

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der
Technischen Universität München

**Analyse der NF- κ B Funktion durch konditionale Geninaktivierung in
CCL17⁺ dendritischen Zellen der Maus**

Susanne Sonnenhauser

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur
Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Siegfried Scherer

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Alfons Gierl
2. Univ.-Prof. Dr. Irmgard Förster,
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Die Dissertation wurde am 02.06.2005 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 09.08.2005 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	3
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	6
TABELLENVERZEICHNIS	8
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	9
1 EINLEITUNG.....	11
1.1 Das Immunsystem	11
1.2 Dendritische Zellen.....	12
1.2.1 Ursprung und Entwicklung von dendritischen Zellen.....	12
1.2.2 Die Rolle dendritischer Zellen in der Immunantwort.....	14
1.2.3 Die Unterklassen von dendritischen Zellen und die Rolle von CCL17 ⁺ dendritischen Zellen.....	18
1.3 NF- κ B als Regulator der Immunantwort	23
1.3.1 Die NF- κ B-Proteinfamilie.....	26
1.3.2 NF- κ B Signalweg.....	29
1.4 DC und NF- κ B	31
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	33
2 MATERIAL UND METHODEN.....	35
2.1 Bezugsquellennachweis	35
2.1.1 Chemikalien.....	35
2.1.2 Enzyme.....	36
2.1.3 Reagenzien, Kits und Verbrauchsmaterialien.....	36
2.1.4 Geräte.....	37
2.2 Medien und Puffer.....	38
2.2.1 Stammlösungen und Puffer	38
2.2.2 Medien für die Bakterienkultur.....	43
2.2.3 Medien für die Zellkultur	44
2.3 Bakterienstämme, Zelllinien und Versuchstiere.....	44
2.3.1 Bakterienstämme	44
2.3.2 Zellen und Zelllinien	45
2.3.3 Versuchstiere	45

2.4	Primer, Antikörper und Zellfarbstoffe.....	46
2.4.1	Primer	46
2.4.2	Antikörper	46
2.4.3	Zellfarbstoffe	47
2.5	Plasmidvektoren	47
2.5.1	Ausgangsvektor	47
2.5.2	Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Vektoren.....	47
2.6	Molekularbiologische Arbeitsmethoden	48
2.6.1	Isolierung von Plasmid-DNS (Qiagen-Kits: DNS für Sonden).....	48
2.6.2	Isolierung von chromosomaler DNS.....	48
2.6.3	Agarosegelelektrophorese.....	49
2.6.4	Enzymatische Behandlung von DNS	50
2.6.5	Transformation von E.coli.....	52
2.6.6	Bestimmung des DNS-Gehalts	53
2.6.7	Southern Blot Analyse	54
2.6.8	Isolierung von Proteinen aus Zellen	56
2.6.9	Bestimmung des Proteingehalts	56
2.6.10	Western Blot.....	57
2.6.11	EMSA.....	59
2.6.12	Polymerasekettenreaktion	63
2.7	Zellkultur	64
2.7.1	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	64
2.7.2	Kultivierung der GM-CSF Myelomzellen.....	64
2.7.3	Kultivierung von DCs aus dem Knochenmark.....	65
2.7.4	Stimulierung der Zellen.....	65
2.8	Immunologische und zellbiologische Methoden.....	66
2.8.1	Isolierung von Zellen aus Organen.....	66
2.8.2	Zellsortierung mittels MACS-Technologie	66
2.8.3	Durchflusszytometrie (FACS Analyse)	67
2.8.4	ELISA.....	68
2.8.5	Bestimmung der T-Zellproliferation	68
2.8.6	Bestimmung der Aktivität der zytotoxischen T-Zellen	71
2.9	Tierversuche.....	73
2.10	Narkotisierung der Tiere (Wach/Schlaf)	74
3	ERGEBNISSE.....	75
3.1	Analyse der Funktion von NF-κB durch Deletion von IκBα	75
3.1.1	Spezifität der Deletion von I κ B α	75
3.1.2	DNS-Bindeaktivität von NF- κ B nach Aktivierung.....	78
3.1.3	Analyse der APC-Funktion von I κ B α ^{-/-} BM-DCs.....	81

3.1.4	Überleben der $I\kappa B\alpha^{-/-}$ DCs nach Stimulation mit LPS und $TNF\alpha$	91
3.2	Analyse der Funktion von NF- κ B durch NEMO-Deletion.....	94
3.2.1	Spezifität der Deletion von NEMO	94
3.2.2	Analyse der APC-Funktion von $NEMO^{-/-}$ BM-DCs	102
3.2.3	Überleben der $NEMO^{-/-}$ DCs nach Stimulation mit LPS und α CD40	110
3.3	Regulation der CCL17-Expression	115
4	DISKUSSION	119
4.1	Charakterisierung der CCL17cre $I\kappa B\alpha$ Tiere	119
4.1.1	$I\kappa B\alpha$ -Deletion	120
4.1.2	Auswirkungen der $I\kappa B\alpha$ -Deletion auf die APC-Funktion.....	123
4.2	Charakterisierung der CCL17cre NEMO Tiere.....	128
4.2.1	NEMO-Deletion.....	129
4.2.2	NF- κ B-unabhängige Expression von MHC II, CD80, CD86 und CD40.....	130
4.2.3	Beeinträchtigt Überleben der NEMO-defizienten DCs nach Stimulation	132
4.2.4	Reduzierte CTL-Antwort in CCL17cre NEMO Tieren.....	134
4.3	Regulation der CCL17-Expression	137
4.4	Ausblick.....	139
5	ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY	141
6	REFERENZEN	145
7	DANKSAGUNG	167

Abbildungsverzeichnis

- 1.1 Ursprung und Entwicklung dendritischer Zellen.
- 1.2 Die Reifung der dendritischen Zellen.
- 1.3 Modell der $CD8\alpha^+$ und $CD8\alpha^-$ DC Differenzierung, Aktivierung und Funktion.
- 1.4 NF- κ B induziert verschiedene anti-apoptotische Faktoren, die vor $TNF\alpha$ -induzierter Apoptose schützen können.
- 1.5 NF- κ B- und I κ B α -Familienmitglieder in Säugetieren.
- 1.6 NF- κ B Aktivierungswege.
- 3.1 Schematische Darstellung des Targeting Vektors und des getargeten Lokus.
- 3.2 Analyse der Spezifität der Deletion von I κ B α (Southern Blot).
- 3.3 DNS-Bindeaktivität von NF- κ B in unstimulierten oder stimulierten (LPS, CpG, $TNF\alpha$) MACS-angereicherten BM-DCs.
- 3.4 Expression von CD40, CD86 und MHC II auf Ktrl.- und KO-BM-DCs.
- 3.5 Zytokinexpression von Ktrl.- und KO-BM-DCs nach Stimulation mit verschiedenen Stimuli.
- 3.6 Proliferation von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen.
- 3.7 Überleben der I κ B $\alpha^{-/-}$ BM-DCs nach LPS- und $TNF\alpha$ -Stimulation.
- 3.8 Analyse der Spezifität der Deletion von NEMO (Southern Blot).
- 3.9 Analyse der NEMO-Deletion.
- 3.10 Generierung von NEMO eGFP Reportermäusen.
- 3.11 Anteil der eGFP $^+$ Zellen an der Gesamtpopulation der BM-DCs und erfolgte NEMO-Deletion in den KO-BM-DCs.
- 3.12 Expression der Aktivierungsmarker MHC II, CD80, CD86.
- 3.13 Induktion einer Ag-spezifischen T-Zellproliferation.
- 3.14 Spezifische Lyse der Zielzellen durch CTLs, die von Ktrl.- und KO-Tieren nach OVA/CpG-Immunisierung gebildet wurden.
- 3.15 AnnexinV $^+$ -Färbung von BM-DCs nach Stimulation mit LPS und $TNF\alpha$.
- 3.16 Anteil der lebenden Zellen an der Gesamtpopulation nach Stimulation mit LPS.
- 3.17 Anteil der lebenden Zellen an der Gesamtpopulation nach Stimulation mit α CD40.

- 3.18 Anteil der CD11c⁺ eGFP⁺ DCs in den LN von NEMO eGFP Reporter-mäusen.
- 3.19 Anteil der CD11c⁺ eGFP⁺ DCs in den LP von CCL17 eGFP Reporter-mäusen.

Tabellenverzeichnis

- 1.1 Gene, die von NF- κ B reguliert werden.
- 1.2 NF- κ B-induzierende Stimuli.
- 2.1 Zusammensetzung der Zellkulturmedien.
- 2.2 Bakterienstämme.
- 2.3 Zellen und Zelllinien.
- 2.4 Primer zur Genotypisierung.
- 2.5 Verwendete Antikörper.
- 2.6 Verwendete Zellfarbstoffe.
- 2.7 Ausgangsvektoren.
- 2.8 Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Vektoren.
- 2.9 Allgemeiner Ansatz von Restriktionsverdau.
- 2.10 Trenn- und Sammelgel.
- 2.11 PAGE-Gel.
- 2.12 PCR-Bedingungen.

Abkürzungsverzeichnis

Abgesehen von in deutscher Schriftsprache üblichen Abkürzungen wurden folgende Kürzel verwendet:

α -	Anti-
(e)GFP	(Enhanced) grün fluoreszierendes Protein
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APC	Antigenpräsentierende Zelle
AS	Aminosäure
BM-DC	Knochenmark-DC
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
CD	Clusters of differentiation
cDNA	DNS-Kopie der mRNA (komplementäre DNS)
CMV	Cytomegalovirus
Cre	Causes recombination
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CTL	Zytotoxische T-Zelle
CTLA-4	Cytolytic T-lymphocyte-associated Ag-4
DC	Dendritische Zelle
DNS	Desoxyribonukleinsäure
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FCS	Fötales Kälberserum
G418	Ganciclovir 418
GM-CSF	Granulocyte/Macrophage-colony stimulating factor
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
HSV TK	Herpes simplex Virus Thymidin Kinase
huCrP	Humanes C-reaktives Protein
I κ B α	Inhibitory κ B protein
i.p.	Intraperitoneal
IP	Incontinentia Pigmenti
i.v.	Intravenös
IFN	Interferon
IKK γ	Inhibitory κ B Kinase Komplex γ
IL-	Interleukin-
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LN	Lymphknoten

loxP	locus X-ing over P1 phage
LPS	Lipopolysaccharid
M	Mol
MΦ	Makrophage(n)
MACS	Magnetic activated cell sorting
MCS	Multiple cloning site
M-CSF	Macrophage colony stimulating factor
MHC	Major histocompatibility complex
MIIC	MHC class II rich compartment
MIP	Macrophage inflammatory protein-2
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEMO	NF-κB Essential Modulator
NK	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
N-Terminus	Amino-Terminus
ORF	Open reading frame
OVA	Ovalbumin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PALS	Periarteriolar lymphoid sheath
PCR	Polymerase chain reaction
PIC	Proteinase Inhibitor Cocktail
PLP	Proteolipid protein
PNS	Peripheres Nervensystem
PRR	Pattern recognition receptor
RAG	Recombinase activating gene
RNS	Ribonukleinsäure
RPA	mRNA-Protection assay
RT	Raumtemperatur
SA	Streptavidin
SDS	Sodium dodecylsulfat
SV	Simian Virus
TCR	T-Zell-Rezeptor
tg	Transgen
TGF-β	Transforming growth factor β
TLR	Toll like receptor
TNF	Tumor Nekrosefaktor
TRANCE	TNF-related activation-induced cytokine
TRANCER	TNF-related activation-induced cytokine receptor
TZ	Tischzentrifuge
u	units
Ü/N	Über Nacht
w/v	Gewicht/Volumen
well	Vertiefung einer Rundbodenkulturplatte
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Jeden Tag sind wir Menschen einem wahren Ansturm von Pathogenen (Parasiten, Bakterien, Viren, Pilze, etc.) ausgesetzt, dem unser Körper, genauer gesagt, unser Immunsystem, Herr werden muss. Um dieser vielfältigen Aufgabe gerecht zu werden, hat das Immunsystem im Laufe der Evolution zwei ineinander greifende Abwehrmechanismen entwickelt: Die angeborene (innate) und die erworbene (adaptive) Immunität (Fearon and Locksley, 1996). Das innate Immunsystem bietet Schutz durch unspezifische Abwehrmechanismen, z.B. durch anatomische (Haut, Schleimhäute) oder physiologische Barrieren (Temperatur, pH-Wert), aber auch durch zelluläre Komponenten, wie z.B. NK-Zellen, NKT-Zellen, Neutrophile und Epithelzellen, durch lösliche Faktoren wie Lysozym und Defensine und durch das Komplementsystem (Ganz, 2002; Janeway and Medzhitov, 2002). Die Zellen des innaten Immunsystems exprimieren Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, die evolutionär hochkonservierte Strukturen von Pathogenen („pathogen-associated molecular patterns“, PAMPS) wie z.B. Lipopolysaccharid (LPS) oder CpG (Cytosin Guanosin) DNA erkennen können (Janeway and Medzhitov, 1998). Zu diesen als „pattern recognition receptors“ (PRR) bezeichneten Rezeptoren zählen u.a. der Mannose-Rezeptor, DEC205 und die „toll-like-receptor“ (TLR) Familie. Durch die PRR ist das innate Immunsystem sehr früh in der Lage, Infektionen durch Pathogene zu erkennen und unspezifische Abwehrmechanismen zu aktivieren. Neben dieser ersten Verteidigung des Organismus besteht eine weitere wesentliche Aufgabe der angeborenen Immunität darin, die Zellen des adaptiven Immunsystems (T- und B-Zellen) zu aktivieren (Matzinger, 1994). Dies geschieht u.a. über die sog. professionellen Antigen-präsentierenden Zellen, den APCs („antigen-presenting cells“). Zu den APCs gehören die B-Zellen, die Makrophagen ($M\Phi$) und die dendritischen Zellen (DC) (Knight and Stagg, 1993). Von diesen besitzen nur die letzteren die Fähigkeit, die primäre Immunantwort zu induzieren („priming“) und das immunologische Gedächtnis zu etablieren (Banchereau and Steinman, 1998; Steinman, 1991; Bell et al., 1999; Hart, 1997).

Das Priming erfolgt u.a. durch die Hochregulation bestimmter kostimulatorischer Oberflächenmoleküle wie z.B. CD80 oder CD86 auf den DCs, wodurch naive T-Zellen

über die Erkennung von Peptid-Antigenen, die auf klassischen MHC I und MHC II Molekülen präsentiert werden, aktiviert werden. Dies führt letztendlich zur Differenzierung in T-Helferzellen (T_H) und zytotoxische T-Zellen (T_C) und zur Ausbildung des oben erwähnten immunologischen Gedächtnisses (Watts, 1997). Daneben setzen die DCs in der Frühphase der Infektion lösliche Faktoren wie z.B. Interleukine (IL), Interferone oder Chemokine frei, die die angeborene Immunität wesentlich beeinflussen und verstärken.

Die zweite an der adaptiven Immunantwort beteiligte Zellart, die B-Zellen, differenzieren nach dem Kontakt mit einem spezifischen Antigen (Ag) in Antikörper (Ak)-produzierende Plasmazellen oder Gedächtnis-B-Zellen, die ebenfalls zur Ausprägung eines immunologischen Gedächtnisses beitragen. Dieses immunologische Gedächtnis ist verantwortlich dafür, dass nach einem erneuten Kontakt mit demselben Antigen eine schnellere und wirksamere Abwehrreaktion stattfindet.

Zusammen gewährleisten die verschiedenen Mechanismen der innate und der adaptiven Immunantwort einen optimalen Schutz gegenüber Pathogenen.

1.2 Dendritische Zellen

1.2.1 Ursprung und Entwicklung von dendritischen Zellen

Dendritische Zellen wurden zuerst 1973 als „große sternförmige Zellen mit verschiedenen Eigenschaften“ (Steinman and Cohn, 1973) entdeckt. Wie alle Zellen des Immunsystems und des Blutes gehen auch DCs aus pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks hervor. Diese Zellen besitzen ein zunächst uneingeschränktes Entwicklungspotential, das sie aber mit zunehmender Differenzierung entlang der verschiedenen Entwicklungslinien des hämatopoietischen Systems wieder verlieren.

Als erstes konnte anhand von „colony-forming unit“ Experimenten gezeigt werden, dass DCs, Makrophagen ($M\Phi$) und Granulozyten unter dem Einfluss des Zytokins „granulocyte-macrophage colony-stimulating factor“ (GM-CSF) aus einer gemeinsamen MHC II Vorläuferzelle generiert werden können (Inaba et al., 1992). Die Idee, dass sich DCs aus einer myeloiden Vorläuferzelle entwickeln, konnte in den darauffolgenden Jahren bestätigt werden (Randolph et al., 1999). *In vivo* Experimente zeigten jedoch, dass die Entwicklung dendritischer Zellen komplexer ist als ursprünglich angenommen.

Heute geht man davon aus, dass DC sowohl aus myeloiden als auch aus lymphoiden Vorläuferzellen hervorgehen können. Das aktuelle Schema zu Ursprung und Entwicklung dendritischer Zellen ist in Abbildung 1.1 gezeigt:

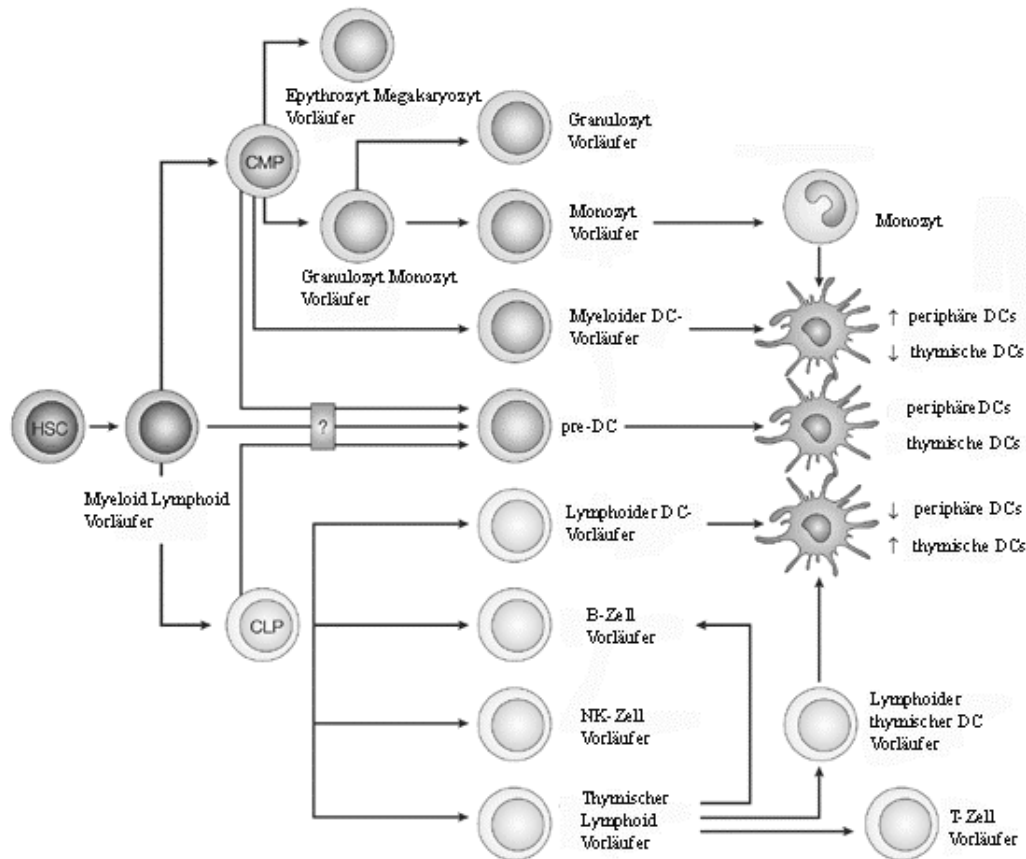


Abb. 1.1: Ursprung und Entwicklung dendritischer Zellen. Theoretisches Modell für die Entwicklung von dendritischen Zellen in der Maus. HSC: Hämatopoetische Stammzelle; CMP: Myeloide Vorläuferzelle; CLP: Lymphoide Vorläuferzelle (nach Ardavin, 2003).

Wie im Schema gezeigt, geht man heute davon aus, dass DC, neben $CD8\alpha^-$, $CD8\alpha^+$, plasmacytoiden $B220^+$ und Langerhans-Zellen, direkt aus myeloiden und lymphoiden Vorläuferzellen (Traver et al., 2000) sowie aus zirkulierenden allgemeinen DC Vorläufern (common DC precursor, pre-DCs) hervorgehen können (del Hoyo et al., 2002). Aufgrund des relativen DC-Differenzierungspotentials und der absoluten Anzahl myeloide und lymphoide Vorläuferzellen („common myeloid precursor“, CMP, bzw. „common lymphoid precursor“, CLP) wurde gezeigt, dass DCs im Thymus zu gleichen Teilen aus beiden Vorläuferzellen hervorgehen, wohingegen sich periphere DCs hauptsächlich aus CMPs entwickeln (Manz et al., 2001; Wu et al., 2001). Myeloide Vorläuferzellen, die sich zu DCs entwickeln, gehen aus den CMPs hervor, die den

Marker „fms-related tyrosine kinase 3“ (FLT3) exprimieren (D'Amico and Wu, 2003). „Lymphoide“ DCs gehen entweder aus lymphoiden Vorläuferzellen im Knochenmark oder im Thymus hervor. Aus den Vorläuferzellen im Thymus können auch noch T-Zell- und B-Zell-Vorläufer entstehen. Pre-DCs und Monozyten können sich in peripherem Gewebe z.B. beim Vorliegen einer Entzündung ebenfalls zu DCs entwickeln (del Hoyo et al., 2002).

1.2.2 Die Rolle dendritischer Zellen in der Immunantwort

Die Aufgabe der dendritischen Zellen besteht darin, Antigene aus dem peripheren nicht-lymphatischen Gewebe aufzunehmen, zu prozessieren und zu den lymphatischen Organen zu migrieren, um den T-Zellen die Fremdpeptide zu präsentieren.

Aufnahme und Prozessierung von Antigenen

Unreife dendritische Zellen können mit Hilfe verschiedener Mechanismen Antigene aus ihrer Umgebung aufnehmen: Die Makropinozytose erlaubt den Zellen eine kontinuierliche, nicht-selektive Aufnahme großer Mengen an Flüssigkeit, wohingegen mit Hilfe der Phagozytose oder der Rezeptor-medierten Endozytose apoptotische und nekrotische Zellfragmente, Viren und Bakterien bzw. Immunkomplexe oder opsonisierte Partikel internalisiert werden können (Albert et al., 1998b; Sallusto et al., 1995).

Nach der Internalisierung der Antigene in Endosomen erfolgt deren Prozessierung mit Hilfe von Proteasen zu Peptiden mit einer Länge zwischen 15 und 24 Aminosäuren (AS). Diese werden dann in den reifenden DCs in sogenannte MHC II-reiche Kompartimente (MIIC) transportiert, auf naszierende MHC II-Moleküle geladen und unter Beteiligung des Membran-Glykoproteins DC-LAMP (de Saint-Vis et al., 1998) an die Zelloberfläche transportiert, wo der Peptid-MHC II-Komplex über Tage hinweg stabil bleibt und das Peptid effektiv den CD4⁺ T-Zellen präsentieren kann. Intrazelluläre Antigene werden von cytosolischen Proteasomen zu Peptiden mit einer Länge von 8-10 AS degradiert, im endoplasmatischen Retikulum (ER) auf neu synthetisierte MHC I-Molekülen geladen und zytotoxischen T-Zellen (CD8⁺ T-Zellen) präsentiert.

Falls keine Entzündung vorhanden ist, verbleiben die meisten MHC II-Moleküle in intrazellulären lysosomalen Kompartimenten und können nicht effizient mit Peptiden beladen werden. Sie sind deshalb instabil und werden im sauren Milieu der Kompartimente schnell abgebaut. In Anwesenheit einer lokalen Entzündung und damit inflammatorischer Stimuli wie z.B. bakterieller Stoffwechselprodukte oder Entzündungs-Zytokinen können die MHC II-Moleküle effektiv mit Peptiden beladen und an die Zelloberfläche transportiert werden (Pierre and Mellman, 1998; Pierre et al., 1997). Die durch inflammatorische Stimuli aktivierten, gereiften DCs verlieren weitestgehend ihre endozytotische Aktivität und wandern von der Peripherie in die Lymphknoten ein, wo sie den im Paracortex der Lymphknoten lokalisierten T-Zellen die aufgenommenen Antigene präsentieren und die primäre Immunantwort initiieren (Banchereau et al., 2000).

Dendritische Zellen können exogene Antigene in bestimmten Fällen auch über MHC-I-Moleküle CD8⁺ T-Zellen präsentieren, ein Vorgang, der als „cross-presentation“ bezeichnet wird (Ackerman et al., 2005; Albert et al., 1998a; Albert et al., 1998b; Pooley et al., 2001).

Migration und Reifung von dendritischen Zellen

Chemokine

Die Migration der reifenden DCs in die T-Zell-Bereiche der sekundären lymphoiden Organe wird zumindest teilweise durch sogenannte Chemokine reguliert:

Chemokine sind kleine sekretierte Proteine, die die Migration von Leukozyten regulieren. Basierend auf der Position der ersten zwei der insgesamt vier konservierten Cystein-Reste werden sie in vier Unterfamilien eingeteilt (CXC, CC, C, CX₃C) (Rossi and Zlotnik, 2000). Die Rezeptoren der Chemokine sind G-Protein-gekoppelte Proteine mit sieben Transmembrandomänen. Chemokine und ihre Rezeptoren spielen u.a. eine wichtige Rolle bei der Infektionsabwehr, bei der T-Zell-Entwicklung, bei der Ausprägung der T_H1/T_H2 T-Zell-Antwort und bei der Reifung der DCs (Sozzani et al., 1998; Vicari et al., 1997).

Chemokine und Chemokin-Rezeptoren während Reifung und Migration der DCs

Chemokine lassen sich in zwei große Untergruppen einteilen, zwischen denen die Grenze aber dennoch fließend ist: In inflammatorische Chemokine, die durch inflammatorische Stimuli induziert oder hochreguliert werden und Zellen rekrutieren, die an Entzündungsreaktionen beteiligt sind, und in konstitutiv exprimierte lymphoide Chemokine, die hauptsächlich in lymphoiden Organen gebildet werden und für die homöostatische Kontrolle der Leukozyten-Rekrutierung verantwortlich sind (Yoshie et al., 1997). Die Fähigkeit von zunächst unreifen („immature“) DCs, Ag aufzunehmen und dann nach Kontakt mit inflammatorischen Stimuli (z.B. $\text{TNF}\alpha$, LPS, CD40) als reife („mature“) DCs von entzündetem Gewebe zu den drainierenden LNs zu migrieren und den dort ansässigen T-Zellen die Peptid-Ag zu präsentieren, ist nur durch das strikt regulierte Zusammenspiel der Expression von bestimmten Chemokinen und ihren Rezeptoren möglich.

Immature, im Gewebe residierende DCs sind gekennzeichnet durch ihre relativ geringen T-Zell-stimulatorischen Eigenschaften und ihre ausgeprägte Fähigkeit zur Ag-Aufnahme. Sie exprimieren Rezeptoren für inflammatorische Chemokine wie z.B. CCR1, CCR2, CCR5 oder CCR6, die sie anhand eines Chemokin-Gradienten zum Entzündungsherd führen: Die Liganden (u.a. CCL3 oder „macrophage inflammatory protein“ MIP-1 α und CCL20 oder MIP-3 α) werden besonders in der Peripherie im Laufe einer Entzündungsreaktion ausgeprägt (Dieu et al., 1998; Sallusto et al., 1998b), während der dann die Ag-Aufnahme stattfindet. Im Zuge des damit einhergehenden Reifungsprozesses werden die Rezeptoren für die inflammatorischen Chemokine herunterreguliert. Gleichzeitig wird CCR7, ein Rezeptor für konstitutive Chemokine, hochreguliert (Dieu et al., 1998; Sallusto et al., 1998b). CCR7 dirigiert die reifenden DCs anhand eines Chemokin-Gradienten zuerst zu den Lymphgefäßen und dann in die T-Zell-Bereiche der LNs, wo die Liganden für CCR7, CCL221 (auch SLC, „secondary lymphoid tissue chemokine“) und CCL19 (auch ELC, „EBV-induced gene 1 ligand chemokine“) sekretiert werden (Dieu et al., 1998). Weitere von DCs sekretierte Chemokine sind sowohl lymphoider wie auch inflammatorischer Natur. Zur zweiten Gruppe zählen z.B. CCL18 (auch PARC, „pulmonary and activation-regulated chemokine“), CCL22 (auch MDC, „macrophage-derived chemokine“) und CCL17 (auch TARC, „thymus and activation regulated chemokine“) (Adema et al., 1997; Godiska et al., 1997; Sallusto et al., 1998a) ebenso wie die bereits oben erwähnten

Chemokine CCL20 und CCL3 (Power et al., 1997). CCL18 und CCL19 rekrutieren naive T-Zellen in die T-Zell-Bereiche der LNs, wohingegen CCL3, CCL22 und CCL17 hauptsächlich aktivierte T-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen rekrutieren (Cyster, 1999; Imai et al., 1999; Lieberam and Förster, 1999; Schaniel et al., 1999).

Falls die in die Lymphknoten eingewanderten DCs nicht mit antigenspezifischen T-Zellen zusammentreffen, so sterben sie innerhalb weniger Stunden durch Apoptose (De Smedt et al., 1998). Wenn jedoch die auf den MHC I/II-Molekülen präsentierten fremden Antigene von den Rezeptoren der T-Zellen (T-Zell-Rezeptor, TCR) erkannt werden, werden durch die Interaktion bestimmter Rezeptoren Signale an die DCs übermittelt, die den programmierten Zelltod verhindern können. Beispiele dafür sind CD40L bzw. TRANCE auf der T-Zelle, die mit CD40 bzw. TRANCE-R, die von DCs exprimiert werden, interagieren (Ludewig et al., 1995; Wong et al., 1997).

Antigenpräsentierung und T-Zell-Aktivierung

Nur DCs sind in der Lage, naive T-Zellen zu aktivieren und die primäre Immunantwort zu initiieren. Zur Aktivierung der T-Lymphozyten durch APCs sind zwei Signale notwendig: Das erste Signal wird durch die Bindung des MHC/Peptid-Komplexes an den TCR sowie durch die Korezeptoren CD4 (im Falle von MHC II) und CD8 (im Falle von MHC I) ausgelöst. Das zweite Signal kann z.B. von den Rezeptoren CD28 oder CD40L auf Lymphozyten, die mit B7-1,2 bzw. CD40 auf Seiten der APC reagieren, vermittelt werden (Ennis et al., 1993; Krummel and Allison, 1995; Lenschow et al., 1996; Van Severter et al., 1990). Beide Signale zusammen führen zur Aktivierung und Proliferation der Ag-spezifischen T-Zellen. Falls die naiven T-Zellen mit ihrem Rezeptor nur den Liganden binden und das zweite kostimulierende Signal ausbleibt, werden die betroffenen Zellen anergisch, d.h. sie sind funktionell inaktiv. Abbildung 1.2 zeigt die Reifung der DCs und die damit einhergehende Änderung des Zytokinprofils, der Oberflächenmarker-Expression und der Funktion im Überblick:

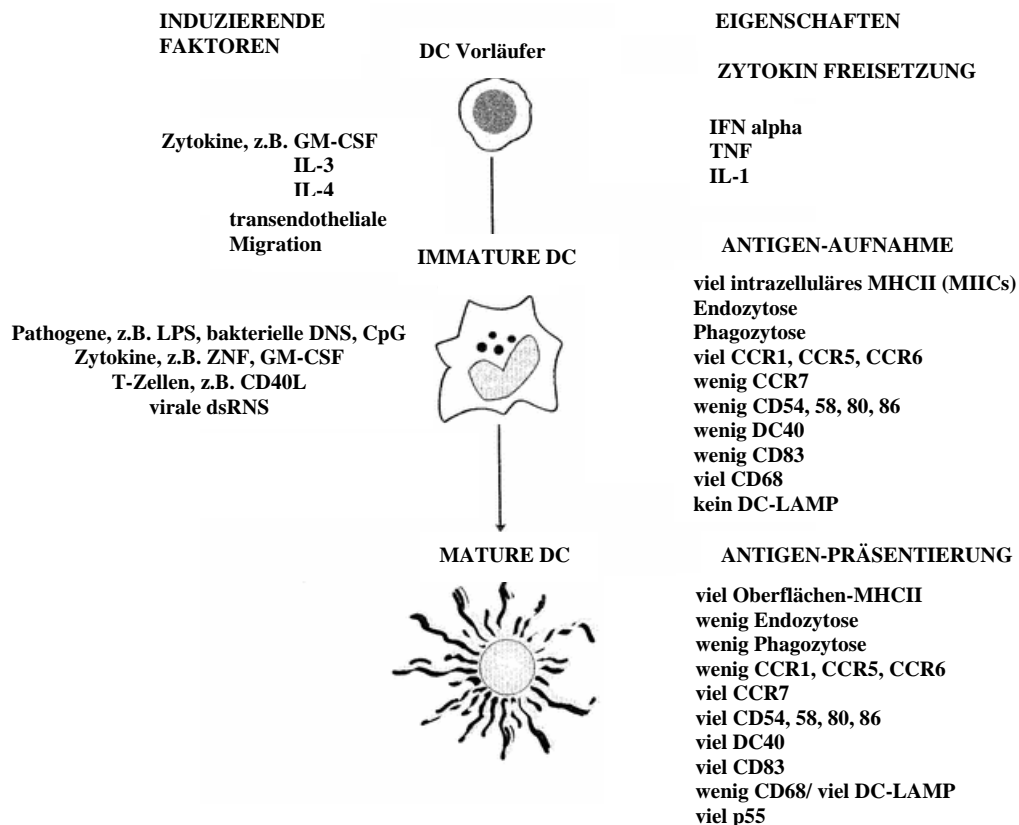


Abb. 1.2: Die Reifung der dendritischen Zellen.

Die linke Seite des Schemas zeigt die Faktoren, die den Übergang von einer Stufe zur nächsten induzieren; die rechte Seite zeigt die wichtigsten Eigenschaften jeder Differenzierungs/Maturierungsstufe (nach Banchereau, 2000).

1.2.3 Die Unterklassen von dendritischen Zellen und die Rolle von CCL17⁺ dendritischen Zellen

Anhand der Expression der Oberflächenmoleküle CD11b (Integrin- α_M Kette von Mac-1), DEC205 (C-Typ-Lektin) und B220 (CD45 Isoform), vor allem aber anhand der Expression von CD4 und CD8 α , lassen sich innerhalb der Familie der CD11c⁺ dendritischen Zellen verschiedene Subpopulationen abgrenzen. Heute ist allgemein akzeptiert, dass sich diese Subpopulationen nicht nur in der Expression ihrer Oberflächenmoleküle, sondern auch hinsichtlich ihrer Funktion unterscheiden.

DC-Subpopulationen

In der Milz kann man 3 Subpopulationen aufgrund der Stärke der CD8 α -Expression voneinander abtrennen: CD8 α^+ CD4 $^-$, CD8 α^- CD4 $^+$ und CD8 α^- CD4 $^-$ DCs (Vremec et al., 2000).

Die „lymphoiden“ CD8 α^+ DCs befinden sich hauptsächlich in den T-Zell-Bereichen der Milz. Die „myeloiden“ CD8 α^- DCs sind dagegen zunächst vor allem in der Marginalzone zu finden, nach Stimulation mit mikrobiellen Produkten migrieren jedoch auch sie in die T-Zell-Zone (De Smedt et al., 1996; Iwasaki and Kelsall, 2000; Reis e Sousa et al., 1997). CD4 $^-$ CD8 α^+ DCs, die zugleich auch DEC205 $^+$ CD11b $^-$ sind, sind in geringem Maße in Lymphknoten zu finden, stellen aber v.a. die Hauptpopulation der DC im Thymus dar. Zwei Subpopulationen, die nur in LN und nicht in der Milz gefunden werden können, sind die CD4 $^-$ CD8 α^{int} CD11b $^+$ DCs, die vermutlich eine mature Form der interstitiellen Gewebs-DCs darstellen. Sie unterscheiden sich von den DC der Milz durch eine intermediäre Expression von DEC205 (Anjuere et al., 1999; Henri et al., 2001; Iwasaki and Kelsall, 2000). Ebenfalls durch eine intermediäre CD8 α Expression - neben DEC205- und CD11b-Expression - zeichnen sich die DCs aus, die sich in den drainierenden LN der Haut befinden. Da sie zusätzlich Langerin, einen Marker für epidermale Langerhans-Zellen, exprimieren, nimmt man an, dass diese Subpopulation die mature Form von Langerhans-Zellen darstellt (Henri et al., 2001), worauf auch die hohen Expressionslevel der DC-Aktivierungsmarker MHC II, CD40, CD80 und CD86 hinweisen. Die CD8 α^{int} DCs der mesenterialen LN scheinen hingegen in der Lamina Propria ihren Ursprung zu haben. Eine weitere Untergruppe der murinen DCs stellen die plasmazytoiden Gr-1 $^+$ B220 $^+$ DCs dar, die funktional den B220 $^+$ DCs des Menschen entsprechen. Sie können in allen lymphoiden Organen der Maus gefunden werden und zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, nach einer viralen Infektion große Mengen an Typ 1 Interferonen produzieren zu können (Boonstra et al., 2003). Zudem scheinen sie durch die Induktion von regulatorischen T-Zellen (T $_{\text{Reg}}$) an der Aufrechterhaltung der T-Zelltoleranz beteiligt zu sein (Bilsborough et al., 2003).

Die CD8 α^- DCs der Milz bzw. die CD8 α^{int} der Peyerschen Patches (PPs) befinden sich v.a. in Bereichen, in denen die DCs Antigene aufnehmen (Marginalzone und subepithelialer Dom) (Iwasaki and Kelsall, 2000; Leenen et al., 1998) und scheinen eine höhere endozytische und phagozytische Kapazität als CD8 α^+ DCs zu besitzen (Kamath

et al., 2002; Leenen et al., 1998). *In-vivo*-Studien zeigten, dass $CD8\alpha^-$ DCs überwiegend eine T_H2 -T-Zell-Antwort hervorrufen, wohingegen $CD8\alpha^+$ DCs aufgrund der erhöhten IL-12 und $IFN\gamma$ -Produktion hauptsächlich eine T_H1 -T-Zell-Antwort induzieren (Maldonado-Lopez et al., 2001; Ohteki et al., 1999). Jedoch konnten *in vitro*-Versuche eine hohe funktionale Plastizität von DCs nachweisen: Unter bestimmten Bedingungen, z.B. bei CD40L-vermittelter Aktivierung, können auch $CD8\alpha^-$ DCs IL-12 freisetzen (Fallarino et al., 2002; Maldonado-Lopez et al., 2001) und T_H1 -Zytokine produzieren bzw. $CD8\alpha^+$ DCs bei niedrigen Ag-Dosen die Produktion von T_H2 -Zytokinen induzieren (Boonstra et al., 2003). Ferner konnte gezeigt werden, dass $CD8\alpha^-$ DCs nach *in vitro*-Aktivierung mit mikrobiellen Stimuli $IFN-\gamma$ und IL-12 produzieren können (Maldonado-Lopez et al., 2001) und nach Fc-Rezeptor-vermittelter Aktivierung die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation („cross-priming“) erlangen (den Haan and Bevan, 2002). Ob diese funktionale Plastizität auch *in vivo* existiert, muss noch gezeigt werden. Abbildung 1.3 stellt eine Zusammenfassung der unterschiedlichen Rollen von $CD8\alpha^+$ und $CD8\alpha^-$ DCs dar.

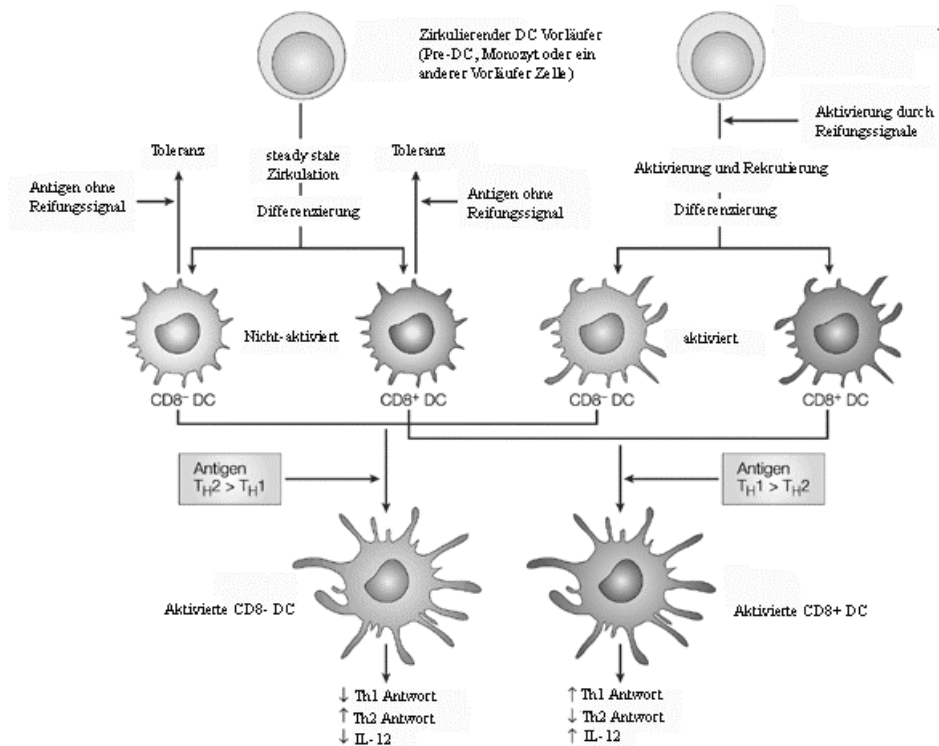


Abbildung 1.3: Modell der $CD8\alpha^+$ und $CD8\alpha^-$ DC Differenzierung, Aktivierung und Funktion (Ardavin, 2003). Die Induktion einer T-Zell Antwort könnte von $CD8^+$ und $CD8^-$ DC abhängen, die sich zum Zeitpunkt des Antigen-Eintritts bereits in lymphoiden Organen befinden (links) und/oder von neu generierten DC, die sich -induziert durch Antigen- aus zirkulierenden DC Vorläuferzellen differenzieren (rechts). Bei Abwesenheit von Reifungssignalen (danger signals) könnten nicht-aktivierte DC an der Ausbildung von peripherer Toleranz beteiligt sein. Differenzierung von DC aus Vorläuferzellen, die durch Antigen zusammen mit einem Reifungssignal aktiviert und rekrutiert wurden, entwickeln sich zu voraktivierten $CD8^+$ und $CD8^-$ DC. Nach Aufnahme von Antigen zusammen mit einem Reifungssignal durchlaufen $CD8^+$ und $CD8^-$ DC ein Aktivierungsprogramm, das letztendlich zur Aktivierung von Antigen-spezifischen T-Zellen führt. $CD8^-$ DC antworten hauptsächlich auf Th2-Antigene und induzieren daher eher Th2 gerichtete Immunantworten. Im Gegensatz dazu werden $CD8^+$ DC eher durch Th1-Antigene aktiviert und induzieren folglich, v.a. durch hohe IL-12 Produktion, Th1 gerichtete Immunantworten und die Differenzierung von zytotoxischen T-Zellen.

CCL17⁺ dendritische Zellen

Das Chemokin CCL17 und sein Rezeptor

Humanes (hu) CCL17 (TARC; thymus- and activation-regulated chemokine) ist ein auf Chromosom 16 codiertes, 8 kDa großes Chemokin (Imai et al., 1996), das von Keratinozyten und Endothelzellen der Venen in chronisch entzündeter Haut, vor allem aber von DCs myeloiden Ursprungs exprimiert wird (Campbell et al., 1999; Sallusto et

al., 1999; Vestergaard et al., 2001). Obwohl huCCL17 ursprünglich als ein Thymus-spezifisches Chemokin beschrieben wurde, konnte eine Expression auch in einer Vielzahl anderer Organe, darunter Lunge, Leber und der schon erwähnten Haut, nachgewiesen werden (Imai et al., 1996; Lieberam and Förster, 1999). CCL17 ist ein Ligand des Chemokin Rezeptors CCR 4. Ein weiterer CCR4-Ligand ist das von mononukleären Zellen (auch MΦ, B-Zellen, myeloide DCs) exprimierte Chemokin MDC („macrophage-derived chemokine“) bzw. CCL22 (Andrew et al., 1998; Godiska et al., 1997). CCR4 wird hauptsächlich auf T_H2-T-Zellen und den CLA⁺ („cutaneous lymphocyte antigen“) Gedächtnis-T-Zellen der Haut exprimiert (Campbell et al., 1999). Auch auf CD25⁺ regulatorischen Gedächtnis-T-Zellen konnte CCR4-Expression gezeigt werden (Iellem et al., 2001). Da CCL17 vor allem CD4⁺ T_H2-T-Zellen rekrutiert, wird CCL17 auch als T_H2-Chemokin bezeichnet. Daneben konnte CCR4-Expression auch auf natürlichen Killerzellen („natural killer cells“, NK-Zellen), Monozyten, Langerhans Zellen (LC) und Blutplättchen nachgewiesen werden. CCL17 und CCL22 scheinen durch ihre Bindung an CD4⁺ T_H2 Lymphozyten eine Rolle bei allergischen Entzündungen der Atemwege, bei atopischer Dermatitis und beim septischen Schocksyndrom zu spielen (Chvatchko et al., 2000; Romagnani, 2002).

Die Aufgaben von CCL17⁺ DCs

CCL17⁺ DCs gehören zu den maturen myeloiden CD8α⁻CD11b⁺DEC205⁺ DCs, eingeschlossen der LC-abgeleiteten DCs der Haut (Alferink et al., 2003; Henri et al., 2001; Lieberam and Förster, 1999). CCL17⁺ DCs befinden sich bevorzugt in den drainierenden LNs der Haut oder des Darms und auf Schleimhäuten. Demgemäß kann die Expression von CCL17 durch den Kontakt zu Umwelt-Antigenen induziert werden. In den PPs kann man die CCL17⁺ DCs am subepithelialen Dom finden, der Eingangsstelle für Antigene und Mikroben. Von da migrieren sie in die interfollikuläre Region und treten nach dem Aufeinandertreffen mit dem Ag mit T-Zellen in Kontakt (Alferink et al., 2003; Iwasaki and Kelsall, 1999; Iwasaki and Kelsall, 2001). In der Lamina Propria (LP) kann man CCL17⁺ DCs in den basalen Krypten finden; die DCs, die sich dort befinden, demnach auch die dort lokalisierten CCL17⁺ DCs, könnten an einem alternativen Weg der Ag-Aufnahme über das Öffnen von sog. *Tight Junctions* beteiligt sein (Alferink et al., 2003; Rescigno et al., 2001).

Erstaunlicherweise kann man in der Milz selbst nach systemischer bakterieller Infektion keine CCL17 Expression induzieren. Dies legt den Schluss nahe, dass die durch CCL17 vermittelte Attraktion von Effektor-T-Zellen bzw. aktivierten T-Zellen bevorzugt an Stellen stattfindet, die häufig von Ag aus der Umgebung frequentiert werden, wie z.B. die LNs oder das mukosale Immunsystem. CCL17-defiziente Mäuse zeigen eine reduzierte Kontakt-Hypersensitivität und eine verzögerte Transplantat-Abstoßung (Alferink et al., 2003).

Aufgrund der Fähigkeit, IL-12 zu produzieren und bei Ag-spezifischen T-Zellen sowohl IFN- γ -Produktion als auch Proliferation zu induzieren (Alferink et al., 2003), sind CCL17⁺ DCs immunstimulatorisch tätig. Verglichen mit der CCL17⁻ Subpopulation aus DCs, die aus Knochenmarks-Vorläuferzellen hergestellt oder aus LNs gewonnen wurden, stellt die CCL17⁺ Untergruppe die potentere APC-Population dar (Alferink et al., 2003).

1.3 NF- κ B als Regulator der Immunantwort

Der NF- κ B Signalweg nimmt unter allen bisher bekannten Signalwegen aufgrund der Schnelligkeit der Aktivierung und des ungewöhnlichen Regulationsmechanismus eine Sonderstellung ein.

Der evolutionär konservierte Transkriptionsfaktor NF- κ B wurde 1986 als ein im Zellkern von B-Zellen lokalisierter Faktor identifiziert, der an ein Enhancer-Element des Gens für die leichte Kette des Immunglobulin (Ig) κ gebunden war und so dessen Expression kontrollierte (Sen and Baltimore, 1986). Heute jedoch weiß man, dass sich die NF- κ B-Expression nicht nur auf B-Zellen beschränkt, sondern in nahezu jedem Zelltyp zu finden ist. Entsprechend diesem fast ubiquitären Vorkommen spielt NF- κ B in der Regulation sowohl der innate als auch der adaptiven Immunantwort eine herausragende Rolle, so z.B. bei der Steuerung von inflammatorischen und apoptotischen Prozessen. Die Kontrolle erfolgt dabei durch die transkriptionelle Aktivierung der Expression einer Vielzahl von zellulären und viralen Genen, die die sog. κ B-Site, die Bindestelle für NF- κ B, besitzen (Baldwin, 1996; Ghosh et al., 1998): In Lymphozyten z.B. reguliert NF- κ B die Aktivierung, die Proliferation und die Effektorfunktionen durch die Induktion von immunmodulatorischen Faktoren, u.a. von Zytokinen (TNF, IL-1, IL-6), Chemokinen („monocyte chemotactic protein-1“ MCP-1,

IL-8), Adhäsionsmolekülen („intracellular adhesion molecule-1“ ICAM-1, „vascular cellular adhesion molecule –1“ VCAM-1), anti-mikrobiellen Peptiden, Zellzyklusregulatoren und anti-apoptotischen Proteinen. Insgesamt werden mehr als 150 Gene NF- κ B abhängig reguliert, darunter auch Gene, welche ihrerseits NF- κ B stimulieren (Baeuerle and Baltimore, 1996; Pahl, 1999; Siebenlist et al., 1994). Einige der NF- κ B-regulierten Gene sind in Tabelle 1.1 aufgeführt:

Interleukine und Wachstumsfaktoren	IL-1, -2, -6, -8, -12, TNF α , G-CSF, M-CSF, GM-CSF, IFN- β , MGSA/gro- α
Zytokine und Zelladhäsionsrezeptoren	IL-2R α , E-Selektin, ICAM-1, VCAM-1, MadCAM-1, BLR1
Apoptosis-bezogene Faktoren	A20, Bcl-2-Familie (A1), XIAP, c-IAP1, c-IAP2, Fas, TRAF1, TRAF2
Immunmodulatoren	MHC I u. II, TCR- α u. - β , Ig- κ , TAP-1, LMP2, IRF-1, IgE
andere	Komplement-Faktoren B, C3, C4, iNOS, COX-2, I κ B α , NF- κ B1, NF- κ B2, p53

Tabelle 1.1: Gene, die von NF- κ B reguliert werden (modifiziert nach de Martin, 1999).

Besonders in den letzten Jahren wurde die Rolle von NF- κ B als Regulator der Apoptose, einem wichtigen Prozess, der die Entwicklung und Selektion von T- und B-Zellen steuert und die immunologische Homöostase in der Peripherie aufrechterhält, entdeckt. Dabei kann NF- κ B sowohl eine pro- als auch eine anti-apoptotische Funktion erfüllen. Die ersten Hinweise auf eine Apoptose-supprimierende Wirkung von NF- κ B kamen von Analysen von RelA (ein Mitglied der NF- κ B Familie, s.u.)- defizienten Mäusen, welche am embryonalen Tag 15 (E15) infolge einer TNF α -induzierten Leber-Apoptose starben (Beg et al., 1995b). Andere Experimente, die die verschiedenen von TNF α via TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) aktivierten Signalwege untersuchten, zeigten unabhängig voneinander, dass NF- κ B eine wichtige anti-apoptotische Funktion hat (Liu et al., 1996).

