



Forschungszentrum Karlsruhe
in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 7006

Die Rolle der Rel/NF- κ B- Transkriptionsfaktoren in der Reifung und Funktion dendritischer Zellen

T. Herrmann

Institut für Toxikologie und Genetik

Mai 2004

Forschungszentrum Karlsruhe
in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 7006

Die Rolle der Rel/NF- κ B-
Transkriptionsfaktoren
in der Reifung und Funktion
dendritischer Zellen

Tanja Herrmann

Institut für Toxikologie und Genetik

von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der
Universität Karlsruhe (TH)
genehmigte Disseration

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

2004

Impressum der Print-Ausgabe:

**Als Manuskript gedruckt
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor**

**Forschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe**

**Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft
Deutscher Forschungszentren (HGF)**

ISSN 0947-8620

urn:nbn:de:0005-070065

Die Rolle der Rel/NF- κ B- Transkriptionsfaktoren in der Reifung und Funktion dendritischer Zellen

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der
Universität Karlsruhe (TH)
genehmigte

DISSERTATION

von

Tanja Herrmann

Tag der mündlichen Prüfung: 15.02.04
Dekan: Prof. Dr. M. Kappes
Referent: PD Dr. Falk Weih
Korreferent: Prof. Dr. Margot Zöller

The role of Rel/NF- κ B transcription factors in maturation and function of dendritic cells

The Rel/NF- κ B family of transcription factors consists of the members NF- κ B1, NF- κ B2, RelA, RelB, and c-Rel, which play an important role in the expression of genes involved in immune responses, stress and inflammatory reactions, apoptosis, and cancer. All five members are expressed in bone marrow-derived dendritic cells (DCs), professional antigen presenting cells of the immune system. Characteristic of DCs is their ability to take up antigens in the periphery and to migrate to the T cell areas of secondary lymphoid organs, where they upregulate expression of several surface molecules that are important for the stimulation of naive T cells and the initiation of an immune response.

Aim of this work was to analyze the function of the Rel/NF- κ B transcription factors in DC maturation and immune response. Electrophoretic mobility shift assays revealed that during terminal maturation of DCs, which can be induced by different stimuli, DNA binding of Rel/NF- κ B proteins was strongly enhanced. Rel/NF- κ B-deficient DCs were generated in vitro from bone marrow (BM-DCs) of wild-type, RelB-, NF- κ B1-, and NF- κ B2-deficient mice and compared in functional tests. In this context, *nfkb1*^{-/-} BM-DCs were not able to upregulate costimulatory molecules characteristic for terminal maturation and required for proper T cell stimulation. *Nfkb1*^{-/-} BM-DCs also showed a reduced capacity in antigen-specific T cell stimulation assays. Whereas IL-12 production was impaired, enhanced IL-10 secretion could be observed after stimulation. In addition, *nfkb1*^{-/-} BM-DCs showed increased apoptosis independent of the maturation stage. In *relB*^{-/-} mice, impaired in vivo maturation of the CD8⁺ DC subpopulation could be confirmed, whereas *relB*^{-/-} BM-DCs were able to mature normally in vitro. Upregulation of MHC-II and costimulatory molecules during terminal maturation was comparable to wild-type BM-DCs. Although *relB*^{-/-} BM-DCs showed reduced IL-12 production after stimulation with LPS they were able to induce antigen-specific immune responses in vitro and in vivo. Since *relB*^{-/-} mice have a disrupted spleen architecture and lack lymph nodes it was not clear whether *relB*^{-/-} DCs are able to home to secondary lymphoid organs. This work demonstrates that *relB*^{-/-} BM-DCs can migrate to draining lymph nodes after adoptive transfer into syngeneic wild-type mice. In contrast to *relB*^{-/-} and *nfkb1*^{-/-} BM-DCs, *nfkb2*^{-/-} BM-DCs did not show marked differences compared to wild-type DCs. Thus, while both RelB and NF- κ B1 are important for IL-12 production, only NF- κ B1 plays a role in terminal maturation, T-cell stimulation, and apoptosis of BM-DC.

Zusammenfassung

Die Rel/NF- κ B-Transkriptionsfamilie in Säugetieren besteht aus den Mitgliedern NF- κ B1, NF- κ B2, RelA, RelB und c-Rel, welche eine bedeutende Rolle bei der Expression von Genen, die in Immunantworten, Streß- und Entzündungsreaktionen involviert sind, einnehmen. Alle fünf Familienmitglieder werden in antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems exprimiert, zu denen die dendritischen Zellen (DZ) zählen. DZ zeichnen sich durch ihre Migrationsfähigkeit aus, die es ihnen ermöglicht, aufgenommene Antigene aus den peripheren Geweben in die T-Zell-Bereiche der lymphoiden Organe zu transportieren. In den lymphoiden Organen erlangen DZ die Fähigkeit, T-Zellen antigenspezifisch zu aktivieren, um eine adäquate Immunantwort zu initiieren. Charakteristisch für DZ ist hierbei die Reifung, welche mit der Expression der für die verschiedenen Funktionen notwendigen Oberflächenmoleküle einhergeht. Ziel der Arbeit war die Analyse von Rel/NF- κ B-Transkriptionsfaktoren in der DZ-Reifung sowie in DZ-vermittelten Immunantworten.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch Gelretardationsexperimente eine verstärkte DNA-Bindung der Rel/NF- κ B-Familienmitglieder nach externer Stimulation, welche zu einer Endreifung der DZ führt, detektiert werden. In funktionellen Experimenten wurden DZ, die aus dem Knochenmark Rel/NF- κ B-defizienter Mäuse generiert wurden (KM-DZ), vergleichend untersucht. Hierbei zeigte sich in *nfkb1*^{-/-} KM-DZ ein Defizit in der Endreifung. In der Endreifung wird die Expression von kostimulatorischen Molekülen induziert, welche für die Stimulation von T-Zellen wichtig sind. In diesem Zusammenhang zeigte sich eine verminderte Fähigkeit der *nfkb1*^{-/-} KM-DZ, antigenspezifische Immunantworten auszulösen. Zusätzlich konnte in den *nfkb1*^{-/-} KM-DZ-Kulturen ein verändertes Zytokinmuster mit erhöhter IL-10 und verminderter IL-12 Produktion detektiert werden. Die *nfkb1*^{-/-} DZ, die sich nicht durch Stimulation zur Endreifung induzieren ließen, zeigten eine positive Färbung für CD45RB. Hierbei handelt es sich um ein Oberflächenmolekül, welches von einem DZ-Subtyp exprimiert wird, der die Differenzierung von regulatorischen T-Zellen induziert und damit eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz spielt. Darüber hinaus zeigten *nfkb1*^{-/-} DZ eine erhöhte Apoptoserate, die unabhängig vom Reifungszustand der Zellen war.

In *relB*^{-/-} Mäusen konnte der Defekt in der *in vivo* Reifung der CD8⁺ DZ-Subgruppe bestätigt werden, jedoch zeigten *relB*^{-/-} KM-DZ die Fähigkeit, *in vitro* zu reifen. Hierbei konnte eine mit wildtyp DZ vergleichbare Hochregulation von MHC-II und kostimulatorischer Moleküle wie CD86 und CD40 detektiert werden. Obwohl eine stark verminderte IL-12 Sekretion gemessen wurde, waren *relB*^{-/-} KM-DZ in der Lage, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* antigenspezifische Immunantworten auszulösen. Aufgrund fehlender Lymphknoten in *relB*^{-/-} Mäusen konnte bislang die Fähigkeit von *relB*^{-/-} DZ zur Migration aus der Epidermis in drainierende Lymphknoten nicht bestätigt werden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass *relB*^{-/-} KM-DZ nach adoptivem Transfer in syngene wildtyp Mäuse in der Lage sind, *in vivo* in wt Lymphknoten zu wandern.

1	EINLEITUNG	7
1.1	Dendritische Zellen	7
1.1.1	Entwicklung und Differenzierung von dendritischen Zellen	9
1.1.2	Immunregulation durch funktionelle Subgruppen	11
1.2	Die Transkriptionsfaktor-Familie Rel/NF-κB	13
1.2.1	Der NF- κ B-Signalübertragungsweg	14
1.2.2	Pathologische Veränderungen in Mäusen mit einem zerstörten Rel/NF- κ B Gen	17
2	MATERIAL UND METHODEN	20
2.1	Chemikalien und Bezugsquellen	20
2.2	Mäuse	20
2.3	Generierung von dendritischen Zellen aus dem Knochenmark	20
2.4	Isolierung von dendritischen Zellen aus lymphoiden Geweben der Maus	21
2.5	Isolierung von Langerhans Zellen aus der Epidermis	22
2.6	Generierung von Knochenmarkchimären	23
2.7	Durchflusszytometrische Messung	23
2.8	Apoptose und Zellviabilität	24
2.9	DNA-Bindung der NF-κB-Proteine	24
2.10	Funktionelle Tests mit dendritischen Zellen	26
2.10.1	FITC-Dextran Aufnahme Test	26
2.10.2	Gemischte Leukozyten-Reaktion (MLR)	27
2.10.3	Antigenspezifische Immunantwort	27
2.10.4	Bestimmung der Zytokinproduktion durch ELISA	27
2.10.5	Migrationsexperimente mit <i>relB</i> ^{-/-} dendritische Zellen	28
2.10.6	Kontakthypersensitivität	28
3	ERGEBNISSE	29
3.1	<i>In vitro</i> Generierung von dendritischen Zellen aus dem Knochenmark	29
3.2	DNA-Bindungsaktivität der Rel/NF-κB Proteine in dendritischen Zellen	30
3.3	Durchflusszytometrische Bestimmung der dendritischen Zell-Subgruppen in <i>relB</i>^{-/-}, <i>nfbk1</i>^{-/-} und <i>nfbk2</i>^{-/-} Mäusen	33
3.4	<i>In vitro</i> Reifung der Rel/NF-κB-defizienten dendritischen Zellen	36
3.4.1	NF- κ B1-defiziente dendritische Zellen lassen sich nur teilweise zur vollständigen Reifung induzieren	36

3.4.2	Zellzahlbestimmung und Viabilität der dendritischen Zellen	40
3.5	Funktionelle Tests mit Rel/NF-κB-defizienten dendritischen Zellen	42
3.5.1	Verminderte Antigenaufnahme bei <i>nfk2^{-/-}</i> dendritischen Zellen	42
3.5.2	<i>Nfk1^{-/-}</i> dendritische Zellen zeigen eine verminderte Fähigkeit zur T-Zell Stimulation	43
3.5.3	Reduzierte Anzahl von dendritischen Zellen in <i>nfk1^{-/-}nfk2^{-/-}</i> Doppel-Knockout-Mäusen	45
3.5.4	<i>Nfk1^{-/-}</i> dendritische Zellen exprimieren CD45RB	47
3.5.5	Erhöhte IL-10 Produktion in <i>nfk1^{-/-}</i> dendritischen Zellkulturen und reduzierte IL-12 Produktion in <i>relB^{-/-}</i> und <i>nfk1^{-/-}</i> dendritischen Zellkulturen	48
3.5.6	RelB-defiziente dendritische Zellen besitzen die Fähigkeit zur Migration	49
3.5.7	RelB-defiziente dendritische Zellen sind in der Lage eine Immunantwort <i>in vivo</i> auszulösen.	51
4	DISKUSSION	55
4.1	DNA-Bindungsaktivität der Rel/NF-κB-Proteine während der Reifung dendritischer Zellen	55
4.1.1	Durch Stimulation mit LPS und CD40L wird die DNA-Bindung der Rel/NF- κ B-Familienmitglieder p50, p52, RelA, RelB und c-Rel aktiviert	57
4.2	Funktionelle Experimente mit <i>nfk1^{-/-}</i> dendritischen Zellen	59
4.2.1	<i>Nfk1^{-/-}</i> dendritische Zellen gehen verstärkt in Apoptose	59
4.2.2	Erhöhte IL-10 Produktion in der <i>in vitro</i> Kultur von <i>nfk1^{-/-}</i> dendritischen Zellen	60
4.2.3	Reduzierte IL-12 Produktion in der <i>in vitro</i> Kultur von <i>nfk1^{-/-}</i> dendritischen Zellen	62
4.3	Funktionelle Experimente mit <i>nfk2^{-/-}</i> und <i>nfk1^{-/-}nfk2^{-/-}</i> dendritischen Zellen	62
4.4	Funktionelle Experimente mit <i>relB^{-/-}</i> dendritischen Zellen	63
4.4.1	<i>RelB^{-/-}</i> dendritische Zellen zeigen eine verminderte IL-12 Produktion	67
4.4.2	Die Rolle von RelB bei der <i>in vivo</i> Reifung von dendritischen Zellen	67
5	LITERATUR	69

Abkürzungen

µM	mikromolar
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
7-AAD	7-Amino-actinomycin D
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APZ	antigenpräsentierende Zelle
AV	Annexin V
Biot	biotinyliert
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD40L	<i>CD40-Ligand</i>
CHS	<i>contact hypersensitivity</i> (Kontakthypersensitivität)
cpm	<i>counts per minute</i>
Da	Dalton
DTH	<i>delayed type hypersensitivity</i> (Überempfindlichkeit vom verzögerten Typ)
DTT	Dithiothreitol
DZ	dendritische Zellen
EDTA	Ethylendiamin-N,N-tetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsorter
FITC	Fluoreszein Isothiocyanat
FITC-DX	FITC-Dextran
FKS	Fötale Kälberserum
FSC	<i>Forward scatter</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage-colony stimulating factor</i>
gr	Gramm
h	Stunde
HBSS	<i>Hank`s balanced salt solution</i>
IL	Interleukin
IκB	Inhibitor von NF-κB

i.v.	intravenös
KM	Knochenmark
KM-DZ	aus dem Knochenmark generierten DZ
Ktrl.	Kontrolle
LK	Lymphknoten
LPS	Lipopolysaccharid
LZ	Langerhans Zellen
MACS	<i>magnetic cell sorting</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MHC-II ^{int}	mittlere Expression des MHC-II-Komplex
min	Minute
MLR	gemischte Leukozyten-Reaktion
mM	millimolar
Mo	aus Monozyten generierte DZ
NF- κ B	<i>nuclear factor kappaB</i>
NP-40	Nonidet P40
OD	optische Dichte
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
poly I:C	<i>polyinosinic-polycytidylic</i>
RT	Raumtemperatur
s.c.	subcutan
SSC	<i>Sideward scatter</i>
T _H	Helfer-T-Zellen
TMB	Tetramethylbenzidin
TNBS	<i>picrylsulfonic acid</i>
TNCB	2, 4, 6-Trinitrochlorobenzen
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAF	TNF-Rezeptor-assoziiertes Faktor
wt	wildtyp

1 Einleitung

Die Aufgabe des Immunsystems ist es, fremde Stoffe zu erkennen und zu eliminieren, die durch ihr Eindringen in den Körper die Gesundheit des eigenen Organismus bedrohen. Um diese unzähligen und allgegenwärtigen Viren, Bakterien sowie andere Pathogene abwehren zu können, entwickelten sich in Säugetieren komplexe Mechanismen, die auf der Entwicklung von hochspezialisierter Zelltypen basieren. Für die Differenzierung dieser Zellen und die Ausführung ihrer spezialisierten Aufgaben wird eine schnelle und individuelle Expression einer Vielzahl von Genen benötigt. Im Laufe der Evolution entwickelte sich innerhalb dieser Zellen ein komplexes System, basierend auf hochspezialisierten Transkriptionsfaktoren. Einige dieser Proteine, die aufgrund ihrer strukturellen und funktionellen Ähnlichkeiten als Rel/NF- κ B-Familie zusammen gefasst werden, sind verstärkt in den sogenannten dendritischen Zellen aktiv. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Funktion von Rel/NF- κ B in diesen hochentwickelten, flexiblen und schnell reagierenden Zellen, die aufgrund ihrer regulatorischen Fähigkeiten eine zentrale Rolle im Immunsystem einnehmen.

1.1 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DZ) stellen eine kleine Population des zellulären Immunsystems dar, die sich aus proliferierenden Knochenmarkvorläuferzellen entwickeln. Durch ihre Migrationsfähigkeit sind sie in der Lage, Antigene aus den peripheren Organen schnell zu den Effektorzellen des Immunsystems in die sekundären lymphoiden Organen zu transportieren (Kraal et al., 1993; van Wilsem et al., 1994). Im sogenannten "unreifen" Zustand zeichnen sich DZ durch ihre Fähigkeit aus, Antigene durch Makropinozytose, Phagozytose oder über Rezeptoren zu internalisieren (Lanzavecchia 1990). Die aufgenommenen Antigene werden in speziellen Kompartimenten (MIIC = *MHC class II-rich compartments*) prozessiert und auf MHC-Moleküle geladen (Pierre et al., 1997). In der Epidermis der Haut werden antigenaufnehmende DZ als Langerhans Zellen (LZ) bezeichnet. Zur Initiierung einer Immunantwort wandern LZ zu den drainierenden Lymphknoten, um dort die Peptid-MHC-Komplexe den T-Zellen zu präsentieren (Kraal et al., 1993) (Abbildung 1). Das Potenzial T-Zellen zu aktivieren, erhalten DZ durch

Hochregulation von MHC-II und von kostimulatorischen Molekülen sowie der Produktion spezifischer Zytokine. In diesem Differenzierungszustand wird die DZ allgemein als reife DZ bezeichnet (Banchereau und Steinman, 1998). Das Resultat der T-Zell-Aktivierung ist nicht nur ein proliferierender antigenspezifischer T-Zellklon, sondern beinhaltet auch die Differenzierung in spezielle T-Zelltypen mit unterschiedlicher Zytokinproduktion. T-Zell-Differenzierung und Proliferation führen somit zu unterschiedlichen Arten von Immunantworten, wobei DZ auch bei der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz beteiligt sind (Walker und Abbas, 2001; Herrath und Harrison, 2003). In den letzten zehn Jahren wurde der Wissenschaft eine immer größer werdende Datenflut zur Verfügung gestellt, welche DZ als komplexe Zellen mit vielen spezialisierten Funktionen darstellt. Ob eine sogenannte unreife DZ soviel Plastizität besitzen kann, um flexibel die erforderliche Immunantwort einzuleiten, oder ob sich ein Zellsystem mit unterschiedlich funktionell ausgerüsteten Untergruppen entwickelt hat, ist zur Zeit eine zentrale Frage in der DZ-Forschung.

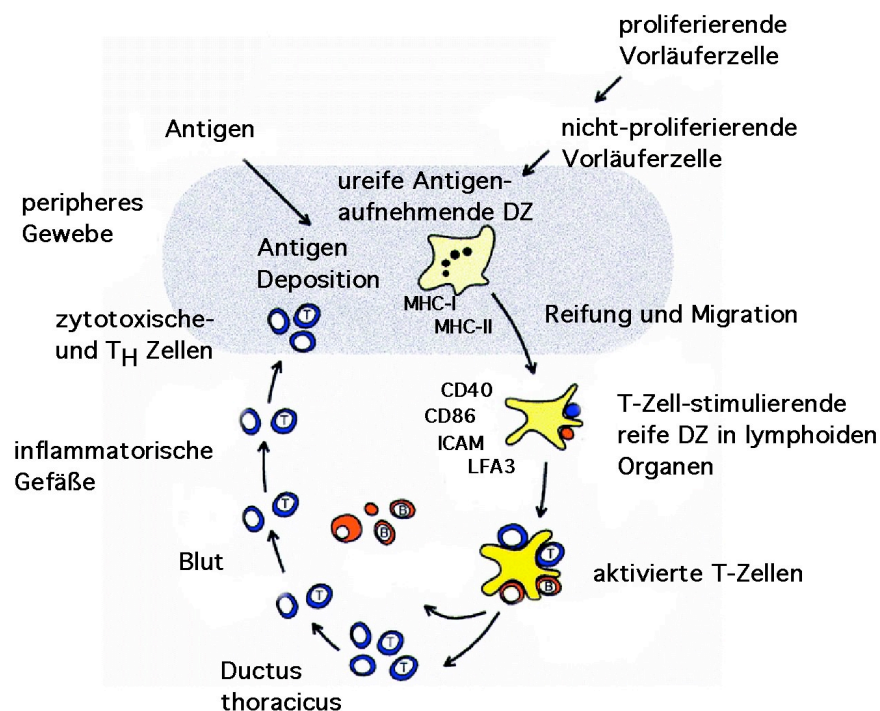


Abbildung 1. Funktionelle Reifung dendritischer Zellen. In peripheren Geweben nehmen unreife DZ Antigene auf, welche nach Prozessierung auf MHC-Moleküle geladen werden. DZ wandern daraufhin in die T-Zell Bereiche der lymphoiden Organe, wobei sie MHC-II und kostimulatorische Moleküle verstärkt exprimieren. Reife DZ stimulieren T-Zellen und leiten somit eine Immunantwort ein. DZ können zusätzlich B-Zellen binden, welche von T_H-Zellen zur Proliferation und Antikörperbildung aktiviert werden. Aktivierte T-Zellen verlassen die T-Zell Gebiete und gelangen über das Blut an die Stelle der Antigen Deposition, die sie durch Veränderungen in den inflammatorischen Gefäßen erkennen.

1.1.1 Entwicklung und Differenzierung von dendritischen Zellen

1973 wurden DZ erstmals als antigenpräsentierende Zellen beschrieben, deren Phänotyp und morphologische Ähnlichkeiten mit Makrophagen einen gemeinsamen myeloiden Ursprung vermuten ließ (Steinman et al., 1973). Zusätzlich beschrieb Inaba et al. (1993), dass sich Makrophagen, Granulozyten und DZ durch den Wachstumsfaktor GM-CSF aus einer gemeinsamen MHC-II-negativen Vorläuferzelle entwickeln. Als Sallusto und Lanzavecchia (1994) zeigen konnten, dass humane DZ *in vitro* von Monozyten generiert werden können, schien der myeloide Ursprung bestätigt. Etwa zeitgleich jedoch zeigten Rekonstitutionsexperimente, dass sich CD8⁺ DZ im Thymus aus einer CD4^{low} Vorläuferzelle entwickeln können (Ardavin et al., 1993; Wu et al., 1996). Daraufhin wurden die DZ in zwei Subgruppen eingeteilt: die CD8⁻CD11b⁺ myeloiden DZ mit myeloiden Ursprung und die CD8⁺CD11b⁻ lymphoiden DZ mit lymphoiden Ursprung. Es konnte jedoch später gezeigt werden, dass beide Subtypen sowohl aus einer gemeinsamen CD4^{low} Vorläuferzelle (Martin et al. 2000) als auch aus einer gemeinsamen myeloiden Vorläuferzelle hervorgehen können (Traver et al., 2000). Darüberhinaus entwickeln sich nach Koinjektion der beiden Vorläuferzellen simultan aus diesen CD8⁻ und CD8⁺ DZ in Milz und Thymus. Zusätzlich wurde im Blut von Mäusen eine von myeloidem und lymphoidem Differenzierungspotenzial freie DZ-restringierte Vorläuferzelle beschrieben, die sich sowohl in CD8⁻ und CD8⁺ als auch in plasmazytoide B220⁺ DZ entwickeln kann (del Hoyo et al., 2002a). Selbst wenn Rekonstitutionsexperimente in bestrahlten Mäusen nur eingeschränkt eine *in vivo* Situation widerspiegeln, muss die Einteilung und Bezeichnung der DZ-Subgruppen neu überdacht werden.

Grundlegend können für die Entwicklung von DZ drei unterschiedliche Modelle in Betracht gezogen werden (Abbildung 2): a) eine funktionelle Endreifung in unterschiedliche Subgruppen aus unreifen DZ, die sich aus einer Linie entwickelt haben. Hierbei könnte sowohl die Umgebung der DZ als auch die Art der Infektion die Differenzierung zu einer spezialisierten DZ-Subgruppe beeinflussen. Während der Evolution entwickelten sich in Bakterien oder Parasiten konservierte molekulare Strukturen. Durch deren Bindung an spezielle Muster-erkennende Rezeptoren (PRR = *pattern-recognition receptors*) wie z.B. TLRs (*Toll-like receptors*) könnten über die Induktion unterschiedlicher Signaltransduktionswege die erforderlichen Transkriptionsfaktoren aktiviert werden (Reis e Sousa et al., 2002); b) eine unabhängige Entwicklung von funktionell spezialisierten Subgruppen aus mehreren Linien bzw. c) die DZ durchlaufen eine Entwicklungslinie bis zur Endreifung, wobei die sogenannten

Subgruppen lediglich die unterschiedlichen Reifungszustände widerspiegeln. Passend zu dieser Theorie wird die Frage diskutiert, ob sich $CD8^+$ DZ aus $CD8^-$ DZ entwickeln. Immunhistologische Färbungen ergaben, dass $CD8^-$ DZ in der marginalen Zone der Milz lokalisiert sind, während sich $CD8^+$ DZ im Inneren der weißen Pulpa befinden (Leenen et al., 1998). Interessanterweise bewirkt die Zugabe von LPS eine Migration der $CD8^-$ DZ in das Innere der weißen Pulpa, korrelierend mit der Hochregulation von DEC-205, ein endozytotischer Rezeptor, welcher von $CD8^+$ DZ exprimiert wird (Reis e Sousa et al., 1997). Außerdem konnte gezeigt werden, dass $CD8^-$ DZ, welche in ein Ly5.1/Ly5.2 System transferiert wurden, durch Hochregulation von $CD8$, DEC-205 und Herunterregulation von $CD11b$ und $CD4$ *in vivo* den Phänotyp von $CD8^+$ DZ erlangten (del Hoyo et al. 2002b). Gegen diese Theorie – und für die unabhängige Subgruppen-Entwicklung - stehen die Bromodeoxyuridin-Markierungsexperimente von Kamath et al. (2000), in denen die drei DZ-Subgruppen $CD4^+CD8^-$, $CD4^-CD8^-$ und $CD4^-CD8^+$ jeweils eine sehr kurze Halbwertszeit von 1,5 – 2,9 Tagen zeigen. Hierbei konnte bei der unreifer erscheinenden $CD4^+CD8^-$ Subgruppe der langsamste Umsatz beobachtet werden, woraus geschlossen wurde, dass sich diese DZ nicht weiter in $CD4^-CD8^-$ bzw. $CD4^-CD8^+$ DZ differenzieren. Darüber hinaus konnte in einem weiterführenden Experiment durch kontinuierliche Depletion der $CD4^+CD8^-$ Subgruppe keine Abnahme der $CD4^-CD8^-$ und $CD4^-CD8^+$ DZ detektiert werden.

Aufgrund der schnellen Plastizität und Komplexität der DZ ist eine Mischung dieser Theorien nicht ausgeschlossen und würde den DZ innerhalb der Entwicklung des gesamten Immunsystems, welches auf neue Gefahren flexibel reagieren muss, eine bedeutende Rolle geben.

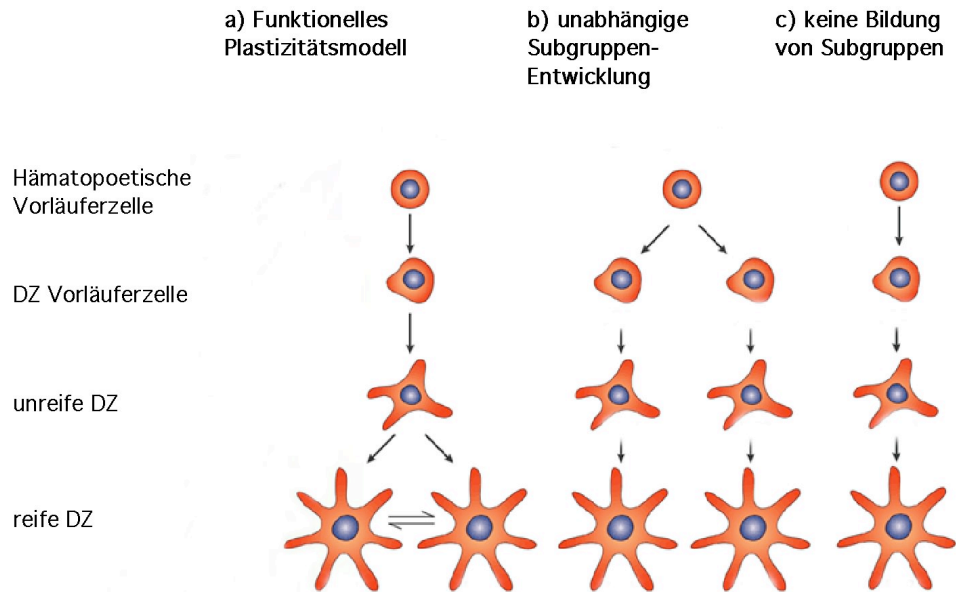


Abbildung 2. Alternative Modelle für die DZ-Entwicklung und Bildung der funktionellen Subgruppen. **a)** Eine funktionelle Endreifung in unterschiedliche Subgruppen aus einer unreifen DZ, die sich aus einer Linie entwickelt hat. Diese unreife DZ würde eine sehr große Plastizität besitzen, um auf die jeweiligen äußeren Einflüsse zu reagieren. **b)** Eine unabhängige Entwicklung von funktionell spezialisierten Subgruppen. Hierbei divergieren die Vorläuferzellen schon früh während der Hämatopoese. **c)** Die DZ durchlaufen eine Entwicklungslinie bis zur Endreifung. Die Zellen reagiert nicht flexibel, sondern jeder Entwicklungsschritt induziert den nächsten funktionellen Phänotyp.

1.1.2 Immunregulation durch funktionelle Subgruppen

DZ können in Bezug auf die Expression spezifischer Oberflächenmoleküle und ihrem lokalen Vorkommen in den Organen in Subgruppen eingeteilt werden. Als ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal diente in den letzten Jahren die Expression von CD4 und CD8, wobei deren Funktionen auf DZ noch nicht bekannt sind. Die am häufigsten vorkommenden Subgruppen sind die $CD8^-CD4^-CD11b^+DEC-205^-$ DZ, die $CD8^+CD4^-CD11b^-DEC-205^+$ DZ und die $CD8^-CD4^+CD11b^+DEC-205^-$ DZ (Vremec et al., 1992; Vremec et al., 2000; Henri et al., 2001).

In der Milz und den Peyerschen Plaques des Dünndarms sind $CD8^-CD4^-$ DZ in der Marginalzone bzw. dem subepithelialen Dom lokalisiert, in denen verstärkt Antigenaufnahme stattfindet, während die $CD8^+CD4^-$ DZ in den T-Zell-Bereichen dieser Organe detektiert werden können. Dementsprechend weisen $CD8^-CD4^-$ DZ eine größere endozytotische und phagozytotische Fähigkeit auf als $CD8^+CD4^-$ DZ, denen ein größeres Potenzial zur T-Zell-Stimulation zugeschrieben wird (Leenen et al., 1998). $CD8^+CD4^-$ DZ produzieren größere Mengen an $IFN-\gamma$ und IL-12 und induzieren *in vivo* hauptsächlich eine T_H1 T-Zell-Antwort, welche inflammatorische und zytotoxische Funktionen fördern. $CD8^-CD4^-$ DZ vermitteln verstärkt eine T_H2 T-Zell-Antwort, was in

die verstärkte Sekretion von IL-4 und IL-5 resultiert und oft in Zusammenhang mit Antikörper- und allergischen Reaktionen steht (Maldonado-López et al., 1999). *In vitro* können jedoch beide DZ-Subgruppen nach mikrobieller Stimulation IL-12 produzieren, wobei hier die Art des Pathogens die Zytokinproduktion beeinflusst. LPS von *E. coli* z. B. stimuliert CD8⁺CD4⁻ DZ zur IL-12 Produktion und der Aktivierung einer T_H1 T-Zell-Antwort, LPS von *P. gingivalis* hingegen bewirkt die Induktion einer T_H2 T-Zell-Antwort (Pulendran et al., 2001). Im Gegensatz hierzu scheinen die CD8⁻CD4⁺ DZ generell nicht in der Lage zu sein IL-12 zu produzieren, wobei eine Sekretion von IL-10 nach Stimulation detektiert werden kann (Reis e Sousa et al., 2003). Die CD8⁻CD4⁻ CD11b⁺DEC-205⁺ DZ repräsentieren eine weitere Subgruppe in Milz und Lymphknoten, deren Funktionen jedoch noch nicht näher beschrieben wurden.

