
Aus der Abteilung für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie
der Medizinischen Hochschule Hannover

**Differenzierung dendritischer Zellen aus
hämatopoetischen Progenitorzellen –
Expressionsanalyse von
Transkriptionsfaktoren in der Zelllinie CR1**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

vorgelegt von

Mirja Behrens

aus Peine

Hannover, 2006

**Angenommen vom Senat der
Medizinischen Hochschule Hannover am 15.05.2007**

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident: Prof. Dr. Dieter Bitter-Suermann

Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. Christoph Klein

Referent: Prof. Dr. Kai Wollert

Korreferent: Prof. Dr. Andreas Kispert

Tag der mündlichen Prüfung: 15.05.2007

**Promotionsausschussmitglieder:
Prof. Dr. Hermann Haller
Prof. Dr. Klaus Otto
Prof. Dr. Christoph Klein**

I.	Danksagung	6
II.	Abkürzungsverzeichnis.....	7
1.	Einleitung.....	10
1.1.	Hämatopoese	10
1.2.	Bedeutung dendritischer Zellen.....	12
1.2.1.	Einleitung	12
1.2.2.	Suptypen dendritischer Zellen	12
1.2.3.	Differenzierung dendritischer Zellen	14
1.2.4.	Wichtige Zytokine für die Entwicklung dendritischer Zellen.....	15
1.2.5.	Wichtige Transkriptionsfaktoren für die Entwicklung dendritischer Zellen	16
1.2.6.	Aktivierung dendritischer Zellen.....	19
1.2.7.	Antigen-Präsentation und T-Zellaktivierung.....	21
1.2.8.	Dendritische Zellen und Toleranz	22
1.2.9.	Klinische Relevanz dendritischer Zellen	23
1.3.	Zielsetzung	25
2.	Material und Methoden.....	26
2.1.	Allgemeine Zellkulturbedingungen	26
2.2.	Zellzahlbestimmung	26
2.3.	Puffer und Medien	26
2.4.	CR1-Zelllinie	27
2.5.	Sca1 ⁺ Lin ⁻ -Zellen.....	27
2.5.1.	Material und Reagenzien.....	27
2.5.2.	Durchführung	28
2.6.	EL4.IL-4.GM-CSF-Zellen.....	28
2.7.	<i>In vitro</i> Differenzierung von CR1-Zellen in dendritische Zellen	28
2.8.	<i>In vitro</i> Differenzierung von Sca1 ⁺ Lin ⁻ -Zellen in dendritische Zellen	29
2.9.	Durchflusszytometrie.....	29
2.9.1.	Material und Reagenzien.....	29
2.9.2.	Durchführung	30
2.10.	RNA-Isolation	30
2.10.1.	Material und Reagenzien.....	30
2.10.2.	Durchführung	31
2.11.	<i>GeneChip</i> [®] Array.....	31
2.11.1.	Durchführung	32
2.11.2.	Datenauswertung.....	32
2.12.	cDNA-Synthese.....	33

2.12.1.	Material und Reagenzien	33
2.12.2.	Durchführung	33
2.13.	Polymerasekettenreaktion	34
2.13.1.	Material und Reagenzien	34
2.13.2.	Durchführung	35
2.13.3.	PCR-Programm	35
2.14.	Agarosegelelektrophorese	36
2.14.1.	Material und Reagenzien	36
2.14.2.	Durchführung	36
2.15.	DNA-Extraktion aus Agarosegelen.....	37
2.15.1.	Material und Reagenzien	37
2.15.2.	Durchführung	37
2.16.	<i>Real-Time PCR</i>	37
2.16.1.	Material und Reagenzien	39
2.16.2.	Durchführung	39
2.16.3.	<i>Real-Time PCR-Programm</i>	40
2.16.4.	Datenauswertung.....	40
2.17.	Generierung retroviraler Partikel und verwendete Plasmide	41
2.17.1.	Durchführung	42
2.18.	Transduktion hämatopoetischer Stammzellen mittels <i>Spinoculation</i>	42
2.18.1.	Durchführung	42
2.19.	Extraktion genomischer DNA	43
2.19.1.	Material und Reagenzien	43
2.19.2.	Durchführung	43
3.	Ergebnisse.....	44
3.1.	<i>In vitro</i> Differenzierung von CR1-Zellen in dendritische Zellen	44
3.2.	Genexpressionsanalyse mittels <i>Microarray-Technologie</i> zur Identifizierung von Transkriptionsfaktoren, welche die frühe Entwicklung dendritischer Zellen kontrollieren ...	45
3.3.	Validierung des Expressionsstatus der im <i>Microarray</i> identifizierten Transkriptionsfaktoren mittels <i>Real-Time PCR</i>	49
3.4.	Untersuchungen zur Bedeutung des Transkriptionsfaktors Krox20 für die Differenzierung von dendritischen Zellen	59
4.	Diskussion	63
4.1.	Differenzierung von hämatopoetischen Zelllinien in dendritische Zellen.....	63
4.2.	Die laboreigene multipotente murine hämatopoetische Vorläuferzelllinie CR1 als <i>in vitro</i> DC-Differenzierungssystem	64
4.3.	<i>Microarray-Untersuchungen</i> zur Identifizierung von TFs	65

4.4.	Validierung von <i>Microarray-Experimenten</i>	66
4.5.	Charakterisierung der untersuchten Transkriptionsfaktoren.....	66
4.6.	Auswertung der <i>Real-Time PCR-Expressionsdaten</i>	70
4.7.	Differenzierung von Krox20-defizienten Sca1 ⁺ Lin ⁻ -hämatopoetischen Stammzellen in phänotypisch normale dendritische Zellen.....	72
4.8.	Die Bedeutung der untersuchten Transkriptionsfaktoren für die Myelopoese.....	74
4.9.	Die Bedeutung der untersuchten Transkriptionsfaktoren für die Pathologie von Malignomen	76
4.10.	Die Bedeutung der untersuchten Transkriptionsfaktoren für die Entwicklung von zellulären Therapien mit DCs	78
4.11.	Ausblick	80
5.	Zusammenfassung	81
6.	Literatur	83
III.	Anhang	97
III.I.	Geräte.....	97
III.II.	Verbrauchsmaterialien.....	98
III.III.	Chemikalien.....	99
III.IV.	Zytokine	99
III.V.	Verwendete Primerpaare.....	100
III.VI.	Monoklonale Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoffen für FACS-Untersuchungen	102
IV.	Lebenslauf	103
V.	Erklärung nach § 2 Abs. 2 Nrn. 5 und 6 der Promotionsordnung der Medizinischen Hochschule Hannover	105

I. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Dr. Christoph Klein für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, seine Offenheit und seine sehr gute wissenschaftliche Beratung.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. Chozhavendan Rathinam für seine Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten, intensive Betreuung und gute Teamarbeit. Mit seinem Vertrauen in meine Fähigkeiten verstand er es von Anfang an Begeisterung und Spaß an Thema und Methodik zu vermitteln.

Bei Frau Dr. Britta Maecker möchte ich mich für die kontinuierliche Betreuung meiner Arbeit, stetige Gesprächsbereitschaft und sorgfältige Durchsicht des Manuskripts bedanken.

Frau Harini Nivarthi war mir bei der Durchführung vieler Experimente eine tatkräftige Unterstützung und gute Teamkollegin. Ihr danke ich auch für die Bereitstellung von Tibia und Femur der *Knockout- und Wildtypmäuse*, sowie der viralen Partikel für die Transduktion.

Herrn Dr. Matthias Ballmaier danke ich für die Kooperation bei der Durchführung der fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung. Herrn Dr. Robert Geffers und Herrn Prof. Dr. Jan Buer danke ich für die Durchführung der *Microarray-Analyse*.

Den weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe, insbesondere Fatih Noyan und Georg Bohn, danke ich für die gut Arbeitsatmosphäre und ständige Hilfsbereitschaft.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie und meinem Freund bedanken, die mich unmittelbar unterstützt haben und stets ein offenes Ohr für meine Sorgen hatten. Nicht zu vergessen Familien-Hund Benny, der durch seine Anwesenheit beim Schreiben des Manuskripts eine wunderbare moralische Unterstützung war.

II. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AML	akute myeloische Leukämie
ANF	<i>antinuclear factor</i>
B220	pan B-cell marker, <i>protein tyrosine phosphatase receptor type C</i>
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CCR7	<i>chemokine (C-C motif) receptor</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD40L	<i>CD40 ligand on B-cells</i>
CDNA(RNA)	<i>complementary DNA(RNA)</i>
6Ckine	6 Chemokine
c-kit	CD117
CLP	<i>common lymphoid progenitor</i>
CML	chronisch myeloische Leukämie
(c)MMP	<i>(chicken matrix) metalloproteinase vector</i>
CMP	<i>common myeloid progenitor</i>
Cre	<i>causes recombination</i>
CXCR5	<i>C-X-C chemokine receptor type 5</i>
DC(s)	dendritische Zelle(n)
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
ErP	erythroide Progenitorzelle
et al.	et alii
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FcR	«fragment crystalline» Rezeptor
FCS	fetales Kälberserum

FDCP	<i>factor dependent cell-Paterson</i>
FLT3(L)	<i>FMS-like tyrosine kinase 3 (ligand)</i>
FSC	<i>forward light scatter</i>
FSDC	<i>fetal skin-derived dendritic cell line</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
Glc	Glucose
GM-CSF(R)	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (receptor)</i>
GMP	<i>granulocyte-macrophage precursor</i>
HLH	<i>helix-loop-helix</i>
(H)SC	(hämatopoetische) Stammzelle
IF(R)N	<i>interferon regulatory factor</i>
IL	Interleukin
IMDM	<i>Iscove`s modified DMEM</i>
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
kb	Kilobasenpaare
KD	Kilodalton
KM	Knochenmark
LC	Langerhans-Zelle
Lin	<i>a cocktail of mononuclear antibodies that is directed toward antigens on mature haematopoietic cells of various lineages</i>
loxP	locus of x over in P1
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar (mol/l)
MACS	<i>magnetic cell sorting</i>
MALT	Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe (<i>tissue</i>)
MD	Megadalton
MEP	<i>megakaryocyte-erythrocyte precursor</i>
mg	Milligramm
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIP3 β	<i>macrophage-inflammatory-protein 3 beta</i>
MkP	<i>megakaryocyte progenitor</i>
ml	Milliliter
MM/mM	millimolar (mmol/l)
MOI	<i>multiplicity of infection</i> (Viruspartikel pro Targetzelle)
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
NAD(P)H	Nikotinamid-adenin-dinukleotid-(Phosphat) (reduzierte Form)
nm	Nanometer

Ox40	CD134
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered salt solution</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	Potentia Hydrogenii
ProB(T)	<i>B(T)-cell progenitor</i>
RANK	<i>receptor activator of nuclear factor kappa B</i>
rm	<i>recombinant murine</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Zellkulturmedium, entwickelt am <i>Rosewell Park Memorial Institute</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SA-PE	Streptavidin-Phycoerythrin
Sca1	<i>stem cell antigen 1</i>
SOCS1	<i>suppressor of cytokine signaling 1</i>
SSC	<i>side scatter</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TF(s)	Transkriptionsfaktor(en)
TGFβ	<i>transforming growth factor beta</i>
TLR	<i>Toll-like-Rezeptoren</i>
TNF(RI)(α)	Tumornekrosefaktor (Rezeptor I) (alpha)
TRANCE	<i>TNF-related activation-induced cytokine</i>
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-RNA
U	<i>Unit</i>
μM	mikromolar (μmol/l)
u. a.	unter anderem/n
v/v	<i>volume per volume</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
z. B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1. Hämatopoese

Ausgangspunkt der Bildung der korpuskulären Elemente im Knochenmark (KM) sind die hämatopoetischen Stammzellen (HSCs), die die Fähigkeit zur Selbstreplikation mit der Bildung von Tochterzellen besitzen und die sich als pluripotente Zellen in die verschiedenen Zellreihen der Hämatopoese differenzieren können. HSCs sind in der Lage, eine lebenslange Produktion neuer Blutzellen zu leisten (Weissman, 2000).

Während im humanen System die distinkten Subpopulationen aufgrund methodischer Limitationen nur unzureichend charakterisiert sind, haben Studien im Mausmodell detaillierte Aufschlüsse über Phänotyp und Funktion diverser Subpopulationen geliefert.

Nach phänotypischen und funktionellen Gesichtspunkten werden HSCs in *long-term-HSCs*, welche sich ein Leben lang teilen, in *short-term-HSCs*, welche sich nur begrenzte Zeit teilen, und in multipotente Vorläuferzellen eingeteilt. Aus diesem Pool an HSCs gehen nach Zellteilung und Differenzierung eine gemeinsame myeloische Progenitorzelle (*common myeloid progenitor*, CMP) und eine gemeinsame lymphoide Progenitorzelle (*common lymphoid progenitor*, CLP) als Hauptzellreihen des KM hervor. CLPs produzieren Zelltypen lymphoiden Ursprungs wie T-Zellen, B-Zellen, natürliche Killerzellen und dendritische Zellen (DCs), während sich CMPs insbesondere zu Megakaryozyten, Erythrozyten, Granulozyten und Makrophagen-Vorläuferzellen entwickeln. Spätere Zellvorläuferstadien beschränken sich auf einen Zelltyp (Adolfsson et al., 2001; Akashi et al., 2000; Kondo et al., 1997; Reya et al., 2001; Weissman et al., 2001).

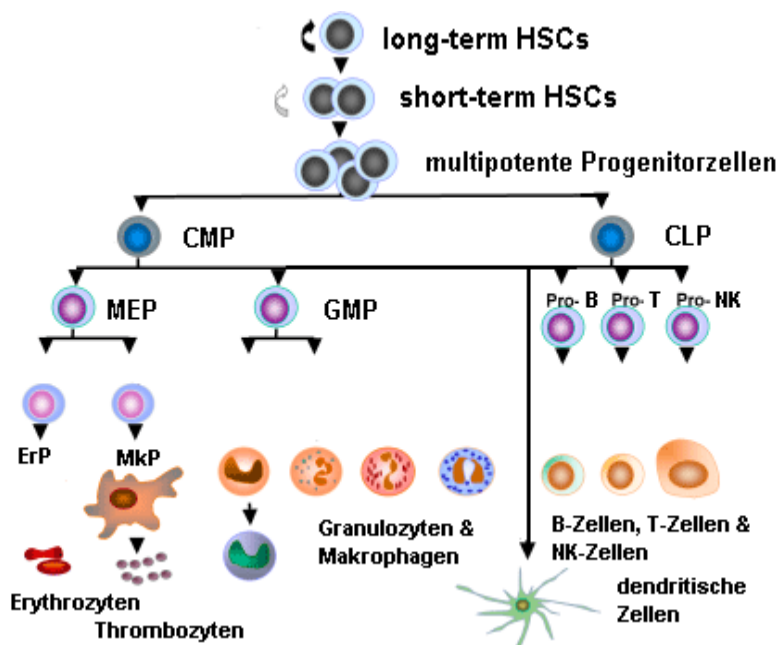


Abb. 1.1: Entwicklung der einzelnen Blutzellen aus einer pluripotenten Stammzelle im KM, modifiziert nach Reya (Reya et al., 2001).

Die Proliferation und Differenzierung der HSCs zu einer bestimmten Zellreihe findet unter der Einwirkung von Zytokinen statt, welche ihre Wirkung über Signalkaskaden entfalten, die letztlich zu einem veränderten Expressionprofil von Transkriptionsfaktoren (TFs) führen (Orkin, 2000). Nach dem heutigen Kenntnisstand ist bisher jedoch noch kein „*master-Gen*“ bekannt, welches eine *naive* Zelle in eine HSC oder Linien-spezifische Blutzelle überführen kann. Allerdings gibt es hämatopoetische Regulatoren, die durch ihre Expression einen bestimmten Linien-Phänotyp hervorrufen können.

Weiterhin konnte experimentell gezeigt werden, dass einige TFs nicht nur ein bestimmtes Differenzierungs-Programm aktivieren, sondern gleichzeitig auch die Entwicklung in alternative Zellreihen verhindern. Dabei kann es auch zu einer molekularen Interaktion und Antagonisierung einzelner TFs kommen. Interessanterweise scheint auch die Expressions-Höhe das Zellschicksal und die Differenzierung zu beeinflussen (Orkin, 2000).

Gensymbol	Expressionsmuster
GATA-1	Progenitorzellen, Erythrozyten, Megakaryozyten, eosinophile Granulozyten, Mastzellen
GATA-2	Progenitorzellen, Megakaryozyten, Mastzellen
GATA-3	Progenitorzellen, T-Zellen, Th2-Zellen
PU.1	Progenitorzelle, myeloische Zellen, B-Zellen
FOG-1	Progenitorzellen, Erythrozyten, Megakaryozyten, Mastzellen
C/EBPα	myeloische Zellen, eosinophile Granulozyten
MafB	Monozyten
Runx1	hämatopoetische Zellen
T-bet	Th1-Zellen
Pax5	B-Zellen
Ikaros	Progenitorzellen, T-Zellen

Tabelle 1.1: Wichtige regulatorische Transkriptionsfaktoren der Hämatopoese und ihr Expressionsmuster, modifiziert nach Orkin (Orkin, 2000).

1.2. Bedeutung dendritischer Zellen

1.2.1. Einleitung

Die DC wurde erstmals im Jahre 1868 als sogenannte Langerhans-Zelle (LC) in der Haut beschrieben. 104 Jahre später begannen Steinmann et al. diese besondere Zelle näher zu charakterisieren (Steinman and Cohn, 1973).

DCs gehören zur Gruppe der Antigen-präsentierenden Zellen. Sie sind einzigartig in ihrer Fähigkeit, eine primäre Immunantwort auszulösen (Hart, 1997).

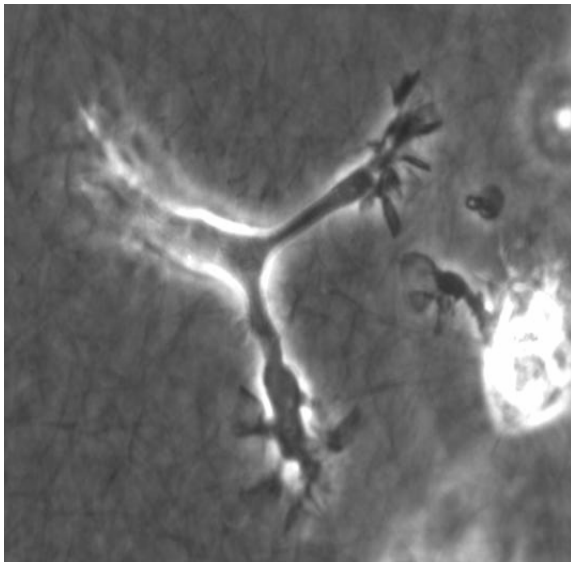


Abb. 1.2: Aus humanen Blut-Monozyten mittels *in vitro* Zytokinstimulation generierte reife dendritische Zellen, Phasenkontrastmikroskopie, im Original 100fache Vergrößerung (eigene Daten).

1.2.2. Subtypen dendritischer Zellen

Im **Maus-Modell** gibt es viele Studien über DC-Subtypen. DCs, welche den Oberflächenmarker CD11c, die kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40 exprimieren, sowie *major histocompatibility complex* (MHC)-Klasse-II-Proteine präsentieren, werden als reife DCs bezeichnet. Shortman und Liu haben anhand der Oberflächenmarker CD4, CD8, CD11 und CD205 murine DCs in fünf Subtypen eingeteilt (Shortman and Liu, 2002).

Lymphgewebe	DC-Subtypen				
	CD4 ⁻ CD8 ^{hi} CD205 ^{hi} CD11b ⁻	CD4 ⁺ CD8 ⁻ CD205 ⁻ CD11b ⁺	CD4 ⁻ CD8 ⁻ CD205 ⁻ CD11b ⁺	CD4 ⁻ CD8 ⁻ CD205 ⁺ CD11b ⁺	CD4 ⁻ CD8 ^{lo} CD205 ^{hi} CD11b ⁺
Milz	+	++	+		
Thymus	++				
Mesenteriale LK	+		+	+	
Haut-drainierende LK	+		+	+	+

Tabelle 1.2: Vorkommen der Subtypen dendritischer Zellen im Lymphgewebe.

CD4⁻CD8^{lo}CD205^{hi}CD11b⁺-DCs entsprechen Langerhans Zellen, dargestellt nach einem Modell von Shortman und Liu (Shortman and Liu, 2002).

Nach den beiden Kriterien Organspezifität und Phänotyp hat auch Ardavin DCs in einem anderen Modell in sechs Subtypen klassifiziert (Ardavin, 2003).

Organ	DC-Subtypen					
	CD8 ⁻ (CD4 ⁻ CD8 ⁻ / CD4 ⁺ CD8 ⁻)	CD8 ⁺	CD8 ^{int}	Langerhans Zellen	Dermale DCs	B220 ⁺
Thymus	(+)	+				+
Milz	+	+				+
LK	+	+	+			+
Peyer-Plaques	+	+				+
Haut				+	+	
Leber	+	+				?

Tabelle 1.3: Organspezifität der Subtypen dendritischer Zellen, dargestellt nach einem Modell von Ardavin (Ardavin, 2003).

Im **humanen System** gibt es wesentlich weniger Studien über DC-Subtypen. DCs, die aus dem menschlichen Blut isoliert wurden, sind heterogen in ihrer Oberflächenmarkerexpression. Die Marker zeigen vielmehr den Aktivitätsstatus der DC als die Zuordnung zu bestimmten Subpopulationen an (Hart, 1997).

Wie bei der Maus gibt es auch beim Menschen LCs, die sich durch die charakteristische *Birbeck Granula* und die Marker CD1a und *langerin* auszeichnen.

Die meisten humanen thymischen DCs sind $CD11c^+CD11b^-CD45RO^{lo}$ und besitzen keine myeloischen Marker. Sie ähneln den $CD8^+$ -DCs der Maus. Eine kleine Fraktion humaner thymischer DCs ist $CD11c^{hi}CD11b^+CD45RO^{hi}$ und exprimiert myeloische Marker. Diese Zellen gleichen den thymischen $CD8^+$ -DCs der Maus (Vandenabeele et al., 2001).

Eine allgemein anerkannte Klassifikation DCs ist bisher sowohl bei der Maus als auch beim Menschen noch nicht etabliert.

1.2.3. Differenzierung dendritischer Zellen

Auf Grund ihrer funktionellen und phänotypischen Gemeinsamkeiten mit Makrophagen und Monozyten wurden DCs zunächst als Zellen myeloischer Herkunft angesehen. Später konnte gezeigt werden, dass sich DCs auch aus Vorläuferzellen der lymphatischen Zellreihe entwickeln können. Lange Zeit wurde deshalb davon ausgegangen, dass $CD8\alpha^+$ -DCs lymphatischen und $CD8\alpha^-$ -DCs myeloischen Ursprungs sind (Anjuere et al., 1999; Vremec et al., 1992; Wu et al., 1996).

Dieses Modell musste wieder verlassen werden, als Experimente zeigten, dass sowohl Vorläuferzellen myeloischer als auch lymphatischer Herkunft gleichsam „lymphatische“ oder „myeloische DCs“ bilden können (Manz et al., 2001; Martin et al., 2000; Traver et al., 2000). Die Expression des Oberflächenmarkers $CD8\alpha$ legt folglich nicht den hämatologischen Ursprung der DC fest (Ardavin et al., 2001).

Im Blut der Maus gibt es eine *common DC-Progenitorzelle*, die die Fähigkeit besitzt, $CD8\alpha^-$ -, $CD8\alpha^+$ - und plasmazytoide $B220^+$ -DCs zu rekonstituieren (del Hoyo et al., 2002).

Kürzlich wurde eine weitere DC-Vorläufer-Population mit den Oberflächenmarkern $Lin^-Sca1^-c-kit^+Flt3^+$ im KM der Maus entdeckt. Diese Zellen scheinen sehr frühe Progenitorzellen sämtlicher DC-Subtypen zu sein (D'Amico and Wu, 2003).

Im humanen System gibt es zwei unterschiedliche DC Vorläuferzellen: *pre-DC1* und *pre-DC2*. *Pre-DC1s* differenzieren zu myeloiden DCs (DC1s) und *pre-DC2s* zu plasmazytoiden DCs (DC2s) (Grouard et al., 1997; Res et al., 1999; Rissoan et al., 1999; Spits et al., 2000).

Es bleibt festzuhalten, dass es bisher noch nicht gelungen ist, eine Vorläuferzelle im Menschen oder in der Maus eindeutig zu definieren, welche einzig und allein ein Differenzierungspotenzial für sämtliche DC-Subtypen besitzt (Ardavin, 2003).

1.2.4. Wichtige Zytokine für die Entwicklung dendritischer Zellen

Zytokine sind Polypeptide, die als Botenstoffe fungieren und die von spezifischen Zellen wie z.B. Makrophagen, T- und B-Zellen sezerniert werden. Sie besitzen ein pleiotropes Wirkungsspektrum. Das bedeutet, dass sie nach Bindung an Rezeptoren verschiedenartige Wirkungen in den jeweiligen Zielzellen hervorrufen können. Umgekehrt können verschiedenartige Zytokine gleichartige Wirkungen in einer Zielzelle auslösen. Dieses Phänomen wird als Redundanz bezeichnet (Taga and Kishimoto, 1992).

Zytokine spielen eine Rolle in der natürlichen Immunabwehr und bei Entzündungsreaktionen. Sie wirken immunregulierend und kontrollieren in besonderem Maße die Hämatopoese und damit auch die Differenzierung von DCs. *In vitro* Differenzierungsexperimente und Maus-Modelle konnten wichtige Zytokine für die Entwicklung von DCs identifizieren. Sie werden im Folgenden näher erläutert:

GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*): Das Zytokin GM-CSF scheint für die *in vitro* Differenzierung von DCs aus KM- und Blutvorläuferzellen notwendig zu sein. Dies gilt jedoch nicht für die Verwendung von thymischen Vorläuferzellen (Inaba et al., 1992). Offensichtlich ist GM-CSF keine *conditio sine qua non* für die Differenzierung dendritischer Zellen. Es konnte nämlich experimentell gezeigt werden, dass DCs aus Lin⁻KM-Zellen auch ohne die Zugabe von GM-CSF generiert werden können (Brasel et al., 2000). Darüber hinaus ist die Entwicklung von DCs bei GM-CSF- oder GM-CSFR-defizienten Mäusen völlig normal (Vremec et al., 1997).

TNF- α (Tumornekrosefaktor alpha): Das Zytokin TNF- α wird in vielen Maus- und humanen DC- und LC-Differenzierungsassays aus KM-Vorläuferzellen eingesetzt und scheint somit ein äußerst wichtiges Zytokin für die *in vitro* Generierung von DCs aus CD34-Vorläuferzellen zu sein (Caux et al., 1992). Erstaunlicherweise zeigen TNF- α oder TNFR1-defiziente Mäuse eine normale DC-Differenzierung. Somit ist TNF- α anscheinend kein essentielles Zytokin für die *in vivo* DC-Entwicklung (Zhang et al., 1997).

FLT3L (*FMS-like tyrosine kinase 3 ligand*): Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* spielt das Zytokin FLT3L eine wichtige Rolle in der Differenzierung von DCs (Brasel et al., 2000; Curti et al., 2001; Maraskovsky et al., 1996; Maraskovsky et al., 2000). *FLT-3L-Knockout-Mäuse* zeigen eine schwere Störung ihrer Hämatopoese. Sowohl $CD8\alpha^+$ -DCs, als auch $CD8\alpha^-$ -DCs kommen bei diesen Mäusen nur in geringer Anzahl vor (McKenna et al., 2000). Darüber hinaus konnte *in vitro* gezeigt werden, dass FLT3L das Überleben von DC-Vorläuferzellen erhöht und deren Differenzierung fördert (Curti et al., 2001).

IL-4 (Interleukin 4): Das Zytokin IL-4 ist essentiell für die Differenzierung von humanen Monozyten in DCs. Zudem wirkt IL-4 zugleich inhibitorisch auf die Makrophagen-Differenzierung (Romani et al., 1994). In Kombination mit GM-CSF ermöglicht IL-4 die Generierung von murinen DCs aus KM-Zellen (Mayordomo et al., 1995).

TGF- β (*transforming growth factor beta*): Das Zytokin TGF- β wird von Keratinozyten, LCs und epidermalen Leukozyten produziert. Interessanterweise besitzen *TGF- β -Knockout-Mäuse* keine epidermalen LCs. Dennoch können LC-typische DCs *in vitro* ohne die Zugabe von TGF- β generiert werden. Ein Vergleich ihres Phänotypus mit LCs, die in Gegenwart von TGF- β generiert wurden, zeigt jedoch, dass dieser inkomplett ist. Folglich scheint TGF- β wichtig für eine physiologische Differenzierung von LCs zu sein (Borkowski et al., 1996).

1.2.5. Wichtige Transkriptionsfaktoren für die Entwicklung dendritischer Zellen

In der Hämatopoese wird die Determination der Zellschicksale durch die Kombination verschiedener TFs kontrolliert (Orkin, 2000). Bisher ist nicht viel über solche Faktoren bei DC-Vorläuferzellen bekannt (Ardavin, 2003). Wichtige Aufschlüsse über die Bedeutung diverser TFs wurden durch die Analyse von *Knockout-Mäusen* erzielt. In diesen *Gene-Targeted-Mäusen* konnten einige wenige TFs mit besonderer Bedeutung für die Entwicklung DCs identifiziert werden:

Ikaros: Ikaros, ein TF der Zinkfingerproteinfamilie, hat eine entscheidene Bedeutung für die Differenzierung von Lymphozyten. Mäuse, welche homozygot für eine dominant-negative Mutation im Ikaros-Gen sind, zeigen tiefgreifende Defekte ihrer lymphopoetischen, nicht jedoch myelopoetischen Zellentwicklung (Georgopoulos et al., 1994). Im Thymus und in der Milz dieser Mäuse kommen keine DCs vor (Wu et al., 1997). Epidermale LCs sind interessanterweise vorhanden (Georgopoulos et al., 1994). Hingegen haben Mäuse mit einer

Ikaros-Nullmutation weniger schwere Defekte in der lymphopoetischen Zellentwicklung. In der Milz und im Thymus kommen $CD8\alpha^+$ -DCs in geringer Anzahl vor, $CD8\alpha^-$ -DCs fehlen komplett (Wu et al., 1997).

Id2 (*Inhibitor of DNA-binding or differentiation*): Id-Proteine gehören zur Familie der *helix-loop-helix* (HLH)-Proteine, welche eine Schlüsselrolle in der Zellreihen-Determination und Differenzierung spielen. *Id2-Knockout-Mäuse* besitzen keine Lymphknoten und Peyer-Plaques. Die $CD8\alpha^+$ -DCs sind in ihrer Anzahl stark reduziert, LCs fehlen völlig (Hacker et al., 2003).

PU.1: Der TF PU.1, ein Mitglied der ets-Familie DNA-bindender Proteine, wird von vielen hämatopoetischen Zellreihen exprimiert und kann die Gen-Expression myeloischer und lymphoider Gene regulieren. *PU.1-Knockout-Mäuse* sterben noch als Embryo während der späten Gestationsphase oder kurz nach der Geburt. Es liegt ein schwerer Defekt sowohl in der lymphoiden als auch in der myeloischen Zellentwicklung vor. *PU.1-Knockout-Mäuse* produzieren funktionelle $CD8\alpha^+$ -DCs, jedoch keine $CD8\alpha^-$ -DCs. Die Entwicklung ihrer $CD8\alpha^+$ -DCs tritt verzögert auf, erreicht aber später zahlenmäßig und funktionell das Wildtypniveau. Im Thymus können keine thymischen DCs detektiert werden (Guerriero et al., 2000).

