

Identifizierung intrazellulärer Signalwege bei der Differenzierung humaner hämatopoetischer Stammzellen zu myeloiden Dendritischen Zellen

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften**

vorgelegt beim Fachbereich 14
Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von Matthias Hamdorf
aus Villingen

Frankfurt a. M. 2007
(D 30)

Vom Fachbereich 14 Biochemie, Chemie und Pharmazie der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:.....Prof. Dr. Harald Schwalbe

Gutachter:.....Prof. Dr. Bernd Ludwig

Gutachter:.....Prof. Dr. Klaus Cichutek

Datum der Disputation:

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	6
1.1 Hämatopoese	6
1.1.1 Die humane hämatopoetische Stammzelle	6
1.1.2 Quelle humaner hämatopoetischer Stammzellen.....	8
1.1.3 Humane Hämatopoetische Zytokine.....	9
1.2 Intrazelluläre Signalwege bei der Hämatopoese	12
1.2.1 Die Mitogene Signalkaskade	12
1.2.1.1 Die extrazellulär Signal-regulierte Kinase-Kaskade (ERK-Kaskade) .	14
1.2.1.2 JNK und p38/MAP-Kinasen	14
1.2.2 Proteinkinase C (PKC).....	15
1.2.3 Der JAK-STAT-Signalweg	17
1.2.4 Transkriptionsfaktoren bei der Hämatopoese.....	19
1.2.4.1 Die Rolle des Transkriptionsfaktor PU.1 bei der Hämatopoese	20
1.3 Dendritische Zellen (DC)	23
1.3.1 Die Reifung und Diversität der Dendritischen Zellen.....	25
1.3.2 Antigenprozessierung und Antigenpräsentation.....	28
1.4 Ziel der Arbeit	30
2. Material und Methoden	31
2.1. Methoden der Molekularbiologie.....	31
2.1.1. Verwendete Plasmide	31
2.1.2. Oligonukleotide	32
2.1.3. Herstellung kompetenter Bakterien nach der CaCl ₂ -Methode	34
2.1.4. Transformation von kompetenten Bakterien.....	35
2.1.5. Präparationen von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen.....	36
2.1.6. Photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren	36
2.1.7. Restriktion von Plasmid-DNA	37
2.1.8. Agarose-Gelelektrophorese	37
2.1.9. Ligation	38
2.1.10. Präparation von Total-RNA und die Herstellung von cDNA.....	38
2.1.11. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	39
2.1.12 Klonierung des Expressionsplasmids pIRES2-HA-PU.1-EGFP und pHis-GATA-1	41
2.1.13 Klonierung des Reporterplasmids pPU.1-Luc Reporter und pGATA-1-Luc Reporter	42
2.2 Methoden der Zellbiologie	43
2.2.1 Verwendete Zelllinien	43
2.2.2 Kultivierung von Zelllinien.....	44
2.2.3 Expansion von humanen hämatopoetischen Stamm- / Progenitorzellen (HSC)	44
2.2.4 Differenzierung von Dendritischen Zellen aus CD34 ⁺ -Zellen (HSC).....	45
2.2.5 „Colony forming assay“ Progenitorzell-Assay	45
2.2.6 Aufreinigung primärer Monozyten aus peripherem Blut.....	46
2.2.7 Zellstimulatoren und -inhibitoren	47

2.2.8	Transiente Transfektion von ädhärenten Zellen.....	48
2.2.9	Durchflußzytometrie (Fluorescence-Activated Cell-Sorting: FACS).....	49
2.2.9.1	Analyse der Expression von Oberflächenantigenen durch Antikörpermarkierung.....	50
2.3	Methoden der Proteinbiochemie.....	51
2.3.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	51
2.3.2	Zellyse.....	52
2.3.3	Immunpräzipitation.....	53
2.3.4	Dephosphorylierung von Proteinen mit Calf Intestinal Phosphatase (CIP)	54
2.3.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	54
2.3.6	Western Blot-Analyse	55
2.3.7	May-Grünwald-Giemsa-Färbung (Pappenheim-Färbung).....	58
2.3.8	Immunfluoreszenzfärbung	60
2.3.9	Zytokin-Array und Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	60
2.3.10	Luciferase-Assay	61
2.3.11	<i>In vitro</i> Kinase-Assay	62
3.	Ergebnisse	65
3.1	Etablierung des Expansionsprotokolls für humane hämatopoetische Stammzellen (HSCs, CD34 ⁺ Zellen).....	65
3.1.1	Morphologische Charakterisierung.....	65
3.1.2	Analyse der Expansion (verschiedene Zytokinkombinationen).....	66
3.1.3	Charakterisierung der expandierten Zellen durch spezifische Oberflächenmarker	67
3.2	Etablierung des Differenzierungsprotokolls für humane Dendritische Zellen (DCs)	68
3.2.1	Morphologische Charakterisierung der Dendritischen Zellen	68
3.2.2	Nachweis von MHC II und Aktivierungsmarkern auf Dendritischen Zellen durch Immunfluoreszenz.....	69
3.2.3	Überprüfung dendritenspezifischer Genexpressionsmarker	71
3.2.4	Charakterisierung der differenzierten humanen Dendritischen Zellen durch Oberflächenmarker	72
3.2.5	Aktivierung der differenzierten Dendritischen Zellen durch Antigenkontakt	74
3.3	Identifizierung intrazellulärer Signalkaskaden bei der Differenzierung von HSCs zu DCs.....	75
3.3.1	Aktivierung der intrazellulären Mitogenen Signalkaskade durch GM-CSF und IL-4	76
3.3.2	Aktivierung der Januskinasen und STAT-Transkriptionsfaktoren durch GM-CSF und IL-4.....	77
3.3.3	Aktivierung der Protein Kinase C δ durch GM-CSF und IL-4	79
3.3.4	Vergleich der untersuchten Signalwege in HSCs mit akut myeloiden Leukämiezelllinien	79
3.3.5	Aktivierung von ERK und PKC δ und die Induktion dendritischer Zelldifferenzierung durch Stimulation der HSC mit dem Phorbol-ester TPA.....	80
3.4	Rolle spezifischer Signalwege bei der Differenzierung von HSCs	81
3.4.1	Wirksamkeits- und Dosisanalyse des PKC Inhibitors Gö 6983.....	82
3.4.2	Wirksamkeits- und Dosisanalyse des MEK Inhibitors U0126	83

3.4.3 Hemmung der durch TPA induzierten Differenzierung von HSC durch PKC und ERK Inhibitoren	83
3.4.4 Einfluß signalwegspezifischer Inhibitoren auf die Differenzierung von HSCs (colony forming assay)	85
3.5 Regulation des essentiellen myeloiden Transkriptionsfaktors PU.1 bei der Differenzierung von HSCs zu DCs durch ERK und PKC δ	87
3.5.1 Regulation von PU.1 durch die Mitogene Signalkaskade ERK und PKC δ	88
3.5.2 Expression von PU.1 in verschiedenen Zelllinien und in CD34 ⁺ hämatopoetischen Stammzellen.....	88
3.5.3 Analyse der Expression von HA-PU.1	89
3.6 PU.1 als Phosphoprotein	90
3.6.1 Untersuchung einer möglichen Phosphorylierung von PU.1.....	90
3.6.2 Analyse der <i>in vitro</i> Phosphorylierung von PU.1 durch PKC δ , ERK2 und CKII	92
3.6.3 Konstruktion eines PU.1 Reporterplasmids zur Analyse der PU.1 Aktivität <i>in vivo</i>	95
3.6.4 Inhibitorische Interaktion zwischen PU.1 und GATA-1.....	96
3.6.5 Inhibition der PU.1 Transaktivierung durch siRNA vermittelte Expressionsverringerng von PKC δ , ERK und PU.1	98
4. Diskussion	101
4.1 Expansion humaner hämatopoetischer Stammzellen	101
4.2 Etablierung der myeloiden dendritischen Zelldifferenzierung aus humanen hämatopoetischen Stammzellen.....	103
4.3 Charakterisierung intrazellulärer Signalwege bei der Differenzierung von HSCs	105
4.4 Modulation der Differenzierung durch Blockierung der beobachteten Signalwege.....	108
4.5 Analyse der molekularen Aktivierungsmechanismen von PU.1 durch PKC δ und ERK.....	111
5. Zusammenfassung	116
6. Literaturverzeichnis.....	118
7. Abkürzungsverzeichnis	139

1. EINLEITUNG

1.1 Hämatopoese

Der Begriff Hämatopoese leitet sich von den griechischen Worten $\eta\alpha\iota\mu\alpha\tau\omicron\varsigma$ (haimatos)-Blut und $\pi\omicron\iota\epsilon\sigma\iota\varsigma$ (poiesis)-Herstellung ab. Sie ist der medizinische Begriff für die Bildung und Reifung der Blutzellen im Knochenmark und somit für deren lebenslange Bildung aus langzeitrepopulierenden hämatopoetischen Stammzellen (HSC) verantwortlich. Viele der gebildeten Effektorzellen weisen nur eine sehr kurze Lebensspanne von mehreren Stunden bis Tagen auf. Beim erwachsenen Menschen müssen täglich 1×10^{12} Blutzellen neu gebildet werden, was eine strikte Regulation durch stimulatorische und inhibitorische Signale voraussetzt. Unter dem Einfluß von Wachstumsfaktoren (Zytokinen) reifen innerhalb von wenigen Stunden bis zu ca. 10 Tagen die unterschiedlichen Zellen des Blutsystems heran (Heckner and Freund 2001), (Theml 2002).

Beim gesunden erwachsenen Menschen findet die Hämatopoese hauptsächlich im roten Knochenmark statt, welches sich aus dem Schädel, den Rippen, dem Becken und den Epiphysen der Ober- und Unterschenkelknochen und der Wirbelsäule zusammensetzt. Das Knochenmark zeichnet sich durch für Ansiedlung, Proliferation und Ausreifung hämatopoetischer Zellen speziell geeignete Mikronischen, das Knochenmarkstroma, aus. Das Knochenmarkstroma besteht aus sieben verschiedenen Typen stromaler Zellen: Osteoblasten und Osteoklasten (knochenauf- und abbauende Zellen), Fettzellen, Bindegewebszellen (Fibroblasten), Knochenmarksmakrophagen, glatte Muskelzellen, sowie Gefäßendothelien und extrazelluläre Matrix (Mazo and von Andrian 1999), (Chan and Watt 2001). Die hämatopoetischen Zellen vermehren sich extravaskulär im Stroma und passieren erst nach Ausreifung die Wand der Knochenmarksgefäße.

1.1.1 Die humane hämatopoetische Stammzelle

Die Ahnenreihe der Blutzellen im Knochenmark beginnt mit sogenannten pluripotenten, undifferenzierten hämatopoetischen Stammzellen (HSC). Diese können durch die Expression des Oberflächenmarkers CD 34 nachgewiesen werden und werden daher auch als $CD34^+$ Zellen bezeichnet. Aus einer relativ kleinen Zahl dieser sich nur langsam teilenden Stammzellen gehen alle Generationen der Erythropoese, Leukopoese u. Thrombopoese hervor. Diese pluripotenten Stammzellen werden auch als CFU (colony forming units) bezeichnet, weil sie bei Transplantation in andere Gewebe Kolonien von sog. determinierten Vorläuferzellen

bilden. Durch asymmetrische Zellteilung entstehen neue Stammzellen, sowie definierte Progenitoren der lymphoiden und myeloiden Reihe (Abb. 1.1). Dieser Prozeß ist nach der heutigen Vorstellung stochastisch zufällig und setzt sich auf der Ebene der Progenitoren entsprechend fort (Huang, *et al* 1999). Stammzellen und Progenitoren sind durch morphologische Merkmale nicht voneinander zu unterscheiden. Je weiter Proliferation und Ausreifung voranschreiten, desto stärker ist die Zelle auf einen bestimmten Zelltyp festgelegt, zu dem sie ab einer gewissen Stufe endgültig ausdifferenziert. Die Zellproliferation nimmt mit zunehmender Ausreifung der Zellen ab und führt schließlich zur Bildung spezialisierter, nicht mehr teilungsfähiger Effektorzellen (Abb. 1.2). Zellen der lymphoiden Reihe reifen dabei zu T- und B-Lymphozyten sowie natürlichen Killer-Zellen (NK-) heran, während aus myeloiden Vorläuferzellen, sowohl Erythrozyten als auch Thrombozyten, Monozyten und Granulozyten werden können (Abb. 1.1) (Heckner and Freund 2001), (Theml 2002).

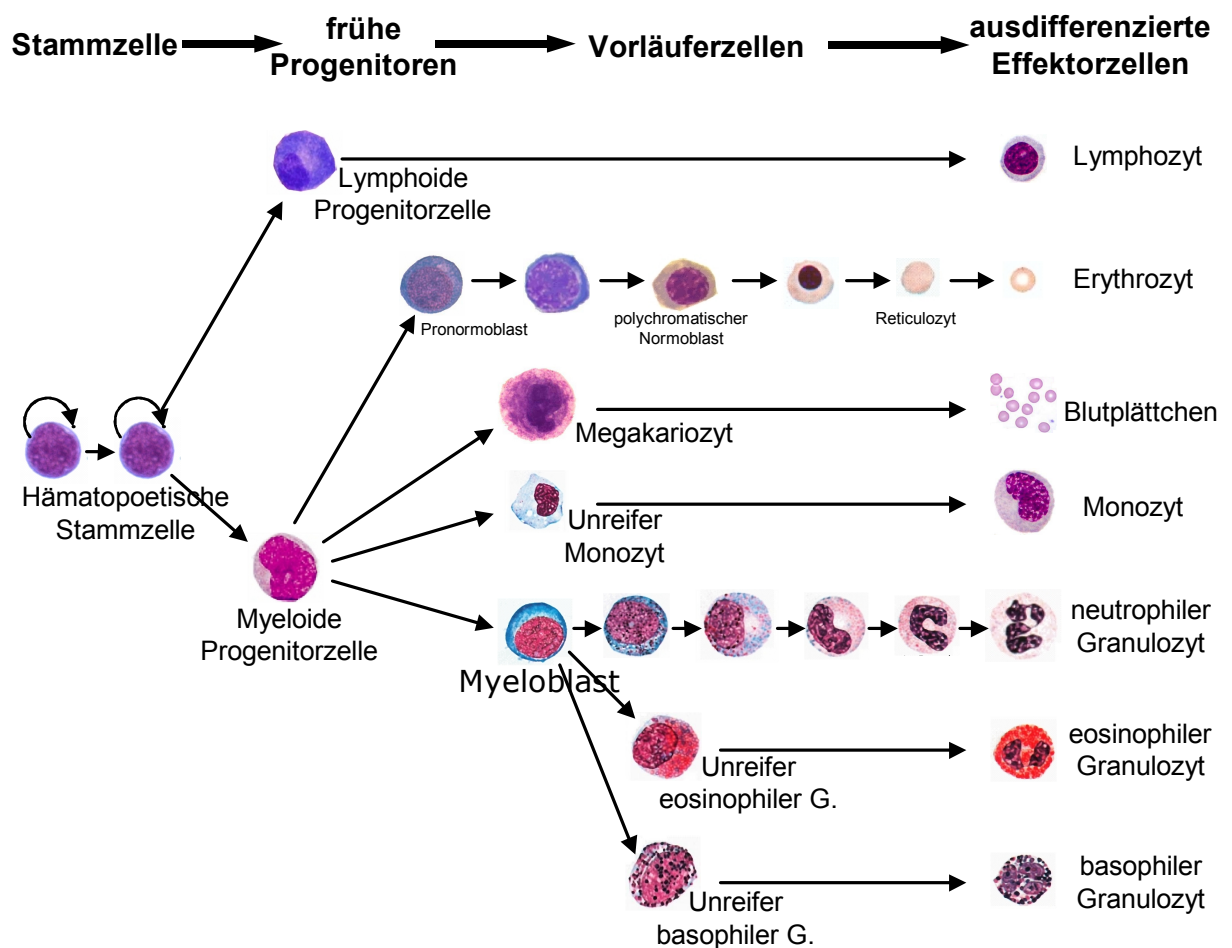


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Hämatopoese. Ausgehend von einer pluripotenten Stammzelle differenzieren die Zellen in Richtung lymphatischer oder myeloischer Reihe bis zur reifen Bluteffektorzelle.

Zytokine und Wachstumsfaktoren fördern die Ausreifung bzw. verhindern die Apoptose spezifischer Zellreihen. Nicht benötigte, aus dem stochastischen Prozeß resultierende Zellen durchlaufen den Vorgang der Apoptose (Ogawa 1993).

Die hämatopoetischen Stammzellen zeigen drei besondere Eigenschaften. Sie haben eine auf etwa 50 Zellteilungen begrenzte Fähigkeit zur Selbstreproduktion, ein breites Differenzierungspotential und sie befinden sich durch langsame Zellteilung lange Zeit in einem ruhenden Stadium des Zellzykluses. Diese Fähigkeiten verlieren sie allmählich im Zuge der Differenzierung zur hämatopoetischen Vorläuferzelle (Abb. 1.2).

Sowohl zufällige intrinsische molekulare Ereignisse als auch induzierende exogene Ereignisse, wie z. B. die Stimulation durch hämatopoetische Wachstumsfaktoren, fördern und bestimmen das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung der Zellen.

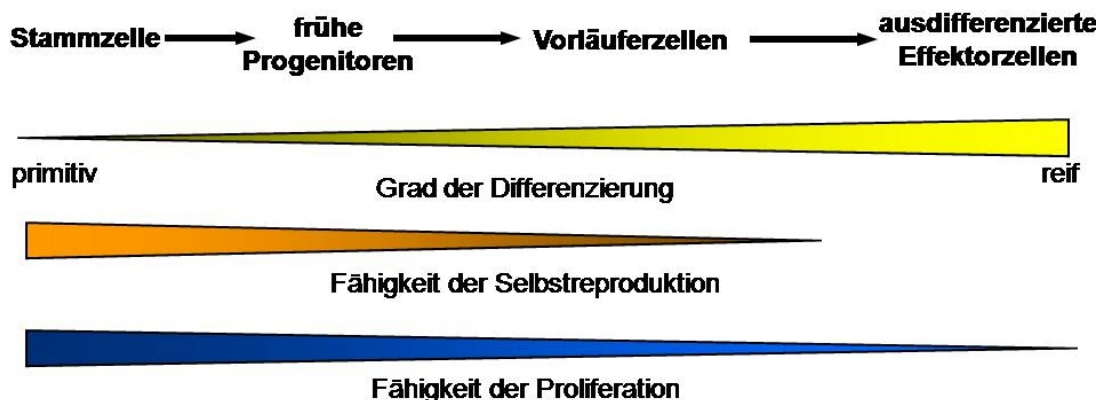


Abbildung 1.2: Gegenläufige Regulation von Proliferation und Differenzierung. Die Fähigkeit der Selbstreproduktion verhält sich gegenläufig zum Grad der Differenzierung. Die Fähigkeit der Proliferation nimmt im Laufe der Differenzierung der Zellen ab. Reife Effektorzellen haben diese Fähigkeit verloren.

Modifizierte Abbildung nach HemoGenix (<http://www.hemogenix.com/stemCellsBloodForming.htm>)

Die Plastizität von hämatopoetischen Stammzellen ist bis zum heutigen Tag umstritten und kontrovers diskutiert. In der Literatur finden sich Hinweise auf eine mögliche Reprogrammierbarkeit der Zellen und somit die Differenzierung in nicht-hämatologische Linien (Transdifferenzierung), wie z. B. Muskelzellen (Herzmuskel) (Korbling and Estrov 2003). Die Beobachtung der Transdifferenzierung zu Kardiomyozyten konnte mittlerweile jedoch widerlegt werden (Murry, *et al* 2004), (Nygren, *et al* 2004).

1.1.2 Quelle humaner hämatopoetischer Stammzellen

Als Stammzellquelle für fremdgespendete, also nicht eigene (= allogene) Stammzelltransplantate, diente bisher das Knochenmark (KM) von verwandten oder nicht-verwandten Spendern, welches durch eine Biopsie gewonnen wird. Durch Mobilisierung der Stammzellen mit den Wachstumsfaktoren (siehe Kapitel 1.1.3) GM-CSF oder G-CSF, d. h. durch Ausschwemmen der Zellen aus dem Knochenmark

in das Blut des Spenders, können seit einiger Zeit Stammzellen aus dem peripheren Blut (PB) gewonnen werden (Andrews, *et al* 1999), (Wagers, *et al* 2002). Im Falle beider Verfahren müssen immunologisch passende Spender gefunden werden, deren Transplantationsantigene (HLA-Proteine) zu denen des Empfängers passen, da es sonst zu schweren Abstoßungsreaktionen kommt (graft-versus-host-disease, abgekürzt GVHD). Obwohl weltweit mehr als 5,5 Millionen Freiwillige in Knochenmarkspender-Dateien (<http://www.dkms.de>) registriert sind, haben auch Patienten mit einem der häufigsten HLA-Merkmalen nur eine ca. 80%ige Chance, einen passenden HLA-Fremdspender zu finden (Oudshoorn, *et al* 1997). Weniger als die Hälfte der Patienten, für die ein Spender gefunden wurde, erhalten tatsächlich ein Transplantat (McNiece and Briddell 2001).

Nabelschnurblut (Synonym: Plazentarestblut) hat sich seit der ersten erfolgreichen Transplantation im Jahr 1988 neben Knochenmark und peripherem Blut als weitere Quelle für hämatopoetische Stammzellen etabliert (Gluckman, *et al* 1989), (Cairo and Wagner 1997). Eine Einschränkung des Einsatzes von Plazentarestblut-Transplantaten für erwachsene Patienten ist die begrenzte Anzahl an CD34⁺ Zellen. Die *ex-vivo* Expansion hämatopoetischer Stammzellen (HSCs, CD34⁺) stellt daher eine der wichtigsten Herausforderung für die Transplantation und Untersuchung von CD34⁺ Zellen aus diesen Ressourcen dar. Die maximale Anzahl der Zellen aus einer Nabelschnur beträgt dabei bei optimalen Bedingungen 3×10^6 Zellen. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde ein vielfaches dieser Zellzahl benötigt. Aus diesem Grund wurde zu Beginn der Arbeit ein geeignetes Expansionsprotokoll für HSCs etabliert. Als Grundlage für das Protokoll dienten die Untersuchungen von Zandstra *et al.* (Zandstra, *et al* 1998) und Heike *et al.* (Heike and Nakahata 2002). Die Literatur favorisiert dabei drei verschiedene Zytokinkombinationen, die jeweils zur Expansion von CD34⁺ Zellen führen. Alle drei Kombinationen wurden in dieser Arbeit untersucht und eine bestimmte Zytokinkombination für die späteren Untersuchungen angewandt.

1.1.3 Humane Hämatopoetische Zytokine

Zytokine haben als extrazelluläre Botenstoffe die Aufgabe, das Immunsystem zu koordinieren, und sind darüber hinaus für viele Differenzierungsvorgänge, wie z. B. für die Hämatopoese unerlässlich. Zytokine binden an spezifische Rezeptoren auf der Membranoberfläche ihrer Zielzellen und lösen über eine intrazelluläre Signaltransduktionskaskade eine zytokin- und zellspezifische Reaktion aus. Das Zytokinnetzwerk wird geprägt durch eine Vielzahl von verschiedenen Regulationsmöglichkeiten und einer engen Verknüpfung verschiedener Zytokinsysteme. Interaktion und Regulation findet auf der Ebene der Zytokine, der Rezeptoren und der intrazellulären Signaltransduktionsmoleküle statt. Dadurch entsteht ein Netzwerk, das unterschiedliche Zellen und Gewebe befähigt, koordiniert auf Außensignale zu reagieren (Kaushansky 2006).

Seit Mitte der 80er Jahre wurden mithilfe moderner molekularbiologischer Methoden zahlreiche hämatopoetische Wachstumsfaktoren entdeckt. Sie lassen sich heute auch gentechnisch *in vitro* in größeren Mengen herstellen. Die Regulation der Hämatopoese wird durch diese verschiedenen hämatopoetischen Wachstumsfaktoren, Zytokine und Chemokine gesteuert, die *in vivo* von stromalen Zellen des Knochenmarks oder anderen akzessorischen Zellen sezerniert werden. Hämatopoetische Wachstumsfaktoren, die „colony stimulating factors“ (CSF) üben einen stimulierenden Effekt auf Differenzierung und Proliferation der Blutzellen aus. Es sind kleine Peptide, die als parakrine Hormone unter anderem aus den Makrophagen des Knochenmarks freigesetzt und vor Ort wirksam werden. Die entstehenden Vorläuferzellen werden je nach ihrer Determinierung als „blast forming unit - erythroid“ (BFU-E), „colony forming unit - granulocyte macrophage“ (CFU-GM) und „colony forming unit – megacariocyte“ (CFU-Meg) bezeichnet (Abb. 1.3). Bei den verschiedenen Schritten der Determinierung wirken die Wachstumsfaktoren G-CSF, M-CSF sowie die Interleukine IL-3 und IL-5 stimulierend. Viele der Zytokine sind für die linienspezifische Ausdifferenzierung der Zellen verantwortlich. Modellhaft findet die Bildung in drei „Pools“ statt, dem Proliferationspool, dem Reifungspool und dem Funktionspool (Blut). Die Lymphozytenbildung erfolgt aus den pluripotenten Stammzellen unter Einwirkung von Interleukin-2 (IL-2) und Thymopoetin in den lymphatischen Organen (Leber, Milz, Lymphknoten).

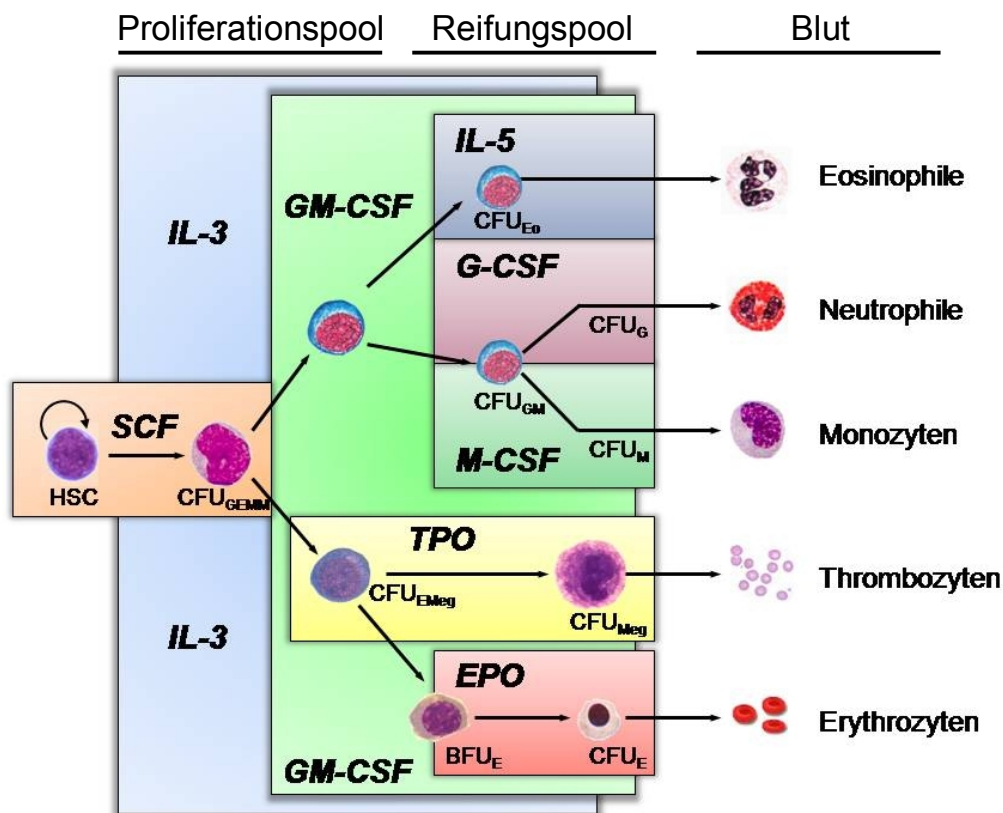


Abbildung 1.3: Regulation der Hämatopoese durch spezifische Zytokine. Verschiedene Faktoren wirken auf die linienspezifische Ausdifferenzierung der hämatopoetischen Zellen. HSC = hematopoetic stem cell, SCF = stem cell factor, IL-3 = Interleukin 3, IL-5 = Interleukin 5, TPO = Thrombopoetin, EPO = Erythropoetin, CSF = colony-stimulating factor, CFU = colony forming unit. Modifizierte Abbildung aus Roche Lexikon Medizin, 5. Aufl. (Zink 1997).

Einer der ersten für die primitiven hämatopoetischen Zellen wichtigen entdeckten Faktoren ist der „*stem cell factor*“ (*SCF*) (McNiece and Briddell 1995), (Broudy 1997). Er ist für die normale Hämatopoese unabdingbar. Im Mausmodell zeigte sich, daß Mäusen, denen entweder *SCF* oder sein Rezeptor (*c-kit*) fehlt, als Föten pränatal sterben. Die Neutralisation von *SCF* und Blockierung des *c-kit*-Rezeptors in erwachsenen Mäusen verursacht Panzytopenie, also die Verminderung von Blutzellen im Blut, und verringert die Zellularität im Knochenmark. Dies legt die Notwendigkeit der konstitutiven Expression von *SCF* durch Endothelzellen und Fibroblasten im Knochenmark nahe (Broudy 1997). *SCF* alleine ist jedoch nicht in der Lage, Stammzellen *in vitro* am Leben zu halten, oder die Zellen zur Proliferation anzuregen. Es sind daher weitere Faktoren für die Homöostase sowie die Proliferation der Stammzellen notwendig. Ein weiterer Faktor, der Wirkung auf die frühen Progenitorzellen zeigt, ist der Ligand der Rezeptortyrosinkinase *flt3/flk2* (*Flt-3 ligand*). Er weist eine strukturelle Homologie mit *SCF* auf. Die Rezeptoren der Zytokine gehören beide zu der PDGF-Rezeptor („receptors for platelet-derived growth factor“) Superfamilie. Für den *Flt-3*-Rezeptor konnte gezeigt werden, daß er nur auf den primitiven, *CD34*-exprimierenden Zellen vorhanden ist. Sein Ligand *Flt-3 ligand* treibt die primitiven *CD34*⁺ Zellen in die Zellproliferation (Haylock, *et al* 1997). Die Eliminierung des Zytokins oder des dazugehörigen Rezeptors führt zu einer defekten Hämatopoese (McKenna, *et al* 1995) und einer Reduktion der langzeitrepopulierenden hämatopoetischen Stammzellen um das Fünffache (Yonemura, *et al* 1997). Wie *SCF* hat *Flt-3 ligand* alleine geringe proliferative Aktivität auf Stamm- und Progenitorzellen, wirkt aber synergistisch mit einer breiten Auswahl anderer Faktoren (Lyman 1998), (Dooley, *et al* 1997).

Ein weiteres früh wirkendes Zytokin ist das Thrombopoetin (*TPO*). Es gilt primär als Regulator der Megakaryopoese, d. h. es stimuliert die Reifung der Megakaryozyten und die damit verbundene Bildung funktioneller Blutplättchen (Abb. 1.3). *TPO* übt jedoch auch auf primitiven hämatopoetischen Zellen deutliche Effekte aus und veranlaßt diese beschleunigt in den Zellzyklus einzutreten. Damit unterstützt es deren Überleben und Proliferation (Kaushansky 1998), (Murray, *et al* 1999).

Für die Differenzierung von Erythrozyten wird das Zytokin Erythropoetin (*EPO*) benötigt (Bociek and Armitage 1996). Die Stimulation der myeloiden Progenitorzellen mit *EPO* führt zur Teilung der Progenitorzellen des Typs BFU-E (burst forming unit - erythroid), die zunächst zu den reiferen Progenitorzellen des Typs CFU-E (colony forming unit erythroid) und schließlich zu Erythrozyten ausdifferenzieren (Abb. 1.3) (Watkins, *et al* 1986), (Watowich 1999). So werden im Durchschnitt beim Erwachsenen circa 200 Milliarden Erythrozyten pro Tag gebildet. Zusätzlich wirkt *EPO* bei der Differenzierung der Progenitorzellen als Apoptosehemmer und stimuliert in geringem Maße auch die Bildung von Megakaryozyten. Akute und chronische Insuffizienzen infolge degenerativer Erkrankungen der Niere führen zu verminderten *EPO*-Bildung und damit zur renalen Anämie (Lappin, *et al* 2002).

Ein weiterer Faktor der Hämatopoese ist Interleukin 3 (*IL-3*). Es regt nicht nur die Thrombozytenbildung an, sondern fördert wie der genannte Stammzellfaktor (*SCF*)

auch unspezifisch die Teilung unreifer Vorläufer der verschiedensten Blutzellen (Ogawa, *et al* 1997), (Kobayashi, *et al* 1991).

1.2 Intrazelluläre Signalwege bei der Hämatopoese

Zu dem komplexen System, mit dem Zellen auf Signale von Außen reagieren, zählen neben Rezeptoren der Zellmembran und intrazellulären Rezeptorproteinen auch Proteinkinasen und -phosphatasen, GTP-bindende Proteine und eine Vielzahl weiterer Proteine, die mit anderen Signalproteinen in Wechselwirkung treten. Um Zellen zum Wachstum oder zur Differenzierung anzuregen, müssen relativ kurzlebige Ereignisse in der näheren Umgebung der Zellmembran in länger dauernde Signale verwandelt werden. Die von Wachstumsfaktoren ausgehenden Signale werden von der Zelloberfläche zum Zellkern übertragen, wo durch Aktivierung der Transkription spezifischer Gene die Ausreifung und das Wachstum der Zellen angeregt wird. Dieser als Signaltransduktion bezeichnete Prozess besteht aus mehrfach in Serie geschalteten Kaskaden von Phosphorylierungs- bzw. Acetylierungsschritten. Die Signaltransduktionswege sind stark verzweigte Stoffwechselwege mit Überkreuzungen und Überlappungen, so daß ein gewisses Maß an Redundanzen besteht. Auf jeder Stufe können Zusatzinformationen einfließen, die den Informationsfluss modulieren. Bei der häufigsten Form der Signaltransduktion werden energiereiche Phosphatgruppen vom biologischen Energiespeicher ATP (Adenosintriphosphat) auf Tyrosin-, Threonin- oder Serinreste intrazellulärer Substratproteine z.B. Transkriptionsfaktoren übertragen, die in anhängigen, späteren Schritten der Signaltransduktion eine Rolle spielen. Für diese Übertragung ist die Enzymklasse der Kinasen notwendig. Unter der großen Gruppe der Proteinkinasen hat in der letzten Zeit die evolutionär hochkonservierte Familie der sogenannten "Mitogen-aktivierten Proteinkinasen" (MAP Kinasen, MAPK) eine besondere Bedeutung erlangt (Joneson, *et al* 1998), (Widmann, *et al* 1999), (Lewis, *et al* 2000) und nehmen bei der Regulation von Zelldifferenzierungs- und Proliferationsvorgängen eine zentrale Stellung ein (Platanias 2003).

1.2.1 Die Mitogene Signalkaskade

MAP-Kinase (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) Kaskaden finden sich in allen eukaryotischen Zellen. Sie bestehen aus einem Modul von Enzymen, die nacheinander geschaltet sind und die von der Membran ankommenden extrazellulären Signalen zum Zellkern leiten (Lewis, *et al* 1998). Hier werden die Signale in Form einer veränderten Genexpression umgesetzt, welche Einfluß auf den Stoffwechsel und das Schicksal der Zelle nimmt. Die MAP-Kinasen kontrollieren

fundamentale Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Überleben und Apoptose der Zelle.

MAP-Kinasen sind Serin/Threonin-spezifische Proteinkinasen, die selbst durch Threonin- und Tyrosinphosphorylierung reguliert werden. Es sind bisher drei Untergruppen bekannt. Zu diesen gehören die ERK1/2 (extrazellulär Signal-regulierte Kinasen), die p38-Kinasen und die JNK (c-Jun-N-terminale Kinasen)/ SAPK (Stress-aktivierte Proteinkinasen).

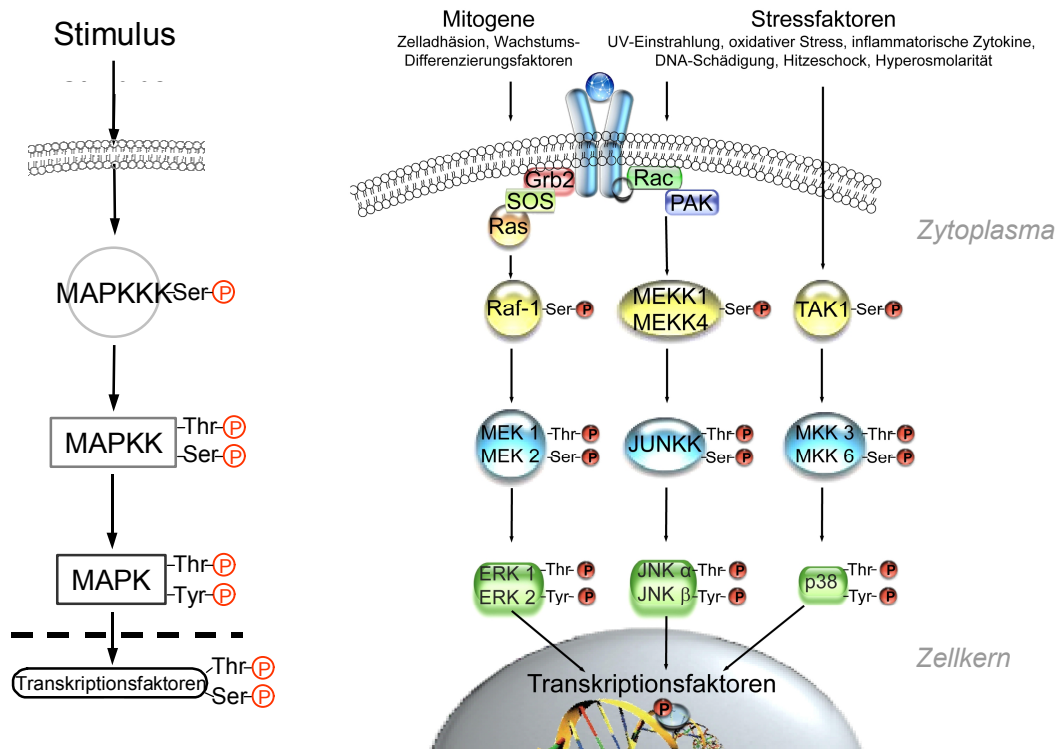


Abbildung 1.4: Die MAP-Kinase Kaskaden

Die MAP Kinasen setzen sich aus Modulen mit 3 nacheinander geschalteten Kinasen zusammen. Sie leiteten extrazelluläre Signale in das Zytoplasma und in den Zellkern weiter. Bei der ersten Kinase handelt es sich um die MAP Kinase Kinase Kinase (MAPKKK) darauf folgt die MAP Kinase Kinase (MAPKK) und am Ende der Kaskade steht die MAP Kinase (MAPK). Zu den MAP Kinasekaskaden zählt die ERK -, die JNK - und die p38 Kinasekaskade.

Die Organisation der MAPK-Signaltransduktionskette besteht nach heutigen Vorstellungen aus einem Modul von drei Kinasen. Die an der Spitze der Kaskade stehende MAPKKK (MAP-Kinase Kinase Kinase) phosphoryliert die ihr nachgeschaltete MAPKK und diese aktiviert wiederum die am Ende der Kette stehende MAPK (Abb. 1.4 linke Seite), die in den Zellkern wandert und Transkriptionsfaktoren aktiviert. Eine Störung in einer der MAPK-Signalwege in hämatopoetischen Stammzellen resultiert in der Regel mit einer Entartung der Hämatopoese (Milella, *et al* 2003), (Platanias 2003).

1.2.1.1 Die extrazellulär Signal-regulierte Kinase-Kaskade (ERK-Kaskade)

Die nacheinander geschalteten Kinasen des ERK-Moduls sind Raf (MAPKKK), MEK1/2 (MAPKK) und ERK1/2 (MAPK). Sie wird unter anderem durch Zelladhäsion, Wachstums- und Differenzierungsfaktoren induziert. An oberster Stelle der Kaskade steht das Protoonkogen Raf, eine Serin/Threonin-spezifische Kinase, die MEK1/2 (MAPK/ERK Kinase) an einem dieser beiden Reste phosphoryliert (Kyriakis, *et al* 1992). Die dualspezifischen Kinasen MEK1/2 übertragen wiederum im nächsten Schritt jeweils einen Phosphatrest auf Threonin- und Tyrosinreste (Thr-x-Tyr-Motiv) von ERK1/2 (Dhanasekaran and Premkumar Reddy 1998). MEK1/2 arbeiten hoch selektiv und aktivieren nur ERK1/2 (English, *et al* 1999). Bei ERK1 (p44) und ERK2 (p42) handelt es sich um zwei Isoformen, die sich in ihrem Molekulargewicht unterscheiden. Bis heute sind noch 2 weitere Isoformen von ERK1 beschrieben worden. Es handelt sich um ERK1b, welches spezifisch in Herzmuskelzellen exprimiert wird (Yung, *et al* 2000) und ERK1c, das in einer Vielzahl von unterschiedlichen Zellen und Geweben exprimiert wird, dessen Expression jedoch deutlich geringer ist als die von ERK1 (Aebersold, *et al* 2004). ERK hat verschiedene Substrate im Zytosol und transloziert auch in den Zellkern, um dort Transkriptionsfaktoren wie z. B. Elk-1, c-Myc und p90RSK zu aktivieren (Schenk and Snaar-Jagalska 1999), (Davis 1995). Die aktivierte Kaskade reguliert Proliferation, Differenzierung und das Überleben der Zelle (Galabova-Kovacs, *et al* 2006) (Abb. 1.4). Über die Funktion von ERK in der Hämatopoese ist bis heute nur sehr wenig bekannt. ERK-Aktivierung ist dabei bei der Differenzierung von Megakaryozyten beobachtet worden (Miyazaki, *et al* 2001). In verschiedenen akuten myeloiden Leukämiezelllinien z. B. K-562 wurde beobachtet, daß ERK-Aktivierung an der durch Hemin induzierten Erythroblastenbildung beteiligt ist (Woessmann and Mivechi 2001), (Kucukkaya, *et al* 2006). In verschiedenen anderen hämatologischen Erkrankungen wurden Veränderungen in der ERK Aktivität und dessen antiapoptotischer Wirkung beobachtet (Milella, *et al* 2003), (Platanias 2003).