In den peripheren Lymphknoten kann zusätzlich zu den oben erwähnten Subgruppen eine DZ-Population mit der Expression von CD8^{int}DEC-205⁺CD11b⁺ und Langerin⁺ detektiert werden. Bei diesen Zellen handelt es sich vermutlich um reife LZ, welche nach Antigenaufnahme aus der Epidermis in die Lymphknoten wandern und dabei CD8 und Langerin, sowie MHC-II und kostimulatorische Moleküle hochregulieren (Weinlich et al., 1998; Anjuère et al., 1999).

Während in der Milz, den Peyerschen Plaques und den Lymphknoten verstärkt antigenspezifische T-Zellen zur Immunantwort aktiviert werden, sind DZ im Thymus in der Reifung von T-Zellen und der zentralen Toleranz involviert (Brocker et al., 1997). Die zentrale Toleranz wird im Thymus durch induzierte Apoptose von selbst-reaktiven T-Zellen erlangt, der sogenannten negativen Selektion. Es ist wahrscheinlich, dass thymische DZ hierbei eher die Fähigkeit zur Präsentation von Eigenpeptiden und der Induktion von T-Zell-Apoptose besitzen, als die Fähigkeit zur Migration und Antigenaufnahme. Dem entsprechend befinden sich im Thymus überwiegend CD8⁺CD4⁻ DZ, die im Gegensatz zu den CD8⁻CD4⁻ DZ das Oberflächenmolekül FasL exprimieren (Süss et al., 1996), welches bei dem AICD (*activation-induced cell death*) eine Rolle spielt. Zusätzlich sind speziell CD8⁺CD4⁻ DZ in der Lage aufgenommene Proteine durch *cross-presentation* in Verbindung mit dem MHC-I-Molekül zu präsentieren (Pooley et al., 2001). Diese Funktion wird im Zusammenhang mit der Selbst-Toleranz diskutiert.

Dies könnten ebenfalls Mechanismen für die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz darstellen, da nicht alle selbst-reaktiven T-Zellen durch die zentrale Toleranz eliminiert werden. In der Peripherie würden CD8⁺CD4⁻ DZ somit eher regulatorische Funktionen ausführen, indem sie selbst-reaktive T-Zellen zur Apoptose induzieren. Für die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz werden generell zwei Mechanismen

vorgeschlagen: die erste Theorie beinhaltet die Entwicklung von spezialisierten DZ-Subgruppen, die z.B. durch Apoptose oder durch die induzierte Differenzierung von regulatorischen T-Zellen eine Immunreaktion verhindern. Die zweite Theorie schlägt vor, dass alle DZ die Fähigkeit zur Initiierung einer Immunantwort oder zur Toleranz besitzen. Die Entscheidung ist abhängig vom Reifungs- und Aktivierungszustand der Zelle: unreife Zellen induzieren Toleranz, während reife DZ eine Immunantwort aktivieren.

1.2 Die Transkriptionsfaktor-Familie Rel/NF- κ B

NF- κ B wurde zum ersten Mal als Transkriptionsfaktor mit einer induzierbaren Bindung an das Verstärkerelement der Immunglobulin- κ leichten Kette in B-Zellen beschrieben, wodurch es seinen Namen erhielt (Sen und Baltimore, 1986). Sehr bald zeigte sich jedoch, daß NF- κ B ein sehr häufig vorkommender Transkriptionsfaktor ist, welcher an der Regulation einer Vielzahl von Genen beteiligt ist. Mittlerweile sind über 150 Zielgene identifiziert worden. Ein großer Teil dieser exprimierten Moleküle spielt eine bedeutende Rolle bei Streßreaktionen, Immunantworten, entzündlichen Reaktionen und bei der Apoptose.

Der Rel/NF- κ B-Familie werden Proteine zugeordnet, welche eine konservierte 300 Aminosäuren lange Domäne gemeinsam haben (Abbildung 3). Diese sogenannte Rel-Homologie-Domäne (RHD), in der sich die Translokationssequenz für den Transport in den Zellkern befindet, ist für die DNA-Bindung, die Interaktion mit I κ B (Inhibitor von κ B) und die Bildung von Homo- und Heterodimeren notwendig. In Säugetieren zählen folgende Proteine zu den Mitgliedern der Rel/NF- κ B-Familie: NF- κ B1 (Vorläufermolekül p105 und das N-terminale Spaltprodukt p50), NF- κ B2 (Vorläufermolekül p100 und das N-terminale Spaltprodukt p52), c-Rel, RelA (auch als p65 bezeichnet) und RelB. Ebenfalls der Familie zugeordnet werden die *Drosophila melanogaster* Proteine Dorsal, das eine wichtige Rolle bei der dorsoventralen Polarisierung des Embryos spielt, sowie die Transkriptionsfaktoren Dif und Relish.

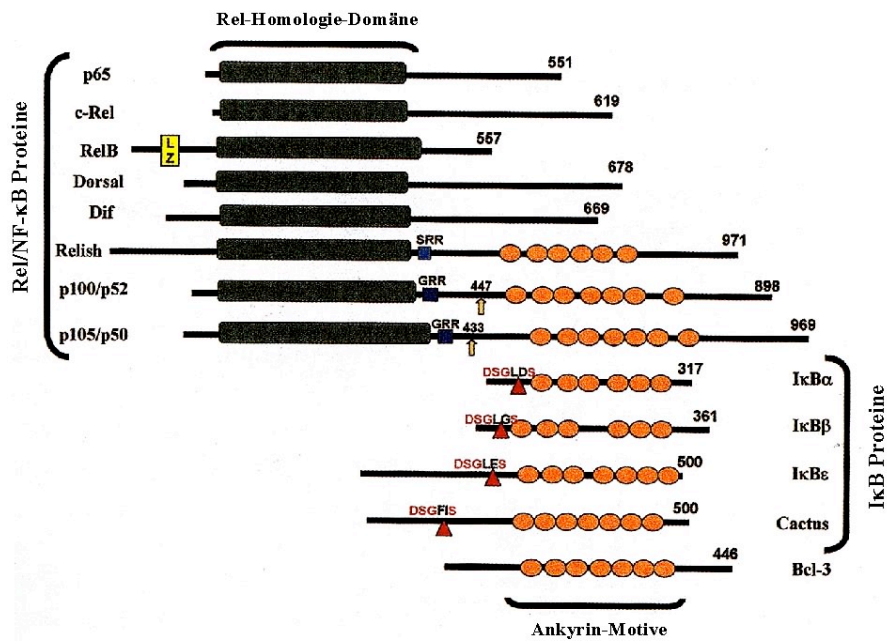


Abbildung 3. Die Transkriptionsfaktor-Familie Rel/NF- κ B und die I κ B-Inhibitorfamilie. Die Anzahl der Aminosäuren ist rechts neben den einzelnen Proteinen angegeben. Schwarze Kästen repräsentieren die Rel-Homologie-Domänen der einzelnen Rel/NF- κ B-Familienmitglieder. Die Pfeile weisen auf die endoproteolytischen Schnittstellen der NF- κ B1 und NF- κ B2 Proteine hin. Die orangenen Kreise kennzeichnen die Ankyrin-Motive der I κ B-Proteine. Die Serinreste, deren Phosphorylierung durch extrazelluläre Signale induziert wird und die für die induzierbare Degradierung von I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ und Cactus notwendig sind, sind durch Dreieckspfeile gekennzeichnet. LZ = Leucinzipper; SRR = serinreiche Region; GRR = glyzinreiche Region.

1.2.1 Der NF- κ B-Signalübertragungsweg

Die Rel/NF- κ B-Proteine bilden in vielen Kombinationen Homo- und Heterodimere, wobei RelB keine Homodimere formt. Die DNA-Bindungsaktivität dieser Dimere wird durch die Interaktion mit Mitgliedern der I κ B-Familie moduliert. Der I κ B-Familie zugeordnet werden die Proteine I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ und Bcl-3 in Säugetieren und Cactus in *Drosophila melanogaster*. Charakteristisches Merkmal dieser Familie sind die Ankyrin-Module, die für die Interaktion mit den NF- κ B-Dimeren verantwortlich sind. Hierbei nimmt das Protein Bcl-3 eine Sonderstellung ein, da es im Gegensatz zu den anderen Vertretern transkriptionell aktiv sein kann. Die C-terminalen Regionen der Proteine p100 und p105, aus denen die NF- κ B-Mitglieder p52 und p50 gebildet werden, besitzen ebenfalls Ankyrin-Motive und können die κ B-Aktivität inhibieren. Die Variabilität in der Sequenz und die Anzahl der Ankyrin-Motive bestimmt die unterschiedliche Bindungsaffinität der I κ B-Proteine zu den einzelnen NF- κ B-Dimeren. Dies erlaubt eine

individuelle Regulation der NF- κ B-Proteine. Zum Beispiel binden I κ B α , I κ B β , I κ B γ bevorzugt an RelA oder c-Rel, während Bcl-3 an p50 oder p52 Homodimere bindet.

Die Identifizierung des inhibitorischen Moleküls I κ B α führte zu einem ersten Modell des NF- κ B-Aktivierungsmechanismus (Baeuerle und Baltimore, 1988) (Abbildung 4). Durch die Interaktion mit den I κ B-Proteinen wird die Kernlokalisierungssequenz maskiert und die NF- κ B-Dimere verbleiben inaktiv im Zytoplasma. Stimulierung der Zelle durch Substanzen wie Wachstumsfaktoren, Zytokine oder Antigene führt zu einer Freisetzung der NF- κ B-Proteine und leitet damit ihre regulatorische Funktion auf der Genebene ein. Nahezu alle Signale, die eine NF- κ B-Aktivität induzieren, aktivieren den I κ B-Kinase (IKK) Komplex, der aus den drei Untereinheiten IKK α , IKK β und IKK γ besteht. IKK α und IKK β sind die katalytischen Untereinheiten des IKK Komplexes, deren Dimerisierung für die Aktivität der Kinase wichtig ist. Die dritte Komponente IKK γ ist die regulatorische Untereinheit, die auch als NEMO (*NF- κ B essential modulator*) bezeichnet wird. Die Aktivierung des IKK Komplexes führt zu einer Phosphorylierung von I κ B an zwei konservierten Serinresten im N-Terminus (Serinreste 32 und 36 bei I κ B α , Serinreste 19 und 23 bei I κ B β und Serinreste 157 und 161 bei I κ B γ) (Karin et al., 1999). Hierauf erfolgt die Ubiquitinierung von I κ B an den Lysinresten 21 und 22. Sowohl Phosphorylierung als auch Ubiquitinierung sind nötig für die anschließende Degradation des Inhibitormoleküls durch das 26s Proteasom (Karin et al., 2000a). Dadurch ist die Kernlokalisierungssequenz nicht mehr maskiert und eine Translokation der NF- κ B-Dimere in den Zellkern kann stattfinden. Im Zellkern schließlich interagieren die NF- κ B-Dimere mit den κ B-Bindungsstellen und regulieren die Expression von Zielgenen (Ghosh und Karin, 2002). Obwohl der oben beschriebene Signalübertragungsweg für nahezu jede NF- κ B-Aktivierung zutreffend ist, konnten andere Mechanismen, die eine Degradierung von I κ B α ohne Phosphorylierung an den Serinresten 32 und 36 beinhalten, charakterisiert werden (Karin et al., 2000b). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß NF- κ B durch einen I κ B unabhängigen Mechanismus über die direkte Phosphorylierung der einzelnen NF- κ B-Proteine aktiviert werden kann (Schmitz et al., 2001).

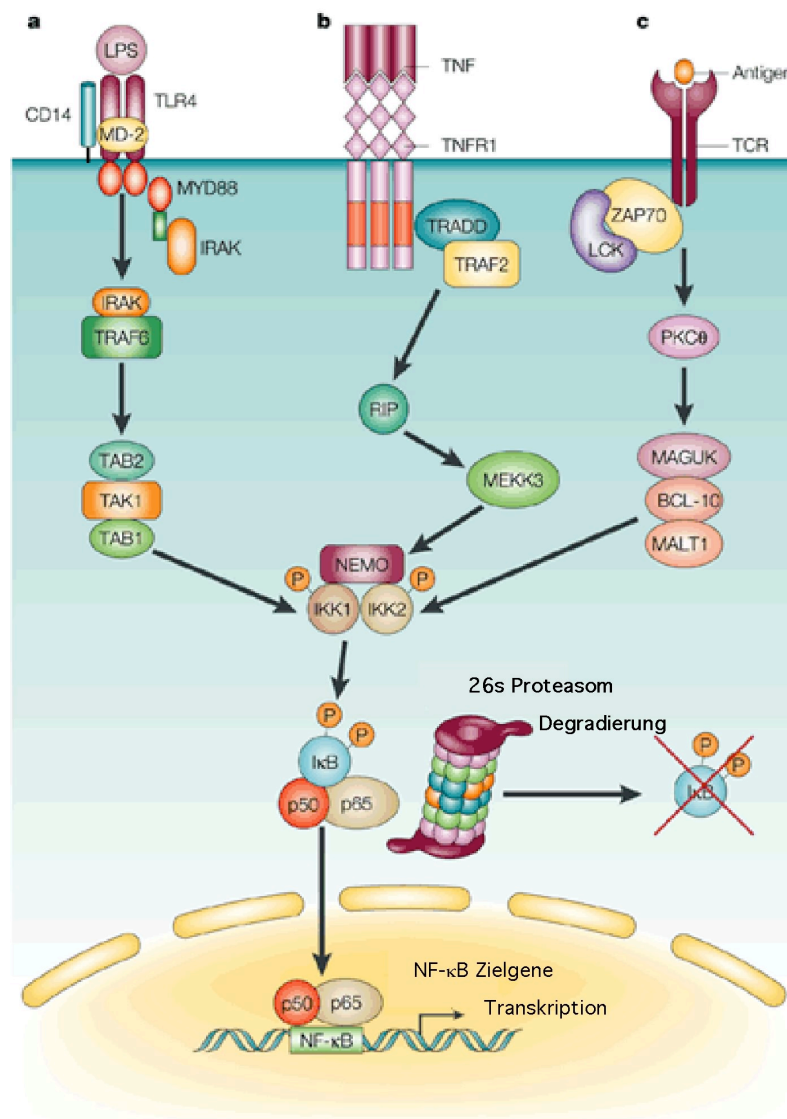


Abbildung 4. Aktivierung des Rel/NF- κ B-Signalübertragungswegs. Eine Vielzahl von Stimuli, darunter Lipopolysaccharide (LPS), proinflammatorische Zytokine wie TNF oder aktivierte T-Zell-Rezeptoren (TCR) stimulieren den Rel/NF- κ B-Signalübertragungsweg. Nahezu alle Signalübertragungswege laufen über den IKK-Komplex, welcher aus den Kinasen IKK1 und IKK2 (auch als IKK α und IKK β bezeichnet) sowie der regulatorischen Untereinheit NEMO (auch als IKK γ bezeichnet) besteht. **a)** LPS Bindung an den Toll-like Rezeptor 4 (TLR4)-CD14-MD-2 Komplex aktiviert MYD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*) und IRAK (*interleukin-1-receptor associated kinase*). Dies führt zur Phosphorylierung von TRAF6 (*TNF-receptor-associated factor 6*), welcher über den TAK1-TAB1-TAB2 Komplex den IKK Komplex aktiviert. **b)** TNF-abhängige Trimerisierung des TNF-Rezeptors führt zur Rekrutierung der Adaptermoleküle TRADD und TRAF2, welche vermutlich über RIP (*serine/threonine kinase*) und MEKK3 (*MAP/ERK kinase kinase*) den IKK-Komplex aktivieren. **c)** T-Zell Stimulation durch antigen-präsentierenden Zellen führt zur Aktivierung der Protein Kinase C θ (PKC θ). Die Komponenten, die PKC θ mit dem IKK Komplex verbinden sind noch nicht näher bestimmt, aber Komplexe mit MAGUK (*membrane-associated guanylate kinase homologue*), BCL-10 und MALT1 (*mucosal-associated lymphoid tissue*) sind daran beteiligt. Aktivierung des IKK-Komplexes führt zur Phosphorylierung und Ubiquitinierung von I κ B, welches daraufhin durch das 26s Proteasom degradiert wird. Rel/NF- κ B wird freigesetzt, kann in den Zellkern einwandern und mit der Transkription der Zielgene beginnen. ERK = *extracellular signal-regulated kinase*; MAP = *mitogen-activated protein*. TAB1 = *TAK1-binding protein*; TAK1 = *transforming-growth-factor- β -activated kinase*; TRADD = *TNF receptor associated via death domain*.

1.2.2 Pathologische Veränderungen in Mäusen mit einem zerstörten Rel/NF- κ B Gen

Zur Untersuchung der *in vivo* Funktionen von Rel/NF- κ B-Proteinen wurden Mauslinien etabliert, in denen die Gene einzelner Mitglieder durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen zerstört wurde (zur Übersicht: Attar et al., 1997; Gerondakis et al., 1999).

1.2.2.1 Mäuse mit Mutationen im *nfkb1* Gen

Das häufige Vorkommen und die Vielzahl von Genen, die von NF- κ B1 reguliert werden, ließen eine Knockout-Maus mit stark pathologischem Phänotyp vermuten. Aber *nfkb1*^{-/-} Mäuse entwickeln sich relativ normal und es konnten keine histopathologische Befunde detektiert werden. Hohe Anfälligkeiten zeigen sich jedoch bei der Abwehr von *L. monocytogenes* und *S. pneumoniae* Infektionen, wobei eine normale Reaktion gegenüber den gram-negativen Bakterien *H. influenzae* und *E. coli* statt findet (Sha et al., 1995). Zudem sind B-Zell-vermittelte Immunantworten aufgrund selektiver Defekte in der antigenspezifischen Antikörperproduktion gestört. Während der Isotypwechsel zu IgG1 normal ist, sind IgG3, IgE und IgA reduziert. Darüberhinaus ist die B-Zell-Proliferation nach Stimulation mit LPS oder löslichem CD40L gestört, während die Reaktion auf vernetzende Stimuli normal verläuft (Snapper et al., 1996). Ebenfalls zeigte sich ein Proliferationsdefekt in CD4⁺ T-Zellen nach antigenspezifischer Stimulation (Artis et al., 2003).

1.2.2.2 Mäuse mit Mutationen im *nfkb2* Gen

Die Expression von NF- κ B2 kann in der Medulla des Thymus, in der Marginalzone, den äußeren Regionen der periarteriolen lymphatischen Scheiden der Milz sowie in den epithelialen Schichten des Magens detektiert werden.

Nfkb2^{-/-} Mäuse zeigen eine veränderte Mikroarchitektur in Lymphknoten und in der Milz, wobei die Keimzentren in der Milz nach Injektion von T-Zell-abhängigen Antigenen nur sehr schwach ausgebildet werden. Der Verlust von NF- κ B2 führt zu einer verminderten Anzahl von B-Zellen, wobei die Proliferation nach verschiedenen mitogenen Stimuli nur leicht reduziert ist. Die Zahl der T-Zellen in der Milz ist jedoch erhöht, einhergehend mit einer gesteigerten IL-2- und GM-CSF-Produktion nach entsprechender Stimulation. Darüber hinaus zeigen *nfkb2*^{-/-} Mäusen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber *L. monocytogenes*, während die Bekämpfung einer LCMV-Infektion (*lymphocytic choriomeningitis virus*) normal verläuft. Ähnlich wie bei *nfkb1*^{-/-} Mäusen sind in *nfkb2*^{-/-} Mäusen in erster Linie B-Zell-vermittelte Immunantworten und

die Produktion antigenspezifischer Antikörper betroffen (Caamaño et al., 1998; Franzoso et al., 1998).

1.2.2.3 Mäuse mit Mutationen im *nfk1* und im *nfk2* Gen

Diese Doppel-Knockout-Mäuse wurden generiert, um eine mögliche Kompensation der beiden Familienmitglieder NF- κ B1 und NF- κ B2 zu analysieren. Tatsächlich zeigte sich ein verstärkt pathologischer Phänotyp mit einer erhöhten Sterberate. Oft sterben die Tiere schon innerhalb der ersten zwei Wochen nach der Geburt an massiver neutrophiler Infiltration aufgrund opportunistischer bakterieller Infektionen. Der Verlust beider Gene führt zu Defekten in der Knochenentwicklung mit einer deutlichen Abnahme von Osteoklasten und ausgeprägter Osteopetrose (Iotsova et al., 1997). Darüber hinaus entwickeln *nfk1^{-/-}nfk2^{-/-}* Mäuse myeloide Hyperplasie sowie Thymus- und Lymphknotenatrophie. CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sind nicht vorhanden und es zeigt sich eine verminderte B-Zellpopulation (Franzoso et al., 1997).

1.2.2.4 Mäuse mit Mutationen im *relA* Gen

RelA wird - wenn auch in niedrigen Mengen - in nahezu allen Zellen exprimiert. Ein Verlust dieses Gens führt schon während der Embryonalentwicklung zu einem pathologischen Phänotyp. RelA-Knockout-Mäuse sterben zwischen E15 und E16 durch programmierten Zelltod von Hepatozyten, während hämatopoetische Vorläuferzellen und rote Blutzellen nicht betroffen sind. In Transplantationsexperimenten mit fötaler Leber konnte gezeigt werden, daß die Entwicklung von Lymphozyten in der Abwesenheit von RelA normal verläuft. Dagegen ist die Aktivierung von T- und B-Zellen durch verschiedene Stimuli stark eingeschränkt und die Sekretion von IgG1- und IgA-Immunglobulinen ist deutlich reduziert (Beg et al., 1995; Horwitz et al. 1997; Doi et al., 1997).

1.2.2.5 Mäuse mit Mutationen im *relB* Gen

RelB kann in der späten embryonalen Entwicklung im Thymus und in adulten Mäusen in den periarteriolen lymphatischen Scheiden der Milz, in der Medulla des Thymus und im Kortex der Lymphknoten detektiert werden. In diesen Organen wird RelB speziell in DZ, Makrophagen, B-Zellen und UEA-1-positiven medullären Epithelzellen exprimiert.

Charakteristisch für die RelB-Knockout-Maus sind die ausgeprägten entzündlichen Infiltrate in vielen nichtlymphatischen Organen. Dieser Entzündungsphänotyp ist T-Zell-abhängig (Weih et al., 1996) und vermutlich auf selbst-reaktive T-Zellen in der Peripherie zurückzuführen, die aus einer defekten negativen Selektion resultieren (Laufer et al., 1996). Die Medulla des Thymus ist bei *relB^{-/-}* Mäusen nur rudimentär

vorhanden. Es fehlen die UEA-1-exprimierenden medullären Epithelzellen und es konnte eine Reduktion der CD8⁺CD11b⁺ DZ festgestellt werden (Wu et al., 1998). Weitere histologische Befunde ergaben eine myeloide Hyperplasie im Knochenmark und eine vergrößerte Milz aufgrund extramedullärer Hämatoopoese. Neben diesen pathologischen Veränderungen in lymphoiden und nichtlymphoiden Geweben weisen *relB*^{-/-} Mäuse eine eingeschränkte zelluläre und humorale Immunität auf. Die Knockout-Mäuse haben eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber *L. monocytogenes* und LCMV und zeigen Defekte in der antigenspezifischen IgG-Produktion (Lo et al., 1992; Weih et al. 1995, 1997; Burkly et al., 1995).

1.2.2.6 Mäuse mit Mutationen im *c-rel* Gen

Im Embryo wird c-Rel in hämatopoetischen Zellen, in der Leber, Thymus und Milz exprimiert. In der adulten Maus kann c-Rel in der Medulla des Thymus, in den Keimzentren der Milz, in den Lymphknoten und in den Peyerschen Plaques detektiert werden.

Mäuse mit einem zerstörten *c-rel* Gen zeigen eine beeinträchtigte humorale Immunität mit reduzierter Serumkonzentration von IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3. Die *in vitro* Proliferation nach Stimulation von T- und B-Zellen ist reduziert, wobei die Proliferation der T-Zellen durch exogenes IL-2 rekonstituiert werden kann. Die Zytokinproduktion ist einerseits vermindert in der Sekretion von IL-2, IL-3 und GM-CSF in T-Zellen, andererseits ist die Produktion von GM-CSF, G-CSF und IL-6 in Makrophagen erhöht. Darüber hinaus zeigen peritoneale Makrophagen eine verminderte zytotoxische Aktivität, welche mit einer reduzierten Produktion reaktiver Stickstoffoxide korreliert. Gegenüber Infektionen zeigen *c-rel*^{-/-} Mäuse eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber *L. major* (Köntgen et al., 1995, 1996; Grigoriadis et al., 1996).

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Bezugsquellen

Alle nicht näher aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen) und alle Radiochemikalien von der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen.

2.2 Mäuse

Die Generierung der *nfkb1^{-/-}*, *nfkb2^{-/-}* und *relB^{-/-}* Mäuse wurde in folgenden Veröffentlichungen beschrieben: Sha et al., 1995; Caamaño et al., 1998; Weih et al., 1995. Die OT-I und OT-II Mäuse wurden in folgenden Veröffentlichungen charakterisiert: Clarke et al., 2000; Robertson et al., 2000). Alle Tiere wurden unter Standardbedingungen im pathogenfreien Tierhaus des Forschungszentrums Karlsruhe, Institut für Toxikologie und Genetik versorgt und gezüchtet.

2.3 Generierung von dendritischen Zellen aus dem Knochenmark

Die DZ wurden modifiziert nach dem Protokoll von M. Lutz generiert (Lutz et al., 1999). Tibia und Femur wurden 2 min in 70% Ethanol gereinigt, die Knochenenden knapp abgeschnitten und das Knochenmark mit einer 2ml-Einmalspritze, 24G Nadel (B. Braun, Melsungen) herausgespült. Nach 4 min ACK-Lyse bei RT wurden je 2×10^6 Zellen mit 10 ml DZ-Medium / 20 ng/ml GM-CSF in 94/16mm Petrischalen (Falcon 1029, Becton Dickinson) pipettiert. Nach 3 Tagen wurden weitere 10 ml DZ-Medium/20 ng/ml GM-CSF hinzugegeben. Um einen Zellverlust beim Mediumwechsel zu reduzieren, wurden an Tag 6 und Tag 8 der KM-Kultur je 10 ml abgenommen und nach Zentrifugation die Zellen mit 10 ml frischem DZ-Medium / 20 ng/ml GM-SCF aufgenommen und wieder in die Petrischale zurückgegeben. Die Plastik-Beschichtung dieser Petrischalen behindert die Entwicklung der Makrophagen, welche die Reifung der DZ inhibieren können. Zur Endreifung hingegen werden die Zellen in Kulturplatten transferiert, da nun adhärierende Makrophagen-Vorläuferzellen die Reinheit der nicht-adhärenen reifen DZ indirekt erhöhen.

Endreifung der dendritischen Zellen durch Stimulation:

An Kultur-Tag 8 bzw. 10, je nach Reifezustand der Zellen, wurden die DZ durch die Zugabe von 1 µg/ml LPS (L2637, Sigma), 1 µg/ml anti-CD40 (HM40-3, Becton Dickinson) oder 20 µg/ml poly I:C (Sigma, P0913) zu einer weiteren Reifung stimuliert. Dabei wurden die Zellen mit 10 ml frischem DZ-Medium / 10 ng/ml GM-SCF in 94 mm Kulturplatten (Falcon 3003, Becton Dickinson) transferiert.

Stimulation mit CD40L-transfizierten Zellen:

Eingefrorene CD40L-transfizierte Zellen wurden aufgetaut und mit 10 ml DZ-Medium in Kulturplatten ausgesät. Nachdem die ganze Bodenfläche von den adhärennten Zellen bedeckt war, wurde das Medium abgenommen und die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen. $1-3 \times 10^7$ KM-DZ wurden in 10 ml DZ-Medium aufgenommen und zu den adhärennten CD40L-transfizierten Zellen hinzugefügt.

Ag8653 Hybridomüberstand zur Gewinnung des GM-CSF:

Zur Gewinnung des GM-CSF wurden die mit einem murinen GM-CSF cDNA Konstrukt stabil transfizierten Myeloma Zellen Ag8653 nach Expansion in Dulbecco Medium in sogenannte Roller Bottles transferiert. Diese wurden alle paar Tage mit CO₂ begast und im 37°C-Raum rotiert, bis der Überstand sich gelb verfärbte. Die GM-CSF-Konzentration im Überstand wurde durch einen GM-CSF-ELISA nach Herstellerangaben (PromoKine) bestimmt.

ACK-Lyse-Puffer: 8,92 g NH₄Cl, 1 g KHCO₃, 0,32 g Na₂EDTA; H₂O ad 1l

DZ-Medium: RPMI-1640, 2 mM L-Glutamin, 50 µM 2-Mercaptoethanol, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10% hitzeinaktiviertes (60 min bei 55°C) und gefiltertes (0,22 µm) FKS

Ag8653-Medium: DMEM, 10% FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2% L-Glutamin, 1% nicht-essenzielle Aminosäuren, 1% Na-Pyruvat

2.4 Isolierung von dendritischen Zellen aus lymphoiden Geweben der Maus

Die lymphoiden Organe der *relB*^{-/-}, *nfkb1*^{-/-} und *nfkb1*^{-/-} Mäuse wurden nach Fettentfernung mit einer Schere sehr fein zerkleinert und mit 1 mg/ml Kollagenase D (Roche Diagnostics, Kat. Nr. 1088866) in 5 ml DZ-Medium 40 min lang verdaut. Um DZ-T-Zellaggregate zu lösen, wurde in den letzten 10 Minuten des Verdaus 500 µl 0,1 M EDTA hinzugefügt. Die Zellen wurden anschließend durch ein grobmaschiges, flaches Netz mit einem Glasstempel aus dem Gewebe herausgedrückt und über ein 70 µm

Zellsieb (Falcon) in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer ACK-Lyse – zur Depletion der Erythrozyten - wurden die Zellen dreimal gewaschen (300 g), wobei der letzte Waschschrift in MACS-Puffer durchgeführt wurde. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis mit anti-CD11c paramagnetischen *beads* (N418, Miltenyi Biotec) in einer 1:5 Verdünnung in MACS-Puffer (50 µl *beads* pro 10^8 Zellen), wurden 8 ml MACS-Puffer hinzugefügt und die Zellen zentrifugiert (200 g, 10 min). Die Zellen wurden anschließend in 1 ml MACS-Puffer auf die MS-Separationssäule bzw. in 3 ml auf die LS-Separationssäule aufgetragen (Miltenyi Biotec). Nach dreimaligem Waschen (3 x 1 ml bzw. 3 ml MACS-Puffer) wurden die Säulen von dem Magnet gelöst und die zurückgehaltenen Zellen mit 1 ml bzw. 6 ml MACS-Puffer durch den Einsatz eines Stempels aus den Säulen gedrückt.

MACS-Puffer: 0,5% BSA (Sigma, A-7906), 5 mM EDTA in Ca- und Mg-freiem PBS

2.5 Isolierung von Langerhans Zellen aus der Epidermis

Zur Gewinnung von frisch isolierten Langerhans Zellen wurden die Ohren der Mäuse abgeschnitten, kurz mit 70% Ethanol gespült und zum Trocknen auf Whatmanpapier gelegt. Die Ohren wurden anschließend mit zwei feinen gebogenen Pinzetten (INOX 7) in zwei Hälften auseinandergezogen; die dorsale Hälfte wurde mit der dermalen Seite nach unten auf HBSS mit 0,33% Trypsin (Trypsin 250, DIFCO) schwimmend gelegt, während die etwas dickere ventrale Hälfte eine 1%-ige Trypsinlösung benötigte. Nach 30 min Verdau im Inkubator (37°C, 5,0% CO₂) - die ventralen Hälften nach 60 min - wurde die Trypsinlösung vorsichtig mit der Pasteurpipette entfernt und die epidermale Seite, um Zellkontaminationen aus der dermalen Seite zu verhindern, mit einer feinen Pinzette an einem Stück abgezogen. Die epidermalen Seiten wurden auf ein Sieb gelegt ("stainless steel" mit einem 200mesh screen, Sigma, S-4145), welches in eine mit 35 ml DZ-Medium gefüllte Kulturplatte gestellt wurde. Durch 3 minütiges Schütteln (leichte, schnelle "auf und ab" Bewegungen aus dem Handgelenk) wurden die Zellen aus dem Gewebe herausgelöst und mit DZ-Medium dreimal gewaschen. Zur weiteren Identifizierung und Quantifizierung der LZ wurden die Zellen mit Antikörper gegen CD11c und MHC-II gefärbt und einer durchflusszytometrischen Messung unterzogen.