ICSBP (*interferon consensus sequence binding protein*): ICSBP gehört zur Familie der *interferon regulatory factors* (IRF)-Proteine, welche eine wichtige Rolle in der Zelldetermination spielen. Die Expression von ICSBP ist auf myeloische und lymphoide Zellreihen beschränkt. *ICSBP-Knockout-Mäuse* sind infektionsanfällig, zeigen eine veränderte Hämatopoese und entwickeln eine myeloproliferative Erkrankung, die der humanen chronisch myeloischen Leukämie (CML) ähnelt. Interferon-produzierende Zellen fehlen in allen Lymphorganen der *Knockout-Maus*. Der Anteil $CD8\alpha^+$ -DCs, die zudem einen veränderten Phänotyp gegenüber dem Wildtyp aufweisen, ist reduziert (Schiavoni et al., 2002). Die Anzahl an LCs ist bei der *ICSBP-Knockout-Maus* ebenfalls geringer im Vergleich zum Wildtyp. Bei diesen findet außerdem die Migration von der Haut zu den Lymphknoten zeitverzögert statt. *In vitro* differenzierte DCs aus dem Knochenmark der *Knockout-Maus* exprimieren kein IL-12 und sind phänotypisch unreif (Schiavoni et al., 2004).

IRF2 (*interferon regulatory factor 2*): IRF2 ist ein weiteres Mitglied der IRF-Familie. *IRF2-Knockout-Mäuse* weisen einen schweren Defekt ihrer $CD4^+CD11b^+$ -DCs auf. Auch ihre LCs sind zahlenmäßig reduziert. Die Population der $CD8\alpha^+$ -DCs bleibt unbeeinflusst. *In vitro*

Studien mit zu DCs differenzierten KM-Zellen der *Knockout-Maus* zeigen, dass IRF2 eine wichtige Funktion für die Ausreifung von DCs besitzt (Ichikawa et al., 2004).

IRF4 (*interferon regulatory factor 2*): Neben ICSBP und IRF2 nimmt auch das IRF-Familienmitglied IRF4 eine essentielle Rolle in der Homöostase und Funktion des Immunsystems wahr. Bei *IRF4-Knockout-Mäusen* ist die Anzahl $CD4^+CD8\alpha^-$ -DCs in der Milz extrem reduziert. Zudem ist die *in vitro* Generierung von $CD11b^{high}$ -DCs aus KM-Zellen der *Knockout-Maus* schwer beeinträchtigt (Suzuki et al., 2004).

P50 und RelA (*protein of 50 KD und avian reticuloendotheliosis viral (v-rel) oncogene related A*): Die Mitglieder der TFs-Familie NF- κ B (*nuclear factor kappa B*) setzen sich aus Homo-oder Heterodimeren fünf unterschiedlicher Proteine zusammen: p50, p52 (*protein of 52 KD*), RelA, *avian reticuloendotheliosis viral (v-rel) oncogene related B* (RelB) und *v-rel avian reticuloendotheliosis viral (v-rel) oncogene homolog* (cRel). Diese Proteine spielen eine wichtige Rolle in der Regulation inflammatorischer und Immunabwehr-spezifischer Gene (Chen et al., 1998). *Knockout-Mäuse*, bei denen nur eines der Gene RelA, p50 oder cRel „ausgeschaltet“ wurde, verfügen über eine normale Entwicklung und Ausreifung ihrer DCs. Bei *Knockout-Mäusen* mit einer „kombinierten Ausschaltung“ der Gene p50 und RelA ist die Entwicklung der DCs massiv gestört. In der Milz dieser Mäuse sind keine $CD11c^+$ -DCs detektierbar. Zellen mit einer charakteristischen DC-Morphologie fehlen völlig (Ouaaz et al., 2002).

RelB (*avian reticuloendotheliosis viral (v-rel) oncogene related B*): *RelB-Gene-Targeted-Mäuse* haben eine gestörte Thymusarchitektur mit nur wenigen DCs als sekundären Effekt. In der Milz gibt es $CD8\alpha^+$ -DCs, nicht jedoch $CD8\alpha^-$ -DCs. KM-Transplantationsexperimente zeigen, dass es sich dabei, anders als bei den thymischen DCs, um einen direkten Effekt der RelB-Mutation handelt. Die LCs scheinen von der RelB-Mutation unberührt (Wu et al., 1998).

Stat3 (*signal transducer and activator of transcription 3*): Stat-Proteine werden als Antwort auf eine Vielzahl an Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Hormonen aktiviert. *Stat3-Knockout-Mäuse* sterben bereits während der frühen Embryogenese (del Hoyo et al., 2002; Takeda et al., 1997). Erst durch die Entwicklung gewebe-spezifischer *Stat3-Knockout-Mäuse* konnte die Bedeutung des TF Stat3 für die Homöostase des hämatopoetischen Systems gezeigt werden (Akira, 2000). Im KM und in den Lymphorganen dieser Mäuse kommen $CD8\alpha^+$ -DCs nur in einer geringen Anzahl vor, $CD8\alpha^-$ -DCs fehlen komplett. Ebenso besitzen diese Mäuse auch kaum *common DC-Progenitorzellen*. Die *in vitro* Generierung von plasmazytoiden bzw. myeloischen DCs durch Supplementierung des Kulturmediums mit FLT3L bzw. GM-CSF ist

ein anerkanntes Verfahren. Wird diese Methode auf Stat3-defiziente KM-Zellen angewandt, können keine plasmazytoiden DCs gewonnen werden. Myeloische DCs werden jedoch gebildet (Laouar et al., 2003).

Gfi1 (*growth factor independent 1*): Der TF Gfi1 spielt eine wichtige Rolle in der HSC-Homöostase, T-Zell- und Granulozyten-Entwicklung (Hock et al., 2004; Hock et al., 2003; Karsunky et al., 2002a; Karsunky et al., 2002b; Schmidt et al., 1998; Yucel et al., 2004; Zeng et al., 2004). In unserer Arbeitsgruppe konnten Rathinam et al. zeigen, dass Gfi1 zudem entscheidend für die Entwicklung und Funktion von DCs ist. *Gfi1-Knockout-Mäuse* weisen in sämtlichen Lymphorganen eine starke Reduktion ihrer DCs auf. Transplantationsexperimente konnten einen autonomen Zelleffekt für Gfi1 belegen. Gfi1-defiziente DCs sind phänotypisch und funktionell verändert. Sie exprimieren nur in geringem Maße MHC-Klasse-II-Moleküle, regulieren nach Gabe von Reifungsstimulatoren keine kostimulatorischen Moleküle hoch und können T-Zellen nur unzureichend stimulieren. Allerdings liegt das Aktivierungspotential Gfi1-defizienter DCs, welches sich durch eine erhöhte IL-12-Sekretion widerspiegelt, über dem normaler DCs. Die *in vitro* Differenzierung von Gfi1-defizienten HSC in DCs mittels GM-CSF oder FLT3L misslingt. Stattdessen besitzen die generierten Zellen Merkmale von Makrophagen. Folglich scheint Gfi1 der entscheidende Faktor in der myeloetischen Entwicklungsstufe DC *versus* Makrophage zu sein. Interessanterweise ist die defiziente DC-Entwicklung von *Gfi1-Knockout-Mäusen* mit einer verminderten Stat3-Aktivierung in den Vorläuferzellen assoziiert (Rathinam et al., 2005).

1.2.6. Aktivierung dendritischer Zellen

Im Blut zirkulieren sogenannte DC-Vorläuferzellen, welche sich im Gewebe als unreife DCs ansiedeln. Unreife DCs besitzen eine enorme Fähigkeit zur Endozytose (Makropinozytose, Phagozytose und Clathrin-vermittelte Endozytose), die es ihnen ermöglicht, unterschiedliche Antigene, z. B. Mikroorganismen, apoptotische Zellfragmente und Immunkomplexe, aufzunehmen. Diese phagozytierten Antigene werden in der Zelle auf unterschiedlichen Wegen prozessiert, um als Peptidpitope sowohl gebunden an MHC-Moleküle der Klasse-I als auch der Klasse-II präsentiert zu werden. Durch Inkorporation verschiedener Stimuli beginnt die Zelle zu reifen (Banchereau et al., 2000).

Der Reifungsprozess ist ein kontinuierlicher Vorgang und bedeutet den Übergang von einer Antigen-aufnehmenden zu einer Antigen-präsentierenden Zelle, welche die Fähigkeit zur

Stimulation von T-Zellen besitzt. Folgende phänotypische und funktionelle Veränderungen finden statt: Hochregulierung kostimulatorischer und T-Zell-bindener Moleküle wie beispielsweise CD80 und CD86, Verlust der Endozytose-Rezeptoren, Hochregulierung der MHC-Klasse-I- und II-Moleküle, Ausbildung langer „dendritischer“ Fortsätze zur Vergrößerung der Kontakt-/Oberfläche, Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-12, irreversibler Verlust Makrophagen-typischer Moleküle und Funktionen (Satthaporn and Eremin, 2001).

Neben der Antigen-Aufnahme gibt es weitere wichtige Reifungsstimuli: pathogene Bestandteile wie Lipopolysaccharid (LPS) über Toll-like-Rezeptoren (TLR), proinflammatorische Zytokine wie TNF- α über Zytokinrezeptoren, CD40L auf T-Zellen über den CD40-Rezeptor, Immunkomplexe oder spezifische Antikörper über Rezeptoren für Immunkomplexe (FcR) und wahrscheinlich Apoptose über entsprechende Sensoren (Guermonez et al., 2002).

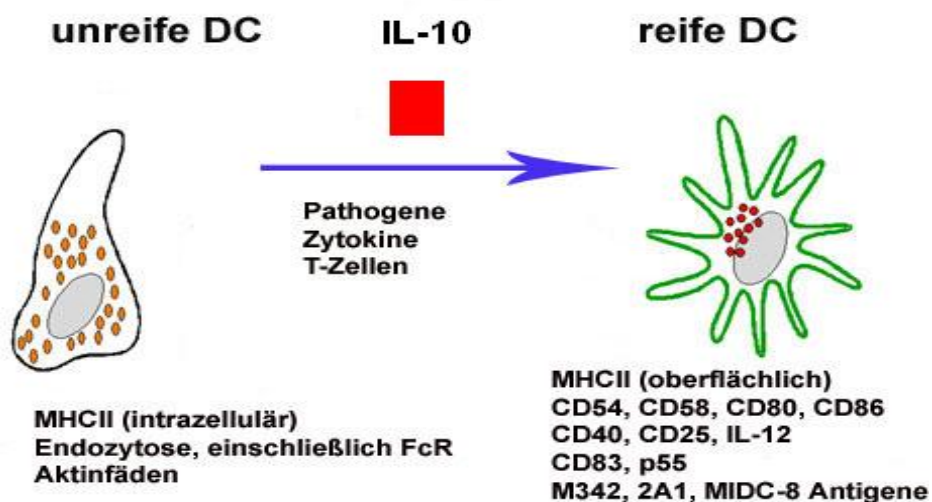


Abb. 1.2: Veränderungen der dendritischen Zelle während des Reifungsprozesses. IL-10 kann die Reifung der dendritischen Zelle unterbinden, modifiziert nach Banchereau und Steinman (Banchereau and Steinman, 1998).

1.2.7. Antigen-Präsentation und T-Zellaktivierung

Die reifende DC verlässt das nicht lymphoide Gewebe und wandert in die T-Zell-Gebiete der sekundären Lymphorgane (z.B. die parakortikalen Areale der Lymphknoten), um ihren MHC-Peptid-Komplex naiven $CD4^+$ -T-Helfer-Zellen und zytotoxischen $CD8^+$ -T-Zellen zu präsentieren. Diese Migration wird wesentlich durch Chemokine koordiniert. Während des Reifungsprozesses reguliert die DC u. a. den Chemokinrezeptor CCR7 hoch und folgt dem Lockreiz der CCR7-Liganden MIP-3 β und 6CKine. 6CKine wird von den Lymphgefäßen exprimiert. Außerdem sezernieren Zellen der T-Zell-Zone MIP-3 β und 6CKine (Banchereau et al., 2000).

Im sekundären Lymphgewebe findet nun die spezifische Immunantwort statt. Die DC präsentiert ihr Antigen gegenüber T-Zellen. Wird der MHC-Peptid-Komplex der DC durch den Antigen-spezifischen T-Zell-Rezeptor der T-Zelle erkannt, kommt es zur Interaktion und zur Ausbildung der „immunologischen Synapse“ (Grakoui et al., 1999).

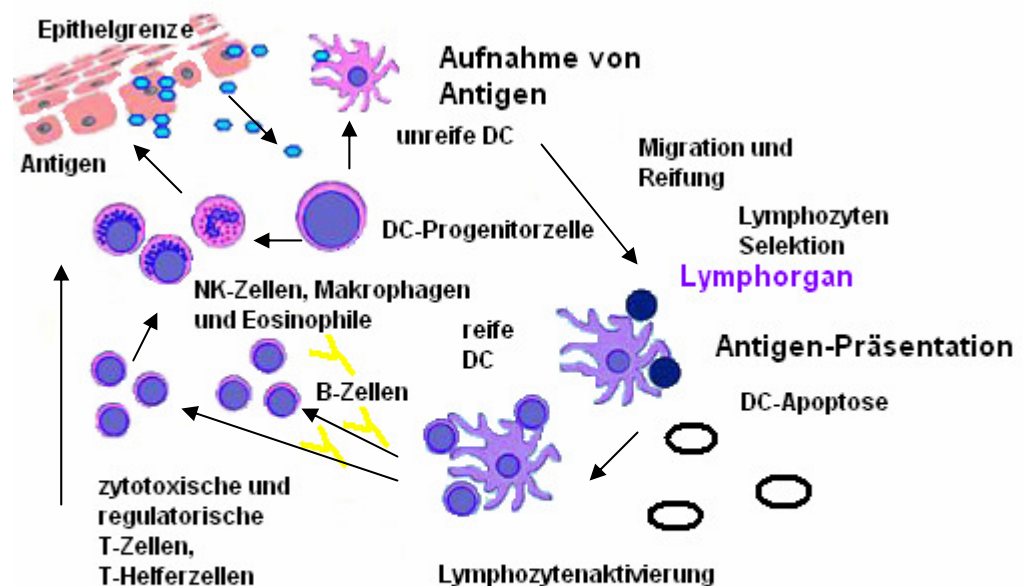


Abb. 1.3: Der Lebenszyklus dendritischer Zellen, modifiziert nach Banchereau et al (Banchereau et al., 2000).

Adhäsionsmoleküle wie beispielsweise die Integrine $\beta 1$ und $\beta 2$ bilden eine vorübergehende Brücke zwischen der DC und der T-Zelle. Kostimulatorische Moleküle der DC interagieren mit den entsprechenden Liganden der T-Zelle. CD86 scheint dabei eine außerordentlich wichtige Rolle für die Amplifikation der T-Zell-Antwort zu spielen.

Die T-Zelle kann ihrerseits die DC über ihren CD40-Liganden aktivieren. Als Folge reguliert die DC die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 hoch und schüttet Zytokine wie IL-1, TNF- α und IL-12 aus. Außerdem wird durch CD40 der DC-Ligand OX40 hochreguliert, welcher naive T-Zellen zur IL-4-Ausschüttung und vermehrten CXCR5-Expression stimuliert. Der Ligand von CXCR5, ein Chemokin, lockt B-Lymphozyten in die Follikel. Ein weiterer wichtiger Rezeptor für den „DC-T-Zell-Dialog“ ist der TRANCE/RANK-Rezeptor. Eine Bindung seiner Liganden, Proteine die zur Gruppe der Tumornekrosefaktoren gehören und von aktivierten T-Zellen gebildet werden, löst bei der DC eine Ausschüttung von IL-1, IL-6 und IL-12 aus und verlängert ihr Überleben (Banchereau et al., 2000).

Die stimulierte CD4⁺-T-Zelle wird zur T-Gedächtniszelle und unterstützt die Differenzierung und Expansion von CD8⁺-T-Zellen und B-Zellen (Satthaporn and Eremin, 2001). Darüber hinaus können CD8⁺-T-Zellen und B-Zellen auch direkt durch die DC aktiviert werden. Das Gleiche gilt für natürliche Killerzellen (Banchereau et al., 2000).

Interessanterweise bewirken unterschiedliche DC-Subklassen unterschiedliche Immunantworten. So lösen IL-12-produzierende CD8 α^+ -DCs bei CD4⁺-T-Zellen eine Th1-Antwort aus, während CD8 α^- -DCs eine Th2-Antwort bewirken. Auch das Reifungsstadium der DC kann über die Art der T-Zell-Aktivierung entscheiden. Ebenso spielen die Umgebung, die DC-T-Zell-Ratio und die Dauer der DC-Stimulation eine Rolle (Guermonprez et al., 2002).

1.2.8. Dendritische Zellen und Toleranz

Immunologische Toleranz ist ein wesentliches Prinzip zur Aufrechterhaltung der Diskriminierung zwischen körpereigenen und körperfremd. Ferner dient sie dem Schutz vor Autoimmunphänomenen. Es wird zwischen zentraler Toleranz, die sich im Thymus abspielt, und peripherer Toleranz im übrigen Gewebe unterschieden. An beiden Formen der Toleranz ist die DC maßgeblich beteiligt (Guermonprez et al., 2002).

Im Thymus kann die DC eine Negativ-Selektion autoreaktiver T-Zellen bewirken. Brocker et al. zeigten beispielsweise, dass die MHC-Klasse II-Expression eines retroviral-kodierten

Superantigens ausreicht, um eine V β -spezifische Negativ-Selektion zu bewirken (Brocker et al., 1997).

Eine spezifische periphere T-Zell-Toleranz konnte experimentell durch die Beladung einiger DC-Oberflächenmoleküle mit Antigenen gezeigt werden (Finkelman et al., 1996; Hawiger et al., 2001).

Auch hier gibt es Hinweise, dass weitere Faktoren wie das Reifungsstadium der DC und die DC-Subklasse eine Rolle spielen: In erster Linie scheinen unreife und plasmazytoide DCs *naive* autoreaktive T-Zellen in regulatorische T-Zellen umzuwandeln (Barratt-Boyes and Thomson, 2005; Guermonprez et al., 2002).

1.2.9. Klinische Relevanz dendritischer Zellen

Die besondere Fähigkeit der DCs, T-Zellen äußerst effizient zu stimulieren, wird von vielen Arbeitsgruppen genutzt, um Immuntherapie-Protokolle zu entwickeln. Grundidee ist die Injektion Antigen-beladener DCs. Mehrere Arbeitsgruppen zeigten, dass Kulturen adhärenter *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC) in GM-CSF und IL-4 Zellen ausbilden, die das typische Profil unreifer DCs zeigen. In ähnlicher Weise werden für den Therapie-Einsatz ausreichende Zahlen reifer oder unreifer DCs aus Blut-Monozyten oder CD34⁺-Vorläuferzellen durch *in vitro* Zytokinstimulation gewonnen. Alternativ können DCs *in vivo* mittels FLT3L-Injektionen expandiert werden.

Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten die MHC-Moleküle der DCs mit antigenem Peptid zu beladen: Transduktion der DCs mit retro- oder adenoviralen Vektoren, Fusion von DCs mit Tumorzellen, Tumorlysate, Tumorzell-Ribonukleinsäure (RNA), definierte Tumor-Peptide bekannter Sequenz oder Exosome aus DCs, die zuvor mit Tumorpeptiden beladen wurden. Bei den Exosomen handelt es sich um Vesikel endosomalen Ursprungs, die hohe Konzentrationen an MHC-Molekülen und Peptiden enthalten (Banchereau et al., 2000; Guermonprez et al., 2002; Romani et al., 1994; Sallusto and Lanzavecchia, 1994).

Die erste DC-Vakzinierungs-Studie bei Krebs-Patienten wurde 1996 durchgeführt. Bei drei der vier an einem follikulären B-Zell-Lymphom erkrankten Patienten konnte eine Immunantwort und positive klinische Effekte festgestellt werden. Viele weitere klinische Studien sind gefolgt, von denen sich einige bereits in der Phase I und II befinden (Hsu et al., 1996; Nestle et al., 2005). Allerdings muß zum gegenwärtigen Zeitpunkt festgestellt werden,

dass der erhoffte Durchbruch in der Immuntherapie maligner Tumoren durch DCs (noch) nicht erreicht wurde.

Unterschiedliche Strategien verfolgen daher das Ziel, die Effizienz der DC-Vakzinierung zu steigern. Dabei finden die Erkenntnisse aus der Grundlagenforschung der DC-Biologie Anwendung. Beispielsweise migrierten mehr DCs in die Orte der T-Zellaktivierung, nachdem die Injektionsgebiete bei den Versuchstieren zuvor mit inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen präkonditioniert wurden (Itano et al., 2003).

Als mögliche Nebenwirkung einer DC-basierten Therapie ist immer das potentielle Risiko einer Autoimmunreaktion zu bedenken. Verschiedene murine und humane Studien belegen, dass DCs zu einer Durchbrechung der Toleranz führen können und eine unerwünschte Autoimmunreaktion induzieren können. DCs bewirken insbesondere dann eine schwere Autoimmunreaktion, wenn Tumor-Antigene auch von nicht-lymphoidem Gewebe exprimiert werden. In einem Mausmodell befand sich ein Tumor-Antigen auch in den Langerhans-Inseln des Pankreas. Während der DC-Vakzinierungs-Therapie entwickelten die Mäuse daraufhin einen Autoimmundiabetes (Ludewig et al., 2000). In einer klinischen Therapie-Studie bei metastasiertem malignem Melanom entwickelten einige Patienten nach Vakzinierung mit Antigen-beladenen DCs und zusätzlicher Applikation von IL-2 eine Vitiligo, einen Insulin-abhängigen Diabetes und eine Autoimmunthyroiditis (Chianese-Bullock et al., 2005).

Klinische Situationen, in denen die T-Zell-Toleranz induzierende Funktion der DCs genutzt werden könnte, sind die Prävention der allogenen Transplantat-Abstoßung und die Therapie von Autoimmunerkrankungen. Eine Transplantat-Abstoßung wird sowohl durch die Präsentation von Spender MHC-Antigenen durch Spender-DCs, als auch durch die Präsentation von Spender MHC-Antigenen durch Empfänger-DCs ausgelöst. Entsprechend wird versucht, sowohl Spender- als auch Empfänger-DCs zu manipulieren.

Bei den Autoimmunerkrankungen liegt oftmals eine erhöhte Anzahl an DCs vor, die zudem phänotypische Abnormalitäten aufweisen.

Strategien wie die Generierung Peptid-beladener DCs, die genetische Modifikation von DCs und die Verwendung unterschiedlicher DC-Reifungsstadien werden in den Tiermodellen der Transplantat-Abstoßung und in den Tiermodellen der Autoimmunerkrankungen bereits mit ersten Erfolgen angewandt (Morel et al., 2003).

Angesichts der unbefriedigenden Ergebnisse der aktuellen klinischen Studien bestand das Ziel der vorliegenden Arbeit darin, zunächst mehr über die physiologischen Differenzierungsprozesse der DC zu lernen. Es bleibt zu hoffen, dass ein besseres Verständnis der grundlegenden Biologie der DC eines Tages auch zu optimierten Strategien ihres klinischen Einsatzes führen könnten.

1.3. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, TFs in frühen Stadien der Differenzierung von DCs aus hämatopoetischen Progenitorzellen zu identifizieren.

Dazu sollte zunächst in einer Art *Screening-Untersuchung* eine *Microarray-Analyse* durchgeführt werden. Das differentielle Expressionsmuster der TFs sollte dann mittels *Real-Time PCR* validiert werden. Anschließend sollte die spezifische Bedeutung einzelner Faktoren in gezielten Über- oder Unterexpressionsstudien *in vitro* oder im Maus-Modell (*knockout* bzw. *knockin*) untersucht werden.

2. Material und Methoden

Die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer, sowie die Enzyme werden, soweit bekannt, im zugehörigen Abschnitt beschrieben. Die benutzten Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien sind im Anhang zu finden. Ebenfalls im Anhang befindet sich eine genaue Auflistung der benutzten Primer-Sequenzen, Zytokine und Antikörper.

2.1. Allgemeine Zellkulturbedingungen

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen wurden in Brutschränken (5% CO₂, 37°C und 100% Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden aseptisch in Sterilwerkbänken ausgeführt.

2.2. Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau verdünnt und die ungefärbten (lebenden) Zellen in einer geeichten Neubauer Zählkammer ausgezählt. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit einer geeichten Neubauer-Zählkammer unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufen.

2.3. Puffer und Medien

Die Medien und Zusätze wurden, soweit nicht anders vermerkt, von PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich verwendet.

IMDM+10% FCS Medium	IMDM
	10% FCS
	0.3 mg/ml Glutamin
	100 U/ml Penicillin
	0.1 mg/ml Streptomycin
	10 µM 2-Mercaptoethanol
	1 mM nicht-essentielle Aminosäuren

PBS	137 mM NaCl 2.7 mM KCl 8.1 mM Na ₂ HPO ₄ 1.5 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,2
<i>RBC-Lysis-Puffer</i>	7 mM Tris 140 mM NH ₄ Cl, pH 7,65
RPMI+10% FCS Medium	RPMI 10% FCS 0.3 mg/ml Glutamin 100 U/ml Penicillin 0.1 mg/ml Streptomycin 10 µM 2-Mercaptoethanol 1 mM nicht-essentielle Aminosäuren
MACS-Puffer	PBS 0,5% BSA

2.4. CR1-Zelllinie

Die CR1-Zelllinie ist eine von Rathinam et al. etablierte murine multipotente hämatopoetische Vorläuferzelllinie (siehe auch 4.2.) (Rathinam et al., 2006).

Die CR1-Zellen wurden in 10 ml IMDM+10% FCS Medium supplementiert mit 5 ng/ml rm-IL-3 in 25 cm² Zellkulturflaschen bei einer Zelldichte von 3x10⁶ Zellen/ml kultiviert. Das Medium wurde jeden zweiten Tag erneuert.

2.5. Sca1⁺Lin⁻-Zellen

2.5.1. Material und Reagenzien

Lineage Cell Depletion Kit mouse

(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach):

Lösungen:

- *Biotin-Antibody Cocktail*
- *Anti-Biotin MicroBeads*

zusätzlich zum Kit:

- *Anti-Sca-1 MicroBeads* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)

2.5.2. Durchführung

Die Anreicherung der Sca1⁺Lin⁻ Zellen aus dem KM der vom Muskelgewebe freipräparierten Tibia und dem Femur von vier konditionierten *Krox20-Knockout-Mäusen* und vier C57Black6-Wildtyp-Mäusen erfolgte mit einem *autoMACSTM-Gerät* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) gemäss Herstellerprotokoll unter Verwendung des *Lineage Cell Depletion Kit* und *Anti-Sca-1 MicroBeads* zur Depletion bzw. positiven Selektion der Zielzellen. Anschließend wurden die Zellen bei einer Zelldichte von 1x10⁵ Zellen/Well in IMDM+10% FCS Medium auf einer *24-Well-Platte* kultiviert. Das Medium wurde mit 10 ng/ml rm-IL-3, 10 ng/ml rm-IL-6, 50 ng/ml rm-SCF und 50 ng/ml rh-FLT3L supplementiert.

2.6. EL4.IL-4.GM-CSF-Zellen

EL4.IL-4.GM-CSF ist eine von Parool Meelu etablierte laboreigene Sublinie der murinen Thymoma-Zelllinie EL4. EL4.IL-4.GM-CSF-Zellen produzieren und sekretieren IL-4 und GM-CSF. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen bei einer Zelldichte von 1x10⁶ Zellen/ml in RPMI+10% FCS. Das Medium wurde alle drei Tage erneuert. Der GM-CSF- und IL-4-haltige Überstand wurde bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

2.7. *In vitro* Differenzierung von CR1-Zellen in dendritische Zellen

Die CR1-Zellen wurden nach einem von Rathinam et al. etablierten Protokoll in DCs differenziert (Rathinam et al., 2006).

Dazu wurden die Zellen zunächst auf einer *6-Well-Platte* bei einer Dichte von 3x10⁶ Zellen/Well in 3 ml IMDM+10% FCS ausplattiert. Das Medium wurde mit 5 ng/ml rm-GM-CSF supplementiert und jeden zweiten Tag erneuert. Nach acht Tagen wurden die Zellen bezüglich DC-definierender Oberflächenmarker (CD11c, CD40, CD80, CD86 und MHCII-IA^b) analysiert.

2.8. *In vitro* Differenzierung von Sca1⁺ Lin⁻-Zellen in dendritische Zellen

Die transduzierten Sca1⁺ Lin⁻-Zellen wurden analog zu den CR1-Zellen in DCs differenziert. Allerdings wurde für die Zytokinstimulation das Medium mit dreiprozentigem Überstand der EL4.IL-4.GM-CSF-Zelllinie anstatt rm-GM-CSF versetzt.

2.9. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS, *fluorescence activated cell sorting*) ist ein anerkanntes Verfahren zur quantitativen Bestimmung und Erfassung von Einzelzellen, Oberflächenmolekülen oder anderen Zellstrukturen.

Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung an einem scharf gebündelten Laserstrahl vorbeigeleitet. Beim Queren dieses Laserstrahls entsteht Streulicht. Das Vorwärtsstreulicht (FSC, *Forward Light Scatter*) gibt Auskunft über die Größe der Zelle, das Seitwärtsstreulicht (SSC, *Side Scatter*) über die Granularität der Zelle.

Sind die Zellen mit an Antikörper gebundenen Chromogenen markiert, werden diese durch den Laser zur Aussendung von Lichtquanten angeregt. Dieses Fluoreszenzsignal wird in einem Photomultiplier detektiert, verstärkt und in ein elektrisches Signal umgewandelt, welches auf dem Computerbildschirm dargestellt werden kann (Givan, 2001).

Der hier verwendete *FACSCalibur* verfügt über zwei Argonlaser und erlaubt damit die gleichzeitige Analyse von vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen.

2.9.1. Material und Reagenzien

Lösungen:

- *FACS Calibur*TM (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).
- *FACS Clean*TM (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Lösungen:

- *FACS Rinse™* (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

2.9.2. Durchführung

Die für die FACS-Analyse bestimmten Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und auf eine Zahl von 1 bis 2×10^5 Zellen pro FACS-Röhrchen eingestellt. Das entsprechende Volumen Zellsuspension wurde in die Röhrchen gegeben, mit 2 ml PBS aufgefüllt und für drei Minuten bei 1.400 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit je 100 μ l Antikörper-Lösung resuspendiert. Diese enthielt die für die jeweilige gewünschte Färbung austitrierte Konzentration an verschiedenen Antikörpern. Anschließend wurden die Zellen und Antikörper auf Eis in Dunkelheit für 20 Minuten inkubiert und zweimal gewaschen (Zentrifugation bei 1.400 rpm, 3 Minuten). Für die Messungen wurden die Proben in 100 μ l PBS resuspendiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm *CELLQuest™* (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

2.10. RNA-Isolation

Das *Absolutely RNA® Miniprep Kit* basiert auf einem Säulensystem mit Silikatmatrix. Die Silikatmatrix bindet die RNA in der Gegenwart chaotropischer Salze. Währenddessen können kontaminierende Bestandteile wie Proteine und Desoxyribonukleinsäure (DNA) herausgewaschen werden.

2.10.1. Material und Reagenzien

Absolutely RNA® Miniprep Kit
(STRATAGENE, La Jolla, CA, USA):

Enzyme:

- *RNase-free Dnase I*

Lösungen:

- *Lysis Buffer*
- β -Mercaptoethanol

Lösungen:Konzentration:

- *DNase Reconstitution Buffer*

- *DNase Digestion Buffer*

- *High-Salt Wash Buffer*

(1,67x), versetzt mit 100%

Ethanol

- *Low-Salt Wash Buffer (5x)*,

versetzt mit 100% Ethanol

- *Elution Buffer*

Tris-HCL

10mM

EDTA

0,1mM

- 70% Ethanol

2.10.2. Durchführung

Die RNA-Isolation erfolgte strikt nach Herstellervorgaben gemäß dem Produkt beigefügten Protokoll.