1.2.1.2 JNK und p38/ MAP-Kinasen

Neben der klassischen ERK/MAP-Kinase gibt es noch die c-Jun-NH₂-terminale Kinasen (JNK oder auch SAPK genannt) und die p38-Kinasen. Auch diese sind in einem kaskadenartigen Modell mit dem gleichen Grundmodul organisiert, wie die schon vorgestellte ERK-Signalübertragungskette. Diese beiden Kinasen werden in erster Linie durch inflammatorische Zytokine wie IL-1 und TNF- α (Aggarwal, *et al* 2006) oder durch chemischen und physikalischen Streß wie bakterielle Endotoxine, Arsenit, Anisomycin, H₂O₂, osmotischer Streß, Hitze-Schock, UV-Strahlen und einige genotoxische Substanzen aktiviert (Dent, *et al* 2003), (Bachelor and Bowden 2004), (Strniskova, *et al* 2002). Die JNK wird durch dualspezifische MKK4 und MKK7 phosphoryliert und die p38-Isoformen durch MKK3 und MKK6. Aktivatoren von

MKK4 und MKK7 sind MEKK1, -2, -3, -4 beziehungsweise PAK (p21-aktivierte Kinasen), die wiederum durch Interaktion mit Rho-Proteinen-Familie aktiviert werden. Die Phosphorylierung und Aktivierung von MKK4 und MKK7 kann aber auch durch zahlreiche andere Kinasen erfolgen, die auch MKK3 und MKK6 phosphorylieren, wie z.B. MLK-1,-2,-3 (Mixed lineage kinase), ASK1 (Apoptose Signal-regulierte Kinase), TAK1 (TGF β -aktivierte Kinase) (Abb. 1.4). Ras kann ebenfalls die Aktivierung der JNK und p38-Kinase Kaskaden vermitteln. Die MAPKK Kinasen können wiederum durch eine noch größere Zahl von Proteinen, die zu der „sterile 20 kinase family“ gehören, aktiviert werden (Tibbles and Woodgett 1999). Substrate der p38 und JNK sind zum einen zytoplasmatische Proteine und zum anderen Transkriptionsfaktoren im Zellkern. Bekannte Transkriptionsfaktoren, die durch JNK aktiviert werden, sind ATF-2, Elk-1 und c-Jun (van Dam, *et al* 1995), (Whitmarsh, *et al* 1995), das einen Teil des Aktivator Protein 1 (AP1) darstellt. Die MAP-Kinase p38 phosphoryliert bevorzugt die Transkriptionsfaktoren Sap-1, AFT-2 (Raingeaud, *et al* 1995); (Janknecht and Hunter 1997), aber auch CHOP (Wang and Ron 1996) und MEF2C (Han, *et al* 1997). Ein wichtiges zytoplasmatisches Substrat der p38 ist die MAPKAP-Kinase 2 (Mitogen-aktivierte Proteinkinase-aktivierte Proteinkinase), die das Hsp 27, CREB (Clifton, *et al* 1996) und auch den SRF phosphoryliert (Heidenreich, *et al* 1999). Diese Kinasen sind an der Entstehung von apoptotischen und inflammatorischen Zellprozessen beteiligt.

In der Hämatopoese ist die Aktivierung von p38 bei der erythroiden Differenzierung, sowohl bei akut myeloiden Leukämiezellen (AML) als auch bei CD34⁺ Progenitorzellen, als essentiell beschrieben worden (Miyazaki, *et al* 2001), (Uddin, *et al* 2004), (Huang, *et al* 2006). JNK hingegen ist an der Feinregulation der Expression von CD83 in KG-1 Zellen (AML-Zellen) beteiligt (Kim, *et al* 2004). In verschiedenen Leukämiezelllinien ist die Aktivierung von JNK sowohl mit apoptotischen (Czibere, *et al* 2005) als auch mit proliferativen (Hartman, *et al* 2006) Prozessen verbunden.

1.2.2 Proteinkinase C (PKC)

Die Aktivität der Proteinkinase C (PKC) besitzt eine zentrale regulatorische Funktion bei der Signaltransduktion. Ihre Aktivität wird über Hormone und Neurotransmitter gesteuert, deren Signale über sekundäre Botenstoffe, sogenannte „second messenger“ weitergeleitet werden. Sie gehört der Familie der G-Protein-gekoppelten Proteinkinasen an. Durch eine Übertragung von Phosphat auf Serin- oder Threoningruppen steuert sie die Aktivität nachgeschalteter Enzyme oder Faktoren. Die Proteinkinase C besteht aus einer regulatorischen N-terminalen und einer katalytischen C-terminalen Domäne, weist die regulatorische Domäne eine Pseudosubstratsequenz auf, die das aktive Zentrum der katalytischen Domäne im Ruhezustand blockiert: Anstelle eines phosphorylierbaren Serinrestes ist hier ein Alaninrest vorhanden (Spitaler and Cantrell 2004).

Derzeit sind 12 Isoenzyme der Proteinkinase C bekannt. Sie wurde inzwischen aus *Drosophila* und zahlreichen Säugern kloniert. Ihre Molekülmassen betragen 61 bis 154 kDa. Man unterscheidet drei Gruppen der PKC-Isoenzyme: klassische PKC (cPKC), neue PKC (nPKC) und atypische PKC (aPKC). Die cPKC-Isoformen werden durch second messenger (Ca^{2+} und Diacylglycerin) aktiviert (Spitaler and Cantrell 2004), die nPKC-Isoformen werden nur durch Diacylglycerin aktiviert (Kikkawa, *et al* 2002), und aPKC sind Ca^{2+} und Diacylglycerinunabhängig und werden durch Insulin und Phosphatidylinositol-3,4,5-(PO_4)₃ aktiviert (Mao, *et al* 2000), (Kanoh, *et al* 2003). Zusätzlich existieren weitere, zell- und isoformabhängige Aktivierungs- und Inaktivierungswege. Zu den cPKC-Isoformen zählen $\text{PKC}\alpha$, $\text{PKC}\beta\text{I}$, $\text{PKC}\beta\text{II}$ und $\text{PKC}\gamma$, zu den nPKC-Isoformen zählen $\text{PKC}\epsilon$, $\text{PKC}\delta$ und $\text{PKC}\eta$ und die aPKC-Isoformen bestehen aus $\text{PKC}\zeta$, $\text{PKC}\lambda/\iota$ und $\text{PKC}\mu$. Bei $\text{PKC}\mu$ und $\text{PKC}\iota$ handelt es sich um die sogenannten orthotopen Enzyme, in Mäusen wird $\text{PKC}\lambda$ exprimiert, während beim Menschen die gleichen Funktionen von $\text{PKC}\iota$ wahrgenommen werden (Tan and Parker 2003).

Für die Funktion der klassischen Proteinkinase C wird Ca^{2+} benötigt. Darüber hinaus ist die Bindung an Phosphatidylserin, eine Lipidkomponente der inneren Seite der Zellmembran, erforderlich. Diacylglycerin, ein „second messenger“, erhöht die Affinität für Ca^{2+} in einem Maße, daß die Aktivität des Enzyms schon bei geringen Konzentrationen des Ions gewährleistet ist. Der PKC- Ca^{2+} -Komplex verlagert sich zur Zellmembran. Da die Verbindung zwischen der PKC und Ca^{2+} sehr kurzlebig ist, nimmt man heute an, daß nur ein Ca^{2+} -Anstieg unmittelbar unterhalb der Membran (also durch Einfluß von Ionen durch Ionenkanäle) die PKC aktivieren kann.

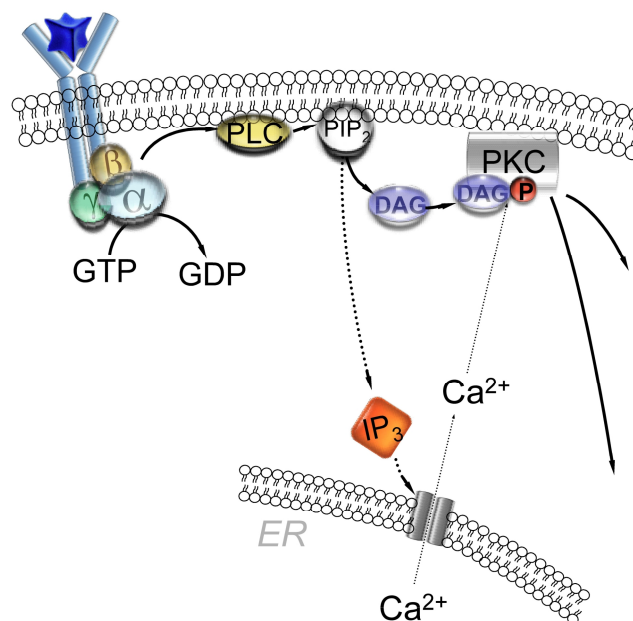


Abbildung 1.5: Der Proteinkinase C (PKC) Signalweg

Nach Aktivierung des Rezeptors steht die G-Protein vermittelte Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) durch die Phospholipase C beta (PLC) in Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃). Sowohl DAG als auch der durch das IP₃ vermittelte intrazelluläre Ca^{2+} -Anstieg aktivieren die PKC. Die Aktivierung der nPKC-Isoformen ist Ca^{2+} unabhängig und wird nur über die Bindung von DAG vermittelt.

Die Bindung einer Reihe von Neurotransmittern, Wachstumsfaktoren und Hormonen an ihre G-Protein-gekoppelten Rezeptoren vermittelt über die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) die Freisetzung der „second messenger“ Inosit-1,4,5-triphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG) aus der Membrankomponente Phosphatidylinositoldiphosphat (PIP₂). IP₃ bindet an Rezeptoren in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums und verursacht die Freisetzung von Ca²⁺ (Abb. 1.5). Bei neuen PKC-Formen wie z. B. PKC δ erfolgt die volle Aktivierung der Kinase bereits durch das Binden von DAG an diese und ist somit Ca²⁺ unabhängig. (Kikkawa, *et al* 2002).

PKC ist an der Regulation des zellulären Wachstums beteiligt. Eine Fehlsteuerung dieses Signalwegs führt zu einem stark erhöhtem Tumor- und Leukämierisiko. Die Bedeutung der PKC für Zellteilung und Proliferation wurde offensichtlich, als man die Wirkungsweise der Phorbolster, wie z. B. TPA, als wichtige Karzinogene erkannte. Diese polyzyklischen Alkoholderivate aktivieren das Enzym aufgrund ihrer Ähnlichkeit zum natürlichen Aktivator DAG (Mastro and Pepin 1982b), (Mastro and Pepin 1982a), (Nishizuka 1984), (Saltis, *et al* 1991), (Zanaboni, *et al* 1992). Die dadurch vermittelte Aktivität hat lange Bestand, da Phorbolster im Gegensatz zu DAG nur langsam abgebaut werden. Verschiedene Ca²⁺-abhängige und unabhängige PKC-Isoformen sind nach der Aktivierung durch Phorbolster in der Lage, das Raf-1 Inhibitorprotein zu phosphorylieren, wodurch Raf-1 aktiviert und die mitogene Signalkaskade unabhängig von Zytokinen unkontrolliert angeschaltet wird, was zur Tumorbildung führen kann (Cai, *et al* 1997), (Corbit, *et al* 2003), (English, *et al* 1999). In experimentellen Untersuchungen wird TPA gerne als Stimulus zur PKC-Aktivierung eingesetzt.

Die verschiedenen PKC Formen greifen vielschichtig in den Verlauf der Hämatopoese ein. Bei der erythroiden Differenzierung aktiviert Erythropoetin PKC (Spivak, *et al* 1992). Bei der Differenzierung von Granulozyten und Makrophagen stimulieren die Zytokine GM-CSF und M-CSF die Freisetzung von Diacylglycerol und dadurch die Aktivierung von PKC (Whetton, *et al* 1994). Die Aktivierung von PKC führt in hämatopoetischen Zellen zu einer Verlangsamung der Interferon vermittelten Zellproliferation (Tiefenbrun and Kimchi 1991). Die Analyse von hämatopoetischen Progenitorzellen zeigte, daß die neuen und atypischen PKC Formen stark, wohingegen die klassischen PKC Formen schwach bis gar nicht exprimiert werden und daher eine entscheidende Rolle bei der Hämatopoese zu spielen scheinen (Bassini, *et al* 1999).

1.2.3 Der JAK-STAT-Signalweg

Der JAK-STAT-Signalweg dient in eukaryotischen Zellen dazu, die Information von Zytokinen von der Zellmembran, intrazellulär zu Zielgenpromotoren im Zellkern weiterzuleiten. Er trägt dabei zur Regulation der Zellentwicklung, Wachstumskontrolle und Hämatopoese in vielzelligen Organismen bei. Ursprünglich wurde er

bei der Behandlung von Zellen mit Interferonen entdeckt. Neben Zytokinen wie Interferone und Interleukine, sind auch Hormone wie Erythropoietin (Haq, *et al* 2002), Prolaktin und Wachstumshormon typische Liganden für die beteiligten Zytokinrezeptoren. Der JAK-STAT Signalweg ist in Schleimpilzen, Würmern, Fliegen und Vertebraten vertreten, nicht jedoch in Pilzen und Pflanzen (Rawlings, *et al* 2004).

Die Bindung des Liganden an den Zytokinrezeptor führt durch Konformationsänderung zur Bindung der rezeptorassoziierten Januskinase (JAK), die sich selbst und den Rezeptor an Tyrosin phosphoryliert (Leonard 2001). JAKs sind evolutionär konserviert, wobei vier verschiedene Varianten in Säugetierzellen zu finden sind (JAK1, JAK2, JAK3 und TYK2) (Feng, *et al* 1997). Die neu entstandenen Phosphotyrosine am Rezeptor stellen Bindungsstellen für die Src-homology 2 (SH2) Domänen der „Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)“-Moleküle dar. Nach Bindung der STATs über ihre SH2-Domäne an den phosphorylierten Rezeptor werden sie von den JAKs an einem carboxyterminalen Tyrosin (z. B. Y694 in STAT5 oder Y641 in STAT6) phosphoryliert, wodurch auf ihrer Oberfläche ebenfalls SH2-Bindungsstellen entstehen (Gouilleux, *et al* 1994), (Nelms, *et al* 1999). Nach Dissoziation vom Rezeptor werden die Phosphotyrosine zweier STATs reziprok erkannt, wobei die SH2-Domäne eines STAT jeweils das Phosphotyrosin des anderen bindet und ein aktiviertes Dimer entsteht (Abb. 1.6). Auch STATs sind wie JAKs evolutionär konserviert. In Säugetieren gehören ihrer Familie sieben Mitglieder an (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b und STAT6). Bei Aktivierung des Rezeptors durch Liganden kommt es abhängig von Rezeptor und der beteiligten rezeptorspezifischen JAKs zur Homo- oder Heterodimerisierung bestimmter STATs (Muller, *et al* 2005).

Das aus der Dimerisierung resultierende nukleäre Lokalisationssignal (NLS) führt unmittelbar zu deren Translokation in den Kern, dort setzen sie als Transkriptionsfaktoren das extrazelluläre Signal in Gentranskription um (Abb. 1.6). Der JAK-STAT Signalweg stellt demnach eine direkte Route in den Kern dar und kommt ohne „second messenger“ aus. Die an der Plasmamembran aktivierten latenten Transkriptionsfaktoren sind direkt an weiteren Ereignissen im Nukleus beteiligt (Reich and Liu 2006). Für die Erkennung spezifischer Promotorsequenzen ist die DNA-Bindungsdomäne (DBD) verantwortlich. Sie liegt von der SH2-Domäne aus gesehen N-terminal und ist mit dieser über eine so genannte Linkerdomäne verbunden. Die meisten Dimere erkennen ein 8-10 Basenpaar langes palindromisches DNA-Element mit der Konsensussequenz 5'-TT(N4-6)AA-3'. Üblicherweise wird diese als GAS-Sequenz bezeichnet, was ihre ursprüngliche Charakterisierung als γ -Interferon-Aktivierungssequenz widerspiegelt (Decker, *et al* 1997). Nach Bindung des STAT-Dimers an den Promotor werden weitere Coaktivatoren rekrutiert, die Chromatinmodifikationen und die Kommunikation mit generellen Transkriptionsfaktoren vermitteln (Darnell 1997).

Bei immundefizienten Patienten und bei verschiedenen hämatologischen Erkrankungen konnte eine Veränderung, die durch Mutationen in den Signalmolekülen des JAK-STAT-Signalwegs hervorgerufen wurde, nachgewiesen

werden. Die direkte Vermittlung von Zytokinsignalen über diesen Signalweg scheint daher für die Hämatopoese von großer Bedeutung zu sein (Khwaja 2006).

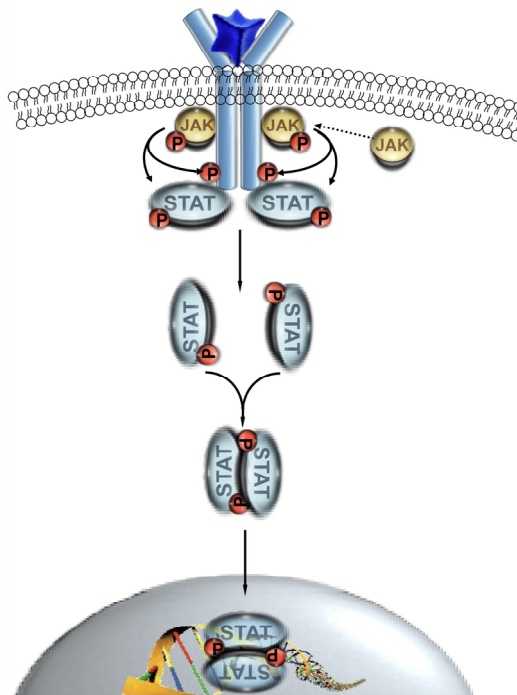


Abbildung 1.6: Der JAK-STAT-Signalweg

Die Hauptfunktion der JAK/STAT-Übertragungskaskade ist es, die durch Zytokine vermittelten Signale in Expression von spezifischen Zielgenen zu ermöglichen. Nach der Anbindung des Liganden an den extrazellulären Teil des Rezeptors führen Konformationsänderungen zu einer Aktivierung der assoziierten JAK, die zuerst sich selbst und dann den Rezeptor phosphoryliert und damit eine Andockstelle für „Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)“-Moleküle erzeugt. STAT-Moleküle können an diese Andockstelle binden, werden ebenfalls durch JAK phosphoryliert, bilden Dimere und wandern zum Zellkern. Im Kern binden die aktivierten STAT-Dimere dann an regulatorische DNA-Sequenzen der Zielgene.

1.2.4 Transkriptionsfaktoren bei der Hämatopoese

Durch Signaltransduktionskaskaden werden externe Stimuli, die die Zelle an der Membran empfängt, nicht nur an Protein-Substrate im Zytoplasma, sondern auch in den Zellkern weitergeleitet. Endglieder dieser Kaskaden wandern in den Zellkern (Nukleus) und phosphorylieren dort Transkriptionsfaktoren. Im Nukleus selbst binden diese Faktoren an die Promotoren von Genen und aktivieren damit deren Transkription. Eine für die vorliegende Arbeit wichtige Gruppe solcher Transkriptionsfaktoren ist die Ets-Familie, die sich in die Ternärkomplexfaktoren (TCF) und in die Ets-Gruppe unterteilt und durch Phosphorylierungen aktiviert werden kann (Tootle and Rebay 2005), (Gardner and Montminy 2005).

1.2.4.1 Die Rolle des Transkriptionsfaktor PU.1 bei der Hämatopoese

Der Transkriptionsfaktor PU.1 besitzt eine zentrale Rolle in der Hämatopoese. Wird die DNA-Bindung von PU.1 in HSCs unterbunden, kommt es zu einer gesamten Blockierung der Differenzierung von HSCs (Voso, *et al* 1994). PU.1 gehört zu der Familie der Ets-DNA-Bindungsproteinen. Seine Expression findet ausschließlich in hämatopoetischen Zellen statt, wobei über die Regulation des Faktors wenig bekannt ist (Klemsz, *et al* 1990), (Hromas, *et al* 1993). PU.1 steuert die Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen in Makrophagen, Granulozyten und B-Lymphozyten (Galson, *et al* 1993). Er spielt eine entscheidende Rolle in der Zellentwicklung in Richtung der myeloiden und lymphatischen Linien (Tenen, *et al* 1997), (Lloberas, *et al* 1999), (Dahl and Simon 2003). PU.1 inhibiert die erythroide Differenzierung durch Interaktion mit dem Zink-Finger-Transkriptionsfaktor GATA-1 (Stopka, *et al* 2005) und spielt eine kritische Rolle bei der Differenzierung des thrombozytären und erytroiden Systems durch Interaktion mit GATA-2 (Kitajima, *et al* 2006). In Mäusen konnte gezeigt werden, daß Mutationen im PU.1-Gen schwerwiegende Folgen für die Differenzierung von B-Lymphozyten und Makrophagen hatten und dieser Faktor somit essentiell für die Entwicklung der Effektorzellen ist (Abb. 1.7). Die Bildung von Granulozyten und T-Lymphozyten blieb dagegen weitestgehend unbeeinflusst (Scott, *et al* 1994), (Scott, *et al* 1997), (McKercher, *et al* 1996), (Anderson, *et al* 1998), (Iwasaki, *et al* 2005). PU.1 ist in der Lage, konzentrationsabhängig spezifisch diese Differenzierungswege zu induzieren. Durch Gentransfer von PU.1 in PU.1-negativen Nullmutanten (PU.1^{-/-}) und Heterozygoten konnte gezeigt werden, daß hohe Konzentrationen von PU.1 eine Entwicklung in Richtung von Makrophagen induzieren, während niedrige Konzentrationen eine Differenzierung in Richtung von B-Lymphozyten ermöglicht (Back, *et al* 2005).

Hämatopoetische Vorläuferzellen, die aus der fötalen Leber von PU.1-negativen (PU.1^{-/-}) Mäusen stammen, proliferieren in Anwesenheit von Multilinienzytokinen wie Interleukin-3. Sie sind jedoch eingeschränkt in ihrer Reaktion auf linienbeschränkte Zytokine wie GM-CSF, G-CSF, M-CSF oder Interleukin-7 (DeKoter, *et al* 2002), (Scott, *et al* 1997). PU.1 scheint auf direktem Wege die Transkription von Genen zu aktivieren, die Rezeptoruntereinheiten für diese linienbeschränkten Zytokine codieren (DeKoter, *et al* 2002), (Singh, *et al* 1999). PU.1 spielt ebenso eine Rolle bei der Expression der Interleukin-7 Rezeptoruntereinheit IL-7R α . Mit Hilfe von PU.1-Nullmutanten (PU.1^{-/-}), in denen der Transkriptionsfaktor nicht mehr gebildet wird, konnte gezeigt werden, daß die Abwesenheit von PU.1 eine eingeschränkte Expression dieser Untereinheit zur Folge hat (DeKoter and Singh 2000). Durch retrovirale Transduktion von IL-7R α in PU.1-Nullmutanten konnte gezeigt werden, daß diese wieder die Fähigkeit erlangten, Interleukin-7-abhängig zu proliferieren (DeKoter, *et al* 2002).

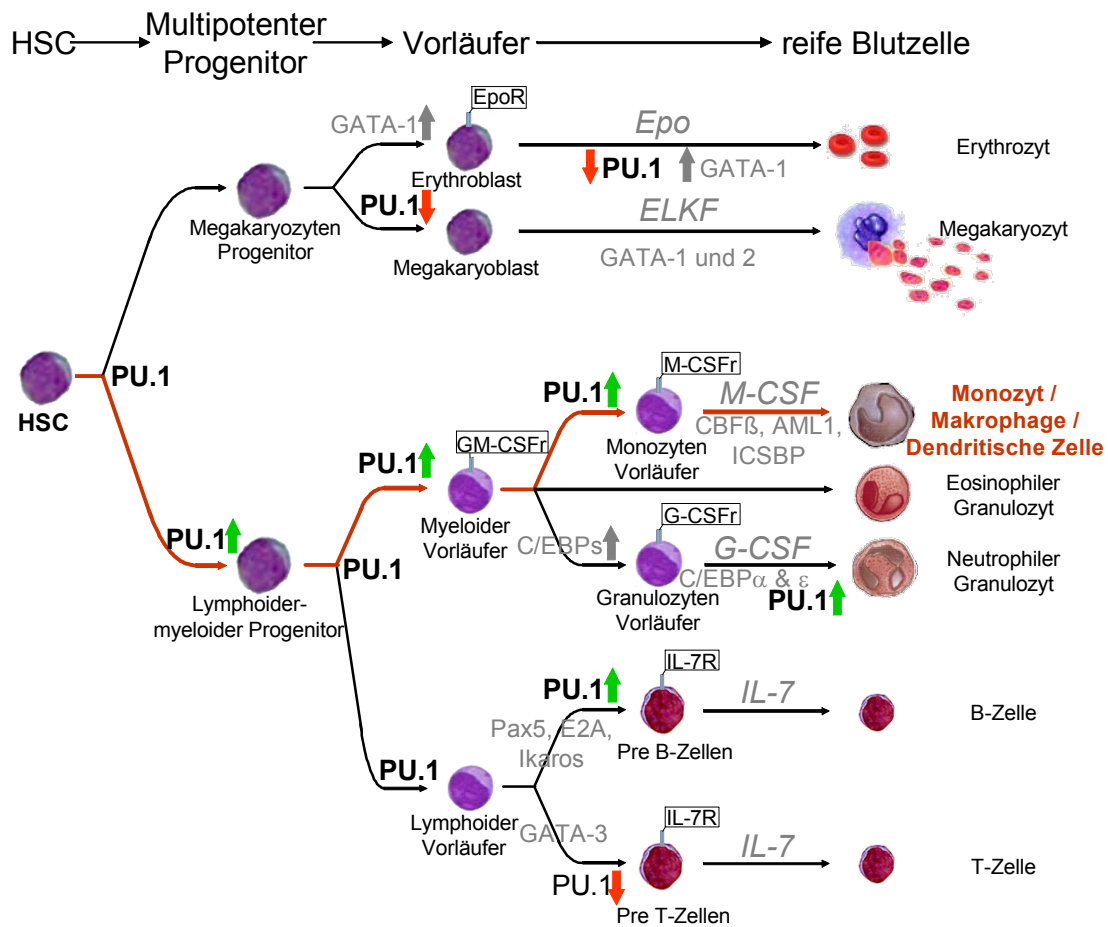


Abbildung 1.7: Selektive Beteiligung von PU.1 an den verschiedenen Stadien der Hämatopoese. Das Schema zeigt, daß PU.1 vielschichtig in einzelne Schritte der Hämatopoese eingreift. In hämatopoetischen Stammzellen und multipotenten Progenitoren wird PU.1 in einem geringen Level exprimiert. Die Expressionsrate steigt spezifisch in der lymphoiden und myeloiden Differenzierung an. Die Differenzierung von Macrophagen benötigt hohe Konzentrationen an PU.1 wohingegen eine gleichbleibende niedrige Expression in den Pre B-Zellen benötigt wird. Die Expression von PU.1 ist eine Voraussetzung für die M-CSF-abhängige Bildung von Monozyten Vorläufern und für die Maturierung der aus ihnen resultierenden Effektorzellen (→). Bei Eosinophilen Granulozyten wird PU.1 durch GATA-1 und C/EBP α herunterreguliert, es wird jedoch für die Differenzierung von Neutrophilen Granulozyten benötigt. Das Ausschalten von PU.1 ist ebenfalls während der Differenzierung von Erythrozyten und T-Zellen von entscheidender Bedeutung. Modifizierte Abbildung nach (Gangenahalli, *et al* 2005)

Hochregulation $\hat{\uparrow}$, Runterregulation $\hat{\downarrow}$, grau = Transkriptionsfaktoren, grau und *kursiv* = Wachstumsfaktoren

Die Menge des Faktors PU.1 hat auch eine Bedeutung bei der Entstehung der akuten myeloiden Leukämie (AML). Eine reduzierte Expression von PU.1 kann im Menschen und in der Maus eine AML auslösen. Ist der Faktor PU.1 völlig ausgeschaltet, führt dies dagegen zu keiner Ausbildung einer AML. Hohe Konzentrationen von PU.1 verhindern die Ausdifferenzierung von erythroiden Zellen, weshalb PU.1 auch eine Rolle bei der Entstehung von erythroiden Leukämien zugewiesen werden kann (Atar and Levi 2005). In 95 % der FV- oder SFFV (spleen focus-forming virus)-induzierten Erythroleukämien findet sich eine Aktivierung des

viralen Gens Spi-1 (SFFV proviral integration) durch Provirusintegration (Moreau-Gachelin, *et al* 1988). Das Virusprotein Spi-1 ist identisch mit dem hämatopoetischen Transkriptionsfaktor PU.1. Die Expressionsstärke von PU.1 ist demnach von entscheidender Bedeutung für seine Funktion (Rosenbauer, *et al* 2004), (Koschmieder, *et al* 2005). Rotenbauer *et al.* und Stirewalt *et al.* konnten zeigen, daß eine um 80 % reduzierte PU.1-Expression nur noch zur Bildung von präleukämischen Granulozyten führt (Rosenbauer, *et al* 2004), (Stirewalt 2004).

Die Bedeutung von PU.1 in der dendritischen Differenzierung wurde von Anderson *et al.* und Guerriero *et al.* gezeigt (Anderson, *et al* 2000), (Guerriero, *et al* 2000). Beide konnten zeigen, daß PU.1 defiziente Progenitorzellen nicht mehr in der Lage sind, myeloide Dendritische Zellen zu bilden. Dieser Aspekt ist für die vorliegende Arbeit von besonderer Bedeutung, da als Differenzierungsmodell die Differenzierung von HSCs zu myeloiden DCs gewählt wurde. PU.1 greift also vielschichtig in die Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen und daraus resultierender Effektorzellen ein.

Das PU.1-codierende Gen wurde bei der Untersuchung einer murinen Makrophagen-Bibliothek entdeckt. Seine Sequenz besteht aus 816 Basen und codiert für ein Protein mit 272 bzw. 266 Aminosäuren (AS). Das humane PU.1 Gen codiert für ein Protein mit 264 Aminosäuren, welches eine 85%ige Sequenzhomologie mit dem homologen Mausprotein hat und auf Chromosom 11 (Region p11.22) lokalisiert ist (Nguyen, *et al* 1990). Drei funktionelle Domänen des PU.1 Proteins konnten bis heute charakterisiert werden. Die evolutionär konservierte ETS-Domäne von 85 Aminosäuren ist am C-Terminus des Proteins lokalisiert und vermittelt die DNA- Bindung des Proteins, sowie die Interaktion mit verschiedenen anderen Transkriptionsfaktoren wie c-Jun, GATA-1, GATA-2, „CAAT/enhancer binding“ Protein α und β (C/EBP) und ALM1 (Abb.1.8) (Behre, *et al* 1999), (Rekhtman, *et al* 1999), (Nerlov, *et al* 2000), (Petrovick, *et al* 1998), (Reddy, *et al* 2002). Der N-Terminus besteht aus drei sauren und einer glutamin-reichen Aminosäureregion. Er ist für die Transaktivierung von PU.1 verantwortlich und wird daher als Transaktivatordomäne (TAD) bezeichnet (AS 1 – 86). An ihr findet die Interaktion mit den basalen Transkriptionsfaktoren, TFIID, TATA Bindeprotein (TBP), Retinoblastom Protein (RB), GATA-1 und GATA-2, Glukokortikoidrezeptor (GR) und dem Hitzeschockprotein statt (HSP90) (Abb.1.8) (Hagemeyer, *et al* 1993), (Nagulapalli, *et al* 1995). Die dritte Domäne liegt zwischen der Transaktivatordomäne und der DNA-Bindungsdomäne und wird als PEST-Domäne bezeichnet (AS 118 - 160). Ihr Name leitet sich von der Ansammlung an Prolin, Glutaminsäure (E), Serin und Threonin Aminosäuren in der Region ab. Diese Domäne interagiert mit Interferon- regulierenden Faktoren (IRFs), zu denen PIP/NF-EM5 und Interferon-consensussequenz-Bindeprotein (ICSBP) gehören (Abb.1.8) (Pongubala, *et al* 1993), (Pongubala and Atchison 1997), (Eisenbeis, *et al* 1995), (Eisenbeis, *et al* 1993). Ihre Proteininteraktion hat sowohl aktivierende (c-Jun) als auch inhibierende (GATA-1, C/EBP α) Wirkung auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors PU.1 (Tenen 2003).

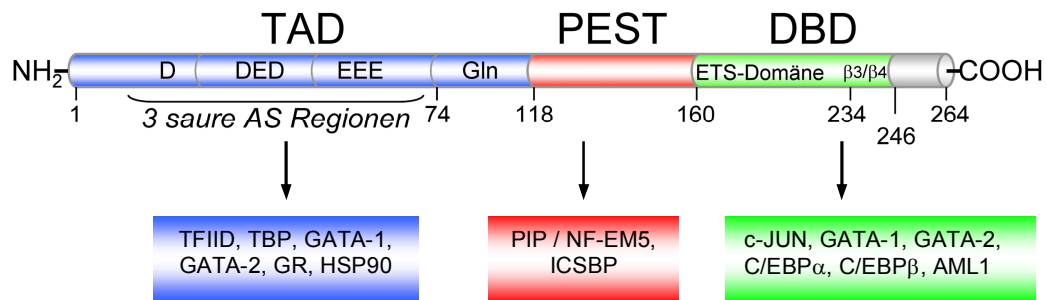


Abbildung 1.8: Domänen von PU.1 und deren Interaktionspartner. Das humane PU.1 Protein (264 Aminosäuren) besteht aus drei funktionellen Domänen, der Transaktivator-domäne (TAD; Aminosäure 1-86), der PEST-Domäne (Aminosäure 118-160) und der DNA-Bindungsdomäne (DBD / Ets-Domäne; Aminosäure 160-246). Jede der drei Domänen kann mit unterschiedlichen Proteinen interagieren. Die einzelnen Proteine sind jeweils unter der Domäne aufgelistet. Bei vielen der Proteine handelt es sich um Transkriptionsfaktoren. Modifizierte Abbildung nach (Gangenhalli, *et al* 2005)

1.3 Dendritische Zellen (DC)

In der vorliegenden Arbeit wird die Differenzierung von Dendritischen Zellen aus humanen hämatopoetischen Stammzellen als Modellsystem verwendet. Die Etablierung des Differenzierungsprotokolls beruht auf den Arbeiten von Zheng *et al.* und Liu *et al.* (Zheng, *et al* 2000), (Liu, *et al* 2002).

Wenn pathogene Erreger z. B. Viren, Bakterien, Pilze oder eukaryotische Parasiten in den Organismus eindringen, kann dies Krankheiten oder sogar den Tod des Organismus zur Folge haben. Eine der wichtigsten Funktionen des Immunsystems in Wirbeltieren ist es, dieses zu verhindern, indem es Mikroben und andere Fremdstoffe spezifisch erkennt und neutralisiert. Das Immunsystem stellt ein komplexes Netzwerk dar und umfaßt Organe wie Thymus, Milz und Lymphknoten, sowie Blut und Lymphe. Die besonderen Kennzeichen des Immunsystems sind Anpassung, Gedächtnis und Spezifität. Es unterscheidet zwischen „eigen“ und „fremd“ und leitet als Effektorfunktion gegen das „Fremde“ eine Abwehrreaktion oder Toleranz ein, die auf zwei verschiedenen, jedoch miteinander kommunizierenden Wegen stattfindet.

Man unterscheidet dabei im Allgemeinen zwischen Abwehrreaktionen, die auf der Bildung von Antikörpern (Ak) basierende humorale Immunität und zellulären Immunantworten, bei denen Ak nur eine untergeordnete Rolle spielen. Bei humoralen Immunantworten wird das fremde Antigen (Ag) durch die von B-Zellen sezernierten Ak gebunden und dadurch entweder die Interaktion mit Zellen neutralisiert oder, wie im Fall von Mikroorganismen, opsonisiert, d. h. markiert und durch das Fc-Ende des Antikörpers für die Phagozyten erkennbar gemacht. Mit Hilfe von membranständigen Ak kann das Ag von den B-Zellen auch direkt

aufgenommen werden und T-Zellen präsentiert werden. Bei den zellulären Immunantworten spielen dagegen hauptsächlich die zytotoxischen T-Zellen und die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) eine wichtige Rolle. Diese Zellen sind im Stande, infizierte Zellen zu erkennen und sie zu lysieren. Die Selektion des jeweiligen Effektormechanismus wird von aktivierten T-Helferzellen (Th-Zellen, CD4⁺) bestimmt und ist weitgehend von der Art des Pathogens abhängig. Während die B-Zellen im Stande sind, natives Ag zu erkennen, werden von den T-Zellen nur kurze Peptide erkannt, die im Zusammenhang mit Haupthistokompatibilitätsmolekülen (MHC-Moleküle) auf den Antigenpräsentierenden Zellen (APC) präsentiert werden (Romani, *et al* 1989), (Romani and Schuler 1989) (Germain 1994), (Brown, *et al* 1993), (Carbone, *et al* 1989). Bei den APC, zu denen neben Dendritischen Zellen (DC) auch Makrophagen und B-Zellen gehören, handelt es sich um Zellen, die Ag aus ihrer Umgebung aufnehmen und auf ihrer Oberfläche präsentieren (Abb. 1.12).

Der erste „Urtyp“ der Dendritischen Zellen (DC) wurden 1868 von Paul Langerhans mittels Goldchlorid-Färbung in der Epidermis der Haut entdeckt. Aufgrund ihrer Morphologie (lange Zellausläufer) nannte er sie Dendritische Zellen und nahm an, daß sie zum Nervensystem gehörten (Langerhans 1868). Die Funktion dieser Zellen war jedoch lange unklar. 1973 identifizierten Steinmann und Cohn eine bis dahin unbekannte Zellpopulation in der Milz von Mäusen, die sie ebenfalls Dendritische Zellen nannten. Diese Zellen gehörten nicht zu den Phagozyten und waren semi adhärent (Steinman and Cohn 1973), (Steinman and Cohn 1974), (Steinman, *et al* 1975). In weiteren Versuchen zeigte sich, daß diese Dendritischen Zellen aus Knochenmarksvorläuferzellen hervorgehen und in allen lymphatischen und vielen nicht lymphatischen Geweben von Säugern und Nagern vorhanden waren (Crowley, *et al* 1989), (Hart and Fabre 1981), (Pugh, *et al* 1983), (Van Voorhis, *et al* 1982). Damit war aber noch keine Verbindung zu den von Langerhans entdeckten Zellen der Haut hergestellt. Deshalb wurden beide Populationen getrennt voneinander untersucht. Es zeigte sich, daß die von Langerhans entdeckten Zellen und die Zellen, die von Steinmann und Cohn charakterisiert wurden, verschiedene Subpopulationen von hochspezialisierten Antigenpräsentierenden Zellen (APC) waren. Beide Subpopulationen spielen eine zentrale Rolle bei der Induktion T-Zell-vermittelter Immunität (Steinman 1991). Dendritische Zellen können eine Immunantwort wesentlich effektiver initiieren als Monozyten oder Makrophagen. Die weitere Erforschung der dendritischen Zellen wurde durch die Tatsachen erschwert, daß die Zellen nur in geringer Zahl vorhanden sind und im humanen System über keinen „zelleigenen“ Marker verfügen. Durch die Entdeckung von Caux, daß humane CD34⁺ hämatopoetische Vorläuferzellen mit Hilfe von Zytokinen (GM-CSF und TNF- α) *in vitro* zu DC differenziert werden können, konnten nun erstmals größere Mengen an DC erzeugt werden (Caux, *et al* 1992). Eine weitere Verbesserung stellte die Veröffentlichung einer Methode von Sallusto und Lanzavecchia im Jahre 1994 dar. Darin wurde beschrieben, wie Monozyten des humanen peripheren Blutes *in vitro* mit GM-CSF und IL-4 zu unreifen und später, durch Zugabe eines Reifungssignals (TNF- α), zu reifen DC ausdifferenziert werden konnten (Sallusto and Lanzavecchia 1994).

Da die Zahl der Monozyten wesentlich höher ist, als die der $CD34^+$ hämatopoetischen Vorläuferzellen, konnte die Zahl der *in vitro* generierten DC nochmals erhöht werden.