2.6 Generierung von Knochenmarkchimären

Zur Bestimmung des LZ-Austausches in der Epidermis wurde das Ly5.1/Ly5.2 System eingesetzt, wobei als Donor die Ly5.1- und als Rezipient die Ly5.2-Maus gewählt wurde. Die Knochenmarkzellen von Ly5.1-Mäusen wurden nach Isolierung aus Tibia und Femur (in 2.3 beschrieben) über ein 70 µm Zellsieb von Knochenfragmenten abgetrennt und jeweils $3\text{-}5 \times 10^6$ Zellen in 100 µl PBS resuspendiert. Die Knochenmarkzellen wurden anschließend mit der Hilfe von Norma Howells in die Schwanzvenen von bestrahlten (2 x 550 Rad, 3 h Intervall) Ly5.2-Mäusen injiziert. Diese Mäuse wurden in einem belüfteten Schrank (*Scantainer*) gehalten und für die ersten 4 Wochen mit Penicillin/Streptomycin-haltigem Wasser und Naßfutter versorgt (100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin).

2.7 Durchflusszytometrische Messung

Für die durchflusszytometrischen Messungen wurden die Zellen je nach Fragestellung zwischen $0,2\text{-}1 \times 10^6$ Zellen in 96-Rundboden-Mikrotiterplatten ausgesät und nach Zentrifugation (400 g, 3 min, 4°C) mit den Antikörpern in den entsprechenden Verdünnungen bei 4°C für 30 min in FACS-Puffer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit FACS-Puffer (PBS mit 2% FKS) wurden die Zellen entweder sofort am FACS-Gerät (Becton Dickinson FACStar^{PLUS} bzw. Becton Dickinson FACScan) gemessen oder für eine spätere Analyse fixiert. Hierfür wurden die Zellen mit 10% Formalin 15 min bei RT inkubiert und nach einmaligem Waschen in FACS-Puffer bei 4°C aufbewahrt.

FITC gekoppelte anti-Maus Antikörper (Verdünnung 1:100):

CD11b / Integrin α_M chain, Mac-1 α chain (M1/70)

CD11c (Klon HC3)

CD14 (Klon rmC5-3)

MHCI / H-2K^b (Klon AF6-88.5)

MHCII / I-A^b (Klon AF6-120.1)

DEC-205 / NLDC145

CD86 / B 7-2 (Klon GL1)

CD40 (Klon HM40-3)

Ly-6G / Gr-1 und Ly-6C (Klon RB6-8C5)

CD80 / B7-1 (Klon 16-10A1)

CD25 / IL-2 Rezeptor α Kette (Klon 7D4)

PE gekoppelte anti-Maus Antikörper (1:200):

CD11b / Integrin α_M chain, Mac-1 α chain (Klon M1/70)

CD11c (Klon HC3)

MHCII / I-A^b (Klon AF6-120.1)

CD8a / Ly-2 (Klon 53-6.7)

Ly-6G / Gr-1 (Klon RB6-8C5)
 CD4 (L3T4 (Klon RM4-5)
 CD45R / B220 (Klon RA3-6B2)
 CD45RB (Klon 16A)

In Dreifachfärbungen wurde der CD11c Biot (Klon HC3) eingesetzt (Verdünnung 1:50) und mit den Sekundärantikörpern Streptavidin-Cy-Chrom (Verdünnung 1:400) oder Streptavidin-PerCP (Verdünnung 1:200) gefärbt.

Alle Antikörper für die durchflusszytometrische Messungen (bis auf DEC-205, Biomedicals AG) wurden von BD/Pharmingen bezogen.

2.8 Apoptose und Zellviabilität

Zur quantitativen Bestimmung der apoptotischen Zellen wurde PE-konjugiertes AnnexinV (Becton Dickinson) und zur Identifizierung der toten Zellen 7-AAD (Becton Dickinson) eingesetzt. So konnte für eine weitere Charakterisierung des Zelltyps bzw. Reifungszustandes eine dritte Farbe (FITC) benutzt werden. Nach Resuspension von 1×10^5 gefärbten Zellen (mit CD11c, MHCII oder CD86) in 100 μ l Bindungspuffer A wurden 4 μ l Annexin V-PE sowie 4 μ l 7-AAD hinzugefügt. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde die Reaktion durch Zugabe von 400 μ l Bindungspuffer A gestoppt und innerhalb einer Stunde durchflusszytometrisch analysiert.

Bindungspuffer A: 10 mM HEPES, pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl_2

2.9 DNA-Bindung der NF- κ B-Proteine

Präparation von nukleären Extrakten:

Für die Herstellung von Kernextrakten wurden die KM-DZ nach Stimulation zu verschiedenen Zeitpunkten (30 min, 2 h, 4 h, 8 h und 24 h) geerntet. Von jedem Zeitpunkt und Stimulus wurden $2 - 10 \times 10^6$ Zellen zentrifugiert (300 g, 4 min), in 400 μ l hypotonischem Puffer A aufgenommen und für 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellmembran wurde durch Zugabe von 25 μ l 10% NP-40 lysiert, und die Kerne durch Zentrifugation (12000 U/min, 5 min) in einer Eppendorffzentrifuge abgetrennt. Danach wurden die Kerne 15 min mit 40 - 60 μ l Puffer C bei 4°C geschüttelt (Extraktion) und anschließend zentrifugiert (12000 U/min, 5 min, 4°C). Der gewonnene Kernextrakt (Überstand) mit den Rel/NF- κ B-Proteinen wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Puffer A: 10 mM HEPES pH 7,9, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 2,5 mM DTT, 1 mg/ml Leupeptin, 0,1 M PMSF

Puffer C: 20 mM HEPES pH 7,9, 25% Glycerin, 0,4M NaCl, 1 mM EDTA, 2,5 mM DTT, 1 mg/ml Leupeptin, 0,1 M PMSF

Bestimmung der Proteinkonzentration:

Je 4 µl der zu bestimmenden Proteinlösung wurden auf 800 µl mit ddH₂O aufgefüllt und dann mit 200 µl Farbstoffkonzentrat BIO-RAD PROTEIN ASSAY gemischt. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Zur Quantifizierung wurden Eichlösungen mit bekannter Proteinkonzentration parallel dazu verarbeitet. Die Berechnung der Proteinkonzentrationen der Proben erfolgte anhand der Regressionsgeraden aus der Eichkurve.

Präparation von radioaktiv markierten β -Bindungssequenzen:

I) Hybridisierung der Oligonukleotide:

200 pmol je Oligonukleotid wurden mit 200 µl TE (pH 7,5) und 2 µl 5 M NaCl-Lösung für 15 min bei 80°C inkubiert, und anschließend über Nacht bei RT langsam abgekühlt (*Annealing*). Die so erhaltenen doppelsträngigen DNA-Fragmente wurden bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Folgende Einzelstrang-Oligonucleotide wurden eingesetzt:

Ig α up: 5'-GAT CCA GAG GGG ACT TTC CCA CAG GA-3'

Ig α lo: 5'-GAT CTC CTC TGG GAA AGT CCC CTC TG-3'

II) Radioaktive Markierung und Reinigung der hybridisierten Oligonukleotide:

2 pmol an hybridisiertem Oligonukleotid wurden mit 10 µl ddH₂O, 2 µl 10x REACT 2-Puffer (Invitrogen), 3 µl [³²P]-dCTP (3000 Ci/mmol), 2 µl dNTP-Mix und 1 µl Klenow-Fragment (0,5 U *E.coli* DNA-Polymerase I, Invitrogen) gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 10 µl Blue Dextran (0,7% (w/v) in Wasser) wurde das Reaktionsgemisch auf eine 1 ml Sephadex G-50-Säule aufgetragen und die aufgereinigten Produkte mit 1 \times TE-Puffer eluiert. Die Zerfallsrate von 1 µl der aufgereinigten Lösung wurde mit Hilfe eines Szintillationszählers (1211 Minibeta, Wallac) bestimmt.

dNTP-Mix: je 0,5 mM dATP, dGTP und dTTP in 10 mM Tris pH 7,5

1 \times TE-Puffer: 100 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA

EMSA (electrophoretic mobility shift assay) = Gelretardationsexperimente

0,5 – 2 µg Kernproteine wurden mit 1 µl Antiserum gegen die NF-κB-Mitglieder der Maus versetzt und für 15 min bei 4°C präinkubiert. Danach wurde 4 µl 5x Bindungspuffer zugegeben und 1/10 der Proteinmenge an Kalbs-Thymus-DNA. Nach Zugabe von 2 µl [³²P]-markiertem Oligonukleotid, mit einer Zerfallsrate von mindestens 8·10³ cpm/µl, und Angleichen des Volumens mit Wasser auf 20 µl, wurde 30 min lang bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde nach Zugabe von Glycerin-Probenpuffer auf ein Polyacrylamidgel (5%) aufgetragen und elektrophoretisch getrennt (Laufpuffer: 0,25x TBE; Spannung 150-250 V für 2-3 h). Das Gel wurde anschließend bei 80°C für 30 min getrocknet und auf Hyperfilm MP (Amersham) exponiert.

Bindungspuffer: 10 mM Tris pH 7,5, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 5% Glycerinl

0,25x TBE: 22,5 mM Tris/Borat, 0,5 mM EDTA

Glycerin-Probenpuffer: 10 mM EDTA, 10% Glycerin, 0,1% SDS, 0,02% Bromphenolblau

5% Polyacrylamid Gel: 8,3 ml Acrylamid:Bisacrylamid (30%), 2,5 ml 5x TBE (Endkonz. 0,25x), 39,2 ml ddH₂O

Anti-Rel/NF-κB polyklonale Antiseren für EMSA:

KD 57 oder Hasen Serum (Sigma): Preimmune Serum (PI)

KD 57-8: anti-p50

KD 38-2: anti-p52

KD 13-3: anti-RelA

KD 6-8 oder RR 2-8: anti-RelB

sc (N-466X) (Santa Cruz): anti-c-Rel

2.10 Funktionelle Tests mit dendritischen Zellen

2.10.1 FITC-Dextran Aufnahme Test

Um die Fähigkeit der DZ zur Antigenaufnahme zu testen, wurden je 2x10⁵ Zellen an Tag 6 der KM-Kulturen in 96-Rundboden-Mikrotiterplatten titriert. Nach 10 min Inkubation bei 37°C bzw. 4°C (Negativ-Kontrolle) wurde 0,25 mg/ml (Endkonz.) FITC-Dextran (M_r = 40.000 Da, FD-405, Sigma) mit einer Multipipette zupipettiert. Die Zellen wurden zur Antigenaufnahme in den Brutschrank bzw. die Negativ-Kontrolle auf Eis gestellt. Die Aufnahme wurde durch Zugabe von eiskaltem FACS-Puffer nach 10, 30, 60, 90, 180 und 300 min gestoppt und dreimal mit eiskaltem FACS-Puffer gewaschen. Um DZ des gleichen Reifungszustandes vergleichen zu können, wurden die Zellen

zusätzlich mit Antikörper gegen MHC-II in PE gefärbt und die FITC-DX Aufnahme der unreifen DZ (MHC-II^{int}) durchflusszytometrisch quantifiziert.

2.10.2 Gemischte Leukozyten-Reaktion (MLR)

Für die Stimulation von T-Zellen wurden zwischen $0,1 \times 10^3$ bis 1×10^4 DZ in 96-Rundboden-Mikrotiterplatten titriert und jeweils 2×10^5 Zellen des mesenterialen Lymphknoten einer BALB/c Maus hinzugefügt. Um eine Proliferation der KM-DZ zu verhindern, wurden die KM-DZ zuvor mit 2000 Rad bestrahlt. Nach 3 Tagen Inkubation im Brutschrank wurde zur Proliferationsbestimmung $1 \mu\text{Ci}$ [³H]-Thymidin in 5 μl DZ-Medium in jede Kavität pipettiert und 16 h inkubiert. Das eingebaute [³H]-Thymidin wurde auf Filtermatten (Wallac) geerntet (TOMTEC Harvester) und mit Hilfe des Szintillationszähler (1450 Microbeta, Wallac) in Triplikaten ausgewertet.

2.10.3 Antigen-spezifische Immunantwort

Für eine antigen-spezifische Immunantwort wurden $0,15 \times 10^3$ bis 5×10^3 DZ mit $0,1 \mu\text{M}$ OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid (Bachem) bzw. 200 $\mu\text{g/ml}$ OVA-Protein (Serva, Kat. Nr. 11840) im Inkubator für 1 h inkubiert und anschließend 5×10^4 T-Zellen hinzugefügt. Die T-Zellen für die MHC-I restringierte Immunantwort wurden aus der Milz der OT-I-Maus isoliert und nach Inkubation mit CD8 paramagnetischen *beads* (1:10 Verdünnung mit $10 \mu\text{l}$ *beads*/ 10^7 Zellen) über eine LS-Separationssäule aufgereinigt (wie unter 2.4 beschrieben). Zur Induktion einer MHCII-restringierten T-Zell-Aktivierung wurden aus der OT-II-Maus die T-Zellen mit CD4 paramagnetischen *beads* gewonnen. Im weiteren Protokollverlauf wurde wie bei 2.10.2 verfahren.

2.10.4 Bestimmung der Zytokinproduktion durch ELISA

Zur Charakterisierung der Zytokinproduktion wurden die DZ an Tag 10 der Generierung wie unter 2.3 beschrieben stimuliert und der Überstand nach 24 Stunden abgenommen. Die Zytokine wurden nach den Protokollen des IL-12 p70 DuoSet von R&D Systems bzw. des IL10-ELISA-KIT von PromoKine bestimmt. Für den IL-12 p70 ELISA wurde das BSA von Sigma (A7030) und das TMB von R&D Systems (DY 999) eingesetzt.

2.10.5 Migrationsexperimente mit *re/B^{-/-}* dendritischen Zellen

5×10^6 reife *re/B^{-/-}* DZ (Tag 10 der KM-Kultur) sowie 5×10^6 reife wt DZ wurden mit dem Farbstoff PKH26 (Minikit-26, Sigma) in einer Konzentration von 2 μM nach Herstelleranleitung gefärbt. Davon wurden jeweils 5×10^4 Zellen subkutan in die Bauchhaut von C57BL/6 Mäusen gespritzt. Nach 24 h wurden die drainierenden Lymphknoten (axillare und inguinale) entnommen und Gefrierschnitte angefertigt bzw. für die quantitative Bestimmung eine Zellsuspension erstellt. Hierfür wurden die Lymphknoten ohne Kollagenase D-Verdau "ruckartig" durch ein grobmaschiges kleines Netz gedrückt, welches in eine 60 mm Petrischale gestellt wurde. Zur Bestimmung der DZ wurden die Zellen mit CD11c-FITC gefärbt und die eingewanderten DZ als CD11c- und PKH26-positiv identifiziert.

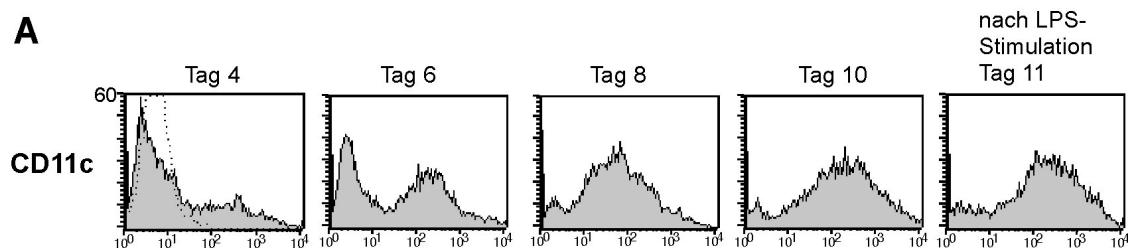
2.10.6 Kontakthypersensitivität

Für die afferente Phase der Kontakthypersensitivität wurden 3×10^5 reife KM-DZ mit 1 mM TNBS in 1 ml PBS haptensiert (15 min bei 37°C) und in 40 μl (2 x 20 μl) PBS s.c. in die rasierte Bauchhaut von C57BL/6 Mäuse gespritzt (28G-Nadel). Nach 5 Tagen wurde zur Initiierung der efferenten Phase auf die Rückseite eines Ohrs 20 μl 1% TNCB in Aceton aufgetragen. Auf das andere Ohr wurde als Kontrolle nur Aceton pipettiert. Die Ohrschwellung wurde mit einem Meßgerät für Ohrdicke (Mituoyo Corporation, Leonberg GmbH) vor und nach Allergen-Behandlung bestimmt.

3 Ergebnisse

3.1 *In vitro* Generierung von dendritischen Zellen aus dem Knochenmark

In den folgenden Abschnitten werden Resultate aus Experimenten dargestellt, die zu einem großen Teil mit DZ durchgeführt wurden, die *in vitro* aus dem Knochenmark generiert wurden (= KM-DZ) (siehe Methoden 2.3). Der Anteil der sich entwickelnden DZ wurde mit Antikörper gegen CD11c bestimmt, wobei nach 10 Tagen Kultur eine Ausbeute bis zu 90% erzielt werden konnte (Abbildung 5A). Während den ersten 3 Tagen Kulturperiode konnten unter dem Lichtmikroskop hauptsächlich runde Granulozyten und Makrophagen gesichtet werden, letztere adhärierend auf dem Plattenboden. Zwischen dem 4. und 6. Tag entwickelten sich immer mehr CD11c⁺ DZ, die ebenfalls die für DZ charakteristischen Moleküle MHC-I und MHC-II exprimierten (Abbildung 5B). Eine Zunahme in der Expression dieser Moleküle sowie eine Hochregulation des kostimulatorischen Moleküls CD80 korrelierte mit dem Reifezustand der Zellen. Die Expression von CD86 hingegen konnte in der Regel erst nach dem 8. Tag der Kulturperiode bzw. nach Stimulation detektiert werden. Durch die Zugabe von LPS, poly I:C, anti-CD40 bzw. CD40L-transfizierten Zellen konnte eine maximale Expression von MHC-I, MHC-II, CD80, CD86 und CD40 (Daten nicht alle gezeigt) erzielt werden. Je nach Fragestellung konnten somit in den funktionellen Tests DZ mit dem erforderlichen Reifezustand eingesetzt werden.



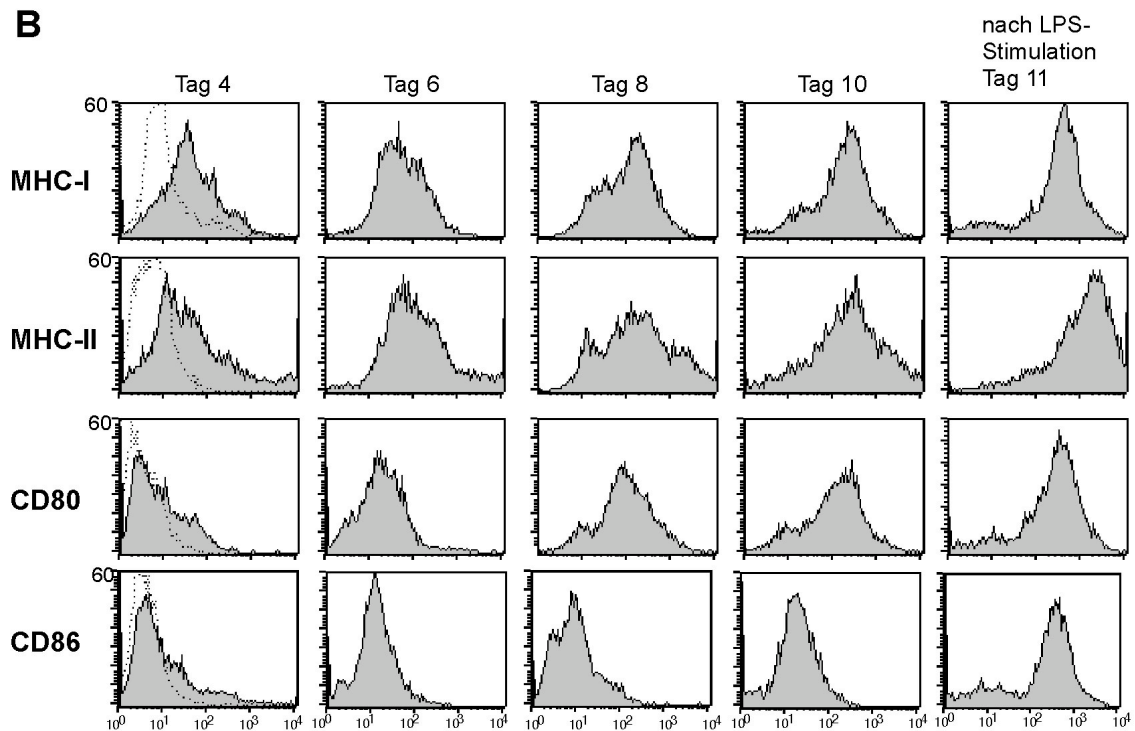


Abbildung 5. Generierung von wt DZ aus dem Knochenmark. Die KM-DZ wurden im Laufe der Kultur durchflusszytometrisch charakterisiert. An Tag 10 der Kultur wurden die Zellen mit LPS zur Endreifung stimuliert. (A) Identifizierung der DZ durch Färbung mit Antikörper gegen CD11c (gefüllte Histogramme). (B) Zunehmende Expression der MHC-Moleküle während der Reifung sowie Hochregulation der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86. Gepunktete Linien = ungefärbte Zellen.

3.2 DNA-Bindungsaktivität der Rel/NF- κ B Proteine in dendritischen Zellen

Die DNA-Bindung der Transkriptionsfaktoren p50/NF- κ B1, p52/NF- κ B2, RelA, RelB und c-Rel wurde in Gelretardationsexperimenten untersucht. Ziel der Experimente war herauszufinden, welche Mitglieder der Rel/NF- κ B-Familie in der DZ bei der Regulation von Genen beteiligt sind und wann sie während der Reifung zum Einsatz kommen. Durch die Zugabe von LPS bzw. CD40L-transfizierten Zellen an Tag 10 der Zellkultur konnte eine DNA-Bindung der Rel/NF- κ B Proteine induziert werden (Abbildung 6). Während vor der Stimulation nur eine schwache Bindung der Rel/NF- κ B Proteine (Komplex \square) beobachtet werden konnte, zeigte sich nach Stimulation eine deutliche Zunahme der Bindungsaktivität sowohl in Komplex \square als auch in Komplex \square . Um eine Quantifikation der DNA-Bindung an den verschiedenen Zeitpunkten zu ermöglichen, wurde die aufgetragene Menge der Komplexe durch die jeweilige Ladekontrolle (\square) dividiert. Die relative mittlere DNA-Bindung nach Stimulation mit LPS bzw. CD40L-transfizierten Zellen von drei unabhängigen Experimenten ist graphisch in Abbildung

6B dargestellt. Hierbei zeigte sich ein unterschiedlicher Kurvenverlauf: während ein deutliches Maximum der Rel/NF- κ B-Bindungsaktivität zwei Stunden nach LPS-Stimulation beobachtet werden konnte, zeigte sich eine langsamere, aber länger anhaltende Induktion durch Stimulation mit CD40L-transfizierten Zellen.

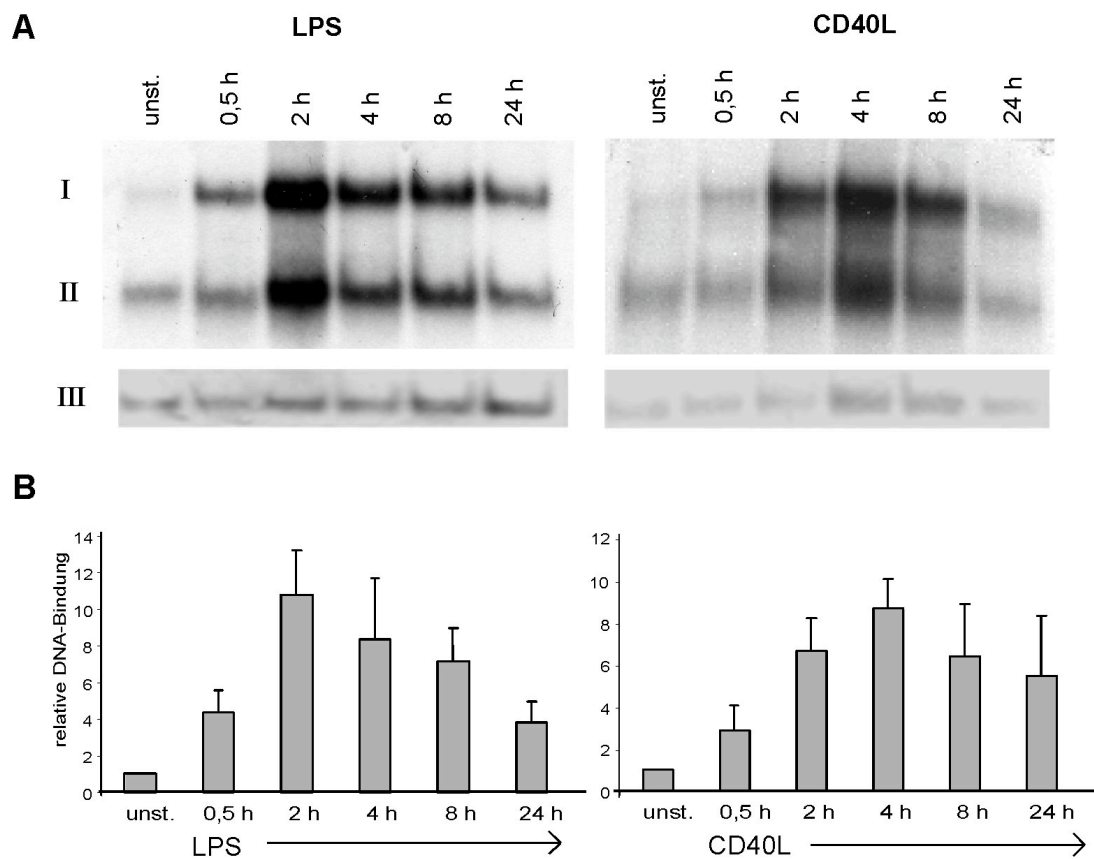


Abbildung 6. Rel/NF- κ B Bindungsaktivität in DZ. DZ wurden aus wildtyp Knochenmark generiert und an Tag 10 der Kultur mit LPS bzw. CD40L-transfizierten Zellen stimuliert. (A) Die Kernextrakte der angegebenen Zeitpunkte wurden mit einer palindromischen κ B-Bindungsstelle inkubiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Rel/NF- κ B-Komplexe sind mit \square bzw. \square gekennzeichnet. Als Ladekontrolle diente eine unspezifische Bande (\square). (B) Graphische Darstellung der relativen DNA-Bindung der Rel/NF- κ B-Komplexe nach Stimulation mit LPS bzw. CD40L-transfizierten Zellen. Die Mittelwerte resultieren aus drei unabhängigen Experimenten.

Durch die Zugabe von α -p50-, α -p52-, α -RelB- bzw. α -c-Rel-Antiserum werden die entstehenden DNA-Protein-Antikörper-Verbindungen (IV) in den Geltaschen zurückgehalten (Abbildung 7A). Dies ermöglicht eine Identifizierung und Quantifizierung der einzelnen Rel/NF- κ B-Familienmitglieder innerhalb der aktivierten Komplexen I und II. Während der Komplex II nur aus p50-p50 Homodimeren besteht, befinden sich in Komplex I Heterodimere aus p50, RelB, RelA und geringe Mengen von c-Rel und p52. Mit Hilfe des AIDA-Programms (*Advanced Image Data Analyzer*) wurden die einzelnen DNA-Protein-Antikörper-Verbindungen nach Stimulation mit LPS (als Beispiel in Abbildung 7B gezeigt) bzw. CD40L-transfizierten Zellen quantifiziert. In Abbildung 7C sind repräsentative Kurvenverläufe der RelA-, RelB- und p50-DNA-Bindung eines Experiments dargestellt. Interessanterweise wird die verzögerte und länger anhaltende DNA-Bindungsaktivität nach CD40-Stimulation durch die Bindung von p50 bestimmt, während zwei Stunden nach Stimulation RelA und RelB ähnliche Maxima aufweisen wie nach Behandlung mit LPS.

Zusammenfassend kann aus diesen Experimenten gefolgert werden, dass die DNA-Bindung aller untersuchter Rel/NF- κ B-Familienmitglieder, wenn auch in unterschiedlichen Mengen, in DZ erhöht ist, was eine veränderte Genexpression nahe legt. Durch die Gelretardationsexperimenten zeigte sich deutlich, daß eine verstärkte DNA-Bindungsaktivität der Rel/NF- κ B-Mitglieder durch externe Stimulation, welche zu einer Endreifung der DZ führt (siehe 3.1), induziert werden kann.

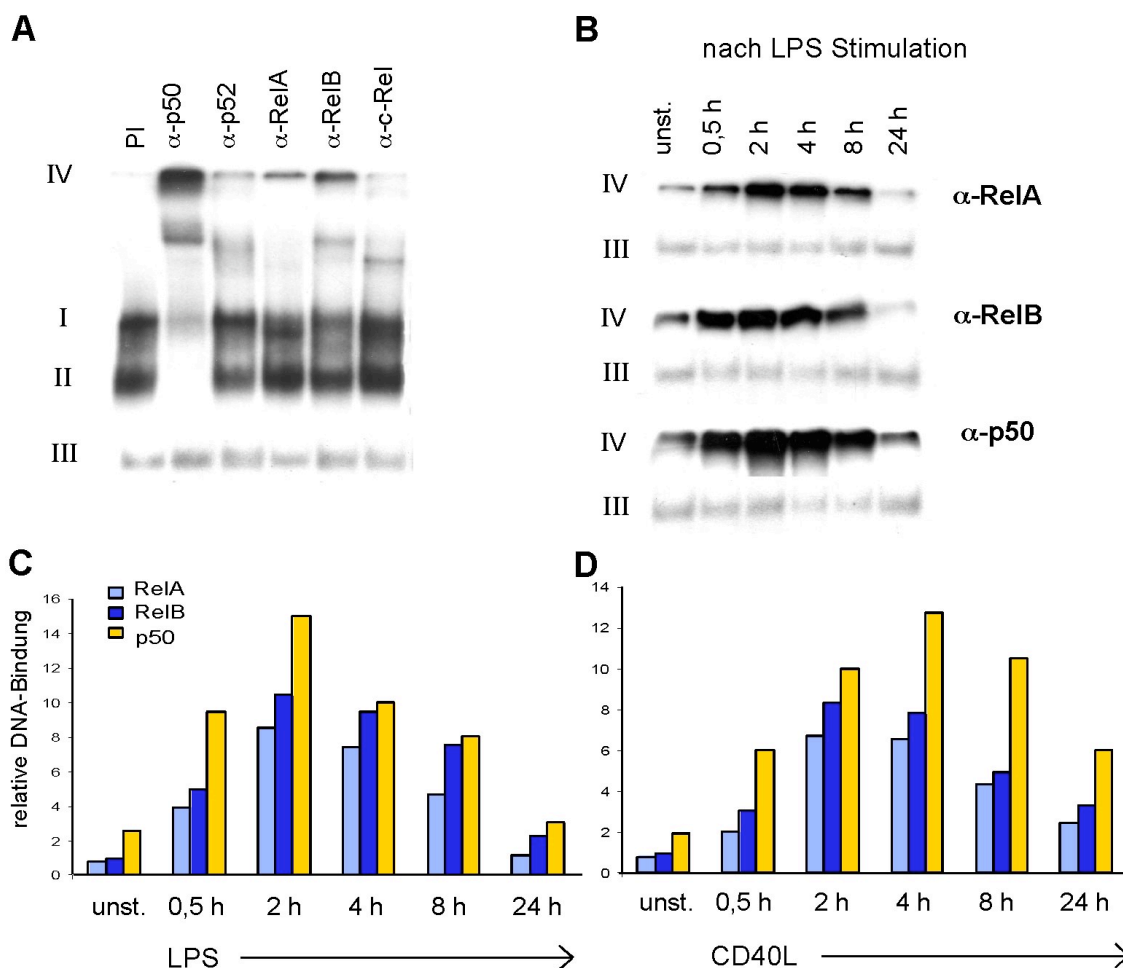


Abbildung 7. Identifizierung der aktivierten Rel/NF- κ B-Komplexe in DZ. Extrakte von KM-DZ wurden mit einer markierten palindromischen κ B-Bindungsstelle inkubiert und in Gelretardationsexperimenten analysiert. (A) Heterodimere Rel/NF- κ B-Komplexe (I) und p50-p50 Homodimere (II) wurden durch die Zugabe spezifischer Antisera identifiziert. Hier gezeigt am Beispiel eines Extraktes, der 2h Stunden nach LPS-Stimulation präpariert wurde. (B) Die Zunahme der DNA-Bindung von RelA, RelB und p50 (IV) nach LPS-Stimulation an den angegebenen Zeiten. (C) Die relative DNA-Bindung der Rel/NF- κ B-Familienmitglieder NF- κ B1 (p50), RelA und RelB nach Stimulation mit LPS. (D) Im Vergleich dazu die relative DNA-Bindung nach Stimulation mit CD40L-transfizierten Zellen. PI = Präimmunsereum. III = Ladekontrolle.