2.11. *GeneChip*[®] Array

Der *GeneChip*[®] besteht aus einem kleinen Silikatplättchen, das Oligonukleotide (*probes*) von DNA-Sequenzen der zu untersuchenden Spezies an definierten Lokalisationen enthält. Die präzise Lokalisation dieser *probes* wird als *feature* bezeichnet. Ein einziger *GeneChip*[®] Array kann Millionen *features* enthalten.

Für die Durchführung eines Arrays wird die zu untersuchende RNA aus den Zellen extrahiert, *revers* transkribiert, amplifiziert, markiert und mit den *probes* des *GeneChips*[®] hybridisiert. Mittels Laser kann dann ähnlich wie bei der *Real-Time PCR* die emittierte Fluoreszenz gemessen werden. Die emittierte Fluoreszenz repräsentiert die an die korrespondierenden *probes* gebundene Nukleinsäuremenge. So ist es möglich, die simultane Expressionsaktivität von über 10.000 unterschiedlichen RNA-Transkripten zu quantifizieren (www.affymetrix.com).

2.11.1. Durchführung

Die *Microarray-Analyse* wurde von Robert Geffers und Jan Buer (Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF), Braunschweig) durchgeführt. Das Protokoll ist deshalb hier nur in Kürze wiedergegeben:

Zunächst wurde die Qualität der RNA überprüft. Anschließend wurde die Gesamt-RNA mittels *reverse* Transkription unter Verwendung eines T7T23V-Primers (Eurogentec; Seraing, Belgium) in doppelsträngige *complementary* (c)DNA umgeschrieben. In einer RNA-Polymerase-Reaktion wurde die gewonnene cDNA mit Hilfe von Biotin-gekoppelten Nukleotiden in einzelsträngige cRNA (komplementär zur ursprünglichen RNA) umgewandelt und fragmentiert. Anschließend wurden diese Nukleinsäure-Fragmente mit den *probes* des *GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array* (Affymetrix GmbH, München) hybridisiert. In der Affymetrix *GeneChip® Fluidics Station 400* (Affymetrix GmbH, München) folgten die Entfernung der nicht hybridisierten Nukleinsäure-Fragmente und die Färbung des *GeneChip®* mit Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE). Die Signalintensität der RNA-Transkripte wurde in einem Scanvorgang aufgezeichnet und akquiriert.

2.11.2. Datenauswertung

Die Auswertung der Fluoreszenzdaten erfolgte mit dem Programm *Microarray Suite 5.0* (Affymetrix GmbH, München). Mit diesem Programm kann die Expression eines Gens quantitativ eingeschätzt, sowie eine Veränderung der Genexpression im Vergleich zum *GeneChip®* der Kontrolle angegeben werden. Gemäß dem *Wilcoxon signed rank test* wurden p-Werte für die Messgenauigkeit und die Änderungen der Signalintensitäten angegeben.

Alle *Array-Experimente* wurden mittels eines *Target-Intensitätswert* von 150 oder Standardwerten der *Microarray Suite* normalisiert. Gene mit einem Wert größer oder gleich 2 bzw. kleiner oder gleich -2 wurden als verändert in ihrer Expression definiert (*fold change*). Alle Gene mit Werten außerhalb der zuvor genannten Bereiche wurden als unverändert angesehen.

2.12. cDNA-Synthese

Durch *reverse* Transkription wird die RNA in ein stabileres *cDNA-Template* überschrieben, das für die nachfolgende PCR-Analytik eingesetzt werden kann. Das dazu notwendige Schlüsselenzym, die aus Retroviren isolierte *reverse* Transkriptase, ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die als Matrize sowohl RNA wie auch DNA verwenden kann.

2.12.1. Material und Reagenzien

Enzyme:

- *Expand reverse Transkriptase* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

Lösungen:

Konzentration:

- | | | |
|---|-------------------|--------|
| - Oligo-(dT)Primer | | |
| - cDNA Synthese Puffer (5x) | Tris-HCl | 250 mM |
| | KCl | 200 mM |
| | MgCl ₂ | 25 mM |
| | Tween | 2,5% |
| - DTT | | 10 mM |
| - dNTP-Mix (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) | | 10 mM |

2.12.2. Durchführung

Zur cDNA-Synthese wurden jeweils 2 µg RNA und 2 µl oligo-(dT)Primer mit ddH₂O zu einem Gesamtvolumen von 11 µl ergänzt und in einem 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäß für zehn Minuten bei 65°C erhitzt. Nach Ablauf dieses Reaktionsschrittes wurden die Proben für zwei Minuten auf Eis gestellt und anschließend kurz zentrifugiert. Die *reverse* Transkription wurde eingeleitet durch Zugabe von 2 µl Dithiothreitol (DTT), 2 µl Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP-Mix) und 1 µl *Expand reverse Transkriptase*. Zur DNA-Polymerisation wurden die Proben bei 43°C für 45 bis 60 Minuten erhitzt. Nach einer erneuten kurzen Abkühlung auf Eis erfolgte die Denaturierung der mRNA bei 92°C für zwei Minuten. Die synthetisierte cDNA wurde bis zu ihrer Weiterverarbeitung bei -20°C eingefroren.

2.13. Polymerasekettenreaktion

Die PCR wurde 1984 von Karl Mullis entwickelt und ist eine Methode zur gezielten *in vitro*-Amplifizierung von DNA-Sequenzen.

Das Reaktionsgemisch, auch als *Master-Mix* bezeichnet, enthält vier verschiedene dNTPs, eine Puffersubstanz, zwei Oligonukleotide (*sense*- und *antisense*-Primer), eine thermostabile DNA-Polymerase und eventuell Additiva wie beispielsweise Dimethylsulfoxid (DMSO) als Reaktionsbeschleuniger. Der Prozess besteht aus einer Serie von 20 bis 30 Zyklen, wobei jeder Zyklus aus drei Einzelschritten zusammengesetzt ist: Denaturierung, *Annealing* und Extension.

Durch Erhitzen auf etwa 90°C wird das *Template*, die Ausgangs-DNA, in zwei Einzelstränge gespalten (Denaturierung). Beim Abkühlen auf etwa 50°C lagern sich die Primer über Basenpaarung spezifisch an ihre komplementäre Sequenz des jeweiligen Einzelstrangs (*annealing*). Die DNA-Polymerase komplementiert die beiden Einzelstränge unter Verbrauch der dNTPs zum jeweiligem Doppelstrang bei etwa 70°C (Extension). Dabei stellt der Primer ein freies 3'-OH-Ende zur Verfügung, an das die Polymerase weitere Nukleotide anknüpfen kann. Somit ergibt sich auch, dass nur die DNA-Sequenz, welche zwischen zwei Primern liegt, amplifiziert wird.

Die Wiederholung der Zyklen resultiert in einer exponentiellen Zunahme der amplifizierten DNA-Moleküle. Die neu entstandenen DNA-Stränge dienen dabei im folgenden Zyklus als Amplifikations-Vorlage (Mullis et al., 1986).

2.13.1. Material und Reagenzien

Expand High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim):

Enzyme:

- *Enzyme mix, high fidelity* Mix aus thermostabiler Taq-Polymerase und *proofreading* Polymerase

Lösungen:Konzentration:

- DMSO
- *Expand High Fidelity buffer*
(10x)
- dNTP-Mix (Roche
Diagnostics GmbH,
Mannheim) 2 mM
- Startprimer, MWG,
Ebersberg 5 pmol/μl
- Endprimer, MWG,
Ebersberg 5 pmol/μl
- ddH₂O

2.13.2. Durchführung

Die PCR wurde in 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäßen in einem Gesamtvolumen von 20 μl auf Eis angesetzt. Sie enthielt folgende Reagenzien, pipettiert in der hier gezeigten Reihenfolge:

- *Template*-DNA (ca. 100 ng): 1,0 μl
- ddH₂O: 9,5 μl
- *Expand High Fidelity buffer* 2,0 μl
(10 x):
- dNTP-Mix (2 mM): 2,0 μl
- Startprimer (5 pmol/μl): 2,0 μl
- Endprimer (5 pmol/μl): 2,0 μl
- *Enzyme mix, high fidelity*: 1,0 μl
- DMSO 0,5 μl

2.13.3. PCR-Programm

Zyklen	Denaturierung	Annealing	Extension
Erster Zyklus	5' bei 95°C	1' bei 55°C	1' bei 72°C
29 folgende Zyklen	1' bei 95°C	1' bei 55°C	1' bei 72°C
letzter Zyklus	1' bei 95°C	1' bei 55°C	10' bei 72°C

2.14. Agarosegelelektrophorese

Durch Elektrophorese lassen sich DNA-Moleküle trennen. Abhängig von der Größe, Form, Nettoladung, sowie der angelegten Spannung und Porengröße der Gel-Matrix ergibt sich die spezifische Wanderungsgeschwindigkeit. Da die Nukleotide der DNA negative Ladungen tragen, wandern sie im elektrischen Feld zur Anode. Eine Ethidiumbromidfärbung macht durch Interkalierung mit der DNA die Banden im UV-Licht sichtbar (Sharp et al., 1973).

2.14.1. Material und Reagenzien

<u>Lösungen:</u>		<u>Konzentration:</u>
- TBE-Puffer (5 x)	Tris-HCl, pH 8,3	0,36 M
	Borsäure	0,36 M
	EDTA-Dinatriumsalz, pH 8	2 mM
- DNA-Probenpuffer (6 x)	Bromphenolblau	0,25 %
	Sucrose in Wasser (w/v)	40 %
- Ethidiumbromid		
- Seakem LE Agarose (Cambrex Molecular Biology, Hess Oldendorf)		
<u>Größenmarker:</u>		
- DNA-Leiter, 1 kb (PEQLAB GmbH Biotechnology, Erlangen)	Basenpaare: 10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.500, 3.000, 2.500, 2.000, 1.500, 1.000, 750, 500, 250	

2.14.2. Durchführung

Die Elektrophorese der PCR-Produkte erfolgte in horizontalen Standard-Elektrophoresekammern. Zur Herstellung eines einprozentigen Gels wurden 0,5 g Agarose in einem Erlenmeyerkolber mit 50 ml Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer versetzt. Das Gemisch wurde in der Mikrowelle erhitzt, bis sich die Agarose vollkommen aufgelöst hatte. Nach Abkühlung und Zugabe von 2,5 µl Ethidiumbromidlösung (Stammlösung: 10mg/ml) wurde das flüssige Gel blasenfrei in den Gel-Schlitten gegossen. Ein zuvor eingesetzter Teflonkamm sorgte für die Aussparung der Taschen, in die später die DNA-Proben gegeben wurden. Nach Aushärtung wurde das Gel mitsamt dem Schlitten in die

Elektrophoresekammer platziert. Diese wurde mit TBE-Puffer aufgefüllt, bis das Gel komplett vom Puffer bedeckt war. Die mit 1/6 vol Probenpuffer versetzte DNA wurde in die Taschen gegeben und bei einer Spannung von 100 Volt elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die DNA-Banden im UV-Licht des Transilluminators sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert.

2.15. DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Das *QIAX II Gel Extraction Kit* wurde in Anlehnung an das Protokoll von Vogelstein und Gillespie entwickelt. DNA bindet in Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen an Glaspartikel. Durch mehrere Waschschrte kann das Gemisch von Salz und weiteren Verunreinigungen befreit werden. Anschließend löst Wasser die DNA wieder von den Glaspartikeln, ohne dass diese degradiert (Vogelstein and Gillespie, 1979).

2.15.1. Material und Reagenzien

QIAX II Gel Extraction Kit

(Qiagen GmbH, Hilden):

Lösungen:

- *Buffer QX1*
- QIAEX II Suspension
- *Buffer PE*, versetzt
mit 100% Ethanol

2.15.2. Durchführung

Die DNA-Extraktion erfolgte gemäß den Herstellerangaben, die dem Produkt beilagen.

2.16. Real-Time PCR

Bei der konventionellen PCR ist es problematisch, das PCR-Produkt akkurat zu quantifizieren. Dies liegt daran, dass die PCR, abhängig von der Menge des eingesetzten *Templates*, nach einer bestimmten Zykluszahl eine sogenannte Plateau-Phase erreicht, in welcher die Amplifikation nicht mehr exponentiell ist. Grund dafür ist beispielsweise ein

Verbrauch der Reagenzien, eine nachlassende Aktivität der Polymerase oder eine Akkumulation an Pyrophosphat-Molekülen.

Mit der Möglichkeit die PCR-Produkte in Echtzeit, *real-time*, das heißt zum Akkumulationszeitpunkt zu messen, kann das Amplifikations-Produkt direkt in der exponentiellen Phase der PCR quantifiziert werden. In der exponentiellen Phase ist das gemessene PCR-Produkt direkt proportional zur *Template*-Menge, welche zu Beginn der PCR eingesetzt wurde (Freeman et al., 1999; Ginzinger, 2002).

Das Prinzip der Quantifizierung bei der *Real-Time* PCR beruht auf Fluoreszenz-Messungen von dsDNA-bindenden Fluorochromen. In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem interkalierenden Farbstoff *SYBR Green I* gearbeitet. *SYBR Green I* wird durch eine Blau-Licht emittierende Diode (470 nm) spezifisch angeregt, und die resultierende Emissionsfluoreszenz wird durch eine Silikon-Photodiode mit einem Wellenlängenfilter von 530 nm gemessen. Neben dieser Photodiode gibt es bei dem hier verwendeten *LightCycler* von Roche Molecular Biochemicals noch zwei weitere in anderen Wellenlängenbereichen, die es ermöglichen unterschiedliche Fluorophore einzusetzen. (Wittwer et al., 1997).

Die während des Amplifikations-Prozesses in jedem Zyklus gemessene emittierte Fluoreszenz repräsentiert die bis zu diesem Zeitpunkt amplifizierte Probenmenge. Das heißt, dass mit steigender initialer *Template-Konzentration* weniger Amplifikations-Zyklen gebraucht werden, um den Punkt zu erreichen, in welchem die gemessene Fluoreszenz statistisch signifikant über der Hintergrundfluoreszenz liegt. Dieser Punkt wird als Schwellenwert (C_T) bezeichnet. Er liegt in der exponentiellen Phase der Amplifikation und wird berechnet als die Standardabweichung der Basislinien-Fluoreszenz multipliziert mit dem Faktor 10. Die Basislinie ist definiert als Fluoreszenz derjenigen PCR-Zyklen am Anfang des Amplifikations-Prozesses, in denen der Anstieg der Fluoreszenz noch zu gering ist, um von der Maschine detektiert werden zu können. Die ermittelten C_T -Werte der Proben werden für die spätere Quantifizierung genutzt (Ginzinger, 2002).

2.16.1. Material und Reagenzien

FastStart DNA Master SYBR

Green I (Roche Diagnostics

GmbH, Mannheim):

Enzyme:

- *LightCycler FastStart*

Enzyme

Lösungen:

Konzentration:

- *LightCycler FastStart*

Reaction Mix

- MgCl₂

25 mM

- H₂O, *PCR grade*

2.16.2. Durchführung

Die *Real-Time PCR* erfolgte nach einem laboreigenen optimierten Protokoll. Zunächst wurden die Glaskapillaren in die Adapter des 4°C kalten Kühlblockes positioniert. Anschließend wurde der Master-Mix jeweils für das zu amplifizierende Gen und die endogene Kontrolle Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) angesetzt. Pro Reaktionskapillare wurden 1 µl Enzym plus Reaktions-Mix, 1 µl Startprimer, 1 µl Endprimer, 0,4 µl MgCl₂, 0,5 µl DMSO und 4,1 µl H₂O berechnet. Diese Menge wurde, multipliziert mit der gewünschten Reaktionszahl plus eine zusätzliche Reaktion, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Für jede *Real-Time PCR* wurde der Mix, Enzym plus Reaktions-Mix im Verhältnis eins zu fünf, frisch angesetzt. Es folgte die Verteilung des *Master-Mixes* zu je 8 µl pro Reaktionskapillare und die Zugabe von 2 µl *Template* (ca. 200 ng DNA) oder 2 µl der Verdünnungsserie. Für eine Negativkontrolle wurde das *Template* durch 2 µl Wasser ersetzt. Eine Verdünnungsserie des zuvor mittels konventioneller PCR amplifizierten *Templates* diente der Erstellung eines externen Standards. Die Verdünnung betrug 1 ng/µl, 100 pg/µl und 10 pg/µl.

Die Kapillaren wurden mit einem Plastikstopper verschlossen, mit dem Adapter in eine Mikrozentrifuge gestellt und für fünf Sekunden bei 1000 rpm zentrifugiert. Dies dient dem Transfer des Reaktionsmixes in das Kapillar-Ende. Anschließend wurden die Kapillaren in das *LightCycler-Karussell* gestellt. Das folgende Programm wurde gestartet:

2.16.3. Real-Time PCR-Programm

Zyklen	Denaturierung	Annealing	Extension
Präinkubation	600 sec bei 95°C		
31 folgende Zyklen	15 sec bei 95°C	10 sec bei 60°C	30 sec bei 74°C

Die Präinkubationsphase dient der Enzymaktivierung: Die hitzelabilen Gruppen, die das Enzym bei Raumtemperatur inaktiv halten, werden entfernt. Die Fluoreszenz wurde am Ende der Extensionsphase gemessen.

2.16.4. Datenauswertung

Die Datenauswertung erfolgte mit der zugehörigen *LightCycler-Software* nach der häufig genutzten Methode der relativen Quantifizierung. Die Probe 1 wurde ins Verhältnis zur Probe 2 gesetzt.

Zuvor wurde die Menge des PCR-Produktes anhand der co-amplifizierten endogenen Kontrolle normalisiert. Dadurch wurden Fehler, die auf gering veränderte PCR-Effekte oder verschiedene Ausgangskonzentrationen basieren, vermieden. Als endogene Kontrolle wurde ein sogenanntes *housekeeping-Gen* verwendet, welches idealerweise unter den verschiedenen experimentellen Bedingungen immer konstant exprimiert werden sollte. In der vorliegenden Arbeit wurde sich für GAPDH, ein vielfach verwendetes *housekeeping-Gen*, entschieden. Die RNA, welche GAPDH codiert, wird von den meisten Zelltypen exprimiert (Giulietti et al., 2001; Livak and Schmittgen, 2001).

Um spezifische von unspezifischen Fluoreszenzsignalen zu unterscheiden, bietet der *LightCycler* die Möglichkeit einer Schmelzpunktanalyse am Ende eines Amplifikations-Prozesses. Unspezifische PCR-Produkte schmelzen normalerweise bei einer sehr viel niedrigeren Temperatur als spezifische Produkte. Parallel zum Schmelzvorgang fällt auch das Fluoreszenzsignal, da *SYBR Green I* nur an nicht denaturierte DNA bindet. Entsprechend kann bei dem spezifischen Amplifikations-Produkt mit seinem sehr viel höheren Schmelzpunkt noch ein Fluoreszenzsignal gemessen werden, während eine Probe ohne spezifische Target-Moleküle schon keine Fluoreszenz mehr zeigt.

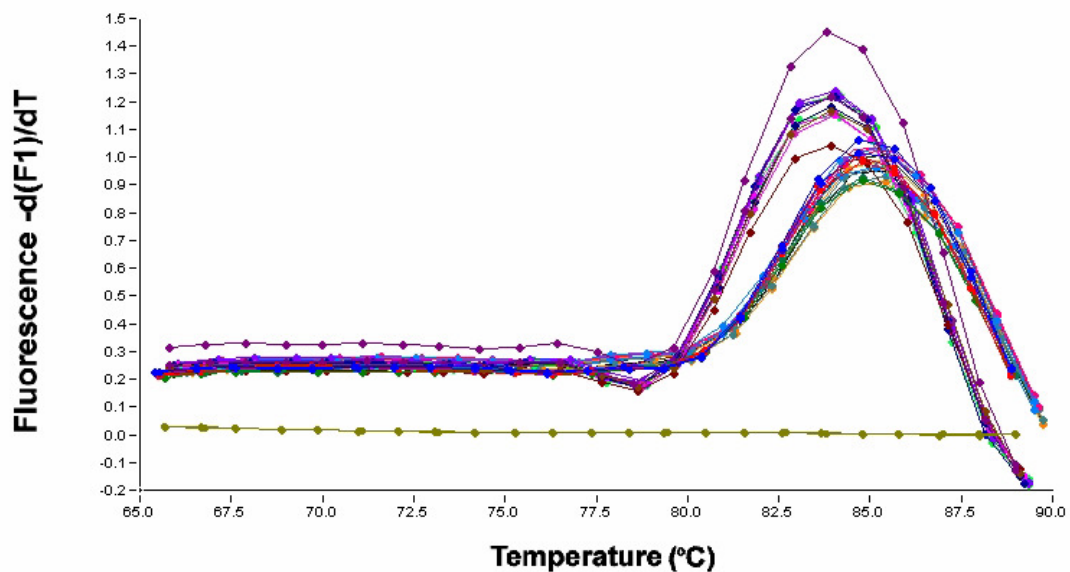


Abb. 3.8: Exemplarische Darstellung einer Schmelzpunktanalyse. Nach der eigentlichen *Real-Time PCR* wird das Produkt schrittweise erhitzt. Bei einer für das Produkt spezifischen Temperatur denaturiert der Doppelstrang und es kommt zum Fluoreszenzabfall. Der erste *Peak* entspricht GAPDH, der zweite dem Transkriptionsfaktor Sfp1.

2.17. Generierung retroviraler Partikel und verwendete Plasmide

Zur Generierung viraler Partikel wurden Zellen der retroviralen Verpackungszelllinie 293 GPG verwendet. Die 293GPG-Zelllinie ist eine von *human embryonic kidney* (HEK/293)-Zellen abgeleitete retrovirale Verpackungszelllinie. Retrovirale Verpackungszelllinien enthalten die Gene für alle retroviralen Proteine, welche für die Produktion infektiöser, replikationsdefizienter Retroviren notwendig sind. So besitzt die 293GPG-Zelllinie stabil integrierte Expressionsvektoren für das amphotrope Hüllprotein VSV-G (*vesicular stomatitis virus*) und das MuMLV (*Moloney murine leukemia virus*) *gag-pol*-Polyprotein. Die konstitutive Expression von VSV-G ist unter normalen Umständen toxisch für die Zelle. Deshalb wurde die VSV-G-Expression der Zelllinie unter die Kontrolle eines Tetracyclin-abhängigen Promoters gestellt (Ory et al., 1996).

Plasmide:

cMMP-Cre-GFP (*chicken matrix metalloproteinase vector-causes recombination-GFP*)

MMP-IRES-GFP

(*metalloproteinase vector-internal ribosome entry site-GFP*)

Referenz:

laboreigen, konstruiert ausgehend von cMMP-(IRES)-GFP (Klein et al., 2000)

laboreigen, konstruiert ausgehend von cMMP-(IRES)-GFP (Klein et al., 2000)

2.17.1. Durchführung

Die Virusüberstände der mit den Plasmiden cMMP-Cre-GFP und MMP-IRES-GFP nach der Methode Kalziumphosphat-DNA-Korpräzipitation transient transfizierten 293GPG-Zellen wurden freundlicherweise von Harini Nivarthi für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

2.18. Transduktion hämatopoetischer Stammzellen mittels *Spinoculation*

Die Transduktion der Sca1⁺ Lin⁻-Zellen erfolgte nach der Methode *Spinoculation* durch Zentrifugation unter Zugabe von Polybrene (Manning et al., 1971; O'Doherty et al., 2000).

2.18.1. Durchführung

Für die Transduktion wurde auf die Sca1⁺ Lin⁻-Zellen behutsam aufgetauter Virusüberstandes und Polybrene (8µg/ml) gegeben und vorsichtig gemischt. Nach einer Stunde Inkubation im Brutschrank wurde die *24-Well-Platte* mit den Zellen für zweieinhalb Stunden bei 37°C und 1.800 rpm zentrifugiert. Anschließend folgten sechs bis acht weitere Stunden Inkubation der Viruspartikel mit den Zellen im Brutschrank. Am nächsten Morgen wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, danach das Zellpellet in 3 ml frischem Medium aufgenommen, die Zellen auf eine *6-Well-Platte* ausplattiert und weiter kultiviert.

48 Stunden nach *Spinoculation* konnte die Transduktionseffizienz als Anzahl GFP-positiver Zellen im FACS-Gerät bestimmt werden.

Anhand dieser GFP-Reporterexpression wurden die positiv transduzierten Zellen mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortierung separiert. Für diesen Arbeitsschritt wurde der Zellsorter MoFlo™ von Dako Cytomation verwendet. Die GFP-positiven Zellen wurden anschließend auf einer *12-Well-Platte* bei einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen/Well in IMDM+10% FCS Medium ausplattiert und in DCs differenziert (siehe 2.8.).

2.19. Extraktion genomischer DNA

Das *E.Z.N.A.® Tissue DNA Mini Kit* basiert auf einem Säulensystem mit Silikatmatrix. Die Silikatmatrix bindet reversibel DNA-Moleküle. Zellulärer *Debris*, Proteine und sonstige Kontaminationen können währenddessen durch Waschen mit speziellen Puffern entfernt werden.

2.19.1. Material und Reagenzien

E.Z.N.A.® Tissue DNA Mini Kit

(PEQLAB Biotechnologie
GmbH, Erlangen)

Lösungen:

- TL-Puffer
- BL-Puffer
- DNA-Waschpuffer, versetzt
mit 100% Ethanol
- Elutionspuffer
- OB™ Protease, gelöst in TE
Puffer
- 100% Ethanol

Konzentration:

10mM

2.19.2. Durchführung

Die DNA-Isolation erfolgte strikt nach Herstellervorgaben gemäß dem Produkt beigefügten Protokoll.

3. Ergebnisse

3.1. *In vitro* Differenzierung von CR1-Zellen in dendritische Zellen

Zellen der von Rathinam et al. entwickelten multipotenten hämatopoetischen Vorläuferzelllinie CR1 wurden nach einem ebenfalls von Rathinam et al. etablierten Protokoll in DCs differenziert (Rathinam et al., 2006). Nach wenigen Tagen Stimulation mit GM-CSF zeigten die CR1-Zellen morphologisch das typische Erscheinungsbild von DCs. Am Tag 8 der Zytokinstimulation wurden die Zellen im FACS-Gerät bezüglich DC-definierender Oberflächenmarker analysiert. Mehr als 95% der in DCs differenzierten CR1-Zellen zeigten morphologische und immunphänotypische Charakteristika myeloider DCs: Expression der Oberflächenmarker CD11c, CD40, CD80, CD86 und MHCII-IA^b.

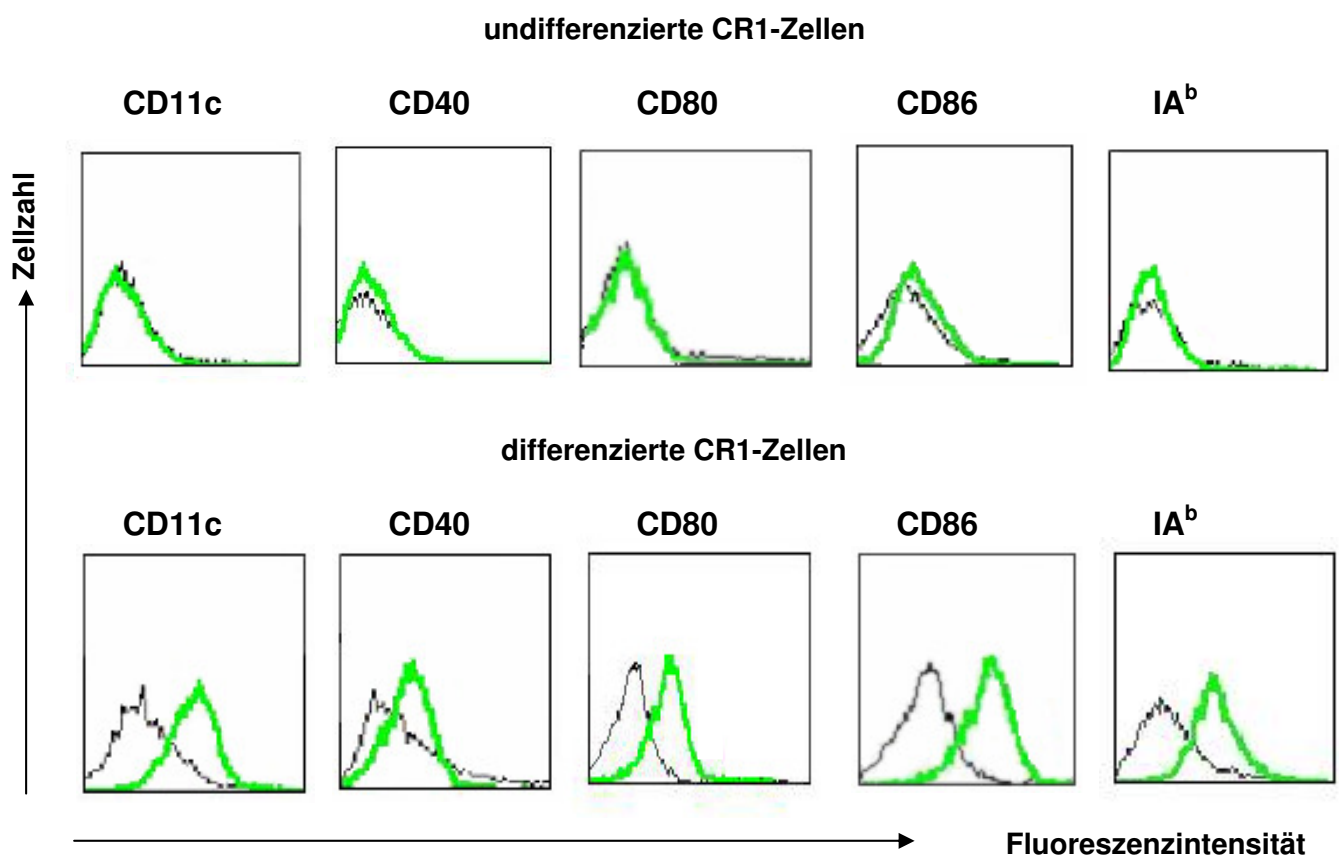


Abb. 3.1: FACS-Analyse: Vergleich der spezifischen Oberflächenmarkerexpression undifferenzierter und differenzierter CR1-Zellen.

3.2. Genexpressionsanalyse mittels *Microarray-Technologie* zur Identifizierung von Transkriptionsfaktoren, welche die frühe Entwicklung dendritischer Zellen kontrollieren

Ziel der Genexpressionsanalyse war es, TFs zu identifizieren, die eine Schlüsselrolle in der frühen Differenzierungsphase von DCs spielen.

Dazu wurden CR1-Zellen mittels GM-CSF-Stimulation in dendritische Zellen differenziert. Nicht stimulierte CR1-Zellen dienten als Kontrolle. Jeweils zu den Zeitpunkten 6, 24 und 48 Stunden nach GM-CSF-Gabe wurde die RNA aus den Zellen extrahiert.

Die Gen-Expressionsanalyse wurde anschließend mittels *Affymetrix-Microarray-Technologie* von Herrn Dr. Robert Geffers und Herrn Prof. Dr. Jan Buer (GBF, Braunschweig) durchgeführt. Hierbei wurde der *GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array*, der mehr als 39.000 Transkripte enthält, eingesetzt. Die extrahierte RNA von jedem der oben genannten Ansätze wurde in Biotin-markierte cRNA umgewandelt, mit jeweils einem GeneChip® hybridisiert und mithilfe eines *K-Means Cluster-Algorithmus* analysiert.