1.3.1 Die Reifung und Diversität der Dendritischen Zellen

Zu den am meisten spezialisierten APC gehören die DC, die kontinuierlich aus den $CD34^+$ hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark gebildet werden. Sie bilden eine heterogene Population und unterscheiden sich untereinander sowohl phänotypisch als auch funktionell (Hart 1997), (Lipscomb and Masten 2002). Im Laufe ihrer Entwicklung migrieren sie aus dem Knochenmark über das Blut in die peripheren Gewebe, wo sie zu einem Stadium differenzieren, in dem man sie als unreife DC bezeichnet. In diesem unreifen Stadium besitzen DC nur eine sehr geringe stimulatorische Kapazität, da sie die meisten Adhäsions- und kostimulatorischen Moleküle, wie CD40, ICAM-1, LFA-3, B7.1 und B7.2 nicht besitzen. Das Hauptmerkmal von unreifen DC ist ihre Fähigkeit, extrazelluläre Antigene (Ag, Pathogen) aufzunehmen. Sie sind imstande, Ag sowohl unspezifisch über Phagozytose (Inaba, *et al* 1993), (Moll, *et al* 1993), (Reis e Sousa, *et al* 1993) und Makropinozytose (Sallusto, *et al* 1995) als auch über spezifische Rezeptoren (Sallusto and Lanzavecchia 1994), (Sallusto, *et al* 1995), (Jiang, *et al* 1995) aufzunehmen. Im Gegensatz zu reifen DC prägen unreife DC nur wenig MHC Klasse II auf ihrer Oberfläche aus, besitzen aber auf der anderen Seite sogenannte MHC Klasse II-reiche Kompartimente, in denen MHC Klasse II Moleküle gespeichert werden (Sallusto and Lanzavecchia 1994); (Nijman, *et al* 1995); (Winzler, *et al* 1997a); (Pierre, *et al* 1997), (Turley, *et al* 2000). Kommt es zur Aktivierung, werden die MHC-Moleküle mit Peptiden beladen, die aus den aufgenommenen Ag generiert wurden, und auf die Zelloberfläche gebracht (Pierre, *et al* 1997); (Cella, *et al* 1997). Gleichzeitig erhöht sich die Halbwertszeit von Oberflächen-MHC, so daß die DC das Ag viel effizienter präsentieren können. Dieser Prozeß kann durch viele Faktoren ausgelöst werden. Dazu zählen unter anderem Bakterien (Winzler, *et al* 1997a), Lipopolysaccharide (Verhasselt, *et al* 1997), Viren (Feldman, *et al* 1994) und Zytokine wie IL-1, GM-CSF und $TNF-\alpha$ (Koide, *et al* 1987), (Kolenik, *et al* 1990); (Josien, *et al* 1999).

Die Aktivierung löst neben der erwähnten Verstärkung der Ag-Präsentation eine Reihe von Veränderungen aus, die den Verlust der Ag-Aufnahmefähigkeit und die Erhöhung der stimulatorischen Kapazität zur Folge haben (Pure, *et al* 1990); (Stossel, *et al* 1990); (Sallusto, *et al* 1995). Zur gleichen Zeit migrieren DC aus dem Gewebe über die Lymphe in die sekundären lymphatischen Organe, wo sie sich entweder in der T-Zell-Region oder B-Zell-Follikel ansiedeln und jeweils T- und B-Zellen durch die Ausschüttung von Chemokinen anlocken (Adema, *et al* 1997) und stimulieren (Abb. 1.9).

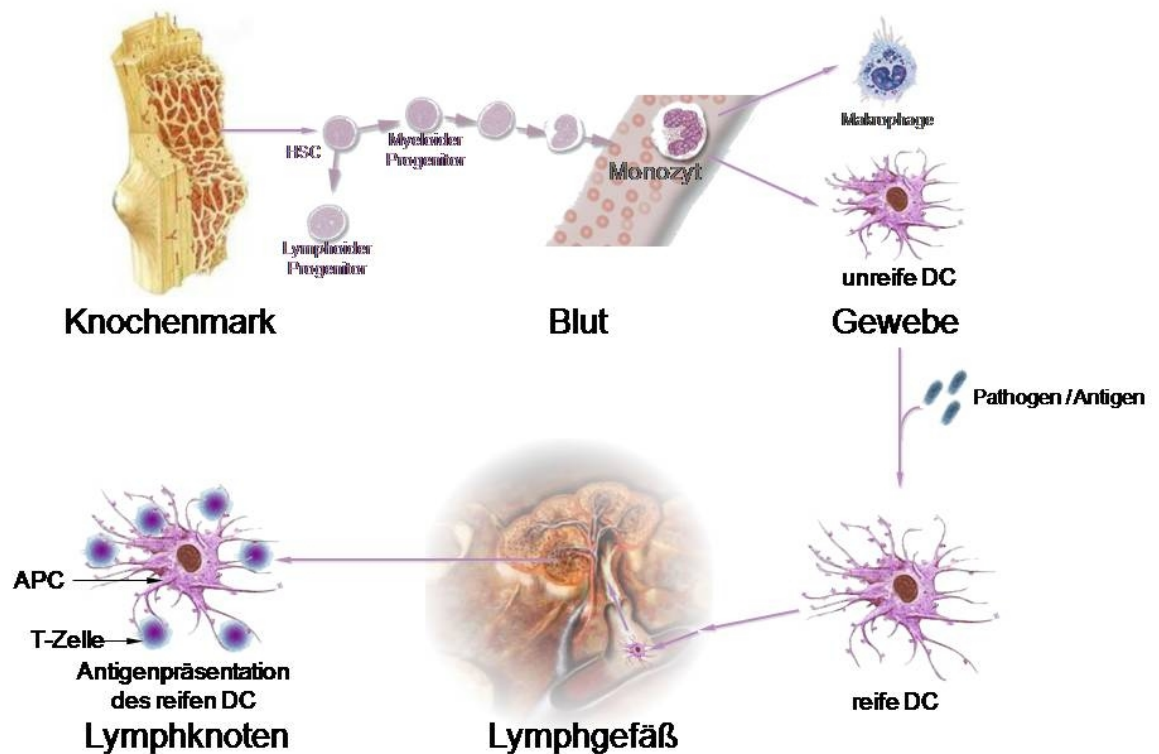


Abbildung 1.9: Lebenszyklus der Dendritischen Zellen.

Aus HSC-Knochenmarksvorläuferzellen entwickeln sich über verschiedene Zwischenschritte Dendritische Zellen (DCs). Diese unreifen Dendritischen Zellen bzw. deren Vorläufer, die Monozyten, wandern über den Blutstrom in verschiedene Gewebe ein. Dort verweilen sie so lange, bis sie auf ein Antigen (Pathogen) treffen, dieses aufnehmen und Bruchstücke des Antigens auf ihrer Oberfläche präsentieren. Durch das Antigen wird ein Ausreifungsprozeß der DCs induziert, bei dem sie ihren Phänotyp verändern und zu effizienten antigenpräsentierenden Zellen (APCs) werden, die über die Lymphgefäße in die Lymphknoten einwandern. In der T-Zell-Zone des Lymphknotens wird die Immunantwort durch die Antigenpräsentation und die damit verbundene Aktivierung naiver T-Zellen initialisiert. Die DCs verlassen nach der T-Zellaktivierung den Lymphknoten und treten in den apoptotischen Zelltod ein. Modifizierte Abbildung nach (Dieu-Nosjean, *et al* 1999)

Die Untersuchungen von humanen DC werden hauptsächlich durch den Mangel an geeignetem Gewebematerial und durch Probleme bei der Aufreinigung erheblich erschwert. Blut ist das einzige humane Gewebe, das in ausreichender Menge für Untersuchungen zur Verfügung steht. Aus diesem Grund sind DC aus dem humanen Blut (BDC) die am besten beschriebene Population und werden als $HLA-DR^+$, $CD3^-$, $CD14^-$, $CD19^-$ und $CD56^-$ definiert. Die DC des Blutes befinden sich im peripheren Blut oder den afferenten Lymphgefäßen (Knight, *et al* 1982); (Spry, *et al* 1980), wobei sie ca. 1% der peripheren mononukleären Zellen (PBMC) ausmachen. Die Langerhans Zellen (LC) befinden sich in der Epidermis der Haut. Diese LC sind die einzigen DC, die im unreifen Zustand die charakteristischen Birbeck Granula besitzen. Dies sind trilamellare zytoplasmatische Organellen, die aus gefalteten Membranen bestehen und häufig mit Vesikeln verbunden sind (Larsen, *et al* 1992), (Macatonia, *et al* 1986). Die Membranen spannen sich von der

äußeren Membran zur Zellkernmembran und werden häufig an den Kontaktstellen zwischen DC und T-Zellen beobachtet (Bos and Kapsenberg 1993). Die Funktion dieser Birbeck Granula ist noch umstritten. Man vermutet, daß sie beim Transport von Antigenen in die Zelle beteiligt sind (Rezeptor-vermittelte Endozytose) oder daß sie eine sekretorische Funktion haben. Nach der Reifung verlieren die LC ihre Birbeck Granula. Die interstitiellen DC befinden sich in fast allen Organen (Herz, Leber, Niere, Pankreas, Darm, Haut, Urogenitaltrakt, Schilddrüse) (Hart and Fabre 1981); (Prickett, *et al* 1988). Diese Zellen zeigen einige Gemeinsamkeiten mit DC, die aus Monozyten differenziert wurden (Keller 2001). Die plasmazytoiden DC (pDC), die im Gegensatz zu den gerade beschriebenen DC nicht aus einer myeloiden, sondern aus einer lymphoiden Vorläuferzelle hervorgehen, findet man vorwiegend in den T-Zell-Zonen der lymphatischen Organe (O'Doherty, *et al* 1994), (Strobl, *et al* 1998), (Facchetti, *et al* 1999), (Cella, *et al* 1999). Da sie große Mengen IFN- α bilden können, wird ihnen eine zentrale Rolle bei der unspezifischen Abwehr von Viren zugeschrieben (Cella, *et al* 1999), (Siegal, *et al* 1999). Eine Zusammenfassung der unterschiedlichen Merkmalen der Dendritischen Zellen ist in der folgenden Abbildung zusammengefasst (Abb. 1.10).

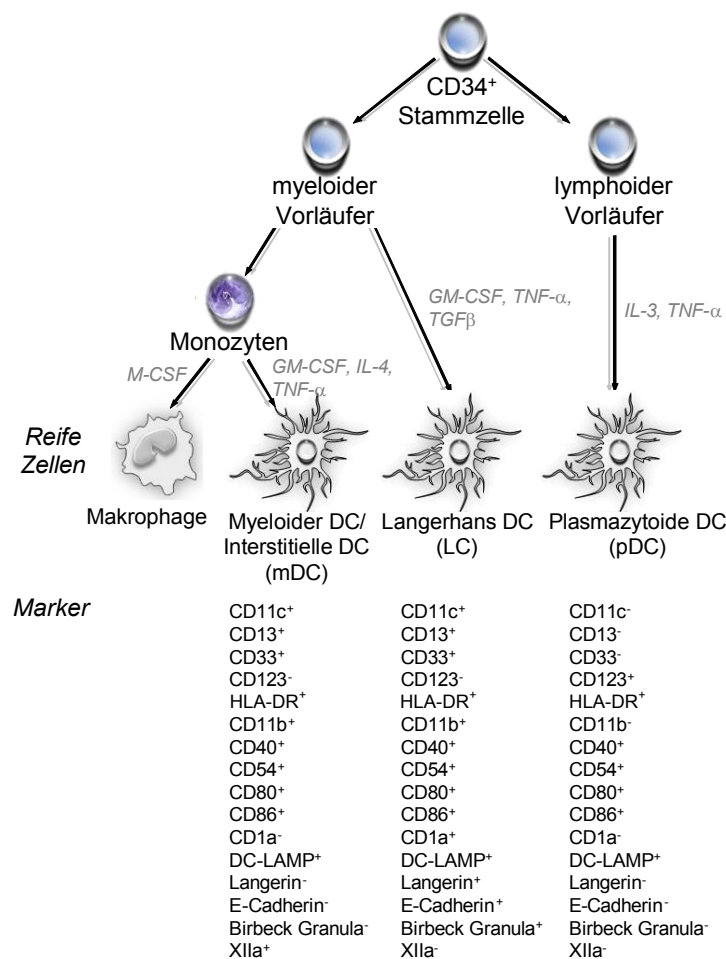


Abbildung 1.10: Herkunft und Charakterisierung der DC-Populationen. Sowohl die myeloiden als auch die lymphoide Linie der DC können von CD34⁺ Vorläuferzellen des Knochenmarks und von Blut-Vorläufern abgeleitet werden. Dafür sind verschiedene Kombinationen von Wachstumsfaktoren wie GM-CSF, TNF- α , IL-4 oder IL-3 notwendig. Einige phänotypische Oberflächenmarker, die die einzelnen DC-Subtypen charakterisieren, sind in der Abbildung zusammengefaßt. Modifizierte Abbildung nach Lipscomb *et al.* (Lipscomb and Masten 2002)

1.3.2 Antigenprozessierung und Antigenpräsentation

DC können Antigene mit Hilfe zweier unterschiedlicher Oberflächenmoleküle, den „Major Histo-compatibility“-Komplexen I und II (MHC I und MHC II) präsentieren. MHC-Klasse-I-Moleküle bestehen aus drei Ig-ähnlichen Domänen, einer Transmembrandomäne und dem nicht-kovalent assoziierten extrazellulären β 2-Mikroglobulin. MHC-Klasse-II-Moleküle dagegen besitzen eine α - und eine β -Kette mit je zwei Ig-ähnlichen Domänen und einer Transmembrandomäne.

Endogene Antigene (z. B. virale Proteine) werden im Zytoplasma durch intrazelluläre Proteasen (Proteasom) und Peptidasen in Peptidfragmente gespalten. Diese häufig aus 9 Aminosäuren bestehenden Peptidfragmente werden durch die Bindung an den TAP1/TAP2-Translokator in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) transportiert. In der ER-Membran werden neu synthetisierte MHC-Klasse-I-Moleküle durch Chaperone zurückgehalten, bis das MHC-Klasse-I-Molekül mit β 2-Mikroglobulin und einem geeigneten Peptidfragment beladen worden ist. Erst die beladenen MHC-Klasse-I-Moleküle können das ER verlassen und zur Oberfläche wandern (Howard 1995); (Lehner and Cresswell 1996); (York and Rock 1996).

Diese MHC-Klasse-I-Moleküle können in Verbindung mit dem Costimulator B7 $CD8^+$ T-Zellen aktivieren (Larsen, *et al* 1992), die dann zu zytotoxischen T-Zellen (CTL) ausdifferenzieren (Abb. 1.11).

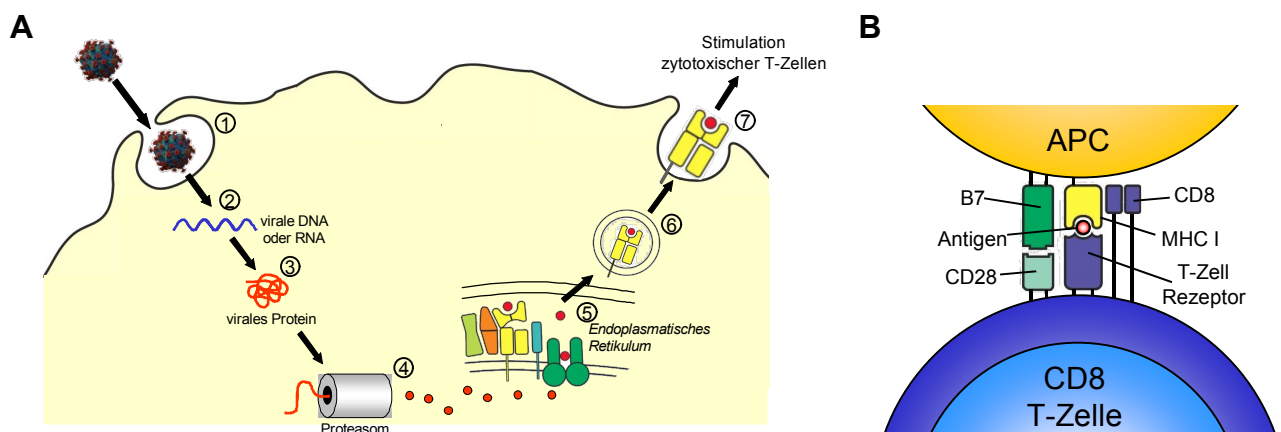


Abbildung 1.11: Präsentation viraler Antigene (endogener Ag) durch MHC I. (A) Die Antigenpräsentierende Zelle (APC) wird durch das Virus infiziert (1). Die virale RNA oder DNA dient als Grundlage für die Expression viraler Proteine (2+3). Diese Proteine werden durch das Proteasom in kleine Peptide gespalten (4). Über den TAP-Transporter (ABC-Transporter) gelangen die Peptide von 8-15 Aminosäuren in das Endoplasmatische Retikulum und binden dort an spezifische MHC I Moleküle (5). Die beladenen MHC I Komplexe werden vom ER abgeschnürt und wandern als Vesikeln über den Golgiapparat zur Zellmembran (6). Auf der Zellmembran werden die Peptide über den MHC I-Komplex zytotoxischen T-Zellen präsentiert und die Immunantwort induziert (7). (B) Virusinfizierte Dendritische Zellen präsentieren virale Antigene über den MHC I-Komplex und coexprimieren B7. Sie sind in der Lage naive $CD8$ T-Zellen zu aktivieren. Modifizierte Abbildung nach (Janeway 2005) und (Alberts 2004).

Exogene Antigene, die durch Phagozytose oder Endozytose in die DC gelangen, werden in Vesikeln bei sinkendem pH-Wert von Proteasen in kleine Peptidfragmente gespalten. Bei der Bildung von MHC-Klasse-II-Molekülen werden zuerst die α - und die β -Kette der MHC-Klasse-II-Moleküle synthetisiert und nach Bindung an HLA-DM, in die Klasse-II-Kompartimente (MIIC) innerhalb des ERs transportiert.

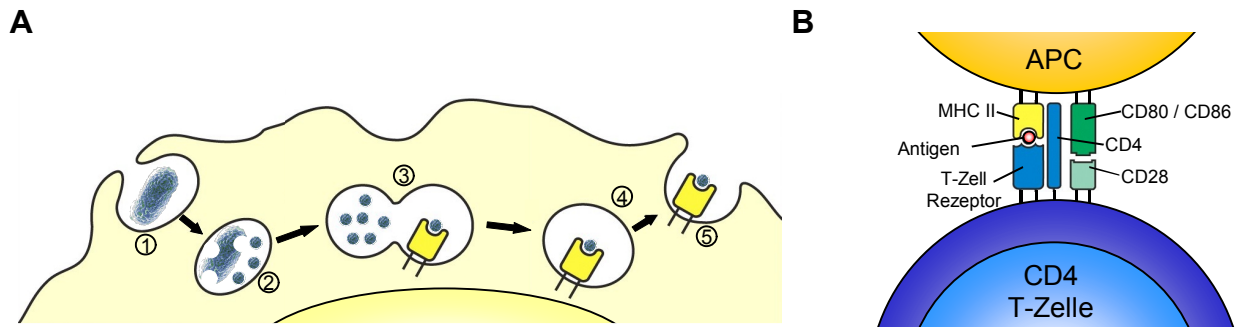


Abbildung 1.12: Präsentation exogener Antigene durch MHC II. (A) Aufnahme des Antigenes durch Phagozytose und Makropinozytose (1). Das Antigen wird durch sinkenden pH-Wert und proteolytischen Peptidasen in kleine Fragmente zerlegt (2). Die späten Endosomen fusionieren mit den MHC II Vesikeln (3). Die Antigenfragmente binden an MHC II und werden zur Zelloberfläche transportiert (4). Präsentation des Antigenes auf der Zelloberfläche durch MHC II und Stimulation von T-Helferzellen (5). (B) Präsentation exogener Antigene durch MHC II-Komplexe auf der Oberfläche von Antigenpräsentierenden Zellen. Der Komplex ist in der Lage zusammen mit CD4 und dem Kostimulator CD80 bzw. CD86 naive CD4 T-Zellen zu aktivieren. Modifizierte Abbildung nach (Janeway 2005)

Dort erhalten sie ihre endgültige Struktur und werden in Vesikel verpackt, aus dem Beladungskompartiment zur Plasmamembran geschleust. Nach der Fusion der beiden oben erwähnten Vesikel wird das HLA-DM durch eines der Fremdpeptide ausgetauscht (German, *et al* 1996), (Lanzavecchia 1996), (Turley, *et al* 2000). MHC-Klasse-II-Moleküle aktivieren in Verbindung mit dem Costimulator CD80 oder CD86 CD4⁺ T-Zellen, die dadurch B-Zellen zur Proliferation und zur Produktion von Antikörpern anregen können (Abb. 1.12).

1.4 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung, Charakterisierung und gerichtete Modulation intrazellulärer Signalwege, die am Differenzierungsprozess von humanen hämatopoetischen Stammzellen (HSC) zu myeloiden Dendritischen Zellen (DC) beteiligt sind. Dabei sollte zunächst ein geeignetes Kultivierungsprotokoll zur Expansion der begrenzt verfügbaren humanen Nabelschnurstammzellen etabliert werden. Als Grundlage für die Expansion sollten im ersten Schritt publizierte Protokolle auf ihre Expansionseigenschaften überprüft werden (Heike and Nakahata 2002).

Nach erfolgreicher Expansion sollte das myeloide Differenzierungsmodell für DC aufgebaut werden. Als Grundlage für das Differenzierungsprotokoll dienten die Arbeiten von Curti *et al.*, Luft *et al.*, Lotze *et al.* und Steinman *et al.*, die eine dendritische Differenzierung unter der Einwirkung von GM-CSF und IL-4 beobachtet haben (Curti, *et al* 2001), (Luft, *et al* 1998), (Lotze 1999), (Steinman 1991).

Im nächsten Schritt sollte die Charakterisierung, der bei der Differenzierung relevanten Signalwege, erfolgen. Der Hauptfokus der Arbeit sollte dabei auf drei intrazellulären Signalwegen der Zelle, der mitogenen Signalkaskade (MAPK/ERK), Protein Kinase C (PKC) gekoppelten Prozessen und dem JAK/STAT Signalweg liegen, da diese essentielle Prozesse der Zelle steuern.

Nach Charakterisierung der Signalwege, sollte deren Relevanz im Differenzierungsprozeß durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren untersucht werden, sowie die Beteiligung relevanter Transkriptionsfaktoren. Der Fokus der Arbeit sollte dabei auf dem Transkriptionfaktor PU.1 liegen, da von Anderson *et al.* gezeigt wurde, daß die Differenzierung von Dendritischen Zellen von diesem Faktor abhängig ist (Anderson, *et al* 2000).

2. Material und Methoden

2.1. Methoden der Molekularbiologie

2.1.1. Verwendete Plasmide

Expressionsplasmide		
Name	Eigenschaft	Bezugsquelle/ Literatur
pTARGET	Expressionsplasmid für eukaryotische Zellen. Es enthält einen Cytomegalovirus Promotor und ein SV40-Polyadenylierungssignal. Zwischen ihnen befindet sich eine „TA-multiple cloning site“. Für die Selektion enthält das Plasmid ein Kanamycin bzw. Neomycin Resistenzgen.	Promega, Mannheim
pIRES2-EGFP	Expressionsplasmid für eukaryotische Zellen. Es enthält einen Cytomegalovirus Promotor eine nachgeschaltete MCS, gefolgt von einem IRES-Element, an die das Fluoreszenzgen EGFP gekoppelt ist. Die RNA wird durch ein SV40-Polyadenylierungssignal terminiert. Für die Selektion enthält das Plasmid ein Kanamycin bzw. Neomycin Resistenzgen.	Clontech, Saint-Germain-en-Laye
pHis-GATA-1	Expressionsplasmid für den His-markierten GATA-1 Transkriptionsfaktor. Basierend auf pTARGET.	diese Arbeit
pIRES2-HA-PU.1-EGFP	Expressionsplasmid für den HA-getagte PU.1 Transkriptionsfaktor. Basierend auf pIRES2-EGFP.	diese Arbeit

Reporterplasmide		
Name	Eigenschaft	Bezugsquelle/ Literatur
pTL-Luc	Das Plasmid enthält 5 Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor GAL4, sowie einen TK Minimalpromotor mit nachgeschaltetem Luciferasegen.	Panomics, Heidelberg

pPU.1-Luc Reporter	Das Plasmid enthält 5 Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor PU.1, sowie einen TK Minimalpromotor mit nachgeschaltetem Luciferasegen. Basierend auf pTL-Luc.	diese Arbeit
pGATA-1-Luc Reporter	Das Plasmid enthält 5 Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor GATA-1, sowie einen TK Minimalpromotor mit nachgeschaltetem Luciferasegen. Basierend auf pTL-Luc.	diese Arbeit

2.1.2. Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma MWG (Ebersberg) und der Firma OPERON (Köln) bezogen und auf eine Standardkonzentration von 100 pmol/µl eingestellt.

Konstruktion des Plasmids pIRES2-HA-PU.1-EGFP (HA-tag)

sense: 5'-GCC ACC ATG TAC CCC TAC GAC GTG CCC GAC TAC GCC
GGC GAA GGG TTT CCC CTC GTC CCC CCT CCA TCA GAA GAC
CTG GTG CCC- 3'

antisense: 5'- TCA GTG GGG CGG GTG GCG CCG CTC GGC CAG GCC CCC
GCG GCC CAG-3'

Konstruktion des Plasmides pPU.1-Luc Reporter (PU.1 Bindungssequenz)

PU.1 Reporter sense:

5' Phosphat-AGC TTG CAT GCC TGC AGG TGG AAG AGG AAG AGG AAG AGG
AAG AGG AAG AAG CGG AGA CTC TAG AGG GTA TAT AAT GGA TCC-3'

PU.1 Reporter antisense:

5' Phosphat-CCG GGG ATC CAT TAT ATA CCC TCT AGA GTC TCC GCT TCT
TCC TCT TCC TCT TCC TCT TCC TCT TCC ACC TGC AGG CAT GCA-3'

Konstruktion des Plasmids pHIS-GATA-1 (His-tag)

sense: 5'-ATG CAC CAC CAC CAC CAC CAC GGC GAG TTC CCT
GGC CTG GG-3'

antisense: 5'- TCATGAGCTGAGCGGAGCCAC-3'

Konstruktion des Plasmides pGATA-1-Luc Reporter (*GATA-1 Bindungssequenz*)

GATA-1 Reporter sense

5' Phosphat-AGC TTG CAT GCC TGC AGG TGA TAA GAG ATA AGA GAT AAG
AGA TAA GAG ATA AGA AGC GGA GAC TCT AGA GGG TAT ATA ATG GAT CC-3'

GATA-1 Reporter antisense

5' Phosphat-CCG GGG ATC CAT TAT ATA CCC TCT AGA GTC TCC GCT TCT
TAT CTC TTA TCT CTT ATC TCT TAT CTC TTA TCA CCT GCA GGC ATG CA-3'Primer für die Sequenzierung

IRES2 sense 5'-GCT GGT TTA GTG AAC CGT CAG ATC-3'

IRES2 antisense 5'-GCC TTA TTC CAA GCG GCT TC-3'

T7 promoter sense 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'

GATA-1 sequ. 2 sense 5'-GAGCACAGCCACCGCTGCAGC-3'

Primer für den Nachweis spezifischer DC mRNAs*Cathepsin-C*

sense 5'-TTTCTCAGCTCCCTGCAGCA-3'

antisense 5'-CATGCACCCACCCAGTCATT-3'

Fragmentgröße: 481bp

Markerreferenz: (Hashimoto, *et al* 1999)*DC-CK1*

sense 5'-GCCAGGTGTCATCCTCCTAA-3'

antisense 5'-GGCACAATGTCTGCTGAGAA-3'

Fragmentgröße: 436bp

Markerreferenz: (Vissers, *et al* 2001), (Adema, *et al* 1997), (Bruna-Romero, *et al* 2003)*DC-SIGN*

sense 5'-ACAGAGGAGAGCCCAACAACG-3'

antisense 5'-GGTCGAAGGATGGAGAGAAGGA-3'

Fragmentgröße: 236bp

Markerreferenz: (Martinez, *et al* 2005), (Patterson, *et al* 2001), (Turville, *et al* 2001)

MCP-4

sense 5'-ATGACAGCAGCTTTCAACCCC-3'

antisense 5'-CTCCAAACCAGCAACAAGTCAAAT-3'

Fragmentgröße: 451bp

Markerreferenz: (Hashimoto, *et al* 1999)*CD11b*

sense 5'-CTCATGCTCAAAGGAGCTGCTA-3'

antisense 5'-CGAAAGAATGCCTTTAAGATCCTAG-3'

Fragmentgröße: 312bp

Markerreferenz: (Dilioglou, *et al* 2003), (Kandilci and Grosveld 2005), (Platzer, *et al* 2004)*β2-Microglobulin*

sense 5'-CTCGCTCCGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGC-3'

antisense 5'-TAACTTATGCACGCTTAACTATC-3'

Fragmentgröße: 704 bp

Markerreferenz: (Bethea and Forman 1990), (Cylwik and Szmitkowski 1997)

2.1.3. Herstellung kompetenter Bakterien nach der CaCl₂-Methode

Der jeweilige Bakterienstamm wurde in 5 ml LB-medium ohne Selektionsantibiotikum angeimpft und über Nacht bei 37° C und 200 rpm geschüttelt. Am Folgetag wurden je 2,5 ml der Übernachtskultur in 100 ml frisches LB-Medium überführt und bei 37° C und 200 rpm im Schüttler inkubiert. Das Wachstum der Bakterien wurde photometrisch überwacht und bei einer optischen Dichte von 0,5 bei 550 nm (OD₅₅₀) (Gene Quant RNA/DNA Calculator, Amersham, Buckinghamshire, UK) war die Inkubation abgeschlossen, da die Bakterien sich bei dieser Dichte in einer logarithmischen Wachstumsphase befinden. Die Kultur wurde für 5 min. auf Eis gestellt und anschließend erfolgte die Pelletierung in zwei 50 ml Röhrchen (4500rpm, 4° C, 10 min., Varifuge RF, Heraeus Sepatech, Osterode). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in je 20 ml TFB1-Puffer aufgenommen. Nach einer Inkubationszeit von 5 min. auf Eis wurden die Zellen unter den oben beschriebenen Bedingungen abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und in je 2 ml TFB2-Puffer resuspendiert. Es folgte eine Inkubationszeit für 15 min. auf Eis, bevor die Bakterien aliquotiert (100 µl pro Aliquot) und bei -80° C eingefroren wurden.

Benötigte Medien und Puffer:

LB-Medium (PEI Medienküche):

Bacto-Trypton	10 g/l
Bacto-Hefeextrakt	10 g/l
NaCl	10 g/l

TFB1-Puffer:

CH ₃ COOK	30 mM	(Merck, Darmstadt)
RbCl	100 mM	(Merck, Darmstadt)
CaCl ₂ / 2 H ₂ O	10 mM	(Merck, Darmstadt)
MnCl ₂ / 4 H ₂ O	50 mM	(Merck, Darmstadt)
Glycerin	15 % (v/v)	(Fluka, Steinheim)

Die Lösung wurde mit Essigsäure auf einen pH-Wert von 5,8 eingestellt und sterilfiltriert.

TFB2-Puffer:

MOPS	10 mM	(Serva, Heidelberg)
CaCl ₂	75 mM	(Merck, Darmstadt)
RbCl	10 mM	(Merck, Darmstadt)
Glycerin	15 % (v/v)	(Fluka, Steinheim)

Die Lösung wurde mit KOH auf einen pH-Wert von 6,5 eingestellt und sterilfiltriert.

2.1.4. Transformation von kompetenten Bakterien

Die kompetenten Bakterien wurden dem -80° C Gefrierschrank entnommen und langsam auf Eis aufgetaut. Für eine Retrofo wurden 50 ng Plasmid-DNA zu den 100 µl Bakterien gegeben und vorsichtig gemischt. Bei einer Klonierung wurde die Plasmid-DNA durch den Ligationsansatz ersetzt. Nach einer Inkubationszeit von 1 h auf Eis erfolgte ein Hitzeschock der Zellen für 1 min. in einem 42° C heißem Wasserbad bzw. Thermoblock und anschließend sofort die Abkühlung bei 4° C für 1 min. Die Bakterien wurden in 500 ml S.O.C.-Medium (Gibco Invitrogen, Carlsbad,

USA) ohne Antibiotikum gegeben und für 60 min. bei 37° C geschüttelt. Von der Bakteriensuspension wurden 300 µl auf einer angewärmten Ampicillin-Agar-Platte (LB-Agar mit 50 µg/ml Ampicillin) ausplattiert. Nach der Inkubation der Platten über Nacht bei 37° C bzw. 2 Tage Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte das Picken von Einzelklonen und das Animpfen von Bakterienminikulturen (5 ml).

2.1.5. Präparationen von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde eine Bakterienkultur angeimpft. Zu diesem Zweck wurden entweder 200 µl einer Vorkultur oder etwas Bakterienmaterial von einem eingefrorenen Glycerin-Stock mit einer Impföse entnommen und in 200 ml LB-Medium mit 50 µg /ml Ampicillin überführt. Die Bakterienkultur wurde über Nacht bei 37° C oder für zwei Tage bei 25° C bei 200 rpm im Schüttler inkubiert. Von der Bakteriensuspension wurde 1 ml für einen Glycerin-Stock entnommen (siehe unten). Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte unter der Verwendung des Maxi-DNA-Präparations Protokolls des QIAGEN Plasmid Purification Kits (QIAGEN, Hilden). Nach der Beendigung der Aufreinigung wurde das ausgefällte DNA-Pellet in 200 – 500 µl H₂O gelöst und die Konzentration und Reinheit der DNA photometrisch bestimmt. Die aufgereinigte DNA wurde für die langfristige Lagerung bei -20° C eingefroren. Bei Plasmiden, die aus einer Neuklonierung hervorgingen, erfolgte eine Überprüfung der DNA durch Sequenzierung (MWG, Martinsried). Zur Lagerung der transformierten Bakterien wurde aus der zuvor abgenommenen Bakteriensuspension ein Glycerin-Stock hergestellt, indem die 1 ml Bakteriensuspension mit 500 µl Glycerin versehen und gut gemischt wurde. Der Stock wurde danach sofort bei -80° C eingefroren.

2.1.6. Photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von RNA oder DNA basiert auf dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren bei 260 nm (OD₂₆₀). Für diese Absorption sind die aromatischen Ringe der Basen verantwortlich. Die Absorption bei 260 nm wird photometrisch in einer Quarzküvette gemessen, da dies das UV-Licht nicht absorbiert. Die DNA Konzentration wurde in einer Küvette mit einer Schichtdicke von 1 cm im Photometer (Gene Quant RNA/DNA Calculator, Amersham, Buckinghamshire, UK) bestimmt. Die Reinheit der DNA wurde durch die zusätzliche Messung der Probe bei 280 nm (OD₂₈₀) abgeschätzt. Das Absorptionsmaximum für Proteine liegt bei dieser Wellenlänge. Dies basiert auf der Absorption der aromatischen Aminosäurereste bei 280 nm. Eine reine DNA-Lösung besitzt einen OD₂₆₀/OD₂₈₀-Wert von 1,8 und eine reine RNA-Lösung einen Wert von 2. Diese Werte sinken signifikant durch Verunreinigungen der Lösung mit Proteinen. Eine

50%ige Protein/DNA-Lösung besitzt nur noch ein Verhältnis OD_{260}/OD_{280} von ca. 1,5.

2.1.7. Restriktion von Plasmid-DNA

Die durchgeführten Restriktionen wurden mit den Restriktionsendonukleasen der Firma New England BioLabs (NEB, Schwalbach) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für einen analytischen Verdau wurden zwischen 0,5 – 1 µg DNA eingesetzt und die Reaktion erfolgte in einem Volumen von 30 µl. Für einen präparativen Verdau wurden 5 µg DNA in einem Volumen von 50 µl eingesetzt. Die DNA Fragmente wurden danach durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

2.1.8. Agarose-Gelelektrophorese

Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden Agarosegele mit einem Agaroseanteil von 0,7 – 3% verwendet. Die Agarose wurde in TAE-Puffer oder bei Fragmenten <100 bp in TBE-Puffer aufgekocht und mit 1µl Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe) pro 100 ml versetzt. Nach einer kurzen Abkühlungsphase wurde das Gel in eine Flachbettgelkammer (Bio-Rad SUB-Cell GT, München) gegossen. Zur Probenvorbereitung wurden die DNA-Proben mit sechsfach konzentriertem Probenpuffer gemischt und dann in die Taschen des Agarosegels aufgetragen. Als Größenmarker wurden ein 100 bp DNA ladder und ein 1 kb DNA ladder (NEB, Schwalbach) verwendet. Die Elektrophorese wurde ca. 1 - 2 h bei 70 – 120 V Gleichstrom durchgeführt (POWER SUPPLY Bio-Rad, München) und die Analyse der DNA-Banden unter UV-Licht durchgeführt.

Für PCR-Produkte oder Restriktionsansätze, die für eine Klonierung weiter verwendet wurden, erfolgte eine Isolierung der gewünschten Banden durch Ausschneiden aus dem Agarosegel mit einem Skalpell. Die Isolation der DNA aus der Agarose erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden) oder mit JetSorb (Genomed GmbH, Löhne) nach den Angaben der Hersteller.

6x-Agarosegel-Probenpuffer:

Histopaque-1077	10 ml	(Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
Glycerin	15 ml	(Fluka, Steinheim)
H ₂ O bidest.	5 ml	(PEI)
Chinolingelb; Indigotin	1 ml – 2 ml	(Wutzig, Sitzendorf)

100 bp oder 1 kb DNA ladder (Gebrauchslösung 50 µg/ml):

DNA ladder (500 µg/ml)	100 µl	(NEB)
6x-Agarosegel-Probenpuffer	300 µl	(siehe oben)
H ₂ O bidest. (Zyclodest)	600 µl	(PEI)

TAE-Puffer pH 8,0:

Tris-Acetat	40 mM	(Merck, Darmstadt)
EDTA	1 mM	(PEI)

TBE-Puffer pH 8,0

Tris-Acetat	89 mM	(Merck, Darmstadt)
Borsäure	89 mM	(Merck, Darmstadt)
EDTA	2 mM	(PEI)

2.1.9. Ligation

Für die Ligationen wurde eine modifizierte T4-DNA-Ligase (Quick Ligase) von NEB (Schwalbach) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Als Leitsatz wurde ein molares Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:3 verwendet, wobei zwischen 100 bis 500 ng des Vektors in einem Gesamtvolumen von 20 µl eingesetzt wurden. Die Reaktion erfolgte bei RT für 5 min., gefolgt von 15 min. bei 4° C. Der Ligationsansatz wurde dann für die Transformation in kompetente Bakterien eingesetzt.

2.1.10. Präparation von Total-RNA und die Herstellung von cDNA

Zur Isolierung von Total-RNA aus eukaryontischen Zellen wurde das RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden) verwendet. Je Ansatz wurde $1 - 3 \times 10^3$ Zellen eingesetzt. Die RNA wurde nach den Angaben der Hersteller aufgereinigt und mit 40 µl RNase freiem H₂O eluiert. Die RNA-Konzentration wurde anschließend photometrisch bestimmt.

Um die Proben von genomischer DNA-Verunreinigungen zu befreien, wurde ein DNase I- Verdau durchgeführt. Dazu wurde die RNA-Probe nach der Aufreinigung mit dem RQ1 RNase-Free DNase (Promega, Mannheim) behandelt bzw. der DNA-Verdau erfolgte während der RNA-Aufreinigung unter der Verwendung des RNase-Free DNase Set (Qiagen, Hilden). Beide Methoden wurden nach den Angaben der Hersteller durchgeführt.

Für die reverse Transkription der RNA in cDNA wurde das SUPERSRIPT First-Strand Synthese System for RT-PCR (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Die RT-Reaktion wurde unter Verwendung eines Oligo(dT)-Primers durchgeführt, wodurch es zu cDNA Synthese der mRNAs kommt. Für jeden Ansatz wurden zwischen 1,5 – 2 µg Total-RNA für die Synthese verwendet. Die resultierende cDNA wurde bei -20° C eingefroren und später für eine PCR eingesetzt.

2.1.11. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur Amplifikation und anschließenden Klonierung des Transkriptionsfaktors PU.1 und GATA-1 wurde das Expand High Fidelity PCR System (Roche, Mannheim) verwendet. Das System besitzt durch die „proofreading“-Polymerase eine besonders niedrige Fehlerrate. Die für die PCR benötigten Desoxyribonukleotide wurden von der Firma NEB bezogen. Von diesen wurde eine Stammlösung angesetzt, die je 5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP enthielt. Die Reaktion wurde in dünnwandigen PCR-Gefäßen im Thermocycler (PTC-200, MJ Research) durchgeführt.

Für die Durchführung der PCR wurden folgende Bedingungen gewählt:

Denaturierung:	94° C	2 min.	
Denaturierung:	94° C	45 sec.	} 31 Zyklen
Primer-Annealing:	55° C	30 sec.	
Primer-Extension:	72° C	2 min.	
Primer-Extension:	72° C	7 min.	
	4° C		

Standardansatz:

10-50 ng cDNA

10 mM jedes Desoxyribonucleotids

10 pmol Plus-Primer

10 pmol Minus-Primer

10 µl PCR-Puffer mit MgCl₂

0,75 µl Enzym-Lösung (2,6 Units)

ad 100 µl H₂O bidest.

10 µl des PCR Ansatzes wurden nach der Reaktion zur Überprüfung im Agarosegel analysiert und nach positivem Ergebnis der Rest des PCR-Ansatzes aufgereinigt und für die Klonierung von pIRES2-HA-PU.1-EGFP und pHis-GATA-1 verwendet.