3.3 Durchflusszytometrische Bestimmung der dendritischen Zell-Subgruppen in *relB*^{-/-}, *nfkB1*^{-/-}, und *nfkB2*^{-/-} Mäusen

Um eine mögliche Funktion der einzelnen Rel/NF- κ B-Mitglieder während der *in vivo* Reifung und Differenzierung zu untersuchen, wurden die DZ wie unter 2.4 beschrieben aus Kontroll- und Knockout-Mäusen isoliert und mit Hilfe des *Cellquest*-Programms elektronisch weiter aufgereinigt (Abbildung 8).

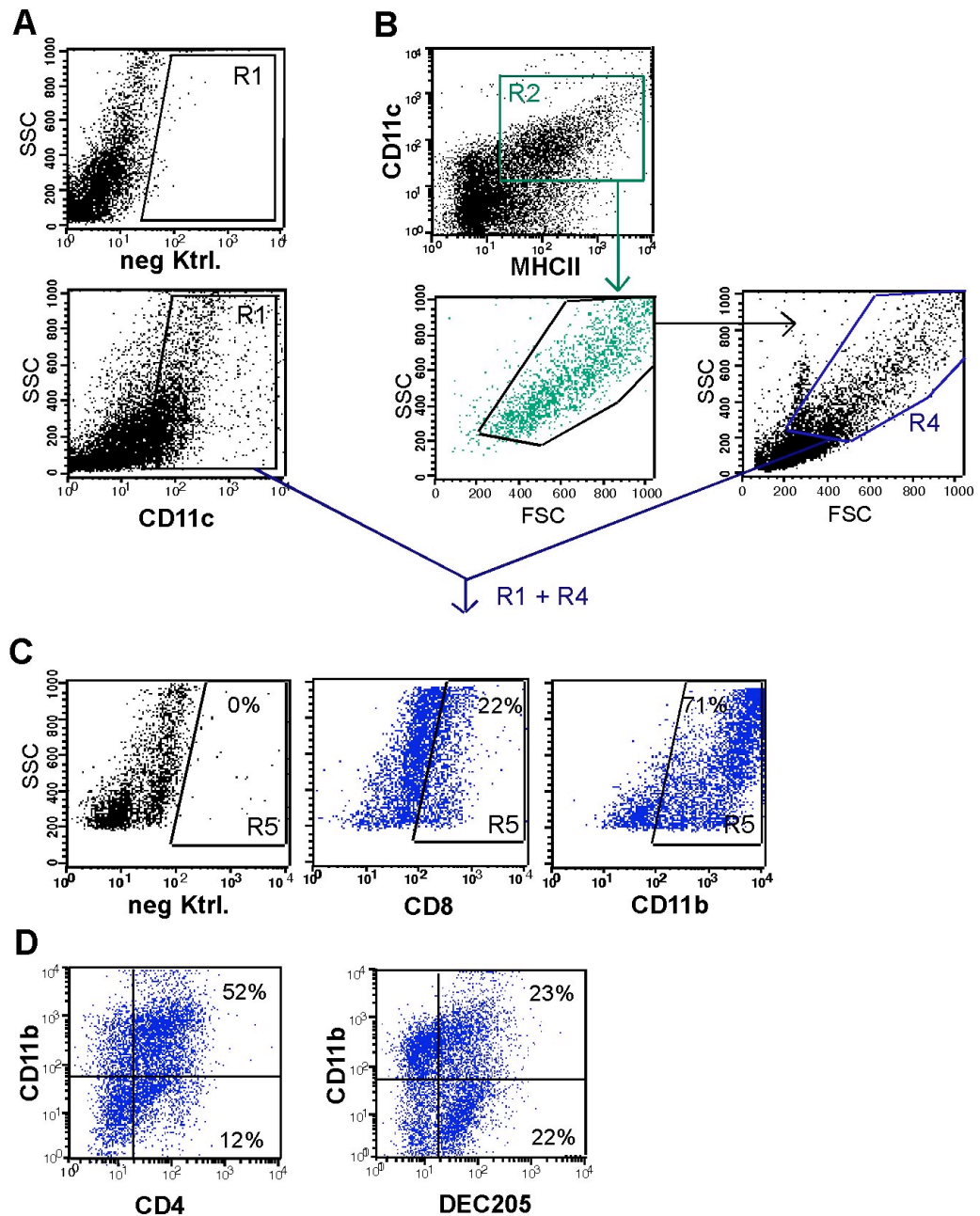


Abbildung 8. Durchflusszytometrische Charakterisierung der DZ-Subgruppen. (A) Die DZ wurden aufgrund ihrer CD11c-Färbung [R1] und (B) ihres FSC/SSC-Profiles [R4], welches indirekt über die Position der CD11c und MHC-II-positiven Zellen bestimmt wurde [R2], elektronisch weiter aufgereinigt. Die Zellen, die sich sowohl in [R1] als auch in [R4] befinden, wurden auf DZ-Subgruppen typische Marker weiter charakterisiert. (C) Quantitativer Anteil von CD8⁺ lymphoiden und CD11b⁺ myeloiden DZ. (D) Quantitativer Anteil von CD11b⁺/CD4⁺ DZ und CD11b⁺/DEC-205⁺ DZ. Der Anteil der doppelt-positiven Zellen ist im oberen rechten Quadranten dargestellt. In C und D sind exemplarisch Färbungen von wt DZ gezeigt.

Weil die *re1B*^{-/-} Maus keine Lymphknoten (LK) ausbildet, wurden die DZ-Subgruppen aus den Milzen und Thymi isoliert und charakterisiert. Hierbei wurde zunächst der prozentuale Anteil der zwei am häufigsten beschriebenen Subgruppen, die durch die Expression der Oberflächenmoleküle CD8 bzw. CD11b unterschieden werden können,

miteinander verglichen. In der wt Milz sind ca. 70 - 80% der CD11c positiven Zellen CD8⁺CD11b⁺ DZ, die übrigen 20 - 30% repräsentieren CD8⁺CD11b⁺ DZ. Die CD8⁻ DZ können aufgrund von spezifischer Expression der Oberflächenmoleküle CD4 und DEC205 in weitere Subgruppen eingeteilt werden. In der gesamten CD11c-positiven Zellpopulation waren die CD11b⁺CD4⁺DEC-205⁻ DZ mit ca. 50% zu einem größeren Anteil vertreten als die CD11b⁺CD4⁻DEC-205⁺ DZ, die ca. 20% der DZ-Population darstellten (Tabelle 1). Es konnte eine leichte Reduktion der CD11b⁺CD4⁺DEC-205⁻ DZ bei *nfk1*^{-/-} und *nfk2*^{-/-} DZ beobachtet werden, was mit einer Erhöhung in den CD11b⁺CD4⁻DEC205⁺ DZ korrelierte. Insgesamt jedoch zeigten *nfk1*^{-/-} und *nfk2*^{-/-} Mäuse eine mit wt vergleichbare Verteilung der DZ-Populationen. In den *relB*^{-/-} Mäusen hingegen konnte eine deutliche Reduktion der CD8⁻CD11b⁺ myeloiden DZ festgestellt werden (Tabelle 1) wobei nur eine leichte (möglicherweise indirekte) Erhöhung in der CD8⁺CD11b⁻ DZ-Population entstand. Die restlichen CD11c⁺CD11b⁺ Zellen, die nahezu 50% der CD11c⁺ Zellen repräsentierten, zeigten keine MHC-II Expression sowie keine positive Färbung für die Oberflächenmoleküle CD4, CD8, DEC-205 und Gr-1 (Daten nicht gezeigt).

Im Thymus konnten in den *relB*^{-/-} Mäusen ebenfalls keine CD8⁻CD11b⁺MHC-II⁺ DZ detektiert werden, während die prozentuale Verteilung der CD8⁺CD11b⁻ DZ der *relB*^{-/-}, *nfk1*^{-/-} und *nfk2*^{-/-} DZ mit wt DZ vergleichbar waren.

Milz	wt DZ	<i>nfk1</i> ^{-/-} DZ	<i>nfk2</i> ^{-/-} DZ	<i>relB</i> ^{-/-} DZ
CD8 ⁺ CD11b ⁻ CD4 ⁻ DEC-205 ⁺ MHC-II ⁺	22 ^{+/- 1,2}	26 ^{+/- 1,7}	22 ^{+/- 2,9}	31 ^{+/- 5,3}
CD8 ⁻ CD11b ⁺ MHC-II ⁺	78 ^{+/- 2,1}	67 ^{+/- 1,2}	72 ^{+/- 4,9}	23 ^{+/- 8,9}
a) CD8 ⁻ CD11b ⁺ CD4 ⁺ DEC-205 ⁻ MHC-II ⁺	52 ^{+/- 3,3}	46 ^{+/- 1,8}	49 ^{+/- 1,1}	n.d.
b) CD8 ⁻ CD11b ⁺ CD4 ⁻ DEC-205 ⁺ MHC-II ⁺	19 ^{+/- 2,1}	24 ^{+/- 5,6}	23 ^{+/- 1,3}	n.d.

Thymus	wt DZ	<i>nfk1</i> ^{-/-} DZ	<i>nfk2</i> ^{-/-} DZ	<i>relB</i> ^{-/-} DZ
CD8 ⁺ CD11b ⁻ CD4 ⁻ DEC-205 ⁺ MHC-II ⁺	73 ^{+/- 4,9}	72 ^{+/- 1,7}	74 ^{+/- 2,9}	79 ^{+/- 5,3}
CD8 ⁻ CD11b ⁺ MHC-II ⁺	26 ^{+/- 3,3}	33 ^{+/- 2,8}	27 ^{+/- 4,4}	n.d.

Tabelle 1. Prozentuale Anteil der DZ-Subgruppen in der Milz und Thymus von wt, *nfk1*^{-/-}, *nfk2*^{-/-} und *relB*^{-/-} Mäusen. Die Zellen wurden wie in Abbildung 8 beschrieben elektronisch ausgewertet. Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von jeweils 4 Mäusen dargestellt. N.d. = nicht detektierbar.

3.4 *In vitro* Reifung der Rel/NF- κ B-defizienten dendritischen Zellen

In den folgenden Experimenten wurden DZ untersucht, die von den Rel/NF- κ B-Knockout-Mäusen aus dem Knochenmark *in vitro* generiert wurden. Dadurch konnte das Verhalten der Rel/NF- κ B-defizienten mit wt DZ verglichen und mögliche Funktionen der jeweiligen Transkriptionsfaktoren abgeleitet werden.

3.4.1 NF- κ B1-defiziente dendritische Zellen lassen sich nur teilweise zur vollständigen Reifung induzieren

DZ wurden aus den Knochenmarkvorläuferzellen der *relB*^{-/-}, *nfk1*^{-/-}, *nfk2*^{-/-}, und wt Mäusen generiert und die Entwicklung 10 Tage lang durchflusszytometrisch verfolgt. In Abbildung 9 sind repräsentative Reifungsprofile von *relB*^{-/-}, *nfk1*^{-/-}, *nfk2*^{-/-} und wt DZ eines Experimentes dargestellt. Zur Identifizierung der DZ wurde mit Antikörper gegen CD11c gefärbt, ein Oberflächenmolekül, welches von allen zur Zeit bekannten DZ-Subgruppen exprimiert wird. Durch die Zugabe des Wachstumsfaktors GM-CSF konnte sowohl bei der wt Maus als auch bei den Rel/NF- κ B-Knockout-Mäusen eine DZ Ausbeute von über 90% erzielt werden (Abbildung 9).

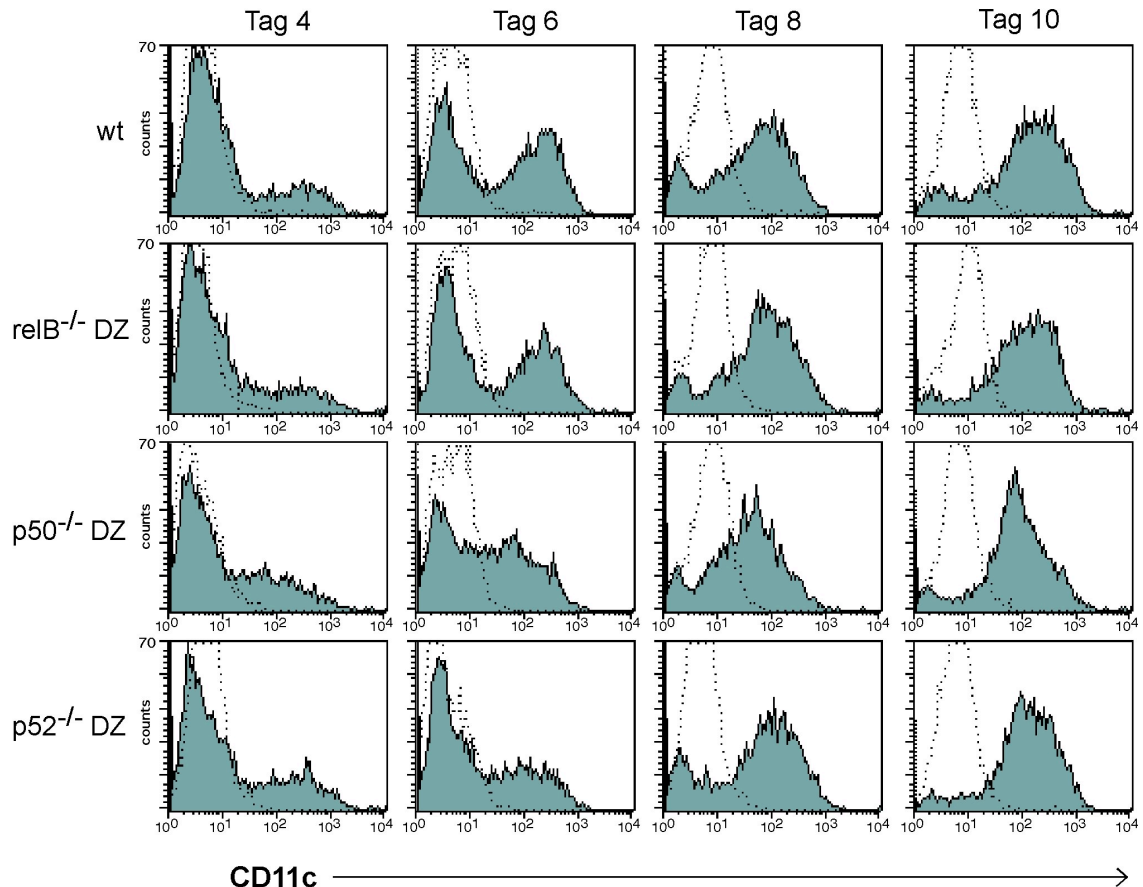


Abbildung 9. DZ-Generierung aus NF- κ B-defizientem Knochenmark. Die Zellen wurden im Laufe der Kultur durchflusszytometrisch mit Antikörper gegen CD11c charakterisiert (gefüllte Histogramme). Als Negativkontrolle dienten ungefärbte Zellen der jeweiligen Kultur (gepunktete Linien).

Der Reifezustand der Zellen zeigt sich u.a. durch die Expression von MHC-II Molekülen, wobei reifere DZ eine Zunahme dieses Oberflächenmoleküls im Verlauf der Differenzierung aufweisen (Abbildung 10). Vier Tage nach Beginn der DZ-Kultur exprimierten mehr als 70% der Knochenmarkszellen eine geringe Menge von MHC-II, welche in der Abbildung durch eine Fluoreszenzintensität unter 10^2 definiert wird. Zwei Tage später konnten schon bei nahezu 50% der wt, *relb*^{-/-} und *nfk2*^{-/-} Zellen eine mittlere Expression von MHC-II (Fluoreszenzintensität zwischen 10^2 und 10^3) detektiert werden. Nach 10 Tagen Zellkultur wiesen mehr als 90% der Zellen eine MHC-II-Färbung über 10^2 auf, in den wt, *relb*^{-/-} und *nfk2*^{-/-} Kulturen zeigten ca. 10% davon einen sehr reifen Phänotyp (Fluoreszenzintensität über 10^3). Ein Unterschied im Reifungsverhalten konnte bei den *nfk1*^{-/-} DZ beobachtet werden: an Tag 6 der Kultur zeigten mehr als die Hälfte der Zellen ein reiferes Verhalten (Fluoreszenzintensität zwischen 10^2 und 10^3), während die sehr reifen DZ mit einer hohen Expression von MHC-II (Fluoreszenzintensität $> 10^3$) an Tag 10 kaum detektiert werden konnten.

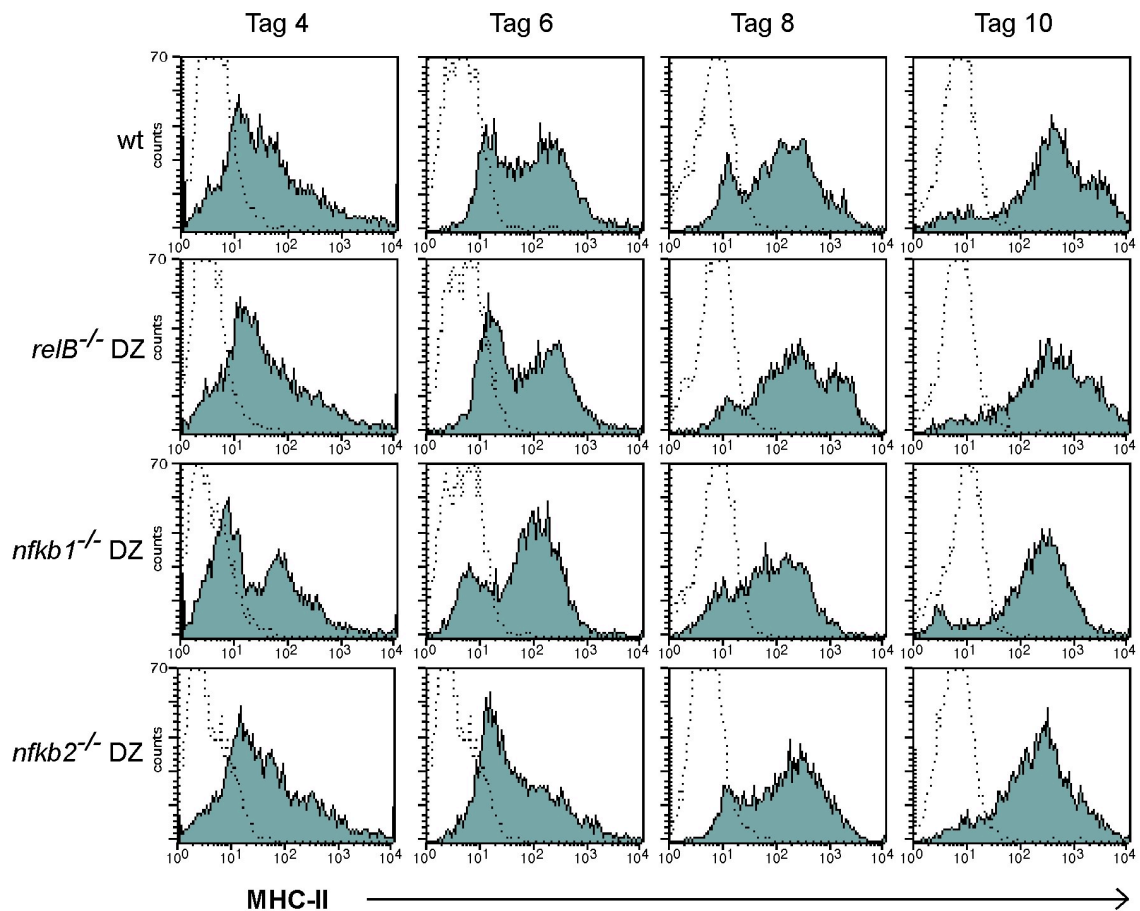


Abbildung 10. Reifungsprofile der NF- κ B-defizienten DZ. Die Zellen wurden aus dem Knochenmark von wt und NF- κ B-Knockout-Mäusen generiert und an Tag 4, 6, 8 und 10 der Kultur durchflusszytometrisch mit Antikörper gegen MHC-II charakterisiert (gefüllte Histogramme). Gepunktete Linien = ungefärbte Zellen der jeweiligen Kulturen.

Ab dem 8. Tag der DZ Generierung konnten durch Zugabe von LPS, poly I:C oder Antikörper gegen CD40 nahezu alle wt, *relB*^{-/-} und *nfkb2*^{-/-} DZ zur sogenannten Endreifung stimuliert werden. Diese reifen DZ weisen eine maximale Expression von MHC-II (Abbildung 11) sowie der kostimulatorischen Moleküle CD80 (nicht gezeigt), CD86 (Abbildung 12A) und CD40 (Abbildung 12B) auf. Im Gegensatz dazu zeigten 30 - 50% der *nfkb1*^{-/-} DZ keine typische Endreifung. Diese CD11c positive *nfkb1*^{-/-} DZ exprimierten MHC-II vorwiegend im mittleren Bereich und deutlich reduzierte Mengen an CD86 und CD40 (sowie CD80 und CD25; Daten nicht gezeigt). Demnach können *nfkb1*^{-/-} KM-DZ durch Stimulation mit LPS, poly I:C oder Antikörper gegen CD40 nicht zu einer weiteren Reifung induziert werden.

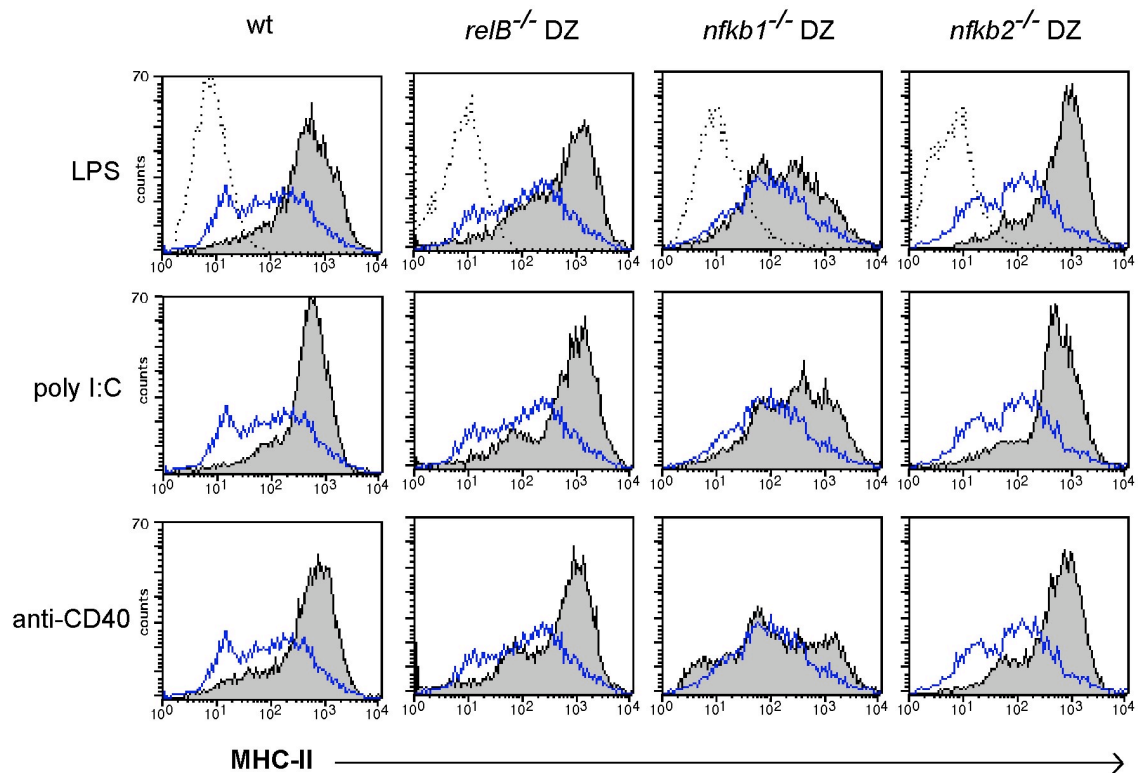
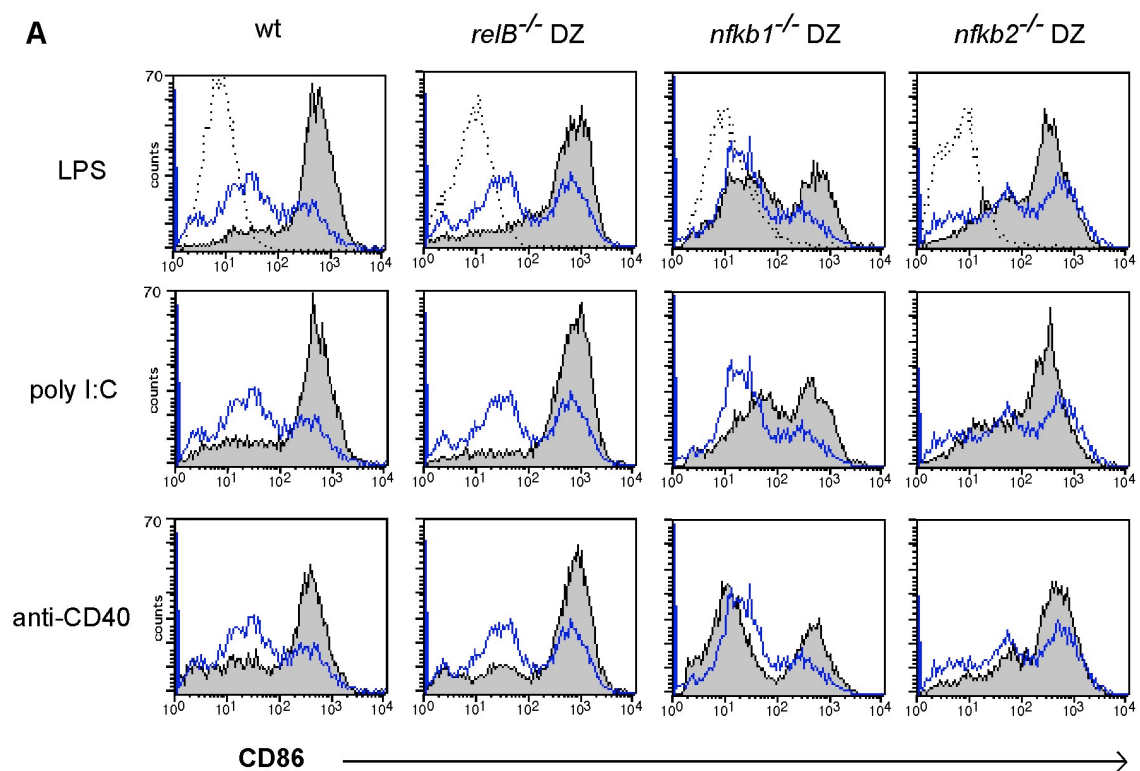


Abbildung 11. Endreifung der DZ durch Stimulation. Die KM-DZ wurden an Tag 10 mit LPS, poly I:C oder Antikörper gegen CD40 zur Endreifung induziert und die verstärkte Expression von MHC-II durchflusszytometrisch bestimmt (gefüllte Histogramme). Negativ-Kontrollen (ungefärbte Zellen) sind durch gepunktete Linien und die unstimulierten DZ durch blaue Histogrammen dargestellt.



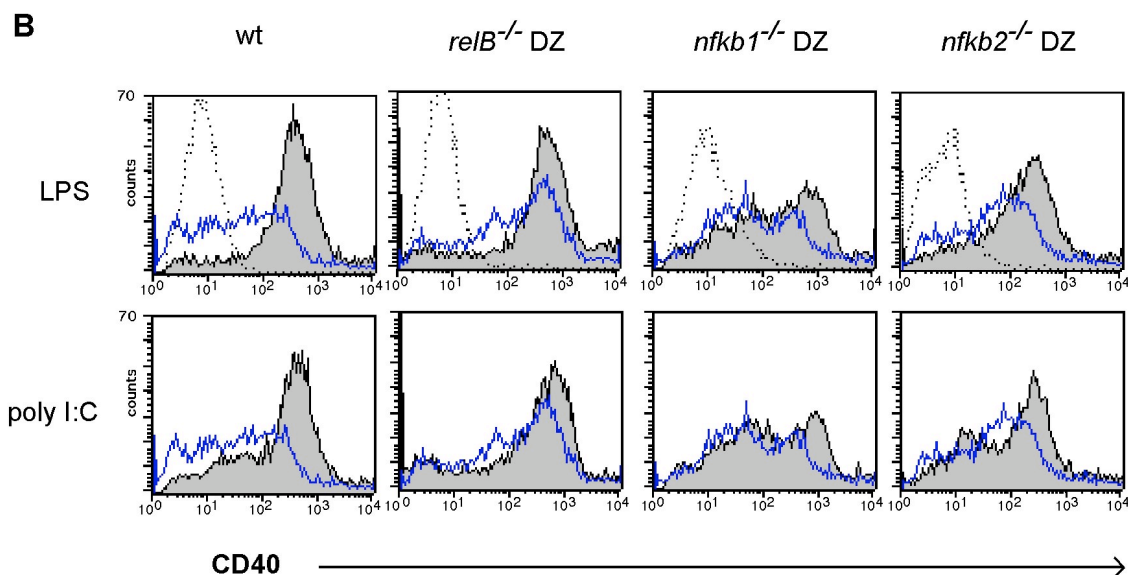


Abbildung 12. Hochregulation kostimulatorischer Moleküle in der Endreifung. KM-DZ wurden mit LPS, poly I:C oder Antikörper gegen CD40 zur Endreifung induziert und die Hochregulation der kostimulatorischen Moleküle (A) CD86 und (B) CD40 durchflusszytometrisch bestimmt (gefüllte Histogramme). Gepunktete Linien = ungefärbte Zellen. Blaue Histogramme = unstimulierte DZ.

3.4.2 Zellzahlbestimmung und Viabilität der dendritischen Zellen

Während der 11 Tage *in vitro* Reifung wurden die Zellen auf Anzahl und Viabilität untersucht. Die Zellzahl wurde unter dem Mikroskop mit Hilfe einer Neubauer Kammer an Tag 6, 8, 10 und 11 der DZ-Kultur ermittelt (Abbildung 13). Die Zunahme der Zellzahl bis zum 10. Tag der Kultur resultiert aus der Proliferation der unreifen DZ. An Tag 10 wurden die Zellen mit LPS, poly I:C oder mit Antikörpern gegen CD40 zu einer Endreifung stimuliert und dabei auf neue Kulturplatten übertragen. Dadurch wurden leicht adhärenente noch proliferierende Vorläuferzellen in den alten Platten zurückgelassen, was die allgemeine Zellreduktion erklärt. Eine zusätzliche, nahezu 4-fache Reduktion der Zellzahl konnte bei den *nfkb1*^{-/-} DZ beobachtet werden. Die verminderte Zellzahl resultierte nicht nur aus der Stimulation, da sich diese Reduktion schon vor der Stimulation der DZ-Kultur bei den *nfkb1*^{-/-} DZ abzeichnete.

