

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-  
Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. T. Ruzicka

**Die I $\kappa$ B $\alpha$ -Knockout-Maus als Modell für ein  
Myelodysplastisches Syndrom und Psoriasis vulgaris**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Bernd Rebholz

aus  
Landau i. d. Pfalz

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. R. A. Rupec

Mitberichterstatter Prof. Dr. med. J. Diebold

Priv.-Doz. Dr. med. Ch. Klein

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Priv.-Doz. Dr. med. R. A. Rupec

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 22.12.2006

*Für meine Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	7
1.1 Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B und sein Inhibitormolekül I $\kappa$ B $\alpha$	7
1.2 Die NF- $\kappa$ B-Signaltransduktionskaskade	10
1.3 Regulation der NF- $\kappa$ B Aktivität	11
1.4 Pathophysiologische Bedeutung von NF- $\kappa$ B	12
1.4.1 Rolle von NF- $\kappa$ B in der Onkogenese	12
1.4.2 Rolle von NF- $\kappa$ B in der Hämatopoese	15
1.4.3 Die Bedeutung von NF- $\kappa$ B für die Physiologie und Pathophysiologie der Haut	17
1.4.4 Psoriasis vulgaris als Modell einer entzündlichen Hauterkrankung	19
1.5 Funktion des Notch/Jagged1-Signalwegs in der Myelopoese	21
1.5.1 Aufbau und Struktur von Notch/Jagged	21
1.5.2 Notch/Jagged1 Signalweg	22
1.5.3 Rolle von Notch/Jagged1 in der Hämatopoese/Myelopoese	23
<b>2. Material und Methoden</b>	25
2.1 Chemikalien und Reagentien	25
2.2 Antikörper	31
2.3 Molekularbiologische Kits	32
2.4 Verwendete Mäusestämme: <i>Ikba</i> <sup><math>\Delta/\Delta</math></sup> , <i>Ikba</i> <sup><math>K5\Delta/K5\Delta</math></sup> , <i>Ikba</i> <sup><math>lck\Delta/lck\Delta</math></sup> , <i>Ikba</i> <sup><math>my\Delta/my\Delta</math></sup> , <i>RelA</i> <sup><math>K5\Delta/K5\Delta</math></sup> , <i>Rag2</i> <sup><math>^{-/-}</math></sup> , TNF/LT $\Delta$ 3, <i>Tnfr1</i> <sup><math>^{-/-}</math></sup> , <i>Tnf</i> <sup><math>^{-/-}</math></sup>	32
2.5 Zucht der Mäuse	33
2.6 Genotypisierung der gezüchteten Mäusestämme mittels PCR	33
2.7 RT-PCR	36
2.8 Zellkultur	38
2.8.1 CFUs	38
2.8.2 Hepatozytenkultivierung und Co-Kultivierung von Knochenmarkzellen	38
2.8.3 Isolierung und Kultivierung von Keratinozyten	39
2.9 Proteinanalytische Verfahren	40
2.9.1 Proteinisolierung aus Mausgewebe	40

2.9.2	Western-Blot-Analyse	40
2.10	Gelretardationsassay	41
2.11	Durchflußzytometrie (FACS) und Zellsortierung	42
2.11.1	Verarbeitung von Organen für die FACS-Färbung	42
2.11.2.	Apoptose-Nachweis	43
2.11.3.	DNA-Färbung mit Propidiumiodid (Zellzyklus-Analyse)	43
2.12	Hauttransplantationen	
	43	
2.13	Histologie und Immunhistologie	44
2.13.1	HE-Färbungen	44
2.13.2	Histologie von Knochenmark, Leber und peripherem Blut	44
2.13.3	CAE (Chloracetat-Esterase-Färbung)	45
2.13.4	Immunhistochemie	45
2.13.5.	ELISA	46
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	47
Teil I	Myelopoese	47
3.1	Fehlregulierte Myelopoese in <i>Ikba</i> <sup>ΔΔ</sup> Mäusen	47
3.2	Neugeborene <i>Ikba</i> <sup>ΔΔ</sup> Mäuse entwickeln eine Myelodysplasie	50
3.3	Die spezifische Deletion des <i>Ikba</i> Gens in Gr-1 <sup>+</sup> /Mac-1 <sup>+</sup> -Granulozyten bleibt ohne Einfluss auf die Myelopoese	52
3.4	Konstitutive Notch1 Expression in <i>Ikba</i> -defizienten Gr-1 <sup>+</sup> /Mac-1 <sup>+</sup> Granulozyten	55
3.5	Perinatale Expression von Jagged1 in <i>Ikba</i> -defizienten Hepatozyten	58
Teil II	Funktion von NF-κB in der Haut	62
3.6	<i>Ikba</i> <sup>ΔΔ</sup> Mäuse entwickeln eine psoriasisartige Entzündung der Haut	62
3.7	Die epidermisspezifische Deletion von <i>Ikba</i> führt zu einer unspezifischen Entzündung der Haut	65
3.8	Initiation und Aufrechterhaltung des psoriasisartigen Hautphänotyps sind T-Zell-abhängig	68
3.9	Die psoriasisartige Entzündung ist abhängig von TNF und LT	71
3.10	Epidermales <i>RelA</i> koordiniert die epidermal-dermale Zellinteraktionen	73

<b>4. Diskussion</b>	75
4.1 Zielsetzung	75
4.2 Bedeutung von <i>Ikba</i> in der fötalen Hämatopoese	75
4.3 Rolle von Jagged1 bei der Regulation der Myelopoese	77
4.4 Epidermales RelA als Vermittler von Keratinozyten-T-Zell Interaktionen in der psoriasisartigen Hauterkrankung <i>Ikba</i> -defizienter Mäuse	79
<b>5. Zusammenfassung</b>	82
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	84
<b>7. Abkürzungen</b>	91
<b>8. Danksagung</b>	93
<b>9. Lebenslauf</b>	94

# 1. Einleitung

## 1.1 Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B und sein Inhibitorprotein I $\kappa$ B $\alpha$

Grundlage vieler biologischer Prozesse in einer Zelle ist die Regulation der Genexpression auf der Ebene der Transkription. Zellen von der Hefe bis zum Menschen nutzen jeweils verschiedene Kontrollinstanzen, um zu koordinieren, welche Gene an- und ausgeschaltet werden (differentielle Genaktivität). Eine zentrale Instanz der Genkontrolle sind hierbei Proteine, die man Transkriptionsfaktoren nennt. Als solche binden sie dabei ganz spezifisch an regulatorische DNA-Elemente in Promotoren/Enhancern von Genen, wodurch sie die Ablesung der Gene in mRNA steuern. Ihre Hauptaufgabe liegt darin, die Initiationsstelle (Transkriptionsstartpunkt) für die Transkription (mRNA-Synthese) am Promotor festzulegen, welche durch die RNA-Polymerase II katalysiert wird. Zusammen mit der Polymerase stellen diese Hilfsproteine den basalen Transkriptionsapparat dar. Die meisten Transkriptionsfaktoren regulieren die Expression mehrerer Zielgene häufig im Verbund mit anderen Transkriptionsfaktoren. Aufgrund ihres dreiteiligen Aufbaus mit DNA-Bindedomäne, Aktivierungsdomäne und Protein-Proteininteraktionsdomäne können sie sowohl mit Mitgliedern der eigenen Transkriptionsfaktor-Familie als auch mit denen anderer Transkriptionsfaktorfamilien dimere oder multimer DNA-Bindungskomplexe zu bilden. Hinsichtlich der Regulation und der transkriptionellen Aktivierung von Genen sind mittlerweile mehrere Transkriptionsfaktoren gut charakterisiert. Unter all diesen Transkriptionsfaktoren sticht Nuclear-Factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) infolge mehrerer Eigenschaften besonders hervor: rasche Aktivierbarkeit, ungewöhnlicher Regulationsmechanismus. Über diese rein funktionellen Merkmale hinaus nimmt NF- $\kappa$ B eine Schlüsselstellung bei Entzündungsprozessen und in der Tumorentstehung ein (Karin, 2006). 1986 wurde NF- $\kappa$ B zum ersten Mal von Sen und Baltimore in den B-Lymphozyten der Maus beschrieben (Sen and Baltimore, 1986). Ursprünglich wurde angenommen, NF- $\kappa$ B sei ein B-Zellspezifischer Transkriptionsfaktor, der an die leichte Kette des Immunglobulin  $\kappa$ -Enhancers bindet. Bald wurde jedoch erkannt, dass NF- $\kappa$ B in nahezu jedem Zelltyp vorhanden ist und dabei eine Vielzahl von biologischen Entscheidungen kontrolliert. Angefangen von der Bedeutung für die Ausbildung einer dorsal-ventralen Polarität in Insekten, bis hin zur Koordination von Entzündungs- und Immunantworten (Baeuerle and Baltimore, 1996). Zu den NF- $\kappa$ B-regulierten Genen zählen solche, die für Zytokine, Chemokine, Adhäsionsmoleküle, Zelloberflächenrezeptoren und Immunmodulatoren kodieren (Tab. 1) (Ghosh and Karin, 2002; Grilli et al., 1993; Pahl, 1999). Der großen Anzahl an Genen, die von NF- $\kappa$ B reguliert werden, steht eine nicht minder große Zahl an Stimuli gegenüber, die NF- $\kappa$ B aktivieren können.

Diese Stimuli erstrecken sich von zellulären Botenstoffen wie den Zytokinen und Wachstumsfaktoren (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-18) über Chemikalien (Phorbol ester), physikalische Noxen (UV-Strahlung, ionisierende Strahlung), oxidativen Stress (z.B. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), bis hin zu infektiösen Agentien (Lipopolysaccharide, Viren) (Grilli et al., 1993; Messer and Rupec, 2001).

NF- $\kappa$ B liegt als Homo- oder Heterodimer zusammengesetzt aus Mitgliedern der NF- $\kappa$ B/Rel-Familie im Zytoplasma vor. Zu den Mitgliedern dieser Familie zählen RelA (p65), c-Rel, RelB, NF- $\kappa$ B1 (p50) und NF- $\kappa$ B2 (p52). p65 (RelA), RelB und c-Rel besitzen an ihrem C-terminalen Ende eine Transaktivierungsdomäne. p50 und p52 entstehen durch proteolytische Spaltung aus den p105 bzw. p100. Die Mechanismen, durch welche die p105- und p100-Vorläuferproteine proteolytisch zu p50 und p52 prozessiert werden, sind noch nicht vollständig verstanden. Man vermutet aber, dass die Prozessierung des NF- $\kappa$ B1 Vorläufers p105 cotranslational (Karin and Ben-Neriah, 2000; Lin et al., 1998) oder post-translational über das Ubiquitin-Proteasom-System erfolgt. In den meisten Zellen liegt NF- $\kappa$ B als Heterodimer, bestehend aus den Untereinheiten p50 und p65, vor (Siebenlist, 1997). Alle Untereinheiten der NF- $\kappa$ B/Rel-Familie weisen eine hochkonservierte aminoterminal Sequenz auf, die als Rel-Homology-Region (RHR) bezeichnet wird (Nolan and Baltimore, 1992). Sie ist wichtig für die Dimerisierung der NF- $\kappa$ B Untereinheiten, Bindung an die DNA und Interaktion mit dem Inhibitor I $\kappa$ B.

Kontrolliert wird die transkriptionelle Aktivität von NF- $\kappa$ B durch Mitglieder der Inhibitor of NF- $\kappa$ B oder I $\kappa$ B-Familie. Bei ruhenden, nicht stimulierten Zellen sind die NF- $\kappa$ B/Rel-Dimere an die inhibitorische Untereinheit I $\kappa$ B gebunden, welche durch Maskierung des Kernlokalisierungssignals (NLS) in der RHD-Region von NF- $\kappa$ B dafür sorgt, dass NF- $\kappa$ B im Zytoplasma zurückgehalten wird und somit nicht in den Zellkern translozieren kann, um dort seine Zielgene zu aktivieren (Baldwin, 1996; Ghosh et al., 1998). Mittlerweile wurden sieben I $\kappa$ B-Moleküle identifiziert: I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\gamma$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , Bcl-3, p100 und p105 (Ghosh et al., 1998). So sind p100 und p105 genau wie die übrigen Mitglieder der I $\kappa$ B-Familie durch das Vorhandensein von mehreren Ankyrin-Repeats charakterisiert, die als Protein-Protein Interaktionsdomänen mit der RHD-Region von NF- $\kappa$ B interagieren und dadurch NF- $\kappa$ B im Zytoplasma zurückhalten (Ghosh et al., 1998). Die I $\kappa$ Bs haben überlappende aber dennoch unterschiedliche inhibitorische Spezifitäten, die sie befähigen, NF- $\kappa$ B Dimere unterschiedlich zu hemmen. Das am besten charakterisierte I $\kappa$ B-Molekül ist I $\kappa$ B $\alpha$ . I $\kappa$ B $\alpha$  kann in drei strukturelle Domänen eingeteilt werden: eine 70-Aminosäuren lange N-terminale Region, eine 205-Aminosäuren lange zentrale Region, die aus Ankyrin-Repeats aufgebaut ist, sowie eine



<b>Zytokine und Wachstumsfaktoren</b>	<b>Interleukin-2, -3, -6, -12</b> <b>Tumor Nekrose Faktor-<math>\alpha</math>, LT<math>\alpha</math></b> <b>Interferon-<math>\beta</math></b> <b>GM-CSF</b> <b>G-CSF</b> <b>M-CSF</b>
<b>Chemokine</b>	<b>Interleukin-8</b>
<b>Adhäsionsmoleküle</b>	<b>ELAM-1</b> <b>VCAM-1</b> <b>ICAM-1</b> <b>E-Selektin</b> <b>Mad-CAM-1</b>
<b>Zelloberflächenrezeptoren</b>	<b>TCR<math>\alpha</math>, TCR<math>\beta</math></b> <b><math>\beta</math>2-Mikroglobulin</b> <b>IL-2R<math>\alpha</math></b>
<b>Transkriptionsfaktoren</b>	<b>c-myc</b> <b>c-Rel</b> <b>I<math>\kappa</math>B<math>\alpha</math></b>
<b>Weitere Gene</b>	<b>iNO Synthase</b> <b>COX-1, -2</b> <b>TAP-1 Peptidtransporter</b> <b>LMP2 Proteasom-Untereinheit</b>

**Tab.1 Auswahl NF- $\kappa$ B-regulierter Gene**

C-terminale 42-Aminosäuren umfassende Region, die die sogenannte PEST-Region enthält (Baldwin, 1996). Das PEST-Motiv ist eine Sequenz der I $\kappa$ B-Phosphorylierung und ist ebenso verantwortlich für den Grundumsatz dieser Proteine.

## 1.2 Die NF- $\kappa$ B Signaltransduktionskaskade

Zu den grundlegenden Eigenschaften der Zelle gehört es, auf Signale (Reize) der Umwelt zu reagieren und diese in eine zelluläre Antwort umzuwandeln. Damit dieses Signal von der Zelloberfläche in den Zellkern gelangen kann, um dort eine spezifische Genexpression auszulösen, haben die Zellen der Eukaryonten ein ausgefeiltes System von Proteinen entwickelt, mit dem sie auf Signale von anderen Zellen antworten können. Zu diesem System gehören Zelloberflächenrezeptoren, intrazelluläre Rezeptorproteine, Proteinkinasen und Proteinphosphatasen. In einem komplexen biochemischen Vorgang, den man als Signaltransduktion bezeichnet, regen aktivierte Zelloberflächenrezeptoren über Proteinkinasen eine Phosphorylierungs-/Aktivierungskaskade intrazellulärer Proteine an. Dieser Prozess mündet am Ende in einem spezifischen Muster der Genexpression, welches durch Transkriptionsfaktoren, die am Ende der Signalübertragungskette stehen, vermittelt wird.

NF- $\kappa$ B ist im Zytoplasma der ruhenden Zelle an das Inhibitorprotein I $\kappa$ B $\alpha$  gebunden. Auf eine zelluläre Stimulation, z.B. durch das Einwirken von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF, IL-1, IL-18 oder anderen Stimuli, wie z.B. den bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS) hin wird das I $\kappa$ B $\alpha$ -Protein an zwei konservierten Serinresten (Ser32 und Ser36) durch den I $\kappa$ B-Kinase-Komplex (IKK) phosphoryliert, anschließend durch eine E3 Ubiquitin-Ligase ubiquitiniert und dann durch das 26S-Proteasom degradiert (Karin and Ben-Neriah, 2000). Aufgrund der Degradierung von I $\kappa$ B $\alpha$  liegt keine Assoziation mit NF- $\kappa$ B mehr vor, so dass aktives NF- $\kappa$ B in den Zellkern transloziert und gemeinsam mit dem Coaktivator CBP/p300 den RNA-Polymerase-II-Komplex aktivieren kann.

Inzwischen weiß man, dass die NF- $\kappa$ B-Aktivierung über verschiedene Signalwege erfolgen kann. Vor allem die TNF-Rezeptoren 1 (p55/TNFR1) und 2 (p75/TNFR2) sowie die Toll/Interleukin-1-Rezeptoren sind an diesen Signaltransduktionsprozessen beteiligt. Charakteristisch für den „klassischen“ Signalweg ist, dass er in der Aktivierung des IKK-Komplexes, dem Schlüsselmolekül der NF- $\kappa$ B-Aktivierung, mündet (Malinin et al., 1997). Der IKK-Komplex (700-900 kDa) besteht aus den zwei katalytischen Kinase-Untereinheiten IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  sowie der regulatorischen Untereinheit IKK $\gamma$ /NEMO (Rothwarf et al., 1998; Zandi and Karin, 1999; Zandi et al., 1997). Vor allem die katalytischen Kinase-Untereinheiten IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  sind für die signal-induzierende Phosphorylierung von I $\kappa$ B verantwortlich (DiDonato et al., 1997). In einem alternativen NF- $\kappa$ B-Signalweg sorgt eine von NIK (NF- $\kappa$ B-Inducing-Kinase) aktivierte IKK $\beta$ -Untereinheit für die Phosphorylierung und anschließende Prozessierung von p100 zu p52. Das so generierte p52 verbindet sich mit der RelB-Untereinheit und bewegt sich als p52/RelB-Heterodimer in den Zellkern. Die Aktivierung des

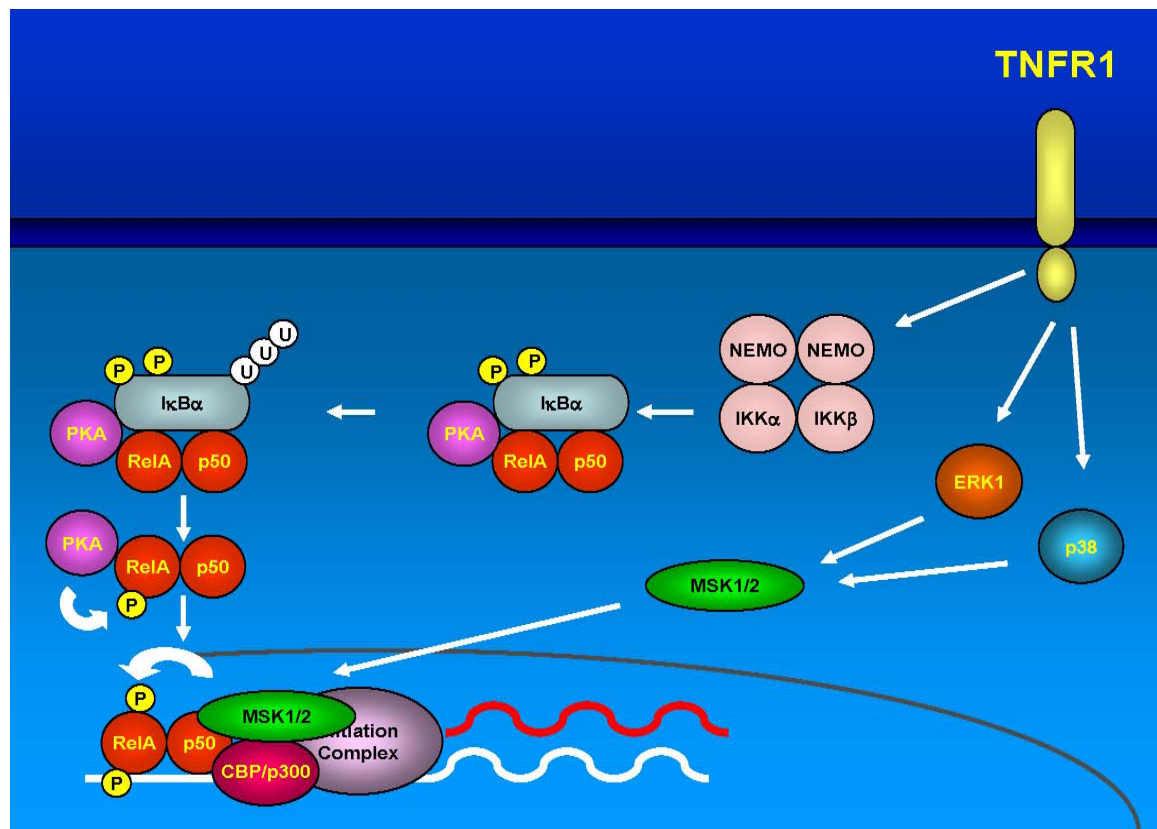
alternativen Signalweges erfolgt über die Lymphotoxin $\beta$ - (LT $\beta$ ), BAFF- oder CD40-Rezeptoren, die allesamt zur Familie der TNF-Rezeptoren gehören. Weitere alternative Signaltransduktionswege, die zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B führen, haben Bender/Li und Imbert beschrieben. So wird z.B im Falle einer UV-Bestrahlung eine NF- $\kappa$ B-Aktivierung hervorgerufen, die zwar mit einer I $\kappa$ B-Degradierung einhergeht, aber nicht mit einer I $\kappa$ B-Phosphorylierung gekoppelt ist (Bender et al., 1998). Werden Jurkat T-Zellen mit Pervanadat behandelt, so kommt es ebenfalls zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B, wobei I $\kappa$ B $\alpha$  am Tyrosinrest 42 phosphoryliert wird, ohne dass I $\kappa$ B $\alpha$  proteolytisch abgebaut wird (Imbert et al., 1996).

### 1.3 Regulation der NF- $\kappa$ B-Aktivität

Die zytoplasmatische Retention von NF- $\kappa$ B durch I $\kappa$ B gilt als der Hauptmechanismus zur Verhinderung einer spontanen NF- $\kappa$ B-Aktivität. Erst die IKK $\alpha$  und IKK $\beta$ -vermittelte Phosphorylierung von I $\kappa$ B sowie seine anschließende proteosomale Degradierung stellen die notwendigen Voraussetzungen für eine vollständige NF- $\kappa$ B-Aktivierung dar. Denn nur wenn die Kernlokalisierungssequenz des p50/p65- oder des p52/p65-NF- $\kappa$ B-Komplexes freigelegt ist, kann sich der Komplex in Richtung Zellkern bewegen und an das NF- $\kappa$ B Bindesequenz-Element im Promotor seines Zielgenes binden (Ghosh and Karin, 2002). Dennoch reicht eine einfache Bindung dieses Transkriptionsfaktors an die DNA nicht aus, um eine hinreichende NF- $\kappa$ B-Aktivierung zu erzielen. Post-translationale Modifikationen beeinflussen maßgeblich die transkriptionelle Aktivität von NF- $\kappa$ B. Berichten mehrerer Arbeitsgruppen zufolge sollen eine Vielzahl von Proteinkinasen wie Casein Kinase II, Akt, IKK, die PKAc und die MAP-Kinase p38 (Mitogen-Activated Protein Kinase) an der Phosphorylierung verschiedener Serinresten (276, 468, 529 und 536) der transaktivierenden Domäne von p65 beteiligt sein, wodurch die transkriptionelle Aktivität von NF- $\kappa$ B moduliert wird (Mercurio and Manning, 1999; Schmitz and Baeuerle, 1991; Vermeulen et al., 2003; Wang and Baldwin, 1998; Zhong et al., 1997). Demnach induziert LPS die Phosphorylierung des Serins 276 an der p65-Untereinheit durch die Proteinkinase A. Die Rolle dieser Phosphorylierung scheint in zweierlei Hinsicht von wichtiger Bedeutung zu sein. Erstens wird durch die Phosphorylierung die DNA-Bindung von p65 verstärkt, und zweitens sorgt sie für eine zusätzliche Interaktionsstelle für den transkriptionellen Coaktivator CBP/p300 (CREB-Binding-Protein) (Zhong et al., 2002; Zhong et al., 1998), so dass die transkriptionelle Aktivität von p65 erhöht wird (Viatour et al., 2005; Zhong et al., 1997).

Auch die negative Regulation der NF- $\kappa$ B Aktivierung ist komplex. Neu-synthetisierte I $\kappa$ B $\alpha$ -Moleküle gelangen in den Zellkern und entfernen NF- $\kappa$ B von der DNA (Arenzana-Seisdedos

et al., 1995). Als wesentlichen Mechanismus für den Rücktransport von NF- $\kappa$ B vom Zellkern ins Zytoplasma kommen leucinreiche NES-Sequenzen (Nucleus-Export-Sequences) im I $\kappa$ B $\alpha$ -Molekül in Betracht (Arenzana-Seisdedos et al., 1997; Rodriguez et al., 1999).



**Abb. 1** Aktivierung von NF- $\kappa$ B. Nach Stimulation über den p55/TNFR1 Rezeptor kommt es nach Aktivierung des IKK Signalsoms (IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , IKK $\gamma$ /NEMO) zur Phosphorylierung und Degradation von I $\kappa$ B $\alpha$ ; dies führt zur Phosphorylierung von p65/RelA an Ser536 und Translokation in den Zellkern. Über die MAP Kinasen ERK1 und p38 und nachfolgender Aktivierung von MSK1/2 phosphorylieren MSK1/2 p65/RelA an Ser276.

## 1.4 Pathophysiologische Bedeutung von NF- $\kappa$ B

### 1.4.1 Rolle von NF- $\kappa$ B in der Onkogenese

Die Entstehung eines malignen Tumors basiert auf zahlreichen Veränderungen im zellulären Stoffwechsel. Dazu zählen Veränderungen, die nicht nur die Zellproliferation, sondern auch den programmierten Zelltod (Apoptose), die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Angiogenese betreffen. Das Ungleichgewicht zwischen Zellproliferation und programmiertem Zelltod gilt daher als eines der kritischsten zellulären Ereignisse, die zur Onkogenese führen. Es überrascht daher nicht, dass der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B eine wichtige Rolle bei der Entstehung von malignen Tumoren einnimmt. Die ersten Anhaltspunkte, wonach NF- $\kappa$ B in

der Onkogenese involviert sein könnte, stammten von Untersuchungen an Retroviren, die v-Rel codieren, ein onkogenes virales Homolog zu c-Rel, welches Tumoren in Hühnern verursachte (Rayet and Gelinas, 1999; Sylla and Temin, 1986).

Im Laufe der Zeit hat sich immer mehr herauskristallisiert, dass NF- $\kappa$ B auch an der Entstehung maligner Tumore des lymphatischen Systems beteiligt sein kann. Gerade in Tumoren lymphoiden Ursprungs findet man häufig eine fehlregulierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung vor. Als Ursache dieser Fehlsteuerung werden genetische Veränderungen wie chromosomale Rearrangements (Genumordnungen im Genom), chromosomale Translokationen (reziproker Austausch von Chromosomensegmenten), Amplifikationen (Vervielfältigung von Genkopien) oder Mutationen in *Rel*- und *Ikb* Genen verantwortlich gemacht (Cabannes et al., 1999; Gilmore, 1999; Rayet and Gelinas, 1999). Insbesondere die für c-Rel-, NF- $\kappa$ B2- und Bcl-3-kodierenden Gene sind in Regionen des Genoms lokalisiert, die bei Rearrangment- oder Amplifikationsvorgängen involviert sind. Während das *c-Rel* Gen in amplifizierter Form (mit der Kopienzahl steigt auch das Ausmaß der Gesamtexpression) und „rearranged“ in einigen krebsartigen Zelllinien gefunden wurde (Gilmore et al., 1996; Rayet and Gelinas, 1999), wurde das *Bcl-3* Gen als eine [t(14,19)(q32;q13.1)] chromosomale Translokation in einer Reihe von chronischen lymphatischen B-Zell-Leukämien identifiziert und nachgewiesen (McKeithan et al., 1997). Darüberhinaus wird *Bcl-3* in bestimmten B-Zell-Neoplasmen überexprimiert (McKeithan et al., 1997). Der t(10,14) chromosomale Translokationsbruchpunkt, der mit NF- $\kappa$ B2 assoziiert ist, wurde ursprünglich in B-Zell Non-Hodgkin-Lymphomen gefunden und tritt in zahlreichen lymphoiden Neoplasmen, insbesondere kutanen Lymphomen auf (Fracchiolla et al., 1993). Die Umordnung von *Nfkb-2* Genen innerhalb der Ankyrin-kodierenden Domäne produziert C-terminal veränderte Proteine. Der dadurch resultierende partielle Verlust der Ankyrin-Domäne führt zu einer verstärkten Kernlokalisierung und zur NF- $\kappa$ B-DNA-Bindung dieser NF- $\kappa$ B2 Proteine. Im Gegensatz zur prozessierten Wildtyp-Form p52, welches generell die Transkription unterdrückt, aktivieren Tumor-abgeleitete NF- $\kappa$ B2 Proteine die Genexpression in Säugerzellen (Zhang et al., 1994). Beim Morbus Hodgkin, einem B-Zell-Lymphom mit hoher Proliferationsrate der klonalen, malignen Reed-Sternberg-Zellen (Bargou et al., 1997), kommt es infolge einer genetischen Mutation im *Ikba* Gen zu einem Verlust des hemmenden Einflusses der I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteine auf NF- $\kappa$ B (Cabannes et al., 1999). Dementsprechend ist NF- $\kappa$ B in diesen Zellen konstitutiv aktiv. Es kam daher die Vermutung auf, I $\kappa$ B nehme eine Rolle als Tumorsuppressor wahr. Eine durch molekulare Veränderungen resultierende konstitutive Aktivierung des Rel/NF- $\kappa$ B-Signalwegs trägt auf verschiedene Arten zur Transformation der Zelle bei. Dies geschieht entweder dadurch, dass die

Zellproliferation und das Überleben von Zellen (Bargou et al., 1997) begünstigt, das Wachstum von Tumorzellen (Duffey et al., 1999) gefördert, die Tumordinvasion in umliegendes Gewebe erleichtert oder die Metastasierung und die Angiogenese (Huang et al., 2000) verstärkt werden. Es ist daher naheliegend, dass eine veränderte NF- $\kappa$ B-Aktivierung eine Fehlregulation von NF- $\kappa$ B kontrollierten Genen nach sich zieht. Betroffen davon sind hauptsächlich Gene, die die Zellproliferation und die Apoptose regulieren oder Gene, die die Angiogenese (z.B. VEGF) fördern.

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass die NF- $\kappa$ B-Aktivierung den Signalweg für den programmierten Zelltod unterdrücken kann und dass aktives NF- $\kappa$ B notwendig ist, um die Zellen vor der apoptotischen Kaskade (Caspase-8-Kaskade), welche durch TNF und andere proapoptischen Stimuli induziert werden kann, zu schützen (Barkett and Gilmore, 1999). Die Hemmung der Apoptose durch NF- $\kappa$ B ist in der Expression von TRAF1, -2 und den antiapoptischen Proteinen c-IAP-1 und -2 (cellular inhibitors of apoptosis) begründet, die dafür sorgen, dass eine Caspase-8-Aktivierung unterbunden wird. Caspasen gelten als die wichtigsten Enzyme, um eine zur Apoptose führende Signalkaskade schrittweise zu triggern. Andere antiapoptischen Gene, die durch NF- $\kappa$ B transkriptionell aktiviert werden, sind die Bcl-2 Homologen A1/Bfl-1 und Bcl-X<sub>L</sub>, IEX-1, und XIAP.

Neben der Inhibition der Apoptose reguliert NF- $\kappa$ B auch den Zellzyklus, indem es das Zellwachstum durch die Hochregulierung des Cyclin D1-Genes fördert. Das Zellzyklusprotein Cyclin D1 begünstigt den Eintritt der Zellen von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus. Dieser Vorgang ist mit einer Hyperphosphorylierung des Tumorsuppressorproteins Retinoblastom (Rb), der Progression in die S-Phase des Zellzyklus und der Verhinderung der Apoptose verbunden. Eine Hochregulierung von Cyclin D1 konnte in vielen humanen Tumoren nachgewiesen werden (Cao et al., 2001).

Die ersten Beweise, wonach NF- $\kappa$ B unabhängig von chromosomalen Translokationseignissen mit einer zellulären Transformation verbunden ist, rühren von Erfahrungen mit einer Vielzahl viral transformierender Proteine, die für eine NF- $\kappa$ B-Aktivierung sorgen. Zum Beispiel aktiviert das Tax Protein des humanen T-Zell Leukämie Virus-I (HTLV-I) NF- $\kappa$ B (Hiscott, 2001) über die Wechselwirkungen mit dem IKK-Komplex (Chu et al., 1998). Andere viral transformierende Proteine wie das Epstein-Barr-Virus-Protein Nuklear-Antigen 2 oder das latente Membran-Protein 1 (LMP-1) stimulieren ebenfalls die transkriptionelle Aktivität von NF- $\kappa$ B (Mosialos, 1997). Das Burkitt- und das Hodgkin-Lymphom sind Beispiele einer NF- $\kappa$ B vermittelten, viral induzierten (durch Epstein-Barr-Virus) Tumorgenese (Berger et al., 1997).

Weitere Indizien, die für eine Beteiligung von NF- $\kappa$ B in der Onkogenese sprechen, stammen von Experimenten, in welchen der NF- $\kappa$ B-Signalweg direkt gestört war. Eine Hemmung von NF- $\kappa$ B durch die Expression einer modifizierten Form von I $\kappa$ B $\alpha$  (Finco et al., 1997) oder durch eine dominant negative Form des IKK-Komplexes blockierte die Ras-induzierte Focus-Bildung/Transformation (Arsura et al., 2000; Mayo et al., 1997). Ziel ist es daher, eine Anti-Krebs-Therapie zu entwickeln, die darauf abzielt, den NF- $\kappa$ B-Signalweg so zu hemmen, dass Tumorzellen gegenüber chemotherapeutischen Agentien sensitiv werden, aber gleichzeitig die nützliche Funktion von NF- $\kappa$ B bei der Immunantwort erhalten bestehen bleibt.

