressionsgedächtnisses hinweisen¹³⁵. Existierende Studien zur Funktion von STAT6 und GATA-3 bei der Regulation der aktivierungsabhängigen IL-4-Expression in differenzierten Th2-Zellen^{65,180} haben hingegen die Möglichkeit einer funktionellen Redundanz beider Faktoren außer acht gelassen. Vor diesem Hintergrund wäre zu klären, ob differenzierte Th2-Zellen, in denen GATA-3 konditionell deletiert wurde, auch nach Weiterkultivierung unter einer zusätzlichen Blockade des IL-4/IL-4-R-Signaltransduktionsweges durch inhibitorische Anti-IL-4-Antikörper zur restimulationsabhängigen IL-4-Expression fähig sind.

4.5 IL-4-produzierende und IL-4-nichtproduzierende Th2-Zellen sind durch ein differentielles Genexpressionsmuster charakterisiert

Über die Charakterisierung des IL-4-Lokus-assoziierten Transkriptionsfaktorkomplexes hinaus konnte durch die genomweite Affymetrix-Microarray-Analyse ein differentielles Genexpressionsmuster zwischen IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen detektiert werden. Die untersuchten Zellpopulationen zeigten dabei signifikante Genexpressionsunterschiede bei insgesamt 68 Genen, wovon 52 Gene differentiell in den IL-4-produzierenden und 16 Gene differentiell in den IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen erhöht exprimiert waren (siehe Tabelle 3.1 und 3.2). Für den Großteil dieser Faktoren ist eine direkte oder indirekte Beteiligung bei der Regulation der IL-4-Expression bisher nicht gezeigt bzw. untersucht worden und bedarf nach Bestätigung der differentiellen Expression mittels quantitativer RT-PCR weitergehenden Analysen.

Für einige wenige Faktoren konnten bereits verschiedene Untersuchungen eine Beteiligung bei der Expressionsregulation bestimmter Zytokingene belegen.

Vor dem Hintergrund einer möglichen Involvierung bei der Induktion der IL-4-Expression ist beispielsweise die IL-4-syngene Expression des Zytokins Interleukin-3 interessant, für das verschiedene Studien eine Verstärkerrolle bei der restimulationsabhängigen IL-4-Expression nachweisen konnten^{198,199}. Diesbezüglich muss im Rahmen weiterer Untersuchungen experimentell überprüft werden, ob nach Aktivierung differenzierter Th2-Zellen und zusätzlicher Blockade des IL-3/IL-3-Rezeptor-Signaltransduktionsweges durch inhibitorische anti-IL-3-Antikörper eine Inhibition der IL-4-Expression zu beobachten ist bzw. ob durch den Zusatz von rekombinantem IL-3 die IL-4-Expression auch in den IL-4-Nichtproduzenten induziert werden kann.

Die in den IL-4-Produzenten detektierte, differentiell erhöhte Expression des *Repressor of GATA-3*, ROG, erscheint vor dem Hintergrund der bisherigen Erkenntnisse über die zelluläre Funktion von ROG überraschend. Verschiedenen Studien konnten diesbezüglich zeigen, dass ROG einerseits die TCR-vermittelte T-Zell-Aktivierung vermindert und andererseits über die Interaktion mit GATA-3 dessen Transaktivierungsaktivität blockiert²⁰⁰⁻²⁰². Inwieweit ROG auch als positiver Aktivator der IL-4-Expression wirken kann, ist derzeit nicht bekannt.

Bei der Analyse des differentiellen Genexpressionsmusters konnten darüber hinaus verschiedene Mitglieder der Tumor-Nekrose-Faktor-Ligand- und -Rezeptor-Superfamilie (TNFSF und TNFRSF) detektiert werden, die selektiv in den IL-4-produzierenden Th2-Zellen überexprimiert waren. Darunter befanden sich die Faktoren LIGHT (*tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14*), RANKL (*tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11*), CD30L (*tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8*) sowie CD27-Antigen (*tumor necrosis factor receptor superfamily, member 7*). Diese Liganden bzw. Rezeptoren aktivieren als kostimulatorische Moleküle verschiedene Signalwege, die u.a. in der Aktivierung der NF- κ B- und AP-1-Transkriptionsfaktoren münden²⁰³. Da jedoch die zur Stimulation der Th2-Zellen verwendeten Substanzen Ionomycin als Calcium-Ionophor und PMA als Aktivator der Protein-Kinase-C bezüglich der Signaltransduktionskette unterhalb der Ligand/Rezeptor-Signalübertragung angreifen, ist eine entscheidende Rolle der TNFSF/TNFRSF bei der stochastischen Regulation der IL-4-Expression eher unwahrscheinlich. Dennoch müssen für eine abschließende Aussage über die eventuelle Beteiligung dieser kostimulatorischen Moleküle bei der stochastischen Regulation der IL-4-Expression weitergehende Untersuchungen durchgeführt werden.

Die in den IL-4-Nichtproduzenten differentiell überexprimierten Gene sind vor allem vor dem Hintergrund der Inhibition der NFAT-vermittelten Transkriptionsfaktorrekutierung an den IL-4-Promoter interessant. So konnte in den IL-4-Nichtproduzenten eine differentielle Überexpression der Faktoren SOCS1 und SOCS2 (*suppressor of cytokine signaling1/2*) sowie des IL-4-repressorischen Transkriptionsfaktors IRF-1 (*interferon regulatory factor 1*) detektiert werden. Zahlreiche Studien konnten für die SOCS-Proteine eine inhibitorische Funktion für verschiedene Zytokin-Signaltransduktionswege nachweisen²⁰⁴⁻²⁰⁷. Losmann et al. und andere konnten diesbezüglich zeigen, dass SOCS1 über die Inhibition der JAK1/3-Phosphorylierung die Aktivität des Transkriptionsfaktors STAT6 vermindert^{204,208,209}. Die SOCS-vermittelte Inhibition der STAT6-Aktivierung scheint vor dem Hintergrund der äquivalenten STAT6-Bindungsaktivität in IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen jedoch vernachlässigbar zu sein. Inwieweit SOCS1 und SOCS2 zusätzlich zur inhibitorischen Beeinflussung verschiedener JAK/STAT-Signalwege die Expression von IL-4 auf Chromatinebene beeinflussen kann, ist derzeit nicht bekannt.

Bezüglich des Transkriptionsfaktors IRF1 (*Interferon regulatory factor 1*) bestätigte sich in nachfolgenden, quantitativen RT-PCR-Analysen ein etwa 2-3facher differentieller Expressionsunterschied zwischen IL-4-nichtproduzierenden und IL-4-produzierenden Th2-Zellen (Daten nicht gezeigt). Elser et al. konnten zeigen, dass IRF1 nach T-Zellaktivierung an drei verschiedene Bindungsstellen innerhalb des IL-4-Promoters bindet und die IL-4-Transkription dosisabhängig inhibiert¹⁷. IRF1-defiziente Mäuse sind zudem durch eine ausgeprägte Th2-Polarisierung charakterisiert, wobei schon naive IRF1^{-/-}-T-Zellen stimulationsabhängig große Mengen an IL-4 exprimieren¹⁷.

Hierzu müssen weitere Untersuchungen erfolgen, um die funktionelle Bedeutung von IRF1 bei der stochastischen Regulation der IL-4-Expression in differenzierten Th2-Zellen zu bestätigen.

4.6 Ein molekulares Modell der stochastisch-determinierten IL-4-Expression

Durch die Charakterisierung der Transkriptionsfaktorbesetzung am IL-4-Promoter und an der HS Va in IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Bindung von NFAT1/2 sowie die NFAT-abhängige Rekrutierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B/p65, c-MAF, p300 und SWI/SNF/Brg1 eine Schlüsselrolle bei der stochastischen Regulation der IL-4-Expression einnehmen.

Die IL-4-Expressionsdefizienz in den IL-4-Nichtproduzenten ist dabei auf eine drastische Verminderung bzw. einen kompletten Verlust der NFAT-Bindung und der damit verbundenen, fehlenden Rekrutierung der genannten Transkriptionsfaktoren insbesondere am IL-4-Promoter zurückzuführen. Basierend auf den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen lässt sich daraus ein Modell entwerfen, das die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen der stochastischen IL-4-Expression beschreibt und schematisch in der Abbildung 4.3 dargestellt ist.

In ruhenden, differenzierten Th2-Zellen ist der IL-4-Lokus alleinig durch den Transkriptionsfaktor STAT6 besetzt, der vermutlich durch die exogene sowie stimulationsabhängige, endogene IL-4-Zufuhr nahezu konstitutiv aktiviert ist. Nach Stimulation des T-Zell-Rezeptors und kostimulatorischer Moleküle kommt es zur Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege, die u. a. in der Aktivierung und nukleären Translokation der NFAT-Proteine NFAT1 und NFAT2 münden. NFAT1 und NFAT2 binden daraufhin an verschiedene NFAT-Consensus-Motive innerhalb des IL-4-Promoters und der HS Va und induzieren direkt bzw. auch indirekt die Assoziation der Transkriptionsfaktoren NF- κ B/p65, c-MAF, p300, SWI/SNF/Brg1 sowie GATA-3 an den IL-4-Lokus. Der IL-4-Promoter ist dabei zusammen mit anderen cis-regulatorischen Regionen wie der HS Va, der CNS-1- oder der Lokus-Kontroll-Region (LCR) in einem Chromatin-Kernkomplex assoziiert.