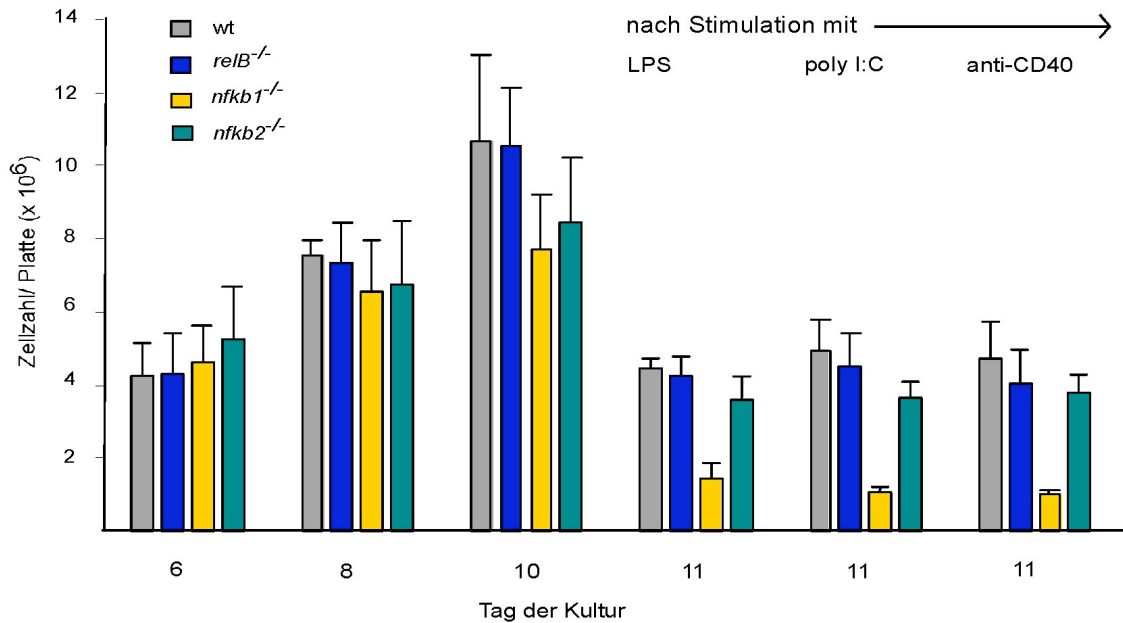


Abbildung 13. Zellzahlbestimmung während der DZ-Reifung. Zu Beginn der DZ-Generierung wurden jeweils 2×10^6 KM-Zellen pro Platte ausgesät und die wachsende Zellzahl an Tag 6, 8, 10 und 11 der Kultur mit Hilfe der Neubauer Kammer bestimmt. An Tag 10 wurde die Zellen mit LPS, poly I:C oder anti-CD40 stimuliert und dabei in neue Kulturplatten übertragen. Die Durchschnittswerte resultieren aus jeweils vier unabhängigen DZ-Kulturen.

Zur Erklärung der auffallenden Abnahme der Zellzahl bei den *nfkb1*^{-/-} DZ wurde eine verstärkte Apoptose angenommen. Für diese Fragestellung wurden die Zellen mit Annexin V (AV) gefärbt. Dieser Farbstoff bindet das Membran-Phospholipid Phosphatidylserin, welches bei der Apoptose von der Innenmembran nach außen translokiert wird. Um die schon toten Zellen, welche ebenfalls für AV positiv sind auszuschließen, wurden die Zellen zusätzlich mit 7-AAD gefärbt (Abbildung 14A). Die DZ, welche gerade in Apoptose gehen, sind in Abbildung 14B durch die prozentuale AV-Färbung dargestellt (AV⁺, 7-AAD⁻). Hierbei zeigte sich bei *nfkb1*^{-/-} DZ eine verdoppelte Apoptoserate, welche zu allen entnommenen Zeitpunkten unbeeinflusst von der Stimulation gleich groß war. Fast die Hälfte der *nfkb1*^{-/-} DZ in der Kultur zeigten eine positive Färbung für AV. Eine zusätzliche Färbung mit Antikörper gegen das kostimulatorische Molekül CD86 zeigte, dass nicht nur reife CD86 DZ, sondern auch CD86 negativen *nfkb1*^{-/-} DZ in Apoptose gingen (Daten nicht gezeigt).

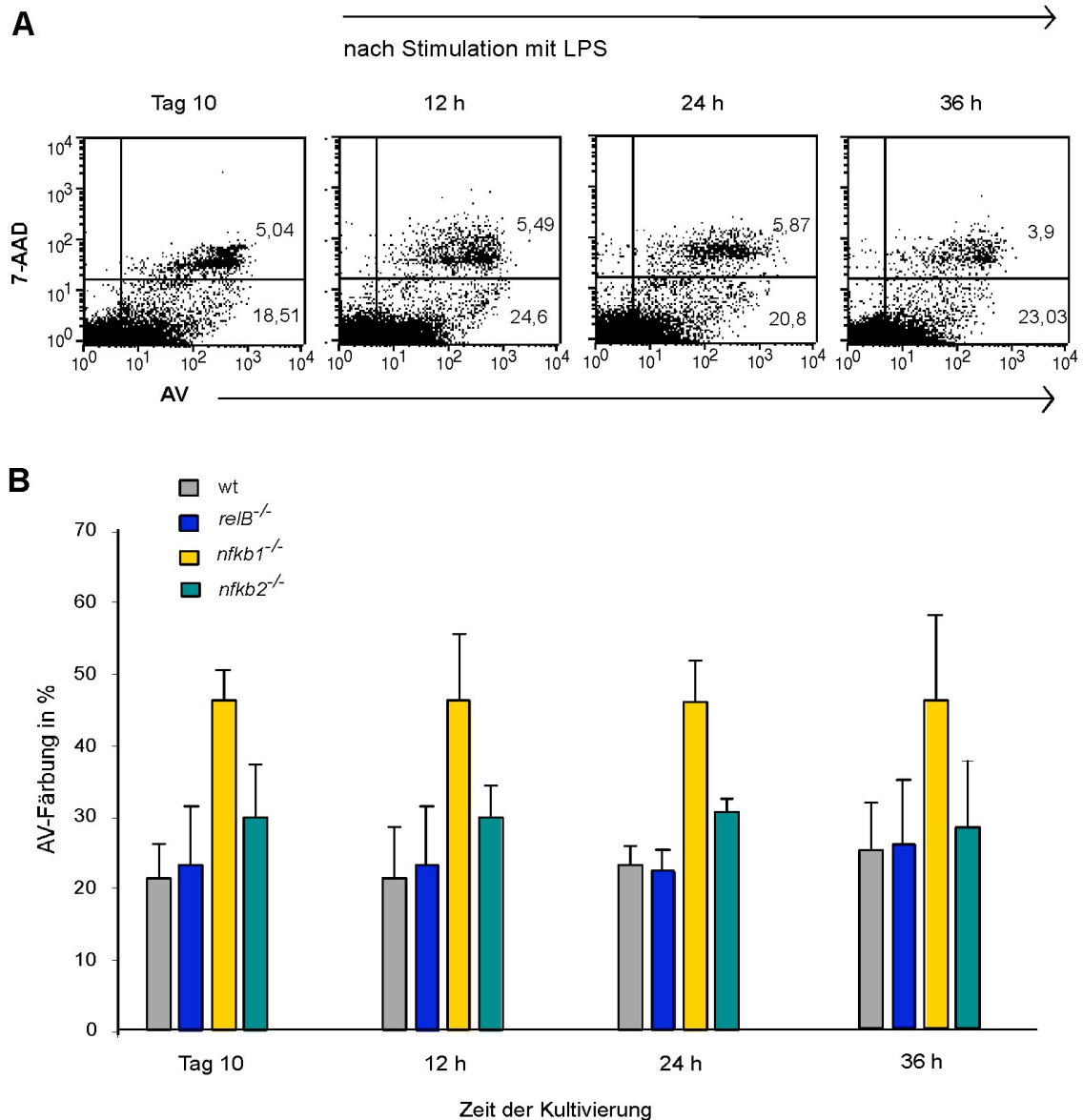


Abbildung 14. Apoptoserate in DZ-Kulturen. (A) $RelB^{-/-}$, $nfkb1^{-/-}$, $nfkb2^{-/-}$ KM-DZ wurden an Tag 10 vor der Stimulation, sowie 12 h, 24 h und 36 h nach LPS-Stimulation mit 7-AAD und AV gefärbt und durchflusszytometrisch charakterisiert. Die Zellen, welche sich gerade in Apoptose befinden, sind im unteren rechten Quadranten dargestellt. (B) Graphische Darstellung der durchflusszytometrischen Bestimmung. Die Mittelwerte resultieren aus drei unabhängigen Experimenten.

3.5 Funktionelle Tests mit Rel/NF- κ B-defizienten dendritischen Zellen

3.5.1 Verminderte Antigenaufnahme bei $nfkb2^{-/-}$ dendritischen Zellen

Die Fähigkeit zur Antigenaufnahme wurde durch die Zugabe von FITC-gekoppeltem Dextran (FITC-DX) (40.000 Da), durchflusszytometrisch untersucht. Antigene werden verstärkt von unreifen DZ aufgenommen, für die eine mittlere Expression von MHC-II

charakteristisch ist. Deshalb wurden für dieses Experiment Zellen an Tag 6 der DZ-Generierung geerntet und zur Bestimmung des Reifezustandes nach der FITC-DX-Aufnahme mit Antikörper gegen MHC-II gefärbt. Um die DZ aus den unterschiedlichen Kulturen vergleichen zu können, wurde nur die FITC-DX-Aufnahme der DZ mit einer mittleren Expression von MHC-II bestimmt. Während nach 3 h 60-80% der wt, *relB*^{-/-} und *nfk1*^{-/-} DZ FITC-DX positiv waren, zeigten selbst nach 5 h nur 30-40% der *nfk2*^{-/-} DZ die Fähigkeit zur DX-Aufnahme (Abbildung 15).

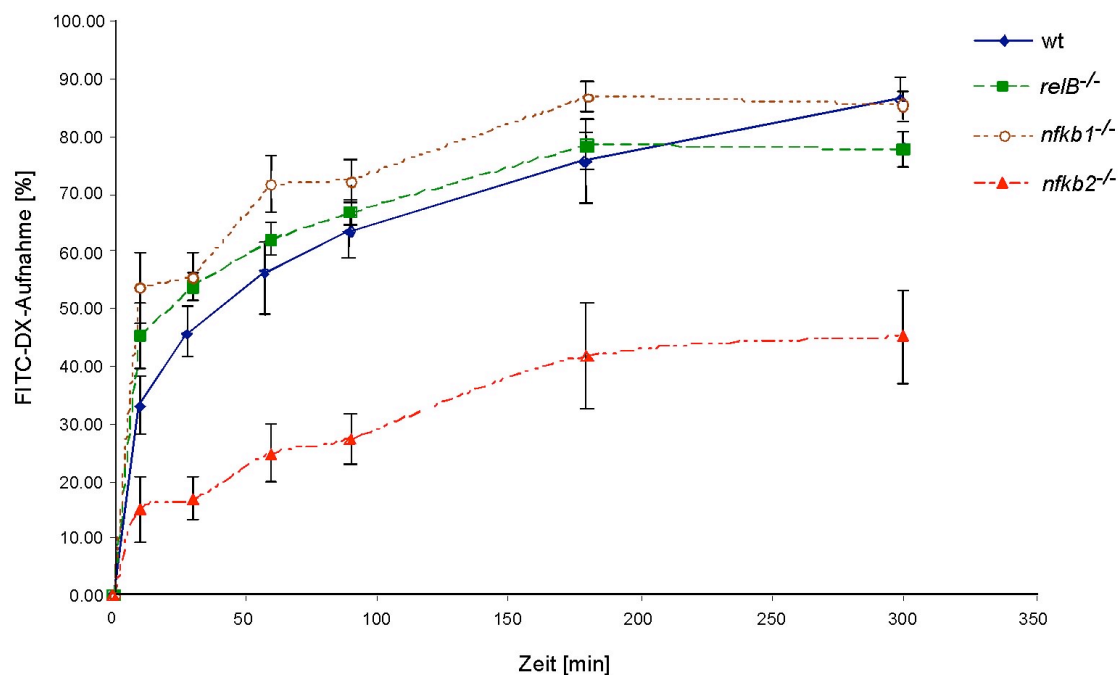


Abbildung 15. *Nfk2*^{-/-} DZ zeigen eine verminderte Fähigkeit zur FITC-DX-Aufnahme. Die Zellen wurden an Tag 6 der DZ-Kultur geerntet und FITC-DX zupipettiert. Bei den angegebenen Zeitpunkten wurde die Aufnahme durch die Zugabe von eiskaltem PBS gestoppt und die FITC-DX positiven DZ durchflusszytometrisch quantifiziert.

3.5.2 *Nfk1*^{-/-} dendritische Zellen zeigen eine verminderte Fähigkeit zur T-Zell-Stimulation

Die gemischte Leukozytenreaktion (MLR), welche auf die Erkennung fremder MHC-Genprodukte durch T-Zellen basiert, wird als *in vitro* Modell für eine zellvermittelte Immunreaktion eingesetzt. Die Reaktion kann durch Kultivierung lymphoider Zellen zweier Tiere aus Inzuchtstämmen ausgelöst werden. In diesem Experiment wurden aus Knochenmark generierte DZ aus wt bzw. NF- κ B-Knockout Mäusen (mit C57BL/6 Hintergrund) mit frisch isolierten Lymphknotenzellen (LKZ) von BALB/c Mäusen

kultiviert (Abbildung 16). Hierbei reagieren die T-Zellen der BALB/c Mäuse, welche auf den MHC-Haplotyp I-A^d restringiert sind, gegen den MHC-Haplotyp (I-A^b) der C57BL/6 APZ. Aktivierung der T-Zellen resultiert u. a. in deren Proliferation, welche durch [³H] Thymidin-Einbau gemessen wurde. Hierbei konnte bei allen MLR-Experimenten eine starke Reduktion in der T-Zell-Aktivierung detektiert werden. Während wt DZ und *relB*^{-/-} DZ eine vergleichbare und *nfkB2*^{-/-} DZ sogar eine leicht verstärkte T-Zell Antwort auslösten, zeigten *nfkB1*^{-/-} DZ eine stark verminderte Fähigkeit zur T-Zell-Stimulation.

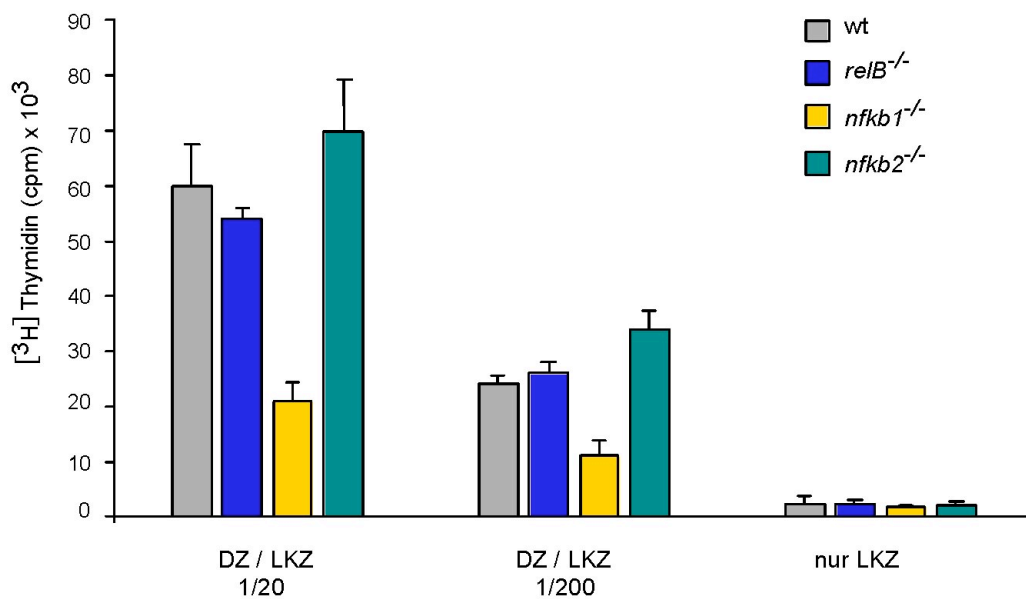


Abbildung 16. Gemischte Leukozytenreaktion mit wt und NF- κ B-defizienten KM-DZ. Reife DZ wurden an Tag 10 der Kultur in unterschiedlichen Konzentrationen mit 2×10^5 LKZ von BALB/c Mäusen kokultiviert und die Proliferationsrate der aktivierten T-Zellen durch [³H] Thymidin-Einbau gemessen. Die Mittelwerte resultieren aus Dreifachmessungen eines repräsentativen Experimentes.

Für die antigenspezifischen T-Zell-Stimulationen wurden transgene OT-I und OT-II Mäuse verwendet, die OVA-spezifische T-Zell Rezeptoren exprimieren. CD8⁺ T-Zellen der OT-I Mäuse erkennen an MHC-I gebundene OVA-Peptide (Abbildung 17A). CD4⁺ T-Zellen der OT-II Mäuse erkennen prozessiertes OVA-Protein, das durch MHC-II-Moleküle präsentiert wird (Abbildung 17B). Bei diesen Experimenten zeigten *nfkB2*^{-/-} DZ, geladen mit OVA-Peptiden, kaum eine stärkere T-Zell-Stimulation, während die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen minimal reduziert war. Bei den *relB*^{-/-} DZ konnte im Vergleich zu wt DZ keine Unterschiede in ihrem Verhalten gegenüber CD8⁺ oder CD4⁺ T-Zellen festgestellt werden. Die *nfkB1*^{-/-} DZ hingegen zeigten auch bei den antigenspezifischen Stimulationstests Defizite in der Fähigkeit T-Zellen zu einer Proliferation zu stimulieren.

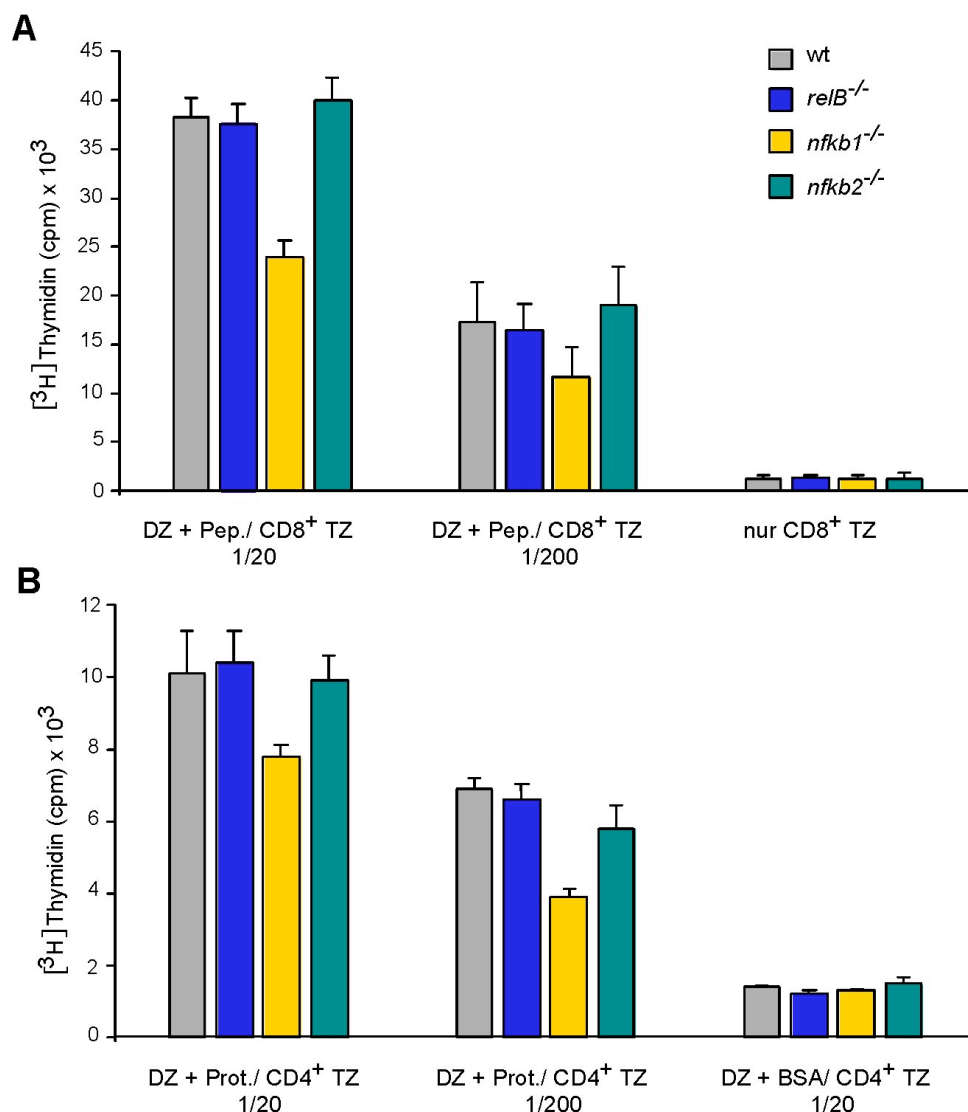


Abbildung 17. Antigen-spezifische Stimulationstests mit wt und NF- κ B-defizienten KM-DZ. Reife DZ wurden an Tag 10 der Kultur in unterschiedlichen Konzentrationen mit 5×10^4 T-Zellen kokultiviert und die Proliferation der T-Zellen durch [3 H] Thymidin-Einbau gemessen. (A) Die T-Zellen für die MHC-I restringierte Immunantwort wurden aus der Milz der OT-I-Maus isoliert und nach Inkubation mit anti-CD8 paramagnetischen *beads* über eine LS-Separationssäule aufgereinigt. (B) Zur Induktion einer MHC-II-restringierten T-Zell-Aktivierung wurden aus der OT-II-Maus die T-Zellen mit anti-CD4 paramagnetischen *beads* gewonnen. Die Mittelwerte resultieren aus Dreifachmessungen eines repräsentativen Experiments.

3.5.3 Reduzierte Anzahl von dendritischen Zellen in *nfkb1*^{-/-}*nfkb2*^{-/-} Doppel-Knockout-Mäusen

Da die *nfkb1*^{-/-}*nfkb2*^{-/-} Maus unter Osteopetrosis leidet, konnten aus dieser Maus keine DZ aus dem Knochenmark generiert werden (Iotsova et al., 1997; Franzoso et al., 1997). Für die T-Zell Stimulationstests wurden deshalb die DZ *ex vivo* eingesetzt. Die gesamte Milz-Zellsuspension aus *nfkb1*^{-/-}*nfkb2*^{-/-} und wt Mäusen wurden nach ACK-

Lyse in unterschiedlichen Konzentrationen zu den Milzzellen von BALB/c Mäusen titriert und nach drei Tagen die Proliferation durch [³H] Thymidin-Einbau gemessen (Abbildung 18). Um eine Prolifertation der *nfkb1^{-/-}nfkb2^{-/-}* Milz-Zellsuspension zu verhindern, wurde diese vor der Kokultivierung mit 2000 Rad bestrahlt. In der Proliferationsrate ist eine deutliche Reduktion der T-Zellen zu sehen, welche von *nfkb1^{-/-}nfkb2^{-/-}* APZ stimuliert wurden. Ein leicht erhöhter [³H] Thymidin-Einbau nach Konzentrationserhöhung sowie eine sichtbar höhere Proliferationsrate gegenüber den Kontrollen (nur BALB/c-Milzzellen) zeigt, dass eine stark reduzierte T-Zell-Stimulation statt fand.

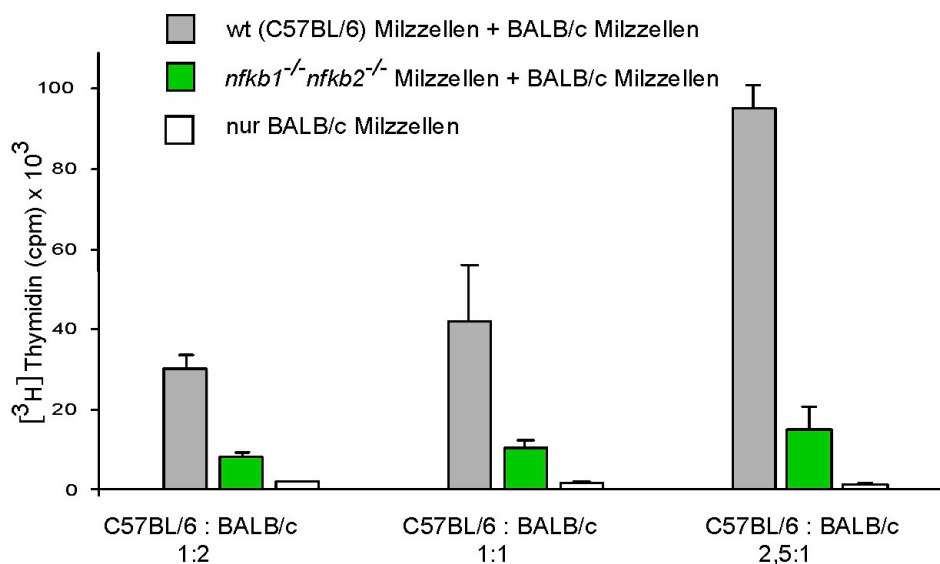


Abbildung 18. *Nfkb1^{-/-}nfkb2^{-/-}* APZ zeigen eine sehr reduzierte Fähigkeit zur T-Zell Stimulation. Für die MLR wurden bestrahlte *nfkb1^{-/-}nfkb2^{-/-}* Milzzellen (mit C57BL/6 Hintergrund) in unterschiedlichen Konzentrationen mit BALB/c Milzzellen kokultiviert. Als Kontrollen dienten C57BL/6 Milzzellen. Die Aktivierung der T-Zellen wurde durch [³H] Thymidin-Einbau gemessen. Die Mittelwerte resultieren aus jeweils einer Dreifachmessung eines repräsentativen Experiments.

Eine stark reduzierte T-Zell-Stimulation kann durch fehlende DZ erklärt werden, weshalb im nachfolgenden Experiment (Abbildung 19) die DZ in der *nfkb1^{-/-}nfkb2^{-/-}* Milz-Zellsuspension durchflusszytometrisch quantifiziert wurden. Während der prozentuale Anteil der durch CD11c Färbung charakterisierten wt DZ ca. 1,5% betrug, konnten nur durchschnittlich 0,24% DZ bei den *nfkb1^{-/-}nfkb2^{-/-}* Milzzellen detektiert werden (Abbildung 19A und B).

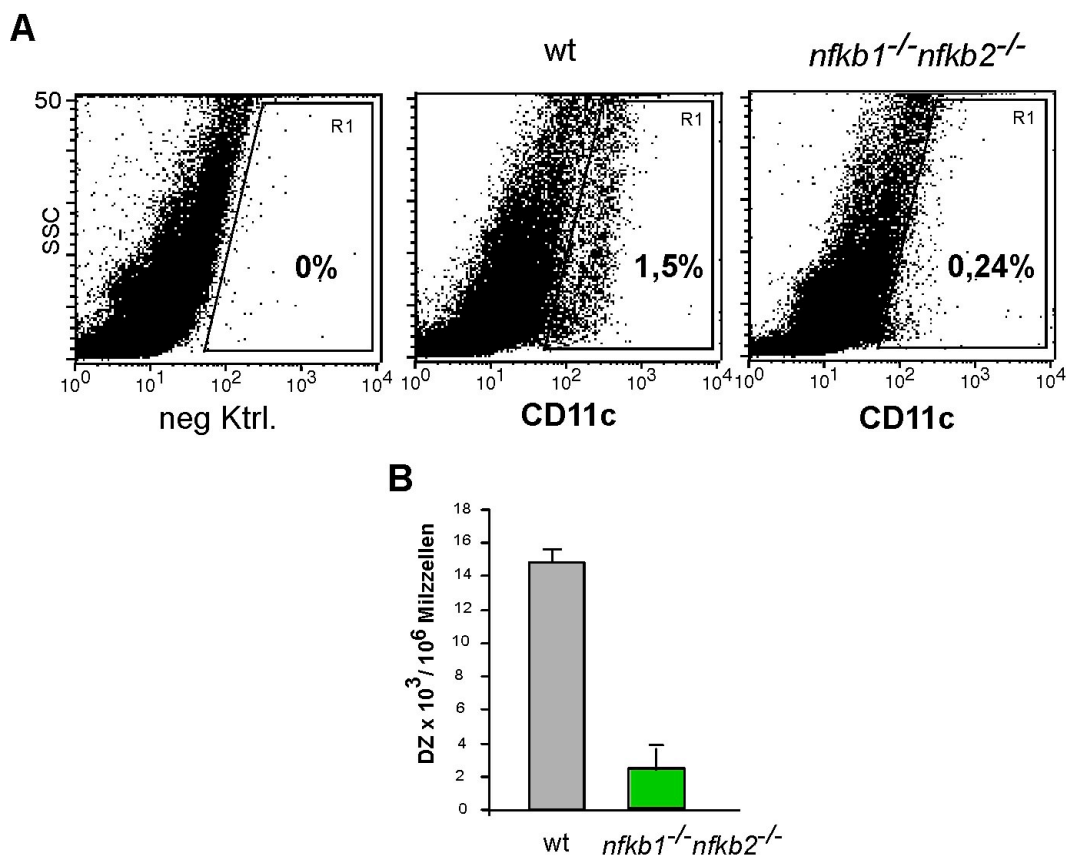


Abbildung 19. Auffällig verminderte DZ in der *nfkb1^{-/-}nfkb2^{-/-}* Maus. (A) Quantitative Messung der CD11c gefärbten *nfkb1^{-/-}nfkb2^{-/-}* bzw. wt Milzzellen (R1). (B) Graphische Darstellung der DZ pro 10⁶ Milzzellen. Die Durchschnittswerte resultieren aus DZ-Isolationen von jeweils fünf Mäusen.

3.5.4 *Nfkb1^{-/-}* dendritische Zellen exprimieren CD45RB

Nur ca. 50-70% der aus Knochenmark generierten *nfkb1^{-/-}* DZ ließen sich durch Stimulation mit LPS, \square -CD40 oder poly I:C zur vollständigen Reifung induzieren. Die restlichen 30-50% der *nfkb1^{-/-}* DZ exprimierten keine oder nur sehr wenige kostimulatorische Moleküle, welche für reife zur T-Zell-Stimulation fähige DZ typisch sind. In Abbildung 20A ist die Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 nach LPS-Stimulation gezeigt. Sehr gut sichtbar ist eine Zellpopulation in der *nfkb1^{-/-}* DZ-Kultur, welche kaum positiv für CD86 ist. Diese Zellen zeigten jedoch eine positive Färbung für CD11c und eine mittelstarke Expression von MHC-II (siehe 3.4.1). Dies deutet auf DZ hin, die entweder einen unreifen Zustand widerspiegeln oder eine DZ-Subgruppe mit spezieller Funktion und daher anderem Expressionsmuster von Oberflächenmolekülen. Eine DZ-Subgruppe mit unreifem Erscheinungsbild, welche in antigenspezifischen Stimulationstests eine geringere T-Zell-Proliferation auslöst und bei der Induktion von tolerogenen T-Zellen beteiligt ist, kann durch seine Expression

von CD45RB charakterisiert werden (Wakkach et al., 2003). Interessanterweise zeigten alle CD11c positive *nfk1^{-/-}* DZ, die sich selbst durch LPS nicht zu einer Endreifung induzieren ließen, eine eindeutige Expression von CD45RB. Im Gegensatz dazu wiesen die reifen CD86 exprimierenden DZ bei der durchflusszytometrischen Analyse keine CD45RB Färbung auf (Abbildung 20B).