#### **1.4.2 Rolle von NF- $\kappa$ B in der Hämatopoese**

Die zellulären Bestandteile des peripheren Blutes erfüllen lebenswichtige Aufgaben wie Sauerstofftransport (Erythrozyten), Blutgerinnung (Thrombozyten) und Infektionsabwehr (Leukozyten). Aufgrund ihrer begrenzten Lebensdauer müssen diese Zellen jedoch zeitlebens in hoher Zahl regeneriert werden. Der Prozess der Blutbildung (Hämatopoese) vollzieht sich bei der Maus zunächst im Dottersack bis zum embryonalen Tag 11,5 (E11,5). Nach diesem Entwicklungsstadium nimmt die Hämatopoese im Dottersack ab und die fötale Leber wird das vorherrschende hämatopoetische Organ für den Rest des fötalen Lebens. Später erfolgt die Blutbildung im Knochenmark. Ihren Ursprung hat die Hämatopoese in wenigen hämatopoetischen Stammzellen, aus denen über verschiedene Reifungsstufen durch Proliferation und Differenzierung die Zellen des peripheren Blutes entstehen. Da Stammzellen viele Möglichkeiten haben sich zu entwickeln, spricht man auch von „pluripotenten“ Stammzellen. Sie teilen sich asymmetrisch: bei ihrer Teilung entstehen nicht zwei gleiche Zellen, sondern jeweils eine neue pluripotente Stammzelle (Selbsterneuerung) und eine bereits als Vorstufe der einzelnen Blutzellen differenzierte Zelle (determinierte Stammzelle), die anschließend weiter heranreift. Es wird angenommen, dass dieser Prozess durch ein Netzwerk von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren gesteuert und reguliert wird. Je nachdem, welcher Wachstumsfaktor einwirkt, entstehen dabei entweder die verschiedenen Typen der Leukozyten, Erythrozyten oder Thrombozyten. Im Allgemeinen kann man zwei spezialisierte Stammzellen unterscheiden: eine lymphatische Stammzelle, aus der sich B- und T-Zellen bilden (Lymphopoese) und eine myeloische Stammzelle, aus der Leukozyten, Erythrozyten und Megakaryozyten hervorgehen (Myelopoese) (Akashi et al., 2000). Zu den Leukozyten zählen die Monozyten/Makrophagen, die basophilen, eosinophilen und neutrophilen Zellen, die man auch wegen ihrer ungewöhnlichen Zellkernform als polymorphkernige Leukozyten oder wegen ihres körnigen Zytoplasmas

als Granulozyten bezeichnet. Weil sich in der Zellkultur einzelne blutbildende Zellen so vermehren, dass auf dem Nährboden „Kolonien“ entstehen, fasst man diese blutbildenden Wachstumshormone als Kolonie stimulierende Faktoren (CSF=colony stimulating factor) zusammen.

Während der Myelopoese kontrollieren die Zytokine Interleukin-3 (IL-3), Granulozyten/Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) und Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF) Vorgänge der Zellproliferation und Zelldifferenzierung dadurch, dass viele Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B, PU.1, JunB, C/EBP- $\alpha$  und C/EBP- $\epsilon$  von diesen Zytokinen reguliert werden (Friedman, 2002; Tenen et al., 1997). Inzwischen weiß man, dass diese Transkriptionsfaktoren an der Reifung neutrophiler Granulozyten involviert sind (Friedman, 2002; Tenen et al., 1997). Den Transkriptionsfaktoren kommt daher gerade im Hinblick auf die Differenzierung/Proliferation hämatopoetischer Vorläuferzellen eine große Bedeutung zu (Orkin, 1995; Shivdasani and Orkin, 1996). Pyatt und Mitarbeiter haben gezeigt, dass NF- $\kappa$ B mit für das Überleben von Knochenmarkstammzellen verantwortlich ist (Pyatt et al., 1999). Eine regulatorische Funktion von NF- $\kappa$ B in der Hämatopoese ist daher naheliegend. Obwohl die funktionelle Rolle von NF- $\kappa$ B in der Myelopoese nach wie vor unklar ist, ist es in den letzten Jahren gelungen, dank der Entwicklung von transgenen Mäusen, mehr Informationen über den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B hinsichtlich der Regulation von Zellteilungs- und -differenzierungsvorgängen im Zusammenhang mit der Entwicklung myeloischer Zellen (Myelopoese) zu bekommen. Es konnte gezeigt werden, dass die für die Myelopoese wichtigen Wachstumsfaktoren GM-CSF (granulocytes/macrophages colony-stimulating factor) und G-CSF (granulocytes colony-stimulating factor) durch NF- $\kappa$ B reguliert werden. Verantwortlich für die Regulation von GM-CSF ist die c-Rel-Untereinheit (Gerondakis et al., 1996). Aus dem adoptiven Transfer von p50/RelA-defizienten fötalen Leberzellen in letal bestrahlte Mäuse resultierte ein starker Mangel an Lymphozyten und eine starke Vermehrung von Granulozyten im peripheren Blut (Horwitz et al., 1997). Eine auftretende Hypergranulopoese und eine schwere Anämie waren ebenfalls bei der Transplantation RelA/c-Rel-defizienter Stammzellen in bestrahlte Mäuse, sowie in RelB-defizienten Mäusen zu beobachten (Burkly et al., 1995; Grossmann et al., 1999; Weih et al., 1995). Als Konsequenz einer fehlregulierten NF- $\kappa$ B-Aktivität, die durch eine I $\kappa$ B $\alpha$  Defizienz bedingt ist, entwickeln I $\kappa$ B $\alpha$ -Knockout-Mäuse als Folge einer gestörten Myelopoese postnatal eine Hypergranulopoese (Beg et al., 1995; Klement et al., 1996). Fehler, die bei der Kontrolle der Zellproliferation und Differenzierung während der Myelopoese auftreten, führen zur Leukämie (Passegué et al., 2001). Neben seinem Einfluss auf die Myelopoese scheint NF- $\kappa$ B eine



mögliche Rolle in der Erythropoese einzunehmen. Darauf stützen sich Beobachtungen, wonach p50, p52 und RelA stark in erythroiden Vorläuferzellen exprimiert werden. Knockout-Mäuse erwiesen sich als probates Mittel um herauszufinden, welche Funktionen den einzelnen Mitgliedern der NF- $\kappa$ B-Familie in der Lymphopoese zukommen. Für einzelne Komponenten dieses Transkriptionsfaktors konnten wichtige Funktionen bei der Kontrolle des Zellwachstums und des Überlebens von B- und T-Zellen aufgefunden werden (Grumont et al., 1998; Kontgen et al., 1995; Sha et al., 1995). c-Rel-Knockout-Mäuse hatten eine normale Anzahl hämatopoetischer Zellen. T- und B-Zellen zeigten jedoch Defizite in der proliferativen Antwort nach Stimulation mit verschiedenen Mitogenen. Ebenso wiesen diese Mäuse eine Störung bei der Zytokinproduktion und im Isotyp-Switching auf (Gerondakis et al., 1996; Grigoriadis et al., 1996; Grumont et al., 1998; Kontgen et al., 1995). Knockout Mäuse, denen RelB, das spezifisch in Dendritischen Zellen und B-Lymphozyten exprimiert wird, fehlte, zeigten Störungen bei der angeborenen und erworbenen Immunität (Burkly et al., 1995; Weih et al., 1995). Welche Rolle genau NF- $\kappa$ B in den verschiedenen Blutzelllinien der Hämatopoese spielt, ist zurzeit noch nicht geklärt. Auch die molekularen Mechanismen, durch welche die Rel/NF- $\kappa$ B-Proteine die Hämatopoese regulieren, sind noch unbekannt. Aus pathophysiologischer Sicht führt eine konstitutive Aktivierung dieser Faktoren zu verschiedenen Arten maligner hämatologischer Tumoren, einschließlich Lymphomen (Hodgkin's Erkrankung, Burkitt's Lymphome, T-Zell-Leukämien), multiplen Myelomen, akuten myeloischen Leukämien und akuten lymphoblastischen Leukämien (Turco et al., 2004).

### **1.4.3 Die Bedeutung von NF- $\kappa$ B für die Physiologie und Pathophysiologie der Haut**

Die Haut ist das mit 1,5 -2m<sup>2</sup> größte Organ des Menschen. Sie dient als Barriere gegen eine Vielzahl äußerer Einflüsse und schützt den Organismus vor chemischen, mikrobiellen und physikalischen Schadstoffen. Darüberhinaus nimmt sie eine wichtige Funktion bei der angeborenen Wirtverteidigung ein und gilt als ein Vermittler bei der Initiation von stressbedingten Signalen (Bell et al., 2003). Die Bildung und Aufrechterhaltung der reifen Epidermis, der obersten Schicht der Haut, basiert auf einem ausbalancierten Vorgang zwischen Keratinozytenproliferation und terminaler Differenzierung. Die Epidermis ist ein mehrschichtiges Epithel, dessen Hauptbestandteile die Keratinozyten darstellen, die in vier unterschiedlichen Schichten angeordnet sind. Die epidermalen Stammzellen sind vermutlich in der Basalzellschicht und der „bulge region“ des Haares lokalisiert. Eine Tochterzelle bleibt basal erhalten, die andere Tochterzelle befindet sich in einer permanenten zur Hautoberfläche gerichteten Wanderbewegung. Während dieses Prozesses unterliegt sie strukturellen Umwandlungen

und formiert das Stratum spinosum, das Stratum granulosum und schließlich das Stratum corneum in Form von Keratinozyten, den leblosen Hornzellen, wo sie als Hornschuppe abgeschilfert wird. Die Transitzeit von Keratinozyten vom Stratum basale bis zum Stratum granulosum beträgt etwa 2-3 Wochen, vom Stratum granulosum bis zur Hornschuppe nochmals 2 Wochen. Die Regulationsmechanismen der Epidermopoese und Differenzierung sind aber noch weitgehend unbekannt, so dass die Kontrolle derjenigen Gene, die den Zellzyklusarrest, die Auswanderung und die terminale Differenzierung regulieren, noch nicht vollständig verstanden wird (Jones et al., 1995). Störungen in diesen Vorgängen unterbrechen die epitheliale Homeostase und können sowohl zu kutanen Neoplasmen als auch zu vielen entzündlichen Hauterkrankungen führen. Es ist zu erwarten, dass NF- $\kappa$ B, welches in zelluläre Prozesse der Proliferation, Differenzierung, Zellzyklus-Regulation und Tumorbildung involviert ist, auch als Schlüsselmediator inflammatorischer Hauterkrankungen in Frage kommt.

Vor allem durch die Anwendung verschiedener muriner Modellsysteme mit Störungen der Rel/NF- $\kappa$ B-Funktion in der Haut konnte eine Beteiligung von NF- $\kappa$ B in der Hautphysiologie nachgewiesen werden. Frühere *in vivo* und *in vitro*-Experimente zeigten eine Hyperproliferation der Keratinozyten und eine epidermale Hyperplasie (Verdickung der Epidermis) nach Hemmung des NF- $\kappa$ B-Signalweges und einen Wachstumsarrest nach einer NF- $\kappa$ B-Aktivierung in epidermalen Keratinozyten. Diese Daten lassen auf eine Rolle von NF- $\kappa$ B in der Wachstumsregulation von epidermalen Keratinozyten und somit auf eine Funktion von NF- $\kappa$ B in der epidermalen Homeostase schließen (Hu et al., 2001; Seitz et al., 2000; Seitz et al., 1998).

NF- $\kappa$ B hat aber nicht nur Einfluss auf die Zellproliferation/-differenzierung und Homeostase in der Haut, sondern kontrolliert darüber hinaus Vorgänge in der Apoptose und Karzinogenese der Haut (van Hogerlinden et al., 1999). Die Hemmung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs hervorgerufen durch eine Überexpression von I $\kappa$ B $\alpha$  führte in diesem Mausmodell nicht nur zu einer stark erhöhten Apoptoserate der Keratinozyten, sondern auch dazu, dass solche Mäuse verstärkt spinozelluläre Karzinome entwickelten (Seitz et al., 1998; van Hogerlinden et al., 1999). Welche Rolle NF- $\kappa$ B in der Dermatologie genau spielt, ist bisher noch nicht definitiv geklärt (Fuchs and Raghavan, 2002).

#### **1.4.4 Psoriasis vulgaris als Modell einer entzündlichen Hauterkrankung**

Grundvoraussetzung für den Ablauf einer Entzündungsreaktion in der Epidermis ist die Rekrutierung von Granulozyten, Monozyten und T-Zellen an den Ort der Entzündung. Damit dies

geschehen kann, müssen Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin an der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert werden. Das ermöglicht die Bindung von Lymphozyten und polymorphkernigen Leukozyten an das Endothel sowie die Diapedese und Migration dieser Zellen ins Zielgewebe. Chemokine ihrerseits tragen dazu bei, diese Entzündungszellen an den Ort der Entzündung anzulocken. Da die Expression von Adhäsionsmolekülen von Zytokinen induziert wird, spielt gerade die NF- $\kappa$ B Transkriptionsfaktorfamilie in diesem Zusammenhang eine zentrale Rolle bei der Entstehung von Entzündungsprozessen und in der Auslösung einer Akuten-Phase-Reaktion. Als Antwort auf infektiöse Agentien oder proinflammatorische Stimuli werden eine Reihe von Zytokinen wie TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 nach NF- $\kappa$ B-Aktivierung synthetisiert.

NF- $\kappa$ B stimuliert zudem die Expression von Enzymen, deren Produkte Anteil an der Pathogenese chronischer inflammatorischer Prozesse haben. Zu diesen Enzymen zählen die induzierbare Form der iNOS (inducible Nitric Oxidase Synthase), welche Stickoxid (NO) erzeugt, und die induzierbare Cyclooxygenase (COX-2), welche Prostaglandine produziert. Eine erhöhte Expression der NF- $\kappa$ B induzierten iNOS konnte in den Epithelien der Atemwege von Asthma-Patienten aber auch in den Synovialzellen bei rheumatoider Arthritis vorgefunden werden.

Die Psoriasis ist eine chronische entzündliche Hauterkrankung des Menschen. Sie geht typischerweise mit geröteten, scharf begrenzten Plaques und einer charakteristischen silbrig-glänzenden Schuppung einher. Etwa 2 % der kaukasischen Bevölkerung leidet an dieser Krankheit, deren Pathogenese bis heute noch nicht geklärt ist. Ein Modell geht davon aus, dass die Entstehung der Psoriasis auf einer T-Zell vermittelten Autoimmunreaktion basiert (Prinz, 2004). Eine zentrale und derzeit stark diskutierte Frage ist die funktionale Bedeutung der Interaktionen zwischen Keratinozyten und inflammatorischen Zellen für die Initiation und Aufrechterhaltung der Psoriasis. Man nimmt an, dass Gedächtnis-Effektor-T-Zellen vom Lymphknoten in das Blut und letztendlich in die Haut gelangen („Homing“) und dort durch neuerliche Interaktion mit antigenpräsentierenden Zellen aktiviert werden. Daraufhin soll es zur Ausschüttung entzündungsfördernder Substanzen sog. Zytokinen kommen, welche dann die Entzündungsreaktion in der psoriatischen Plaque vermitteln und unterhalten. Infolge der Entzündung beginnen Keratinozyten stärker zu proliferieren. Ihre epidermale Transitzeit ist deutlich verkürzt, was zum typischen klinischen Bild mit verdickten, schuppigen Plaques führt. Neben einer genetischen Disposition können Umweltfaktoren, wie beispielsweise Medikamente und Infektionskrankheiten als Auslöser fungieren. Die psoriatische Epidermis bei chronisch-stationärer Plaque-Psoriasis ist histologisch durch eine verdickte Epidermis (A-

kanthose), eine unvollständige Verhornung (Parakeratose), das Fehlen des Stratum granulosum, intra- und subkorneale Mikroabszesse, durch verlängerte Reteleisten und durch eine verstärkte dermale Angiogenese charakterisiert.

Im Falle der Psoriasis vulgaris liegen Daten vor, die für NF- $\kappa$ B eine psoriasis-fördernde Wirkung propagieren, während andere Ergebnisse einen gegenteiligen Effekt, eine antipsoriatische Wirkung für NF- $\kappa$ B zugrundelegen. Für eine psoriasis-fördernde Wirkung von NF- $\kappa$ B sei hier der Fumarsäureester Dimethylfumarat erwähnt, welcher erfolgreich zur Behandlung der Psoriasis eingesetzt wird. Seine Wirkung erzielt das Dimethylfumarat durch einen antiproliferativen und antiinflammatorischen Effekt in den Keratinozyten. Indem Dimethylfumarat inhibitorisch auf NF- $\kappa$ B einwirkt, wird die Expression von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1, ICAM-1 und E-Selektin an den Endothelzellen sowie die Produktion weiterer inflammatorischer Zytokine, wie z.B. TNF unterbunden. Anthralin hingegen ist eines der effektivsten therapeutischen Agentien zur Behandlung der Psoriasis. Dieses Medikament induziert eine inflammatorische Antwort in der Haut, in deren Verlauf Zytokin- und Zelladhäsionsmolekülgene exprimiert werden, die für die therapeutische Effizienz essentiell sein sollen. Als Mediatoren dieser Entzündungsantwort werden ROIs (reactive oxygen intermediates; reaktive Sauerstoffradikale), insbesondere  $H_2O_2$  (als second messenger) für die Anthralin-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung diskutiert (Schmidt et al., 1996). Es ist auch bekannt, dass im psoriatischen Plaque mehrere von NF- $\kappa$ B kontrollierte Zytokine wie TGF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-8 und TNF hochreguliert sind, so dass sie durchaus eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Psoriasis spielen (Bos and De Rie, 1999). TNF nimmt eine Schlüsselfunktion bei der inflammatorischen Kaskade der Psoriasis ein. Illustriert wird dies durch eine erhöhte TNF Expression in den psoriatischen Hautläsionen. TNF wird daher auch als mögliche Ursache für die Anwesenheit infiltrierender Leukozyten diskutiert. Vor allem Tiermodelle eignen sich hervorragend, um die pathophysiologische Bedeutung von NF- $\kappa$ B bei inflammatorischen Prozessen zu untersuchen. Die Rolle von NF- $\kappa$ B bei der Differenzierung und Proliferation von Keratinozyten sowie die Regulation inflammatorischer Zytokine, wie es bei transgenen Mäusen demonstriert worden ist, zieht die Frage nach einer möglichen Beteiligung von NF- $\kappa$ B bei der Entwicklung psoriatischer Läsionen nach sich. Für eine Beteiligung von NF- $\kappa$ B an entzündlichen Erkrankungen der Haut spricht der entzündliche Hautphänotyp von I $\kappa$ B $\alpha$ -Knockout-Mäusen (Beg et al., 1995; Klement et al., 1996). Die histopathologischen Veränderungen in diesem Mausmodell haben Ähnlichkeiten mit denen der Psoriasis beim Menschen. Man weiß allerdings nicht, ob dieser Hautphänotyp durch die Überexpression von NF- $\kappa$ B oder durch den zellautonomen Verlust von I $\kappa$ B $\alpha$  in den Keratinozyten selbst oder eventuell

durch das Fehlen von I $\kappa$ B $\alpha$  in den Leukozyten, bedingt ist. Dieses Modell steht im Widerspruch zu Mausmodellen, bei denen eine Überexpression von NF- $\kappa$ B in den Keratinozyten eine epidermale Hypoplasie hervorruft. Allerdings gibt das zuletzt genannte Tiermodell den *in vivo* Charakter nicht wieder, da nur in den Keratinozyten NF- $\kappa$ B artifiziell überexprimiert wurde und die Rolle des entzündlichen Infiltrats keine Berücksichtigung fand. Die verschiedenen Hautphänotypen, die man in diesen Modellen beobachten konnte, erscheinen zwar in einigen Fällen sehr gegensätzlich, betonen aber die Vielzahl an Funktionen, die NF- $\kappa$ B in der Haut einnimmt. So gesehen können unterschiedliche unspezifische proinflammatorische Vorgänge über eine NF- $\kappa$ B-Aktivierung eine Gefäßreaktion sowie eine reaktive Infiltration der Haut bei der Psoriasis bewirken. Durch proinflammatorische Signale kommt es zur Expression von Adhäsionsmolekülen, die gemeinsam mit Chemokinen und Zytokinen die Einwanderung und Aktivierung von Leukozyten in die Haut steuern.

Es ist daher gut möglich, dass NF- $\kappa$ B durch seine proinflammatorische Wirkung einerseits, aber auch über die Steuerung von Apoptosevorgängen und Einflussnahme auf den Zellzyklus/-differenzierung in Keratinozyten andererseits, zur Entstehung der chronischen Hauterkrankung Psoriasis vulgaris beiträgt.

## **1.5 Funktion des Notch/Jagged1-Signalwegs in der Myelopoese**

### **1.5.1 Aufbau und Struktur von Notch/Jagged**

Der Notch-Signalweg ist evolutionär konserviert. Ihm kommt eine fundamentale Bedeutung bei der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse wie Apoptose, Zellproliferation und Morphogenese zu. Entdeckt wurde das Notch-Gen zuerst in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, wo es an vielen Entwicklungsprozessen, einschließlich der Myogenese, Neurogenese, Flügelbildung und Augenentwicklung beteiligt ist (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Die Notch-Familie umfasst eine Gruppe von Proteinen, die zum einen als Zelloberflächenrezeptoren fungieren und zum anderen als direkte Regulatormoleküle die Gentranskription beeinflussen (Artavanistsakonas et al., 1995; Honjo, 1996; Kopan et al., 1996). Notch-Rezeptoren werden im Trans-Golgi-Apparat gespalten und als Heterodimere auf der Zelloberfläche exprimiert (Logeat et al., 1998). Sie stellen Transmembranproteine dar, die mit einer extrazellulären und einer intrazellulären Domäne ausgestattet sind. Die extrazelluläre Domäne von Notch enthält 33-36 Tandem EGF-Repeats (epidermal growth factor) und drei Lin-12/Notch-Repeats (LNR), die für die Ligandenbindung bei Zell-Zell-Interaktionen benötigt werden. Die intrazelluläre Domäne zeichnet sich durch sechs cdc10/SWI6/Ankyrin-Repeats, RAM-Domäne, Kernlokalisierungssignale (NLS), sowie durch eine C-terminale OPA/PEST-Region

aus. Besonders die cdc10-Region stellt einen äußerst konservierten Anteil dieses Moleküls dar und ist zusammen mit der RAM-Domäne maßgeblich an dem intrazellulären Signaltransduktionsvorgang beteiligt (Fortini and Artavanis-Tsakonas, 1994; Kopan et al., 1994; Lieber et al., 1993; Struhl et al., 1993). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind vier Notch-Gene (Notch1-4) bekannt (Lardelli et al., 1994; Uyttendaele et al., 1996; Weinmaster et al., 1991; Weinmaster et al., 1992). Eine physiologische Aktivierung des Notch-Signalweges bedarf einer Bindung des dazugehörigen Liganden an seinen Rezeptor. Bei Vertebraten konnten inzwischen mehrere Liganden nachgewiesen werden, die homolog sind zu den Drosophila Notch-Liganden Delta und Serrate (Egan and Sandborn, 1998; Fleming et al., 1997). Diese Liganden werden entsprechend als Delta/Delta-like bzw. Jagged bezeichnet. Bislang wurden sechs Notch-Liganden, Jagged1 und -2 und Delta 1-4 im Säugersystem identifiziert. Gegenwärtig weiß man aber nur sehr wenig über die Spezifitäten der verschiedenen Notch-Rezeptoren zu jedem ihrer Liganden. Notch-Liganden sind wie Notch-Rezeptoren Transmembranproteine. Ihre extrazelluläre Domäne besteht aus multiplen EGF-artigen Repeats/Wiederholungen und einer charakteristischen DSL-Domäne (Delta, Serrate, LAG-2) (Weinmaster, 1997), welche für die Notch-Bindung und Aktivierung verantwortlich ist (Fitzgerald and Greenwald, 1995; Muskavitch, 1994). Strukturell unterscheiden sich Serrate, Jagged1 und Jagged 2 von dem Liganden Delta durch zusätzliche EGF-artige Wiederholungen, sowie durch das Vorhandensein einer cysteinreichen Region.

### **1.5.2 Notch/Jagged1 Signaltransduktionsweg**

In dem heute gültigen Modell zum Notch-Signaltransduktionsprozess führt eine Zell-Zell-Interaktion zwischen Notch-exprimierenden Zellen und benachbarten Zellen, die einen Notch-Liganden auf ihrer Zelloberfläche aufweisen, zu einer Notch-Aktivierung. Dieses Ereignis geht mit einer proteolytischen Spaltung, Freisetzung und einer nachfolgenden Translokation der aktivierten intrazellulären Domäne von Notch (Notch-IC) in den Zellkern einher (Brou et al., 2000; De Strooper et al., 1999; Mumm and Kopan, 2000). Notch-IC hat die Möglichkeit mit einer Vielzahl von zytoplasmatischen Proteinen und Kernproteinen zu interagieren, was zur Folge hat, dass der Vorgang der Signaltransduktion durch mindestens zwei verschiedene Signaltransduktionswege vermittelt werden kann. Generell kann man zwischen einem CSL-abhängigen und einem CSL-unabhängigen Signaltransduktionsweg unterscheiden (CBF1/RBP- $\kappa$ , Su(h), LAG-1). Beim CSL-abhängigen Signaltransduktionsweg führt die Interaktion von Notch-IC mit dem Transkriptionsfaktor CSL zur Konvertierung des transkriptionellen Repressors CSL in einen transkriptionellen Aktivator (Mumm et al., 2000). Ein

Komplex aus CSL/Notch-IC/Koaktivator ist dann in der Lage, Zielgene wie Hairy and Enhancer of Split (HES-1) zu transaktivieren (Jarriault et al., 1998; Kuroda et al., 1999).

### **1.5.3 Rolle von Notch/Jagged1 in der Hämatopoese/Myelopoese**

Das Entschlüsseln von zellulären und molekularen Mechanismen, die für die Differenzierung und Selbsterneuerung von hämatopoetischen Vorläuferzellen verantwortlich sind, ist entscheidend für das Verständnis der Blutbildung. Trotz bemerkenswerter Fortschritte auf diesem Gebiet bleiben die molekularen Vorgänge, welche die Selbsterneuerung und weitere Differenzierung von Vorläuferzellen bestimmen, noch weitgehend unklar (Milner and Bigas, 1999; Orkin, 1995). Vieles spricht allerdings dafür, dass Notch-vermittelte zelluläre Interaktionen eine wichtige Rolle bei der Regulation in verschiedenen Stadien der Hämatopoese spielen. So bildete die Beobachtung, dass humanes Notch1 in hämatopoetischen CD34<sup>+</sup>-Vorläuferzellen des Knochenmarks exprimiert wird, die Grundlage für die Hypothese einer Notch-Funktion in der Hämatopoese (Milner et al., 1994). Später konnte auch eine Notch1-Expression in lymphoiden, myeloiden und erythroiden Vorläuferpopulationen, sowie in peripheren T- und B-Zellen, T-Zellen im Thymus, Monozyten und neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden (Milner and Bigas, 1999). Die Expression von DSL-Liganden im Knochenmark, in fötaler Leber und im Thymus (Jones et al., 1998; Li et al., 1998; Shawber et al., 1996; Varnum-Finney et al., 1998), sowie die Expression von Notch 2, -3 und -4 in hämatopoetischen Vorläuferzellen (Kojika and Griffin, 2001; Milner et al., 1996; Milner et al., 1994) lieferten weitere Hinweise für eine Beteiligung des Notch-Signalweges in der Hämatopoese. Insbesondere das Expressionsmuster von Jagged1 in der Leber während der Embryogenese legt eine regulatorische Funktion dieses Liganden bei der fötalen Hämatopoese nahe. Ein Modell sieht vor, dass die Expression von Notch1 die Proliferation von Vorläuferzellen stimuliert, die in Abhängigkeit von zusätzlichen Differenzierungsfaktoren weiter in Richtung lymphoide oder myeloide Reihe differenzieren (Varnum-Finney et al., 2000). Dennoch gibt es unterschiedliche und konträre Auffassungen über die Funktion von Notch in der Myelopoese. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Expression konstitutiv aktiver Formen von Notch die Differenzierung myeloider Vorläuferzellen inhibiert (Carlesso et al., 1999; Li et al., 1998; Milner and Bigas, 1999; Milner et al., 1996). Die inhibitorische Wirkung war abhängig vom Typ des Notch-Rezeptors und des verwendeten Zytokins. Während Notch1 die myeloische Differenzierung in Anwesenheit von G-CSF hemmte, hemmte Notch2 die myeloische Differenzierung in Gegenwart von GM-CSF (Bigas et al., 1998). Andere Berichte hingegen haben in *in vitro* Versuchen nachweisen können, dass Notch1 in Gegenwart von G-CSF die granulozytäre Reifung beschleunigt (Schroeder and Just, 2000; Tan-Pertel et al., 2000). Als

Hauptgründe für die doch widersprüchlich erscheinenden Ergebnisse werden Unterschiede in den jeweiligen Versuchsbedingungen, wie zum Beispiel die Verwendung unterschiedlicher myeloischer Vorläuferzelllinien bzw. der Einsatz verschiedener N1c-Konstrukte, diskutiert. Eine ambivalente Rolle scheinen auch die Notch-Rezeptor-Liganden Jagged und Delta in primären hämatopoetischen Vorläuferzellen einzunehmen. So werden Jagged1 und Delta1 über die Aktivierung des Notch1-Rezeptors von einigen Arbeitsgruppen als mögliche wachstumsfördernde Faktoren für hämatopoetische Stammzellen angesehen (Jones et al., 1998; Karanu et al., 2000; Karanu et al., 2001; Varnum-Finney et al., 1998), wohingegen in anderen Berichten eine Abnahme bei der Koloniebildung (Walker et al., 1999) oder eine beschleunigte Differenzierung zu beobachten war (Mizutani et al., 2000). Im Zusammenhang mit der Lymphopoese soll Notch1 auch die lymphoide Differenzierung fördern (Stier et al., 2002). Eine Fehlregulation der Notch-Rezeptoren und ihrer Liganden wurde im Zusammenhang mit der Entstehung hämatologischer Neoplasien beschrieben (Aster and Pear, 2001). Als Folge einer konstitutiven Notch-Expression (Bellavia et al., 2000; Pear et al., 1996) bzw. einer Translokation des für Notch1 kodierenden Genes soll es zur Ausbildung von T-Zell-Lymphomen kommen. Wie die Überexpression einzelner Notch-Rezeptoren, so kann auch die Überexpression der Notch-Rezeptor-Liganden zur Entdifferenzierung hämatopoetischer Zellen führen. Eine Überexpression des Liganden Delta-like 4 soll für die Induzierung von T-Zell-Lymphomen verantwortlich sein (Yan et al., 2001). Eine Zelllinie, die bei einem Patienten mit Myelodysplasie und akuter myeloischer Leukämie isoliert wurde, zeigte eine gesteigerte Proliferation nach Stimulation mit dem Notch-Liganden Delta-1 (Tohda et al., 2002). Aufgrund der embryonalen Letalität von Notch1 und Jagged1 defizienten Mäusen gestaltet es sich schwer, Veränderungen in der Myelopoese *in vivo* im Kontext mit dem Notch/Jagged-Signaltransduktionsweg zu untersuchen (Swiatek et al., 1994; Xue et al., 1999).



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Reagentien

**Acrylamid-Lösung, 30%** (Bio-Rad)

**Agarose** (Invitrogen)

**Bradford Protein Assay** (Bio-Rad)

**Bromphenolblau (50mg/ml)**

Bromphenolblau (Sigma)	0,15g
ddH <sub>2</sub> O	3ml

**BSA** (Bovine serum albumin, Sigma)

**Chloroform** (Sigma)

**D+-Puffer**

HEPES (Gibco)	20mM, pH 7,2
Glycerin (Roth)	20%
KCl (Merck)	100mM
EDTA (Merck)	0,5mM, pH 8,0
NF-40 (Roche)	0,25%
DTT (Roche)	2mM
PMSF (Sigma)	0,1mM

**Dithiothreitol 0,1 M (DTT)**

DTT (Roche)	309mg
DEPC-H <sub>2</sub> O	18ml
EDTA (Merck)	20µl
pH 6,0 einstellen, DEPC-H <sub>2</sub> O ad 20ml	

**DMSO** (Fluka)

**DNA-Fluoreszenzfarbstoff**

Propidiumjodid (Sigma)

**DNA-Standard 1kb-Ladder** (Gibco)

**DTT** (Roche)

**EDTA 0,5 M, pH 8,0**

EDTA (Merck)	186,1g EDTA
	ad. 1000ml ddH <sub>2</sub> O
	mit 5M NaOH auf pH 8,0 einstellen

**EF-Medium (embryonale Fibroblasten)**

DMEM (Gibco)	500ml
L-Glutamin (Gibco)	5ml
Penicillin/Streptomycin (100×), (Invitrogen)	5ml
2-Mercaptoethanol (100×), (Sigma)	500µl
FCS (Biochrom)	25ml

**Erythrozyten-Lysepuffer**  
Tris-Puffer 0,17 M (Sigma)

20,6g Tris in 900ml ddH<sub>2</sub>O lösen, auf pH 7,65  
einstellen, ddH<sub>2</sub>O ad 1000ml

Gebrauchslösung

8,3g NH<sub>4</sub>Cl in 1000ml ddH<sub>2</sub>O lösen, 111µl Tris-  
Puffer hinzugeben, auf pH 7,2 einstellen

**Ethanol** (Merck)

**Ethidiumbromid-Stammlösung 10mg/ml**  
(Sigma)

**5 × F-Puffer**

Ficoll 400 (Amersham) 20%  
HEPES (Gibco) 100mM, pH 7,2  
KCl (Merck) 300mM  
DTT (Roche) 10mM  
PMSF (Sigma) 0,1mM

**FACS-Puffer**

PBS 1%  
FCS (fetales Kälberserum)

**Formaldehyd-Ladepuffer**

EDTA 1mM, pH 8,0  
Bromphenolblau 0,25%  
Xylencyanol 0,25%  
Glycerol 50%

**Hepatozyten-Medium**

DMEM (Gibco) 500ml  
FCS 10%  
L-Glutamin (Invitrogen) 2mM  
1 × nichtessentielle Aminosäuren (Gibco)  
1 × Insulin-Transferrin (Gibco)  
Gentamycin (Invitrogen) 50µg/ml

**Hepatozytenverdaulösung** (Gibco)

**Hepatozytenwaschlösung** (Gibco)

**Keratinozyten-SFM-Medium** (Gibco)

**Kinasepuffer** (New England Biolabs)

**Knochenmark-Medium**

500ml

DMEM	10%
FCS	0,1M
2-Mercaptoethanol (Sigma)	2mM
L-Glutamin (Invitrogen)	50 µg/ml
Gentamycin (Invitrogen)	10ng
IL-7	10ng
IL-3	10ng
c-kit	3ng
GM-CSF	

**Luminol Reagent A+B (Santa Cruz)**

**Magnesiumchlorid (Merck)**

<b>Membranlysepuffer</b>	60,5mg
Trispuffer	101,5mg
MgCl <sub>2</sub> ×6H <sub>2</sub> O	0,5ml
Triton X-100	ddH <sub>2</sub> O ad 50ml, pH auf 7,5 einstellen
	Vor Anwendung die Proteaseinhibitoren PMSF(1mM), Aprotinin und Leupeptin (5µg/ml) zugeben

<b>Ammoniumpersulfat 1 %-ig</b>	1g
APS (Merck)	10ml
ddH <sub>2</sub> O	

**Novex Tris-Glycin SDS-Running Buffer (Invitrogen)**

**Novex Tris-Glycin Transfer Buffer (Invitrogen)**

<b>Oligonukleotide</b>	5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3'
sense NF-κB1 (Promega)	3'-TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G-5'
antisense NF-κB2 (Promega)	

<b>10×PBS (Phosphate Buffered Saline)</b>	1000ml
Für	2,76g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -2H <sub>2</sub> O	14,24g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -2H <sub>2</sub> O	76g
NaCl	1ml
DEPC-H <sub>2</sub> O	

<b>4% PFA/PBS (Paraformaldehyd)</b>	500ml
Für	20g
Paraformaldehyd	500ml, bei 70°C 4Std. lösen, auf pH 7,0 einstellen
1×PBS	

**Phenol/Chloroform-Lösung (Sigma)**

**PMA** (Sigma)

**Poly-[dIdC]** (Sigma)

**Primer für Genotypisierung**

CreI (K5Cre):

CreII (K5Cre):

gtype1 (TNFIII):

gtype2 (TNFIII):

gtype4 (TNFIII):

lox1:

lox2:

1loxP1:

1loxP2:

Mlys1 (LysMCre):

Mlys2 (LysMCre):

Cre8 (LysMCre):