Die restimulationsabhängige Rekrutierung des Chromatin-Remodeling-Komplexes SWI/SNF an die HS Va führt zur Veränderung der Chromatinkonfiguration innerhalb dieser Region, die sich in einer erhöhten Sensitivität gegenüber verschiedenen DNA-Restriktionsendonukleasen zeigt und vermutlich die Voraussetzung für die DNA-Bindung weiterer Transkriptionsfaktoren darstellt.

Über die Stabilisierung des an den IL-4-Lokus gebundenen Transkriptionsfaktorkomplexes und die Rekrutierung des transkriptionellen Koaktivators p300 vermittelt NFAT die Assoziation der RNA-Polymerase-II an den IL-4-Promoter und darüber die Initiation der IL-4-Transkription.

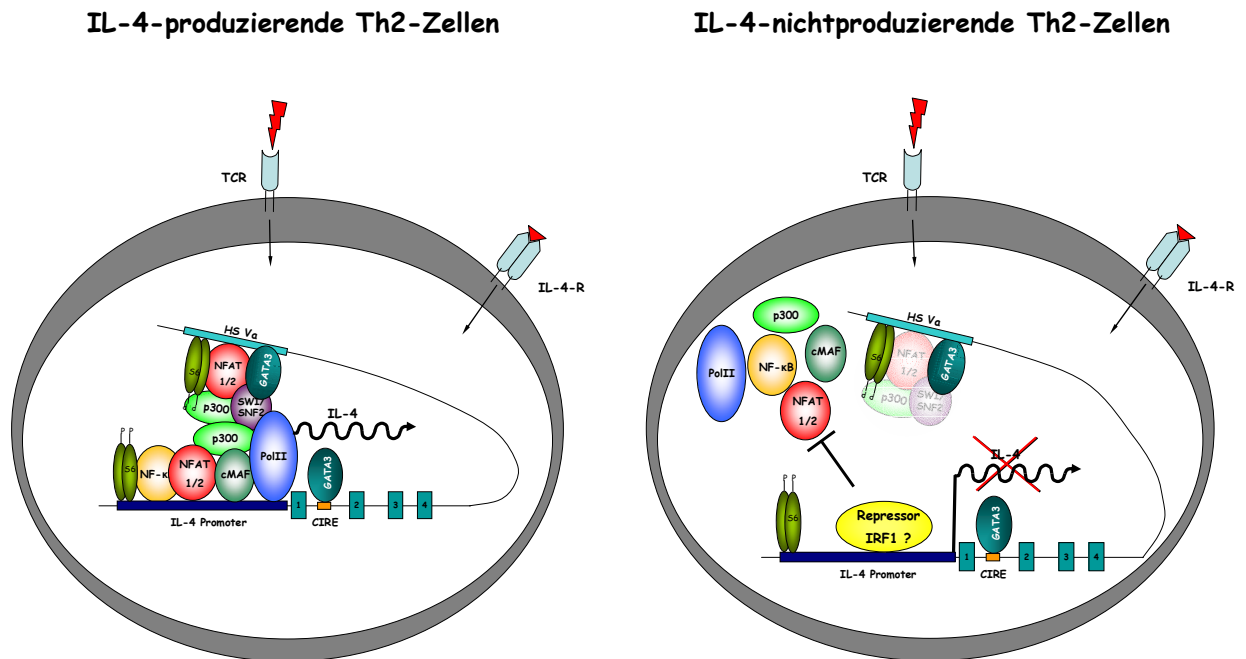


Abb. 4.3: Ein molekulares Modell der stochastisch determinierten IL-4-Expression. In IL-4-produzierenden Th2-Zellen ist ein Transkriptionsfaktorkomplex bestehend aus NFAT1/2, NF-κB, c-MAF, p300, SWI/SNF/Brg1, GATA-3 und STAT6 an den IL-4-Locus gebunden und vermittelt über die Rekrutierung der RNA-Polymerase-II an den IL-4-Promoter die Initiation der IL-4-Transkription. In IL-4-Nichtproduzenten ist die Bindung der Transkriptionsfaktoren NFAT1 und NFAT2 und die damit verbundene Rekrutierung der Faktoren NF-κB, c-MAF und p300 an den IL-4-Promoter hingegen blockiert. Die RNA-Polymerase-II wird aufgrund der fehlenden Transaktivierungsaktivität nicht an den IL-4-Promoter rekrutiert und die IL-4-Transkription nicht induziert. Eine spezifische und stochastische Inhibition der NFAT-Rekrutierung an den IL-4-Promoter könnte dabei durch einen transkriptionellen Repressor wie z. Bsp. IRF1 vermittelt werden, der spezifisch an den IL-4-Promoter bindet und mit NFAT um die Promoterbindung konkurriert.

In aktivierten, aber IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen werden die NFAT-Proteine NFAT1 und NFAT2 nach Stimulation ebenfalls aktiviert, translozieren in den Zellkern und aktivieren durch Bindung an verschiedene NFAT-Consensusmotive NFAT-abhängige Zielgene. Aus bisher ungeklärter Ursache wird die Bindung von NFAT1/2 an den IL-4-Promoter jedoch inhibiert, was eine fehlende Rekrutierung der Transkriptionsfaktoren NF-κB/p65, c-MAF und p300 zur Folge hat.

GATA-3 bindet abhängig von der NFAT-Aktivierung, aber unabhängig von der NFAT-Bindung am IL-4-Promoter auch in den IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen an die CIRE- sowie die HS-Va-Region, ist alleinig jedoch nicht in der Lage, die Transkription des IL-4-Gens zu induzieren.

Die fehlende Transkriptionsfaktorassemblierung am IL-4-Promoter scheint dabei aufgrund des vorliegenden Chromatinkernkomplexes auch die Transkriptionsfaktorrekrutierung an der HS Va zu beeinflussen. Im Vergleich zu ruhenden Th2-Zellen findet hierbei jedoch eine geringfügige Assoziation der Transkriptionsfaktoren NFAT1/2, p300 und SWI/SNF/Brg1 statt, die infolge der Chromatin-Remodeling-Aktivität des SWI/SNF-Komplexes zu einer geringfügigen bzw. nur kurzweiligen Veränderung der Chromatinkonfiguration führt.

Aufgrund der fehlenden Transkriptionsfaktorassemblierung insbesondere der fehlenden Bindung des transkriptionellen Koaktivators p300 wird die RNA-Polymerase-II nicht an den IL-4-Promoter rekrutiert und die IL-4-Transkription nicht initiiert.

Die differentielle Bindung des NFAT-abhängigen Transkriptionsfaktorkomplexes insbesondere am IL-4-Promoter könnte einerseits durch die Existenz eines essentiellen Koaktivators erklärt werden, der nur in IL-4-produzierenden Th2-Zellen aktiv bzw. exprimiert ist und die Bindung von NFAT an den IL-4-Promoter vermittelt. Andererseits könnte jedoch auch die Aktivität eines transkriptionellen Repressors, der spezifisch nur in IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen mit dem IL-4-Promoter assoziiert ist und die Bindung des NFAT-abhängigen Transkriptionsfaktorkomplexes inhibiert, postuliert werden.

Im Falle eines für die NFAT-Bindung essentiellen Koaktivators müsste hierbei eine Spezifität ausschließlich am IL-4-Promoter gegeben sein, da NFAT sowohl in IL-4-produzierenden als auch in IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen an verschiedene andere Promotoren NFAT-abhängiger Zielgene binden kann. Selbst an der HS Va-Region konnte in IL-4-Nichtproduzenten eine geringfügige NFAT-Aktivität nachgewiesen werden.

Da im Bereich des IL-4-Promoters sechs verschiedene NFAT-Bindungsstellen über einen DNA-Abschnitt von mehr als 350 bp verteilt sind, erscheint es eher unwahrscheinlich, dass die aktivierten NFAT-Proteine spezifisch nur in Anwesenheit eines Kofaktors in der Lage sein sollten, an all diese Bindungsstellen zu binden.

Denkbar wäre in diesem Zusammenhang auch, dass der IL-4-Promoter erst durch die Bindung eines hypothetischen Faktors epigenetisch geöffnet werden muss, damit die NFAT-Proteine an ihre entsprechenden Bindungsstellen rekrutiert werden können. Diesbezüglich konnten Studien von Guo et al. jedoch eindeutig nachweisen, dass in IL-4-produzierenden sowie IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen eine vergleichbare Chromatinzugänglichkeit im Bereich des IL-4-Promoters vorliegt¹⁶⁹.