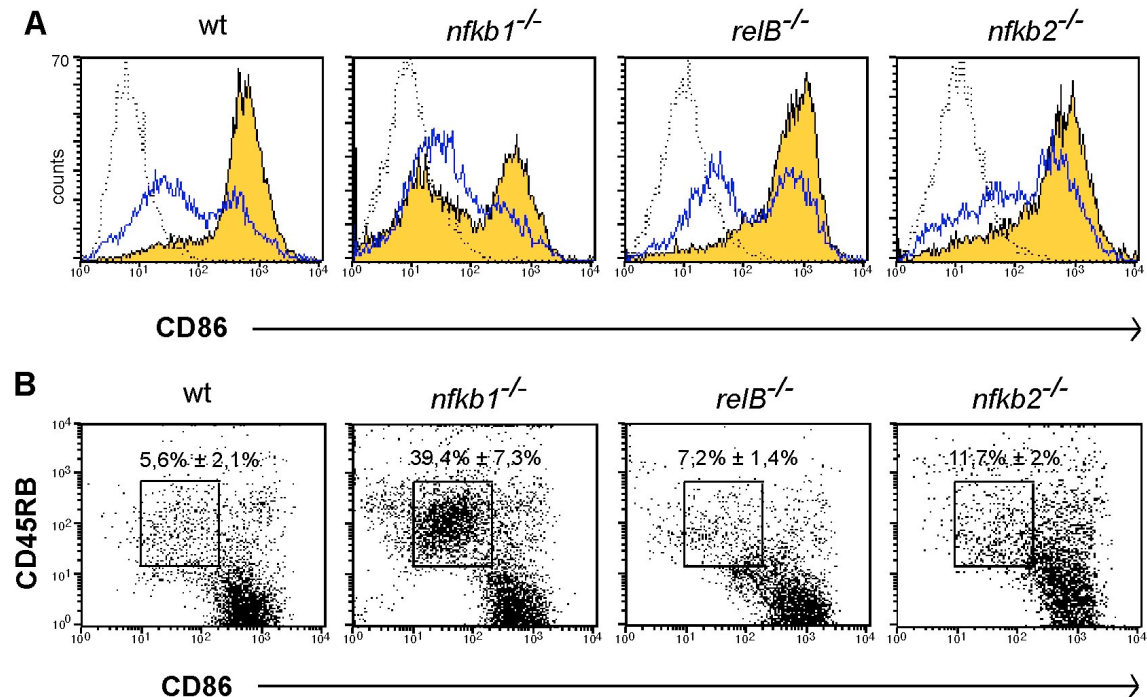


Abbildung 20. Unreif erscheinende *nfk1^{-/-}* DZ exprimieren CD45RB. (A) Die Zellen wurden an Tag 8 der DZ-Generierung mit LPS stimuliert und nach 24 h mit Antikörper gegen das kostimulatorische Molekül CD86 gefärbt (gelbe Histogramme). Ungefärbte Zellen sind als gepunktete Linien dargestellt und unstimulierte Zellen durch blaue Histogramme. (B) Eine zusätzliche Färbung mit Antikörper gegen CD45RB zeigt eine eindeutige Färbung der unreifen Zellen (CD86 negative DZ) in der *nfk1^{-/-}* DZ-Kultur.

3.5.5 Erhöhte IL-10 Produktion in *nfk1^{-/-}* dendritische Zellkulturen und reduzierte IL-12 Produktion in *relB^{-/-}* und *nfk1^{-/-}* dendritische Zellkulturen

Die Art des Pathogens und der vorherrschende DZ-Subtyp beeinflussen die Zytokinproduktion, wodurch unterschiedliche Richtungen von Immunantworten induziert werden können (Pulendran et al., 2001). Während die Produktion von IL-12 eine T_H1 Antwort initiiert, spielt das Zytokin IL-10 durch die Generation von tolerogenen DZ und der Differenzierung von regulatorischen T-Zellen eine eher suppressive Rolle. Die Produktion beider Zytokine kann durch die Zugabe von LPS stimuliert werden, wobei die Expression von IL-10 bzw. IL-12 von dem DZ-Subtyp

beeinflusst wird. In diesem Experiment wurden 1×10^6 Rel/NF- κ B defiziente DZ pro ml Medium an Tag 10 der DZ-Generierung mit LPS stimuliert und nach 24 h in den Überständen die Zytokinproduktion mit Hilfe von ELISA gemessen. Interessanterweise zeigte sich nach LPS-Stimulation in den Überständen der *nfk1*^{-/-} DZ eine erhöhte Menge von IL-10 und eine reduzierte Produktion von IL-12. Im Gegensatz hierzu zeigten *relB*^{-/-} DZ zwar eine geringere Fähigkeit IL-12 zu produzieren, wiesen jedoch keine erhöhte Menge von IL-10 auf (Abbildung 21.).

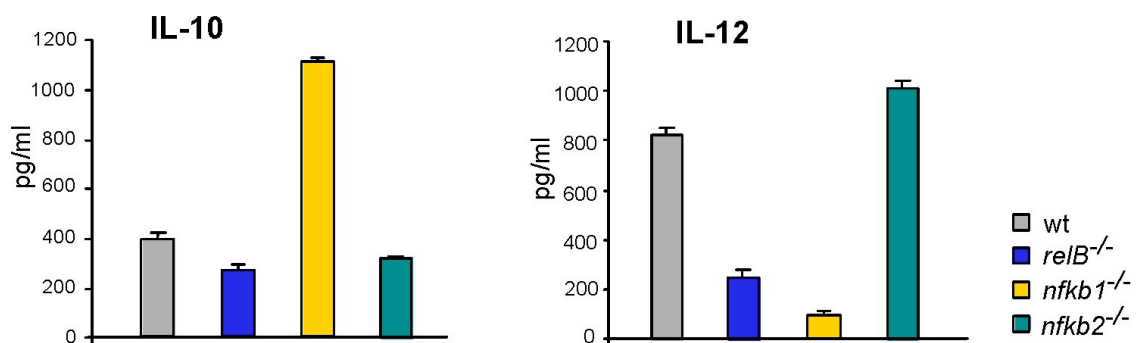


Abbildung 21. 1×10^6 Rel/NF- κ B defiziente DZ/ml Medium wurden an Tag 10 der DZ-Kultur mit LPS stimuliert und nach 24 h in den Überständen die produzierten Zytokine mit Hilfe von ELISA gemessen. Die durchschnittlichen Werte resultieren aus Dreifachmessungen eines repräsentativen Experiments.

3.5.6 RelB-defiziente dendritische Zellen besitzen die Fähigkeit zur Migration

Aufgrund fehlender Lymphknoten in der RelB-Knockout-Maus war nicht bekannt, ob RelB-defiziente DZ in Lymphknoten einwandern können. Interessanterweise exprimieren LZ in der Epidermis der Haut kein RelB, während eine RelB-Expression in DZ in den Lymphknoten detektiert werden kann. Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass eine RelB-Aktivierung während der Migration einsetzt, um z.B. für die Migration notwendige Chemokinrezeptoren oder Adhäsionsmoleküle zu regulieren. Um zu testen, ob bei DZ aus RelB-Knockout-Mäusen die Fähigkeit zur Migration eingeschränkt ist, wurden aus Knochenmark generierte *relB*^{-/-} DZ fluoreszenzmarkiert und in syngene wt Mäuse injiziert.

In einem Vorexperiment wurde der Farbstoff FITC direkt auf die Haut von wt Mäusen gepinselt und nach 24 h der drainierende Lymphknoten isoliert. Es wurden Gewebeschnitte angefertigt und diese anschließend mit Antikörper gegen RelB gefärbt (Abbildung 22). In der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme ist eine rote RelB-Färbung des Zellkerns sowie das aufgenommene FITC (grün) zu sehen. Die

Aufnahme bestätigt, daß DZ aus der Epidermis in den Lymphknoten wandern und zeigt, dass der Transkriptionsfaktor RelB während oder nach der Migration in den Lymphknoten aktiviert und in den Zellkern transloziert wird. Somit wurde ein Migrationsexperiment abgeschlossen.

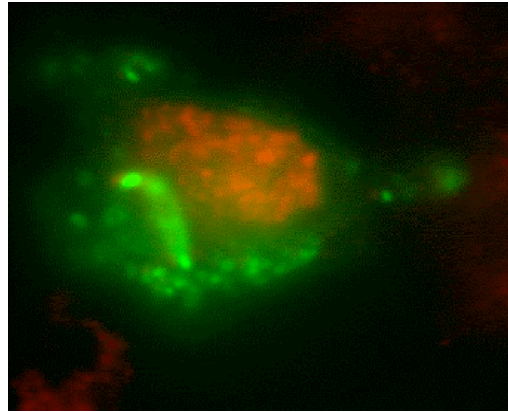


Abbildung 22. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer DZ nach Migration in den Parakortex des drainierenden inguinalen LK. Das aufgepinselte FITC (grün) wurde in der Epidermis von wt LZ aufgenommen und in den drainierenden LK transportiert. LK-Paraffinschnitte mit Antikörper (Texas Red) gegen RelB (roter Zellkern).

Hierfür wurden aus Knochenmark generierte reife DZ (Tag 10 der Kultur) von *relB*^{-/-} und wt Mäusen *in vitro* mit dem Farbstoff PKH26 fluoreszenzmarkiert und syngenen wt Mäusen (C57BL/6) in die Bauchhaut injiziert. Die in den Lymphknoten eingewanderten *relB*^{-/-} KM-DZ konnten in Gewebeschnitten unter dem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden (Abbildung 23B). Für eine quantitative Bestimmung wurde aus den isolierten Lymphknoten (axillare und inguinale) eine Zellsuspension erstellt und die PKH26-markierten Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (Abbildung 23A und C). Hierbei zeigte eine mit wt KM-DZ vergleichbar hohe Prozentzahl von eingewanderten PKH26 positiven Zellen, dass *relB*^{-/-} KM-DZ zur Migration in den Lymphknoten fähig sind. Eine zusätzliche Färbung mit Antikörper gegen CD11c ergab, dass es sich bei den PKH26 positiven Zellen um DZ handelte (Daten nicht gezeigt). Als weitere Kontrolle wurden PKH26 markierte KM-DZ hitzeinaktiviert (70°C) und in wt Mäuse gespritzt. In diesen Mäusen konnte keine PKH26 Färbung in den Lymphknoten detektiert werden, womit der Transport von z.B. PKH26 gefärbten Zellfragmenten durch wt LZ ausgeschlossen werden kann.

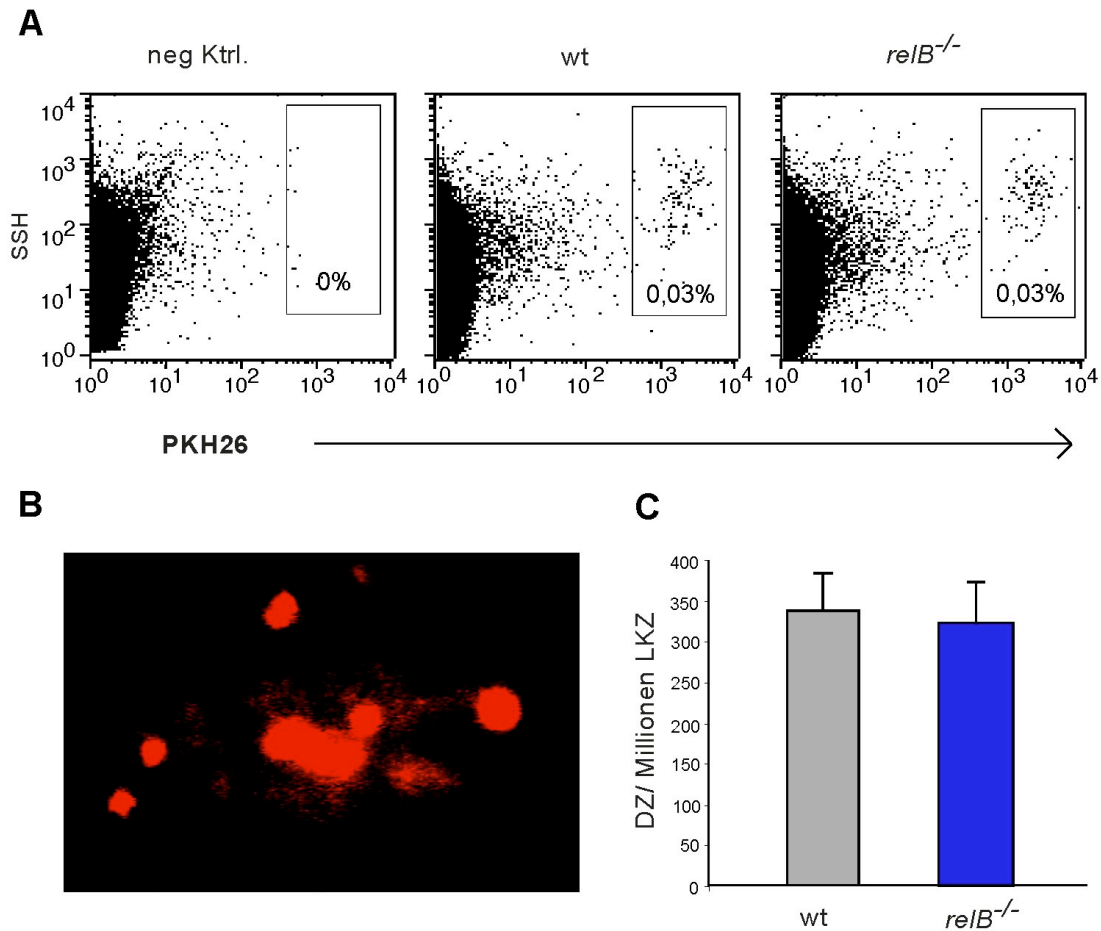


Abbildung 23. $RelB^{-/-}$ KM-DZ besitzen die Fähigkeit zur Migration in den Lymphknoten. *In vitro* generierte DZ von $relB^{-/-}$ und wt Knochenmark wurden mit PKH26 gefärbt und s.c. in die Bauchhaut von syngenigen Mäusen gespritzt. (A) Quantifizierung der eingewanderten fluoreszierenden Zellen. (B) Nach 24 Stunden können PKH26 positive DZ in Gewebeschnitten des drainierenden Lymphknotens detektiert werden. (C) Graphische Darstellung der eingewanderten DZ pro Millionen Lymphknotenzellen basierend auf drei unabhängigen Experimenten.

3.5.7 $RelB$ -defiziente dendritische Zellen sind in der Lage eine Immunantwort *in vivo* auszulösen.

Im vorangehenden Migrationsexperiment konnte gezeigt werden, dass $relB^{-/-}$ DZ fähig sind in Lymphknoten zu wandern. Um zu testen, ob $relB^{-/-}$ DZ dort in der Lage sind eine Immunantwort zu induzieren, wurde ein zusätzlicher *in vivo* Stimulationstest durchgeführt. Außerdem konnten bei der MLR bzw. antigenspezifischen T-Zell-Stimulation (siehe 3.5.2) nur die Interaktion zwischen DZ und T-Zellen untersucht werden, wobei Einflüsse von anderen Zellen oder Geweben, die *in vivo* eine zellvermittelte Immunantwort regulieren könnten, nicht vorhanden waren.

Die CHS entsteht durch eine zellvermittelte Immunantwort und kann in zwei Phasen eingeteilt werden. In der afferenten Phase initiieren epidermale DZ eine

Immunreaktion gegen Antigene bzw. Haptene, indem sie diese nach Aufnahme und Einwanderung in den lokalen Lymphknoten naiven T-Zellen präsentieren. In der efferenten Phase werden nach nochmaliger Antigenexposition von den nun aktivierten T-Zellen andere Immunzellen an den Ort der Entzündungsreaktion rekrutiert, wo sie eine lokale Induration verursachen. Als Hapten wurde TNBS gewählt, welches *in vitro* auf KM-generierte wt und *relB*^{-/-} DZ gegeben wurde. Diese haptensierten DZ wurden in syngene wt Mäuse s.c. injiziert, weil bei den RelB-Knockout-Mäusen der zur Immunantwort notwendige Lymphknoten nicht entwickelt ist. Nach fünf Tagen afferenter Phase wurde die efferente Phase durch epikutane Applikation des Haptens TNCB am rechten Ohr ausgelöst. Das linke Ohr wurde zur Kontrolle nur mit dem Lösungsmittel Aceton behandelt. Um auszuschließen, dass evtl. haptensierte Zelltrümmer von umgebenden LZ aufgenommen und T-Zellen präsentiert werden, wurde für eine weitere Kontrolle haptensierte KM-DZ durch 70°C inaktiviert und in syngene Mäuse injiziert. Solche Kontrolltiere zeigten keine Reaktion, während Mäuse, in welche vitale wt bzw. *relB*^{-/-} DZ injiziert wurden, eine vergleichbare Zunahme der Ohrdicke aufwiesen (Abbildung 24B). In Abbildung 24A sind repräsentative Schnitte vor und 24 h nach epikutaner Applikation des Haptens gezeigt.

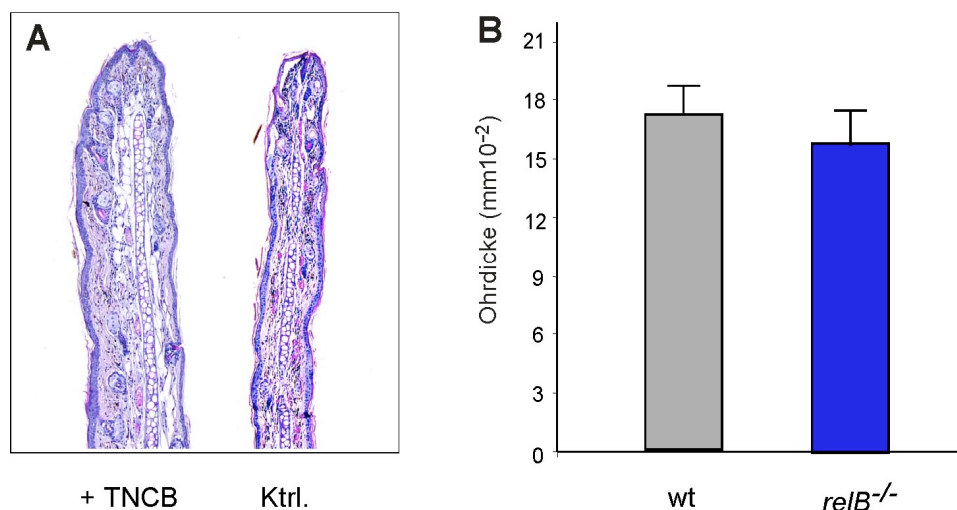


Abbildung 24. *RelB*^{-/-} DZ sind in der Lage eine CHS auszulösen. KM-DZ wurden mit TNBS haptensiert und in syngene wt Mäuse s.c. injiziert. Die Schwellung der Ohrdicke wurde vor und 24 h nach epikutaner Applikation des Haptens gemessen. (A) Paraffinschnitte 24 h nach Applikation mit TNCB. Entzündliche Infiltrate nach TNCB-Behandlung, bzw. keine histopathologische Veränderung bei dem Kontrollohr, welches nur mit Lösungsmittel (Aceton) behandelt wurde. (B) Zunahme in der Ohrdicke nach Auslösung der efferenten Phase in den mit wt DZ und *relB*^{-/-} DZ behandelten Mäusen. Es sind die Mittelwerte von jeweils 5 Mäusen angezeigt.

Dieses Experiment zeigt, dass *relB*^{-/-} KM-DZ eine antigenspezifische Immunantwort nach *in vitro* Sensibilisierung und adoptivem Transfer in naiven Kontrolltieren auslösen können. Die Immunantwort fand in vergleichbarem Ausmaß in mit wt KM-DZ behandelten Kontrolltieren statt.

Bei dem oben beschriebenen CHS-Experiment wurden *relB*^{-/-} DZ, welche *in vitro* aus dem Knochenmark generiert wurden, in die Epidermis von wt Mäusen injiziert. Da nicht ausgeschlossen werden kann, daß LZ in der Epidermis ein anderes Expressions- und damit Verhaltensmuster zeigen, wurde ein Modell gewählt, welches eine annähernde *in vivo* Situation bietet. Durch einen *relB*^{-/-} Knochenmark-Transfer in wt Mäuse und späterer Applikation eines Haptens könnte die Fähigkeit von *relB*^{-/-} LZ eine CHS auszulösen getestet werden. Um auszuschließen, dass noch residente wt LZ in der Epidermis das Hapten zu den drainierenden Lymphknoten transportieren, wurde in einem Vorexperiment der LZ-Austausch über mehrere Wochen beobachtet. Hierfür wurde Knochenmark von Ly5.1 Mäusen, dessen Zellen das Oberflächenmolekül CD45.1 exprimieren, in bestrahlte Ly5.2 Mäuse (Expression von CD45.2) transferiert. Die LZ wurden nach dem Knochenmark-Transfer an den angegebenen Zeitpunkten aus der Epidermis der Ohren isoliert und mit CD11c- und MHC-II-Färbung durchflusszytometrisch identifiziert. Zur weiteren Bestimmung der Abstammung der LZ wurde mit einer dritten Farbe gegen CD45.1 bzw. CD45.2 gefärbt und diese Zellen innerhalb von R1 (CD11c⁺ und MHC-II⁺ Zellen) bestimmt (Abbildung 25A). Leider zeigte sich, daß selbst 30 Wochen nach Knochenmark-Transfer immer noch ca. 80% der LZ von der Rezipienten-Maus stammten und der LZ-Austausch auf diesem Niveau eine Sättigung erreichte (Abbildung 25B).

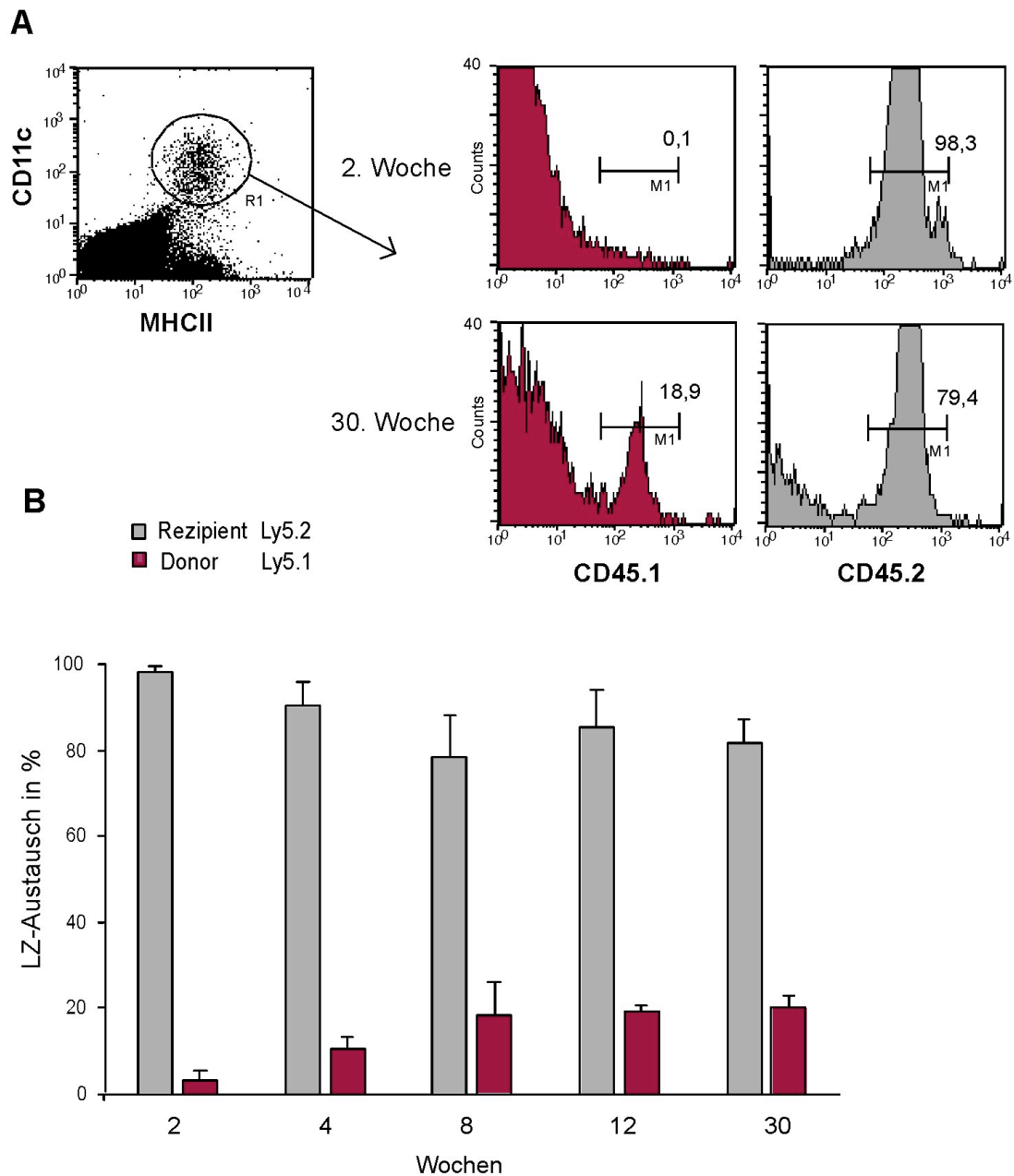


Abbildung 25. LZ-Austausch nach Knochenmark-Transfer. Das Knochenmark mit CD45.1 positiven Zellen wurde in bestrahlte Mäuse mit CD45.2 positiven Zellen i.v. injiziert. (A) Zellen aus der Epidermis der Ohren mit Antikörper gegen CD11c, MHC-II und CD45.1 bzw. CD11c, MHC-II und CD45.2 gefärbt. Die Anzahl der positiven CD45.1 LZ (Donor) bzw. CD45.2 positiven LZ (Rezipient) wurden aus den CD11c/MHC-II positiven Zellen bestimmt (R1). (B) Graphische Darstellung der durchflusszytometrischen Messung. Der durchschnittliche prozentuale LZ-Austausch zu den angegebenen Zeitpunkten wurde aus 3-5 Mäusen ermittelt.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von Rel/NF- κ B in dendritischen Zellen untersucht, wofür unterschiedliche experimentelle Herangehensweisen gewählt wurden. Eine große Schwierigkeit bei der Arbeitsweise mit DZ *ex vivo* ist die geringe Anzahl dieses Zelltyps (ca. 1-3%) in den lymphoiden Organen. In den folgenden Abschnitten wird daher die Rolle von Rel/NF- κ B in DZ diskutiert, welche *in vitro* aus dem Knochenmark generiert wurden. Dies bietet ein definierbares System, das einen DZ-Anteil von ca. 90% zur Verfügung stellt. Vergleichende funktionelle Tests mit *in vitro* generierten KM-DZ und frisch isolierten Milz-DZ zeigten eine vergleichbare Fähigkeit zur Antigenaufnahme und Stimulation von T-Zellen (Garrigan et al., 1996), weshalb KM-DZ für diesbezügliche Experimente eingesetzt werden können. In Abschnitt 4.1 wird zunächst auf die DNA-Bindungsaktivität und damit Aktivität der einzelnen Rel/NF- κ B Proteine in wt DZ eingegangen, während in den darauf folgenden Abschnitten das Verhalten von *relB*^{-/-}, *nfkb1*^{-/-} und *nfkb2*^{-/-} DZ in funktionellen Experimenten diskutiert wird.

4.1 DNA-Bindungsaktivität der Rel/NF- κ B-Proteine während der Reifung dendritischer Zellen

Ziel dieser Untersuchung war herauszufinden, welche Proteine der Rel/NF- κ B-Familie bei der Regulation von Genen in der DZ beteiligt sind und wann sie während der Reifung eine Rolle spielen.

Mittlerweile sind eine Vielzahl von Faktoren bekannt, die über unterschiedliche Signaltransduktionswege die DNA-Bindungsaktivität der Rel/NF- κ B-Proteine induzieren (May und Ghosh, 1997; May und Ghosh, 1998). In der vorliegenden Arbeit wurden für die Aktivierung der Rel/NF- κ B-Proteine LPS und CD40L eingesetzt. LPS ist ein Bestandteil der Gram-negativen bakteriellen Zellwand, welcher durch Bindung an die Toll-like-Rezeptoren TLR2 (Medzhitov et al., 1997) und TLR4 (Poltorak et al., 1998) die κ B-Bindungsaktivität auslösen. LPS-Aktivierung über TLR ist abhängig vom Plasmaprotein LBP (*LPS-binding protein*) und wird durch das Glycosylphosphatidylinositol-verankerte Membranprotein CD14 verstärkt (Yang et al., 1998). Stimulation mit LPS ist ausreichend, um bei der DZ das vollständige "Reifungsprogramm" zu initiieren, wobei durch die Expression von speziellen Oberflächenmolekülen die verschiedenen

Funktionen widergespiegelt werden (Rescigno et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte ein Maximum an \square B-Bindungsaktivität 2 h nach Zugabe von LPS detektiert werden, wobei schon nach 30 min eine Aktivierung stattfand (siehe Abbildung 6). In einer Veröffentlichung konnte die zeitliche Abfolge einiger typischer DZ-Funktionen nach LPS-Stimulation durch funktionelle *in vitro* Experimente mit etablierten D1-Zellen charakterisiert werden (Granucci et al., 1999). Bei den D1-Zellen handelt es sich um eine Wachstumsfaktor-abhängige, myeloide, unreife DZ-Linie, die durch Stimulation mit LPS zur Endreifung induziert werden kann (Winzler et al., 1997). In den ersten 2 h nach LPS-Behandlung steigert sich die endozytotische Fähigkeit zu einem Maximum, während die Fähigkeit zur Migration eingestellt wird, um eine bestmögliche Antigenaufnahme zu ermöglichen. In diesem Zeitraum werden verstärkt MHC-II-Moleküle exprimiert (Cella et al., 1997). Nach 2-4 h stellt die DZ die Antigenaufnahme ein und erlangt wieder die Fähigkeit zu wandern. Es werden verstärkt CD40 und CD86 exprimiert, wobei die Expression von MHC-I und CD80 erst nach 4-6 h hochreguliert wird. Interessanterweise konnte bei *nfk2^{-/-}* DZ eine reduzierte Fähigkeit zur FITC-DX-Aufnahme festgestellt werden, während bei *nfk1^{-/-}* DZ Defizite in der Hochregulation von MHC-II sowie der Expression kostimulatorischer Moleküle detektiert wurde. Somit kann eine Regulation von Genen, die bei diesen Funktionen involviert sind, in Betracht gezogen werden. Es ist jedoch nur bedingt möglich bei einer Abfolge von so vielen Ereignissen, von denen hier nur einige genannt wurden, eine Korrelation zwischen dem Rel/NF- \square B-DNA-Bindungsverlauf und den bisher bekannten Funktionen zu erstellen. Außerdem ist die Zeitspanne zwischen DNA-Bindung, dem Erscheinen der exprimierten Oberflächenmoleküle sowie deren funktioneller Einsatz nicht bekannt.

Das TNF-Familienmitglied CD40L, welches *in vivo* von T-Zellen exprimiert wird, aktiviert durch Bindung an das Oberflächenmolekül CD40 über den TNF-Rezeptor-assoziierten-Faktor TRAF-3 die \square B-Bindungsaktivität in DZ (Wulczyn et al., 1996). Dies resultiert in die Expression von interzellulären Adhäsionsmolekülen wie z.B. CD54, CD58, Hochregulation der kostimulatorische Molekülen CD80 und CD86 sowie verstärkte Sekretion der Zytokine IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 und TNF (Van Kooten und Banchereau, 1997). Zusätzlich wird durch die Stimulation von CD40 die Lebensspanne der Zelle verlängert, um den Zellen für die Stimulation ausreichend Zeit zu gewähren. Diese Funktionen sind insgesamt wichtig bei der Stimulation von T-Zellen und tatsächlich konnte bei der CD40L-Knockout-Maus eine defekte antigenspezifische T-Zell-Stimulation beobachtet werden (Campbell et al., 1996; Soong et al., 1996). Im Gegensatz zur LPS-Stimulation stehen zum zeitlichen Verlauf der einzelnen Ereignisse nach CD40 Stimulation keine Daten zur Verfügung, weshalb

eine funktionelle Ableitung aus der maximalen Rel/NF- κ B-Bindung nach CD40-Stimulation nicht gezogen werden kann. Da im Rahmen dieser Arbeit bei den *relB*^{-/-} und *nfkb1*^{-/-} DZ eine veränderte IL-12 bzw. IL-10 Produktion detektiert wurde (siehe 3.5.5), ist eine Regulation dieser Zytokine, direkt oder indirekt, durch RelB bzw. NF- κ B1 anzunehmen.