RAG4 (RAG2):

RAG5 (RAG2):

RAG6 (RAG2):

RelAlox1:

RelAlox2:

RelAloxPneo:

**Primer für RT-PCR**

Bcl2:

Bcl-x<sub>L</sub>:

Cyclin D1:

G-CSFR:

5'-CGG TCG ATG CAA CGA GTG ATG AGG-3'

5'-CCA GAG ACG GAA ATC CAT CGC TCG-3'

5'-CGG GTC TCC GAC CTA GAG ATC-3'

5'-CCA CAA CAG GTG TGA CTG TCT C-3'

5'-CCA CTT GTC CAG TGC CTG CTC-3'

5'-GTG GAG TCA GAT GTA GCA CG-3'

5'-AGA AAG GGA TAA GCC ATG GAG-3'

5'-CAT ACT TCC AAG CAG AGA CGT-3'

5'-TAC GTT CGG AGT TTA AGA CTC-3'

5'-CTT GGG CTG CCA GAA TTT CTC-3'

5'-TTA CAG TCG GCC AGG CTG AC-3'

5'-CCC AGA AAT GCC AGA TTA CG-3'

5'-AGA CAC AAC GGC TTG CAA CAC AG-3'

5'-TGC CGA GAA AGT CCT TCT GCC AG-3'

5'-GTG GAA TGA GTG CGA GGC CAG A-3'

5'-GAG CGC ATG CCT AGC ACC AG-3'

5'-GTG CAC TGC ATG CGT GCA G-3'

5'-ACT GAA GCG GCC AGG ATG-3'

5'-GCG GAA TTC TCT TCA GGG ATG GGG  
TGA ACT-3'

5'-GCG AAG CTT CAG AGA CAG CCA GGA  
GAA ATC-3'

5'-GCG GAA TTC ACC GCG TAT CAG AGC  
TTT GAG-3'

5'-GCG AAG CTT AGG CTC TAG GTG GTC  
ATT CAG-3'

5'-TGG AGC CCC TGA AGA AGA G-3'

5'-AAG TGC GTT GTG CGG TAG C-3'

5'-ACA GGA GTG TGA ACT TCG CT-3'

5'-TTG CTT CTT CTG ACA CCA CG-3'

5'-AGC ACA GAA AGT CAT CAA AGC C-3'

HES1:	5'-TTC ATG CAC TCG CTG AAG CC-3'
	5'-GCA GAC AAG CTT AGT TGT GG-3'
IL-3R:	5'-TCT TAA CAT GGA GGC CGT TC-3'
	5'-TGC AGC TGT CAA TCA CTT CG-3'
Jagged1:	5'-CAG AAT GAC GCT TCC TGT CG-3'
	5'-ATG ACA CTG CTC GGC CGT CT-3'
LT- $\alpha$ :	5'-CTA CAG AGC GAA GGC TCC AAA-3'
	5'-CAT ATG CAG GGA CGT CGG CTT GAG-3'
LT- $\beta$ :	5'-GGA TCC CTG TCA CCC CAC CAT CAC-3'
	5'-CGC TTC TCC TTC TTC ACT GG-3'
MPO:	5'-CTG CCA TTG TCT TGG AAT CG-3'
	5'-CCA CTC GTT CTG ATT GTC GTC CAT-3'
Notch1:	5'-CAG AGA TCT CTG CAC CTC ATG TAC GTG-3'
	5'-GCG GAA TTC GCG ACA TGA AGG ACA GCA TCT-3'
PU.1:	5'-GCG AAG CTT GCT GAA CTG GTA GGT GAG CTT-3'
	5'-ATG AGC ACA GAA AGC ATG ATC-3'
TNF	5'-TAC AGG CTT GTC ACT CGA ATT-3'
	5'-GAC AGA GGC AAA CTG AGC ACC-3'
Tubulin:	5'-CAA CGT CAA GAC GGC CGT GTG-3'
<b>Proteinase K (10mg/ml)</b>	125mg
Proteinase K (Sigma)	3,125ml
DEPC-H <sub>2</sub> O	4Std. bei 37°C vorverdauen
<b>RNase A (10mg/ml)</b>	100mg
RNase A (Sigma)	10ml
DEPC-H <sub>2</sub> O	Bei -20°C lagern
<b>10 % SDS</b>	50g
SDS (Sigma)	ad. 500ml
ddH <sub>2</sub> O	
<b>6×SDS-Ladepuffer</b>	3,0ml
100% Glycerin (Roth)	7,0ml
	0,93g
	1g

4×Tris-Cl/SDS	1,2mg
DTT (Roche)	
SDS	
Bromphenolblau (Sigma)	242g
	57,1ml
<b>50×TAE-Stammlösung</b>	100ml
Tris	ad 1000ml
Eisessig	
0,5 M EDTA, pH 8,0	
ddH <sub>2</sub> O	108g
	55g
<b>10×TBE</b>	40ml
Tris	ad 1000ml
Borsäure (Roth)	
0,5 M EDTA, pH 8,0	
ddH <sub>2</sub> O	6,05g
	43,8g
<b>10×TBS</b>	pH 8,2 ad 1000ml
Tris-Base	
NaCl	
ddH <sub>2</sub> O	
	25ml
	0,5ml
<b>TBST</b>	ad 250ml
10×TBS	
Tween 20 (Fluka)	
ddH <sub>2</sub> O	5,0g
	50ml
<b>TBST/Milchpulver</b>	1ml
Milchpulver (Fluka)	ad. 500ml
10×TBS	
Tween 20	
ddH <sub>2</sub> O	15ml
	1:100 verdünnt
<b>TBST/Milchpulver/Primärantikörper</b>	
Milchpulver/TBST	
Primärantikörper	15ml
	1:2000 verdünnt
<b>TBST/Milchpulver/Sekundärantikörper</b>	
Milchpulver/TBST	
Sekundärantikörper	0,1M
	10mM
	ad 500ml, autoklavieren
<b>10×TE-Puffer</b>	
Tris-HCl, pH 8,0	
EDTA, pH 8,0	
ddH <sub>2</sub> O	
<b>TEMED (Sigma)</b>	
	20mM

<b>TNF-<math>\alpha</math></b> (Sigma)	0,35M
	20%
<b>Totex-Puffer</b>	1%
HEPES, pH 7,9	1mM
NaCl	0,5mM
Glycerol	0,1mM
NP-40	1mM
MgCl <sub>2</sub>	1mM, unmittelbar vor Anwendung hinzugeben
EDTA, pH 8,0	50mM
EGTA, pH 7,2	5mM
DTT	
PMSF	
NaF (Sigma)	121g
Na-Vanadat (Sigma)	ad 1000ml, auf pH 7,4 einstellen

### **1 M Tris-Cl**

Tris-Base (Sigma)  
ddH<sub>2</sub>O

### **Trizol** (Invitrogen)

<b>10×Trypsin-Lösung</b> (Sigma)	500 $\mu$ l
	50 $\mu$ l
<b>Verdaulösung</b>	25 $\mu$ l
TNE	7,5 $\mu$ l

10% SDS  
Pronase E  
Proteinase K

## **2.2 Antikörper:**

Antikörper für die Durchflußzytometrie:

FITC-anti-mouse CD45.1 (BD Pharmingen)  
R-PE anti-mouse CD45.1 (BD Pharmingen)  
FITC-anti-mouse Gr-1 (BD Pharmingen)  
PE-anti-mouse Gr-1 (BD Pharmingen)  
PE-anti-mouse Mac-1 (BD Pharmingen)  
PE-anti-mouse Ter-119 (BD Pharmingen)

Antikörper für Histologie/Immunhistologie:

PE-anti-mouse CD3  
FITC-anti-mouse F4/80  
FITC-anti-mouse Filagrin  
FITC-anti-mouse Gr-1  
anti-Jagged1 (R&D Systems)  
FITC-anti-mouse K5  
FITC-anti-mouse K6  
FITC-anti-mouse K10  
FITC-anti-mouse Loricrin

Western Blot:

- anti-mouse I $\kappa$ B- $\alpha$  (goat), (Santa Cruz)
- anti-goat IgM HRP-konjugiert, (Santa Cruz)
- anti- $\beta$ -Actin (mouse), (Sigma)
- anti-mouse IgG Sekundärantikörper, (Sigma)

Antikörper für Supershifts:

- anti-NF- $\kappa$ B p50 (Santa Cruz)
- anti-NF- $\kappa$ B p65 (Santa Cruz)

### 2.3 Molekularbiologische Kits

Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen)

PCR-Kit (Invitrogen)

- Taq-DNA-Polymerase (5U/ $\mu$ l)
- 10 $\times$ Reaktionspuffer
- 50 mM MgCl<sub>2</sub>
- 10 mM dNTPs

Reverse Transkription:

- SuperScript TM II (Invitrogen)
- 5 $\times$ Erst-Strang-Puffer (Invitrogen)
- 0,1 M DTT (Invitrogen)
- RNAsin 40U/ $\mu$ l (Promega)
- 10mM dNTPs (Invitrogen)
- Oligo (dT)12-18 (Invitrogen)

RNA-Aufreinigung:

- DNase I Amp Grade (Invitrogen)
- 10 $\times$ Reaktionspuffer (Invitrogen)
- 25mM EDTA, pH 8,0 (Invitrogen)

### 2.4 Verwendete Mäusestämme: *Ikba* <sup>$\Delta/\Delta$</sup> , *Ikba*<sup>K5 $\Delta$ /K5 $\Delta$</sup> , *Ikba*<sup>lck $\Delta$ /lck $\Delta$</sup> , *Ikba*<sup>my $\Delta$ /my $\Delta$</sup> , *RelA*<sup>K5 $\Delta$ /K5 $\Delta$</sup> und *Ikba* <sup>$\Delta/\Delta$</sup> *RelA*<sup>K5 $\Delta$ /K5 $\Delta$</sup> , *Rag2*<sup>-/-</sup>, TNF/LT $\Delta$ 3, *Tnfr1*<sup>-/-</sup>, *Tnf*<sup>-/-</sup>

In dieser Arbeit wurden Mäuse verwendet, bei denen *loxP*-Gensegmente in den *Ikba*-Lokus eingebaut wurden (man spricht auch von geflochtenen *Ikba* Mäusen). Diese Mäuse eignen sich für die ubiquitäre und gewebespezifische Deletion des *Ikba* Genes. Zur Erzeugung von *Ikba* <sup>$\Delta/\Delta$</sup> -Mäusen (*ikba*-Totalknockout) wurden Mäuse mit einem geflochtenen *Ikba* Allel (*Ikba*<sup>f/f</sup>) (Rupec et al., 2005) mit Deleter-Cre Mäusen verpaart (Schwenk et al., 1995). Für die Generierung der *Ikba*<sup>K5 $\Delta$ /K5 $\Delta$</sup> -, *Ikba*<sup>lck $\Delta$ /lck $\Delta$</sup> -, *Ikba*<sup>my $\Delta$ /my $\Delta$</sup>  Mäuse wurden *Ikba*<sup>f/f</sup> Mäuse mit transgenen Mäusen verpaart, bei denen die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines Keratinozyten-



spezifischen Keratin5-Promotors (*Ikba*<sup>K5Δ/K5Δ</sup>) (Tarutani et al., 1997), eines T-Zell-spezifischen *lck*-Promotors (*Ikba*<sup>lckΔ/lckΔ</sup>) (Hennet et al., 1995) bzw. eines Neutrophilen/Makrophagen-spezifischen LysM-Promotors (*Ikba*<sup>myΔ/myΔ</sup>) (Clausen et al., 1999), steht. Mäuse, die solche *loxP*-mutierten Gene besitzen, werden mit transgenen Mäusen verpaart, die das Gen der Cre-Rekombinase exprimieren. Dieses Gen unterliegt der Kontrolle eines gewebespezifischen oder induzierbaren Promotors. Wenn die Cre-Rekombinase aktiviert wird, schneidet das Enzym die DNA zwischen den eingefügten *loxP*-Stellen heraus und inaktiviert so das Gen oder das Exon. Um *Ikba*<sup>Δ/Δ</sup>*RelA*<sup>K5Δ/K5Δ</sup> Mäuse zu erhalten, wurden die Nachkommen einer *RelA*<sup>fl/fl</sup>-K5-*Cre2* Verpaarung mit *Ikba*<sup>Δ/Δ</sup> Mäusen verpaart. *Ikba*<sup>Δ/Δ</sup>*RAG2*<sup>-/-</sup>, *Ikba*<sup>Δ/Δ</sup>TNF/LTΔ3, *Ikba*<sup>Δ/Δ</sup>*Tnfr1*<sup>-/-</sup> und *Ikba*<sup>Δ/Δ</sup>*Tnf*<sup>-/-</sup> Mäuse wurden durch entsprechende Verpaarungen erhalten. Der genetische Hintergrund war für die *Ikba*<sup>fl/fl</sup>, *RelA*<sup>fl/fl</sup>, K5-*Cre2*, LysM-*Cre*, *lck-Cre*, *RAG2*<sup>-/-</sup>, *Tnfr1*<sup>-/-</sup>, *Tnf*<sup>-/-</sup> und TNF/LTΔ3 Mäuse C57BL/6.

## 2.5 Zucht der Mäuse

Zur Zucht wurde jeweils 1 Weibchen im gebärfähigen Alter (8-40 Wochen) mit einem Männchen (8-40 Wochen) zusammengesetzt. Die Nachkommen wurden im Alter von 3-7 Tagen durch PCR-Analyse der DNA aus Schwanzgewebe genotypisiert. Im Alter von 3 Wochen wurden die Jungtiere von den Elterntieren abgesetzt und nach Geschlechtern getrennt.

## 2.6 Genotypisierung der gezüchteten Mäusestämme mittels PCR

Für die Isolierung genomischer DNA wurden die Zellen aus Schwanzbiopsien mit Hilfe einer Verdauung (600µl pro Biopsat) aufgeschlossen. Die Inkubation der Biopsate erfolgte hierbei im Heizblock bei 56°C über Nacht.

Zur Beseitigung von proteinhaltigen Verunreinigungen in Nukleinsäurepräparationen wurde eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion angewandt. Hierbei handelt es sich um eine Mischung, die zu gleichen Teilen aus gepuffertem Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol (im Verhältnis 24:1) besteht. Die verdauten Schwanzbiopsien wurden jeweils mit 600µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol versetzt, gerührt und schließlich 10min bei 13.000Upm zentrifugiert, um so eine Phasentrennung vorzunehmen. Danach wurde die DNA enthaltende Phase abgezogen, in neue Tubes überführt und dann einer Ethanolpräzipitation unterzogen. Für die Fällung der DNA wurden 850µl 100%iges Ethanol eingesetzt. Die ausgefällte DNA wurde anschließend mit 70%igem Ethanol gewaschen, in 100µl TE-Puffer aufgenommen und bei 37°C gelöst. Die DNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

Die Messung der DNA/RNA-Konzentration erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260nm. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht eine OD260 von 1,0:

50µg/ml doppelsträngiger DANN

oder

40µg/ml einzelsträngiger RNA

Die Reinheit von DNA und RNA wurde aus dem Verhältnis OD260/OD280 abgeschätzt. Dieser Quotient sollte über 1,7 liegen.

Das Prinzip der PCR ist die selektive und hocheffiziente Anreicherung *in vitro* amplifizierter DNA von definierter Länge und Sequenz. In einem zyklischen Prozeß aus Denaturierung, Annealing und Elongation synthetisiert die thermostabile Taq-DNA-Polymerase in einem exponentiellen Reaktionsverlauf DNA-Fragmente, die von spezifischen Oligonukleotidprimern flankiert sind.

Die erwarteten Größen der PCR-Produkte betragen für das geflochte *Ikba* Allel 340 bp, für das Wildtyp Allel 250 bp und für das deletierte Allel 500 bp. Für das geflochte *RelA*-Allel wird eine Bandengröße von 294 bp, für das Wildtyp Allel eine Größe von 260 bp und für das deletierte Allel eine Bandengröße von 400 bp erwartet.

#### **PCR-Protokoll für die Genotypisierungen (Standard-Reaktionsansatz):**

DNA (500 ng)	1,0µl
Primer A (100 pmol/µl)	1,0µl
Primer B (100 pmol/µl)	1,0µl
(Primer C (100 pmol/µl)	1,0µl
10× PCR-Puffer	5µl
10mM dNTPs	2,5µl
50mM MgCl <sub>2</sub>	2,5µl
Taq-DNA-Polymerase(5U/µl)	1,0µl
H <sub>2</sub> O	35µl

#### **Amplifikationsbedingungen:**

- (1) Initiale Denaturierung
- (2) Denaturierung

- (3) Annealing
- (4) Polymerisation/Elongation
- (5) Finale Polymerisation

**Ikba  $\Delta$  Wildtyp, gefloxt, Ikba  $\Delta$  KO, RelA Wildtyp und RelA  $\Delta$ :**

(1) 94°C	(2) 94°C	(3) 61°C	(4) 72°	(5) 72°C	4°C
5min	1min	30sec	1min3sec	5min	24std

Anzahl der Zyklen (Wdh. der Schritte 2-4): 30

**TNF/LT $\Delta$ 3:**

(1) 94°C	(2) 94°C	(3) 63°C	(4) 72°C	(5) 72°C	4°C
5min	1min	1min	1min	5min	24std

Anzahl der Zyklen: 30

**LysMcre (Mlys1+Mlys2-Primer= Wildtyp; Mlys1+Cre8= cre):**

(1)94°C	(2)62°C	(3)72°C	(4)72°C	4°C
1min	1min	1min20sec	10min	24std

Anzahl der Zyklen: 35

**K5Cre:**

(1) 94°C	(2) 94°C	(3) 60°C	(4) 65°C	(5) 65°C	4°C
5min	30sec	40sec	1min30sec	5min	24std

Anzahl der Zyklen: 40

**RAG-2:**

(1) 94°C	(2) 63°C	(3) 72°C	(4) 72°C	4°C
20sec	1min	2min	10min	24std

Anzahl der Zyklen: 35

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der horizontalen Agarose-Gelelektrophorese. Basierend auf ihrer negativen Ladung sind Nukleinsäuren imstande, im elektrischen Feld zu wandern. Das Agarose-Gel wirkt dabei als molekulares Sieb, so dass eine Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Masse/Größe möglich ist. Eine Interkalation der Nukleinsäuren mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid läßt die DNA bzw. RNA im

UV-Licht sichtbar erscheinen. Ein DNA-Standard-Marker dient dem Größenvergleich der aufgetrennten DNA-Fragmente. 0,5-1g Agarose wurden in 50 ml 1×TAE aufgenommen ( $\cong$  1-2%-igem Agarosegel) und anschließend so lange im Mikrowellenherd aufgeschmolzen, bis die Agarose klar und schlierenfrei war. Elektrophorese-Laufbedingungen: 100-120V für 30-45 Minuten. Das Ergebnis der DNA-Auftrennung konnte nach einer 15-minütigen Färbung des Agarosegels in Ethidiumbromid (2 $\mu$ g/ml) mit Hilfe eines UV-Transilluminators (Gel Doc 2000, Bio-Rad) dokumentiert werden.

## 2.7 RT-PCR

Um RNA mit Hilfe der PCR zu vervielfältigen, hybridisiert man einen Primer an die RNA-Matrize und erstellt mittels der Reversen Transkriptase (RT) und einer anschließenden PCR eine cDNA-Kopie. Die RT-PCR ist eine Methode, mit der man ganz allgemein die Genexpression auf der Stufe der RNA untersuchen kann. Für das Umschreiben von RNA in cDNA wurden 2 $\mu$ g RNA eingesetzt.

Sämtliche Reagentien und Materialien müssen absolut RNase-frei sein. Die Gewebeproben wurden zunächst in PBS-Medium in einem Zellsieb homogenisiert. Die daraus resultierende Zellsuspension wurde bei 1.200U<sub>pm</sub> 5min zentrifugiert und das Pellet (5-10 $\times$ 10<sup>6</sup> Zellen) in 1ml Trizol-Lösung resuspendiert. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei RT wurden zum Überstand 0,2ml Chloroform hinzugefügt, 30sec gevortext und nochmals 5min bei RT stehen gelassen. Daran schloss sich eine erneute Zentrifugation an (5min bei 13.000 U<sub>pm</sub> 4°C). Aus der oberen wässrigen Phase (ca 0,5 ml) wurde mit 0,5ml 100%igem Isopropanol die RNA gefällt, 5min bei RT inkubiert und abzentrifugiert (10min bei 13.000U<sub>pm</sub>, 4°C). Das Pellet wurde mit 1ml 75%igem Ethanol gewaschen und 5min bei 7.500 U<sub>pm</sub> abzentrifugiert. Die RNA wurde kurz luftgetrocknet und in 60 $\mu$ l DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst. Gelagert wurde die RNA bei -80°C. Für die Quantifizierung der RNA wurden Verdünnungen von 1:100 hergestellt und vermessen (2.2.1.1.5).

Bevor die RNA in cDNA umgeschrieben wurde, erfolgte eine RNA-Aufreinigung, indem störende/kontaminierte DNA mit Hilfe der DNase I eliminiert wurde.

Folgender Reaktions-Mix wurde in einem RNase-freien, 1,5 ml Tube angesetzt (auf Eis):

- 2 $\mu$ g RNA
- 2 $\mu$ l 10× DNase I Reaktionspuffer

- 2µl DNase I, 1U/µl
- mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 20µl auffüllen

Es folgte eine 15-minütige Inkubation der Tubes bei Raumtemperatur. Eine Inaktivierung der DNase I wurde durch die Zugabe von 2µl 25mM EDTA-Lösung herbeigeführt. Anschließend wurde der Reaktions-Mix für 10min. bei 65°C erhitzt. Die RNA-Proben konnten nun für die Reverse Transkription verwendet werden.

In einem Reaktionsvolumen von 24µl wurden folgende Komponenten in ein nuklease-freies Tube gegeben:

- 2µg aufgereinigte RNA
- 2µl Oligo (dT)<sub>12-18</sub> (500µg/ml)
- 2µl 10mM dNTP

mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 24µl auffüllen.

Erhitzen des Reaktions-Mixes auf 65°C für 5min und dann sofort auf Eis stellen. Danach kurz zentrifugieren und

- 8µl 5× Erst-Strang-Puffer
- 4µl 0,1 M DTT
- 2µl RNAsin (40U/µl)

hinzufügen, den Inhalt des Tubes mischen und für 2min bei 42°C inkubieren. Anschließend wurden 2µl (200U) SuperScript<sup>TM</sup> II hinzugefügt, der Reaktionsansatz vorsichtig gemischt und schließlich für 50min bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch eine 15-minütige Erhitzung bei 70°C inaktiviert.

### **PCR-Bedingungen:**

- **MPO, G-CSF R, PU.1, Bcl2, Bcl-x<sub>L</sub>, IL-3 R:**

hot start (94°C, 2min)

35 Zyklen (94°C, 1min / 60°C, 1min / 72°C, 2min)

4°C, 24std

- **Notch1, Cyclin D1:**

2min 94°C, 35×(1min 94°C, 1min 50°C, 2min 72°C, 7min 72°, 4°C

- **TNF, LT- $\alpha$ :**

5min 94°C, 30×(1min30sec 94°C, 1min 55°C, 2min 72°C, 10min 72°, 4°C

- **LT- $\beta$ :**

5min 94°C, 29×(30sec 94°C, 45 sec 57°C, 2min 72°C, 10min 72°C, 4°C

- **Tubulin:**

2min 94°C, 35×(30sec 94°C, 45sec 55°C, 2min30sec 65°C, 7min 65°C, 4°C

## **2.8 Zellkultur**

### **2.8.1 CFUs**

Der Femur von 3-4 Tage alten Mäusen wurde mehrere Male mit eiskalter PBS-Lösung gespült und das Knochenmark durch ein Zellsieb gedrückt. Die Zellen wurden dann mehrfach mit Hanks-buffered salt solution (HBSS) gewaschen, bevor eine Trennung mittels eines Ficoll-Gradienten ( $d=1,077$ ) erfolgte. Die mononuklearen Zellen wurden gewaschen und 50.000 Zellen/2 ml Methylzellulose (MethoCult GF M3434, StemCell Technologies Inc.) in 6-well-Platten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden die Kolonien (CFU-M, CFU-G, CFU-GEMM) unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.

### **2.8.2 Hepatozyten-Kultivierung und Co-Kultivierung von Knochenmarkzellen**

Nach Entnahme der Leber aus 3 Tage alten Mäusen, wurde sie durch ein Zellsieb gedrückt, in Hepatozytenwaschlösung aufgenommen und 6min bei 500U zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 1ml Hepatozytenverdaulösung resuspendiert und 40min bei 37°C inkubiert. Nach erfolgter Hämolyse mit einem hypotonischen Puffer (Verdau wurde mit 1ml Waschlösung gestoppt) wurden die Zellen noch einmal gewaschen und in 1ml Hepatozyten-Medium aufgenommen. Jeweils 2 Mio. Hepatozytenzellen von *Ikba*<sup>+/+</sup> und *Ikba* <sup>$\Delta\Delta$</sup> -Mäusen wurden dann anschließend auf eine extrazelluläre Matrix (tebu-bio) ausgesät und über Nacht bei 37°C bebrütet.

Für die Co-Kultivierung wurden pro well 2 Mio. *Ikba*<sup>+/+</sup> Primärknochenmarkszellen auf 2 Mio *Ikba*<sup>+/+</sup> bzw. *Ikba* <sup>$\Delta\Delta$</sup>  Hepatozyten, 3T3-Zellen, oder Jagged1-exprimierende 3T3-Zellen ausplattiert. Nach einer Kultivierungszeit von einer Woche in 3ml DMEM-Medium, welches mit 10 %-igem FCS, L-Glutamin, Gentamycin, 2-Mercaptoethanol, IL-7, IL-3, GM-CSF und SCF versetzt war, wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und 50.000 Zellen in 2 ml Methylzellulose (mit SCF, IL-7, IL-, GM-CSF) passagiert und bei 37°C

und 6 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten wurde die Anzahl der Kolonien (> 50 Zellen/Klon) gemäß ihrer Morphologie und Größe bestimmt. Zur Inhibition dieser Experimente wurde 0,5 mg/ml Jagged 1-Antikörper bzw. IκBα-Antikörper als Kontrollantikörper zum Kulturmedium hinzugefügt.

Primäre Maus-Stromazellen wurden erhalten, indem die Femures getöteter Mäuse durch ein 100µm Nylonzellsieb gedrückt wurden. Diese Zellen wurden zunächst mit Jagged1-transfizierten 3T3-Zellen und auf Kontroll 3T3-Zellen kultiviert, und zwar in einem DMEM-Medium (GIBCO/BRL), welches mit 10% FCS (Biochrom KG), 2mM L-Glutamin (GIBCO/BRL), 1×nicht-essentielle Aminosäuren (GIBCO/BRL), 0,1mM 2-Mercaptoethanol (GIBCO/BRL), und 50µg/ml Gentamycin (GIBCO/BRL) versetzt war. Danach erfolgte ein Transfer auf Methylzellulose.

### **2.8.3 Isolierung und Kultivierung von Keratinozyten**

Die Haut von 3-7 Tage alten Mäusen wurde zunächst mit Jodobac und Ethanol desinfiziert und anschließend mit PBS gewaschen. Nachfolgend wurde die Haut in eine Antibiotika/Antimykotika-Lösung (GibCo), welche 1:100 in PBS (ohne Calcium und Magnesium) verdünnt war, für einige Minuten transferriert. Mit der dermalen Seite nach unten wurde die Haut in 2,5%iger Trypsin/PBS/EDTA-Lösung bei 4°C über Nacht eingelegt. Die Epidermis konnte dann mit einer Pinzette von der Dermis abgezogen werden. Mit einem Skalpell wurde die Epidermis in kleinste Fragmente geschnitten und in 1,5ml DMEM bzw. Keratinozytenmedium (Gibco) resuspendiert und 30min bei RT und 1000Upm zentrifugiert. Ausplattiert wurde die epidermale Zellsuspension auf kollagenbeschichteten Petrischalen. Feeder-Zellen, die zuvor mit Mitomycin (4µg/ml) behandelt worden waren und für 2std bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert worden waren, wurden mit 1×PBS/EDTA gewaschen und trypsinisiert. Die Feeder-Zellen konnten nun in DMEM bzw. Keratinozytenmedium resuspendiert werden und zu den Keratinozytenkulturen hinzugefügt werden. Bebrütet wurden die Zellen bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>. Für die Erstellung eines Proliferationsassays wurden jeweils 30.000 Zellen (Ausgangszellpopulation) in 6-well-Kollagenplatten ausgesät und bis zu 7 Tagen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Für die Zellzahlbestimmung wurden die Zellen täglich mit jeweils 1ml Trypsin/EDTA-Lösung von ihrer Unterlage abgelöst, 5min bei 1.200Upm abzentrifugiert und in etwas Keratinozytenmedium resuspendiert. Ein Teil dieser Keratinozytensuspension wurde mit einer Trypanblau-Lösung 1:3 verdünnt. Für die Auswertung dieses Proliferationsassays wurden nur lebende Zellen berücksichtigt.

## **2.9 Proteinanalytische Verfahren**

### **2.9.1 Proteinisolierung aus Mausgewebe**

Zunächst wurden die Zellen (Keratinozyten, Thymozyten, Gr-1/Mac-1-Granulozyten) mit PBS-Medium gewaschen und anschließend für 30min bei 4°C in 50µl Membranlysepuffer aufgenommen und resuspendiert, um so eine Zellyse hervorzurufen. Die unlöslichen Bestandteile wurden dann bei 12.000Upm und 4°C für 15min abzentrifugiert. Der Überstand (Proteinextrakt) wurde in neue Röhrchen überführt und bei -80°C gelagert. Für die Quantifizierung der Proteine wurden Verdünnungen von 1:50 hergestellt und vermessen.

### **2.9.2 Western-Blot-Analyse**

Der Farbstoff Coomassie Blau liegt in saurer Lösung in der braunen Leukoform vor und wird durch die Bindung an positiv geladene Aminogruppen von Proteinen in einen blauen Farbstoff überführt. Durch Messung der Extinktion einer Probenlösung bei 595nm läßt sich über eine BSA-Eichkurve die Konzentration einer Proteinlösung bestimmen.

Die Proteinkonzentration wurde mit dem Bio-Rad Protein Assay gemäß dem Protokoll des Herstellers bestimmt.

Mittels der Western Blot Analyse können spezifische Proteine in Zell- und Gewebeextrakten nachgewiesen werden. Die Proteinproben werden durch vertikale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend vom Gel auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert (geblottet). Die Proteine können durch die spezifische Bindung primärer Antikörper, an welche sich wiederum enzymgekoppelte Sekundärantikörper (HRP-konjugiert: Horseradish Peroxidase) binden, durch anschließende Chemiluminiszenzreaktion detektiert werden.

Für die Polyacrylamid-Elektrophorese wurden pro Ansatz 15µg Protein mit 6×SDS-Ladepuffer versetzt und für 5min bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in 1,0mm dicken Fertiggelen (12%ig) bei 40mA für 1std30min. Der Gellauf war beendet, nachdem das Bromphenolblau den unteren Rand des Trenngels erreicht hatte.

Mit Hilfe der Semidrytechnik konnten in einer Blottingkammer die im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden. Hierzu wurden die Blotting-Pads, die Filterpapiere, die Membran und das Trenngel in Transferpuffer getränkt und wie folgt luftblasenfrei in der Blotting-Apparatur aufeinandergelegt:

- 2 Blotting-Pads



- 1 Filterpapier (Whatman-Papier)
- Trenngel
- Nitrozellulose-Membran
- 1 Filterpapier
- 2 Blotting-Pads

Es wurde dann für 1std bei 170mA geblottet.

Die auf eine Nitrozellulosemembran transferierten Proteine wurden für 1h mit Blockierungs-Lösung unter ständigem Schütteln bei RT inkubiert, um so unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Danach schlossen sich 3 Waschschrte mit TBST für jeweils 5min an. Im Anschluß daran wurde die Membran mit einem unkonjugierten Primärantikörper für 1std30min bei RT inkubiert. Nach 3 je fünfminütigen Waschschrten mit TBST wurde die Membran mit einem Meerrettichperoxidase- (horseradish peroxidase, HRP) konjugierten Sekundärantikörper in Milchpulver-TBST-Lösung für 1std bei RT inkubiert. Das Entfernen von überschüssigem Antikörper erfolgte durch erneutes dreimaliges Waschen mit TBST für jeweils 5min. Zur Detektion der HRP-markierten Proteine wurde ein Chemiluminiszenzverfahren (Luminol, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) gemäß den Angaben des Herstellers angewandt. Die Exposition erfolgte auf einem Kodak X-Omat-Röntgenfilm.

## 2.10 Gelretardationsassay

Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass DNA /Proteinkomplexe in einer Gelelektrophorese langsamer wandern als freie radioaktiv markierte DNA. Pro Ansatz wurden 50.000-100.000 Zellen in Totex-Puffer für 30min bei 4°C lysiert. Für den EMSA-Mix wurden jeweils 10µg Protein mit 2µl BSA (20µg/µl), 2µl dIdC (1µg/µl), 4µl 5 × F-Puffer, 2µl D+-Puffer und 20.000 cpm des <sup>32</sup>P-markierten NF-κB Oligonukleotids vermischt und mit ddH<sub>2</sub>O auf 20µl aufgefüllt. Die Inkubation dieses Gemisches erfolgte bei RT für 25min. Die Markierung des Oligonukleotids erfolgte mittels eines T4-Polynukleotidkinasekits (New England Biolabs) gemäß den Angaben des Herstellers. Die Auftrennung erfolgte über ein 4%-iges Acrylamidgel (60ml ddH<sub>2</sub>O, 10ml Acrylamid 30%, 3ml 10×TBE-Puffer, 400µl APS als Radikalstarter sowie 40µl TEMED als Radikalstabilisator) in 0,5×TBE bei 20mA. Anschließend folgte eine Vakuum-Trocknung des Gels für 1Std bei 80°C sowie seine Exponierung auf einem Kodak-Röntgenfilm bei -80°C.

Für Supershift-Experimente wurden 5µg Protein mit 2µl Antikörper (Santa Cruz Biotechnology) in einer Konzentration von 200µg/ml für 30min bei 4°C vor Zugabe des EMSA-Mix inkubiert.

## 2.11 Durchflußzytometrie (FACS) und Zellsortierung

Die Durchflußzytometrie (im Englischen Fluorescence Activated Cell Sorting [FACS]) ermöglicht das Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Zellen in einem Flüssigkeitsstrom. Eine Hauptanwendung besteht darin, mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff markierten Proben (z.B Antikörper) den Zellzyklus, die Vitalität oder die Expression von intra- bzw. zellmembrangebundenen Proteinen zu analysieren.