Zur analytischen Amplifikation der dendritischen Zellmarker wurde das Phusion PCR System (NEB, Schwalbach) verwendet. Das System besitzt durch die „proofreading“-Polymerase eine besonders niedrige Fehlerrate. Die für die PCR benötigten Desoxyribonukleotide wurden von der Firma NEB bezogen. Von diesen wurde eine Stammlösung angesetzt, die je 5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP enthielt. Die Reaktion wurde in dünnwandigen PCR-Gefäßen im Thermocycler (PTC-200, MJ Research) durchgeführt.

Für die Durchführung der PCR wurden folgende Bedingungen gewählt:

Denaturierung:	98° C	30 sec..	} 35 Zyklen
Denaturierung:	98° C	10 sec.	
Primer-Annealing:	50° C	30 sec.	
Primer-Extension:	72° C	30 sec.	
Primer-Extension:	72° C	10 min.	
	4° C		

Standardansatz:

2 ng cDNA

10 mM jedes Desoxyribonucleotids

10 pmol Plus-Primer

10 pmol Minus-Primer

10 µl 5x Phusion HF Buffer

0,5 µl Enzym-Lösung

ad 50 µl H₂O bidest.

2.1.12 Klonierung des Expressionsplasmids pIRES2-HA-PU.1-EGFP und pHis-GATA-1

Für die Klonierung von PU.1 und GATA-1 wurde die mRNA von KG1a, K-562 und TF-1 Zellen gewonnen und in cDNA umgeschrieben (siehe Kapitel 2.1.10). Über spezifische Primer wurde PU.1 mit einem HA-tag und GATA-1 mit einem His-tag amplifiziert (siehe Kapitel 2.1.11). Nach der Aufreinigung der PCR Produkte wurden diese über TA-Klonierung in das Expressionsplasmid pTARGET ligiert (siehe Kapitel 2.1.9) und in Bakterien transformiert. Für beide Plasmide erfolgte die Überprüfung per Sequenzierung. Für PU.1 wurden nur Klone mit verkehrter Orientierung gefunden und daher erfolgte eine Subklonierung der HA-PU.1-Sequenz mit den Restriktionsenzymen *Bam*H I und *Sal* I (NEB, Schwalbach) in das Expressionsplasmid pIRES2-EGFP (Abb. 2.1).

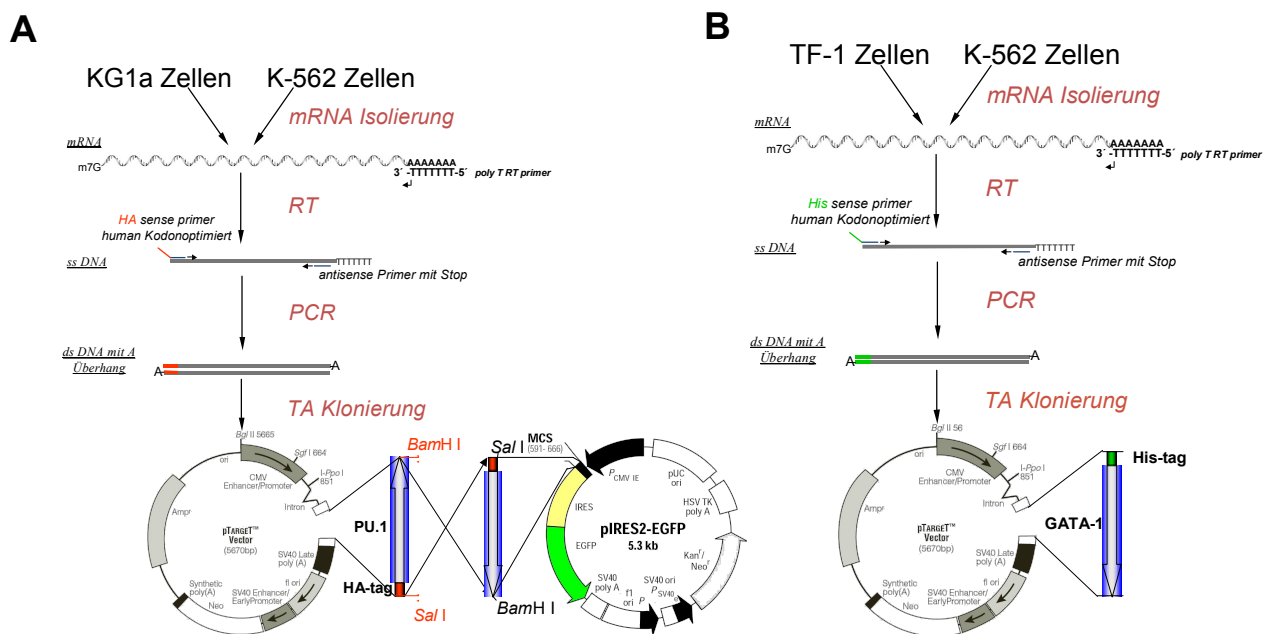


Abbildung 2.1: Schematische Abbildung der Klonierung von pIRES2-HA-PU.1-EGFP (A) und pHis-GATA-1 (B)

2.1.13 Klonierung des Reporterplasmids pPU.1-Luc Reporter und pGATA-1-Luc Reporter

Das Reportersystem für PU.1 und GATA-1 basiert auf dem Plasmid pTL-Luc (BioCat/Panomics). Das Plasmid enthält 5 Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor GAL4, welche durch die PU.1 Bindungsstelle **AGGAAG** aus dem PEA3 „Enhancer Motiv“ oder durch die GATA-1 Bindungsstelle **AGATAA** ausgetauscht wurden, sowie einen TK Minimalpromotor mit nachgeschaltetem Luciferasegen. Der Austausch erfolgte durch die Restriktion von pTL-Luc mit den Restriktionsenzymen *Hind* III und *Xma* I. Das Plasmidbackbone wurde durch Aufreinigung im Agarosegel isoliert und mit der neue Bindungssequenz legiert (Abb. 2.2).



Abbildung 2.2: Schematische Abbildung des GATA-1 und PU.1 Reporters.

2.2 Methoden der Zellbiologie

2.2.1 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Besondere Eigenschaften	Referenzen
293T	Humane embryonale Nierenzelllinie	Transformiert durch das große T-Antigen von SV40. Vermehrt transfizierte DNA mit SV40 ori. (Suspensionszellen)	(DuBridge, <i>et al</i> 1987)
NIH3T3	Murine embryonale Fibroblastenzelllinie	Wachstum der Zellen in Monolayer Form (adhärente Zellen)	(Jainchill, <i>et al</i> 1969)
HeLa	Humane Gebärmutterhalskrebs-zelllinie	Wachstum der Zellen in epithelialer Monolayer Form (adhärente Zellen)	(Scherer, <i>et al</i> 1953),
TF-1	Knochenmark eines Patienten mit Erythroleukämie	Zellen mit induzierbarem Differenzierungspotential in Richtung von Erythrozyten und Monozyten/Makrophagen (Suspensionszellen)	(Kitamura, <i>et al</i> 1989a), (Kitamura, <i>et al</i> 1989b)
KG-1 & KG-1a	Knochenmark eines Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML)	Myeloide Zellen mit koloniebildendem Potential und Differenzierungspotential in Richtung Dendritische Zellen nach TPA Stimulation. Der Subklon KG-1a verfügt nicht mehr über dieses Potential (Suspensionszellen)	(Koeffler and Golde 1978), (Koeffler 1983)
K-562	Knochenmark eines Patienten mit chronischer myeloider Leukämie (CML)	Zellen mit Differenzierungspotential in Richtung Erythrozyten, Granulozyten und Monozyten (Suspensionszellen)	(Lozzio, <i>et al</i> 1973), (Lozzio and Lozzio 1975), (Rowley, <i>et al</i> 1984)
MUTZ-3	Blut eines Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML FAB M4)	Zellen mit natürlichen Differenzierungspotential (GM-CSF, IL-4) zu Dendritischen Zellen (adhärente Zellen)	(Hu, <i>et al</i> 1996), (Masterson, <i>et al</i> 2002)
5637	Etabliert aus einem Harnblasen Karzinom eines Patienten	Diese Zelllinie produziert verschiedene Zytokine z. B. SCF, IL-1, IL-6, G-CSF, GM-CSF, usw. (adhärente Zellen)	(Welte, <i>et al</i> 1985)

2.2.2 Kultivierung von Zelllinien

Die hämatopoetischen Zelllinien K562, TF-1 und KG-1a wurden in RPMI-1640-Medium (PEI) mit 10% hitzeinaktiviertem (40 min. bei 56° C) FKS (fötale Kälberserum, Biochrom KG, Berlin), 2 mM L-Glutamin (Biochrom KG, Berlin), 50 µg/ml Streptomycin (Biochrom KG, Berlin) und 100 Einheiten/ml Penicillin in einem Zellinkubator (37° C, 5% CO₂, 95% gesättigte Wasserdampfatosphäre, Cytoperm, Heraeus, Osterode) kultiviert. Das Medium für die TF-1 Zellen enthielt zusätzlich 5 ng/ml rhIL-3. Die Zelllinie Mutz-3 wurde mit 65% alpha-MEM (Invitrogen, Karlsruhe), 20% hitzeinaktiviertem FKS, 15% konditioniertes Medium von 5637 Zellen sowie 2 mM L-Glutamin, 50 µg/ml Streptomycin und 100 Einheiten/ml Penicillin im Zellinkubator unter den oben genannten Bedingungen kultiviert. Zweimal pro Woche, bei einer Dichte von ca. 1 x 10⁶ Zellen/ml, wurden die Zellen je nach deren Wachstumsgeschwindigkeit zwischen 1:10 bis 1:20 gesplittet.

Adhärente Zellen wurden in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium, PEI) mit 10% hitzeinaktiviertem FKS, 2 mM L-Glutamin, 50 µg/ml Streptomycin und 100 Einheiten/ml Penicillin in einem Zellinkubator kultiviert. Zweimal pro Woche wurden die konfluenten Zellen durch Ablösen mit PBS+EDTA (PEI) im Verhältnis 1:10 gesplittet. Bei HeLa und 5637 Zellen wurde zum Ablösen der Zellen zusätzlich 0,05% Trypsin (PEI) verwendet.

Die langfristige Lagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff. Dazu wurden je 1 x 10⁶ Zellen pelletiert (1100 rpm, 4° C, 5 min., Multifuge 3_{S-R}, Heraeus / Thermo, Langenselbold) und in 1 ml kaltem FKS mit 10% DMSO (Merck, Darmstadt) resuspendiert. Die Zellen wurden in ein vorgekühltes 2 ml-Kryoröhrchen überführt und 24 h bei -80° C eingefroren und anschließend in den flüssigen Stickstoff zur längerfristigen Lagerung überführt.

Zum Ankultivieren der eingefrorenen Zellen wurden diese aus der Stickstofflagerung in ein 37° C warmes Wasserbad gestellt und sofort nach dem Auftauen in 30 ml frisches raumtemperiertes Medium zum Waschen überführt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (1100 rpm, RT, 5 min., Multifuge 3_{S-R}, Heraeus / Thermo, Langenselbold) und in 15 ml frischem Medium resuspendiert. Die Suspension wurde in eine Zellkulturflasche überführt und nach den oben genannten Bedingungen kultiviert.

2.2.3 Expansion von humanen hämatopoetischen Stamm- / Progenitorzellen (HSC)

Die angereicherten und bei -180° C eingefrorenen CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen (Cambrex BIO SCIENCE, Etterbeek, Belgien) wurden in einem Wasserbad bei 37° C aufgetaut und in 30 ml angewärmtem StemSpan SFEM Medium (StemCell Technologies INC, Vancouver) aufgenommen. Zum Waschen

wurden die Zellen im nächsten Schritt für 7 min. bei 1100 rpm (Multifuge 3_{S-R}, Heraeus / Thermo, Langenselbold) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in 5 ml StemSpan SFEM Medium, ein speziell modifiziertes Iscove's MDM Medium mit Zytokinen und 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 292 µg/ml L-Glutamin (Invitrogen) überführt. Es wurden drei Zytokinkombinationen ausgetestet. Die erste Kombination CC100 (StemCell Technologies INC, Vancouver) enthielt rh Flit-3 Ligand (*Flt-3*) 100 ng/ml, rh stem cell factor (*SCF*) 100 ng/ml, rh Interleukin-3 (*IL-3*) 20 ng/ml und rh Interleukin-6 (*IL-6*) 20 ng/ml. Die zweite Kombination CC110 enthielt rh Flit-3 Ligand (*Flt-3*) 100 ng/ml, rh stem cell factor (*SCF*) 100 ng/ml, rh Thrombopoetin (*TPO*) 100 ng/ml und die dritte CC200 Thrombopoetin (*TPO*) 50 ng/ml, stem cell factor (*SCF*) 50 ng/ml, Interleukin-3 (*IL-3*) 10 ng/ml. Die Kultivierung der Zellen erfolgte serumfrei, da Bestandteile des Serums die Differenzierung der HSCs einleiten können, bei 37°C und 99% Luftfeuchtigkeit. Jeden zweiten Tag wurden die Zellen gezählt, mit neuem Medium versorgt und das Expansionsvolumen durch Splitten erhöht. 5 -7 Tage nach Start der Expansion wurden die Zellen per FACS auf die Expression von CD34, CD38, CD117 und Differenzierungsmarkern analysiert, sowie für weitere Experimente eingesetzt.

2.2.4 Differenzierung von Dendritischen Zellen aus CD34⁺-Zellen (HSC)

Für die Differenzierung von Dendritischen Zellen aus den expandierten CD34-positiven Zellen wurden diese in einer Dichte von je 5×10^5 Zellen pro Loch einer 12-Loch-Platte ausgesät. Als Differenzierungsmedium wurde StemSpan SFEM (StemCell Technologies INC, Vancouver) supplementiert mit 100 ng/ml rh GM-CSF, 20 ng/ml rh IL-4, 20 ng/ml rh SCF mit und ohne 100 ng/ml rhFlt-3 verwendet. Die Zellen wurden für 5 Tage mit dem Differenzierungsmedium kultiviert. Danach erfolgte für zwei weitere Tage eine Kultivierung mit StemSpan SFEM supplementiert mit 20 ng/ml rhTNF- α , zum weiteren Ausreifen der Zellen. Nach 7 Tagen erfolgte die Analyse der Zellen.

2.2.5 „Colony forming assay“ Progenitorzell-Assay

Nach Expansion der CC34⁺ Zellen wurden diese ohne oder mit Inhibitoren in MethoCult-Medium (StemCell Technologies INC, Vancouver) ausplattiert, um die Anzahl der Progenitorzellen, sowie deren Differenzierungspotential bestimmen zu können. Zu diesem Zweck wurden 1500 Zellen in 300 µl StemSpan Medium aufgenommen und mit 3 ml vorgewärmten MethoCult GF H4434 gemischt. MethoCult GF H4434 enthält Zytokine (50 ng/ml *SCF*, 10 ng/ml *GM-CSF*, 10 ng/ml *IL-3*, 3 U/ml *Epo*) zur Bildung von Erythrozyten, Granulozyten und Makrophagen. Nach Inkubation von ca. 5 min. wurden jeweils 1 ml mit 500 Zellen in eine 35 mm

Petrischale ausplattiert und zusammen mit mindestens einer mit Wasser gefüllten Petrischale in einer 140 x 20 mm Schale mit Entlüftungsnocken (Nerbe plus, Winsen/Luhe) bei 37° C inkubiert. Nach 14 bis 16 Tagen wurden die Kulturen ausgewertet, indem die Frequenz der jeweilig gebildeten Kolonien bestimmt wurde. Dies erfolgte bei einer 50 fachen Vergrößerung mit Hilfe einer Rasterplatte am Mikroskop (Carl Zeiss, Göttingen).

Tabelle aus Human Hematopoietic Colonies in Health and Disease (Nissen-Druey, et al 2005)

Kolonietyp	<i>Epo</i>	<i>SCF</i>	<i>GM-CSF</i>	<i>G-CSF</i>	<i>IL-3</i>
CFU-G	±	(+)	(+)	+	(+)
CFU-M	±	+	++	+	+
CFU-GM	±	++	+++	+	+
CFU-Eo	±	+	++	±	++
BFU-E	++	+++	++	+	+
CFU-E	+++	-	-	-	-
CFU-GEMM	+	+++	+	+	+
CFU-Baso	kein Effekt	+	±	±	±

stimulatorischer (+) und inhibitorischer (-) Effekt der Zytokine; kein Effekt (±)

2.2.6 Aufreinigung primärer Monozyten aus peripherem Blut

Zur Gewinnung primärer Monozyten aus peripherem Blut wurde Vollblut ohne Plasma vom Blutspendedienst des DRK, Frankfurt/Main bezogen. Das Vollblut wurde im ersten Schritt mit PBS 1:2 verdünnt. Für den Separationsschritt der Monozyten wurde der human monocyte enrichment cocktail (CellSystems, St. Katharinen) verwendet. Im folgenden Schritt wurden 30 ml des vorverdünnten Blutes mit 30 ml Lösung 1 (PBS + 2% FKS + 1 mM EDTA) sowie 50 µl/ml RosetteSep Antikörpercocktail versehen und gut gemischt. Während der 20 min. Inkubationszeit bei RT verklumpen unerwünschte mononukleäre Zellen mit den Erythrozyten und können im nächsten Schritt abzentrifugiert werden. Für die Zentrifugation wurde ein Ficoll-Gradient (Histopaque-1077, Sigma, Taufkirchen) von 20 ml in einem 50 ml Falcon-Röhrchen (Greiner, Frickenhausen) vorgelegt und mit dem Blut-Antikörpergemisch überschichtet. Es folgte eine 20 min. Zentrifugation bei RT mit 1200 x g (Multifuge 3_{S-R}, Heraeus /Thermo, Langenselbold). Der angereicherte Monozytenring wurde vorsichtig vom Ficollkissen abgesaugt und 2 mal mit Waschpuffer (PBS + 2% FKS) gewaschen. Die Reinheit der Zellen wurde bestimmt (FACS) und lag zwischen 80 – 90%. Die Ausreifung der Monozyten erfolgte analog zu Abschnitt (2.2.4) mit dem Unterschied, daß die Stimulation mit GM-CS und IL-4 nur für 2 Tage erfolgte.

2.2.7 Zellstimulatoren und -inhibitoren

Stimulation von primären hämatopoetischen Stammzellen:

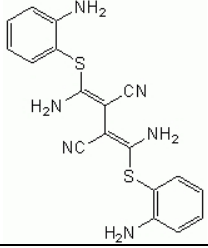
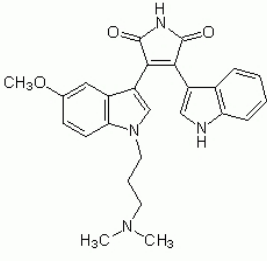
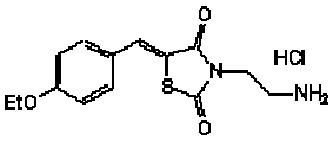
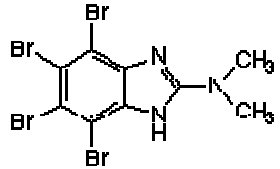
Zur Aktivierung von HSCs wurden 10 ng/ml TPA (Sigma, Taufkirchen) in das Medium gegeben.

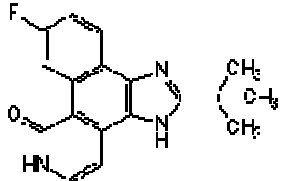
Stimulation von Zelllinien:

Für eine Aktivierung von Zelllinien wurden 20 ng/ml TPA für 12 – 24 h auf die Zellen gegeben.

Zur kurzfristigen Aktivierung der MAPK ERK wurden die Zellen für 10 – 30 min. mit 100 ng/ml TPA stimuliert. Zur zusätzlichen Stimulation von JNK/SAPK wurden 0,5 μ M Ionomycin (Sigma, Taufkirchen) und zur Stimulation von p38 wurden 10 μ g/ml Anisomycin (Sigma, Taufkirchen) eingesetzt.

Eingesetzte Inhibitoren:

Inhibitor	Strukturformel	Quelle	Stammlösung	Endkonzentration
MEK-Inhibitor U0126		Promega, Mannheim	10 mM	5 – 10 μ M
PKC –Inhibitor Gö 6983		Calbiochem, Cambridge, UK	10 μ g/ ml	1 μ M
ERK-Inhibitor		Calbiochem, Cambridge, UK	30 mM	30 μ M
CKII-Inhibitor DMAT		Calbiochem, Cambridge, UK	10 mM	500 nM

Januskinase- Inhibitor JAK Inhibitor I		Calbiochem, Cambridge, UK	10 mM	250 nM
--	---	------------------------------	-------	--------

Alle Inhibitoren wurden in DMSO angesetzt und bei -20 oder -80 °C gelagert.

2.2.8 Transiente Transfektion von ädhärenten Zellen

LipofectAMINE (DNA):

Adhärenente Zellen (293T und NIH 3T3) wurden mit LipofectAMINE Plus (Invitrogen, Karlsruhe) transfiziert. Dazu wurden in einer 6-Loch-Platte je $7,5 \times 10^5$ Zellen ausgesät, so daß die Zellen am folgenden Tag zu ca. 80% konfluent waren. 1-2 µg DNA wurden in einem Polystyrolröhrchen vorgelegt und mit 100 µl OPTI-MEM1 (Invitrogen, Karlsruhe) verdünnt. Nach Zugabe von 6 µl PLUS-Reagenz folgte eine Inkubation für 15 min. bei Raumtemperatur. Es folgte die Zugabe von je 100 µl OPTI-MEM1 mit 5 µl LipofectAMINE und eine erneute Inkubation von 15 Minuten. In dieser Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und danach mit 800 µl OPTI-MEM1 überschichtet. In jedes 6-Loch-Platte wurden 200 µl der DNA-Lipid-Komplexe gegeben und mit den Zellen für 4 – 5 h im Zellinkubator inkubiert. Anschließend wurde der Überstand von den Zellen abgenommen und durch 3 ml neues DMEM-Vollmedium ersetzt. Nach 48 h im Inkubator erfolgte die Analyse der Zellen.

FuGENE 6 (DNA):

Adhärenente Zellen (HeLa) wurden mit FuGENE 6 (Roche, Mannheim) transfiziert. Dazu wurden in einer 6-Loch-Platte zwischen 5×10^5 bis 8×10^5 Zellen ausgesät, so daß die Zellen am folgenden Tag ca. 80 – 90% konfluent waren. Für die Transfektion wurden 100 µl serumfreies DMEM Medium (PEI) in einem Polystyrolröhrchen vorgelegt und mit 3 – 6 µl FuGENE (DNA zu FuGENE Verhältnis = 1:3) versehen und sofort gemischt. Die Lösung wurde für 5 min. inkubiert und danach mit 1 – 2 µg DNA versetzt und gut durchmischt. Die Bildung der Transfektionskomplexe ist nach einer weiteren Inkubationszeit von 15 min. abgeschlossen und der 100 µl Reaktionsansatz wurde langsam zu den mit neuem DMEM-Vollmedium versorgten Zellen getropft. Nach 48 Stunden im Inkubator erfolgte die Analyse der Zellen.

HiPerFect (siRNA und DNA):

Für die Transfektion von HeLa Zellen mit siRNA wurden das HiPerFect „Fast-Forward Protocol“ (QIAGEN, Hilden) verwendet. 300 - 600 ng siRNA (10 – 20 nM) wurden in ein Polystyrolröhrchen vorgelegt und mit 100 µl serumfreiem DMEM

verdünnt. Für die Bildung der Transfektionskomplexe wurden 12 µl HiPerFect zugegeben, die Lösung mit der Pipette resuspendiert und für 10 min. inkubiert. Für diesen Transfektionsschritt wurden in eine 6-Loch-Platte je 5×10^5 Zellen ausgesät und sofort mit 100 µl Transfektionsansatz (tropfenweise) gemischt. Eine Durchmischung der Zellen mit den Transfektionskomplexen erfolgte durch leichtes Schütteln der 6-Loch-Platte. Nach 48 Stunden im Inkubator erfolgte die Analyse der Zellen.

Für die Koftransfektion von DNA und siRNA wurde ein modifiziertes HiPerFect Protokoll verwendet. Dazu wurden in einer 6-Loch-Platte je 5×10^5 Zellen ausgesät, so daß die Zellen am folgenden Tag zu ca. 80% konfluent waren. 1-2 µg DNA sowie 600 ng siRNA (20 nM) wurden in ein Polystyrolröhrchen vorgelegt und mit 50 µl HBS-Puffer verdünnt. In einem zweiten Polystyrolröhrchen werden 12 µl HiPerFect mit 50 µl HBS-Puffer verdünnt. Es folgte eine Inkubationszeit von 5 min. bevor die beiden Lösungen (DNA + HiPerFect) miteinander gemischt wurden. Nach weiteren 15 min. wurde der 100 µl Reaktionsansatz langsam zu den mit neuem DMEM-Vollmedium versorgten Zellen getropft. Nach 48 Stunden im Inkubator erfolgte die Analyse der Zellen.

HBS-Puffer:

Hepes	50 mM	(Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
NaCl	150 mM	(Merck, Darmstadt)

Der pH-Wert der Lösung wurde auf 7,4 eingestellt und die Lösung sterilfiltriert.

2.2.9 Durchflußzytometrie (Fluorescence-Activated Cell-Sorting: FACS)

Die Durchflußzytometrie ist eine Methode zur Charakterisierung von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Partikeln (Zellen, Kunststoffkügelchen usw.) innerhalb eines Gemisches. Dabei können die Partikel, z.B. bei Zellen, unter anderem nach ihrer Größe und Granularität getrennt werden. Dies wird ermöglicht, indem die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom nacheinander an einem Laserstrahl vorbei geleitet werden und die entstehende Lichtbeugung und -streuung sowie emittierte Fluoreszenz von Detektoren aufgenommen und anschließend mathematisch verrechnet wird. Die Zellen können durch fluoreszenzfarbstoffgekoppelte Antikörper markiert werden. Dadurch lassen sich diese Zellen über die Expression von Oberflächenproteinen charakterisieren.

2.2.9.1 Analyse der Expression von Oberflächenantigenen durch Antikörpermarkierung

Für die Färbung wurden je 2×10^5 Zellen verwendet. Die Dendritischen Zellen wurden dazu mit Trypsin/EDTA abgelöst und in ein 5 ml-Rundbodenröhrchen (Falcon) überführt und mit 500 μ l FACS-Waschpuffer gewaschen. Die HSCs wurden direkt in ein 5 ml-Rundbodenröhrchen überführt und mit 500 μ l FACS-Waschpuffer gewaschen und abzentrifugiert (6 min., 11000 upm, 4° C, Multifuge 3_{S-R}, Heraeus /Thermo, Langenselbold). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 100 μ l FACS-Waschpuffer resuspendiert. Für die Dendriten wurde eine Vorinkubation mit 4 μ l FcR-Blocking Reagent (Milteny Biotec, Bergisch Gladbach) für 10 min. bei 4°C durchgeführt, um unspezifische Bindung der Antikörper an mögliche Fc-Rezeptoren (Expression auf monozytären Zwischenstufen der DC-Differenzierung) zu verhindern. Je nach Antikörper wurden zwischen 1 μ l und 6 μ l zu den resuspendierten Zellen gegeben. Für Mehrfachfärbungen wurden je ein Ansatz mit den einzelnen Antikörpern, sowie ein Gemisch, verwendet. Als Negativkontrolle wurden Zellen mit einem unspezifischen Immunglobulin des gleichen Typs (Isotyp) in gleicher Konzentration wie der spezifische Antikörper inkubiert. Nach 30 min. bei 4°C wurden der Antikörper-Zellsuspension 500 μ l FACS-Waschpuffer zugefügt und die Zellen zentrifugiert (6 min., 11000 upm, 4° C, Multifuge 3_{S-R}, Heraeus /Thermo, Langenselbold). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen ein zweites Mal mit 500 μ l FACS-Waschpuffer gewaschen. Zuletzt wurden die Zellen in 200 μ l FACS-Waschpuffer aufgenommen und mit einem FACScan (LSRII, Becton Dickinson) analysiert.

FACS-Waschpuffer:

hitzeinaktiviertes FKS	1 % (v/v)	(Biochrom, Berlin)
NaN ₃	0,01 % (v/v)	(Merck, Darmstadt)
in PBS		(PEI)

Liste der für die FACS-Färbung verwendeten Antikörper:

Antikörper	Chromophor	Hersteller	Isotypkontrolle	Hersteller
α -CD1a	Phycoerythrin (PE)	Biolegend	Mouse IgG1	Biolegend
α -CD11c	APC	Biolegend	Mouse IgG1	Biolegend
α -CD14	Pacific Blue	Biolegend	Mouse IgG2a	Biolegend

α -CD34	Phycoerythrin (PE)	Beckman Coulter	Mouse IgG1	Beckman Coulter
α -CD38	Phycoerythrin-Cy5 (PE-Cy5, PC5)	Beckman Coulter	Mouse IgG1	Beckman Coulter
α -ILT-3 (CD85k)	Phycoerythrin-Cy5 (PE-Cy5, PC5)	Beckman Coulter	Mouse IgG1	Beckman Coulter
α -CD117	Phycoerythrin (PE)	Biolegend	Mouse IgG1	Biolegend
α -HLA-DR	APC-Cy7	Biolegend	Mouse IgG2a	Biolegend

2.3 Methoden der Proteinbiochemie

2.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer Lösung wurde die Methode des Bradford-Assays angewendet. Diese Methode basiert auf einer Komplexbildung kationischer und nichtpolarer, hydrophober Seitenketten der Proteine mit dem Farbstoff Coomassie-Brillantblau G 250. In Gegenwart von Proteinen verschiebt sich sein Absorptionsmaximum von 465 zu 595 nm. Der Grund hierfür ist, daß die Stabilisierung von unprotonierten, anionischen Sulfat-Formen, die durch die Anlagerung an Proteine begünstigt werden. Die Absorption bei 595 nm wird spektroskopisch gemessen und korreliert direkt mit der Proteinkonzentration.

Standardansatz: 200 μ l Protein Assay Reagenz (Bio-Rad, München)

800 μ l H₂O bidest. (PEI)

5 μ l Proteinlösung

Die Ansätze wurden zur Komplexbildung für 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Detektion bei 595 nm im Photometer (Gene Quant RNA/DNA Calculator, Amersham, Buckinghamshire, UK). Anhand einer vorher eingemessenen Eichkurve, die mit bekannten Mengen an BSA erstellt wurde, erfolgte die Umrechnung der OD-Werte in Proteinkonzentrationen.

2.3.2 Zelllyse

Zum Aufschluß der Zellen wurden diese zunächst abzentrifugiert (1100 rpm, 5 min., Multifuge 3 S-R, Heraeus /Thermo, Langensfeld) und einmal mit PBS (PEI) gewaschen. Anschließend wurden die Zellpellets in dem entsprechenden Lysispuffer aufgenommen (ca. 1×10^4 Zellen/ μ l Lysepuffer), gut resuspendiert in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und für 30 min. auf Eis inkubiert. Die Lysate wurden durch abzentrifugieren (13000 rpm, 15 min., 4° C, Biofuge Fresco, Heraeus, Osterode) geklärt und der Überstand entweder bei -20° C eingefroren oder direkt für Western Blot, Immunopräzipitationen, Coomassie-Färbung oder Luciferase-Assay eingesetzt. Für die Analyse der Luciferaseaktivität im Luciferase-Assay wurde für den Aufschluß der Zellen der Passive Lysis Buffer (Promega, Mannheim) verwendet, für die restlichen Experimente entweder TLB oder RIPA.

TLB:

Stammlösung:

Tris pH 7,4	20 mM	(PEI)
NaCl	137 mM	(Merck, Darmstadt)
Glycerin	1 % (v/v)	(Fluka, Steinheim)
EDTA ph 8,0	2 mM	(PEI)
Triton-X-100	1 % (v/v)	(Sigma, Taufkirchen)
Na- β -Glycerophosphat	50 mM	(Sigma, Taufkirchen)

vor Gebrauch frisch zugegeben:

complete (Protease-Inhibitor-Cocktail)	1 Tablette/ 50 ml	(Roche, Mannheim)
Na-Orthovanadate	1 mM	(Calbiochem, Cambridge)
Benzamidin	5 mM	(Sigma, Taufkirchen)
Leupeptin	5 μ g/ml	(Sigma, Taufkirchen)
Aprotinin	5 μ g/ml	(Sigma, Taufkirchen)

RIPA:

Stammlösung:

Tris pH 8,0	25 mM	(PEI)
-------------	-------	-------

NaCl	137 mM	(Merck, Darmstadt)
Glycerin	1 % (v/v)	(Fluka, Steinheim)
Na-Deoxycholat	0,5 % (v/v)	(Sigma, Taufkirchen)
NP-40	1 % (v/v)	(USB, Cleveland, USA)
EDTA pH 8,0	2 mM	(PEI)
SDS	0,1 % (v/v)	(Merck, Darmstadt)

vor Gebrauch frisch zugegeben:

complete (Protease-Inhibitor-Cocktail)	1 Tablette/ 50 ml	(Roche, Mannheim)
Na-Orthovanadate	1 mM	(Calbiochem, Cambridge)
Benzamidin	5 mM	(Sigma, Taufkirchen)
Leupeptin	5 µg/ml	(Sigma, Taufkirchen)
Aprotinin	5 µg/ml	(Sigma, Taufkirchen)

2.3.3 Immunpräzipitation

Für die Präzipitation von Proteinen wurde zwischen 300 µg und 1500 µg Zelllysat eingesetzt. Alle Arbeiten wurden dabei auf Eis durchgeführt, die Beads wurden mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze pipettiert. Die verwendeten HA-Beads (Roche, Mannheim) wurden im entsprechenden Lysepuffer (siehe Kapitel 2.3.2) gewaschen und das Zelllysat dem Eppendorf-Reaktionsgefäß zugeführt. Mit dem Lysepuffer wurden die Proben auf 1 ml Gesamtvolumen eingestellt. Die Immunopräzipitation erfolgte für 1 – 2 h bei 4° C in einem „Überkopf“-Rotor. Anschließend wurden die Beads abzentrifugiert (12000 rpm, 30 – 60 sec., Zentrifuge 5415, Eppendorf, Hamburg) und 3 mal mit 1 ml Lysispuffer gewaschen. Danach erfolgte ein letzter Waschschrift mit PBS. Für den Western Blot (siehe Kapitel 2.3.5 und 2.3.6) wurden die Beads mit 30 µl SDS-Probenpuffer aufgeköcht und auf das Gel aufgetragen.

Für das Kinase-Assay wurde HA-PU.1 vom Antikörper und dessen Trägermaterial durch kompetitive Verdrängung mit einem HA-Peptid (1 mg/ml, Roche, Mannheim) abgelöst. Dazu wurden die Beads mit dem Peptid zusammen bei 30° C inkubiert und der Überstand mit dem abgelösten HA-PU.1 durch Zentrifugation gewonnen.

2.3.4 Dephosphorylierung von Proteinen mit Calf Intestinal Phosphatase (CIP)

Zur Dephosphorylierung von Proteinen wurde bei dieser Arbeit die Calf Intestinal Phosphatase von New England Biolabs (NEB, Schwalbach) verwendet. Diese hydrolysiert Serin-, Threonin- und Tyrosinphosphorylierung der Proteine.

Die Dephosphorylierung des Proteins erfolgte in einem 50 µl Ansatz unter der Verwendung des NEB-Puffers 2 für 60 min. bei 37° C im Heizblock.

2.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Gelelektrophorese wandern die von SDS (Natriumdodecylsulfat) umschlossenen Proteine in einem elektrischen Feld durch die Maschen des SDS-Polyacrylamid-Gel, wobei sie entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt werden. Das anionische Detergenz SDS bindet dabei mit den unpolaren Enden an die Proteine und maskiert dabei deren Ladung, sowie mögliche Glykosylierung der Proteine. Die Zugabe von β -Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt) in den Probenpuffer denaturiert die Proteine durch die Reduktion von Disulfidbrücken und die damit verbundene Zerstörung der 3D-Proteinstruktur. Beim Lauf des Gels sammeln sich zunächst die Proteine im Sammelgel, das einen niedrigen Acrylamid-Gehalt hat, und im Trenngel erfolgt die Auftrennung der Proteine in einzelne Proteinbanden.

Für die vorliegende Arbeit wurde das NuPAGE-Gelsystem verwendet. Die Proben wurden mit 4 x SDS-Probenpuffer (Roth, Karlsruhe) versetzt und bei 95° C für 5 min. im Heizblock (Thermomixer 5436, Eppendorf) denaturiert. Nach dem Abkühlen wurden die Proben in die Geltaschen geladen, wobei zur Kontrolle des Molekulargewichtes der Proteinmarker Rainbowmarker RPN 800 (Amersham, Freiburg) verwendet wurde. Die Auftrennung der Zellysate erfolgte im 4 – 12%ige Bis-Tris-Gradientengel (Invitrogen, Karlsruhe). Als Laufpuffer wurde der MOPS/SDS-Laufpuffer verwendet. Die Elektrophorese lief zunächst bei 80 V, bis die Proben in das Sammelgel eingelaufen waren, und dann bei 120 – 150 V.

MOPS/SDS-Laufpuffer 1 l (20x):

MOPS	1 M	(Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
Tris	1 M	(Merck, Darmstadt)
SDS	2 %	(Merck, Darmstadt)
EDTA	20,5 mM	(Merck, Darmstadt)

Der Puffer wurde mit Zyclodest (entsalztes H₂O PEI) auf 1 Liter aufgefüllt. Vor der Verwendung des Puffers wurde dieser auf eine einfache Konzentration verdünnt (pH 7,7).

Für die bessere Reproduktion der Ergebnisse wurde für einige Experimente der Laufpuffer NuPAGE MOPS SDS Running Buffer (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

2.3.6 Western Blot-Analyse

Die Methode des Western Blots dient dem spezifischen Nachweis von Proteinen aus einem Proteingemisch. Die Proben werden dazu zunächst durch ein SDS-Gel aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgt durch das Wandern der einzelnen Proteine im elektrischen Feld durch die Gelmatrix, wobei die Wanderung vom Molekulargewicht der einzelnen Proteine abhängt. Anschließend werden die aufgetrennten Proteine auf eine Membran (Nitrozellulose oder PVDF) übertragen und dadurch immobilisiert. Dieser sogenannte Blotting-Vorgang kann durch Kapillartransfer oder Elektrotransfer erfolgen. In dieser Arbeit wurde die Methode des Elektroblottings verwendet. Nach der Immobilisierung erfolgt die spezifische Detektion des entsprechenden Proteins durch den Einsatz von Antikörpern. Über einen geeigneten Sekundärantikörper, der an eine Peroxidase gekoppelt ist, kann ein Chemilumineszenzsubstrat zur Lichtemission angeregt und auf einem Röntgenfilm detektiert werden.

Für den Transfer der Proteine aus dem SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond-C Extra, Amersham, Buckinghamshire, UK) wurde eine Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell Protean III (Bio-Rad, München) verwendet. Dabei wurde unter der Vermeidung von Luftblasen zwischen Gel und Membran zwischen zwei Filterpapieren (Whatmann, Maidstone, UK) in die entsprechende Halterung eingelegt (siehe Schema).

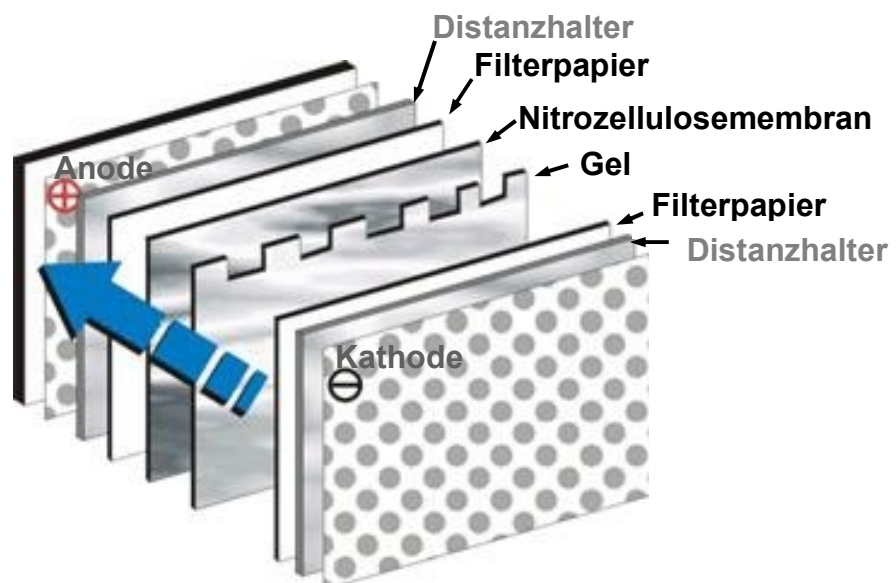


Abbildung 2.3: Schematischer Aufbau der Blotting-Apparatur

Die Kammer wurde mit Blotting-Puffer befüllt und der Proteintransfer erfolgte durch eine angelegte Stromstärke von 330 mA (80 - 90 V) bei 4° C für 1h.