Zusammenfassend kann jedoch aus den Gelretardationsexperimenten eindeutig auf eine verstärkte Aktivität von Rel/NF- κ B nach Stimulation geschlossen werden, welche mit der sogenannten Endreifung der DZ korreliert. Hierfür sprechen auch Veröffentlichungen über die Rel/NF- κ B-Bindung in humanen, aus Monozyten generierte DZ (Mo-DZ), in denen nach Zugabe von LPS (Ammon et al., 1999; Lyakh et al., 2000) oder nach CD40-Stimulation (O'Sullivan und Ranjany, 2002) eine induzierte κ B-Bindung beobachtet wurde. Darüber hinaus konnte nach Stimulation von CD40 in B-Zellen (Berberich et al., 1994) sowie in DZ (Neumann et al., 1996) eine Rel/NF- κ B-Aktivität nachgewiesen werden.

Es bleibt die Frage zu diskutieren, ob Rel/NF- κ B in KM-DZ ausschließlich durch externe Stimulation induziert wird oder ob zusätzlich eine konstitutive, wenn auch geringe DNA-Bindung vorliegt. In den Gelretardationsexperimenten konnte vor der Stimulation der KM-DZ eine schwache κ B-Bindung beobachtet werden. Es muss jedoch beachtet werden, dass sich nicht alle Zellen im Laufe der DZ-Generierung aus dem KM im gleichen Reifezustand befinden. Ab dem 8. Tag der DZ-Kultur kann eine leichte Zunahme von sehr reifen DZ mit einer hohen Expression von MHC-II (Fluoreszenzintensität über 10^3 in Abbildung 10) beobachtet werden. Es handelt sich hierbei sehr wahrscheinlich um Zellen, die ebenfalls die kostimulatorischen Moleküle CD86 und CD40 exprimieren (blaue Histogramme in Abbildung 12). Die Zugabe von fremden Proteinen und Zytokinen, welche im FKS enthalten sind sowie mechanische Einflüsse, wie Mediumwechsel und Pipettieren, können eine DZ-Endreifung in der *in vitro* Kultur bewirken. Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass die vor der Stimulation detektierte Rel/NF- κ B-Bindung aus diesen schon gereiften DZ resultiert. Hierfür spricht auch, dass die DNA-Bindung vor der Stimulation dieselben Anteile der einzelnen NF- κ B-Proteine enthält, wie die Protein-Komplexe nach der Stimulation.

4.1.1 Durch Stimulation mit LPS und CD40L wird die DNA-Bindung der Rel/NF- κ B-Familienmitglieder p50, p52, RelA, RelB und c-Rel aktiviert

In bereits veröffentlichten Experimenten wurde die DNA-Bindung der Rel/NF- κ B-Familienmitglieder während der Differenzierung von humanen Mo-DZ bzw. murinen LZ

charakterisiert. Bei der Zusammensetzung der Rel/NF- κ B-Proteine konnten diesbezüglich unterschiedliche Resultate beobachtet werden. Die humanen DZ wurden aus frisch isolierten peripheren Monozyten generiert und die Zellen durch die Zugabe einer Zytokinmischung bestehend aus IL-1 α , IL-6, TNF, IL-1 β und PGE $_2$ zur Endreifung induziert. Es zeigte sich nach Stimulation eine erhöhte Proteinkonzentration im Zellkern von RelB, p50 und p52 sowie ein Anstieg von c-Rel. RelA hingegen blieb in dieser *Western Blot* Analyse unabhängig von dem Reifungszustand stark hoch (Neumann et al., 2000). Mit GM-CSF kultivierte, reife LZ hingegen zeigten einen Anstieg in RelB, p50 und c-Rel, jedoch konnte RelA nur sehr wenig und p52 überhaupt nicht detektiert werden (Neumann et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit konnten bei der Analyse der DNA-bindenden Komplexe überwiegend p50, RelB und RelA identifiziert werden. P52 und c-Rel hingegen hatten nur einen geringfügigen Anteil an den gebundenen Rel/NF- κ B-Proteinen (Abbildung 7).

Der Zelltyp, seine Herkunft sowie die Art der Kultivierung und Stimulation mögen für die unterschiedliche Induktion der Rel/NF- κ B-Proteine verantwortlich sein. Die Zusammensetzung der Familienmitglieder spiegelt lediglich die Zelle in der jeweiligen Kulturbedingung wider und kann mit DZ *in vivo* nur begrenzt in Bezug gesetzt werden. Selbst bei Untersuchungen an frisch isolierten Monozyten, in denen eine Rel/NF- κ B-Bindung festgestellt wurde (Ammon et al., 1999), kann in Frage gestellt werden, inwieweit diese durch den Aufreinigungsprozess eingeleitet wurde. Alle bisher veröffentlichten Arbeiten haben aber eines gemeinsam: die Induktion von Rel/NF- κ B beginnt innerhalb einer sehr kurzen Zeit von ca. 30 min, unabhängig von der Art der Stimulation. Das verzögerte Maximum der DNA-Bindung nach der CD40-Stimulation (Abbildung 7) könnte daraus resultieren, dass es länger dauert bis alle DZ in der Kultur an die CD40L-transfizierten Zellen gebunden sind.

Die DNA-Bindung von p50, p52, RelA, RelB und c-Rel läßt eine Funktion dieser Transkriptionsfaktoren während der Reifung in den KM-DZ vermuten. Um die Funktion der Rel/NF- κ B-Familienmitglieder während der Reifung zu bestimmen, wurden in den weiterführenden Experimente deshalb DZ aus Knochenmarkvorläuferzellen von Mäusen mit einem fehlenden *nfk1*, *nfk2* oder *relB* Gen generiert und diese mit wt DZ in funktionellen Experimenten vergleichend untersucht. Hierbei wurde versucht aus den Verhaltensdefiziten aufgrund des fehlenden Gens Rückschlüsse auf die eigentlichen Funktionen der jeweiligen Transkriptionsfaktoren zu ziehen. Die RelA-Knockout-Maus stirbt bereits zwischen den Embryonalstadien E15 und E16 durch den programmierten Zelltod von Hepatozyten (Beg et al., 1995), weshalb die Funktion von RelA mit der beschriebenen Herangehensweise nicht untersucht werden konnte. Die

Beobachtungen der *in vitro* DZ-Reifung sowie die Resultate der funktionellen Experimente mit den Rel/NF- κ B-defizienten DZ werden in den folgenden Abschnitten diskutiert.

4.2 Funktionelle Experimente mit *nfkb1*^{-/-} dendritischen Zellen

Im Gegensatz zu dem Reifungsverhalten der *relB*^{-/-} KM-DZ zeigten *nfkb1*^{-/-} DZ ein deutliches Defizit in der Endreifung. Auffallend war hierbei die Bildung von zwei Populationen: ein Teil der *nfkb1*^{-/-} DZ war nach Stimulation zu einer vollständigen Hochregulation der kostimulatorischen Moleküle in der Lage, während ca. 30-50% der DZ ein unreifes Erscheinungsbild zeigten. Diese Zellen konnten selbst nach LPS-Stimulation nicht zu einer typischen Reifung induziert werden. Da ein Teil der Zellen fähig war, kostimulatorische Moleküle hochzuregulieren, ist eine direkte Regulation dieser Gene durch NF- κ B1 eher unwahrscheinlich. Außerdem blieb die Hochregulation der als typische Reifungsmarker geltenden Moleküle wie CD86, CD80, CD40, CD25, sowie MHC-I und MHC-II in diesen Zellen aus (Daten nicht alle gezeigt). Es ist eher unwahrscheinlich, dass ein Genprodukt die Regulation all dieser Genexpressionen, die für eine effektive Immunantwort verantwortlich sind, direkt reguliert.

Erwartungsgemäß zeigte sich bei allen durchgeführten Stimulationstests eine reduzierte Fähigkeit der *nfkb1*^{-/-} DZ T-Zellen zur Proliferation zu aktivieren. Für die Bildung der unreifen *nfkb1*^{-/-} DZ-Population sowie der daraus resultierenden verminderten T-Zell-Stimulation werden in den folgenden Abschnitten zwei nicht kontroverse Theorien diskutiert.

4.2.1 *Nfkb1*^{-/-} dendritische Zellen gehen verstärkt in Apoptose

Einen direkten Zusammenhang zwischen NF- κ B und der Zellzyklusregulation wurde schon in einigen Zelltypen beschrieben: bei der Differenzierung von MEL (murinen Erythroleukemia-Zellen) wird *c-myb*, welches ebenfalls an der Proliferation beteiligt ist, von p50-RelB transkriptionell reguliert (Suhasini et al., 1999). In der NF- κ B1-Knockout-Maus konnte ein Proliferationsdefekt in CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit DZ entdeckt werden, der auf verminderte Expression der IL-2-Rezeptoren auf den T-Zellen zurückzuführen ist (Artis et al., 2003). In embryonalen Fibroblasten bewirkt NF- κ B die Transkription von Cyclin D1 und ist in der Transition von der G₁- zur S-Phase involviert (Hinz et al., 1999).

In der unreifen B-Zelllinie (WEHI 231) konnte durch die Zugabe von TPCK (*N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone*) bzw. PDTC (*pyrrolidinedithiocarbamate*), welche die Aktivierung von NF- κ B hemmen, verstärkt Apoptose induziert werden (Wu et al., 1996). NIH 3T3 Fibroblasten hingegen, die sehr niedrige Mengen an NF- κ B exprimieren, zeigten nach gleicher Behandlung keine Zunahme an apoptotischen Zellen. Interessanterweise konnte eine Überexpression des Bcl-X_L Proteins in WEHI 231 B-Zellen die TPCK bzw. PDTC induzierte Apoptose aufheben. Dies impliziert eine Rolle von NF- κ B bei der Regulation anti-apoptotischer Proteine.

In der vorliegenden Arbeit konnte bei *nfkb1*^{-/-} KM-DZ eine erhöhte Sterberate von über 50% detektiert werden. Ein Teil der Zellen war jedoch in der Lage mit einer erhöhten Expression von MHC-II, CD40 und CD86 auszureifen. Die Sterberate war sowohl vor als auch nach LPS-Stimulation erhöht und betraf sowohl unreife als auch reife DZ. Eine Erklärung für die teilweise ausgereiften *nfkb1*^{-/-} DZ trotz verfrüht einsetzender Apoptose wäre folgende: LPS kann durch Aktivierung von MEK/ERK einen von NF- κ B-unabhängigen Signaltransduktionsweg initiieren und das Überleben der DZ nach Stimulation zunächst verlängern und somit zu einer Reifung der Zelle beitragen (Resicigno et al., 1998). In einer *GeneChip*[®]-Analyse konnten in reifen D1-Zellen nach LPS-Stimulation die Hochregulation von anti-proliferativen sowie anti-apoptotischen Genen wie z. B. c-IAP-1 identifiziert werden (Granucci et al., 2001). Durch LPS-Stimulation könnten somit NF- κ B-unabhängige, induzierbare anti-apoptotische Proteine aktiviert werden. Es könnte sein, dass NF- κ B1, insbesondere in Verbindung mit Rel-A, eine evtl. konstante Expression spezieller anti-apoptotischer Proteine reguliert. In bereits veröffentlichten Daten konnten in *nfkb1*^{-/-}*relA*^{-/-} KM-DZ nach 3 – 4 Tagen Kultur durch Trypan-Blau-Färbung eine Sterberate von über 70% identifiziert werden (Ouaaz et al., 2002).

4.2.2 Erhöhte IL-10 Produktion in der *in vitro* Kultur von *nfkb1*^{-/-} dendritischen Zellen

Nach der LPS-Stimulation konnte im Überstand der *nfkb1*^{-/-} DZ-Kultur eine Erhöhung von IL-10 detektiert werden (Abbildung 21). In veröffentlichten Daten wurde gezeigt, dass durch die externe Zugabe von IL-10 LZ und Mo-DZ in einen tolerogenen Zustand gebracht werden, in dem sie unfähig sind eine antigenspezifische Immunantwort auszulösen (Enk et al., 1993; Steinbrink et al., 1997). Diese DZ wiesen einen unreifen Phänotyp mit fehlenden kostimulatorischen Molekülen auf. Eine "neue" DZ-Subgruppe, welche die Differenzierung von regulatorischen T-Zellen induziert, wurde

erst kürzlich von Wakkach et al. (2003) näher charakterisiert. Aktivierte antigen-spezifische regulatorische T-Zellen können Immunantworten unterdrücken und nehmen damit eine wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz ein. Bei dieser DZ-Subgruppe, welche in der Lage ist Selbst-Toleranz zu induzieren, handelt es sich um CD11c positive Zellen mit einem unreifen Erscheinungsbild und einer spezifischen Expression von CD45RB. Durch die Behandlung mit IL-10 entwickelten sich in der Knochenmarkzellkultur ca. 30% der DZ zu diesem beschriebenen Zelltyp, der selbst durch LPS-Stimulation nicht zu einer weiteren Reifung induziert werden konnte, jedoch eine erhöhte IL-10 Produktion aufwies. Die generierten DZ in dieser Veröffentlichung zeigten *in vitro* eine reduzierte Fähigkeit zur T-Zell-Stimulation und induzierten *in vivo* eine durch CD4⁺ T-Zellen übertragbare Toleranz (Wakkach et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit konnte ein Teil der *nfk1^{-/-}* DZ nicht durch Stimulation zu einer weiteren Reifung induziert werden und zeigte ebenfalls keine Expression von kostimulatorischen Molekülen. Interessanterweise wiesen diese CD86⁻ DZ eine Färbung für CD45RB auf (Abbildung 20). Warum differenziert aber nur ein Teil der DZ zu diesem Zelltyp, während die restlichen DZ in der Kultur ausreifen? Eine mögliche Erklärung wäre, dass bereits gereifte Zellen nicht mehr zurück differenziert werden können, wenn IL-10 erst zu einem späteren Zeitpunkt sekretiert wird. Es konnte gezeigt werden, dass unreife Mo-DZ nur geringe Mengen an IL-10 sekretieren und erst nach LPS-Stimulation die Produktion steigern (Corinti et al., 2001). Es muss jedoch in weiteren Experimenten geklärt werden, ob IL-10 direkt von *nfk1^{-/-}* DZ oder von anderen *nfk1^{-/-}* Knochenmarkzellen in der Kultur exprimiert wird. Zu Beginn der DZ-Kultur wurden Makrophagen, die IL-10 produzieren können, nicht depletiert. Die Zytokin-produzierenden Zellen könnten durch eine intrazelluläre Färbung mit Antikörper gegen IL-10 sowie zelltypspezifischer Oberflächenfärbung durchflusszytometrisch identifiziert werden. Darüberhinaus sollte getestet werden, ob *nfk1^{-/-}* DZ in der Lage sind eine Differenzierung von antigenspezifischen regulatorischen T-Zellen zu induzieren und dabei eine Toleranz *in vivo* auslösen können. Zusätzlich sollte die CD45RB⁺ Subgruppe in der Milz von *nfk1^{-/-}* Mäusen *in vivo* auf eine mögliche Erhöhung untersucht werden. Während in wt Mäusen ca. 8% der CD11c⁺ Zellen CD45RB⁺ DZ darstellen, konnte Wakkach et al. (2003) in IL-10 transgenen Mäusen eine Erhöhung von 12,5% detektieren.

Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen geschlossen werden, dass alle hier erörterten Defekte in *nfk1^{-/-}* DZ sich nicht gegenseitig widersprechen und alle zu

einer reduzierten Zellzahl sowie verminderten Fähigkeit zur T-Zell-Stimulation beitragen.

4.2.3 Reduzierte IL-12 Produktion in der *in vitro* Kultur von *nfkb1*^{-/-} dendritischen Zellen

Im Gegensatz zur IL-10 Produktion war die Sekretion von IL-12 sowohl in der *nfkb1*^{-/-} als auch in der *relb*^{-/-} DZ-Kultur reduziert (Abbildung 21). Für eine direkte Regulation der IL-12 Expression durch beide NF- κ B-Mitglieder sprechen folgende veröffentlichte Daten: Yoshimura et al. (2001) konnten durch Adenoviren-vermittelten Gentransfer eine Überexpression von I κ B α in Mo-DZ induzieren, wodurch die Aktivität von NF- κ B unterbunden wird. Dies resultierte neben einer verminderten Hochregulation kostimulatorischer Moleküle und MHC-II zu einer stark reduzierten IL-12 Produktion.

Grohmann et al. (1998) konnten zeigen, dass DZ IL-12 Rezeptoren exprimieren, deren Aktivierung eine weitere verstärkte Sekretion von IL-12 und Expression von MHC-II auslöst. Durch die Aktivierung der IL-12 Rezeptoren konnte eine DNA-Bindungsaktivität von RelB und p50 analysiert werden. Diese Studien sagen wenig über die Zielgene aus, lassen aber eine Rolle der NF- κ B-Familienmitglieder bei der Regulation der IL-12 Expression vermuten.

Die reduzierte IL-12 Produktion könnte jedoch bei den *nfkb1*^{-/-} DZ auch eine indirekte Folge der erhöhten Menge an IL-10 sein, da externe Zugabe von IL-10 die IL-12 Produktion von aktivierten DZ unterdrückt, während die Zugabe von IL-12 die IL-10 Produktion nicht beeinflusst (Xia und Kao, 2003). Im Zusammenhang mit der suppressiven Wirkung des IL-10 Zytokins konnten Schottelius et al. (1999) zeigen, dass IL-10 die TNF- und LPS-induzierte NF- κ B-Aktivität in humanen Monozyten blockiert. IL-10 verhindert die Bindung von NF- κ B an die DNA durch Blockierung der IKK-Aktivität, wodurch die Phosphorylierung und Degradierung des I κ B α verhindert wird.

4.3 Funktionelle Experimente mit *nfkb2*^{-/-} und *nfkb1*^{-/-}*nfkb2*^{-/-} dendritischen Zellen

Die Rolle von NF- κ B2 in DZ wird an dieser Stelle weniger ausführlich besprochen, weil es verglichen mit den wt DZ fast keine auffälligen Unterschiede gab. Da in DZ selbst nach LPS-Stimulation nur wenig NF- κ B2 aktiviert wird, lässt dieses eine eher geringfügige Rolle in der Zelle vermuten und wird diesbezüglich selten in der Literatur

erwähnt. Auffallend war jedoch die verminderte Fähigkeit FITC-gekoppeltes Dextran aufzunehmen. Obwohl die Dextran-Aufnahme über Mannose-Rezeptoren erfolgen soll (Lutz et al., 1996), konnte diese durch die Zugabe von Mannan nicht gehemmt werden, was eine weitere Untersuchung erschwerte. Obwohl die Fähigkeit zur FITC-Dextran Aufnahme im Vergleich zu wt KM-DZ vermindert war, konnten keine Defizite in der antigenspezifischen T-Zell Stimulation, sowie der Produktion von IL-10 und IL-12 detektiert werden. Dies lässt eine gewisse Redundanz innerhalb der Rel/NF- κ B Proteine vermuten, wobei berücksichtigt werden muss, dass im Rahmen dieser Arbeit nicht alle Funktionen von DZ untersucht werden konnten. Es wäre jedoch für die Entwicklung des Immunsystems von Vorteil, die Regulation wichtiger Funktionen wie z. B. T-Zell-Aktivierung nicht einzelnen Proteinen zu überlassen.

Nfkb1^{-/-}*nfkb2*^{-/-} DZ hingegen zeigten eine stark reduzierte Anzahl von DZ und eine verminderte Fähigkeit T-Zellen zu stimulieren. Da RelB in DZ mit p50 bzw. p52 Heterodimere bildet, fällt die Aktivität von RelB zusätzlich in diesen Doppel-Knockout-Mäusen aus. Dies könnte verstärkend in *nfkb1*^{-/-}*nfkb2*^{-/-} DZ zum Tragen kommen und somit die drastisch reduzierte DZ-Anzahl in der Doppel-Knockout-Maus und die daraus resultierende reduzierte T-Zell-Stimulation erklären.

4.4 Funktionelle Experimente mit *relB*^{-/-} dendritischen Zellen

Immunhistologische Färbungen in murinen (Burkly et al., 1995) und humanen (Pettit et al., 1997; Clark et al., 1999) Hautschnitten zeigten keine RelB-Färbung der LZ in der Epidermis, während in den Lymphknoten interdigitierende DZ RelB-positiv waren. Wurden isolierte humane Monozyten kultiviert und aktiviert, konnte in Gelretardationsexperimenten aktiviertes RelB detektiert werden (Ammon et al., 1999; Lyakh et al., 2000; O'Sullivan und Ranjany, 2002). RelB war also in antigenpräsentierenden Zellen aktiv, woraus geschlossen wurde, dass RelB eine Rolle bei der T-Zell-Stimulation spielt.

Darauf deuteten auch die ersten veröffentlichten funktionellen Experimente mit RelB-defizienten DZ hin. Bei diesen allogenen MLR wurde die gesammte Milzzellsuspension aus RelB-defizienten Mäusen eingesetzt, wobei sich eine stark reduzierte T-Zell-Proliferation zeigte (Burkly et al., 1995). Es stellte sich jedoch heraus, dass in der RelB-defizienten Milz die Anzahl der CD8⁻ myeloiden DZ stark reduziert ist. In dieser Veröffentlichung konnte überdies gezeigt werden, dass gereinigte RelB-defiziente CD8⁺ DZ eine mit wt CD8⁺ DZ vergleichbare Fähigkeit zur T-Zell-Stimulation besitzen (Wu et al., 1998). Es ist daher zu beachten, dass in allen folgenden zitierten

Stimulationstests, die mit DZ aus der RelB-Knockout-Maus bzw. *in vivo* mit *relB*^{-/-} Knochenmarkchimären durchgeführt wurden, die CD8⁺ DZ reduziert sind.

In antigenspezifischen Stimulationstests zeigten aus *relB*^{-/-} Knochenmarkchimären aufgereinigte, OVA-Peptid geladene DZ ein starkes Defizit in der Fähigkeit CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen zu stimulieren (Castiglioni et al., 2002a). Im Gegensatz hierzu waren die *relB*^{-/-} KM-DZ in der vorliegenden Arbeit in der Lage sowohl eine antigenspezifische CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zell-Antwort auszulösen. Interessanterweise konnte bei einer somatisch transgenen Immunisierung in *relB*^{-/-}-Knochenmarkchimären eine mit Kontrolltieren vergleichbare T-Zell-Antwort gemessen werden (Castiglioni et al., 2002a). (In dieser Immunisierung wurde Plasmid-DNA, deren Transgen unter der Kontrolle eines B-Zell-spezifischen Promoter steht, in die Knochenmarkchimären injiziert. Durch das aufgenommene Plasmid exprimieren B-Zellen direkt in der Milz systematisch das Antigen, Peptide des *Plasmodium falciparum*. Bei dieser Art der Immunisierung wird vermutlich eine CD4⁺ T-Zellantwort induziert).

Ein Defekt in der antigenspezifischen T-Zell-Stimulation kann durch mangelnde Fähigkeit in der Antigenaufnahme erklärt werden. In diesbezüglich veröffentlichten Experimenten zeigten aufgereinigte Milz-DZ aus *relB*^{-/-} Knochenmarkchimären eine Stunde nach i.v. Injektion mit FITC-konjugiertem OVA-Protein eine stark verminderte Fähigkeit zur Aufnahme (Castiglioni et al., 2002a), während nach s.c. Injektion mit FITC-konjugiertem OVA-Protein aufgereinigte LK-DZ aus *relB*^{-/-} Knochenmarkchimären zur Antigenaufnahme in der Lage waren (Castiglioni et al., 2002b). In den *relB*^{-/-} DZ aus der Milz könnte es sich hauptsächlich um CD8⁺ DZ mit einer geringeren Fähigkeit zur Antigenaufnahme handeln; bei den *relB*^{-/-} DZ aus den Lymphknoten könnten strahlungsresistente wt LZ beteiligt sein. In den hier vorliegenden Daten zeigten *relB*^{-/-} KM-DZ eine mit wt KM-DZ vergleichbare Antigenaufnahme (Abbildung 15).

Weiterhin benötigt die DZ für eine effektive T-Zell-Stimulation eine erhöhte Expression von MHC-Komplexen und kostimulatorischen Molekülen. Einen direkten Zusammenhang zwischen der Regulation dieser Moleküle und Rel/NF- κ B konnte in der B-Zelle nachgewiesen werden (O'Sullivan et al., 2000). Durch transiente Transfektion einer B-Zelllinie mit RelB, die in Zellextrakten zu einer erhöhten Menge von RelB-p50 Heterodimeren führte, konnte eine erhöhte Expression von CD40 und MHC-I nachgewiesen werden. Diese Zellen zeigten eine verstärkte Fähigkeit zur T-Zell-Stimulation, während B-Zellen, die mit Antisense *relB* behandelt wurden, infolge verminderter Expression von CD40 und MHC-I, eine reduzierte T-Zell-Proliferation induzierten. In den Arbeiten von Castiglioni et al. (2002a) zeigten die aus Milz und Lymphknoten von *relB*^{-/-} Chimären isolierten DZ keine MHC-II und CD40 Färbung.

Selbst nach *in vitro* Kultivierung mit LPS-Stimulation konnte hier nur eine leichte Hochregulation der Moleküle erzielt werden. Kontrovers ist jedoch, dass in dieser Veröffentlichung die OVA-positiven *relB*^{-/-} Milz-DZ im Antigenaufnahmetest alle CD40-positiv sind. Einen hierzu gegensätzlichen Phänotyp zeigten die isolierten Milz-DZ aus der RelB-defizienten Maus in einer älteren Veröffentlichung: *relB*^{-/-} DZ wiesen hier sogar eine erhöhte Expression von CD40 und CD86 auf (Wu et al., 1998). Die sehr gegensätzlich erscheinenden Ergebnisse könnten in der unterschiedlichen Aufreinigung der DZ aus den Organen begründet sein. Ebenso könnten unterschiedliche Kulturbedingungen der Knochenmarkvorläuferzellen die Fähigkeit der *relB*^{-/-} KM-DZ zu Reifung beeinflussen. Während in einer Veröffentlichung *relB*^{-/-} KM-DZ eine verminderte MHC-II-Expression und kaum detektierbares CD86 bzw. CD40 aufwiesen (Martin et al., 2003), konnten in unserem Labor die *relB*^{-/-} KM-DZ in jeder Kultur ausgereift werden. Hierbei war die Expression von CD40 vergleichbar mit wt DZ. Eine mögliche Erklärung wäre folgende: in der oben genannten Veröffentlichung wurden vor dem Kulturstart aus der Knochenmarkzellsuspension die mononukleären Zellen, Makrophagen sowie MHC-II-positive Zellen entfernt. Bei dieser Aufreinigung bleiben hauptsächlich MHC-II-negative Knochenmarkvorläuferzellen übrig. Außerdem wurde zu dem GM-CSF, welches mit 10 ng/ml niedriger dosiert wurde als in der vorliegenden Arbeit, zusätzlich IL-4 hinzugefügt. In der vorliegenden Arbeit wurden, um eine größere Zellzahl zu erlangen, alle Knochenmarkzellen ausgesät, wobei nicht-DZ wie z.B Granulozyten während der verlängerten Kulturperiode von 10 Tagen starben. Es könnte durchaus sein, dass bereits differenzierte Knochenmarkzellen und ein daraus resultierendes Zytokinmilieu ausschlaggebend für die Reifefähigkeit der RelB-defizienten DZ unter diesen Kulturbedingungen ist. Sicherlich ist der reife Phänotyp und die Fähigkeit kostimulatorische Moleküle zu exprimieren eine Erklärung dafür, warum die *relB*^{-/-} DZ in der vorliegenden Arbeit antigenspezifische CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Antworten auszulösen vermag (Abbildung 17). Ebenfalls waren haptensisierte *relB*^{-/-} KM-DZ nach adoptivem Transfer in syngene wt Mäuse in der Lage eine antigenspezifische Immunantwort *in vivo* auszulösen (Abbildung 24). Wobei hier nicht ausgeschlossen werden kann, dass durch wt DZ ein *cross-priming* stattgefunden hat.

Die Fähigkeit der *relB*^{-/-} DZ in der Kultur zu reifen und T-Zellen zu stimulieren, muss nicht der *in vivo* Situation widersprechen, in der eine verminderte Anzahl von CD8⁻ myeloiden DZ vorhanden ist (Tabelle 1). Obwohl die KM-DZ als eine DZ mit myeloidem Charakter gilt, handelt es sich hier um eine *in vitro* gereifte Zelle. Für *in vivo* Stimulationstests sollten daher *relB*^{-/-} Knochenmarkchimären generiert und durch

epikutane Applikation eines Haptens eine CHS induziert werden. Die Idee war, dadurch *relB*^{-/-} LZ zu erhalten und zusätzlich ein *cross-priming* auszuschließen. Das CHS-Experiment bietet überdies den Vorteil einen typischen Funktionsablauf von reifenden *relB*^{-/-} DZ mit Antigenaufnahme, Migration und T-Zell-Stimulation *in vivo* zu testen. Obwohl Arbeiten auf einen permanenten, antigenunabhängigen LZ-Austausch in der Haut hindeuteten (Hill et al., 1990; Ghaznawie et al., 1999), wurde in einem Vorexperiment der LZ-Austausch nach Knochenmark-Transfer überprüft, da für unsere Experimente eine absolut wt-LZ freie Epidermis wichtige Voraussetzung war. In einem Ly5.1/Ly5.2 Transfer-System wurde der LZ-Austausch in der Epidermis über mehrere Wochen bestimmt (siehe 3.5.7). Es zeigte sich jedoch, dass selbst nach 30 Wochen nur 20% der LZ sich aus dem Knochenmark der Donor-Maus entwickelt hatten. Nach ca. 8 Wochen konnte keine prozentuale Steigerung mehr beobachtet werden. Dies lässt vermuten, dass LZ relativ langlebige DZ in der Epidermis sind, die nur nach Antigenexposition oder durch den Einfluß anderer Signale die Haut verlassen, um eine Immunantwort zu initiieren. Tatsächlich konnte in einer aktuellen Veröffentlichung (Merad et al., 2002) gezeigt werden, daß Rezipienten-LZ noch nach 18 Monaten in der Epidermis detektiert werden können. Zusätzlich untersuchten Merad et al. die Anzahl der verbliebenen Rezipienten-LZ nach Exposition durch UV-Licht, nach letaler Bestrahlung sowie nach Behandlung der Haut mit einem Aceton/Öl-Gemisch (Aceton/Öl verursacht Migration und lokale Inflammation vergleichbar mit FITC). Obwohl jede dieser Behandlungen eine vorübergehende Abnahme der Rezipienten-LZ bewirkten, konnte nur nach 30 min UV-Bestrahlung ein nahezu vollständiger LZ-Austausch beobachtet werden. Es konnte jedoch immer noch ein geringer Anteil an Rezipienten-LZ in der Epidermis detektiert werden, weshalb für unsere Experimente ein Knochenmark-Transfer mit anschließender UV-Behandlung nicht in Betracht gezogen wurde.

RelB^{-/-} Knochenmarkchimären eignen sich somit nur bedingt für *in vivo* Stimulationsexperimente. Ebenfalls ist es schwierig *in vitro* Stimulationen mit frisch isolierten DZ aus *relB*^{-/-} Knochenmarkchimären auszuwerten. Obwohl nach Knochenmark-Transfer wt DZ in anderen Organen wie Milz und Thymus ausgetauscht werden, können die *RelB*-defizienten CD8⁻ DZ in der Rezipientenmaus nicht rekonstituiert werden (Wu et al., 1998). Da es aufgrund der sehr geringen Zellzahl schwierig ist eine reine *relB*^{-/-} CD8⁻ DZ *ex vivo* zu erhalten, sind vergleichende Experimente mit allen Milz-DZ nur eingeschränkt interpretierbar.