Auswahl von Absorptions- und Emissionsmaxima von den in dieser Arbeit eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffen:

<b>Fluorochrom</b>	<b>Absorptionsmaximum [nm]</b>	<b>Emissionsmaximum [nm]</b>	<b>Abkürzung</b>
Fluoreszeinisothiozyanat	495	519	FITC
Phycoerythrin	480;565	578	PE
Propidiumjodid	550	650	PI

### 2.11.1 Verarbeitung von Organen für die FACS-Färbung

Die Organe (Milz, Knochenmark, Leber) wurden nach der Entnahme in 4ml EF-Medium bei 4°C gelagert. Diese wurden dann in einem Zellsieb mit einem Spritzenkolben zerdrückt und die daraus resultierende Zellsuspension durch Auf- und Abpipettieren gut resuspendiert. Die Zellsuspension wurde für 5min bei 1.200Upm zentrifugiert und der Überstand anschließend abgesaugt. Das verbleibende Zellsediment wurde mit 3ml Lyse-Puffer resuspendiert. Die Lyse wurde durch die Zugabe von 3ml EF-Medium unterbrochen. Erneut schloß sich eine Zentrifugation für 5min bei 1.200Upm an. Wiederum wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in etwas EF-Medium aufgenommen und für die FACS-Färbungen gleichmäßig in Eppendorf Röhrchen verteilt. Nach einer erneuten Zentrifugation für 5min bei 3.400Upm wurde der Überstand abgenommen und die Zellen ( $1 \times 10^6$ ) 5min mit 10µl Fc-Blocklösung (anti-CD16/anti-CD32, Pharmingen) behandelt. Gefärbt wurden die Zellen mit den dafür vorgesehenen Maus-Antikörpern (30µl; 1:100 verdünnt in FACS-Puffer) für 30min bei 4°C. Nach Hinzufügen von 150µl FACS-Puffer (PBS/1% FCS) erfolgte eine 5minütige Zentrifugation bei 1.500Upm. Anschließend wurden die Zellen noch zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und am FACSCalibur-Gerät (Becton Dickinson) eingelesen. Lebende Zellen bestimmt durch Forward und Side Scatter Profile wurden mit Hilfe der CellQuest Software analysiert.

Für den Zell-Sort (Granulozyten-Sort) wurden die gefärbten Zellen (Gr-1-PE 1:200 verdünnt; CD11b-FITC 1:300 verdünnt) in reinem FCS aufgenommen. Gesortet wurde mit einem MoFlo Sorter (Cytomation).

### 2.11.2 Apoptose-Nachweis

Der Apoptose-Nachweis wurde mit einem Annexin V/7AAD Kit (Roche) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

### 2.11.3 DNA-Färbung mit Propidiumiodid (Zellzyklus-Analyse)

Als DNA-Fluoreszenzfarbstoff wurde PI verwendet. Das Absorptionsmaximum von PI liegt bei 550nm, das Emissionsmaximum bei 650nm. In dieser Arbeit wurde die PI-Fluoreszenz immer im FL3-Kanal detektiert. Das polare Fluorochrom PI dringt durch die vorher mit 70%igem Methanol permeabilisierte Membran in die Zelle ein und interkaliert stöchiometrisch zwischen den Basen der doppelsträngigen Nukleinsäuren. Die resultierende Fluoreszenz ist proportional zum DNA-Gehalt und kann so zur DNA-Quantifizierung und zur Zellzyklus-Analyse verwendet werden.

Proliferierende Zellen durchlaufen nacheinander folgende Stadien des Zellzyklus: G1 (gap1, Ruhephase), S (synthesis, DNA-Synthese) und G2/M (gap2/mitosis, Mitose), erneut gefolgt von G1. In der G1-Phase besitzen die Zellen einen einfachen DNA-Gehalt, im Verlaufe der S-Phase wird dieser verdoppelt und in der G2/M-Phase liegt der doppelte DNA-Gehalt vor. Anschließend halbiert sich dieser wiederum bei der Zellteilung auf den einfachen Wert. Für die Zellzyklusanalyse wurden Gr-1 gefärbte Zellen aus dem Knochenmark von 5-Tage alten *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> und Wildtyp Mäusen mit 1ml 70%igem Methanol über Nacht fixiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 425μl PBS aufgenommen (1x10<sup>6</sup> Zellen pro Färbeansatz). Daraufhin wurden 50μl RNase (1mg/ml, Sigma) zugegeben und 20min bei 37°C inkubiert. Vor der FACS-Analyse wurden dann noch 25μl PI (1mg/ml) hinzugefügt. Zur Berechnung der prozentualen Anteile der Zellzyklusphasen wurden die Flächen unter den Kurven des DNA-Histogramms integriert.

## 2.12 Hauttransplantationen

Die Haut von *Ikba*<sup>+/+</sup>, *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> und *Ikba*<sup>K5Δ/K5Δ</sup> Mäusen wurde auf *Rag2*<sup>-/-</sup> Mäuse transplantiert. Die *Rag2*<sup>-/-</sup> Mäuse wurden zunächst mit 180μl Narkosemittel (375μl Rompun 2%, 3ml Ketavet und 6ml PBS) narkotisiert und auf dem Rücken und der Brustkorbbregion großflächig enthaart. Dann wurde ein ca. 1cm<sup>2</sup> großes Hautstück auf der Rückenseite herausgeschnitten, mit

dem Transplantat gedeckt und mit Pflaster und Leukoplast verbunden. Nach vier Wochen wurden die Mäuse getötet und die Transplantate histologisch untersucht.

## **2.13 Histologie und Immunhistologie**

### **2.13.1 HE-Färbungen**

Leber- und Hautproben wurden in 4%igem Formaldehyd für 24Std fixiert, in Paraffin eingebettet und 5µm dicke Schnitte angefertigt und schließlich einer HE-Färbung unterzogen. Die Präparate wurden 1-3min in Harrys Hämatoxylin (Sigma) eingetaucht und kurz in ddH<sub>2</sub>O gespült.

Danach folgten Inkubationen in:

- 30%iges Ethanol für 30sec
- 70%iges Ethanol für 30sec
- Eosin für 5-15sec (Eosin Y Solution, Sigma)
- 70%iges Ethanol für 30sec
- 90%iges Ethanol für 30sec
- 100%iges Ethanol für 1min
- Xylol für 1min (Sigma)

Ein Tropfen Einschlußmittel (Corbit-Balsam) wurde auf die Objektträger gegeben und mit einem Deckglas die Schnitte luftblasenfrei abgedeckt. Die Präparate konnten dann mikroskopisch ausgewertet werden.

### **2.13.2 Histologie von Knochenmark, Leber und peripherem Blut**

Für die histologische Färbung des Knochenmarks wurde der Femur von getöteten Mäusen entfernt und dieser für 24std in 4%igem Formaldehyd fixiert. Danach wurde der gesamte Femur in Paraffin eingebettet und davon 5µm dicke Schnitte angefertigt. Diese Schnitte wurden dann mit Wright-Giemsa, Period-Schiff Acid Solution, HE, Elastica-van-Gieson und Prussian Blau gefärbt. Die Leber wurde in 4%igem Formaldehyd/PBS fixiert, in Paraffin eingebettet, geschnitten und ebenfalls HE gefärbt. Zur Bestimmung der Anzahl hämatopoetischer Kolonien wurde ein bestimmter Teil des Hepatozytengewebes ausgewählt und unter 200facher Vergrößerung fotografiert. Im Zentrum des Bildes wurden acht Gebiete von 1.250 mm<sup>2</sup> zufällig ausgewählt und mit Hilfe der Zeiss Axio Vision 4.1 Software aufgenommen. Anschließend wurden die Kolonien gezählt. Für die Evaluierung der Zytologie und der Zellzahl wurden Ausstriche von peripherem Blut mit Wright-Giemsa gefärbt.

### 2.13.3 CAE (Chloracetat-Esterase-Färbung)

Die CAE-Färbung an der Leber von 3 und 5 Tage alten Mäusen wurde nach einem Standardprotokoll in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Priv.-Doz. Dr. R. Huss am Institut für Pathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. CAE-positive Zellen wurden in der gleichen Weise wie unter 2.13.2 unter 400facher Vergrößerung untersucht.

### 2.13.4 Immunhistochemie

Für die Gefrierschnitte wurden Hautproben vom Rücken der Mäuse entnommen, in 2-Methylbutan (Merck) gekühlt und dann in OCT Tissue Tec Medium (Miles Inc.) eingebettet. 5µm dicke Schnitte wurden an einem Kryotom (Leica) angefertigt, in 4%igem PBS fixiert und mit Wasser gespült. Antikörper gegen CD31 und CD54 (R&D-Systems) wurden zusammen mit dem Biotin/Streptavidin Detektionssystem (Vektor Systems) verwendet (siehe 2.14.3).

Für die Färbungen inflammatorischer und proliferierender Zellen wurden folgende monoklonale Antikörper von der Ratte auf diese Gefrierschnitte gebracht: anti-CD3 und anti-CD8 (beide 1:1000 verdünnt; Chemicon), anti-CD4 (1:50; BD Bioscience Pharmingen), Ki67 (1:50; clone TEC-3, Dako). Nach dem Waschen in PBS wurden die Schnitte mit einem anti-Ratten Alexa 488 gekoppelten IgG (Molecular Probes) und Propidiumjodid inkubiert, welche in normalem Mausserum gelöst waren. Nach dem Waschen der Schnitte wurden sie in 4%igem Paraformaldehyd fixiert und in Gelvatol eingedeckt. Die Fluoreszenzfärbungen wurden an einem Leica TCS konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop bei einer Wellenlängenanregung von 488 und 543nm analysiert. Für die Färbungen der Haut mit den Antikörpern K5, K6, K10, Loricrin und Filaggrin wurden 6-8µm dicke Hautschnitte 30min bei 4°C in 4%igem Paraformaldehyd fixiert und danach für 10min unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Daran schlossen sich zwei fünfminütige Waschschrte mit TBS an. Die Schnitte wurden dann jeweils mit den dafür vorgesehenen Antikörpern für 1std in feuchter Kammer überschichtet: Wiederum wurden die Schnitte zweimal 5min in TBS gewaschen und die K5, K6 und Loricrin behandelten Schnitte wurden für 20min mit ToPro gefärbt, während die K10 und Filaggrin gefärbten Schnitte 20min mit Phalloidin behandelt wurden. Nach zwei 5minütigen Waschschrten mit TBS erfolgte eine Gegenfärbung mit Phalloidin bzw. ToPro. Erneut wurden die Schnitte in TBS gewaschen und schließlich mit Eindeckmedium und DAPI eingedeckt. Die Lebern (von *Ikba*<sup>Δ/Δ</sup> und *Ikba*<sup>+/+</sup> Mäusen) wurden zunächst in 2-Methylbutan (Merck), welches in Flüssigstickstoff vorgekühlt wurde, gefroren und anschließend in OCT Tissue Tec Medium (Miles Inc.) eingebettet. Davon wurden dann an einem Kryotom (Leica) 5µm dicke

Schnitte angefertigt. Die Gefrierschnitte wurden dann in 4%igem Paraformaldehyd/PBS fixiert und einmal mit ddH<sub>2</sub>O und zweimal in Tris-Puffer gespült. Um unspezifische Bindungsstellen abzublocken, wurde eine 20minütige Inkubation in einem ABC-System Blockkit (Avidin-Biotin-Block, DAKO) und eine 10minütige Inkubation in einem Avidin-Biotin-Blockkit (DAKO) angewandt. Nach zweimaligem Spülen der Objektträger in Tris-Puffer für jeweils 5min wurden diese mit anti-Jagged1 Antikörper (R&D-Systems, 1:10.000) für 1std bei RT inkubiert und nochmals zweimal für 5min in Tris-Puffer gewaschen. Biotin (Vector-Systems) wurde hinzugefügt und nochmals für 30min inkubiert. Diesem Inkubationsschritt folgten zwei Waschschrte in Tris-Puffer und dann eine Inkubation in Streptavidin (Vector-Systems) für weitere 30min. Nach zwei erneuten Waschschrten in Tris-Puffer, wurden die Schnitte 15min mit AEC (Sigma) behandelt, solange bis die gewünschte Farbintensität zum Vorschein kam. Nach einem Waschschrte in H<sub>2</sub>O wurden die Schnitte für 20-30sec in Hämatoxylin (Vector) gegengefärbt und schließlich in H<sub>2</sub>O gewaschen und mit Aquatex (Merck) bedeckt.

### **2.13.5 ELISA**

Ein ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ist ein serologischer Test, bei dem man gebundene Antigene oder Antikörper mit Hilfe eines gekoppelten Enzyms, das eine farblose Substanz in ein farbiges Produkt umwandelt, nachweist.

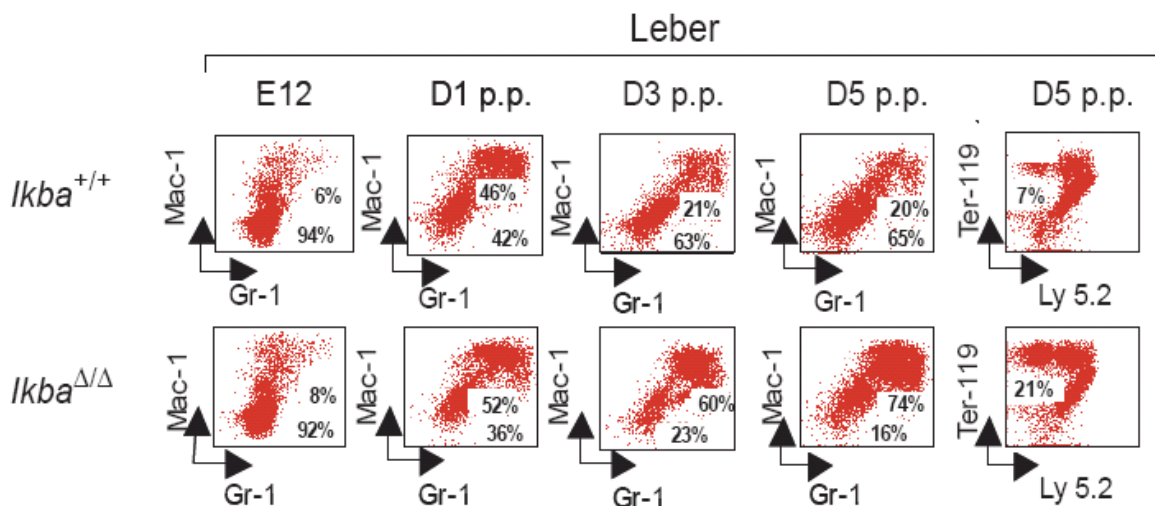
Für die Bestimmung des TNF-Spiegels im murinen Serum wurde ein ELISA-Kit (Quantikine, R&D-Systems) verwendet und gemäß den Instruktionen des Herstellers verfahren.

### 3. Ergebnisse

#### Teil I Myeloopoese

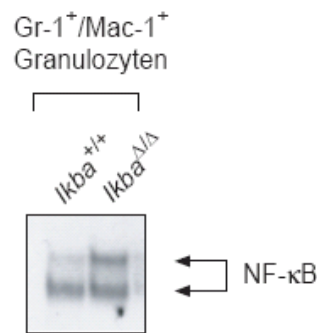
##### 3.1 Fehlregulierte Myeloopoese in $Ikba^{\Delta/\Delta}$ Mäusen

Schon frühere histologische und durchflußzytometrische Studien des Knochenmarks und der Milz zeigten eine signifikant erhöhte Anzahl von granulozytären Vorläuferzellen in  $IkB\alpha$ -defizienten ( $Ikba^{-/-}$ ) Mäusen (Beg et al., 1995). Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Ursache der veränderten Myeloopoese mit Hilfe konditionaler  $IkB\alpha$ -Knockout Mäuse genauer charakterisiert werden. Zunächst wurden Mäuse, bei denen das für  $IkB\alpha$  kodierende Gen  $Ikba$  mit  $loxP$  Boxen markiert worden war  $Ikba^{lox/lox}$  ( $Ikba^{f/f}$ ) mit sogenannten Deleter-Cre Mäusen (Schwenk et al., 1995) verpaart. Bei homozygoten Nachkommen,  $Ikba^{\Delta/\Delta}$ , ist  $IkB\alpha$  ubiquitär deletiert.  $Ikba^{\Delta/\Delta}$  Mäuse wurden in der nach Mendel zu erwartenden Häufigkeit geboren. Die durchflußzytometrische Untersuchung der Leber von  $Ikba^{\Delta/\Delta}$  Mäusen zeigte, dass der Anteil  $Gr-1^+$ / $Mac-1^+$ -positiver Granulozyten in der Leber 12 Tage alter Embryonen E12 zwischen  $Ikba^{\Delta/\Delta}$  Mäusen und Wildtyp Mäusen vergleichbar groß ist. Während der Anteil  $Gr-1^+$ / $Mac-1^+$ -positiver Granulozyten in Wildtyp Mäusen kurzfristig ansteigt, um dann wieder auf einen Anteil von 7% zu fallen, fällt der Anstieg in  $Ikba^{\Delta/\Delta}$  Mäusen deutlich höher aus und der Anteil bleibt auch bis zum 5. Tag post partum höher als bei Wildtyp Mäusen (Abb. 2).



**Abb. 2** Durchflußzytometrische Analysen von  $Gr-1^+$ / $Mac-1^+$  gefärbten Granulozyten der Leber, beginnend vom embryonalen Tag 12 (E12) bis zu 5-Tage alten Wildtyp und  $Ikba^{\Delta/\Delta}$  Mäusen, zeigen eine erhöhte  $Gr-1^+$ / $Mac-1^+$ -Population in den  $Ikba^{\Delta/\Delta}$  Mäusen ab dem Tag 3 p.p. im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen.

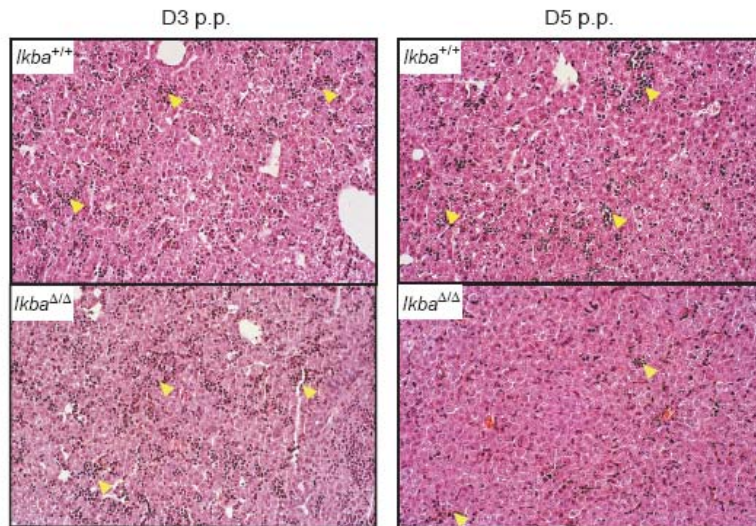
Um zu untersuchen, ob die Defizienz von I $\kappa$ B $\alpha$  die NF- $\kappa$ B-Aktivierung in den Gr-1<sup>+</sup>/Mac-1<sup>+</sup>-Granulozyten beeinflusst, wurden Gelretardationsassays durchgeführt. Hierfür wurden aus Lebern von *Ikba* <sup>$\Delta\Delta$</sup>  und Wildtyp Mäusen Gr1<sup>+</sup>/Mac-1<sup>+</sup> Zellen mit Hilfe eines Cell Sorters isoliert. Aus diesen primären Gr-1<sup>+</sup>/Mac-1<sup>+</sup>-Granulozyten wurden die Proteine extrahiert und mit einem <sup>32</sup>P radioaktiv markierten Oligonukleotid mit einer NF- $\kappa$ B Konsensus-Bindestelle inkubiert. Im Vergleich zu den Gr-1<sup>+</sup>/Mac-1<sup>+</sup>-Granulozyten der Wildtyp Mäuse zeigten die Gr-1<sup>+</sup>/Mac-1<sup>+</sup> Zellen der *Ikba* <sup>$\Delta\Delta$</sup>  Mäuse eine konstitutive NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität, womit gezeigt wurde, dass eine funktionelle Inaktivierung von I $\kappa$ B $\alpha$  in neutrophilen Granulozyten eine konstitutive NF- $\kappa$ B Aktivierung zur Folge hat (Abb. 3).



**Abb. 3** EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) von gesorteten primären Gr-1<sup>+</sup>/Mac-1<sup>+</sup>-Granulozyten von 5-Tage alten Wildtyp und *Ikba* <sup>$\Delta\Delta$</sup>  Mäusen. Ein radioaktiv markiertes NF- $\kappa$ B Konsensus Oligonukleotid wurde als Bindungssonde benutzt. Die spezifische NF- $\kappa$ B Bande ist durch einen Pfeil angezeigt.

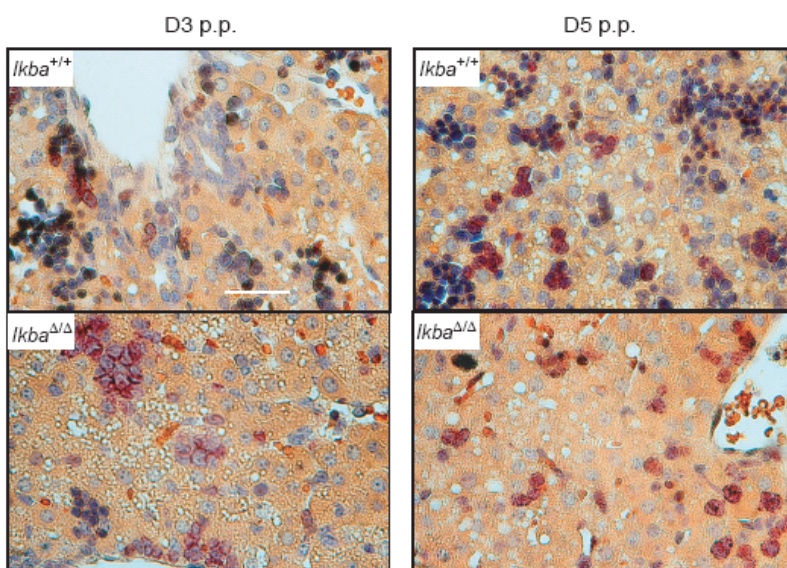
Während der Anteil an Nestern fötaler Hämatopoese zwischen 3-Tage alten Wildtyp und *Ikba* <sup>$\Delta\Delta$</sup>  Mäusen vergleichbar war der Anteil an Nestern fötaler Hämatopoese in 5-Tage alten *Ikba* <sup>$\Delta\Delta$</sup>  Mäusen deutlich geringer im Vergleich zu gleich alten Wildtyp Mäusen (Abb. 4). Bei 5-Tage alten Mäusen konnten durchschnittlich 4,5 Kolonien/1250  $\mu$ m<sup>2</sup> gezählt werden, während bei den *Ikba* <sup>$\Delta\Delta$</sup>  Mäusen 2,5/1.250  $\mu$ m<sup>2</sup> gezählt werden konnten.





**Abb. 4** Hämatopoese (Pfeile) ist bei 5-Tage alten *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> Mäusen (rechts) im Vergleich zu den 3-Tage alten *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> Mäusen und Wildtyp Mäusen (links) signifikant reduziert.

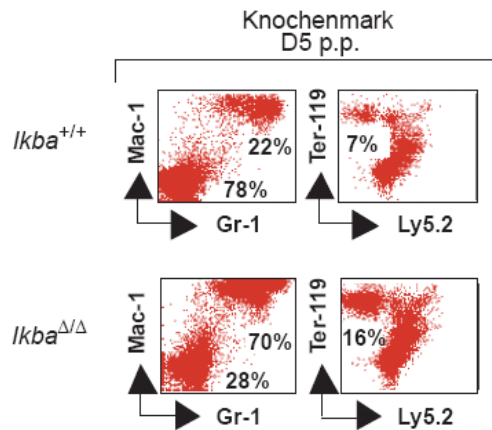
Um den Anteil an neutrophilen Granulozyten untersuchen zu können, wurden eine Färbung der Leber mit Chloracetat-Esterase (CAE), einem myeloischen Marker, durchgeführt. Hier zeigte sich ein deutlich erhöhter Anteil neutrophiler Granulozyten in den Lebern von 3- und 5-Tage alten *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> Mäusen im Vergleich zu altersentsprechenden Wildtyp Mäusen. (Abb. 5). Konnten in den Lebern von Wildtyp Mäusen durchschnittlich 42/1250  $\mu\text{m}^2$  CAE-positive Zellen gezählt werden, waren das bei *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> Mäusen durchschnittlich 64/1250  $\mu\text{m}^2$  CAE-positive Zellen.



**Abb. 5** Leber von 3- (linke Spalte) und 5-Tage alten (rechte Spalte) *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> Mäusen (untere Spalte) zeigen im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen (obere Spalte) einen erhöhten Anteil CAE-positiver Zellen.

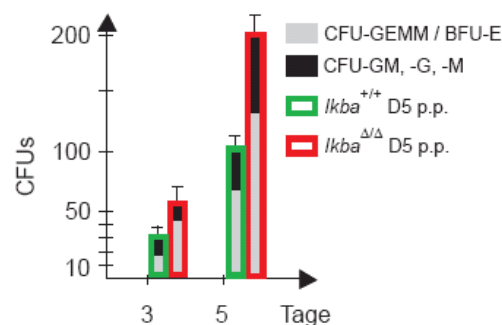
### 3.2 Neugeborene *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> Mäuse entwickeln eine Myelodysplasie

Ein erhöhter Anteil Gr-1<sup>+</sup>/Mac-1<sup>+</sup>-Granulozyten ließ sich ebenfalls im Knochenmark von *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> Mäusen nachweisen (Abb. 6). Darüber hinaus wurde ein erhöhter Anteil Ter-119 gefärbten erythropoetischen Zellen im Knochenmark *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> Mäusen gefunden (Abb. 6).



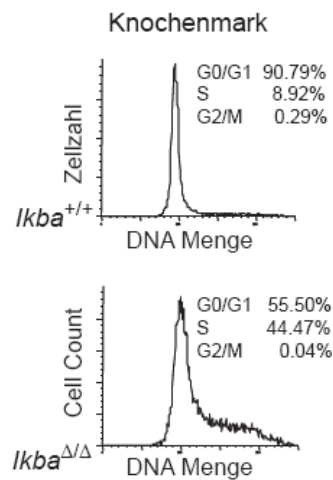
**Abb. 6** FACS-Färbungen von Knochenmarkszellen zeigen eine Zunahme von Gr-1<sup>+</sup>/Mac-1<sup>+</sup>-Granulozyten und Ter-119 erythropoetischen Zellen in 5-Tage alten *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> Mäusen.

Um zu untersuchen welchen Einfluß die Defizienz von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  in *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> Mäusen auf die Proliferation hämatopoetischer Vorläuferzellen hat, wurden Colony-Forming Unit Assays durchgeführt. Im Vergleich zu Wildtyp Mäusen konnte eine nahezu doppelt so hohe Anzahl an CFU-GEMMs, GM-, G-, M-CFUs in den Knochenmarkskulturen von 5 Tage alten *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> Mäusen beobachtet werden (Abb. 7).



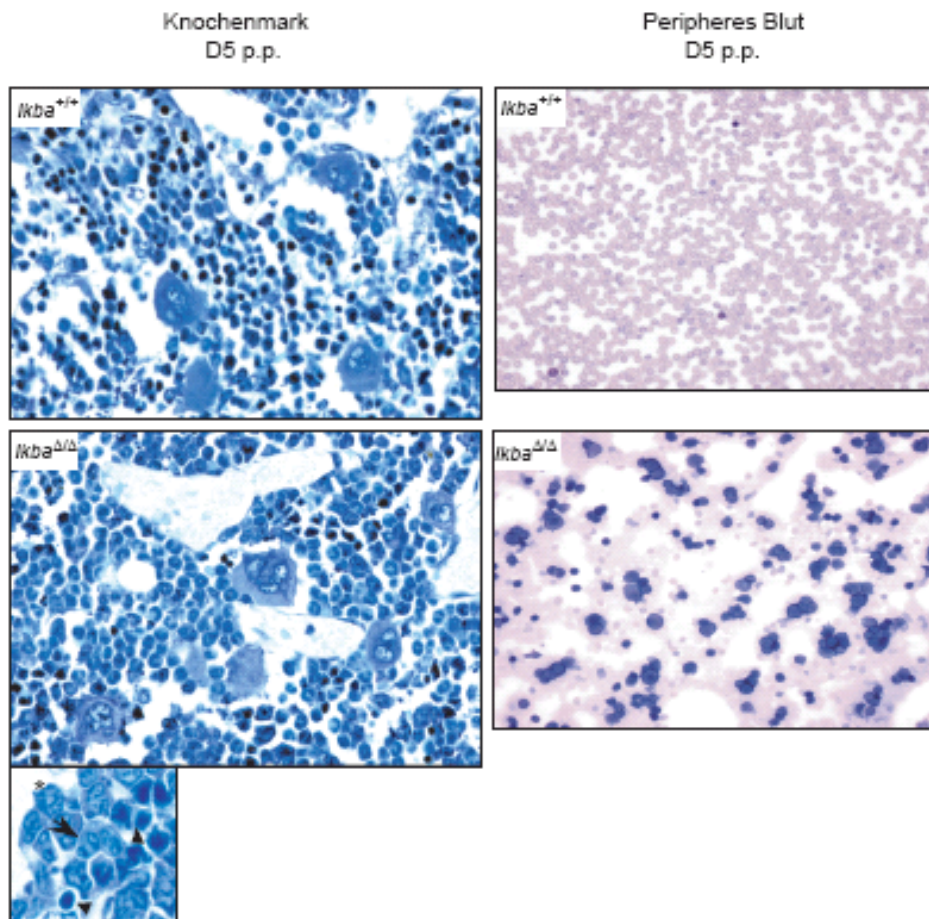
**Abb. 7** Colony-Forming-Unit-Assay durchgeführt an Knochenmarkszellen von Wildtyp und *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> Mäusen. Die Ergebnisse sind für drei untersuchte Mäuse pro Zeitpunkt und Genotyp repräsentativ.

Um zu klären, ob diese Hypergranulopoese Folge einer erhöhten Anzahl sich teilender myeloischer Vorläuferzellen ist, wurden Zellzyklusanalysen durchgeführt. Diese ergaben, dass bei Wildtyp Mäusen die Mehrheit der Gr-1<sup>+</sup>/Mac-1<sup>+</sup>-Zellen sich in der G0/G1-Phase des Zellzyklus befanden, während 9-10% dieser Zellen sich in der S- und G2/M-Phase aufhielten (Abb. 8). Im Gegensatz dazu befanden sich zwischen 40 und 50% der Gr-1<sup>+</sup>/Mac-1<sup>+</sup>-Zellen der *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> Mäuse in der S- bzw. G2/M-Phase. Da eigentlich nur Vorläuferzellen mitotisch aktiv sind, lassen diese Ergebnisse auf eine verstärkte Anzahl in Zellteilung befindlicher Vorläuferzellen in *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> Mäusen schließen.



**Abb. 8** Zellzyklusanalysen von Gr-1/PJ-gefärbten Zellen des Knochenmarks von 5-Tage alten Wildtyp (oben) und *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> Mäusen (unten).

Wie bereits in der Leber von *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> Mäusen dominierten auch im Knochenmark Granulozyten. Diese hatten überwiegend dysplastische Merkmale mit Pseudo-Pelger-Huët-Bildung. Verändert waren ebenfalls die Megakaryopoese mit Mikromegakaryozyten und die Erythropoese mit einer Kondensation des Chromatins und einer Asynchronität des Kern-Zytoplasma Verhältnisses (Abb. 9). Im peripheren Blut von *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> Mäusen fand sich eine erhöhte Anzahl weißer Blutzellen mit Dysplasie in der neutrophilen Linie einschließlich unreifer Formen (Abb. 9). Der ubiquitäre Verlust von IκBα führt zu einer Myelodysplasie, die zu einem der sekundären akuten myeloischen Leukämie ähnelnden Bild fortschreiten kann.

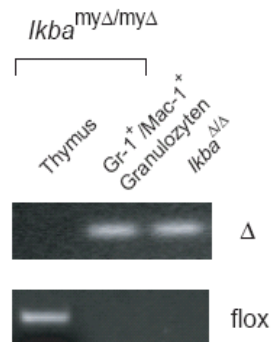


**Abb. 9** Links: Knochenmark von 5-Tage alten *Ikba*<sup>+/+</sup> und *Ikba*<sup>Δ/Δ</sup> Mäusen. Das Knochenmark der *Ikba*<sup>Δ/Δ</sup> Mäuse zeigt eine erhöhte Zahl meist reifer Granulozyten mit dysplastischen Merkmalen wie Mikromegakaryozyten (Pfeil) und Pseudo-Pelger-Huët Bildung (Stern). Die Erythropoese hat kondensiertes Chromatin und eine Asynchronität hinsichtlich des Kern-Zytoplasma-Verhältnisses (Pfeilköpfe) (Originalvergrößerung × 400). Rechts: Wright-Giemsa gefärbte Blutausstriche von 5-Tage alten *Ikba*<sup>Δ/Δ</sup> Mäusen zeigen Blastenzellen im peripheren Blut.

### 3.3 Die spezifische Deletion des *Ikba*- Gens in Gr-1<sup>+</sup>/Mac-1<sup>+</sup>-Granulozyten bleibt ohne Einfluss auf die Myeloese

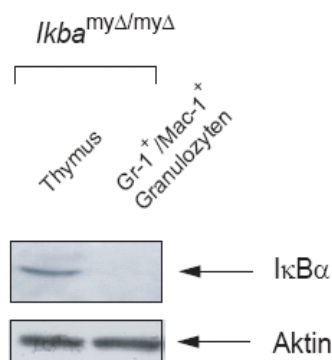
Um zu klären, welche Bedeutung die Deletion von *Ikba* in der myeloischen Linie für die Entstehung der Myelodysplasie hat, wurden gefloxtete *Ikba*<sup>flox/flox</sup> Mäuse mit einer Cre knock-in Linie verpaart, welche die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des endogenen Maus Lysozym-Promotors (LysM-Cre) exprimiert (Clausen et al., 1999). Mäuse mit einer spezifischen *Ikba*-Defizienz in der myeloischen Linie (*Ikba*<sup>myΔ/myΔ</sup>) wurden in einer nach Mendel zu erwartenden Häufigkeit geboren. Mittels PCR konnte gezeigt werden, dass die Deletion organspezifisch und effizient erfolgt (Abb. 10). Im Thymus dieser Mäuse war ausschließlich die gefloxtete Bande nachweisbar. Da nur in den Gr-1<sup>+</sup>/Mac-1<sup>+</sup>-Granulozyten und Makrophagen *Ikba* dele-

tiert war, kann man von einer gewebespezifischen Inaktivierung von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  ausgehen. Die DNA, die aus den Mäuseschwänzen der  $\text{Ikba}^{\Delta/\Delta}$  Mäusen isoliert wurde, diente als Kontrolle.



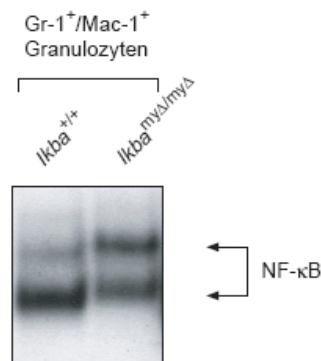
**Abb. 10** PCR-Analyse genomischer DNA aus dem Thymus sowie von  $\text{Gr-1}^+/\text{Mac-1}^+$ -Granulozyten. Die DNA, die aus dem Mäuseschwanz der  $\text{Ikba}^{\Delta/\Delta}$  Mäuse isoliert worden ist, diente als Kontrolle.

Mittels Western-Blot wurde zusätzlich gezeigt, dass kein  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  Protein in  $\text{Gr-1}^+/\text{Mac-1}^+$ -Granulozyten aus  $\text{Ikba}^{\text{my}\Delta/\text{my}\Delta}$  Mäusen detektiert werden kann (Abb. 11). Im Thymus hingegen konnte eine spezifische  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  Bande bei 37 kDa nachgewiesen werden.