Die in dieser Arbeit gezeigte, in IL-4-Produzenten und IL-4-Nichtproduzenten vorliegende äquivalente Histon-H3-K4-Methylierung im Bereich des IL-4-Promoters verdeutlicht dabei zusätzlich, dass sowohl IL-4-produzierende als auch IL-4-nichtproduzierende Th2-Zellen durch eine transkriptionell aktive Chromatinkonfiguration im IL-4-Promoterbereich charakterisiert sind. Die leicht erhöhte Histon-H3-Azetylierung am IL-4-Promoter der IL-4-Produzenten ist dabei vermutlich auf die differentielle Bindung von p300/CBP, das eine intrinsische Histonazetyltransferaseaktivität besitzt, zurückzuführen.

Die stochastische Regulation der IL-4-Expression ist vor dem Hintergrund der fehlenden NFAT-Bindung am IL-4-Promoter in den IL-4-Nichtproduzenten am ehesten durch die Existenz eines transkriptionellen Repressors zu erklären, der spezifisch mit dem IL-4-Promoter assoziiert ist und mit NFAT um die Promoterbindung konkurriert.

Ein funktioneller Repressor könnte dabei ein konkreter Faktor sein, der entsprechende Bindungsstellen am IL-4-Promoter besitzt und direkt bzw. indirekt über die Assoziation mit repressori-schen Proteinen die NFAT-vermittelte Rekrutierung des Transkriptionsfaktorkomplexes an den IL-4-Promoter blockiert.

Andererseits könnten wiederum epigenetische Mechanismen wie DNA-Methylierungen im Bereich des IL-4-Promoters die Zugänglichkeit für aktivierte NFAT-Proteine verringern. Jones et al. konnten beispielsweise für den IFN γ -Promoter zeigen, dass eine spezifische CpG-Methylierung an Position -53 die Bindung der Transkriptionsfaktoren ATF2/c-Jun und CREB blockiert und dadurch die IFN γ -Transkription in differenzierten Th2-Zellen inhibiert²¹⁰. Eine solche Situation liegt am IL-4-Promoter jedoch nicht vor, da die im Promoterbereich vorhandenen CpGs nicht innerhalb einzelner NFAT-Bindungsstellen lokalisiert sind. Tykocinski et al. konnten zudem zeigen, dass der IL-4-Promoter bereits zu einem sehr frühen Differenzierungszeitpunkt sowohl in IL-4-produzierenden als auch in IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen komplett demethyliert wird¹³⁵. Die in diesem Zusammenhang demonstrierte differentielle Demethylierung im Bereich des ersten Introns des IL-4-Gens unterstreicht dabei die Rolle der CIRE-Region bei der Ausbildung eines frühen IL-4-Expressionsgedächtnisses.

Zwar konnten Studien von Guo et al. durch die Analyse verschiedener IL-4-produzierender und IL-4-nichtproduzierender Th2-Zellklone zeigen, dass die Demethylierung im Bereich der CNS-1-Region mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit der IL-4-Expression assoziiert ist¹⁶⁹, eine direkte Schlussfolgerung bezüglich der stochastisch-determinierten IL-4-Expression ist daraus jedoch nicht abzuleiten. So waren innerhalb eines Th2-Zellklones, bei dem stabil 30% der Zellen nach Stimulation IL-4 exprimierten, 15 von 15 untersuchten CNS-1-Allelen komplett demethyliert.

Bei Annahme einer besonderen Bedeutung des CNS-1-Methylierungsstatus bei der Vermittlung der stochastischen IL-4-Expressionsregulation müsste man jedoch erwarten, dass bei 70% IL-4-nichtproduzierender Zellen innerhalb dieses Zellklones über die Hälfte der untersuchten Allele in einem methylierten Zustand vorliegt.

Einen epigenetischen Hintergrund der stochastischen IL-4-Expression erscheint zudem eher unwahrscheinlich, da epigenetische Veränderungen wie Histonmodifizierungen und DNA-Methylierungen die Ausbildung stabiler Expressionsmuster vermitteln und weniger als Mechanismen der akuten Expressionsregulation dienen^{211,212}.

Ein hypothetisches Modell eines transkriptionellen Repressors, der nur in IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen spezifisch am IL-4-Promoter gebunden ist und mit NFAT um die Bindung an den IL-4-Promoter konkurriert, beschreibt die Vorgänge der stochastischen Regulation der IL-4-Expression am ehesten. Diese ist charakterisiert durch eine, nach Aktivierung differenzierter Th2-Zellen, wahrscheinlichkeitsbedingten und zwischen den jeweiligen IL-4-Allelen unabhängigen Induktion der IL-4-Transkription¹⁷¹. Die Wahrscheinlichkeit der IL-4-Transkription pro IL-4-Allel ist dabei kleiner als eins. Dies hat zur Folge, dass innerhalb einer aktivierten Th2-Zellpopulation IL-4-nichtproduzierende, monoallelisch-IL-4-exprimierende sowie zu einem geringen Prozentsatz auch biallelisch-IL-4-exprimierende Th2-Zellen existieren¹⁷⁰. Bei Vorliegen eines transkriptionellen Repressors, der mit NFAT um die Bindung an den IL-4-Promoter konkurriert, ist zum einen eine Spezifität am IL-4-Promoter und zum anderen die Unabhängigkeit der IL-4-Transkription zwischen beiden IL-4-Allelen gegeben. Über die Konzentration des Repressors kann darüber hinaus die Zahl IL-4-exprimierender Th2-Zellen innerhalb der gesamten Zellpopulation bei Aufrechterhaltung der stochastischen Determinierung reguliert werden. Liegt der Repressor in einer relativ zur NFAT-Menge niedrigen Konzentration vor, ist dabei die Wahrscheinlichkeit, dass NFAT an den IL-4-Promoter binden und die IL-4-Transkription über die Rekrutierung des Transkriptionsfaktorkomplexes induzieren kann, höher als bei einer höheren Konzentration des Repressors. In ausdifferenzierten Th2-Zellen könnte zudem ein steady-state-Niveau des relativen NFAT/Repressor-Verhältnisses erreicht werden, dass einen annähernd stabilen Prozentsatz IL-4-produzierender Th2-Zellen innerhalb der Gesamtpopulation gewährleistet.

Durch die Situation, dass die Konkurrenz zwischen NFAT und einem hypothetischen Repressor um die Bindung an den IL-4-Promoter nach jeder Stimulation differenzierter Th2-Zellen erneut auftritt, würde sich die stochastische und von dem jeweiligen IL-4-Expressionszustand zurückliegender Th2-Zellaktivierungen unabhängige IL-4-Transkription erklären.

Der im Rahmen der genomweiten Genexpressionsanalyse detektierte Faktor IRF1 könnte dabei eine Hauptfunktion als transkriptioneller Repressor in den IL-4-Nichtproduzenten spielen. IRF1 wird in T-Zellen stimulationsabhängig aktiviert und bindet innerhalb des IL-4-Promoters an drei verschiedene DNA-Bindungsstellen. Die Rekrutierung an den IL-4-Promoter führt dabei zu einer kompletten Inhibition der IL-4-Transkription¹⁷. Die Tatsache, dass IRF1 innerhalb einer Zellpopulation dosisabhängig die Expression von IL-4 blockiert, weist zusätzlich auf eine eventuelle Konkurrenz mit der NFAT-vermittelten Transkriptionsfaktorrekutierung an den IL-4-Promoter hin. Die massiv gesteigerte IL-4-Expression in T-Zellen IRF1-defizienter Mäuse verdeutlicht dabei zusätzlich die *in-vivo*-Funktion von IRF-1 als transkriptionaler IL-4-Repressor.

Das hier beschriebene molekulare Modell lässt somit durch die Postulierung eines spezifischen transkriptionellen Repressors, mit Hinweisen auf eine mögliche Involvierung von IRF1, eine umfassende Beschreibung der stochastischen Regulation der IL-4-Expression mit all den beschriebenen Charakteristika zu.

5 Zusammenfassung

Interleukin-4 spielt als zentrales Zytokin der Th2-vermittelten Immunantwort sowohl eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung und Differenzierung von Th2-Effektorzellen als auch bei der Vermittlung wichtiger Th2-Effektorfunktionen. Eine Dysregulation der IL-4-Expression steht dabei in pathogenetischem Zusammenhang mit der Entstehung allergischer Erkrankungen wie Asthma bronchiale und anaphylaktischen Reaktionen.

Vor diesem Hintergrund war es das Ziel dieser Arbeit, die stochastische Regulation der IL-4-Expression in differenzierten Th2-Zellen, insbesondere den Status der Transkriptionsfaktorbesetzung am IL-4-Lokus in IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen, zu analysieren, um damit ein tiefergehendes Verständnis der komplexen IL-4-Regulation auf molekularer Ebene zu erhalten.