Die anti-apoptotische Funktion des Transkriptionsfaktors (TF) wird durch die Induktion von anti-apoptotischen Genen durch NF- κ B vermittelt: So stehen z.B. die „cellular inhibitors of apoptosis“ (c-IAPs), „caspase-8-c-FLIP“ (FLICE inhibitory protein), A1, „TNFR-associated factor“ 1 und 2 (TRAF1 und 2) unter Kontrolle von NF- κ B. TRAF1 und 2 sind Adaptermoleküle, die für eine optimale Aktivierung von NF- κ B notwendig sind; wahrscheinlich gründet sich darauf ihre anti-apoptotische Wirkung. Die c-IAPs (auch das davon regulierte „x chromosome-linked IAP“ XIAP) und c-FLIP wiederum

binden an die Effektor-Caspasen Caspase-3 und –7 und inhibieren so deren apoptotische Wirkung. Daneben verhindern sie die Aktivierung der Pro-Caspasen 6, 9 und 8 (Deveraux et al., 1998). Mitglieder der Bcl-2 Familie wie z.B. A1 oder Bcl-x_L agieren durch die Blockierung der Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien über den Mitochondrien-abhängigen Apoptose-Weg (Wang et al., 1999). Abbildung 1.4 zeigt die anti-apoptotischen NF-κB-abhängigen Faktoren im Überblick:

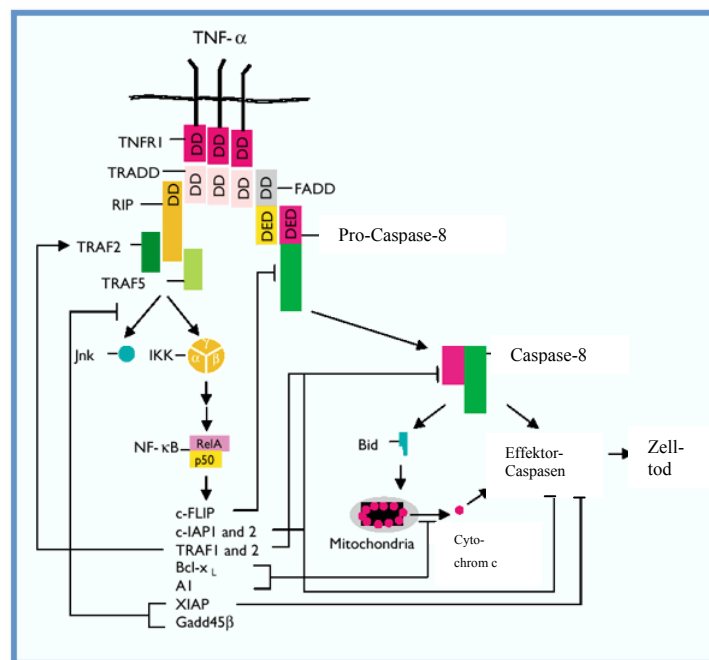


Abb. 1.4: NF-κB induziert verschiedene anti-apoptotische Faktoren, die vor TNFα-induzierter Apoptose schützen können. Diese anti-apoptotischen Faktoren schließen c-FLIP, c-IAPs, Mitglieder der Bcl-2 Familie (A1, Bcl-x_L) und XIAP mit ein (nach Karin, 2002).

Neben dieser Vielzahl an NF-κB-regulierten anti-apoptotischen Faktoren gibt es pro-apoptotische Stimuli, die in der Lage sind, diese zu umgehen bzw. zu inaktivieren. So stellen z.B. viele Schlüsselkomponenten des TNFα-aktivierten NF-κB Signalweges Zielstrukturen für Caspasen dar, was schließlich zur Inaktivierung der anti-apoptotischen Aktivität führt: Caspase 8 z.B. spaltet die Adaptermoleküle RIP und TRAF1, welche daraufhin die Fähigkeit zur Signalweiterleitung verlieren (Hong et al., 2000; Lin et al., 2000). Auch ein Inhibitor-Protein von NF-κB, IκBα, kann von Caspase-3 gespalten werden: Das verbleibende truncierte Protein kann aufgrund seiner nun fehlenden regulatorischen Domäne am NH₂-Terminus nicht vom 26S-Proteosom degradiert werden, woraufhin NF-κB als inaktiver TF im Cytosol verbleiben muss

(Reuther and Baldwin, 1999). Auch NF- κ B selber kann von Caspasen gespalten werden; eine Signalweiterleitung ist dann nicht mehr möglich, eine Aktivierung der anti-apoptotischen Faktoren kann nicht stattfinden (Levkau et al., 1999).

Der Funktion von NF- κ B als Schlüsselkomponente bei der Regulation der Immunantwort entsprechend können Fehler in der Signalkaskade des TF zu Erkrankungen von Mensch und Maus führen. So zeigt sich mehr und mehr, dass NF- κ B eine nicht unerhebliche Rolle bei der Erhaltung und sogar auch bei der Initiierung von Tumoren spielt. Virale Onkogene können z.T. direkt NF- κ B konstitutiv aktivieren und so zur unkontrollierten Zellproliferation führen (Xiao et al., 2001). Tumoren mit konstitutiver NF- κ B-Aktivität zeigen vermutlich aufgrund der NF- κ B-abhängigen Expression des „multidrug resistance P-glycoprotein“ eine erhöhte Resistenz gegenüber chemotherapeutischer Behandlungen (Bentires-Alj et al., 2003; Zhou and Kuo, 1997). Auch bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie z.B Morbus Crohn wurden Hinweise auf eine konstitutive NF- κ B-Aktivität und somit eine Beteiligung des TFs an diesen Krankheiten gefunden (Ardite et al., 1998; Keates et al., 1997; Kim et al., 2001; Neurath et al., 1996; Rogler et al., 1998).

Eine Mutation des x-chromosomal gekoppelten NF- κ B-Mitglieds NEMO („NF- κ B essential modulator“ oder IKK γ ; s.u.) führt zur Ausprägung der Krankheit „incontinentia pigmenti“, IP, welche sowohl in der Maus als auch bei Menschen vorkommt: Die Betroffenen weisen je nach Schweregrad der Erkrankung Hautrötungen, Bläschen, Pusteln, warzige Läsionen, Hyperpigmentierungen, Blässe und Narbenbildung auf, gepaart mit einer erhöhten Granulozyteninfiltration und einer erhöhten Apoptose von Keratinozyten (Landy and Donnai, 1993; Schmidt-Supprian et al., 2000). Aufgrund der gonosomalen Kopplung von NEMO führt eine Mutation bei männlichen Tieren zum pränatalen Tod, wohingegen heterozygot betroffene weibliche Mäuse ein schachbrettartiges Muster der x-Inaktivierung zeigen.

1.3.1 Die NF- κ B-Proteinfamilie

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B besteht aus einer Familie von dimeren DNS-bindenden Proteinen. In Säugetieren existieren fünf NF- κ B- Familienmitglieder: RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p50 und der Vorläufer p105) und NF- κ B2 (p52 und der Vorläufer p100) (s. Abb. 1.5). Sie kommen entweder als Homo- oder Heterodimere vor und

besitzen einen konservierten, 300 Aminosäuren (AS) umspannenden N-Terminus, die sog. Rel-homologe Domäne (RHD). Sie ist verantwortlich für die Dimerisierung der einzelnen Proteine, die nukleäre Lokalisation des TFs, die DNS-Bindung und für die Aktivierung der Transkription der Zielgene über die Transaktivierungsdomäne (TD) (Ghosh et al., 1998). Die Dimerbildung kann zwischen allen Mitgliedern stattfinden, ausgenommen zwischen RelB; der in den meisten Zelltypen vorherrschende NF- κ B-Dimer besteht aus p50 und RelA.

Die Aktivität des TFs ist strikt von den inhibitorischen („inhibitory“) κ B-Proteinen (I κ Bs) reguliert, welche durch den Besitz von je 33 AS umfassenden multiplen Ankyrin-Repeats, die Protein-Protein-Interaktionen vermitteln, gekennzeichnet sind (s. Abb. 1.5). Bisher bekannt sind die drei wichtigsten Isoformen I κ B α , I κ B β und I κ B ϵ , neben den NF- κ B-Vorläuferproteinen p100 und p105, I κ B ξ (Shiina et al., 2004) und Bcl-3. Bcl-3 interagiert spezifisch mit p52 und p50 Homodimeren und kann die Expression von NF- κ B-regulierten Genen induzieren; diese Funktion steht in scharfem Kontrast zu der inhibitorischen Funktion der anderen I κ B-Proteinen (Dechend et al., 1999; May and Ghosh, 1997). Hauptaufgabe der I κ B-Proteine ist es, NF- κ B durch Maskierung der Kernlokalisationssequenzen (NLSs) der Dimere in einem inaktiven Zustand im Zytoplasma zurückzuhalten.

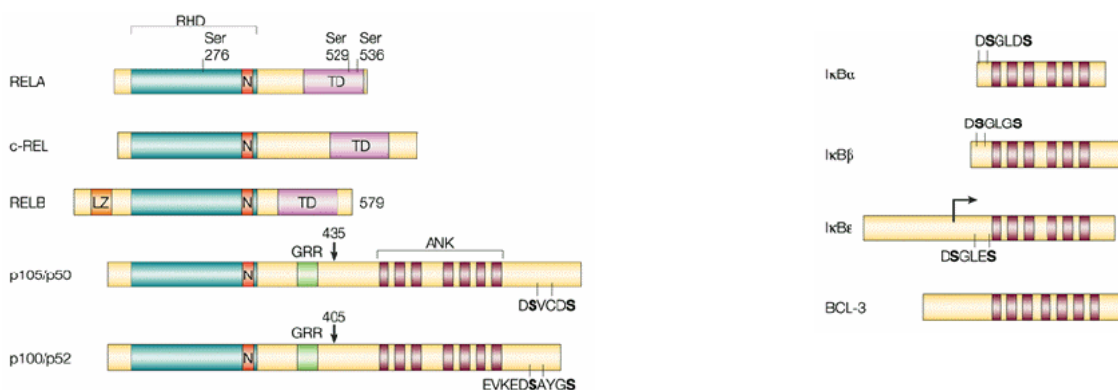


Abb. 1.5: NF- κ B- und I κ B α -Familienmitglieder in Säugetieren. *Linke Seite:* Die NF- κ B-Familie umfasst fünf Mitglieder: RelA (p65), c-Rel, RelB, p105/p50 (NF- κ B1) und p100/p52 (NF- κ B2). Sie besitzen eine strukturell konservierte Amino-terminale Rel-homologe Domäne (RHD), welche die Dimerisierungs-, die nukleäre Lokalisierungs (N)- und die DNS-Bindedomänen enthält. Die c-Rel-, RelB- und RelA-Proteine besitzen zusätzlich eine Carboxy-terminale, nicht-homologe Transaktivierungsdomäne (TD). RelB besitzt ein zusätzliches Leucin-Zipper-Motiv (LZ). *Rechte Seite:* Die I κ B-Familie umfasst I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ (zwei Transkripte) und Bcl-3, und ist charakterisiert durch viele Ankyrin (ANK)-Repeats. Die AS-Sequenzen, die die Phosphorylierung und die nachfolgende Degradierung induzieren, sind ebenfalls gezeigt (DSGLDS, DSGLGS bzw. DSGLES). p105 und p100 enthalten am Amino-Terminus RHDs und am Carboxy-Terminus die ANK repeats. Proteolytische Prozessierung von p105 und p100 an den Positionen 435 bzw. 405 (angezeigt durch die Pfeile) führt zur Bildung von p50 und p52. Die Glyzin-reiche Region (GRR) und die Carboxy-terminalen Stellen, wo induzierbare Phosphorylierung stattfindet (in der DSVCS und EVKEDSA YGS Sequenzen für p105 bzw. p100), werden für die Prozessierung benötigt. Phosphorylierung von RelA bei Ser276, Ser529 und Ser536 ist wichtig für die Transaktivierungs-Aktivität (nach Li, 2002).

Die Aktivierung von NF- κ B findet als Antwort auf verschiedenste extrazelluläre Stimuli (LPS, TNF α) oder nach physikalischem und chemischem Stress statt; eine Auswahl zeigt Tabelle 1.2:

Interleukine und Wachstumsfaktoren	IL-1, -2, TNF α , M-CSF, GM-CSF, IFN- γ , LIF
Mitogene	Phorbol-Ester, Lektine, PDGF, Kreuzvernetzen des TCR, Oberflächen-IgM, α CD2, -3, -28
Viren, Mikroorganismen und deren Produkte	HIV-1, HSV, HTLV-1, HBV, EBV, LPS, <i>Shigella flexneri</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Plasmodium falciparum</i>
Physikalische Stimuli	UV, γ -Strahlung
andere	Leukotrine, Prostaglandine; TLR-Liganden

Tabelle 1.2: NF- κ B-induzierende Stimuli (modifiziert nach de Martin, 1999).

Nach der Aktivierung werden die Signale über den NF- κ B-Weg bis zu den I κ B-Proteinen weitergeleitet, die degradiert werden und die NLS der NF- κ B-Dimere freisetzen. Diese translozieren in den Kern, binden an die κ B-Sites ihrer Zielgene und aktivieren die Transkription derselben.

1.3.2 *NF- κ B Signalweg*

Wie oben erwähnt, führen viele verschiedene Stimuli zur Aktivierung von NF- κ B, darunter auch LPS, TNF und die Bindung von Antigenen an den TCR. Anhand dieser drei Aktivierungswege wird im Folgenden der NF- κ B-Signalweg dargestellt.

Die Bindung von LPS an TLR4 führt zur Rekrutierung und Aktivierung der Adaptermoleküle MyD88 („myeloid differentiation primary response gene 88“) und IRAK1 („IL-1-receptor-associated kinase 1“). Das aktivierte IRAK1 wiederum phosphoryliert TRAF6 („TNF-receptor-associated factor 6“), welches das Signal über den TAB2/TAB1/TAK1-Komplex zum IKK („inhibitory κ B“-Komplex weiterleitet.

Die Bindung von TNF an den TNF Rezeptor (TNFR) führt zur Rekrutierung der Adaptermoleküle TRADD („TNFR-associated death domain“) und TARF2 und zur anschließenden Aktivierung der Kinasen MEKK3 („mitogen activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase 3“) und RIP („receptor-interacting serine/threonine kinase“), welche das Signal an den IKK-Komplex weiterleiten.

Die Stimulierung von T-Zellen infolge eines Kontaktes zu APCs oder zu α TCR-CD3-Ak führt zur schnellen Translokation von PKC θ („protein kinase C θ “) an die Plasmamembran. Zu den Komponenten, die an der Verbindung zwischen PKC θ und dem IKK-Komplex beteiligt sind, gehören MAGUK („membrane-associated guanylate kinase homologue“), BCL-10 und MALT („mucosal-associated lymphoid tissue“) 1.

Der IKK-Komplex, wo schließlich nach jeder Zellstimulierung die Aktivierungssignale der unterschiedlichen Aktivierungswege zusammenlaufen, besteht aus drei Komponenten, nämlich den höchst homologen katalytischen Untereinheiten IKK („inhibitory κ B Komplex“) 1 und IKK2 bzw. IKK α und IKK β und der regulatorischen Untereinheit IKK3 bzw. γ , auch NEMO genannt. NEMO und IKK β sind für die Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Weges nach Kontakt mit pro-inflammatorischen Stimuli essentiell (Chu et al., 1999; Li et al., 1999a; Li et al., 1999b; Li et al., 1999c; Makris et al., 2000; Rudolph et al., 2000; Senftleben et al., 2001; Tanaka et al., 1999). Im Gegensatz dazu ist IKK α an einer alternativen Aktivierung des NF- κ B-Weges beteiligt, die zusätzlich von IKK β abhängig ist. Dieser Signalweg kontrolliert die basale Prozessierung von NF- κ B2/p100 und die von BAFF („B-cell activating factor“), CD40L und Lymphotoxin β (LT β) induzierte Prozessierung von p100 in reifen B-Zellen (Kaisho et al., 2001; Coope et al., 2002; Dejardin et al., 2002; Kayagaki et al.,

2002; Senftleben et al., 2001). Zusätzlich reguliert IKK α unabhängig von NF- κ B die epidermale Differenzierung (Hu et al., 1999; Hu et al., 2001; Li et al., 1999a).

Das wichtigste Mitglied im IKK-Komplex ist NEMO. Mutationen dieses regulatorisch tätigen Proteins führen aufgrund massiver Apoptose von Hepatozyten zu embryonaler Lethalität (Rudolph et al., 2000). Auch das Auftreten von IP-ähnlichen Symptomen in weiblichen Mäusen konnte auf eine Mutation von NEMO zurückgeführt werden (Makris et al., 2000; Schmidt-Supprian et al., 2000). Des Weiteren wurde gezeigt, dass NEMO-defiziente Zellen nach Stimulation mit verschiedenen Stimuli in der abwärts von NEMO gelegenen Signalkaskade keine NF- κ B-Aktivität mehr aufweisen. Die genauen Mechanismen, wie NEMO NF- κ B reguliert, sind noch weitestgehend unbekannt; eine Hypothese besagt, dass NEMO den IKK-Komplex dadurch aktiviert, dass es ihn in die unmittelbare Nähe von anderen Proteinen rekrutiert und es so den aufwärts gelegenen Komponenten ermöglicht, die IKK-Funktion zu modulieren (Devin et al., 2001).

Weitere wichtige Regulatoren der NF- κ B-Aktivierung sind die bereits erwähnten I κ B-Proteine. Nach der Aktivierung des IKK-Komplexes phosphoryliert dieser die an die NLS der NF- κ B-Dimere gebundenen I κ B-Proteine, welche daraufhin ubiquitinyliert und vom 26S-Proteasom rasch degradiert werden. Die nun freien Dimere translozieren daraufhin in den Kern, wo sie durch Bindung an die κ B-Site im Promotor der jeweiligen Zielgene deren Transkription aktivieren.

Das wichtigste I κ B-Protein ist I κ B α , welches als einziges Protein der NF- κ B-Familie neben einer κ B-Site im Promotor eine nukleäre Export-Sequenz (NES) am Amino-Terminus besitzt. Da in einem NF- κ B-I κ B α -Komplex immer nur eine NLS in einem unstimulierten Zustand maskiert ist, kann der Komplex trotz nicht vorhandener Aktivierung in den Kern translozieren. Da der durch die NES hervorgerufene Export-Prozess effizienter ist als der Import-Prozess, kann trotz der noch unmaskierten NLS kein inaktiver NF- κ B-Komplex im Kern gefunden werden. Ein weiterer Hinweis auf die prominente Stellung von I κ B α sind die schweren Defekte, die I κ B α -defiziente Mäuse zeigen: Die Komplettknockouts sterben postnatal (Tag 9) aufgrund einer allgemeinen Immunschwäche. Des Weiteren zeigen sie eine inflammatorische Dermatitis und Granulozytose, die Lymphozyten zeigen eine erhöhte konstitutive NF- κ B-Aktivität. Eine Ersetzung von I κ B α mit I κ B β (unter Kontrolle des I κ B α -Promotors) kann zwar einen Wildtyp (WT)-Phänotyp wiederherstellen, was auf eine zumindest ähnliche

biochemische Funktion der beiden Proteine hinweist. Weitere Versuche haben jedoch gezeigt, dass I κ B β in einem anderen zeitlichen Muster wie I κ B α exprimiert wird und so *in vivo* die Deletion von I κ B α nicht kompensieren kann (Cheng et al., 1998).

Abbildung 1.6 zeigt eine Zusammenfassung der NF- κ B Signalkaskade.

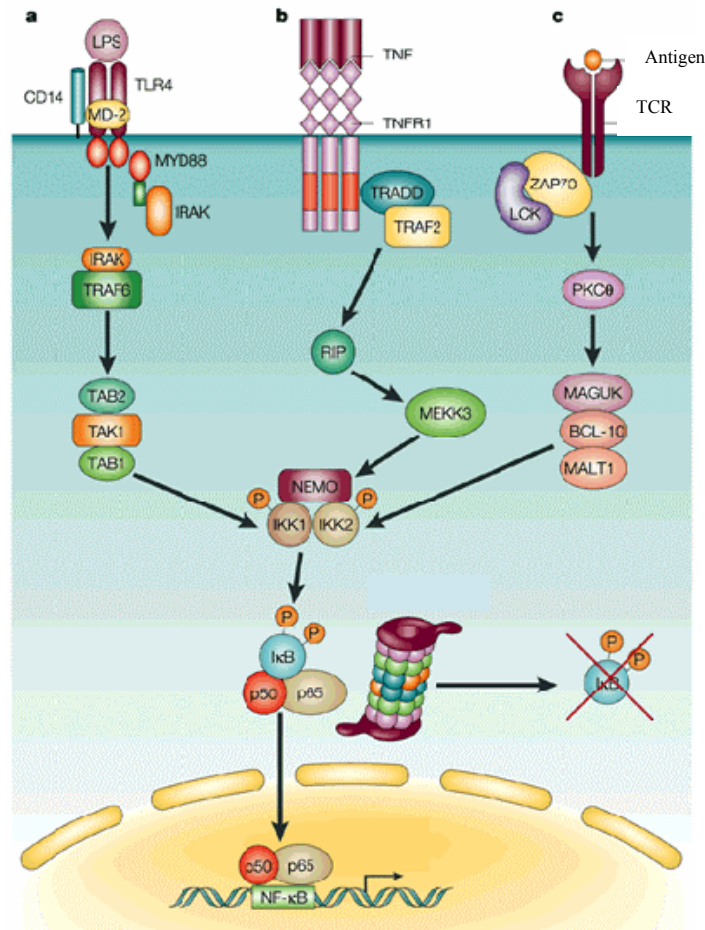


Abb. 1.6: NF- κ B Aktivierungswege. Der NF- κ B-Signalweg wird durch viele verschiedene Wege aktiviert, u.a. über den LPS-, den TNF- und den TCR-Weg. Der IKK-Komplex stellt einen Verschmelzungspunkt der unterschiedlichen Aktivierungswege dar. a) LPS-Weg. b) TNF-Weg. c) TCR-Weg (nach Li, 2002).

1.4 DC und NF- κ B

Viele Faktoren, die die Reifung der DCs induzieren, sind gleichzeitig starke Aktivatoren des NF- κ B-Signalweges (Baldwin, 1996; Ghosh et al., 1998). Tatsächlich konnte für huDCs gezeigt werden, dass die Aktivierung des TF mit der Maturierung der DCs korreliert, denn sowohl die Hochregulation der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40 und der inflammatorischen Zytokine wie z.B. IL-12 als auch die

Hochregulation von MHC II sind von NF- κ B abhängig (Yoshimura et al., 2001a; Yoshimura et al., 2003; Yoshimura et al., 2001b; O'Sullivan and Thomas, 2003; O'Sullivan and Thomas, 2002; Ouaz et al., 2002). Ebenso konnte unter Verwendung eines adenoviralen Transfers von I κ B α die Ag-Präsentation von DCs blockiert werden (Rescigno et al., 1998; Yoshimura et al., 2001b). Trotz dieser Ergebnisse ist die NF- κ B-abhängige Regulation der Expression dieser Oberflächenmoleküle umstritten. So konnte auch gezeigt werden, dass p50/cRel-defiziente Tiere nach 24 h LPS-Stimulation keinen Unterschied in der Expression von MHC I, MHC II, CD80 und CD86 zeigen (Ouaz et al., 2002).

Die Analyse von p50/RelA defizienten Mäusen zeigte dramatische Defekte in der Entwicklung von DCs: In der Milz sind aufgrund massiven Zelltodes fast keine CD11c⁺ DCs vorhanden; somit scheint das Dimer p50/RelA eine wichtige Rolle bei der Generierung von sowohl CD11c⁺CD8 α ⁺ als auch CD11c⁺CD8 α ⁻ DCs zu spielen. Im Gegensatz dazu entwickeln sich DCs von p50/c-Rel^{-/-} Mäusen trotz dramatisch reduzierter Bindung von NF- κ B an die κ B-Sites normal, zeigen jedoch eine erhöhte Apoptose-Rate nach Stimulierung mit CD40L und TRANCE und eine beeinträchtigte IL-12-Produktion (Ouaz et al., 2002).

RelB ist für die Entwicklung von myeloiden CD11c⁺CD8 α ⁻ DCs, nicht aber für die Entwicklung von CD11c⁺CD8 α ⁺ DCs, notwendig. Ebenso spielt RelB eine Rolle bei der Reifung und Ag-Präsentation von BM-DCs (Wu et al., 1998; Zanetti et al., 2003).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Bei der Regulation der Immunantwort spielen Antigen-präsentierende Zellen (APC) eine entscheidende Rolle. Vor allem DC, die potentesten APCs, stehen dabei an der Schnittstelle zwischen angeborener und erworbener Immunantwort. Im Falle einer bakteriellen Infektion oder einer Entzündung müssen die DCs nach Bindung der Liganden an ihre Rezeptoren rasch auf die Veränderungen in ihrer Mikroumgebung reagieren können und entsprechende Signale über Signalkaskaden in das Zellinnere weiterleiten. Eine der am häufigsten vorkommenden Antworten nach Rezeptorbindung ist die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und die Synthese von neuen Proteinen. Den wichtigsten Transkriptionsfaktor stellt dabei NF- κ B dar, denn durch seine Fähigkeit, eine Vielzahl von inflammatorischen Genen zu aktivieren, kommt ihm eine zentrale Rolle in der Steuerung immunologischer Prozesse zu.

Ziel dieser Arbeit war es nun, die NF- κ B Funktion durch konditionale Geninaktivierung von zwei Mitgliedern der NF- κ B-Familie in murinen DCs zu analysieren. Dies sollte mit Hilfe der sog. CCL17cre-Maus geschehen. Die CCL17cre-Maus ist die erste Maus, die eine spezifische Deletion in DCs erlaubt, allerdings nur in der CCL17⁺ Subpopulation. Diese Subpopulation stellt jedoch innerhalb der DCs eine herausragende Unterklasse dar, da sie an den Eintrittspferten externer Ag lokalisiert ist und zudem eine wichtige Rolle bei der Transplantatabstoßung, der Kontakthypersensibilität, der Kreuzpräsentation (Kurts, pers. Mitteilung) und der Abwehr von Parasiten (Hörauf, pers. Mitteilung) spielt.

Um die NF- κ B-Funktion in CCL17⁺ DCs zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Strategien angewendet: Zum einen sollte NF- κ B durch fehlende Inhibition über I κ B α überexprimiert werden, und zum anderen sollte die NF- κ B-Funktion durch NEMO-Deletion ausgeschaltet werden. Eine elegante Möglichkeit, ein bestimmtes Gen zellspezifisch zu inaktivieren, stellt das Cre/loxP-System dar: Die DNS-Rekombinase Cre aus dem Bakteriophagen P1 bindet spezifisch „loxP“ Rekombinationssequenzen von 34 bp Länge und vermittelt durch reziproken Strangaustausch die Deletion von DNS-Sequenzen, die von zwei in gleicher Orientierung angeordneten loxP-Sequenzen flankiert werden (Abremski et al., 1983; Sauer and Henderson, 1988). Mäuse, die das loxP-flankierte konditionale Allel tragen, werden mit Cre-Transgenen gekreuzt, die die Rekombinase unter Kontrolle eines bestimmten Promotors ausprägen. In den Cre-

exprimierenden Zellen inaktiviert die Rekombinase das Zielgen durch Deletion, während es in den übrigen Zellen des Organismus intakt bleibt. Von besonderem Vorteil ist diese Methode, wenn eine Null-Mutation des Gens in der Keimbahn zu neonataler oder embryonaler Lethalität führt, wie es z.B. bei $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ - oder NEMO-KOs der Fall ist (Beg et al., 1995a; Rudolph et al., 2000).

Um eine spezifische Deletion beider NF- κ B-Mitglieder in CCL17^+ DCs zu erhalten, sollten bereits vorhandene CCL17cre Mäuse, welche das Enzym Cre-Rekombinase unter Kontrolle des CCL17 -Promotors exprimieren (I. Lieberam, Dissertation, und I. Förster, unveröffentlichte Daten), zum einen mit Tieren gekreuzt werden, die ein gefloxtes Allel des NF- κ B-Inhibitors $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ tragen (Rupec et al., 2005). Diese Mäuse wurden freundlicherweise von K. Pfeffer und R. Rupec zur Verfügung gestellt. Andererseits sollten die CCL17cre -Mäuse mit Tieren gekreuzt werden, die ein gefloxtes NEMO-Allel tragen (Schmidt-Supprian et al., 2000). Die jeweils daraus resultierenden $\text{CCL17cre I}\kappa\text{B}\alpha$ bzw. CCL17cre NEMO Mäuse sollten zuerst bezüglich der Spezifität der Deletion der jeweiligen gefloxtten Allele untersucht werden. Bei erfolgreicher Deletion von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ bzw. NEMO in CCL17^+ DCs stellen diese Tiere ein geeignetes Modell für die Analyse der NF- κ B-Funktion in dieser Subpopulation dar.

Um die CCL17^+ und somit NEMO-deletierten DCs direkt analysieren zu können, sollten zusätzlich sog. Reporter-mäuse, welchen eine eGFP („enhanced green fluorescent protein“-)Kassette in den CCL17 -Locus inseriert wurde, verwendet werden. Die NEMO-defizienten DCs können anhand der grünen Fluoreszenz leicht diskriminiert und spezifisch analysiert werden (Alferink, 2003).

2 Material und Methoden

2.1 Bezugsquellennachweis

2.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
λ /Hind-DNS Längenstandard	Invitrogen, Taufkirchen
γ - ³² P-dATP	Amersham, Braunschweig
α - ³² P-dCTP	Amersham, Braunschweig
[Methyl- ³ H] Thymidin	Amersham, Braunschweig
β -Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen
1 kb-DNS Längenstandard	Invitrogen, Karlsruhe
10X PBS	Biochrom, Berlin
20X SSC	Invitrogen, Karlsruhe
20X SSPE	Invitrogen, Karlsruhe
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA (Rinderserumalbumin, RIA Qualität)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Chloramphenicol	Sigma, Taufkirchen
CFSE	Molecular Probes, USA
CpG	TIB MolBiol, Berlin
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma, Taufkirchen
Desoxynukleotide (dNTPs)	Invitrogen, Karlsruhe
Dithiothreoxat (DTT)	Sigma, Taufkirchen
DMEM-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA	Sigma, Taufkirchen
Ethanol	Apotheke, Klinikum rechts der Isar
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	Sigma, Taufkirchen
Fötales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech, Aidenbach
Geneticin (G418)	Invitrogen, Karlsruhe
Glyzerin	Sigma, Taufkirchen
HEPES Puffer, 1 M	GibcoBRL, Eggenstein
huCrP	Sigma, Taufkirchen
Isopropanol	Apotheke, Klinikum rechts der Isar
Kanamycin	Sigma, Taufkirchen
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
LPS	Sigma, Taufkirchen
Marker 1 kb DNS-Leiter	GibcoBRL Eggenstein
Methylenblau	Merck, Darmstadt
Mineralöl	Sigma, Taufkirchen

Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdextransulfat (DSS)	Pierce, USA
Natriumdodecylsulphat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
NF- κ B Bindesequenz	TIB Molbiol, Berlin
Paraformaldehyd	Sigma, Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
PIC (Proteinase Inhibitor Cocktail)	Sigma, Taufkirchen
PMSF (Phenylmethylsulphonylfluorid)	Sigma, Taufkirchen
RPMI 1640 Medium	Invitrogen, Karlsruhe
salmon sperm DNS (ssDNS)	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
Skim Milk (fettfreies Milchpulver)	Roth, Karlsruhe
TBS	GibcoBRL, Eggenstein
TEMED	Sigma, Taufkirchen
Thioglykollat	Sigma, Taufkirchen
TNF α	Sigma, Taufkirchen
TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
Tween-20	Sigma, Taufkirchen

2.1.2 *Enzyme*

Enzym	Bezugsquelle
T4-Polynukleotidkinase	Invitrogen, Karlsruhe
Bakterielle Alkalische Phosphatase	Invitrogen, Karlsruhe
Kollagenase D	Sigma, Taufkirchen
DNase I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Restriktionsenzyme	Invitrogen, Karlsruhe
Taq-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinase K	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Pronase E	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Restriktionsenzyme	GibcoBRL, Eggenstein Biolabs, New England

2.1.3 *Reagenzien, Kits und Verbrauchsmaterialien*

Reagenzien	Bezugsquelle
DNA-Quantification Kit	BioRad, München
CELLection™ Biotin Binder Kit	Dynal Biotech, Hamburg
ELISA-Kits	R&D
EMA	Moleclar Probes, Kalifornien

Film	Kodak® BioMax MS Film, Sigma-Aldrich, München
Kryoröhrchen	Peske oHG, Aindling-Pichl
Ligationskit	TaKaRa Bio Inc., Japan
MACS-Säulen	Miltenyi, Bergisch-Gladbach
Microspin Säulchen	Amersham, Braunschweig
M-PER® Mammalian Protein Extraction Kit	Pierce, USA
Nylonmembran Gene-screen-plus	Perkin Elmer, Zaventem
Chicken egg albumin (OVA)	Sigma, Taufkirchen
Peptid (SIINFEKL; OVA Peptid 257-264)	Affina GmbH, Berlin
Parafilm M	Nunc, Wiesbaden
Plastikwaren	Nunc, Wiesbaden
	Corning, USA
	Falcon, USA
Qiagen Gelextraction-Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen-Maxi-Filterprep	Qiagen, Hilden
Rediprime DNA Labelling System	Amersham, Braunschweig
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
SuperSignal® West Femto Chemiluminescence Substrate Kit	Pierce, USA
SuperSignal® West Pico Chemiluminescence Substrate Kit	Pierce, USA
Transfermembran (Western Blot)	Immobilon™ -P, Transfer Membranes, Millipore, USA
TOPO-TA-Cloning-Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Whatman Papier	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellsieb (70 und 100µm)	Falcon, USA

2.1.4 Geräte

Gerät	Hersteller
β-Counter	Matrix™ 9600, Canberra Packard, Frankfurt, Germany
Brutschrank	Cytoperm 2, Heraeus, Hanau
Durchflußzytometer	FACScalibur, Becton Dickinson, USA
Elektrophorese von DNS	BioRad, München
ELISA-Reader	Tecan Sunrise
FACS-Gerät und Auswert-Software	FACS Calibur und CellQuest, Becton Dickinson, USA
Fluorometer	VersaFluor™, BioRad, München
Geldokumentation	Eagle EYE II, Stratagene, Heidelberg
Geltrockner	BioRad, München
Kühlzentrifugen (Heraeus, Sorvall)	Sorvall® RC 26 Plus, Heraeus, Hanau
	Biofuge Stratos, Heraeus, Hanau
	Variofuge 3.0RS, Heraeus, Hanau
MACS	Miltenyi, Bergisch-Gladbach
Mikroskop	Axiocvert 25, Zeiss, Jena
	Axiolab, Zeiss, Jena
PCR-Maschinen	PTC-200 Peltier Thermal Cycler, Biozym, Oldendorf
	TrioThermoblock, Biometra, Göttingen
Phosphoimager	Storm 840, Molecular dynamics, USA

Photometer	Ultrospec 3000 pro, Amersham, Braunschweig
Spannungsquelle	BioRad, München
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Tischzentrifugen	Biofuge pico/fresco, Heraeus, Hanau
UV-Crosslinker	UV Stratalinker [®] 2400, Stratagene, Heidelberg
UV-Photometer	Ultrospec 3000pro, Amersham, Hanau
Western Blot Apparatur	BioRad, München
Zell-Harvester	Micro 96 Harvester, Skatron Instruments, England

2.2 Medien und Puffer

2.2.1 Stammlösungen und Puffer

Stammlösung oder Puffer		Zusammensetzung
AnnexinV-Bindepuffer	10 mM	HEPES/NaOH, pH 7,4
	140 mM	NaCl
	2,5 mM	CaCl ₂
	add milliQ	100 ml
EtBr	10 mg/ml	
G418	100 mg/ml	aktives Protein
	Lösen in Medium; pH mit 10 N NaOH auf physiologischen Wert einstellen	
PBS	13,7 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	80,9 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
LPS (aus <i>E. coli</i>; Serotyp O55:B5 <i>in vitro</i>; O127:B8 <i>in vivo</i>)	1 mg/ml	sonifiziert, gelöst in PBS, sterilfiltriert
rekombinantes murines TNFα	0,5 %	BSA PBS Stock: 1 μ g/ml
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	50 % (v/v)	Phenol pH: 8,0
	48 % (v/v)	Chloroform
	2 % (v/v)	Isoamylalkohol

TE-Puffer	10 mM 1 mM	Tris pH 8,0 EDTA pH 8,0
TNE-Puffer	10 mM 100 mM 1 mM	Tris pH 8,0 NaCl EDTA pH 8,0
Transferpuffer (Southern Blot)	0,4 N 0,6 M	NaOH NaCl
Neutralisationslösung (Southern Blot)	0,5 M 1 M	Tris pH 7 NaCl
Hybridisierungslösung (Southern Blot)	1 M 50 mM 10 % (w/v) 1 % (w/v) 0,5 mg	NaCl Tris pH 7,5 Dextransulfat SDS ssDNS/ml
Proteinase K	10 mg/ml	in H ₂ O _{bidest} gelöst
Pronase E	10 mg/ml 10 mM 10 mM	Pronase E Tris pH 8,0 NaOH Selbstverdau 1 h bei 37 °C
Verdaulösung (für die Isolierung chromosomaler DNS)		
I. für Southern Blot (Southern Blot Verdau-Puffer)	500 µl 50 µl 7,5 µl 25 µl	TNE SDS (10 %) Proteinase K Pronase E
II. für PCR-Typisierung (Lysis-Puffer)	100 mM 5 mM 200 mM 0,2 % (w/v) 100 µg/ml	Tris pH 8,5 EDTA pH 8,5 NaCl SDS Proteinase K
M-PER[®] Lysepuffer	1000 µl 2 mM 1:500	M-PER DTT PIC
1x SDS Probenauftragspuffer (Western Blot)	6,25 mM 2 % 10 % 50 mM 0,01 %	Tris-HCl pH 6,8 SDS Glycerol DTT Bromphenol- blau/Phenolrot

	add MilliQ	10 ml
Puffer B (EMSA)	10 mM	HEPES pH 7,9
	10 mM	KCl
	0,1 mM	EDTA pH 8,0
	1 mM	DTT
	0,5 mM	PMSF
	1 x	PIC
	0,4 %	Ipegal CA 360
Puffer C (EMSA)	20 mM	HEPES pH 7,9
	0,4 M	NaCl
	1 mM	EDTA pH 8,0
	1 mM	DTT
	1 mM	PMSF
	1 x	PIC
10 x L-Puffer (EMSA)	100 µl 1 M	Tris pH 7,5
	100 µl	1 M MgCl ₂
	10 µl	1 M DTT
	800 µl	H ₂ O
DEO-Puffer (EMSA)	20 mM	HEPES pH 7,9
	1 mM	MgCl ₂
	0,2 mM	EDTA pH 8,0
	10 %	Glycerol
	0,05 %	Ipegal CA 630
	60 mM	KCl
	20 µg/ml	BSA
SDS PAGE Laufpuffer (EMSA)	151 g	Tris
	940 g	Glycin
	add H ₂ O	9 l
	500 ml	10 % SDS
Transfer-Puffer (Western Blot)	25 mM	Tris base
	0,2 M	Glycin
	20 %	Methanol
	add MilliQ	1 l
10 x TBS	24,2 g	Tris base
	80 g	NaCl
	add MilliQ	1 l
		mit HCl auf pH
		7,6 einstellen
Blocking Puffer (Western Blot)	1 x	TBS
	0,1 %	Tween-20
	5 % (w/v)	Milchpulver
	add MilliQ	150 ml

Wasch Puffer bzw. TBS/T (Western Blot)	1 x 0,1 % add MilliQ	TBS Tween-20 1 l
Primärer Antikörper Verdünnungspuffer	1 x 0,1 % 5 % 5 % add MilliQ	TBS Tween-20 BSA Blocking Puffer 20 ml
Milchpulver	unmittelbar vor Gebrauch (w/v) zugeben	
10 x Ladepuffer (EMSA)	250 mM 0,2 % 40 %	Tris-HCl pH 7,5 Bromphenol- blau Glyzerin
10x TAE-Puffer	0,4 M 0,01 M 0,2 M	Tris pH 8,0 EDTA Eisessig
6x DNS Auftragspuffer	15 % 0,05 % 0,05 %	Ficoll Typ 400 Bromphenol- blau Xylencyanol
20 x SSC	3 M 0,3 M	NaCl Trinatriumcitrat
20 x SSPE	3 M 0,2 M 0,02 M	NaCl NaH ₂ PO ₄ EDTA pH 7,4
Waschpuffer (Southern Blot)		
I.	2 x 0,1 % (w/v)	SSC SDS
II.	0,5 x 0,1 % (w/v)	SSC SDS
FACS-Puffer	1 x 0,5 % (w/v) 0,01 % (w/v)	PBS BSA Natriumazid
10 x PCR-Puffer	500 mM 33 mM 200 mM 75 mM	Tris pH 8,3 MgCl ₂ (NH ₄) ₂ SO ₄ β-Mercapto- ethanol

Erythrozyten Lysepuffer	1,55 M 100 mM 10 mM	NH ₄ Cl KHCO ₃ EDTA pH 7,2
Kollagenase-Lösung	1 mg/ml 200 U/ml 1 x	Kollagenase Typ VIII DNase I PBS
dNTP-Mix	1 mM 1 mM 1 mM 1 mM	dATP dCTP dTTP dGTP
MACS-Puffer	1 x 2 mM 0,5% (w/v)	PBS EDTA BSA
Puffer-P1	50 mM 10 mM 100 µg/ml	Tris pH 8,0 EDTA RNase A
Puffer-P2	200 mM 1% (w/v)	NaOH SDS
Puffer-P3	3,0 M	Kaliumacetat pH 5,5
Puffer-QBT	750 mM 50 mM 15 % (v/v) 0,15% (v/v)	NaCl MOPS pH 7,0 Isopropanol Triton X-100
Puffer-QC	1,0 M 50 mM 15% (v/v)	NaCl MOPS pH 7,0 Isopropanol
Puffer-QF	1,25 M 50 mM 15% (v/v)	NaCl Tris pH 8,5 Isopropanol
4 % Paraformaldehyd-Lösung	4% (w/v) 1 x	Paraformaldehyd PBS
	bis ca. 65°C erhitzen, 1 N NaOH zutropfen, bis sich das Paraformaldehyd gelöst hat	
TRIS/TWEEN	0,01 M 0,05% (v/v)	Tris pH 7,6 Tween 20

TRIS/TWEEN/1% BSA	1 x 1 % (w/v)	TRIS/TWEEN BSA
EMA-Mischung	2 ml 2 µl 20 µl	FACS Puffer EMA Fc-Block

2.2.2 *Medien für die Bakterienkultur*

Für die Kultivierung von *E.coli* wurde ausschließlich autoklaviertes (121°C/2 bar/20 min) Luria-Bertani (LB) Vollmedium verwendet. Um das Festmedium zu erhalten, wurden vor dem Autoklavieren pro Liter Medium 12 g Agar zugegeben. Die Anzucht der Bakterien erfolgte unter aeroben Bedingungen bei einer Temperatur von 37 °C, Flüssigkulturen wurden im Schüttelkolben inkubiert. Die Organismen konnten bis zu 4 Wochen bei 4°C aufbewahrt werden, wobei Austrocknen oder Kontamination der Platten durch Abkleben mit Parafilm verhindert wurde. Die so gezogenen Bakterien wurden durch Abzentrifugation bei 6000 UpM bzw. 4000 UpM bei 4 °C gewonnen.

LB-Medium	10 g 5 g 10 g ad 1 l	Trypton Hefeextrakt NaCl H ₂ O _{bidest}
LB-Festmedium	12 g	Bactoagar

Zur langfristigen Konservierung wurden über Nacht gewachsene Klone mit 50% sterilem Glycerin gemischt und bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.3 Medien für die Zellkultur

Tabelle 2.1: Zusammensetzung der Zellkulturmedien			
	Zelltypen		
Grundmedium	DC DMEM oder RPMI 1640	Milzzellsuspension RPMI 1640	GM-CSF-Hybridomzellen RPMI 1640
Zusätze			
FCS	10 %	10 % *	10 %
L-Glutamin	2 mM	2 mM *	2 mM
Penicillin	100 U/ml	100 U/ml *	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml	100 µg/ml *	100 µg/ml
β-Mercaptoethanol	0,05 mM	0,05 mM *	0,05 mM
HEPES		10 mM *	
GM-CSF	10 % #, 1 % ⁺		
G418			1 mg/ml

* beim Markieren der Zellen mit CFSE wurde proteinfreies Medium (ohne Zusätze) verwendet.

GM-CSF wurde als Überstand des transfizierten Myeloms X63Ag8-653 zugesetzt (B. Stockinger; GM-CSF^S).

⁺ GM-CSF wurde als Überstand eines effizienteren Subklons zugesetzt (GM-CSF^M).

2.3 Bakterienstämme, Zelllinien und Versuchstiere

2.3.1 Bakterienstämme

Folgende Bakterienstämme wurden im Rahmen dieser Arbeit für Klonierungszwecke verwendet:

Tabelle 2.2: Bakterienstämme		
Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ Φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ ,m _K ⁺) <i>phoA supE44 λ thi-1 gyrA96 relA1</i>	GibcoBRL
<i>E. coli</i> TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mmr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 deoR araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen

2.3.2 Zellen und Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen und Zelllinien sind in Tabelle 2.3 aufgeführt.

Tabelle 2.3: Zellen und Zelllinien		
Zellen bzw. Zelllinie	Herkunft/Einsatz	Referenz
DC	Kultivierung aus Knochenmarksvorläuferzellen mit GM-CSF	Inaba et al., 1992
Splenozyten	Primäre Milzzellen, kultiviert nach Organhomogenisierung und Erythrozytenlyse	
X63Ag8-635-GM-CSF	Überstand 1 % ig (GM-CSF ^M) bzw. 10 % ig (GM-CSF ^S) zur Generierung von BM-DC aus Knochenmarksvorläuferzellen einsetzen	Zal et al., 1994

2.3.3 Versuchstiere

Alle verwendeten Mäuse wurden im spezifisch pathogenfreien (SPF) Bereich des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München gezüchtet und gehalten.

Tiere mit loxP-flankierten (geflochten) I κ B α - und NEMO- Allelen wurden über Embryotransfer in den SPF Bereich transferiert. Die daraus resultierenden Nachkommen wurden hinsichtlich der geflochtenen Allele genotypisiert (PCR siehe 2.6.12) und mit heterozygoten CCL17cre-Mäusen (mindestens N 4), die das Enzym Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des CCL17-Promotors exprimieren, (I. Lieberam, Dissertation) gekreuzt. Die daraus resultierenden Tiere wurden wiederum verpaart, um homozygot geflochte CCL17cre^{c/+} oder CCL17cre^{+/+} Nachkommen zu erhalten.

Des Weiteren wurden CCL17eGFP Tiere, die eGFP unter der Kontrolle des CCL17-Promotors exprimieren (Alferink et al., 2003), mit NEMO^{FL}-Mäusen verpaart. Deren Nachkommen wurden als Reporterermäuse bezeichnet, da nahezu alle Zellen, die eGFP⁺ sind, auch NEMO-defizient sind. Mit Hilfe dieser Mäuse kann man bei FACS-Analysen die Population der NEMO-deletierten Zellen genauer abgrenzen und somit gezielter analysieren.

Für die Proliferationsassays (³H]-Thymidin-Einbau in die DNS) wurden zusätzlich zu den CCL17^{c/+}NEMO^{FL} Tieren Dep-tg Mäuse, deren TCR spezifisch über MHC II präsentierte, prozessierte humanes CrP (huCrP) erkennt (Doffinger et al., 1997) verwendet.

2.4 Primer, Antikörper und Zellfarbstoffe

Alle in diesem Kapitel aufgeführten Primer wurden von der Firma TIB Molbiol (Berlin) bezogen. Die Primer wurden in TE in einer Konzentration von 100 pmol/μl gelöst und bei -20 °C aufbewahrt. Für die Gebrauchslösung wurden die Primer mit H₂O_{bidest} auf eine Konzentration von 10 pmol/μl verdünnt.

2.4.1 Primer

Primername	Sequenz (5'→3')	PCR
NEMO-1	CGT GGA CCT GCT AAA TTG TCT	NEMO-PCR
NEMO-2	ATC ACC TCT GCA AAT CAC CAG	NEMO-PCR
NEMO-3	ATG TGC CCA AGA ACC ATC CAG	NEMO-PCR
lox 1	GTG GAG TCA GAT GTA GCA CG	IκBα-PCR
lox 2	AGA AAG GGA TAA GCC ATG GAG	IκBα-PCR
CCL17 2M	ACT CTC AGG ACA CCT GCT TCC	CCL17CRE-PCR
CCL17 Cre8	CCC AGA AAT GCC AGA TTA CG	CCL17CRE-PCR
CCL17 2M	ACT CTC AGG ACA CCT GCT TCC	CCL17eGFP-PCR
bgHpA3	GGG GCA AAC AAC AGA TGG	CCL17eGFP-PCR

2.4.2 Antikörper

Antikörper	Konjugat	Klon/Spezies	Quelle
Anti-Maus CD11c	Microbeads	N418/Hamster	Miltenyi
Anti-Maus MHC-II(I-A ^b)	Biotin	25-9-17/ Maus	Pharmingen
Anti-Maus CD86	FITC/PE	GL1/ Ratte	Pharmingen
Anti-Maus CD80	PE	16-10A1/ Hamster	Pharmingen
Anti-Maus CD45R/B220	PE	RA3-6B2/ Ratte	Pharmingen
Anti-Maus CD40	Biotin	3/23/ Ratte	Pharmingen
Anti-Maus CD40	PE	3/23/ Ratte	Pharmingen
Anti-Maus CD8α	APC	53-6.7/ Ratte	Pharmingen/ Caltag
Anti-Maus CD4	PE~Cy5.5	RM4-L/ Ratte	Caltag
Anti-Maus CD11c	PE/APC	HL3/ Hamster	Pharmingen
Anti-Maus CD16/32	unkonjugiert	2.4G2/ Ratte	Pharmingen

Antikörper	Konjugat	Klon/Spezies	Quelle
Streptavidin	APC	-	Pharmingen
Streptavidin	PerCP	-	Pharmingen

Antikörper für Western Blot			
Antikörper	Konjugat	Klon/Spezies	Quelle
Anti-Maus IKK γ	-	-/Rabbit	Cell Signaling
Anti-Rabbit	HRP	-	Cell Signaling
Anti- β -Actin	-	AC-15/Maus	Sigma
Anti-Maus IgG+IgM	HRP	-/Goat	Jackson Immunoresearch

2.4.3 Zellfarbstoffe

Tabelle 2.6: Verwendete Zellfarbstoffe			
Protein	Konjugat	Funktion	Quelle
AnnexinV	FITC	Bindung an Phosphatidylserin; Marker für frühe Apoptose	Pharmingen
Propidiumjodid	-	Einlagerung in die DNS, Marker für nekrotische Zellen	Sigma

2.5 Plasmidvektoren

2.5.1 Ausgangsvektor

Tabelle 2.7: Ausgangsvektoren		
Name	Eigenschaften	Referenz
pCR [®] 2.1-TOPO	Vektor zur direkten Klonierung von PCR Produkten. AmpR, KanR, LacZ α , fl ori, pUC ori; 3,9 kb	Invitrogen
pBluescriptIIS -	Vektor zur Klonierung von DNS-Fragmenten. AmpR, lacZ α -Fragment, fl(+) α ori, pUC ori, lac Promotor; 3.0 kb	Stratagene

2.5.2 Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Vektoren

Tabelle 2.8: Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Vektoren		
Name	Beschreibung	
pCR [®] 2.1-TOPO NEMO-Sonde	kloniertes PCR-Produkt der NEMO-Sonde; Gesamtgröße 4,45 kb; Herausschneiden der Sonde mit EcoRI	
pBluescriptIIS+ I κ B α -Sonde	kloniertes PCR-Produkt der I κ B α -Sonde; Gesamtgröße 3,6 kb; Herausschneiden der Sonde mit NotI und BamHI	

2.6 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

2.6.1 *Isolierung von Plasmid-DNS (Qiagen-Kits: DNS für Sonden)*

Um Plasmid DNS für Klonierungen zu isolieren, wurden, je nach Menge der benötigten DNS, Mini- oder Maxi-Plasmidisolierungs-Kits der Firma Qiagen verwendet. Die DNS Isolierung erfolgte dabei nach den Angaben des Herstellers. Die eluierte und mit Isopropanol präzipitierte DNS wurde in einem geeigneten Volumen TE (30 µl-250 µl) gelöst.

2.6.2 *Isolierung von chromosomaler DNS*

DNS für Genotypisierungs-PCR

Aus Proteinase-verdauten Mausschwanz-Biopsien wird die genomische DNS nach Abtrennung von Proteinen und Festbestandteilen direkt durch Ausspinnen gewonnen.

Durchführung:

- Mausschwanz-Biopsie mit 500 µl Lysis-Puffer über Nacht bei 55°C inkubieren.
- Zentrifugieren (10 min, 4°C, 13 000 UpM) und Dekantieren des Überstandes in ein mit 500 µl Isopropanol gefülltes Eppendorf-Röhrchen (DNS fällt aus).
- ausgefällte DNS in Eppendorf-Reaktionsröhrchen (250µl TE-Puffer Vorlage) überführen
- Lösen der DNS entweder für 5 min bei 55 °C oder bei 4 °C über Nacht

DNS für Southern Blot Analyse

Die DNS für Southern Blot Analysen wird ebenfalls durch Verdau der Gewebs- bzw. Zellproben mit Proteinase K und zusätzlich Pronase E gewonnen. Um eine besondere Reinheit der gefällten DNS zu erreichen, wird nach dem Verdau der Proben eine Phenol/Chloroform Aufreinigung angewendet.