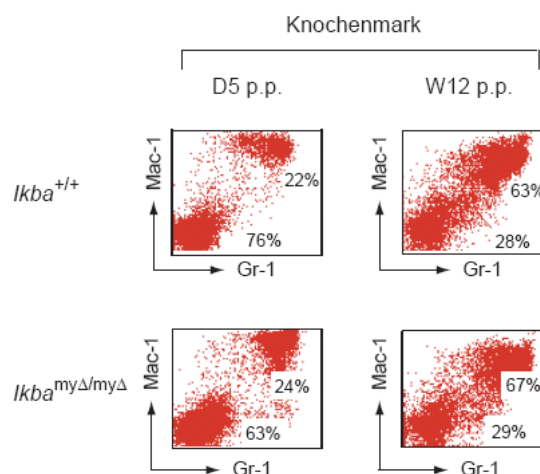
**Abb. 11** Western-Blot-Analyse mit einem  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Antikörper, der gegen den Gesamtzellextrakt des Thymus und der  $\text{Gr-1}^+/\text{Mac-1}^+$ -Granulozyten von  $\text{Ikba}^{\text{my}\Delta/\text{my}\Delta}$  Mäusen gerichtet ist, zeigt den gewebespezifischen Verlust des  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  Proteins. Die Aktin-Expression diente als Ladekontrolle.

Um zu untersuchen wie die Defizienz von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  in neutrophilen Granulozyten die  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  Aktivität beeinflusst, wurden Gelretardationsassays durchgeführt. Wie bereits in neutrophilen Granulozyten, die aus  $\text{Ikba}^{\Delta/\Delta}$  Mäusen isoliert worden waren, ging die Defizienz von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  mit einer konstitutiven  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  Aktivierung einher (Abb. 12).



**Abb. 12** EMSA von gesorteten Gr-1<sup>+</sup>/Mac-1<sup>+</sup>-Granulozyten aus 5-Tage alten *Ikba*<sup>+/+</sup> und *Ikba*<sup>Δ/Δ</sup> Mäusen. Die Pfeile zeigen die spezifischen NF-κB Banden.

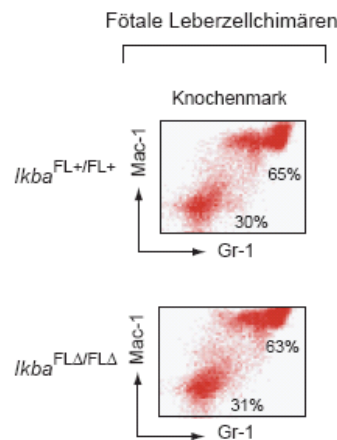
Die konstitutive Aktivierung von NF-κB hatte keine Veränderung des Anteils an Gr-1<sup>+</sup>/Mac-1<sup>+</sup>-Zellen im Knochenmark zur Folge, weder bei 5 Tage, noch bei 12 Wochen alten Tieren. So belief sich der Gr-1<sup>+</sup>/Mac-1<sup>+</sup>-Anteil im Knochenmark bei den 5 Tage alten *Ikba*<sup>myΔ/myΔ</sup> Mäusen auf durchschnittlich 24% (Wildtyp Mäuse: 22%), bei den 12 Wochen alten Tieren auf 67% (Wildtyp Mäuse: 63%) (Abb. 13).



**Abb. 13** FACS-Analysen von Zellen aus dem Knochenmark und der Milz von 5-Tage alten und 12-Wochen alten *Ikba*<sup>myΔ/myΔ</sup> und Wildtyp Mäusen.

Der genaue Zeitpunkt der Cre-vermittelten Rekombination des *Ikba* Gens in den *Ikba*<sup>myΔ/myΔ</sup> Mäusen ist nicht bekannt. Um auszuschließen, dass der fehlende Phänotyp in den in den *Ikba*<sup>myΔ/myΔ</sup> Mäusen Folge einer zu späten Deletion von *Ikba* in der Myelopoese ist, wurden fötale Leberzellchimären generiert. FACS-Analysen mit Gr-1<sup>+</sup>/Mac-1<sup>+</sup> spezifischen Antikörpern an Knochenmark- und Milzzellen von 6-Monate alten Mäusen zeigten, dass keine Unter-

schiede bei dem Gr-1<sup>+</sup>/Mac-1<sup>+</sup>-Zellenanteil zwischen den Chimären und Kontroll Mäusen besteht. Der Anteil der Gr-1<sup>+</sup>/Mac-1<sup>+</sup>-Zellen beträgt bei den *Ikba*<sup>FLΔ/FLΔ</sup> Mäusen 63%, bei den Kontroll Mäusen 65% (Fig. 14).



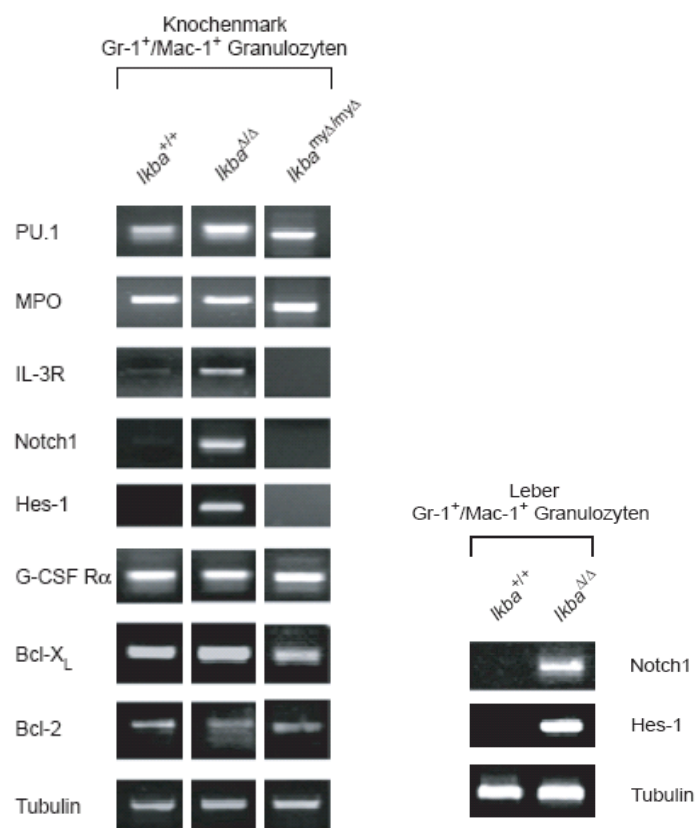
**Abb. 14** Gr-1<sup>+</sup>/Mac-1<sup>+</sup>-FACS-Analysen von Knochenmarkszellen von 9-Monate alten *IkBα* defizienten fötalen Leberzellchimären und fötalen Kontroll-Leberzellchimären.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Entwicklung einer myeloischen Dysplasie in *Ikba*<sup>Δ/Δ</sup> Mäusen nicht auf eine alleinige Defizienz von *IkBα* in der Myelopoese zurückzuführen ist.

### 3.4 Konstitutive Notch1 Expression in *Ikba*-defizienten Gr-1<sup>+</sup>/Mac-1<sup>+</sup>-Granulozyten

Um einen besseren Einblick darüber zu bekommen, welche molekularen Mechanismen der Hypergranulopoese zugrunde liegen, wurde eine Expressionsanalyse von Genen durchgeführt, die zum einen für die Myelopoese relevant sind, zum anderen von NF-κB reguliert werden. Speziell das Genexpressionsniveau von PU.1, MPO, IL-3R, Notch1, Hes-1, G-CSFRα, Bcl-x<sub>L</sub> und Bcl-2 in Gr-1<sup>+</sup>/Mac-1<sup>+</sup>-Granulozyten, die aus *Ikba*<sup>Δ/Δ</sup>, *Ikba*<sup>Δmy/myΔ</sup> und Wildtyp Mäusen isoliert wurden, wurde analysiert (Abb. 15). Hier fiel auf, dass in Gr-1<sup>+</sup>/Mac-1<sup>+</sup>-Granulozyten aus *ikba*<sup>Δ/Δ</sup> Mäusen im Unterschied zu Gr-1<sup>+</sup>/Mac-1<sup>+</sup>-Granulozyten aus *Ikba*<sup>Δmy/myΔ</sup> und Wildtyp Mäusen der Transmembranrezeptor Notch1 sehr stark exprimiert war. Die Expression des *Hes1*-Genes, ein Zielgen von Notch1 (Jarriault et al., 1995). Hinsichtlich der Expressionstärke des Transkriptionsfaktors PU.1, der Myeloperoxidase (MPO) und Mitglieder der Ets-Transkriptionsfaktorfamilie konnten in den Gr-1<sup>+</sup>/Mac-1<sup>+</sup>-Granulozyten der *Ikba*<sup>Δ/Δ</sup>, *Ikba*<sup>myΔ/myΔ</sup> und Wildtyp Mäuse vergleichbare Werte ermittelt werden. PU.1 ist vor allem für die terminale Differenzierung und Funktion neutrophiler Granulozyten von Bedeutung (Anderson

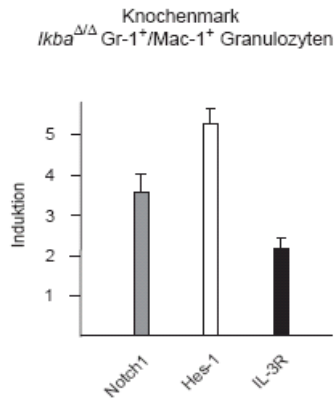
et al., 1998). Auch die für die antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub> kodierenden Gene (ebenfalls NF-κB reguliert) wurden nicht unterschiedlich in den Gr-1<sup>+</sup>/Mac-1<sup>+</sup>-Granulozyten der *Ikba*<sup>Δ/Δ</sup>, *Ikba*<sup>myΔ/myΔ</sup> und Wildtyp Mäuse exprimiert. Diese Beobachtung deckt sich mit den oben erhobenen Daten. Starke Unterschiede bezüglich der Expressionsstärke konnten weiterhin bei dem IL-3 Rezeptor, dem eine wichtige Funktion bei der Proliferation und Differenzierung aber auch beim Überleben myeloischer Vorläuferzellen zukommt, festgestellt werden. So lag die Expression dieses Rezeptors in den Gr-1<sup>+</sup>/Mac-1<sup>+</sup>-Granulozyten des Knochenmarks von *Ikba*<sup>Δ/Δ</sup> Mäusen deutlich höher als bei *Ikba*<sup>myΔ/myΔ</sup> und Wildtyp Mäusen. Die Expressionsstärken der α-Ketten des G-CSF Rezeptors und GM-CSF Rezeptors waren in den Gr-1<sup>+</sup>/Mac-1<sup>+</sup>-Granulozyten bei allen untersuchten Mäusestämmen vergleichbar.



**Abb. 15** Primäre Gr-1<sup>+</sup>/Mac-1<sup>+</sup>-Zellen aus der Leber (oben) und dem Knochenmark (unten) von *Ikba*<sup>Δ/Δ</sup>, *Ikba*<sup>myΔ/myΔ</sup> und Kontroll Mäusen (n=4) wurden durchflußzytometrisch aufgereinigt. Die Zellen wurden mittels der RT-PCR auf die Expressionsstärke der jeweiligen Gene untersucht. Die Tubulin-Expression diente als Ladekontrolle für die RT-PCR.

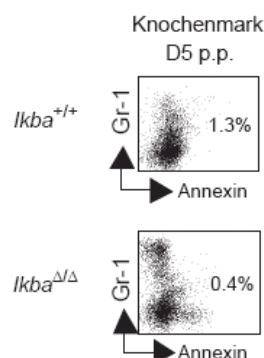
Mit Hilfe quantitativer PCR wurde eine circa dreifach erhöhte Notch1- und eine mehr als fünf mal so hohe Hes-1 Expression in *Ikba*<sup>Δ/Δ</sup> Gr-1<sup>+</sup>/Mac-1<sup>+</sup>-Granulozyten im Vergleich zu neutrophilen Granulozyten aus Wildtyp Mäusen detektiert (Abb. 16).





**Abb. 16** Quantitative real-time PCR-Analyse der *Notch1*, *Hes1*, und *Il-3r*-Expression in *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> Gr-1<sup>+</sup>/Mac-1<sup>+</sup> Granulozyten. Die Stärke der Genexpression wurde für jede mRNA-Präparation mit Tubulin genormt, und die verstärkte Zunahme in den Gr-1<sup>+</sup>/Mac-1<sup>+</sup> Granulozyten der *Ikba*<sup>ΔΔ</sup>-Mäuse wurde durch den Vergleich mit den Wildtyp Ergebnissen errechnet.

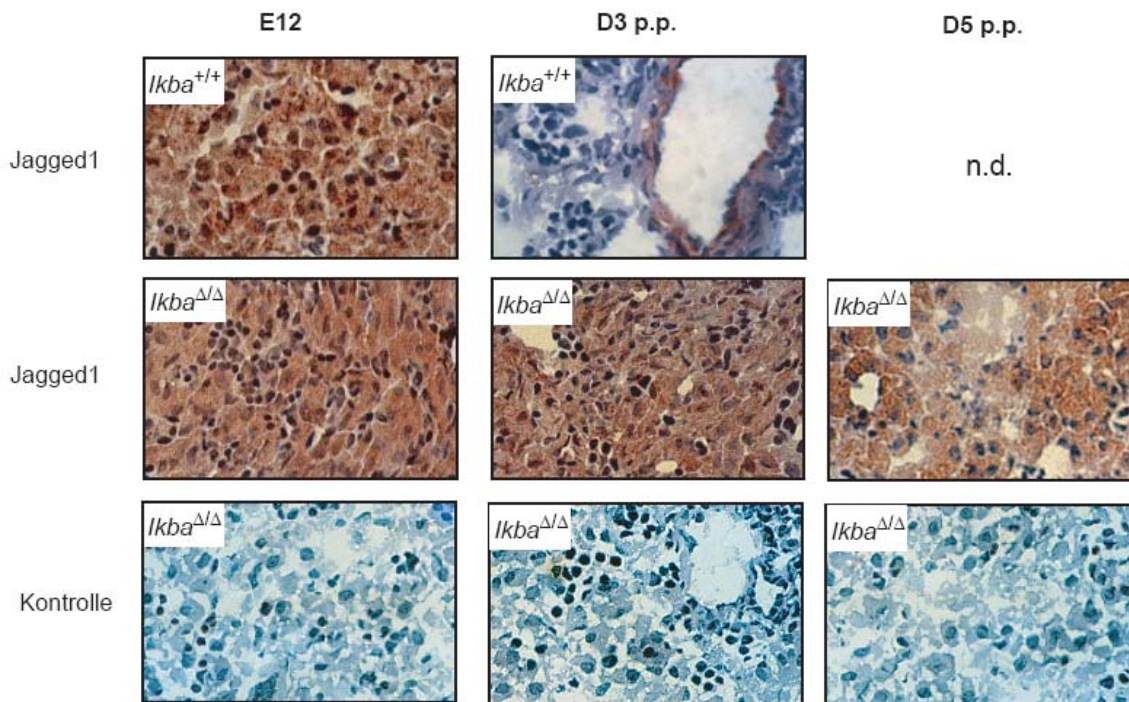
Um nun zu untersuchen inwieweit die erhöhte Anzahl an myeloischen Zellen in den 5-Tage alten *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> Mäusen Folge einer Veränderung der Apoptose in neutrophilen Granulozyten ist, wurde eine Doppelfärbung der Knochenmarkszellen mit Gr-1<sup>+</sup>/AnnexinV-Antikörpern durchgeführt. Da sich der Anteil apoptotischer Gr-1<sup>+</sup>/AnnexinV-Granulozyten bei den Wildtyp-Mäusen nicht signifikant von dem gleichaltriger *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> Mäuse unterscheidet (1,3% apoptotische Gr-1<sup>+</sup>/AnnexinV-Granulozyten beim Wildtyp und 0,4 % bei der *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> Maus), lässt sich daraus schlußfolgern, dass die vermehrte Anzahl myeloischer Zellen in den *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> Mäusen nicht durch eine Veränderung der Apoptose von neutrophilen Granulozyten bedingt ist (Abb. 17).



**Abb. 17** Bestimmung des apoptotischen Anteils (in Prozentangaben) von neutrophilen Granulozyten im Knochenmark mit Hilfe einer Gr-1<sup>+</sup>/Annexin V-Doppelfärbung bei 5-Tage alten *Ikba*<sup>+/+</sup> und *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> Mäusen.

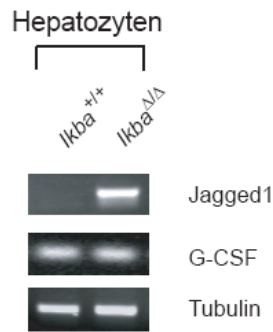
### 3.5 Perinatale Expression von Jagged1 in *Ikba*-defizienten Hepatozyten

Eine Notch1-Aktivierung ist nur möglich, wenn benachbarte Zellen einen Notch-Liganden exprimieren (Jennings et al., 1994). Die Untersuchung des Expressionsmusters von Notch1 Liganden in Mausembryonen zeigte, dass die Expression von Jagged1 in der Leber von *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen verändert ist. Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden Kryostatschnitte der Leber im Zeitraum vom embryonalen Tag 12 (E12) bis 5 Tage post partum mit dem anti-Jagged1-Antikörper gefärbt (Abb. 18). In der Leber von 12-Tage alten Embryonen ist die Expression von Jagged1 zwischen *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> Mäusen und Wildtyp Mäusen vergleichbar stark ausgeprägt. Während diese aber bei den *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> Mäusen hochreguliert blieb, beschränkte sich die Jagged1-Expression bei 3-Tage alten Wildtyp Mäusen auf das venöse Endothel.



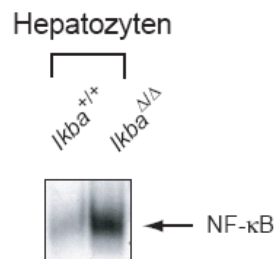
**Abb. 18** Lebern von E12, 3- und -5 Tage alten *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> und Wildtyp Mäusen mit einem Jagged1-spezifischen Antikörper gefärbt. Die untere Reihe ist die Isotyp-Kontrolle.

Um die Jagged1-Expression auf transkriptioneller Ebene mit der Proteinexpression zu korrelieren, wurde die Jagged1 mRNA Expression mittels semiquantitativer RT-PCR bei 3 Tage alten *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> und Wildtyp Mäusen analysiert (Abb. 19).



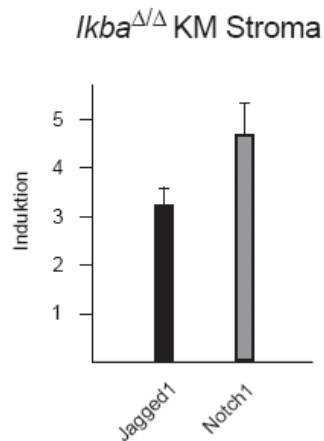
**Abb. 19** RT-PCR Analyse der Jagged1 und G-CSF Expression von Hepatozyten aus 3-Tage alten *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> und Wildtyp Mäusen. Die Tubulinexpression diente als Ladekontrolle.

Um zu untersuchen inwieweit die Hochregulierung von Jagged1 in den Hepatozyten mit der NF-κB Aktivität in Hepatozyten korreliert, wurden Gelretardationsassays durchgeführt. Hierbei konnte in den *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> Hepatozyten im Vergleich zu Wildtyp Hepatozyten eine konstitutive Aktivität von NF-κB nachgewiesen werden (Abb. 20).



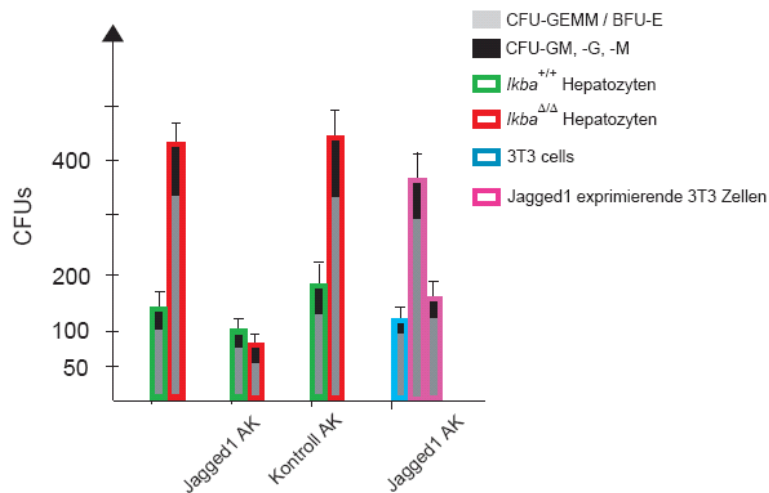
**Abb. 20** EMSA von Hepatozyten aus 5 Tage alten *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> und Wildtyp Mäusen. Der Pfeil zeigt die spezifische NF-κB Bande.

Eine verstärkte Expression von Jagged1 wurde ebenfalls in den Stromazellen des Knochenmarks von *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> Mäusen gefunden. Das korreliert mit der Jagged1 Expression von aus dem Knochenmark isolierten neutrophilen Granulozyten. (Abb. 21). Zusätzlich fand sich auch eine induzierte Expression von Notch1 in diesen Zellen.



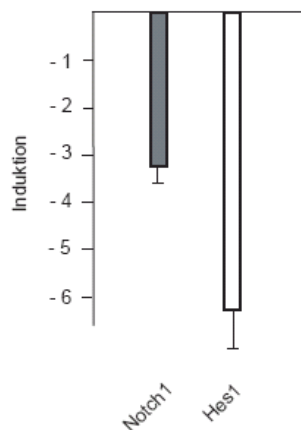
**Abb. 21** Die Induktion von *Jagged1* und *Notch1* auf Stromazellen des Knochenmarks wurde mit der real-time RT-PCR gemessen. Die RNA-Proben wurden aus sechs verschiedenen *Ikba*<sup>Δ/Δ</sup> Mäusen und Wildtyp präpariert. Eine Dreifachbestimmung wurde für jede mRNA Probe durchgeführt. Die Genexpressionsstärken wurden für jede mRNA-Probe mit Tubulin genormt und die Mehrfachzunahme in den *Ikba*<sup>Δ/Δ</sup> Mäusen durch den Vergleich mit den Ergebnissen bei Wildtyp Mäusen berechnet.

Um zu klären inwieweit eine persistente Jagged1 Expression auf Hepatozyten die Hämatopoese beeinflusst, wurden Wildtyp Knochenmarkzellen zunächst mit Hepatozyten aus *Ikba*<sup>Δ/Δ</sup> beziehungsweise Wildtyp Mäusen kokultiviert und anschließend Colony-Forming-Assays durchgeführt. Hierbei konnte im Vergleich zu Kokulturen mit Wildtyp Hepatozyten eine fast vierfache Zunahme an CFU-GEMMs beobachtet werden, wenn Knochenmarkzellen mit *IkBα*-defizienten Hepatozyten kokultiviert worden waren (Abb. 22). Wurden *Ikba*<sup>Δ/Δ</sup>-defiziente Hepatozyten vor den Kokulturen mit einem Jagged1-spezifischen Antikörper präinkubiert, zeigte sich kein Unterschied mehr zu Kokulturen mit aus Wildtyp Mäusen isolierten Hepatozyten. Dies konnte auch mit Jagged1 exprimierenden 3T3-Zellen gezeigt werden (Abb. 22).



**Abb. 22** Colony-Forming-Assays, durchgeführt an Knochenmarkszellen von 5-Tage alten *Ikba*<sup>+/+</sup> Mäusen nach einer Kultivierungszeit von 1 Woche auf Wildtyp bzw. *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> Hepatozyten mit oder ohne Vorinkubation mit einem Jagged1-spezifischen Antikörper bzw. Kontrollantikörper ( $\alpha$ -IkB $\alpha$ ). Als Kontrolle für die Spezifität und inhibitorische Funktion des Jagged1-Antikörpers, wurden Colony-Forming-Assays an Knochenmarkszellen durchgeführt, die aus 5-Tage alten Wildtyp Mäusen isoliert und für 1 Woche auf 3T3-Zellen und auf Jagged1-exprimierenden 3T3-Zellen mit oder ohne Vorinkubation mit dem Jagged1-Antikörper kultiviert worden sind. Die Ergebnisse sind für 4 untersuchte Mäuse pro Zeitpunkt und Genotyp repräsentativ.

Die Präinkubation der Jagged1 exprimierenden 3T3 Zellen mit einem Jagged1 spezifischen Antikörper geht einher mit einer Abnahme der Expression von Notch1 und Hes1 (Abb. 23).



**Abb. 23** Quantitative RT-PCR von mRNA-Proben, die aus Kolonien isoliert wurden, die für 1 Woche auf Jagged1-exprimierenden 3T3-Zellen mit oder ohne Vorinkubation mit dem Jagged1-Antikörper, kultiviert wurden. Die Genexpressionsstärken wurden für jede mRNA-Probe mit Tubulin genormt. Die Menge an mRNA, die nach einer Kultivierung mit Jagged1 exprimierenden 3T3-Zellen nach Vorinkubation mit dem Jagged1 Antikörper erhalten wurde, wurde durch den Vergleich mit dem Ergebnis, welches man nach einer Kultivierung mit Jagged1-exprimierenden 3T3-Zellen ohne Vorinkubation mit dem Jagged1 Antikörper erhielt, berechnet.

## Teil II Funktion von NF- $\kappa$ B in der Haut

Der zweite Teil der Untersuchungen widmet sich der Rolle von I $\kappa$ B $\alpha$  und RelA in der Haut. Bisher publizierte Ergebnisse im murinen System lassen auf eine Funktion von NF- $\kappa$ B und I $\kappa$ B $\alpha$  bei entzündlichen Vorgängen der Haut und bei der epidermalen Homeostase schließen (Beg et al., 1995; Klement et al., 1996).

### 3.6 *Ikba* <sup>$\Delta\Delta$</sup> Mäuse entwickeln eine psoriasisartige Entzündung der Haut

Beginnend mit dem 3. Tag post partum wurde die Haut der *Ikba* <sup>$\Delta\Delta$</sup>  Mäuse zunehmend rot und begann zu schuppen. Dies nahm bis zum 8./9. Tag zu. Danach starben die Mäuse (Abb. 24).



Abb. 24 Rötung und Schuppung der Haut bei 6-Tage alten *Ikba* <sup>$\Delta\Delta$</sup>  Mäusen.

Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B ist in der Haut von *Ikba* <sup>$\Delta\Delta$</sup>  Mäusen konstitutiv an die DNA gebunden (Abb. 25). Mittels ELISA wurde die Zusammensetzung des NF- $\kappa$ B Komplexes weiter analysiert. Er war aus den Untereinheiten RelA und p50 zusammengesetzt. Andere Mitglieder der NF- $\kappa$ B Familie konnten nicht nachgewiesen werden (Abb. 25).

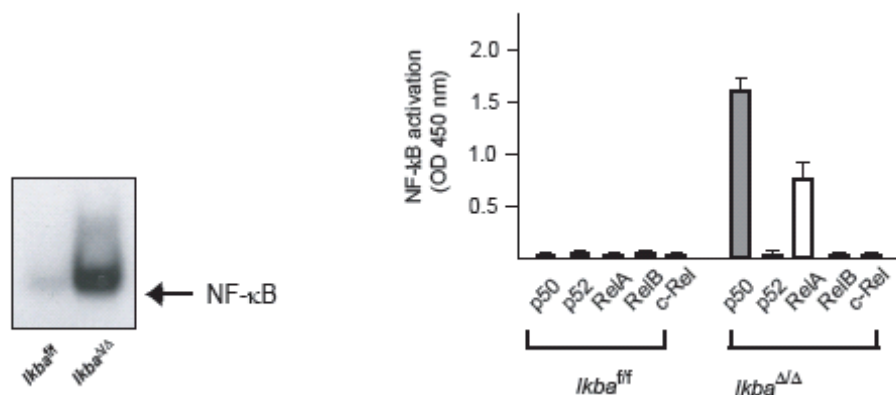
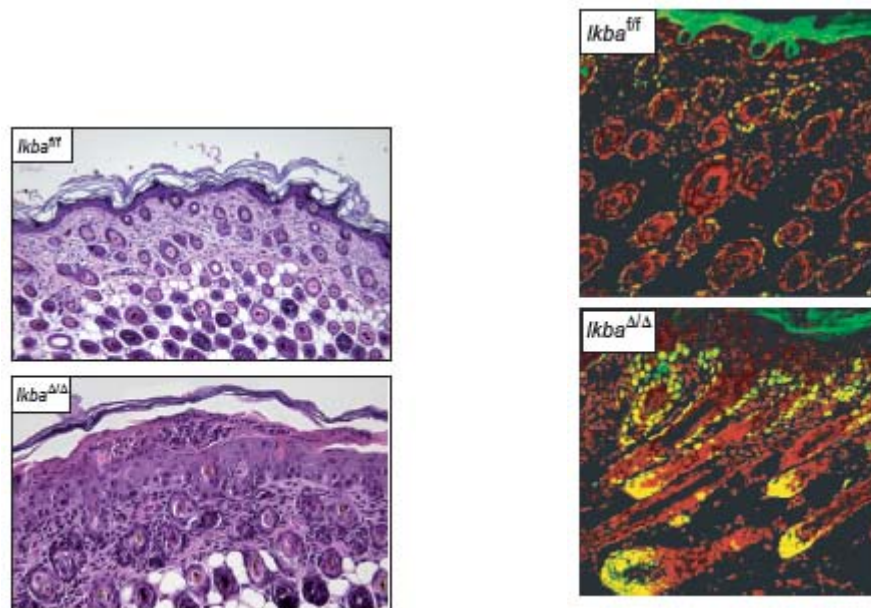


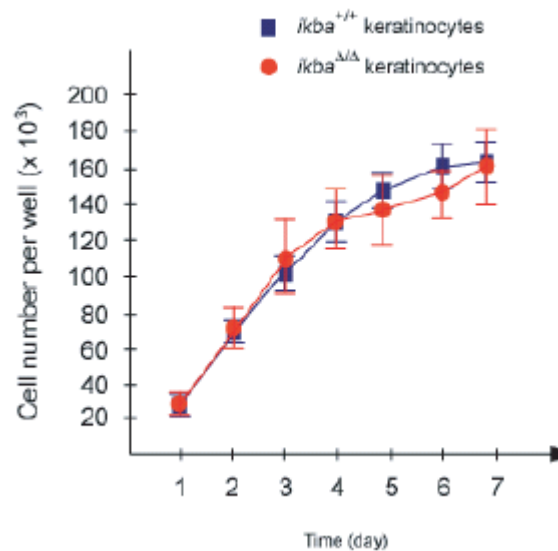
Abb. 25 Bestimmung der NF- $\kappa$ B-DNA Bindungsaktivität mittels EMSA (links). Die hierfür spezifischen Untereinheiten dieses Transkriptionsfaktors wurden mittels ELISA als p50 und RelA identifiziert (rechts).

Die histopathologische Untersuchung der Haut von *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> Mäusen zeigte eine Verbreiterung des Stratum spinosum (Akanthose) und des Stratum corneum (Hyperkeratose), in welchem noch Reste von Zellkernen zu erkennen waren (Parakeratose). Das Stratum granulosum war fokal nicht ausgebildet. Die dermalen Blutgefäße waren weitgestellt und die obere Dermis mit Entzündungszellen infiltriert. Neutrophile Granulozyten waren ebenfalls intraepidermal und suborneal in der Epidermis zu erkennen (intraepitheliale und subkorneale Mikroabszesse) (Abb. 26). Die Ki-67 Färbung deutete auf eine gesteigerte Proliferation der Keratinozyten in der Haut von *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen hin (Abb. 26).



**Abb. 26** HE-gefärbte Hautschnitte von *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> und *Ikba*<sup>ff</sup> Mäusen (links). Ki67-Färbung (grün) zur Untersuchung der Zellproliferation. Zellkerne sind rot gefärbt.

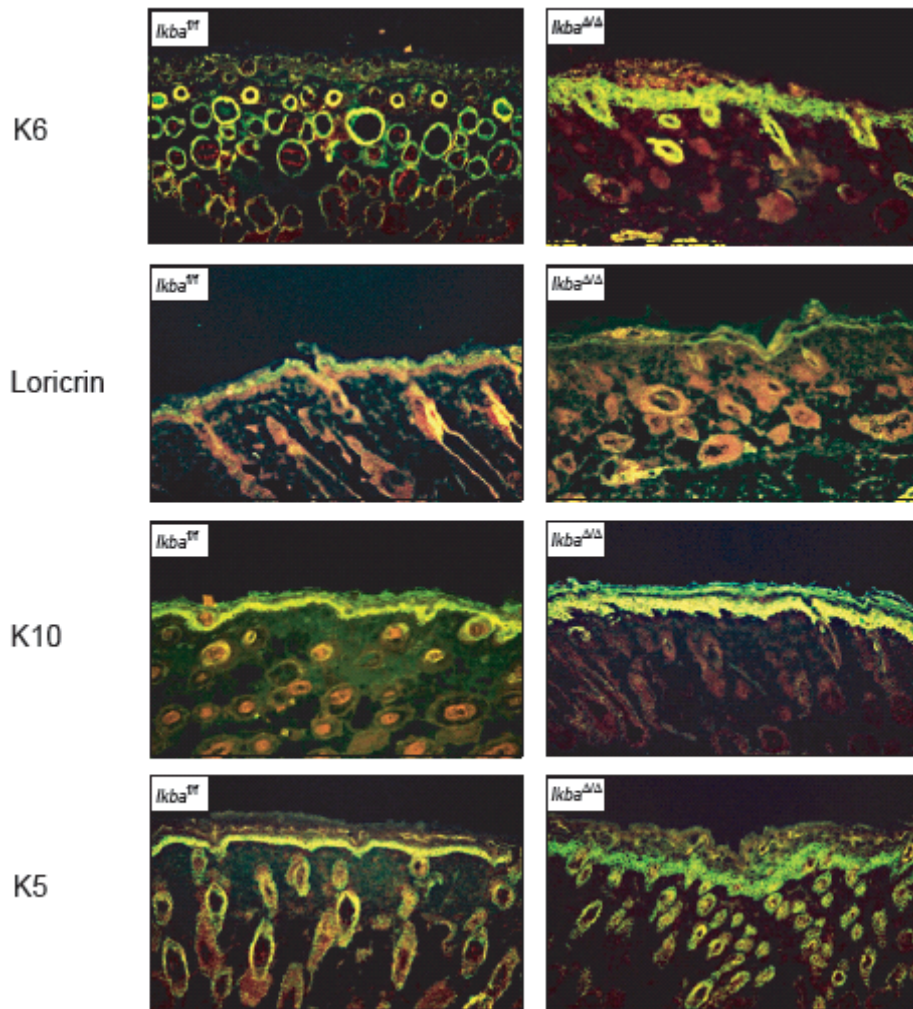
Um zu klären inwieweit die gesteigerte Proliferation eine direkte Folge der Deletion von IκBα in den Keratinozyten ist, wurden *ex vivo* Zellkulturen durchgeführt und die Proliferation von *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> und Wildtyp Keratinozyten verglichen. Eine Ausgangspopulation von jeweils 30.000 Keratinozyten wurde bis zu 7 Tagen kultiviert. Nach jedem Tag wurde die Anzahl der Keratinozyten mittels einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Mit der Zeit nahm die Anzahl der Keratinozyten sowohl bei den Wildtyp Mäusen als auch bei den *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> Mäusen stetig zu. Über den gesamten Zeitraum von 7 Tagen konnte allerdings kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Keratinozytenproliferation zwischen *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> und Wildtyp Mäusen festgestellt werden. (Abb. 27). Somit ist die epidermale Hyperproliferation *in vivo* keine direkte, zellautonome Konsequenz der IκBα Defizienz in *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> Keratinozyten (Abb. 27).



**Abb. 27** Wachstumskurven von kultivierten Primärkeratinozyten. Jeweils 30.000 Zellen von *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> (rote Kurve) und Wildtyp Mäusen (blaue Kurve) wurden pro well ausgesät und für 7 Tage kultiviert. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die Zellen abgeerntet und gezählt.