Der Proteintransfer auf die Nitrozellulosemembran wurde mit Hilfe von Ponceau-S kontrolliert. Die rote Proteinfärbung ist reversibel und wurde durch Waschen mit TBST von der Membran abgewaschen. Es erfolgte nun der spezifische Nachweis der entsprechenden Proteine. Zum Blockieren freier Bindestellen auf der Nitrozellulosemembran wurde die Membran für 1 h mit 25 ml bzw. bei 4° C über Nacht inkubiert (Kippschüttler). Dann wurde die Membran mit dem in Blocking-Puffer gelösten Primärantikörper inkubiert (nicht phosphorylierte Proteine: 1 - 3 h, RT, Kippschüttler; phosphorylierte Proteine: über Nacht, 4° C, Kippschüttler). Nach dreimaligen Waschen (je 10 min. mit 30 ml TBST) folgte die Inkubation für 1 h auf dem Kippschüttler mit dem Sekundärantikörper, welcher zuvor in TBST mit 3% Milchpulver gelöst wurde. Für die Detektion wurde das ECL Western Blotting Detection System (Amersham, Buckinghamshire, UK) verwendet.

Blotting-Puffer:

Glycin	192 mM	(Merck, Darmstadt)
Tris	25 mM	(Merck, Darmstadt)
SDS	0,015 (w/v)	(Merck, Darmstadt)
Methanol	20 % (v/v)	(PEI)

TBST:

Tris pH 8,0	1 mM	(PEI)
NaCl	15 mM	(Merck, Darmstadt)
Tween 20	0,05 % (v/v)	(Roth, Karlsruhe)

Blocking-Puffer:

normaler Western Blot:

Magermilchpulver	5% (w/v)	(AppliChem, Darmstadt)
------------------	----------	------------------------

in TBST

Western Blot mit phosphorylierten Proteinen:

ImmunO BSA Fraction V 5% (w/v) (MP Biomedicals, Eschwege)

in TBST

Liste der für den Western Blot verwendeten Primär- und Sekundärantikörper:

Primär-Antikörper	Verdünnung	Motiv	Quelle	Sekundär-Antikörper	Verdünnung	Quelle
α -phospho-p44/42 (ERK1/2)	1:1000	Thr202/ Tyr204	Cell Signaling	α -rabbit-HRP	1:7500	Amersham
α -phospho-SAPK/JNK	1:1000	Thr183/ Tyr185	Cell Signaling	α -rabbit-HRP	1:7500	Amersham
α -phospho-p38	1:1000	Thr180/ Tyr182	Cell Signaling	α -rabbit-HRP	1:7500	Amersham
α -phospho-JAK2	1:1000	Tyr1007/ Tyr1008	Cell Signaling	α -rabbit-HRP	1:7500	Amersham
α -phospho-STAT5	1:1000	Tyr694	Cell Signaling	α -rabbit-HRP	1:7500	Amersham
α -phospho-STAT6	1:1000	Tyr641	Cell Signaling	α -rabbit-HRP	1:7500	Amersham
α -phospho-PKC δ	1:1000	Thr505	Cell Signaling	α -rabbit-HRP	1:7500	Amersham
α -p44/42 (ERK1/2)	1:1000	-	Cell Signaling	α -rabbit-HRP	1:7500	Amersham
α -p42 (ERK2)	1:1000	-	Cell Signaling	α -rabbit-HRP	1:7500	Amersham
α -SAPK/JNK	1:1000	-	Cell Signaling	α -rabbit-HRP	1:7500	Amersham
α -p38	1:1000	-	Cell Signaling	α -rabbit-HRP	1:7500	Amersham
α -JAK2	1:1000	DSQRKLQFY EDKHQLPAP KC	CHEMICON	α -rabbit-HRP	1:7500	Amersham
α -STAT5	1:1000		Cell Signaling	α -rabbit-HRP	1:7500	Amersham
α -STAT6	1:1000		Cell Signaling	α -rabbit-HRP	1:7500	Amersham
α -Tubulin [YL1/2]	1:5000	-Glu-Glu-Phe(OH) /-Gly-Gly-Tyr	abcam	α -rat-HRP	1:7500	abcam

α -PKC δ	1:1000	-	Cell Signaling	α -rabbit-HRP	1:7500	Amersham
α -PU.1	1:1000	-	Cell Signaling	α -rabbit-HRP	1:7500	Amersham
α -PU.1 (H-135)	1:200-1:500	AS 1-135	Santa Cruz	α -rabbit-HRP	1:7500	Amersham
α -HA 12CA5 / HA.11	1:1000	YPYDVPDYA	Roche / Covance	α -mouse-HRP	1:7500	Amersham
α -CKII alpha	1:2000		BETHYL	α -rabbit-HRP	1:7500	Amersham

2.3.7 May-Grünwald-Giemsa-Färbung (Pappenheim-Färbung)

In der Hämatologie hat sich die May-Grünwald-Giemsa-Färbung (Synonym: Pappenheim-Färbung) als Standardfärbung etabliert. Sie ermöglicht eine sehr feine morphologische Differenzierung der Zellen und somit ein hohes Maß an diagnostischer Sicherheit. Sie verdeutlicht morphologische Strukturen von Blutaussstrichen, Mikroorganismen, Spermatozoen und Harnsedimenten.

Färbeverhalten von May-Grünwald-Lösung:

Die May-Grünwald-Lösung (Roth, Karlsruhe) besteht aus eosinsaurem Methylenblau in Methylalkohol. Die Intensität der Färbung hängt von der genauen Zusammensetzung der May-Grünwald-Lösung ab. Die May-Grünwald-Färbung ist aufgrund ihrer pH-abhängigen Farbgebung besonders für die Anfärbung von Granula geeignet. Basophile Granula erscheinen im lichtmikroskopischen Bild durch die Anfärbung mit Methylenblau tiefblau bis violett, während saure Granula Eosin anreichern und damit leuchtend rot erscheinen. Neutrale Granula weisen nach Färbung einen hell- bis purpurroten, blassen Farbton auf. Das Zytoplasma von Erythrozyten wird durch die May-Grünwald-Lösung hellrot, das der Thrombozyten leicht bläulich.

Färbeergebnis:

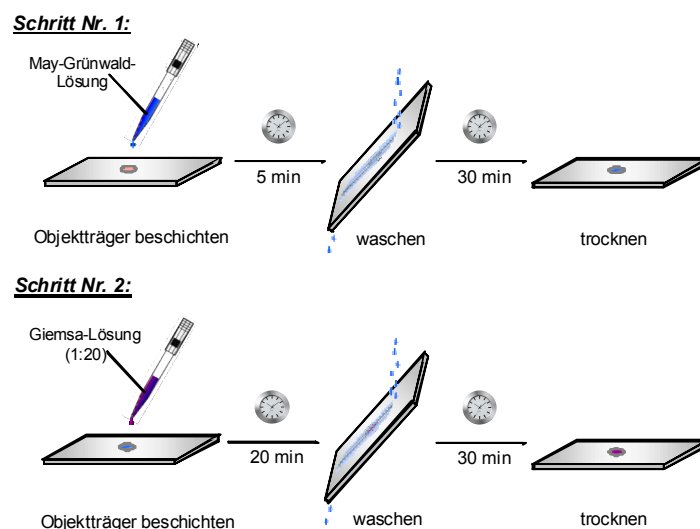
Kerne der Leukozyten	rotviolett
Lymphozyten - Zellplasma	blau
Monozyten - Zellplasma	graublau
Neutrophilen-Granula	hellviolett
Eosinophilen-Granula	rot bis braunrot
Basophilen-Granula	dunkelviolett
Erythrozyten	blassrosa

Färbeverhalten von Giemsa-Lösung:

Die Giemsa-Lösung (Roth, Karlsruhe) besteht aus Methylenazur, Methylviolett, Methylenblau und Eosin, gelöst in Methanol und Glycerin. Die Intensität der Färbung hängt von der genauen Zusammensetzung der Giemsa-Lösung ab. Zellkerne erscheinen in gefärbten Ausstrichen durch eine Komplexbildung der Farbstoffe mit der DNA purpurrot. Das Zytoplasma wird meist bläulich dargestellt. Parasiten- bzw. Protozoen-Kerne erscheinen ebenfalls leuchtend rot. Das Färberesultat kann jedoch deutliche Unterschiede aufweisen. Es wird unter anderem durch den pH Wert der Lösung und der Pufferlösung, die Puffersubstanzen, die Färbezeit und die Art der Fixierung beeinflusst.

Färbeergebnis:

Neutrophilen-Plasma	rosa (azidophil)
Kerne der Neutrophilen	rotviolett
Lymphozyten-Plasma	blau (basophil)
Monozyten-Plasma	graublau
Erythrozyten	blassrosa
Neutrophilen-Granula	rotviolett
Eosinophilen-Granula	rotbraun
Basophilen-Granula	dunkelblau
Thrombozyten	blau mit violetter Kern

Färbung:

Um die Zellen anzufärben, wurden diese zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit May-Grünwald-Lösung bedeckt und für 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde abgenommen und die Zellen gründlich mit H₂O gewaschen und das Präparat danach getrocknet. Danach erfolgte die Färbung der

Zellen für 20 min. mit einer mit Wasser verdünnten Giemsa-Lösung (1:20) bei Raumtemperatur. Darauf folgte erneut ein gründliches Waschen mit H₂O und das Trocknen des Präparates. Das trockene Präparat wurde mit einem Deckglas eingedeckelt.

2.3.8 Immunfluoreszenzfärbung

Mit Hilfe dieser Methode läßt sich die intrazelluläre Lokalisation eines Proteins in der Zelle bestimmen, die oft schon Hinweise auf dessen mögliche Funktion gibt. Die Dendritischen Zellen wurden mit 4% Paraformaldehydlösung (4% Paraformaldehyde in 1x PBS) für 20 min. bei Raumtemperatur fixiert. Die fixierten Zellen wurden danach gründlich 2 mal mit PBS gewaschen und danach mit 0,1% Tritonpuffer (0,1% Triton x-100 in PBS) für 15 min. permeabilisiert. Vor dem Blockieren freier Bindungsstellen wurden die Zellen noch einmal mit PBS gewaschen und danach für 20 min. mit Image-it (Invitrogen, Karlsruhe) zur Blockierung behandelt. Es folgte die Färbung von HLA-DR mit einem FITC-markierten Antikörper (Becton Dickinson, Heidelberg) und in einem zweiten Präparat die Färbung von CD86 mit einem FITC-markierten Antikörper (Becton Dickinson, Heidelberg). Gleichzeitig wurde die Färbung von Aktin mit Phalloidin-Rhodamin durchgeführt. Die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte für 60 min. bei RT. Der nicht gebundene Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit TBST (0,5% Tween 20 in TBS) entfernt. Vor dem letzten Waschschrift erfolgte eine 5 min. Inkubation mit DAPI-Lösung (1 µg/ml, Chemikon, Schwalbach) zur Kernfärbung. Zum Schutz der Präparate wurden diese mit Pro-long-gold-Lösung (Invitrogen, Karlsruhe) eingebettet.

2.3.9 Zytokin-Array und Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

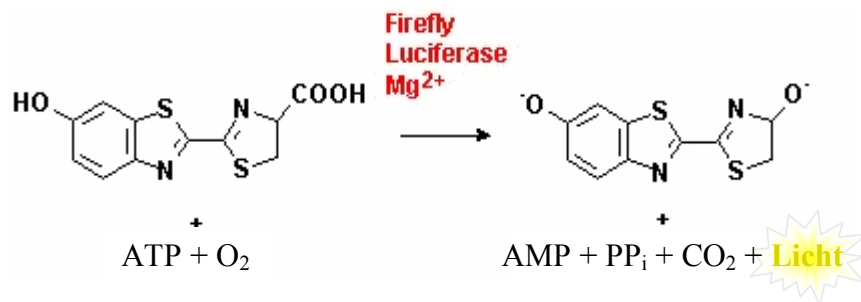
Eine ELISA Technik (Sandwich-ELISA) verwendet zwei Antikörper, die beide spezifisch an das nachzuweisende Antigen binden. Hierbei ist es wichtig, dass beide Antikörper an unterschiedlichen Stellen an das Antigen binden, da sie sich sonst gegenseitig behindern würden. Der erste Antikörper (coating-Antikörper) wird an eine feste Phase (meist spezielle 96-Well-Mikrotiterplatte) gebunden. Die Probe mit dem nachzuweisenden Antigen wird dann in die „wells“ gegeben. Dabei bindet der an die Platte gebundene Antikörper das in der Probe vorhandene Antigen. Durch Waschen werden die ungebundenen Bestandteile der Probe entfernt. Im nächsten Schritt wird ein Detektions-(detection)-Antikörper zugegeben, an dessen Ende ein Enzym (meistens Meerrettichperoxidase (HRP) oder Alkalische Phosphatase (AP)) gebunden ist. Dieser zweite Antikörper bindet ebenfalls an das Antigen und es entsteht der Antikörper-Antigen-Antikörper Komplex (deshalb der Name Sandwich-

ELISA - das Antigen ist zwischen die beiden Antikörper wie in einem Sandwich gepackt). Durch erneutes Waschen der Platte wird der überschüssige zweite Antikörper ausgewaschen und dann ein Chromogen (z.B. p-Nitrophenylphosphat (pNPP)) zugegeben. Die Alkalische Phosphatase spaltet den Phosphatrest vom farblosen Nitrophenylphosphat ab und es entsteht p-Nitrophenol, welches schwach gelb ist. Diese Reaktion kann mit einem Photometer verfolgt werden. Die Intensität der Farbe ist dabei proportional zu der Konzentration des entstandenen Nitrophenols und damit auch der Konzentration des zu bestimmenden Antigens in der Probe.

Für die Analyse der Überstände der stimulierten Dendritischen Zellen (10 µg LPS/ml) wurde ein TNF-alpha instant ELISA (Bender MedSystems, Vienna), sowie ein „human cytokine set 2 Array“ (Biosource, California), der in der Funktionsweise einem ELISA entspricht, verwendet. Dabei wurde das Protokoll des Herstellers befolgt.

2.3.10 Luciferase-Assay

Die katalytische Aktivität der Firefly-Luciferase wird über den spezifischen Umsatz des Substrats Luciferin pro Zeiteinheit bestimmt. In Anwesenheit von ATP, Mg^{2+} und O_2 katalysiert die Luciferase die Oxidation des Luciferins über das Intermediat Luciferyl-AMP zu Oxyluciferin. Bei dieser Reaktion wird blaues Fluoreszenzlicht emittiert und kann mit Hilfe eines Luminometers quantifiziert werden.



Die Untersuchung der Luciferaseaktivität erfolgte 48 h nach Transfektion. Es wurde das Luciferase-Assay-System (Promega, Mannheim) verwendet. Je 20 µl Zellysat wurden in eine weiße Mikrotiterplatte pipettiert und kurze Zeit bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zugabe von je 50 µl Substrat (Luciferase Assay Reagent, Promega, Mannheim) erfolgte automatisch im Luminometer (Microplate Luminometer LB 96 V, EG & G Berthold, Pforzheim). Es wurde die Einstellung gewählt, daß 2 sec. nach der Substratzugabe für 10 sec. die Lumineszenz gemessen wurde. Die gemessene relative Luciferase-Aktivität wurde auf die Proteinkonzentration der Zellysate normalisiert. In der Regel wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt, aus denen der Mittelwert und die jeweilige Standardabweichung bestimmt wurden. Die Standardabweichung wurde mit der Excel-Funktion STABW berechnet, der folgende mathematische Formel zugrunde liegt:

$$\sigma = \sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}}$$

σ = Standardabweichung
 n = Anzahl der Messwerte
 x = gemessene Luciferasewerte

2.3.11 *In vitro* Kinase-Assay

HA-markiertes PU.1, das als Substrat für die Kinasereaktion eingesetzt werden sollte, wurden in NIH 3T3 Zellen exprimiert und in RIPA-Lysispuffer lysiert (siehe Kapitel Zelllyse 2.3.2) Dabei wurden je Ansatz 1×10^6 Zellen verwendet, die 48 h zuvor mit $1 \mu\text{g}$ pIRES2-HA-PU.1-EGFP transfiziert worden waren. Das in den Zellen exprimierte HA-PU.1 wurde in RIPA lysiert und immunopräzipitiert (siehe Kapitel 2.3.3). Der Überstand auf den Beads wurde vollständig mit abgeflachten MultiFlex-Spitzen (Roth, Karlsruhe) abgesaugt. Zum Ablösen der gebundenen HA-PU.1 Proteine wurde $30 \mu\text{l}$ HA-Peptidlösung auf die Beads gegeben. In der Peptidlösung befindet sich die HA-Bindungssequenz (YPYDVPDYA) im Überschuß und verdrängt dadurch das an die Beads gebundene HA-PU.1. Das Ablösen erfolgte im Thermoblock (10 min. bei 300 rpm, 20 min. ohne Schütteln, Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg). Nach der Inkubation wurden die Beads abzentrifugiert (13000 rpm, 1 min, Zentrifuge 5415, Eppendorf, Hamburg) und der Überstand mit dem gelösten HA-PU.1 mit einer MultiFlex-Spitze abgenommen. Wurde in einer Kinasereaktion größere Mengen Substrat benötigt, wurden mehrere HA-Präzipitationen miteinander gepoolt.

HA-Peptidlösung (1 mg/ml):

HA-Peptid	5mg	(Roche, Mannheim)
PBS	5 ml	(PEI)
complete mini (Protease-Inhibitor)	1 Tablette/ 10 ml	(Roche, Mannheim)

CKII- und MAP-Kinase-Assay

Der CKII-Kinase-Assay wurde mit humanem rekombinantem Enzym CKII alpha (Calbiochem, Darmstadt) durchgeführt. Der MAP-Kinase-Assay wurde mit humanem rekombinantem Enzym ERK2 (Upstate, Lake Placid, USA) durchgeführt. Als Substrat diente das isolierte HA-PU.1. Als Positivkontrolle für CKII wurde rekombinantes Pbj-Nef (Dr. Sanzenbacher, PEI) und für ERK2 rekombinantes Elk1 (Upstate, Lake Placid, USA) eingesetzt.

Für die Kinasereaktion wurden 2 µl CKII alpha (10 ng) bzw. 2 µl ERK2 (2,5 ng), 10 µl HA-PU.1 Substratlösung, 20 µl MAP-Kinase-Puffer und 1 µl [γ ³³P]-ATP (10 µCi) verwendet. Zur Kontrolle der spezifischen Phosphorylierung durch CKII wurde 500 nM DMAT ein CKII Inhibitor (Calbiochem, Darmstadt) und 30 µM ERK Inhibitor (Calbiochem, Darmstadt) in einem Teil der Ansätze verwendet. Die Proben wurden für 20 min. bei 30° C im Heizblock (Thermomixer 5436, Eppendorf) inkubiert. Nach Zugabe von 7 µl SDS-Puffer (Roti-Load1, Roth, Karlsruhe) wurden die Proben für 5 min. bei 95° C im Heizblock aufgeköcht. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE-Analyse (siehe Kapitel 2.3.5) aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet (siehe Kapitel 2.3.6). Die Membran wurde 10 min. mit 5% BSA-Lösung inkubiert und anschließend mit TBST gewaschen. Die Membran wurde kurz auf einem Zellstofftuch getrocknet und in eine Filmkassette eingelegt. Der Nachweis der ³³P-phosphorylierten Proteine erfolgte mit Hilfe der Kodak BioMax MR-Filme und einer Verstärkung des Signals durch einen Transcreen LE Intensifying Screen (Kodak). Die Filmkassette wurde zu diesem Zweck auf -80° C eingefroren und zu verschiedenen Zeitpunkten der eingelegte Film entnommen.

MAP-Kinase Puffer:

Tris-HCl pH 7,5	25 mM	(PEI)
MgCl ₂	10 mM	(PEI)
β-Glycerophosphat	5 mM	(Sigma, Taufkirchen)

vor Gebrauch des Puffers frisch zugeben:

Dithiothreitol (DTT)	2 mM	(Sigma, Taufkirchen)
Na-Ortovanadat	1 mM	(Calbiochem, Darmstadt)

PKC δ-Kinase-Assay

Der PKC δ-Kinase-Assay wurde mit humanem rekombinantem Enzym (Upstate, Lake Placid, USA) durchgeführt. Als Substrat diente das isolierte HA-PU.1. Als Positivkontrolle wurde Histon H1 (Upstate, Lake Placid, USA) eingesetzt.

Für jede Kinasereaktion wurden 10 µCi [γ ³³P]-ATP verwendet. Der PKC Lipid Activator (Upstate, Lake Placid, USA) wurde auf Eis aufgetaut und für 1 min. im Eiswasser gefüllten Ultraschallbad beschallt, um die darin enthaltenen Lipidkomponenten in Lösung zu bringen. Für die Kinasereaktion wurden 5 µl PKC Lipid Activator, 2µl PKC δ (20ng), 10 µl HA-PU.1 Substratlösung, 3 µl PKC delta-Kinase Puffer (x 10) und 10 µl [γ ³³P]-ATP-Lösung (10 µCi) verwendet. Zur Kontrolle der spezifischen Phosphorylierung durch PKC δ wurde 1 µM PKC Inhibitor Gö 6983 (Calbiochem, Darmstadt) in einem Teil der Ansätze verwendet. Die Proben wurden

für 20 min. bei 30° C im Heizblock (Thermomixer 5436, Eppendorf) inkubiert. Nach Zugabe von 7 µl SDS-Puffer (Roti-Load1, Roth, Karlsruhe) wurden die Proben für 5 min. bei 95° C im Heizblock aufgekocht. Es folgte die SDS-PAGE-Analyse, Blotting und Detektion der phosphorylierten Proteine wie für den CKII-Kinase-Assay und MAP-Kinase-Assay beschrieben.

PKC delta-Kinase Puffer (x 10):

HEPES pH 7,4	200 mM	(PEI)
Triton-X 100	0,3 %	(Sigma, Taufkirchen)

[γ -³³P]-ATP-Lösung:

[γ - ³³ P]ATP	10 µCi	(Amersham, Freiburg)
MgCl ₂	75 mM	(PEI)
Dithiothreitol	1 mM	(Sigma Taufkirchen)
Na-Ortovanadat	1 mM	(Calbiochem, Darmstadt)

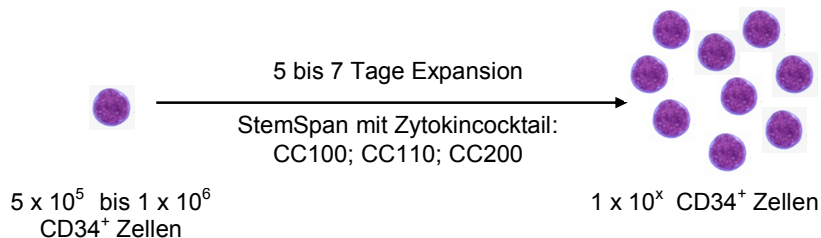
3. Ergebnisse

3.1 Etablierung des Expansionsprotokolls für humane hämatopoetische Stammzellen (HSCs, CD34⁺ Zellen)

3.1.1 Morphologische Charakterisierung

Zur Expansion wurden die aufgereinigten und eingefrorenen humanen hämatopoetischen Stammzellen (5 bis 10×10^5 Zellen) aus Nabelschnurblut im Wasserbad aufgetaut, mit Medium gewaschen und in ein serumfreies SFEM Medium mit verschiedenen Zytokinkombinationen (CC100: Flt-3 Ligand, SCF, IL-3, IL-6; CC110: Flt-3 Ligand, SCF, TPO; CC200: TPO, SCF, IL-3) überführt (Abb. 3.1 A). Ein Teil der Zellen wurde für eine direkte Analyse abgenommen und durch Zentrifugation auf einen Objektträger zentrifugiert (Zytospin). Es erfolgte eine Anfärbung mit May-Grünwald-Giemsa. Die Zellen zeigen dabei eine charakteristische blastuläre Stammzellmorphologie mit einem schmalen blau gefärbten Zytoplasmaring und großem rot-violettem Kern (Abb. 3.1 B links). Die Morphologie ähnelt der von Lymphozyten.

A



B

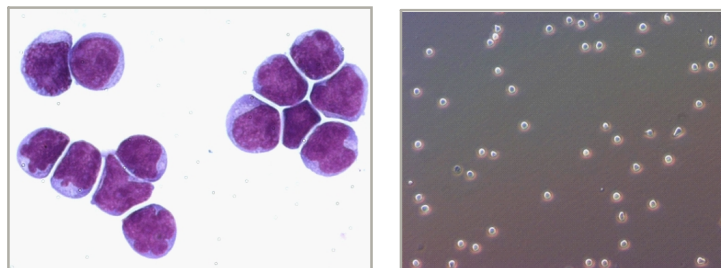


Abbildung 3.1: Morphologische Charakterisierung der verwendeten CD34⁺ Stammzellen

(A) Schematische Abbildung des angewendeten Expansionsprotokoll. Für die Expansion wurden die aufgetauten CD34⁺ Zellen für 5 bis 7 Tage in serumfreiem Medium mit verschiedenen Zytokinen kultiviert und deren Expansionsrate, sowie Differenzierungsgrad bestimmt. (B links) Die linke Seite zeigt eine May-Grünwald-Giemsa Färbung eines Zytospins von CD34⁺ Zellen vor der Expansion (400fache Vergrößerung). Der Zytoplasmasaum weist eine bläuliche Färbung auf und ist deutlich vom violetten Kern abgegrenzt. (B rechts) Die rechte Seite zeigt exemplarisch CD34⁺ Zellen 7 Tage nach Beginn der Expansion unter Verwendung des Zytokincocktails CC100. Die Zellen zeigen keine Untergrundhaftung, sind klein, deutlich abgegrenzt und abgekugelt. Die Zellen zeigen überwiegend blastuläre Morphologie (100fache Vergrößerung).

Die Kultivierung der Zellen erfolgte für 5 bis 7 Tage. Die Abbildung 3.1 B rechts zeigt hämatopoetische Stammzellen nach einer Expansionsphase von 7 Tagen mit der Zytokinkombination CC100. Die Zellen befinden sich in Suspension, sind klein, rund und abgekugelt und zeigen überwiegend blastuläre Morphologie.

3.1.2 Analyse der Expansion (verschiedene Zytokinkombinationen)

Im ersten Schritt sollte ein geeigneter Cocktail aus verschiedenen hämatopoetischen Wachstumsfaktoren (Zytokinen) gefunden werden, der in der Lage ist, die in der Kultur vorhandenen Stammzellen zu erhalten und Progenitoren deutlich zu vermehren. Dazu wurden die aus Nabelschnurblut isolierten CD34⁺ Zellen (HSCs) unter Zugabe verschiedener Zytokine in Suspensionskultur gehalten. Für die Analyse der Zellen wurde die Zellproliferation durch Zählung der Gesamtzellen, der Anteil an CD34⁺ Zellen in der Suspension (FACS), morphologische Veränderungen, sowie Differenzierungsmarker zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 3.1 zusammengefaßt.

Mit der Kombination CC100 ließ sich nach 7- 10 Tagen eine Vermehrung der Zellen um das ca. 100-fache erreichen. Bei der FACS-Messung sind 80-90% der Zellen CD34⁺ und negativ für linienspezifische Differenzierungsmarker, wie z.B. CD11c. Die Morphologie der Zellen bleibt unbeeinflusst. Die Kombination CC110 zeigt eine noch stärkere Proliferation der Zellen von ca. 160-fach. Die Zellen zeigen jedoch deutliche morphologische Veränderungen in Richtung Megakariozyten. Die FACS-Analyse ergab zwischen 60 - 70% CD34⁺ Zellen. Die Kombination CC200 zeigte Eigenschaften, die zwischen den beiden ersten Zytokinkombinationen liegt. Die Proliferation der Zellen steigt um das ca. 120-fache. Die Zellen weisen leichte morphologische Veränderungen auf und liegen in einem mittleren CD34⁺ Expressionsspektrum (ca.75% positive Zellen).

Zytokinkombination	Zytokine	Zellproliferation	Induktion von Differenzierung	Maximale Kultivierungsdauer CD34 ⁺ > 10 %
CC100	Flt-3 Ligand, SCF, IL-3, IL-6	+	+	3 – 4 Wochen
CC110	Flt-3 Ligand, SCF, TPO	++	+++	2 Wochen
CC200	TPO, SCF, IL-3	+(+)	++	2 – 3 Wochen

+schwach ++ mittel +++ stark

Tabelle 3.1: Bestimmung des ex-vivo Expansionsverhalten der HSCs nach Stimulation mit verschiedenen Zytokinkombinationen. Für die Analyse der Zellen wurde die Zellproliferation durch Zählung der Gesamtzellen, der Anteil an CD34⁺ Zellen in der Suspension (FACS), morphologische Veränderungen, sowie Differenzierungsmarker zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt.

Proliferation + = 100-fach, +++ = 160-fach

Die Zytokinkombination Flt-3 Ligand, SCF, IL-3 und IL-6 (CC100; rote Umrahmung) zeigte für die Expansion der hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) die besten

Kulturbedingungen, da die Anzahl der CD34⁺ Zellen deutlich gestiegen ist und diese in einem undifferenziertem Stadium bleiben. Für alle nachfolgenden Untersuchungen wurden daher die Zellen mit diesen Bedingungen expandiert.

3.1.3 Charakterisierung der expandierten Zellen durch spezifische Oberflächenmarker

Als Standardmethode für die Zellcharakterisierung gilt die durchflußzytometrische Bestimmung der Zahl von Zellen, die das Oberflächenantigen CD34 tragen (Krause, *et al* 1996). CD34 ist ein membranständiges Antigen, das auf hämatopoetischen Vorläuferzellen, ferner auf Endothelzellen kleinerer Gefäße (Krause, *et al* 1996), (Fina, *et al* 1990) und embryonalen Fibroblasten (Brown, *et al* 1991) nachgewiesen werden kann. Die höchste Antigenichte von CD34 ist auf frühen Vorläuferzellen beschrieben worden und nimmt mit fortschreitender Differenzierung der Zellen ab (Civin and Loken 1987). Vollständig differenzierte Zellen des Blutes sind CD34-negativ. Die eher willkürliche Unterscheidung nach stärkerer oder schwächerer Expression des CD34-Antigens hat dazu geführt, daß weitere Antigene hinzugezogen wurden, um möglichst frühe Vorläuferzellen charakterisieren zu können.

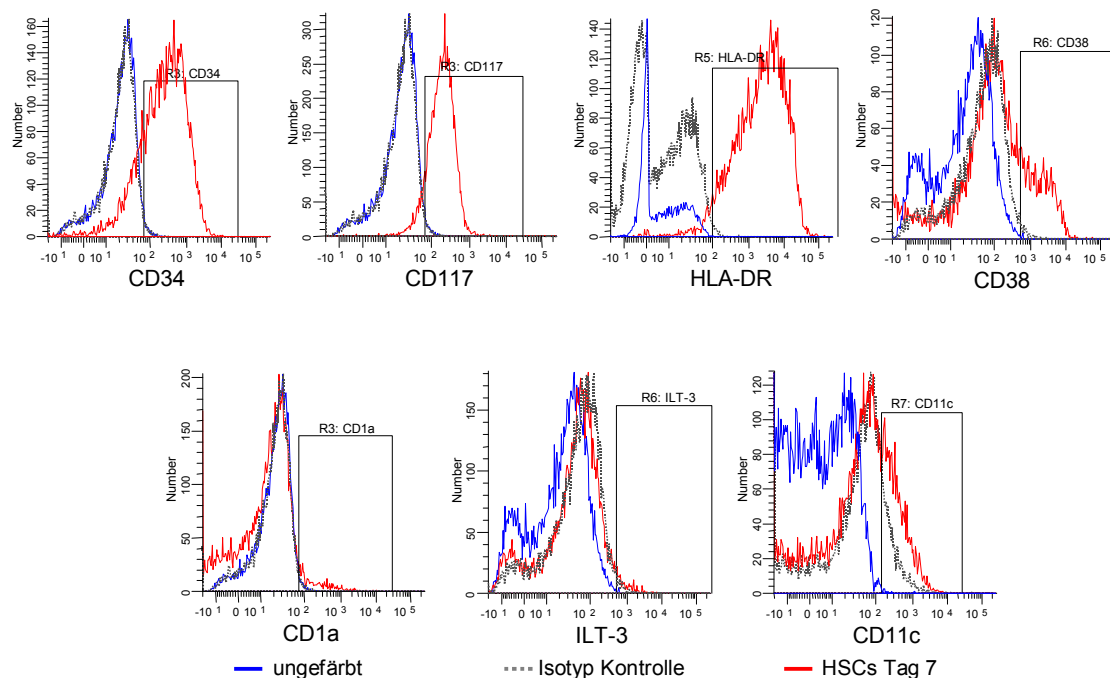


Abbildung 3.2: FACS-Messung von HSC spezifischen Oberflächenmarker, sowie Differenzierungsmarker für DCs. Für die einzelnen Färbungen wurden 2×10^5 Zellen verwendet. Die Zellen wurden auf die Expression der hämatopoetischen Oberflächenantigene CD34, CD117, HLA-DR und CD38 im FACS überprüft. Zusätzlich erfolgte die Untersuchung der dendritischen Differenzierungsmarker CD1a, ILT-3 und CD11c. Für die Analyse erfolgten für die einzelnen Marker jeweils eine Einzelfärbung, sowie eine gleichzeitige Parallelfärbung von 6 Oberflächenantigenen. Die Zellen wurden unmittelbar nach der FACS-Färbung im LSR II gemessen.

Als derzeitiger Stand gilt, daß die frühesten charakterisierbaren Vorläuferzellen des Blutes folgende Antigenkombination tragen: CD34 stark positiv, CD38 schwach bis negativ, HLA-DR schwach bis negativ, CD117 positiv und negativ für weitere linienspezifische Antigene (Baum, *et al* 1992), (Fritsch, *et al* 1993), (Olweus, *et al* 1996), (Law, *et al* 1999).

Für die Bestimmung der Oberflächenrezeptoren wurden 2×10^5 Zellen pro Färbung eingesetzt. Die gefärbten Zellen wurden unmittelbar danach durchflußzytometrisch im FACS (LSR II) analysiert (Abb. 3.2).

Die expandierten Stammzellen zeigen eine hohe Expressionsrate des Antigens CD34 von 85 % und des SCF-Rezeptors CD117 von 91 % auf ihrer Oberfläche und sind für CD38 nur gering positiv (18 %). 96 % der gemessenen Zellen tragen bereits jetzt HLA-DR auf ihrer Oberfläche. Die Zellen sind für die dendritischen Differenzierungsmarker CD1a, ILT-3, sowie CD11c negativ (Abb. 3.2).

3.2 Etablierung des Differenzierungsprotokolls für humane Dendritische Zellen (DCs)

Als Modellsystem für die Untersuchung intrazellulärer Signalwege, die an der Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen (HSC) beteiligt sind, wurde die Differenzierung zu Dendritischen Zellen gewählt. Die HSCs differenzieren dabei über eine monozytäre Zwischenstufe zu Dendritischen Zellen (DCs) (Curti, *et al* 2001), (Luft, *et al* 1998), (Lotze 1999), (Steinman 1991). Im nächsten Schritt dieser Arbeit wurde daher ein Differenzierungsprotokoll etabliert.

3.2.1 Morphologische Charakterisierung der Dendritischen Zellen

Für die Differenzierung wurden 5×10^5 expandierte HSCs in eine 12-Loch-Platte mit 2 ml serumfreiem SFEM-Medium mit den differenzierungsinduzierenden Zytokinen GM-CSF und IL-4 für 5 Tage inkubiert (Abb. 3.3 A). Während dieser Inkubationsphase differenzieren die Zellen in Richtung der unreifen Dendritischen Zellen (immature DCs). Die Reifung der Zellen wurde durch eine anschließende Inkubation der Zellen mit TNF- α induziert (Abb. 3.3 A).

Während der Differenzierung zeigen die Zellen deutliche morphologische Veränderungen (Abb. 3.3 B). Die sich zuvor in Suspension befindenden Stammzellen adhären an die Oberfläche der Kulturschale, bilden typische dendritische Fortsätze aus und verändern sich in Zellgröße und Granularität. Die Ausbildung der dendritischen Fortsätze ist dabei sehr unterschiedlich und die daraus resultierenden Zellformen sehr heterolog. Es können sehr langgestreckte Zellen bis hin zu sternförmigen Zellfortsätzen beobachtet werden (Abb. 3.3 C).

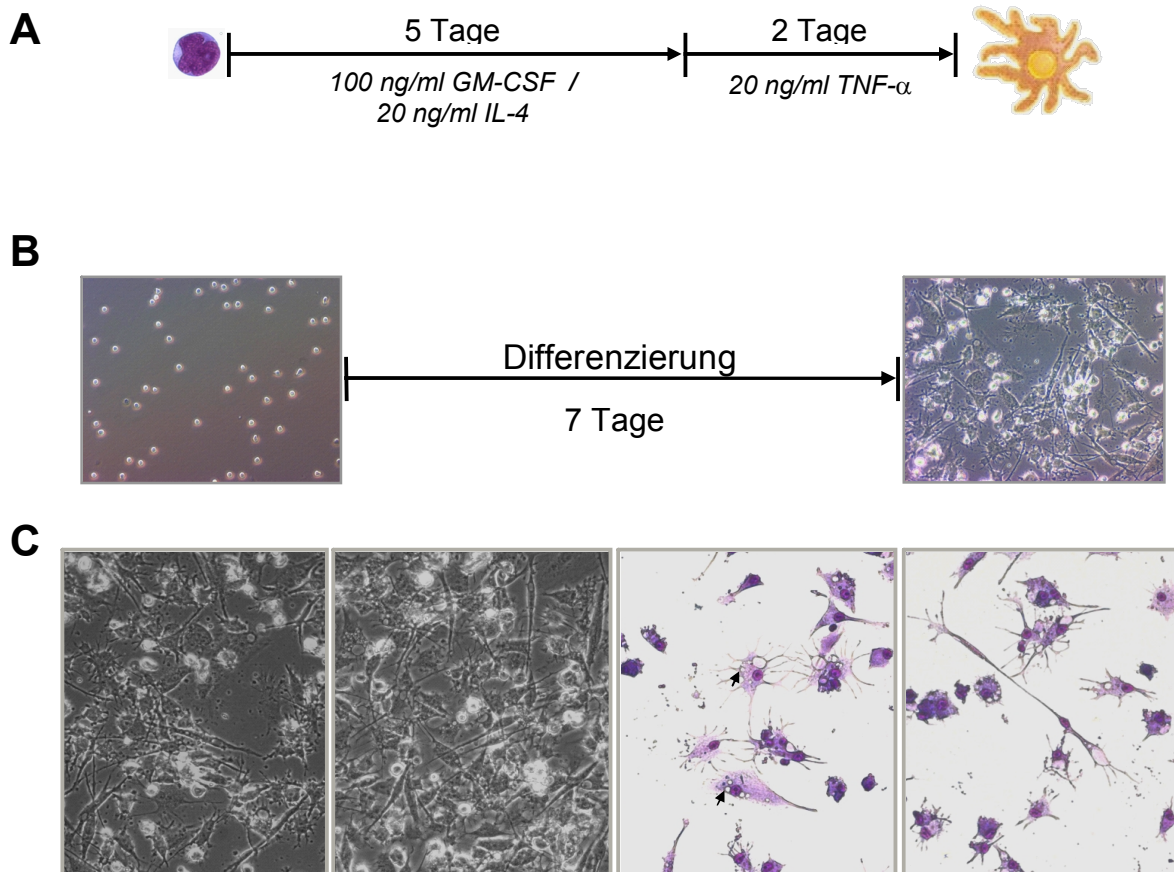


Abbildung 3.3: Differenzierungsschema und Morphologie von differenzierten Dendritischen Zellen (DC).

(A) Schematische Abbildung des verwendeten Differenzierungsprotokolls. Die expandierten HSCs werden dabei für 5 Tage in serumfreiem Medium mit GM-CSF und IL-4 kultiviert. In dieser Kultivierungsphase entstehen überwiegend unreife Dendritische Zellen. Die Reifung der Zellen wird durch die Gabe von TNF- α induziert. (B) In diesem Teil der Abbildung sind die expandierten HSCs den ausdifferenzierten DCs gegenübergestellt (200 x Vergrößerung). Es sind dramatische morphologische Unterschiede zu beobachten. Während der Differenzierung beginnen die Zellen zu adhären, der Zellkern verändert sich und es entstehen deutliche dendritische Ausläufer. (C) Auf der linken Seite sind zwei Abbildungen der Zellen in Zellkultur dargestellt. Zur Verdeutlichung der Zellmorphologie sind auf der rechten Seite zwei May-Grünwald-Giemsa Färbungen der Zellen abgebildet. → Endozytosevesikel

In der May-Grünwald-Giemsa-Färbung weisen die DCs gegenüber den HSCs eine deutliche Zunahme des Zytoplasmaanteils auf. Die Färbung des Zytoplasmas ist nun rotviolett, welches auf eine Verschiebung des pH-Wertes im Zytoplasma hinweist. Das Zytoplasma von kleinen Endozytosevesikeln (kleine kugelförmige Bläschen) durchzogen, welches auf die Aufnahme von Antigenpartikeln hinweist (durch Pfeile markiert).

3.2.2 Nachweis von MHC II und Aktivierungsmarkern auf Dendritischen Zellen durch Immunfluoreszenz

Dendritische Zellen sind für das Immunsystem, aufgrund ihrer antigen-präsentierender Eigenschaften (antigen presenting cell = APC), einer der wichtigsten

Vermittler zwischen Pathogenen und spezifischen T-Zellen. Die dabei aufgenommenen Antigene werde in Bruchstücke zerlegt und über die Bindung an MHC II auf der Zelloberfläche präsentiert (Villadangos, *et al* 2001), (Villadangos, *et al* 2005), (Wilson and Villadangos 2005). Nach Antigenaufnahme zeigen die Zellen eine Expression von Aktivierungsmarkern z. B. CD86 (Zou and Hu 2005).