Durchführung:

- Gewebeproben (mit Skalpell zerkleinert) bzw. Zellproben in je 500 µl Lysispuffer Ü/N bei 56 °C inkubieren
- 500 µl Phenol/Chloroform zugeben, mischen
- zentrifugieren bei 13 000 Upm, 15 min (TZ)
- wässrige Phase abnehmen, in Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 500 µl Chloroform-Vorlage geben, 13 000 Upm, 15 min (TZ)
- wässrige Phase in Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 0,7 Volumen Isopropanol überführen
- Eppendorf-Reaktionsgefäß schütteln, bis DNS ausfällt
- 13 000 Upm, 15 min, 4 °C (TZ)
- Pellet in angemessener Menge EtOH (70 %) waschen
- Überstand absaugen
- Pellet lufttrocknen lassen
- Pellet in geeignetem Volumen TE aufnehmen und Ü/N bei 4 °C oder bei 55 °C für 10 min im Heizblock lösen lassen
- gelöste DNA im Kühlschrank lagern

2.6.3 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Standardmethode, bei der DNS-Fragmente in einem Agarosegel ihrer Größe nach aufgetrennt werden, wobei die Nukleinsäure aufgrund des negativ geladenen Zucker-Phosphat-Rückgrats in einem elektrischen Feld zur Anode wandert. Sichtbar gemacht werden die im Gel aufgetrennten Fragmente durch Ethidiumbromid, einem planaren, in die DNS interkalierenden Farbstoff, der im ultravioletten Licht hell aufleuchtet.

Analytische Gelelektrophorese

Durchführung:

- 0,8-2 % (w/v) Agarose in 1 x TAE-Puffer aufkochen, bis eine klare, homogene Lösung entsteht
- EtBr (~4 µg/ml) zugeben
- in eine Gelwanne mit Kamm gießen und verfestigen lassen
- die Gelwanne mit dem erstarrten Gel in eine Elektrophoreseapparatur einsetzen, Kamm herausziehen und mit 1 x TAE-Puffer überschichten
- DNS-Proben mit Auftragspuffer mischen (1:6) und in die Geltaschen pipettieren
- zur Größenbestimmung den internen Standard (Marker) „1 kb DNS-Leiter“ mitlaufen lassen
- Elektrophorese je nach Gelgröße bei 40-180 Volt und 400 mA durchführen

- Herausnehmen der Gelwanne aus dem Elektrophoresegerät und Visualisieren der DNS-Banden unter UV-Bestrahlung (280 nm)
- Das Bandenmuster kann zu Dokumentationszwecken und zur Auswertung mit diversen Computerprogrammen (Adobe PhotoshopTM5.0, CorelDRAW 8) auf Diskette gespeichert werden.

Präparative Gelelektrophorese

Zu präparativen Zwecken wurden -je nach DNS-Menge- mehrere Taschen eines Kamms abgeklebt, um ein größeres Ladevolumen zu erhalten. Nach Durchführung der Gelelektrophorese wurden die gewünschten Banden unter langweilliger UV-Beleuchtung (325 nm) mit einem Skalpell ausgeschnitten und die sich in dem so isolierten Gelstück befindende DNS mit Hilfe eines „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

Bestimmung der Fragmentgrößen

Durch einen internen Standard im Gel kann die Größe der DNS-Moleküle und gegebenenfalls auch deren Konzentration bestimmt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die 1 kb-Leiter und λ -HindIII-Marker (Invitrogen) verwendet.

2.6.4 *Enzymatische Behandlung von DNS*

Restriktionsverdau

In dieser Arbeit wurden fast ausschließlich Restriktionsendonukleasen mit dem entsprechenden Reaktionspuffer der Firma Invitrogen verwendet.

Für den Totalverdau von gereinigter DNS wurden 2-5 Einheiten (units; u) Enzym pro μg Plasmid DNS und bis zu 10 Einheiten Enzym pro μg genomischer DNS eingesetzt.

	Verdau von Plasmid DNS	Verdau von genomischer DNS
DNS	1-5 μg	10-20 μg
10 x Reaktionspuffer	2 μl	10 μl
Enzym	2-5 Einheiten/ μg DNS	bis 10 Einheiten/ μg DNS
H ₂ O _{bidest}	ad 20 μl	ad 100 μl

Die Ansätze wurden für den Verdau von Plasmid DNS 1-2 Stunden, für den Verdau von genomischer DNS 12 Stunden bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert.

Dephosphorylierung von DNS

Um eine Selbstligation des Vektors mit den kompatiblen Enden zu vermeiden und um eine intermolekulare Ligation zwischen Vektor und DNS-Fragment zu begünstigen, wurden die 5'-Enden des Vektors mit Alkalischer Phosphatase, einer Phosphomonoesterase, dephosphoryliert. Nach dem Restriktionsverdau wurde zu dem Ansatz 1 µl (=150 u) Alkalische Phosphatase zugegeben und bei 65 °C 1 h inkubiert. Um bei der anschliessenden Ligation störende Enzymaktivität zu vermeiden, wurde der Ansatz anschliessend über eine präparative Agarosegelelektrophorese (siehe 2.6.3) aufgereinigt.

Ligation von DNS-Molekülen (TaKaRa® Ligation Kit Ver.2, TAKARA Shuzo Co., LTD. Otsu, Japan): *IkBα* Sonde

In diesem Kit wird die DNS-Ligase des Bakteriophagen T4 dazu verwendet, um die Verknüpfung zweier DNS Stränge durch die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einem 5'-Phosphat und einem 3'-Hydroxylende zu katalysieren. Die T4 Ligase vermag sowohl überstehende Enden als auch glatte Enden miteinander zu verknüpfen.

Durchführung:

- Vektor und Insert in einem Verhältnis 1:3 bis 1:10 in einem Gesamtvolumen von 5-10 µl mischen
- gleiches Volumen Solution I (TaKaRa) zugeben
- Inkubation bei 16 °C für 30 min

Mit diesem Gemisch werden DH5α-*E.coli* (Library Efficiency bzw. Subcloning Efficiency) transformiert.

TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogen): NEMO Sonde

Bei der Klonierung von PCR-Produkten in den Vektor pCR[®]II-TOPO[®] wird sich die template-unabhängige Transferase-Aktivität von thermostabiler Taq Polymerasen zunutze gemacht, durch die ein einzelnes Deoxyadenosin an das 3'-Ende von PCR-Produkten angehängt wird. Da pCR[®]II-TOPO[®] ein singuläres überhängendes Deoxythymidin am 3'-Ende besitzt, können PCR-Produkte direkt in diesen Vektor kloniert werden.

Nach der Ligation werden kompetente *E.coli* (One Shot TOP10) durch Hitzeschock mit dem Konstrukt transformiert.

Durchführung:

- 2 µl PCR-Produkt
- 1 µl Salzlösung
- 2 µl H₂O_{dd}
- 1 µl pCR[®]II-TOPO[®]-Vektor
- Ansatz vorsichtig mischen
- 5 min bei RT inkubieren

Der Reaktionsansatz kann direkt zur Transformation in kompetente Bakterien (*E.coli* One Shot TOP10) eingesetzt werden.

2.6.5 Transformation von *E.coli*

Transformiert wurden kompetente *E.coli* One Shot TOP10 (NEMO-Sonde) bzw. *DH5α* *Subcloning Efficiency* (IkB α -Sonde):

Transformation der NEMO-Sonde

- 2 µl des obigen Ansatzes zu auf Eis aufgetauten One-Shot *E.coli* (TOP10) geben und vorsichtig mischen
- 5 min. auf Eis inkubieren
- 30 sec bei 42°C inkubieren
- sofort 2 min auf Eis lagern
- 250 µl SOC-Medium zugeben
- Inkubation für 1 h bei 37 °C im Schüttler, um Expression der plasmidkodierte Antibiotikumresistenz zu ermöglichen

- Ausplattieren von je 100 μl , 10 μl und dem mit 50 μl in SOC-Medium resuspendiertem Pellet auf mit X-Gal behandelten Antibiotikum-haltigen LB-Platten
- Ü/N im Brutschrank wachsen lassen

Am nächsten Tag werden einige der weißen Kolonien gepickt, mit Hilfe des Qiagen Miniprep Kits (siehe 2.6.1) deren Plasmid-DNS gewonnen und mit einem Restriktionsverdau analysiert. Bakterienklone, die das gewünschte Plasmid enthalten, werden zur Langzeitkonservierung 1:1 mit Glycerin (autoklaviert) gemischt, 5 min. auf Trockeneis gelagert und dann bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Um Bakterien aus diesem Stock zu expandieren, wird das Cryröhrchen auf Eis vorsichtig angetaut und die Mikroorganismen mit einer sterilen Impföse auf Agarplatten mit dem jeweiligen Antibiotikum ausplattiert.

Transformation der *I κ B α -Sonde*

- 100 μl *E.coli DH5 α* (auf Eis aufgetaut) mit 1 μl des Reaktionsgemisches mischen
- 30 min auf Eis inkubieren
- Hitzeschock: für 45 sec bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$
- 2 min auf Eis inkubieren
- 900 μl LB-Medium zugeben
- 1 h in Schüttler bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubieren
- Reaktionsgemisch (100 μl und 200 μl) ausplattieren und unter Selektionsdruck Ü/N wachsen lassen.

Am nächsten Tag werden Klone gepickt und zur Überprüfung des Transformationserfolges bzw. zur Langzeitkonservierung wird wie im oberen Abschnitt beschrieben fortgefahren.

2.6.6 Bestimmung des DNS-Gehalts

Photometrisch

Die Konzentration einer DNS-Lösung wurde photometrisch durch Extinktionsmessung bei $\lambda=260\text{ nm}$ bestimmt. Der Berechnung wurde zugrunde gelegt, dass die Absorption $A=1$ bei einer Wellenlänge von 260 nm einer DNS-Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ entspricht. Die Reinheit der gewonnenen DNS wurde durch einen Vergleich der Absorption bei $\lambda=260\text{ nm}$ mit der Absorption bei $\lambda=280\text{ nm}$ bestimmt. Der Quotient

A_{260}/A_{280} ist 2,0 bei reinen DNS-Lösungen und kleiner als 2,0 bei einer Protein-Kontamination.

Fluorometrisch

Da die oben beschriebene photometrische DNS-Konzentrationsmessung durch RNA- oder Protein-Kontaminationen oft zu ungenauen Ergebnissen führt, wurde in einigen Fällen (Southern Blot Analysen, EMSA) die genauere fluorometrische DNS-Konzentrationsmessung unter Verwendung des Hoechst-Fluoreszenzfarbstoffes 33258 (Bisbenzimid) durchgeführt. Mit Bindung dieses Farbstoffes an die kleine Furche der DNS ändert sich die Intensität und die Wellenlänge der Fluoreszenz von Hoechst 33258. Die Fluoreszenz kann mit einem Fluorometer bei einer Excitationswelle von 360 nm und einer Emissionswelle von 460 nm gemessen werden. Mit Hilfe einer mit BSA erstellten Standardkurve kann die Konzentration von DNS-Proben sehr genau ermittelt werden (Labarca and Paigen, 1980).

In dieser Arbeit wurde das „Fluorescent DNA quantitation kit“ der Firma Biorad verwendet. Die Messungen wurden gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

2.6.7 Southern Blot Analyse

Die Southern Blot Analyse wird zum Nachweis bestimmter DNS-Sequenzen in einem DNS-Fragment verwendet (Southern, 1975). Durch DNS/DNS Hybridisierung mit einer komplementären, radioaktiven Sonde können die gesuchten DNS-Sequenzen markiert und anschließend detektiert werden.

Alkalischer Transfer auf Nylonmembranen

Nach dem Restriktionsverdau der DNS mit mehreren Restriktionsenzymen werden die erhaltenen DNS-Fragmente der Größe nach durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Durch aufeinanderfolgende Säure- und Alkalibehandlungen werden die Fragmente in kleinere Stücke zerlegt und denaturiert. Durch einen Kapillarblot werden sie auf eine Nylonmembran transferiert, so dass eine Replika des Fragmentmusters des Agarosegels auf dem Filter entsteht (Meinkoth and Wahl, 1984; Wahl et al., 1979).

Durchführung:

- Restriktionsverdau von 20 µg chromosomaler DNS
- DNS-Gelelektrophorese (0,8 % iges Agarosegel)
- Gel 45 min in EtBr-Lösung (500 µg/l) schwenken
- Dokumentation des Verdau mit Längenstandard (Lineal)
- Gel zur partiellen Depurinierung etwa 10 min in 0,25 N HCl schwenken
- Gel zur Denaturierung und Spaltung an den depurinierten Stellen ca. 10 min in Transferpuffer schwenken
- Nylonmembran auf die gleiche Größe des Gels zurechtschneiden und 5 min in H₂O äquilibrieren

Aufbau des Kapillarblots

- Gelträger auf Ränder von zwei mit Transferpuffer gefüllten Wannen stellen
- darauf luftblasenfrei folgende Schichten plazieren:
 - 2 Lagen in Transferpuffer getauchtes Whatman-Papier (Enden tauchen in Transferpuffer)
 - Gel mit den Taschenöffnungen nach unten
 - Nylonmembran
 - 3 Lagen mit Transferpuffer befeuchtetes Whatman-Papier
 - ca. 10 cm Zellstoffpapier
 - Glasplatte

Der Kapillarblot wird mit ca. 0,5 kg beschwert und Ü/N bei RT inkubiert. Durch die Kapillarkräfte wird die Blotlösung nach oben gesaugt und die DNS-Fragmente werden auf die Nylonmembran transferiert.

- Membran kurz in Neutralisationslösung schwenken.
- DNS durch UV-Kreuzvernetzung auf der Nylonmembran fixieren

Radioaktive Markierung von Sonden (> 100 Basenpaare)

Zur Herstellung und Markierung der Sonde wird das Klenow-Fragment benutzt, welches an einzelsträngiger DNS den Komplementärstrang synthetisiert. Durch die Zugabe von radioaktiv markierten Nukleotiden zu den unmarkierten Nukleotiden wird die neu synthetisierte DNS radioaktiv markiert (Feinberg and Vogelstein, 1984). Bei dem hier verwendeten „Rediprime™ II random prime labelling system“-Kit von Amersham werden bis ca. 25 ng DNS unter Verwendung von [α -³²P]dCTP laut Herstellerangaben radioaktiv markiert. Nicht eingebaute radioaktive Nukleotide wurden

mit MicroSpin™ S-200 HR Säulchen nach Angaben des Herstellers (Amersham) vom Reaktionsansatz abgetrennt.

DNS/DNS-Hybridisierung

Die DNS/DNS-Hybridisierung zwischen einer markierten, einzelsträngigen Sonde und der dazu komplementären, nachzuweisenden chromosomalen DNS-Sequenz führt zur Bildung eines stabilen, doppelsträngigen DNS/DNS-Hybrids. Die Positionen der markierten Hybridmoleküle können durch anschließende Detektion der radioaktiven Markierung sichtbar gemacht werden.

Durchführung:

- Membran für mehrere Stunden bei 65 °C bzw. 50 °C in Hybridisierungslösung prähybridisieren (neben der in Kapitel 2.2.1 beschriebenen Lösung wurde später PerfectHyb™ Plus Lösung von Sigma verwendet).
- markierte, hitzedenaturierte Sonde zugeben.
- Ü/N bei 65 °C bzw. 50 °C hybridisieren.
- stringentes Waschen des Blots mit Waschpuffer I: 5-10 min bei 65 °C
- stringentes Waschen des Blots mit Waschpuffer II: 15-30 min bei 65 °C
- spezifisch gebundene Radioaktivität mit Hilfe eines Phosphoimagers (Molecular Dynamics) detektieren.

2.6.8 Isolierung von Proteinen aus Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden Proteine aus Zellen unter Einsatz des M-PER® Mammalian Protein Extraction Reagent Kit (Pierce) isoliert. Das Kit verwendet dabei zur Lyse der Zellen ein in Bizin-Lösung gepuffertes Detergens. Um einen Abbau der Proteine zu verhindern, wurden dem Detergens die Protease-Inhibitoren DTT und PIC zugesetzt.

2.6.9 Bestimmung des Proteingehalts

Um in späteren Assays (Western Blot: Gesamtprotein; EMSA: nukleäre Proteine) eine genau definierte Menge an Protein einsetzen zu können, musste vorher der Proteingehalt bestimmt werden. Dazu wurde das „Coomassie Plus™ Reagent“ Kit von Pierce verwendet. Die Färbelösung Coomassie Plus™ enthält als Hauptkomponente Coomassie

Brilliant Blau G-250, daneben zusätzlich Methanol, Phosphorsäure und solubilisierende Agenzien. Coomassie Brilliant Blau G-250 bindet in einem sauren Milieu unspezifisch an Proteine, was eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm zur Folge hat. Durch Messung der Absorption bei 595 nm kann der Proteingehalt unter Bezugnahme auf das Referenzprotein BSA in einer Probe bestimmt werden. Die Messung wurde laut Herstellerangaben durchgeführt.

2.6.10 Western Blot

Beim Western-Blotting werden die einzelnen Komponenten eines Proteingemisches gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran überführt und dort einer Nachweisreaktion unterzogen, die für ein bestimmtes Protein, in diesem Falle NEMO, spezifisch ist.

Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese

In Gegenwart von 1 % (w/v) SDS werden die Proteine bei der eindimensionalen Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli (1970) aufgrund ihres Molekulargewichtes während ihrer Wanderung durch die Gelmatrix in Richtung Anode getrennt. Die Proben werden zuerst in SDS-Probenpuffer hitzedenaturiert. Im Puffer vorhandenes β -Mercaptoethanol bewirkt eine Reduzierung von Disulfidbrücken.

Durchführung:

- Einspannen der Glasplatten in die Elektrophorese-Apparatur
- Gießen von Trenn- und Sammelgel (je 10 ml):

Tabelle 2.10: Trenn- und Sammelgel		
	Trenngel (12 %)	Sammelgel (5 %)
H ₂ O _{dd}	4 ml	4 ml
30 % Polyacrylamid (29:1)	4 ml	1,7 ml
1,5 M Tris HCl	2,5 ml, pH 8,8	1,25 ml, pH 6,8
10 % SDS	100 μ l	100 μ l
10 % APS	50 μ	50 μ
TEMED	10 μ l	10 μ l

- zuerst Trenngel eingießen, mit Isopropanol überschichten und ca. 30 min auspolymerisieren lassen

- Isopropanol abgießen, Sammelgel eingießen und Spacer einschieben; ca. 30 min auspolymerisieren lassen
- Gelplatten in Elektrophoresekammer einsetzen, Laufpuffer in die Kammer füllen

Probenvorbereitung und -auftrag

- aus den Proteinproben Volumen entnehmen, das 22,5 µg oder 12 µg Protein enthält
- Auftragspuffer zugeben (ad 20 µl), mischen
- Proben und Marker (15 µl) 5 min bei 95 °C denaturieren
- Proben und Marker 1 min auf Eis inkubieren
- Proben und Marker aufgetragen

Gel bei 150 V laufen lassen, bis die Bromphenolblau-Front den unteren Rand des Trenngels erreicht hat.

Elektrophoretischer Proteintransfer auf die Membran

Unmittelbar nach der Gelelektrophorese erfolgt der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine proteinbindende Membran. Dabei erfolgt der Transfer senkrecht zur Trennrichtung, damit das Muster der getrennten Proteine auf der Membran exakt dem Trennmuster des Geles entspricht. In der vorliegenden Arbeit wurde das sogenannte Semi-Dry Verfahren angewendet.

Durchführung:

- 6 Whatmanpapiere und 1 PVDF-Nitrocellulosemembran in der Grösse des Gels zurechtschneiden
- Membran vorbehandeln: 5 sec in Methanol schwenken, 2 min in H₂O_{dd} liegen lassen, 10 min in Transferpuffer liegen lassen
- Blot aufbauen (luftblasenfrei!): Whatman-Papier in Transferpuffer einweichen; 3 Lagen Whatman-Papier übereinander legen, darauf Membran legen, dann das Gel hinzufügen und mit den verbleibenden 3 Lagen Whatman-Papier bedecken.
- 2 h bei 94 mA (1 mA/cm²) blotten

Nachweisreaktion von NEMO

- zum Waschen die Membran in 50 ml Falcon Röhrchen mit 25 ml TBS geben und bei RT rollen
- zum Saturieren von überschüssigen Proteinbindestellen Membran in 50 ml-Falcon mit 25 ml Blocking-Puffer geben und 1 h bei RT inkubieren
- Membran 3 x 5 min mit je 15 ml TBS/T waschen

- Membran Ü/N mit primärem Antikörper (Anti-Maus NEMO-Antikörper, 1:1000 verdünnt in Antikörper-Verdünnungslösung) bei 4 °C inkubieren:
- Membran 3 x mit je 15 ml TBS/T waschen
- Membran mit Sekundäntikörper (α Rabbit-HRP; 1:2000 verdünnt in Blocking-Puffer) 1 h bei RT inkubieren

Visualisierung des markierten Proteins

- Membran 3 x 5 min mit je 15 ml TBS/T waschen
- Peroxid-Lösung und Pico-Luminol/Enhancer Lösung (SuperSignal[®] West Femto Chemiluminescence Substrate Kit, Pierce) mischen, auf die Membran träufeln und 1 min inkubieren lassen
- Membran in Hülle einlegen, auf Röntgenfilm legen und Film zwischen 30 sec und 9 min belichten lassen
- Film entwickeln und auswerten

Nachweisreaktion und Visualisierung der Ladungskontrolle β -Aktin

- Membran 2 h in Blockingpuffer bei RT inkubieren
- Membran 3 x 5 min mit je 15 ml TBS/T waschen
- β -Aktin-Antikörper zugeben (1:20000 in Blocking-Puffer verdünnen), 2 h bei RT inkubieren
- Membran 3 x 5 min mit je 15 ml TBS/T waschen
- Anti-Maus IgG + IgM HRP Antikörper (Jackson Immunoresearch; 1:5000 in Blocking-Puffer verdünnt) zugeben
- 1 h bei RT auf Roller inkubieren
- Membran 3 x 5 min mit je 15 ml TBS/T waschen
- Peroxid-Lösung und Pico-Luminol/Enhancer Lösung (SuperSignal[®] West Piko Chemiluminescence Substrate Kit, Pierce) mischen, auf die Membran träufeln und 1 min inkubieren lassen
- Membran in Hülle einlegen, auf Röntgenfilm legen und Film zwischen 15 und 30 sec belichten lassen
- Film entwickeln und auswerten

2.6.11 EMSA

Der Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) ist ein einfaches, schnelles und sensitives Verfahren zum Nachweis von Proteinen, die spezifisch an definierte DNS-Sequenzen binden. Die nachzuweisenden Proteine, in der vorliegenden Arbeit der aktive Transkriptionsfaktor NF- κ B, werden mit einer terminal markierten, doppelsträngigen DNS inkubiert. Der entstehende Protein/DNS Komplex kann aufgrund seines verlangsamten Laufverhaltens elektrophoretisch vom Überschuss an freier DNS

abgetrennt werden. Die Detektion des Protein/DNS-Komplexes erfolgt durch Autoradiographie.

Ein Vorteil dieser Methode gegenüber herkömmlichen Nachweisverfahren von Transkriptionsfaktoren, z.B. Western Blot mit nukleärem oder zytosolischem Protein oder immunohistochemischer Assays, liegt darin, dass man neben der Beobachtung, ob eine Translokation in den Kern erfolgte, zusätzlich erkennen kann, ob der translozierte Transkriptionsfaktor an die DNS gebunden hat.

In der vorliegenden Arbeit wurden am Tag 6 CD11c⁺ BM-DCs MACS-angereichert, in 12-well-Platten kultiviert und mit LPS (100 ng/ml) und CpG (20 nmol) für 0', 10', 30', 60', 2 h, 4 h, 13 h, 24 h und 48 h stimuliert. Die Überstände der Zellkulturen wurden zu den jeweiligen Zeitpunkten abgenommen und für spätere ELISA-Analysen bei -20 °C weggefroren. Aus den BM-DCs wurden wie unten beschrieben die nukleären Proteine extrahiert und ein EMSA durchgeführt.

Durchführung:

Gewinnung nukleärer Extrakte

- Zellen in 12-well-Platten kultivieren; pro well 5 x 10⁵ Zellen aussäen
- am Tag 6: Zellen für bestimmte Zeitdauer stimulieren
- nach Stimulation: Zellen aus Inkubator nehmen und sofort auf Eis stellen; Medium (RPMI + 10 % GM-CSF) bis auf kleinen Bodenüberstand absaugen
- 1 ml eiskaltes PBS pro well zugeben, DCs abschaben und in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße überführen
- 4000 Upm, 4 °C, 4 min (TZ)
- Überstand absaugen bzw. für später durchzuführende ELISA Assays bei -20 °C wegfrieren
- zu den Pellets 500 µl PBS/Eppi zugeben, Pellet resuspendieren
- 4000 Upm, 4 min, 4 °C (Tischzentrifuge)
- Pellet in 250 µl Puffer B resuspendieren, 5 – 10 min. auf Eis inkubieren. Durch den osmotischen Schock (Puffer B ist ein Niedrigsalz-Puffer) wird die Zellmembran zerstört und die zytosolischen Proteine werden freigesetzt.
- 5 min, 4 °C bei max. Leistung zentrifugieren (13 000 Upm, TZ)
- Pellet in 200 µl Puffer B resuspendieren, 30 sec (4 °C) bei maximaler Leistung zentrifugieren (TZ)
- Pellet in 40-50 µl Puffer C (hypotonisch) resuspendieren. Durch den osmotischen Schock wird die Kernmembran zerstört.
- Extraktion der Kernproteine durch starkes Schütteln der Eppendorf-Reaktionsgefäße für 15 min bei 4 °C
- 5 min, 4 °C bei max. Leistung zentrifugieren (13000 Upm, TZ)
- Überstand in neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen
- 1 µl Aliquot entnehmen für Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe 2.6.9)

- die nukleären Kernextrakte werden in einem Trockeneis/EtOH-Gemisch bei -80 °C bis zur radioaktiven Markierung der Sonde und bis zur Durchführung des Gelshifts weggefroren.

Radioaktive Markierung der NF- κ B sense- und antisense DNS Proben

Zur radioaktiven Markierung der DNS-Bindungssequenzen wird der β -Strahler γ -³²P-ATP verwendet. Wie schon bei der Ligation von DNS-Molekülen beschrieben, katalysiert auch in diesem Fall die T4-Kinase die Übertragung des γ -Phosphatrestes von ATP auf die freien OH-Gruppen der 5'-Enden der DNS.

Die NF- κ B sense- bzw. antisense Oligonukleotide besitzen folgende Sequenz (NF- κ B Bindesequenz im E-Selectin Promotor, (Schindler and Baichwal, 1994)):

5'-GAT GCC ATT GGG GAT TTC CTC TTT ACT G-3'
5'-CAG TAA AGA GGA AAT CCC CAA TGG CAT C-3'

Annealing-Reaktion

- 1 μ l (330 ng) NF- κ B sense Oligo
- 1 μ l (330 ng) NF- κ B antisense Oligo
- + 5 μ l „L“ 10 x Puffer
- + 14,5 μ l H₂O_{dd}
- 21,5 μ l gesamt
- 15 min bei 55 °C inkubieren
- 15 min bei RT inkubieren
- 4 μ l der Annealing-Mixtur
- + 8 μ l H₂O
- + 2 μ l 10 x T4 PNK (Phosphonukleotidkinase) Puffer
- + 5 μ l γ -³²p-ATP
- + 1 μ l T4 PNK (5 – 10 u)
- 20 μ l ges.

- 30 min bei 37 °C inkubieren
- Auffüllen mit 30 μ l H₂O auf 50 μ l Gesamtvolumen
- Aufreinigen über MicroSpin™ S-200 HR Säulchen (BioRad; lt. Anweisung des Herstellers)
- 1 μ l des Eluats entnehmen und mit Hilfe eines Szintillationsmessers die cpm bestimmen (idealerweise 1 x 10⁶ cpm/ μ l)
- die restliche Probe kann bei -20 °C Schrank im Radioaktivlabor weggefroren und wiederverwendet werden

Gelherstellung

- 5 % nicht-denaturierendes PAGE-Gel gießen (SDS würde Protein/DNS-Bindung stören)

Tabelle 2.11: PAGE-Gel	
	PAGE-Gel (5 %; 100 ml)
H ₂ O _{dd}	82,5 ml
10 x TBE	5 ml
1,5 M Tris HCl	2,5 ml, pH 8,8
40 % PAA (19:1)	12,5
APS	750 µ
TEMED	75 µl

- Glasplatten werden vor Gebrauch mit Seife und Isopropanol gewaschen, um (Fett-) Flecken zu entfernen, die z.B. die Bildung von Luftblasen fördern könnten; anschließend mit Repel-Silan einreiben und trocknen lassen
- Gelapparatur zusammenbauen
- Gel eingießen, Kamm einstecken
- Gel auspolymerisieren lassen
- Gelkammer mit Laufpuffer (0,25 x TBE) füllen
- Gel vor Auftrag der Proben 1 h bei 80 V vorlaufen lassen

Vorbereiten der Proben, Bindungsreaktion

- pro Probe:
 - 10 ng Protein in einem Volumen von 5 µl (falls nötig, mit T4-Puffer auffüllen) verwenden
 - + 1 µl Poly(dIdC) zugeben
 - + 14 µl DEO-Puffer
 - + 20000 cpm der radioaktiv markierten Probe zugeben (falls nötig, Probe mit DEO-Puffer auf 20000 cpm einstellen)
 - 30 min bei RT inkubieren
 - 5 µl 50 % Glycerol zugeben, damit die Probe durch die grössere spezifische Dichte leichter in die Geltasche gleitet
 - Proben in die Geltaschen geben
 - Gel 4 h bei 120 V laufen lassen

Zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen bei Bindungsreaktionen von Doppelstrang-bindenden Proteinen wird dem Probenansatz das synthetische Poly(dIdC) (im DEO-Puffer enthalten) zugesetzt: Es fängt die meisten unspezifisch bindenden Proteine ab. KCl und MgCl₂ sorgen für die ideale Ionenkonzentration zur Bildung von Protein/DNS-Komplexen, das ebenfalls im DEO-Puffer enthaltene BSA und Glycerin führt zu einer Erhöhung der Stabilität der gebildeten Komplexe während der Elektrophorese. Elektrophorese-Ladepuffer kann nicht zu den Proben zugegeben werden, da das darin enthaltene Bromphenolblau die DNS-Proteinbindung negativ beeinflusst. Um dennoch die zurückgelegte Laufstrecke abschätzen zu können, wird

eine Gelspur mit Ladepuffer alleine beladen. Bromphenolblau läuft auf der Höhe eines 70 bp-DNS-Oligonukleotids. Da die verwendete NF- κ B-Sonde nur 28 bp lang ist, muss das Gel noch vor dem Erreichen der Lauffront durch Bromphenolblau gestoppt werden, um ein Auslaufen der Proben aus dem Gel zu vermeiden.

Detektion der Protein/DNS Komplexe

- Nach dem Ende der Elektrophorese Gel aus der Apparatur nehmen, Whatman-Papier in Grösse des Gels auf Gel legen und Gel vorsichtig abziehen; in Folie wickeln und mit Hilfe eines Geltrockners 2 h bei 80 °C trocknen lassen
- getrocknetes Gel mit Phosphorimager-Platte in Filmkassette einlegen und mit Phosphorimager detektieren

2.6.12 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) (Mullis and Faloona, 1987; Saiki et al., 1988) beruht auf der Eigenschaft von DNS-Polymerasen, einzelsträngige DNS (Template) als Matrize für die Synthese eines komplementären Stranges zu benutzen und so sehr viele Kopien des Ausgangsstranges zu synthetisieren.

Reaktionsansatz:

DNS	1,5 μ l	(ca. 100 ng)
Primer 1 und 2	je 1 μ l	(10 pmol/ μ l)
dNTP-Mix	1 μ l	
BSA	2 μ l	(4 mg/ml)
10 x PCR-Puffer	5 μ l	
<i>Taq</i> -Polymerase	0,5 μ l	
H ₂ O _{bidest}	ad 50 μ l	

Durchführung:

- Reaktionsansatz auf Eis zusammenpipettieren, kurz vortexen und abzentrifugieren
- mit ca. 50 μ l Mineralöl (Sigma) überschichten, um Verdampfen des Ansatzes während der Reaktion zu verhindern (nicht notwendig bei Benutzung eines Thermocyclers mit beheizbarem Deckel)
- Durchführung der Reaktionszyklen unter den in Tabelle 2.12 angegebenen Bedingungen

Funktion	Dauer				Temperatur			
	NEMO	IκBα	CCL17cre	CCL17eGFP	NEMO	IκBα	CCL17cre	CCL17eGFP
DNS Denaturierung	-		-	5 min	-		-	94 °C
Hot Start	-		-	5 min	-		-	80 °C
DNS Denaturierung	20 sec	20 sec	20 sec	1 min	94 °C	94 °C	94 °C	94 °C
Primerhybridisierung	1 min	1 min	1 min	1 min	62 °C	63 °C	63 °C	60 °C
Primerverlängerung	2 min	1,5 min	1,5 min	1 min	72 °C	72 °C	72 °C	72 °C

Die Sequenz der verwendeten Primer ist unter 2.4.1 aufgeführt. Die Anzahl der Zyklen betrug bei der NEMO- und der CCL17cre-PCR 35 und bei der IκBα-PCR 30.

2.7 Zellkultur

Die Arbeiten mit Zellkulturen wurden ausschließlich unter einer Heraeus Umluft-Sterilbank durchgeführt. Zellkulturen wurden in einem Heraeus Zell-Inkubations-Schrank bei 37°C, 7,5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchte von 95% kultiviert. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden sterile Plastikpipettenspitzen und Glaspipetten verwendet.

2.7.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen werden zuerst pelletiert, dann in 1 ml Einfriermedium pro Ø 15 cm-Zellkulturschale resuspendiert und auf Eis in Kryoröhrchen überführt. Dort werden sie für ~30 min bei -20 °C inkubiert, über Nacht bei -80 °C gelagert und zur Dauerkonservierung in flüssigen Stickstoff überführt.

Um die Zellen aufzutauen, werden die Kryoröhrchen unverzüglich in ein 37°C-Wasserbad gestellt, danach in ~9 ml Zellkulturmedium überführt, resuspendiert und 7 min bei 1200 g abzentrifugiert. Das Pellet wird anschließend in Zellkulturmedium resuspendiert und die Zellen ausplattiert.

2.7.2 Kultivierung der GM-CSF Myelomzellen

Die aufgetauten und auf Ø 15 cm-Zellkulturschalen ausgesäten GM-CSF produzierenden Hybridomzellen werden 10 Tage in RPMI 1640 Zellkulturmedium mit G418 (1 mg/ml) positiv selektioniert. Am elften Tag werden die Zellen in

Rollkulturflaschen (1 l Zellsuspension/Flasche) in Medium ohne G418 überführt und inkubiert. Sobald das Medium eine durch den Nährstoffverbrauch und die damit einhergehende Änderung des pH Wertes hervorgerufene gelbe Farbe angenommen hat, werden die Zellen abzentrifugiert und der Überstand in Aliquots à 13 ml bei -20 ° C weggefroren. Optional kann die Aufzucht der Myelomzellen auch in Ø 10 cm Zellkulturschalen erfolgen. Der GM-CSF enthaltende Überstand wird dem Zellkulturmedium in einer Konzentration von 10 % (GM-CSF^S) bzw. 1 % (GM-CSF^M) zugesetzt.

2.7.3 Kultivierung von DCs aus dem Knochenmark

Für die Gewinnung von dendritischen Zellen aus dem Knochenmark werden Femur und Tibia von Spendermäusen präpariert und das Knochenmark ausgespült. Anschließend werden die so gewonnenen Zellen für mindestens sechs Tage in Medium mit 10 % GM-CSF^S bzw. 1 % GM-CSF^M kultiviert (Inaba et al., 1992).

Durchführung:

- Hinterbein (Femur und Tibia) abtrennen und von Geweberesten freipräparieren
- mit einer Spritze das Knochenmark mit kaltem PBS ausspülen
- Zellen resuspendieren, durch Zellsieb filtrieren
- Zellen in DMEM bzw. RPMI 1640 + 10 % bzw. 1 % GM-CSF aufnehmen und in einer Dichte von 5×10^6 Zellen pro 10 cm Zellkulturschale aussäen
- Mediumwechsel an Tag 3
- an Tag 6 werden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers aus der Kulturschale gelöst und weiterverarbeitet (u.a. MACS-Anreicherung der CD11c⁺ Zellen, Stimulierung)

2.7.4 Stimulierung der Zellen

Um die Zellen zur Reifung zu bringen bzw. um eine maximale Deletion des mit loxP flankierten Allels zu erreichen, werden die Zellen mit LPS (Serotyp O55:B5 für *in vitro* Versuche, 100 ng/ml), TNF α (50 ng/ml) oder CpG 1668 (20 nmol/ml) stimuliert. LPS und TNF α wurden von Sigma bezogen, CpG 1668 (phosphotioiert, sulfhydryl-modifiziert) wurde von Tib Molbiol nach folgender Sequenz synthetisiert: 5'-S-TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT-3'. Das CpG-Motiv ist unterstrichen.

Um das Überleben der BM-DCs zu untersuchen, wurden die Zellen *in vitro* mit α CD40 (50 ng/ml; Klon FGK 45.5-F freundlicherweise von D. Busch zur Verfügung gestellt) bzw. LPS (100 ng/ml) für die angegebenen Zeitpunkte (12 h, 36 h, 60 h, 84 h, 106 h) stimuliert.

Nach der Stimulation wurden die BM-DCs mit Zellschabern abgeschabt, pelletiert und wie in 2.8.2 beschrieben MACS-angereichert. Anschließend wurden die Zellen gemäß der in 2.8.3 beschriebenen Vorgehensweise mit Antikörpern markiert und mittels eines FACS-Caliburs analysiert. Im Falle der $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -DCs wurde nach der MACS-Anreicherung zusätzlich zur FACS-Analyse ein EMSA durchgeführt.

2.8 Immunologische und zellbiologische Methoden

2.8.1 *Isolierung von Zellen aus Organen*

Zur Entnahme von Organen oder Zellen einer Maus wurde diese durch Genickbruch getötet und die jeweiligen Organe nach Desinfektion des Operationsgebietes mit 70 % EtOH steril entnommen. In einigen Fällen wurden die Mäuse vor der Organentnahme mit LPS (300 μ g-400 μ g; Serotyp O127:B8) i.p. für 15 h bzw. 24 h immunisiert. Zur Gewinnung von peritonealen M Φ wurden Mäuse mit 5 ml Thioglykollat-Lösung i.p. injiziert. Nach 4-5 Tagen wurden die Mäuse getötet und der Bauchraum der Mäuse mit 10 ml kaltem PBS gespült. Die Isolierung von B- und T-Zellen erfolgte aus einer Zellsuspension der Milz und der mesenterialen (m) LNs unter nachfolgender MACS-Anreicherung der Zellen mit B220- bzw. Thy1 (CD90)- MicroBeads (s. 2.8.2).

2.8.2 *Zellsortierung mittels MACS-Technologie*

„Magnetic activated cell sorting“ (MACS) ist eine effektive Standardmethode zur Anreicherung einer bestimmten Zellpopulation aus einem Zellgemisch. Dabei werden die anzureichernden Zellen mit Antikörpern markiert, die mit super-paramagnetischen Partikeln konjugiert sind. Diese Zellen werden dann über eine MACS-Säule gegeben, die einem starken magnetischen Feld ausgesetzt ist. Dabei werden die mit dem Antikörper/magnetischen Partikel markierten Zellen in der Säule zurückgehalten, während die unmarkierten Zellen durch die Säule laufen. Nachdem die Säule aus dem

magnetischen Feld genommen wurde, können die markierten Zellen mit MACS-Puffer eluiert werden. In dieser Arbeit wurden MACS super-paramagnetische MicroBeads, die mit monoklonalen CD11c-, B220- und Thy1 (CD90)- Antikörpern konjugiert sind, verwendet, um spezifisch DCs, B-Zellen und T-Zellen anzureichern.

Die MACS-Anreicherung der aus den Organen gewonnenen Zellen bzw. der aus den Kulturschalen abgeschabten BM-DCs wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

2.8.3 Durchflusszytometrie (FACS Analyse)

Diese Methode erlaubt die Unterscheidung von einzelnen Zellpopulationen aus einem Gesamtgemisch aufgrund der Expression von jeweils spezifischen Oberflächenmolekülen: Die Zellen einer Suspension werden mit monoklonalen Ak, die gegen ein bestimmtes Oberflächenmolekül gerichtet sind, markiert. Zusätzlich sind die Ak mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Die in dieser Arbeit verwendeten Ak bzw. Zellfarbstoffe sind in Tabelle 2.4.2 und 2.4.3 aufgelistet.

Die Analysen der Immunfluoreszenz erfolgten am FACS-Calibur Durchflusszytometer mit Cellquest- und FlowJo- Software.

Durchführung (auf Eis, im Dunkeln):

- Zellen (mindestens 5×10^4) in 200 μ l FACS-Puffer aufnehmen
- zentrifugieren bei 4000 Upm, 4 min, 4 °C (TZ)
- Fc-Block zugeben: Zellen in 30 μ l Fc-Block (anti-CD32/16; 1:100 in FACS-Puffer) für 20 min auf Eis inkubieren.
- 2 x mit 500 μ l FACS-Puffer waschen
- Primärantikörper zugeben:
 - Zellen mit 50 μ l Primärantikörper zusammen mit Fc-Block (anti-CD32/16; 1:100) in FACS-Puffer für 20 min auf Eis inkubieren.
- 2 x mit 500 μ l FACS-Puffer waschen.
- gegebenenfalls Sekundärreagenz zugeben:
 - Zellen mit 50 μ l Sekundärreagenz (z.B. Streptavidin-APC) in FACS-Puffer für 30 min auf Eis inkubieren.
- 2 x mit 500 μ l FACS-Puffer waschen.
- Zellen in 150-300 μ l FACS-Puffer (je nach Zellzahl) resuspendieren und am FACS-Calibur analysieren

2.8.4 *ELISA*

Das grundlegende Prinzip eines ELISAs (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) ist die Verwendung eines Enzyms zur Detektion einer Antigen-Ak Bindung. Das Enzym setzt ein farbloses Substrat (Chromogen) in ein farbiges Produkt um, was eine vorhandene Antigen-Ak Bindung anzeigt.

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Bestimmung von Zytokinkonzentrationen in Kulturüberständen folgende ELISA-Kits der Firma R&D verwendet:

- IL-12p70, Kat. # M1270
- IL-6, Kat. #M6000

2.8.5 *Bestimmung der T-Zellproliferation*

CFSE-basierte Bestimmung der T-Zellproliferation (Footpad-Assay)

Der Fluoreszenzfarbstoff 5(6)-Carboxylfluoresceindiacetat Succinimidylester (CFSE) diffundiert passiv in die Zelle und bleibt farblos und nichtfluoreszierend, bis die Acetatgruppen durch intrazelluläre Esterasen abgespalten werden, wodurch ein stark leuchtendes und aminreaktives Fluorophor entsteht. Durch Reaktion mit Lysin-Seitengruppen oder anderen Aminresten von intrazellulären, aber auch Zelloberflächen-Proteinen bildet diese Markierung irreversible Protein-Addukte. Teilen sich die Zellen, wird die CFSE-Markierung gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt, die somit nur noch mit halber Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den Parentalzellen markiert sind. Der CFSE-Farbstoff kann mittels Durchflusszytometrie bei einer Exzitationswellenlänge von 488 nm vermessen werden.

Im Gegensatz zur Thymidin-basierten Bestimmung der T-Zellproliferation ermöglicht die CFSE-basierte Bestimmung der T-Zellproliferation durch zusätzliche FACS-Färbung gewünschter Zellmarker die Diskriminierung der eventuell proliferierenden T-Zellen. In der vorliegenden Arbeit wurde zwischen der CD4⁺ und CD8⁺ Population unterschieden.

Durchführung:

Entnahme der Zellen

- Immunisieren der Mäuse mit OVA/CFA-Mischung (in den Fuß, subkutan); immunisiert wird jeweils nur der linke Fuß, der rechte Fuß wird als interne Kontrolle verwendet
 - 50 µl/Fuß; 300 µg OVA; OVA in PBS und CFA im Verhältnis 1:1 ansetzen
 - Ansatz für 50 µl:
25 µl OVA (Stock: 12 mg/ml) in PBS lösen, 25 µl CFA unter ständigem Rühren zutropfen
- am 7. Tag nach der Immunisierung Entnahme der poplietalen LN
- in Falcon-Schalen mit vorgelegtem PBS (eiskalt) legen
- ab jetzt unter der Sterilbank arbeiten
- Collagenase-Verdau der LN: 1 ml Collagenase-Lösung in Spritze aufziehen, LN durchspülen
- kurz stehen lassen
- LN mit gebogener Pinzette zerrupfen
- 20 min bei 37 °C inkubieren
- Zellsuspension resuspendieren und über Zellsieb (Ø 100 µm) in 50 ml-Falcon geben
- Schalen mit je 2 ml PBS nachspülen
- Zellen 2 x mit 5 ml PBS waschen
- Pellet in je 1 ml Medium (RPMI complete + 5 ml/500 ml HEPES) resuspendieren

CFSE-Markierung der Zellen

- Zellen 2 x in proteinfreiem Medium (RPMI 1640) waschen
- Pellets in CFSE-Lösung (5 µm) inkubieren: 1 ml CFSE-Lösung/1 x 10⁷ Zellen
- 10 min bei 37 °C inkubieren
- Stoppen der Markierungsreaktion durch Zugabe des gleichen Volumens FCS; gut mischen
- Zellen 2 x mit 5 ml RPMI complete + HEPES 5 ml/500 ml waschen
- Zellen aussäen: pro well 3 x 10⁶ Zellen in 500 µl Medium RPMI complete + HEPES
- Restimulation der Zellen mit OVA in Volumen von 500 µl RPMI complete + HEPES: 0 µg, 50 µg, 100 µg, 200 µg OVA
- Zellen 2,5-3 Tage inkubieren

FACS-Analyse der Zellen

- Zellen im well resuspendieren, in Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen
- 3000 Upm, 3 min, 4 °C
- Pellet 2 x mit FACS-Puffer waschen

- Pellet in je 50 µl Färbelösung resuspendieren:
 - CD4 Cy5.5-PE 1:200
 - CD8-APC 1:100
 - Fc-Block 1:50
- Zellen 15 min auf Eis abgedeckt färben
- Zellen am FACS-Calibur analysieren

Thymidin-basierte Bestimmung der T-Zellproliferation (in vitro)

Durch die Zugabe von [³H]-Thymidin zum Kulturmedium wird die Aufnahme der Markierung in die DNS im Verlauf wiederholter Zellteilungen detektiert. Zur Untersuchung der TCR-vermittelten Zellaktivierung wurden MACS-angereicherte, 12 h mit LPS-stimulierte DCs mit oder ohne T-Zellen von Dep tg Mäusen (Doffinger et al., 1997) in der Konzentration 1×10^5 pro well mit oder ohne huCrP in 96-well Rundbodenplatten für 48 h inkubiert. Die Proliferation der T-Zellen wurde durch Zugabe von 1 µCi [³H]-Thymidin pro Vertiefung für die letzten 16-18 h der Kultur bestimmt und mittels eines β-Counters direkt vermessen. Als Negativkontrolle wurden T-Zellen bzw. DCs alleine und nur Medium eingesetzt, als Positivkontrolle wurde zusätzlich zu den DCs und T-Zellen αCD3 (1:1000) zugegeben.

Durchführung:

- MACS-angereicherte CD11c⁺ Zellen Ü/N (12 h) mit LPS (100 ng/ml) und huCrP (10 µg/ml, 5 µg/ml, 1 µg/ml, 0,2 µg/ml) stimulieren ($2,0 \times 10^6$ Zellen in 1,5 ml RPMI 1640 complete)
- Zellen abschaben
- 4×10^4 DC (100 µl) pro 96-well Rundbodenplatte zusammen mit 50 µl CrP (10 µg/ml, 5 µg/ml, 1 µg/ml, 0,2 µg/ml) und 100 µl Dep tg T-Zellen (1×10^5 ; Gewinnung s. unten) in RPMI 1640 complete aussäen

Gewinnung von Dep-tg T-Zellen

- Entnahme der Milz von 1-2 syngeneten Dep tg Mäusen
- Anfertigen einer Zellsuspension
- Zellsuspension 2 x mit PBS waschen
- Erythrozyten-Lyse durchführen: Pellet in 4 ml Erythrozyten Lysepuffer resuspendieren, 4-5 min bei RT inkubieren
- Stoppen der Lyse-Reaktion durch gleiches Volumen PBS
- Zellen waschen, in 10 ml PBS/BSA resuspendieren und in 15 ml-Falcon überführen
- Zellen in 1 ml Ak-Lösung resuspendieren:

- α CD11c-bio 1:100
- α CD11b-bio 1:100
- α B220-bio 1:100
- Zellen 30 min auf Eis inkubieren
- Zellen 1 x mit 2 ml PBS waschen
- Pellet in 4,5 ml PBS resuspendieren, 150 μ l Dynabeads[®] (superparamagnetische Polystyrolkugelchen, die mit rekombinantem Streptavidin beschichtete sind und biotinylierte Antikörper binden; CELLection[™] Biotin Binder Kit (DynaL Biotech)) zugeben
- 30 min bei 4 °C auf Schüttler inkubieren
- 15 ml-Falcon in Magnethalter stellen (CELLection[™] Biotin Binder Kit, Dynal Biotech): Die mit Biotin markierten magnetischen Dynal-Beads binden an die Streptavidin-gekoppelten Antikörper und halten die daran gebundenen CD11c/CD11b/B220⁺ Zellen zurück, während die restlichen CD4/CD8⁺ T-Zellen durch Absaugen des Überstandes abgetrennt werden
- T-Zellen waschen und in der oben genannten Konzentration zu den DCs in die 96-well Rundbodenplatte geben
- Platte für 48 h inkubieren

[³H]-Thymidin-Markierung

- Platte aus Inkubator nehmen
- in jedes well 1 μ Ci [³H]-Thymidin geben
- Platte für 16-18 h inkubieren

Detektion der Proliferation

- Platte aus dem Inkubator nehmen, absaugen der Platte mit dem Harvester und [³H]-Thymidin-Einbau mittels β -Counter bestimmen

2.8.6 Bestimmung der Aktivität der zytotoxischen T-Zellen

Mit Hilfe eines CTL-Assays kann die Fähigkeit des Organismus, spezifische funktionsfähige zytotoxische CD8⁺ T-Zellen zu generieren, überprüft werden. Zu diesem Zweck wird die spezifische Lyse einer mit hochkonzentriertem CFSE-markierten, SIINFEKL-präsentierenden Zielzelle durch eine OVA-spezifische zytotoxische CD8⁺ T-Zelle gemessen. Dabei wird mit OVA/CpG immunisierten Mäusen eine syngene Zellsuspension, hergestellt aus Milz und mesenterialen Lymphknoten, i.v. injiziert. Vorher wurde eine Hälfte dieser Zellen mit SIINFEKL gepulst und mit hochkonzentriertem CFSE („high“) markiert, die andere Hälfte blieb unbeladen und wurde mit niedrigkonzentriertem CFSE („low“) gekennzeichnet. Nach 4 Stunden wird die Milz entnommen und eine Zellsuspension hergestellt. Nach dem

Ausschluss toter Zellen mit Hilfe einer EMA-Färbung kann man durch Vergleich der jeweiligen Zellzahl der „high“ bzw. der „low“ Population feststellen, ob sich funktionsfähige CTLs gebildet haben: Diese erkennen mit ihrem OVA-spezifischen TCR das von der Zielzelle auf MHC I präsentierte SIINFEKL-Peptid und lysieren sie.

Die spezifische Lyse wird mit folgender Formel berechnet (Lefrancois et al., 2003):

$$\left[1 - \frac{A \#CFSE^{low}}{A \#CFSE^{high}} / \frac{B \#CFSE^{low}}{B \#CFSE^{high}}\right] \times 100$$

wobei

- A = nur mit OVA stimuliertes Tier (Negativkontrolle)
- B = mit OVA/CpG stimuliertes Tier
- # = Zellzahl.