Zusammenfassend ergab sich, dass zu den gewählten Zeitpunkten 6, 24 und 48 Stunden, insgesamt 628 Gene hochreguliert waren. Von den 56 als TFs identifizierten Genen waren 9 zum Zeitpunkt 6 Stunden (Tabelle 3.1), 19 zum Zeitpunkt 24 Stunden (Tabelle 3.2) und 28 zum Zeitpunkt 48 Stunden (Tabelle 3.3) exprimiert.

Gensymbol	UniGenBeschreibung	n-fache Änderung der Expression
Hoxa9	Homeo box A9	1,49
Klf7	Kruppel-like-factor 7 (ubiquitous)	1,08
2210412K09Rik	RIKEN cDNA 2210412K09 gene	1,08
MGC18736	Hypothetical protein MGC18736	1,36
Rbm6	RNA binding motif protein 6	2,13

Tabelle 3.1: Liste der nach 6 Stunden GM-CSF-Stimulation in den CR1-Zellen hochregulierten Transkriptionsfaktoren.

Gensymbol	UniGenBeschreibung	n-fache Änderung der Expression
Satb1	Special AT-rich sequence binding protein 1	1,55
Sin3b	Transcriptional regulator, SIN3B (yeast)	1,48
Sox4	SRY-box containing gene 4	1,07
Stat5b	Signal transducer and activator of transcription 5B	1,14

Tabelle 3.1: Liste der nach 6 Stunden GM-CSF-Stimulation in den CR1-Zellen hochregulierten Transkriptionsfaktoren.

Gensymbol	UniGenBeschreibung	n-fache Änderung der Expression
AI256856	EST AI256856	1,23
Aplp2	Amyloid beta (A4) precursor-like protein 2	1,28
D16Ertd465e	DNA segment, Chr 16, ERATO Doi 465	1,92
Dnmt3l	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3-like	2,48
Egr1	Early growth response 1	1,48
Egr2/Krox20	Early growth response 2	2,32
Hlx	H2.0-like homeo box gene	2,11
Irf7	Interferon regulatory factor 7	1,11
Lmo4	LIM only 4	1,82
Nab2	Ngfi-A binding protein 2	2
Nucb2	Nucleobindin 2	4,34

Tabelle 3.2: Liste der nach 24 Stunden GM-CSF-Stimulation in den CR1-Zellen hochregulierten Transkriptionsfaktoren.

Gensymbol	UniGenBeschreibung	n-fache Änderung der Expression
Plagl2	Pleiomorphic adenoma gene-like 2	1,09
Pml	Promyelocytic leukemia	1,05
Rbl2	Retinoblastoma-like 2	1,28
RelB	Avian reticuloendotheliosis viral (v-rel) oncogene related B	1,86
Stat1	Signal transducer and activator of transcription 1	1,59
Tcfec	Transcription factor EC	2,56
Trim30	Tripartite motif protein 30	1,4
Zfp3611	Zinc finger protein 36, C3H type-like 1	1,43

Tabelle 3.2: Liste der nach 24 Stunden GM-CSF-Stimulation in den CR1-Zellen hochregulierten Transkriptionsfaktoren.

Gensymbol	UniGenBeschreibung	n-fache Änderung der Expression
Atbf1	AT motif binding factor 1	1,36
Bcl6	B-cell leukemia/lymphoma 6	1,41
Cebpb	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	1,88
Creb3	cAMP responsive element binding protein 3	1,63
D16Ert465e	DNA segment, Chr 16, ERATO Doi 465, expressed	2,02/1,37
Dnmt3a	DNA methyltransferase 3A	2,66
Egr1	Early growth response 1	2,67
Egr2/Krox20	Early growth response 2	3,34

Tabelle 3.3: Liste der nach 48 Stunden GM-CSF-Stimulation in den CR1-Zellen hochregulierten Transkriptionsfaktoren.

Gensymbol	UniGenBeschreibung	n-fache Änderung der Expression
Ets2	E26 avian leukemia oncogene 2, 3' domain	1,98
Foxj2	Forkhead box J2	2,52
Hlx	H2.0-like homeo box gene	2,35
Icsbp	Interferon consensus sequence binding protein	2,38
Ifi204	Interferon activated gene 204	6,97
Irf7	Interferon regulatory factor 7	3,87
Jun	Jun oncogene	1,46
Junb	Jun-B oncogene	1,43
Nab2	Ngfi-A binding protein 2	2,46
Nfat5	Nuclear factor of activated T-cells 5	1,18
Nfatc1	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1	1,26
Nfe2l2	Nuclear, factor, erythroid derived 2, like 2	1,48
Notch1	Notch gene homolog 1, (Drosophila)	2,54
Nr4a1	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	2,81
RelB	Avian reticuloendotheliosis viral (v-rel) oncogene related B	5,42
Sfpi1	SFFV proviral integration 1	1,41
Sin3b	Transcriptional regulator, SIN3B (yeast)	2,15
Tcfec	Transcription factor EC	3,64
Trim30	Tripartite motif protein 30	2,51
Zfp36l1	Zinc finger protein 36, C3H type-like 1	1,85

Tabelle 3.3: Liste der nach 48 Stunden GM-CSF-Stimulation in den CR1-Zellen hochregulierten Transkriptionsfaktoren.

3.3. Validierung des Expressionsstatus der im *Microarray* identifizierten Transkriptionsfaktoren mittels *Real-Time PCR*

Um die im *Microarray* identifizierten 56 TFs zu verifizieren, wurden *Real-Time PCR-Analysen* durchgeführt.

Hierfür wurden jene TFs ausgewählt, die im *Microarray* eine besonders gute Signalintensität gezeigt hatten und die deshalb mit großer Wahrscheinlichkeit während der GM-CSF-Stimulation in den CR1-Zellen tatsächlich hoch- oder herunterreguliert sind. Dies war bei 34 der 56 TFs der Fall, für die anschließend eine *Real-Time PCR Analyse* durchgeführt wurde. Verwendet wurde die cDNA eines neuen Ansatzes GM-CSF-stimulierter und nicht-stimulierter CR1-Zellen. Die Datennormalisierung erfolgte anhand des ebenfalls amplifizierten *housekeeping-Gens* GAPDH.

Das Ergebnis der *Real-Time PCR Analyse* bestätigte die Hochregulierung von 25 TFs in den CR1-Zellen zu den gewählten Zeitpunkten 6, 24 und 48 Stunden nach GM-CSF-Stimulation. Im einzelnen konnte für den Zeitpunkt 6 Stunden für 6 der 7 gewählten TFs, für den Zeitpunkt 24 Stunden für 11 der 15 gewählten TFs und für den Zeitpunkt 48 Stunden für 17 der 23 gewählten TFs eine Hochregulierung verifiziert werden, dies entspricht 75,56%.

Die Tabelle 3.4 zeigt die Daten der *Real-Time PCR* im Vergleich mit der *Microarray-Analyse*.

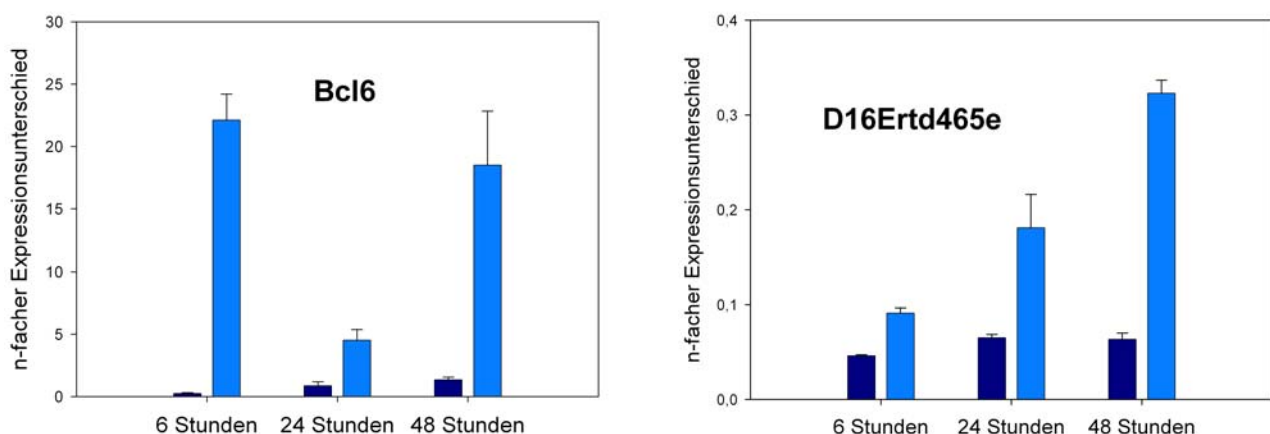


Abb. 3.2: In der *Real-Time PCR-Analyse* zu allen gewählten Zeitpunkten (6, 24 und 48 Stunden) hochregulierte Transkriptionsfaktoren.

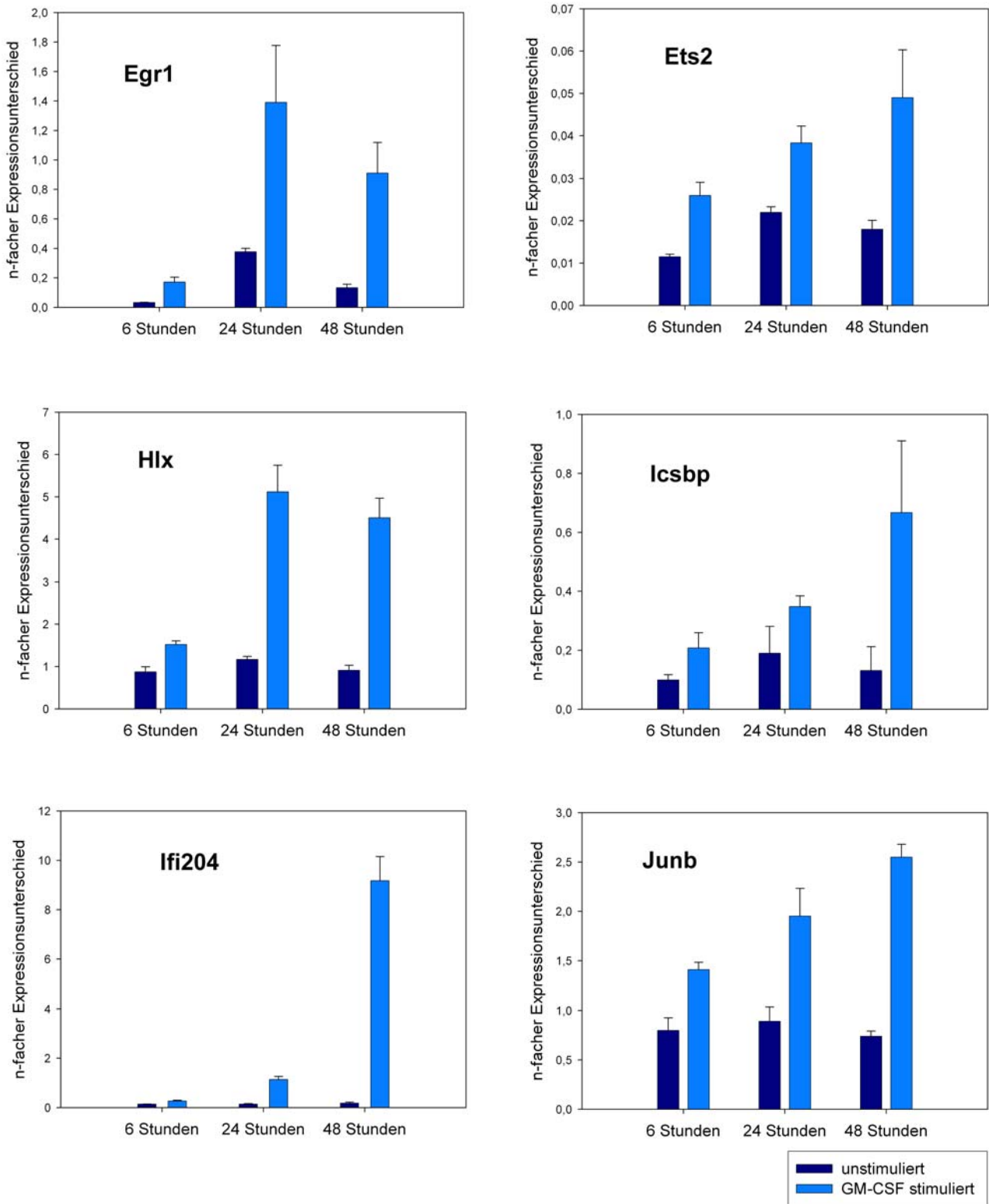


Abb. 3.2: In der *Real-Time PCR*-Analyse zu allen gewählten Zeitpunkten (6, 24 und 48 Stunden) hochregulierte Transkriptionsfaktoren.

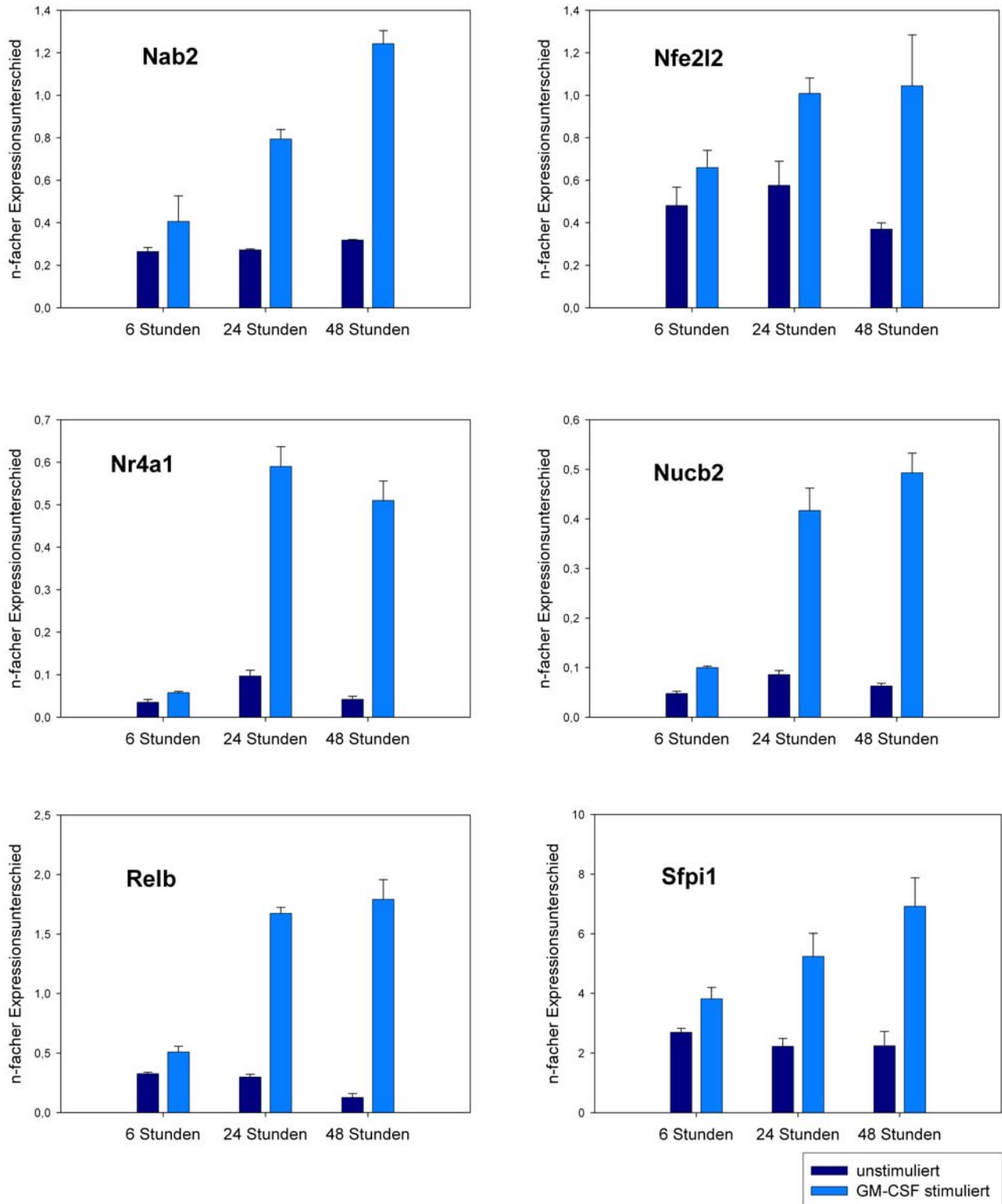


Abb. 3.2: In der *Real-Time PCR*-Analyse zu allen gewählten Zeitpunkten (6, 24 und 48 Stunden) hochregulierte Transkriptionsfaktoren.

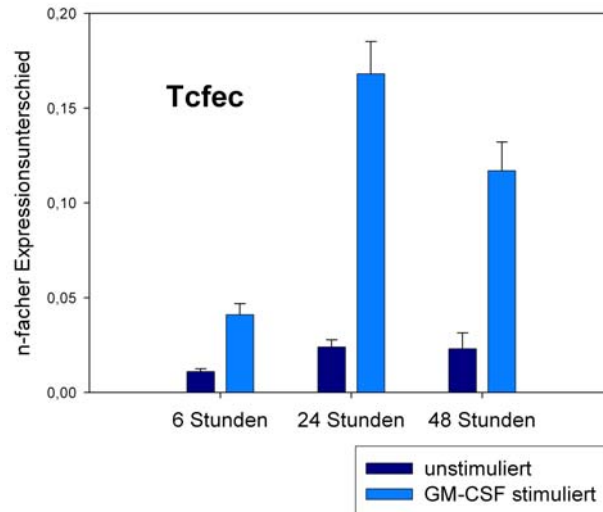


Abb. 3.2: In der *Real-Time PCR*-Analyse zu allen gewählten Zeitpunkten (6, 24 und 48 Stunden) hochregulierter Transkriptionsfaktor.

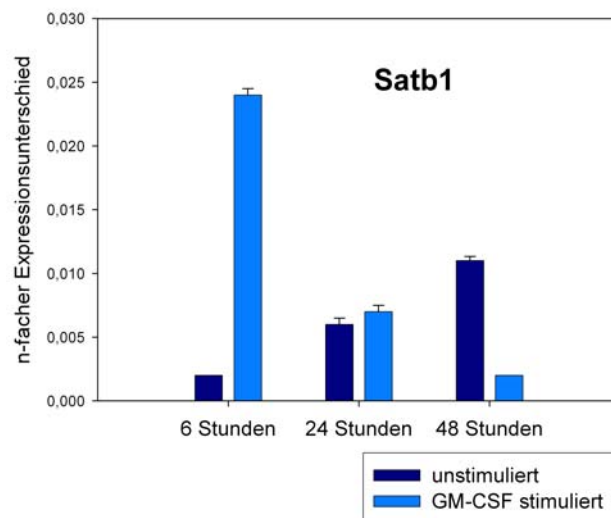


Abb. 3.3: In der *Real-Time PCR*-Analyse zu den gewählten Zeitpunkten 6 und 24 Stunden hochregulierter Transkriptionsfaktor.

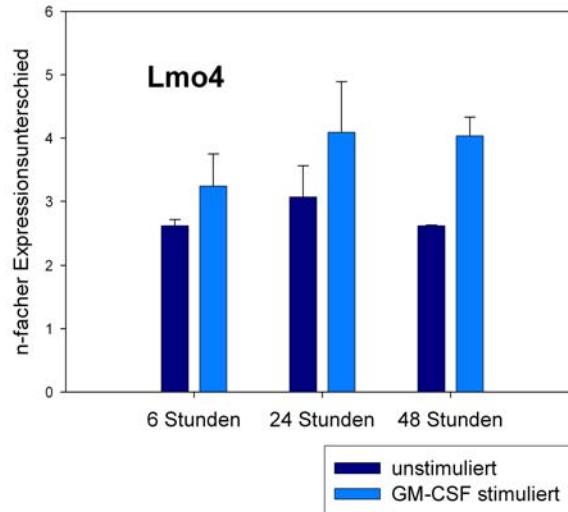


Abb. 3.4: In der *Real-Time PCR*-Analyse zu den gewählten Zeitpunkten 6 und 48 Stunden hochregulierter Transkriptionsfaktor.

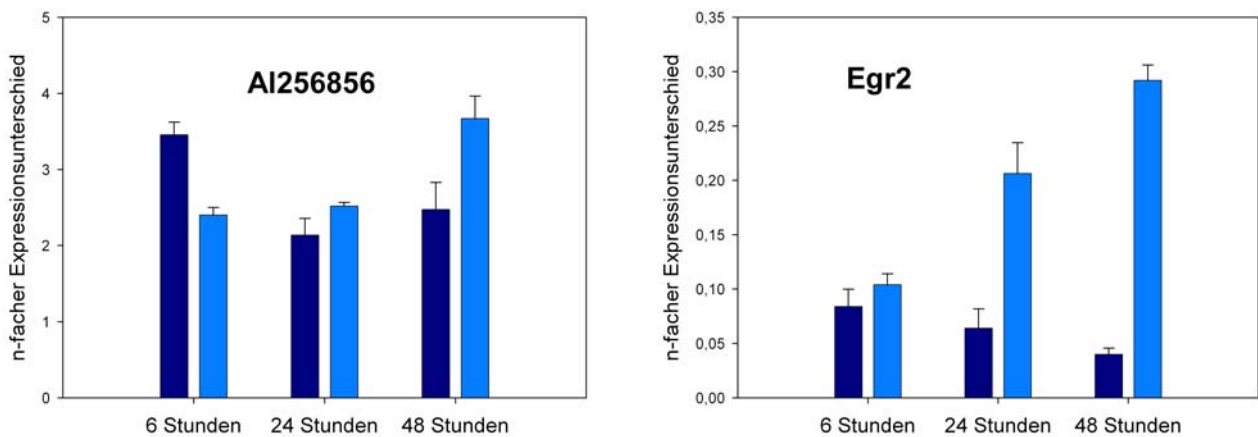


Abb. 3.5: In der *Real-Time PCR*-Analyse zu den gewählten Zeitpunkten 24 und 48 Stunden hochregulierte Transkriptionsfaktoren.

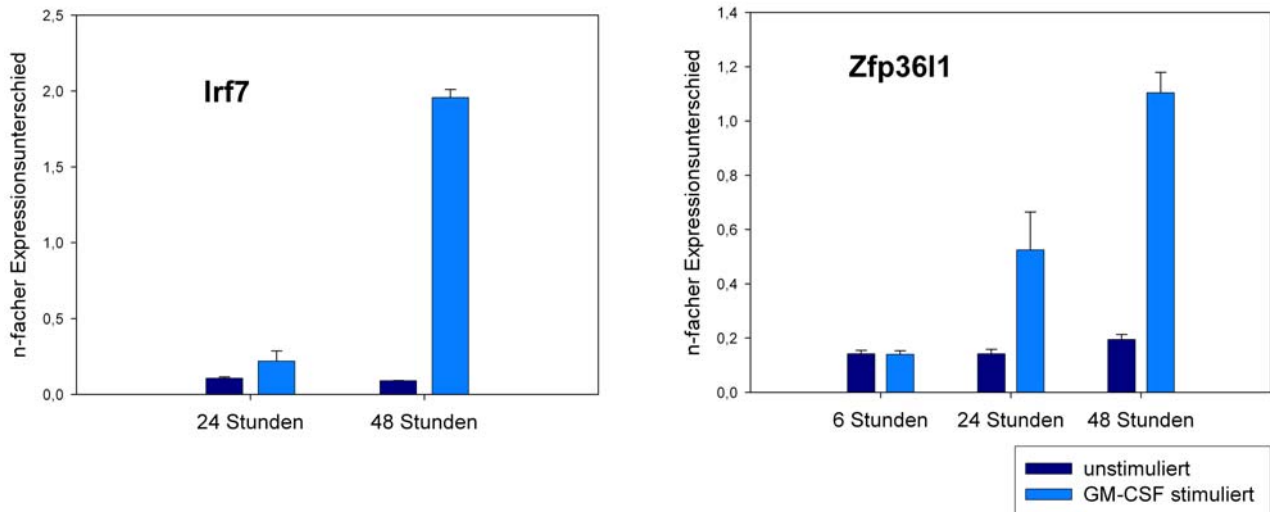


Abb. 3.5: In der *Real-Time PCR-Analyse* zu den gewählten Zeitpunkten 24 und 48 Stunden hochregulierte Transkriptionsfaktoren.

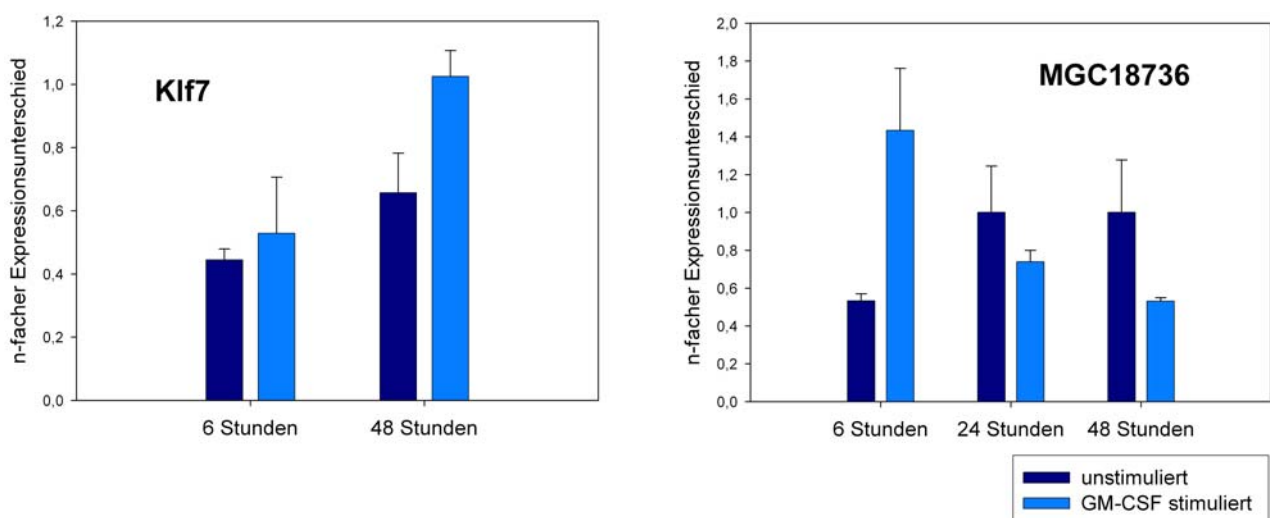


Abb. 3.6: In der *Real-Time PCR-Analyse* nur zu einem der gewählten Zeitpunkte (6, 24 und 48 Stunden) hochregulierte Transkriptionsfaktoren.

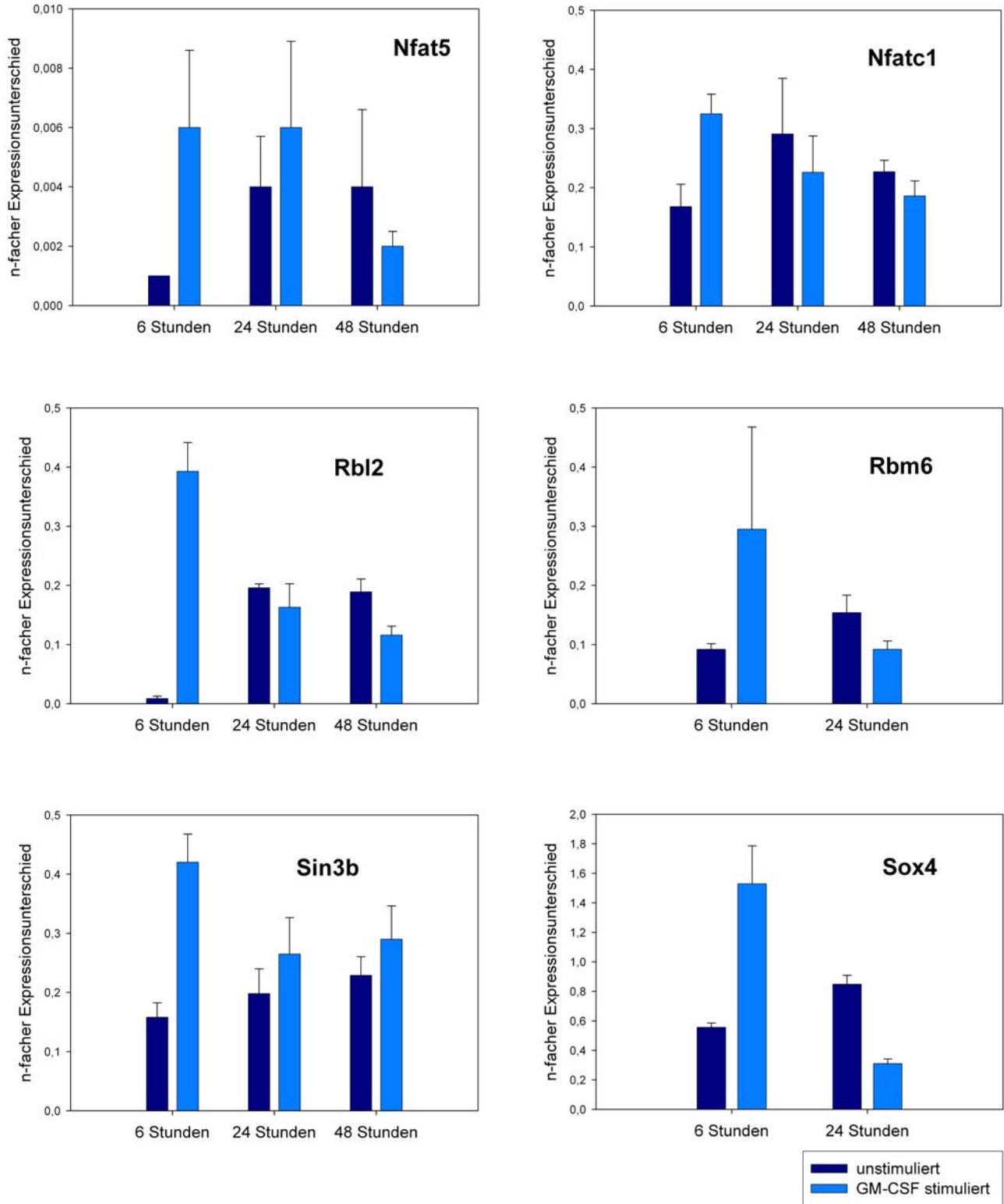


Abb. 3.6: In der *Real-Time PCR*-Analyse nur zu einem der gewählten Zeitpunkte (6, 24 und 48 Stunden) hochregulierte Transkriptionsfaktoren.