Die Zellen wurden dabei auf Glasobjektträgern nach dem Differenzierungsprotokoll von 3.2.1 zu Dendritischen Zellen differenziert. Nach der Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd und der Permeabilisierung erfolgte die Färbung der Zellen mit spezifischen Antikörpern gegen HLA-DR und CD86, die mit dem Farbstoff FITC markiert sind. Für die Zellmorphologie wurde eine Aktinfärbung (Rodami-Phalloidin) gewählt und der Kern durch DAPI-Färbung visualisiert. Die Analyse der Präparate erfolgte im Laserscan-Mikroskop. Die Zellen zeigen eine deutliche Expression von MHC II. Es sind dabei deutliche Clusterbildungen von MHC II zu erkennen (Abb. 3.4). In der Überlagerung zeigt sich, daß Aktin und HLA-DR zu einem großen Teil kolokalisieren (Abb. 3.4 oben). Dies läßt den Rückschluß zu, daß es sich um HLA-DR handelt, welches auf der Zelloberfläche und nicht im ER gebunden ist und somit als aktiv präsentierendes, antigenbeladenes MHC II Molekül vorliegt.

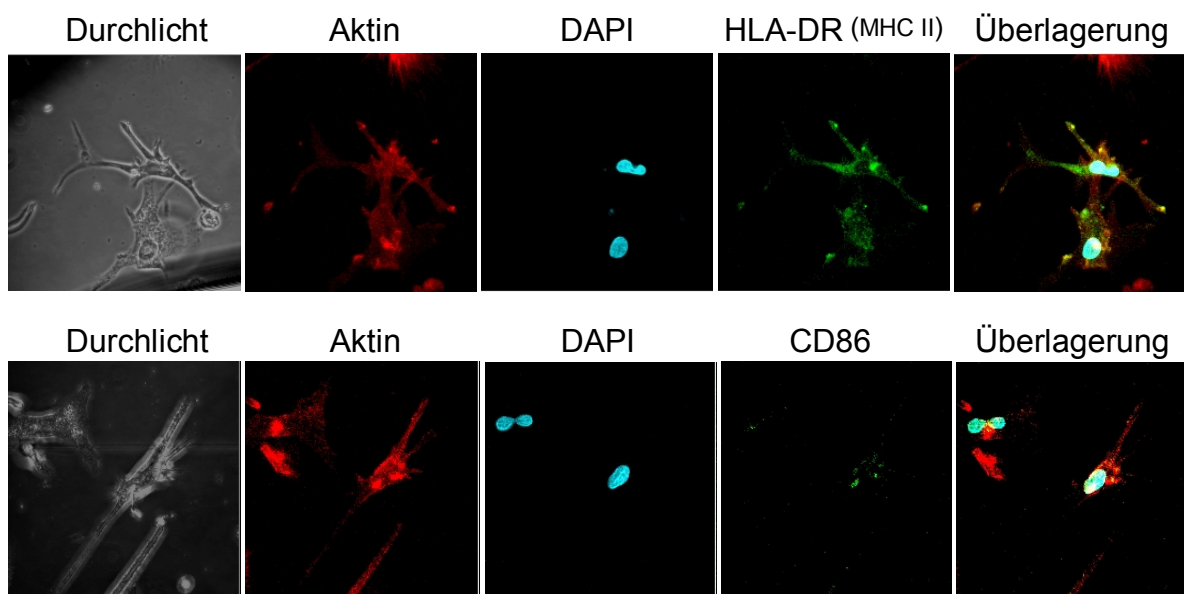


Abbildung 3.4: Nachweis der Antigenpräsentation durch MHC II und der Zellaktivierung durch den Aktivierungsmarker CD86. Konfokale Laserscan Analyse der differenzierten Dendritischen Zellen (400 x Vergrößerung). In der oberen Reihe der Abbildung ist die Färbung der Zellen auf MHCII in grün dargestellt. Aktinfärbung wurde zur Darstellung des Zytoskelettes und DAPI-Färbung für den Zellkern gewählt. In der Überlagerung sind deutlich MHC II und Aktin Kolokalisationen zu erkennen. In der unteren Reihe ist eine Färbung auf den Aktivierungsmarker CD86 durchgeführt. Die differenzierten Zellen zeigen diesen Marker, hier in grün dargestellt, welcher auf eine Aktivierung der Zellen schließen läßt.

Das detektierte CD86 zeigt ähnliche Eigenschaften wie HLA-DR. Auch CD86 kolokalisiert mit Aktin und befindet sich daher in räumlicher Nähe zur Zelloberfläche. CD86 liegt ebenfalls in Clustern vor (Abb.3.4 unten). Die Konzentration des Oberflächenantigens ist jedoch wesentlich geringer.

3.2.3 Überprüfung dendritenspezifischer Genexpressionsmarker

Dendritische Zellen stellen eine besondere Untergruppe des Immunsystems dar und zeigen ein spezifisches und einzigartiges mRNA Expressionsprofil. Als grundlegende Arbeit für die Untersuchung der Marker gilt die Publikation von Hashimoto *et al.* (Hashimoto, *et al* 1999). Im nächsten Schritt der Charakterisierung wurde die Expression von 5 dieser Markergenen in den aus HSC differenzierten Dendritischen Zellen, sowie aus Monozyten gereifte DCs mit RT-PCR nachgewiesen und verglichen. Bei den Markergenen handelt es sich um Cathepsin-C, eine Dipeptidyl-Aminopeptidase, die zu den papain-ähnlichen Zysteinproteinasen gehört (Turk, *et al* 1997), DC-CK1, ein spezifisches von DCs sekretiertes β -Chemokin (Adema, *et al* 1997), DC-SIGN, ein membranständiger C-Typ Leptinrezeptor (Geijtenbeek, *et al* 2000b) mit Bindungsfähigkeit an HIV-1 (Geijtenbeek, *et al* 2000a), MCP-4 (CCL13) eine Metalloproteinase, hochspezifisch für DCs (Hashimoto, *et al* 1999), (Vicari, *et al* 2004) und CD11b einem Zelladhäsion vermittelnden Membranrezeptor, dessen Expression auf DCs (Luft, *et al* 1998) und Makrophagen nachgewiesen wurde (Tan, *et al* 2000). Als Kontrolle diente das Haushaltsgen Beta-2-Mikroglobulin (β -Mikroglobulin).

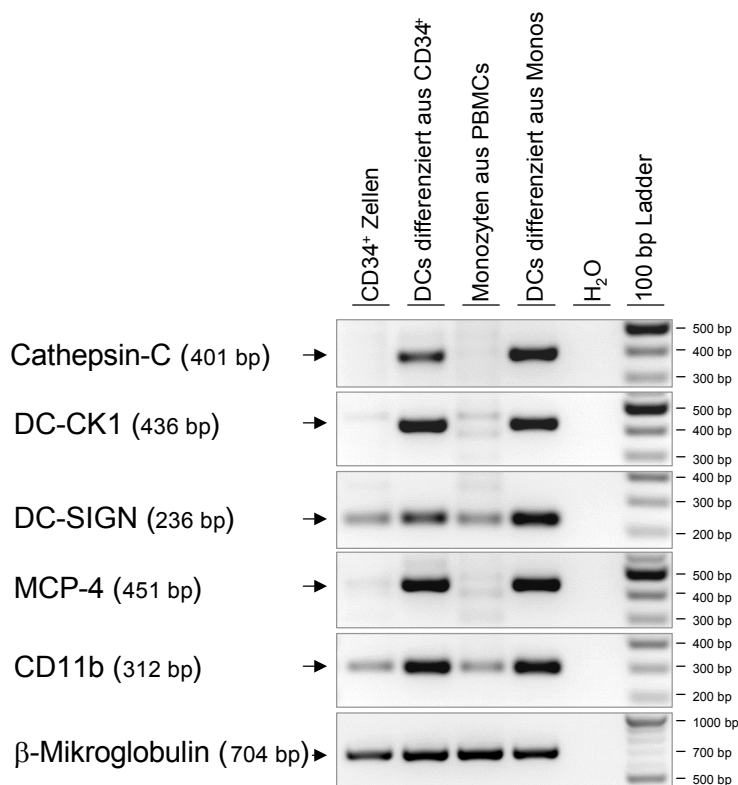


Abbildung 3.5: Nachweis spezifischer mRNA Expression in den differenzierten DCs. Die expandierten Stammzellen, daraus differenzierte Dendriten, Monozyten, sowie aus Monozyten (Monos) differenzierte Dendriten wurden auf die Expression der dendriten-spezifischen mRNAs Cathepsin-C, DC-CK1, DC-SIGN, MCP-4 und CD11b überprüft. Für die jeweiligen Marker ist ein deutlicher Expressionsanstieg in den Dendritischen Zellen zu erkennen. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen Dendritischen Zellen aus HSC oder aus Monozyten festgestellt. Als Kontrolle wurde Beta-2-Mikroglobulin (β -Mikroglobulin) als Haushaltsgen verwendet.

Die aus den HSC differenzierten DCs zeigen ein mit den aus Monozyten gereiften DCs vergleichbares Expressionsmuster für alle 5 Markergene (Abb. 3.5). Die mRNA von Cathepsin-C, DC-CK1 und MCP-4 wurde für beide Zellpopulationen spezifisch nur in den differenzierten Zellen nachgewiesen. Die expandierten CD34⁺ Zellen zeigen für die Expression von DC-SIGN und CD11b mit den Monozyten vergleichbare Expression. Dieser Befund läßt den Rückschluß zu, daß in der HSC Population bereits wenige Zellen in einer monozytären Differenzierungsstufe vorliegen.

3.2.4 Charakterisierung der differenzierten humanen Dendritischen Zellen durch Oberflächenmarker

Die Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen zu Dendritischen Zellen wurde durch die Messung der Oberflächenrezeptoren CD1a, HLA-DR, CD11c und ILT-3 (CD85k), sowie die Abnahme der Stammzellmarker CD34 und CD117 bestimmt. Der Oberflächenmarker CD14 wurde zur Detektion von monozytären Übergangsformen der Dendritendifferenzierung verwendet. Die differenzierten Zellen sind für die Stammzellmarker CD34 sowie CD117 negativ. Für HLA-DR sowie CD11c findet man jeweils zwei Populationen (Abb. 3.6 A).

Für den spezifischen Dendritenmarker CD1a sind 29% der Zellen positiv. Diese positiven Zellen wurden zusätzlich auf die Expression der Dendritenmarker HLA-DR, CD11c und ILT-3 untersucht, sowie auf den Monozytenmarker CD14 (Abb. 3.6 B). Die CD1a positiven Zellen koexprimieren sowohl HLA-DR (96,5%), CD11c (94%) sowie ILT-3 (40%). Eine kleine Subpopulation zeigt zusätzlich noch den Monozytenmarker CD14 (10%) und zeigt somit Zellen, die sich noch in der Differenzierungsphase befinden.

Bei ca. 30% der Zellen handelt es sich aufgrund der gemessenen Oberflächenmarker um reife Dendritische Zellen. Die expandierten HSCs sind demzufolge in der Lage in Dendritische Zellen zu differenzieren.

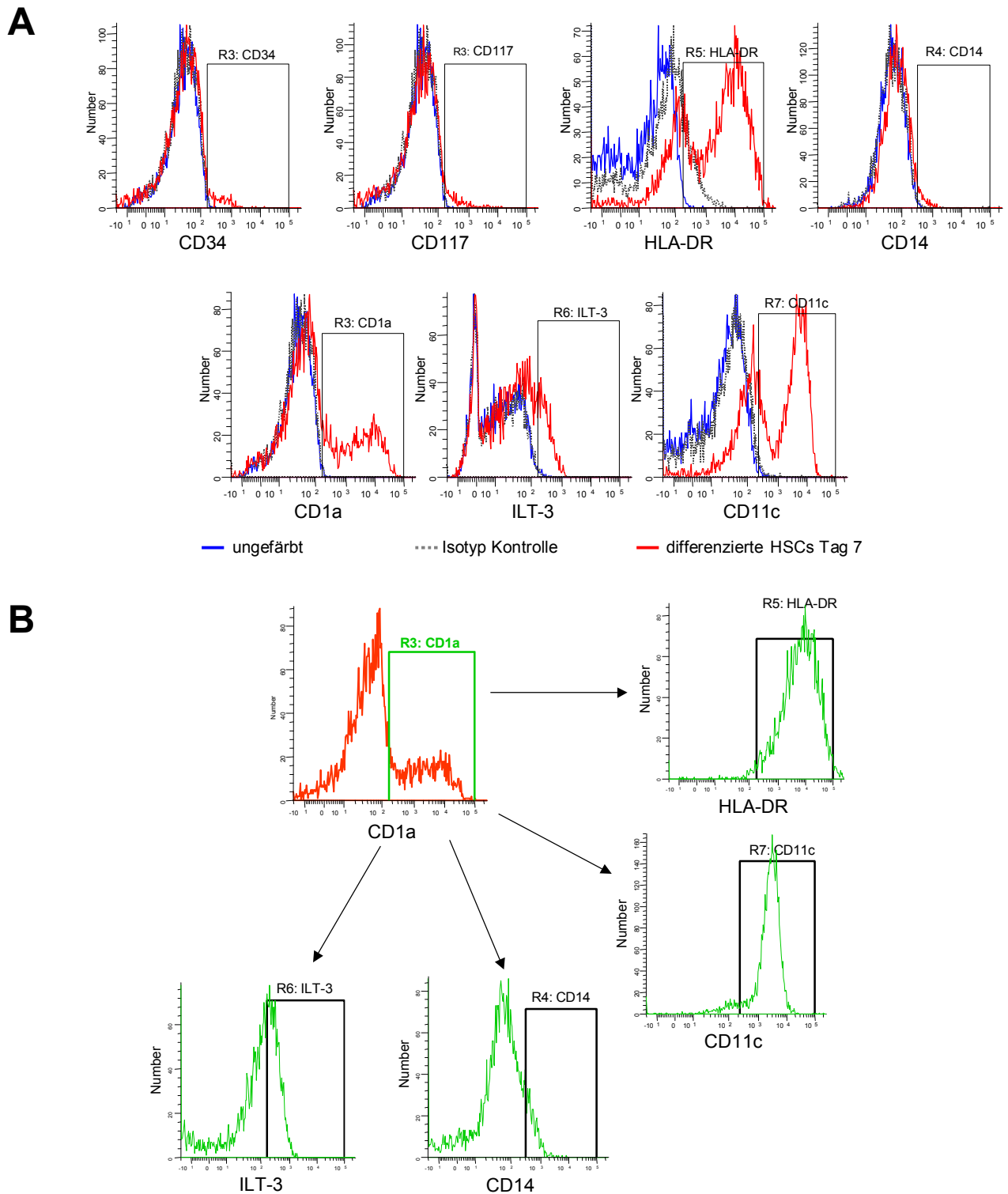


Abbildung 3.6: FACS-Messung von Dendritischen Zellen spezifischen Oberflächenmarkern, sowie der Verlust von HSC Markern. Für die einzelnen Färbungen wurden 2×10^5 Zellen verwendet. (A) Die Zellen wurden auf die Expression der hämatopoetischen Oberflächenantigene CD34 und CD117 im FACS überprüft. Zusätzlich erfolgte die Untersuchung der dendritischen Differenzierungsmarker CD1a, ILT-3 und CD11c. Für die Analyse erfolgten für die einzelnen Marker jeweils eine Einzelfärbung, sowie eine gleichzeitige Parallelfärbung von 6 Oberflächenantigenen. (B) Die Mehrfachfärbung diente zur weiteren Charakterisierung der CD1a positiven Zellen. Die Zellen zeigen Coexpression von HLA-DR, CD11c und ILT-3 auf ihrer Oberfläche. Die Zellen wurden unmittelbar nach der FACS-Färbung im LSR II gemessen.

3.2.5 Aktivierung der differenzierten Dendritischen Zellen durch Antigenkontakt

Im letzten Abschnitt der Charakterisierung wurden die DCs auf ihre Effektorzellfunktion überprüft. Dendritische Zellen sind nicht nur Antigen-präsentierende Zellen sondern auch ein Reservoir für verschiedene Zytokine und Chemokine. Der Antigenkontakt induziert dabei durch „Toll-like receptor signaling“ die Produktion und Sekretion proinflammatorischer Botenstoffe. (Strengell, *et al* 2006). Als Antigen wurde bakterielles LPS (Lipopolysaccharid) aus Salmonellen verwendet.

Für das Experiment wurden die zuvor aus HSC differenzierten DCs (Abschnitt 3.2.1) mit 10 µg/ml LPS im Medium stimuliert. Die Stimulation wurde zu verschiedenen Zeitpunkten gestoppt und der Überstand für die Analyse der sekretierten Botenstoffe im „Cytokine Array“ (Abb. 3.7 A) sowie im TNF- α ELISA (Abb. 3.7 B) verwendet. Als Vergleich diente Überstand von Zellen, die nur mit frischem Medium ohne LPS behandelt wurden. Der „Cytokin Array“ (Abb. 3.7 A) zeigt bereits nach 6 Stunden LPS Stimulation eine deutliche Sezernierung von synthetisiertem IL-6, sowie eine Zunahme des Chemokins MCP-1 im Überstand der Zellen. Diese Synthese und Sekretion akkumuliert über die 24 Stunden Beobachtungszeit. Nach 18 sowie 24 Stunden ist die Synthese und Sekretion von RANTES einem weiteren Chemokins zu beobachten.

Für die Detektion einer TNF- α Antwort auf die Stimulation mit LPS wurde ein spezieller „Instant-ELISA“ verwendet. Die Sekretion von TNF- α erreicht bereits nach 6 Stunden einen maximalen Wert, der nach 12 und 18 Stunden langsam wieder absinkt. Zum Vergleich wurde auch hier der Zellüberstand von unstimulierten DCs verwendet. Im Vergleich zeigt sich, daß LPS zu einer zeitabhängigen, gesteuerten Synthese und Sekretion von TNF- α führt (Abb. 3.7 B).

Die untersuchten Zellen zeigten nach Antigenkontakt (LPS) eine charakteristische, zeitabhängige Zytokin- und Chemokinantwort, die der in der Literatur beschriebenen Immunantwort von funktionellen Dendritischen Effektorzellen entspricht (Strengell, *et al* 2006).

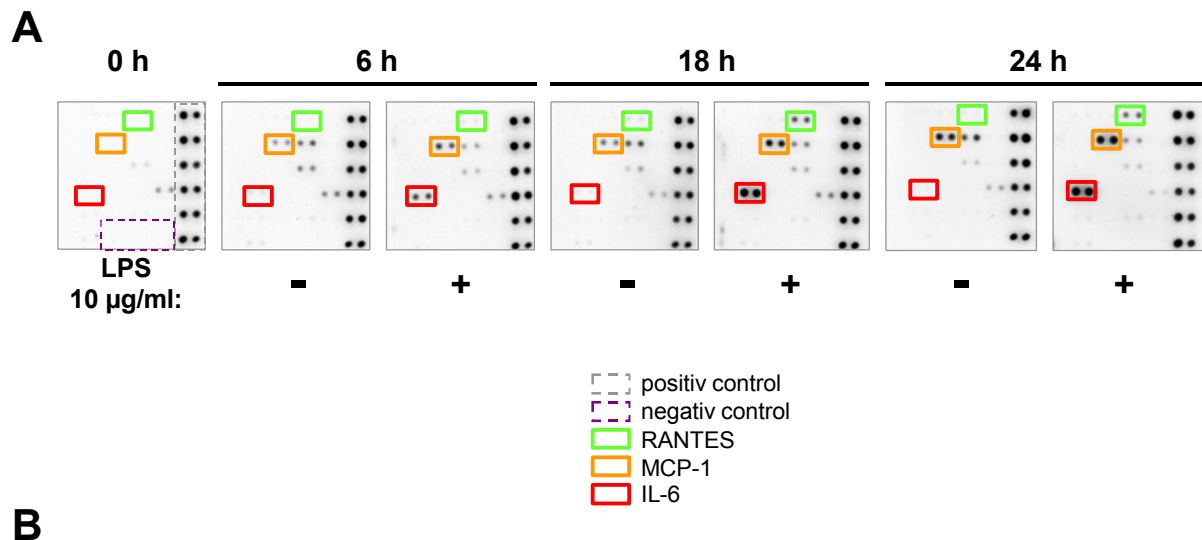


Abbildung 3.7: Analyse der Sekretion von inflammatorischen Zytokinen nach Antigenkontakt (LPS salmonella) der aus HSC differenzierten DCs. (A) 2 ml Überstand der LPS stimulierten DCs und der Kontrolle wurden mit dem „human cytokine set 2 Array“ auf die Sekretion von inflammatorischen Zytokinen untersucht. Der linke Blot zeigt Zytokinspots, die durch das verwendete SFEM Medium hervorgerufen werden. Diese Spots sind als Hintergrund zu werten. Zusätzlich enthält jeder Blot eine interne Positiv- und Negativkontrolle. (B) Die TNF- α Konzentration im Überstand von LPS stimulierten DCs wurde im ELISA analysiert.

3.3 Identifizierung intrazellulärer Signalkaskaden bei der Differenzierung von HSCs zu DCs

In der Literatur gibt es ausführliche Untersuchungen, welche Zytokine hämatopoetische Stammzellen in verschiedene Effektorzellen differenzieren. Die molekularen Mechanismen der Differenzierung sind jedoch noch nicht aufgeklärt. Mit dem etablierten Expansions- und Differenzierungsprotokoll wurde die Differenzierung von Dendritischen Zellen als Modellsystem etabliert. Dieses Modellsystem wurde nun zur Untersuchung intrazellulärer Signalvermittlung und damit zur Aufklärung von Differenzierungsmechanismen verwendet. Die Aktivierung

der verschiedenen untersuchten Signalwege ist dabei immer mit der Phosphorylierung einzelner Kinasen der jeweiligen Signalkaskade verbunden und wurde durch phosphospezifische Antikörper nachgewiesen

3.3.1 Aktivierung der intrazellulären Mitogenen Signalkaskade durch GM-CSF und IL-4

Für die Untersuchung der intrazellulären Signalwege der Differenzierung von Dendritischen Zellen wurde im ersten Schritt die Mitogene Signalkaskade untersucht. Um die Aktivierung der einzelnen Signalkaskaden zu untersuchen, wurden $0,5 - 1 \times 10^6$ expandierte $CD34^+$ Stammzellen mit 100 ng/ml GM-CSF und 20 ng/ml IL-4 stimuliert. Die Stimulation wurde zu verschiedenen Zeitpunkten durch Zugabe von eiskaltem PBS gestoppt. Die pelletierten Zellen wurden in RIPA mit Phosphatase- und Proteaseinhibitoren lysiert und das Lysat in einem Gradienten-SDS-Gel (4 – 12 %) aufgetrennt. Als Positivkontrolle für die Phosphorylierung wurde eine Probe mit 100 ng/ml TPA, 0,5 μ M Ionomycin und 10 μ g/ml Anisomycin (TPA/Iono/Aniso) stimuliert, das zu einer Aktivierung aller drei Kinasen führt. Die Detektion der einzelnen Kinasen (ERK, JNK, p38) und deren Aktivierung durch Phosphorylierung erfolgte im Western Blot durch phosphospezifische Antikörper (Abb. 3.8). Als Beladungskontrolle wurde das jeweilige unphosphorylierte Protein nachgewiesen.

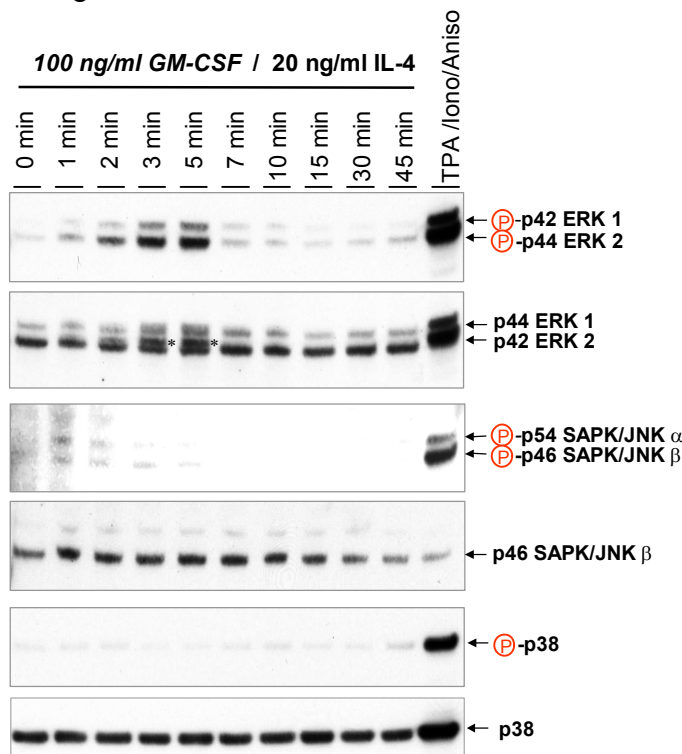


Abbildung 3.8: Untersuchung der Aktivierung der MAPK durch GM-CSF und IL-4.

Die HSCs wurden mit 100 ng/ml GM-CSF und 20 ng/ml IL-4 für verschiedene Zeitpunkte stimuliert. Die Stimulation wurde durch eiskaltes PBS gestoppt und Lysate für den Western Blot angefertigt. Für den spezifischen Nachweis von aktivem ERK, JNK und p38 wurden phosphospezifische Antikörper zur Detektion eingesetzt. Als Kontrolle für die Phosphorylierung wurde eine Probe mit 100 ng/ml TPA, 0,5 μ M Ionomycin und 10 μ g/ml Anisomycin (TPA/Iono/Aniso) stimuliert. Als Beladungskontrolle wurde das jeweilige unphosphorylierte Protein nachgewiesen. Zusätzliche Bande (*)

Im Phospho-Western Blot zeigt die Aktivierung der Zellen mit GM-CSF und IL-4 eine schnelle und deutliche Phosphorylierung der MAPK/ERK. Diese Aktivierung ist zeitlich begrenzt, sie erreicht ihr Maximum bereits 5 Minuten nach

Stimulationsbeginn und endet nach 7 Minuten. Für die MAPK/JNK und p38 wurde keine Aktivierung festgestellt. Die phosphorylierten Proteine zeigten im Gel aufgrund ihrer höheren molekularen Größe ein verändertes Laufverhalten. Aus diesem Grund sieht man im Kontrollblot für ERK noch eine zusätzliche ERK-Bande, die der phosphorylierten Form entspricht (*). Der Kontroll-Western Blot auf das jeweilige unphosphorylierte Protein ist unter dem Phospho-Western Blot abgebildet und zeigt eine konstante Proteinbeladung. Die Stimulation der HSCs mit GM-CSF und IL-4 führt zu nur einer Aktivierung der ERK-Signalkaskade.

3.3.2 Aktivierung der Januskinasen und STAT-Transkriptionsfaktoren durch GM-CSF und IL-4

Frühere Veröffentlichungen zeigen, daß GM-CSF-Stimulation von zytokinabhängigen Zellen wie TF-1 oder Mikroglia zur Aktivierung der Januskinase 2 (JNK2) führen. Die aktive Form phosphoryliert die ihr nachgeschaltete „Signal transducers and activators of transcription 5“ (STAT5). (Liva, *et al* 1999). Daher wurde untersucht, ob hämatopoetische Stammzellen nach Stimulation mit GM-CSF und IL-4 diese Aktivierung zeigen.

Für die Untersuchung wurden $0,5 - 1 \times 10^6$ expandierte $CD34^+$ Stammzellen mit 100 ng/ml GM-CSF und 20 ng/ml IL-4 stimuliert. Die Stimulation wurde zu verschiedenen Zeitpunkten durch Zugabe von eiskaltem PBS gestoppt. Die pelletierten Zellen wurden in RIPA mit Phosphatase- und Proteaseinhibitoren lysiert und das Lysat in einem Gradienten-SDS-Gel (4 – 12%) aufgetrennt. Die Detektion der einzelnen Kinasen und deren Aktivierung durch Phosphorylierung erfolgte im Western Blot durch phosphospezifische Antikörper (Abb. 3.9). Als Beladungskontrolle wurde das jeweilige unphosphorylierte Protein sowie Tubulin nachgewiesen.

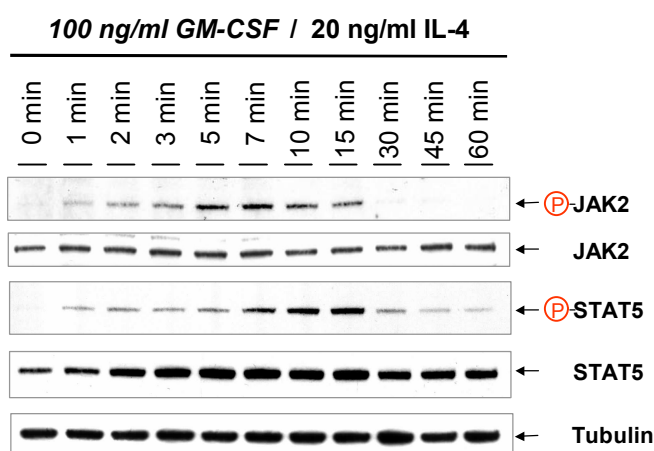


Abbildung 3.9: Untersuchung der Aktivierung des JAK2/STAT5 Signalwegs durch GM-CSF und IL-4. Die HSCs wurden mit 100 ng/ml GM-CSF und 20 ng/ml IL-4 für verschiedene Zeitpunkte stimuliert. Die Stimulation wurde durch eiskaltes PBS gestoppt und Lysate für den Western Blot angefertigt. Für den spezifischen Nachweis der Aktivierung von JAK2 und STAT5 wurden phosphospezifische Antikörper eingesetzt. Als Beladungskontrolle wurde das jeweilige unphosphorylierte Protein sowie Tubulin nachgewiesen.

Für die Januskinase 2 konnte eine schnelle Aktivierung festgestellt werden. Diese Aktivierung ist zeitlich begrenzt und erreicht ihr Maximum zwischen 5 – 7 Minuten.

Zwischen 15 und 30 Minuten erfolgt die Dephosphorylierung der Kinase. Dies ist durch ein Verschwinden des Phosphosignals im Western Blot zu erkennen. Die Aktivierung des Faktors STAT5 ist ebenfalls zeitlich begrenzt. Seine maximale Aktivierung ist jedoch zeitlich leicht verschoben und findet ihr Maximum zwischen 10 und 15 Minuten. Der Verlauf beider Aktivierungen zeigt deutlich, daß es sich um eine nacheinander geschaltete Signalkaskade handelt. Beide Aktivierungen zeigen im Vergleich zur ERK Aktivierung in Abschnitt 3.3.1 eine wesentlich längere Halbwertszeit. Die Kontrollfärbung auf das jeweilige unphosphorylierte Protein und Tubulin zeigt eine konstante Proteinbeladung. Die Stimulation der HSCs mit GM-CSF und IL-4 führt zu einer Aktivierung des JAK2/STAT5 Signalwegs.

In humanen T- und B-Zellen und verschiedenen myeloiden Zelllinien ist nach Stimulation der Zellen mit IL-4 eine Aktivierung von STAT6 beobachtet worden (Wang, *et al* 2004). Da für die dendritische Differenzierung IL-4 als Faktor benötigt wird, wurde die Aktivierung von STAT6 in HSCs analog zu der Aktivierung von STAT5 untersucht (Abb. 3.10).

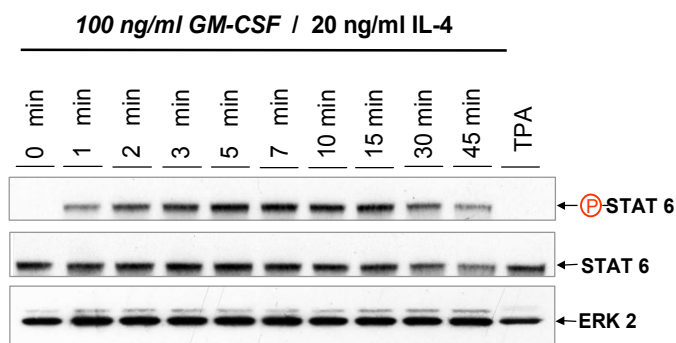


Abbildung 3.10: Untersuchung der Aktivierung des STAT6 Signalwegs durch GM-CSF und IL-4.

Die HSCs wurden mit 100 ng/ml GM-CSF und 20 ng/ml IL-4 für verschiedene Zeitpunkte stimuliert. Die Stimulation wurde durch eiskaltes PBS gestoppt und Lysate für den Western Blot angefertigt. Als Kontrolle wurden Zellen mit 100 ng/ml TPA stimuliert und mit aufgetragen. Für den spezifischen Nachweis der Aktivierung von STAT6 wurden phosphospezifische Antikörper eingesetzt. Als Beladungskontrolle wurde das unphosphorylierte Protein sowie ERK2 nachgewiesen.

Die Stimulation der HSCs mit GM-CSF und IL-4 zeigte eine schnelle und langanhaltende Aktivierung von STAT6. Sie erreicht ein Maximum zwischen 3 und 15 Minuten und ist selbst nach 45 Minuten noch sichtbar. TPA führt hingegen zu keiner Aktivierung von STAT6 und dient in diesem Fall als Negativkontrolle. Die Kontrollfärbung auf das jeweilige unphosphorylierte Protein und Tubulin zeigt eine gleichmäßige Proteinbeladung. Die Stimulation der HSCs mit GM-CSF und IL-4 führt zu einer Aktivierung des STAT6 Signalwegs.

3.3.3 Aktivierung der Protein Kinase C δ durch GM-CSF und IL-4

Für die Untersuchung wurden $0,5 - 1 \times 10^6$ expandierte $CD34^+$ Stammzellen mit 100 ng/ml GM-CSF und 20 ng/ml IL-4 stimuliert. Die Stimulation wurde zu verschiedenen Zeitpunkten durch Zugabe von eiskaltem PBS gestoppt. Die pelletierten Zellen wurden in RIPA mit Phosphatase- und Proteaseinhibitoren lysiert und das Lysat in einem Gradienten-SDS-Gel (4 – 12%) aufgetrennt. Die Detektion der einzelnen Kinasen und deren Aktivierung durch Phosphorylierung erfolgte im Western Blot durch phosphospezifische Antikörper (Abb.3.11). Als Beladungskontrolle wurde MAPK/ERK2 nachgewiesen.

Die Stimulation der HSCs mit GM-CSF und IL-4 zeigte eine schnelle und langanhaltende Aktivierung von PKC δ . Sie erreicht ein Maximum nach 5 Minuten und ist selbst nach 75 Minuten noch nicht vollständig abgeklungen. Die Kontrollfärbung von MAPK/ERK2 zeigt eine gleichmäßige Proteinbeladung. Die Stimulation der HSCs mit GM-CSF und IL-4 führt zu einer langanhaltenden Aktivierung des PKC δ Signalwegs.

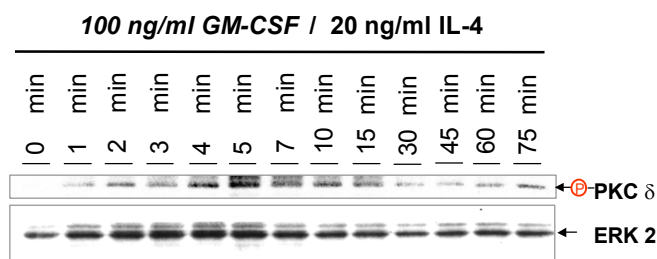


Abbildung 3.11: Untersuchung der Aktivierung von PKC δ durch GM-CSF und IL-4. Die HSCs wurden mit 100 ng/ml GM-CSF und 20 ng/ml IL-4 für verschiedene Zeitpunkte stimuliert. Die Stimulation wurde durch eiskaltes PBS gestoppt und Lysate für den Western Blot angefertigt. Für den spezifischen Nachweis der Aktivierung von PKC δ wurde ein phosphospezifischer Antikörper eingesetzt. Als Beladungskontrolle wurde ERK2 nachgewiesen.

3.3.4 Vergleich der untersuchten Signalwege in HSCs mit akut myeloiden Leukämiezelllinien

Für einen Vergleich der in den HSCs charakterisierten Signalwege wurden zwei myeloide Zelllinien auf die Aktivierung von PKC δ , ERK, STAT5 und STAT6 nach GM-CSF und IL-4 Stimulation untersucht. Bei der Zelllinie MUTZ-3 handelt es sich um eine zytokinabhängige frühe $CD34^+$ Progenitorlinie, die durch die Zytokin-kombination GM-CSF und IL-4 zu voll funktionsfähigen Dendritischen Zellen ausdifferenziert werden kann (Masterson, *et al* 2002). Diese Zelllinie wurde aufgrund dieser Eigenschaft gewählt, da in ihr die natürlichen HSC Differenzierung nachempfunden werden kann. Bei der verwendeten Zelllinie TF-1 handelt es sich um eine zytokinabhängige erythroleukämische Zelllinie im frühen erythroiden

Differenzierungszustand (Kitamura, *et al* 1989a), (Kitamura, *et al* 1989b). In der Literatur ist beschrieben, daß TF-1 Zellen auf die Zytokine GM-CSF und IL-4 mit Proliferation antworten.

Für die Untersuchung wurden 1×10^6 Zellen mit 100 ng/ml GM-CSF und 20 ng IL-4 stimuliert. Die Stimulation wurde zu verschiedenen Zeitpunkten durch Zugabe von eiskaltem PBS gestoppt. Die pelletierten Zellen wurden in RIPA mit Phosphatase- und Proteaseinhibitoren lysiert und das Lysat in einem Gradienten- SDS-Gel (4 – 12%) aufgetrennt. Die Detektion der einzelnen Kinasen und deren Aktivierung durch Phosphorylierung erfolgte im Western Blot durch phosphospezifische Antikörper (Abb. 3.12).

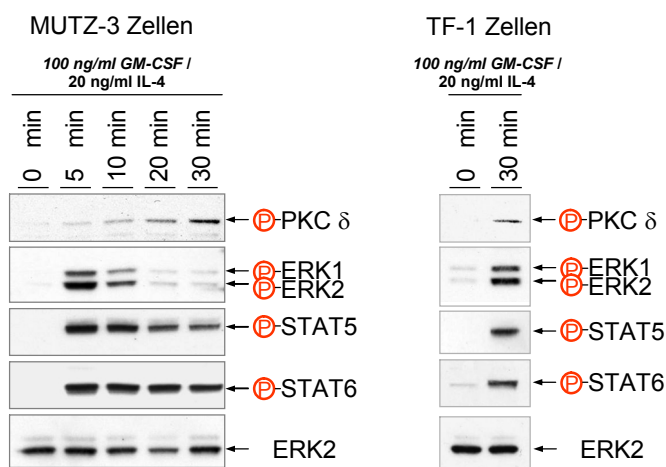


Abbildung 3.12: Untersuchung der Aktivierung von PKC δ , ERK, STAT5 und STAT6 in den myeloiden Leukämiezelllinien MUTZ-3 und TF-1. MUTZ-3 und TF-1 Zellen wurden mit 100 ng/ml GM-CSF und 20 ng/ml IL-4 für verschiedene Zeitpunkte stimuliert. Die Stimulation wurde durch eiskaltes PBS gestoppt und Lysate für den Western Blot angefertigt. Für den spezifischen Nachweis der Aktivierung von PKC δ , ERK, STAT5 und STAT6 wurden phosphospezifische Antikörper eingesetzt. Als Beladungskontrolle wurde ERK2 nachgewiesen.

Der Aktivierungsverlauf von PKC δ , ERK, STAT5 und STAT6 in MUTZ-3 Zellen entspricht dem der untersuchten HSCs. Auch hier ist eine frühe ERK Aktivierung festzustellen, die nach ca. 10 Minuten wieder deaktiviert wird. Für PKC δ zeigt sich ein kontinuierlicher Aktivierungsanstieg innerhalb der untersuchten 30 Minuten. STAT5 und STAT6 sind über den gesamten Zeitraum der Stimulation aktiv. Für die TF-1 Zellen wurde eine starke ERK-Phosphorylierung nach 30 Minuten detektiert. Vergleicht man HSCs mit den MUTZ-3 Zellen, so stellt man eine deutliche zeitliche Verschiebung der Aktivierung fest. Für PKC δ , STAT5 und STAT6 zeigen die Zellen das Aktivierungsspektrum, welches dem der HSCs und den MUTZ-3 Zellen entspricht.

3.3.5 Aktivierung von ERK und PKC δ und die Induktion dendritischer Zelldifferenzierung durch Stimulation der HSC mit dem Phorbolster TPA

Für die Untersuchung wurden 5×10^5 expandierte HSCs in serumfreiem SFEM-Medium mit den differenzierungsinduzierenden Zytokinen GM-CSF und IL-4 oder

mit 20 ng/ml TPA für 5 Tage inkubiert. Während der Differenzierung zeigen beide Ansätze eine deutliche morphologische Veränderung der Zellen (Abb. 3.13).

Die mit TPA stimulierten Zellen zeigen die gleiche dendritische Morphologie wie die mit GM-CSF und IL-4 differenzierten Dendritischen Zellen. Wie in Abschnitt 3.3.1 – 3.3.3 gezeigt, führt die Stimulation der HSCs mit Zytokinen zur Aktivierung von STAT5, STAT6, PKC δ und ERK. Auf der rechten Seite der Abb. 3.13 ist die Western Blot Analyse der HSCs mit TPA dargestellt. TPA aktiviert den ERK-Signalkaskade, sowie die Aktivierung von PKC δ . STAT5 und STAT6 werden durch TPA nicht induziert. Die Differenzierung der HSCs zu DCs ist offenbar nicht von der Aktivierung dieser Signalkaskaden abhängig. Im nächsten Abschnitt soll die Funktion der ERK und PKC Aktivierung bei der Differenzierung von HSCs zu DCs analysiert werden.