Durchführung:

Tag 0: Immunisierung der Mäuse

- Mäuse immunisieren (5 nmol CpG und 300 µg OVA bzw. OVA und PBS alleine in einem Volumen von 100 µl in die Schwanzbasis subkutan injizieren)

Tag 7: Zellsuspension anfertigen und CFSE-Markierung der Zellen

- von syngeneten Mäusen Zellsuspension aus Milzzellen und mesenterialem Lymphknoten anfertigen:
 - Milz und mesenteriale Lymphknoten entnehmen, in Schale mit RPMI geben
 - mit Spritzenstempel durch 100 µm-Zellsieb drücken
 - Zellsuspension in 15 ml-Falcon überführen, zentrifugieren
- Erythrozytenlyse durchführen: Zellsuspension für 4-5 min in 4 ml Erythrozyten Lysepuffer inkubieren, zum Abstoppen der Lysereaktion 5 x Volumen PBS zugeben und abzentrifugieren.
- Zellen zählen und in 2 gleichgroße Populationen aufteilen; ein Aliquot (1 x 10⁶ Zellen) zum Einstellen am FACS-Gerät entnehmen und auf Eis stellen
- Population 1 wird mit SIINFEKL gepulst:
 - Peptid (Stock 1 mM) 1:1000 mit RPMI verdünnen (Endkonzentration 1 µM)
 - Pellet in 1 ml Peptidlösung resuspendieren
- Population 2: Pellet in 1 ml RPMI resuspendieren
- Population 1 und 2 45 min bei 37 °C inkubieren
- Zellen 2 x mit je 10 ml RPMI waschen
- CFSE-Markierung der Zellen (Population 1 und 2):

- Population 1 („High CFSE“) in 1 ml 1:450-verdünnter CFSE-Stocklösung resuspendieren; CFSE wurde mit proteinfreiem RPMI verdünnt
- Population 2 („Low CFSE“) in 1 ml 1:1800-verdünnter CFSE-Stocklösung resuspendieren; CFSE wurde mit proteinfreiem RPMI verdünnt
- Zellsuspensionen 10 min bei 37 °C inkubieren
- zum Stoppen der Markierungs-Reaktion gleiches Volumen (= 1 ml) FCS und 5 ml RPMI zugeben
- zentrifugieren
- 1 x mit PBS waschen
- Zellen zählen
- Pellets von Population 1 und 2 in PBS (eiskalt) resuspendieren (je 1×10^7 Zellen in 100 μ l)
- Population 1 und 2 poolen; 2. Aliquot (1×10^6 Zellen) zum Einstellen am FACS-Calibur entnehmen und mit 1. Aliquot mischen
- pro Maus 200 μ l Zellsuspension i.v. spritzen

Färbung der Zellen und Analyse am FACS-Calibur:

- nach 4 h Milz entnehmen, Zellsuspension anfertigen
 - Milz entnehmen, in Schale mit RPMI geben
 - mit Spritzenstempel durch 100 μ m-Zellsieb drücken
 - Zellsuspension in 15 ml-Falcon überführen
- Erythrozytenlyse durchführen: Zellsuspension für 4-5 min in 4 ml Erythrozyten Lysepuffer inkubieren, zum Abstoppen der Lysereaktion 5 x Volumen PBS zugeben und abzentrifugieren.
- EMA-Färbung durchführen:
 - 2 μ l EMA-Stocklösung in 1 ml FACS-Puffer geben (1:500); vortexen
 - Jede Probe in 100 - 200 μ l EMA-Lösung resuspendieren
 - 20 min auf Eis unter Lichtquelle inkubieren
 - 1 x mit FACS-Puffer waschen
 - Pellet in 300 μ l FACS-Puffer resuspendieren, in FACS-Röhrchen überführen und am FACS-Gerät analysieren

2.9 Tierversuche

Die in dieser Arbeit durchgeführten meldepflichtigen Tierversuche wurden unter der Tierversuchsantrags-Nummer 211-2531-68/99 (2001- Oktober 2004) bzw. 211-2531-69/04 (ab November 2004) registriert. In die Kategorie „meldepflichtige Tierversuche“ fielen der *in vivo* CTL-Assay (siehe 2.8.6), die CFSE-basierte Bestimmung der T-Zell-Proliferation (siehe 2.8.5) und die LPS-Injektionen (i.p.; siehe 2.8.2).

2.10 Narkotisierung der Tiere (Wach/Schlaf)

Um für die Versuchstiere die Belastung möglichst gering zu halten, wurde unter sorgfältiger Abwägung des Nutzen/Risiko-Verhältnisses für die Mäuse eine Betäubung mit einem Domitor/Dormicum/Fentanyl-Gemisch (DDF) durchgeführt. Die Narkose ist komplett antagonisierbar mit Antisedan/Anexate/Narcanti (AAN). Die Verabreichung erfolgte je nach Gewicht der Mäuse und bewegte sich in einem Bereich zwischen 50 µl AAN und 170 µl DDF (20 g) bzw. 90 µl AAN und 306 µl DDF (36 g).

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der Funktion von NF- κ B durch Deletion von I κ B α

3.1.1 Spezifität der Deletion von I κ B α

CCL17 wird hauptsächlich von CD8 α ⁻ DCs myeloiden Ursprungs exprimiert. CCL17-Expression kann u.a. im Thymus, in der Lunge, in LN, in der Leber und in aktivierten LCs festgestellt werden. In BM-DCs wird CCL17-Expression nach Stimulation mit verschiedenen Stimuli wie z.B. LPS, CpG oder TNF α hochreguliert (Alferink et al., 2003; Lieberam and Förster, 1999).

Um die Spezifität der Deletion in CCL17cre I κ B α Knockout (KO)-Mäusen zu analysieren, wurde aus verschiedenen Zelltypen und Organen (Lunge, Leber, Haut, Milz, Herz) DNA isoliert und ein Southern Blot durchgeführt. Der Terminus „Ktrl.-Tier“ bezeichnet dabei Mäuse, die zwar eine gefloxt DNS-Sequenz aufweisen, jedoch keine Cre-Expression und somit keine Deletion zeigen. Im Gegensatz dazu steht der Begriff „KO-Tier“ für Mäuse, die zusätzlich zu der mit loxP versehenen DNS-Sequenz das Enzym Cre-Rekombinase exprimieren. Der jeweilige Genotyp wurde vor der Durchführung der Versuche mit einer für Cre bzw. die loxP-Sequenzen spezifischen PCR bestimmt (s. 2.6.12).

B- und T-Zellen wurden wie in 2.8.1 und 2.8.2 beschrieben aus Milz und mLN isoliert und angereichert, die M Φ wurden aus dem Peritoneum von Thioglykollat-injizierten (s. 2.8.2) Tieren gewonnen. BM-DCs wurden entweder am Tag 6 als unstimulierte BM-DCs oder am Tag 7 nach 12 h LPS-Stimulation geerntet. Die Auftrennung der BM-DCs in CD11c⁺ MHC II^{hoch} bzw. CD11c⁺ MHC II^{niedrig} erfolgte durchflusszytometrisch (MOFLO). Lunge, Haut, Milz, Leber, Herz und Thymus wurden wie in 2.8.1 beschrieben isoliert.

Die extrahierte und aufgereinigte DNS aus den Zellpopulationen bzw. Organen wurde mit dem Restriktionsenzym (RE) KpnI verdaut und nach einem Agarosegellauf auf eine Nylonmembran geblottet. Die Hybridisierung erfolgte mit einer von R. Rupec und K. Pfeffer freundlicherweise zur Verfügung gestellten I κ B α -spezifischen Sonde (3'-Probe;

(Rupec et al., 2005)). Wie aus Abbildung 3.1 entnommen werden kann, ist nach dem Verdau bei einer erfolgten Deletion der mit zwei loxP-Sequenzen flankierten Exons 1 und 2 eine sog. 1lox-Bande mit einer Größe von 2,7 kb zu erwarten. Falls keine Deletion der geflochtenen Region eintritt, erhält man ein sog. 2lox-Fragment mit einer Größe von 5,6 kb. Das WT-Fragment weist eine Größe von 16 kb auf (Rupec et al., 2005).

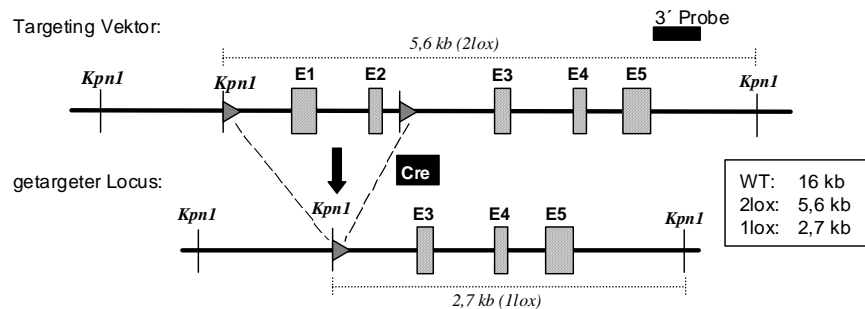


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des Targeting Vektors und des getargeteten Locus. Nach Verdau der aufgereinigten DNS mit KpnI und Hybridisierung der aufgetrennten und geblotteten Fragmente mit der $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Sonde (3'-Probe) kann man folgende Bandengrößen erkennen: WT: 16 kb; 2lox: 5,6 kb; 1lox: 2,7 kb. E: Exon; Cre: Cre-Rekombinase; graue Dreiecke: loxP-Sequenzen (modifiziert nach Rupec et al., 2005)

Wie aus der fehlenden 1lox-Bande ersichtlich ist, hat in M Φ , B- und T-Zellen von Ktrl.- als auch von KO-Tieren keine Deletion der geflochtenen Region stattgefunden (Abb. 3.2.a). In den BM-DCs der KO-Mäuse hingegen ist eine 2,7 kb-Bande sichtbar, d.h. der mit den loxP-Sequenzen flankierte Bereich wurde von dem Enzym Cre-Rekombinase herausgeschnitten. Dabei ist zu erkennen, dass das Ausmaß der Deletion mit dem Aktivierungszustand der Zellen direkt korreliert: Mit zunehmender Aktivierung der BM-DCs (zu erkennen an der Höhe der MHC II-Expression auf der Zelloberfläche) nimmt auch die Stärke der Deletion zu. Diese Beobachtung kann darauf zurückgeführt werden, dass mit zunehmender Aktivierung die CCL17-Expression auch die Cre-Expression hochreguliert wird (Alferink et al., 2003). In den BM-DCs der Ktrl.-Tiere hingegen ist keine Deletion der geflochtenen Region festzustellen.

Abbildung 3.2.b zeigt eine äquivalente Southern Blot Analyse von verschiedenen Organen der Ktrl.- und KO-Tiere: Lunge, Haut, Milz, Herz, Thymus und Leber der Ktrl.-Mäuse weisen keine 1lox-Bande auf. Bei den KO-Tiere dagegen ist in den untersuchten Organen (mit Ausnahme der Milz) eine sehr schwache, kaum wahrnehmbare Deletion zu erkennen. Diese ist sehr wahrscheinlich mit der

Anwesenheit von gewebsständigen DC oder im Blut zirkulierenden DC zu erklären. Die geringe CCL17-Expression -und somit $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Deletion- stimmt mit den bisher veröffentlichten Daten bzgl. einer CCL17-Expression in diesen Organen überein (Imai et al., 1997; Lieberam and Förster, 1999). In der aufgrund der nicht vorhandenen CCL17-Expression als interne Negativkontrolle verwendeten Milz ist keine Deletion zu sehen (Alferink et al., 2003) (3.2.b).

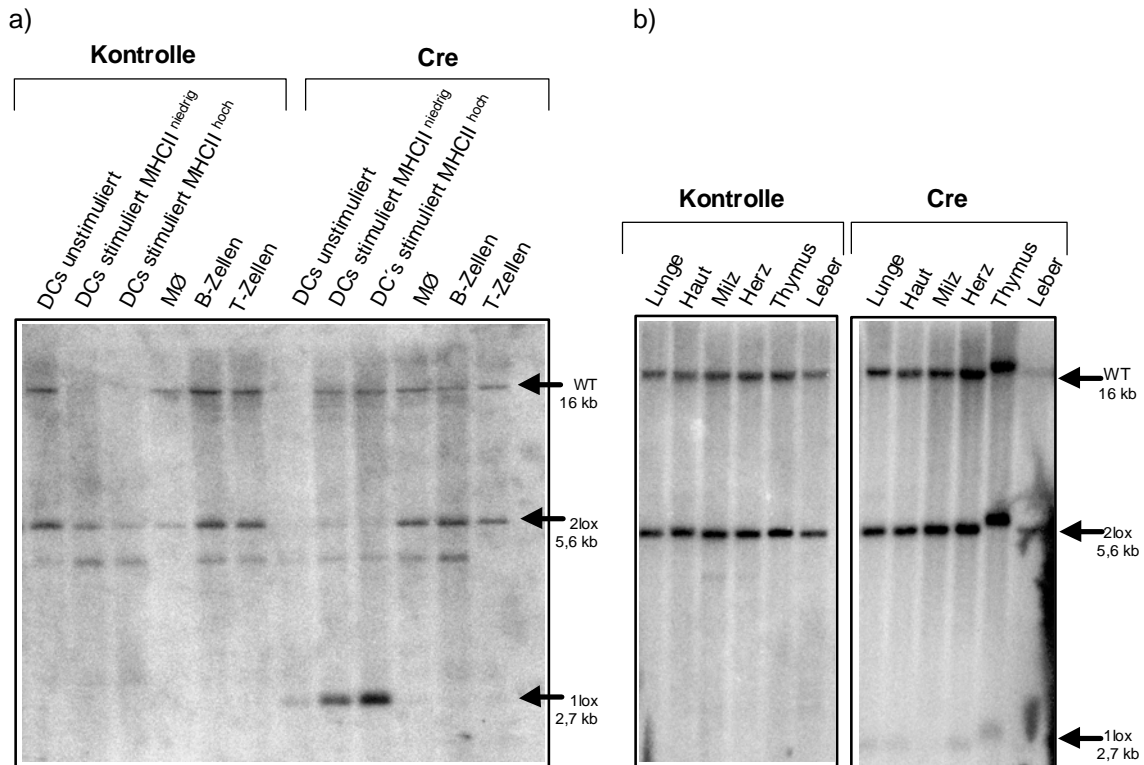


Abb. 3.2: Analyse der Spezifität der Deletion von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ (Southern Blot). BM-DCs wurden aus Knochenmarksvorläuferzellen von Ktrl.- oder KO-Tieren gewonnen und am Tag 6 abgeerntet. Die CD11c^+ MHC II^{hoch} bzw. CD11c^+ MHC II^{niedrig} Zellen wurden durchflusszytometrisch (MOFLO) angereichert. Ein Teil der Zellen wurde für 12 h mit LPS stimuliert (100 ng/ml). B- und T-Zellen wurden aus Milz und mLNs gewonnen, MΦ aus dem Peritoneum von Thioglykollat-injizierten Tieren. Daneben wurde DNS aus diversen Organen analysiert. a) Deletion in unstimulierten und stimulierten DCs, MΦ, B- und T-Zellen; b) Deletion in Lunge, Haut, Milz, Herz, Thymus und Leber.

Da für diesen Versuch die Organe (und Zellen) von heterozygot geflochten Mäusen verwendet wurden, ist in dem Southern Blot die WT-Bande (16 kb) zu sehen. Die ca. 5 kb große Bande knapp unterhalb des 2lox-Fragments in Abb. 3.2.a könnte aus einem unvollständigen Verdau der DNS stammen.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Southern-Blot Analyse zeigt, dass die hier am Institut für Medizinische Mikrobiologie der TU München generierte CCL17^{cre}-Maus tatsächlich spezifisch in CCL17⁺ DCs DNS-Sequenzen, die mit einer loxP-site flankiert

sind, deletiert und folglich die erste Mauslinie darstellt, mit der man in einer bestimmten Untergruppe der DCs eine konditionale Geninaktivierung durchführen kann.

3.1.2 *DNS-Bindeaktivität von NF- κ B nach Aktivierung*

Nach der Stimulation von Zellen mit verschiedenen Stimuli wie z.B LPS oder CpG wird I κ B α phosphoryliert und degradiert, was schließlich zu einer Translokation des aktivierten TFs NF- κ B in den Kern, zur Bindung an die κ B-Sequenz der Zielgene und zu deren Expression führt (Henkel et al., 1993).

Um die Auswirkung des fehlenden Inhibitors I κ B α auf die DNS-Bindeaktivität von NF- κ B in BM-DCs *in vitro* zu untersuchen, wurde der sog. „Electrophoretic Mobility Shift Assay“ (EMSA) angewendet. Dazu wurden zunächst BM-DCs von Ktrl.- und KO-Tieren generiert, die dann ab Tag 6 der Kultur mit LPS, CpG oder TNF α verschieden lang stimuliert wurden (0 min., 10 min., 30 min., 1 h, 2 h, 4 h, 13 h, 24 h, 48 h). Nach Beendigung der Stimulation wurden aus den abgeernteten BM-DCs die nukleären Proteine gewonnen und EMSAs (s. 2.6.11) durchgeführt (Abb. 3.3.a). Dieser Assay erlaubt zusätzlich zur Analyse der Translokation von NF- κ B in den Kern eine Aussage darüber, ob der TF an die DNS-Bindestellen im Promotor der Zielgene gebunden hat. Um eine eventuell vorhandene DNS-Bindung von NF- κ B quantitativ vergleichen zu können, wurde in allen Assays die gleiche Menge an nukleärem Protein eingesetzt (10 ng; Protein-Menge wurde wie in 2.6.9 beschrieben bestimmt).

Zuerst wurde die DNS-Bindeaktivität von NF- κ B in BM-DCs von Ktrl.-Tieren nach Stimulation mit LPS (Abb. 3.3.b oben), CpG (Mitte) und TNF α (unten) untersucht. Bereits in unstimulierten Zellen ist als basaler Level eine geringe Menge des an die DNS gebundenen TFs zu erkennen. Im Falle der Stimulation der BM-DCs mit LPS ist bereits nach 10 min ein Anstieg an transloziertem, gebundenem NF- κ B im Kern zu beobachten, nach einer Stimulationsdauer von 30 min. wird das Maximum erreicht. Diese Kinetik ist auch nach CpG-Stimulation zu sehen. Über einen Zeitraum von 1 h bis 24 h hinweg bleibt die Menge an gebundenem TF relativ relativ konstant, um nach 48 h wieder auf den basalen Level abzufallen. Die TNF α -stimulierten Zellen zeigen eine leicht nach hinten verschobene Kinetik: Ein Anstieg der Menge an in den Kern transloziertem, DNS gebundenem NF- κ B ist erst nach 30 min. sichtbar, das Maximum wird nach 2 h erreicht. Ebenso wie in den LPS- und CpG-stimulierten Ktrl.-Zellen

würde man erwarten, dass die Menge an gebundenem TF 48 h nach der Stimulation wieder abfällt; allerdings ist in der Bahn „48 h“ kaum eine durch den radioaktiven Zerfall hervorgerufene Schwärzung zu sehen. Es kann deshalb sein, dass das fehlende NF- κ B-Signal nicht auf eine wieder aufgehobene Bindung des TFs an die DNS, sondern durch eine fehlende Probe bzw. zu geringe Probenmenge zurückgeführt werden kann.

Bei den KO-BM-DCs kann man schon in den unstimulierten Zellen einen gegenüber den Ktrl.-Proben erhöhten basalen Level an DNS-gebundenem NF- κ B im Kern feststellen. In den LPS-stimulierten KO-BM-DCs (3.3.c) wird das Maximum der Bindung bereits nach 10 min. erreicht. 48 h nach Stimulationsbeginn fällt die Menge an transloziertem und gebundenem TF auf ein mit den Ktrl.-Zellen zu vergleichendes Niveau zurück. Auch bei den CpG-stimulierten KO-BM-DCs ist ein erhöhter basaler Level an NF- κ B im Kern und ein Abfall der Menge an gebundenem TF nach 48 h zu erkennen. Im Vergleich zu den Ktrl.-Zellen scheint über alle beobachteten Zeitpunkte hinweg (ausgenommen bei einer Stimulationsdauer von 48 h) mehr NF- κ B an die DNS gebunden zu haben (3.3.d). Dies ist auch ganz deutlich bei den TNF α -stimulierten KO-BM-DCs zu sehen (3.3.e). Wie die Ktrl.-Zellen erreicht die Menge an gebundenem TF in den KO-Zellen nach 2 h Stimulation das Maximum. Im deutlichen Gegensatz zu den mit LPS oder CpG stimulierten Ktrl- oder KO-Zellen jedoch fällt die Menge an DNS-gebundenem NF- κ B nach 48 h Stimulation nicht ab, sondern bleibt weiterhin auf konstant hohem Niveau.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, dass in den KO-BM-DCs im Vergleich zu den Ktrl.-Zellen das Niveau der basalen DNS-Bindung von NF- κ B höher ist. Zusätzlich dazu kann man in den KO-BM-DCs nach CpG- und TNF α -Stimulation erkennen, dass mehr TF an die DNS gebunden ist als in den Ktrl.-Zellen.

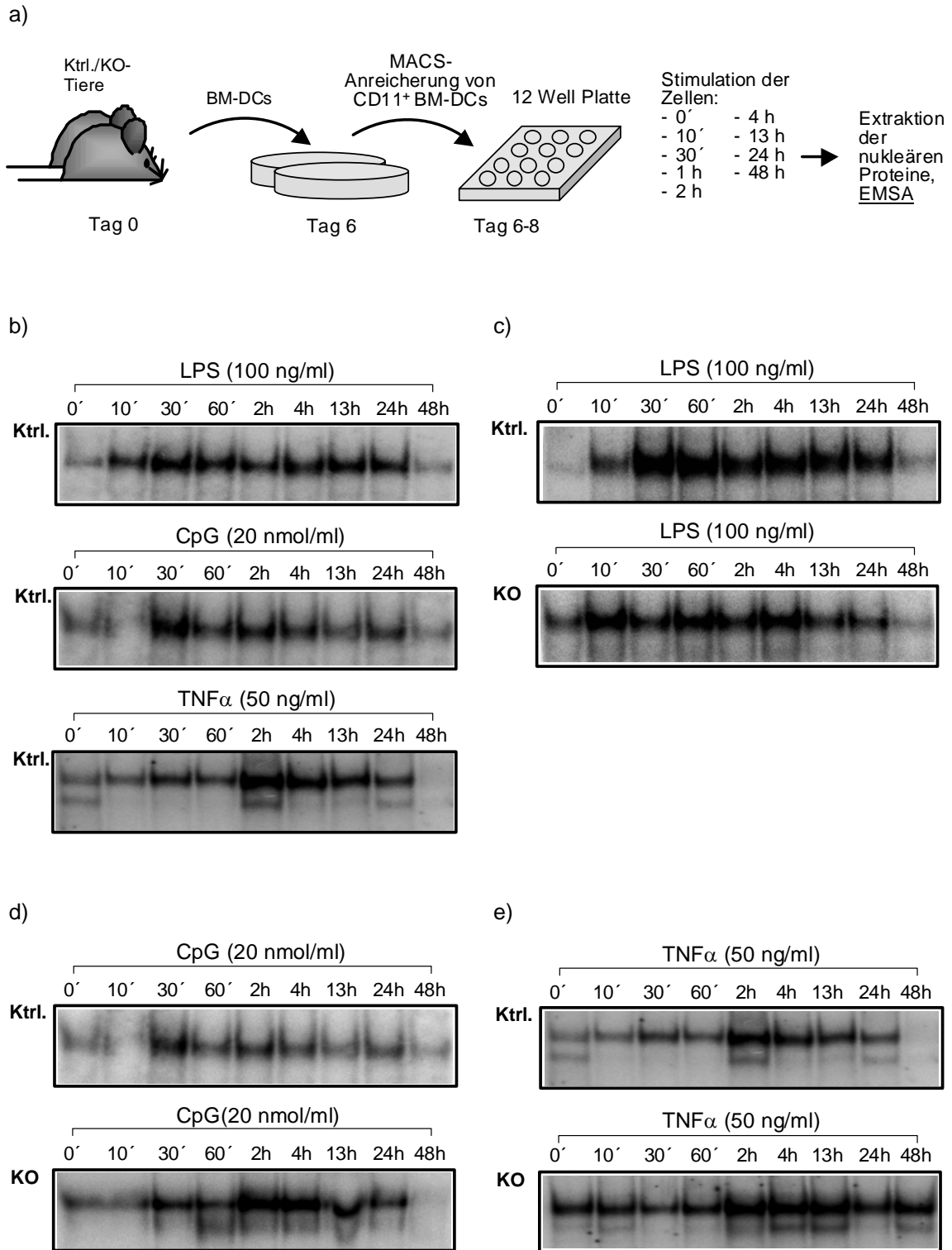


Abb. 3.3: DNS-Bindeaktivität von NF- κ B in unstimulierten oder stimulierten (LPS, CpG, TNF α) MACS-angereicherten BM-DCs. a) Versuchsaufbau: An Tag 6 wurden die aus Knochenmark von Ktrl.- und KO-Tieren gewonnenen Zellen MACS-angereichert, in 12 Well Platten überführt und gemäß den angegebenen Zeitpunkten stimuliert. Nach der Extraktion der nukleären Proteine wurde ein EMSA durchgeführt. Vergleich der DNS-Bindeaktivität von NF- κ B in Ktrl.-Zellen nach LPS (oben)-, CpG (Mitte)- und TNF α (unten)-Stimulation (b) und in KO-Zellen (c, d, e). (Die jeweiligen EMSAs wurden (bis auf Ktrl. TNF α -Stimulation und KO CpG-Stimulation) zweimal mit je mindestens 2 Tieren pro Gruppe durchgeführt.)

3.1.3 *Analyse der APC-Funktion von $I\kappa B\alpha^{-/-}$ BM-DCs*

Innerhalb der APCs nehmen die DCs eine Sonderstellung ein: Nur sie sind in der Lage - im Gegensatz zu den B-Zellen und $M\Phi$ - naive T-Zellen im Zuge der primären Immunantwort zu aktivieren. Von entscheidender Bedeutung bei der Generierung einer primären Immunantwort ist die Fähigkeit der DCs, den naiven T-Zellen die aufgenommenen und prozessierten Ag auf MHC I- bzw. MHC II-Molekülen gleichzeitig mit den im Laufe der Maturierung hochregulierten kostimulatorischen Molekülen (CD80, CD86, CD40) zu präsentieren. Zusammen mit der Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie z.B. IL-12 oder IL-6 gewährleisten die DCs mit ihrer APC-Funktion eine rasche Aktivierung von naiven T-Zellen.

Expression von Aktivierungsmarkern

Viele Stimuli, die zur Aktivierung der DCs führen, sind gleichzeitig starke Induktoren von NF- κ B (Baldwin, 1996; Ghosh et al., 1998), was den Schluss nahe legt, dass dieser TF eine Schlüsselrolle bei der Maturierung der DCs, also u.a. bei der Regulation der Expression der Aktivierungsmarker, inne hat. Um zu analysieren, ob die fehlende NF- κ B-Inhibierung in $I\kappa B\alpha^{-/-}$ BM-DCs Auswirkungen auf die Expression dieser Oberflächen (OF)-Moleküle hat, wurden FACS-Analysen von BM-DCs durchgeführt: Aus Ktrl.- und KO-Mäusen wurden BM-DCs generiert und am Tag 6 als unstimulierte Zellen aus den Kulturschalen abgeschabt. Weitere Zellproben wurden am Tag 7 nach 15 h LPS- bzw. TNF α -Stimulation entnommen. Wie in 2.8.3 beschrieben, wurden das als allgemeiner DC-Marker akzeptierte Integrin CD11c, die Aktivierungsmarker CD86 und MHC II und das DC-kostimulatorische Molekül CD40 mit Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelten Ak gefärbt.

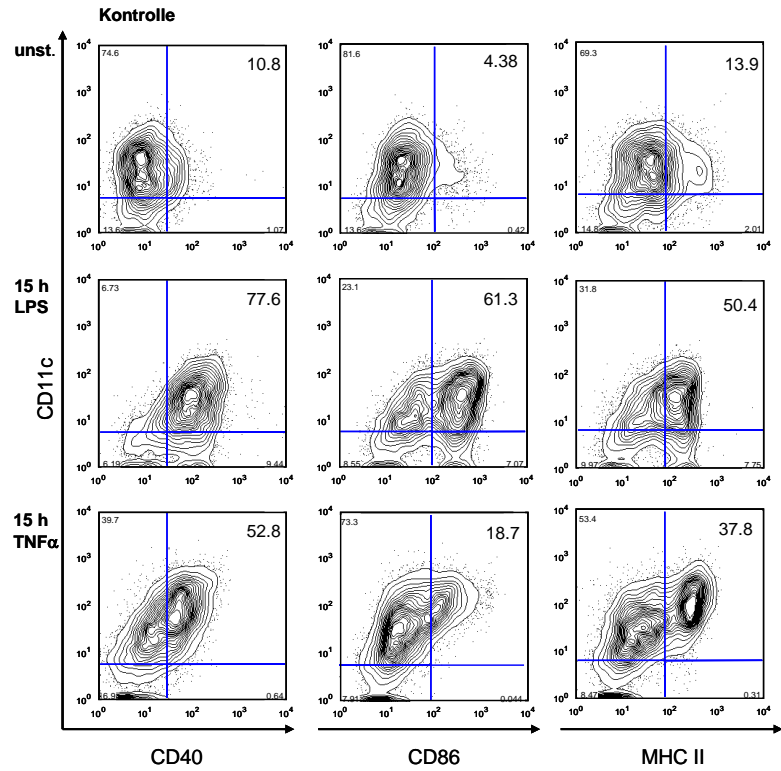
Wie am relativ geringen Anteil der für CD11c und CD40/CD86/MHC II doppelpositiven Zellen abzulesen ist, hat in den unstimulierten BM-DCs am Tag 6 der Kultur noch keine Hochregulation der untersuchten OF-Moleküle stattgefunden (Abb. 3.4.a, obere Reihe). Sowohl Ktrl- als auch KO-Zellen zeigen eine vergleichbare Expression von CD40, CD86 und MHC II. Nach Stimulation der Zellen mit TNF α (50 ng/ml) und besonders mit LPS (100 ng/ml) über 15 h hinweg ist eine deutliche Hochregulation der Marker zu sehen. Auffällig dabei ist jedoch, dass v.a. nach LPS-

Stimulation und in geringerem Umfang auch nach $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation die normalerweise zu erwartende Verschiebung der MHC II⁺ Population zu MHC II^{hoch} in den $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -defizienten BM-DCs nicht in dem Ausmaß stattfindet wie in den Ktrl.-Zellen.

Des Weiteren ist zu beobachten, dass nach 15 h LPS-Stimulation (nicht aber nach $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation oder in den unstimulierten Zellen) der Oberflächenmarker CD86 in den KO-BM-DCs nicht in dem Maße wie in den Ktrl.-Zellen hochreguliert wird (42,5 % in den KO- und 61,3 % in den Ktrl.-Zellen). Laut Literatur würde man ein anderes Ergebnis erwarten: Yoshimura et al. z.B konnten zeigen, dass bei Überexpression von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ in humanen Monozyten u.a. die Expression von CD40, CD86 und HLA-DR deutlich verringert ist (Yoshimura et al., 2001b). Die Abwesenheit des Inhibitors könnte folglich eine Hochregulation dieser Marker in den KO-Zellen nach sich ziehen.

Ein Grund für die beobachtete niedrigere Expression eines Teils der analysierten Oberflächenmarker in den KO-BM-DCs könnte u.a. darin liegen, dass aufgrund des fehlenden Inhibitors $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ und der daraus resultierenden erhöhten basalen Bindeaktivität von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ an die DNS (s. Abb. 3.3) eine Adaptierung der Zellen stattgefunden hat. Die Spezifität der einzelnen Rel-Proteine für bestimmte Stimuli und Promotoren könnte erklären, dass nicht alle untersuchten Oberflächenmarker, sondern nur einzelne nach LPS- bzw. $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation betroffen sind. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass aufgrund der in den KO-BM-DCs früher stattfindenden $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Aktivität auch die $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -abhängigen negativen Regulationsmechanismen früher induziert werden und zu einem vorzeitigen Beenden der $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -aktivierten Hochregulation von CD86 und MHC II führen.

a)



b)

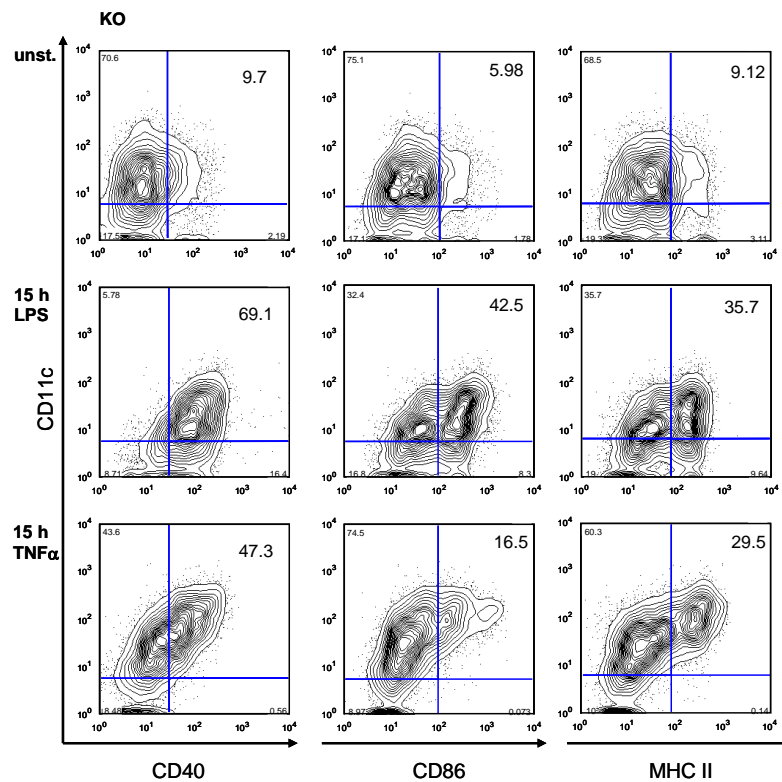


Abb. 3.4: Expression von CD40, CD86 und MHC II auf Ktrl. (a)- und KO-BM-DCs (b). BM-DCs von Ktrl.- und KO-Tieren wurden am Tag 6 unstimuliert oder am Tag 7 nach 15 h Stimulation mit LPS (mittlere Reihe) und TNF α (untere Reihe) abgeschabt und mit Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelten Antikörpern gegen CD11c, CD40, CD86 und MHC II gefärbt. Die Zahl in den jeweiligen Quadranten gibt den Anteil der sich darin befindenden Zellen (in Prozent) an. (Der Versuch wurde zweimal mit je 2 Mäusen pro Gruppe durchgeführt.)

Zytokinexpression

Ein weiteres wichtiges Merkmal neben der Hochregulation von OF-Markern, das den Aktivierungszustand von DCs anzeigt, ist die Zytokinproduktion. Während der z.B. durch bakterielle Stimuli wie LPS- oder CpG-Kontakt hervorgerufenen Maturierung erfolgt- neben der Expression von $\text{TNF}\alpha$, MIP-1 α oder MIP-1 β - u.a. die Expression der Zytokine IL-12 und IL-6. IL-12 ist ein heterodimeres Zytokin, das aus den zwei Untereinheiten p35 und p40 besteht, deren codierenden Gene bei der Maus auf Chromosom 6 und 11 liegen (Gubler et al., 1991). Falls beide Formen in derselben Zelle exprimiert werden, verbinden sie sich über Disulfid-Brücken zum biologisch aktiven IL-12p70. IL-12p40 kann als freies Monomer oder Homodimer auftreten, IL-12p35 dagegen wird in monomerer Form nicht sekretiert. Die Expression von IL-12p35 erfolgt ubiquitär und konstitutiv auf niedrigem Niveau, IL-12p70 hingegen wird nur von phagozytisch aktiven Zellen exprimiert, die zugleich IL-12p40 produzieren. Die Expression von p40 ist auf transkriptioneller Ebene streng reguliert und wird durch mikrobielle Produkte wie z.B. LPS oder CpG induziert. Der Promotor von *p40* bindet neben IRF („Interferon Regulatory Factor“-)1, ICSBP („Interferon Consensus Binding Protein“), c-Rel und Mitgliedern der Ets-Familie auch den TF NF- κ B: Im Promotor wurde eine NF- κ B-Bindestelle (von -117 bis -107) nachgewiesen (Murphy et al., 1995), welche bevorzugt p50/RelA und p50/c-Rel Heterodimere bindet (Gri et al., 1998 Sanjabi, 2000). In DCs wird nach LPS-Stimulation hauptsächlich der NF- κ B Heterodimer p50/c-Rel aktiviert (Ouaaz et al., 2002).

Das von Immunzellen und auch nicht-Immunzellen produzierte inflammatorische Zytokin IL-6 wird während einer Entzündung nach $\text{TNF}\alpha$ und IL-1 als eines der ersten Zytokine exprimiert. Es inhibiert die weitere Sekretion von $\text{TNF}\alpha$ und IL-1, aktiviert die Produktion von Akut-Phase-Proteinen (z.B. C-reaktives Protein) und hilft so, die Inflammation zu kontrollieren (van Deventer et al., 1990 Hesse, 1988; Schindler, 1990). Das pleiotrope Zytokin IL-6 hat vielfältige Funktionen; so ist es u.a. notwendig zur Differenzierung und Maturierung von B-Zellen, zur Produktion von Immunglobulin durch B-Zellen und zur Proliferation und Differenzierung von T-Zellen. Die transkriptionelle Regulation von IL-6 ist sehr komplex: Der Promotor des auf Chromosom 7 codierten Gens trägt Erkennungssequenzen für die TFs „nuclear factor“

(NF)-IL6, AP-1 und NF- κ B, wobei Letzterer für die Expression von IL-6 essentiell ist (Palanki, 2002).

Da die Produktion sowohl von IL-12 als auch von IL-6 wesentlich von NF- κ B kontrolliert wird, und beide Zytokine eine wichtige Rolle in der Regulation der Immunantwort durch DCs innehaben, wurden diese Interleukine ausgewählt, um zu untersuchen, ob der Verlust des Inhibitors von NF- κ B einen Einfluss auf die Zytokinproduktion von BM-DCs hat. Dazu wurden in Überständen von Ktrl.- bzw. KO-BM-DC-Kulturen, die mit LPS, CpG oder TNF α verschieden lang stimuliert wurden, die Mengen an IL-12p70 und IL-6 im Überstand gemessen.

Abb. 3.5.a zeigt die Menge an IL-12p70, die nach Stimulation mit LPS (100 ng/ml; Bild 1 und 2), TNF α (50 ng/ml; Bild 3) und CpG (20 nmol/ml; Bild 4) in den Überstand freigesetzt wurde. Nach LPS-Stimulation konnten zum Teil erhebliche Abweichungen bezüglich der gemessenen IL-12p70-Menge festgestellt werden, wie Bild 1 und 2 zeigen: In einem Experiment (Bild 1) bestand ein beträchtlicher Unterschied in der IL-12p70 Produktion zwischen Ktrl.- und KO-BM-DCs, ein Maximum wurde nach jeweils 24 h Stimulation mit 242 pg/ml bzw. 20 pg/ml erreicht. In einem weiteren Experiment (Bild 2) hingegen wurde ein Maximum bereits nach 13 h LPS-Stimulation gemessen, welches zusammen mit dem Unterschied zwischen den Ktrl.- und KO-BM-DCs mit 55 pg/ml bzw. 35 pg/ml bei weitem nicht so stark ausgeprägt war. Dieses Ergebnis konnte in einem weiteren Experiment (nicht gezeigt) wiederholt werden. Somit stellt der in Bild 1 gezeigte starke Unterschied in der Expression von IL-12p70 eine Ausnahme dar. Bild 3 zeigt den IL-12p70- Level nach TNF α (50 ng/ml)-Stimulation. Ein Maximum wird nach 13 h (Ktrl.) bzw. 24 h (KO) erreicht, wobei wie schon nach LPS-Stimulation die Überstände der KO-Zellen eine statistisch signifikant höhere Menge an IL-12p70 aufweisen. In den Überständen der mit CpG (20 nmol/ml) stimulierten Zellen (Bild 4) kann man eine im Vergleich zu den LPS- und TNF α -stimulierten Zellen eine nach hinten verschobene Kinetik feststellen: Erst nach 48 h Stimulation kann ein sprunghafter Anstieg festgestellt werden. Auch in diesem Fall weisen die Überstände der KO-Zellen eine signifikant höhere Menge an Zytokin auf.

Wie Abb. 3.5.b zeigt, kann man auch für IL-6 nach LPS (100 ng/ml; Bild 1)- und CpG (20 nmol/ml; Bild 2)-Stimulation einen vergleichbaren zeitlichen Verlauf in Bezug auf den Anstieg des Zytokinniveaus feststellen. 24 h nach TNF α -Zugabe und 48 h nach CpG-Zugabe erreicht der IL-6 Pegel ein Maximum. Ebenso wie für IL-12p70 weisen

die Überstände der stimulierten KO-BM-DCs eine signifikant größere Menge an IL-6 auf.

a)

IL-12p70:

Bild 1:

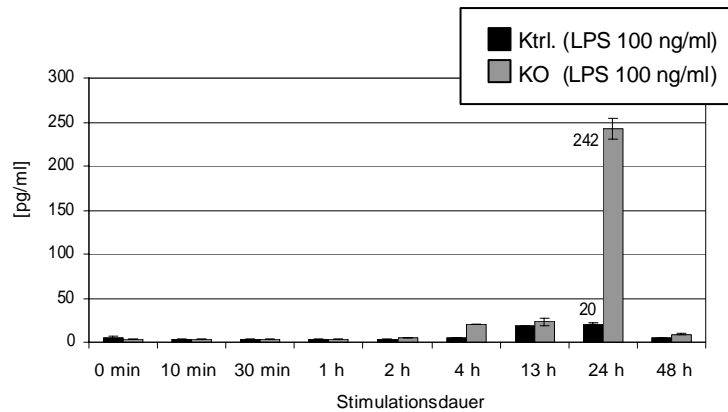


Bild 2:

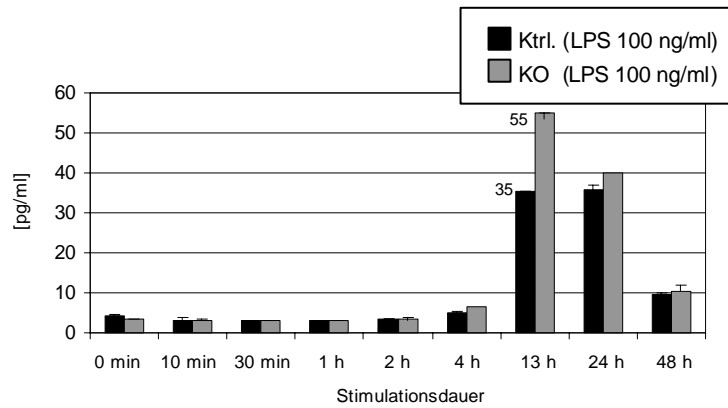


Bild 3:

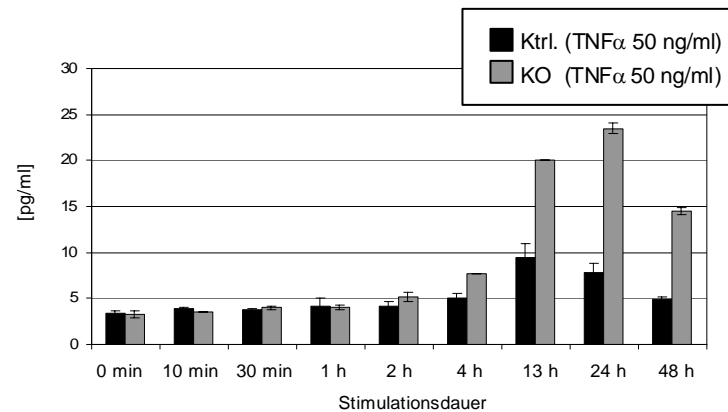
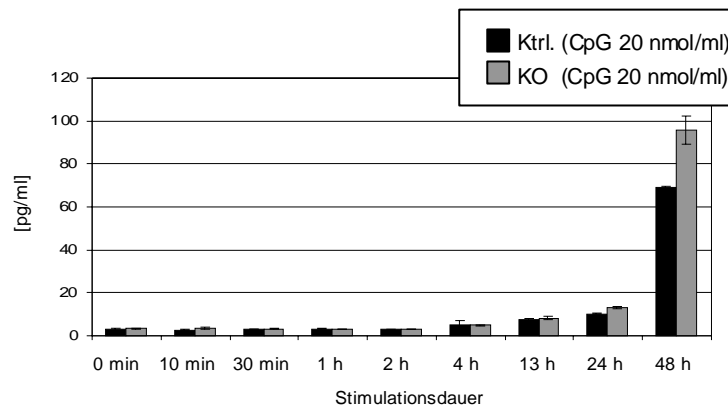
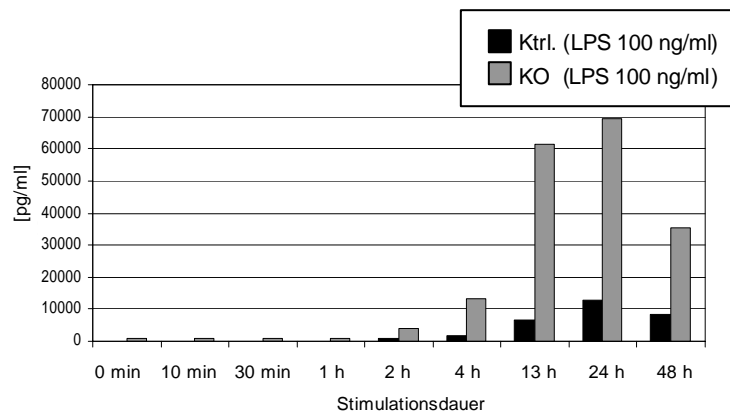
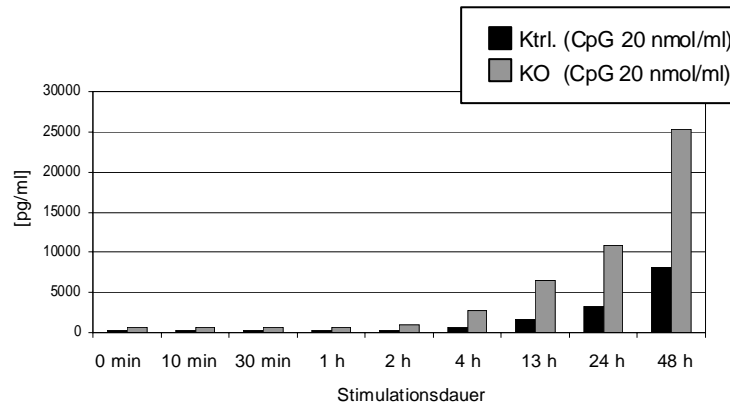


Bild 4:



b)

IL-6:**Bild 1:****Bild 2:****Abb. 3.5: Zytokinexpression von Ktrl.-u. KO-BM-DCs nach Stimulation mit verschiedenen Stimuli.**

a) IL-12p70-Expression nach Stimulation der BM-DCs mit LPS (Bild 1 und 2), TNF α (Bild 3) und CpG (Bild 4). b) IL-6 Expression nach Stimulation der BM-DCs mit TNF α (Bild 1) und CpG (Bild 2). Schwarze Kästchen: KO-BM-DCs; graue Kästchen: Ktrl.-BM-DCs. (Der IL-12p70-ELISA wurde pro Stimulus -mit Ausnahme nach TNF α -Stimulation, hier wurde der Versuch einmal ausgeführt- mind. zweimal mit mind. je 2 Tieren pro Gruppe durchgeführt; für den IL-6-ELISA wurde pro Stimulation ein Versuch durchgeführt.)

Proliferation von CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen

Wie bereits erwähnt, zeichnen sich maturierte DCs v.a. dadurch aus, dass sie als einzige der professionellen APCs in der Lage sind, naive T-Zellen über die Präsentation von exogenen Ag zu aktivieren und so die primäre Immunantwort zu initiieren. Innerhalb von 48 h differenzieren die ursprünglich naiven T-Zellen zu Lymphoblasten und durchlaufen während einer Zeitspanne von 4-5 Tagen mehrere Proliferationsrunden, an deren Ende eine Vielzahl an CD4⁺ bzw. CD8⁺ Effektor-T-Zellen stehen.

Um zu untersuchen, ob $I\kappa B\alpha^{-/-}$ DCs in der Lage sind, naive T-Zellen zu aktivieren und eine Proliferation von OVA-geprimten T-Zellen als Reaktion auf OVA-Restimulation zu induzieren, wurden sog. T-Zell-Proliferationsassays durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden am Tag 0 Ktrl.- und KO-Mäuse wie in 2.8.5 beschrieben mit einem Ovalbumin (OVA)/„complete Freund’s adjuvants“ (CFA)-Gemisch subkutan an der Fußsohle des linken Hinterbeines immunisiert. Nach 7 Tagen wurden die drainierenden LNs (poplietale LN, pLN) entnommen, mit Collagenase VIII verdaut, um die im Gewebe haftenden DCs herauszulösen, mit CFSE markiert und in 48-well-Kulturschalen ausgesät. Um eine Proliferation der während der 7 Tage dauernden Inkubationszeit gebildeten $CD4^{+}$ bzw. $CD8^{+}$ T-Zellen hervorzurufen, wurden die Zellen mit verschiedenen Mengen an OVA-Protein (0 μg , 50 μg , 100 μg , 200 μg , 400 μg /500 μl Medium) restimuliert. Nach 2,5-3 Tagen wurden die Zellen geerntet, die $CD4^{+}$ bzw. $CD8^{+}$ T-Zellen mit Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelten Ak markiert und durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 3.6): Von den am FACS-Calibur aufgenommenen Zellen wurden die vitalen Lymphozyten abgetrennt (3.6.a) und in einfachpositive $CD4$ (x-Achse) bzw. $CD8$ (y-Achse) T-Zellen eingeteilt. Da sich mit jeder Proliferationsrunde der CFSE-Gehalt der Zellen halbiert, lassen sich die proliferierten T-Zellen von den ungeteilten T-Zellen aufgrund der sukzessiv abnehmenden Fluoreszenzintensität abtrennen. Die Histogramme auf der linken Seite zeigen jeweils den Anteil der proliferierten $CD8^{+}$ T-Zellen, die Histogramme auf der rechten Seite zeigen den Anteil der proliferierten $CD4^{+}$ T-Zellen.

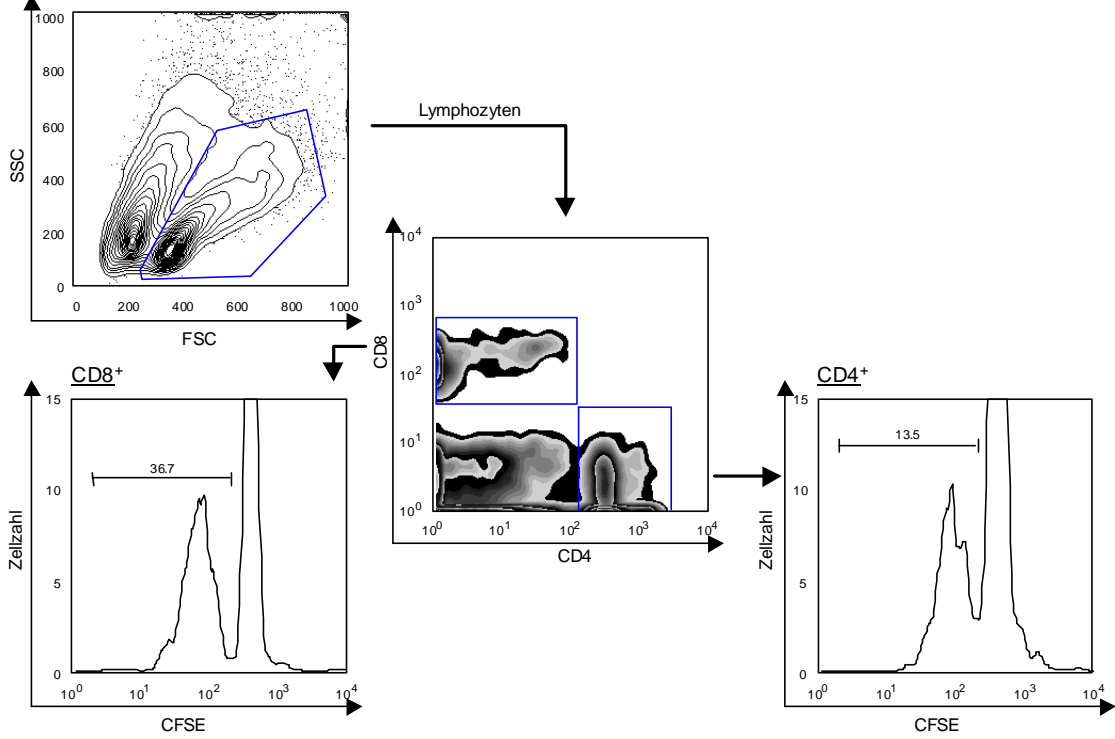
Von den T-Zellen, die aus den pLN der mit OVA/CFA stimulierten Seite gewonnen wurden, teilten sich bei den Ktrl.-Tieren 36,7 % ($CD8^{+}$) bzw. 13,5 % ($CD4^{+}$), bei den KO-Tieren 7,85 % der $CD8^{+}$ und 14 % der $CD4^{+}$ T-Zellen (Abb. 3.6.a). Der Anteil an T-Zellen, der nach Restimulation mit 400 μg OVA *in vitro* weitere Teilungszyklen durchläuft, liegt bei den Ktrl.-Zellen bei 59,1 % ($CD8^{+}$) bzw. 20,7 % ($CD4^{+}$) und somit in einem Bereich, der der Teilungsrate bei den KO-Zellen nahe ist (52,9 % der $CD8^{+}$ bzw. 34,9 % der $CD4^{+}$ T-Zellen) (Abb. 3.6.b).

Die Hintergrundproliferation, die sich als der Anteil der proliferierten T-Zellen im poplietalen LN der nichtinjizierten Seite nach *in vitro*-Restimulation mit OVA definiert, liegt sowohl bei den T-Zellen, die aus Ktrl.-Tieren gewonnen wurden, als auch bei den aus den KO-Tieren gewonnenen T-Zellen bei jeweils unter 4 %.