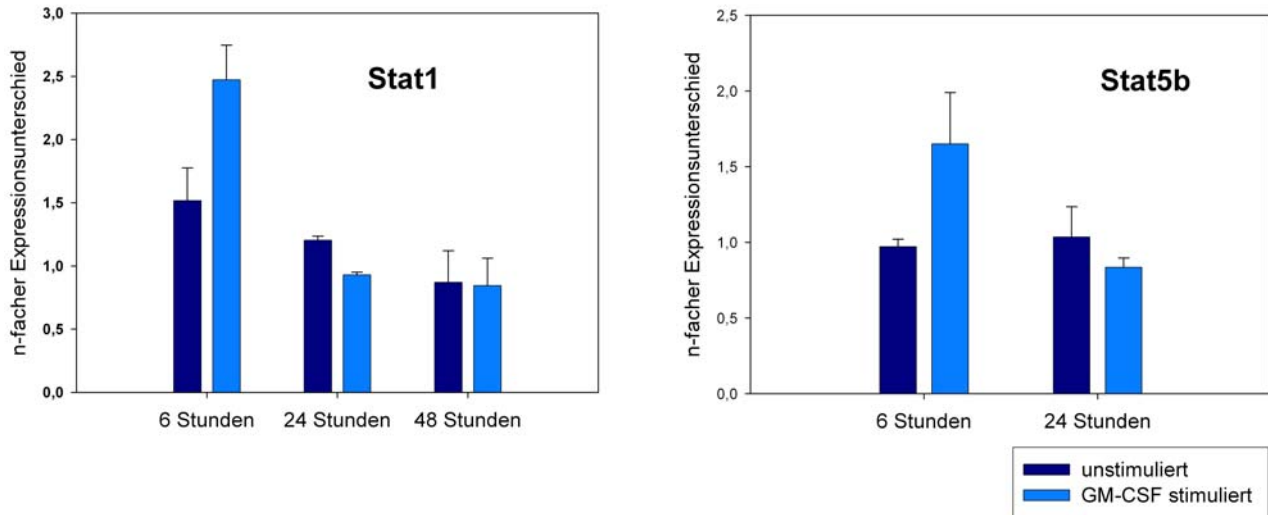


Abb. 3.6: In der *Real-Time PCR*-Analyse nur zu einem der gewählten Zeitpunkte (6, 24 und 48 Stunden) hochregulierte Transkriptionsfaktoren.

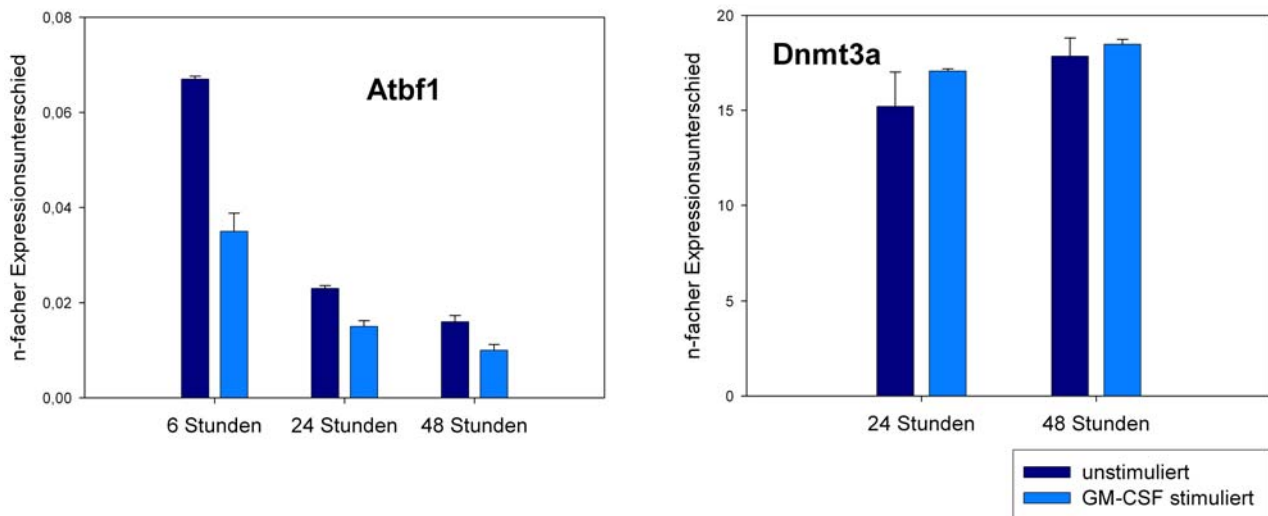


Abb. 3.7: In der *Real-Time PCR*-Analyse zu keinem der gewählten Zeitpunkte (6, 24 und 48 Stunden) hochregulierte Transkriptionsfaktoren.

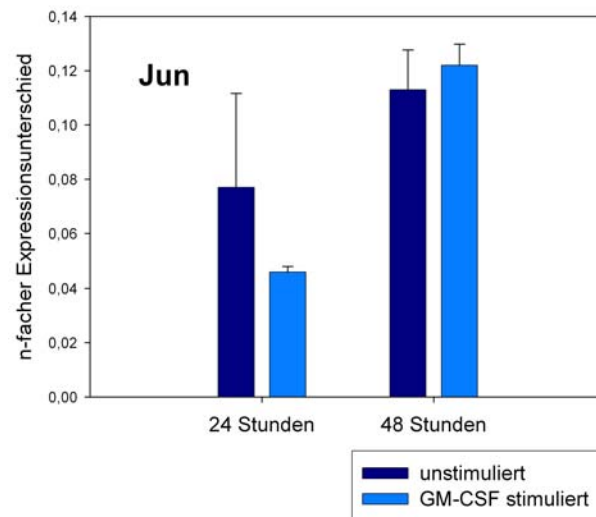


Abb. 3.7: In der *Real-Time PCR*-Analyse zu keinem der gewählten Zeitpunkte (6, 24 und 48 Stunden) hochregulierte Transkriptionsfaktoren.

Gensymbol	Expressionsprofil					
	<i>Microarray</i>			<i>Real-Time PCR</i>		
	6h	24h	48h	6h	24h	48h
AI256856	↔	↑	↑	↓	↑	↑
Atbf1	↔	↔	↑	↓	↓	↓
Bcl6	↔	↔	↑	↑	↑	↑
D16Ertd465e	↔	↑	↑	↑	↑	↑
Dnmt3a	↔	↔	↑		↔	↔
Egr1	↔	↑	↑	↑	↑	↑
Egr2/Krox20	↔	↑	↑	↔	↑	↑
Ets2	↔	↔	↑	↑	↑	↑
Hlx	↔	↑	↑	↑	↑	↑
Icsbp	↔	↔	↑	↑	↑	↑
Ifi204	↔	↔	↑	↑	↑	↑

Tabelle 3.4: Vergleich der *Microarray*-Daten mit der *Real-Time PCR*-Analyse. Die fett markierten Pfeile zeigen nicht übereinstimmende Expressions-Daten an.

Gensymbol	Expressionsprofil					
	<i>Microarray</i>			<i>Real-Time PCR</i>		
	6h	24h	48h	6h	24h	48h
Irf7	↔	↑	↑	↔	↑	↑
Jun	↔	↔	↑		↓	↔
Junb	↔	↔	↑	↑	↑	↑
Klf7	↑	↔	↔	↔		↑
Lmo4	↔	↑	↔	↑	↔	↑
MGC18736	↑	↔	↔	↑	↔	↓
Nab2	↔	↑	↑	↑	↑	↑
Nfat5	↔	↔	↑	↑	↔	↔
Nfatc1	↔	↔	↑	↑	↔	↔
Nfe2l2	↔	↔	↑	↑	↑	↑
Nr4a1	↔	↔	↑	↑	↑	↑
Nucb2	↔	↑	↔	↑	↑	↑
RelB	↔	↑	↑	↑	↑	↑
Rbl2	↔	↑	↔	↑	↔	↓
Rbm6	↑	↔	↔	↑	↓	
Satb1	↑	↔	↔	↑	↑	↓
Sfpi1	↔	↔	↑	↑	↑	↑
Sin3b	↑	↔	↑	↑	↔	↔
Sox4	↑	↓	↓	↑	↓	
Stat1	↔	↑	↔	↑	↓	↔
Stat5b	↑	↔	↔	↑	↔	
Tcfec	↔	↑	↑	↑	↑	↑
Zfp36l1	↔	↑	↑	↔	↑	↑

Tabelle 3.4: Vergleich der *Microarray*-Daten mit der *Real-Time PCR*-Analyse. Die fett markierten Pfeile zeigen nicht übereinstimmende Expressions-Daten an.

3.4. Untersuchungen zur Bedeutung des Transkriptionsfaktors Krox20 für die Differenzierung von dendritischen Zellen

Nach der Validierung der differentiellen Expression einer Serie von TFs stellte sich die Frage, wie die Bedeutung der einzelnen Faktoren allein bzw. in ihrer synergistischen Wirkung untersucht werden können. Zwei Wege stellten sich dar: einerseits kann die spezifische Bedeutung eines definierten TF dadurch untersucht werden, dass er mit Hilfe von retroviralen Gentransfertechnologien in unreifen HCSs überexprimiert wird. Sofern er eine kritische Bedeutung für die Differenzierung dendritischer Zellen hat, wird diese eventuell verstärkt oder beschleunigt. Alternativ kann untersucht werden, ob die DC-Differenzierung nach spezifischer Herunterregulation eines bestimmten TF beeinträchtigt ist. Hierzu bietet sich entweder die si-RNA-vermittelte Herunterregulation an, oder aber der Einsatz von definierten *Knockout-Mäusen*.

Ich habe meinen weiteren Focus auf den TF **Krox20 (Egr2)** gesetzt. In der *Real-Time PCR-Analyse* war der TF Krox20 zu den Zeitpunkten 24 und 48 Stunden nach GM-CSF-Stimulation hochreguliert.

Aufgrund postnataler Letalität sind *Krox20-Knockout-Mäuse* allerdings für weitere Analysen nicht verwendbar (Swiatek and Gridley, 1993). Eine Lösung bietet die konditionierte Genausschaltung. Dabei handelt es sich um ein System, das es ermöglicht, Gene zu definierten Zeiten während der Entwicklung oder in bestimmten Zellen/Geweben abzuschalten. Die Technik basiert auf der Verwendung eines Rekombinase-Systems aus dem Bakteriophagen P1. Die Rekombinase Cre erkennt *locus of x over in P1* (loxP)-Sequenzen und vermittelt einen reziproken Strangaustausch zwischen zwei loxP-Erkennungsregionen. Somit kann eine beliebige Zielsequenz bei entsprechender Positionierung der loxP-Sequenzen ausgeschnitten werden. Das Entfernen der gewünschten Sequenz kann auf SC-Ebene durch eine transiente Cre-Expression oder aber in der Maus durch eine Kreuzung mit einer transgenen Linie, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines induzierbaren und/oder gewebespezifischen Promoters enthält, durchgeführt werden (Sauer, 1998).

Die Arbeitsgruppe von Patrick Charnay (INSERM, Paris) entwickelte 2002 eine konditionierte Krox20-defiziente Mauslinie. In das Krox20-Gen wurde dazu am zweiten Exon ein loxP-Element und am 3'-Ende eine „geflochte“ (das heißt loxP flankierte) Neomycin-Resistenz (neoR)-Kassette eingefügt. Anschließend wurden murine embryone SCs durch Elektroporation mit dem *targeting vector* transfiziert und zur Generierung einer Mauslinie in

Blastozysten injiziert. Nach Kreuzung der neuen „geflochten“ Mauslinie mit einer Cre-Rekombinase exprimierenden Mauslinie zeigte sich eine erfolgreiche Ausschaltung des *Krox20*-Gens (Taillebourg et al., 2002). Diese Mauslinie wurde unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Um die mögliche Rolle von *Krox20* für die Differenzierung von dendritischen Zellen zu untersuchen, wurden $Sca1^+ Lin^-$ HSCs der konditionierten *Krox20*-Knockout-Maus ($Krox20^{flox/flox}$) verwendet. Die Zellen wurden mit dem Virus cMMP-Cre-GFP (Cre-Virus) transduziert. Dieser Virus kodiert eine Cre-Rekombinase und enthält zusätzlich ein Leseraster für das Fluoreszenzprotein GFP. Die Cre-Rekombinase inaktiviert gezielt den „geflochten“ TF *Krox20*. Die grüne Fluoreszenz korreliert mit der Virusexpression und kann zytometrisch ermittelt werden. Als Kontrolle wurde ein Teil der $Sca1^+ Lin^- Krox20^{flox/flox}$ -Zellen mit dem Virus MMP-IRES-GFP (MIG-Virus) transduziert. Die Transduktionseffizienz lag für den Cre-Virus durchschnittlich bei 14% und für den MIG-Virus bei 43%. Die GFP-Koexpression der beiden Viren ermöglichte auch die Konzentrierung der exprimierenden Zellen durch fluoreszenzaktivierte Zellsortierung.

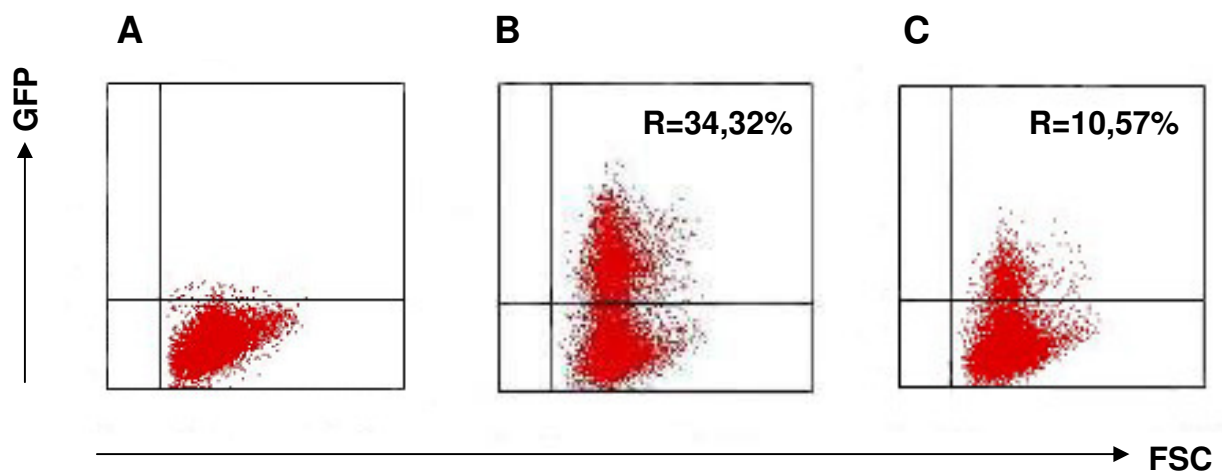


Abb. 3.9: FACS-Analyse: Exemplarische Bestimmung der Transduktionseffizienz.

A: Nicht-transduzierte $Krox20^{flox/flox}$ -Zellen. **B:** MMP-IRES-GFP-transduzierte $Krox20^{flox/flox}$ -Zellen.

C: cMMP-Cre-GFP-transduzierte $Krox20^{flox/flox}$ -Zellen. R= Prozentsatz GFP-positiver Zellen.

Nach erfolgreicher Transduktion und *Sorting* wurden die $Sca1^+ Lin^-$ -Zellen analog dem Protokoll für CR1-Zellen mittels GM-CSF-Stimulation in DCs differenziert. Aus einem Teil der Zellen wurde zuvor die genomische DNA extrahiert und mittels PCR die erfolgreiche Deletion von *Krox20* verifiziert ($Krox20^{-/-}$ -Allel).

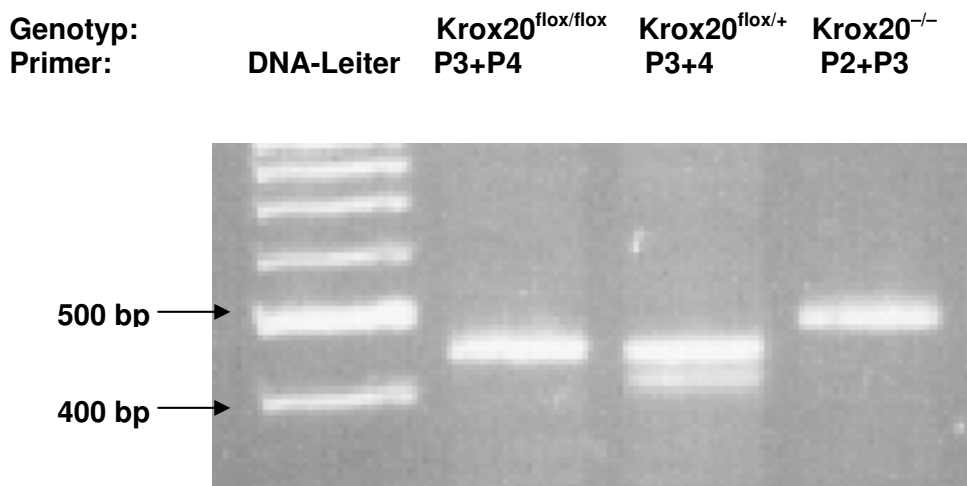


Abb. 3.10: PCR-Analyse der Krox20^{flox/flox}-, Krox20^{-/-}- und Krox20-Wildtypallele. Die Primer P3 und P4 amplifizieren ein 408 bp-Fragment vom Krox20-Wildtypallel und ein 441 bp-Fragment vom Krox20^{flox/flox}-Allel. Die Primer P2 und P3 amplifizieren ein ~500bp-Fragment vom Krox20^{-/-}-Allel.

Am Tag 7 oder 8 der Zytokinstimulation wurden die Zellen im FACS-Gerät bezüglich DC-definierender Oberflächenmarker analysiert. Leider musste die Analyse auf die drei Marker CD11c, MHCII-IA^b und CD80 beschränkt werden, da ein Großteil der mit dem Cre-Virus transduzierten HSCs pyknotisch wurde und abstarb.

In der vergleichenden FACS-Analyse zeigte sich kein Unterschied in der Oberflächenmarker-Expression zwischen den Cre-Virus transduzierten Krox20^{flox/flox}-Zellen (Krox20^{-/-}-DCs) und den mit dem MIG-Virus transduzierten Krox^{flox/flox}-Zellen (Krox20^{+/+}-DCs). Sowohl die Krox20^{-/-}-DCs als auch die Krox20^{+/+}-DCs wiesen für die Marker CD11c, MHCII-IA^b und CD80 ein DC-typisches Expressionsprofil auf.

In einer weiteren Kontrolle wurden Sca1⁺ Lin⁻-Zellen aus C57Black6-Wildtyp-Mäusen ebenfalls mit den beiden genannten Viren transduziert. Nach Differenzierung in DCs zeigten die Zellen die gleiche DC-typische Oberflächenmarker-Expression (Abbildungen nicht gezeigt.)

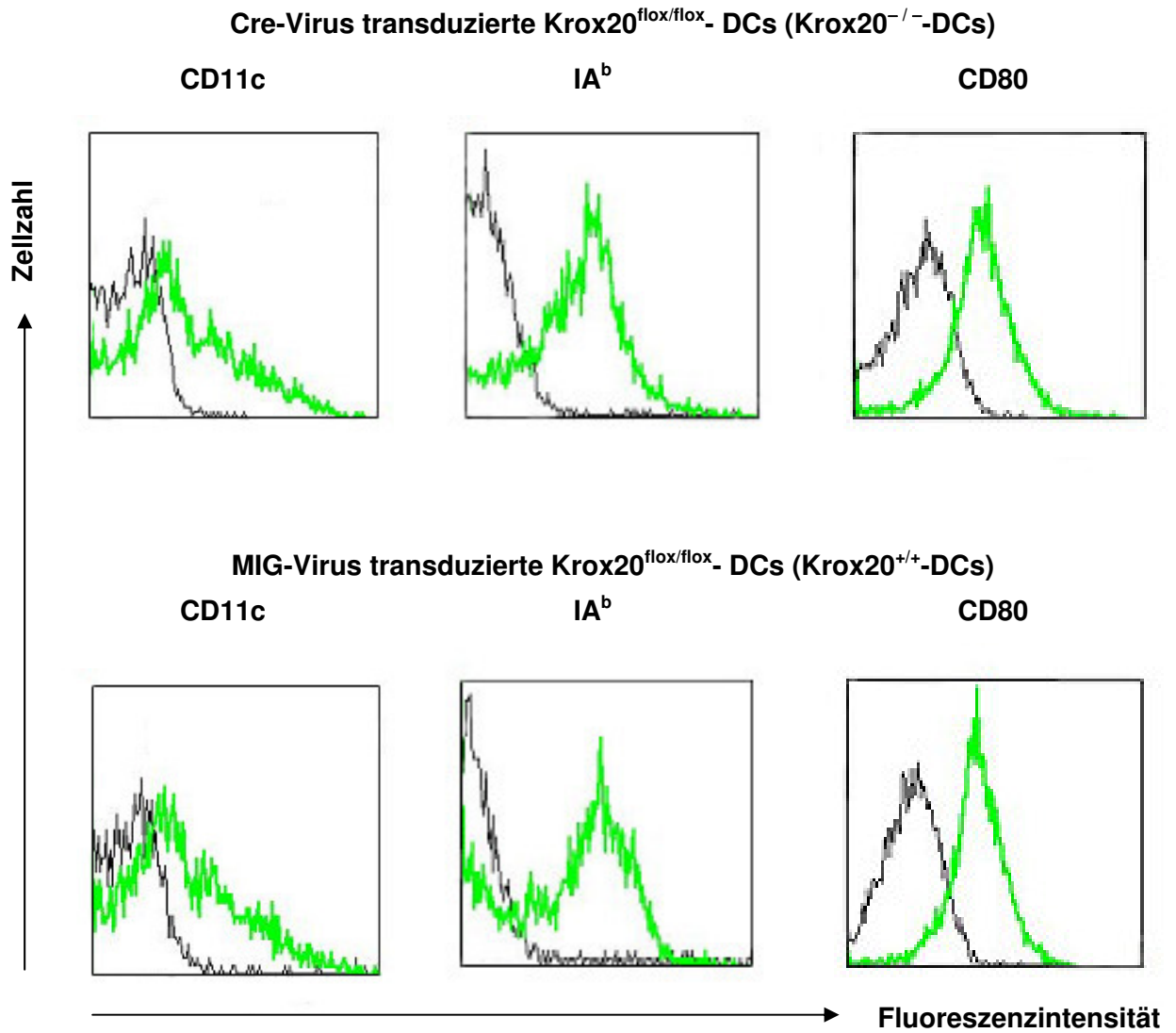


Abb. 3.11: FACS-Analyse: Vergleich der spezifischen Oberflächenmarkerexpression Cre-Virus transduzierter und MIG-Virus transduzierter Krox20^{flox/flox}-dendritischer Zellen.

4. Diskussion

4.1. Differenzierung von hämatopoetischen Zelllinien in dendritische Zellen

Ziel dieser Studie war es, das bislang noch wenig entschlüsselte genetische Prinzip, welches die Differenzierung und Determination hämatopoetischer Vorläuferzellen in DCs kontrolliert, besser zu verstehen. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde ein *in vitro* Differenzierungssystem benötigt, welches molekulare Analysen früher Differenzierungsphasen der DCs erlaubt.

Die murine nicht leukämische, multipotente Stammzelllinie *factor dependent cell-Paterson* (FDCP)-mix ist ein solches System. FDCP-mix wurde 1991 von Just et al. durch Transduktion von KM-Zellen mit einem *src*-Virus entwickelt. In IL-3 enthaltendem Medium zeigen FDCP-Zellen eine unreife Blastenmorphologie und exprimieren den Stammzell-Oberflächenmarker Sca-1. FDCP-mix-Zellen können in Granulozyten, Makrophagen, Megakaryozyten und frühe B-Vorläuferzellen differenziert werden (Just et al., 1993)

Schroeder et al. gelang es zudem aus FDCP-mix funktionelle, reife DCs zu generieren. Nach 13 Tagen Kultivierung in GM-CSF und IL-4 enthaltendem Medium zeigten die Zellen phänotypisch und funktionell Attribute von DCs („dendritische“ Fortsätze, Expression der Oberflächenmarker MHCII⁺, CD40⁺, CD80⁺ und CD86⁺, Stimulation von T-Zellen) (Schroeder et al., 2000).

Allerdings handelte es sich bei den aus FDCP-mix generierten Zellen um eine sehr heterogene DC-Population, wahrscheinlich durch „kontaminierende“ Granulozyten und Makrophagen. Zudem besitzen FDCP-mix-Zellen nur ein Differenzierungspotential in sogenannte myeloische DCs.

Neben der Zelllinie FDCP-mix existieren noch weitere Zelllinien mit DC-Merkmalen. Dabei handelt es sich jedoch um Zelllinien, die durch ein Onkogen transformiert worden sind, nur ein DC-Entwicklungsstadium darstellen, tumorigen sind oder einen heterogenen DC-Phänotyp aufweisen. Beispiele dafür sind die tumorigene und Faktoren-unabhängige Zelllinie IGM36, die aus einer GM-CSF transgenen Maus entwickelt wurde, und die aus Haut und Milz generierten Zelllinien FSDC (*fetal skin-derived dendritic cell line*) und CB1, die

Kennzeichen unreifer DCs aufweisen (Girolomoni et al., 1995; Paglia et al., 1993; Rasko et al., 1997)

4.2. Die laboreigene multipotente murine hämatopoetische Vorläuferzelllinie CR1 als *in vitro* DC-Differenzierungssystem

CR1 ist eine von Rathinam et al. entwickelte laboreigene multipotente murine hämatopoetische Vorläuferzelllinie. Die Zelllinie basiert auf Sca1⁺ckit⁺Lin⁻ hämatopoetischen Stammzellen, isoliert aus C57Black6-Mäusen, die mit einem Notch1 und GFP exprimierenden VSV G (*vesicular stomatitis virus*) pseudotypisierten bicistronischen Retrovirus transduziert worden sind. In Gegenwart von rekombinanten IL-3 konnten die Zellen ohne Verlust ihrer Morphologie, ihres Phänotypes oder ihres Proliferationspotentials für mehr als sechs Monate kultiviert werden. Eine nach sechs Monaten durchgeführte spektrale Karyotypisierung zeigte einen normalen diploiden Maus-Chromosomensatz ohne einen Hinweis auf klonale, numerische oder strukturelle Mutationen.

Nach Transplantation in konditionierte CD45.1 Empfängermäuse sind CR1-Zellen in der Lage, T-Zellen (CD3), NK-Zellen (NK1.1), DCs (CD11c), Makrophagen (CD11b, F4/80) und Granulozyten (GR-1), nicht jedoch erythrozytäre Zellen, zu bilden.

Nach Gabe von GM-CSF differenzieren CR1-Zellen in myeloische MHCII⁺CD11c⁺CD40⁺CD80⁺CD86⁺-DCs und nach Gabe von FLT3L in plasmazytoide CD11c⁺B220⁺-DCs. Eine Ausreifung dieser DCs kann durch Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen oder durch Aktivierung des TLR erreicht werden.

Die myeloischen CR1-DCs können ebenso gut wie aus KM generierte DCs allogene T-Zellen stimulieren und nach TNF- α -Stimulation IL-12 ausschütten. Im Phagozytose- und Migrations-Assay zeigen die myeloischen CR1-DCs eine gute Ingestion von *Escherichia coli* und ein gutes Migrationsverhalten gegenüber einem chemotaktischen Gradienten mit MIP3- β . In einem murinen Tiermodell für akute myeloische Leukämie (AML) induzieren CR1-DCs eine effektive und langanhaltende Anti-Tumor-Antwort. In ihrer Morphologie, ihrem Immunophänotyp und ihren funktionellen Eigenschaften ähneln CR1-DCs primären aus KM generierten DCs (Rathinam et al., 2006).

CR1 ist folglich eine sehr gut geeignete Zelllinie, um die Differenzierung von DCs zu studieren.

4.3. *Microarray-Untersuchungen zur Identifizierung von TFs*

In den letzten Jahren wurden unterschiedliche molekularbiologische Techniken genutzt, um die Genexpression von DCs zu studieren. Verwendet wurden Methoden wie SAGE (sequenzielle Analyse der Genexpression) (Hashimoto et al., 1999), *Microarray-Studien* (Granucci et al., 2001; Matsunaga et al., 2002; Messmer et al., 2003), auch in Kombination mit komplementärer DNA-Subtraktion (Ahn et al., 2002), und integrierte Genom- und Proteomanalysen (Le Naour et al., 2001; Richards et al., 2002). Ziel der meisten dieser Studien war es allerdings, Gene zu identifizieren, welche die Ausreifung von DCs steuern.

Die geeignetste Methode zur Untersuchung von Genexpressionsprofilen ist derzeit die *Microarray-Technik*. Die Besonderheit dieser Technik liegt in ihrer Eigenschaft, die simultane Expression bis zu mehrerer zehntausend Gene in einer einzelnen Probe zu erfassen (Schena et al., 1995).

Ebenfalls in einer *Microarray-Studie* entdeckten Hacker et al. Id2 als wichtigen TF für die Entwicklung von LCs und CD8 α^+ -DCs. Die Arbeitsgruppe generierte DCs aus humanen CD34 $^+$ -Nabelschnurblutzellen. Nach sechs Tagen Kultivierung mit GM-CSF und IL-4, sowie wahlweise TNF- α für 24 weitere Stunden, wiesen die Zellen phänotypische und funktionelle Merkmale von unreifen, bzw. nach TNF- α -Stimulation reifen DCs auf. Die vergleichend durchgeführten *Microarray-Analysen* der Progenitorzellen, unreifen und reifen DCs identifizierten 481 hochregulierte TFs während der DC-Differenzierung. Die anschließende Erstellung von *self-organizing maps* (SOMS) zeigte eine spezifische Hochregulierung einiger HLH-TFs mit einer besonders starken Expression von Id2.

Dieses Ergebnis konnte anschließend im Mausmodell bestätigt werden. *Id2-Knockout-Mäuse* weisen eine defekte DC-Entwicklung auf. Sie besitzen keine LCs und ihre CD8 α^+ -DCs sind zahlenmäßig stark reduziert (Hacker et al., 2003).

Im Gegensatz zu der von Hacker et al. durchgeführten Studie wurde in der vorliegenden Arbeit eine murine Stammzelllinie verwendet, um Genexpressionsstärken zu messen. Weiterhin war das Ziel der vorliegenden Arbeit, TFs der frühen DC-Differenzierung zu identifizieren. Dazu wurden die Zeitpunkte 6, 24 und 48 Stunden nach Zytokinstimulation für die *Microarrays* gewählt. Die Arbeitsgruppe von Hacker et al. hingegen untersuchte den gesamten Zeitraum der DC-Entwicklung, indem sie das Genexpressionsprofil differenzierter DCs mit Progenitorzellen verglich.

4.4. Validierung von *Microarray-Experimenten*

Experimente mit *Microarrays* enthalten zahlreiche potentielle Fehlerquellen. Bei jedem Arbeitsschritt, von der Prüfung der zellulären mRNA bis zum Scanvorgang, kann es zu fehlerhaften Ergebnissen kommen. Vor der Datenprozessierung und Auswertung muss deshalb eine gründliche Untersuchung auf mögliche Fehler oder systemische Einflüsse beim Versuchsablauf erfolgen. Systemische Fehler können durch die Normalisierung der Daten korrigiert werden (Tseng et al., 2001).

Die *state-of-the-art* Technologie zur Validierung von *Microarray-Daten* ist die *Real-Time PCR-Analyse*. Einmal etabliert, ist diese Methode schnell, relativ preisgünstig und benötigt nur eine geringe Menge an *Template*. Hilfreich bei der Validierung ist auch der Vergleich der *Array-Ergebnisse* mit Daten aus der Literatur (Chuaqui et al., 2002).

Die TFs Icsbp (Irf8), Sfp1 (PU.1) und RelB sind in der *Real-Time PCR-Analyse* zu allen drei gewählten Zeitpunkten (6, 24 und 48 Stunden) hochreguliert. Sie dienen in der vorliegenden Arbeit als Positivkontrolle, da ihre Bedeutung für die Entwicklung von DCs bereits im Mausmodell gezeigt werden konnte (siehe auch 1.2.5).

4.5. Charakterisierung der untersuchten Transkriptionsfaktoren

TFs sind transaktive, sequenzspezifische DNA-bindene Proteine, die über die Bindung an regulatorische DNA-Elemente die Expression von Genen steuern. Ein TF definiert somit wann, wo und unter welchen Bedingungen ein Gen aktiv wird (Lenardo et al., 1989; Mitchell and Tjian, 1989; Ptashne, 1988; Ptashne and Gann, 1990).