Für die Untersuchungen wurde dafür ein etabliertes Th2-in-vitro-Modellsystem verwendet, das die Analyse der IL-4-Expressionsregulation in differenzierten Th2-Zellen erlaubt.

Mittels der magnetischen Chromatin-Immunopräzipitation konnte dabei zunächst gezeigt werden, dass nach Aktivierung differenzierter Th2-Zellen ein Transkriptionsfaktorkomplex, bestehend aus den Faktoren NFAT1, NFAT2, NF- κ B/p65, c-MAF, p300, SWI/SNF/Brg1 und GATA-3, transient an den IL-4-Promoter/CIRE-Region und an die HS Va bindet und über die Rekrutierung der RNA-Polymerase-II die IL-4-Transkription induziert. Der Transkriptionsfaktor STAT6 ist hingegen sowohl in ruhenden als auch aktivierten Th2-Zellen konstitutiv mit dem IL-4-Lokus assoziiert.

Durch Verwendung des NFAT-spezifischen Inhibitors BTP1 konnte weitergehend demonstriert werden, dass die Rekrutierung des gesamten Transkriptionsfaktorkomplexes an den IL-4-Promoter von der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT abhängig ist.

In der Analyse der Transkriptionsfaktorbesetzung in IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen zeigte sich, dass beide Zellpopulationen durch eine äquivalente Expression, Aktivierung und DNA-Bindungsaktivität der NFAT-Faktoren NFAT1 und NFAT2 charakterisiert sind, NFAT1/2 sowie der NFAT-vermittelte Transkriptionsfaktorkomplex jedoch selektiv nur am IL-4-Promoter der IL-4-produzierenden Th2-Zellen gebunden ist. An der HS Va konnte ebenso eine differentielle Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktorkomplexes nachgewiesen werden, wobei jedoch auch IL-4-Nichtproduzenten durch eine im Vergleich zu ruhenden Th2-Zellen geringfügige Transkriptionsfaktorbesetzung gekennzeichnet sind.

Für die Transkriptionsfaktoren STAT6 und GATA-3 zeigte sich im Gegensatz dazu eine äquivalente Bindungsaktivität an der IL-4-Promoter-/CIRE-Region bzw. der HS Va.

Durch eine genomweite Genexpressionsanalyse konnten verschiedene, zwischen IL-4-produzierenden und IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen differentiell exprimierte Gene detektiert werden, die einen Ausgangspunkt für weitergehende Untersuchungen zu den zellbiologischen Mechanismen der stochastischen IL-4-Regulation darstellen.

Aus den gewonnenen Erkenntnissen der Transkriptionsfaktorbindungsanalysen wurde zusammenfassend ein molekulares Modell der stochastisch-determinierten IL-4-Expression entworfen. Dieses postuliert die Präsenz eines transkriptionellen Repressors, der spezifisch an den IL-4-Promoter bindet und über die Konkurrenz mit NFAT um die Bindung an den IL-4-Promoter die stochastische Regulation der IL-4-Expression vermittelt.

Diesbezüglich konnte im Rahmen der differentiellen Genexpressionsanalyse der selektiv in den IL-4-nichtproduzierenden Th2-Zellen erhöht exprimierte Faktor *Interferon regulatory factor 1* (IRF1) detektiert werden, für den bereits eine Bindung am IL-4-Promoter sowie eine inhibitorische Aktivität im Zusammenhang mit der IL-4-Transkription beschrieben wurde. Der transkriptionelle Repressor IRF1 stellt somit einen möglichen Vermittler der stochastischen Regulation der IL-4-Expression dar und muss diesbezüglich in weiteren Untersuchungen näher analysiert werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Ansel, K. M., Lee, D. U. & Rao, A. An epigenetic view of helper T cell differentiation. *Nat Immunol* **4**, 616-23 (2003).
2. Li-Weber, M. & Krammer, P. H. Regulation of IL4 gene expression by T cells and therapeutic perspectives. *Nat Rev Immunol* **3**, 534-43 (2003).
3. Mowen, K. A. & Glimcher, L. H. Signaling pathways in Th2 development. *Immunol Rev* **202**, 203-22 (2004).
4. Murphy, K. M. & Reiner, S. L. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* **2**, 933-44 (2002).
5. Abbas, A. K., Murphy, K. M. & Sher, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383**, 787-93 (1996).
6. Messi, M. et al. Memory and flexibility of cytokine gene expression as separable properties of human T(H)1 and T(H)2 lymphocytes. *Nat Immunol* **4**, 78-86 (2003).
7. Sad, S. & Mosmann, T. R. Single IL-2-secreting precursor CD4 T cell can develop into either Th1 or Th2 cytokine secretion phenotype. *J Immunol* **153**, 3514-22 (1994).
8. Wang, X. & Mosmann, T. In vivo priming of CD4 T cells that produce interleukin (IL)-2 but not IL-4 or interferon (IFN)-gamma, and can subsequently differentiate into IL-4- or IFN-gamma-secreting cells. *J Exp Med* **194**, 1069-80 (2001).
9. Grogan, J. L. et al. Early transcription and silencing of cytokine genes underlie polarization of T helper cell subsets. *Immunity* **14**, 205-15 (2001).
10. Harrington, L. E. et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* **6**, 1123-32 (2005).
11. Park, H. et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* **6**, 1133-41 (2005).
12. Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M. & Stockinger, B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* **24**, 179-89 (2006).
13. Bettelli, E. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* **441**, 235-8 (2006).
14. Mangan, P. R. et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* **441**, 231-4 (2006).
15. Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M. H., de Sauvage, F. J. & Gurney, A. L. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* **278**, 1910-4 (2003).
16. Sutton, C., Brereton, C., Keogh, B., Mills, K. H. & Lavelle, E. C. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* **203**, 1685-91 (2006).
17. Elser, B. et al. IFN-gamma represses IL-4 expression via IRF-1 and IRF-2. *Immunity* **17**, 703-12 (2002).
18. Kaplan, M. H., Sun, Y. L., Hoey, T. & Grusby, M. J. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature* **382**, 174-7 (1996).
19. Magram, J. et al. IL-12-deficient mice are defective but not devoid of type 1 cytokine responses. *Ann N Y Acad Sci* **795**, 60-70 (1996).
20. Thierfelder, W. E. et al. Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature* **382**, 171-4 (1996).
21. Szabo, S. J., Dighe, A. S., Gubler, U. & Murphy, K. M. Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J Exp Med* **185**, 817-24 (1997).
22. Lighvani, A. A. et al. T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 15137-42 (2001).
23. Szabo, S. J. et al. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science* **295**, 338-42 (2002).
24. Szabo, S. J. et al. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* **100**, 655-69 (2000).

25. Mullen, A. C. et al. Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science* **292**, 1907-10 (2001).
26. Finotto, S. et al. Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science* **295**, 336-8 (2002).
27. Nelms, K., Keegan, A. D., Zamorano, J., Ryan, J. J. & Paul, W. E. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol* **17**, 701-38 (1999).
28. Zheng, W. & Flavell, R. A. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* **89**, 587-96 (1997).
29. Zhang, D. H., Cohn, L., Ray, P., Bottomly, K. & Ray, A. Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene. *J Biol Chem* **272**, 21597-603 (1997).
30. Ouyang, W. et al. Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment. *Immunity* **12**, 27-37 (2000).
31. Lee, H. J. et al. GATA-3 induces T helper cell type 2 (Th2) cytokine expression and chromatin remodeling in committed Th1 cells. *J Exp Med* **192**, 105-15 (2000).
32. Lee, G. R., Fields, P. E. & Flavell, R. A. Regulation of IL-4 gene expression by distal regulatory elements and GATA-3 at the chromatin level. *Immunity* **14**, 447-59 (2001).
33. Kim, J. I., Ho, I. C., Grusby, M. J. & Glimcher, L. H. The transcription factor c-Maf controls the production of interleukin-4 but not other Th2 cytokines. *Immunity* **10**, 745-51 (1999).
34. Coffman, R. L. et al. B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells. *J Immunol* **136**, 4538-41 (1986).
35. Dabbagh, K. et al. IL-4 induces mucin gene expression and goblet cell metaplasia in vitro and in vivo. *J Immunol* **162**, 6233-7 (1999).
36. Ricci, M., Matucci, A. & Rossi, O. IL-4 as a key factor influencing the development of allergen-specific Th2-like cells in atopic individuals. *J Investig Allergol Clin Immunol* **7**, 144-50 (1997).
37. Steinke, J. W. & Borish, L. Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. *Respir Res* **2**, 66-70 (2001).
38. Marsh, D. G. et al. Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. *Science* **264**, 1152-6 (1994).
39. Rosenwasser, L. J. & Borish, L. Genetics of atopy and asthma: the rationale behind promoter-based candidate gene studies (IL-4 and IL-10). *Am J Respir Crit Care Med* **156**, S152-5 (1997).
40. Song, Z. et al. Polymorphic nucleotides within the human IL-4 promoter that mediate overexpression of the gene. *J Immunol* **156**, 424-9 (1996).
41. Mitsuyasu, H. et al. Ile50Val variant of IL4R alpha upregulates IgE synthesis and associates with atopic asthma. *Nat Genet* **19**, 119-20 (1998).
42. Heinzmann, A. et al. Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy. *Hum Mol Genet* **9**, 549-59 (2000).
43. Gao, P. S. et al. Variants of STAT6 (signal transducer and activator of transcription 6) in atopic asthma. *J Med Genet* **37**, 380-2 (2000).
44. Herrick, C. A. & Bottomly, K. To respond or not to respond: T cells in allergic asthma. *Nat Rev Immunol* **3**, 405-12 (2003).
45. Ray, A. & Cohn, L. Th2 cells and GATA-3 in asthma: new insights into the regulation of airway inflammation. *J Clin Invest* **104**, 985-93 (1999).
46. Panina-Bordignon, P. et al. The C-C chemokine receptors CCR4 and CCR8 identify airway T cells of allergen-challenged atopic asthmatics. *J Clin Invest* **107**, 1357-64 (2001).
47. Daher, S. et al. Interleukin-4 and soluble CD23 serum levels in asthmatic atopic children. *J Investig Allergol Clin Immunol* **5**, 251-4 (1995).
48. Walker, C. et al. Activated T cells and cytokines in bronchoalveolar lavages from patients with various lung diseases associated with eosinophilia. *Am J Respir Crit Care Med* **150**, 1038-48 (1994).
49. Chan, S. C. et al. Abnormal IL-4 gene expression by atopic dermatitis T lymphocytes is reflected in altered nuclear protein interactions with IL-4 transcriptional regulatory element. *J Invest Dermatol* **106**, 1131-6 (1996).