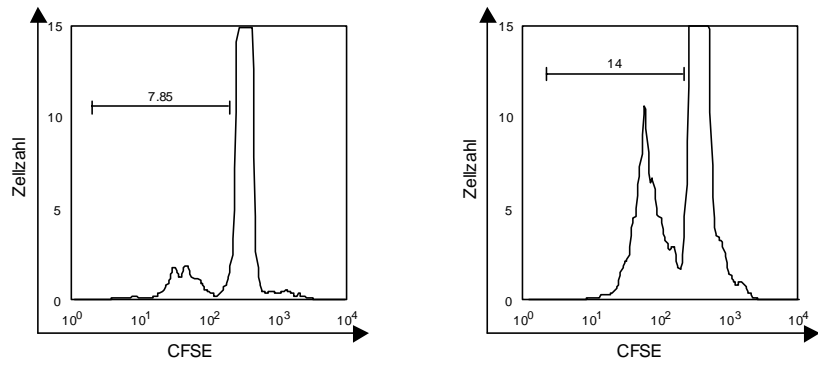
a)

**OVA/CFA-injizierter Fuß,
keine OVA-Restimulation**

Ktrl.:

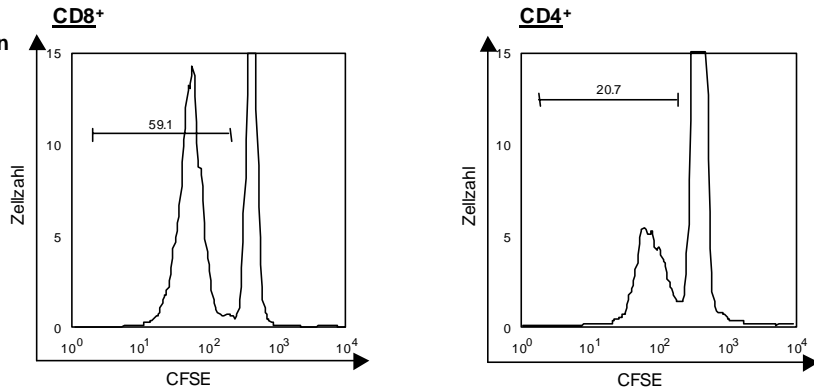


KO:



b)

OVA/CFA-injizierter Fuß,
400 µg OVA-Restimulation
Ktrl.:



KO:

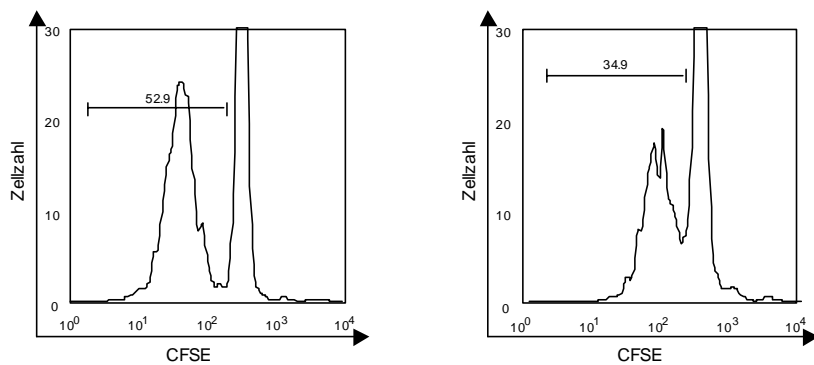


Abb. 3.6: Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. a)-c): Die vitalen Lymphozyten wurden in CD4⁺ (rechts) und CD8⁺ (links) T-Zellen unterteilt. Von diesen Populationen wurde dann der Anteil an proliferierenden Zellen anhand der abnehmenden CFSE-Fluoreszenzintensität im Histogramm bestimmt. a): Anteil der proliferierten T-Zellen des pLN des mit OVA/CFA immunisierten Fußes ohne OVA-Restimulation *in vitro*, b) Anteil der proliferierten T-Zellen des pLN des mit OVA/CFA immunisierten Fußes nach Restimulation mit 400 µg OVA *in vitro*. (Der Versuch wurde insgesamt fünfmal durchgeführt.)

Insgesamt konnte man bei diesem mehrmals durchgeführten Versuch eine sehr starke Schwankung bezüglich der Proliferationsraten zwischen den einzelnen Versuchen feststellen. Die Tendenz war in allen Versuchen bis auf einen wie in diesem hier beispielhaft gezeigten Versuch dargestellt: Es bestand kein signifikanter Unterschied bzgl. der Proliferation der CD8⁺ und der CD4⁺ T-Zellen, die sowohl aus Ktrl.- als auch aus KO-Tieren gewonnen wurden. In einem Versuch wiesen die T-Zellen der KO-Tiere eine im Vergleich zu den T-Zellen der Ktrl.-Tiere massiv erhöhte Proliferationsrate auf. Dieses Ergebnis ließ sich nicht reproduzieren und wurde somit aus der Wertung genommen. Eventuell ist dieses Resultat auf eine bereits vorhanden gewesene Infektion oder andere Erkrankung der Maus zurückzuführen.

3.1.4 Überleben der $I\kappa B\alpha^{-/-}$ DCs nach Stimulation mit LPS und $TNF\alpha$

NF- κ B spielt bei der Regulation der immunologischen Homöostase als Vermittler sowohl von pro- als auch von anti-apoptotischen Ereignissen eine wichtige Rolle. So wurde z.B. gezeigt, dass RelA-defiziente Mäuse nach Stimulation mit $TNF\alpha$ am embryonalen Tag 15 infolge einer $TNF\alpha$ -induzierten Leber-Apoptose sterben (Beg et al., 1995b). Die anti-apoptotische Wirkung des TFs ist darauf zurückzuführen, dass z.B. Mitglieder der Bcl-2-Familie wie Bcl-x_L von NF- κ B reguliert werden: Im Falle einer Aktivierung des TFs aktiviert dieser die Expression der anti-apoptotischen Faktoren und die Zelle überlebt (Beg et al., 1995b). Allerdings kann die anti-apoptotische Aktivität des TFs auch geblockt werden: So können z.B. *downstream* gelegene Adaptermoleküle (TRAF1, TRAF2, RIP) oder NF- κ B-Mitglieder wie IKK β oder RelA durch Caspasen degradiert werden und eine anti-apoptotische Funktion von NF- κ B verhindern (Hong et al., 2000; Leo et al., 2001; Levkau et al., 1999; Schwenzer et al., 1999; Tang et al., 2001).

Um zu überprüfen, ob die $I\kappa B\alpha$ -defizienten BM-DCs im Vergleich zu den Ktrl.-BM-DCs nach Stimulation ein anderes Apoptose/Nekrose-Verhalten zeigen, wurden die angesetzten Zellen am Tag 6 geerntet, gewaschen, verschieden lang mit LPS (100 ng/ml) bzw. $TNF\alpha$ (50 ng/ml) stimuliert und nach erfolgter Stimulation mit AnnexinV und Propidiumjodid (PJ) doppelgefärbt. Der Zellfarbstoff AnnexinV bindet an Phosphatidylserin und stellt einen Marker der frühen Apoptose dar. PJ hingegen lagert sich in die DNS ein und kennzeichnet so nekrotische Zellen. Zellen, die für beide Farbstoffe doppelnegativ sind, werden als lebend angesehen.

Zuerst wurde der Anteil an lebenden Zellen bzw. der an apoptotischen und nekrotischen Zellen ohne Stimulation oder nach Stimulation mit LPS für 21 h und 69 h bestimmt (Abb. 3.7.a). Im unstimulierten Zustand (linke Bildreihe) befinden sich 85,9 % (Ktrl.; oben) bzw. 76,9 % (KO; unten) lebende Zellen in der Kultur. Nach 21 h sinkt der Anteil an AnnexinV- und PJ-negativen Zellen bei den KO-BM-DCs auf 62,4 %, wohingegen in der Ktrl.-Kultur noch 82,9 % lebende Zellen zu finden sind. Am Tag 3 nach LPS-Stimulation (69 h) sinkt sowohl bei den KO- als auch bei den Ktrl.-BM-DCs der Anteil der lebenden Zellen auf ca. 20 %.

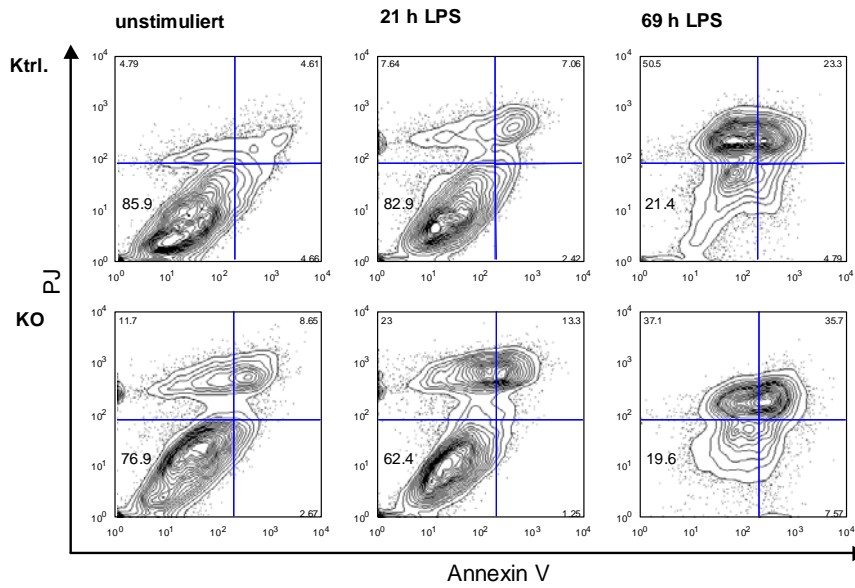
Nach TNF α -Stimulation (3.7.b) beträgt der Anteil an lebenden Zellen in der Kultur 86,8 % (Ktrl.-BM-DCs; oben) bzw. 88,4 % (KO-Zellen; unten). 24 h später ist dieser Anteil an lebenden Zellen in der Ktrl.-Kultur nahezu unverändert bei 83,6 %, wohingegen der Anteil der lebenden Zellen in der KO-Kultur auf 69,7 % sinkt. 48 h nach TNF α -Stimulation beträgt der Anteil der doppelnegativen Zellen sowohl bei der Ktrl.- als auch bei der KO-Kultur ca. 75 %.

Sowohl nach LPS- als auch nach TNF α -Stimulation fällt der Anteil an lebenden Zellen der KO-Kultur nach 21 h bzw. 24 h Stimulation deutlich unter den Anteil an lebenden Zellen der Ktrl.-Kultur, deren Anteil an doppelnegativen Zellen relativ konstant um die 83 % bleibt. Beim letzten untersuchten Stimulationszeitpunkt (69 h LPS- bzw. 48 h TNF α -Gabe) kann man keinen Unterschied mehr in der Anzahl der lebenden Zellen in den Ktrl.- oder KO-Kulturen feststellen.

In der Kultur der KO-Zellen befinden sich nach 21 h LPS-Stimulation mit einem Anteil von 23 % an der Gesamtkultur viel mehr PJ-positive Zellen als bei den Ktrl.-BM-DCs (7,6 %). Nach 24 h TNF α -Stimulation hingegen sind mehr AnnexinV-positive, apoptotische Zellen in der KO-Kulturschale zu finden (18,7 %) als in der Ktrl.-Schale, wo nur 1,9 % der Zellen Apoptose durchliefen.

Zusammengefasst sterben die I κ B α -defizienten BM-DCs früher als die Ktrl.-Zellen, wobei die KO-BM-DCs nach LPS-Stimulation vermehrt Nekrose und nach TNF α -Zugabe vermehrt Apoptose zu durchlaufen scheinen. Dass die KO-BM-DCs wie hier beobachtet schneller sterben, war nicht erwartet, da die meisten Publikationen eine anti-apoptotische Funktion des TFs belegen. Das hier beobachtete schnellere Absterben der I κ B α -defizienten BM-DCs sowohl nach LPS- als auch nach TNF α -Stimulation deutet darauf hin, dass unter diesen Bedingungen eher der Apoptose-induzierende Signalweg aktiviert wird.

a)



b)

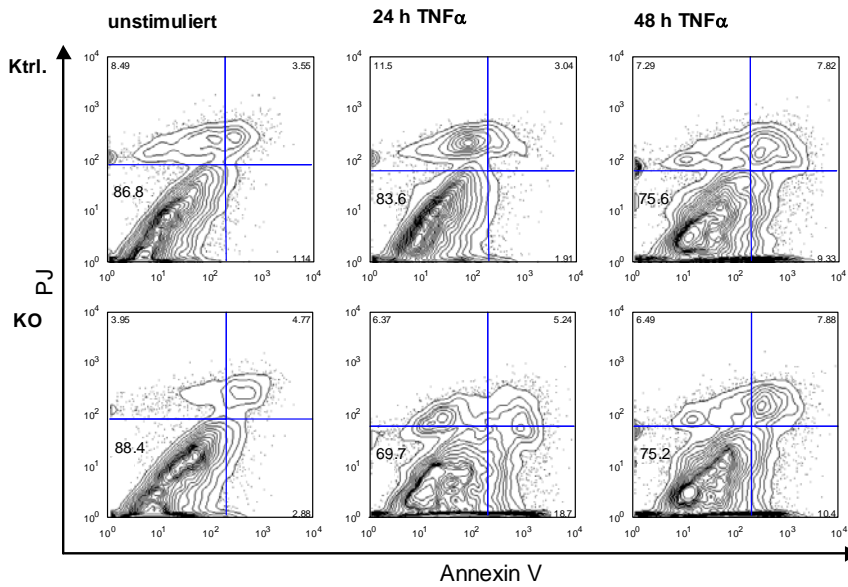


Abb. 3.7: Überleben der $\text{I}\kappa\text{B}\alpha^{-/-}$ BM-DCs nach LPS- und $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation. Am Tag 6 der Kultur wurden die Zellen geerntet, MACS-angereichert (CD11c^+), gewaschen und entweder sofort mit AnnexinV/PJ gefärbt und am FACS-Calibur analysiert oder a) für 21 h bzw. 69 h mit LPS und b) für 24 h bzw. 48 h mit $\text{TNF}\alpha$ stimuliert und dann erst gefärbt und analysiert. (Versuch a) wurde zweimal mit je 2 Tieren pro Gruppe durchgeführt, Versuch b) einmal.)

3.2 Analyse der Funktion von NF- κ B durch NEMO-Deletion

Nachdem im vorangegangenen Teil der Effekt der fehlenden Inhibierung von NF- κ B durch I κ B α auf CCL17⁺ DCs und somit die Folgen der Überaktivierung des TFs untersucht wurden, werden im nächsten Abschnitt die Auswirkungen einer Inhibition von NF- κ B in CCL17⁺DCs analysiert. Diese Inhibition wird durch eine konditionale Geninaktivierung des NF κ B-Regulators *nemo* erreicht.

3.2.1 Spezifität der Deletion von NEMO

Southern- und Western-Blot-Analysen

Um die Spezifität der Deletion in CCL17cre KO-Tieren zu analysieren, wurden neben einem Southern Blot auch verschiedene Western Blots durchgeführt. Ein Vorteil dieser Methode gegenüber Southern Blot-Analysen liegt darin, dass die Deletion auf Proteinebene nachgewiesen werden kann.

Für die CCL17cre NEMO Mäuse konnte mit Hilfe einer Southern Blot Analyse (Schmidt-Supprian et al., 2000) gezeigt werden, dass in Milz, Leber, Herz, Thymus und Lunge von KO-Tieren keine NEMO-Deletion stattfindet (Abb. 3.8). Im Gegensatz dazu kann man in den unstimulierten MHC II^{niedrig} und in den unstimulierten MHC II^{hoch} DCs eine Deletion feststellen. Da bei den unstimulierten MHC II^{hoch} DCs nicht nur die Deletionsbande (1lox), sondern auch die nicht-deletierte Bande (2lox) relativ schwach ausgeprägt ist, ist in diesem Fall eine Aussage über die Deletionseffizienz in dieser DC-Population im Vergleich zu den unstimulierten MHC II^{niedrig} DCs nicht möglich. In der Probe „DCs + LPS MHC II^{hoch}“ scheint zu wenig DNS für eine Aussage bzgl. der Deletionseffizienz vorhanden zu sein.

Je stärker die Zellen stimuliert wurden, umso weniger Deletion scheint stattzufinden, wie bei dem Vergleich der jeweiligen Deletionsbande der DNS-Proben „DCs unstimuliert MHC II^{niedrig}“ und „DCs + LPS MHC II^{niedrig}“ deutlich wird. Diese Beobachtung lässt sich dadurch erklären, dass die für diesen Versuch verwendeten Weibchen heterozygote Träger des geflochten, x-chromosomal gekoppelten NEMO-Allels sind. Durch zufällige Inaktivierung eines x-Chromosoms entstehen DCs, die

entweder ein gefloxtes Allel besitzen oder ein WT-Allel. In den durch das Abschaben von der Kulturschale (DCs unstimuliert MHC II^{niedrig/hoch}) oder zusätzlich durch LPS-Zugabe stimulierten Zellen (DCs stimuliert MHC II^{niedrig/hoch}) kommt es zur Deletion des gefloxten *nemo*, woraufhin aufgrund der prominenten Stellung des NF- κ B-Signalweges -nicht zuletzt bzgl. des Überlebens der Zellen- die deletierten DCs absterben. Angereichert werden somit die nicht-deletierten BM-DCs, was die sehr schwach ausgeprägte bzw. fehlende Deletionsbande im Southern Blot erklärt. Die bei den unstimulierten BM-DCs erscheinende 1lox-Bande lässt sich darauf zurückführen, dass bereits deletierte Zellen noch nicht abgestorben sind.

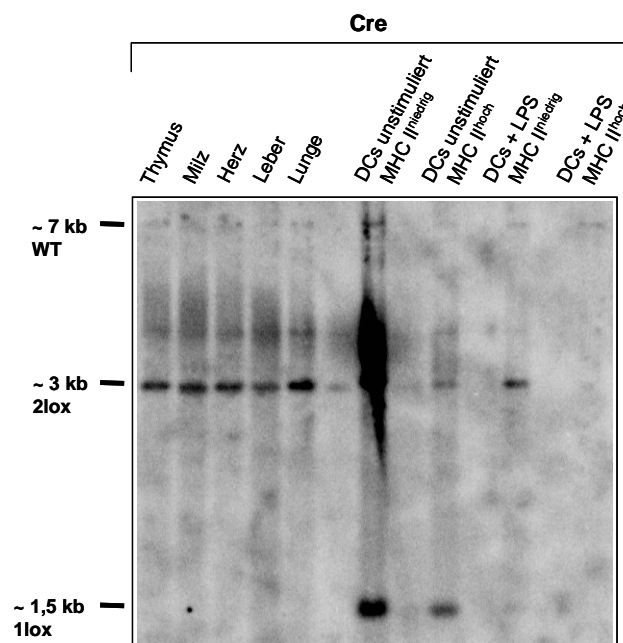


Abb. 3.8: Analyse der Spezifität der Deletion von NEMO (Southern Blot). Um einen Southern Blot durchzuführen, wurde DNS aus verschiedenen Organen (Thymus, Milz, Herz, Leber, Lunge) von KO-Tieren extrahiert. Daneben wurden BM-DCs aus Knochenmarksvorläuferzellen von KO-Tieren gewonnen und am Tag 6 abgeerntet. Die CD11c⁺ MHC II^{hoch} bzw. CD11c⁺ MHC II^{niedrig} Zellen wurden durchflusszytometrisch (MOFLO) angereichert. Ein Teil der Zellen wurde vor der Analyse für 12 h mit LPS stimuliert.

Um zu untersuchen, welches Verfahren zum Anreichern bzw. zum Abgrenzen der CCL17⁺ DCs gegenüber den CCL17⁻ DCs zur stärksten NEMO-Deletion führt, wurden Western Blot Analysen durchgeführt.

Zunächst wurden BM-DCs von homozygot gefloxten Ktrl.-und KO-Tieren am Tag 6 der Kultur nur abgeschabt und CD11c⁺ BM-DCs wurden mit Hilfe der MACS[®]-Technologie angereichert. Die exakteste Methode, eine bestimmte Zellpopulation

anzureichern, besteht darin, die gewünschte Gruppe nach der Expression mehrerer charakteristischer Oberflächenmarker durchflusszytometrisch zu sortieren (MOFLO). Die dritte Gruppe, deren NEMO-Deletionseffizienz untersucht wurde, stellte folglich Zellen dar, die aufgrund des Oberflächenmarker-Expressionsmuster $CD11c^+CD11b^+CD8^-Gr-1^-$ durchflusszytometrisch sortiert wurden.

Die anzureichernde Zellkultur wurde mit verschiedenen Stimuli (LPS; 100 ng/ml, CpG; 20 nmol/ml) für die angegebenen Zeitpunkte stimuliert. Von den nun auf verschiedene Art und Weise erhaltenen Zellpopulationen wurden die Proteine wie in 2.8.6 beschrieben isoliert und der Proteingehalt bestimmt. Um nicht nur eine qualitative, sondern auch eine quantitative Aussage bzgl. der Menge des detektierten NEMO-Proteins treffen zu können, wurde in allen Blots eine einheitliche Proteinmenge wie angegeben (22,5 µg bzw. 12,5 µg) eingesetzt. In Fällen, wo keine Angaben gemacht wurden, wurden 22,5 µg Gesamtprotein eingesetzt.

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung des Gesamtproteins wurde das Gel auf eine Membran geblottet, welche dann mit einem gegen NEMO gerichteten Antikörper nach Blockung von unspezifischen Bindestellen inkubiert wurde. Nach Zugabe eines anti-Rabbit HRP-gekoppelten sekundären Antikörpers konnte nach Hinzufügen der Pico-Luminol/Enhancer Lösung (s. 2.6.10) und Belichtung eines Röntgenfilms das Protein NEMO mit einer Größe von 48 kDa visualisiert werden. Um zusätzlich die Menge an aufgetragenem Gesamtprotein zu überprüfen, wurde die Membran in einem zweiten Schritt mit einem anti-β-Aktin-Ak inkubiert. Das molekulare Gewicht dieses ubiquitären Proteins liegt ebenfalls bei 48 kDa.

In Abb. 3.9.a-c ist die Effizienz der NEMO-Deletion in nicht-angereicherten und MOFLO- bzw. MACS-angereicherten BM-DCs zu sehen. Falls die BM-DCs nur von der Kulturschale abgeschabt werden (3.9.a), ist nach 12 h LPS-Stimulation eine geringe Deletion von NEMO in den KO-Zellen im Vergleich zu den Ktrl.-Zellen zu erkennen; in der Population der unstimulierten BM-DCs hingegen ist nahezu keine Reduktion der NEMO-Menge in den KO-Proben im Vergleich zu den Ktrl.-Proben zu sehen. Wenn die BM-DCs jedoch auf die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle der $CCL17^+$ DCs hin durchflusszytometrisch (MOFLO) gesortet werden ($CD11c^+CD11b^+CD8^-Gr-1^-$; Abb. 3.9.b), erhält man eine Population, deren Reinheit laut Re-Analyse bei ca. 98 % liegt. Innerhalb dieser Zellen kann man eine sehr starke Deletion des Proteins NEMO feststellen. Das Ausmaß der Deletion nach MOFLO-Anreicherung der Zellen liegt in dem Bereich, der nach MACS-Anreicherung (Expression des Oberflächenmarkers

CD11c) der BM-DCs zu sehen ist (3.9.c). Dies lässt sich dadurch erklären, dass die MACS-angereicherten Zellen bereits durch das Abschaben und durch die MACS-Anreicherung vorstimuliert werden, was zu einer Verstärkung der Deletion in der Population der CD11c⁺ Zellen führt. In Abb. 3.9.c wurde auch die Auswirkung der Stimulationsdauer auf die NEMO-Deletion untersucht. Zu diesem Zweck wurde von Zellen Western Blots angefertigt, die nicht bzw. 8 h oder 12 h mit LPS stimuliert wurden. Wie aus Abb. 3.9.c hervorgeht, ist nach 12 h LPS-Stimulation in den KO-Zellen weit weniger NEMO vorhanden als nach 8 h Stimulation.

Wie Alferink et al. zeigen konnten, wird CCL17-Expression in BM-DCs von verschiedenen Stimuli induziert, wobei die höchste CCL17-Expression nach CpG-Stimulation (69 %) zu sehen ist (Alferink et al., 2003). Deshalb wurde im Folgenden (Abb. 3.9.d) die Deletionseffizienz nach LPS- bzw. CpG-Stimulation verglichen: Die Zellen wurden am Tag 6 der Kultur abgeschabt, MACS-angereichert (CD11c⁺) und für 12 h mit LPS bzw. CpG stimuliert. Wie der Western Blot zeigt, besteht bzgl. der vermittelten Deletionseffizienz der beiden Stimuli kein wesentlicher Unterschied; die Zellen, die mit LPS stimuliert wurden, scheinen eine minimal bessere NEMO-Deletion aufzuweisen als die CpG-stimulierten DCs.

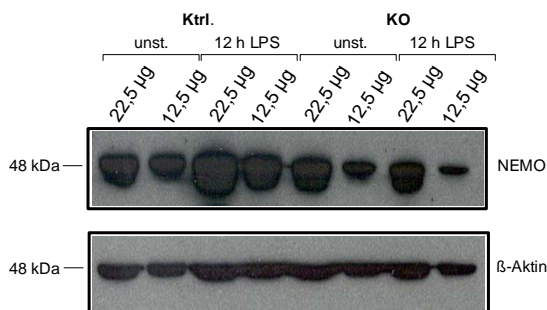
Da der NF- κ B Regulator NEMO auf dem x-Chromosom lokalisiert ist (Jin and Jeang, 1999) und sich deshalb die Deletionseffizienz in BM-DCs aus männlichen und weiblichen Tieren unterscheiden könnte, wurde im nächsten Western Blot die Deletionseffizienz in BM-DCs aus weiblichen und aus männlichen Mäusen nach MACS-Anreicherung miteinander verglichen. Wie aus Abb. 3.9.e ersichtlich wird, findet in den aus weiblichen Tieren gewonnenen KO-Zellen eine deutliche Reduktion von NEMO statt, wohingegen in den aus den männlichen Tieren gewonnenen BM-DCs nur eine relativ geringe Abnahme an NEMO-Protein in den KO-Zellen im Vergleich zu den Ktrl.-Zellen zu sehen ist. Dieses unerwartete Ergebnis wird in 3.3 erneut aufgegriffen.

Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass die Deletionseffizienz in der Zellkultur ohne Anreicherungsverfahren wohl aufgrund der Verunreinigung durch CCL17⁺ Zellen (z.B. M Φ) relativ gering ist. Das Ausmaß der Deletion in der Kultur nach MACS- bzw. MOFLO-Sortierung hingegen ist sehr hoch und bzgl. der Effizienz in beiden Anreicherungsverfahren vergleichbar, wobei nach 12 h LPS-Stimulation die größte Deletion beobachtet werden kann.

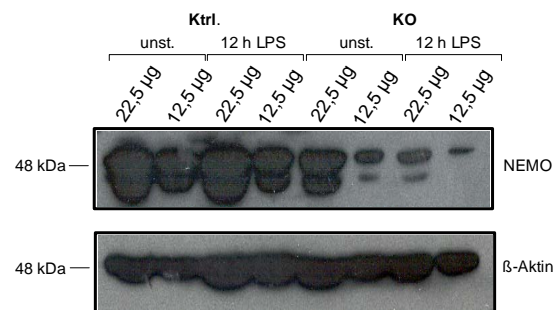
Auffällig ist die scheinbare Widersprüchlichkeit der im Southern Blot und im Western Blot beobachteten Deletion von NEMO: Während im Southern Blot die Deletion mit zunehmender Stimulation nachzulassen scheint, kann man im Western Blot das genaue Gegenteil beobachten: Je länger die Zellen stimuliert werden, umso stärker wird NEMO deletiert. Diese Beobachtung ist darauf zurückzuführen, dass für den Southern Blot die DNS der BM-DCs heterozygoter Mäuse verwendet wurde und im Western Blot die DNS der BM-DCs homozygoter Tiere. Nach zufälliger Inaktivierung eines x-Chromosoms bei den heterozygot geflochten Tieren kann nun -wie im Southern Blot beobachtet- eine Anreicherung der nicht-deletierten BM-DCs stattfinden (wie oben beschrieben), was die scheinbar abnehmende Deletion mit zunehmender Stimulation erklärt. Bei BM-DCs, die aus Weibchen mit homozygot geflochten *nemo* Allelen generiert wurden, kann diese Anreicherung nicht stattfinden; die analysierten Protein-Extrakte stammen folglich aus NEMO-deletierten BM-DCs. Die Ergebnisse der Western Blot Analyse zeigen somit, dass in der Tat mit zunehmender Stimulation eine stärkere Deletion des geflochten *nemo* Allels stattfindet und so weniger NEMO Protein vorhanden ist.

Aufgrund des Ergebnisses der Western-Blot Analysen wurde beschlossen, für die nachfolgenden *in vitro*-Versuche nach Möglichkeit BM-DCs aus weiblichen Tieren zu verwenden, die nach einer MACS-Anreicherung von CD11c⁺ Zellen 12 h oder länger mit LPS stimuliert wurden, um eine maximale Deletion von NEMO zu erhalten.

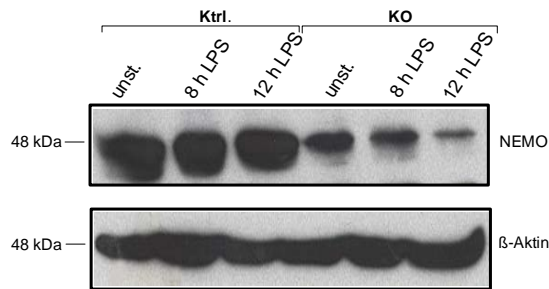
a) keine Anreicherung:



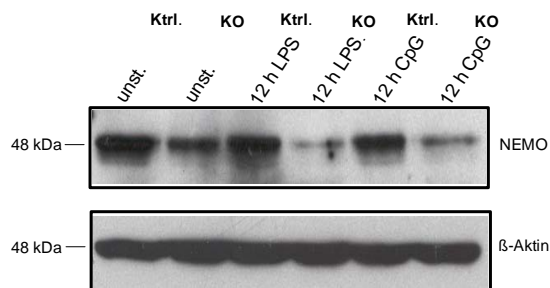
b) MOFLO-Anreicherung:



c)
MACS-Anreicherung:



d) Vergleich LPS/CpG-Stimulation nach
MACS-Anreicherung:



e) Vergleich weibliche/männliche Tiere nach
MACS-Anreicherung:

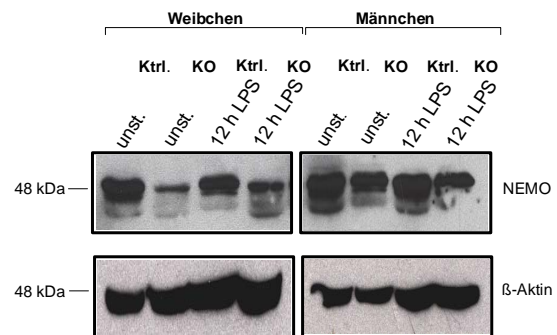


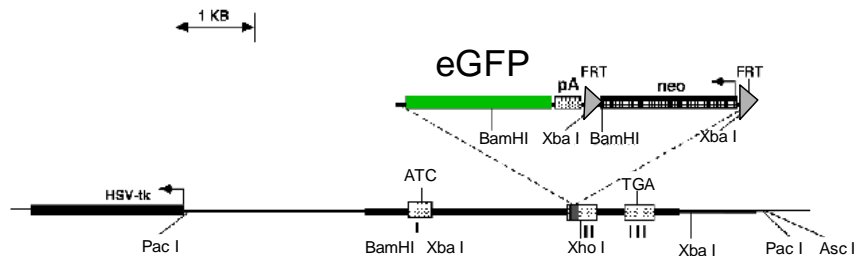
Abb. 3.9: Analyse der NEMO-Deletion a) ohne Anreicherung, b) nach MOFLO-Anreicherung der $CD11c^+CD11b^+CD8^+Gr-1^-$ Zellen, c) nach MACS-Anreicherung der $CD11c^+$ Zellen, d) nach Stimulation mit LPS und CpG und e) nach LPS-Stimulation in männlichen und weiblichen Mäusen.

Analyse von NEMO eGFP Reportertieren

Um die BM-DCs der potentiell NEMO-deletierten Zellen auch visuell (z.B. am FACS-Calibur) bei weiteren *in vitro*-Versuchen darstellen zu können, wurden die CCL17cre NEMO-Tiere mit eGFP („enhanced Green Fluorescent Protein“-)Reportertieren gekreuzt (Alferink et al., 2003). Die eGFP-Reportertiere exprimieren eGFP unter der Kontrolle des CCL17-Promotors, genauso wie die CCL17cre NEMO-Tiere das Enzym Cre-Rekombinase unter der Kontrolle dieses Promotors exprimieren. Eine schematische Darstellung des CCL17eGFP-Targeting Vektors (Alferink et al., 2003) sowie der möglichen Genotypen in der F1 Generation ist in Abb. 3.10.a und b gezeigt: Nach Einkreuzen des Reporters (3.10.a) in die CCL17cre NEMO-Tiere erhält man Nachkommen (3.10.b), die auf einem Allel Cre und zugleich eGFP (Ktrl. weiblich, KO

männlich) oder CCL17 und zugleich eGFP exprimieren (Ktrl. männlich). Da die verpaarten Weibchen homozygot für das gefloxt NEMO-Allel waren, sind alle Nachkommen ebenfalls Träger eines gefloxten Allels.

a)



b)

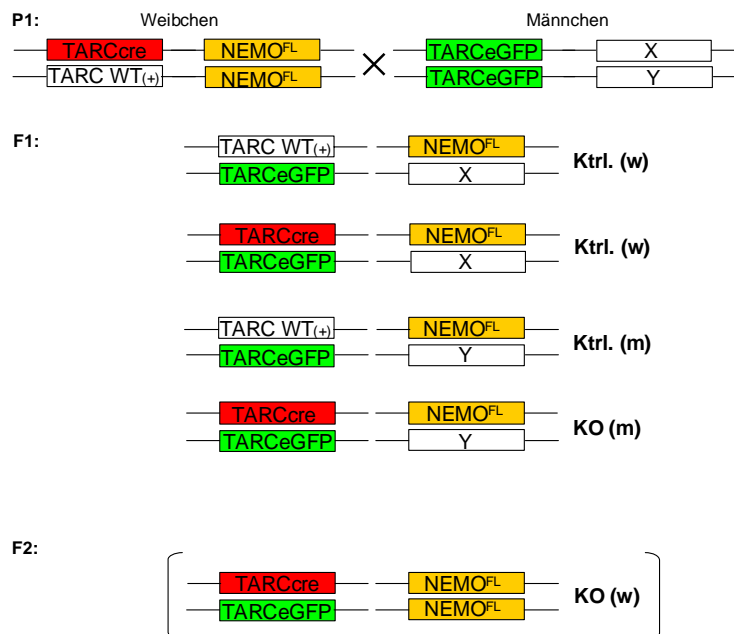


Abb. 3.10: Generierung von NEMO eGFP Reportermäusen. a) Schematische Darstellung des Targeting-Vektors der Reportermäuse (nach (Alferink et al., 2003)); b) Einkreuzen des Reporters in die CCL17cre NEMO Tiere und mögliche resultierende Nachkommen (F1-Generation). Der in Klammern gesetzte Genotyp ist nicht unter den F1-Tieren, sondern wird erst nach weiterer Kreuzung der F1-Generation untereinander erhalten.

Um den Anteil der potentiell deletierten Zellen an der Gesamtpopulation der BM-DCs festzustellen, wurden BM-DCs, die aus dem Knochenmark von NEMO eGFP Reportertieren generiert worden waren (weibliche Ktrl.- und männliche KO-Tiere), am Tag 6 der Kultur entweder nur abgeschabt oder zusätzlich MACS-angereichert. Nach 12

h LPS-Stimulation wurden die Zellen gerettet: Ein Aliquot der BM-DCs wurde einer FACS-Analyse unterzogen (Abb. 3.11.a), aus den restlichen Zellen wurde das Gesamtprotein extrahiert und ein NEMO-Western Blot durchgeführt (Abb. 3.11.b).

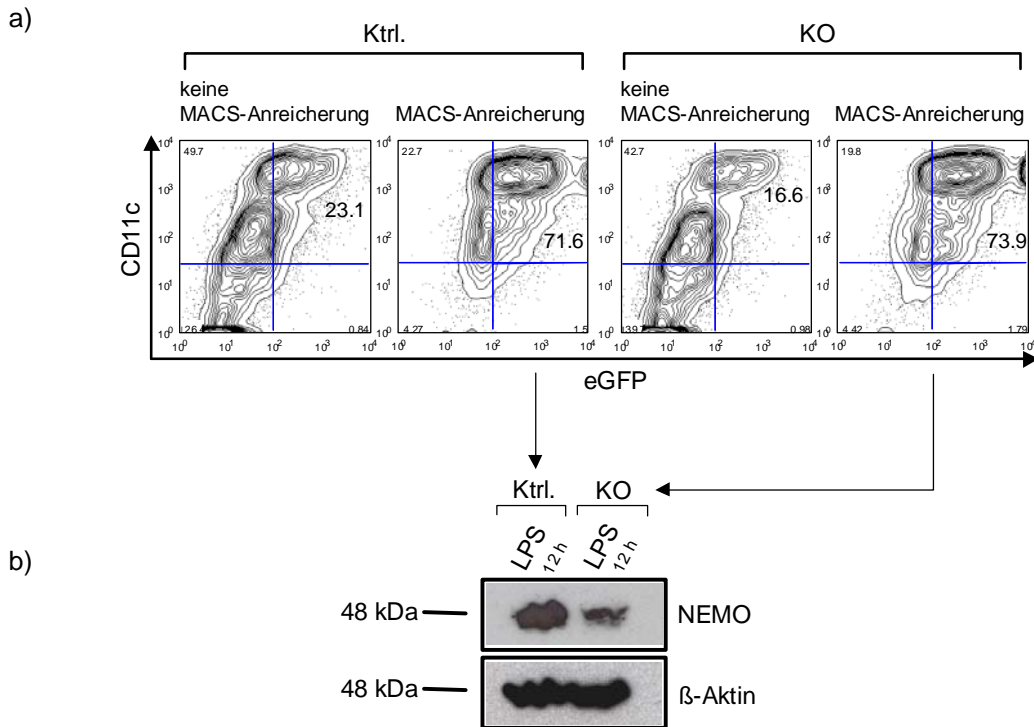


Abb. 3.11: Anteil der eGFP⁺ Zellen an der Gesamtpopulation der BM-DCs und erfolgte NEMO-Deletion in den KO-BM-DCs. a) Anteil der CD11c⁺ eGFP⁺ Zellen an der Gesamtpopulation der BM-DCs ohne bzw. mit MACS-Anreicherung; b) Bestimmung der NEMO-Deletion in den CD11c⁺ eGFP⁺ Zellen mit Hilfe eines Western Blots.

Wie aus Abbildung 3.11 ersichtlich ist, sind über 70 % der MACS-angereicherten, LPS-stimulierten Zellen CD11c⁺ eGFP⁺. In den meisten dieser Zellen findet auch tatsächlich eine NEMO-Deletion statt, wie der Western Blot in Abb. 3.11.b zeigt.

Die Western-Blot Analysen und die Analyse der BM-DCs, die aus den NEMO eGFP Reportertieren generiert wurden, zeigen, dass nach MACS-Anreicherung und zwölfstündiger LPS-Stimulation fast $\frac{3}{4}$ der Zellen *nemo* deletieren. Aus diesem Grund wurden die im Folgenden ausgeführten *in vitro*-Versuche mit Zellen durchgeführt, die genau wie oben beschrieben (MACS-Anreicherung, 12 h LPS-Stimulation) behandelt wurden.

3.2.2 Analyse der APC-Funktion von *NEMO*^{-/-} BM-DCs

Expression von Aktivierungsmarkern

Die Präsentation von Ag durch DCs trägt wesentlich zur Generierung einer Immunantwort bei. So konnte *in vivo* gezeigt werden, dass im Falle einer Blockade der Ag-Präsentation sowohl die humorale als auch die zell-vermittelte Immunantwort abgeschwächt wird: Allergische Encephalomyelitis z.B. lässt sich -zumindest experimentiell- wirkungsvoll durch Verabreichen eines Antikörpers gegen den murinen MHC II-Komplex behandeln; die Blockade der kostimulatorischen Moleküle CD80/CD86 durch ein CTLA4-Fusionsprotein führt zu einer verlängerten Akzeptanz von Transplantaten (Pearson et al., 1996; Smith et al., 1994).

Die Regulation der Expression kostimulatorischer Moleküle ist jedoch nach wie vor umstritten; einige Autoren beschreiben, dass die Ag-Präsentation in murinen und humanen DCs von NF- κ B abhängig ist; insbesondere soll der TF die Expression von MHC II, der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 und die Zytokin-Expression (z.B. IL-12) regulieren. Daneben soll NF- κ B auch die Dauer des DC-T-Zell-Kontakts durch Kontrolle der Expression von Zelladhäsionsmolekülen (LFA-1, ICAM-1, ICAM-3) bestimmen (de Martin et al., 1999; Yoshimura et al., 2003; Yoshimura et al., 2001b). Andere Gruppen wiederum konnten keine NF- κ B-Abhängigkeit der Expression von z.B. MHC II, CD80 oder CD86 sowohl in unstimulierten als auch in LPS-stimulierten BM-DCs aus *p50*^{-/-} *cRel*^{-/-} Mäusen feststellen (Ouaaz et al., 2002).

Anhand von FACS-Analysen habe ich deshalb in unserem Modell untersucht, ob NEMO eine Rolle bei der Expression der Oberflächenmoleküle MHC II, CD80, CD86 und CD40 spielt.

Zum einen wurden für *in vitro*-Versuche weibliche NEMO Ktrl.- und KO-Tiere ohne Reporterfunktion verwendet, da die in Abb. 3.10 in Klammern gezeigten weiblichen KO-NEMO eGFP Reportermäuse noch nicht zur Verfügung standen. Zum anderen wurden NEMO eGFP Reportertiere mit den in Abb. 3.10.b dargestellten Genotypen (Ktrl. weiblich und männlich, KO männlich) verwendet, um am FACS-Calibur die potentiell deletierten Zellen anhand ihrer Grünfluoreszenz von den CCL17 BM-DCs zu unterscheiden.

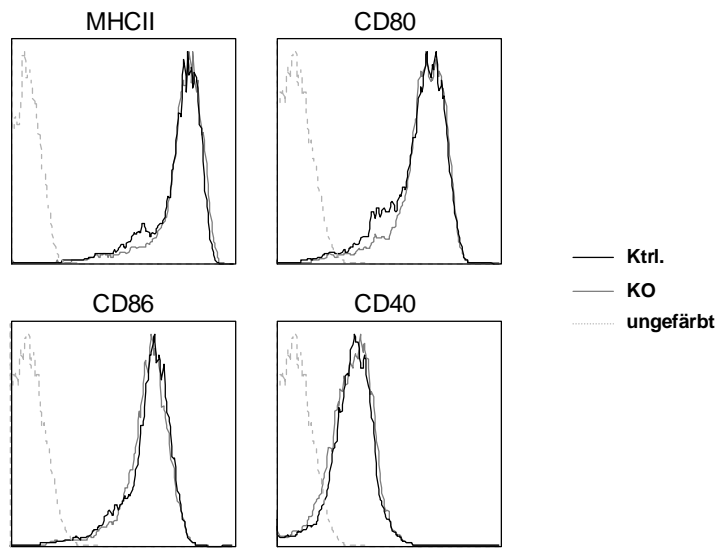
Da am Anfang der Zucht der NEMO eGFP Reportertiere nur wenige Mäuse zur Verfügung standen, wurden für den *in vitro*-Versuch (Abb. 3.12.a) Tiere ohne eGFP Reporter verwendet. Für den *ex vivo*-Versuch (Abb. 3.12.b) dagegen wurden NEMO eGFP Reportertiere eingesetzt.

Zunächst wurden für den *in vitro*-Versuch aus den Ktrl.- und KO-Tieren ohne eGFP Reporter BM-DCs generiert und am Tag 6 erfolgte eine MACS-Anreicherung der CD11c⁺ Zellen. 12 h nach LPS-Stimulation (100 ng/ml) erfolgte eine Färbung der Oberflächenmoleküle MHC II, CD80, CD86 und CD40. Anhand einer durchflusszytometrischen Analyse konnte die Expressionsstärke von diesen Marken auf Ktrl.- und KO-BM-DCs verglichen werden (Abb. 3.12 a). Wie in Abb. 3.12.a zu sehen ist, besteht in LPS-stimulierten Ktrl.- und KO-Tieren bezüglich der Expression dieser Marker kein Unterschied.

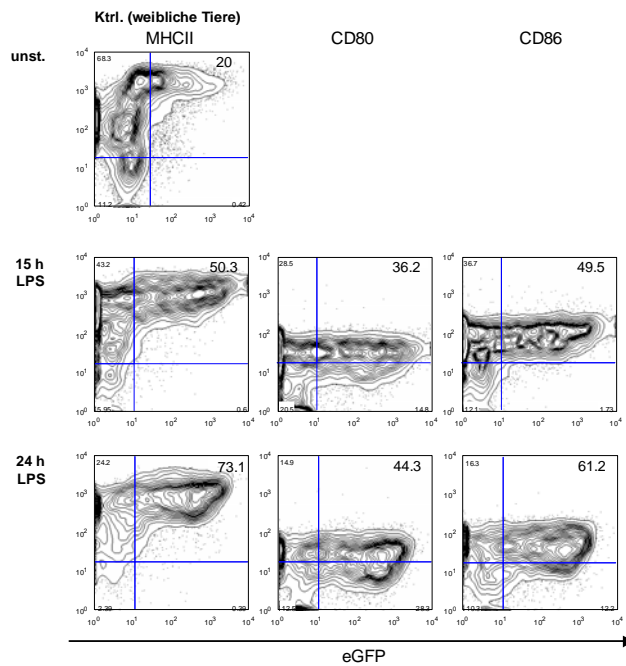
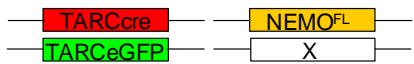
In den *ex vivo*-Versuchen wurden unstimulierten Mäusen oder Tieren, denen 15 h bzw. 24 h zuvor LPS (400 µg LPS bzw. 300 µg LPS) i.p. injiziert wurde, die mesenterialen, poplietalen, axilliären, brachialen und inguinalen LNs entnommen. Nach der Herstellung einer Zellsuspension wurde eine MACS-Anreicherung von CD11c⁺ Zellen durchgeführt und die Oberflächenmoleküle MHC II, CD80 und CD86 wurden mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern markiert. Anschließend wurden die so vorbereiteten Zellen durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 3.12.b-d).

Wie aus Abb. 3.12.b hervorgeht, werden die Aktivierungsmarker MHC II, CD80 und CD86 im Laufe der Stimulationsdauer hochreguliert. 24 h nach LPS-Stimulation hat die Expression der Oberflächenmarker ein Maximum erreicht. Abb. 3.12.c und d zeigen die FACS-Analysen von männlichen Ktrl. (3.12.c)- und KO (3.12.d)-Tieren. Auch hier ist zu sehen, dass die Expression von MHC II, CD80 und CD86 mit zunehmender Stimulationsdauer hochreguliert wird. Im Gegensatz zur Ktrl.-Population der weiblichen Tiere ist allerdings nach 15 h LPS-Gabe ein Maximum erreicht. Ein Unterschied bezüglich der Oberflächenmarker-Expression ist bei den männlichen Ktrl.- und KO-Tieren nicht zu sehen. Auffallend hingegen ist, dass die Expression von MHC II, CD80 und CD86 in den CCL17⁺ DCs der männlichen KO-Tiere (3.12.d) im Vergleich zu der Oberflächenmarker-Expression in den CCL17⁺ DCs der weiblichen Ktrl.-Tiere (3.12.b) nach 24 h LPS-Stimulation deutlich niedriger ist. Ob dieser *ex vivo* beobachtete Unterschied in der Expression der Aktivierungsmarker auf die NEMO-Deletion in den CCL17⁺ DCs zurückzuführen ist, oder dieser Beobachtung ein geschlechtsspezifischer Hintergrund zugrunde liegt, wird in 3.3 näher untersucht.

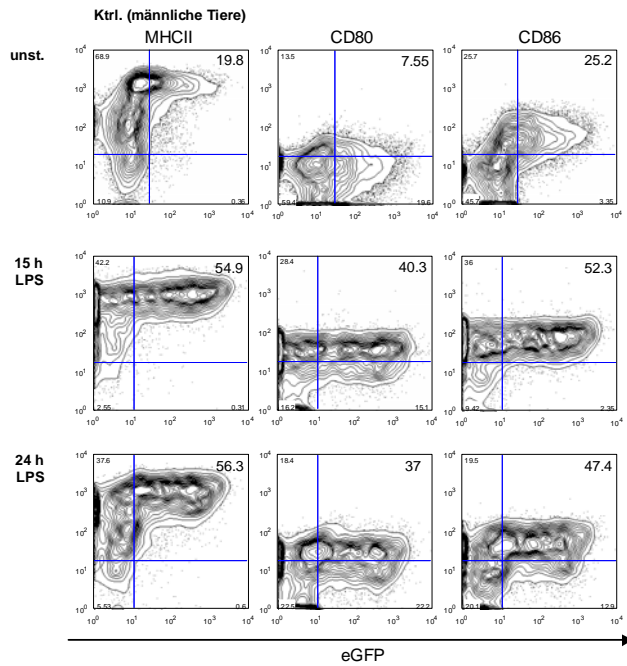
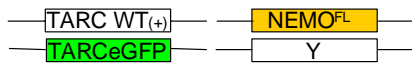
a) Ktrl.- und KO-BM-DCs, 12 h mit LPS stimuliert:



b)



c)



d)

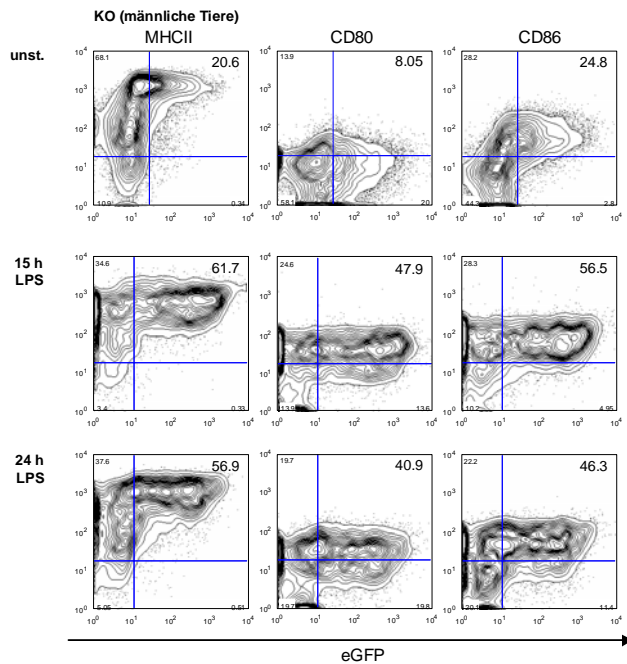
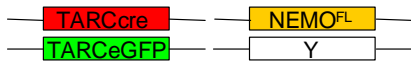


Abb. 3.12: Expression der Aktivierungsmarker MHC II, CD80, CD86. a) Für die *in vitro*-Versuche wurden die CD11c⁺ BM-DCs am Tag 6 der Kultur MACS-angereichert, 12 h mit LPS (100 ng/ml) stimuliert, mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern für MHC II, CD80 und CD86 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. b) Für die *ex-vivo*-Versuche wurden die Tiere für die angegebenen Zeitpunkte mit LPS stimuliert (i.p.-Injektion). Danach erfolgte die Entnahme der mesenterialen, poplietalen, axillären, brachialen und inguinalen LNs. Aus der Zellsuspension wurden die CD11c⁺ Zellen MACS-angereichert, mit Antikörpern markiert und am FACS-Calibur analysiert. (Die Färbungen wurden mit je 2 Tieren pro Gruppe durchgeführt.)

Ag-spezifische T-Zellproliferation

Eine weitere wichtige Aufgabe der DCs liegt darin, im Falle einer Infektion naive T-Zellen über die Expression von kostimulatorischen Molekülen wie z.B CD80 und CD86 zu aktivieren und die primäre Immunantwort zu induzieren. Wie bereits in Abschnitt 3.1.3 beschrieben, durchlaufen die aktivierten T-Zellen mehrere Proliferationsrunden, an deren Ende eine Vielzahl von T-Effektorzellen stehen. Die durch die DCs vermittelte Proliferation der T-Zellen kann durch die Zugabe von [³H]-Thymidin zum Kulturmedium detektiert werden: Bei jeder Proliferationsrunde wird erneut [³H]-Thymidin in die DNS eingebaut und kann mit Hilfe eines β -Counters bestimmt werden. Um zu untersuchen, ob die NEMO-deletierten DCs in der Lage sind, naive T-Zellen zur Proliferation anzuregen, wurden sog. *in vitro*-T-Zellproliferationsassays durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden MACS-angereicherte CD11c⁺ Zellen von Ktrl.- und KO-Tieren 12 h mit LPS stimuliert, um eine maximale Deletion von NEMO zu erreichen. Zusätzlich wurde huCrP in verschiedenen Konzentrationen (10 μ g/ml, 5 μ g/ml, 1 μ g/ml, 0,2 μ g/ml) zu der Kultur gegeben, welches die DCs prozessieren und präsentieren sollten. Diese DCs wurden dann zusammen mit Dep tg T-Zellen, die für huCrP spezifisch sind (Doffinger et al., 1997), und verschiedenen Konzentrationen an huCrP (10 μ g/ml, 5 μ g/ml, 1 μ g/ml, 0,2 μ g/ml) in 96-well-Rundbodenplatten ausgesät. Nach 48 h wurden die Zellen für weitere 16-18 h mit [³H]-Thymidin markiert und im Anschluss daran die T-Zell-Proliferation detektiert.