In ihrem molekularen Aufbau weisen viele TFs eine modulare Zusammensetzung einzelner sogenannter Strukturdomänen auf, die gleichzeitig funktionelle Domänen repräsentieren. Derartige Funktionsdomänen erfüllen z. B. die Aufgabe der spezifischen DNA-Erkennung und DNA-Bindung (DNA-Bindungsdomänen) oder Transkriptionsaktivierung (Transaktivierungsdomäne). Vergleiche der Aminosäuresequenzen von TFs ermöglichten die Identifizierung der DNA-bindenden Regionen. Dies erlaubt die Klassifizierung von TFs entsprechend ihrer DNA-Bindungsmodule in strukturelle Familien.

Die folgende Tabelle ordnet die untersuchten TFs nach ihrer DNA-Bindungsdomäne in Anlehnung an ein von Stegmaier et al etabliertes Klassifizierungssystem (Stegmaier et al., 2004). *UniProt Knowledgebase Release 5.6* diente hierbei als Datenbank.

Gensymbol	Struktur/Familie	Genlokalisierung
Basic domains		
Jun	bZIP family Jun subfamily 1 bZIP domain	1p32-p31
Junb	bZIP family Jun subfamily 1bZIP domain	19p32.2
Nfe2l2	bZIP family CNC subfamily 1bZIP domain	2q31
Tcfec	1 basic helix-loop-helix (bHLH) domain	7q31.2
Zinc-coordinating domains		
Bcl6	1 BTB (POZ) domain 5 C2H2-type zinc fingers	3q27
Egr1	EGR C2H2-type zinc-finger protein family 3 C2H2-type zinc-fingers	5q31.1
Egr2/Krox20	EGR C2H2-type zinc-finger protein family 3 C2H2-type zinc-fingers	10q21.1
Klf7	Krüppel C2H2-type zinc-finger protein family	2q32
Nr4a1	Nuclear hormone receptor family, Nr4 subfamily 1 nuclear receptor DNA-binding domain	12q13
Helix-turn-helix domains		
Atbf1	22 C2H2-type zinc fingers 4 Homeobox DNA-binding domains	16q22.3-q23.1

Tabelle 4.1: Einteilung der untersuchten Transkriptionsfaktoren in Anlehnung an ein von Stegmaier et al. etabliertes Klassifizierungssystem (Stegmaier et al., 2004).

Gensymbol	Struktur/Familie	Genlokalisierung
Helix-turn-helix domains		
Ets2	ETS family 1 ETS DNA-binding domain 1 PNT (pointed) domain	21q22.3
Hlx	H2.O homeobox family 1 Homeobox DNA-binding domain	1q41-q42.12
Icsbp	IRF family 1 Tryptophan pentad repeat DNA-binding domain	16q24.1
Irf7	IRF family 1 Tryptophan pentad repeat DNA-binding domain	11p15.5
Lmo4	2 LIM Zinc-binding domains	1p22.3
Satb1	CUT homeobox family 2 CUT DNA-binding domains 1 Homeobox DNA-binding domain	3p24.3-p23
Sfpi1	ETS family 1 ETS DNA-binding domain	11p12
Beta-scaffold domains with minor groove contacts		
Nfat5	1 RHD (Rel-like) domain	16q22.1
Nfatc1	1 RHD (Rel-like) domain	18q23
RelB	1 RHD (Rel-like) domain	19q13.32
Sox4	1 HMG box DNA-binding domain	6p22.3
Stat1	STAT family 1 SH2 domain	2q32.2-q32.3

Tabelle 4.1: Einteilung der untersuchten Transkriptionsfaktoren in Anlehnung an ein von Stegmaier et al. etabliertes Klassifizierungssystem (Stegmaier et al., 2004).

Gensymbol	Struktur/Familie	Genlokalisierung
Beta-scaffold domains with minor groove contacts		
Stat5b	STAT family 1 SH2 domain	17q11.2
others		
AI256856	Myeloid leukemia factor (MLF) family	6F13
D16Ertd465e	Cold shock domain (CSD) family Cold shock protein domain	16p13.3
Dnmt3a	C5-methyltransferase family 1 ADD-type zinc finger 1 PWWp domain	2p23
Ifi204	1 DAPIN domain 2 HIN-200 domain	1q22
MGC18736	Krüppel associated box Zinc finger	13C1
Nucb2	Nucleobindin family 2 EF-hand domains	11p15.1-p14
Nab2	NAB family	12q13.3-q14.1
Rbl2	Retinoblastoma protein (RB) family	16q12.2
Rbm6	1 RNA recognition motif	3p21.3
Sin3b	3 PAH repeats	19p13.11
Zfp361l1	2 C3H1-type zinc fingers	14q22-q24

Tabelle 4.1: Einteilung der untersuchten Transkriptionsfaktoren in Anlehnung an ein von Stegmaier et al. etabliertes Klassifizierungssystem (Stegmaier et al., 2004).

4.6. Auswertung der *Real-Time PCR-Expressionsdaten*

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, TFs zu identifizieren, die die frühe Differenzierung von DCs kontrollieren. Von den über 39.000 Transkripten des *Genchips* waren insgesamt 628 Gene zu den untersuchten Zeitpunkten 6, 24 und 48 Stunden nach GM-CSF-Stimulation in den CR1-Zellen hochreguliert. 56 dieser Gene konnten als TFs identifiziert werden. Anschließend wurden 34 TFs, die im *Microarray* eine gute Signalintensität gezeigt hatten, für die *Real-Time PCR-Analyse* ausgewählt.

Davon zeigten 15 TFs eine Hochregulierung zu allen drei gewählten Zeitpunkten. Unter diesen befanden sich auch die bereits in ihrer Bedeutung für die DC-Differenzierung entschlüsselten TFs Icsbp (Irf8), Sfp1 (PU.1) und RelB. Die weiteren Faktoren Bcl6, Egr1, Ets2, Hlx, Ifi204, Junb und Tcfec wurden in der Literatur bereits im Zusammenhang mit der Myelopoese beschrieben (näheres siehe 4.8). Nab2 ist als Korepressor von Egr1 bekannt und unterdrückt in dieser Funktion u.a. dessen Wachstumstimuli (Houston et al., 2001). Nfe2l2, auch bekannt unter dem Namen *NF-E2 related factor 2* (Nrf2), reguliert die Transkription von vielen antioxidativen Genen. *Nrf2-Knockout-Mäuse* sind anfällig für ein allergisches Asthma mit bronchialer Hyperreaktivität und schwerer Entzündung der Atemwege (Numazawa and Yoshida, 2004; Rangasamy et al., 2005). Nr4a1 wird von vielen Geweben exprimiert und scheint eine Rolle in der Apoptose von Thymozyten, Tumorzellen und Makrophagen zu spielen (Suzuki et al., 2003).

Über die Faktoren Nucb2 und D16Ert465e ist wenig bekannt. Nucb2 kodiert ein Ca^{2+} -bindendes Protein und D16Ert465e, auch bekannt unter dem Namen *calcium-regulated heat-stable protein of 24kDa* (CRHSP24), ist das physiologische Substrat von *protein phosphatase 2B/Calcineurin* (PP2B) in pankreatischen Azinuszellen (Grolewski et al., 1995; Taniguchi et al., 2000).

10 der untersuchten TFs waren nur zu einem der gewählten Zeitpunkte in der *Real-Time PCR-Analyse* hochreguliert und zwar bis auf den Faktor Klf7 jeweils zum Zeitpunkt 6 Stunden nach GM-CSF-Stimulation. Interessanterweise zeigten fünf dieser TFs zu einem der späteren untersuchten Zeitpunkte (24 und 48 Stunden) eine Herunterregulierung. Bei diesen TFs handelt es sich um Gene, die eine Bedeutung während der frühen Phase der DC-Differenzierung haben könnten. Für die beiden Stat-TFs Stat1 und Stat5b existieren *Knockout-Modelle*. Diese Mausmodelle und die Rolle der beiden Stat-TFs in der Hämatopoese werden unter 4.8 näher erläutert. Für Sox4 wurde ebenfalls eine *Knockout-Maus* entwickelt. Aufgrund kardialer Fehlbildungen sterben *Sox4-Knockout-Mäuse* bereits

am Tag 14 der Embryonalentwicklung. Sox4 spielt eine Rolle in der frühen B- und T-Zellentwicklung und Thymozyten-Differenzierung. So entwickeln sich B-Lymphozyten nur bis zu einem Pro-B-Zellstadium in der *Sox4-Knockout-Maus* (Schilham et al., 1996). Über die anderen nur zu einem Zeitpunkt hochregulierten Faktoren (Klf7, MGC18736, Nfat5, Nfatc1, Rbl2, Rbm6, Sin3b) ist in der Literatur erst wenig bekannt.

In der *Real-Time PCR-Analyse* war der TF Atbf1 als einziger Faktor zu allen drei untersuchten Zeitpunkten herunterreguliert. Eine Hochregulierung, wie sie im *Microarray* zum Zeitpunkt 48 Stunden gesehen worden war, konnte nicht bestätigt werden. Atbf1 kodiert das größte bekannte DNA-bindene Protein. Erstmals beschrieben wurde Atbf1 als Inhibitor der α -Fetoprotein Genexpression in Hepatozyten (Morinaga et al., 1991). Im Dünndarmepithel reguliert Atbf1 die Transkription der Aminopeptidase N (Kataoka et al., 2000). Während der Hirnentwicklung kommt es zeitweise zu einer starken Atbf1-Expression (Watanabe et al., 1996).

Insgesamt war in der *Real-Time PCR-Analyse* der Großteil der 34 untersuchten TFs zum Zeitpunkt 6 Stunden nach GM-CSF-Stimulation hochreguliert (26 TFs zum Zeitpunkt 6 Stunden, 20 TFs zum Zeitpunkt 24 Stunden und 21 TFs zum Zeitpunkt 48 Stunden). Im *Microarray* hingegen hatten die meisten TFs zum Zeitpunkt 48 Stunden eine Hochregulierung gezeigt. Von den insgesamt 628 hochregulierten Genen des Genchips waren ebenfalls die meisten zum Zeitpunkt 48 Stunden exprimiert.

Das Expressionsprofil der *Microarray-Analyse*, betrachtet man nicht nur die hochregulierten TFs (Bestätigung der Daten zu 75,56%), wurde nur zu 47,91% bestätigt. Die fünf TFs (Egr2, Ifi204, Irf7, Tcfec und RelB) allerdings, die im *Microarray* eine *fold change* von über 3 und damit einen sehr signifikanten Expressionsunterschied gezeigt hatten, wurden in der *Real-Time PCR-Analyse* zu 100% verifiziert. Weiterhin waren die in der *Real-Time-PCR Analyse* untersuchten TFs zu mehr Zeitpunkten hochreguliert als im *Microarray*. Im Einzelnen waren 15 TFs zu allen drei gewählten Zeitpunkten, 6 TFs zu zwei der gewählten Zeitpunkte und 10 TFs zu einem der gewählten Zeitpunkte hochreguliert.

Erklärt werden kann dies dadurch, dass die *Real-Time-PCR* eine sehr sensible Methode ist, die bereits feine Expressionsunterschiede erfassen kann (Ginzinger, 2002).

Bei der Interpretation der Genexpressionsanalyse muß generell berücksichtigt werden, dass die mRNA-Expressionsdaten nur bedingt Rückschlüsse auf die Proteinebene ermöglichen. Cham et al. verglichen in einer *Microarray-Analyse* das Genexpressionsprofil *naiver* T-Zellen

mit dem von CD8⁺-T-Zellen. Dabei waren einige TFs, die von den CD8⁺-T-Zellen im Vergleich niedriger exprimiert wurden, im anschließenden Western-Blot auf Proteinebene gleich hoch exprimiert. Grund dafür können Regulationsmechanismen auf der Translationsebene oder posttranslationelle Veränderungen sein (Cham et al., 2003).

4.7. Differenzierung von Krox20-defizienten Sca1⁺ Lin⁻-hämatopoetischen Stammzellen in phänotypisch normale dendritische Zellen

Mehreren Arbeitsgruppen ist es bereits gelungen, TFs in *Microarray-Studien* zu identifizieren, deren Funktion für die Differenzierung von DCs anschließend im *Knockout-Modell* bestätigt werden konnte (Hacker et al., 2003; Rathinam et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde der TF Krox20 für weitere Untersuchungen ausgewählt. Krox20, auch bekannt unter dem Namen Egr2, war sowohl im *Microarray* als auch in der *Real-Time PCR-Analyse* zu den Zeitpunkten 24 und 48 Stunden nach GM-CSF-Stimulation in den CR1-Zellen hochreguliert.

Krox20 ist ein Zinkfinger-TF und Mitglied der Gruppe der *early response genes*. Die von dieser Gen-Familie kodierten Proteine spielen eine wichtige Rolle in der Regulation zentraler Zellprozesse wie Wachstum, Differenzierung und Reaktion auf Hormonstimuli. Darüberhinaus aktiviert und reguliert Krox20 „Schlüsselgene“ der Myelinisation (Chavrier et al., 1988; Warner et al., 1998).

Krox20-Knockout-Mäuse sterben in der Regel bereits kurz nach der Geburt. Die wenigen überlebenden Mäuse weisen eine abnorme Segmentierung ihres Rhombenzephalons und eine Hypomyelinisierung ihres peripheren Nervensystems auf. Die Schwann-Zellen der Mäuse sind zu einem frühen Differenzierungszeitpunkt ihrer Entwicklung blockiert (Schneider-Maunoury et al., 1993; Swiatek and Gridley, 1993; Topilko et al., 1994). Zudem ist die Knochenbildung bei *Krox20-Knockout-Mäusen* defekt (Levi et al., 1996).

Ähnliche Krankheitsbilder finden sich auch beim Menschen. Neben vielen anderen Mutationen wurden bei Patienten mit hereditären demyelinisierenden Neuropathien auch Mutationen des TF Krox20 gefunden. Im einzelnen handelt es sich dabei um die drei folgenden Neuropathien: Charcot-Marie-Tooth-Syndrom Typ I, Dejerine-Sottas-Syndrom und die kongenitale hypomyelinisierende Neuropathie. (Warner et al., 1998).

Patrick Charnay (INSERM, Paris) stellte unserer Arbeitsgruppe konditionelle Krox20-defiziente Mäuse zur Verfügung. Bei diesen Mäusen wird das Krox20-Gen von zwei loxP-Elementen flankiert. Nach Transduktion von Sca1⁺ Lin⁻-Zellen dieser Mauslinie mit dem Virus cMMP-Cre-GFP bewirkte die von dem Virus kodierte Cre-Rekombinase eine gezielte Inaktivierung des TF Krox20. Die nun Krox20-defizienten Zellen wurden mittels GM-CSF-Stimulation in DCs differenziert. Da ein Großteil der mit dem Cre-Virus transduzierten Zellen pyknotisch war, musste die anschließende FACS-Analyse auf drei Marker reduziert werden.

Mehrere Arbeitsgruppen haben ein ähnliches Phänomen bei ihren Cre-exprimierenden Zellkulturen festgestellt. Ungefähr eine Woche nach Transduktion mit einem Cre-Virus hörten die Zellen auf zu proliferieren und wiesen einen abnormen Phänotyp auf. In der chromosomalen Metaphase-Analyse zeigten sich zudem genomische Instabilitäten in Form von Strangbrüchen und Fragmenten. Diese Toxizität war abhängig von der Endonuklease-Aktivität der Cre-Rekombinase. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist, dass das Säugetiergenom endogene Sequenzen enthält, die als *pseudo-loxP-sites* fungieren und so von der Cre-Rekombinase erkannt und ausgeschnitten werden (Loonstra et al., 2001; Silver and Livingston, 2001).

Eine Möglichkeit, dieses Problem zu lösen, wäre die Verpaarung der Krox20^{flox/flox}-Maus mit einer Cre-Maus, bei der die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines für die Hämatopoese spezifischen Promoters steht (Krox20^{flox/flox} Cre-Maus). Zudem haben Silver et Livingston einen „*self-excising*“ retroviralen Vektor entwickelt, der die Dauer und Intensität der Cre-Expression limitiert und damit die Cre-Toxizität reduziert (Silver and Livingston, 2001).

In der FACS-Analyse zeigten die Krox20^{-/-}-DCs keinen Unterschied bezüglich der DC-definierenden Oberflächenmarkerexpression (CD11c, MHCII-IA^b und CD80) im Vergleich mit den nur GFP-exprimierenden Zellen der Kontrolle.

Die drei hier untersuchten Marker werden typischerweise von sogenannten myeloiden DCs exprimiert. Damit scheint Krox20 für die Aufrechterhaltung eines normalen myeloiden DC-Phänotyps nicht essentiell zu sein. Möglicherweise kann die Funktion von Krox20 von anderen TF im Sinne einer Redundanz übernommen werden. Oberflächenmarker sind jedoch nur ein Aspekt von DCs. Möglich wäre, dass Krox20^{-/-}-DCs funktionell beeinträchtigt sind. In weiteren Experimenten könnte beispielsweise die Fähigkeit zur allogenen T-Zell-Stimulation und Zytokinproduktion untersucht werden. Des Weiteren sollten einzelne DC-Suptypen näher betrachtet werden. Dies wäre bei Verwendung einer Krox20^{flox/flox} Cre-Maus möglich.

4.8. Die Bedeutung der untersuchten Transkriptionsfaktoren für die Myelopoese

Drei der untersuchten TFs – **Icsbp (Irf8)**, **Sfpi1 (PU.1)** und **RelB** – wurden bereits in ihrer Bedeutung für die Entwicklung von DCs identifiziert. Sie stellen für diese Arbeit eine Positivkontrolle dar und werden unter 1.2.5 näher erläutert. Die anderen TFs sind in der Literatur im Zusammenhang mit der Entwicklung von DCs noch unbekannt. Es gibt jedoch Hinweise, dass einige von ihnen eine Rolle in der Myelopoese spielen. Von denen im folgenden näher erläuterten TFs zeigten alle, bis auf die TFs Egr2, Irf7, Jun, Satb1, Stat1 und Stat5b, eine Hochregulierung zu allen drei untersuchten Zeitpunkten (6, 24 und 48 Stunden) in der *Real-Time PCR Analyse*.

Bcl6: Das Proto-Onkogen Bcl6 kodiert einen Transkriptions-Repressor. In zahlreichen Zelltypen, darunter auch Monozyten, steigt die Bcl6-Expression kontinuierlich während der terminalen Differenzierung an (Albagli-Curiel, 2003).

Egr1: Der TF Egr1 wird von vielen Zelltypen exprimiert und kann durch unterschiedliche extrazelluläre Stimuli induziert werden (Sukhatme et al., 1988). Egr1 fördert die Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen in Makrophagen. So verhindert beispielsweise der Einsatz von Egr1 *antisense* Oligonukleotiden die Makrophagen-Differenzierung von Zellen der myeloischen Leukämie-Zelllinien HL-60 und U937 (Nguyen et al., 1993). Bei diesen beiden Zelllinien wurden zudem auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchten TFs **Jun**, **Junb**, **Sfpi1**, **Stat1** und **Krox20 (Egr2)** als während der monozytären Entwicklung und Makrophagen-Aktivierung hochregulierte TFs identifiziert.

Umgekehrt verursacht die Überexpression von Egr1 eine Differenzierung von Zellen der hämatopoetischen Zelllinie 32Dcl3 in Makrophagen. Normalerweise differenzieren diese Zellen nicht in Makrophagen (Krishnaraju et al., 1995). Weitere Experimente dieser Arbeitsgruppe zeigten zudem, dass normale hämatopoetische Vorläuferzellen, die nach retroviraler Transduktion ektop Egr1 exprimieren, sich zu Zellen der Makrophagen-Reihe entwickeln. Dies geschieht „auf Kosten“ anderer Zellreihen (granulozytäre und erythroide Zellreihen).

Egr1-Knockout-Mäuse zeigen im Vergleich zum Wildtyp keine Unterschiede bezüglich ihres myeloischen Differenzierungspotenziales (Lee et al., 1996).

Ets2: Der TF Ets2 wird von vielen myelomonozytären Zellreihen während der Differenzierung zu Makrophagen induziert (Aperlo et al., 1996).

Hlx: Der TF Hlx wird von myelomonozytären Zellreihen exprimiert. Insbesondere reife Makrophagen, Granulozyten und frühe B-Vorläuferzellen zeigen hohe Hlx-Expressionslevel (Allen et al., 1991). Des Weiteren scheint Hlx die Reifung myeloider Zellen zu kontrollieren wie Überexpressions-Studien zeigten (Allen and Adams, 1993).

Ifi204: Interferone aktivieren die Expression vieler unterschiedlicher Gene, darunter auch die Familie der Ifi200-Gene. Ifi204 ist Mitglied dieser Gen-Familie und kodiert das Protein p204. Neben Interferonen bewirken Lipopolysaccharide, synthetische Doppelstrang-RNA oder eine Virusinfektion eine gesteigerte Synthese von p204 (Choubey and Lengyel, 1992). Eine p204-Überexpression hemmt die Zellproliferation in dafür sensiblen Zelllinien und fördert stattdessen die Zelldifferenzierung (Hertel et al., 2000). So reifen Monozyten, die p204 überexprimieren, zu Makrophagen (Gariglio et al., 1998).

Irf7: Irf7 ist ein Mitglied der *interferon regulatory factor* TFs-Familie, zu der auch der für die DC-Differenzierung bedeutende TF Icsbp gehört. Irf7 wird von Monozyten-Vorläuferzellen und plasmazytoiden DCs exprimiert (Kerkmann et al., 2003; Sykes et al., 2003).

Junb: Der TF Junb greift negativ regulierend in die Zell-Proliferation ein. So entwickeln transgene Mäuse, die spezifisch kein Junb in der myeloopoetischen Zellreihe exprimieren, eine myeloproliferative Erkrankung, die der humanen CML ähnelt und eine erhöhte Anzahl an Granulozyten-Vorläufer-Zellen aufweist. Junb scheint folglich eine Schlüsselrolle in der Regulation der Myelopoese zu spielen (Passegue et al., 2001).

Satb1: Satb1 kodiert ein Gewebe-spezifisches Zellkernprotein, welches Doppelstrang-DNA mit einem hohen Anteil an *base-unpairing regions* (BURs) erkennt. Besonders Thymozyten, aber auch periphere T-Zellen exprimieren Satb1 (Cai et al., 2003). Während der terminalen Differenzierung myeloider Zellen wird Satb1 herunterreguliert, parallel zur Transkriptionsinduktion von *91-KD glycoprotein* (gp91^{phox}), ein Gen, welches eine Komponente des NADPH-Oxidase-Komplexes in Phagozyten kodiert und für welches multiple Interaktionselemente mit Satb1 bestehen (Hawkins et al., 2001).

Stat1 und Stat5b: Eine bedeutende Anzahl von Zytokinen, welche eine Rolle in der Ausreifung von DCs spielen, vermitteln ihre extrazellulären Signale durch die Aktivierung von Stat-Proteinen (Bromberg and Darnell, 2000; Darnell, 1997). Mittels Westernblot- und

electrophoretic mobility shift assay (EMSA)-Analysen konnte gezeigt werden, dass die Zytokine GM-CSF und IL-4 während aller DC-Reifungsstadien eine kontinuierliche Expression von Stat5 bewirken. Stat1 hingegen wird erst von ausgereiften DCs hochexprimiert. Für Stat6 verhält es sich umgekehrt: frühe DC-Reifungsformen zeigen eine hohe Aktivierung dieses TF.

DCs, die aus dem KM von *Stat1-Knockout-Mäusen* generiert worden sind, weisen bezüglich ihrer Morphologie und Oberflächenmarkerexpression kaum Unterschiede zu den Wildtyp-DCs der Kontrolle auf. Interessanterweise wird jedoch der Oberflächenmarker CD80 schon während der frühen Reifung hochreguliert, während die Hochregulierung von CD11c und CD40 ausbleibt. Weiterhin konnte in dieser Studie eine „*feedback*“-*Regulation* der Stat1-Expression über SOCS1 gezeigt werden (Jackson et al., 2004).

Stat5a/5b-Knockout-Mäuse weisen nur einen relativ milden Defekt ihrer Hämatopoese auf. Neben einer Reduktion peripherer T-Zellen und einer unzureichenden Erythropoese ist bei diesen Mäusen das Überleben von Monozyten-Vorläuferzellen reduziert (Kieslinger et al., 2000; Socolovsky et al., 1999; Teglund et al., 1998). Des Weiteren sind nach Transplantationsexperimenten die KM-Zellen dieser Mäuse insuffizient in der Rekonstituierung myeloider, erythroider und lymphoider Zellen (Snow et al., 2002).

Tcfec: Aus humanen Monozyten generierte DCs zeigen nach Stimulation mit LPS und TNF- α eine transiente Hochregulierung des TF Tcfec (Matsunaga et al., 2002).

4.9. Die Bedeutung der untersuchten Transkriptionsfaktoren für die Pathologie von Malignomen

TFs sind oft an der Regulierung wichtiger zellulärer Prozesse, wie z. B. Proliferation, Differenzierung und Apoptose, beteiligt. Es verwundert daher nicht, dass in zahlreichen Malignomen eine fehlgeleitete Aktivität bestimmter TFs nachgewiesen werden konnte und viele TFs Protoonkogene oder Tumorsuppressorgene sind.

Die DC gilt als effizienteste Antigen-präsentierende Zelle und nimmt als solche auch eine Schlüsselfunktion in der Tumorabwehr ein (Banchereau et al., 2000). Für einige hämatologische Malignome wie z. B. der akuten myeloischen Leukämie, der chronischen myeloischen Leukämie, der Haarzelleukämie und der Vorläufer-B-ALL (pB ALL) wurde, u.a. auch von unserer Arbeitsgruppe, eine eingeschränkte Funktion der DCs nachgewiesen

(Bourguin-Plonquet et al., 2002; Maecker et al., 2006; Mami et al., 2004; Mohty et al., 2002; Mohty et al., 2001). So konnten Mami et al aus CD34-Vorläuferzellen von pB ALL-Patienten keine mDCs oder pDCs generieren (Mami et al., 2004).

Von besonderem Interesse ist deshalb die Frage, inwieweit die untersuchten TFs gleichzeitig eine Rolle in der Entstehung bestimmter Malignome, insbesondere derjenigen hämatologischen Ursprungs, spielen. Möglicherweise verursacht die Mutation eines tumorassoziierten TF, der während der frühen Phase der DC-Differenzierung hochreguliert ist, neben der Entstehung eines Malignoms, gleichzeitig eine Hemmung der Entwicklung funktionsfähiger DCs. Die folgende Tabelle zeigt die Assoziation der untersuchten TFs mit einigen ausgewählten Malignomen.

Gensymbol	Assoziiertes Malignom
Atbf1	Prostatakarzinom (Sun et al., 2005)
Bcl6	Brustkrebs, Non-Hodgkin-Lymphom, B-Zell-Lymphome, diffus-großzelliges Lymphom, MALT-Lymphome (Bos et al., 2003; Min et al., 2005; Ohno and Fukuhara, 1997)
Egr1	Prostatakarzinom (Adamson and Mercola, 2002)
Ets2	Brustkrebs, Leukämien, Plattenepithelkarzinom des Ösophagus, Prostatakarzinom (Buggy et al., 2006; Li et al., 2003; Liu et al., 1997; Papas et al., 1990)
Jun	Brustkrebs, Hodgkin-Lymphom (Mathas et al., 2002; Yang et al., 1997)
Junb	Hodgkin-Lymphom, anaplastisches großzelliges Lymphom, CD30 ⁺ diffus-großzelliges Lymphom, T-lymphoblastisches Lymphom, chronisch myeloische Leukämie (Rassidakis et al., 2005; Szremska et al., 2003; Yang et al., 2003)
Lmo4	Brustkrebs, Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (Lewis et al., 2005; Mizunuma et al., 2003)
Stat5b	akute Promyelozytenleukämie, Plattenepithelkarzinome (Dong and Tweardy, 2002; Xi et al., 2003)
Sfp1	akute myeloische Leukämie (Rosenbauer et al., 2004)

Tabelle 4.2: Assoziation der untersuchten Transkriptionsfaktoren mit einigen ausgewählten Malignomen.

4.10. Die Bedeutung der untersuchten Transkriptionsfaktoren für die Entwicklung von zellulären Therapien mit DCs

Die Erfolge einer allogenen KM-Transplantation bei Patienten mit einer chronisch myeloischen Leukämie zeigen deutlich den Effekt einer zellulären Antitumor-Immunantwort (Maness and McSweeney, 2004). Weiterhin illustriert wird dies durch die erfolgreiche Gabe allogener Spenderlymphozyten beim Rezidiv einer CML nach KM-Transplantation (Kolb et al., 1990).

Tumorzellen verfügen über zahlreiche Strategien, der Immunabwehr des Organismus zu entgehen. Beispielsweise konnte bei Krebspatienten und im Tiertumormodell eine eingeschränkte Antigen-Präsentation der DCs nachgewiesen werden. So sind DCs beschrieben worden, die zwar Kolonkarzinome und Basaliome infiltrierten, denen aber die Oberflächenmoleküle CD80 und CD86 fehlten und die deshalb eine deutlich eingeschränkte Fähigkeit zur T-Zell-Aktivierung aufwiesen (Chaux et al., 1993). Weiterhin wurde beobachtet, dass Tumoren Faktoren wie IL-10, TGF- β oder VEGF sezernieren, die die Differenzierung, Reifung und Funktion der DCs inhibieren (Alleva et al., 1994; Bronte et al., 1999; Dummer et al., 1995; Gabilovich et al., 1996). Das Zytokin IL-10 kann sogar die Induktion einer antigenspezifischen Anergie bewirken, was einer Tumortoleranz gleichkommt (Chai et al., 1999; Enk et al., 1997; Enk et al., 1994; Steinbrink et al., 1999). Eine ausgereifte DC hingegen scheint gegenüber hemmenden Zytokinen resistent zu sein (Steinbrink et al., 1997).

Genauere molekulare Kenntnisse über die Differenzierung von DCs ermöglichen dem Therapeuten die Identifizierung und das gezielte Korrigieren von Fehlern in der Zellentwicklung. DCs besitzen eine hohe Potenz zur Induktion einer spezifischen tumorgerichteten Immunantwort. Diese Fähigkeit kann genutzt werden, um eine Immunantwort gegen Tumorantigene zu initiieren und so mithilfe des körpereigenen Immunsystems Krebs zu bekämpfen.

Für die Entwicklung einer Tumorstoffimpfung ist neben der Identifizierung geeigneter Tumorantigene die Generierung von DCs mit einer optimalen T-Zell-stimulatorischen Aktivität entscheidend. Vor allem die hier untersuchten DCs mit myeloiden Charakteristika sind interessant für Tumorstoffimpfungen, da diese besonders zur Antigenaufnahme und –präsentation befähigt sind.

Erste klinische Phase I- und II-Studien zeigen, dass eine Immuntherapie mit DCs möglich ist. Leider waren die bisher erzielten Erfolge meist nur von kurzer Dauer. Dies liegt sicherlich auch daran, dass bisher überwiegend Patienten mit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen in DC-Vakzinierungsprotokolle aufgenommen wurden. Bei diesen Patienten liegt wahrscheinlich bereits durch den Tumor oder die vorausgegangene Therapie eine schwere Schädigung des Immunsystems vor (Nestle et al., 2005). Dagegen zeigten Patienten mit B-Zell Lymphom, die eine Vakzine mit Idiotyp-beladenen DCs als adjuvante *first-line* Therapie erhielten, sowohl humoral als auch zelluläre Immunantworten, die mit einer klinischen Regression des Lymphoms einhergingen (Timmerman et al., 2002).

Ein besseres molekulares Verständnis der DC-Differenzierung kann dazu beitragen, die Generierung und Aktivierung tumorspezifischer DCs zu optimieren. Dies könnte zu einem festen Bestandteil der Immuntherapie neben Operation, Chemotherapie und Bestrahlung in der multimodalen Krebsbehandlung führen.