50. Hsieh, C. S., Heimberger, A. B., Gold, J. S., O'Garra, A. & Murphy, K. M. Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an alpha beta T-cell-receptor transgenic system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6065-9 (1992).
51. Miyazaki, T. et al. Functional activation of Jak1 and Jak3 by selective association with IL-2 receptor subunits. *Science* **266**, 1045-7 (1994).
52. Witthuhn, B. A. et al. Involvement of the Jak-3 Janus kinase in signalling by interleukins 2 and 4 in lymphoid and myeloid cells. *Nature* **370**, 153-7 (1994).
53. Kaplan, M. H., Schindler, U., Smiley, S. T. & Grusby, M. J. Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity* **4**, 313-9 (1996).
54. Shimoda, K. et al. Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature* **380**, 630-3 (1996).
55. Takeda, K. et al. Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature* **380**, 627-30 (1996).
56. Zhu, J., Guo, L., Watson, C. J., Hu-Li, J. & Paul, W. E. Stat6 is necessary and sufficient for IL-4's role in Th2 differentiation and cell expansion. *J Immunol* **166**, 7276-81 (2001).
57. Kurata, H., Lee, H. J., O'Garra, A. & Arai, N. Ectopic expression of activated Stat6 induces the expression of Th2-specific cytokines and transcription factors in developing Th1 cells. *Immunity* **11**, 677-88 (1999).
58. Curiel, R. E. et al. Identification of a Stat-6-responsive element in the promoter of the human interleukin-4 gene. *Eur J Immunol* **27**, 1982-7 (1997).
59. Lederer, J. A. et al. Cytokine transcriptional events during helper T cell subset differentiation. *J Exp Med* **184**, 397-406 (1996).
60. Ho, I. C., Hodge, M. R., Rooney, J. W. & Glimcher, L. H. The proto-oncogene c-maf is responsible for tissue-specific expression of interleukin-4. *Cell* **85**, 973-83 (1996).
61. Finkelman, F. D. et al. Stat6 regulation of in vivo IL-4 responses. *J Immunol* **164**, 2303-10 (2000).
62. Jankovic, D. et al. Single cell analysis reveals that IL-4 receptor/Stat6 signaling is not required for the in vivo or in vitro development of CD4+ lymphocytes with a Th2 cytokine profile. *J Immunol* **164**, 3047-55 (2000).
63. Ouyang, W. et al. Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity* **9**, 745-55 (1998).
64. Pai, S. Y., Truitt, M. L. & Ho, I. C. GATA-3 deficiency abrogates the development and maintenance of T helper type 2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 1993-8 (2004).
65. Zhu, J. et al. Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in T(H)1-T(H)2 responses. *Nat Immunol* **5**, 1157-65 (2004).
66. Yamashita, M. et al. Essential role of GATA3 for the maintenance of type 2 helper T (Th2) cytokine production and chromatin remodeling at the Th2 cytokine gene loci. *J Biol Chem* **279**, 26983-90 (2004).
67. Das, J. et al. A critical role for NF-kappa B in GATA3 expression and TH2 differentiation in allergic airway inflammation. *Nat Immunol* **2**, 45-50 (2001).
68. Noben-Trauth, N., Kropf, P. & Muller, I. Susceptibility to Leishmania major infection in interleukin-4-deficient mice. *Science* **271**, 987-90 (1996).
69. Chang, H. D. et al. Expression of IL-10 in Th memory lymphocytes is conditional on IL-12 or IL-4, unless the IL-10 gene is imprinted by GATA-3. *Eur J Immunol* **37**, 807-17 (2007).
70. Shoemaker, J., Saraiva, M. & O'Garra, A. GATA-3 directly remodels the IL-10 locus independently of IL-4 in CD4+ T cells. *J Immunol* **176**, 3470-9 (2006).
71. Skapenko, A. et al. GATA-3 in human T cell helper type 2 development. *J Exp Med* **199**, 423-8 (2004).
72. Koretzky, G. A. & Myung, P. S. Positive and negative regulation of T-cell activation by adaptor proteins. *Nat Rev Immunol* **1**, 95-107 (2001).
73. Shibasaki, F., Price, E. R., Milan, D. & McKeon, F. Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4. *Nature* **382**, 370-3 (1996).
74. Rao, A., Luo, C. & Hogan, P. G. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* **15**, 707-47 (1997).
75. Northrop, J. P. et al. NF-AT components define a family of transcription factors targeted in T-cell activation. *Nature* **369**, 497-502 (1994).
76. Ho, S., Timmerman, L., Northrop, J. & Crabtree, G. R. Cloning and characterization of NF-ATc and NF-ATp: the cytoplasmic components of NF-AT. *Adv Exp Med Biol* **365**, 167-73 (1994).