Wie aus Abb. 3.13 ersichtlich ist, kann man nach einer Zugabe von 10 μ g/ml huCrP zwischen den CD11c⁺ Ktrl.- und KO-BM-DCs eine Differenz in der Stärke der T-Zellproliferation erkennen; da diese aber so gering ist und bei den restlichen CrP-Konzentrationen kein Proliferationsunterschied besteht, kann man festhalten, dass hinsichtlich der Proliferation der Dep tg T-Zellen, die mit huCrP gepulsten Ktrl.- oder KO-DCs stimuliert wurden, kein Unterschied besteht. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Ag-Prozessierung und -Präsentation in CCL17⁺ BM-DCs durch die fehlende regulatorische Untereinheit NEMO nicht betroffen ist.

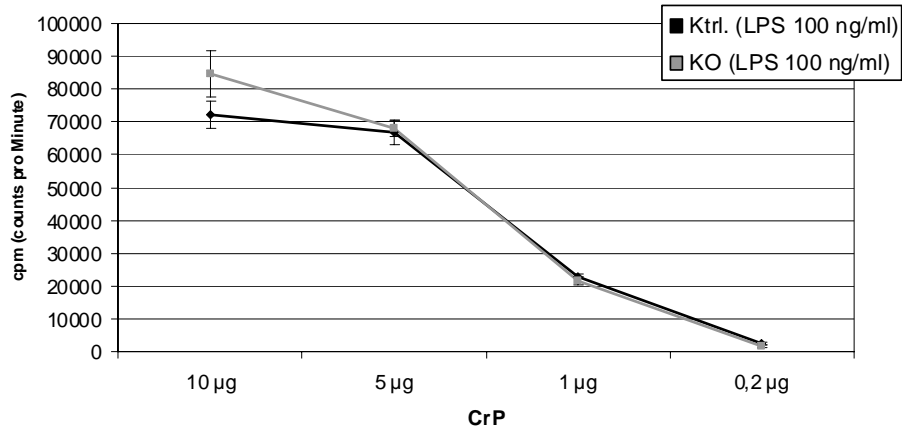


Abb. 3.13: Induktion einer Ag-spezifischen T-Zellproliferation. BM-DCs von Ktrl.- und KO-Tieren wurden nach 12 h LPS-Stimulation und CrP-Zugabe in 96-well Platten ausgesät und mit T-Zellen aus syngenem Dep tg Mäusen für 48 h kokultiviert. Während der nächsten 16-18 h wurden die Zellen mit [³H]-Thymidin markiert und im Anschluss daran die T-Zellproliferation anhand des Einbaus des radioaktiven Thymidins in die DNS detektiert. (Der Versuch wurde dreimal mit je zwei Tieren pro Gruppe durchgeführt. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis.)

Induktion einer CTL-Antwort

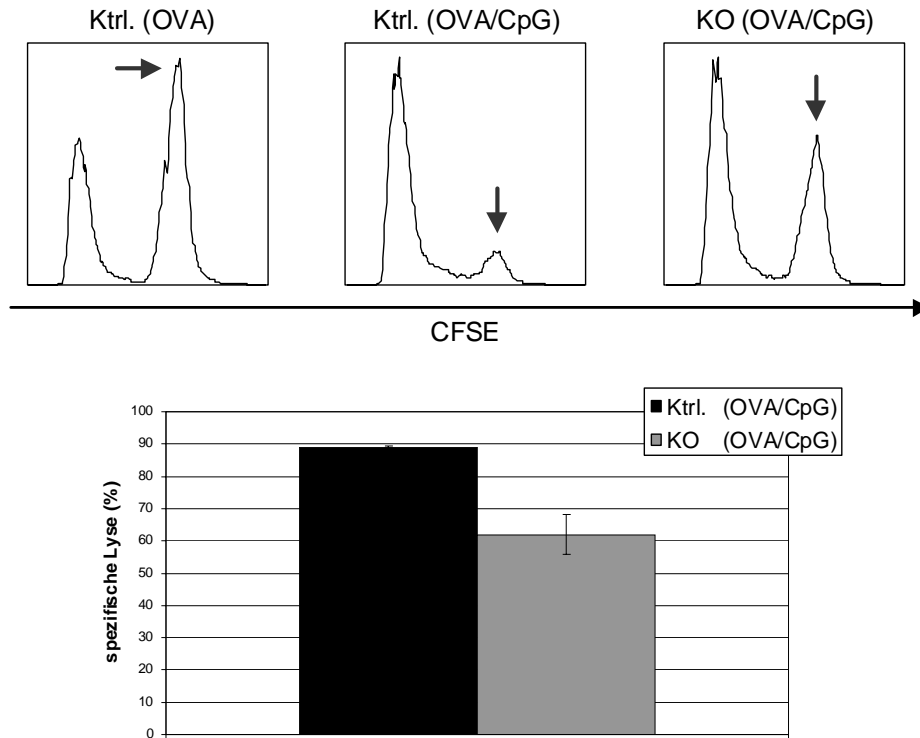
Eine weitere wichtige Aufgabe der DCs liegt in der Induktion einer zytotoxischen T-Zell (CTL)-Antwort: Aktivierte CD4⁺ T_H-Zellen treten über CD40/CD40L-Interaktion mit DCs in Kontakt und befähigen diese, CD8⁺ CTL, die über einen MHC I/TCR-Kontakt an die selbe DC gebunden sind, zu aktivieren. Die aktivierten CTL sind nun in der Lage, ihre Effektor-Funktion auszuführen und in MHC I/Peptid-exprimierenden Zielzellen wie z.B. Tumorzellen oder virusinfizierten Zellen Apoptose zu induzieren. Wichtige Mediatoren bei der Aktivierung einer CTL-Antwort sind die durch den Kontakt zu der CD4⁺ T_H-Zelle hochregulierten kostimulatorischen Moleküle CD80/CD86 sowie IL-2 und IL-12 (Wiethe et al., 2003). Eine weitere prominente Rolle wurde der Aktivierung der DC über die Ligation von CD40 durch CD40L, exprimiert von der aktivierten CD4⁺ T_H-Zelle, zugesprochen (Behrens et al., 2004). Essentiell für die Induktion einer CTL-Antwort ist folglich eine vollständig maturierte und aktivierte DC. Da NF-κB eine wichtige Rolle bei der Maturierung und Aktivierung von DCs zu spielen scheint, wurde im Folgenden untersucht, ob NEMO-defizienten BM-DCs in der

Lage sind, funktionsfähige CTL zu generieren. Zu diesem Zweck wurden sog. CTL-Assays durchgeführt.

Am Tag 0 wurden Ktrl.- und KO-Tiere subkutan an der Schwanzbasis mit einem OVA/CpG-Gemisch bzw. mit OVA alleine immunisiert. Am Tag 7 wurde aus der Milz und aus den mLNs normaler C57BL/6 Mäuse eine Zellsuspension hergestellt, welche mit dem MHC I-restringierten OVA-Peptid SIINFEKL gepulst und mit CFSE in verschiedenen Konzentrationen markiert wurde. Die so behandelten Zielzellen wurden den immunisierten Ktrl.- und KO-Mäusen i.v. gespritzt. Nach 6 h wurde jeweils die Milz entnommen, eine Zellsuspension hergestellt und die so erhaltenen Zellen mit EMA gefärbt, um tote Zellen auszuschließen. Mit Hilfe einer durchflusszytometrischen Analyse kann man nach der in 2.8.6 angegebenen Formel die durch die gebildeten CTLs vermittelte spezifische Lyse der Zielzellen berechnen und so Rückschlüsse bezüglich der Fähigkeit NEMO-defizienter BM-DCs, CTLs zu aktivieren, ziehen.

Wie in Abb. 3.14.a zu sehen ist, zeigen die mit OVA/CpG immunisierten KO-Mäuse eine reproduzierbare, signifikant geringere spezifische Lyse der Zielzellen als die immunisierten Ktrl.-Tiere. Der Unterschied in der Lyse ist jedoch mit ca. 28 % relativ gering. Diese nur geringe Abnahme stimmt mit der Beobachtung überein, dass die NEMO-defizienten BM-DCs kostimulatorische Moleküle wie CD80, CD86 sowie MHC II und CD40 in unstimuliertem Zustand und nach 15 h bzw. 12 h (CD40) LPS-Stimulation im gleichen Ausmaß exprimieren wie Ktrl.-BM-DCs. Da das von DCs exprimierte CD40 über die Interaktion mit CD40L (auf CD4⁺ T_H-Zellen) eine herausragende Stellung in der Induzierung von CTL-Antworten inne hat (Behrens et al., 2004), wurde die Expression dieses Oberflächenmoleküls nochmal genauer analysiert (Abb. 3.14.b): 24 h nach Immunisierung von Ktrl.- und KO-Tieren mit OVA (300 µg)/CpG (5 nmol) wurden die LN (mesenterial, axilliär, brachial, inguinal) entnommen und eine Zellsuspension angefertigt. Anschließend wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten Ak für CD8α, CD11c und CD40 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 3.14.b). Dargestellt sind die CD11c⁺ und die CD40⁺ Zellen innerhalb der CD8α⁻ Population. Der Anteil der CD11c⁺CD40⁺ DCs mit 3,98 % (Ktrl.) bzw. 3,39 % (KO) unterscheidet sich nicht signifikant. Somit wurde gezeigt, dass -zumindest in diesem experimentiellen Ansatz- kein Unterschied bzgl. der CD40-Expression besteht und somit andere Faktoren für die reduzierte CTL-Antwort in den KO-Tieren verantwortlich sein müssen.

a)



b)

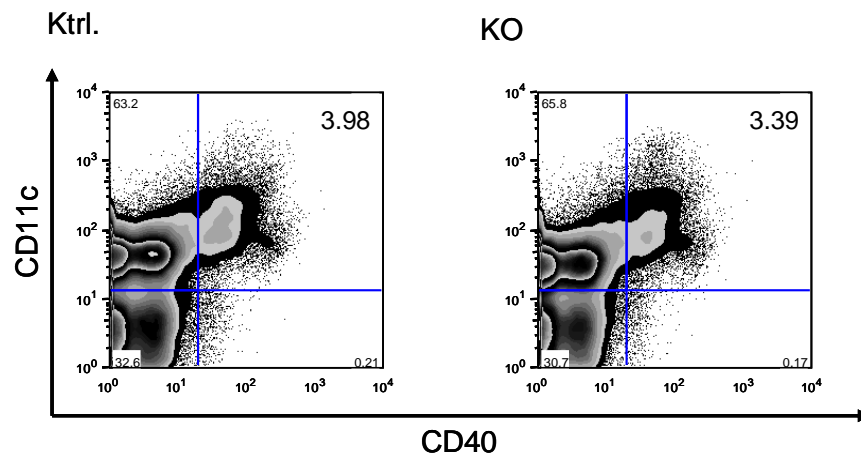
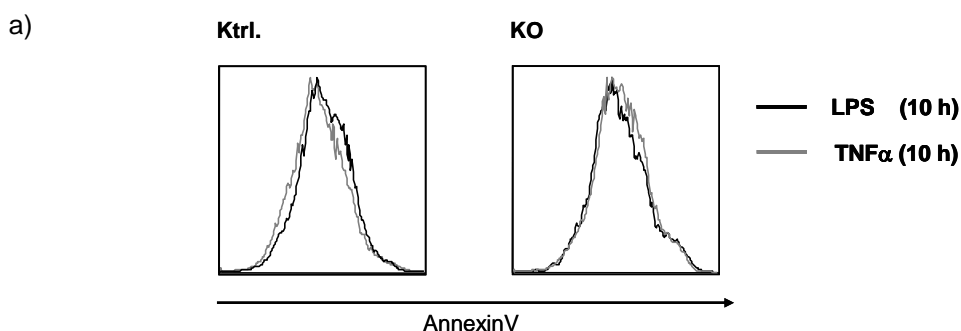


Abb. 3.14: Spezifische Lyse der Zielzellen durch CTLs, die von Ktrl.- und KO-Tieren nach OVA/CpG-Immunsierung gebildet wurden. Die CTLs der Ktrl.-Tiere töteten mehr SIINFEKL-gepulste, mit CFSE markierte Zielzellen als die CTLs der KO-Tiere (a, Pfeil und Diagramm). Am Tag 7 wurden Ktrl.- und KO-Tieren SIINFEKL-gepulste, CFSE-markierte Zielzellen i.v. gespritzt. Nach 6 h wurde jeweils die Milz der Ktrl.- und KO-Tiere entnommen, eine Zellsuspension hergestellt und durchflusszytometrisch analysiert. Das obere Bild zeigt die Population der CFSE-markierten Zielzellen der Milz 6 h nach i.v.-Injektion der nur mit OVA immunisierten Tiere (links) und der OVA/CpG-immunisierten Ktrl. (Mitte)- und KO-Tiere (rechts). In der unteren Grafik von a) ist die spezifische Lyse der Zielzellen in Ktrl.- und KO-Tieren dargestellt. b) OVA (300 µg)/CpG (5 nmol)-immunisierten Ktrl.- und KO-Mäusen wurden nach 12 h Stimulation die LN (mesenterial, axillär, brachial, inguinal) entnommen, jeweils gepoolt, eine Zellsuspension angefertigt und eine FACS-Färbung durchgeführt. Im Quadranten rechts oben ist der Anteil der CD11c⁺CD40⁺ Zellen an der CD8α⁺ Population zu sehen. (Der CTL-Assay wurde viermal mit mind. 2 Tieren pro Gruppe durchgeführt, die Färbung in b) einmal mit je 2 Tieren pro Gruppe.)

3.2.3 Überleben der $NEMO^{-/-}$ DCs nach Stimulation mit LPS und $\alpha CD40$

Wie bereits in der Einleitung und in 3.1.4 dargestellt, spielt NF- κ B eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von pro- und antiapoptotischen Ereignissen. In den folgenden Versuchen wurde untersucht, welchen Einfluss NEMO auf das Überleben von BM-DCs hat. Dabei wurden zwei verschiedene DC/NF- κ B-Aktivierungswege ausgewählt: Zuerst wurden die BM-DCs mit LPS und somit über den TLR-vermittelten Weg aktiviert, danach wurden die BM-DCs durch Zugabe eines CD40-Ak über den TNF-medierten Signalweg aktiviert. Diese Stimulationswege führen letztendlich beide zur Expression von antiapoptotischen Proteinen, die ein verlängertes Überleben der betroffenen Zellen bewirken (Caamano and Hunter, 2002; Wong et al., 1997).

Besonders nach Stimulation mit TNF α zeigen Zellen mit einem NF- κ B-Defekt erhöhte Sensitivität gegenüber Apoptose (Beg et al., 1995b; Li et al., 1999b; Tanaka et al., 1999). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die NEMO-defizienten BM-DCs mit LPS, CpG und TNF α für verschiedene Zeitpunkte stimuliert und anschließend mit PI/AnnexinV-Färbung auf das Vorhandensein von nekrotische bzw. apoptotische Zellen untersucht. Erste Analysen ergaben, dass kein signifikanter Unterschied nach AnnexinV-Färbung bzgl. der apoptotischen (AnnexinV⁺) Zellen nach Stimulation mit LPS und TNF α auftrat (Abb. 3.15.a). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Zellen vor der eigentlichen Zugabe der Stimuli bereits durch das Abschaben und durch die MACS-Anreicherung der CD11c⁺ Zellen vorstimuliert wurden. Da also kein Unterschied bzgl. der AnnexinV⁺ Zellen nach LPS- bzw. TNF α -Stimulation zu sehen war und nach LPS-Stimulation -wie im Western Blot gezeigt- die Deletion besonders hoch war, wurden die weiteren Versuche mit nur einem Stimulus, nämlich LPS, durchgeführt.



b)

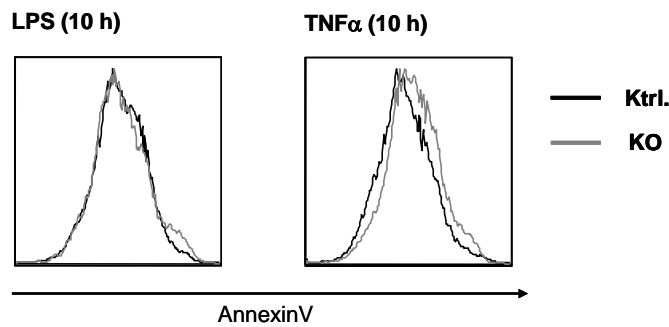


Abb: 3.15: AnnexinV⁺-Färbung von BM-DCs nach Stimulation mit LPS und TNF α . BM-DCs aus Ktrl.- und KO-Tieren wurden am Tag 6 nach MACS-Anreicherung der CD11c⁺ Zellen für 10 h mit LPS oder TNF α stimuliert. Die Identifizierung der apoptotischen Zellen erfolgte durch Färbung mit AnnexinV. Abbildung a) zeigt den Vergleich von Ktrl. (linkes Bild)- bzw. KO (rechtes Bild)-Zellen, die mit LPS und TNF α stimuliert wurden, Abbildung b) zeigt den Vergleich zwischen Ktrl.- und KO-Zellen, die einmal mit LPS (linkes Bild) und einmal mit TNF α (rechtes Bild) stimuliert wurden.

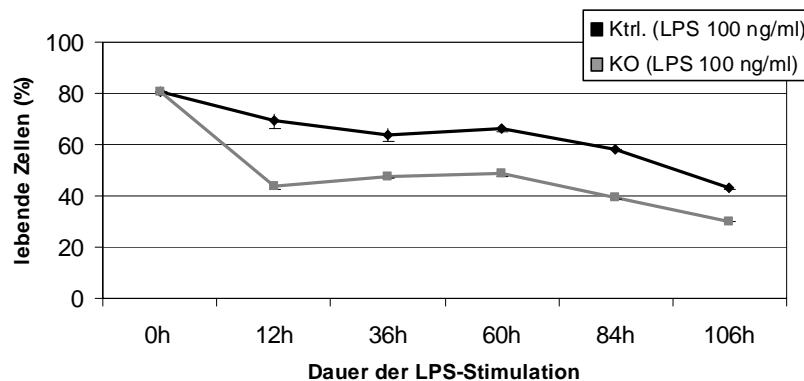
Stimulation mit LPS

Von Ktrl.- und KO-Tieren gewonnene, am Tag 6 MACS-angereicherte CD11c⁺ BM-DCs wurden nach der Anreicherung erneut ausgesät, um die Zellen für eine bestimmte Dauer mit LPS zu stimulieren. Da der zur Differenzierung von BM-DCs aus hämatopoietischen Vorläuferzellen verwendete Wachstumsfaktor GM-CSF das Überleben von myeloiden DCs durch die Hochregulation von *mcl-1*, einem der *bcl-2*-Familie zugehörigem Protein, positiv beeinflusst (Woltman et al., 2003), wurden die bereits ausdifferenzierten Zellen ab dem 6. Tag der Kultur (nach der MACS-Anreicherung) in RPMI-Medium ohne GM-CSF-Zusatz kultiviert und mit LPS stimuliert. Nach 12 h, 36 h, 60 h, 84 h und 106 h wurden die BM-DCs abgeerntet und mit AnnexinV/PJ doppelgefärbt. Der Anteil der lebenden Zellen ergibt sich aus dem Anteil der doppeltnegativen Zellen an der Gesamtpopulation. Zusätzlich zu der Analyse der Zellen am FACS-Calibur wurde jeweils ein Aliquot der Zellsuspension mit Trypanblau gefärbt: Der Farbstoff lagert sich unspezifisch in tote Zellen ein und färbt sie dunkel an. Im Lichtmikroskop kann man die toten Zellen anhand dieser Färbung leicht von den lebenden, hell leuchtenden Zellen unterscheiden.

Wie aus Abb. 3.16.a hervorgeht, ist der Anteil der lebenden Zellen in der Ktrl.- und der KO-Zellkultur im unstimulierten Zustand mit ca. 80 % gleich. Nach 12 h LPS-Stimulation jedoch ist bereits ein deutlicher Unterschied zu erkennen: Der Anteil der doppeltnegativen, lebenden Ktrl.-BM-DCs beträgt immer noch 69,2 %, wohingegen der

Anteil der lebenden KO-BM-DCs auf 43,7 % gesunken ist. Dieser Unterschied bezüglich des Anteils der lebenden Zellen in der Kultur ist auch nach 36 h, 60 h, 80 h und 106 h Stimulationsdauer zu sehen. Auch die Auszählung der lebenden Zellen unter dem Lichtmikroskop bestätigt das Ergebnis der FACS-Analyse (Abb. 3.16.b): Nach LPS-Stimulation sind jeweils weniger vitale KO-Zellen in der Kultur als Ktrl.-BM-DCs. Auffällig ist der Anstieg des Anteils der lebenden Zellen, der nach 12 h (KO) bzw. nach 36 h (Ktrl.) in der FACS-Analyse bzw. nach 36 h (Ktrl. und KO) in der Trypanblau-Färbung sichtbar ist. Diese Beobachtung könnte darauf zurückzuführen sein, dass die in der Population vorhandenen nicht-deletierten Zellen noch weiter proliferieren.

a)



b)

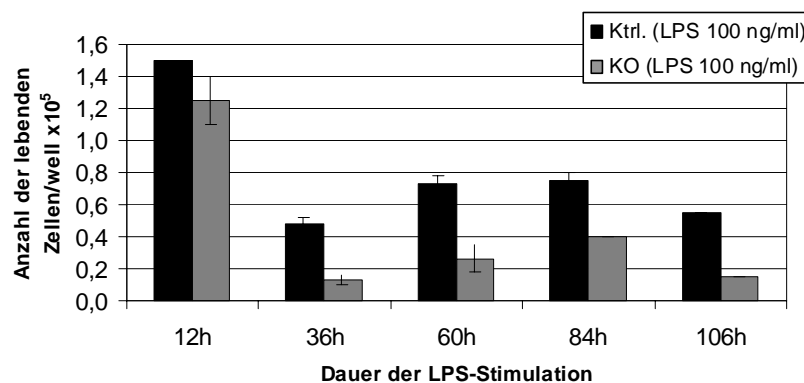


Abb. 3.16: Anteil der lebenden Zellen an der Gesamtpopulation nach Stimulation mit LPS. Am Tag 6 der Kultur wurden die CD11c⁺ Ktrl.- bzw. KO-BM-DCs MACS-angereichert und für die angegebenen Zeitpunkte mit LPS (100 ng/ml) stimuliert. Ein Teil der Zellen wurde mit AnnexinV/PJ markiert (a), der andere Teil der Zellen wurde mit Trypanblau gefärbt (b). Der Anteil der lebenden Zellen an der Gesamtpopulation konnte dann mit Hilfe des FACS-Caliburs bzw. mit einer lichtmikroskopischen Analyse ermittelt werden. (Versuch a) wurde viermal mit mind. 2 Tieren pro Gruppe durchgeführt; Versuch b) wurde zweimal mit je 2 Tieren pro Gruppe durchgeführt.)

Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass die KO-BM-DCs nach Stimulation mit LPS schneller sterben als die Ktrl.-BM-DCs, was sowohl durch durchflusszytometrische Analyse (AnnexinV/PJ-Färbung) als auch durch Auszählen der lebenden Zellen unter dem Lichtmikroskop (Trypanblau-Färbung) gezeigt werden konnte. Da NEMO für eine Stimulus-abhängige Aktivierung von NF- κ B und einer damit einhergehenden Expression der Zielgene unabkömmlich ist, könnte das schnellere Absterben der KO-BM-DCs auf eine aufgrund der NEMO-Deletion nicht erfolgte Expression der antiapoptischen Gene zurückzuführen sein (Rudolph et al., 2000).

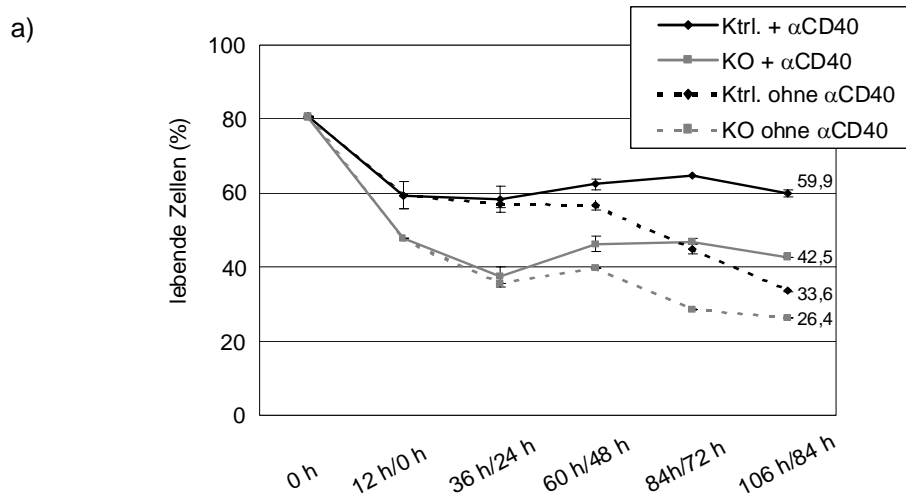
Stimulation mit α CD40

Ein wichtiger Überlebensfaktor für mature DCs ist das von aktivierten, maturaen T-Zellen exprimierte Oberflächenmolekül CD40L: Nach der Bindung von CD40L an das von DCs exprimierte kostimulatorische Molekül CD40 erfolgt über die Aktivierung von NF- κ B eine Expression des antiapoptischen Proteins Bcl-x_L und führt zu einem längeren Überleben dieser DCs (Josien et al., 2000; Ouaz et al., 2002; Wong et al., 1997). Um zu analysieren, ob die NEMO-defizienten BM-DCs im Vergleich zu den Ktrl.-BM-DCs ein verändertes Überleben nach α CD40-Stimulation zeigen, wurden wiederum Überlebens-Assays durchgeführt.

Genau wie bei der Stimulation mit LPS beschrieben, wurden die CD11c⁺ Zellen für diesen Versuch zunächst MACS-angereichert und dann in komplettem RPMI-Medium ohne GM-CSF-Zusatz für 12 h, 36 h, 60 h, 84 h und 106 h mit α CD40 (20 ng/ml) stimuliert. Der Anteil der lebenden Zellen an der Gesamtpopulation wurde einerseits nach Färbung der Zellen mit AnnexinV/PJ durchflusszytometrisch (Abb. 3.17.a) und andererseits unter dem Lichtmikroskop nach Ausschluss der toten Zellen mit Trypanblau bestimmt (Abb. 3.17.b). In den Abb. 3.17.a und b sind auf der Zeitachse jeweils zwei Zeitpunkte angegeben; die erste Angabe bezeichnet die Dauer nach der MACS-Anreicherung, der zweite Zeitpunkt steht für die Dauer der α CD40-Stimulation. Abb. 3.17.a zeigt den Anteil der lebenden Zellen an der Gesamtpopulation nach α CD40-Stimulation bzw. ohne Stimulation. 106 h nach MACS-Anreicherung bzw. 84 h nach α CD40-Zugabe ist ein deutlicher Unterschied zwischen den Ktrl.- und den KO-Zellen zu sehen: Der Anteil der lebenden Zellen ohne α CD40-Zugabe ist in der Ktrl.- bzw. der KO-Zellkultur mit 33,6 % bzw. 26,4 % relativ gleich. In den Kulturen

allerdings, zu denen α CD40 zugegeben wurde, ist ein deutlicher Unterschied zu sehen: In der Ktrl.-Kultur befinden sich 59,9 % lebende Zellen, in der KO-Kultur hingegen nur 42,5 %. Dieses Ergebnis konnte durch die lichtmikroskopische Auszählung der lebenden Zellen in den jeweiligen Kulturen zu den angegebenen Zeitpunkten bestätigt werden (Abb. 3.17.b): Zu Beginn des Experiments, 12 h nach MACS-Anreicherung der CD11c⁺ Zellen bzw. unmittelbar vor der Zugabe von α CD40 (12 h/0 h), sind bezüglich der Anzahl der lebenden Zellen in der Ktrl.- bzw. der KO-Kultur keine Unterschiede zu erkennen. Im Laufe der Stimulationsdauer jedoch nimmt die Zahl der lebenden KO-Zellen im Vergleich zu der Zahl der lebenden Ktrl.-Zellen deutlich ab; am Ende der Stimulationsdauer kann man $0,7 \times 10^5$ lebende Zellen in der Kultur der Ktrl.-Zellen mit α CD40-Zugabe erkennen, in der KO-Kultur hingegen liegt die Zahl der lebenden Zellen mit Stimulation bei $0,3 \times 10^5$.

Während sich die Ktrl.-BM-DCs nach Stimulation mit α CD40 wieder zu erholen scheinen (59,9 % lebende Zellen 84 h nach α CD40-Zugabe), sind in der Kultur der KO-BM-DCs nach Stimulation nur noch 42,5 % vitale Zellen vorhanden. Ohne α CD40-Zugabe ist am Ende der Stimulationszeit der Anteil an lebenden Zellen in beiden Kulturen fast gleich niedrig mit 33,6 % (Ktrl.) bzw. 26,4 % (KO). Wie auch schon nach LPS-Stimulation scheint der Grund in der reduzierten Viabilität der KO-Zellen darin zu liegen, dass die Zellen aufgrund des fehlenden NF- κ B-Regulators NEMO nicht in der Lage sind, antiapoptotische Gene zu exprimieren. Dass trotzdem ein leichter Anstieg in der Viabilität der Zellen in der KO-Kultur nach α CD40-Zugabe zu sehen ist, könnte daran liegen, dass dieser von den in der Kultur vorhandenen nicht-deletierten Zellen getragen wird.



b)

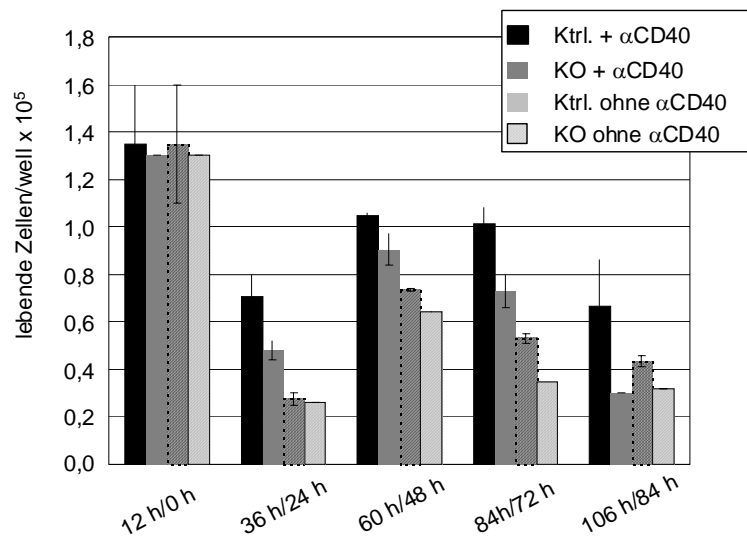


Abb. 3.17: Anteil der lebenden Zellen an der Gesamtpopulation nach Stimulation mit α CD40. Am Tag 6 der Kultur wurden die CD11c⁺ Ktrl.- bzw. KO-BM-DCs MACS-angereichert und für die angegebenen Zeitpunkte mit α CD40 (20 μ g/ml) stimuliert. Ein Teil der Zellen wurde mit AnnexinV/PJ markiert (a), der andere Teil der Zellen wurde mit Trypanblau gefärbt (b). Der Anteil der lebenden Zellen an der Gesamtpopulation konnte dann mit Hilfe des FACS-Caliburs bzw. mit einer lichtmikroskopischen Analyse ermittelt werden. (Versuch a) wurde viermal mit mind. 3 Tieren pro Gruppe durchgeführt, Versuch b) wurde einmal durchgeführt mit 3 Tieren pro Gruppe.)

3.3 Regulation der CCL17-Expression

Wie in Abschnitt 3.2.1 anhand eines Western-Blots gezeigt (Abb. 3.8 e), scheinen die aus weiblichen Tieren gewonnenen KO-BM-DCs NEMO besser zu deletieren als KO-BM-DCs, die aus den Vorläuferzellen männlicher Tiere generiert wurden. Ähnlich wie bei diesem Western Blot wurden auch bei der Analyse der Oberflächenmarker von männlichen und weiblichen NEMO eGFP Reportertieren Unregelmäßigkeiten festgestellt.

NEMO eGFP Reportertiere

Bei der durchflusszytometrischen Analyse der Oberflächenmarker wurden Unterschiede bezüglich des Anteils der eGFP⁺ CD11c⁺ Zellen in BM-DC-Kulturen aus männlichen und aus weiblichen Tieren festgestellt: Der Anteil von CD11c⁺eGFP⁺ MHC II⁺/CD80⁺/CD86⁺ Zellen in den BM-DC-Kulturen von weiblichen Ktrl.-Tieren liegt

deutlich über dem Anteil der CD11c⁺ MHC II⁺/CD80⁺/CD86⁺ Zellen in der Kultur von männlichen KO- und Ktrl.-Tieren (Abb. 3.12 b-d).

Um diese Beobachtung genauer zu untersuchen, wurde der Anteil aller eGFP⁺ CD11c⁺ Zellen an der Gesamtpopulation der MACS-angereicherten CD11c⁺ Zellen von NEMO eGFP Reporter-mäusen (s. Abb. 3.12.b-d) graphisch dargestellt (Abb. 3.18): Ab einer Stimulationsdauer von mehr als 15 h zeigen die DCs aus den LN von männlichen Ktrl.- und KO-NEMO eGFP Reporter-mäusen einen sehr geringen bzw. überhaupt keinen Anstieg in der eGFP- und somit in der CCL17-Expression. Die DCs aus den LN von weiblichen Tieren hingegen zeigen einen deutlichen Anstieg in der eGFP- bzw. CCL17-Expression auf über 70 %.

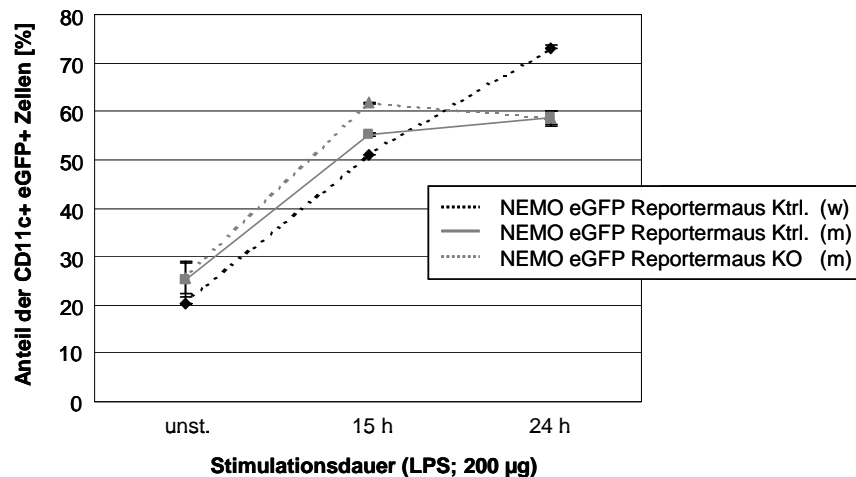


Abb. 3.18: Anteil der CD11c⁺ eGFP⁺ DCs in den LN von NEMO eGFP Reporter-mäusen. Die Tiere wurden i.p. mit LPS immunisiert (15 h bzw. 24 h), dann wurden die mesenterialen, poplietalen, axillären, brachialen und inguinalen LNs entnommen. Nach Anfertigung einer Zellsuspension wurden die CD11c⁺ Zellen MACS-angereichert und durchflusszytometrisch analysiert. (Versuch wurde einmal durchgeführt mit je 2 Mäusen pro Gruppe.)

CCL17 eGFP Reportertiere

Um zu untersuchen, ob der zuvor beobachtete Unterschied in der eGFP- und somit in der CCL17-Expression eine geschlechtsspezifische Ursache hat, oder ob dieser Unterschied aus der NEMO-Deletion resultiert, wurde die eGFP-Expression in DCs aus den LN von sog. CCL17 eGFP Reporter-mäusen (Abb. 3.18.a) analysiert. Diese Reporter-mäuse wurden verwendet, da in dieser Zucht männliche und weibliche homo-

und heterozygote Tiere vorhanden waren und somit die eGFP-Expression der verschiedenen Genotypen der männlichen und der weiblichen Tiere miteinander verglichen werden konnten.

Die CCL17 eGFP Reporterermäuse (Alferink et al., 2003) exprimieren als heterozygote Tiere auf einem CCL17-Allel eGFP unter der Kontrolle des CCL17-Promotors und auf dem zweiten Allel CCL17. Die homozygoten Mäuse exprimieren auf beiden Allelen das Reportergen und sind somit zugleich CCL17-KO (Abb. 3.19.a).

Die Ktrl.- und KO-CCL17 eGFP Reportertiere wurden für 15 h bzw. 24 h mit LPS (200 µg) i.p. stimuliert. Nach Entnahme der mesenterialen, poplietalen, axilliären, brachialen und inguinalen LNs wurde eine Zellsuspension angefertigt und die CD11c⁺ Zellen MACS-angereichert. Anschließend wurden die so gewonnenen Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

Wie in Abb. 3.19.b zu sehen ist, zeigen die CD11c⁺ DCs sowohl der heterozygoten als auch der homozygoten weiblichen Reportertiere einen leichten Anstieg in der CCL17- bzw. CCL17-Expression. Bei den CD11c⁺ Zellen der männlichen Reportertiere hingegen ist ein Rückgang des Anteil der eGFP⁺ DCs zu beobachten.

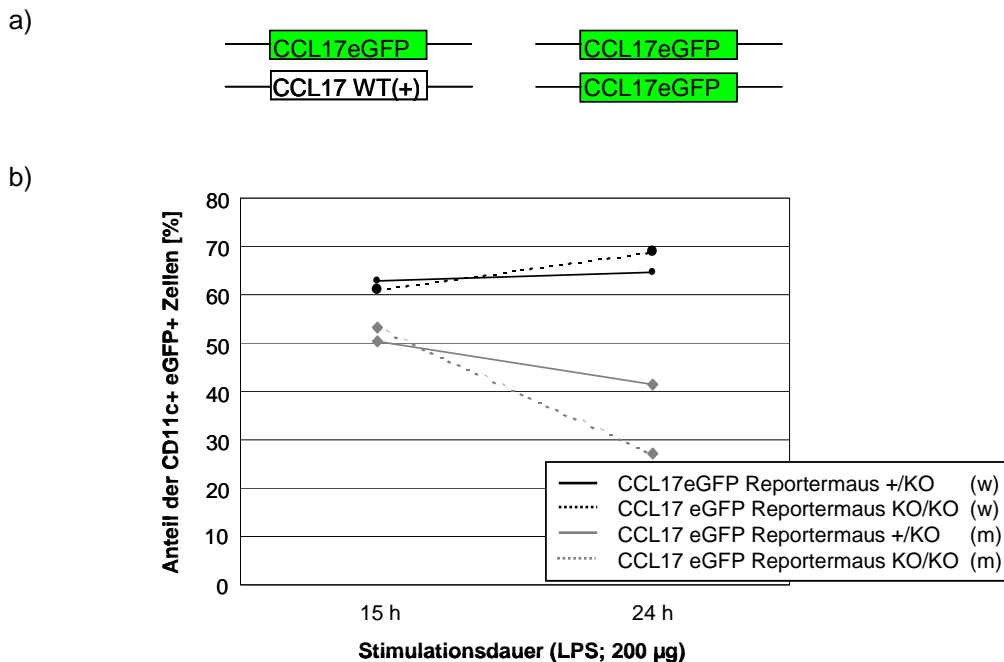


Abb. 3.19: Anteil der CD11c⁺ eGFP⁺ DCs in den LN von CCL17 eGFP Reporterermäusen. a) Genotyp der verwendeten Tiere. b) Anteil der CD11c⁺ eGFP⁺ DCs an der Gesamtpopulation. Die Tiere wurden i.p. mit LPS immunisiert (15 h bzw. 24 h), dann wurden die mesenterialen, poplietalen, axilliären, brachialen und inguinalen LNs entnommen. Nach Anfertigung einer Zellsuspension wurden die CD11c⁺ Zellen MACS-angereichert und durchflusszytometrisch analysiert. (Versuch wurde einmal durchgeführt mit je zwei Mäusen pro Gruppe.)

Durch diese Versuche konnte gezeigt werden, dass die Expression des Chemokins CCL17 geschlechtsabhängig ist: Sowohl die weiblichen Ktrl.- als auch KO-CCL17 eGFP Reportermäuse zeigen eine konstante bzw. leicht ansteigende eGFP-Expression in den DCs der gepoolten LN zwischen 15 h und 24 h Stimulation (200 µg i.p.). Die DCs der LN der männlichen CCL17 eGFP Reportertiere hingegen zeigen eine abfallende CCL17-Expression.

Dieses Ergebnis erklärt auch die Beobachtung, dass die BM-DCs, die aus den Knochenmarksvorläufer der männlichen KO-Tieren generiert wurden, eine geringere NEMO-Deletion aufweisen (Abb. 3.9.e): Da diese Tiere weniger CCL17 exprimieren, können sie auch weniger stark bzw. weniger effizient das gefloxtete Allel deletieren. Die Weibchen hingegen zeigen mit steigender Stimulationsdauer eine erhöhte CCL17- bzw. Cre-Expression und sind somit in der Lage, mehr *nemo* zu deletieren.

4 Diskussion

Das Cre/loxP-System stellt eine elegante Möglichkeit dar, ein bestimmtes Gen gewebs- bzw. zelltypspezifisch zu deletieren. Dabei bindet die aus dem Bakteriophagen P1 stammende Rekombinase Cre, die unter Kontrolle eines spezifischen Promotors exprimiert wird, an zwei je 34 bp umfassende sog. „loxP“ Sequenzen, die das zu deletierende Gen in gleicher Orientierung flankieren. Die von der Cre-Rekombinase vermittelte reziproke konservative DNS-Rekombination führt zum Herausschneiden der dazwischenliegenden DNS-Sequenz in zirkulärer Form und somit -je nach Promotoraktivität- zu einer spezifischen Deletion eines bestimmten Gens (Abremski et al., 1983; Sauer and Henderson, 1988).

Um die Funktion von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ bzw. NEMO, zwei Mitgliedern der NF- κB Proteinfamilie, in CCL17^+ DCs zu analysieren, wurden Mäuse, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des CCL17-Promotors exprimieren (Promotion I. Lieberam, Alferink et al., 2003), einerseits mit Tieren gekreuzt, die ein loxP-flankiertes $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Allel tragen (Rupec et al., 2005), und andererseits mit Tieren verpaart, deren NEMO-Allel mit zwei loxP-Sequenz versehen ist (Schmidt-Supprian et al., 2000). Aufgrund der durch den Promotor von CCL17 kontrollierten Expression der Cre-Rekombinase kann man davon ausgehen, dass die Expression des Enzyms Cre weitgehend der Expression von CCL17 entspricht. Das Resultat der Kreuzung sind zwei Mausmodelle: In dem einen Modell ($\text{CCL17cre I}\kappa\text{B}\alpha$) wird NF- κB durch fehlende Inhibition über $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ überexprimiert, in dem anderen Modell (CCL17cre NEMO) wird die NF- κB -Funktion durch NEMO-Deletion ausgeschaltet.

4.1 Charakterisierung der $\text{CCL17cre I}\kappa\text{B}\alpha$ Tiere

Das Cre/loxP-System ist besonders dann von Vorteil, wenn eine Null-Mutation des betreffenden Gens in der Keimbahn zu embryonaler bzw. postnataler Letalität führt, wie es bei $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -defizienten Mäusen der Fall ist: Diese Tiere sterben typischerweise 7-10 Tage nach der Geburt und zeigen eine schnelle physiologische Degeneration, u.a. eine Atrophie von Milz und Thymus, begleitet von der Entwicklung von

Hautabnormalitäten. Beg et al. und Klement et al. führen die Entstehung einer ausgedehnten Dermatitis auf eine beobachtete Hyperaktivität von NF- κ B und einer darauf zurückzuführenden abnormalen Expression von inflammatorischen Zytokinen in der unteren Epidermis zurück. Dieser morphologisch einer Psoriasis ähnelnde Phänotyp wird durch massive Lymphozyten-Infiltration und Keratinozyten-Proliferation hervorgerufen. Da die Haut das erste Organ ist, das der Umwelt und der darin vorkommenden Stimuli (z.B. Pathogene) ausgesetzt ist, findet zuerst dort eine Manifestation des Phänotyps statt (Beg et al., 1995a; Klement et al., 1996).

4.1.1 *I κ B α -Deletion*

Um die Spezifität der I κ B α -Deletion zu ermitteln, wurden Southern Blot Analysen der extrahierten DNS von bestimmten Organen und unstimulierten bzw. LPS-stimulierten BM-DCs durchgeführt. In den Kontroll-Tieren, die keine Cre-Rekombinase exprimieren, konnte keine Deletion von I κ B α nachgewiesen werden. In den KO-Tieren hingegen, die dieses Enzym exprimieren, konnte eine Deletion festgestellt werden, die je nach Zelltyp unterschiedlich stark ausgeprägt war: Je stärker die BM-DCs stimuliert wurden (zu erkennen an der damit einhergehenden Hochregulation von MHC II), desto stärker war auch die Deletion von I κ B α . Diese Beobachtung korreliert mit dem Befund, dass die CCL17-Expression und somit die Cre-Rekombinase-Expression in BM-DCs nach Stimulation mit TLR- und TNFR-Liganden (z.B. TNF α , LPS und CpG,) induziert bzw. hochreguliert wird (Alferink et al., 2003). Auch in unstimulierten BM-DCs ist eine schwache Deletion von I κ B α zu sehen: Durch das Abschaben der adhärennten Zellen von der Kulturschale und das durchflusszytometrische Anreichern der CD11c⁺ MHC II^{hoch/niedrig} BM-DCs erfolgt bereits eine Vorstimulation der Zellen, die -neben einer konstitutiven CCL17-Expression von ca. 25 % in den unstimulierten, angereicherten BM-DCs (Alferink et al., 2003)- zur Deletion von I κ B α führt.

In Lunge, Haut, Herz, Thymus und Leber konnte eine verschwindend geringe Deletion festgestellt werden, welche wahrscheinlich durch die Anwesenheit von gewebsständigen DCs oder im Blut zirkulierenden DCs zu erklären ist. In der Milz findet aufgrund einer fehlenden CCL17-Expression keine Deletion statt (Alferink et al., 2003).

Nach Stimulation mit inflammatorischen Stimuli wie LPS, CpG oder TNF α erfolgt nach der proteolytischen Degradierung von I κ B α eine rasche Translokation von NF- κ B in den Zellkern, gefolgt von einer Bindung des TFs an die κ B-Bindestellen im Promotor der Zielgene (Beg et al., 1993; Brown et al., 1993; Henkel et al., 1993; Rice and Ernst, 1993). Der an die DNA gebundene TF lässt sich mit Hilfe eines EMSAs (s. 2.6.11) darstellen: Bereits 10 min nach Stimulation mit LPS, CpG oder TNF α lässt sich eine Bindung des TFs an die DNS nachweisen; nach einer Stimulationsdauer von 30 min (LPS, CpG) bzw. 2 h (TNF α) ist die maximale Bindeaktivität erreicht. Der auch in unstimulierten BM-DCs vorhandene geringe basale Level an DNS-gebundenem TF kann darauf zurückgeführt werden, dass die Zellen durch Abschaben und MACS-Anreicherung bereits in geringem Maße mechanisch stimuliert wurden und aufgrund dessen eine Translokation von NF- κ B in den Kern stattfand. Im Vergleich zu den Ktrl.-BM-DCs zeigen die KO-BM-DCs bereits in unstimuliertem Zustand (0') einen erhöhten basalen Level an DNS-gebundenem TF; in den CpG- und TNF α -stimulierten Zellen ist darüberhinaus während der gesamten Stimulationsdauer eine leicht erhöhte Bindeaktivität zu sehen. Im Gegensatz zu den mit LPS und CpG stimulierten Proben, wo eine Beendigung der NF- κ B-Bindeaktivität 48 h nach Stimulationsbeginn zu sehen ist, hält die DNS-Bindung des TFs nach TNF α -Stimulation in den KO-BM-DCs weiterhin an.

Die Beendigung der NF- κ B-Aktivität erfolgt u.a. durch neusynthetisiertes I κ B α , welches aufgrund einer im Promotor vorhandenen κ B-Bindestelle nach Stimulation mit NF- κ B-induzierenden Stimuli exprimiert wird. Das neu synthetisierte I κ B α -Protein trägt eine intrinsische Kernlokalisationssequenz („nuclear localization sequence“, NLS) und kann so in den Kern translozieren (Sachdev et al., 1998). Da I κ B α zu NF- κ B eine höhere Affinität hat als NF- κ B zur κ B-Bindestelle im Promotor des Zielgens, kann I κ B α an NF- κ B binden, mit Hilfe einer amino- und carboxy-terminalen Kern-Export-Sequenz („nuclear-export signal“, NES) den Kern verlassen und so die Expression NF- κ B-abhängiger Gene beenden (Arenzana-Seisdedos et al., 1995; Arenzana-Seisdedos et al., 1997).

Die essentielle Rolle von I κ B α beim Beenden einer NF- κ B-Anwort konnte anhand von Analysen an I κ B α -KO-Tieren gezeigt werden: Falls I κ B α -defiziente Fibroblasten mit TNF α stimuliert werden, kann eine länger anhaltende NF- κ B-Antwort beobachtet

werden (Klement et al., 1996). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche zeigen, dass die von Klement et al. erzielten Ergebnisse auch auf $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -defizienten BM-DCs übertragen werden können: Sowohl in $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -defizienten Fibroblasten als auch in $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -defizienten BM-DCs ist nach $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation eine verlängerte NF- κ B-Bindeaktivität zu beobachten.

Der hingegen nur leicht erhöhte Level an DNS-gebundenem NF- κ B im Kern der $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -KO-BM-DCs nach CpG- und LPS-Stimulation lässt sich dadurch erklären, dass die Funktion des fehlenden $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Proteins in $\text{I}\kappa\text{B}\alpha^{-/-}$ BM-DCs teilweise von dem strukturell verwandten inhibitorischen Protein $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ übernommen wird und $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ folglich nicht alleine für das Zurückhalten des TFs im Zytoplasma verantwortlich ist (Klement et al., 1996). Die Funktionsübernahme von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ durch $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ findet jedoch nicht in allen Zelltypen gleichermaßen statt; im Gegensatz zu dem nicht oder nur leicht erhöhten NF- κ B-Level im Kern von Fibroblasten (Klement et al., 1996) konnten Beg et al. eine massiv erhöhte DNS-Bindeaktivität von NF- κ B in Thymozyten und Splenozyten von 3 Tage alten $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -defizienten Mäusen nachweisen (Beg et al., 1995a).

Im Gegensatz zu $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ besitzt $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ keine κ B-Bindestellen im Promotor und ist somit nicht durch NF- κ B induzierbar. Da neusynthetisiertes, nicht phosphoryliertes $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ im Zellkern -genauso wie $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ - mit NF- κ B-Dimeren, die an die DNS gebunden sind, interagiert, diese aber, im Gegensatz zu $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, nicht ablösen kann, resultiert die Bindung von $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ an NF- κ B/DNS-Komplexe in einer verlängerten NF- κ B-Antwort (DeLuca et al., 1999; Li and Verma, 2002; McKinsey et al., 1997; Phillips and Ghosh, 1997; Tran et al., 1997). Diese wird dadurch noch verstärkt, dass nukleäres $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ aufgrund einer selektiven Interaktion mit endogenem κ B-Ras weniger anfällig als $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ für eine Degradierung während der NF- κ B-Aktivierung ist (Fenwick et al., 2000). Die Stimulation von Zellen mit LPS oder IL-1 führt zu einem Abbau von $\text{I}\kappa\text{B}\beta$, wohingegen $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ nach Behandlung der Zellen mit $\text{TNF}\alpha$ stabil bleibt (Klement et al., 1996).

In den $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -KO-BM-DCs ist nach $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation ebenfalls eine verlängerte NF- κ B-Antwort zu sehen, welche auf die stabile Bindung von $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ an den NF- κ B/DNS-Komplex zurückzuführen ist. Nach LPS- und CpG-Stimulation hingegen wird $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ degradiert, der Komplex zerfällt und der NF- κ B-Dimer wird aus dem Kern transloziert. In WT- bzw. Ktrl.-Zellen erfolgt dieser Transport mit der Hilfe von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$. Für die LPS- und CpG-stimulierten KO-Zellen hingegen, die kein $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ mehr besitzen, konnte

ebenfalls gezeigt werden, dass die NF- κ B-Antwort im gleichen zeitlichen Rahmen wie bei den Ktrl.-Zellen beendet wird. Das legt den Schluss nahe, dass außer I κ B α noch andere Faktoren zur Beendigung einer NF- κ B-Antwort beitragen. Einer dieser Faktoren könnte ein weiteres Mitglied der NF- κ B-Familie sein, nämlich I κ B ϵ . Genau wie I κ B α wird die Expression von I κ B ϵ durch NF- κ B induziert (Tian et al., 2005), und ebenso wie I κ B α besitzt I κ B ϵ sowohl eine NLS als auch eine NES, welche das Pendeln zwischen Zytoplasma und Kern erlaubt. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass es eine der Aufgaben von I κ B ϵ ist, den Export von NF- κ B-Dimeren aus dem Kern in das Zytoplasma zu lenken (Lee and Hannink, 2002). Da die NLS-Funktion in I κ B ϵ wesentlich schwächer ausgeprägt ist als in I κ B α , pendelt I κ B ϵ um ein vielfaches langsamer zwischen Zytoplasma und Zellkern als I κ B α (Lee and Hannink, 2002).