Zur Beantwortung der Frage wie die Defizienz von *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> die epidermale Differenzierung beeinflusst, wurde die Haut von *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> und Wildtyp Mäusen mit Antikörpern gegen epidermale Differenzierungsmarker gefärbt. Die Expression der Keratine 5 und 10 war bei *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen über eine breitere Schicht verteilt (Abb. 28). Die Expression von Loricrin war hingegen bei *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> Mäusen geringer (Abb. 28). Am auffälligsten war die epidermale Expression von Keratin 16 bei *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> Mäusen (Abb. 28). Keratin 16 wird in Wildtyp Mäusen nur im Haarfollikel exprimiert. Vom Menschen ist bekannt, dass Haut von Patienten mit Psoriasis Keratin 16 auch epidermal exprimiert wird. Darüber hinaus kann Keratin 16 in der Epidermis von Wunden beim Menschen exprimiert sein.

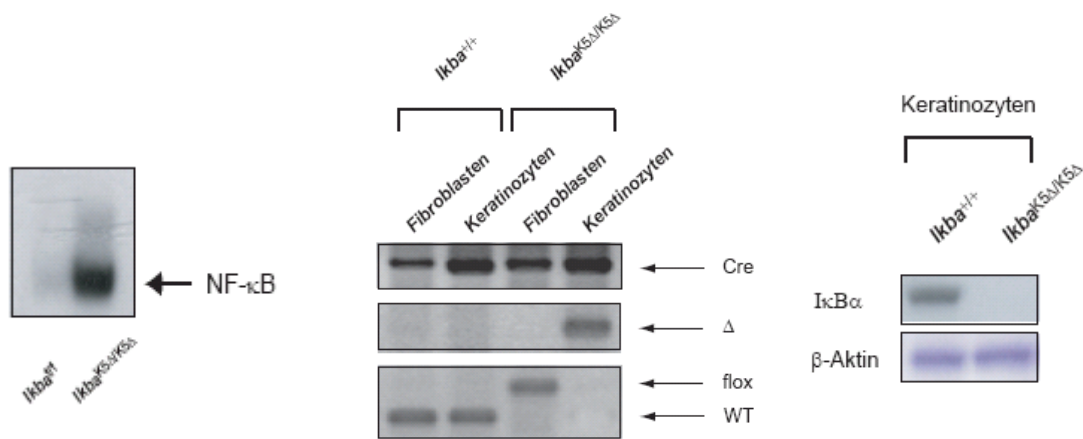




**Abb. 28** Immunfärbung der Haut mit verschiedenen epidermalen Differenzierungsmarkern (grün).

### 3.7 Die epidermisspezifische Deletion von *Ikba* führt zu einer unspezifischen Entzündung der Haut

Um den epidermisspezifischen Beitrag zu untersuchen, der zum psoriasisartigen Phänotyp in *Ikba*<sup>Δ/Δ</sup> Mäusen führt, wurden *Ikba*<sup>f/f</sup> Mäuse mit Keratin5-*Cre2*-Mäusen verpaart, so dass deren Nachkommen eine epidermisspezifische Deletion von *Ikba* (*Ikba*<sup>K5Δ/K5Δ</sup>) aufwiesen. Die Deletion war gewebespezifisch effizient und NF-κB war in den Keratinozyten von *Ikba*<sup>K5Δ/K5Δ</sup> Mäusen konstitutiv an DNA gebunden (Abb. 29).



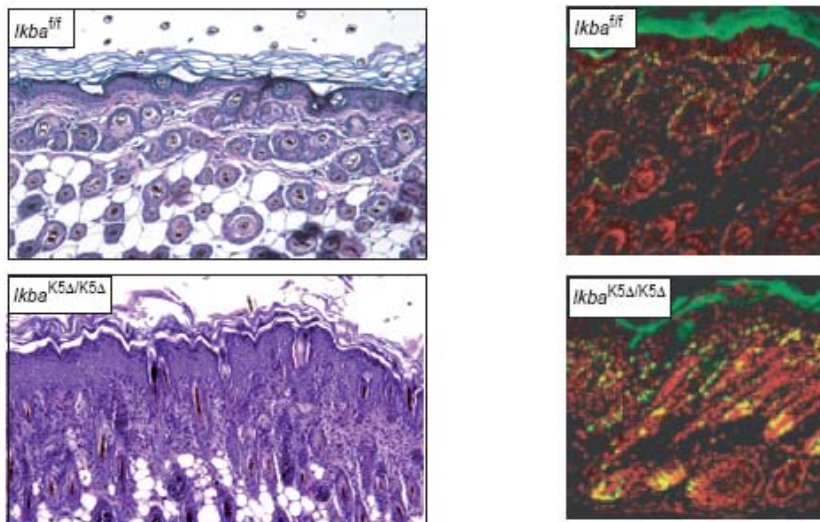
**Abb. 29** EMSA zur Bestimmung der NF- $\kappa$ B Bindung (links). Epidermis-spezifische Inaktivierung von *Ikba* durch das K5-*cre2*-Transgen. Genotypisierung mittels PCR (Mitte) und Western-Blot-Analyse (rechts) zeigt für I $\kappa$ B $\alpha$  in der Haut von 5 Tagen alten Mäusen eine gewebespezifische Deletion von *Ikba*.

*Ikba*<sup>K5 $\Delta$ /K5 $\Delta$</sup>  Nachkommen wurden in der nach Mendel zu erwartenden Häufigkeit geboren und waren makroskopisch bis zum 3. Tag postpartal nicht von den Wildtyp Nachkommen zu unterscheiden, obwohl das I $\kappa$ B $\alpha$  Protein in den epidermalen Keratinozyten dieser Mäuse fehlte (Abb. 30). Ähnlich wie bei den *Ikba* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  Mäusen, war bei diesen Mäusen eine Schuppung der Haut ab dem 3. Tag zu beobachten.



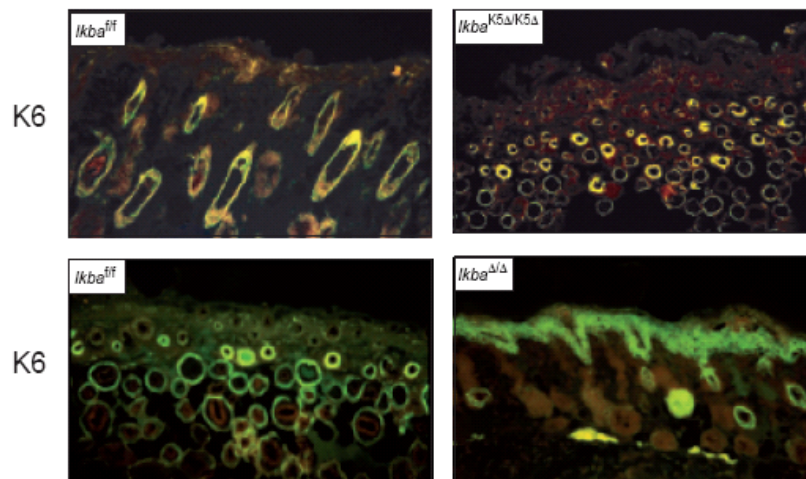
**Abb. 30** Epidermisspezifische I $\kappa$ B $\alpha$ -Knockout-Maus. *Ikba*<sup>K5 $\Delta$ /K5 $\Delta$</sup>  Mäuse und Kontrollmäuse (*Ikba*<sup>fl/fl</sup>) am 7. Tag postpartal.

Die histopathologische Untersuchung der Hautschnitte zeigte eine ausgeprägte Akanthose, Orthohyperkeratose und eine verstärkte Ki-67-Expression sowie ein dermales Infiltrat aus inflammatorischen Zellen (Abb. 31). Im Gegensatz zu den *Ikba* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  Mäusen war das Stratum granulosum normal ausgebildet. Parakeratose und epidermal Mikroabszesse fehlten.



**Abb. 31** HE-gefärbte Hautschnitte von *Ikba*<sup>K5Δ/K5Δ</sup> und Kontroll Mäusen (links). Ki67-Färbung (grün) zur Bestimmung der Zellproliferation. Zellkerne sind rot gefärbt (rechts).

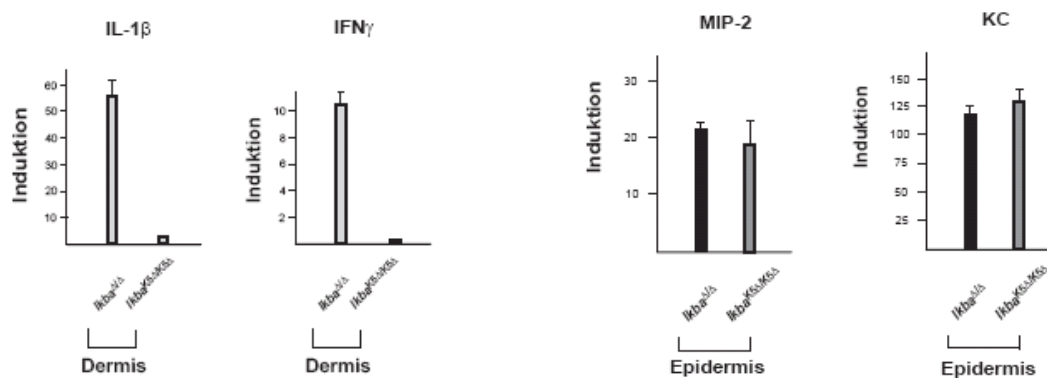
Bei der Analyse der Expression epidermaler Differenzierungsmarker fiel auf, dass im Gegensatz zu den *Ikba*<sup>Δ/Δ</sup> bei *Ikba*<sup>K5Δ/K5Δ</sup> Mäusen K6 in der Epidermis nicht exprimiert wurde. Eine K6 Expression in der Epidermis der *Ikba*<sup>K5Δ/K5Δ</sup> Mäuse fehlte (Abb. 32).



**Abb. 32** Immunfärbung der Haut von *Ikba*<sup>Δ/Δ</sup>, *Ikba*<sup>K5Δ/K5Δ</sup> und Kontroll Mäusen mit einem Antikörper gegen K6 (grün).

Da der K6 Promotor nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  aktiviert werden kann und diese Zytokine auch an der Pathogenese der Psoriasis beteiligt sind, wurde die Expression dieser beiden Zytokine quantitativ mittels Real-time-PCR bestimmt. IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  waren in der Haut von *Ikba*<sup>Δ/Δ</sup> aber nicht in der Haut von *Ikba*<sup>K5Δ/K5Δ</sup> Mäusen hochreguliert. Parallel zur

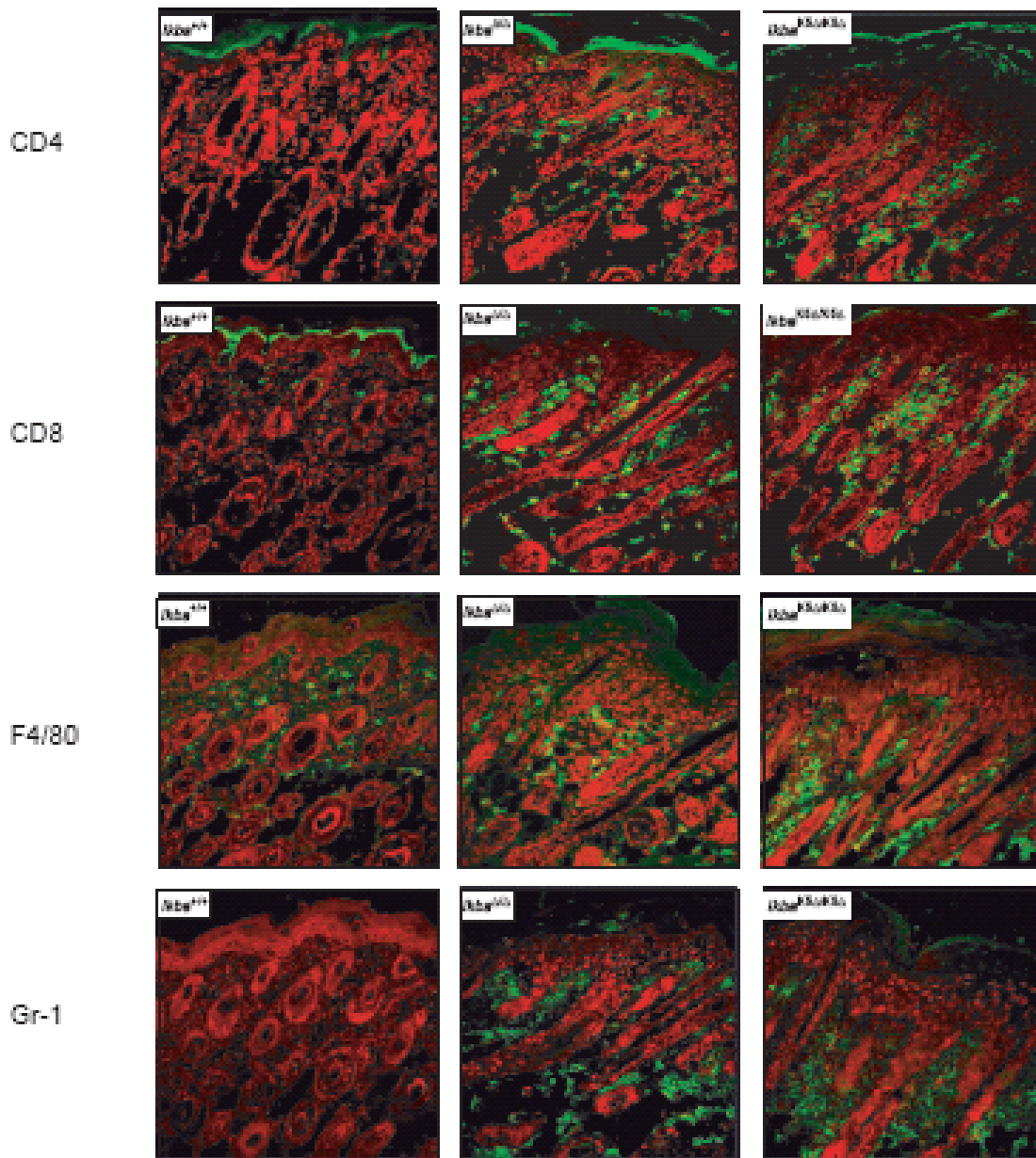
Aktivierung von NF- $\kappa$ B in den *Ikba* <sup>$\Delta/\Delta$</sup> -Mäusen fand eine Hochregulierung der NF- $\kappa$ B-regulierten Gene MIP-2 und KC in den Keratinozyten und Fibroblasten statt (Abb. 33).



**Abb. 33** Induktion der für IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , KC und MIP-2 kodierenden Gene in der Haut von *Ikba* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  und *Ikba* <sup>$K5\Delta/K5\Delta$</sup>  Mäusen wurde mittels Real-time RT-PCR bestimmt. RNA Proben wurden aus sechs verschiedenen *Ikba* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  und *Ikba* <sup>$K5\Delta/K5\Delta$</sup>  Mäusen präpariert. Eine Dreifachbestimmung wurde für jede mRNA-Probe durchgeführt. Die Stärke der Genexpression wurde für jede mRNA-Probe mit Tubulin genormt und die Mehrfachzunahme in den *Ikba* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  und *Ikba* <sup>$K5\Delta/K5\Delta$</sup>  Mäusen wurde durch einen Vergleich mit Ergebnissen der Wildtyp Mäuse ermittelt. Die Ergebnisse entsprechen dem Durchschnitt von je sechs Mäusen pro Genotyp.

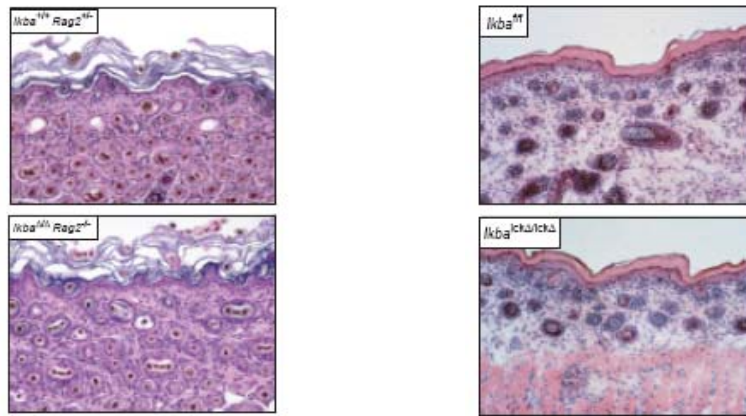
### 3.8 Initiation und Aufrechterhaltung des psoriasisartigen Hautphänotyps sind T-Zell abhängig

Zur genaueren Spezifizierung des entzündlichen Infiltrats wurden immunhistologische Färbungen an Hautschnitten von 5-Tage alten *Ikba* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  und gleichaltrigen *Ikba* <sup>$K5\Delta/K5\Delta$</sup>  Mäusen durchgeführt. Immunhistochemisch konnte gezeigt werden, dass sich das Infiltrat aus CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, Gr-1<sup>+</sup>/Mac-1<sup>+</sup> Granulozyten und F4/80<sup>+</sup> Makrophagen zusammensetzt (Abb. 34). Bis auf die Infiltration der Epidermis von *Ikba* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  Mäusen mit CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigte sich kein Unterschied zwischen den *Ikba* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  und *Ikba* <sup>$K5\Delta/K5\Delta$</sup>  Mäusen. Die Haut von Wildtyp Mäusen war weitgehend frei von Entzündungszellen.



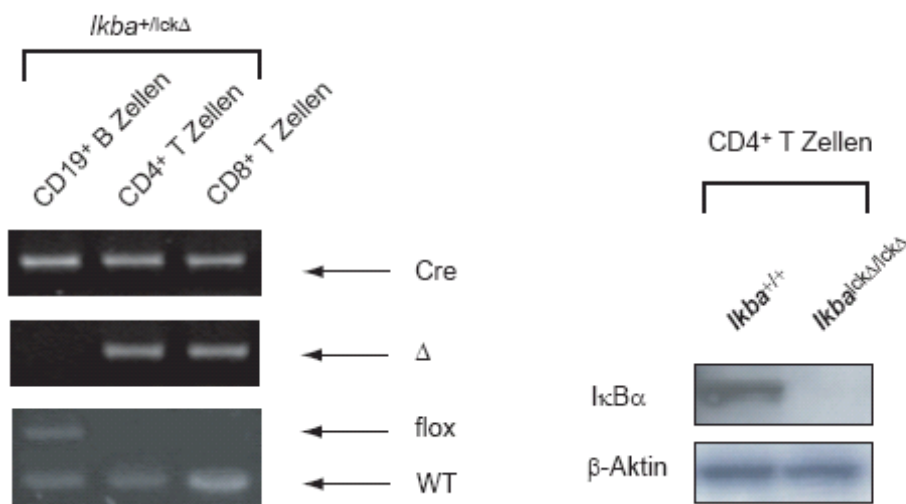
**Abb. 34** Entzündung in der Haut von *Ikba*<sup>Δ/Δ</sup> und *Ikba*<sup>K5Δ/K5Δ</sup>-Mäusen. Immunfärbungen von Hautschnitten mit T-Zell spezifischen-(CD3, CD4, CD8), Neutrophilen spezifischen (Gr-1) und makrophagenspezifischen-Antikörpern (F4/80) (grünes Signal).

Um herauszufinden, welche Rolle die T-Zellen bei der Entwicklung dieser entzündlichen Hauterkrankung in den *Ikba*<sup>Δ/Δ</sup>-Mäusen einnehmen, wurden *Ikba*<sup>Δ/Δ</sup> Mäuse mit *Rag2*<sup>-/-</sup>-Mäusen (Recombination Activating Gene), die keine reifen T- und B-Zellen entwickeln, verpaart. Die daraus resultierenden *Ikba*<sup>Δ/Δ</sup>*Rag2*<sup>-/-</sup>-Mäuse waren kleiner als gleichaltrige Wildtyp Mäuse. Die Haut war jedoch makroskopisch und histopathologisch unauffällig (Abb. 35). Ein weiterer Ansatz war die Verpaarung von *Ikba*<sup>fl/fl</sup> Mäusen mit T-Zellspezifischen Cre-Mäusen. Auch hier zeigte sich bei den Nachkommen (*Ikba*<sup>lckΔ/lckΔ</sup>) eine histopathologisch unauffällige Haut (Abb. 35).



**Abb. 35** HE-gefärbte Hautschnitte von *Ikba*<sup>Δ/Δ</sup>*Rag2*<sup>-/-</sup> (links), *Ikba*<sup>lckΔ/lckΔ</sup> (rechts) und Kontroll Mäusen.

Die Effizienz der Deletion von *Ikba* in *Ikba*<sup>lckΔ/lckΔ</sup> Mäusen war ausreichend. Es konnte kein IκBα Protein in diesen Mäusen nachgewiesen werden und in der PCR war nur die Deletionsbande detektierbar (Abb. 36).



**Abb. 36** T-Zell-spezifische Deletion von *Ikba* durch das *lck-cre*-Transgen. Nachweis mit PCR (links) und Western-Blot-Analyse (rechts). CD3<sup>+</sup> T-Zellen aus dem Thymus wurden durchflusszytometrisch aufgereinigt. B-Zellen dienen als Kontrolle für den Nachweis der Spezifität der Deletion.

Welche Rolle T-Zellen bei der Aufrechterhaltung der entzündlichen Hautveränderungen bei *Ikba*<sup>Δ/Δ</sup>- und *Ikba*<sup>K5Δ/K5Δ</sup> Mäusen zukommt, sollten Transplantationsexperimente zeigen. Hierzu wurde Haut von 6-Tage alten *Ikba*<sup>Δ/Δ</sup>, *Ikba*<sup>K5Δ/K5Δ</sup> und Wildtyp Mäusen auf *RAG2*<sup>-/-</sup> Mäuse übertragen. Die Haut wurde 4 Wochen nach der Transplantation histologisch untersucht. Es konnten keine Unterschiede zwischen *Ikba*<sup>Δ/Δ</sup>, *Ikba*<sup>K5Δ/K5Δ</sup> Transplantaten und Kontrolltransplantaten gefunden werden (Abb. 37).

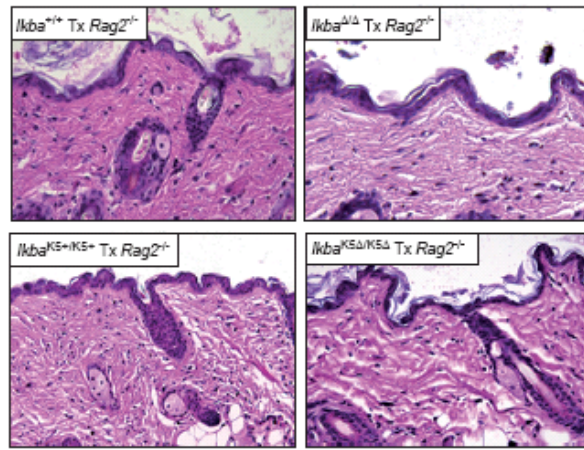


Abb. 37 HE-gefärbte Hautschnitte von  $Ikba^{\Delta/\Delta}TxRag2^{-/-}$ ,  $Ikba^{K5\Delta/K5\Delta}TxRag2^{-/-}$  und Wildtyp Mäusen.

### 3.9 Die psoriasisartige Entzündung ist abhängig von TNF und LT

Entzündetes Gewebe ist durch ein spezielles Milieu charakterisiert, das durch die Produktion proinflammatorischer Zytokine aufrechterhalten wird. Tumor Nekrose Faktor (TNF), Lymphotoxin  $\alpha$  ( $LT\alpha$ ) und Lymphotoxin  $\beta$  ( $LT\beta$ ) sind NF- $\kappa$ B regulierte Schlüsselmediatoren der Entzündung (Pahl, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass der TNF-Spiegel sowohl in psoriatischer Haut (Etehadhi et al., 1994) als auch im Serum von Psoriasis Patienten erhöht ist (Chodorowska, 1998). Eine Analyse des TNF-Spiegels im Serum von  $Ikba^{\Delta/\Delta}$ -Mäusen mittels ELISA zeigte einen 24fach höheren Spiegel im Vergleich zu Wildtyp Mäusen (Abb. 38).

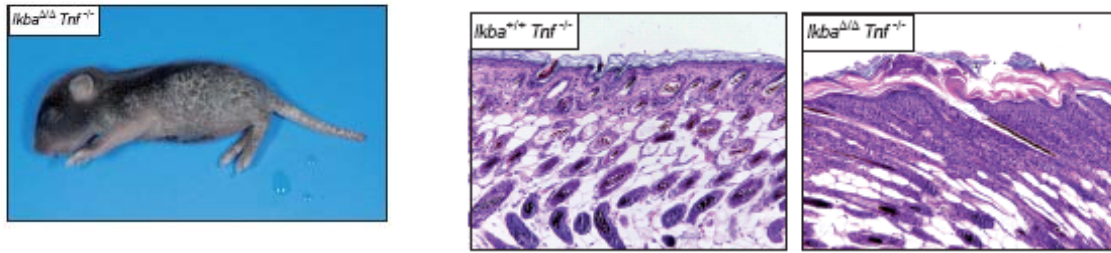
#### TNF Serumspiegel

	$Ikba^{+/+}$	$Ikba^{\Delta/\Delta}$	$Ikba^{f/f}$	$Ikba^{K5\Delta/K5\Delta}$
pg/ml	b.d.l.	24.22	b.d.l.	b.d.l.

b.d.l. = below detection limit

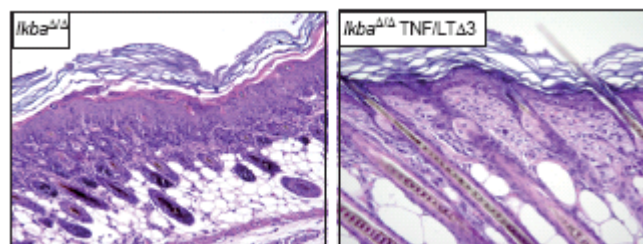
Abb. 38 TNF-Serumspiegel in  $Ikba^{\Delta/\Delta}$ ,  $Ikba^{K5\Delta/K5\Delta}$ ,  $Ikba^{f/f}$  und Wildtyp Mäusen.

Um den TNF-Signalweg zu unterbinden, wurden  $Ikba^{\Delta/\Delta}$  Mäusen mit TNF ( $Tnf^{-/-}$ ) bzw. p55/TNFR1- ( $Tnfr1^{-/-}$ ) defizienten Mäusen verpaart. Nachkommen, die sowohl für  $I\kappa$ B $\alpha$  defizient und darüber hinaus für p55/TNFR1 ( $Ikba^{\Delta/\Delta}Tnfr1^{-/-}$ ) bzw. für TNF ( $Ikba^{\Delta/\Delta}Tnf^{-/-}$ ) (Pasparakis et al., 1996) defizient waren, entwickelten eine Entzündung an der Haut (Abb. 39).

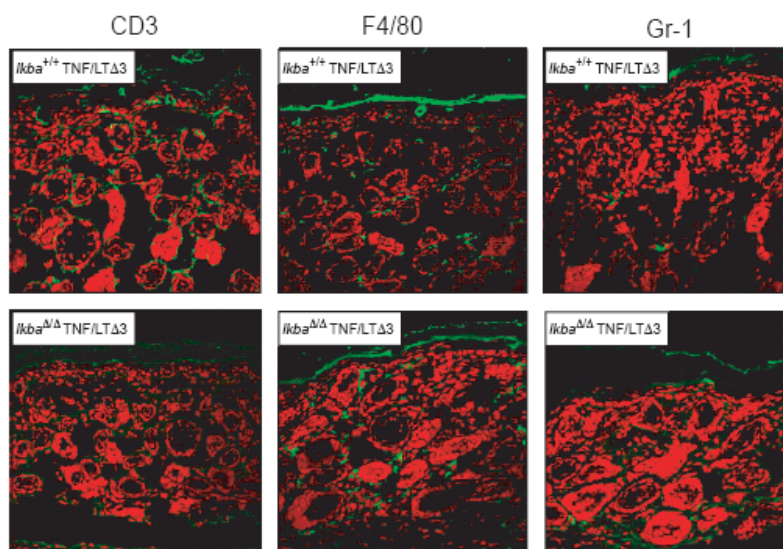


**Abb. 39** Der Psoriasisartige Phänotyp in *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> hängt nicht nur von TNF ab. Schuppung der Haut bei 5-Tage alten *Ikba*<sup>ΔΔ</sup>*Tnf*<sup>-/-</sup> Mäusen (links). Hautproben von *Ikba*<sup>ΔΔ</sup>*Tnf*<sup>-/-</sup> und Kontroll Mäusen wurden HE gefärbt (rechts).

Daher wurden *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> Mäuse mit Mäusen verpaart, die für TNF, LT $\alpha$  und LT $\beta$  (*TNF/LT $\Delta$ 3*) defizient sind. Die Haut dieser Tiere war makroskopisch und histologisch unauffällig. Der entzündliche Hautphänotyp war komplett aufgehoben (Abb. 40). Es war kein entzündliches Infiltrat in der Haut dieser Mäuse mehr nachweisbar (Abb. 41).



**Abb. 40** HE-gefärbte Hautschnitte von *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> und *Ikba*<sup>ΔΔ</sup>*TNF/LT $\Delta$ 3* Mäusen.

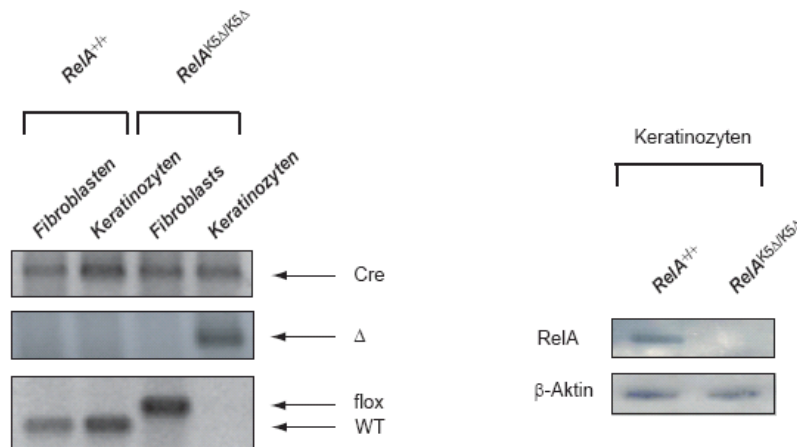


**Abb. 41** Immunfärbung von Hautproben von *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> und *Ikba*<sup>ΔΔ</sup>*TNF/LT $\Delta$ 3* Mäusen mit CD3, F4/80 und Gr-1 Antikörpern



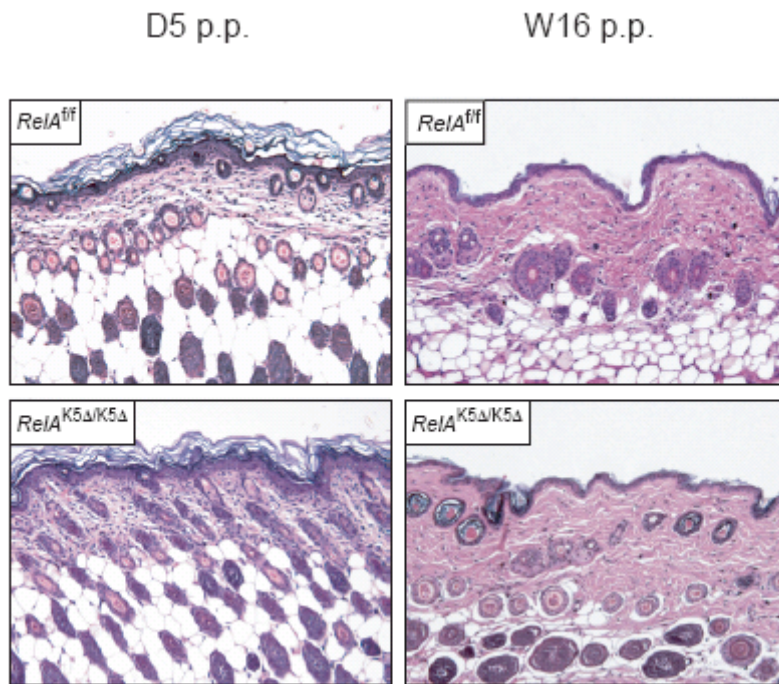
### 3.10 Epidermales RelA koordiniert epidermal-dermale Zellinteraktionen

Die transaktivierende NF- $\kappa$ B-Untereinheit, die in den *Ikba* <sup>$\Delta/\Delta$</sup> - und *Ikba* <sup>$K5\Delta/K5\Delta$</sup> -Keratinozyten aktiv war, konnte als p65/RelA-Untereinheit identifiziert werden. Um den Anteil von RelA bei der Entwicklung des inflammatorischen Phänotyps in *Ikba* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  und *Ikba* <sup>$K5\Delta/K5\Delta$</sup>  Mäusen genauer analysieren zu können, wurden Mäuse mit geflochten RelA-Allelen (*RelA*<sup>*fl/fl*</sup>) zunächst mit Keratin5-Cre2 Mäusen verpaart, um Mäuse zu generieren, bei denen RelA epidermisspezifische deletiert ist (Abb. 42).



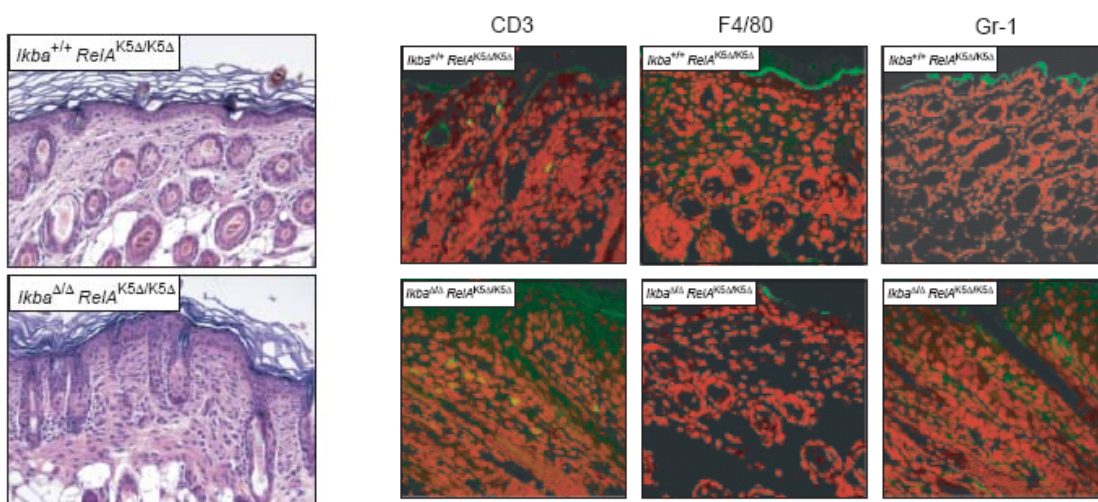
**Abb. 42** Epidermisspezifische Inaktivierung von *RelA* durch das *K5-cre2*-Transgen. Die Genotypisierung mittels PCR (links) und Western-Blot-Analyse (rechts) zeigte eine gewebespezifische Deletion von *RelA* in der Haut von 5-Tage alten Mäusen.

Mäuse mit epidermisspezifischer Deletion von RelA (*RelA* <sup>$K5\Delta/K5\Delta$</sup> ) waren phänotypisch unauffällig (Abb. 43). Weder Hautschnitte von 5-Tage alten, noch von 4-Monate alten *RelA* <sup>$K5\Delta/K5\Delta$</sup> -Mäusen zeigten irgendwelche Unterschiede zu den Kontrollmäusen.