77. Chuvpilo, S. et al. Multiple NF-ATc isoforms with individual transcriptional properties are synthesized in T lymphocytes. *J Immunol* **162**, 7294-301 (1999).
78. Chuvpilo, S. et al. Alternative polyadenylation events contribute to the induction of NF-ATc in effector T cells. *Immunity* **10**, 261-9 (1999).
79. Ranger, A. M. et al. Delayed lymphoid repopulation with defects in IL-4-driven responses produced by inactivation of NF-ATc. *Immunity* **8**, 125-34 (1998).
80. Yoshida, H. et al. The transcription factor NF-ATc1 regulates lymphocyte proliferation and Th2 cytokine production. *Immunity* **8**, 115-24 (1998).
81. Peng, S. L., Gerth, A. J., Ranger, A. M. & Glimcher, L. H. NFATc1 and NFATc2 together control both T and B cell activation and differentiation. *Immunity* **14**, 13-20 (2001).
82. Xanthoudakis, S. et al. An enhanced immune response in mice lacking the transcription factor NFAT1. *Science* **272**, 892-5 (1996).
83. Kiani, A., Viola, J. P., Lichtman, A. H. & Rao, A. Down-regulation of IL-4 gene transcription and control of Th2 cell differentiation by a mechanism involving NFAT1. *Immunity* **7**, 849-60 (1997).
84. Viola, J. P., Kiani, A., Bozza, P. T. & Rao, A. Regulation of allergic inflammation and eosinophil recruitment in mice lacking the transcription factor NFAT1: role of interleukin-4 (IL-4) and IL-5. *Blood* **91**, 2223-30 (1998).
85. Hodge, M. R. et al. Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice. *Immunity* **4**, 397-405 (1996).
86. Schuh, K. et al. NF-ATp plays a prominent role in the transcriptional induction of Th2-type lymphokines. *Immunol Lett* **57**, 171-5 (1997).
87. Schuh, K. et al. Retarded thymic involution and massive germinal center formation in NF-ATp-deficient mice. *Eur J Immunol* **28**, 2456-66 (1998).
88. Monticelli, S. & Rao, A. NFAT1 and NFAT2 are positive regulators of IL-4 gene transcription. *Eur J Immunol* **32**, 2971-8 (2002).
89. Abe, E., De Waal Malefyt, R., Matsuda, I., Arai, K. & Arai, N. An 11-base-pair DNA sequence motif apparently unique to the human interleukin 4 gene confers responsiveness to T-cell activation signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 2864-8 (1992).
90. Szabo, S. J., Gold, J. S., Murphy, T. L. & Murphy, K. M. Identification of cis-acting regulatory elements controlling interleukin-4 gene expression in T cells: roles for NF-Y and NF-ATc. *Mol Cell Biol* **13**, 4793-805 (1993).
91. Chuvpilo, S. et al. Multiple closely-linked NFAT/octamer and HMG I(Y) binding sites are part of the interleukin-4 promoter. *Nucleic Acids Res* **21**, 5694-704 (1993).
92. Burke, T. F., Casolaro, V. & Georas, S. N. Characterization of P5, a novel NFAT/AP-1 site in the human IL-4 promoter. *Biochem Biophys Res Commun* **270**, 1016-23 (2000).
93. Agarwal, S., Avni, O. & Rao, A. Cell-type-restricted binding of the transcription factor NFAT to a distal IL-4 enhancer in vivo. *Immunity* **12**, 643-52 (2000).
94. Li, B., Tournier, C., Davis, R. J. & Flavell, R. A. Regulation of IL-4 expression by the transcription factor JunB during T helper cell differentiation. *Embo J* **18**, 420-32 (1999).
95. Wenner, C. A., Szabo, S. J. & Murphy, K. M. Identification of IL-4 promoter elements conferring Th2-restricted expression during T helper cell subset development. *J Immunol* **158**, 765-73 (1997).
96. Hu, C. M., Jang, S. Y., Fanzo, J. C. & Pernis, A. B. Modulation of T cell cytokine production by interferon regulatory factor-4. *J Biol Chem* **277**, 49238-46 (2002).
97. Rengarajan, J. et al. Interferon regulatory factor 4 (IRF4) interacts with NFATc2 to modulate interleukin 4 gene expression. *J Exp Med* **195**, 1003-12 (2002).
98. Lohoff, M. et al. Dysregulated T helper cell differentiation in the absence of interferon regulatory factor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11808-12 (2002).
99. Avots, A. et al. CBP/p300 integrates Raf/Rac-signaling pathways in the transcriptional induction of NF-ATc during T cell activation. *Immunity* **10**, 515-24 (1999).
100. Sisk, T. J., Gourley, T., Roys, S. & Chang, C. H. MHC class II transactivator inhibits IL-4 gene transcription by competing with NF-AT to bind the coactivator CREB binding protein (CBP)/p300. *J Immunol* **165**, 2511-7 (2000).
101. Serfling, E. et al. The role of NF-AT transcription factors in T cell activation and differentiation. *Biochim Biophys Acta* **1498**, 1-18 (2000).

102. Hodge, M. R. et al. NF-AT-Driven interleukin-4 transcription potentiated by NIP45. *Science* **274**, 1903-5 (1996).
103. Blank, V. & Andrews, N. C. The Maf transcription factors: regulators of differentiation. *Trends Biochem Sci* **22**, 437-41 (1997).
104. Nurieva, R. I. et al. Transcriptional regulation of th2 differentiation by inducible costimulator. *Immunity* **18**, 801-11 (2003).
105. Ho, I. C., Lo, D. & Glimcher, L. H. c-maf promotes T helper cell type 2 (Th2) and attenuates Th1 differentiation by both interleukin 4-dependent and -independent mechanisms. *J Exp Med* **188**, 1859-66 (1998).
106. Hwang, E. S., White, I. A. & Ho, I. C. An IL-4-independent and CD25-mediated function of c-maf in promoting the production of Th2 cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13026-30 (2002).
107. Li, Q. & Verma, I. M. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* **2**, 725-34 (2002).
108. Sun, Z. et al. PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes. *Nature* **404**, 402-7 (2000).
109. Arendt, C. W., Albrecht, B., Soos, T. J. & Littman, D. R. Protein kinase C-theta;: signaling from the center of the T-cell synapse. *Curr Opin Immunol* **14**, 323-30 (2002).
110. Li-Weber, M., Giasi, M. & Krammer, P. H. Involvement of Jun and Rel proteins in up-regulation of interleukin-4 gene activity by the T cell accessory molecule CD28. *J Biol Chem* **273**, 32460-6 (1998).
111. Li-Weber, M. et al. Th2-specific protein/DNA interactions at the proximal nuclear factor-AT site contribute to the functional activity of the human IL-4 promoter. *J Immunol* **161**, 1380-9 (1998).
112. Li-Weber, M., Salgame, P., Hu, C. & Krammer, P. H. Characterization of constitutive and inducible transcription factors binding to the P2 NF-AT site in the human interleukin-4 promoter. *Gene* **188**, 253-60 (1997).
113. Li-Weber, M., Giasi, M., Baumann, S., Palfi, K. & Krammer, P. H. NF-kappa B synergizes with NF-AT and NF-IL6 in activation of the IL-4 gene in T cells. *Eur J Immunol* **34**, 1111-8 (2004).
114. Hehner, S. P. et al. Vav synergizes with protein kinase C theta to mediate IL-4 gene expression in response to CD28 costimulation in T cells. *J Immunol* **164**, 3829-36 (2000).
115. Ishikawa, H., Carrasco, D., Claudio, E., Ryseck, R. P. & Bravo, R. Gastric hyperplasia and increased proliferative responses of lymphocytes in mice lacking the COOH-terminal ankyrin domain of NF-kappaB2. *J Exp Med* **186**, 999-1014 (1997).
116. Ferreira, V. et al. In vivo inhibition of NF-kappa B in T-lineage cells leads to a dramatic decrease in cell proliferation and cytokine production and to increased cell apoptosis in response to mitogenic stimuli, but not to abnormal thymopoiesis. *J Immunol* **162**, 6442-50 (1999).
117. Yang, L. et al. Essential role of nuclear factor kappaB in the induction of eosinophilia in allergic airway inflammation. *J Exp Med* **188**, 1739-50 (1998).
118. Rincon, M., Derijard, B., Chow, C. W., Davis, R. J. & Flavell, R. A. Reprogramming the signalling requirement for AP-1 (activator protein-1) activation during differentiation of precursor CD4+ T-cells into effector Th1 and Th2 cells. *Genes Funct* **1**, 51-68 (1997).
119. Rooney, J. W., Hoey, T. & Glimcher, L. H. Coordinate and cooperative roles for NF-AT and AP-1 in the regulation of the murine IL-4 gene. *Immunity* **2**, 473-83 (1995).
120. Ranganath, S. & Murphy, K. M. Structure and specificity of GATA proteins in Th2 development. *Mol Cell Biol* **21**, 2716-25 (2001).
121. Hartenstein, B. et al. Th2 cell-specific cytokine expression and allergen-induced airway inflammation depend on JunB. *Embo J* **21**, 6321-9 (2002).
122. Takemoto, N., Koyano-Nakagawa, N., Arai, N., Arai, K. & Yokota, T. Four P-like elements are required for optimal transcription of the mouse IL-4 gene: involvement of a distinct set of nuclear factor of activated T cells and activator protein-1 family proteins. *Int Immunol* **9**, 1329-38 (1997).
123. Li-Weber, M., Salgame, P., Hu, C., Davydov, I. V. & Krammer, P. H. Differential interaction of nuclear factors with the PRE-I enhancer element of the human IL-4 promoter in different T cell subsets. *J Immunol* **158**, 1194-200 (1997).
124. Zhu, J., Cote-Sierra, J., Guo, L. & Paul, W. E. Stat5 activation plays a critical role in Th2 differentiation. *Immunity* **19**, 739-48 (2003).
125. Cote-Sierra, J. et al. Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3880-5 (2004).
126. Takatori, H. et al. Stat5a inhibits IL-12-induced Th1 cell differentiation through the induction of suppressor of cytokine signaling 3 expression. *J Immunol* **174**, 4105-12 (2005).