4.1.2 *Auswirkungen der I κ B α -Deletion auf die APC-Funktion*

DC sind APC mit der einzigartigen Fähigkeit, eine primäre Immunantwort zu induzieren: Nach Aufnahme der Ag an der Eintrittsstelle der Pathogene via Makropinozytose, rezeptor-vermittelter Endozytose oder Phagozytose beginnen die maturierenden DCs, bestimmte Oberflächenmoleküle (CD80, CD86, CD40, MHC II) hochzuregulieren, zur T-Zellzone der sekundären lymphoiden Organe zu migrieren und die sich dort befindenden Ag-spezifischen T-Zellen über Präsentation der prozessierten Ag auf MHC I oder MHC II zu aktivieren. Neben der Expression von kostimulatorischen Molekülen trägt auch die Zytokinexpression -sowohl der DCs als auch der T-Zellen- wesentlich zur Induktion und zur Regulierung einer Immunantwort bei (Banchereau et al., 2000).

Yoshimura et al. konnten in mehreren Versuchsreihen zeigen, dass die Ag-Präsentation zumindest in den von ihnen gewählten Modellen durch DC NF- κ B-abhängig ist: Unter Verwendung eines adenoviralen Transfers von I κ B α in humanen Monozyten-abstammende DCs zeigten die Autoren, dass sowohl die Expression u.a. von CD80, CD86, CD40 und HLA-DR als auch die Expression von IL-12 und IL-6 in Anwesenheit des adenoviral exprimierten I κ B α deutlich verringert ist. Zusätzlich war auch die Fähigkeit der infizierten Zellen, eine T-Zellproliferation zu induzieren, dramatisch reduziert (Yoshimura et al., 2001b). Ähnliche Ergebnisse konnten die gleichen Autoren auch bei Versuchen erzielen, bei denen humane, von Monozyten abstammende DCs mit

dem Proteasom-Inhibitor PSI (N-benzyloxycarbonyl-Ile-Glu(O-tert-butyl)-Ala-leucinal) behandelt wurden (PSI inhibiert die Degradierung von I κ B α und verhindert somit die Aktivierung von NF- κ B): Auch hier konnte eine deutliche Reduktion in der Expression von HLA-DR und CD86 festgestellt werden, ebenso wie eine Reduktion der von den DCs exprimierten Zytokine IL-12 und TNF α . Im Gegensatz dazu blieb der Spiegel von IL-6 und IL-8 in den PSI-behandelten DCs unverändert (Yoshimura et al., 2001a). Erste *in vivo*-Versuche bestätigten die Bedeutung von NF- κ B für die Ag-Präsentation von DCs (Yoshimura et al., 2003).

Die Regulation der Expression kostimulatorischer Moleküle durch NF- κ B ist trotz der oben beschriebenen Ergebnisse umstritten. So konnte auch gezeigt werden, dass DCs aus p50^{-/-} cRel^{-/-} - Tieren nach 24 h LPS-Stimulation keinen Unterschied in der Expression von MHC II, MHC I, CD80 und CD86 zeigen. Lediglich die MHC II-Expression der DCs der KO-Tieren im unstimulierten Zustand ist leicht reduziert. Auch waren die DCs der p50/cRel-defizienten Tiere in der Lage, eine normale T-Zellproliferation zu induzieren (Ouaaz et al., 2002).

Entgegen der in der Literatur beschriebenen Beobachtungen bzgl. der Expression der Oberflächenmarker im Falle einer I κ B α -Überexpression bzw. im Falle einer Inhibierung der Degradierung von I κ B α in humanen, Monozyten-abstammenden Zellen und der Analysen von p50/cRel-defizienten Tieren (s. o.) zeigte die Analyse der Oberflächenmarker-Expression der I κ B α ^{-/-} BM-DCs, dass MHC II und CD86 nach LPS-Stimulation und MHC II nach TNF α -Stimulation in den KO-Zellen im Vergleich zu Ktrl.-Zellen herunterreguliert war. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass eine Adaptierung der Zellen an die erhöhten basalen NF- κ B-Level im Kern stattgefunden hat. Auch könnte sein, dass aufgrund der chronisch erhöhten NF- κ B-Bindeaktivität an die DNS eine negative Feedbackschleife aktiviert wird, welche eine Inhibierung der Hochregulation der betroffenen Oberflächenmarker (MHC II, CD86) zur Folge hat.

Dass nicht alle untersuchten Oberflächenmarker (CD40), sondern nur MHC II und CD86 nach Stimulation mit LPS bzw. TNF α betroffen sind, lässt sich durch die Spezifität der einzelnen Rel-Proteine für bestimmte Stimuli, Zelltypen und Promotoren erklären. So konnte z.B. gezeigt werden, dass nach LPS-Stimulation muriner BM-DCs vorwiegend Dimere, die cRel und p50 enthalten, an die DNS gebunden sind (Ouaaz et al., 2002; Rescigno et al., 1998). Nach LPS-Stimulation von sog. D1 DCs translozieren v.a. RelA-enthaltende Dimere in den Zellkern (Rescigno et al., 1998). Nach TNF α -

Stimulation muriner embryonaler RelA^{-/-} Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass die Expression TNF α -induzierter Gene unterblieb (Beg and Baltimore, 1996). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass TNF α -stimulierte NF- κ B-abhängige Gene jeweils bestimmte Rel-Proteine benötigen, um aktiviert zu werden.

Ein Grund für den von Ouaz et al. und Yoshimura et al. unterschiedlich beobachteten Beitrag von NF- κ B zur Regulation der Oberflächenmoleküle könnte darin liegen, dass bei Ouaz et al. BM-DCs verwendet wurden, die jeweils mit LPS oder zusätzlich TNF α stimuliert wurden, bevor der Effekt des beeinträchtigten TFs (p50/cRel-Defizienz) analysiert wurde. Yoshimura et al. dagegen untersuchten humane, von Monozyten abstammende DCs, die entweder mit einem Proteasom-Inhibitor oder mit einem I κ B α -exprimierenden Adenovirus behandelt wurden. Es könnte gut sein, dass die unterschiedlichen Agenzien die Maturierung der Zelle unterschiedlich stark oder gar nicht NF- κ B-abhängig induzieren. Denkbar ist auch, dass -wie oben beschrieben- die Regulation der Maturierung über NF- κ B zelltypspezifisch oder speziesspezifisch ist (Hofer et al., 2001; Ouaz et al., 2002).

Ein eindeutiger Unterschied hingegen zeigt sich bei der Analyse der Zytokin-Expression (abb. 3.5): Entsprechend der NF- κ B-abhängigen Expression von IL-12 und IL-6 (Dendorfer et al., 1994; Grumont et al., 2001; Murphy et al., 1995; Yoshimura et al., 2001a; Yoshimura et al., 2003; Yoshimura et al., 2001b) und der in Abb. 3.3 nachgewiesenen erhöhten NF- κ B-Bindeaktivität im Kern der KO-BM-DCs exprimieren diese nach Stimulation mit LPS, CpG und TNF α signifikant mehr IL-12p70 bzw. nach LPS- und CpG-Stimulation signifikant mehr IL-6 als die Kontrollen.

Da u.a. das Zytokin IL-12 unerlässlich ist für die Induktion einer T-Zell-Proliferation, und da in den KO-BM-DCs neben einem erhöhten IL-6- auch ein erhöhter IL-12-Pegel festgestellt wurde, wurde untersucht, wie sich die T-Zellproliferation in den Ktrl.- und den KO-Mäusen verhält. In vier von fünf Versuchen konnte dabei kein signifikanter Unterschied in der Proliferation der CD8⁺ - bzw. der CD4⁺ T-Zellen festgestellt werden. Wie schon für die OVA-induzierte und antivirale Immunität beschrieben, konnte auch nach Stimulation mit OVA/CFA und Restimulation mit OVA *in vitro* beobachtet werden, dass die CD8⁺ T-Zellen stärker proliferieren als die CD4⁺ T-Zellen (Whitmire and Ahmed, 2000; Beacock-Sharp et al., 2003). In einem Versuch wiesen sowohl die CD4⁺- als auch die CD8⁺ T-Zellen der KO-Tiere eine im Vergleich zu den aus den Ktrl.-Tieren stammenden T-Zellen massiv erhöhte Proliferation auf. Es könnte sein,

dass dieses Ergebnis auf eine bereits vorhanden gewesene Infektion der Maus zurückzuführen ist. Dieses Resultat war einmalig und konnte nicht mehr reproduziert werden.

Die von den KO-BM-DCs produzierte erhöhte Menge an IL-12 hat somit keinen Einfluss auf die OVA/CFA-induzierte Proliferation der CD4⁺- und der CD8⁺ T-Zellen.

Das Fehlen bestimmter Rel-Proteine kann dramatische Auswirkungen auf die Entwicklung von DCs und deren Funktion haben: So konnte gezeigt werden, dass RelB^{-/-} Tiere zwar eine normale Anzahl an CD11c⁺CD8α⁺DEC205⁺ DCs aufweisen, aber aufgrund einer gestörten Thymusstruktur keine CD11c⁺CD8α⁻DEC205⁻ DCs in diesem Organ besitzen (Burkly et al., 1995; Weih et al., 1997; Wu et al., 1998). Im Gegensatz zu RelB ist RelA für die Entwicklung bestimmter DC-Subklassen nicht nötig, denn in Abwesenheit dieses Proteins werden weiterhin normale Anteile an „lymphoiden“ CD11c⁺CD8α⁺ und „myeloiden“ CD11c⁺CD8α⁻ DCs gebildet. Auch in p50- oder cRel-defiziente Tiere ist die Ausbildung der CD8α⁺ und CD8α⁻ DCs nicht beeinträchtigt, wohl aufgrund der funktionellen Redundanz dieser NF-κB-Untereinheiten (Ouaaz et al., 2002). Erst p50/RelA Doppelknockouts zeigen dramatische Defekte in der Entwicklung von DCs: Aufgrund massiven Zelltodes in der Milz sind fast keine CD11c⁺ DCs vorhanden (Ouaaz et al., 2002). Aus diesen Analysen geht hervor, dass NF-κB eine herausragende Stellung bei der Entwicklung von DCs innehat. Im Gegensatz dazu scheint der TF für das Survival von unstimulierten, reifen DCs nicht notwendig zu sein, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Um eine endgültige Aussage über die Rolle von NF-κB beim Survival von murenen DCs *in vivo* treffen zu können, müsste die Turnover-Rate dieser Zellen z.B. mit Hilfe eines BrdU-Labelings analysiert werden.

Nach Stimulation der Zellen mit LPS oder TNFα sterben die KO-BM-DCs früher als die Ktrl.-BM-DCs. Dieses Ergebnis ist überraschend, da eine Vielzahl von Publikationen belegen, dass die Aktivierung von NF-κB sehr stark mit der Inhibition von Apoptose verbunden ist (Beg and Baltimore, 1996; Karin and Lin, 2002; Van Antwerp et al., 1996; Wang et al., 1996). Der Grund dafür liegt wahrscheinlich darin, dass der TF die Expression antiapoptotischer Gene wie z.B. TRAF1, TRAF2, c-IAP1, c-IAP2 oder Bcl-x_L reguliert (Caamano and Hunter, 2002; Karin and Lin, 2002). Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass die antiapoptotische Aktivität von NF-κB geblockt werden kann: Im Falle einer TNFα-induzierten NF-κB-Aktivierung können die im Aktivierungsweg *downstream* gelegenen Adaptermoleküle TRAF 1, TRAF2 und

RIP und sogar IKK β von Caspasen gespalten werden, wodurch der Signalweg unterbrochen und eine Aktivierung der Expression der antiapoptotischen Gene verhindert wird (Hong et al., 2000; Leo et al., 2001; Schwenzler et al., 1999; Tang et al., 2001). Auch die von NF- κ B aktivierten antiapoptotischen Genprodukte selbst wie z.B. c-IAP1 oder Bcl-x_L können von Caspasen degradiert werden (Clem et al., 1998; Clem et al., 2001; Fujita et al., 1998), genauso wie NF- κ B selbst (RelA) (Levkau et al., 1999). Das in dieser Arbeit beobachtete schnellere Absterben von KO-BM-DCs nach LPS- bzw. TNF α -Stimulation deutet darauf hin, dass im Falle einer Deletion von I κ B α in CCL17⁺ BM-DCs eher der Apoptose-induzierende Weg nach NF- κ B-Aktivierung ausgelöst wird. Der Abbau der durch eine erhöhte DNS- Bindeaktivität von NF- κ B vermutlich im Übermaß exprimierten antiapoptotischen Genprodukte durch Caspasen könnte einen Versuch der Zellen darstellen, die Überexpression dieser Proteine zu kompensieren.

Allerdings sollte ein Punkt im Auge behalten werden: Eine maximale Deletion des geflochtenen I κ B α -Allels erfolgt nach einer Stimulationsdauer von 12 h. Es könnte also leicht sein, dass eine phänotypisch wirksame Deletion erst erfolgt ist, wenn die frühen NF- κ B regulierten Vorgänge schon erfolgreich induziert oder abgelaufen sind. Dies könnte auch eine weitere Erklärung dafür sein, dass bzgl. der Expression Oberflächenmarker nur ein geringer (CH86, MHC II) oder gar kein Unterschied (CD40) zu sehen war.

4.2 Charakterisierung der CCL17cre NEMO Tiere

Die meisten Signale, die zur Aktivierung von NF- κ B führen, laufen beim IKK-Komplex, der aus den katalytischen Untereinheiten IKK1 und IKK2 und der regulatorischen Untereinheit NEMO besteht, zusammen. Der aktivierte IKK-Komplex führt zur Phosphorylierung der κ B-Proteine, die daraufhin degradiert werden und die Aktivierung von NF- κ B induzieren (Israel, 2000; Karin and Ben-Neriah, 2000).

IKK1 ist für die Kontrolle der epidermalen Differenzierung und, wie kürzlich gezeigt werden konnte, auch für die Beendigung der NF- κ B Antwort zuständig (Lawrence et al., 2005), wohingegen IKK2 und NEMO für die NF- κ B-Aktivierung durch proinflammatorische Signale notwendig sind (Hu et al., 1999; Hu et al., 2001; Li et al., 1999a; Li et al., 1999b; Li et al., 1999c; Makris et al., 2000; Rudolph et al., 2000; Schmidt-Supprian et al., 2000; Takeda et al., 1999; Tanaka et al., 1999).

Die jeweiligen Untereinheiten des IKK-Komplexes spielen eine wichtige Rolle für das Überleben der Tiere und bei der Entwicklung bzw. Funktion von Lymphozyten: IKK1-defiziente Mäuse sterben kurz nach der Geburt aufgrund einer kardiovaskulären Fehlfunktion in der Plazenta der Mutter und zeigen neben Skelettanomalitäten eine verdickte hyperproliferative Epidermis (Hu et al., 1999). IKK2-KO-Mäuse sterben im Embryonalstadium zwischen Tag 12,5 und 14,5 aufgrund massiver Apoptose der Hepatozyten und zeigen damit einen Phänotyp, der dem der RelA^{-/-}-Tiere ähnelt (Beg et al., 1995b; Li et al., 1999b; Li et al., 1999c). Anhand einer spezifischen Deletion von IKK2 in T-Zellen konnte nachgewiesen werden, dass die defizienten Zellen zwar in der Lage sind, Zytokine zu sekretieren und in T_H1- bzw. T_H2-T-Zellen zu differenzieren, jedoch dramatisch reduzierte Antworten nach Ag-Stimulation zeigen (Schmidt-Supprian et al., 2004). Tiere, die eine Deletion des x-chromosomal gekoppelten NEMO aufweisen, sterben zwischen dem embryonalen Tag 11,5 und 12,5 aufgrund einer TNF α -induzierten Apoptose von Hepatozyten. Des Weiteren zeigen diese Mäuse einen Block in der NF- κ B-Aktivierung nach Stimulation mit proinflammatorischen Stimuli. Heterozygote NEMO-KO-Mäuse entwickeln zudem einen Haut-Phänotyp, der mit der beim Menschen aufgrund einer Mutation in *nemo* auftretenden Krankheit „Incontinentia Pigmenti“ (IP) verglichen werden kann (Schmidt-Supprian et al., 2000). Chimäre

Mäuse, die aus NEMO-defizienten embryonalen Stammzellen (ES)-Zellen generiert wurden, sind nicht in der Lage, periphere B- und T-Zellen zu bilden. NEMO spielt also eine essentielle Rolle bei der Entwicklung und Persistenz von Lymphozyten (Schmidt-Supprian et al., 2003).

In embryonalen Fibroblasten aus NEMO-KO-Mäusen findet keine Phosphorylierung und somit auch keine Aktivierung von NF- κ B statt. Als Folge davon konnte keine NF- κ B-Bindeaktivität an die DNS festgestellt werden (Rudolph et al., 2000). Ebenso wie in den embryonalen Fibroblasten von NEMO-KO-Mäusen ist nach der Blockierung von NF- κ B in humanen, Monozyten-abstammenden DCs durch ein NF- κ B-inhibierendes Peptid (NBD, „NEMO binding domain“) keine I κ B α -Phosphorylierung und folglich keine Translokation von NF- κ B in den Kern festzustellen.

Um zu analysieren ob NEMO auch eine Rolle bei der Funktion von DCs, in diesem Fall von CCL17⁺ DCs, innehat, wurden Mäuse untersucht, die eine Deletion von NEMO in CCL17⁺ DCs aufweisen. Um in diesen Zellen eine spezifische Deletion zu induzieren, wurde aufgrund der embryonalen Letalität der NEMO-Null-Mutation in der Keimbahn das Cre/loxP-System angewendet (1.5, 4.1 und 4.1.1).

4.2.1 NEMO-Deletion

Mit Hilfe einer Southern-Blot Analyse konnte nachgewiesen werden, dass in Thymus, Milz, Herz, Leber und Lunge von Cre-Rekombinase-exprimierenden KO-Tieren keine *nemo*-Deletion stattfindet. Im Gegensatz dazu ist in den BM-DCs (DCs unstimuliert, MHC II^{niedrig/hoch}) eine Deletionsbande zu erkennen, die aber mit fortschreitender Stimulation verschwindet. Darauf und auf den scheinbaren Widerspruch zu den Western-Blot Daten, die eine zunehmende Deletion von NEMO mit zunehmender Stimulationsdauer zeigen, wurde in 3.2.1 eingegangen.

Beim Vergleich verschiedener Anreicherungsverfahren der semi-adhären, aus dem Knochenmark von Ktrl.- und KO-Mäusen *in vitro* generierten BM-DCs stellte sich nach Western Blot-Analyse heraus, dass unter allen getesteten Verfahren (Abschaben, MACS-Anreicherung der CD11c⁺ BM-DCs, MOFLO-Anreicherung der CD11c⁺CD11b⁺CD8⁻Gr-1⁻ Zellen) die Zellen, die MACS-oder MOFLO-angereichert wurden, die höchste Deletionseffizienz aufwiesen. Obwohl nach Stimulation mit CpG im Gegensatz zu LPS-Stimulation ein größerer Anteil an BM-DCs CCL17 hochreguliert

(Alferink et al., 2003), ist in den LPS-stimulierten BM-DCs eine leicht erhöhte Deletionseffizienz gegenüber den CpG-stimulierten Zellen zu erkennen (Abb. 3.9.e). Aus diesem Grunde wurden für die *in vitro*-Versuche BM-DCs verwendet, die MACS-angereichert und mind. 12 h mit LPS stimuliert wurden, um eine maximale Deletion von NEMO zu erreichen. Länger als 15 h wurden die Zellen dem Stimulus nicht ausgesetzt, um ein sog. „*exhausting*“ der Zellen zu vermeiden (Langenkamp et al., 2000). Die in geringem Ausmaß bereits in den unstimulierten Zellen stattfindende NEMO-Deletion ist auf das Vorhandensein eines kleinen Anteils von unstimulierten CCL17⁺ BM-DCs in der Kultur zurückzuführen (Alferink et al., 2003).

Analysen von BM-DCs, die aus dem Knochenmark von NEMO eGFP Reporter-mäusen (Abb. 3.10) generiert wurden (Alferink et al., 2003), zeigen, dass nach MACS-Anreicherung der CD11c⁺ Zellen und LPS-Stimulation mehr als 70 % der Zellen eGFP⁺ sind (Abb. 3.11.a). Dass diese Zellen tatsächlich NEMO deletieren, zeigt die durchgeführte Western Blot-Analyse (Abb. 3.11.b). Der geringe Rest an noch vorhandenem NEMO-Protein lässt sich darauf zurückführen, dass sich in der Kultur noch ca. 28 % nicht-deletierte BM-DCs befinden.

4.2.2 NF- κ B-unabhängige Expression von MHC II, CD80, CD86 und CD40

Wie bereits in 4.1.2 beschrieben, ist die Rolle von NF- κ B bei der Regulation der Expression der Oberflächenmarker umstritten: Yoshimura et al. konnten im Rahmen der von ihnen verwendeten Modelle eine NF- κ B-Abhängigkeit der Oberflächenmarker-Expression nachweisen (Yoshimura et al., 2001a; Yoshimura et al., 2003; Yoshimura et al., 2001b), wohingegen Ouaz et al. in p50/cRel-defizienten Mäusen keine NF- κ B-Abhängigkeit der Expression der von ihnen untersuchten Marker feststellen konnten (Ouaz et al., 2002). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass in DCs, die mit einem NF- κ B-inhibierendes Peptid (NBD, „NEMO binding domain“) behandelt wurden, u.a. keine Hochregulation von HLA-DR und CD86 stattfindet (Tas et al., 2005).

Auch in unserem Modell, den NEMO-defizienten CCL17⁺ BM-DCs, konnte in *in vitro*-Versuchen nach 12 h LPS-Stimulation kein Unterschied bzgl. der Expression der Oberflächenmarker MHC II, CD80, CD86 und CD40 festgestellt werden. Dieses Ergebnis konnte durch die Analyse von CD11c⁺ DCs aus den LN von NEMO eGFP Reportertieren bestätigt werden.

Eine Erklärung dafür könnte sein, dass in unserem Modell die NEMO-Deletion zu spät erfolgt: Erst ca. 12 h nach Stimulation der BM-DCs ist eine maximale Deletion nach LPS-Stimulation sichtbar. Es kann möglich sein, dass bereits während dieser ersten 12 h die (NF- κ B-abhängigen) Vorgänge ablaufen, die zur Regulation der Expression der Oberflächenmarker essentiell sind. Folglich hätte eine NEMO-Deletion nach 12 h keine Auswirkungen mehr auf die Hochregulation der Oberflächenmarker.

Eine weitere Möglichkeit könnte sein, dass es mindestens einen zusätzlichen Signalweg gibt, der den TF NF- κ B unabhängig von NEMO bzw. einem intakten IKK-Komplex aktivieren kann. Ein Weg, der diese Bedingungen erfüllt, stellt der Signalweg über NIK („NF- κ B-inducing kinase“) dar: NIK ist in der Lage, den TF NF- κ B unabhängig von NEMO über einen p38 MAPK-abhängigen Weg zu induzieren.

Die molekularen Ereignisse, die *upstream* des IKK-Komplexes liegen und zu dessen Aktivierung führen, sind immer noch nicht komplett aufgeklärt worden (Ghosh and Karin, 2002). Biochemische Analysen konnten jedoch zeigen, dass die MAP3K Kinase NIK den IKK-Komplex und somit NF- κ B nach LPS-, TNF α - und IL-1-Stimulation aktivieren konnte (Chen et al., 1999; Karin and Delhase, 1998; Ling et al., 1998; Nakano et al., 1998; Traenckner et al., 1995; Woronicz et al., 1997). NIK phosphoryliert dabei zusammen mit einem weiteren Mitglied der MAP3K Familie, MEKK1, IKK β und stimuliert so seine Kinase-Aktivität (Yin et al., 1998).

Die Funktion von NIK konnte zuerst anhand von sog. Alymphoplasia (*aly*) Mäusen, welche eine Punktmutation in dem für NIK codierenden Gen tragen, analysiert werden (Shinkura et al., 1999). Aly-Mäuse besitzen keine Peyers Patches und LN, außerdem besitzen sie eine gestörte Architektur der Milz (May and Ghosh, 1998). Daneben zeigen sie einen stark eingeschränkten Level an Serum Immunglobulin (Ig), besonders Ig A; einen Phänotyp, der dem der Lymphotoxin (LT) β R- und LT α -KO-Mäusen ähnelt (De Togni et al., 1994; Futterer et al., 1998). Diese Ähnlichkeiten führten zu der Vermutung, dass die *aly*-Mutation bzw. NIK eine Rolle im NF- κ B-abhängigen Arm des LT β R-Signalweg spielen. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass NIK für die LT β -induzierte RelA-Phosphorylierung und für die Transkriptionsaktivität von NF- κ B verantwortlich ist (Jiang et al., 2003a; Jiang et al., 2003b). NIK ist aber nicht nur für die Aktivierung der Transkriptionsaktivität von NF- κ B über die Phosphorylierung von IKK β zuständig, sondern ist auch in der Lage, ohne kompletten, funktionsfähigen IKK-Komplex NF- κ B zu aktivieren (Jijon et al., 2004): Anhand von NEMO-defizienten murinen embryonalen

Fibroblasten, die mit einem NIK-exprimierenden Plasmid transfiziert wurden, konnte gezeigt werden, dass NIK die Expression NF- κ B-abhängiger Gene über einen p38 MAPK-abhängigen Signalweg unabhängig von einem intakten IKK-Komplex induziert (Jijon et al., 2004).

Vielleicht ist also der alternative, vom IKK-Komplex unabhängige Signalweg verantwortlich dafür, dass trotz fehlendem NEMO die Expression der analysierten Oberflächenmoleküle nicht beeinträchtigt wird.

4.2.3 *Beeinträchtigt es Überleben der NEMO-defizienten DCs nach Stimulation*

NEMO^{-/-} Mäuse sterben zwischen Tag 12,5 und 13 im Embryonalstadium aufgrund einer massiven Apoptose der Hepatozyten. In NEMO-defizienten murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) ist dabei sowohl nach Stimulation mit den TLR-Liganden LPS und Poly(IC) als auch nach Stimulation mit IL-1 und TNF α keine NF- κ B-Bindeaktivität im Kern festzustellen, ebenso keine Stimulus-abhängige Phosphorylierung und Degradierung von I κ B α . Die deletierten MEFs zeigen zusätzlich eine stark beeinträchtigte Expression von NF- κ B-Zielgenen und eine reduzierte Viabilität nach TNF α -Stimulation (Rudolph et al., 2000).

Auch nach Stimulation von NEMO-defizienten BM-DCs mit LPS konnte eine erhöhte Letalität beobachtet werden: Die KO-BM-DCs starben im Vergleich zu den Ktrl.-Zellen schneller ab, was einerseits durch FACS-Analyse (Abb. 3.15.a) und andererseits durch Auszählen der lebenden Zellen unter dem Mikroskop gezeigt werden konnte (Abb. 3.15.b). Ursache dafür könnte sein, dass die KO-BM-DCs aufgrund eines funktionsunfähigen IKK-Komplexes nicht mehr in der Lage sind, die Expression antiapoptotischer NF- κ B-abhängiger Gene zu induzieren.

Normalerweise induziert LPS, ein TLR4-Ligand, in vielen verschiedenen Zelltypen, u.a. auch in humanen DCs, einen Survival-Signalweg: Am Ende dieser Signalkaskade steht die NF- κ B-aktivierte Expression des antiapoptotischen Proteins c-FLIP oder die Expression der antiapoptotischen Proteine der Bcl-2 Familie (Karin and Lin, 2002; Nicolo et al., 2001; Willems et al., 2000). c-FLIP verhindert den Zelltod durch Behinderung der Aktivierung der Pro-Caspase-8, wohingegen die Mitglieder der Bcl-2-Familie die Induktion des Mitochondrien-vermittelten Zelltodes verhindern (Karin and Lin, 2002). NEMO-defiziente BM-DCs können die Expression der antiapoptotischen

Gene aufgrund des unvollständigen, funktionsunfähigen IKK-Komplexes nicht aktivieren und sterben folglich früher als die Ktrl.-BM-DCs.

Das Überleben der DCs kann nicht nur über Aktivierung von NF- κ B über den TLR-Signalweg via LPS-Stimulation, sondern auch über den TNF-Signalweg nach CD40-Ligation induziert werden (Wong et al., 1998). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von BM-DCs mit CD40L oder TRANCE, einem Mitglied der TNF-Familie, das auf T-Zellen exprimiert wird, letztendlich zur Expression der antiapoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie, v.a. Bcl- x_L , führt (Wong et al., 1997). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass eine ektopische Expression dieses Proteins ausreicht, um ein verlängertes Überleben von DCs zu induzieren (Pirtskhalaishvili et al., 2000). In Kulturen von p50^{-/-}cRel^{-/-} BM-DCs, die mit CD40L behandelt wurden, konnte 5 Tage nach Stimulation im Vergleich zu den Ktrl.-BM-DCs ein um den Faktor fünf reduziertes Überleben der KO-Zellen nachgewiesen werden (Ouaaz et al., 2002). Dabei sterben die defizienten BM-DCs aufgrund einer im Vergleich zu den Ktrl.-Zellen inhibierten Bcl- x_L -Expression (Ouaaz et al., 2002).

Auch NEMO-defiziente BM-DCs zeigen nach Aktivierung des TNF-Signalweges durch Stimulation der Zellen mit α CD40 ein im Vergleich zu den Ktrl.-BM-DCs reduziertes Überleben, was sowohl durch eine FACS-Analyse als auch durch Auszählen der lebenden Zellen unter dem Lichtmikroskop gezeigt werden konnte (Abb. 3.16). Einige Zellen in der KO-Kultur sind dennoch in der Lage, auf die α CD40-Stimulation zu reagieren. Diese Population könnte aus den nicht-deletierten Zellen bestehen, die sich ebenfalls in der KO-Kultur befinden. Wie schon bei der Stimulation mit LPS festgestellt, ist ein leichter Anstieg am Anteil der lebenden Zellen vom Zeitpunkt "36 h/24 h" zum Zeitpunkt "60 h/48 h" zu sehen. Dieser könnte auf eine durch die Stimulation verursachte Proliferation der (nicht deletierten) BM-DCs zurückzuführen sein. Der Schluss liegt nahe, dass die geringere Viabilität der NEMO^{-/-} BM-DCs nach Stimulation mit α CD40 -genau wie bei den p50^{-/-}cRel^{-/-} BM-DCs- durch eine beeinträchtigte Expression von Proteinen der Bcl-2-Familie, evtl. sogar Bcl- x_L , verursacht wird. Um dies genauer abzuklären, müsste jedoch z.B ein EMSA mit einer für Bcl- x_L spezifischen Supershift-Analyse durchgeführt werden.

Wie Garceau et al. nachweisen konnten, ist NIK nicht an der NF- κ B-Aktivierung nach CD40/CD40L-vermittelter DC-Aktivierung beteiligt (Garceau et al., 2000). Aus diesem Grunde kann ausgeschlossen werden, dass in diesem Versuch die NEMO-Defizienz in

den BM-DCs durch eine IKK-unabhängige NIK-induzierte NF- κ B-Aktivierung umgangen wurde.

4.2.4 Reduzierte CTL-Antwort in *CCL17cre NEMO* Tieren

Wenn DCs Ag aufnehmen und maturieren, sind sie in der Lage, eine starke T-Zellantwort zu induzieren. Neben CD4⁺ Effektor-T-Zellen entstehen dabei auch CD8⁺ Effektor-T-Zellen (CTLs), die in der Lage sind, IFN- γ zu produzieren und andere Zellen zu lysieren. Wichtig für die Generierung einer CTL-Antwort ist, dass die DC komplett maturiert sind, d.h. kostimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86, aber auch MHC II und MHC I, hochreguliert haben.

NF- κ B spielt bei der Induktion einer spezifischen T-Zell-Antwort eine wichtige Rolle. So konnte gezeigt werden, dass cRel^{-/-} BM-DCs, verglichen mit Ktrl.-BM-DCs, eine geringere proliferative Antwort von allogenen T-Zellen hervorrufen. Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass die cRel-defizienten BM-DCs im unstimulierten Zustand weniger CD86 exprimieren als Ktrl.-BM-DCs. Desweiteren zeigen die T-Zellen, die von cRel-defizienten BM-DCs stimuliert wurden, eine geringere Expression von IL-2, IL-4 und IFN- γ (Boffa et al., 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass KO-Tiere eine geringere CTL-vermittelte spezifische Lyse von SIINFEKL-beladenen Zielzellen zeigen als die Ktrl.-Tiere (Abb. 3.14). Der beobachtete Unterschied in der Lyse ist mit ca. 28 % jedoch relativ gering. Die Expression von kostimulatorischen Molekülen wie CD80 und CD86 ist eng mit der Fähigkeit der DCs verbunden, eine T-Zell-Antwort zu induzieren (Hathcock et al., 1994; Larsen et al., 1994). Der nur geringe Unterschied in der Lyse könnte dadurch zu erklären sein, dass KO-BM-DCs in gleichem Maße wie Ktrl.-BM-DCs in der Lage sind, diese Oberflächenmoleküle zu exprimieren. Da folglich der beobachtete Unterschied bzgl. der Generierung einer CTL-Antwort zwischen Ktrl.- und KO-Mäusen nicht auf eine niedrigere Expression von CD80, CD86 oder auch MHC II zurückgeführt werden kann, wurde die Expression eines weiteren Oberflächenmoleküls untersucht, nämlich CD40. Die prominente Stellung von CD40 wurde in Versuchen nachgewiesen, bei denen gezeigt werden konnte, dass eine OVA-spezifische CTL-Antwort vom CD40/CD40L-aktivierten Signalling abhängig war. In der Abwesenheit von CD40L-exprimierenden T-Helferzellen konnte ein α CD40-Ak deren Funktion

ersetzen (Bennett et al., 1998). Da unter den Zellen, die an der Generierung einer CTL-Antwort beteiligt sind, nur die DCs CD40 exprimieren, liegt der Schluss nahe, dass eine intakte CD40-Expression der DCs für die Generierung einer CTL-Antwort essentiell ist. Die CD40-Expression wurde sowohl *in vitro* in BM-DCs als auch in *ex vivo* gewonnenen CD11c⁺CD8 α ⁻ analysiert. In beiden Fällen konnte jedoch kein Unterschied festgestellt werden.

Die reduzierte Fähigkeit der KO-Tiere, eine CTL-Antwort zu generieren, muss folglich auf einen anderen Defekt in den KO-Mäusen zurückzuführen sein.

In einer sog. „MLR“ (mixed lymphocyte reaction“) ist die Stimulation der T-Zellen direkt gekoppelt mit der vorhandenen Anzahl an Ag-präsentierenden Stimulator-Zellen. Jegliche Veränderung der Viabilität der Stimulator-Zellen hat somit einen weitreichenden Einfluss auf die T-Zellantwort (Boffa et al., 2003). Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, sterben -zumindest *in vitro*- die NEMO-defizienten DCs schneller als die Ktrl.-DCs. Somit würden weniger DCs für die Stimulation der CD8⁺ T-Zellen zur Verfügung stehen. Dass die NEMO-defizienten DCs in der Lage sind, Ag korrekt aufzunehmen und zu präsentieren, konnte anhand eines T-Zellproliferationsassays nachgewiesen werden: Sowohl T-Zellen, die mit Ktrl.-DCs stimuliert wurden, als auch T-Zellen, die mit KO-DCs stimuliert wurden, zeigten keinen Unterschied in der Proliferation (Abb. 3.13). Ein Defekt der NEMO-defizienten DCs in der Ag-Prozessierung oder -präsentation kann somit ausgeschlossen werden.

Weitere Faktoren, die für eine CTL-Antwort notwendig sind, sind die Zytokine IL-12, ein Verstärker der CTL-Antwort (Grohmann et al., 1998; Noguchi et al., 1995; Schmidt and Mescher, 1999), 4-1BB Ligand, ein *downstream* des CD40/CD40L-Signalweges gelegenes Zytokin, oder IL-2, ein Zytokin, das die T-Zellproliferation anregt. Für IL-12 konnte zusätzlich noch gezeigt werden, dass es als sog. Signal 3 (neben Signal 1, der Erkennung der auf MHC-Molekülen präsentierten Ag, und Signal 2, der Kostimulation) für die Generierung von CD8⁺ CTL-T-Zellen absolut notwendig ist (Curtsinger et al., 2003). Ein erster präliminärer Versuch zeigte, dass die NEMO-defizienten BM-DCs v.a. nach Stimulation mit LPS und CpG weniger IL-12 produzieren als Ktrl.-BM-DCs. Dies könnte ein erster Hinweis darauf sein, dass tatsächlich u.a. die verminderte Expression dieses Zytokins zu einer verringerten CTL-Antwort in den KO-Tieren führt.

Ein wesentlicher Mechanismus, der zur Induktion von Ag-spezifischen T-Zellen und somit auch zur Induktion einer CTL-Antwort beiträgt, ist die sog. Kreuz-Präsentation von Ag („cross presentation“) (Yewdell et al., 1999). Eine Kreuz-Präsentation liegt vor,

wenn exogene Ag im MHC I-Weg prozessiert werden und folglich auf MHC I-Molekülen präsentiert werden (Heath et al., 2004). DCs stellen dabei die Hauptpopulation der Zelle dar, die in der Lage ist, eine Kreuz-Präsentation durchzuführen (den Haan et al., 2000; Huang et al., 1996; Huang et al., 1994). Umstritten jedoch ist, welche Subpopulation der DCs am meisten betroffen ist: So konnten den Haan et al. zeigen, dass v.a. $CD8\alpha^+$ DCs die Fähigkeit zur Kreuz-Präsentation besitzen. Jedoch konnte auch nachgewiesen werden, dass virus-ähnliche Partikel von $CD8\alpha^-$ DCs kreuzpräsentiert werden (Ruedl et al., 2002) bzw. dass sowohl $CD8\alpha^+$ - als auch $CD8\alpha^-$ DCs in der Lage sind, eine starke CTL-Antwort zu induzieren (Schlecht et al., 2001).

In dem in dieser Arbeit analysierten Modell sind nur die $CD8\alpha^-$, CCL17-exprimierenden DCs von der NEMO-Deletion betroffen. Die Tatsache, dass die KO-Tiere nicht in der Lage sind, eine volle CTL-Antwort zu generieren, legt den Schluss nahe, dass -zumindest in diesem Modell- auch die myeloiden, $CD8\alpha^-$ DCs für die Induktion einer CTL-Antwort nötig sind.

Die beobachtete Reduktion der CTL-Antwort könnte u.a. auf das schnellere Absterben der $CCL17^+$ DCs und somit die geringere Anzahl an Ag-präsentierenden Zellen zurückzuführen sein. Ein weiterer Grund könnte sein, dass die NEMO-defizienten BM-DCs, wie ein erster Versuch zeigte, weniger IL-12 produzieren als Krtl.-BM-DCs und somit die durch dieses Zytokin hervorgerufene Amplifikation der CTL-Antwort unterbleibt.

Allerdings darf nicht aus den Augen verloren werden, dass das hier verwendete Modell gewissen Beschränkungen unterliegt: Eine Deletion der geflochtenen Allele *ikba* und *nemo* findet nämlich erst statt, wenn das Enzym Cre-Rekombinase exprimiert wird. Die Expression der Rekombinase wiederum wird durch den CCL17-Promotor reguliert, der erst in stimulierten DCs eine maximale Aktivität erreicht. Eine Deletion der geflochtenen Allele findet folglich erst statt, wenn die DCs bereits in stimuliertem Zustand vorliegen. NF- κ B-regulierte Vorgänge, die in DC-Vorläuferzellen, in unstimulierten DCs oder am Anfang der Stimulation oder Aktivierung ablaufen, sind daher von der Deletion nicht betroffen.

Dies könnte auch die Erklärung dafür sein, dass trotz der nachgewiesenen essentiellen Bedeutung von NF- κ B bei der Entstehung von $CD11c^+$ Zellen (Ouaaz et al., 2002) im

Rahmen des in dieser Arbeit verwendeten Modells in KO-Tieren genauso viele lebende, unstimulierte reife CD11c⁺ Zellen vorhanden waren wie in Ktrl.-Tieren.

Anscheinend ist NF-κB v.a. während der Entwicklung der DCs notwendig; in maturen DCs hingegen scheint der TF primär nur eine Rolle bei der Apoptose-Induktion und bei der Zytokin-Expression innezuhaben.

4.3 Regulation der CCL17-Expression

Wie durchflusszytometrische Analysen von eGFP⁺CD11c⁺ DCs zeigten, bleibt die CCL17-Expression von DCs aus männlichen Ktrl.- und KO-NEMO eGFP Reportermäusen ab einer Stimulationsdauer von 15 h (200 µg LPS i.p.) relativ konstant. DCs aus weiblichen Ktrl.-Tieren hingegen zeigen einen deutlichen Anstieg in der eGFP- bzw. CCL17-Expression. Dass dieser Unterschied nicht auf der NEMO-Deletion beruht, sondern auf eine geschlechtsspezifisch unterschiedliche Expression von CCL17 zurückzuführen ist, konnte eine Analyse von CCL17 eGFP Reportertieren zeigen: Sowohl die DCs der heterozygoten als auch der homozygoten weiblichen Reportertiere zeigen einen leichten Anstieg in der CCL17-Expression. Bei den CD11c⁺ Zellen der männlichen Reportertiere hingegen ist ein Rückgang des Anteils der eGFP⁺- und somit der CCL17-exprimierenden DCs zu beobachten.

Die geschlechtsspezifische Expression von CCL17 erklärt auch die in Western Blot-Analysen beobachtete relativ geringe Deletion von NEMO in DCs aus männlichen Tieren im Vergleich zu der in DCs aus weiblichen Tieren erfolgten Deletion: Da Männchen weniger CCL17 exprimieren als die Weibchen, findet folglich in den Männchen auch eine geringere Deletion des geflochten *nemo* Allels statt.

Dass das Geschlecht eine wichtige Rolle beim Ausprägungsgrad einer Krankheit spielt, konnte vielfach gezeigt werden. Einige Krankheiten, deren Verlauf durch das Geschlecht des Betroffenen beeinflusst wird, sind beim Menschen z.B. Tuberkulose, Sepsis oder Listeriose (Beery, 2003; Caracta, 2003; Gellin and Broome, 1989). Diese geschlechtsspezifischen Unterschiede kann man nicht nur im Menschen beobachten, auch Mäuse zeigen eine unterschiedliche Sensibilität gegenüber Infektionen. Im Allgemeinen kann man dabei beobachten, dass weibliche Betroffene im Vergleich zu männlichen Patienten eine größere Resistenz gegenüber bakteriellen oder viralen

Infektionen aufweisen (Barna et al., 1996; Han et al., 2001; Lortholary et al., 2002; Medina et al., 2001). Diese verringerte Sensibilität weiblicher Individuen gegenüber Infektionen konnte auf das Vorhandensein einer stärkeren Immunantwort bzw. auf das Vorhandensein eines unterschiedlichen Zytokinpegels zurückgeführt werden, was wiederum durch den unterschiedlichen Hormonhaushalt in Männchen und Weibchen reguliert wird (Beagley and Gockel, 2003; Salem, 2004). So konnte z.B. gezeigt werden, dass nach einer Infektion der Mäuse mit Hefe Weibchen in Milz und Blut höhere Level an $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ aufweisen als Männchen. Wahrscheinlich ist, dass die Expression dieser Zytokine durch die weiblichen Geschlechtshormone 17β -Estradiol und Progesteron verstärkt bzw. reguliert wird (Lortholary et al., 2002). Dass Geschlechtshormone die unterschiedliche Zytokinproduktion in Männchen und Weibchen und somit die Anfälligkeit gegenüber Infektionen regulieren, konnte auch anhand von Infektionsversuchen mit *Leishmania major* nachgewiesen werden: Männchen zeigten im Vergleich zu Weibchen eine signifikant höhere Parasitenlast in der Leber. Durch Testosteron-Gabe an Weibchen konnte deren Parasitenlast ebenfalls signifikant erhöht werden (Mock and Nacy, 1988).

Vor diesem Hintergrund kann es durchaus sein, dass auch CCL17 zu den Zytokinen gehört, deren Expression u.a. von Geschlechtshormonen gesteuert wird. Dabei würde die geschlechtsabhängige Expression des Zytokins CCL17 in die Beobachtung passen, dass Weibchen im allgemeinen eine höhere Unempfindlichkeit gegenüber bakteriellen oder viralen Infektionen zeigen: Da CCL17 CCR4-exprimierende Effektor-T-Zellen anzieht und nach LPS-Stimulation hochreguliert wird, könnte dieses Zytokin an der Anreicherung von CD4^+ T-Helferzellen an Entzündungsstellen und somit an der Verstärkung der Immunantwort beteiligt sein (Lieberam and Förster, 1999). Da in Weibchen nach LPS-Stimulation eine im Vergleich zu Männchen höhere CCL17-Expression stattfindet, könnten in Weibchen mehr CD4^+ T-Helferzellen zu Entzündungsstellen rekrutiert werden und somit eine bessere Bekämpfung der Erreger stattfinden.

4.4 **Ausblick**

Die zukünftigen Arbeiten mit den CCL17cre I κ B α -Tieren werden sich neben einigen *in vitro*-Untersuchungen v.a. auf *in vivo*-Analysen der defizienten Mäuse konzentrieren. Aufgrund des einmal beobachteten großen Unterschiedes in der Proliferation der CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen in den KO-Mäusen nach OVA/CFA-Immunsierung soll dieser Versuch nochmals durchgeführt werden. Um einen möglichen Einfluss des gemischten Hintergrundes auf das Versuchsergebnis zu vermeiden, sollen Tiere verwendet werden, die mindestens fünfmal auf einen C57BL/6 Hintergrund zurückgekreuzt wurden. Desweiteren soll die Fähigkeit der CCL17cre I κ B α -KO-Tiere analysiert werden, eine CTL-Antwort zu generieren. Da Zell-assoziiertes Ovalbumin viel effektiver kreuzpräsentiert werden kann als lösliches Ovalbumin (Li et al., 2001), und somit eine CTL-Antwort leichter ausgelöst werden kann, soll der Versuch wie bei Li et al. beschrieben (Li et al., 2001) mit Zell-assoziiertem Ovalbumin durchgeführt werden.

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, weisen die I κ B α -defizienten BM-DCs nach Stimulation mit LPS, CpG und TNF α im Vergleich zu den Ktrl.-BM-DCs eine vermehrte Zytokin-Expression auf. Aus diesem Grund wird es interessant sein, in einem *in vitro*-Versuch zu analysieren, ob die defizienten DCs aufgrund der erhöhten Zytokinlevel eventuell auch eine verstärkte huCrP-abhängige T-Zellproliferation induzieren.

Ebenso wie bei den CCL17cre I κ B α -defizienten Tieren wird sich die weitere Analyse der CCL17cre NEMO-defizienten Tiere hauptsächlich auf *in vivo*-Analysen erstrecken. An erster Stelle steht hierbei eine erneute Durchführung des CTL-Assays, der -ebenso wie bei den CCL17cre I κ B α -defizienten Tieren- mit zellgebundenem Ovalbumin durchgeführt werden soll, um den bereits beobachteten Unterschied zwischen Ktrl.- und KO-Tieren evtl. noch deutlicher zu sehen. Um die Ursache der in den KO-Tieren reduzierten CTL-Antwort zu analysieren, sollen die ersten, präliminären Daten bzgl. der Zytokinexpression anhand weiterer CBAs („Cytometric Bead Array“, Beckton Dickinson, USA) bestätigt und erweitert werden. Wie Alferink et al. zeigen konnten (Alferink et al., 2003), spielt CCL17 eine wichtige Rolle bei der Induktion einer DTH („delayed type hypersensitivity“)-Antwort, da CCL17-KO-Mäuse eine reduzierte DTH Antwort zeigen. Um die Rolle von NF- κ B bei der Induktion einer DTH-Antwort zu

analysieren, soll in CCL17cre NEMO-defiziente Tieren wie bei Ross et al. beschrieben (Ross et al., 1998) eine DTH-Reaktion ausgelöst werden. Diese Versuche finden in Kooperation mit Frau Prof. Reske-Kunz, Klinische Forschergruppe Allergie, Mainz, statt und sind bereits angelaufen.

5 Zusammenfassung/Summary

Dendritische Zellen (DCs) spielen durch ihre Position an der Schnittstelle zwischen innater und adaptiver Immunität bei der Regulation von Immunantworten eine entscheidende Rolle. Eine herausragende Subpopulation innerhalb der DCs stellen dabei die CCL17⁺ DCs dar: Sie sind an der Eintrittspforte externer Antigene lokalisiert und haben u.a. eine wichtige Bedeutung bei der Transplantatabstoßung, der Kontakthypersensibilität, der Kreuzpräsentation und der Abwehr von Parasiten. Ebenfalls eine zentrale Rolle in der Steuerung immunologischer Prozesse kommt dem Transkriptionsfaktor (TF) NF- κ B durch seine Fähigkeit zu, inflammatorische Gene zu aktivieren. Um die Rolle von NF- κ B in CCL17⁺ DCs zu analysieren, wurden im Vorfeld dieser Arbeit Mäuse generiert, die spezifisch in dieser Subpopulation I κ B α bzw. NEMO deletiert haben. Anhand dieser Tiermodelle können einerseits die Auswirkungen einer NF- κ B-Überexpression und andererseits die Folgen eines inaktiven NF- κ B untersucht werden.

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurden die Auswirkungen einer NF- κ B-Überexpression in CCL17⁺ DCs analysiert. Unsere Daten zeigen, dass in den I κ B α -defizienten BM-DCs eine höhere basale DNS-Bindung des TF stattfindet und nach CpG und TNF α -Stimulation mehr NF- κ B an die DNS gebunden hat. Die Analyse der APC-Funktion der betroffenen BM-DCs weist darauf hin, dass I κ B α sowohl die Expression bestimmter Aktivierungsmarker als auch die Zytokinexpression reguliert. Daneben konnte auch gezeigt werden, dass die defizienten CCL17⁺ BM-DCs nach LPS- und TNF α -Stimulation schneller sterben. Dies weist darauf hin, dass in den KO-Zellen eher ein Apoptose-induzierender als ein Apoptose-inhibierender Signalweg aktiviert wird.

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurden die Folgen einer Inaktivierung von NF- κ B in CCL17⁺ BM-DCs anhand einer Deletion der regulatorischen Untereinheit NEMO untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass NEMO offenbar keine Rolle bei der Regulation der Expression der Oberflächenmoleküle CD40, MHC II, CD80 und CD86 durch NF- κ B spielt. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass ein alternativer, von NEMO unabhängiger Signalweg existieren könnte, der NF- κ B aktiviert. Als möglicher Kandidat kommt hierbei eine NIK-abhängige Signaltransduktion in Frage. NEMO-defiziente BM-DCs sind in der Lage, eine normale Ag-abhängige T-Zellproliferation zu

induzieren. Dies impliziert, dass sowohl die Ag-Prozessierung als auch die Ag-Präsentation zumindest in diesem Modell nicht von NEMO reguliert werden. Jedoch konnte zweifelsfrei *in vivo* nachgewiesen werden, dass die KO-Tiere eine im Vergleich zu den Ktrl.-Tieren schwächere CTL-Antwort induzieren. Dies kann evtl. auf die ebenfalls beobachtete verringerte Viabilität der KO-BM-DCs nach LPS- oder α CD40-Stimulation zurückgeführt werden.

Zusätzlich konnten Experimente mit Reportermausen zeigen, dass die CCL17-Expression geschlechtsspezifisch reguliert wird.

Due to their position at the interface of innate and adaptive immunity dendritic cells (DCs) play an important role in the regulation of immune responses. Within the population of dendritic cells CCL17⁺ DCs display an outstanding subpopulation: They are located at the entrance of external antigens and exhibit amongst others an important role in transplant rejection, contact hypersensitivity, cross presentation and blocking parasites. The transcription factor (TF) NF- κ B also plays an important role concerning the regulation of immunological processes due to its ability to activate inflammatory genes. In order to analyse the role of NF- κ B in CCL17⁺ DCs, we used mice which have been generated prior to this work that carry a deletion of I κ B α and NEMO, respectively. On the basis of these animal models we were able to study both the effects of NF- κ B overexpression as well as inactivation of NF- κ B.

In the first part of this work the effects of NF- κ B overexpression in CCL17⁺ DCs were analysed. We could demonstrate an elevated DNA-binding of the TF in I κ B α deficient BM-DCs. Additionally, after stimulation with CpG and TNF α a greater amount of NF- κ B has bound to the DNA. Analysis of antigen-presenting-cell (APC) function of the affected DCs indicates that I κ B α plays a role in regulating both the expression of specific activation markers and cytokine expression. Beside this it could be shown that I κ B α -deficient CCL17⁺ BM-DCs die more rapidly after LPS- and TNF α -stimulation. This indicates that in the KO cells the apoptosis-inducing pathway is more likely to be activated than the apoptosis-inhibiting pathway.