Neben ihrer Rolle als Initiatoren einer antigenspezifischen Immunantwort haben DCs auch eine Bedeutung als Vermittler einer Immuntoleranz. Diese Eigenschaft ist sehr interessant für die Transplantationsmedizin. Das Überleben von allogenen Herztransplantaten bei Ratten wird beispielsweise signifikant verlängert, wenn einen Tag vor der Transplantation unreife DCs der Empfänger-Ratte injiziert wurden (Peche et al., 2005).

Aber nicht nur unreife DCs, die ja bekanntlich weniger MHC-Klasse II und kostimulatorische Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren, induzieren eine T-Zell-Toleranz. Im Maus-Modell schützen injizierte reife DCs (generiert aus KM-Zellen, ausgereift mittels TNF- α) vor einer CD4⁺-T-Zell vermittelten experimentellen Autoimmunenzephalomyelitis (Menges et al., 2002).

Trotz dieser Daten über reife DCs scheinen in erster Linie unreife oder „semi-reife“ DCs (geringe Produktion proinflammatorischer Zytokine) eine Immuntoleranz zu induzieren (Barratt-Boyes and Thomson, 2005).

Verschiedene Arbeitsgruppen haben versucht durch die Gabe von IL-10, Dexamethason, Rapamycin (Sirolimus), Vitamin D3 und Mycophenolat Mofetil die Ausreifung von DCs zu blockieren. Mit unterschiedlichem Erfolg konnte durch diese künstlich unreif gehaltenen DCs das Transplantatüberleben verlängert werden (Gregori et al., 2001; Hackstein and Thomson, 2004; Mirenda et al., 2004).

In einer interessanten Studie von Tomasoni et al. wurde durch Transfektion mit einer dominant negativen Form von IKK2 / *I kappa B kinase 2* (IKK2) die Aktivierung des TF NF- κ B verhindert. Die DCs blieben dadurch unreif und induzierten potente regulatorische CD4⁺-T-Zellen. Der in der vorliegenden Arbeit untersuchte TF RelB gehört zur TFs-Familie NF- κ B. Für RelB existiert bereits eine *Gene-Targeted-Maus*, die neben einer gestörten Thymus-Architektur keine CD8 α ⁻-DCs besitzt (Tomasoni et al., 2005; Wu et al., 1998).

Die Kenntnis von TFs, die die Differenzierung von DCs kontrollieren, eröffnet Möglichkeiten für die Entwicklung spezifischer immunsuppressiver Agenzien, die die Reifung und Aktivierung von DCs hemmen.

4.11. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden 31 TFs beschrieben, die bisher noch nicht im Zusammenhang mit der Differenzierung von DCs beschrieben wurden. Einige dieser Faktoren haben bereits eine Bedeutung in der Hämatopoese oder in der Entstehung bestimmter Krankheitsbilder. Die spezifische funktionelle Rolle der in dieser Studie entdeckten TFs für die Entwicklung von DCs bleibt jedoch unklar. Mittels gezielter Über- oder Unterexpressionsstudien *in vitro* oder im Maus-Modell (*knockout* bzw. *knockin*) ist es möglich, die biologische Bedeutung dieser TFs zu entschlüsseln. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bilden somit ein wichtiges Fundament für weiterführende *in vitro* und *in vivo* Analysen.

5. Zusammenfassung

Dendritische Zellen (DCs) sind hochspezialisierte antigenpräsentierende Zellen. Nach Kriterien wie Organspezifität, Phänotyp und Funktion können DCs in Subtypen klassifiziert werden. Über das genetische Prinzip, welches die Differenzierung und Determination hämatopoetischer Zellen in DCs kontrolliert, ist bisher wenig bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die multipotente murine hämatopoetische Vorläuferzelllinie CR1 als *in vitro* DC-Differenzierungssystem genutzt. CR1-Zellen differenzieren nach GM-CSF-Stimulation in sogenannte myeloide DCs. Mittels *Microarray-Technologie* wurde die Genexpression der frühen DC-Differenzierungsphase analysiert (6, 24 und 48 Stunden nach GM-CSF-Stimulation).

Von den 628 im *Microarray* hochregulierten Genen konnten 56 als Transkriptionsfaktor (TF) identifiziert werden. Davon wurden 34 TFs mit besonders guter Signalintensität für eine anschließende *Real-Time PCR-Validierung* ausgewählt. In dieser Analyse waren 15 TFs zu allen drei gewählten Zeitpunkten (6, 24 und 48 Stunden nach GM-CSF-Stimulation), 6 TFs zu zwei der gewählten Zeitpunkte und 10 TFs zu einem der gewählten Zeitpunkte hochreguliert. Das Ergebnis der im *Microarray* hochregulierten TFs konnte zu 76% bestätigt werden. 31 dieser TFs sind bisher noch nicht im Zusammenhang mit der Differenzierung von DCs beschrieben worden.

Der TF Krox20, auch bekannt unter dem Namen Egr2, wurde für weitere Analysen ausgewählt. Hämatopoetische Progenitorzellen einer konditionellen Krox20-defizienten Maus wurden dazu mit einem Cre-exprimierenden retroviralen Vektor transduziert und anschließend mittels GM-CSF-Stimulation in DCs ausgereift. Die Cre-Rekombinase bewirkte dabei die gezielte Inaktivierung des in dieser Maus geflochten Krox20-Gens. In der FACS-Analyse zeigten die Krox20^{-/-}-DCs jedoch keinen Unterschied bezüglich der DC-definierenden Oberflächenmarkerexpression im Vergleich mit den nur GFP-exprimierenden DCs der Kontrolle. Krox20 scheint folglich für die Aufrechterhaltung eines normalen myeloiden DC-Phänotyps nicht essentiell zu sein. Alternativ kann die Funktion von Krox20 möglicherweise von anderen TF substituiert werden.

Die weitere funktionelle Charakterisierung der hier beschriebenen TF für die DC Differenzierung wird ein verbessertes molekulares Verständnis der Entwicklung von DCs Zellen erlauben. Korrektur von defizienten Signaltransduktionswegen oder deren

therapeutische Modifikation können neue Perspektiven für die Modulation immunologischer Prozesse eröffnen.

6. Literatur

- Adamson, E. D., and Mercola, D. (2002). Egr1 transcription factor: multiple roles in prostate tumor cell growth and survival. *Tumour Biol* 23, 93-102.
- Adolfsson, J., Borge, O. J., Bryder, D., Theilgaard-Monch, K., Astrand-Grundstrom, I., Sitnicka, E., Sasaki, Y., and Jacobsen, S. E. (2001). Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity* 15, 659-669.
- Ahn, J. H., Lee, Y., Jeon, C., Lee, S. J., Lee, B. H., Choi, K. D., and Bae, Y. S. (2002). Identification of the genes differentially expressed in human dendritic cell subsets by cDNA subtraction and microarray analysis. *Blood* 100, 1742-1754.
- 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.
- Albagli-Curiel, O. (2003). Ambivalent role of BCL6 in cell survival and transformation. *Oncogene* 22, 507-516.
- Allen, J. D., and Adams, J. M. (1993). Enforced expression of Hlx homeobox gene prompts myeloid cell maturation and altered adherence properties of T cells. *Blood* 81, 3242-3251.
- Allen, J. D., Lints, T., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Strasser, A., Harvey, R. P., and Adams, J. M. (1991). Novel murine homeo box gene on chromosome 1 expressed in specific hematopoietic lineages and during embryogenesis. *Genes Dev* 5, 509-520.
- Alleva, D. G., Burger, C. J., and Elgert, K. D. (1994). Tumor-induced regulation of suppressor macrophage nitric oxide and TNF-alpha production. Role of tumor-derived IL-10, TGF-beta, and prostaglandin E2. *J Immunol* 153, 1674-1686.
- Anjuere, F., Martin, P., Ferrero, I., Fraga, M. L., del Hoyo, G. M., Wright, N., and Ardavin, C. (1999). Definition of dendritic cell subpopulations present in the spleen, Peyer's patches, lymph nodes, and skin of the mouse. *Blood* 93, 590-598.
- Aperlo, C., Pognonec, P., Stanley, E. R., and Boulukos, K. E. (1996). Constitutive c-ets2 expression in M1D+ myeloblast leukemic cells induces their differentiation to macrophages. *Mol Cell Biol* 16, 6851-6858.
- Ardavin, C. (2003). Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 3, 582-590.
- Ardavin, C., Martinez del Hoyo, G., Martin, P., Anjuere, F., Arias, C. F., Marin, A. R., Ruiz, S., Parrillas, V., and Hernandez, H. (2001). Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends Immunol* 22, 691-700.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18, 767-811.
- Banchereau, J., and Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.
- Barratt-Boyes, S. M., and Thomson, A. W. (2005). Dendritic cells: tools and targets for transplant tolerance. *Am J Transplant* 5, 2807-2813.

- Borkowski, T. A., Letterio, J. J., Farr, A. G., and Udey, M. C. (1996). A role for endogenous transforming growth factor beta 1 in Langerhans cell biology: the skin of transforming growth factor beta 1 null mice is devoid of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* *184*, 2417-2422.
- Bos, R., van Diest, P. J., van der Groep, P., Greijer, A. E., Hermsen, M. A., Heijnen, I., Meijer, G. A., Baak, J. P., Pinedo, H. M., van der Wall, E., and Shvarts, A. (2003). Protein expression of B-cell lymphoma gene 6 (BCL-6) in invasive breast cancer is associated with cyclin D1 and hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha). *Oncogene* *22*, 8948-8951.
- Bourguin-Plonquet, A., Rouard, H., Roudot-Thoraval, F., Bellanger, C., Marquet, J., Delfau-Larue, M. H., Divine, M., and Farcet, J. P. (2002). Severe decrease in peripheral blood dendritic cells in hairy cell leukaemia. *Br J Haematol* *116*, 595-597.
- Brasel, K., De Smedt, T., Smith, J. L., and Maliszewski, C. R. (2000). Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures. *Blood* *96*, 3029-3039.
- Brocker, T., Riedinger, M., and Karjalainen, K. (1997). Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *J Exp Med* *185*, 541-550.
- Bromberg, J., and Darnell, J. E., Jr. (2000). The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* *19*, 2468-2473.
- Bronte, V., Chappell, D. B., Apolloni, E., Cabrelle, A., Wang, M., Hwu, P., and Restifo, N. P. (1999). Unopposed production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by tumors inhibits CD8+ T cell responses by dysregulating antigen-presenting cell maturation. *J Immunol* *162*, 5728-5737.
- Buggy, Y., Maguire, T. M., McDermott, E., Hill, A. D., O'Higgins, N., and Duffy, M. J. (2006). Ets2 transcription factor in normal and neoplastic human breast tissue. *Eur J Cancer* *42*, 485-491.
- Cai, S., Han, H. J., and Kohwi-Shigematsu, T. (2003). Tissue-specific nuclear architecture and gene expression regulated by SATB1. *Nat Genet* *34*, 42-51.
- Caux, C., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D., and Banchereau, J. (1992). GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* *360*, 258-261.
- Chai, J. G., Bartok, I., Chandler, P., Vendetti, S., Antoniou, A., Dyson, J., and Lechler, R. (1999). Anergic T cells act as suppressor cells in vitro and in vivo. *Eur J Immunol* *29*, 686-692.
- Cham, C. M., Xu, H., O'Keefe, J. P., Rivas, F. V., Zagouras, P., and Gajewski, T. F. (2003). Gene array and protein expression profiles suggest post-transcriptional regulation during CD8+ T cell differentiation. *J Biol Chem* *278*, 17044-17052.
- Chaux, P., Hammann, A., Martin, F., and Martin, M. (1993). Surface phenotype and functions of tumor-infiltrating dendritic cells: CD8 expression by a cell subpopulation. *Eur J Immunol* *23*, 2517-2525.
- Chavrier, P., Zerial, M., Lemaire, P., Almendral, J., Bravo, R., and Charnay, P. (1988). A gene encoding a protein with zinc fingers is activated during G0/G1 transition in cultured cells. *Embo J* *7*, 29-35.
- Chen, F. E., Huang, D. B., Chen, Y. Q., and Ghosh, G. (1998). Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF-kappaB bound to DNA. *Nature* *391*, 410-413.

- Chianese-Bullock, K. A., Woodson, E. M., Tao, H., Boerner, S. A., Smolkin, M., Grosh, W. W., Neese, P. Y., Merrill, P., Petroni, G. R., and Slingluff, C. L., Jr. (2005). Autoimmune toxicities associated with the administration of antitumor vaccines and low-dose interleukin-2. *J Immunother* 28, 412-419.
- Choubey, D., and Lengyel, P. (1992). Interferon action: nucleolar and nucleoplasmic localization of the interferon-inducible 72-kD protein that is encoded by the Irf 204 gene from the gene 200 cluster. *J Cell Biol* 116, 1333-1341.
- Chuaqui, R. F., Bonner, R. F., Best, C. J., Gillespie, J. W., Flaig, M. J., Hewitt, S. M., Phillips, J. L., Krizman, D. B., Tangrea, M. A., Ahram, M., *et al.* (2002). Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments. *Nat Genet* 32 Suppl, 509-514.
- Curti, A., Fogli, M., Ratta, M., Tura, S., and Lemoli, R. M. (2001). Stem cell factor and FLT3-ligand are strictly required to sustain the long-term expansion of primitive CD34+DR- dendritic cell precursors. *J Immunol* 166, 848-854.
- D'Amico, A., and Wu, L. (2003). The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid predendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3. *J Exp Med* 198, 293-303.
- Darnell, J. E., Jr. (1997). STATs and gene regulation. *Science* 277, 1630-1635.
- del Hoyo, G. M., Martin, P., Vargas, H. H., Ruiz, S., Arias, C. F., and Ardavin, C. (2002). Characterization of a common precursor population for dendritic cells. *Nature* 415, 1043-1047.
- Dong, S., and Twardy, D. J. (2002). Interactions of STAT5b-RARalpha, a novel acute promyelocytic leukemia fusion protein, with retinoic acid receptor and STAT3 signaling pathways. *Blood* 99, 2637-2646.
- Dummer, W., Becker, J. C., Schwaaf, A., Leverkus, M., Moll, T., and Brocker, E. B. (1995). Elevated serum levels of interleukin-10 in patients with metastatic malignant melanoma. *Melanoma Res* 5, 67-68.
- Enk, A. H., Jonuleit, H., Saloga, J., and Knop, J. (1997). Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma. *Int J Cancer* 73, 309-316.
- Enk, A. H., Saloga, J., Becker, D., M, B. P. m., and Knop, J. (1994). Induction of hapten-specific tolerance by interleukin 10 in vivo. *J Exp Med* 179, 1397-1402.
- Finkelman, F. D., Lees, A., Birnbaum, R., Gause, W. C., and Morris, S. C. (1996). Dendritic cells can present antigen in vivo in a tolerogenic or immunogenic fashion. *J Immunol* 157, 1406-1414.
- Freeman, W. M., Walker, S. J., and Vrana, K. E. (1999). Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques* 26, 112-122, 124-115.
- Gabrilovich, D. I., Chen, H. L., Girgis, K. R., Cunningham, H. T., Meny, G. M., Nadaf, S., Kavanaugh, D., and Carbone, D. P. (1996). Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 2, 1096-1103.
- Gariglio, M., De Andrea, M., Lembo, M., Ravotto, M., Zappador, C., Valente, G., and Landolfo, S. (1998). The murine homolog of the HIN 200 family, Irf 204, is constitutively expressed in myeloid cells and selectively induced in the monocyte/macrophage lineage. *J Leukoc Biol* 64, 608-614.
- Georgopoulos, K., Bigby, M., Wang, J. H., Molnar, A., Wu, P., Winandy, S., and Sharpe, A. (1994). The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell* 79, 143-156.

- Ginzinger, D. G. (2002). Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* *30*, 503-512.
- Girolomoni, G., Lutz, M. B., Pastore, S., Assmann, C. U., Cavani, A., and Ricciardi-Castagnoli, P. (1995). Establishment of a cell line with features of early dendritic cell precursors from fetal mouse skin. *Eur J Immunol* *25*, 2163-2169.
- Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., and Mathieu, C. (2001). An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* *25*, 386-401.
- Givan, A. L. (2001). Principles of flow cytometry: an overview. *Methods Cell Biol* *63*, 19-50.
- Grakoui, A., Bromley, S. K., Sumen, C., Davis, M. M., Shaw, A. S., Allen, P. M., and Dustin, M. L. (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* *285*, 221-227.
- Granucci, F., Vizzardelli, C., Virzi, E., Rescigno, M., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Transcriptional reprogramming of dendritic cells by differentiation stimuli. *Eur J Immunol* *31*, 2539-2546.
- Gregori, S., Casorati, M., Amuchastegui, S., Smiroldo, S., Davalli, A. M., and Adorini, L. (2001). Regulatory T cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance. *J Immunol* *167*, 1945-1953.
- Groblewski, G. E., Wang, Y., Ernst, S. A., Kent, C., and Williams, J. A. (1995). Cholecystokinin stimulates the down-regulation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase in pancreatic acinar cells. *J Biol Chem* *270*, 1437-1442.
- Grouard, G., Risoan, M. C., Filgueira, L., Durand, I., Banchereau, J., and Liu, Y. J. (1997). The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* *185*, 1101-1111.
- Guermontprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C., and Amigorena, S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* *20*, 621-667.
- Guerrero, A., Langmuir, P. B., Spain, L. M., and Scott, E. W. (2000). PU.1 is required for myeloid-derived but not lymphoid-derived dendritic cells. *Blood* *95*, 879-885.
- Hacker, C., Kirsch, R. D., Ju, X. S., Hieronymus, T., Gust, T. C., Kuhl, C., Jorgas, T., Kurz, S. M., Rose-John, S., Yokota, Y., and Zenke, M. (2003). Transcriptional profiling identifies Id2 function in dendritic cell development. *Nat Immunol* *4*, 380-386.
- Hackstein, H., and Thomson, A. W. (2004). Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nat Rev Immunol* *4*, 24-34.
- Hart, D. N. (1997). Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* *90*, 3245-3287.
- Hashimoto, S., Suzuki, T., Dong, H. Y., Nagai, S., Yamazaki, N., and Matsushima, K. (1999). Serial analysis of gene expression in human monocyte-derived dendritic cells. *Blood* *94*, 845-852.
- Hawiger, D., Inaba, K., Dorsett, Y., Guo, M., Mahnke, K., Rivera, M., Ravetch, J. V., Steinman, R. M., and Nussenzweig, M. C. (2001). Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* *194*, 769-779.

- Hawkins, S. M., Kohwi-Shigematsu, T., and Skalnik, D. G. (2001). The matrix attachment region-binding protein SATB1 interacts with multiple elements within the gp91phox promoter and is down-regulated during myeloid differentiation. *J Biol Chem* *276*, 44472-44480.
- Hertel, L., Rolle, S., De Andrea, M., Azzimonti, B., Osello, R., Gribaudo, G., Gariglio, M., and Landolfo, S. (2000). The retinoblastoma protein is an essential mediator that links the interferon-inducible 204 gene to cell-cycle regulation. *Oncogene* *19*, 3598-3608.
- Hock, H., Hamblen, M. J., Rooke, H. M., Schindler, J. W., Saleque, S., Fujiwara, Y., and Orkin, S. H. (2004). Gfi-1 restricts proliferation and preserves functional integrity of haematopoietic stem cells. *Nature* *431*, 1002-1007.
- Hock, H., Hamblen, M. J., Rooke, H. M., Traver, D., Bronson, R. T., Cameron, S., and Orkin, S. H. (2003). Intrinsic requirement for zinc finger transcription factor Gfi-1 in neutrophil differentiation. *Immunity* *18*, 109-120.
- Houston, P., Campbell, C. J., Svaren, J., Milbrandt, J., and Braddock, M. (2001). The transcriptional corepressor NAB2 blocks Egr-1-mediated growth factor activation and angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* *283*, 480-486.
- Hsu, F. J., Benike, C., Fagnoni, F., Liles, T. M., Czerwinski, D., Taidi, B., Engleman, E. G., and Levy, R. (1996). Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* *2*, 52-58.
- Ichikawa, E., Hida, S., Omatsu, Y., Shimoyama, S., Takahara, K., Miyagawa, S., Inaba, K., and Taki, S. (2004). Defective development of splenic and epidermal CD4⁺ dendritic cells in mice deficient for IFN regulatory factor-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 3909-3914.
- Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S., and Steinman, R. M. (1992). Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* *176*, 1693-1702.
- Itano, A. A., McSorley, S. J., Reinhardt, R. L., Ehst, B. D., Ingulli, E., Rudensky, A. Y., and Jenkins, M. K. (2003). Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. *Immunity* *19*, 47-57.
- Jackson, S. H., Yu, C. R., Mahdi, R. M., Ebong, S., and Egwuagu, C. E. (2004). Dendritic cell maturation requires STAT1 and is under feedback regulation by suppressors of cytokine signaling. *J Immunol* *172*, 2307-2315.
- Just, U., Friel, J., Heberlein, C., Tamura, T., Baccarini, M., Tessmer, U., Klingler, K., and Ostertag, W. (1993). Upregulation of lineage specific receptors and ligands in multipotential progenitor cells is part of an endogenous program of differentiation. *Growth Factors* *9*, 291-300.
- Karsunky, H., Mende, I., Schmidt, T., and Moroy, T. (2002a). High levels of the onco-protein Gfi-1 accelerate T-cell proliferation and inhibit activation induced T-cell death in Jurkat T-cells. *Oncogene* *21*, 1571-1579.
- Karsunky, H., Zeng, H., Schmidt, T., Zevnik, B., Kluge, R., Schmid, K. W., Duhren, U., and Moroy, T. (2002b). Inflammatory reactions and severe neutropenia in mice lacking the transcriptional repressor Gfi1. *Nat Genet* *30*, 295-300.
- Kataoka, H., Joh, T., Miura, Y., Tamaoki, T., Senoo, K., Ohara, H., Nomura, T., Tada, T., Asai, K., Kato, T., and Itoh, M. (2000). AT motif binding factor 1-A (ATBF1-A) negatively regulates transcription

- of the aminopeptidase N gene in the crypt-villus axis of small intestine. *Biochem Biophys Res Commun* 267, 91-95.
- Kerkmann, M., Rothenfusser, S., Hornung, V., Towarowski, A., Wagner, M., Sarris, A., Giese, T., Endres, S., and Hartmann, G. (2003). Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 170, 4465-4474.
- Kieslinger, M., Woldman, I., Moriggl, R., Hofmann, J., Marine, J. C., Ihle, J. N., Beug, H., and Decker, T. (2000). Antiapoptotic activity of Stat5 required during terminal stages of myeloid differentiation. *Genes Dev* 14, 232-244.
- Klein, C., Bueler, H., and Mulligan, R. C. (2000). Comparative analysis of genetically modified dendritic cells and tumor cells as therapeutic cancer vaccines. *J Exp Med* 191, 1699-1708.
- Kolb, H. J., Mittermuller, J., Clemm, C., Holler, E., Ledderose, G., Brehm, G., Heim, M., and Wilmanns, W. (1990). Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* 76, 2462-2465.
- Kondo, M., Weissman, I. L., and Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91, 661-672.
- Krishnaraju, K., Nguyen, H. Q., Liebermann, D. A., and Hoffman, B. (1995). The zinc finger transcription factor Egr-1 potentiates macrophage differentiation of hematopoietic cells. *Mol Cell Biol* 15, 5499-5507.
- Laouar, Y., Welte, T., Fu, X. Y., and Flavell, R. A. (2003). STAT3 is required for Flt3L-dependent dendritic cell differentiation. *Immunity* 19, 903-912.
- Le Naour, F., Hohenkirk, L., Grolleau, A., Misek, D. E., Lescure, P., Geiger, J. D., Hanash, S., and Beretta, L. (2001). Profiling changes in gene expression during differentiation and maturation of monocyte-derived dendritic cells using both oligonucleotide microarrays and proteomics. *J Biol Chem* 276, 17920-17931.
- Lee, S. L., Wang, Y., and Milbrandt, J. (1996). Unimpaired macrophage differentiation and activation in mice lacking the zinc finger transcription factor NGFI-A (EGR1). *Mol Cell Biol* 16, 4566-4572.
- Lenardo, M. J., Fan, C. M., Maniatis, T., and Baltimore, D. (1989). The involvement of NF-kappa B in beta-interferon gene regulation reveals its role as widely inducible mediator of signal transduction. *Cell* 57, 287-294.
- Levi, G., Topilko, P., Schneider-Maunoury, S., Lasagna, M., Mantero, S., Cancedda, R., and Charnay, P. (1996). Defective bone formation in Krox-20 mutant mice. *Development* 122, 113-120.
- Lewis, A. G., Flanagan, J., Marsh, A., Pupo, G. M., Mann, G., Spurdle, A. B., Lindeman, G. J., Visvader, J. E., Brown, M. A., and Chenevix-Trench, G. (2005). Mutation analysis of FANCD2, BRIP1/BACH1, LMO4 and SFN in familial breast cancer. *Breast Cancer Res* 7, R1005-1016.
- Li, X., Lu, J. Y., Zhao, L. Q., Wang, X. Q., Liu, G. L., Liu, Z., Zhou, C. N., Wu, M., and Liu, Z. H. (2003). Overexpression of ETS2 in human esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 9, 205-208.
- Liu, A. Y., Corey, E., Vessella, R. L., Lange, P. H., True, L. D., Huang, G. M., Nelson, P. S., and Hood, L. (1997). Identification of differentially expressed prostate genes: increased expression of transcription factor ETS-2 in prostate cancer. *Prostate* 30, 145-153.

- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$ Method. *Methods* 25, 402-408.
- Loonstra, A., Vooijs, M., Beverloo, H. B., Allak, B. A., van Drunen, E., Kanaar, R., Berns, A., and Jonkers, J. (2001). Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9209-9214.
- Ludewig, B., Ochsenbein, A. F., Odermatt, B., Paulin, D., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. (2000). Immunotherapy with dendritic cells directed against tumor antigens shared with normal host cells results in severe autoimmune disease. *J Exp Med* 191, 795-804.
- Maecker, B., Mouggiakakos, D., Zimmermann, M., Behrens, M., Hollander, S., Schrauder, A., Schrappe, M., Welte, K., and Klein, C. (2006). Dendritic cell deficiencies in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients. *Leukemia*.
- Mami, N. B., Mohty, M., Chambost, H., Gaugler, B., and Olive, D. (2004). Blood dendritic cells in patients with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 126, 77-80.
- Maness, L. J., and McSweeney, P. A. (2004). Treatment options for newly diagnosed patients with chronic myeloid leukemia. *Curr Hematol Rep* 3, 54-61.
- Manning, J. S., Hackett, A. J., and Darby, N. B., Jr. (1971). Effect of polycations on sensitivity of BALD-3T3 cells to murine leukemia and sarcoma virus infectivity. *Appl Microbiol* 22, 1162-1163.
- Manz, M. G., Traver, D., Miyamoto, T., Weissman, I. L., and Akashi, K. (2001). Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* 97, 3333-3341.
- Maraskovsky, E., Brasel, K., Teepe, M., Roux, E. R., Lyman, S. D., Shortman, K., and McKenna, H. J. (1996). Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J Exp Med* 184, 1953-1962.
- Maraskovsky, E., Daro, E., Roux, E., Teepe, M., Maliszewski, C. R., Hoek, J., Caron, D., Lebsack, M. E., and McKenna, H. J. (2000). In vivo generation of human dendritic cell subsets by Flt3 ligand. *Blood* 96, 878-884.
- Martin, P., del Hoyo, G. M., Anjuere, F., Ruiz, S. R., Arias, C. F., Marin, A. R., and Ardavin, C. (2000). Concept of lymphoid versus myeloid dendritic cell lineages revisited: both CD8alpha(-) and CD8alpha(+) dendritic cells are generated from CD4(low) lymphoid-committed precursors. *Blood* 96, 2511-2519.
- Mathas, S., Hinz, M., Anagnostopoulos, I., Krappmann, D., Lietz, A., Jundt, F., Bommert, K., Mehta-Grigoriou, F., Stein, H., Dorken, B., and Scheidereit, C. (2002). Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF-kappa B. *Embo J* 21, 4104-4113.
- Matsunaga, T., Ishida, T., Takekawa, M., Nishimura, S., Adachi, M., and Imai, K. (2002). Analysis of gene expression during maturation of immature dendritic cells derived from peripheral blood monocytes. *Scand J Immunol* 56, 593-601.
- Mayordomo, J. I., Zorina, T., Storkus, W. J., Zitvogel, L., Celluzzi, C., Falo, L. D., Melief, C. J., Ildstad, S. T., Kast, W. M., Deleo, A. B., and et al. (1995). Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. *Nat Med* 1, 1297-1302.

- McKenna, H. J., Stocking, K. L., Miller, R. E., Brasel, K., De Smedt, T., Maraskovsky, E., Maliszewski, C. R., Lynch, D. H., Smith, J., Pulendran, B., *et al.* (2000). Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* *95*, 3489-3497.
- Menges, M., Rossner, S., Voigtlander, C., Schindler, H., Kukutsch, N. A., Bogdan, C., Erb, K., Schuler, G., and Lutz, M. B. (2002). Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J Exp Med* *195*, 15-21.
- Messmer, D., Messmer, B., and Chiorazzi, N. (2003). The global transcriptional maturation program and stimuli-specific gene expression profiles of human myeloid dendritic cells. *Int Immunol* *15*, 491-503.
- Min, D. L., Zhou, X. Y., Yang, W. T., Lu, H. F., Zhang, T. M., Zhen, A. H., Cao, P. Z., and Shi, D. R. (2005). Point mutation of 5' noncoding region of BCL-6 gene in primary gastric lymphomas. *World J Gastroenterol* *11*, 51-55.
- Mirenda, V., Berton, I., Read, J., Cook, T., Smith, J., Dorling, A., and Lechler, R. I. (2004). Modified dendritic cells coexpressing self and allogeneic major histocompatibility complex molecules: an efficient way to induce indirect pathway regulation. *J Am Soc Nephrol* *15*, 987-997.
- Mitchell, P. J., and Tjian, R. (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* *245*, 371-378.
- Mizunuma, H., Miyazawa, J., Sanada, K., and Imai, K. (2003). The LIM-only protein, LMO4, and the LIM domain-binding protein, LDB1, expression in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Br J Cancer* *88*, 1543-1548.
- Mohty, M., Isnardon, D., Vey, N., Briere, F., Blaise, D., Olive, D., and Gaugler, B. (2002). Low blood dendritic cells in chronic myeloid leukaemia patients correlates with loss of CD34+/CD38- primitive haematopoietic progenitors. *Br J Haematol* *119*, 115-118.
- Mohty, M., Jarrossay, D., Lafage-Pochitaloff, M., Zandotti, C., Briere, F., de Lamballeri, X. N., Isnardon, D., Sainy, D., Olive, D., and Gaugler, B. (2001). Circulating blood dendritic cells from myeloid leukemia patients display quantitative and cytogenetic abnormalities as well as functional impairment. *Blood* *98*, 3750-3756.
- Morel, P. A., Feili-Hariri, M., Coates, P. T., and Thomson, A. W. (2003). Dendritic cells, T cell tolerance and therapy of adverse immune reactions. *Clin Exp Immunol* *133*, 1-10.
- Morinaga, T., Yasuda, H., Hashimoto, T., Higashio, K., and Tamaoki, T. (1991). A human alpha-fetoprotein enhancer-binding protein, ATBF1, contains four homeodomains and seventeen zinc fingers. *Mol Cell Biol* *11*, 6041-6049.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* *51 Pt 1*, 263-273.
- Nestle, F. O., Farkas, A., and Conrad, C. (2005). Dendritic-cell-based therapeutic vaccination against cancer. *Curr Opin Immunol* *17*, 163-169.
- Nguyen, H. Q., Hoffman-Liebermann, B., and Liebermann, D. A. (1993). The zinc finger transcription factor Egr-1 is essential for and restricts differentiation along the macrophage lineage. *Cell* *72*, 197-209.