127. Takatori, H. et al. Indispensable role of Stat5a in Stat6-independent Th2 cell differentiation and allergic airway inflammation. *J Immunol* **174**, 3734-40 (2005).
128. Kagami, S. et al. Stat5a regulates T helper cell differentiation by several distinct mechanisms. *Blood* **97**, 2358-65 (2001).
129. Lee, D. U. & Rao, A. Molecular analysis of a locus control region in the T helper 2 cytokine gene cluster: a target for STAT6 but not GATA3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16010-5 (2004).
130. Loots, G. G. et al. Identification of a coordinate regulator of interleukins 4, 13, and 5 by cross-species sequence comparisons. *Science* **288**, 136-40 (2000).
131. Agarwal, S. & Rao, A. Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T cell differentiation. *Immunity* **9**, 765-75 (1998).
132. Takemoto, N. et al. Th2-specific DNase I-hypersensitive sites in the murine IL-13 and IL-4 intergenic region. *Int Immunol* **10**, 1981-5 (1998).
133. Takemoto, N. et al. Cutting edge: chromatin remodeling at the IL-4/IL-13 intergenic regulatory region for Th2-specific cytokine gene cluster. *J Immunol* **165**, 6687-91 (2000).
134. Fields, P. E., Lee, G. R., Kim, S. T., Bartsevich, V. V. & Flavell, R. A. Th2-specific chromatin remodeling and enhancer activity in the Th2 cytokine locus control region. *Immunity* **21**, 865-76 (2004).
135. Tykocinski, L. O. et al. A critical control element for interleukin-4 memory expression in T helper lymphocytes. *J Biol Chem* **280**, 28177-85 (2005).
136. Yamashita, M. et al. Identification of a conserved GATA3 response element upstream proximal from the interleukin-13 gene locus. *J Biol Chem* **277**, 42399-408 (2002).
137. Lee, G. R., Fields, P. E., Griffin, T. J. & Flavell, R. A. Regulation of the Th2 cytokine locus by a locus control region. *Immunity* **19**, 145-53 (2003).
138. Zhang, D. H., Yang, L. & Ray, A. Differential responsiveness of the IL-5 and IL-4 genes to transcription factor GATA-3. *J Immunol* **161**, 3817-21 (1998).
139. Ranganath, S. et al. GATA-3-dependent enhancer activity in IL-4 gene regulation. *J Immunol* **161**, 3822-6 (1998).
140. Ansel, K. M. et al. Deletion of a conserved Ii4 silencer impairs T helper type 1-mediated immunity. *Nat Immunol* **5**, 1251-9 (2004).
141. Mohrs, M. et al. Deletion of a coordinate regulator of type 2 cytokine expression in mice. *Nat Immunol* **2**, 842-7 (2001).
142. Solymar, D. C., Agarwal, S., Bassing, C. H., Alt, F. W. & Rao, A. A 3' enhancer in the IL-4 gene regulates cytokine production by Th2 cells and mast cells. *Immunity* **17**, 41-50 (2002).
143. Lee, G. R., Spilianakis, C. G. & Flavell, R. A. Hypersensitive site 7 of the TH2 locus control region is essential for expressing TH2 cytokine genes and for long-range intrachromosomal interactions. *Nat Immunol* **6**, 42-8 (2005).
144. Spilianakis, C. G. & Flavell, R. A. Long-range intrachromosomal interactions in the T helper type 2 cytokine locus. *Nat Immunol* **5**, 1017-27 (2004).
145. Avni, O. et al. T(H) cell differentiation is accompanied by dynamic changes in histone acetylation of cytokine genes. *Nat Immunol* **3**, 643-51 (2002).
146. Reiner, S. L. Epigenetic control in the immune response. *Hum Mol Genet* **14 Spec No 1**, R41-6 (2005).
147. Wilson, C. B., Makar, K. W., Shnyreva, M. & Fitzpatrick, D. R. DNA methylation and the expanding epigenetics of T cell lineage commitment. *Semin Immunol* **17**, 105-19 (2005).
148. Santangelo, S., Cousins, D. J., Winkelmann, N. E. & Staynov, D. Z. DNA methylation changes at human Th2 cytokine genes coincide with DNase I hypersensitive site formation during CD4(+) T cell differentiation. *J Immunol* **169**, 1893-903 (2002).
149. Lee, D. U., Agarwal, S. & Rao, A. Th2 lineage commitment and efficient IL-4 production involves extended demethylation of the IL-4 gene. *Immunity* **16**, 649-60 (2002).
150. Makar, K. W. et al. Active recruitment of DNA methyltransferases regulates interleukin 4 in thymocytes and T cells. *Nat Immunol* **4**, 1183-90 (2003).
151. Lee, P. P. et al. A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival. *Immunity* **15**, 763-74 (2001).
152. Makar, K. W. & Wilson, C. B. DNA methylation is a nonredundant repressor of the Th2 effector program. *J Immunol* **173**, 4402-6 (2004).

153. Hutchins, A. S. et al. Gene silencing quantitatively controls the function of a developmental trans-activator. *Mol Cell* **10**, 81-91 (2002).
154. Crawford, G. E. et al. Identifying gene regulatory elements by genome-wide recovery of DNase hypersensitive sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 992-7 (2004).
155. Jenuwein, T. & Allis, C. D. Translating the histone code. *Science* **293**, 1074-80 (2001).
156. Roth, S. Y., Denu, J. M. & Allis, C. D. Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* **70**, 81-120 (2001).
157. Kouzarides, T. Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *Embo J* **19**, 1176-9 (2000).
158. Baguet, A. & Bix, M. Chromatin landscape dynamics of the Il4-Il13 locus during T helper 1 and 2 development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 11410-5 (2004).
159. Grogan, J. L. et al. Basal chromatin modification at the IL-4 gene in helper T cells. *J Immunol* **171**, 6672-9 (2003).
160. Fields, P. E., Kim, S. T. & Flavell, R. A. Cutting edge: changes in histone acetylation at the IL-4 and IFN-gamma loci accompany Th1/Th2 differentiation. *J Immunol* **169**, 647-50 (2002).
161. Koyanagi, M. et al. EZH2 and histone 3 trimethyl lysine 27 associated with Il4 and Il13 gene silencing in Th1 cells. *J Biol Chem* **280**, 31470-7 (2005).
162. Narlikar, G. J., Fan, H. Y. & Kingston, R. E. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* **108**, 475-87 (2002).
163. Cairns, B. R. Chromatin remodeling complexes: strength in diversity, precision through specialization. *Curr Opin Genet Dev* **15**, 185-90 (2005).
164. Cai, S., Lee, C. C. & Kohwi-Shigematsu, T. SATB1 packages densely looped, transcriptionally active chromatin for coordinated expression of cytokine genes. *Nat Genet* **38**, 1278-88 (2006).
165. Bix, M. & Locksley, R. M. Independent and epigenetic regulation of the interleukin-4 alleles in CD4+ T cells. *Science* **281**, 1352-4 (1998).
166. Riviere, I., Sunshine, M. J. & Littman, D. R. Regulation of IL-4 expression by activation of individual alleles. *Immunity* **9**, 217-28 (1998).
167. Pannetier, C., Hu-Li, J. & Paul, W. E. Bias in the expression of IL-4 alleles: the use of T cells from a GFP knock-in mouse. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **64**, 599-602 (1999).
168. Hu-Li, J. et al. Regulation of expression of IL-4 alleles: analysis using a chimeric GFP/IL-4 gene. *Immunity* **14**, 1-11 (2001).
169. Guo, L., Hu-Li, J. & Paul, W. E. Probabilistic regulation of IL-4 production in Th2 cells: accessibility at the Il4 locus. *Immunity* **20**, 193-203 (2004).
170. Guo, L., Hu-Li, J. & Paul, W. E. Probabilistic regulation in TH2 cells accounts for monoallelic expression of IL-4 and IL-13. *Immunity* **23**, 89-99 (2005).
171. Guo, L., Hu-Li, J. & Paul, W. E. Probabilistic regulation of IL-4 production. *J Clin Immunol* **25**, 573-81 (2005).
172. Karasuyama, H. & Melchers, F. Establishment of mouse cell lines which constitutively secrete large quantities of interleukin 2, 3, 4 or 5, using modified cDNA expression vectors. *Eur J Immunol* **18**, 97-104 (1988).
173. Weinmann, A. S. Novel ChIP-based strategies to uncover transcription factor target genes in the immune system. *Nat Rev Immunol* **4**, 381-6 (2004).
174. Pruss, D. & Bavykin, S. G. Chromatin studies by DNA-protein cross-linking. *Methods* **12**, 36-47 (1997).
175. Wells, J. & Farnham, P. J. Characterizing transcription factor binding sites using formaldehyde crosslinking and immunoprecipitation. *Methods* **26**, 48-56 (2002).
176. Orlando, V., Strutt, H. & Paro, R. Analysis of chromatin structure by in vivo formaldehyde cross-linking. *Methods* **11**, 205-14 (1997).
177. Nowak, D. E., Tian, B. & Brasier, A. R. Two-step cross-linking method for identification of NF-kappaB gene network by chromatin immunoprecipitation. *Biotechniques* **39**, 715-25 (2005).
178. Rozen, S. & Skaletsky, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* **132**, 365-86 (2000).
179. Li, C. & Wong, W. H. Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 31-6 (2001).
180. Lohning, M. et al. Establishment of memory for IL-10 expression in developing T helper 2 cells requires repetitive IL-4 costimulation and does not impair proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12307-12 (2003).