In the second part of this work the effects of NF- κ B inactivation in CCL17⁺ BM-DCs were analysed. For this purpose, the regulatory subunit "NEMO" was deleted. Using this model it could be shown that NEMO deficiency apparently has no influence on the

NF- κ B-dependent regulation of the surface molecules CD40, MHC II, CD80 and CD86. This result points to the existence of an alternative NF- κ B-activating signalling pathway that works independently of NEMO. A possible pathway could be the NIK-dependent signalling transduction. NEMO-deficient BM-DCs are able to induce normal Ag-dependent T-cell proliferation. This implies that -at least in the present model- Ag-processing and Ag-presentation are not regulated by NEMO. However, it could be shown *in vivo* that KO-animals induce a weaker CTL-response compared to ctrl.-animals. This might be explained by the observed reduced viability of KO-BM-DCs after LPS- or α CD40-stimulation.

Additionally, experiments with reporter-mice could show a sex-dependent expression of CCL17.

6 Referenzen

Abremski, K., Hoess, R., and Sternberg, N. (1983). Studies on the properties of P1 site-specific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination. *Cell* 32, 1301-1311.

Ackerman, A. L., Kyritsis, C., Tampe, R., and Cresswell, P. (2005). Access of soluble antigens to the endoplasmic reticulum can explain cross-presentation by dendritic cells. *Nat Immunol* 6, 107-113.

Adema, G. J., Hartgers, F., Verstraten, R., de Vries, E., Marland, G., Menon, S., Foster, J., Xu, Y., Nooyen, P., McClanahan, T., *et al.* (1997). A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature* 387, 713-717.

Albert, M. L., Pearce, S. F., Francisco, L. M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R. L., and Bhardwaj, N. (1998a). Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alpha5beta1 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 188, 1359-1368.

Albert, M. L., Sauter, B., and Bhardwaj, N. (1998b). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392, 86-89.

Alferink, J., Lieberam, I., Reindl, W., Behrens, A., Weiss, S., Huser, N., Gerauer, K., Ross, R., Reske-Kunz, A. B., Ahmad-Nejad, P., *et al.* (2003). Compartmentalized production of CCL17 in vivo: strong inducibility in peripheral dendritic cells contrasts selective absence from the spleen. *J Exp Med* 197, 585-599.

Andrew, D. P., Chang, M. S., McNinch, J., Wathen, S. T., Rihaneck, M., Tseng, J., Spellberg, J. P., and Elias, C. G., 3rd (1998). STCP-1 (MDC) CC chemokine acts specifically on chronically activated Th2 lymphocytes and is produced by monocytes on stimulation with Th2 cytokines IL-4 and IL-13. *J Immunol* 161, 5027-5038.

Anjuere, F., Martin, P., Ferrero, I., Fraga, M. L., del Hoyo, G. M., Wright, N., and Ardavin, C. (1999). Definition of dendritic cell subpopulations present in the spleen, Peyer's patches, lymph nodes, and skin of the mouse. *Blood* 93, 590-598.

Ardavin, C. (2003). Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 3, 582-590.

Ardite, E., Panes, J., Miranda, M., Salas, A., Elizalde, J. I., Sans, M., Arce, Y., Bordas, J. M., Fernandez-Checa, J. C., and Pique, J. M. (1998). Effects of steroid treatment on activation of nuclear factor kappaB in patients with inflammatory bowel disease. *Br J Pharmacol* 124, 431-433.

- Arenzana-Seisdedos, F., Thompson, J., Rodriguez, M. S., Bachelier, F., Thomas, D., and Hay, R. T. (1995). Inducible nuclear expression of newly synthesized I kappa B alpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF-kappa B. *Mol Cell Biol* *15*, 2689-2696.
- Arenzana-Seisdedos, F., Turpin, P., Rodriguez, M., Thomas, D., Hay, R. T., Virelizier, J. L., and Dargemont, C. (1997). Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm. *J Cell Sci* *110* (Pt 3), 369-378.
- Baeuerle, P. A., and Baltimore, D. (1996). NF-kappa B: ten years after. *Cell* *87*, 13-20.
- Baldwin, A. S., Jr. (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* *14*, 649-683.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* *18*, 767-811.
- Banchereau, J., and Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* *392*, 245-252.
- Barna, M., Komatsu, T., Bi, Z., and Reiss, C. S. (1996). Sex differences in susceptibility to viral infection of the central nervous system. *J Neuroimmunol* *67*, 31-39.
- Beacock-Sharp, H., Donachie, A. M., Robson, N. C., and Mowat, A. M. (2003). A role for dendritic cells in the priming of antigen-specific CD4+ and CD8+ T lymphocytes by immune-stimulating complexes in vivo. *Int Immunol* *15*, 711-720.
- Beagley, K. W., and Gockel, C. M. (2003). Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone. *FEMS Immunol Med Microbiol* *38*, 13-22.
- Beery, T. A. (2003). Sex differences in infection and sepsis. *Crit Care Nurs Clin North Am* *15*, 55-62.
- Beg, A. A., and Baltimore, D. (1996). An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* *274*, 782-784.
- Beg, A. A., Finco, T. S., Nantermet, P. V., and Baldwin, A. S., Jr. (1993). Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I kappa B alpha: a mechanism for NF-kappa B activation. *Mol Cell Biol* *13*, 3301-3310.
- Beg, A. A., Sha, W. C., Bronson, R. T., and Baltimore, D. (1995a). Constitutive NF-kappa B activation, enhanced granulopoiesis, and neonatal lethality in I kappa B alpha-deficient mice. *Genes Dev* *9*, 2736-2746.

- Beg, A. A., Sha, W. C., Bronson, R. T., Ghosh, S., and Baltimore, D. (1995b). Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature* 376, 167-170.
- Behrens, G., Li, M., Smith, C. M., Belz, G. T., Mintern, J., Carbone, F. R., and Heath, W. R. (2004). Helper T cells, dendritic cells and CTL Immunity. *Immunol Cell Biol* 82, 84-90.
- Bell, D., Young, J. W., and Banchereau, J. (1999). Dendritic cells. *Adv Immunol* 72, 255-324.
- Bennett, S. R., Carbone, F. R., Karamalis, F., Flavell, R. A., Miller, J. F., and Heath, W. R. (1998). Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 393, 478-480.
- Bentires-Alj, M., Barbu, V., Fillet, M., Chariot, A., Relic, B., Jacobs, N., Gielen, J., Merville, M. P., and Bours, V. (2003). NF-kappaB transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells. *Oncogene* 22, 90-97.
- Bilsborough, J., George, T. C., Norment, A., and Viney, J. L. (2003). Mucosal CD8alpha+ DC, with a plasmacytoid phenotype, induce differentiation and support function of T cells with regulatory properties. *Immunology* 108, 481-492.
- Boffa, D. J., Feng, B., Sharma, V., Dematteo, R., Miller, G., Suthanthiran, M., Nunez, R., and Liou, H. C. (2003). Selective loss of c-Rel compromises dendritic cell activation of T lymphocytes. *Cell Immunol* 222, 105-115.
- Boonstra, A., Asselin-Paturel, C., Gilliet, M., Crain, C., Trinchieri, G., Liu, Y. J., and O'Garra, A. (2003). Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. *J Exp Med* 197, 101-109.
- Brown, K., Park, S., Kanno, T., Franzoso, G., and Siebenlist, U. (1993). Mutual regulation of the transcriptional activator NF-kappa B and its inhibitor, I kappa B-alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2532-2536.
- Burkly, L., Hession, C., Ogata, L., Reilly, C., Marconi, L. A., Olson, D., Tizard, R., Cate, R., and Lo, D. (1995). Expression of relB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells. *Nature* 373, 531-536.
- Caamano, J., and Hunter, C. A. (2002). NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clin Microbiol Rev* 15, 414-429.
- Campbell, J. J., Haraldsen, G., Pan, J., Rottman, J., Qin, S., Ponath, P., Andrew, D. P., Warnke, R., Ruffing, N., Kassam, N., *et al.* (1999). The chemokine receptor CCR4 in

vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. *Nature* *400*, 776-780.

Caracta, C. F. (2003). Gender differences in pulmonary disease. *Mt Sinai J Med* *70*, 215-224.

Chen, F., Castranova, V., Shi, X., and Demers, L. M. (1999). New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem* *45*, 7-17.

Cheng, J. D., Ryseck, R. P., Attar, R. M., Dambach, D., and Bravo, R. (1998). Functional redundancy of the nuclear factor kappa B inhibitors I kappa B alpha and I kappa B beta. *J Exp Med* *188*, 1055-1062.

Chu, W. M., Ostertag, D., Li, Z. W., Chang, L., Chen, Y., Hu, Y., Williams, B., Perrault, J., and Karin, M. (1999). JNK2 and IKKbeta are required for activating the innate response to viral infection. *Immunity* *11*, 721-731.

Chvatchko, Y., Hoogewerf, A. J., Meyer, A., Alouani, S., Juillard, P., Buser, R., Conquet, F., Proudfoot, A. E., Wells, T. N., and Power, C. A. (2000). A key role for CC chemokine receptor 4 in lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. *J Exp Med* *191*, 1755-1764.

Clem, R. J., Cheng, E. H., Karp, C. L., Kirsch, D. G., Ueno, K., Takahashi, A., Kastan, M. B., Griffin, D. E., Earnshaw, W. C., Veluona, M. A., and Hardwick, J. M. (1998). Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 554-559.

Clem, R. J., Sheu, T. T., Richter, B. W., He, W. W., Thornberry, N. A., Duckett, C. S., and Hardwick, J. M. (2001). c-IAP1 is cleaved by caspases to produce a proapoptotic C-terminal fragment. *J Biol Chem* *276*, 7602-7608.

Coope, H. J., Atkinson, P. G., Huhse, B., Belich, M., Janzen, J., Holman, M. J., Klaus, G. G., Johnston, L. H., and Ley, S. C. (2002). CD40 regulates the processing of NF-kappaB2 p100 to p52. *Embo J* *21*, 5375-5385.

Curtsinger, J. M., Lins, D. C., and Mescher, M. F. (2003). Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function. *J Exp Med* *197*, 1141-1151.

Cyster, J. G. (1999). Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* *286*, 2098-2102.

D'Amico, A., and Wu, L. (2003). The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid predendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3. *J Exp Med* *198*, 293-303.

- de Martin, R., Schmid, J. A., and Hofer-Warbinek, R. (1999). The NF-kappaB/Rel family of transcription factors in oncogenic transformation and apoptosis. *Mutat Res* 437, 231-243.
- de Saint-Vis, B., Vincent, J., Vandenabeele, S., Vanbervliet, B., Pin, J. J., Ait-Yahia, S., Patel, S., Mattei, M. G., Banchereau, J., Zurawski, S., *et al.* (1998). A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment. *Immunity* 9, 325-336.
- De Smedt, T., Pajak, B., Klaus, G. G., Noelle, R. J., Urbain, J., Leo, O., and Moser, M. (1998). Antigen-specific T lymphocytes regulate lipopolysaccharide-induced apoptosis of dendritic cells in vivo. *J Immunol* 161, 4476-4479.
- De Smedt, T., Pajak, B., Muraille, E., Lespagnard, L., Heinen, E., De Baetselier, P., Urbain, J., Leo, O., and Moser, M. (1996). Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J Exp Med* 184, 1413-1424.
- De Togni, P., Goellner, J., Ruddle, N. H., Streeter, P. R., Fick, A., Mariathasan, S., Smith, S. C., Carlson, R., Shornick, L. P., Strauss-Schoenberger, J., and *et al.* (1994). Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. *Science* 264, 703-707.
- Dechend, R., Hirano, F., Lehmann, K., Heissmeyer, V., Ansieau, S., Wulczyn, F. G., Scheidereit, C., and Leutz, A. (1999). The Bcl-3 oncoprotein acts as a bridging factor between NF-kappaB/Rel and nuclear co-regulators. *Oncogene* 18, 3316-3323.
- Dejardin, E., Droin, N. M., Delhase, M., Haas, E., Cao, Y., Makris, C., Li, Z. W., Karin, M., Ware, C. F., and Green, D. R. (2002). The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity* 17, 525-535.
- del Hoyo, G. M., Martin, P., Vargas, H. H., Ruiz, S., Arias, C. F., and Ardavin, C. (2002). Characterization of a common precursor population for dendritic cells. *Nature* 415, 1043-1047.
- DeLuca, C., Petropoulos, L., Zmeureanu, D., and Hiscott, J. (1999). Nuclear IkappaBbeta maintains persistent NF-kappaB activation in HIV-1-infected myeloid cells. *J Biol Chem* 274, 13010-13016.
- den Haan, J. M., and Bevan, M. J. (2002). Constitutive versus activation-dependent cross-presentation of immune complexes by CD8(+) and CD8(-) dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 196, 817-827.
- den Haan, J. M., Lehar, S. M., and Bevan, M. J. (2000). CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J Exp Med* 192, 1685-1696.

- Dendorfer, U., Oettgen, P., and Libermann, T. A. (1994). Multiple regulatory elements in the interleukin-6 gene mediate induction by prostaglandins, cyclic AMP, and lipopolysaccharide. *Mol Cell Biol* *14*, 4443-4454.
- Deveraux, Q. L., Roy, N., Stennicke, H. R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. (1998). IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *Embo J* *17*, 2215-2223.
- Devin, A., Lin, Y., Yamaoka, S., Li, Z., Karin, M., and Liu, Z. (2001). The alpha and beta subunits of IkappaB kinase (IKK) mediate TRAF2-dependent IKK recruitment to tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 in response to TNF. *Mol Cell Biol* *21*, 3986-3994.
- Dieu, M. C., Vanbervliet, B., Vicari, A., Bridon, J. M., Oldham, E., Ait-Yahia, S., Briere, F., Zlotnik, A., Lebecque, S., and Caux, C. (1998). Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* *188*, 373-386.
- Doffinger, R., Klein, T. C., Pepys, M. B., Casanova, J. L., and Kyewski, B. A. (1997). The MHC class II-restricted T cell response of C57BL/6 mice to human C-reactive protein: homology to self and the selection of T cell epitopes and T cell receptors. *Mol Immunol* *34*, 115-124.
- Ennis, E., Isberg, R. R., and Shimizu, Y. (1993). Very late antigen 4-dependent adhesion and costimulation of resting human T cells by the bacterial beta 1 integrin ligand invasin. *J Exp Med* *177*, 207-212.
- Fallarino, F., Grohmann, U., Vacca, C., Bianchi, R., Fioretti, M. C., and Puccetti, P. (2002). CD40 ligand and CTLA-4 are reciprocally regulated in the Th1 cell proliferative response sustained by CD8(+) dendritic cells. *J Immunol* *169*, 1182-1188.
- Fearon, D. T., and Locksley, R. M. (1996). The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* *272*, 50-53.
- Feinberg, A. P., and Vogelstein, B. (1984). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. *Anal Biochem* *137*, 266-267.
- Fenwick, C., Na, S. Y., Voll, R. E., Zhong, H., Im, S. Y., Lee, J. W., and Ghosh, S. (2000). A subclass of Ras proteins that regulate the degradation of IkappaB. *Science* *287*, 869-873.
- Fujita, N., Nagahashi, A., Nagashima, K., Rokudai, S., and Tsuruo, T. (1998). Acceleration of apoptotic cell death after the cleavage of Bcl-XL protein by caspase-3-like proteases. *Oncogene* *17*, 1295-1304.

- Futterer, A., Mink, K., Luz, A., Kosco-Vilbois, M. H., and Pfeffer, K. (1998). The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues. *Immunity* 9, 59-70.
- Ganz, T. (2002). Antimicrobial polypeptides in host defense of the respiratory tract. *J Clin Invest* 109, 693-697.
- Garceau, N., Kosaka, Y., Masters, S., Hambor, J., Shinkura, R., Honjo, T., and Noelle, R. J. (2000). Lineage-restricted function of nuclear factor kappaB-inducing kinase (NIK) in transducing signals via CD40. *J Exp Med* 191, 381-386.
- Gellin, B. G., and Broome, C. V. (1989). Listeriosis. *Jama* 261, 1313-1320.
- Ghosh, S., and Karin, M. (2002). Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 109 Suppl, S81-96.
- Ghosh, S., May, M. J., and Kopp, E. B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16, 225-260.
- Godiska, R., Chantry, D., Raport, C. J., Sozzani, S., Allavena, P., Leviten, D., Mantovani, A., and Gray, P. W. (1997). Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel chemoattractant for monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and natural killer cells. *J Exp Med* 185, 1595-1604.
- Gri, G., Savio, D., Trinchieri, G., and Ma, X. (1998). Synergistic regulation of the human interleukin-12 p40 promoter by NFkappaB and Ets transcription factors in Epstein-Barr virus-transformed B cells and macrophages. *J Biol Chem* 273, 6431-6438.
- Grohmann, U., Fioretti, M. C., Bianchi, R., Belladonna, M. L., Ayroldi, E., Surace, D., Silla, S., and Puccetti, P. (1998). Dendritic cells, interleukin 12, and CD4+ lymphocytes in the initiation of class I-restricted reactivity to a tumor/self peptide. *Crit Rev Immunol* 18, 87-98.
- Grumont, R., Hochrein, H., O'Keeffe, M., Gugasyan, R., White, C., Caminschi, I., Cook, W., and Gerondakis, S. (2001). c-Rel regulates interleukin 12 p70 expression in CD8(+) dendritic cells by specifically inducing p35 gene transcription. *J Exp Med* 194, 1021-1032.
- Gubler, U., Chua, A. O., Schoenhaut, D. S., Dwyer, C. M., McComas, W., Motyka, R., Nabavi, N., Wolitzky, A. G., Quinn, P. M., Familletti, P. C., and et al. (1991). Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 4143-4147.
- Han, X., Lundberg, P., Tanamachi, B., Openshaw, H., Longmate, J., and Cantin, E. (2001). Gender influences herpes simplex virus type 1 infection in normal and gamma interferon-mutant mice. *J Virol* 75, 3048-3052.

- Hart, D. N. (1997). Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 90, 3245-3287.
- Hathcock, K. S., Laszlo, G., Pucillo, C., Linsley, P., and Hodes, R. J. (1994). Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J Exp Med* 180, 631-640.
- Heath, W. R., Belz, G. T., Behrens, G. M., Smith, C. M., Forehan, S. P., Parish, I. A., Davey, G. M., Wilson, N. S., Carbone, F. R., and Villadangos, J. A. (2004). Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev* 199, 9-26.
- Henkel, T., Machleidt, T., Alkalay, I., Kronke, M., Ben-Neriah, Y., and Baeuerle, P. A. (1993). Rapid proteolysis of I kappa B-alpha is necessary for activation of transcription factor NF-kappa B. *Nature* 365, 182-185.
- Henri, S., Vremec, D., Kamath, A., Waithman, J., Williams, S., Benoist, C., Burnham, K., Saeland, S., Handman, E., and Shortman, K. (2001). The dendritic cell populations of mouse lymph nodes. *J Immunol* 167, 741-748.
- Hessem, D. G., Tracey, K. J., Fong, Y., Manogue, K. R., Palladino, M. A., Jr., Cerami, A., Shires, G. T., Lowry, S. F. (1988). Cytokine appearance in human endotoxemia and primate bacteremia. *Surg Gynecol Obstet* 2, 147-53.
- Hofer, S., Rescigno, M., Granucci, F., Citterio, S., Francolini, M., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Differential activation of NF-kappa B subunits in dendritic cells in response to Gram-negative bacteria and to lipopolysaccharide. *Microbes Infect* 3, 259-265.
- Hong, S. Y., Yoon, W. H., Park, J. H., Kang, S. G., Ahn, J. H., and Lee, T. H. (2000). Involvement of two NF-kappa B binding elements in tumor necrosis factor alpha -, CD40-, and epstein-barr virus latent membrane protein 1-mediated induction of the cellular inhibitor of apoptosis protein 2 gene. *J Biol Chem* 275, 18022-18028.
- Hu, Y., Baud, V., Delhase, M., Zhang, P., Deerinck, T., Ellisman, M., Johnson, R., and Karin, M. (1999). Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKKalpha subunit of IkappaB kinase. *Science* 284, 316-320.
- Hu, Y., Baud, V., Oga, T., Kim, K. I., Yoshida, K., and Karin, M. (2001). IKKalpha controls formation of the epidermis independently of NF-kappaB. *Nature* 410, 710-714.
- Huang, A. Y., Bruce, A. T., Pardoll, D. M., and Levitsky, H. I. (1996). In vivo cross-priming of MHC class I-restricted antigens requires the TAP transporter. *Immunity* 4, 349-355.

Huang, A. Y., Golumbek, P., Ahmadzadeh, M., Jaffee, E., Pardoll, D., and Levitsky, H. (1994). Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science* 264, 961-965.

Iellem, A., Mariani, M., Lang, R., Recalde, H., Panina-Bordignon, P., Sinigaglia, F., and D'Ambrosio, D. (2001). Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med* 194, 847-853.

Imai, T., Baba, M., Nishimura, M., Kakizaki, M., Takagi, S., and Yoshie, O. (1997). The T cell-directed CC chemokine TARC is a highly specific biological ligand for CC chemokine receptor 4. *J Biol Chem* 272, 15036-15042.

Imai, T., Nagira, M., Takagi, S., Kakizaki, M., Nishimura, M., Wang, J., Gray, P. W., Matsushima, K., and Yoshie, O. (1999). Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. *Int Immunol* 11, 81-88.

Imai, T., Yoshida, T., Baba, M., Nishimura, M., Kakizaki, M., and Yoshie, O. (1996). Molecular cloning of a novel T cell-directed CC chemokine expressed in thymus by signal sequence trap using Epstein-Barr virus vector. *J Biol Chem* 271, 21514-21521.

Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S., and Steinman, R. M. (1992). Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 176, 1693-1702.

Israel, A. (2000). The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF-kappaB? *Trends Cell Biol* 10, 129-133.

Iwasaki, A., and Kelsall, B. L. (1999). Mucosal immunity and inflammation. I. Mucosal dendritic cells: their specialized role in initiating T cell responses. *Am J Physiol* 276, G1074-1078.

Iwasaki, A., and Kelsall, B. L. (2000). Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3alpha, MIP-3beta, and secondary lymphoid organ chemokine. *J Exp Med* 191, 1381-1394.

Iwasaki, A., and Kelsall, B. L. (2001). Unique functions of CD11b+, CD8 alpha+, and double-negative Peyer's patch dendritic cells. *J Immunol* 166, 4884-4890.

Janeway, C. A., Jr., and Medzhitov, R. (1998). Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. *Semin Immunol* 10, 349-350.

Janeway, C. A., Jr., and Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20, 197-216.

Jiang, X., Takahashi, N., Ando, K., Otsuka, T., Tetsuka, T., and Okamoto, T. (2003a). NF-kappa B p65 transactivation domain is involved in the NF-kappa B-inducing kinase pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 301, 583-590.

Jiang, X., Takahashi, N., Matsui, N., Tetsuka, T., and Okamoto, T. (2003b). The NF-kappa B activation in lymphotoxin beta receptor signaling depends on the phosphorylation of p65 at serine 536. *J Biol Chem* 278, 919-926.

Jijon, H., Allard, B., and Jobin, C. (2004). NF-kappaB inducing kinase activates NF-kappaB transcriptional activity independently of IkappaB kinase gamma through a p38 MAPK-dependent RelA phosphorylation pathway. *Cell Signal* 16, 1023-1032.

Jin, D. Y., and Jeang, K. T. (1999). Isolation of full-length cDNA and chromosomal localization of human NF-kappaB modulator NEMO to Xq28. *J Biomed Sci* 6, 115-120.

Josien, R., Li, H. L., Ingulli, E., Sarma, S., Wong, B. R., Vologodskaya, M., Steinman, R. M., and Choi, Y. (2000). TRANCE, a tumor necrosis factor family member, enhances the longevity and adjuvant properties of dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 191, 495-502.

Kaisho, T., Takeda, K., Tsujimura, T., Kawai, T., Nomura, F., Terada, N., and Akira, S. (2001). IkappaB kinase alpha is essential for mature B cell development and function. *J Exp Med* 193, 417-426.

Kamath, A. T., Henri, S., Battye, F., Tough, D. F., and Shortman, K. (2002). Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs. *Blood* 100, 1734-1741.

Karin, M., and Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 18, 621-663.

Karin, M., and Delhase, M. (1998). JNK or IKK, AP-1 or NF-kappaB, which are the targets for MEK kinase 1 action? *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9067-9069.

Karin, M., and Lin, A. (2002). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 3, 221-227.

Kayagaki, N., Yan, M., Seshasayee, D., Wang, H., Lee, W., French, D. M., Grewal, I. S., Cochran, A. G., Gordon, N. C., Yin, J., *et al.* (2002). BAFF/BLyS receptor 3 binds the B cell survival factor BAFF ligand through a discrete surface loop and promotes processing of NF-kappaB2. *Immunity* 17, 515-524.

Keates, S., Hitti, Y. S., Upton, M., and Kelly, C. P. (1997). Helicobacter pylori infection activates NF-kappa B in gastric epithelial cells. *Gastroenterology* 113, 1099-1109.

Kim, H., Lim, J. W., and Kim, K. H. (2001). Helicobacter pylori-induced expression of interleukin-8 and cyclooxygenase-2 in AGS gastric epithelial cells: mediation by nuclear factor-kappaB. *Scand J Gastroenterol* 36, 706-716.

Klement, J. F., Rice, N. R., Car, B. D., Abbondanzo, S. J., Powers, G. D., Bhatt, P. H., Chen, C. H., Rosen, C. A., and Stewart, C. L. (1996). IkappaBalpha deficiency results in a sustained NF-kappaB response and severe widespread dermatitis in mice. *Mol Cell Biol* 16, 2341-2349.

Knight, S. C., and Stagg, A. J. (1993). Antigen-presenting cell types. *Curr Opin Immunol* 5, 374-382.

Krummel, M. F., and Allison, J. P. (1995). CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med* 182, 459-465.

Labarca, C., and Paigen, K. (1980). A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal Biochem* 102, 344-352.

Landy, S. J., and Donnai, D. (1993). Incontinentia pigmenti (Bloch-Sulzberger syndrome). *J Med Genet* 30, 53-59.

Langenkamp, A., Messi, M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2000). Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol* 1, 311-316.

Larsen, C. P., Ritchie, S. C., Hendrix, R., Linsley, P. S., Hathcock, K. S., Hodes, R. J., Lowry, R. P., and Pearson, T. C. (1994). Regulation of immunostimulatory function and costimulatory molecule (B7-1 and B7-2) expression on murine dendritic cells. *J Immunol* 152, 5208-5219.

Lawrence, T., Bebien, M., Liu, G. Y., Nizet, V., and Karin, M. (2005). IKKalpha limits macrophage NF-kappaB activation and contributes to the resolution of inflammation. *Nature* 434, 1138-1143.

Lee, S. H., and Hannink, M. (2002). Characterization of the nuclear import and export functions of Ikappa B(epsilon). *J Biol Chem* 277, 23358-23366.

Leenen, P. J., Radosevic, K., Voerman, J. S., Salomon, B., van Rooijen, N., Klatzmann, D., and van Ewijk, W. (1998). Heterogeneity of mouse spleen dendritic cells: in vivo phagocytic activity, expression of macrophage markers, and subpopulation turnover. *J Immunol* 160, 2166-2173.

Lefrancois, L., Marzo, A., and Williams, K. (2003). Sustained response initiation is required for T cell clonal expansion but not for effector or memory development in vivo. *J Immunol* 171, 2832-2839.

- Lenschow, D. J., Walunas, T. L., and Bluestone, J. A. (1996). CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* *14*, 233-258.
- Leo, E., Deveraux, Q. L., Buchholtz, C., Welsh, K., Matsuzawa, S., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. (2001). TRAF1 is a substrate of caspases activated during tumor necrosis factor receptor-alpha-induced apoptosis. *J Biol Chem* *276*, 8087-8093.
- Levkau, B., Scatena, M., Giachelli, C. M., Ross, R., and Raines, E. W. (1999). Apoptosis overrides survival signals through a caspase-mediated dominant-negative NF-kappa B loop. *Nat Cell Biol* *1*, 227-233.
- Li, M., Davey, G. M., Sutherland, R. M., Kurts, C., Lew, A. M., Hirst, C., Carbone, F. R., and Heath, W. R. (2001). Cell-associated ovalbumin is cross-presented much more efficiently than soluble ovalbumin in vivo. *J Immunol* *166*, 6099-6103.
- Li, Q., Lu, Q., Hwang, J. Y., Buscher, D., Lee, K. F., Izpisua-Belmonte, J. C., and Verma, I. M. (1999a). IKK1-deficient mice exhibit abnormal development of skin and skeleton. *Genes Dev* *13*, 1322-1328.
- Li, Q., Van Antwerp, D., Mercurio, F., Lee, K. F., and Verma, I. M. (1999b). Severe liver degeneration in mice lacking the IkappaB kinase 2 gene. *Science* *284*, 321-325.
- Li, Q., and Verma, I. M. (2002). NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* *2*, 725-734.
- Li, Z. W., Chu, W., Hu, Y., Delhase, M., Deerinck, T., Ellisman, M., Johnson, R., and Karin, M. (1999c). The IKKbeta subunit of IkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis. *J Exp Med* *189*, 1839-1845.
- Lieberam, I., and Forster, I. (1999). The murine beta-chemokine TARC is expressed by subsets of dendritic cells and attracts primed CD4+ T cells. *Eur J Immunol* *29*, 2684-2694.
- Lin, D., Edwards, A. S., Fawcett, J. P., Mbamalu, G., Scott, J. D., and Pawson, T. (2000). A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. *Nat Cell Biol* *2*, 540-547.
- Ling, L., Cao, Z., and Goeddel, D. V. (1998). NF-kappaB-inducing kinase activates IKK-alpha by phosphorylation of Ser-176. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 3792-3797.
- Liu, Z. G., Hsu, H., Goeddel, D. V., and Karin, M. (1996). Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell* *87*, 565-576.

- Lortholary, O., Improvisi, L., Fitting, C., Cavaillon, J. M., and Dromer, F. (2002). Influence of gender and age on course of infection and cytokine responses in mice with disseminated *Cryptococcus neoformans* infection. *Clin Microbiol Infect* 8, 31-37.
- Ludewig, B., Graf, D., Gelderblom, H. R., Becker, Y., Kroczeck, R. A., and Pauli, G. (1995). Spontaneous apoptosis of dendritic cells is efficiently inhibited by TRAP (CD40-ligand) and TNF-alpha, but strongly enhanced by interleukin-10. *Eur J Immunol* 25, 1943-1950.
- Makris, C., Godfrey, V. L., Krahn-Sentfleben, G., Takahashi, T., Roberts, J. L., Schwarz, T., Feng, L., Johnson, R. S., and Karin, M. (2000). Female mice heterozygous for IKK gamma/NEMO deficiencies develop a dermatopathy similar to the human X-linked disorder incontinentia pigmenti. *Mol Cell* 5, 969-979.
- Maldonado-Lopez, R., Maliszewski, C., Urbain, J., and Moser, M. (2001). Cytokines regulate the capacity of CD8alpha(+) and CD8alpha(-) dendritic cells to prime Th1/Th2 cells in vivo. *J Immunol* 167, 4345-4350.
- Manz, M. G., Traver, D., Miyamoto, T., Weissman, I. L., and Akashi, K. (2001). Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* 97, 3333-3341.
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12, 991-1045.
- May, M. J., and Ghosh, S. (1997). Rel/NF-kappa B and I kappa B proteins: an overview. *Semin Cancer Biol* 8, 63-73.
- May, M. J., and Ghosh, S. (1998). Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol Today* 19, 80-88.
- McKinsey, T. A., Chu, Z. L., and Ballard, D. W. (1997). Phosphorylation of the PEST domain of IkappaBbeta regulates the function of NF-kappaB/IkappaBbeta complexes. *J Biol Chem* 272, 22377-22380.
- Medina, E., Goldmann, O., Rohde, M., Lengeling, A., and Chhatwal, G. S. (2001). Genetic control of susceptibility to group A streptococcal infection in mice. *J Infect Dis* 184, 846-852.
- Meinkoth, J., and Wahl, G. (1984). Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal Biochem* 138, 267-284.
- Mock, B. A., and Nacy, C. A. (1988). Hormonal modulation of sex differences in resistance to *Leishmania major* systemic infections. *Infect Immun* 56, 3316-3319.
- Mullis, K. B., and Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155, 335-350.

Murphy, T. L., Cleveland, M. G., Kulesza, P., Magram, J., and Murphy, K. M. (1995). Regulation of interleukin 12 p40 expression through an NF-kappa B half-site. *Mol Cell Biol* 15, 5258-5267.

Nakano, H., Shindo, M., Sakon, S., Nishinaka, S., Mihara, M., Yagita, H., and Okumura, K. (1998). Differential regulation of IkappaB kinase alpha and beta by two upstream kinases, NF-kappaB-inducing kinase and mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3537-3542.

Neurath, M. F., Pettersson, S., Meyer zum Buschenfelde, K. H., and Strober, W. (1996). Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B abrogates established experimental colitis in mice. *Nat Med* 2, 998-1004.

Nicolo, C., Tomassini, B., Rippo, M. R., and Testi, R. (2001). UVB-induced apoptosis of human dendritic cells: contribution by caspase-dependent and caspase-independent pathways. *Blood* 97, 1803-1808.

Noguchi, Y., Richards, E. C., Chen, Y. T., and Old, L. J. (1995). Influence of interleukin 12 on p53 peptide vaccination against established Meth A sarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 2219-2223.

Ohteki, T., Fukao, T., Suzue, K., Maki, C., Ito, M., Nakamura, M., and Koyasu, S. (1999). Interleukin 12-dependent interferon gamma production by CD8alpha+ lymphoid dendritic cells. *J Exp Med* 189, 1981-1986.

O'Sullivan, B., and Thomas, R. (2003). CD40 and dendritic cell function. *Crit Rev Immunol* 23, 83-107.

O'Sullivan, B. J., and Thomas, R. (2002). CD40 ligation conditions dendritic cell antigen-presenting function through sustained activation of NF-kappaB. *J Immunol* 168, 5491-5498.

Ouaaz, F., Arron, J., Zheng, Y., Choi, Y., and Beg, A. A. (2002). Dendritic cell development and survival require distinct NF-kappaB subunits. *Immunity* 16, 257-270.

Pahl, H. L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18, 6853-6866.

Palanki, M. S. (2002). Inhibitors of AP-1 and NF-kappa B mediated transcriptional activation: therapeutic potential in autoimmune diseases and structural diversity. *Curr Med Chem* 9, 219-227.

Pearson, T. C., Alexander, D. Z., Hendrix, R., Elwood, E. T., Linsley, P. S., Winn, K. J., and Larsen, C. P. (1996). CTLA4-Ig plus bone marrow induces long-term allograft survival and donor specific unresponsiveness in the murine model. Evidence for hematopoietic chimerism. *Transplantation* 61, 997-1004.

Phillips, R. J., and Ghosh, S. (1997). Regulation of IkappaB beta in WEHI 231 mature B cells. *Mol Cell Biol* 17, 4390-4396.

Pierre, P., and Mellman, I. (1998). Exploring the mechanisms of antigen processing by cell fractionation. *Curr Opin Immunol* 10, 145-153.

Pierre, P., Turley, S. J., Gatti, E., Hull, M., Meltzer, J., Mirza, A., Inaba, K., Steinman, R. M., and Mellman, I. (1997). Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature* 388, 787-792.

Pirtskhalaishvili, G., Shurin, G. V., Gambotto, A., Esche, C., Wahl, M., Yurkovetsky, Z. R., Robbins, P. D., and Shurin, M. R. (2000). Transduction of dendritic cells with Bcl-xL increases their resistance to prostate cancer-induced apoptosis and antitumor effect in mice. *J Immunol* 165, 1956-1964.

Pooley, J. L., Heath, W. R., and Shortman, K. (2001). Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8- dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8+ dendritic cells. *J Immunol* 166, 5327-5330.

Power, C. A., Church, D. J., Meyer, A., Alouani, S., Proudfoot, A. E., Clark-Lewis, I., Sozzani, S., Mantovani, A., and Wells, T. N. (1997). Cloning and characterization of a specific receptor for the novel CC chemokine MIP-3alpha from lung dendritic cells. *J Exp Med* 186, 825-835.

Randolph, G. J., Inaba, K., Robbiani, D. F., Steinman, R. M., and Muller, W. A. (1999). Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* 11, 753-761.

Reis e Sousa, C., Hieny, S., Scharon-Kersten, T., Jankovic, D., Charest, H., Germain, R. N., and Sher, A. (1997). In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J Exp Med* 186, 1819-1829.

Rescigno, M., Martino, M., Sutherland, C. L., Gold, M. R., and Ricciardi-Castagnoli, P. (1998). Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *J Exp Med* 188, 2175-2180.

Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J. P., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2, 361-367.

Reuther, J. Y., and Baldwin, A. S., Jr. (1999). Apoptosis promotes a caspase-induced amino-terminal truncation of IkappaBalpha that functions as a stable inhibitor of NF-kappaB. *J Biol Chem* 274, 20664-20670.

- Rice, N. R., and Ernst, M. K. (1993). In vivo control of NF-kappa B activation by I kappa B alpha. *Embo J* 12, 4685-4695.
- Rogler, G., Brand, K., Vogl, D., Page, S., Hofmeister, R., Andus, T., Knuechel, R., Baeuerle, P. A., Scholmerich, J., and Gross, V. (1998). Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology* 115, 357-369.
- Romagnani, S. (2002). Cytokines and chemoattractants in allergic inflammation. *Mol Immunol* 38, 881-885.
- Ross, R., Gillitzer, C., Kleinz, R., Schwing, J., Kleinert, H., Forstermann, U., and Reske-Kunz, A. B. (1998). Involvement of NO in contact hypersensitivity. *Int Immunol* 10, 61-69.
- Rossi, D., and Zlotnik, A. (2000). The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 18, 217-242.
- Rudolph, D., Yeh, W. C., Wakeham, A., Rudolph, B., Nallainathan, D., Potter, J., Elia, A. J., and Mak, T. W. (2000). Severe liver degeneration and lack of NF-kappaB activation in NEMO/IKKgamma-deficient mice. *Genes Dev* 14, 854-862.
- Ruedl, C., Storni, T., Lechner, F., Bachi, T., and Bachmann, M. F. (2002). Cross-presentation of virus-like particles by skin-derived CD8(-) dendritic cells: a dispensable role for TAP. *Eur J Immunol* 32, 818-825.
- Rupic, R. A., Jundt, F., Rebholz, B., Eckelt, B., Weindl, G. N., Herzinger, T., Flaig, M. J., Moosmann, S., Plewig, G., Dorken, B., *et al.* (2005). Stroma-Mediated Dysregulation of Myelopoiesis in Mice Lacking IkappaBalpha. *Immunity* 22, 479-491.
- Sachdev, S., Hoffmann, A., and Hannink, M. (1998). Nuclear localization of IkappaB alpha is mediated by the second ankyrin repeat: the IkappaB alpha ankyrin repeats define a novel class of cis-acting nuclear import sequences. *Mol Cell Biol* 18, 2524-2534.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Salem, M. L. (2004). Estrogen, a double-edged sword: modulation of TH1- and TH2-mediated inflammations by differential regulation of TH1/TH2 cytokine production. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 3, 97-104.
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 182, 389-400.

- Sallusto, F., Lenig, D., Mackay, C. R., and Lanzavecchia, A. (1998a). Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* 187, 875-883.
- Sallusto, F., Palermo, B., Lenig, D., Miettinen, M., Matikainen, S., Julkunen, I., Forster, R., Burgstahler, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999). Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *Eur J Immunol* 29, 1617-1625.
- Sallusto, F., Schaerli, P., Loetscher, P., Schaniel, C., Lenig, D., Mackay, C. R., Qin, S., and Lanzavecchia, A. (1998b). Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 28, 2760-2769.
- Sanjabi, S., Hoffmann, A., Liou, H. C., Baltimore, D., Smale, S. T. (2000). Selective requirement for c-Rel during IL-12P40 gene induction in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 23, 12705-10.
- Sauer, B., and Henderson, N. (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5166-5170.
- Schaniel, C., Sallusto, F., Ruedl, C., Sideras, P., Melchers, F., and Rolink, A. G. (1999). Three chemokines with potential functions in T lymphocyte-independent and -dependent B lymphocyte stimulation. *Eur J Immunol* 29, 2934-2947.
- Schindler, U., and Baichwal, V. R. (1994). Three NF-kappa B binding sites in the human E-selectin gene required for maximal tumor necrosis factor alpha-induced expression. *Mol Cell Biol* 14, 5820-5831.
- Schindler, R., Mancilla, J., Endres, S., Ghorbani, R., Clark, S.C., Dinarello, C. A. (1990). Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood* 1, 40-7.
- Schlecht, G., Leclerc, C., and Dadaglio, G. (2001). Induction of CTL and nonpolarized Th cell responses by CD8alpha(+) and CD8alpha(-) dendritic cells. *J Immunol* 167, 4215-4221.
- Schmidt, C. S., and Mescher, M. F. (1999). Adjuvant effect of IL-12: conversion of peptide antigen administration from tolerizing to immunizing for CD8+ T cells in vivo. *J Immunol* 163, 2561-2567.
- Schmidt-Supprian, M., Bloch, W., Courtois, G., Addicks, K., Israel, A., Rajewsky, K., and Pasparakis, M. (2000). NEMO/IKK gamma-deficient mice model incontinentia pigmenti. *Mol Cell* 5, 981-992.

Schmidt-Supprian, M., Courtois, G., Tian, J., Coyle, A. J., Israel, A., Rajewsky, K., and Pasparakis, M. (2003). Mature T cells depend on signaling through the IKK complex. *Immunity* 19, 377-389.

Schmidt-Supprian, M., Tian, J., Ji, H., Terhorst, C., Bhan, A. K., Grant, E. P., Pasparakis, M., Casola, S., Coyle, A. J., and Rajewsky, K. (2004). I kappa B kinase 2 deficiency in T cells leads to defects in priming, B cell help, germinal center reactions, and homeostatic expansion. *J Immunol* 173, 1612-1619.

Schwenzer, R., Siemienski, K., Liptay, S., Schubert, G., Peters, N., Scheurich, P., Schmid, R. M., and Wajant, H. (1999). The human tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 1 gene (TRAF1) is up-regulated by cytokines of the TNF ligand family and modulates TNF-induced activation of NF-kappaB and c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* 274, 19368-19374.

Sen, R., and Baltimore, D. (1986). Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47, 921-928.

Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F. R., Krahn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S. C., and Karin, M. (2001). Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* 293, 1495-1499.

Shiina, T., Konno, A., Oonuma, T., Kitamura, H., Imaoka, K., Takeda, N., Todokoro, K., and Morimatsu, M. (2004). Targeted disruption of MAIL, a nuclear IkappaB protein, leads to severe atopic dermatitis-like disease. *J Biol Chem* 279, 55493-55498.

Shinkura, R., Kitada, K., Matsuda, F., Tashiro, K., Ikuta, K., Suzuki, M., Kogishi, K., Serikawa, T., and Honjo, T. (1999). Alymphoplasia is caused by a point mutation in the mouse gene encoding Nf-kappa b-inducing kinase. *Nat Genet* 22, 74-77.

Siebenlist, U., Franzoso, G., and Brown, K. (1994). Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol* 10, 405-455.

Smith, R. M., Morgan, A., and Wraith, D. C. (1994). Anti-class II MHC antibodies prevent and treat EAE without APC depletion. *Immunology* 83, 1-8.

Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98, 503-517.

Sozzani, S., Allavena, P., D'Amico, G., Luini, W., Bianchi, G., Kataru, M., Imai, T., Yoshie, O., Bonecchi, R., and Mantovani, A. (1998). Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol* 161, 1083-1086.

Steinman, R. M., and Cohn, Z. A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137, 1142-1162.

- Steinman, R. M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9, 271-96.
- Takeda, K., Takeuchi, O., Tsujimura, T., Itami, S., Adachi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Yoshikawa, K., Terada, N., and Akira, S. (1999). Limb and skin abnormalities in mice lacking IKKalpha. *Science* 284, 313-316.
- Tanaka, M., Fuentes, M. E., Yamaguchi, K., Durnin, M. H., Dalrymple, S. A., Hardy, K. L., and Goeddel, D. V. (1999). Embryonic lethality, liver degeneration, and impaired NF-kappa B activation in IKK-beta-deficient mice. *Immunity* 10, 421-429.
- Tang, G., Yang, J., Minemoto, Y., and Lin, A. (2001). Blocking caspase-3-mediated proteolysis of IKKbeta suppresses TNF-alpha-induced apoptosis. *Mol Cell* 8, 1005-1016.
- Tas, S. W., de Jong, E. C., Hajji, N., May, M. J., Ghosh, S., Vervoordeldonk, M. J., and Tak, P. P. (2005). Selective inhibition of NF-kappaB in dendritic cells by the NEMO-binding domain peptide blocks maturation and prevents T cell proliferation and polarization. *Eur J Immunol* 35, 1164-1174.
- Tian, B., Nowak, D. E., Jamaluddin, M., Wang, S., and Brasier, A. R. (2005). Identification of direct genomic targets downstream of the NF-kappa B transcription factor mediating TNF signaling. *J Biol Chem*.
- Traenckner, E. B., Pahl, H. L., Henkel, T., Schmidt, K. N., Wilk, S., and Baeuerle, P. A. (1995). Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli. *Embo J* 14, 2876-2883.
- Tran, K., Merika, M., and Thanos, D. (1997). Distinct functional properties of IkappaB alpha and IkappaB beta. *Mol Cell Biol* 17, 5386-5399.
- Traver, D., Akashi, K., Manz, M., Merad, M., Miyamoto, T., Engleman, E. G., and Weissman, I. L. (2000). Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science* 290, 2152-2154.
- Van Antwerp, D. J., Martin, S. J., Kafri, T., Green, D. R., and Verma, I. M. (1996). Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science* 274, 787-789.
- van Deventer, S. J., Buller, H. R., ten Cate, J. W., Aarden, L. A., Hack, C. E., and Sturk, A. (1990). Experimental endotoxemia in humans: analysis of cytokine release and coagulation, fibrinolytic, and complement pathways. *Blood* 76, 2520-2526.
- Van Seventer, G. A., Shimizu, Y., Horgan, K. J., and Shaw, S. (1990). The LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important costimulatory signal for T cell receptor-mediated activation of resting T cells. *J Immunol* 144, 4579-4586.

Vestergaard, C., Kirstejn, N., Gesser, B., Mortensen, J. T., Matsushima, K., and Larsen, C. G. (2001). IL-10 augments the IFN-gamma and TNF-alpha induced TARC production in HaCaT cells: a possible mechanism in the inflammatory reaction of atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 26, 46-54.

Vicari, A. P., Figueroa, D. J., Hedrick, J. A., Foster, J. S., Singh, K. P., Menon, S., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Bacon, K. B., and Zlotnik, A. (1997). TECK: a novel CC chemokine specifically expressed by thymic dendritic cells and potentially involved in T cell development. *Immunity* 7, 291-301.

Vremec, D., Pooley, J., Hochrein, H., Wu, L., and Shortman, K. (2000). CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J Immunol* 164, 2978-2986.

Wahl, G. M., Stern, M., and Stark, G. R. (1979). Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzyloxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 3683-3687.

Wang, C. Y., Guttridge, D. C., Mayo, M. W., and Baldwin, A. S., Jr. (1999). NF-kappaB induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 19, 5923-5929.

Wang, C. Y., Mayo, M. W., and Baldwin, A. S., Jr. (1996). TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* 274, 784-787.

Watts, C. (1997). Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu Rev Immunol* 15, 821-850.

Weih, F., Warr, G., Yang, H., and Bravo, R. (1997). Multifocal defects in immune responses in RelB-deficient mice. *J Immunol* 158, 5211-5218.

Whitmire, J. K., and Ahmed, R. (2000). Costimulation in antiviral immunity: differential requirements for CD4(+) and CD8(+) T cell responses. *Curr Opin Immunol* 12, 448-455.

Wiethe, C., Dittmar, K., Doan, T., Lindenmaier, W., and Tindle, R. (2003). Enhanced effector and memory CTL responses generated by incorporation of receptor activator of NF-kappa B (RANK)/RANK ligand costimulatory molecules into dendritic cell immunogens expressing a human tumor-specific antigen. *J Immunol* 171, 4121-4130.

Willems, F., Amraoui, Z., Vanderheyde, N., Verhasselt, V., Aksoy, E., Scaffidi, C., Peter, M. E., Krammer, P. H., and Goldman, M. (2000). Expression of c-FLIP(L) and resistance to CD95-mediated apoptosis of monocyte-derived dendritic cells: inhibition by bisindolylmaleimide. *Blood* 95, 3478-3482.

Woltman, A. M., van der Kooij, S. W., Coffey, P. J., Offringa, R., Daha, M. R., and van Kooten, C. (2003). Rapamycin specifically interferes with GM-CSF signaling in human

dendritic cells, leading to apoptosis via increased p27KIP1 expression. *Blood* 101, 1439-1445.

Wong, B. R., Josien, R., Lee, S. Y., Sauter, B., Li, H. L., Steinman, R. M., and Choi, Y. (1997). TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *J Exp Med* 186, 2075-2080.

Wong, B. R., Josien, R., Lee, S. Y., Vologodskaja, M., Steinman, R. M., and Choi, Y. (1998). The TRAF family of signal transducers mediates NF-kappaB activation by the TRANCE receptor. *J Biol Chem* 273, 28355-28359.

Woronicz, J. D., Gao, X., Cao, Z., Rothe, M., and Goeddel, D. V. (1997). IkappaB kinase-beta: NF-kappaB activation and complex formation with IkappaB kinase-alpha and NIK. *Science* 278, 866-869.

Wu, L., D'Amico, A., Hochrein, H., O'Keeffe, M., Shortman, K., and Lucas, K. (2001). Development of thymic and splenic dendritic cell populations from different hemopoietic precursors. *Blood* 98, 3376-3382.

Wu, L., D'Amico, A., Winkel, K. D., Suter, M., Lo, D., and Shortman, K. (1998). RelB is essential for the development of myeloid-related CD8alpha- dendritic cells but not of lymphoid-related CD8alpha+ dendritic cells. *Immunity* 9, 839-847.

Xiao, G., Cvijic, M. E., Fong, A., Harhaj, E. W., Uhlik, M. T., Waterfield, M., and Sun, S. C. (2001). Retroviral oncoprotein Tax induces processing of NF-kappaB2/p100 in T cells: evidence for the involvement of IKKalpha. *Embo J* 20, 6805-6815.

Yewdell, J. W., Norbury, C. C., and Bennink, J. R. (1999). Mechanisms of exogenous antigen presentation by MHC class I molecules in vitro and in vivo: implications for generating CD8+ T cell responses to infectious agents, tumors, transplants, and vaccines. *Adv Immunol* 73, 1-77.

Yin, M. J., Yamamoto, Y., and Gaynor, R. B. (1998). The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature* 396, 77-80.

Yoshie, O., Imai, T., and Nomiyama, H. (1997). Novel lymphocyte-specific CC chemokines and their receptors. *J Leukoc Biol* 62, 634-644.

Yoshimura, S., Bondeson, J., Brennan, F. M., Foxwell, B. M., and Feldmann, M. (2001a). Role of NFkappaB in antigen presentation and development of regulatory T cells elucidated by treatment of dendritic cells with the proteasome inhibitor PSI. *Eur J Immunol* 31, 1883-1893.

Yoshimura, S., Bondeson, J., Brennan, F. M., Foxwell, B. M., and Feldmann, M. (2003). Antigen presentation by murine dendritic cells is nuclear factor-kappa B dependent both in vitro and in vivo. *Scand J Immunol* 58, 165-172.

Yoshimura, S., Bondeson, J., Foxwell, B. M. J., Brennan, F. M., and Feldmann, M. (2001b). Effective antigen presentation by dendritic cells is NF- κ B dependent: coordinate regulation of MHC, co-stimulatory molecules and cytokines. *Int Immunol* 13, 675-683.

Zal, T., Volkmann, A., and Stockinger, B. (1994). Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen. *J Exp Med* 180, 2089-2099.

Zanetti, M., Castiglioni, P., Schoenberger, S., and Gerlioni, M. (2003). The role of relB in regulating the adaptive immune response. *Ann N Y Acad Sci* 987, 249-257.

Zhou, G., and Kuo, M. T. (1997). NF- κ B-mediated induction of mdr1b expression by insulin in rat hepatoma cells. *J Biol Chem* 272, 15174-15183.

7 Danksagung

Zum Schluss möchte ich mich bei all denen bedanken, ohne die diese Arbeit nicht entstanden wäre.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Irmgard Förster für die Möglichkeit, diese Arbeit in ihrem Labor anzufertigen sowie für die exzellente Betreuung und die kontinuierliche Unterstützung.

Bei Prof. Dr. Dr. h.c. Hermann Wagner möchte ich mich bedanken für die Möglichkeit, am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München diese Arbeit anzufertigen.

Herrn Prof. Dr. Alfons Gierl möchte ich danken für die freundliche Betreuung meiner Arbeit von Seiten der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München.

Bedanken möchte ich mich auch bei Matthias Schiemann für die Durchführung der MOFLO-Zellsortierungen.

Allen Kollegen, besonders dem Labor Förster, möchte ich für ihre stetige Hilfsbereitschaft danken: Andrea Behrens, Sabine Brauer, Inge Brosch, Claudia Buffleben, Steffi Förster, Dr. Matthias Lochner, Dr. Wolfgang Reindl, Dr. Sonja Seewaldt und Susie Weiß.

Last but not least möchte ich mich bei meinen Eltern für ihre Unterstützung und das in mich gesetzte Vertrauen bedanken.