**Abb. 43** Die Deletion von RelA hat weder bei neugeborenen Mäusen noch adulten Mäusen einen Einfluss auf die Homeostase. HE Färbung der Haut 5 Tage alter und 4 Monate alter *RelA<sup>K5Δ/K5Δ</sup>* und passender Kontroll Mäuse.

In *Ikba<sup>Δ/Δ</sup> RelA<sup>K5Δ/K5Δ</sup>* Doppelmutanten war der entzündliche, psoriasisartige Hautphänotyp komplett aufgehoben (Abb. 44).



**Abb. 44** HE-gefärbte Hautschnitte von *Ikba<sup>Δ/Δ</sup> RelA<sup>K5Δ/K5Δ</sup>* und Kontroll Mäusen; Immunfärbungen von Hautschnitten dieser Mäuse mit CD3-, F4/80- und Gr-1-Antikörpern.

Somit ist RelA essentiell für die Initiation der psoriasisartigen Entzündung in *Ikba<sup>Δ/Δ</sup>* Mäusen.

## 4. Diskussion

### 4.1 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Analyse des Phänotyps von konditionalen I $\kappa$ B $\alpha$  knockout-Mäusen. Hierbei standen zwei Aspekte des Phänotyps im Vordergrund, die bei ubiquitärer Deletion von I $\kappa$ B $\alpha$  auftreten. Zum einen sollte die Funktion von NF- $\kappa$ B bzw. I $\kappa$ B $\alpha$  im hämatopoetischen System näher charakterisiert werden. Insbesondere sollte der Mechanismus, der der Hypergranulopoese in konventionellen I $\kappa$ B $\alpha$  knockout-Mäusen zugrundeliegt, besser verstanden werden. Zum anderen sollte eine Analyse des Phänotyps an der Haut erfolgen. Schon früher publizierte I $\kappa$ B $\alpha$  knockout-Modelle beschrieben eine entzündliche psoriasisartige Hauterkrankung (Beg et al., 1995; Klement et al., 1996). In dieser Arbeit sollte die funktionelle Rolle von I $\kappa$ B $\alpha$  und RelA bei Entzündungsvorgängen näher untersucht werden. Es sollte insbesondere analysiert werden, inwieweit das Auftreten des psoriasisartigen Phänotyps auf dem Verlust von I $\kappa$ B $\alpha$  in den Keratinozyten oder dessen Defizienz in den inflammatorischen Zellen beruht. Hierzu sollte die Rolle von NF- $\kappa$ B bei der Interaktion zwischen Keratinozyten und T-Zellen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden für diese Untersuchungen konditionale I $\kappa$ B $\alpha$  bzw. RelA Mäuse verwendet. Dadurch ist es mittels des Cre/loxP-Rekombinationssystems möglich, *Ikba* nicht nur ubiquitär zu deletieren, sondern auch eine gewebespezifische Deletion von I $\kappa$ B $\alpha$  oder RelA vorzunehmen.

### 4.2 Bedeutung von *Ikba* in der fötalen Hämatopoese

Transgene Mäuse mit mutierten oder deletierten Komponenten der NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B-Familie haben gezeigt, wie wichtig die einzelnen Komponenten des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B mitsamt dem Inhibitormolekül I $\kappa$ B $\alpha$  für die Hämatopoese *in vivo* sind. Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit konnte zum erstenmal die Bedeutung von I $\kappa$ B $\alpha$  für die Regulation des Jagged/Notch Signalweges in der Myelopoese aufgezeigt werden. Der ubiquitäre Verlust der I $\kappa$ B $\alpha$  Expression in neugeborenen *Ikba* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  Mäusen führte zu einem Phänotyp in der Hämatopoese, welcher dem myelodysplastischen Syndrom (MDS) beim Menschen ähnelt. Im Gegensatz zu den *Ikba* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  Mäusen war die Myelopoese in *Ikba*<sup>my $\Delta$ /my $\Delta$</sup>  Mäusen nicht gestört, obwohl bei diesen Mäusen eine spezifische Deletion von *Ikba* in den neutrophilen Granulozyten und Makrophagen vorlag. Auch die Anzahl der myeloischen Vorläuferzellen war trotz konstitutiver Aktivierung von NF- $\kappa$ B in den neutrophilen Granulozyten unverändert. Das gleiche Ergebnis zeigte sich auch bei I $\kappa$ B $\alpha$ -defizienten fötalen Leberzellchimären. Das Ausbleiben eines MDS in *Ikba* <sup>$\Delta$ my/ $\Delta$ my</sup> und *Ikba*<sup>FL $\Delta$ /FL $\Delta$</sup>  Mäusen, die NF- $\kappa$ B konstitutiv in Gr1/Mac-1-

positiven Granulozyten und Makrophagen exprimieren, zeigt, dass das Fehlen von I $\kappa$ B $\alpha$  und die daraus resultierende NF- $\kappa$ B-Aktivierung in myelo-poetischen Zellen alleine nicht ausreicht, um eine Hypergranulopoese zu induzieren. Stattdessen verursachte sehr wahrscheinlich eine Fehlregulation im die Hämatopoese regulierenden Stroma die myeloproliferative Störung. Die phänotypischen Merkmale, die in dem hier vorgestellten Modell gefunden wurden, ähneln denen bei der chronischen myelomonozytischen Leukämie (CMML) in der Gruppe der nicht-klassifizierbaren myelodysplastischen/myeloproliferativen Erkrankungen (MDS/MPD) mit sekundärer akuter myeloischer Leukämie (2° AML) entsprechend den WHO Klassifikationsrichtlinien für Tumore hämatopoetischen und lymphatischen Ursprungs (Jaffe et al., 2001). In der Gruppe unklassifizierbarer MDS/MDP wurden bisher keine spezifischen zytogenetischen oder molekulargenetischen Veränderungen beschrieben. Die hier beschriebenen Ergebnisse deuten auf eine Mutation im *I $\kappa$ ba*-Lokus hin. Eine Vielzahl transgener Mausmodelle wurde bisher für das humane MDS generiert. In diesen Modellen entsteht das MDS zellautonom auf Grundlage bisher nachgewiesener Mutationen in humanen MDS Zellen. So wurden in humanen MDS-Zellen Genmutationen im Rezeptortyrosinkinase FLT3-Gen (Kelly et al., 2002) sowie in Genen, die für den Transkriptionsfaktor C/EBP $\alpha$  kodieren (Gombart et al., 2002), entdeckt. Aber auch die Überexpression des Zellzyklusmoleküls Cyclin A1 (Liao et al., 2001) sowie das Nukleoporin Homeoboxprotein NUP98-HOXA9 Fusionsprotein (Kroon et al., 2001) oder das virale SV40 große T-Antigen (Inoue et al., 1994) wurden mit der zellautonomen Entstehung des MDS in Verbindung gebracht. Bei den MDS/MPD des Menschen, besonders der CMML und der atypischen CML zeigen sich zahlreiche zytogenetische Abweichungen einschließlich +8, -7del (7q) und strukturelle Abweichungen in 12p, sowie Fusionsgene wie TEL/PDGFB $\beta$ R. Diese entstehen aber möglicherweise erst im Verlauf der Erkrankung.

Die Bedeutung des Knochenmarkstromas für die Entwicklung des MDS wird unterschiedlich bewertet (Deeg et al., 2002). Während Aizawa und Mitarbeiter (Aizawa et al., 1999) von einer MDS-Entwicklung mit einer refraktären Anämie auf Knochenmarkstroma berichten, welches nicht in der Lage ist, die hämatopoetische Proliferation und Differenzierung *in vitro* zu unterstützen, haben Deeg und Mitarbeiter (Deeg et al., 2000) gezeigt, dass Knochenmark mit MDS keinen inhibitorischen Effekt auf die hämatopoetische Klonalität ausübt.

### 4.3 Die Rolle von Jagged1 bei der Regulation der Myelopoese

Der Notch1 Ligand Jagged1 wird während der Embryogenese am Tag E12 in der Leber von Wildtyp und *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> Mäusen exprimiert. Die Hämatopoese in der Maus hat ihren Ursprung im Dottersack. Erst am Tag E12 wird sie in die Leber verlagert. Daher kann man annehmen, dass dem Jagged1-Liganden eine Rolle bei der Regulation der Hämatopoese in der fötalen Leber zukommt. Der Umstand, dass in den *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> Mäusen die persistente Jagged1-Expression mit einer verstärkten Myelopoese einhergeht, weist auf die Myelopoese induzierende Funktion von Jagged1 hin. Die Zunahme an Ter-119 positiven Erythroblasten, zeigt, wie wichtig Jagged1 *in vivo* für die Erythropoese ist. Da IκBα das physiologische Inhibitorprotein zu NF-κB ist, aber NF-κB in dieser Untersuchung konstitutiv in den Hepatozyten von *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> Mäusen exprimiert wird, ist NF-κB möglicherweise an der Regulation von Jagged1-Expression in der fötalen Leber beteiligt. Die Induktion der Jagged1-Transkripte durch die NF-κB-Untereinheiten c-Rel und RelA wurde *in vitro* gezeigt (Bash et al., 1999). Inwieweit der Einfluß von NF-κB auf die Jagged1-Expression auf direktem oder indirektem Wege erfolgt, ist noch nicht geklärt worden.

Notch-Proteine regulieren Differenzierungsvorgänge während der fötalen und postnatalen Entwicklung (Milner and Bigas, 1999; Radtke et al., 2004). Die Charakterisierung der Gr1/Mac-1-positiven Granulozyten von *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> Mäusen ergab eine deutliche Erhöhung der Notch1-Rezeptor Expression. Der in dieser Untersuchung gemachte Befund, dass Notch1 konstitutiv in Gr-1/Mac-1-positiven Granulozyten hochreguliert und aktiviert ist und zudem im Kontext mit einer Hypergranulopoese in *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> Mäusen steht, unterstützt das Konzept von Notch1 als einen Aktivator der Myelopoese. Die Zunahme von *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> CFU-GEMMs (aus Knochenmark stammend) sowie die Zunahme von Gr-1/Mac-1-positiven Granulozyten in der Leber und im Knochenmark von *Ikba*<sup>ΔΔ</sup> Mäusen zeigten, dass Notch1 die Myelopoese in einem frühen Vorläuferstadium kontrolliert. Eine verstärkte Transkription von *Hes1*, einem Zielgen von Notch1, wurde in Gr-1/Mac-1 positiven Granulozyten IκBα-defizienter Mäuse nachgewiesen. Die Überexpression des Notch1 basic Helix-Loop-Helix Zielgens *Hes1* weist darauf hin, dass Notch1 aktiviert wurde und fördert das Konzept, dass *Hes1* ein relevanter Faktor bei der Differenzierung in der Hämatopoese ist (Kawamata et al., 2002; Tan-Pertel et al., 2000). Die sich widersprechenden Ergebnisse in unterschiedlichen *ex vivo* und *in vitro* Untersuchungen können durch die Verwendung unterschiedlicher Co-Kultivierungsbedingungen, Wachstumsfaktoren und Notch1/Jagged1 exprimierenden Zelllinien und Expressionsvektoren bedingt sein. Zusätzlich zur wachstumsfördernden Kapazität sehr früher hämatopoetischer Vorläuferzellen durch Jagged1 (Jones et al., 1998; Karanu et al., 2000; Varnum-Finney

et al., 2000) konnte in einem *in vivo* Model gezeigt werden, dass mit konstitutiv aktivem Notch1 modifizierte hämatopoetische Stammzellen zu myeloischen und lymphatischen Zellen weiterdifferenzieren können (Stier et al., 2002; Varnum-Finney et al., 2000). Im Gegensatz zu den zuvor publizierten *in vivo* und *in vitro* Modellen kommt es in  $Ikba^{\Delta/\Delta}$  Mäusen zu einer konstitutiven Notch1-Expression, ohne dass Notch1 genetisch modifiziert wurde oder Zellen oder Zelllinien mit Expressionsvektoren transfiziert wurden. Das hier vorgestellte Mausmodell zeigt, dass eine konstitutive Überexpression von intaktem Notch1 zu einer Myelodysplasie führt, die dann zu einer sekundären akuten myeloischen Leukämie fortschreiten kann. Nichtsdestotrotz ist es sehr wahrscheinlich, dass zusätzliche Liganden an dem die Hämatopoese regulierenden Stroma, die direkt oder indirekt durch den NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$ -Signalweg reguliert werden, an der Entstehung dieses Phänotyps beteiligt sind. Die Tatsache, dass G-CSF gleich stark in der Leber und im Knochenmark von Wildtyp und I $\kappa$ B $\alpha$  knockout Mäusen exprimiert wird, lässt darauf schließen, dass die Hypergranulopoese in den  $Ikba^{\Delta/\Delta}$  Mäusen nicht durch eine Überexpression von G-CSF verursacht wird, wie es zuvor von der Arbeitsgruppe um Beg angenommen worden war (Beg et al., 1995). Eine erhöhte Notch1-Expression konnte auch in Zelllinien, die aus Patienten mit einer akuten myeloiden Leukämie isoliert wurden, nachgewiesen werden (Tohda and Nara, 2001). Parallel zu dieser erhöhten Notch1-Expression fand man eine Hochregulierung der Jagged1-Expression in leukämischen Zellen. Da Jagged1 nicht in Gr1/Mac-1-positiven Granulozyten, die aus  $Ikba^{\Delta/\Delta}$ - und  $Ikba^{FL/\Delta}$  Mäusen isoliert wurden, exprimiert wurde, scheint Jagged1 für die Ausbildung und Entwicklung eines MDS in diesem Mausmodell nicht von Bedeutung zu sein.

Die konstitutive Expression von Notch1 ist mit der Entwicklung von T-Zell-Leukämien assoziiert worden. Der Grund weshalb hier die Entwicklung einer T-Zell Neoplasie in diesem Mausmodell nicht beobachtet werden konnte, kann an der kurzen Lebensdauer der  $Ikba^{\Delta/\Delta}$  Mäuse liegen. Andererseits ist ein weiterer Notch-Ligand, Delta1, der sich von Jagged1 unterscheidet, sehr wichtig für die T-Zellentwicklung (Schmitt and Zuniga-Pflucker, 2002).

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die verstärkte Expression des IL-3 Rezeptors in  $Ikba^{\Delta/\Delta}$  Gr1/Mac-1 Granulozyten für die erhöhte Anzahl an Vorläuferzellen verantwortlich ist. In  $Ikba^{my\Delta/my\Delta}$  Mäusen mit einer spezifischen Deletion von I $\kappa$ B $\alpha$  in Granulozyten und Makrophagen sowie in  $Ikba^{FL/\Delta}$  Mäusen wurde keine erhöhte Expression des IL-3 Rezeptors nachgewiesen. Folglich kann die IL-3R Transkription auch direkt oder indirekt durch die Jagged1-Expression in Hepatozyten induziert werden.

#### 4.4 Epidermales RelA als Vermittler von Keratinozyten-T-Zell Interaktionen in der psoriasisartigen Hauterkrankung *Ikba*-defizienter Mäuse

Die Psoriasis ist eine Entzündung der Haut, der eine gestörte Interaktion zwischen Keratinozyten und Entzündungszellen zugrunde liegt (Bowcock and Krueger, 2005). Ob die Entzündung primär von den epidermalen Keratinozyten oder inflammatorischen Zellen, hier werden vor allem T-Zellen diskutiert, ausgeht, ist zurzeit umstritten. Bisher publizierte Mausmodelle entstanden entweder auf der Grundlage einer T-Zell-vermittelten Autoimmunreaktion oder basierten auf induzierbaren Störungen in Signalwegen von Keratinozyten. So wurden inflammatorische Mediatoren wie TNF (Cheng et al., 1992), IFN- $\gamma$  (Carroll et al., 1997), Integrine ( $\beta 1, \alpha 2 \beta 1, \alpha 5 \beta 1$ ) (Carroll et al., 1995), Stat3 (Sano et al., 2005) in Keratinozyten überexprimiert oder T-Zellen transplantiert (Schön et al., 1997). Transplantationsexperimente suggerierten eine zentrale Rolle für T-Zellen für die Pathogenese der Psoriasis (Boyman et al., 2004; Schön et al., 1997). Weitere Arbeiten deuten auf einen Makrophagen- oder T-Zell-unabhängigen Mechanismus bei der Entstehung der Psoriasis hin (Pasparakis et al., 2002; Zenz et al., 2005). Bei der *Ikba* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  Maus muss im Gegensatz zu den bisher publizierten Modellen die Mutation sowohl in den Entzündungszellen als auch in den Keratinozyten vorliegen, damit sich der psoriasisartige Phänotyp entwickeln kann. T-Zellen nehmen eine zentrale Rolle hierbei ein. Das konnte im RAG-2-defizienten Hintergrund und mittels Transplantation erkrankter Haut auf RAG-2-defiziente Mäuse gezeigt werden. Inwieweit die Defizienz von *I $\kappa$ B $\alpha$*  in Makrophagen und/oder neutrophilen Granulozyten ebenfalls für die Entstehung des Phänotyps notwendig ist, kann hier nicht endgültig beantwortet werden.

Zahlreichen NF- $\kappa$ B regulierten Genen kommt eine Schlüsselstellung bei der Entstehung von Entzündungsprozessen zu, so dass bei einer Manipulation der Aktivität von NF- $\kappa$ B Untereinheiten bzw. NF- $\kappa$ B Inhibitoren eine Vielzahl von Genen betroffen ist. Die spezifische Deletion von *I $\kappa$ B $\alpha$*  in unterschiedlichen Kompartimenten ermöglicht es, die Relevanz von NF- $\kappa$ B in diesen Kompartimenten für die Entstehung des Phänotyps in *Ikba* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  Mäusen herauszuarbeiten. Wurde *I $\kappa$ B $\alpha$*  epidermisspezifisch deltiert, war die epidermale Beteiligung im Vergleich zu *Ikba* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  Mäusen deutlich verändert. Es fehlte die Infiltration von T-Zellen und neutrophilen Granulozyten. Keratin 6 wurde nicht epidermal exprimiert. Die Parakeratose fehlte und das Stratum granulosum war normal ausgebildet. Eine konstitutive NF- $\kappa$ B-Aktivierung in der Epidermis von *Ikba* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  und *Ikba* <sup>$K5\Delta/K5\Delta$</sup>  Mäusen führte zu einer verstärkten Expression der chemotaktischen Proteine KC und MIP-2 (IL-8 beim Menschen), die wahrscheinlich für die Einwanderung inflammatorischer Zellen in die Dermis verantwortlich sind. Da das Infiltrat in seiner Stärke und Zusammensetzung zwischen *Ikba* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  und *Ikba* <sup>$K5\Delta/K5\Delta$</sup>

Mäusen nicht zu unterscheiden war, ist die fehlende Deletion in den T-Zellen, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten wahrscheinlich für diesen Unterschied verantwortlich. Die Beteiligung weiterer Gewebe, wie beispielsweise dem Gefäßendothel, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Mittels quantitativer PCR konnte ein starker Unterschied in der Expression von IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  zwischen der Haut von *Ikba* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  Mäusen und der Haut von *Ikba*<sup>K5 $\Delta$ /K5 $\Delta$</sup>  Mäusen nachgewiesen werden. Von IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  ist bekannt, dass sie eine Hautentzündung triggern und die Expression von Keratin 6 induzieren können.

In dem hier vorgestellten Modell ist die gestörte epidermal-dermale Interaktion eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung einer psoriatischen Entzündung. Beim Menschen gibt es Hinweise dafür, dass eine gestörte Interaktion tatsächlich vorliegt. So gibt es Fallberichte, bei denen nach Knochenmarktransplantation bei Patienten, die an einer Psoriasis litten, diese sich zurückbildete (Eedy et al., 1990; Kanamori et al., 2002; Kishimoto et al., 1997; Yin and Jowitt, 1992).

Die Rolle von RelA in der epidermalen Homeostase wird kontrovers diskutiert. So zeigte die Arbeitsgruppe um Seitz und Mitarbeiter (Seitz et al., 1998), dass eine dominante NF- $\kappa$ B Inhibition mit einer epidermalen Hyperproliferation einhergeht. Hierfür wurde ein IkB $\alpha$  Superrepressor in der Haut exprimiert, bei dem IkB $\alpha$  so modifiziert wurde, dass Ser32 und Ser36 gegen Alanin ausgetauscht wurden und IkB $\alpha$  nicht mehr degradiert werden kann. Eine Hyperproliferation ist auch bei Transplantation von RelA-defizienter embryonaler Haut zu beobachten (Zhang et al., 2004). Bei dieser Haut ist RelA sowohl in der Epidermis als auch in der Dermis deletiert. In der hier vorgestellten Arbeit hingegen wurde RelA epidermisspezifisch deletiert. Hierbei zeigte sich keine Veränderung der epidermalen Homeostase.

In dem IkB $\alpha$ -defizienten Hintergrund wurde der psoriatische Phänotyp durch die zusätzliche epidermisspezifische Deletion von RelA vollständig aufgehoben. Der Aktivierung von NF- $\kappa$ B in der Epidermis scheint somit eine essentielle Rolle bei der Initiierung dieser Entzündung zuzukommen. Die Rolle von RelA bei der Pathogenese der Psoriasis des Menschen wird zurzeit noch kontrovers diskutiert. Während eine Arbeitsgruppe eine RelA Aktivität bei der Psoriasis negiert (Westergaard et al., 2003), impliziert eine erst kürzlich erschienene Studie eine RelA-Aktivierung bei der Psoriasis. Dort fand man eine positive Färbung von phosphoryliertem RelA in der psoriatischen Haut vor (Lizzul et al., 2005).

Sogenannte TNF-Blocker werden neuerdings als Therapeutika zur Behandlung der Psoriasis eingesetzt (Koo and Khera, 2005). In dem hier vorgestellten Modell konnte gezeigt werden, dass zusätzlich zu TNF LT $\alpha$  und LT $\beta$  wichtige Mediatoren bei der Pathogenese sind. LT $\alpha$  bildet Homotrimere aus und leitet seine Signale über den p55/TNFR1 und p75/TNFR2



weiter. Zusammen mit  $LT\beta$  bildet es Heterotrimere und vermittelt seine Signalwirkung über den  $LT\beta$ -Rezeptor (Pfeffer, 2003). Nur in einem Triple-Knockout-Hintergrund für *Tnf*, *LTa* und *LTb* war die Entwicklung dieses Hautphänotyps effizient gehemmt.

## 5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der myelo-poetische Phänotyp und sowie der Hautphänotyp, der bei Mäusen mit ubiquitärer Deletion von I $\kappa$ B $\alpha$  (*Ikba* <sup>$\Delta\Delta$</sup> ) zu beobachten ist, mit Hilfe konditiona-ler I $\kappa$ B $\alpha$  knockout Mäuse disseziert, um den Pathomechanismus, der diesen Veränderungen zugrunde liegt, besser zu verstehen. Mäuse mit ubiquitärer Deletion von I $\kappa$ B $\alpha$  entwickeln eine hyperproliferative Form einer Myelodysplasie, die bereits in der Embryogenese beginnt. Durch spezifische Deletion von I $\kappa$ B $\alpha$  in der Myelopoese und mit fötalen Leberzellchimären konnte ausgeschlossen werden, dass der Verlust von I $\kappa$ B $\alpha$  in der Myelopoese allein zur Ent-wicklung dieses Phänotyps ausreichend ist. Als wesentlicher Mechanismus, der zur Entwick- lung dieser myeloproliferativen/myelodysplastischen Erkrankung beiträgt, konnte eine perina- tale Expression von Jagged1 in *Ikba* <sup>$\Delta\Delta$</sup>  Hepatozyten festgestellt werden. Die verstärkte Jag- ged1-Expression korrelierte mit einer konstitutiven Aktivierung von Notch1 in neutrophilen Granulozyten aus *Ikba* <sup>$\Delta\Delta$</sup>  Mäusen. Dass Jagged1 als Auslöser dieser myeloproliferati- ven/myelodysplastischen Erkrankung in Frage kommt, zeigten Co-Kultivierungsversuche von *Ikba* <sup>$\Delta\Delta$</sup>  Hepatozyten mit hämatopoetischen Zellen aus Wildtyp Mäusen. Hier kam es zu einer Jagged1-induzierten Zunahme an CFU-GEMMs. Die Proliferation myeloischer Zellen konnte durch eine Blockierung des Notch-Liganden Jagged1 mittels eines Jagged1 spezifischen An- tikörpers inhibiert werden. Im Gegensatz zu Mäusen mit ubiquitärer Deletion von I $\kappa$ B $\alpha$ , konnte in Mäusen mit spezifischer Deletion von I $\kappa$ B $\alpha$  in der myeloischen Linie und in fötalen Leberzellchimären keine zellautonome Induktion einer myeloproliferativen Erkrankung beobachtet werden. Die Myelopoese war in diesen Mäusen unauffällig. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine prämaligne hämatopoetische Störung mit konsekutiver Transforma- tion durch eine Fehlregulation von NF- $\kappa$ B und Jagged1 im die Hämatopoese regulierenden Stroma entstehen kann.

Bei der Untersuchung des Hautphänotyps führte ein ubiquitärer Verlust von I $\kappa$ B $\alpha$  bei neuge- borenen Mäusen zu einer Rötung und Schuppung der Haut. Genauere histologische Analysen ließen eine entzündliche Hauterkrankung mit einem psoriasisartigen Phänotyp erkennen. Ne- ben einer Akanthose in der Epidermis mit fokaler Parakeratose fanden sich auch intraepider- male und subcorneale Pustelbildung sowie entzündliche zelluläre Infiltrate in der Dermis. Das entzündliche Infiltrat bestand vorwiegend aus T-Zellen, neutrophilen Granulozyten und Makrophagen. Kennzeichnend für die entzündliche und hyperproliferative Epidermis der

I $\kappa$ B $\alpha$ -defizienten Mäuse war eine verstärkte Expression von Keratin 6. NF- $\kappa$ B war in *Ikba* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  Keratinozyten konstitutiv aktiv.

Um den Beitrag der Keratinozyten und der T-Zellen für die Entstehung dieses Phänotyps herauszuarbeiten, wurden Mäuse mit gefloxtem *Ikba* Gen mit K5-Cre und I $\kappa$ C-Cre Mäusen verpaart, die eine Keratinozyten bzw. T-Zell spezifische Deletion von I $\kappa$ B $\alpha$  ermöglichen. Mäuse mit epidermisspezifischer Deletion von *Ikba* (*Ikba*<sup>K5 $\Delta$ /K5 $\Delta$</sup> ) entwickelten eine Entzündung, die sich morphologisch von der bei *Ikba* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  Mäusen unterschied. Es fehlten die epidermalen Mikroabszesse, die Verhornung war ortho- und nicht parakeratotisch und die K6 Expression in der Epidermis fehlte. Die Zusammensetzung des entzündlichen Infiltrats in der Dermis von *Ikba* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  und *Ikba*<sup>K5 $\Delta$ /K5 $\Delta$</sup>  Mäusen war immunhistochemisch nicht voneinander zu unterscheiden. Mäuse mit T-Zell spezifischer Deletion von *Ikba* (*Ikba*<sup>I $\kappa$ C $\Delta$ /I $\kappa$ C $\Delta$</sup> ) entwickelten keinen Phänotyp in der Haut. Die Bedeutung von T-Zellen für die Entstehung und Erhaltung des Phänotyps zeigte sich in Experimenten mit RAG2 defizienten Mäusen, die keine reifen T- und B-Zellen entwickeln. B-Zellen spielen bei der Pathogenese der Psoriasis wahrscheinlich keine Rollen. *Ikba* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  Mäuse im RAG2-defizienten Hintergrund entwickeln keinen Phänotyp in der Haut. Wird erkrankte Haut von *Ikba* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  Mäusen oder *Ikba*<sup>K5 $\Delta$ /K5 $\Delta$</sup>  Mäusen auf RAG2 defiziente Mäuse transplantiert, bildet sich die Entzündung vollständig zurück. Die Bedeutung von TNF sowie Lymphotoxin  $\alpha$  (LT $\alpha$ ) und  $\beta$  (LT $\beta$ ) wurde mit Hilfe von Mäusen herausgearbeitet, die defizient für TNF bzw. TNF und LT $\alpha$  und  $\beta$  sind. Die NF- $\kappa$ B Untereinheit RelA in den Keratinozyten nimmt eine Schlüsselstellung bei der Pathogenese der psoriasisartigen Entzündung ein. Die epidermisspezifische Deletion von RelA hat in einem I $\kappa$ B $\alpha$  defizienten Hintergrund (*Ikba* <sup>$\Delta/\Delta$</sup> RelA<sup>K5 $\Delta$ /K5 $\Delta$</sup> ) ein vollständiges Aufheben der psoriasisartigen Entzündung zur Folge. Somit ist die Deletion von I $\kappa$ B $\alpha$  in Keratinozyten und T-Zellen für die Ausbildung der psoriasisartigen Entzündung entscheidend. Sie geht sehr wahrscheinlich aber von den Keratinozyten aus. Das hier vorgestellte Modell integriert somit die beiden bisher in der Literatur vorherrschenden Anschauungen dahingehend, dass nicht die Keratinozyten oder T-Zellen allein entscheidend für die Entwicklung einer psoriasisartigen Entzündung sind, sondern beide. Die Entzündung scheint diesem Modell zur Folge aber von den Keratinozyten auszugehen.

## 6. Literaturverzeichnis

- Aizawa, S., Nakano, M., Iwase, O., Yaguchi, M., Hiramoto, M., Hoshi, H., Nabeshima, R., Shima, D., Handa, H., and Toyama, K. (1999). Bone marrow stroma from refractory anemia of myelodysplastic syndrome is defective in its ability to support normal CD34-positive cell proliferation and differentiation in vitro. *Leuk Res* 23, 239-246.
- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I. L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404, 193-197.
- Anderson, K. L., Smith, K. A., Pio, F., Torbett, B. E., and Maki, R. A. (1998). Neutrophils deficient in PU.1 do not terminally differentiate or become functionally competent. *Blood* 92, 1576-1585.
- Arenzana-Seisdedos, F., Thompson, J., Rodriguez, M. S., Bachelier, F., Thomas, D., and Hay, R. T. (1995). Inducible nuclear expression of newly synthesized I $\kappa$ B $\alpha$  negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF- $\kappa$ B. *Mol Cell Biol* 15, 2689-2696.
- Arenzana-Seisdedos, F., Turpin, P., Rodriguez, M., Thomas, D., Hay, R. T., Virelizier, J. L., and Dargemont, C. (1997). Nuclear localization of I $\kappa$ B $\alpha$  promotes active transport of NF- $\kappa$ B from the nucleus to the cytoplasm. *J Cell Sci* 110, 369-378.
- Arsura, M., Mercurio, F., Oliver, A. L., Thorgeirsson, S. S., and Sonenshein, G. E. (2000). Role of the I $\kappa$ B kinase complex in oncogenic Ras- and Raf-mediated transformation of rat liver epithelial cells. *Mol Cell Biol* 20, 5381-5391.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D., and Lake, R. J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284, 770-776.
- Artavanistsakonas, S., Matsuno, K., and Fortini, M. E. (1995). Notch signalling. *Science* 268, 225-232.
- Aster, J. C., and Pear, W. S. (2001). Notch signaling in leukemia. *Curr Opin Hematol* 8, 237-244.
- Bauerle, P. A., and Baltimore, D. (1996). NF- $\kappa$ B: ten years after. *Cell* 87, 13-20.
- Baldwin, A. S., Jr. (1996). The NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 14, 649-683.
- Bargou, R. C., Emmerich, F., Krappmann, D., Bommert, K., Mapara, M. Y., Arnold, W., Royer, H. D., Grinstein, E., Greiner, A., Scheidereit, C., and Dorken, B. (1997). Constitutive nuclear factor- $\kappa$ B-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest* 100, 2961-2969.
- Barkett, M., and Gilmore, T. D. (1999). Control of apoptosis by Rel/NF- $\kappa$ B transcription factors. *Oncogene* 18, 6910-6924.
- Bash, J., Zong, W. X., Banga, S., Rivera, A., Ballard, D. W., Ron, Y., and Gelinas, C. (1999). Rel/NF- $\kappa$ B can trigger the Notch signaling pathway by inducing the expression of Jagged1, a ligand for Notch receptors. *EMBO J* 18, 2803-2811.
- Beg, A. A., Sha, W. C., Bronson, R. T., and Baltimore, D. (1995). Constitutive NF- $\kappa$ B activation, enhanced granulopoiesis, and neonatal lethality in I $\kappa$ B- $\alpha$ -deficient mice. *Genes Dev* 9, 2736-2746.
- Bell, S., Degitz, K., Quirling, M., Jilg, N., Page, S., and Brand, K. (2003). Involvement of NF- $\kappa$ B signalling in skin physiology and disease. *Cell Signal* 15, 1-7.
- Bellavia, D., Campese, A. F., Alesse, E., Vacca, A., Felli, M. P., Balestri, A., Stoppacciaro, A., Tiveron, C., Tatangelo, L., Giovarelli, M., *et al.* (2000). Constitutive activation of NF- $\kappa$ B and T-cell leukemia/lymphoma in Notch3 transgenic mice. *EMBO J* 19, 3337-3348.
- Bender, K., Gottlicher, M., Whiteside, S., Rahmsdorf, H. J., and Herrlich, P. (1998). Sequential DNA damage-independent and -dependent activation of NF- $\kappa$ B by UV. *EMBO J* 17, 5170-5181.
- Berger, C., Brousset, P., McQuain, C., and Knecht, H. (1997). Deletion variants within the NF- $\kappa$ B activation domain of the LMP1 oncogene in acquired immunodeficiency syndrome-related large cell lymphomas, in pre-lymphomas and atypical lymphoproliferations. *Leuk Lymphoma* 26, 239-250.
- Bigas, A., Martin, D. I., and Milner, L. A. (1998). Notch1 and Notch2 inhibit myeloid differentiation in response to different cytokines. *Mol Cell Biol* 18, 2324-2333.
- Bos, J. D., and De Rie, M. A. (1999). The pathogenesis of psoriasis: immunological facts and speculations. *Immunol Today* 20, 40-46.
- Bowcock, A. M., and Krueger, J. G. (2005). Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. *Nat Rev Immunol* 5, 699-711.
- Boyman, O., Hefti, H. P., Conrad, C., Nickoloff, B. J., Suter, M., and Nestle, F. O. (2004). Spontaneous development of psoriasis in a new animal model shows an essential role for resident T cells and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Exp Med* 199, 731-736.
- Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J. R., Cumano, A., Roux, P., Black, R. A., and Israel, A. (2000). A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell* 5, 207-216.

Burkly, L., Hession, C., Ogata, L., Reilly, C., Marconi, L. A., Olson, D., Tizard, R., Cate, R., and Lo, D. (1995). Expression of *relB* is required for the development of thymic medulla and dendritic cells. *Nature* 373, 531-536.

Cabannes, E., Khan, G., Aillet, F., Jarrett, R. F., and Hay, R. T. (1999). Mutations in the *ikba* gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for I $\kappa$ B $\alpha$ . *Oncogene* 18, 3063-3070.

Cao, Y., Bonizzi, G., Seagroves, T. N., Greten, F. R., Johnson, R., Schmidt, E. V., and Karin, M. (2001). IKK $\alpha$  provides an essential link between RANK signaling and cyclin D1 expression during mammary gland development. *Cell* 107, 763-775.

Carlesso, N., Aster, J. C., Sklar, J., and Scadden, D. T. (1999). Notch1-induced delay of human hematopoietic progenitor cell differentiation is associated with altered cell cycle kinetics. *Blood* 93, 838-848.