- Numazawa, S., and Yoshida, T. (2004). Nrf2-dependent gene expressions: a molecular toxicological aspect. *J Toxicol Sci* 29, 81-89.
- O'Doherty, U., Swiggard, W. J., and Malim, M. H. (2000). Human immunodeficiency virus type 1 spinoculation enhances infection through virus binding. *J Virol* 74, 10074-10080.
- Ohno, H., and Fukuhara, S. (1997). Significance of rearrangement of the BCL6 gene in B-cell lymphoid neoplasms. *Leuk Lymphoma* 27, 53-63.
- Orkin, S. H. (2000). Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet* 1, 57-64.
- Ory, D. S., Neugeboren, B. A., and Mulligan, R. C. (1996). A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11400-11406.
- Ouaaz, F., Arron, J., Zheng, Y., Choi, Y., and Beg, A. A. (2002). Dendritic cell development and survival require distinct NF-kappaB subunits. *Immunity* 16, 257-270.
- Paglia, P., Girolomoni, G., Robbiati, F., Granucci, F., and Ricciardi-Castagnoli, P. (1993). Immortalized dendritic cell line fully competent in antigen presentation initiates primary T cell responses in vivo. *J Exp Med* 178, 1893-1901.
- Papas, T. S., Watson, D. K., Sacchi, N., Fujiwara, S., Seth, A. K., Fisher, R. J., Bhat, N. K., Mavrothalassitis, G., Koizumi, S., Jorcyk, C. L., and et al. (1990). ETS family of genes in leukemia and Down syndrome. *Am J Med Genet Suppl* 7, 251-261.
- Passequé, E., Jochum, W., Schorpp-Kistner, M., Mohle-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.
- Peche, H., Trinite, B., Martinet, B., and Cuturi, M. C. (2005). Prolongation of heart allograft survival by immature dendritic cells generated from recipient type bone marrow progenitors. *Am J Transplant* 5, 255-267.
- Ptashne, M. (1988). How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature* 335, 683-689.
- Ptashne, M., and Gann, A. A. (1990). Activators and targets. *Nature* 346, 329-331.
- Rangasamy, T., Guo, J., Mitzner, W. A., Roman, J., Singh, A., Fryer, A. D., Yamamoto, M., Kensler, T. W., Tuder, R. M., Georas, S. N., and Biswal, S. (2005). Disruption of Nrf2 enhances susceptibility to severe airway inflammation and asthma in mice. *J Exp Med* 202, 47-59.
- Rasko, J. E., Metcalf, D., Alexander, B., Strasser, A., and Begley, C. G. (1997). Establishment of multipotential and antigen presenting cell lines derived from myeloid leukemias in GM-CSF transgenic mice. *Leukemia* 11, 732-742.
- Rassidakis, G. Z., Thomaidis, A., Atwell, C., Ford, R., Jones, D., Claret, F. X., and Medeiros, L. J. (2005). JunB expression is a common feature of CD30+ lymphomas and lymphomatoid papulosis. *Mod Pathol* 18, 1365-1370.
- Rathinam, C., Geffers, R., Yucel, R., Buer, J., Welte, K., Moroy, T., and Klein, C. (2005). The transcriptional repressor Gfi1 controls STAT3-dependent dendritic cell development and function. *Immunity* 22, 717-728.

- Rathinam, C., Sauer, M., Ghosh, A., Rudolph, C., Hegazy, A., Schlegelberger, B., Welte, K., and Klein, C. (2006). Generation and characterization of a novel hematopoietic progenitor cell line with DC differentiation potential. *Leukemia*.
- Res, P. C., Couwenberg, F., Vyth-Dreese, F. A., and Spits, H. (1999). Expression of pTalpha mRNA in a committed dendritic cell precursor in the human thymus. *Blood* *94*, 2647-2657.
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., and Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* *414*, 105-111.
- Richards, J., Le Naour, F., Hanash, S., and Beretta, L. (2002). Integrated genomic and proteomic analysis of signaling pathways in dendritic cell differentiation and maturation. *Ann N Y Acad Sci* *975*, 91-100.
- Rissoan, M. C., Soumelis, V., Kadowaki, N., Grouard, G., Briere, F., de Waal Malefyt, R., and Liu, Y. J. (1999). Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* *283*, 1183-1186.
- Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kampgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B., Konwalinka, G., Fritsch, P. O., Steinman, R. M., and Schuler, G. (1994). Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* *180*, 83-93.
- Rosenbauer, F., Wagner, K., Kutok, J. L., Iwasaki, H., Le Beau, M. M., Okuno, Y., Akashi, K., Fiering, S., and Tenen, D. G. (2004). Acute myeloid leukemia induced by graded reduction of a lineage-specific transcription factor, PU.1. *Nat Genet* *36*, 624-630.
- Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* *179*, 1109-1118.
- Satthaporn, S., and Eremin, O. (2001). Dendritic cells (I): Biological functions. *J R Coll Surg Edinb* *46*, 9-19.
- Sauer, B. (1998). Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods* *14*, 381-392.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., and Brown, P. O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* *270*, 467-470.
- Schiavoni, G., Mattei, F., Borghi, P., Sestili, P., Venditti, M., Morse, H. C., 3rd, Belardelli, F., and Gabriele, L. (2004). ICSBP is critically involved in the normal development and trafficking of Langerhans cells and dermal dendritic cells. *Blood* *103*, 2221-2228.
- Schiavoni, G., Mattei, F., Sestili, P., Borghi, P., Venditti, M., Morse, H. C., 3rd, Belardelli, F., and Gabriele, L. (2002). ICSBP is essential for the development of mouse type I interferon-producing cells and for the generation and activation of CD8alpha(+) dendritic cells. *J Exp Med* *196*, 1415-1425.
- Schilham, M. W., Oosterwegel, M. A., Moerer, P., Ya, J., de Boer, P. A., van de Wetering, M., Verbeek, S., Lamers, W. H., Kruisbeek, A. M., Cumano, A., and Clevers, H. (1996). Defects in cardiac outflow tract formation and pro-B-lymphocyte expansion in mice lacking Sox-4. *Nature* *380*, 711-714.
- Schmidt, T., Karsunky, H., Gau, E., Zevnik, B., Elsasser, H. P., and Moroy, T. (1998). Zinc finger protein GFI-1 has low oncogenic potential but cooperates strongly with pim and myc genes in T-cell lymphomagenesis. *Oncogene* *17*, 2661-2667.
- Schneider-Maunoury, S., Topilko, P., Seitandou, T., Levi, G., Cohen-Tannoudji, M., Pournin, S., Babinet, C., and Charnay, P. (1993). Disruption of Krox-20 results in alteration of rhombomeres 3 and 5 in the developing hindbrain. *Cell* *75*, 1199-1214.

- Schroeder, T., Lange, C., Strehl, J., and Just, U. (2000). Generation of functionally mature dendritic cells from the multipotential stem cell line FDCP-mix. *Br J Haematol* 111, 890-897.
- Sharp, P. A., Sugden, B., and Sambrook, J. (1973). Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* 12, 3055-3063.
- Shortman, K., and Liu, Y. J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2, 151-161.
- Silver, D. P., and Livingston, D. M. (2001). Self-excising retroviral vectors encoding the Cre recombinase overcome Cre-mediated cellular toxicity. *Mol Cell* 8, 233-243.
- Snow, J. W., Abraham, N., Ma, M. C., Abbey, N. W., Herndier, B., and Goldsmith, M. A. (2002). STAT5 promotes multilineage hematolymphoid development in vivo through effects on early hematopoietic progenitor cells. *Blood* 99, 95-101.
- Socolovsky, M., Fallon, A. E., Wang, S., Brugnara, C., and Lodish, H. F. (1999). Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in *Stat5a*^{-/-}*5b*^{-/-} mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell* 98, 181-191.
- Spits, H., Couwenberg, F., Bakker, A. Q., Weijer, K., and Uittenbogaart, C. H. (2000). Id2 and Id3 inhibit development of CD34(+) stem cells into predendritic cell (pre-DC)2 but not into pre-DC1. Evidence for a lymphoid origin of pre-DC2. *J Exp Med* 192, 1775-1784.
- Stegmaier, P., Kel, A. E., and Wingender, E. (2004). Systematic DNA-binding domain classification of transcription factors. *Genome Inform Ser Workshop Genome Inform* 15, 276-286.
- Steinbrink, K., Jonuleit, H., Muller, G., Schuler, G., Knop, J., and Enk, A. H. (1999). Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood* 93, 1634-1642.
- Steinbrink, K., Wolf, M., Jonuleit, H., Knop, J., and Enk, A. H. (1997). Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* 159, 4772-4780.
- Steinman, R. M., and Cohn, Z. A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137, 1142-1162.
- Sukhatme, V. P., Cao, X. M., Chang, L. C., Tsai-Morris, C. H., Stamenkovich, D., Ferreira, P. C., Cohen, D. R., Edwards, S. A., Shows, T. B., Curran, T., and et al. (1988). A zinc finger-encoding gene coregulated with *c-fos* during growth and differentiation, and after cellular depolarization. *Cell* 53, 37-43.
- Sun, X., Frierson, H. F., Chen, C., Li, C., Ran, Q., Otto, K. B., Cantarel, B. L., Vessella, R. L., Gao, A. C., Petros, J., et al. (2005). Frequent somatic mutations of the transcription factor ATBF1 in human prostate cancer. *Nat Genet* 37, 407-412.
- Suzuki, S., Honma, K., Matsuyama, T., Suzuki, K., Toriyama, K., Akitoyo, I., Yamamoto, K., Suematsu, T., Nakamura, M., Yui, K., and Kumatori, A. (2004). Critical roles of interferon regulatory factor 4 in CD11b^{high}CD8 α - dendritic cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8981-8986.
- Suzuki, S., Suzuki, N., Mirtsos, C., Horacek, T., Lye, E., Noh, S. K., Ho, A., Bouchard, D., Mak, T. W., and Yeh, W. C. (2003). Nur77 as a survival factor in tumor necrosis factor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8276-8280.

- Swiatek, P. J., and Gridley, T. (1993). Perinatal lethality and defects in hindbrain development in mice homozygous for a targeted mutation of the zinc finger gene *Krox20*. *Genes Dev* 7, 2071-2084.
- Sykes, D. B., Scheele, J., Pasillas, M., and Kamps, M. P. (2003). Transcriptional profiling during the early differentiation of granulocyte and monocyte progenitors controlled by conditional versions of the E2a-Pbx1 oncoprotein. *Leuk Lymphoma* 44, 1187-1199.
- Szremska, A. P., Kenner, L., Weisz, E., Ott, R. G., Passegue, E., Artwohl, M., Freissmuth, M., Stoxreiter, R., Theussl, H. C., Parzer, S. B., *et al.* (2003). JunB inhibits proliferation and transformation in B-lymphoid cells. *Blood* 102, 4159-4165.
- Taga, T., and Kishimoto, T. (1992). Cytokine receptors and signal transduction. *Faseb J* 6, 3387-3396.
- Taillebourg, E., Buart, S., and Charnay, P. (2002). Conditional, floxed allele of the *Krox20* gene. *Genesis* 32, 112-113.
- Takeda, K., Noguchi, K., Shi, W., Tanaka, T., Matsumoto, M., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Akira, S. (1997). Targeted disruption of the mouse *Stat3* gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3801-3804.
- Taniguchi, N., Taniura, H., Niinobe, M., Takayama, C., Tominaga-Yoshino, K., Ogura, A., and Yoshikawa, K. (2000). The postmitotic growth suppressor *necln* interacts with a calcium-binding protein (NEFA) in neuronal cytoplasm. *J Biol Chem* 275, 31674-31681.
- Teglund, S., McKay, C., Schuetz, E., van Deursen, J. M., Stravopodis, D., Wang, D., Brown, M., Bodner, S., Grosveld, G., and Ihle, J. N. (1998). *Stat5a* and *Stat5b* proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell* 93, 841-850.
- Timmerman, J. M., Czerwinski, D. K., Davis, T. A., Hsu, F. J., Benike, C., Hao, Z. M., Taidi, B., Rajapaksa, R., Caspar, C. B., Okada, C. Y., *et al.* (2002). Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. *Blood* 99, 1517-1526.
- Tomasoni, S., Aiello, S., Cassis, L., Noris, M., Longaretti, L., Cavinato, R. A., Azzollini, N., Pezzotta, A., Remuzzi, G., and Benigni, A. (2005). Dendritic cells genetically engineered with adenoviral vector encoding *dnIKK2* induce the formation of potent CD4+ T-regulatory cells. *Transplantation* 79, 1056-1061.
- Topilko, P., Schneider-Maunoury, S., Levi, G., Baron-Van Evercooren, A., Chennoufi, A. B., Seitanidou, T., Babinet, C., and Charnay, P. (1994). *Krox-20* controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature* 371, 796-799.
- Traver, D., Akashi, K., Manz, M., Merad, M., Miyamoto, T., Engleman, E. G., and Weissman, I. L. (2000). Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science* 290, 2152-2154.
- Tseng, G. C., Oh, M. K., Rohlin, L., Liao, J. C., and Wong, W. H. (2001). Issues in cDNA microarray analysis: quality filtering, channel normalization, models of variations and assessment of gene effects. *Nucleic Acids Res* 29, 2549-2557.
- Vandenabeele, S., Hochrein, H., Mavaddat, N., Winkel, K., and Shortman, K. (2001). Human thymus contains 2 distinct dendritic cell populations. *Blood* 97, 1733-1741.
- Vogelstein, B., and Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 615-619.

- Vremec, D., Lieschke, G. J., Dunn, A. R., Robb, L., Metcalf, D., and Shortman, K. (1997). The influence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on dendritic cell levels in mouse lymphoid organs. *Eur J Immunol* *27*, 40-44.
- Vremec, D., Zorbas, M., Scollay, R., Saunders, D. J., Ardavin, C. F., Wu, L., and Shortman, K. (1992). The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. *J Exp Med* *176*, 47-58.
- Warner, L. E., Mancias, P., Butler, I. J., McDonald, C. M., Keppen, L., Koob, K. G., and Lupski, J. R. (1998). Mutations in the early growth response 2 (EGR2) gene are associated with hereditary myelinopathies. *Nat Genet* *18*, 382-384.
- Watanabe, M., Miura, Y., Ido, A., Sakai, M., Nishi, S., Inoue, Y., Hashimoto, T., and Tamaoki, T. (1996). Developmental changes in expression of the ATBF1 transcription factor gene. *Brain Res Mol Brain Res* *42*, 344-349.
- Weissman, I. L. (2000). Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* *100*, 157-168.
- Weissman, I. L., Anderson, D. J., and Gage, F. (2001). Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol* *17*, 387-403.
- Wittwer, C. T., Ririe, K. M., Andrew, R. V., David, D. A., Gundry, R. A., and Balis, U. J. (1997). The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* *22*, 176-181.
- Wu, L., D'Amico, A., Winkel, K. D., Suter, M., Lo, D., and Shortman, K. (1998). RelB is essential for the development of myeloid-related CD8alpha- dendritic cells but not of lymphoid-related CD8alpha+ dendritic cells. *Immunity* *9*, 839-847.
- Wu, L., Li, C. L., and Shortman, K. (1996). Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny. *J Exp Med* *184*, 903-911.
- Wu, L., Nichogiannopoulou, A., Shortman, K., and Georgopoulos, K. (1997). Cell-autonomous defects in dendritic cell populations of Ikaros mutant mice point to a developmental relationship with the lymphoid lineage. *Immunity* *7*, 483-492.
- Xi, S., Zhang, Q., Gooding, W. E., Smithgall, T. E., and Grandis, J. R. (2003). Constitutive activation of Stat5b contributes to carcinogenesis in vivo. *Cancer Res* *63*, 6763-6771.
- Yang, L., Kim, H. T., Munoz-Medellin, D., Reddy, P., and Brown, P. H. (1997). Induction of retinoid resistance in breast cancer cells by overexpression of cJun. *Cancer Res* *57*, 4652-4661.
- Yang, M. Y., Liu, T. C., Chang, J. G., Lin, P. M., and Lin, S. F. (2003). JunB gene expression is inactivated by methylation in chronic myeloid leukemia. *Blood* *101*, 3205-3211.
- Yucel, R., Kosan, C., Heyd, F., and Moroy, T. (2004). Gfi1:green fluorescent protein knock-in mutant reveals differential expression and autoregulation of the growth factor independence 1 (Gfi1) gene during lymphocyte development. *J Biol Chem* *279*, 40906-40917.
- Zeng, H., Yucel, R., Kosan, C., Klein-Hitpass, L., and Moroy, T. (2004). Transcription factor Gfi1 regulates self-renewal and engraftment of hematopoietic stem cells. *Embo J* *23*, 4116-4125.
- Zhang, Y., Mukaida, N., Wang, J., Harada, A., Akiyama, M., and Matsushima, K. (1997). Induction of dendritic cell differentiation by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, stem cell factor, and

tumor necrosis factor alpha in vitro from lineage phenotypes-negative c-kit+ murine hematopoietic progenitor cells. *Blood* 90, 4842-4853.

III. Anhang

III.I. Geräte

<u>AutoMACS™-Gerät</u>	<i>AutoMACS™ Separator</i> , Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
<u>Brutschränke:</u>	Steri-Cycle CO ₂ Incubator, ThermoLifeSciences, Egelsbach
<u>Dokumentationssysteme:</u>	SigmPlot 2001 for Windows Version 7.101 Microsoft® Word 2000
<u>Elektrophoresekammern:</u>	<i>Sub-Cell GT Agarose Gel Electrophoresis System</i> , BIO-RAD, München
<u>FACS-Gerät:</u>	FACSCalibur™, BD Biosciences, San Jose, CA, USA
<u>Geldokumentationssystem:</u>	GelPrint 2000i, BioPhotonics Corp., Ann Arbor, MI, USA
<u>Glaswaren:</u>	Schott, Mainz
<u>Heizblock:</u>	Thermomixer comfort, 1,5 ml, eppendorf, Hamburg
<u>Mikroskop:</u>	Carl Zeiss, Göttingen
<u>Mikrowelle:</u>	Privileg/Quelle, Fürth
<u>PCR-Thermocycler:</u>	<i>Mastercycler gradient</i> , eppendorf, Hamburg
<u>Pipetten:</u>	Research® (variabel), 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-100 µl, eppendorf, Hamburg
<u>Pipettierhilfe:</u>	pipetus®-akku, Hirschmann®Laborgeräte, Eberstadt
<u>Real-Time PCR-Gerät:</u>	<i>Lightcycler</i> , Roche Biochemicals, Mannheim
<u>Spannungsquellen:</u>	POWER PAC 300, BIO-RAD, München
<u>Sterilwerkbänke:</u>	S1/S2: HERAsafe HS, Heraeus Instruments GmbH, Osterode
<u>Photometer:</u>	BioPhotometer, eppendorf, Hamburg
<u>Schüttler:</u>	CERTOMAT®HK, B.Braun, Biotech International, Melsungen
<u>Transilluminator:</u>	302 nm, Bachofer, Reutlingen
<u>Vortex:</u>	REAX control, Heidolph, Schwabach

<u>Wagen:</u>	Elektronische Präzisionswaage BP 3100S, Sartorius, Göttingen
<u>Wasserbad:</u>	GFL, Burgwedel
<u>Zählkammer:</u>	Neubauer Zählkammer, BRAND, GmbH+Co KG, Wertheim
<u>Zellsorter:</u>	MoFlo™, Dako, Glostrup, Dänemark
<u>Zentrifugen:</u>	Centrifuge 5415D für 1,5/2 ml Gefäße, eppendorf, Hamburg Megafuge 1.OR, Heraeus Instruments GmbH, Osterode

III.II. Verbrauchsmaterialien

Einmalinjektionskanüle	0,4 mm, Sterican®, Braun, Melsungen
Einwegpipetten	2, 5, 10 und 25 ml, Sarstedt, Nümbrecht
<i>HiBind®-DNA-Säulen</i>	<i>E.Z.N.A.® Tissue DNA Mini Kit</i> , PEQLAB
2 ml Sammel-Tubes	Biotechnologie GmbH, Erlangen
Nylongaze	Calbiochem GmbH, Bad Soden
Pasteurpipetten	BRAND, GmbH+Co KG
PCR-Gefäße	<i>Multiply®-PCR-Gefäße</i> , 0,5ml, Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	10, 200 und 1000 µl, Sarstedt, Nümbrecht
Plastikküvetten	UVette®, eppendorf, Hamburg
<i>Prefilter Spin Cups</i>	<i>Absolutely RNA® Miniprep Kit</i> ,
<i>2 ml receptacle tubes</i>	STRATAGENE, La Jolla, CA, USA
<i>RNA Binding Spin Cups</i>	
<i>1,5 ml microcentrifuge tubes</i>	
Reaktionsgefäße	<i>1,5 ml easy cap</i> und <i>0,5 ml Microtubes</i> , Sarstedt, Nümbrecht
Röhre für Durchflußzytometer FACScan	5 ml, Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen	1 ml, Terumo Europe, Leuven, Belgien
Zellkulturflaschen	25 cm ² , 75 cm ² und 175 cm ² , Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatten	<i>6- und 24-Well-Platten</i> , Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhren	15, 50 ml, Sarstedt, Nümbrecht

III.III. Chemikalien

Borsäure	<i>Boric acid</i> , Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
Dithiothreitol (DTT)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
EDTA-Dinatriumsalz	<i>EDTA disodium salt</i> , Sigma, Deisenhofen
Ethanol	J.T. Baker, Deventer, Holland
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Polybrene	Sigma, Deisenhofen
Sucrose	Sigma, Deisenhofen
0,1 M Tris-HCl	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	<i>Trypan Blue Stain 0,4%</i> , GIBCO™ Invitrogen Corporation, Karlsruhe

III.IV. Zytokine

rh-Flt3L	Peprtech, Rocky Hill, NJ, USA
rm-GM-CSF	Peprtech, Rocky Hill, NJ, USA
rm-IL3	Peprtech, Rocky Hill, NJ, USA
rm-IL4	Peprtech, Rocky Hill, NJ, USA
rm-IL6	Peprtech, Rocky Hill, NJ, USA
rm-SCF	Peprtech, Rocky Hill, NJ, USA

III.V. Verwendete Primerpaare

Die Primerpaar wurden von MWG-Biotech AG, Ebersberg verwendet.

Primername	Primersequenz	Fragmentlänge (bp)
AI256856	5'-GGG AGA CAT CCC GAT ACA GA-3' 5'TGA GGG GTG AAG ATG GAA AC-3'	364
Atbf1	5'-CCC AAG AGA AGC AAG GAC AG-3' 5'-ACG ACC TGT CCA AAA ACT GG-3'	380
Bcl6	5'-ACC TTA ATC GCC TCC GAA GT-3' 5'-CGG CTG TTC AGG AAC TCT TC-3'	378
D16Ert465e	5'-ACC CGA GTA GGT CAA ACG TG-3' 5'-CCA CCC CCA GCA CTA CTT TA-3'	368
Dnmt3a	5'-GAA GCC GCT GTT ACC TCT TG-3' 5'-AGG TTA TTG CAC GCG AGT CT-3'	351
Egr1	5'-ACC ACT TTG TGG CCT GAA CC-3' 5'-AGG TCT CCC TGT TGT TGT GG-3'	336
Egr2	5'-CAG TGA CTG CCA CCC CTT AT-3' 5'-CAC TGC TCT TCC GTT CCT TC-3'	377
Ets2	5'-CTT CCA AAA GGA GCA ACG AC-3' 5'-GGT AGT TTG GTG CCT GCA TT-3'	370
Hlx	5'-CTT CAG CGG GAC AGT TCT TC-3' 5'-CCT TGT CCT TGT CCT TCT GC-3'	383
Icsbp	5'-ACG AGG TTA CGC TGT GCT CT-3' 5'-ACC ATC TGG GAG AAA GCT GA-3'	379
Ifi204	5'-GGT AGT TTG GTG CCT GCA TT-3' 5'-CTT CTG CAA CCC AGG AAG AG-3'	382
Irf7	5'-GGT CGT AGG GAT CTG GAT GA-3' 5'-GAG CCC AGC ATT TTC TCT TG-3'	362
Jun	5'-GGA GGG GTT ACA AAC TGC AA-3' 5'-GAG GTT GGG GGC TAC TTT TC-3'	399
Junb	5'-GCA GCT ACT TTT CGG GTC AG-3' 5'-TGC TGA GGT TGG TGT AGA CG-3'	353

Primername	Primersequenz	Fragmentlänge (bp)
Klf7	5'-ATG GCA CAG TGA CGT TGA AA-3' 5'-CTT AAA GGG CTT TGC ACC TG-3'	361
Lmo4	5'-CAT GTT CTA CCT GCC GGA AT-3' 5'-TAG CCC AGG TTC ATG GAG TC-3'	359
MGC18736	5'-TGC ACA TCA AAC GAG TCT CC-3' 5'-GGG TCT GTT TTG CAC TTG GT-3'	345
Nab2	5'-AGC GTT AAA GTG GAG GCA GA-3' 5'-CAG TTG CTC ACA CCA CTG CT-3'	376
Nfat5	5'-GG TCA AAC GAC GAG ATT GT-3' 5'-TGC AAC ACC ACT GGT TCA TT-3'	351
Nfatc1	5'-GGT GCT GTC TGG CCA TAA CT-3' 5'-CGT GGT GTG AAG AGG CTA CA-3'	392
Nfe2l2	5'-AGG ACA TGG AGC AAG TTT GG-3' 5'-CCG TCC AGG AGT TCA GAG AG-3'	396
Nr4a1	5'-ACA CCGT GAG AGT TTG ACA CC-3' 5'-AGG CCC TGA AGA AGC CTT AG-3'	379
Nucb2	5'-GAG GAC GAG ACT GGA TGA GC-3' 5'-TGG TCT TCG TGC TTC CTC TT-3'	353
RelB	5'-CCC CAC GCT CTT CAC TAT GT-3' 5'-GTC CGA TTC AGG ATG AGG AA-3'	358
Rbl2	5'-GTC ATG CCA CCT CAA AAC CT-3' 5'-CGT TGG CAA TAC CTT GGA CT-3'	390
Rbm6	5'-ACG AAG GCC AAG AGT CAA GA-3' 5'-ATG GTG GAT CAA GGT TCT GC-3'	353
Satb1	5'-CTT TGG AGC AGC AAG TTT CC-3' 5'-CTC TCA GTG GCA AGG GTA GC-3'	369
Sfpi1	5'-TGC AAA ATG GAA GGG TTT TC-3' 5'-GCT GGG GAC AAG GTT TGA TA-3'	370
Sin3b	5'-CTG TTC TTC TCG CAG CAG TG-3' 5'-CCA GCT CCA CTT CAC TAG GC-3'	375
Sox4	5'-AAG CAC ATG GCT GAC TAC CC-3' 5'-GGA GTC CGC ACC TTG TAG AC-3'	349

Primername	Primersequenz	Fragmentlänge (bp)
Stat1	5'-TTT CGT GAA CAA GCA ACA GG-3' 5'-TGC TTG ATC TGT GGC TTC AC-3'	329
Stat5b	5'-GTG GTT CAC CAT TGT TGC AG-3' 5'-TGT GTG CGT ACC CAA GAT GT-3'	378
Tcfec	5'-CCC GGG AGT TAG AAC ACA GA-3' 5'-TCC CAA AGG GGC ATA TTG TA-3'	356
Zfp361l	5'-GCC TGT AAG TAC GGG GAC AA-3' 5'-AAA AGG CGA AGG GGT TAT TG-3'	378
P2	AGTTGACAGCCCGAGTCCAGTCG	
P3	CAGAGGCAGATGGGAAATTG	
P4	GGAGATCCAGGGGTCTCTTC	

III.VI. Monoklonale Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoffen für FACS-Untersuchungen

Die monoklonalen Antikörper wurden von eBioscience, San Diego, CA, USA verwendet.

Spezifität	Markierung
anti-mouse CD11c	FITC/PE
anti-mouse CD40	FITC/PE
anti-mouse CD80	FITC/PE
anti-mouse CD86	FITC/PE
anti-mouse MHC class II (I-A/I-E)	PE

IV. Lebenslauf

Persönliche Informationen

Name	Mirja Behrens
Geburtsdatum	23.06.1979
Geburtsort	Peine
Nationalität	deutsch

Hochschulstudium

Mai 2006	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
März 2005	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
August 2002	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
August 2001	Ärztliche Vorprüfung
Oktober 1999 – Mai 2006	Studium der Humanmedizin (Medizinische Hochschule Hannover)

Schulbildung

Juli 1999	Abitur
1992 - 1999	Gymnasium Lehrte
1990 - 1992	Orientierungsstufe Lehrte Ost
1986 - 1990	Grundschule Sievershausen

Dissertation

Oktober 2002 – Mai 2006	„Differenzierung dendritischer Zellen aus hämatopoetischen Progenitorzellen – Expressionsanalyse von Transkriptionsfaktoren in der Zelllinie CR-1“ unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Christoph Klein (Abteilung für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, Medizinische Hochschule Hannover)
-------------------------	--

Ärztliche Tätigkeit

seit Juli 2006	Ärztin in Weiterbildung für Kinder- und Jugendmedizin Klinik und Poliklinik für Kinder und Jugendliche der Universität Leipzig
----------------	--

Praktisches Jahr

12.12.05 – 02.04.06	3. Block, Innere Medizin (Klinikum Minden)
22.08.05 – 11.12.05	2. Block, Pädiatrie (Medizinische Hochschule Hannover)
27.06.05 – 21.08.05	1. Block, 2. Hälfte, Allgemein- und Viszeralchirurgie (Université de Sherbrooke, Kanada)
02.05.05 – 26.06.05	1. Block, 1. Hälfte, Kinderchirurgie (Medizinische Hochschule Hannover)

Praktische Erfahrungen**Famulaturen**

26.07.04 – 09.08.04	HNO-Heilkunde (Praxis Dr. W. Prechtel, Hannover)
11.08.03 – 11.09.03	Pädiatrie (Medizinische Hochschule Hannover)
17.03.03 – 31.03.03	Pädiatrie (Praxis G. Kersten, A. Donert & Dr. I. Schlotfeldt-Schäfer, Lehrte)
01.09.02 – 01.10.02	Viszeral- und Gefäßchirurgie (University of Brescia, Italien)
25.02.02 – 25.03.02	Innere Medizin (Krankenhaus Lehrte der Region Hannover)

Nebentätigkeiten

2003 - 2006	Studentische Hilfskraft (Cytonet GmbH & Co.KG, Hannover)
2000 - 2004	Pflegerische Aushilfstätigkeit (Krankenhaus Lehrte der Region Hannover)

Wissenschaftliche Publikation

Maecker, B., Mougialakos, D., Zimmermann, M., Behrens, M., Hollander, S., Schrauder, A., Schrappe, M., Welte, K., and Klein, C. (2006). Dendritic cell deficiencies in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients. *Leukemia*.

V. Erklärung nach § 2 Abs. 2 Nrn. 5 und 6 der Promotionsordnung der Medizinischen Hochschule Hannover

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel „Differenzierung dendritischer Zellen aus hämatopoetischen Progenitorzellen – Expressionsanalyse von Transkriptionsfaktoren in der Zelllinie CR-1“ in der Abteilung für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie der Medizinischen Hochschule Hannover unter Betreuung von Frau Dr. B. Maecker, Herrn Dr. C. Rathinam und Herrn Prof. Dr. Dr. C. Klein mit der Unterstützung durch Frau H. Nivarthi ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

Hannover, den 05.12.2006

Mirja Behrens