4.4.1 *RelB*^{-/-} dendritische Zellen zeigen eine verminderte IL-12 Produktion

Obwohl in unseren Stimulationstests an *relB*^{-/-} verglichen mit wt DZ keine deutlichen Unterschiede festgestellt wurden, konnte ein Defekt in der Produktion von IL-12 (diskutiert unter 4.2.3), welches bei der Stimulation von T_H-Zellen eine wichtige Rolle spielt, beobachtet werden. Die Fähigkeit CD4⁺ T-Zellen zu stimulieren, aber kein IL-12 zu sekretieren, muss sich jedoch nicht widersprechen. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass durch die neutralisierende Zugabe von Antikörper gegen IL-12 die Fähigkeit von wt DZ zur T-Zell-Stimulation kaum reduziert wurde, während die Blockierung von CD86 die T-Zell-Stimulation vollständig unterbrach (Yoshimura et al., 2001). Dies weist noch einmal darauf hin, wie wichtig die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD86 und CD40 für die T-Zell-Stimulation ist, und dass bei Stimulationstests der Reifezustand der Zellen eine entscheidende Rolle spielt.

4.4.2 Die Rolle von RelB bei der *in vivo* Reifung von dendritischen Zellen

In einer bereits durchgeführten DZ-Analyse von Wu et al. (1998) konnte ein Fehlen der CD11b⁺CD8a⁻ myeloiden DZ in der *relB*^{-/-} Maus entdeckt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls eine stark verminderte Anzahl von CD11b⁺CD8a⁻ DZ festgestellt, wenn auch kein vollständiges Fehlen dieser DZ-Subpopulation bestätigt werden konnte (siehe 3.3). Interessanterweise konnten über 50% CD11c⁺CD11b⁺ Zellen detektiert werden, die keine positive Färbung für MHC-II zeigten. Diese Zellen repräsentierten im FSC/SSC eine abgegrenzte Population mit einer hohen Granularität und einer relativ kleinen Größe. Im Gegensatz hierzu wurden in der Arbeit von Wu et al. (1998) die restlichen CD11c⁺ DZ durch die CD11b⁻CD8a⁺ lymphoiden DZ (evtl. relative Erhöhung) dargestellt, deren prozentualer Anstieg evtl. indirekt war. Die unterschiedlichen Resultate könnten in der Durchführung der DZ-Aufreinigung begründet sein. In der Arbeit von Wu et al. (1998) wurden keine anti-CD11c paramagnetischen *beads* benutzt, sondern die DZ über den Einsatz von Depletionssäulen (Vremec et al., 1992) indirekt angereichert. Hierbei wurde z.B. die CD4⁺ DZ-Population ausgeschlossen, welche mit ca. 50% einen großen Anteil der CD11b⁺ DZ darstellt. Zusätzlich wurden die Zellen vor der Depletion einer Dichtezentrifugation unterzogen, um hoch granuläre Zellen wie z.B. Granulozyten zu entfernen. Dies könnte der Grund sein, warum in der Arbeit von Wu et al. diese Zellen nicht mehr detektiert werden konnten.

Eine Identifizierung dieser Zellen zeigten bisher folgende Resultate: die relativ kleinen Zellen mit einer auffallend großen Granularität exprimieren viel CD11b, zeigen

jedoch keine Expression für MHC-II, Gr-1 (Ly6G und Ly-6C), CD8, CD4 und DEC-205. Aufgrund der kleinen Größe werden Makrophagen ausgeschlossen, wegen der fehlenden Färbung für Gr-1 werden Granulozyten und plasmazytoide DZ nicht in Betracht gezogen. Die fehlende MHC-II Expression kann B-Zellen ausschließen. Da die Zellen bei Färbung mit Antikörper gegen CD11c eine Expression im mittleren Bereich zeigen, könnte die Zellpopulation sehr unreife DZ darstellen. Es könnte in Betracht gezogen werden, dass es sich um myeloide Vorläuferzellen handelt, die *in vivo* nicht in der Lage sind auszureifen, weil das für sie hierfür notwendige Milieu nicht zur Verfügung steht. Anstatt in der marginalen Zone der Milz zu verweilen, um zu CD11c⁺CD11b⁺CD8⁻ DZ zu reifen, würden diese Zellen direkt in die T-Zell-Bereiche der lymphoiden Organe wandern und sich dort anreichern. In der inneren Zone der weißen Pulpa hingegen würde evtl. ein Teil der myeloiden Vorläuferzellen in CD8⁺ DZ reifen, was zu deren Erhöhung führen würde. Dies könnte in der defekten Organisation der *relB*^{-/-} Marginalzone, welche keine Keimzentren und Netzwerke mit dendritischen Follikelzellen entwickeln, begründet sein (Weih et al., 2001). Wu et al. (1998) konnte jedoch in Knochenmarktransfer-Experimenten zeigen, dass die fehlenden *relB*^{-/-} CD11b⁺CD8⁻ DZ in wt Milz und Thymus nicht rekonstituiert werden können. Demnach sind nicht die defekte *relB*^{-/-} Milz- und Thymus-Struktur verantwortlich für die Reduktion der CD11b⁺CD8⁻ DZ, sondern es könnte vielmehr in einer fehlenden Expression von Adhäsionsmolekülen oder Chemokinrezeptoren der DZ begründet sein.

Wichtig bei dieser Theorie ist, dass *relB*^{-/-} Vorläuferzellen keinen eigentlichen Defekt in der Reifung hätten, sondern durch z. B. fehlende interzellulären Kontakte nicht in der Lage wären, an dem Ort, der für die Entwicklung von CD8⁻ DZ entscheidend ist lange genug zu bleiben. Bei der *in vitro* Generation von *relB*^{-/-} DZ aus dem Knochenmark hingegen könnten diese Defekte durch externe Zugabe von Wachstumsfaktoren oder Zytokine bzw. der Art der Kultivierung - z.B. keine Depletion der B-Zellen - behoben werden.

5 Literatur

- Ammon C., Mondal K., Andreesen R., Krause S. W. (2000). Differential expression of the transcription factor NF- κ B during human mononuclear phagocyte differentiation to macrophages and dendritic cells. *Biochem. Biophys. Res.* 268, 99-105.
- Anjuère F., Martin P., Ferrero I., López Fraga M., Martínez del Hoyo G., Wright N., Ardavin C. (1999). Definition of dendritic cell subpopulations present in the spleen, peyer's patches, lymph nodes, and skin of the mouse. *Blood* 93 (2), 590-598.
- Ardavin C., Wu L., Li C., Shortman K. (1993). Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature* 362, 761-763.
- Artis D., Speirs K., Joyce K., Goldschmidt M., Caamano J., Hunter C. A., Scott P. (2003). NF- κ B is required for optimal CD4⁺ Th1 cell development and resistance to *Leishmania major*. *J. Immunol* 170, 1995-2003.
- Attar R. M., Caamaño J., Carrasco D., Iotsova V., Ishikawa H., Ryseck R.-P., Weih F., Bravo R. (1997). Genetic approaches to study Rel/NF- κ B/I κ B function in mice. *Semin. Cancer Biol.* 8, 93-101.
- Baeuerle P. A., and Baltimore D. (1988). I κ B: a specific inhibitor of the NF- κ B transcription factor. *Science* 242, 540-546.
- Banchereau J. and Steinman R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.
- Beg A. A., Sha W. C., Bronson R. T., Ghosh S., Baltimore D. (1995). Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF- κ B. *Nature* 376, 167-169.
- Beg A.A., Sha W.C., Bronson R.T., Ghosh S., Baltimore D. (1995). Embryonic lethally and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF- κ B. *Nature* 376, 167-169.
- Berberich I., Shu G. L., Clark E. A., (1994). Cross-Linking CD40 on B cells rapidly activates nuclear factor κ B. *J. Immunol.* 153, 4357-4366.
- Brockner T., Riedinger M., Karjalainen K. (1997). Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative selection but not positive selection. *J. Exp. Med.* 185, 541-550.
- Burkly L., Hession C., Ogata L., Rely C., Marconi L. A., Olson D., Tizard R., Cate R., Lo D. (1995). Expression of *relB* is required for the development of thymic medulla and dendritic cells. *Nature* 373, 531-536.

- Caamaño J. H., Rizzo C. A., Durham S. K., Barton D. S., Raventos-Suarez C., Snapper C. M., Bravo R. (1998). Nuclear factor (NF)- κ B2 (p100/p52) is required for normal splenic microarchitecture and B cell-mediated immune responses. *J. Exp. Med.* **187**, 185-196.
- Campbell K.A., Owendale P.J., Kennedy M.K., Fanslow W.C., Reed S.G., Maliszewski C.R. (1996). CD40 ligand is required for protective cell-mediated immunity to major. *Immunity* **4**, 283-289.
- Castiglioni P., Janssen E. M., Prilliman K. R., Gerloni M., Schoenberger S., Zanetti M. (2002b). Cross-Priming is under control of the *relB* gene. *Scand. J. Immunol.* **56**, 219-223.
- Castiglioni P., Lu C., Lo D., Croft M., Langlade-Demoyen P., Zanetti M., Gerloni M. (2002a). CD4 T cell priming in dendritic cell-deficient mice. *Int. Immunology* **15**, 127-136.
- Cella M., Engering A., Pinet V., Pieters J., Lanzavecchia A. (1997). Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* **388**, 782-787.
- Clark G. J., Gunningham S., Troy A., Vuckovic S., Hart D. N. J. (1999). Expression of the RelB transcription factor correlates with the activation of human dendritic cells. *Immunology* **98**, 189-196.
- Clarke S. R., Barnden M., Kurts C., Carbone F. R., Miller J. F., Heath W. R. (2000). Characterization of the ovalbumin-specific TCR transgenic line OT-I: MHC elements for positive and negative selection. *Immunol Cell Biol* **78** (2), 110-117.
- Corinti S., Albanesi C., la Sala A., Pastore S., Girolomoni G. (2001). Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *J. Immunol.* **166**, 4312-4318.
- Cumberbatch M., Gould S. J., Peters S. W., Kimber I. (1991). MHC class II expression by Langerhans' cells and lymph node dendritic cells: possible evidence for maturation of Langerhans' cells following contact sensitization. *Immunology* **74**, 414-419.
- De Smedt T., Pajak B., Muraille E., Lespagnard, Heinen E., De Baetselier P., Urbain J., Leo A., Moser M. (1996). Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J. Exp. Med.* **184**, 1413-1424.
- Del Hoyo G. M., Martin P., Arias C. F., Marin A. R., Ardavin C. (2002b). CD8 α^+ dendritic cells originate from the CD8 α^- dendritic cell subset by a maturation process involving CD8 α , DEC205, and CD24 up-regulation. *Blood* **99**, 999-1004.
- Del Hoyo G. M., Martin P., Hernández V., Ruiz S. R., Fernández Arias C., F. Ardavin C. (2002a). Characterization of a common precursor population for dendritic cells. *Nature* **415**, 1043-1047.
- DiMolfetto L., Reilly C., Wei Q., Lo D. (1997). Dendritic-like cells from *relB* mutant mice. *Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology* **8**, 47-54.
- Doi T. S., Takahashi T., Taguchi O., Azuma T., Obata Y. (1997). NF- κ B Rel-A-deficient lymphocytes: normal development of T cells and B cells, impaired production of IgA,

- and IgG1 and reduced proliferative responses. *J. Exp. Med.* **185**, 953-961.
- Enk A. H., Angeloni V. L., Udey M. C., Katz S. I. (1993). Inhibition of Langerhans cell antigen-presenting function by IL-10. *J. Immunol.* **151**, 2390-2398.
- Foti M., Granucci F., Aggujaro D., Liboi E., Luini W., Minardi S., Mantovani A., Sozzani S., Ricciardi-Castagnoli P. (1999). Upon dendritic cell (DC) activation chemokines receptor expression are rapidly regulated for recruitment and maintenance of DC at the inflammatory site. *Int. Immunology* **11**, 979-986.
- Franzoso G., Carlson L., Poljak L., Shores E. W., Epstein S., Leonardi A., Grinberg A., Tran T., Scharton-Kersten T., Anver M., Love P., Brown K. and Siebenlist U. (1998). Mice deficient in nuclear factor (NF)- κ B/p52 present with defects in humoral responses, germinal center reactions, and splenic microarchitecture. *J. Exp. Med.* **187** (2), 147-159.
- Franzoso G., Carlson L., Xing L., Poljak L., Shores E. W., Brown K. D., Leonardi A., Tran T., Boyce B. F., Siebenlist U. (1997). Requirement for NF- κ B in osteoclast and B-cell development. *Genes & development* **11**, 3482-3496.
- Garrigan K., Moroni-Rawson P., McMurray C., Hermans I., Abernethy N., Watson J. and Ronchese F. (1996). Functional comparison of spleen dendritic cells and dendritic cells cultured in vitro from bone marrow precursors. *Blood* **88**, No 9, 3508-3512.
- Gerondakis S., Grossman M., Nakamura Y., Pohl T. and Grumont R. (1999). Genetic approaches in mice to understand Rel/NF- κ B and I κ B function: transgenics and knockouts. *Oncogene* **18** (49), 6888-6895.
- Ghaznawie M., Papadimitriou J. M., Heenan P. J. (1999). The steady-state turnover of murine epidermal Langerhans cells. *British Journal of Dermatology* **141**, 57-61.
- Ghosh S., and Karin M. (2002). Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell* **109**, 81-96.
- Granucci F., Ferrero E., Foti M., Aggujaro D., Vettoretto K., Ricciardi-Castagnoli P. (1999). Early events in dendritic cell maturation induced by LPS. *Microbes and Infection* **1**, 1079-1084.
- Granucci F., Vizzardelli C., Virzi E., Resigno M., Ricciardi-Castagnoli P. (2001). Transcriptional reprogramming of dendritic cells by differentiation stimuli. *Eur. J. Immunol.* **31**, 2539-2546.
- Grigoriadis G., Zhan Y., Grumont R. J., Metcalf D., Li R., Handman E., Cheers C., Gerondakis S. (1996). The Rel subunit of NF- κ B-like transcription factors is a positive and negative regulator of macrophage gene expression: distinct roles for Rel in different macrophage populations. *EMBO J.* **15**, 7099-7107.
- Grohmann U., Belladonna M. L., Bianchi R., Orabona G., Ayroldi E., Fioretti M. C., Puccetti P. (1998). IL-12 acts directly on DC to promote nuclear localization of NF- κ B and primes DC for IL-12 production. *Immunity* **9**, 315-323.
- Grumont R. J., Rourke I. J., O'Reilly L. A., Strasser A., Miyake K., Sha W., Gerondakis S. (1998). B lymphocytes differentially use the Rel and nuclear factor κ B1 (NF- κ B1) transcription factors to regulate cell cycle progression and apoptosis in quiescent and

- mitogin-activated cells. *J. Exp. Med.* *187*, 663-674.
- Henri S., Vremec D., Kamath A., Waithman J., Williams S., Benoist C., Burnham K., Saeland S., Handman E., Shortman K. (2001). The dendritic cell population of mouse lymph nodes. *J. Immunol.* *167*, 741-748.
- Hill S., Edwards A. J., Kimber I., Knight S. C. (1990). Systemic migration of dendritic cells during contact sensitization. *Immunology* *71*, 277-281.
- Hinz M., Krappmann D., Eichten A., Heder A., Scheidereit C., Strauss M. (1999). NF- κ B function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G₀/G₁-to-S-Phase transition. *Molecular and Cellular Biology*, *19*, 2690-2698.
- Horwitz B. H., Scott M. L., Cherry S. R., Bronson R. T., Baltimore D. (1997). Failure of lymphopoiesis after adoptive transfer of NF- κ B-deficient liver cells. *Immunity* *6*, 765-772
- Inaba K., Inaba M., Deguchi M., Hagi K., Yasumizu R., Ikehara S., Muramatsu S., Steinman R. M. (1993). Granulocytes, macrophages, and dendritic cells arise from a common major histocompatibility complex class-II negative progenitor in mouse bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *90*, 3038-3042.
- Iotsova V., Caamano J., Loy J., Yang Y., Lewin A., Bravo R. (1997). Osteopetrosis in mice lacking NF- κ B1 and NF- κ B2. *Nature Medicine* *3*, 1285-1189.
- Ishikawa H., Carrasco D., Claudio E., Ryseck R-P., Bravo R. (1997). Gastric hyperplasia and increased proliferative responses of lymphocytes in mice lacking the COOH-terminal ankyrin domain of NF- κ B 2. *J. Exp. Med.* *186*, 999-1014.
- Ishikawa H., Claudio E., Dambach D., Raventos-Suarez C., Ryan C., Bravo R. (1998). Chronic inflammation and susceptibility to bacterial infections in mice lacking the polypeptide (p)105 precursor (NF- κ B 1) but expressing p50. *J. Exp. Med.* *187*(7), 985-996.
- Kamath A. T., Pooley J., O'Keeffe M. A., Vremec D., Zhan Y., Lew A. M., Dàmico A., Wu L., Tough D. F., Shortman K. (2000). The development, maturation, and turnover rate of mouse spleen dendritic cell populations. *J. Immunol.* *165*, 6762-6770.
- Karasuyama H., and Melchers F. (1988). Establishment of mouse cell lines which constitutively secrete large quantities of interleukins 2, 3, 4, or 5 using modified cDNA expression vectors. *Eur. J. Immunol.* *18*, 97-101.
- Karin M. (1999). How NF- κ B is activated: the role of the I κ B kinase (IKK) complex. *Oncogene* *18* (49), 6867-6874.
- Karin M. and Ben-Neriah Y. (2000a). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu. Rev. Immunol.* *18*, 621-663.
- Karin M. and Delhase M. (2000b). The I κ B kinase (IKK) and NF- κ B: key elements of proinflammatory signalling. *Semin. Immunol.* *12* (1), 85-98.
- Köntgen F., Grumont R. J., Strasser A., Metcalf D., Li R., Tarlinton D., Gerondakis S. (1995). Mice lacking the *c-rel* proto-oncogene exhibit defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin-2 expression. *Genes dev.* *9*, 1965-

1977.

- Kraal G., Van Wilsem E., Breve J. (1993). The phenotype of murine langerhans cells from skin to lymph node. *In Vivo* 7, 203-206.
- Kripke M. L., Munn C. G., Jeevan A., Tang J., Bucana C. (1990). Evidence that cutaneous antigen-presenting cells migrate to regional lymph nodes during contact sensitization. *J. Immunol.* 145, 2833-2838.
- Lanzavecchia A. (1990). Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II restricted T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 8, 773-793.
- Lappin M. B., Weiss J. M., Delattre V., Mai B., Dittmar H., Maier C., Manke K., Grabbe S. (1999). Analysis of mouse dendritic cell migration in vivo upon subcutaneous and intravenous injection. *Immunology* 98, 181-188.
- Laufer, T. M., DeKoning, J., Markowitz, J. S., Lo, D. and Glimcher, L. H. (1996). Unopposed positive selection and autoreactivity in mice expressing class II MHC only on thymic cortex. *Nature* 383, 81-85.
- Leenen P. J. M., Radosevic K., Voerman J. S. A., et al. (1998). Heterogeneity of mouse spleen dendritic cells: in vivo phagocytic activity, expression of macrophage markers, and subpopulation turnover. *J. Immunol.* 160, 2166-2173.
- Lo D., Quill H., Burkly L. C., Scott B., Palmiter R. D., Brinster R. L. (1992). A recessive defect in lymphocyte or granulocyte function caused by an integrated transgene. *Am. J. Pathol.* 141, 1237-1246.
- Lutz M. B., Aßmann C. U., Girolomoni G., Ricciardi-Castagnoli P. (1996). Different cytokines regulate antigen uptake and presentation of a precursor dendritic cell line. *Eur. J. Immunol.* 26, 586-594.
- Lutz M. B., Kukutsch N., Ogilvie A. L. J., Rößner S., Koch F., Romani N., Schuler G. (1999). An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Meth.* 223, 77-92.
- Lyakh L. A., Koski G. K., Telford W., Gress R. E., Cohen P. A., Rice N. R. (2000). Bacterial lipopolysaccharide, TNF α , and calcium ionophore under serum-free conditions rapid dendritic cell-Like differentiation in CD14⁺ Monocytes through distinct pathways that activate NF- κ B. *J. Immunol.* 165, 3647-3655.
- Maldonado-Lopez R., De Smedt T., Michel P, Godfroid J., Pajak B., Heirman C., Thielemans K., Leo O., Urbain J., Moser M. (1999). CD8 α ⁺ and CD8 α ⁻ subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J. Exp Med.* 189, 587-592.
- Martin E., O'Sullivan B. J., Low P., Thomas R. (2003). Antigen-specific suppression of a primed immune response by dendritic cells mediated by regulatory T cells secreting Interleukin-10. *Immunity* 18, 155-167.
- Martin P., del Hoyo G. M., Anjuère F., Ruiz S. R., Arias C. F., Marin A. R., Ardavin C. (2000). Concept of lymphoid versus myeloid dendritic cell lineages revisited: both CD8 α ⁻ and CD8 α ⁺ dendritic cells are generated from CD4^{low} lymphoid-committed

- precursors. *Blood* 96, 2511-2519.
- May M. J. and Ghosh S. (1997). Rel/NF- κ B and I κ B proteins: an overview. *Cancer Biologie* 8, 61-72.
- May M. J. and Ghosh S. (1998). Signal transduction through NF- κ B. *Immunology Today* 19, 80-83.
- Medzhitov R., Preston-Hurlburt P. and Janeway Jr C. A. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-397.
- Merad M., Manz M. G., Karsunky H., Wagers A., Peters W., Charo I., Weissman I. L., Cyster J. G., Engleman E. G. (2002). Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nature Immunology* 4, 1-7.
- Neumann M., Wohleben G., Chuvpilo S., Kistler B., Wirth T., Serfling E., Schimpl A. (1996). CD40, but not lipopolysaccharide and anti-IgM stimulation of primary B lymphocytes, leads to a persistent nuclear accumulation of RelB. *J. Immunol.* 157, 4862-4869.
- O'Sullivan B. J. and Thomas R. (2002). CD40 ligation conditions dendritic cell antigen-presenting function through sustained activation of NF- κ B. *J. Immunol.* 168, 5491-5498.
- O'Sullivan B. J., MacDonald K. P. A., Pettit A. R., Thomas R. (2000). RelB nuclear translocation regulates B cell MHV molecule, CD40 expression, and antigen-presenting cell function. 97, 11421-11426.
- Ouaaz F., Arron J., Zheng Y., Choi Y., Berg A. A. (2002). Dendritic cell development and survival require distinct NF- κ B subunits. *Immunity* 16, 257-270.
- Pettit A. R., Quinn C., MacDonald K. P. A., Cavanagh L. L., Thomas G., Townsend W., Handel M., Thomas R. (1997). Nuclear localization of RelB is associated with effective antigen-presenting cell function. *Immunology* 159, 3681-3691.
- Pierre P., Turley S. J., Gatti E., Hull M., Meltzer J., Mirza A., Inaba K., Steinman R. M., Mellmann I. (1997). Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature* 388, 787-792.
- Poltorak A., Xiaolong He, Smirnova I., Mu-Ya Liu, Van Huffel C., Du X., Birdwell D., Alejos E., Silva M., Galanos C., Freudenberg A., Ricciardi-Castagnoli P., Layton B., Beutler B. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* 282, 2085-2088.
- 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 by CD8⁺ dendritic cells. *J. Immunol.* 166, 5327-5330.
- Pulendran B., Banchereau J., Maraskovsky E., Maliszewski C. (2001). Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors. *Trends Immunol.* 22, 41-47

- Reis e Sousa C., Diebold S. S., Edwards A. D., Rogers N., Schulz O., Spörri R. (2002). Regulation of dendritic cell function by microbial stimuli. *Pathologie Biologie* 51, 67-68.
- Reis e Sousa C., Hieny S., Scharon-Kersten T., Jankovic D., Charest H., Germain R. N., Sher A. (1997). In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of Interleukin12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J. Exp. Med.* 186, 1819-1829.
- Rescigno M., Granucci F., Citterio S., Foti M., Ricciardi-Castagnoli P. (1999). Coordinated events during bacteria-induced DC maturation. *Immunology Today* 20, 200-203.
- Rescigno M., Martino M., Sutherland C. L., Gold M. R., Ricciardi-Castagnoli P. (1998). Dendritic Cell Survival and Maturation are regulated by different signaling pathways. *J. Exp. Med.* 188, 2175-2180.
- Robertson J. M., Jensen P.E., Evavold B.D. (2000). DO11.10 and OT-II T cells recognize a c-terminal ovalbumin 323-339 epitope. *J. Immunol.* 164 (9), 4706-4712.
- Sallusto F. and Lanzavecchia A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor- α . *J. Exp. Med.* 179, 1109-1118.
- Sato K., Yamashita N., Yamashita N., Baba M., Matsuyama T. (2003). Regulatory dendritic cells protect mice from murine acute graft-versus-host disease and Leukemia relapse. *Immunity* 18, 367-379.
- Schmitz M. L., Bacher S., Kracht M. (2001). I κ B-independent control of NF- κ B activity by modulatory phosphorylations. *Trends Biochem Sciences* 26 (3), 187-191.
- Schottelius A. J. G., Mayo M. W., Sartor R. B., Baldwin A. S., Jr. (1999). Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of κ B kinase activity and nuclear factor κ B DNA binding. *J. of Biol. Chemistry* 274, 31868-31874.
- Sen R., and Baltimore D. (1986). Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47, 921-928.
- Sha W. C., Liou H.-C., Tuomanen E. I. and Baltimore D. (1995). Targeted disruption of the p50 subunit of NF- κ B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell* 80, 321-330.
- Snapper C. M., Rosas F. R., Zelazowski P., Moorman M. A., Kehry M. R., Bravo R. Weih F. (1996). B cells lacking RelB are defective in proliferative responses, but undergo normal B cell maturation to Ig secretion and Ig class switching. *J. Exp. Med.* 184, 1537-1541.
- Snapper C. M., Zelazowski P., Rosas F. R., Kehry M. R., Tian M., Baltimore D. Sh W. C. (1996). B cells from p50/NF- κ B knockout mice have selective defects in proliferation, differentiation, germ-line CH transcription, and Ig class switching. *J. Immunol.* 156, 183-191.
- Soong L., Xu J.C., Grewal I.S., Kima P., Sun J., Longley B. Jr., Ruddle N.H., McMahon-Pratt D., Flavell R.A. (1996). Disruption of CD40-CD40 ligand interactions results in an

- enhanced susceptibility to *Leishmania amazonensis* infection. *Immunity* 4, 263-273.
- Steinbrink K., Wöfl M., Jonuleit H., Knop J., Enk A. H. (1997). Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J. Immunol.* 159, 4772-4780.
- Steinman R. M. and Cohn Z. A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* 137, 1142-1162.
- Suhasini M. and Pilz R. B. (1999). Transcriptional elongation of *c-myb* is regulated by NF- κ B (p50/RelB). *Oncogene* 18, 7360-7369.
- Süss G. and Shortman K. (1996). A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* 183, 1789-1796.
- Takashiba S., Van Dyke T. E., Amar S., Murayama Y., Soskolne A. W., Shapira L. (1999). Differentiation of monocytes to macrophages primes cells for lipopolysaccharide stimulation via accumulation of cytoplasmic nuclear Factor κ B. *Infection and Immunity* Nov. 5573-5578.
- Traver D., Akashi K., Manz M., Merad M., Miyamoto T., Engleman E. G., Weisman I. L. (2000). Development of CD8 α -positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science* 290, 2152-2154.
- Van Wilsem E. J. G., Breve J., Kleijmeer M., Kraal G. (1994). Antigen-bearing Langerhans cells in skin draining lymph nodes: phenotype and kinetics of migration. *J. Invest. Dermatol.* 103, 217-220.
- Vremec D. and Shortman K. (1997). Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs. cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. *J. Immunol.* 159, 565-573.
- Vremec D., Pooley J., Hochrein H., Wu L., Shortman K. (2000). CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J. Immunol.* 164, 2978-2986.
- Vremec D., Zorbas M., Scollay R., Saunders D. J., Ardavin C. F., Wu L., Shortman K. (1992). The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. *J. Exp. Med.* 176, 47-58.
- Vremec D., Zorbas M., Scollay R., Saunders D. J., Ardavin C. F., Wu L., Shortman K. (1996). The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. *J. Exp. Med.* 176, 47-58
- Van Kooten Cund Banchereau J. (1997). Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. *Current Opinion in Immunology* 9, 330-337.
- Wakkach A., Fournier N., Brun V., Breittmayer J.-P., Cottrez F., Groux H. (2003). Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 Cell differentiation in vivo. *Immunity* 18, 605-617.

- Weih D. S., Yilmaz Z. B., Weih F. (2001). Essential role of RelB in germinal center and marginal zone formation and proper expression of homing chemokines, *J. Immunol.* **167**, 1909-1919.
- Weih F., Carrasco D., Durham S. K., Barton D. S., Rizzo C. A., Ryseck R.-P., Lira S. A. Bravo R. (1995). Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF- κ B/Rel family. *Cell* **80**, 331-340.
- Weih F., Durham S. K., Barton D. S., Sha W. C., Baltimore D. and Bravo R. (1996). Both multiorgan inflammation and myeloid hyperplasia in RelB-deficient mice are T cell dependent. *J. Immunol.* **157**, 3974-3979.
- Weih F., Warr G., Yang H. and Bravo, R. (1997). Multifocal defects in immune responses in RelB-deficient mice. *J. Immunol.* **158**, 5211-5218.
- Weinlich G., Heine M., Stössel H., Zanella M., Stoitzner P., Ortner U., Smolle J., Koch F., Sepp N. T., Schuler G., Romani N. (1998). Entry into afferent lymphatics and maturation *in situ* of migrating murine cutaneous dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.* **110**, 441-448.
- Winzler C., Rovere P., Rescigno M., Granucci F., Penna G., Adorini L., Zimmermann V. S., Davoust J., Ricciardi-Castagnoli P. (1997). Maturation stages of mouse dendritic cell in growth factor-dependent long-term cultures. *J. Exp. Med.* **185**, 317-328.
- Wu L., D'Amico A., Winkel K. D., Suter M., Lo D., Shortman K. (1998). RelB is essential for the development of myeloid-related CD8 α^+ dendritic cells but not of lymphoid-related CD8 α^+ dendritic cells. *Immunity* **9**, 839-847.
- Wu L., Li C., Shortman K. (1996). Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny. *J. Exp. Med.* **184**, 903-911.
- Wu M., Lee H., Bellas R. E., Schauer S. L., Arsura M., Katz D., FitzGerald M. J., Rothstein T. L., Sherr D. H., Sonnenschein G. E. (1996). Inhibition of NF- κ B/Rel induces apoptosis of murine B cells. *The EMBO Journal* **15**, 4682-4690.
- Wulczyn F. G., Krappmann D., Scheidereit K. (1996). The NF- κ B/Rel and I κ B gene families: mediators of immune response and inflammation. *J. Mol. Med.* **74**, 749-769.
- Xia C.-Q., Kao K. J. (2003). Suppression of interleukin-12 production through endogenously secreted Interleukin-10 in activated dendritic cells: involvement of activation of extracellular signal-regulated protein kinase. *Scandinavian J. Immunol.* **58**, 23-32.
- Yang R. B., Mark M. R., Gray A., Huang A., Xie M. H., Zhang M., Goddard A., Wood W. I., Gurney A. L. and Godowski P. J. (1998). Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* **395**, 284-288.
- Yoshimura S., Bondeson J., Foxwell B. M. J., Brennan F. M., Feldmann M. (2001). Effective antigen presentation by dendritic cells is NF- κ B dependent: coordinate regulation of MHC, co-stimulatory molecules and cytokines. *Immunity* **13**, 675-683.

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