Carroll, J. M., Crompton, T., Seery, J. P., and Watt, F. M. (1997). Transgenic mice expressing IFN- $\gamma$  in the epidermis have eczema, hair hypopigmentation, and hair loss. *J Invest Dermatol* 108, 412-422.

Carroll, J. M., Romero, M. R., and Watt, F. M. (1995). Suprabasal integrin expression in the epidermis of transgenic mice results in developmental defects and a phenotype resembling psoriasis. *Cell* 83, 957-968.

Cheng, J., Turksen, K., Yu, Q. C., Schreiber, H., Teng, M., and Fuchs, E. (1992). Cachexia and graft-vs.-host-disease-type skin changes in keratin promoter-driven TNF $\alpha$  transgenic mice. *Genes Dev* 6, 1444-1456.

Chodorowska, G. (1998). Plasma concentrations of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in psoriatic patients before and after local treatment with dithranol ointment. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 10, 147-151.

Chu, Z. L., DiDonato, J. A., Hawiger, J., and Ballard, D. W. (1998). The tax oncoprotein of human T-cell leukemia virus type 1 associates with and persistently activates I $\kappa$ B kinases containing IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ . *J Biol Chem* 273, 15891-15894.

Clausen, B. E., Burkhardt, C., Reith, W., Renkawitz, R., and Förster, I. (1999). Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res* 8, 265-277.

De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Schrijvers, V., Wolfe, M. S., Ray, W. J., *et al.* (1999). A presenilin-1-dependent  $\gamma$ -secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 398, 518-522.

Deeg, H. J., Beckham, C., Loken, M. R., Bryant, E., Lesnikova, M., Shulman, H. M., and Gooley, T. (2000). Negative regulators of hemopoiesis and stroma function in patients with myelodysplastic syndrome. *Leuk Lymphoma* 37, 405-414.

Deeg, H. J., Beckham, C., Loken, M. R., Bryant, E., Lesnikova, M., Shulman, H. M., and Gooley, T. (2002). Marrow stroma in MDS: culprit or bystander? Negative regulators of hemopoiesis and stroma function in patients with myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* 26, 687-688.

DiDonato, J. A., Hayakawa, M., Rothwarf, D. M., Zandi, E., and Karin, M. (1997). A cytokine-responsive I $\kappa$ B kinase that activates the transcription factor NF- $\kappa$ B. *Nature* 388, 548-554.

Duffey, D. C., Chen, Z., Dong, G., Ondrey, F. G., Wolf, J. S., Brown, K., Siebenlist, U., and Van Waes, C. (1999). Expression of a dominant-negative mutant inhibitor- $\kappa$ B $\alpha$  of nuclear factor- $\kappa$ B in human head and neck squamous cell carcinoma inhibits survival, proinflammatory cytokine expression, and tumor growth in vivo. *Cancer Res* 59, 3468-3474.

Eedy, D. J., Burrows, D., Bridges, J. M., and Jones, F. G. (1990). Clearance of severe psoriasis after allogeneic bone marrow transplantation. *BMJ* 300, 908.

Egan, L. J., and Sandborn, W. J. (1998). Inhibition of nuclear factor kappaB by sulfasalazine: a new target for inflammatory bowel disease therapy? *Gastroenterology* 115, 1295-1296.

Ettehadi, P., Greaves, M. W., Wallach, D., Aderka, D., and Camp, R. D. (1994). Elevated tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) biological activity in psoriatic skin lesions. *Clin Exp Immunol* 96, 146-151.

Finco, T. S., Westwick, J. K., Norris, J. L., Beg, A. A., Der, C. J., and Baldwin, A. S., Jr. (1997). Oncogenic Ha-Ras-induced signaling activates NF- $\kappa$ B transcriptional activity, which is required for cellular transformation. *J Biol Chem* 272, 24113-24116.

Fitzgerald, K., and Greenwald, I. (1995). Interchangeability of *Caenorhabditis elegans* DSL proteins and intrinsic signalling activity of their extracellular domains in vivo. *Development* 121, 4275-4282.

Fleming, R. J., Gu, Y., and Hukriede, N. A. (1997). Serrate-mediated activation of Notch is specifically blocked by the product of the gene fringe in the dorsal compartment of the *Drosophila* wing imaginal disc. *Development* 124, 2973-2981.

Fortini, M. E., and Artavanis-Tsakonas, S. (1994). The suppressor of hairless protein participates in notch receptor signaling. *Cell* 79, 273-282.

Fracchiolla, N. S., Lombardi, L., Salina, M., Migliazza, A., Baldini, L., Berti, E., Cro, L., Polli, E., Maiolo, A. T., and Neri, A. (1993). Structural alterations of the NF- $\kappa$ B transcription factor *lyt-10* in lymphoid malignancies. *Oncogene* 8, 2839-2845.

Friedman, A. D. (2002). Transcriptional regulation of myelopoiesis. *Int J Hematol* 75, 466-472.

Fuchs, E., and Raghavan, S. (2002). Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Genet* 3, 199-209.

Gerondakis, S., Strasser, A., Metcalf, D., Grigoriadis, G., Scheerlinck, J. Y., and Grumont, R. J. (1996). Rel-deficient T cells exhibit defects in production of interleukin 3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 3405-3409.

Ghosh, S., and Karin, M. (2002). Missing pieces in the NF- $\kappa$ B puzzle. *Cell* *109 Suppl*, S81-96.

Ghosh, S., May, M. J., and Kopp, E. B. (1998). NF- $\kappa$ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* *16*, 225-260.

Gilmore, T. D. (1999). Multiple mutations contribute to the oncogenicity of the retroviral oncoprotein v-Rel. *Oncogene* *18*, 6925-6937.

Gilmore, T. D., Koedood, M., Piffat, K. A., and White, D. W. (1996). Rel/NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B proteins and cancer. *Oncogene* *13*, 1367-1378.

Gombart, A. F., Hofmann, W. K., Kawano, S., Takeuchi, S., Krug, U., Kwok, S. H., Larsen, R. J., Asou, H., Miller, C. W., Hoelzer, D., and Koeffler, H. P. (2002). Mutations in the gene encoding the transcription factor CCAAT/enhancer binding protein alpha in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *Blood* *99*, 1332-1340.

Grigoriadis, G., Zhan, Y., Grumont, R. J., Metcalf, D., Handman, E., Cheers, C., and Gerondakis, S. (1996). The Rel subunit of NF- $\kappa$ 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.

Grilli, M., Chen-Tran, A., and Lenardo, M. J. (1993). Tumor necrosis factor  $\alpha$  mediates a T cell receptor-independent induction of the gene regulatory factor NF- $\kappa$ B in T lymphocytes. *Mol Immunol* *30*, 1287-1294.

Grossmann, M., Metcalf, D., Merryfull, J., Beg, A., Baltimore, D., and Gerondakis, S. (1999). The combined absence of the transcription factors Rel and RelA leads to multiple hemopoietic cell defects. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 11848-11853.

Grumont, R. J., Rourke, I. J., O'Reilly, L. A., Strasser, A., Miyake, K., Sha, W., and Gerondakis, S. (1998). B lymphocytes differentially use the Rel and nuclear factor  $\kappa$ B1 (NF- $\kappa$ B1) transcription factors to regulate cell cycle progression and apoptosis in quiescent and mitogen-activated cells. *J Exp Med* *187*, 663-674.

Hennet, T., Hagen, F. K., Tabak, L. A., and Marth, J. D. (1995). T-cell-specific deletion of a polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferase gene by site-directed recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 12070-12074.

Hiscott, J. (2001). Introduction--cytokine receptors, signaling pathways and viruses. *Cytokine Growth Factor Rev* *12*, 129-131.

Honjo, T. (1996). The shortest path from the surface to the nucleus: RBP-J $\kappa$ /Su(H) transcription factor. *Genes Cells* *1*, 1-9.

Horwitz, B. H., Scott, M. L., Cherry, S. R., Bronson, R. T., and Baltimore, D. (1997). Failure of lymphopoiesis after adoptive transfer of NF- $\kappa$ B-deficient fetal liver cells. *Immunity* *6*, 765-772.

Hu, Y., Baud, V., Oga, T., Kim, K. I., Yoshida, K., and Karin, M. (2001). IKK $\alpha$  controls formation of the epidermis independently of NF- $\kappa$ B. *Nature* *410*, 710-714.

Huang, S., Robinson, J. B., Deguzman, A., Bucana, C. D., and Fidler, I. J. (2000). Blockade of nuclear factor- $\kappa$ B signaling inhibits angiogenesis and tumorigenicity of human ovarian cancer cells by suppressing expression of vascular endothelial growth factor and interleukin 8. *Cancer Res* *60*, 5334-5339.

Imbert, V., Rupec, R. A., Livolsi, A., Pahl, H. L., Traenckner, E. B., Mueller-Dieckmann, C., Farahifar, D., Rossi, B., Auberger, P., Baeuerle, P. A., and Peyron, J. F. (1996). Tyrosine phosphorylation of I $\kappa$ B- $\alpha$  activates NF- $\kappa$ B without proteolytic degradation of I $\kappa$ B- $\alpha$ . *Cell* *86*, 787-798.

Inoue, T., Hirabayashi, Y., Mitsui, H., Furuta, Y., Suda, Y., Aizawa, S., and Ikawa, Y. (1994). Experimental model for MDS-like myelodysplasia in transgenic mice harboring the SV40 large-T antigen under an immunoglobulin enhancer. *Leukemia* *8 Suppl 1*, S202-205.

Jaffe, E. S., Harris, N. L., Stein, H., and Vardiman, J. W. (2001). World Health Organization Classification of Tumors: Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (Lyon: IARC Press).

Jarriault, S., Brou, C., Logeat, F., Schroeter, E. H., Kopan, R., and Israel, A. (1995). Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* *377*, 355-358.

Jarriault, S., Le Bail, O., Hirsinger, E., Pourquie, O., Logeat, F., Strong, C. F., Brou, C., Seidah, N. G., and Israel, A. (1998). Delta-1 activation of notch-1 signaling results in HES-1 transactivation. *Mol Cell Biol* *18*, 7423-7431.

Jennings, B., Preiss, A., Delidakis, C., and Bray, S. (1994). The Notch signalling pathway is required for enhancer of split bHLH protein expression during neurogenesis in the Drosophila embryo. *Development* *120*, 3537.

Jones, P., May, G., Healy, L., Brown, J., Hoyne, G., Delassus, S., and Enver, T. (1998). Stromal expression of Jagged 1 promotes colony formation by fetal hematopoietic progenitor cells. *Blood* *92*, 1505-1511.

Jones, P. H., Harper, S., and Watt, F. M. (1995). Stem cell patterning and fate in human epidermis. *Cell* *80*, 83-93.

Kanamori, H., Tanaka, M., Kawaguchi, H., Yamaji, S., Fujimaki, K., Tomita, N., Fujisawa, S., and Ishigatsubo, Y. (2002). Resolution of psoriasis following allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia: case report and review of the literature. *Am J Hematol* *71*, 41-44.

Karanu, F. N., Murdoch, B., Gallacher, L., Wu, D. M., Koremoto, M., Sakano, S., and Bhatia, M. (2000). The notch ligand jagged-1 represents a novel growth factor of human hematopoietic stem cells. *J Exp Med* *192*, 1365-1372.

Karanu, F. N., Murdoch, B., Miyabayashi, T., Ohno, M., Koremoto, M., Gallacher, L., Wu, D., Itoh, A., Sakano, S., and Bhatia, M. (2001). Human homologues of Delta-1 and Delta-4 function as mitogenic regulators of primitive human hematopoietic cells. *Blood* *97*, 1960-1967.

Karin, M. (2006). Nuclear factor- $\kappa$ B in cancer development and progression. *Nature* *441*, 431-436.

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

Kawamata, S., Du, C., Li, K., and Lavau, C. (2002). Overexpression of the Notch target genes Hes in vivo induces lymphoid and myeloid alterations. *Oncogene* *21*.

Kelly, L. M., Liu, Q., Kutok, J. L., Williams, I. R., Boulton, C. L., and Gilliland, D. G. (2002). FLT3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model. *Blood* *99*, 310-318.

Kishimoto, Y., Yamamoto, Y., Ito, T., Matsumoto, N., Ichiyoshi, H., Katsurada, T., Date, M., Ohga, S., Kitajima, H., Ikehara, S., and Fukuhara, S. (1997). Transfer of autoimmune thyroiditis and resolution of palmoplantar pustular psoriasis following allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* *19*, 1041-1043.

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

Kojika, S., and Griffin, J. D. (2001). Notch receptors and hematopoiesis. *Exp Hematol* *29*, 1041-1052.

Kontgen, F., Grumont, R. J., Strasser, A., Metcalf, D., Li, R., Tarlinton, D., and 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.

Koo, J., and Khera, P. (2005). Update on the mechanisms and efficacy of biological therapies for psoriasis. *J Dermatol Sci* *38*, 75-87.

Kopan, R., Nye, J. S., and Weintraub, H. (1994). The intracellular domain of mouse Notch: a constitutively activated repressor of myogenesis directed at the basic helix-loop-helix region of MyoD. *Development* *120*, 2385-2396.

Kopan, R., Schroeter, E. H., Weintraub, H., and Nye, J. S. (1996). Signal transduction by activated mNotch: importance of proteolytic processing and its regulation by the extracellular domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 1683-1688.

Kroon, E., Thorsteinsdottir, U., Mayotte, N., Nakamura, T., and Sauvageau, G. (2001). NUP98-HOXA9 expression in hemopoietic stem cells induces chronic and acute myeloid leukemias in mice. *Embo J* *20*, 350-361.

Kuroda, K., Tani, S., Tamura, K., Minoguchi, S., Kurooka, H., and Honjo, T. (1999). Delta-induced Notch signaling mediated by RBP-J inhibits MyoD expression and myogenesis. *J Biol Chem* *274*, 7238-7244.

Lardelli, M., Dahlstrand, J., and Lendahl, U. (1994). The novel Notch homologue mouse Notch 3 lacks specific epidermal growth factor-repeats and is expressed in proliferating neuroepithelium. *Mech Dev* *46*, 123-136.

Li, L., Milner, L. A., Deng, Y., Iwata, M., Banta, A., Graf, L., Marcovina, S., Friedman, C., Trask, B. J., Hood, L., and Torok-Storb, B. (1998). The human homolog of rat Jagged1 expressed by marrow stroma inhibits differentiation of 32D cells through interaction with Notch1. *Immunity* *8*.

Liao, C., Wang, X. Y., Wei, H. Q., Li, S. Q., Merghoub, T., Pandolfi, P. P., and Wolgemuth, D. J. (2001). Altered myelopoiesis and the development of acute myeloid leukemia in transgenic mice overexpressing cyclin A1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 6853-6858.

Lieber, T., Kidd, S., Alcamo, E., Corbin, V., and Young, M. W. (1993). Antineurogenic phenotypes induced by truncated Notch proteins indicate a role in signal transduction and may point to a novel function for Notch in nuclei. *Genes Dev* *7*, 1949-1965.

Lin, L., DeMartino, G. N., and Greene, W. C. (1998). Cotranslational biogenesis of NF- $\kappa$ B p50 by the 26S proteasome. *Cell* *92*, 819-828.

Lizzul, P. F., Aphale, A., Malaviya, R., Sun, Y., Masud, S., Dombrovskiy, V., and Gottlieb, A. B. (2005). Differential expression of phosphorylated NF- $\kappa$ B/RelA in normal and psoriatic epidermis and downregulation of NF- $\kappa$ B in response to treatment with etanercept. *J Invest Dermatol* *124*, 1275-1283.

Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N. G., and Israel, A. (1998). The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 8108-8112.

Malinin, N. L., Boldin, M. P., Kovalenko, A. V., and Wallach, D. (1997). MAP3K-related kinase involved in NF- $\kappa$ B induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* *385*, 540-544.

Mayo, M. W., Wang, C. Y., Cogswell, P. C., Rogers-Graham, K. S., Lowe, S. W., Der, C. J., and Baldwin, A. S., Jr. (1997). Requirement of NF- $\kappa$ B activation to suppress p53-independent apoptosis induced by oncogenic Ras. *Science* *278*, 1812-1815.

- McKeithan, T. W., Takimoto, G. S., Ohno, H., Bjorling, V. S., Morgan, R., Hecht, B. K., Dube, I., Sandberg, A. A., and Rowley, J. D. (1997). BCL3 rearrangements and t(14;19) in chronic lymphocytic leukemia and other B-cell malignancies: a molecular and cytogenetic study. *Genes Chromosomes Cancer* 20, 64-72.
- Mercurio, F., and Manning, A. M. (1999). Multiple signals converging on NF- $\kappa$ B. *Curr Opin Cell Biol* 11, 226-232.
- Messer, G., and Rupec, R. A. (2001). Nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). I. Funktion und Regulation. *Hautarzt* 52, 677-685.
- Milner, L. A., and Bigas, A. (1999). Notch as a mediator of cell fate determination in hematopoiesis: evidence and speculation. *Blood* 93, 2431-2448.
- Milner, L. A., Bigas, A., Kopan, R., Brashem-Stein, C., Bernstein, I. D., and Martin, D. I. (1996). Inhibition of granulocytic differentiation by mNotch1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13014-13019.
- Milner, L. A., Kopan, R., Martin, D. I., and Bernstein, I. D. (1994). A human homologue of the Drosophila developmental gene, Notch, is expressed in CD34+ hematopoietic precursors. *Blood* 83, 2057-2062.
- Mizutani, K., Matsubayashi, T., Iwase, S., Doi, T. S., Kasai, K., Yazaki, M., Wada, Y., Takahashi, T., and Obata, Y. (2000). Murine Delta homologue, mDelta1, expressed on feeder cells controls cellular differentiation. *Cell Struct Funct* 25, 21-31.
- Mosialos, G. (1997). The role of Rel/NF- $\kappa$ B proteins in viral oncogenesis and the regulation of viral transcription. *Semin Cancer Biol* 8, 121-129.
- Mumm, J. S., and Kopan, R. (2000). Notch signaling: from the outside in. *Dev Biol* 228, 151-165.
- Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Saxena, M. T., Griesemer, A., Tian, X., Pan, D. J., Ray, W. J., and Kopan, R. (2000). A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Mol Cell* 5, 197-206.
- Muskavitch, M. A. (1994). Delta-notch signaling and Drosophila cell fate choice. *Dev Biol* 166, 415-430.
- Nolan, G. P., and Baltimore, D. (1992). The inhibitory ankyrin and activator Rel proteins. *Curr Opin Genet Dev* 2, 211-220.
- Orkin, S. H. (1995). Hematopoiesis: how does it happen? *Curr Opin Cell Biol* 7, 870-877.
- Pahl, H. L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF- $\kappa$ B transcription factors. *Oncogene* 18, 6853-6866.
- Pasparakis, M., Alexopoulou, L., Episkopou, V., and Kollias, G. (1996). Immune and inflammatory responses in TNF $\alpha$ -deficient mice: a critical requirement for TNF $\alpha$  in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *J Exp Med* 184, 1397-1411.
- Pasparakis, M., Courtois, G., Hafner, M., Schmidt-Suppran, M., Nenci, A., Toksoy, A., Krampert, M., Goebele, M., Gillitzer, R., Israel, A., *et al.* (2002). TNF-mediated inflammatory skin disease in mice with epidermis-specific deletion of IKK2. *Nature* 417, 861-866.
- Passegué, E., Jochum, W., Schorpp-Kistner, M., Möhle-Steinlein, U., and Wagner, E. F. (2001). Chronic myeloid leukemia with increased granulocyte progenitors in mice lacking junB expression in the myeloid lineage. *Cell* 104, 21-32.
- Pear, W. S., Aster, J. C., Scott, M. L., Hasserjian, R. P., Soffer, B., Sklar, J., and Baltimore, D. (1996). Exclusive development of T cell neoplasms in mice transplanted with bone marrow expressing activated Notch alleles. *J Exp Med* 183, 2283-2291.
- Pfeffer, K. (2003). Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 14, 185-191.
- Prinz, J. C. (2004). Disease mimicry--a pathogenetic concept for T cell-mediated autoimmune disorders triggered by molecular mimicry? *Autoimmun Rev* 3, 10-15.
- Pyatt, D. W., Stillman, W. S., Yang, Y., Gross, S., Zheng, J. H., and Irons, R. D. (1999). An essential role for NF- $\kappa$ B in human CD34(+) bone marrow cell survival. *Blood* 93, 3302-3308.
- Radtke, F., Wilson, A., Mancini, S. J., and MacDonald, H. R. (2004). Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nat Immunol* 5, 247-253.
- Rayet, B., and Gelinas, C. (1999). Aberrant Rel/NF- $\kappa$ B genes and activity in human cancer. *Oncogene* 18, 6938-6947.
- Rodriguez, M. S., Thompson, J., Hay, R. T., and Dargemont, C. (1999). Nuclear retention of I $\kappa$ B $\alpha$  protects it from signal-induced degradation and inhibits nuclear factor  $\kappa$ B transcriptional activation. *J Biol Chem* 274, 9108-9115.
- Rothwarf, D. M., Zandi, E., Natoli, G., and Karin, M. (1998). IKK- $\gamma$  is an essential regulatory subunit of the I $\kappa$ B kinase complex. *Nature* 395, 297-300.
- Rupec, R. A., Jundt, F., Rebholz, B., Eckelt, B., Weindl, G., Herzinger, T., Flaig, M. J., Moosmann, S., Plewig, G., Dörken, B., *et al.* (2005). Stroma-mediated dysregulation of myelopoiesis in mice lacking I $\kappa$ B $\alpha$ . *Immunity* 22, 479-491.
- Sano, S., Chan, K. S., Carbajal, S., Clifford, J., Peavey, M., Kiguchi, K., Itami, S., Nickoloff, B. J., and DiGiovanni, J. (2005). Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model. *Nat Med* 11, 43-49.



Schmidt, K. N., Podda, M., Packer, L., and Baeuerle, P. A. (1996). Anti-psoriatic drug anthralin activates transcription factor NF- $\kappa$ B in murine keratinocytes. *J Immunol* *156*, 4514-4519.

Schmitt, T. M., and Zuniga-Pflucker, J. C. (2002). Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro. *Immunity* *17*, 749-756.

Schmitz, M. L., and Baeuerle, P. A. (1991). The p50 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF- $\kappa$ B. *Embo J* *10*, 3805-3817.

Schön, M., Detmar, M., and Parker, C. (1997). Murine psoriasis-like disorder induced by naive CD4<sup>+</sup> T cells. *Nat Medicine* *3*, 183-188.

Schroeder, T., and Just, U. (2000). Notch signalling via RBP-J promotes myeloid differentiation. *EMBO J* *19*, 2558-2568.

Schwenk, F., Baron, U., and Rajewsky, K. (1995). A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of *loxP*-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res* *23*, 5080-5081.

Seitz, C. S., Freiberg, R. A., Hinata, K., and Khavari, P. A. (2000). NF- $\kappa$ B determines localization and features of cell death in epidermis. *J Clin Invest* *105*, 253-260.

Seitz, C. S., Lin, Q., Deng, H., and Khavari, P. A. (1998). Alterations in NF- $\kappa$ B function in transgenic epithelial tissue demonstrate a growth inhibitory role for NF- $\kappa$ B. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 2307-2312.

Sen, R., and Baltimore, D. (1986). Inducibility of  $\kappa$  immunoglobulin enhancer-binding protein NF- $\kappa$ B by a post-translational 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- $\kappa$ B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell* *80*, 321-330.

Shawber, C., Boulter, J., Lindsell, C. E., and Weinmaster, G. (1996). Jagged2: a serrate-like gene expressed during rat embryogenesis. *Dev Biol* *180*, 370-376.

Shivdasani, R. A., and Orkin, S. H. (1996). The transcriptional control of hematopoiesis. *Blood* *87*, 4025-4039.

Siebenlist, U. (1997). NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B proteins. Their role in cell growth, differentiation and development. *Biochim Biophys Acta* *1332*, R7-13.

Stier, S., Cheng, T., Dombkowski, D., Carlesso, N., and Scadden, D. T. (2002). Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal in vivo and favors lymphoid over myeloid lineage outcome. *Blood* *99*, 2369-2378.

Struhl, G., Fitzgerald, K., and Greenwald, I. (1993). Intrinsic activity of the Lin-12 and Notch intracellular domains in vivo. *Cell* *74*, 331-345.

Swiatek, P. J., Lindsell, C. E., del Amo, F. F., Weinmaster, G., and Gridley, T. (1994). Notch1 is essential for postimplantation development in mice. *Genes Dev* *8*, 707-719.

Sylla, B. S., and Temin, H. M. (1986). Activation of oncogenicity of the c-rel proto-oncogene. *Mol Cell Biol* *6*, 4709-4716.

Tan-Pertel, H. T., Walker, L., Browning, D., Miyamoto, A., Weinmaster, G., and Gasson, J. C. (2000). Notch signaling enhances survival and alters differentiation of 32D myeloblasts. *J Immunol* *165*, 4428-4436.

Tarutani, M., Itami, S., Okabe, M., Ikawa, M., Tezuka, T., Yoshikawa, K., Kinoshita, T., and Takeda, J. (1997). Tissue-specific knockout of the mouse Pig-a gene reveals important roles for GPI-anchored proteins in skin development. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 7400-7405.

Tenen, D. G., Hromas, R., Licht, J. D., and Zhang, D. E. (1997). Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood* *90*, 489-519.

Tohda, S., and Nara, N. (2001). Expression of Notch1 and Jagged1 proteins in acute myeloid leukemia cells. *Leuk Lymphoma* *42*, 467-472.

Tohda, S., Sakano, S., Ohsawa, M., Murakami, N., and Nara, N. (2002). A novel cell line derived from de novo acute myeloblastic leukaemia with trilineage myelodysplasia which proliferates in response to a Notch ligand, Delta-1 protein. *Br J Haematol* *117*, 373-378.

Turco, M. C., Romano, M. F., Petrella, A., Bisogni, R., Tassone, P., and Venuta, S. (2004). NF- $\kappa$ B/Rel-mediated regulation of apoptosis in hematologic malignancies and normal hematopoietic progenitors. *Leukemia* *18*, 11-17.

Uyttendaele, H., Marazzi, G., Wu, G., Yan, Q., Sassoon, D., and Kitajewski, J. (1996). Notch4/int-3, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene. *Development* *122*, 2251-2259.

van Hogerlinden, M., Rozell, B. L., Ahrlund-Richter, L., and Toftgard, R. (1999). Squamous cell carcinomas and increased apoptosis in skin with inhibited Rel/NF- $\kappa$ B signaling. *Cancer Res* *59*, 3299-3303.

Varnum-Finney, B., Purton, L. E., Yu, M., Brashem-Stein, C., Flowers, D., Staats, S., Moore, K. A., Le Roux, I., Mann, R., Gray, G., *et al.* (1998). The Notch ligand, Jagged-1, influences the development of primitive hematopoietic precursor cells. *Blood* *91*, 4084-4091.

Varnum-Finney, B., Xu, L., Brashem-Stein, C., Nourigat, C., Flowers, D., Bakkour, S., Pear, W. S., and Bernstein, I. D. (2000). Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nat Med* *6*, 1278-1281.

- Vermeulen, L., De Wilde, G., Van Damme, P., Vanden Berghe, W., and Haegeman, G. (2003). Transcriptional activation of the NF- $\kappa$ B p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1). *Embo J* 22, 1313-1324.
- Viatour, P., Merville, M. P., Bours, V., and Chariot, A. (2005). Phosphorylation of NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem Sci* 30, 43-52.
- Walker, L., Lynch, M., Silverman, S., Fraser, J., Boulter, J., Weinmaster, G., and Gasson, J. C. (1999). The Notch/Jagged pathway inhibits proliferation of human hematopoietic progenitors in vitro. *Stem Cells* 17, 162-171.
- Wang, D., and Baldwin, A. S., Jr. (1998). Activation of nuclear factor- $\kappa$ B-dependent transcription by tumor necrosis factor- $\alpha$  is mediated through phosphorylation of RelA/p65 on serine 529. *J Biol Chem* 273, 29411-29416.
- Weih, F., Carrasco, D., Durham, S. K., Barton, D. S., Rizzo, C. A., Ryseck, R. P., Lira, S. A., and Bravo, R. (1995). Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF- $\kappa$ B/Rel family. *Cell* 80, 331-340.
- Weinmaster, G. (1997). The ins and outs of notch signaling. *Mol Cell Neurosci* 9, 91-102.
- Weinmaster, G., Roberts, V. J., and Lemke, G. (1991). A homolog of *Drosophila* Notch expressed during mammalian development. *Development* 113, 199-205.
- Weinmaster, G., Roberts, V. J., and Lemke, G. (1992). Notch2: a second mammalian Notch gene. *Development* 116, 931-941.
- Westergaard, M., Henningsen, J., Johansen, C., Rasmussen, S., Svendsen, M. L., Jensen, U. B., Schroder, H. D., Staels, B., Iversen, L., Bolund, L., *et al.* (2003). Expression and localization of peroxisome proliferator-activated receptors and nuclear factor  $\kappa$ B in normal and lesional psoriatic skin. *J Invest Dermatol* 121, 1104-1117.
- Xue, Y., Gao, X., Lindsell, C. E., Norton, C. R., Chang, B., Hicks, C., Gendron-Maguire, M., Rand, E. B., Weinmaster, G., and Gridley, T. (1999). Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the Notch ligand Jagged1. *Hum Mol Genet* 8, 723-730.
- Yan, X. Q., Sarmiento, U., Sun, Y., Huang, G., Guo, J., Juan, T., Van, G., Qi, M. Y., Scully, S., Senaldi, G., and Fletcher, F. A. (2001). A novel Notch ligand, Dll4, induces T-cell leukemia/lymphoma when overexpressed in mice by retroviral-mediated gene transfer. *Blood* 98, 3793-3799.
- Yin, J. A., and Jowitt, S. N. (1992). Resolution of immune-mediated diseases following allogeneic bone marrow transplantation for leukaemia. *Bone Marrow Transplant* 9, 31-33.
- Zandi, E., and Karin, M. (1999). Bridging the gap: composition, regulation, and physiological function of the I $\kappa$ B kinase complex. *Mol Cell Biol* 19, 4547-4551.
- Zandi, E., Rothwarf, D. M., Delhase, M., Hayakawa, M., and Karin, M. (1997). The I $\kappa$ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ , necessary for I $\kappa$ B phosphorylation and NF- $\kappa$ B activation. *Cell* 91, 243-252.
- Zenz, R., Eferl, R., Kenner, L., Florin, L., Hummerich, L., Mehic, D., Scheuch, H., Angel, P., Tschachler, E., and Wagner, E. F. (2005). Psoriasis-like skin disease and arthritis caused by inducible epidermal deletion of Jun proteins. *Nature* 437, 369-375.
- Zhang, J., Chang, C. C., Lombardi, L., and Dalla-Favera, R. (1994). Rearranged NFKB2 gene in the HUT78 T-lymphoma cell line codes for a constitutively nuclear factor lacking transcriptional repressor functions. *Oncogene* 9, 1931-1937.
- Zhang, J. Y., Green, C. L., Tao, S., and Khavari, P. A. (2004). NF- $\kappa$ B RelA opposes epidermal proliferation driven by TNFR1 and JNK. *Genes Dev* 18, 17-22.
- Zhong, H., May, M. J., Jimi, E., and Ghosh, S. (2002). The phosphorylation status of nuclear NF- $\kappa$ B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol Cell* 9, 625-636.
- Zhong, H., SuYang, H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Ghosh, S. (1997). The transcriptional activity of NF- $\kappa$ B is regulated by the I $\kappa$ B-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism. *Cell* 89, 413-424.
- Zhong, H., Voll, R. E., and Ghosh, S. (1998). Phosphorylation of NF- $\kappa$ B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol Cell* 1, 661-671.

## 7. Abkürzungen

<b>APS</b>	Ammoniumperoxodisulfat
<b>BSA</b>	Rinderserumalbumin
<b>CAE</b>	Chloracetat-Esterase-Färbung
<b>CD</b>	Cluster of Differentiation
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	Bidestilliertes Wasser
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<b>EMSA</b>	Electrophoretic Mobility Shift Assay
<b>FACS</b>	Fluorescence-Activated Cell Sorter
<b>FCS</b>	Fötale Kälber Serum
<b>G-, GM-CSF</b>	Granulozyten-, Granulozyten-Monozyten- koloniestimulierender Faktor
<b>HE</b>	Hämatoxylin & Eosin
<b>IFN</b>	Interferon
<b>I<math>\kappa</math>B</b>	Inhibitory $\kappa$ B
<b>IKK</b>	I $\kappa$ B Kinase
<b>IL</b>	Interleukin
<b>IL-1R</b>	Interleukin-1-Rezeptor
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>mA</b>	Miliampere
<b>min</b>	Minuten
<b>NEMO</b>	NF- $\kappa$ B Essential Modulator
<b>NIK</b>	NF- $\kappa$ B Inducing Kinase
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear Factor $\kappa$ B
<b>PAGE</b>	Polyacrylamid Gelelektrophorese
<b>PBS</b>	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
<b>PEST-Region</b>	Prolin-, Glutaminsäure-, Serin-, Threonin- reiche Region

<b>PI</b>	Propidiumiodid
<b>PMSF</b>	Phenylmethansulfonylfluorid
<b>Rb</b>	Retinoblastom
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>sec</b>	Sekunden
<b>std</b>	Stunden
<b>TBST</b>	Trisgepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20
<b>TEMED</b>	Tetramethylethyldiamin
<b>TLR</b>	Toll-like Rezeptor
<b>TNF</b>	Tumor Nekrose Faktor
<b>TRAF</b>	Tumor necrosis factor Receptor Associated Factor
<b>TRIS</b>	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
<b>Upm</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>V</b>	Volt

## **8. Danksagung**

Hiermit möchte ich folgenden Personen meinen ganz besonderen Dank ausdrücken. Sie haben maßgeblich zum Gelingen meiner Promotionsarbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. Gerd Plewig für die Möglichkeit, die Dissertationsarbeit an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München durchführen zu können.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Rudolf A. Rupec für die Vergabe dieses sehr interessanten und spannenden Dissertationsthemas, sowie für seine intensive Betreuung, Hilfestellung und Diskussionsbereitschaft.

Frau Birgit Eckelt für ihre unermüdliche und freundliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft im Labor.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Ralf Huss vom Pathologischen Institut der LMU München und Herrn Dr. Michael J. Flaig aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der LMU für die Hilfe bei der Begutachtung der histologischen Präparate.

Frau Sabine Moosmann vom Pathologischen Institut der LMU München für die Anfertigung von histologischen Paraffin- und Kryostatschnitten.

Aber auch bei allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern, insbesondere aus der Serologie und Histologie der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der LMU möchte ich mich herzlich für das gute Arbeitsklima bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir stets zur Seite standen und mich in jeglicher Hinsicht unterstützten.

## 9. Lebenslauf

<b>Name</b>	Rebholz
<b>Vorname</b>	Bernd
<b>Geburtsdatum</b>	02.03.1970
<b>Geburtsort</b>	Landau i.d. Pfalz
<b>Familienstand</b>	ledig
<b>Staatsangehörigkeit</b>	deutsch
<b>Eltern</b>	Erich Rebholz Ingrid Rebholz, geb. Jahn

### Ausbildung

1981-1990	Otto-Hahn-Gymnasium Landau
1990-1991	Wehrdienst bei der ABC-Abwehrkompanie Bruchsal
10/91-1993	Anstellungen bei Mercedes-Benz, Wörth und wwk-Druck, Mörlheim
1993-1994	Studium der Chemie (2 Semester), Universität Kaiserslautern
1994-2000	Studium der Biologie, Universität Kaiserslautern
07/2000	Abschluß: Dipl. Biologe
03/2001	Beginn der Dissertation