181. Trevillyan, J. M. et al. Potent inhibition of NFAT activation and T cell cytokine production by novel low molecular weight pyrazole compounds. *J Biol Chem* **276**, 48118-26 (2001).
182. Maneechotesuwan, K. et al. Regulation of Th2 cytokine genes by p38 MAPK-mediated phosphorylation of GATA-3. *J Immunol* **178**, 2491-8 (2007).
183. Chen, C. H., Zhang, D. H., LaPorte, J. M. & Ray, A. Cyclic AMP activates p38 mitogen-activated protein kinase in Th2 cells: phosphorylation of GATA-3 and stimulation of Th2 cytokine gene expression. *J Immunol* **165**, 5597-605 (2000).
184. Zhang, F. & Boothby, M. T helper type 1-specific Brg1 recruitment and remodeling of nucleosomes positioned at the IFN-gamma promoter are Stat4 dependent. *J Exp Med* **203**, 1493-505 (2006).
185. Xu, R., Spencer, V. A. & Bissell, M. J. Extracellular matrix-regulated gene expression requires cooperation of SWI/SNF and transcription factors. *J Biol Chem* **282**, 14992-9 (2007).
186. Vradii, D. et al. Brg1, the ATPase subunit of the SWI/SNF chromatin remodeling complex, is required for myeloid differentiation to granulocytes. *J Cell Physiol* **206**, 112-8 (2006).
187. Goodman, R. H. & Smolik, S. CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev* **14**, 1553-77 (2000).
188. Chan, H. M. & La Thangue, N. B. p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *J Cell Sci* **114**, 2363-73 (2001).
189. Turek-Plewa, J. & Jagodzinski, P. P. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell Mol Biol Lett* **10**, 631-47 (2005).
190. Chen, T. & Li, E. Establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mammals. *Curr Top Microbiol Immunol* **301**, 179-201 (2006).
191. Richter, A., Lohning, M. & Radbruch, A. Instruction for cytokine expression in T helper lymphocytes in relation to proliferation and cell cycle progression. *J Exp Med* **190**, 1439-50 (1999).
192. Bird, J. J. et al. Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle. *Immunity* **9**, 229-37 (1998).
193. Garcia-Rodriguez, C. & Rao, A. Nuclear factor of activated T cells (NFAT)-dependent transactivation regulated by the coactivators p300/CREB-binding protein (CBP). *J Exp Med* **187**, 2031-6 (1998).
194. Gingras, S., Simard, J., Groner, B. & Pfitzner, E. p300/CBP is required for transcriptional induction by interleukin-4 and interacts with Stat6. *Nucleic Acids Res* **27**, 2722-9 (1999).
195. Shen, W. et al. Solution structure of human Brg1 bromodomain and its specific binding to acetylated histone tails. *Biochemistry* **46**, 2100-10 (2007).
196. Pedersen, T. A., Kowenz-Leutz, E., Leutz, A. & Nerlov, C. Cooperation between C/EBPalpha TBP/TFIIB and SWI/SNF recruiting domains is required for adipocyte differentiation. *Genes Dev* **15**, 3208-16 (2001).
197. Chang, H. C. et al. PU.1 expression delineates heterogeneity in primary Th2 cells. *Immunity* **22**, 693-703 (2005).
198. Dan, Y., Katakura, Y., Ametani, A., Kaminogawa, S. & Asano, Y. IL-3 augments TCR-mediated responses of type 2 CD4 T cells. *J Immunol* **156**, 27-34 (1996).
199. Aoki, I., Tanaka, S., Ishii, N., Minami, M. & Klinman, D. M. Contribution of interleukin-3 to antigen-induced Th2 cytokine production. *Eur J Immunol* **26**, 1388-93 (1996).
200. Miaw, S. C., Choi, A., Yu, E., Kishikawa, H. & Ho, I. C. ROG, repressor of GATA, regulates the expression of cytokine genes. *Immunity* **12**, 323-33 (2000).
201. Miaw, S. C., Kang, B. Y., White, I. A. & Ho, I. C. A repressor of GATA-mediated negative feedback mechanism of T cell activation. *J Immunol* **172**, 170-7 (2004).
202. Kang, B. Y., Miaw, S. C. & Ho, I. C. ROG negatively regulates T-cell activation but is dispensable for Th-cell differentiation. *Mol Cell Biol* **25**, 554-62 (2005).
203. Watts, T. H. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu Rev Immunol* **23**, 23-68 (2005).
204. Yu, C. R. et al. Cell proliferation and STAT6 pathways are negatively regulated in T cells by STAT1 and suppressors of cytokine signaling. *J Immunol* **173**, 737-46 (2004).
205. Alexander, W. S. et al. Suppressors of cytokine signaling (SOCS): negative regulators of signal transduction. *J Leukoc Biol* **66**, 588-92 (1999).
206. Davey, G. M., Heath, W. R. & Starr, R. SOCS1: a potent and multifaceted regulator of cytokines and cell-mediated inflammation. *Tissue Antigens* **67**, 1-9 (2006).
207. Yoshimura, A., Naka, T. & Kubo, M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol* **7**, 454-65 (2007).

208. Losman, J. A., Chen, X. P., Hilton, D. & Rothman, P. Cutting edge: SOCS-1 is a potent inhibitor of IL-4 signal transduction. *J Immunol* **162**, 3770-4 (1999).
209. Dickensheets, H. et al. Suppressor of cytokine signaling-1 is an IL-4-inducible gene in macrophages and feedback inhibits IL-4 signaling. *Genes Immun* **8**, 21-7 (2007).
210. Jones, B. & Chen, J. Inhibition of IFN-gamma transcription by site-specific methylation during T helper cell development. *Embo J* **25**, 2443-52 (2006).
211. Miranda, T. B. & Jones, P. A. DNA methylation: The nuts and bolts of repression. *J Cell Physiol* **213**, 384-90 (2007).
212. Berger, S. L. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* **447**, 407-12 (2007).

7 Anhang

7.1 Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben.

Ein großer Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer Andreas Radbruch für die Themenvergabe der Promotionsarbeit, die Bereitschaft zur Diskussion der Daten und weiterer Ideen, Kritiken und Anregungen sowie für den unkomplizierten und lockeren Umgang.

Ich bedanke mich weiterhin bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der AG Radbruch, insbesondere Juliana Köck, Inka Albrecht, Uwe Niesner, Hyun-Dong Chang, Lars Tykocinski und Guido Heine für die gute Zusammenarbeit und die freundschaftliche und entspannte Arbeitsatmosphäre.

Allen Mitarbeitern des DRFZ, insbesondere den Labmanagern Tuula, Heidi und Heidi, den FACS-Experten Toralf und Katharina, allen Arbeitsgruppenleitern sowie den Frauen der Verwaltung, danke ich besonders für viele Hilfestellungen in fachlichen bzw. arbeitsbezogenen Fragestellungen.

Prof. Dr. Alf Hamann, Prof. Dr. Edgar Serfling, Prof. Dr. Thomas Kamradt, Prof. Dr. Burkhard Micheel und PD. Dr. Rudi Manz danke ich für ihre Bereitschaft und ihr Engagement zur Begutachtung dieser Arbeit.

Meinen Eltern möchte ich ganz herzlich für die Möglichkeit der Verwirklichung meiner Vorstellungen sowie die ständige finanzielle und moralische Unterstützung während meines Studiums und während der Durchführung der Promotionsarbeit danken.

Ein besonderer Dank gilt meiner Frau Nicolett, die mich während der gesamten Zeit liebevoll unterstützt hat und mir viele Belastungen abgenommen hat.

Meiner Tochter Hanna möchte ich für ihre Nachsicht danken, dass ich während der schriftlichen Ausarbeitung der Arbeit weniger Zeit mit ihr verbringen konnte.

7.2 Publikationen

Teilergebnisse dieser Arbeit sind in folgende Publikationen eingegangen:

1. Tykocinski LO, Hajkova P, Chang HD, Stamm T, Sozeri O, Lohning M, Hu-Li J, Niesner U, **Kreher S**, Friedrich B, Pannetier C, Grutz G, Walter J, Paul WE, Radbruch A. A critical control element for interleukin-4 memory expression in T helper lymphocytes. *J Biol Chem* 280, 28177-85 (2005)
2. Chang HD, Helbig C, Tykocinski L, **Kreher S**, Koeck J, Niesner U, Radbruch A. Expression of IL-10 in Th memory lymphocytes is conditional on IL-12 or IL-4, unless the IL-10 gene is imprinted by GATA-3. *Eur J Immunol* 37, 807-17 (2007).
3. Niesner U, Albrecht I, Janke M, Doebis C, Eulenburg K, Chang HD, **Kreher S**, Koeck J, Baumgrass R, Bonhagen K, Kamradt T, Enghard P, Humrich J, Rutz S, Schulze-Topphoff U, Aktas O, Bartfeld S, Radbruch H, Baumgart D, Duchmann R, Rudwaleit M, Haeupl T, Gittelman I, Krenn V, Gruen J, Sieper J, Zeitz M, Wiedenmann B, Zipp F, Hamann A, Janitz M, Scheffold A, Burmester GR, Radbruch A . Autoregulation of Th1-mediated inflammation by twist1 (Manuskript eingereicht)

7.3 Erklärung

„Ich, Stephan Kreher, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Die Analyse der IL-4-Expressionsheterogenität in differenzierten Th2-Zellen selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

01.11.2007

Unterschrift

7.4 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.