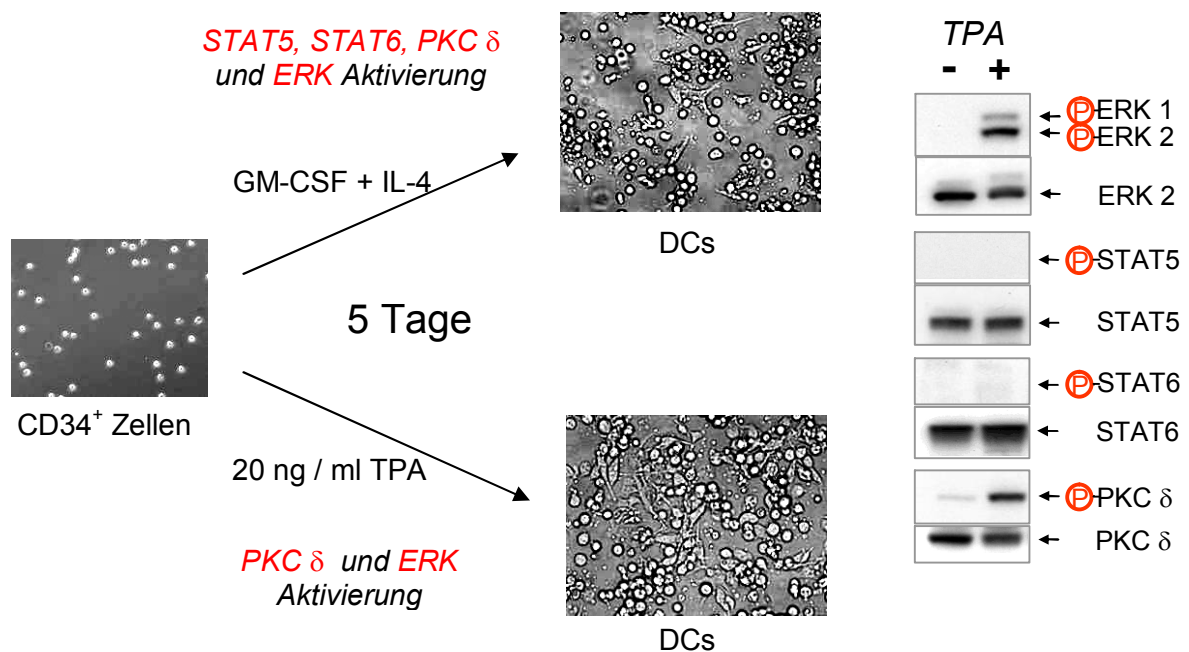


Abbildung 3.13: Vergleich der dendritischen Differenzierung durch Zytokine und TPA. 5×10^5 expandierten HSCs wurden für 5 Tage in serumfreiem Medium mit GM-CSF und IL-4 oder mit 20 ng/ml TPA kultiviert. Die sich zuvor in Suspension befindenden Stammzellen adhären in beiden Ansätzen an die Oberfläche der Kulturschale, bilden typische dendritische Fortsätze aus und verändern sich in Zellgröße und Granularität. Die Aktivierung der einzelnen Signalkaskaden erfolgte im Western Blot mit phosphospezifischen Antikörpern. Als Beladungskontrolle wurde das jeweilige unphosphorylierte Protein detektiert.

3.4 Rolle spezifischer Signalwege bei der Differenzierung von HSCs

In Abschnitt 3.3.5 wurde gezeigt, daß die durch TPA induzierte Differenzierung von HSCs zu DCs mit der Aktivierung von Proteinkinase C und ERK verbunden ist. Zur

weiteren Charakterisierung der intrazellulären Signalwege, wurden spezifische Inhibitoren gegen PKC und dem MAPK-Signalweg ERK eingesetzt. Zunächst wurde die Funktionalität der beiden Inhibitoren an TPA stimulierten KG-1a Zellen überprüft.

3.4.1 Wirksamkeits- und Dosisanalyse des PKC Inhibitors Gö 6983

Für die Wirksamkeits- und Dosisanalyse des Inhibitors Gö 6983 wurden 1×10^6 KG-1a Zellen als hämatopoetisches Stammzellanalogon mit verschiedenen Inhibitor-konzentrationen für 30 min. vorinkubiert. Danach erfolgte eine Stimulation mit 100 ng/ml TPA für 10 Minuten. Die pelletierten Zellen wurden in RIPA lysiert und das Lysat in einem Gradienten-SDS-Gel (4 – 12%) aufgetrennt. Die Detektion der ERK Kinasen als Reporter für die PKC Aktivierung erfolgte im Western Blot durch phosphospezifische Antikörper (Abb. 3.14). Als Beladungskontrolle wurde unphosphoryliertes ERK2 nachgewiesen.

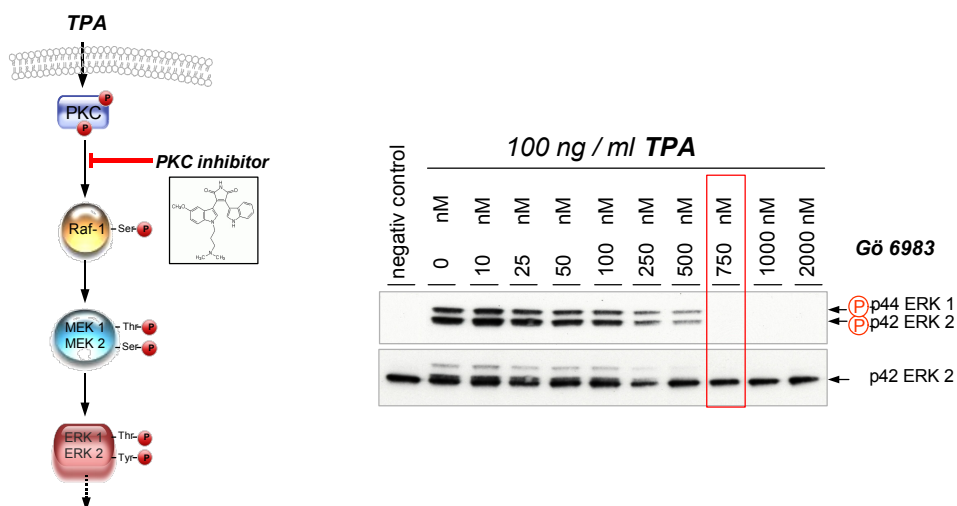


Abbildung 3.14: Dosisanalyse des PKC Inhibitors Gö 6983. KG-1a Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an PKC Inhibitor Gö6983 für 30 min. vorinkubiert. Es folgte eine Stimulation mit 100 ng/ml TPA. Die Analyse des inhibitorischen Effektes erfolgte durch Detektion von phospho-ERK im Western Blot. Als Beladungskontrolle wurde ERK2 nachgewiesen.

Der Western Blot zeigt eine dosisabhängige Inhibition der ERK Aktivierung, die durch den PKC-Inhibitor verursacht wird. Bei einer Konzentration von 750 nM Gö 6983 Inhibitor wurde keine Aktivierung mehr nachgewiesen (Abb. 3.14). Für den späteren Einsatz des Inhibitors in den Stammzellen wurde eine Konzentration von 1 μ M verwendet. Diese Konzentration zeigte in den Stammzellen eine effektive Inhibition und war nicht toxisch (siehe 3.4.3).

3.4.2 Wirksamkeits- und Dosisanalyse des MEK Inhibitors U0126

Für die Wirksamkeits- und Dosisanalyse des Inhibitors wurden 1×10^6 KG-1a Zellen als hämatopoetischer Stammzellanalogon mit verschiedenen Inhibitor-konzentrationen für 30 min. vorinkubiert. Danach erfolgte eine Stimulation mit 100 ng/ml TPA für 10 Minuten. Die pelletierten Zellen wurden in RIPA mit Phosphatase- und Proteaseinhibitoren lysiert und das Lysat in einem Gradienten- SDS-Gel (4 – 12 %) aufgetrennt. Die Detektion der ERK Kinasen erfolgte im Western Blot durch phosphospezifische Antikörper (Abb. 3.15). Als Beladungskontrolle wurde ERK2 nachgewiesen.

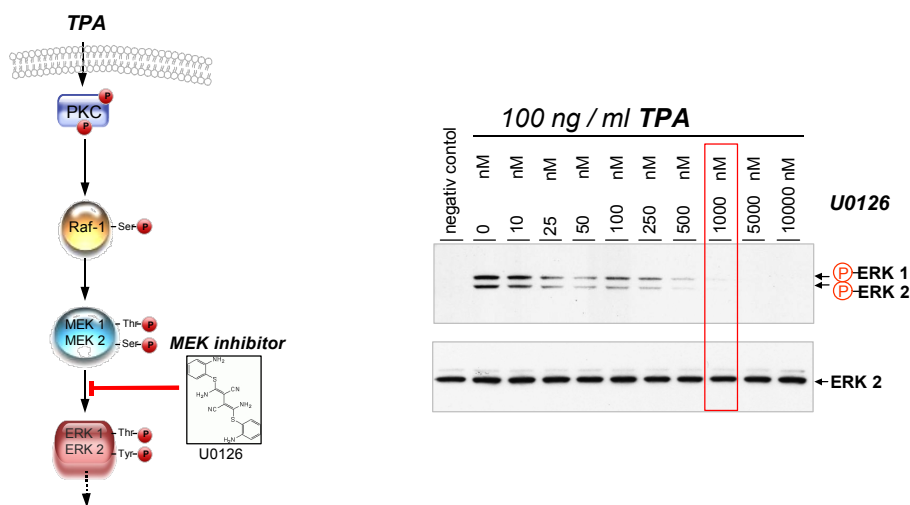


Abbildung 3.15: Dosisanalyse des MEK Inhibitors U0126. KG-1a Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an MEK Inhibitor U0126 für 30 min. vorinkubiert. Es folgte eine Stimulation mit 100 ng/ml TPA. Die Analyse des inhibitorischen Effektes erfolgte durch Detektion von phospho-ERK im Western Blot. Als Beladungskontrolle wurde ERK2 nachgewiesen.

Der Western Blot zeigt eine dosisabhängige Inhibition der ERK Aktivierung. Bei einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ U0126 Inhibitor wurde die Aktivierung vollständig gehemmt (Abb. 3.15). Für den späteren Einsatz des Inhibitors in den Stammzellen wurde eine Konzentration von $5 \mu\text{M}$ verwendet. Diese Konzentration zeigte in den Stammzellen eine effektive Inhibition und war nicht toxisch (siehe 3.4.3).

3.4.3 Hemmung der durch TPA induzierten Differenzierung von HSC durch PKC und ERK Inhibitoren

Um den Einfluß der ERK und PKC Aktivierung auf die Differenzierung der HSCs zu DCs aufzuklären, wurde die TPA induzierte Aktivierung dieser Signalmoleküle durch die getesteten Inhibitoren gehemmt.

Für die Analyse wurden 1×10^5 expandierte HSCs für 30 Minuten mit den jeweiligen Inhibitoren vorinkubiert. Es folgte die Stimulation der Zellen mit 20 ng/ml TPA mit den jeweiligen Inhibitoren für 5 Tage. Als Kontrolle dienten Zellen ohne Inhibitor, sowie

Zellen, die mit der gleichen Menge an DMSO, in der der Inhibitor gelöst ist, behandelt wurden. Alle 2 Tage wurde der Inhibitor erneuert, da die Wirkung der Inhibitoren nach 48 Stunden nachläßt (Daten nicht gezeigt). Am Tag 4 erfolgte die letzte Zugabe der Inhibitoren und an Tag 5 erfolgte die erste morphologische Analyse (in Abb. 3.16 als „+Inhibitor“ gekennzeichnet). Die Zellen wurden danach für weitere 5 Tage kultiviert (in Abb. 3.16 als „- Inhibitor“ gekennzeichnet). Nach der Gesamtzeit von 10 Tagen erfolgte eine erneute morphologische Analyse der Zellen.

In den beiden Kontrollen sind nach 5 Tagen deutliche morphologische Veränderungen der hämatopoetischen Stammzellen zu erkennen. Ein Großteil der Zellen zeigt eine dendritische Morphologie. Die Inhibition der PKC Aktivierung führt dazu, daß die Differenzierung gehemmt wird. Die Zellen bleiben klein, rund, abgekugelt und liegen zumeist vereinzelt vor. Dies entspricht der Morphologie von HSCs. Die Inhibition der ERK-Signalkaskade führt ebenfalls zu einer Hemmung der Differenzierung und die Zellen zeigen typische Stammzellmorphologie mit Proliferationsclustern. Die Aktivierung von PKC ohne ERK-Aktivierung ist somit nicht ausreichend für die Differenzierung.

Beim Abklingen der Inhibitorenwirkung beginnen die zuvor gehemmten Zellen mit der Differenzierung. Am Tag 10 zeigen alle 4 Ansätze Zellen mit dendritischer Morphologie (Abb. 3.16).

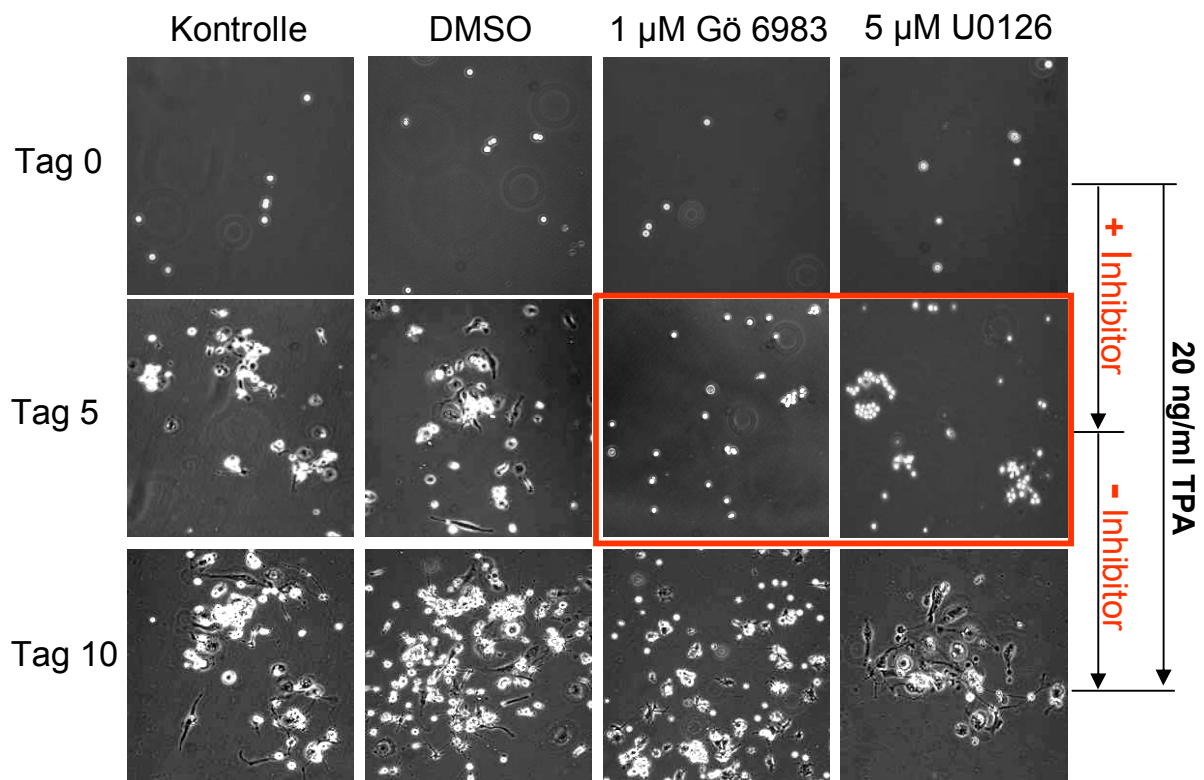


Abbildung 3.16: Einfluß von PKC und ERK Inhibitoren auf die TPA induzierte Differenzierung von HSCs.

Je 1×10^5 HSCs wurden mit den angegebenen Inhibitorkonzentrationen 30 Minuten vor der Stimulation mit 20 ng/ml TPA inkubiert. Bis zum Tag 4 erfolgte alle 2 Tage eine erneute Gabe der Inhibitoren. Während der Inkubationszeit wurden die morphologischen Veränderungen der Zellen am Lichtmikroskop bei 100facher Vergrößerung dokumentiert. Für die Analyse ist die Morphologie der Zellen an Tag 5 und Tag 10 gezeigt.

Dieses Experiment zeigte, daß die Inhibition der beiden Signalwege zu einer Hemmung der Differenzierung führt. Diese Hemmung ist reversibel und zeigte keinen toxischen Effekt für die Zellen.

3.4.4 Einfluß signalwegspezifischer Inhibitoren auf die Differenzierung von HSCs (colony forming assay)

Die in Abschnitt 3.4.3 beschriebene Stimulation der HSCs mit dem Phorbolster TPA führte zu einer Differenzierung zu Dendritischen Zellen. Die Inhibition von PKC und ERK führte zu einer reversiblen Hemmung der Differenzierung. Die Stimulation mit Phorbolster spiegelt jedoch nicht die natürliche Situation der zytokininduzierten Differenzierung wieder. Aus diesem Grund soll im folgenden Abschnitt die Auswirkung des PKC Inhibitors Gö 6983 sowie des MEK Inhibitors U0126 auf die Differenzierung von HSCs in einem komplexen Differenzierungsansatz (colony forming assay) untersucht werden.

Für die Analyse wurden je 500 expandierte CD34⁺ Zellen mit den jeweiligen Inhibitoren für 30 min. vorinkubiert und danach in MethoCult H4434 mit dem jeweiligen Inhibitor eingebettet und ausplattiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit dem Lösungsmittel der Inhibitoren (DMSO), vorinkubiert wurden. Die ausplattierten Zellen wurden für 10 Tag kultiviert. Während dieser Zeit differenzieren die Zellen in Erythrozytenkolonien (BFU-E; blast forming unit-erythroid), Granulozytenkolonien (CFU-G; colony forming unit-granulocyte), Makrophagenkolonien (CFU-M; colony forming unit-macrophage) und Mischkolonien aus Granulozyten und Makrophagen (CFU-GM; colony forming unit-granulocyte, macrophage) aus. Am Tag 10 wurden die einzelnen Kolonieförmungen im Mikroskop bei 50- bis 100-facher Vergrößerung ausgezählt.

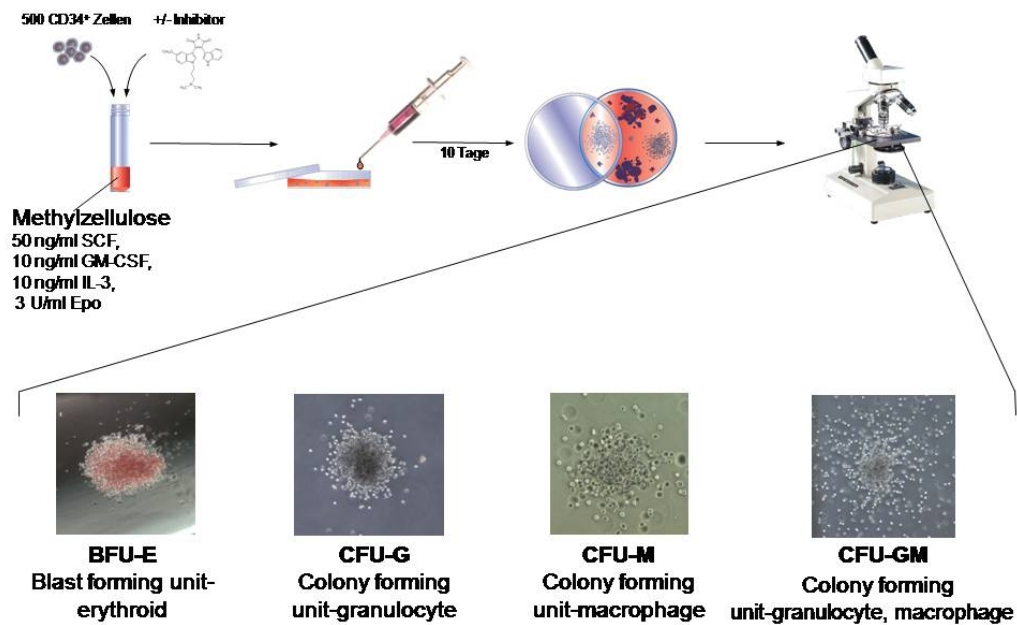
In Abbildung 3.17 C ist die jeweilige Kolonienanzahl in Form eines Balkendiagrammes dargestellt. Die Gesamtzahl der Kolonien blieb durch den PKC und ERK Inhibitor weitestgehend unbeeinflusst, wohingegen der Januskinase Inhibitor zu einem drastischen Rückgang der Kolonien führte (Abb. 3.17 B). In diesem Assay werden keine Dendritischen Zellen gebildet. Da Dendritische Zellen und Makrophagen jedoch aus dem gleichen Vorläufer, den Monozyten, gebildet werden, wurde der Einfluß der Inhibitoren auf diese Population analysiert (roter Rahmen). Die Inhibition der ERK-Signalkaskade führte zu einer deutlichen Reduktion der gebildeten Makrophagenkolonien. Die Hemmung von PKC zeigte einen noch stärkeren Effekt. Hier betrug die Anzahl der gebildeten Kolonien nur noch die Hälfte des Kontrollwertes. Beide Signalwege sind also an der Differenzierung von Makrophagen und somit auch an der Differenzierung von DCs beteiligt.

Im Gegensatz dazu führte die Hemmung der Januskinasen zu einer deutlichen Hemmung aller Kolonieförmungen. Da in Abschnitt 3.3.5 gezeigt werden konnte, daß der JAK/STAT-Signalweg keinen direkten Einfluß auf die Differenzierung von DCs und

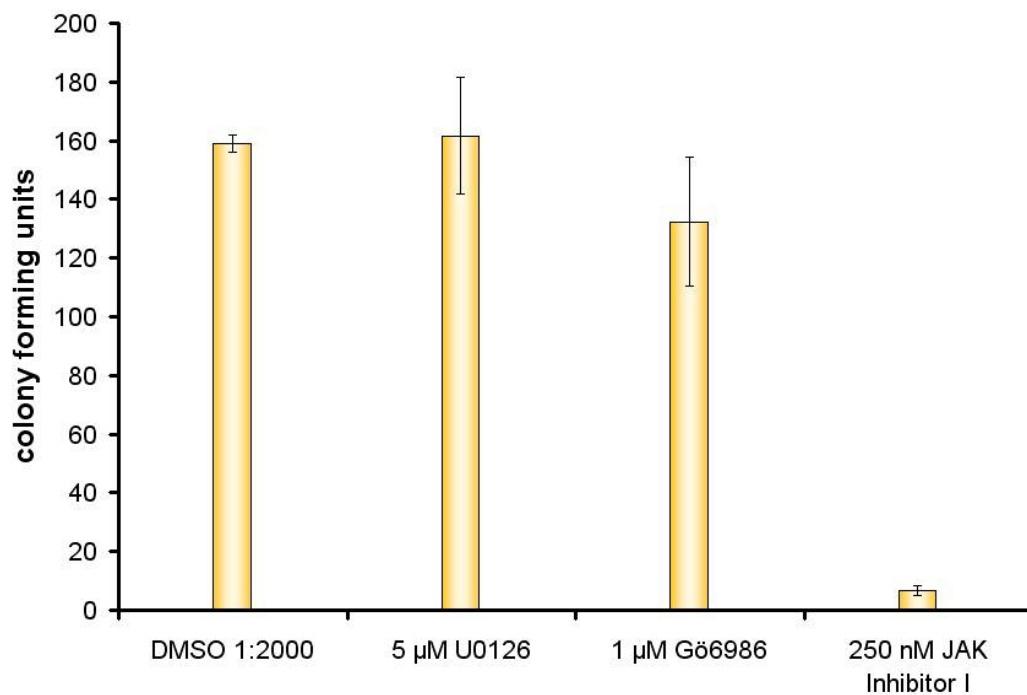
somit von Makrophagen nimmt, scheint jedoch die Proliferation der Zellen während der Differenzierung entscheidend durch diesen Signalweg beeinflusst zu sein.

Für andere Kolonieförmungen wie Erythrozytenkolonien und Granulozyten führte die Inhibition der ERK-Signalkaskade zu einer erhöhten Koloniezahl. Die Bildung dieser Kolonie scheint durch die Aktivierung dieser Signalkaskade inhibiert zu werden (Abb. 3.17 C; BFU-E, CFU-G).

A



B



C

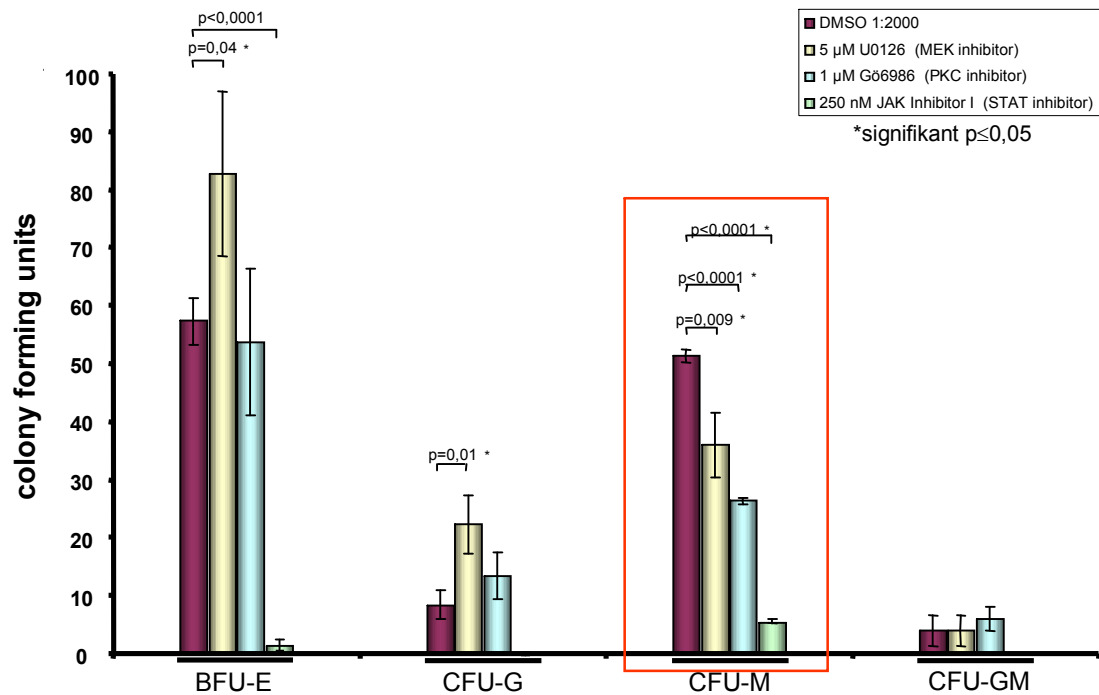


Abbildung 3.17: Koloniebildung von CD34⁺ Zellen im MethoCult-Assay. (A) Schematische Abbildung eines MethoCult-Assays (colony forming assays). (B) Anzahl aller gebildeten Kolonien. Für jeden Ansatz wurden 500 CD34⁺ Zellen, die mit und ohne Inhibitor vorinkubiert wurden, in 1 ml MethoCult H4434 ausplattiert. Nach 10 Tagen wurde die Gesamtzahl an gebildeten Kolonieformen bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte aus Triplikaten mit der dazugehörigen Standardabweichung (C) Für jeden Ansatz wurden 500 CD34⁺ Zellen, die mit und ohne Inhibitor vorinkubiert wurden, in 1 ml MethoCult H4434 ausplattiert. Nach 10 Tagen wurden die einzelnen Kolonieformen bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte aus Triplikaten mit der dazugehörigen Standardabweichung (SD), sowie der Signifikanz (p). Abkürzungen: BFU-E: erythroide Kolonien; CFU-G: granuloid Kolonien; CFU-M: Makrophagenkolonien; CFU-GM: gemischte myeloide Kolonien.

3.5 Regulation des essentiellen myeloiden Transkriptionsfaktors PU.1 bei der Differenzierung von HSCs zu DCs durch ERK und PKC δ

Im letzten Abschnitt der Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen den aktivierten Signalkaskaden und dem für die Differenzierung essentiellen Transkriptionsfaktor PU.1 untersucht.

3.5.1 Regulation von PU.1 durch die Mitogene Signalkaskade ERK und PKC δ .

Das von Koschmieder und Tenen *et al.* aufgestellte Differenzierungsmodell verdeutlicht die Differenzierungsstufen, an denen PU.1 eine entscheidende Rolle spielt (Abb. 3.18). Das Modell in Abbildung 3.18 wurde um die Frage der Regulation von PU.1 durch ERK oder PKC δ erweitert (Koschmieder, *et al* 2005).

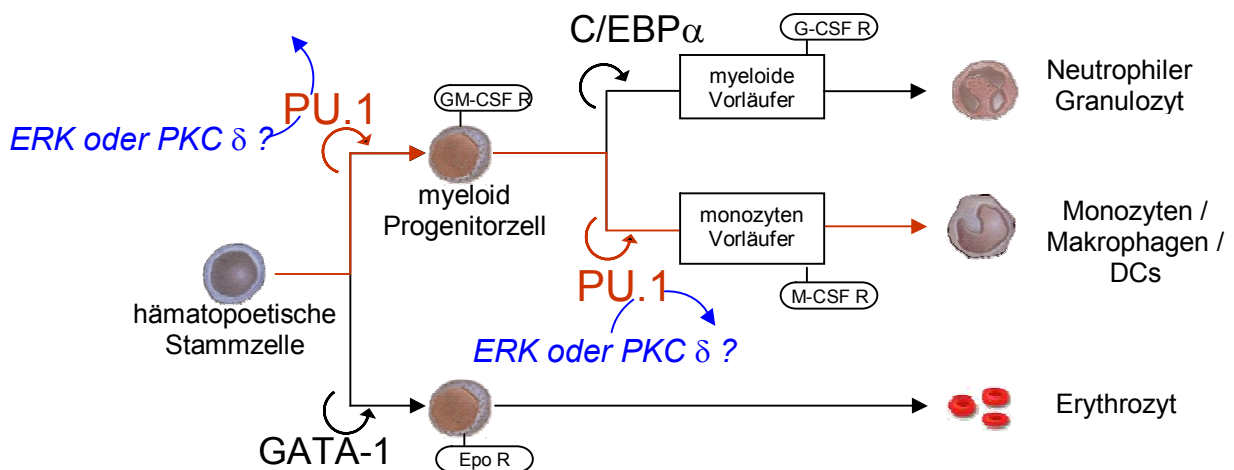


Abbildung 3.18: Differenzierungsmodell nach Tenen *et al.* Schematische Darstellung der an der Differenzierung von HSCs beteiligten Transkriptionsfaktoren. Das Modell wurde um die Frage der Regulation von PU.1 durch ERK oder PKC δ erweitert.

3.5.2 Expression von PU.1 in verschiedenen Zelllinien und in CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen

PU.1 wird ausschließlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert (Klemsz, *et al* 1990), (Hromas, *et al* 1993). Es wurde daher als erstes die Expression von PU.1 in Zelllinien (Abb. 3.19 A) und in CD34⁺ Stammzellen (Abb. 3.19 A+B) überprüft. Die jeweiligen Zellen wurden dazu in RIPA lysiert und 50 μ g Gesamtprotein wurde im SDS-Gel für den anschließenden Western Blot aufgetrennt. Die Western Blot Analyse erfolgte mit einem polyklonalen Antikörper, der gegen die ersten N-terminalen 135 Aminosäuren von PU.1 gerichtet ist. Für die humane akut myeloide Leukämiezelllinie KG-1a sowie die frühe T-Zelllinie A3.01 konnte eine Expression von PU.1 nachgewiesen werden. In Molt 4/8 - eine humanen T-Zelllinie, HOS - einer humanen Osteosarkomazelllinie, 293T - einer embryonalen humanen Nierenkarzinomzelllinie, HeLa - einer humanen Gebärmutterhalskarzinomzelllinie und Alpha 1 - einer humanen Fibroblastenzelllinie wurde keine Expression von PU.1 gefunden. Da es sich bei diesen Zelllinien um Zellen handelt, deren Herkunft sich nicht von hämatopoetischen Zellen ableitet, entspricht dieses Ergebnis der Literatur.

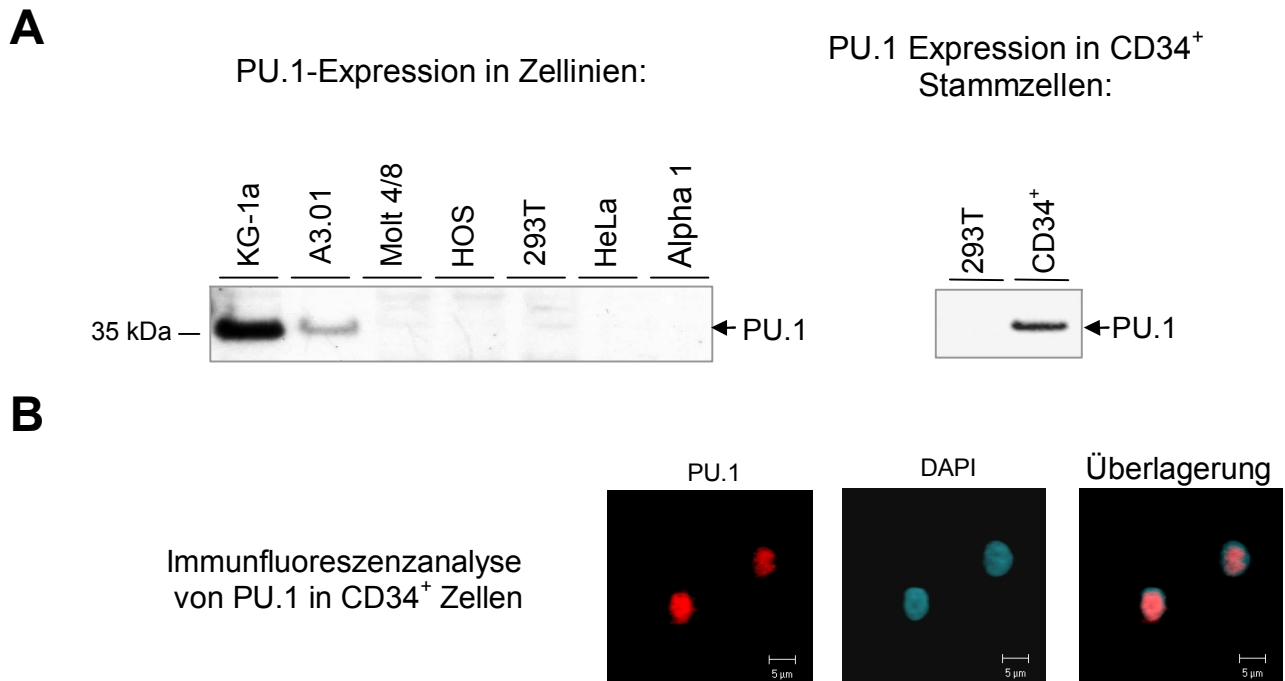


Abbildung 3.19: Nachweis der Expression von PU.1 in hämatopoetischen Zelllinien, sowie CD34⁺ Stammzellen. (A) Verschiedene Zelllinien, sowie expandierte CD34⁺ Zellen wurden im Western Blot (50 µg Gesamtprotein) auf die Expression von PU.1 überprüft. (B) Konfokale Laserscan Analyse der CD34⁺ Zellen (400 x Vergrößerung). Die Färbung der Zellen auf PU.1 ist in Rot dargestellt. Die DAPI-Färbung (blau) wurde zur Darstellung des Chromatins im Zellkern gewählt. Die Überlagerung zeigt deutliche Kolo-kalisation von PU.1 mit der gefärbten DNA.

Für die untersuchten hämatopoetischen Stammzellen (CD34⁺ Zellen) konnte ebenfalls eine deutliche Expression des Transkriptionsfaktors PU.1 nachgewiesen werden. Als Kontrolle diente der Vergleich mit 293T Zellen, die sich in der Zelllinienanalyse als negativ für den Faktor zeigten.

Die Immunfluoreszenzanalyse der CD34⁺ Zellen zeigt eine deutliche Kolo-kalisation von PU.1 und DNA im Zellkern (Abb. 3.19). Wie erwartet ist PU.1 in hämatopoetischen Stamm-/Progenitorzellen als kernständiger Transkriptionsfaktor exprimiert.

3.5.3 Analyse der Expression von HA-PU.1

Für die Untersuchung von PU.1 wurde zunächst ein PU.1-Expressionsplasmid konstruiert. Dazu wurde aus KG-1a und K-562 Zellen mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Durch PCR wurde PU.1 amplifiziert. Am 5'-Ende des Plusprimers wurde die Sequenz einer codonoptimierten (human codon usage optimized) HA-Markierung verwendet. Das resultierende PCR Produkt wurde über TA-Klonierung in das Expressionsplasmid pTARGET (Promega) ligiert und in dem *E. coli*-Stamm

Top10 (Invitrogen) vermehrt. Die Sequenzierung ergab, daß nur Klone mit falscher Orientierung des PU.1-Inserts vorhanden waren. Das Insert wurde daher durch *BamH I* und *Sal I* in das Expressionsplasmid pIRES2-EGFP subkloniert. Die Expression von HA-PU.1 wurde im α -HA-, sowie α -PU.1-Western Blot nachgewiesen. Die Kernlokalisation von HA-PU.1 wurde durch Immunfluoreszenzanalyse gezeigt (Abb. 3.20). Sowohl im Western Blot als auch in der Immunfluoreszenz konnte die Expression von HA-PU.1 gezeigt werden. Der angefügte HA-Tag führt dabei zu keiner Veränderung der Kernlokalisation von PU.1.

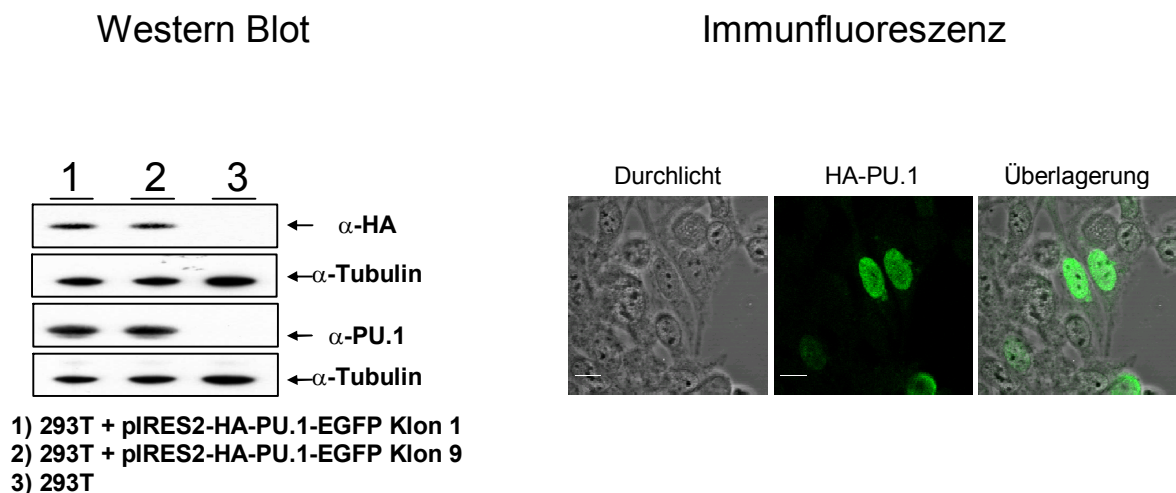


Abbildung 3.20: Nachweis der Expression von HA-PU.1. 293T Zellen wurden mit 1 μ g pIRES2-HA-PU.1-EGFP transfiziert. Nach 48 Stunden erfolgte die Lyse bzw. Fixierung der Zellen für einen α -HA, sowie einen α -PU.1 Western Blot und für eine α -HA Immunfluoreszenzfärbung. Als Beladungskontrolle für den Western Blot wurde Tubulin detektiert.

3.6 PU.1 als Phosphoprotein

3.6.1 Untersuchung einer möglichen Phosphorylierung von PU.1

Um zu untersuchen, ob es sich bei PU.1 um ein Phosphoprotein handelt, wurde im ersten Schritt eine mathematische Analyse der möglichen Phosphorylierungsstellen durchgeführt. Dazu wurde das Programm NetPhosK (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>) verwendet, welches aufgrund der Aminosäuresequenz mögliche Phosphorylierungsstellen vorhersagt. Die Analyse ist in Abbildung 3.21 A dargestellt. Es ergaben sich mögliche Phosphorylierungsstellen für CKII, PKC, p38, EGFR, PKA und PKG. Die Größe der Buchstaben zeigt dabei die eingerechnete Wahrscheinlichkeit an.

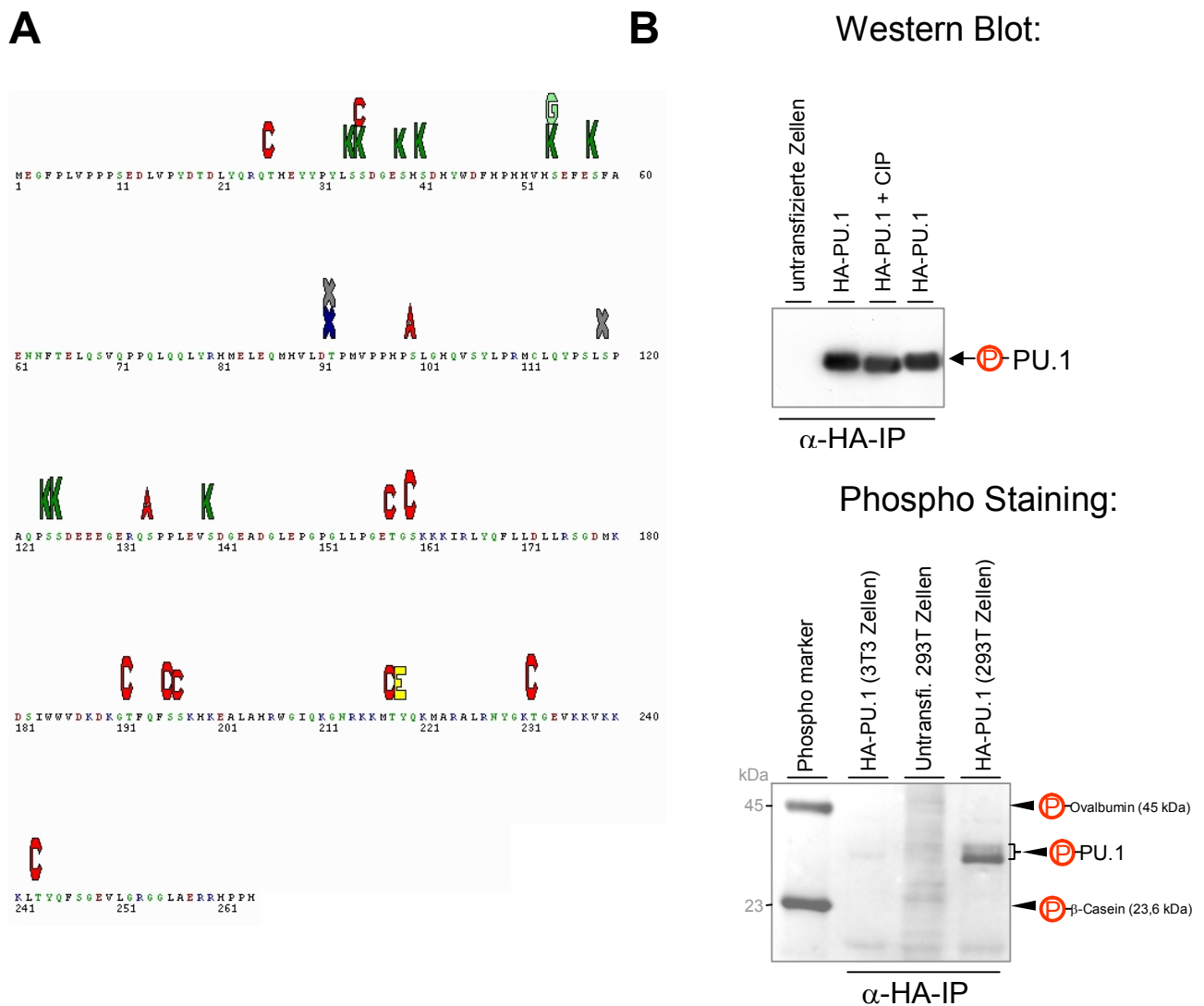


Abbildung 3.21: Untersuchung einer möglichen Phosphorylierung von PU.1. (A) Computeranalyse von möglichen Phosphorylierungsstellen des PU.1 Proteins. Die Größe der Buchstaben korreliert mit der jeweiligen Wahrscheinlichkeit. Abkürzungen: K=CKII, C=PKC, X=p38, E=EGFR, A=PKA und G=PKG (B)

Im Western Blot (Abb.3.21 B) ist für den mit Alkalischer Phosphatase (CIP) behandelten IP Ansatz ein deutlicher Größenunterschied der PU.1 Bande zu erkennen. CIP dephosphoryliert Proteine und verändert so sein Molekulargewicht. Dies weist darauf hin, daß PU.1 in 293T Zellen durch Phosphorylierung modifiziert ist. Der Phosphostain verdeutlicht die Phosphorylierung von PU.1 noch einmal. Mit diesem Verfahren kann Phosphorylierung direkt durch eine Färbung nachgewiesen werden. Bei dieser Färbung lagert sich der Farbstoff direkt an die Phosphogruppe der Proteine an und kann dadurch sichtbar gemacht werden. Interessanterweise zeigt nur das aus 293T immunpräzipitierte PU.1 ein deutliches Phosphorylierungsmuster. In den 3T3 Zellen liegt PU.1 nicht oder nur im geringen Maß phosphoryliert vor. Aus diesem Grund wurde für die Untersuchung von PU.1 im Kinase-Assay das Protein aus transfizierten 3T3 Zellen isoliert. Sowohl Western Blot als auch Phosphostain zeigten, daß der Transkriptionsfaktor PU.1 durch posttranskriptionelle Phosphorylierung verändert wird.

3.6.2 Analyse der *in vitro* Phosphorylierung von PU.1 durch PKC δ , ERK2 und CKII

Um aufzuklären, ob PU.1 möglicherweise durch eine der in den CD34⁺ Zellen untersuchten Signalkaskade reguliert wird, wurde ein *in vitro* Kinase-Assay durchgeführt. Pongubala *et al.*, Lodie *et al.* und Joo *et al.* konnten zeigen, daß Kaseinkinase 2 (CKII) in der Lage ist PU.1 zu phosphorylieren (Pongubala, *et al* 1993), (Lodie, *et al* 1997), (Joo, *et al* 2004). Dies wurde im ersten Experiment überprüft und diente als Positivkontrolle für die *in vitro* Phosphorylierung von PU.1.

Um die Phosphorylierung von PU.1 zu untersuchen, wurde HA-markiertes PU.1 in 3T3 Zellen durch Transfektion von 1 μ g pIRES2-HA-PU.1-EGFP exprimiert und durch eine α -HA-Immunpräzipitation von den übrigen Proteinen des Zellextraktes geklärt. HA-PU.1 wurde vor der Kinasereaktion vom Antikörper und dessen Trägermaterial mittels kompetitiver Bindung eines HA-Peptids abgelöst. Als aktive Kinase wurde eine rekombinant hergestellte CKII-alpha Untereinheit eingesetzt. Als Kontrolle für die Kinasereaktion wurde ein IP-Ansatz in untransfizierten Zellen gewählt, sowie ein spezifischer CKII Inhibitor (DMAT). Im Western Blot wurde die Kinase, sowie PU.1 nachgewiesen. Der CKII-Kinase-Assay zeigt eine starke Phosphorylierung des 36 kDa großen PU.1 Proteins durch CKII-alpha. Diese Phosphorylierung konnte spezifisch durch den CKII Inhibitor gehemmt werden, dies ist durch eine Reduktion der Bandenintensität erkennbar. Der Kontrollansatz ohne rekombinantes CKII-alpha zeigt keine Phosphorylierung von PU.1. Dies läßt darauf schließen, daß keine zusätzliche Kinase kopräzipitiert wurde. Die Kontroll-IP-Ansätze aus den Lysaten der untransfizierten Zellen zeigen kein phosphoryliertes Protein (Abb. 3.22). Die in der Literatur beschriebene Phosphorylierung von PU.1 durch CKII konnte also im Kinase-Assay bestätigt werden.

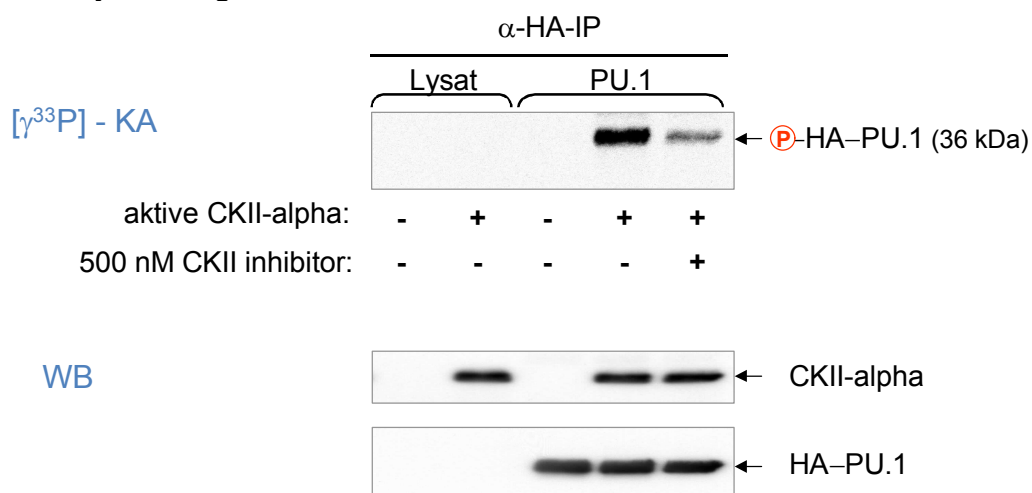


Abbildung 3.22: Untersuchung einer Phosphorylierung von PU.1 durch Kaseinkinase II (CKII). Für die Kinasereaktion wurde eine zuvor aktivierte Form von CKII alpha verwendet. HA- markiertes PU.1 wurde in NIH 3T3-Zellen exprimiert (1 μ g pIRES2-HA-PU.1-EGFP, 48 h), mittels α -HA-Immunopräzipitation (IP) isoliert und als Substrat im Kinaseassay (KA) eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde die IP mit untransfizierten Zellen (Lysat) durchgeführt. Zur Überprüfung der Kinasereaktion wurde ein spezifischer CKII Inhibitor zur Blockierung eingesetzt. Das in der Reaktion eingesetzte HA-PU.1, sowie die verwendete Kinase wurden im α -HA und α -CKII alpha-Western Blot nachgewiesen (WB).

Die vorangegangenen Experimente in den Stammzellen zeigten, daß GM-CSF und IL-4 Stimulation zur Aktivierung von PKC δ führen und daß die Differenzierung der Zellen durch einen spezifischen PKC Inhibitor blockiert werden konnte. Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob PKC δ in der Lage ist PU.1 im Kinase-Assay zu phosphorylieren. Dazu wurde das HA-markierte PU.1 homolog zum CKII Kinase-Assay aus 3T3 Zellen isoliert. Als Kinase wurde ein rekombinant hergestelltes PKC δ Protein eingesetzt. Die Aktivierung der Kinase erfolgte durch Zugabe von Diacylglycerol (DAG) zur Kinasereaktion. Als Negativkontrolle für die Kinasereaktion wurde ein IP-Ansatz aus untransfizierten Zellen gewählt. Als Positivkontrolle wurde die Phosphorylierung von Histon H1 beobachtet. Die Phosphorylierung wurde durch den spezifischen PKC Inhibitor Gö 6983 blockiert. Im Western Blot wurde die Kinase, sowie PU.1 nachgewiesen (Abb. 3.23).

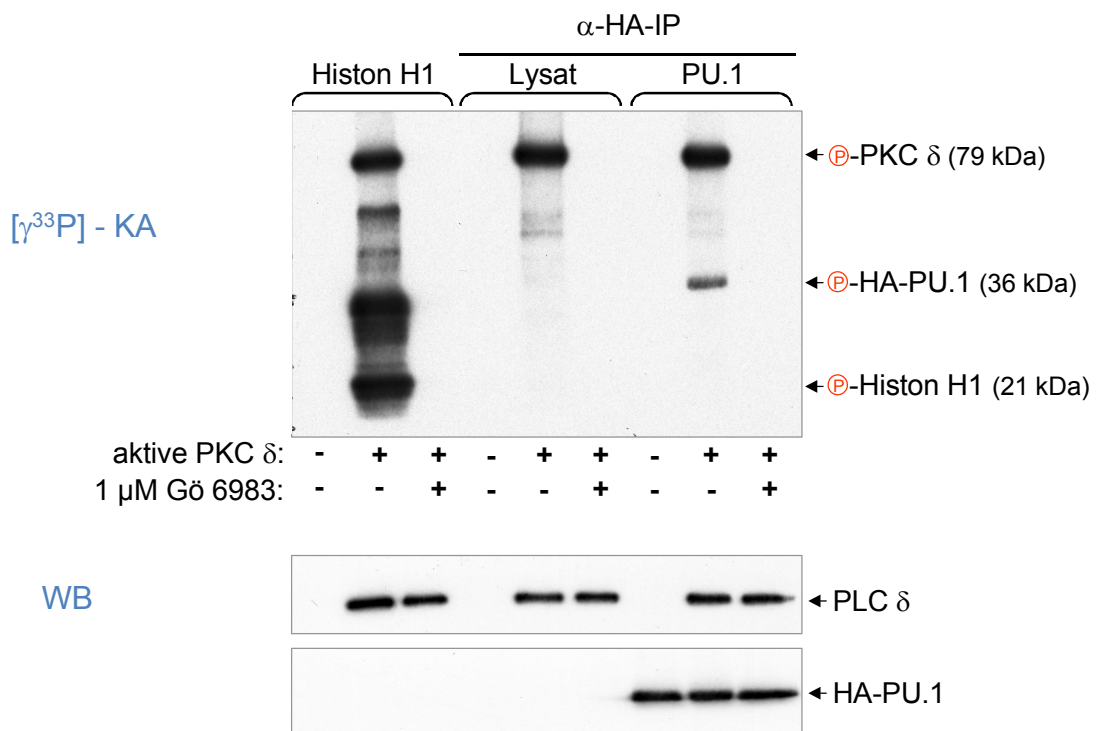


Abbildung 3.23: Untersuchung einer Phosphorylierung von PU.1 durch PKC δ . Für die Kinasereaktion wurde PKC δ durch Diacylglycerol (DAG) aktiviert und in der Reaktion verwendet. HA- markiertes PU.1 wurde in NIH 3T3-Zellen exprimiert (1 μg pIRES2-HA-PU.1-EGFP, 48 h), mittels α -HA-Immunopräzipitation (IP) isoliert und als Substrat im Kinase-Assay (KA) eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde die IP mit untransfizierten Zellen (Lysat) durchgeführt. Zur Überprüfung der Kinasereaktion wurde Histon H1 als Substrat für die Positivkontrolle, sowie ein spezifischer PKC Inhibitor zur Blockierung der Kinasereaktion eingesetzt. Das in der Reaktion eingesetzte HA-PU.1, sowie die verwendete Kinase wurden im α -HA und α -PKC δ -Western Blot nachgewiesen (WB).

Der PKC-Kinase-Assay zeigte eine Autophosphorylierung von PKC δ , die durch die Bindung von DAG an die Kinase hervorgerufen wird. PKC δ war zusätzlich in der

Dieses Experiment zeigt, daß die ERK keinen direkten Einfluß auf PU.1 durch Phosphorylierung nimmt. Im nächsten Kapitel wird jedoch gezeigt werden, daß die Transaktivierung von PU.1 von der Aktivierung der Kinase ERK abhängig ist.

3.6.3 Konstruktion eines PU.1 Reporterplasmids zur Analyse der PU.1 Aktivität *in vivo*

Für eine *in vivo* Untersuchung der PU.1 Aktivierung wurde im nächsten Schritt ein auf Luciferase basierendes Reportersystem verwendet. Dazu war die Konstruktion eines Reporterplasmids notwendig. Das System basiert auf dem Plasmid pTL-Luc (BioCat/Panomics). Das Plasmid enthält 5 Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor GAL4, welche durch 5 Wiederholungen des PU.1 Bindungsmotifs **AGGAAG** aus dem PEA3 „Enhancer Motiv“ ausgetauscht wurde, sowie einen TK Minimalpromotor mit nachgeschaltetem Luciferasegen (Abb. 3.25 A). Für die Untersuchung wurden HeLa Zellen verwendet, da in ihnen die Mitogene Signalkaskade durch TPA Stimulation aktiviert werden kann und die Expression von PkC δ nachgewiesen wurde.

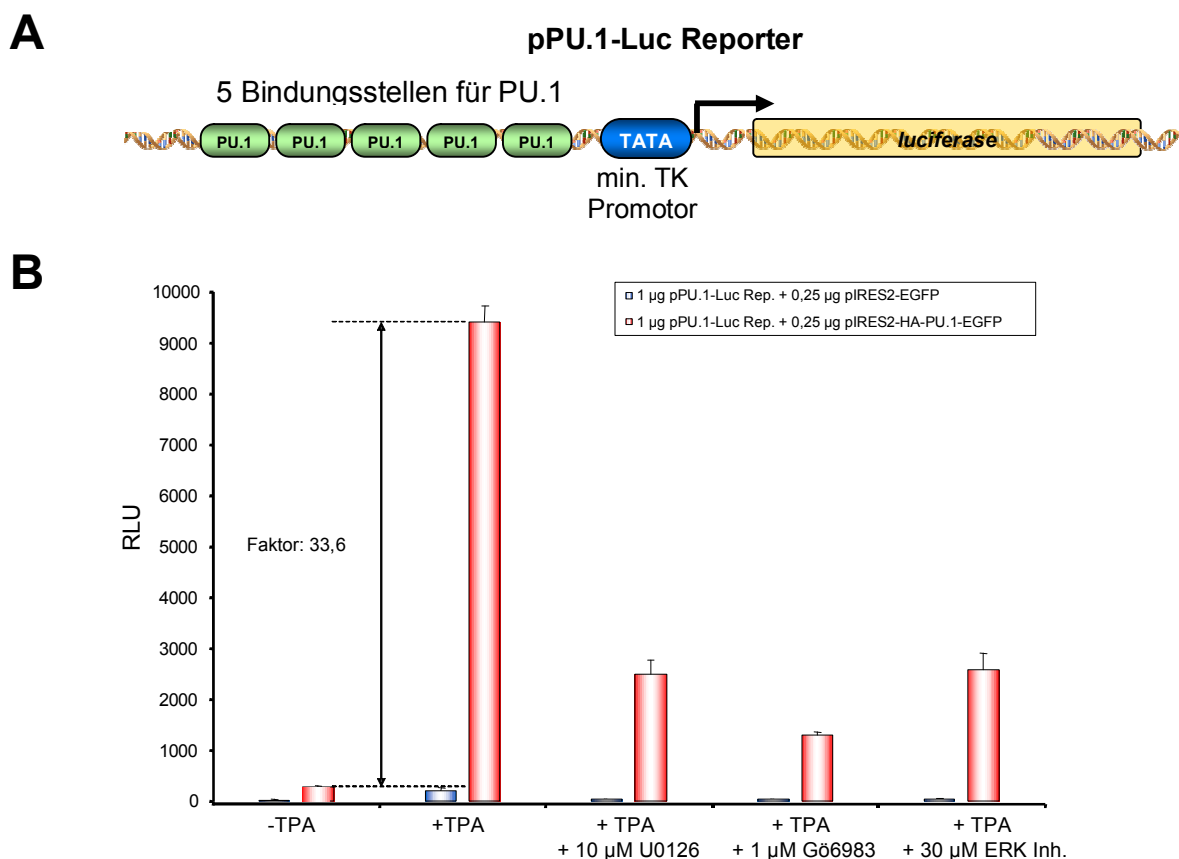


Abbildung 3.25: *In-vivo* Untersuchung der Aktivierung von PU.1 durch die Mitogene Signalkaskade. (A) Schematische Darstellung des Reporterplasmids pPU.1-Luc Reporter. (B) Transfektion von 1 µg pPU.1-Luc Reporter mit 0,25 µg pIRES2-HA-PU.1-EGFP oder 0,25 µg pIRES2-EGFP in HeLa Zellen. 16,5 h vor der Analyse der Zellen im Luciferase-Assay wurden die Zellen mit den angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren behandelt und 30 min später mit 20 ng/ml TPA stimuliert. Die Analyse erfolgte 48 Stunden nach Transfektion. Die Luciferasewerte wurden auf Proteinmenge normalisiert.

Für die Untersuchung wurden HeLa mit 1 µg pPU.1-Luc Reporter mit 0,25 µg pIRES2-HA-PU.1-EGFP oder zur Kontrolle 0,25 µg pIRES2-EGFP transfiziert. 16,5 Stunden vor der Analyse der Zellen wurde ein Teil der Ansätze mit den Inhibitoren Gö 6983 (PKC), U0126 (MEK) und ERK Inhibitor behandelt. Nach 30 Minuten Vorinkubation erfolgte die Stimulation der Zellen mit 20 ng/ml TPA. Die Analyse der Zellen erfolgte 48 Stunden nach der Transfektion im Luciferase-Assay. Die Luciferasewerte wurden auf Proteinmenge normalisiert.

Die mitogene Stimulation von PU.1 führt zu einer Aktivierung der durch PU.1 induzierten Transkription, die sich in einem 33-fachen Anstieg der Luciferaseaktivität widerspiegelt. Diese Aktivierung kann an verschiedenen Stufen der Signalkaskade gehemmt werden. Sowohl PKC, MEK und auch ERK Inhibition führt zu einem 70 – 80 % Reduktion der Aktivierung (Abb. 3.25 B). Durch dieses Experiment konnte gezeigt werden, daß die PU.1 Transaktivierung durch die Mitogene Signalkaskade reguliert wird.

3.6.4 Inhibitorische Interaktion zwischen PU.1 und GATA-1

In der Literatur beschriebene Untersuchungen der Hämatopoese und speziell des Transkriptionsfaktors PU.1 und GATA-1 zeigten, daß PU.1 in der Lage war, GATA-1 Transaktivierung selektiv zu hemmen und GATA-1 hemmte wiederum den PU.1 Cofaktor c-JUN (Zhang, *et al* 2000) (Zhang, *et al* 1999). Dieses Modell ist in Abbildung 3.26 A verdeutlicht. Die gegenseitige Inhibition von GATA-1 und PU.1 ist dabei entscheidend für die erythroide oder myeloide Differenzierung. Untersuchungen von akut myeloiden Leukämiezelllinien wie z.B. K-562 oder TF-1 zeigen, daß PU.1 die Differenzierung der Zellen zu Erythrozyten inhibiert. Für das humane HA-markierte PU.1 und das humane HIS-markierte GATA-1 soll diese Inhibition im nächsten Schritt untersucht und die Funktionalität beider Proteine getestet werden. Das humane HIS-markierte GATA-1 wurde aus TF-1 Zellen analog zu HA-PU.1 kloniert. Seine Expression wurde im α -HIS und α -GATA-1 Western Blot nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich war die Konstruktion eines weiteren Reporterplasmids notwendig. Das Plasmid enthält 5 Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor GATA-1 (**AGATAAG**), sowie einen TK Minimalpromotor mit nachgeschaltetem Luciferasegen (Abb. 3.26 B).

Für das Experiment wurden HeLa Zellen mit 1 µg pGATA-1-Luc Reporter mit und ohne 0,25 µg pHIS-GATA-1, sowie verschiedenen Mengen des Plasmids pEGFP2-HA-PU.1-EGFP transfiziert. Die transfizierte DNA Menge wurde für alle Ansätze konstant gehalten. 16 Stunden vor der Analyse der Zellen im Luciferase-Assay erfolgte die Stimulation der Zellen mit 20 ng/ml TPA. Das Luciferase-Assay wurde 48 h nach Transfektion durchgeführt. Die Luciferasewerte wurden auf Proteinmenge normalisiert.

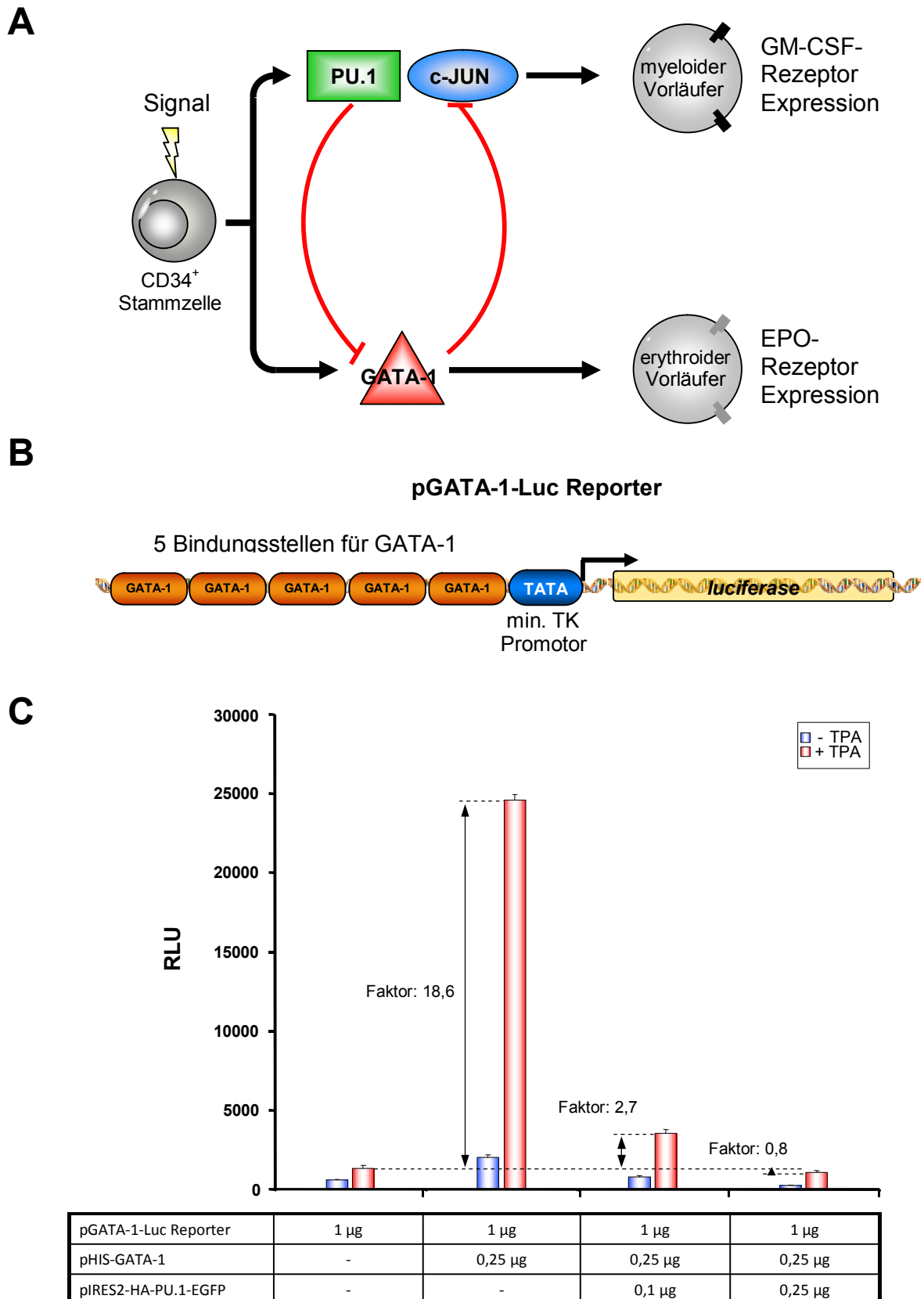


Abbildung 3.26: Selektive Hemmung des Transkriptionsfaktors GATA-1 durch Interaktion mit PU.1. (A) Schematische Darstellung der Interaktion und Inhibition von PU.1 und GATA-1. (B) Schematische Darstellung des Reporterplasmids pGATA-1-Luc Reporter. (C) Transfektion von 1 µg pGATA-1-Luc Reporter mit und ohne 0,25 µg pHIS-GATA-1, sowie verschiedene Dosen pIRES2-HA-PU.1-EGFP in HeLa Zellen. Nach 48 Stunden erfolgte die Luciferaseanalyse mit und ohne 16 h 20 ng/ml TPA Stimulation.

Abbildung 2.26 B zeigt, daß TPA-induzierte Signalwege zur Transaktivierung von GATA-1 führen (+TPA). Bereits geringe Mengen an PU.1 sind in der Lage sowohl die basale transkriptionelle Aktivität (Basalaktivität) von GATA-1 als auch die Transaktivierung zu inhibieren (Abb. 3.26 C).

Die in der Literatur beschriebene Wechselwirkung von PU.1 mit GATA-1 und die damit verbundene Inhibition von GATA-1 konnte mit dem Experiment bestätigt werden.

3.6.5 Inhibition der PU.1 Transaktivierung durch siRNA vermittelte Expressionsverringerng von PKC δ , ERK und PU.1

Im Abschnitt 3.6.3 konnte gezeigt werden, daß die Transaktivierung von PU.1 sowohl durch Inhibition von PKC als auch durch die Inhibition von MEK und ERK gehemmt wird. Die Inhibitoren zeigen eine hohe Selektivität für die zu inhibierende Kinase, sind jedoch manchmal nicht nebenwirkungsfrei, d.h. zu einem geringen Prozentsatz hemmen sie auch andere Kinasen. Zudem war eine Untersuchung einzelner Kinaseformen wie PKC δ mit dem Inhibitor Gö 6983 nicht möglich, da dieser sowohl die klassischen als auch die neuen PKC Formen hemmt. Im Experiment sollte daher die Funktion der einzelnen Kinasen genauer im Detail charakterisiert werden. Dazu wurden die Expression der einzelnen Kinasen mit Hilfe der siRNA Technik verringert.

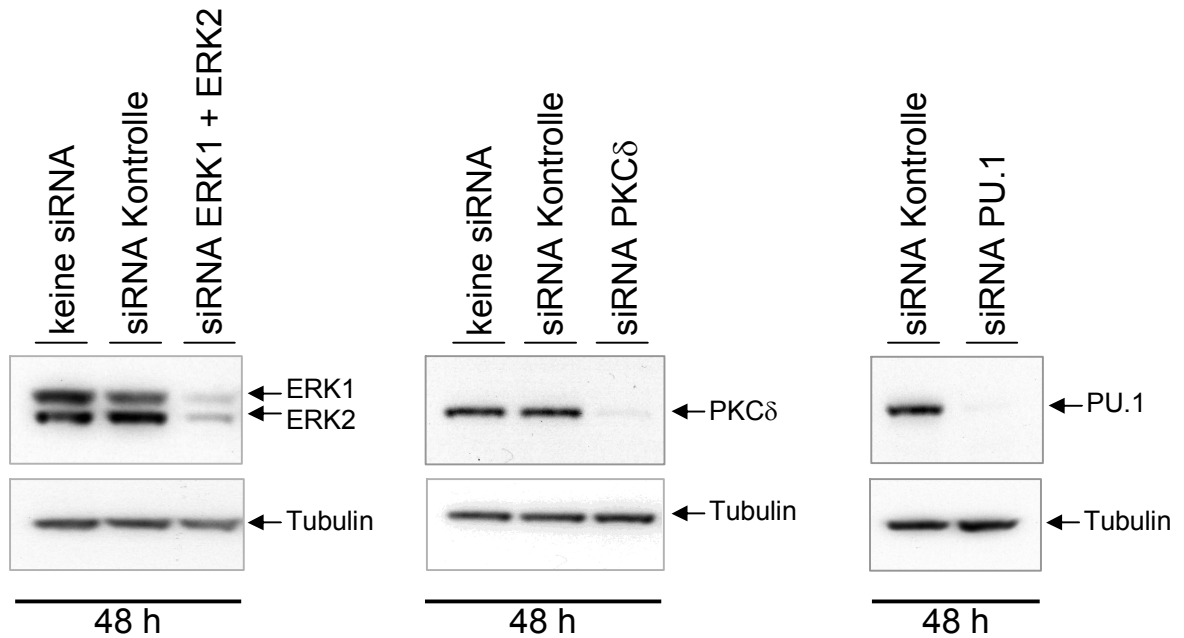
Für das Experiment wurden HeLa Zellen mit 1 μ g pPU.1-Luc Reporter, sowie 0,25 μ g pIRES2-HA-PU.1-EGFP und der jeweiligen siRNA kotransfiziert. Es wurde jeweils ein Ansatz mit spezifische siRNA, sowie unspezifische siRNA als Kontrolle verwendet. 16 Stunden vor der Analyse der Zellen im Luciferase-Assay erfolgte die Stimulation der Zellen mit 20 ng/ml TPA. Das Luciferase-Assay wurde 48 h nach Transfektion durchgeführt. Die Luciferasewerte wurden auf Proteinmenge normalisiert. Zusätzlich wurden im Western Blot die Expressionsverringerng der Kinasen analysiert.

Es wurde eine fast vollständige Reduktion der Proteinexpression von PKC δ und PU.1 beobachtet. Für ERK war nach 48 Stunden eine Restexpression im Western Blot nachzuweisen (Abb. 3.27 A). Die unspezifische siRNA führt in keinem der Ansätze zu einer Beeinflussung der Proteinexpression.

Im Luciferase-Assay (Abb. 3.27 B) zeigte die unspezifische siRNA die erwartete Induktion der Transaktivierung nach TPA Stimulation. Die Inhibition der ERK Expression führte zu einer Hemmung der PU.1 vermittelten Transkription des Luciferasereporters. Für die Basalaktivität von PU.1 konnte keine Veränderung gegenüber der Kontrolle beobachtet werden. Interessanterweise zeigte die Expressionsverringerng der PKC δ einen deutlichen Rückgang der PU.1 vermittelten Transkription des Luciferasereporters, sowie ein signifikante Verringerung der Basalaktivität. Sie ist mit dem Ansatz, in dem PU.1 Expression

inhibiert wurde, vergleichbar. Diese Beobachtung läßt darauf schließen, daß ERK die Aktivierung von PU.1 moduliert, wohingegen PKC δ die DNA Bindungseigenschaften des Transkriptionsfaktors zu beeinflussen zu scheint.

A



B

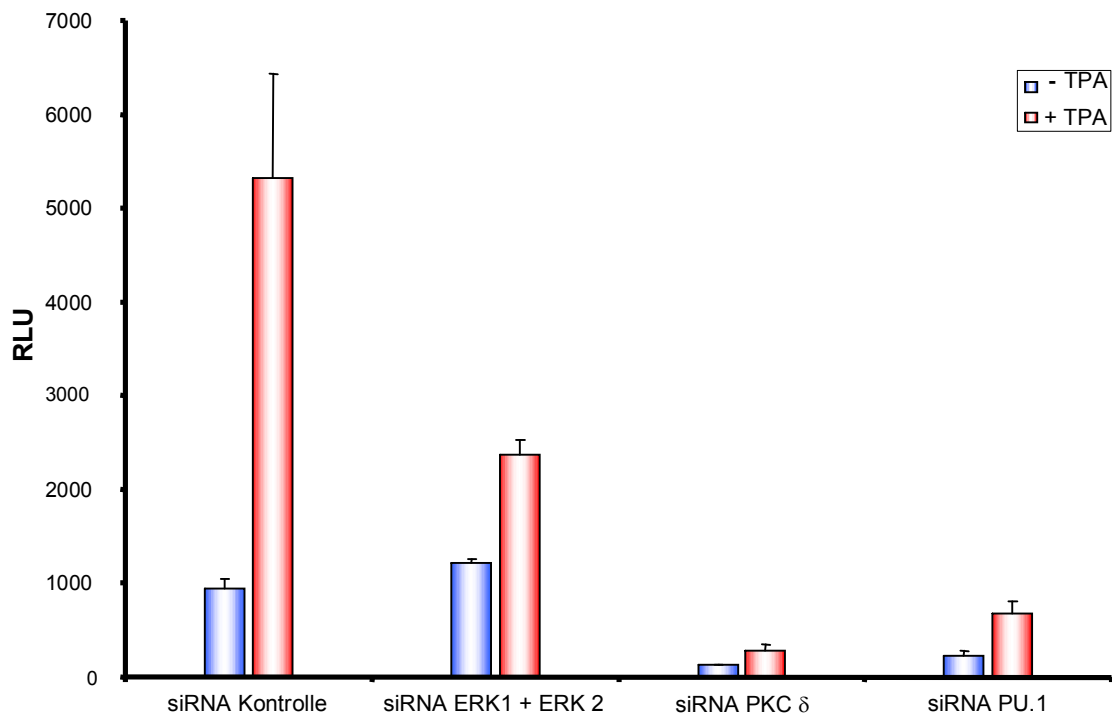


Abbildung 3.27: Inhibition der PU.1 Transaktivierung durch siRNA vermittelter Expressionsverringerng von PKC δ und ERK. (A) Western Blot Analyse zur Untersuchung des Knockdowns von ERK, PKC δ und PU.1 (B) Transfektion von 1 μ g pPU.1-Luc Reporter, sowie 0,25 μ g pIRES2-HA-PU.1 und 20 nM der siRNAs in HeLa Zellen. Nach 48 Stunden erfolgte die Luciferaseanalyse mit und ohne 16 h 20 ng/ml TPA Stimulation.

Es konnte gezeigt werden, daß sowohl ERK als auch PKC δ eine entscheidende Rolle bei der Steuerung des Transkriptionsfaktors PU.1 besitzen.

4. Diskussion

Humane hämatopoetische Stammzellen (HSCs) bilden die Grundlage des blutbildenden Systems. Neben der Fähigkeit zur Selbsterneuerung können HSCs in alle zellulären Bestandteile des Blutes ausdifferenzieren. In der klinischen Anwendung stellt die Transplantation regenerativer HSCs ein etabliertes Verfahren zur dauerhaften Rekonstitution des hämatopoetischen Systems dar. Darüber hinaus bietet die Anwendung von HSCs zahlreiche weitere Therapiemöglichkeiten bei hämatologischen Systemerkrankungen, immunologischen Störungen, Leukämien und angeborenen Stoffwechselerkrankungen. Für diese und zukünftige Anwendungen ist es unabdingbar die molekularen Mechanismen, die den Prozess der Vermehrung und Differenzierung von humanen hämatopoetischen Stammzellen steuern, zu erforschen und deren funktionelle Bedeutung zu verstehen.

Ein Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung, Charakterisierung und gerichtete Modulation funktionell relevanter Signalwege, die am Differenzierungsprozeß von HSCs zu Effektorzellen wie myeloiden Dendritischen Zellen beteiligt sind. Für diese Untersuchung wurde im ersten Teil der Arbeit ein geeignetes Stammzellkultivierungsprotokoll (Expansion von HSCs), sowie die myeloide Differenzierung zu Dendritischen Zellen (DC) als Modellsystem etabliert.

4.1 Expansion humaner hämatopoetischer Stammzellen

Die Expansion von humanen hämatopoetischen Stammzellen (HSC) stellt eine der größten Herausforderungen der Transplantationsmedizin dar. Die Stammzellen werden dabei dem Knochenmark von gesunden Spendern entnommen oder aus Nabelschnurblut isoliert und *ex vivo* unter Zugabe von Zytokinen zur Proliferation angeregt und expandiert. In der klinischen Anwendung, sowie in der Forschung haben sich drei Zytokinkombinationen 1.: Flt-3 Ligand, SCF, IL-3 und IL-6 (CC100); 2.: Flt-3 Ligand, SCF und TPO (CC110); 3.: TPO, SCF und IL-3 (CC200) zur *ex vivo* Expansion durchgesetzt (Heike and Nakahata 2002), (Zandstra, *et al* 1998). Alle drei Kombinationen wurden in dieser Arbeit angewandt und auf die resultierenden Expansionseigenschaften überprüft.

Einer der entscheidenden klinischen Marker für HSCs stellt dabei der Stammzellrezeptor CD34 dar. Die expandierten Stammzellen dieser Arbeit wurden auf die Expression des Oberflächenmarkers CD34 überprüft. Zusätzlich wurden die expandierten Zellen auf einen weiteren Stammzellmarker CD117 (c-Kit, SCF-Rezeptor), sowie verschiedene myeloide Differenzierungsmarker (CD1a, CD11c, ILT-3) überprüft (Abb.3.2). Im Vergleich der verschiedenen, in der Literatur beschriebenen, Zytokinkombinationen (Heike and Nakahata 2002), zeigten sich deutliche Unterschiede im Expressionsverhalten von CD34, sowie in der

Morphologie der Zellen. Die Zytokinkombinationen CC110 und CC200 mit TPO zeigte eine deutliche Veränderung der HSCs in Richtung der Megakaryozyten sowie eine verminderte CD34 Expression. Diese Beobachtung entspricht den Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Dr. K. Bieback der Universität Heidelberg (<http://www.ma.uni-heidelberg.de/inst/iti/imther.html>), die für die Zytokinkombinationen mit TPO eine rasche Differenzierung und Ausreifung megakaryozytärer Vorläuferzellen zeigen konnte. Die geeignetste in dieser Arbeit getestete Zytokinkombination (CC100) zeigte nach 7 Tagen Expansion bei durchschnittlich 85 % der Zellen eine Expression des Stammzellrezeptors CD34 und bei 18 % der Zellen eine Expression von CD38, einem Progenitormarker und waren für die myeloiden Differenzierungsmarker negativ. Auf ca. 15 % der Zellen konnte keine Expression von CD34 nachgewiesen werden. Dieser Prozentsatz resultiert wahrscheinlich aus $CD34^+$ Zellen, die sich zu Beginn der Expansion bereits in einem Übergangsstadium (Progenitoren) der Differenzierung befanden (siehe Abb. 4.1) und aus ca. 2 - 5 % anderen Blutzellen ($CD34^-$), die nach der Aufreinigung als Verunreinigung enthalten waren und unter den Proliferationsbedingungen für HSCs ebenfalls teilungsfähig blieben. Bei der RT-PCR konnte festgestellt werden, daß die expandierten hämatopoetischen Stammzellen ($CD34^+$) das gleiche Expressionsprofil wie die aufgereinigten Monozyten aufwiesen. Dieses Expressionsmuster könnte von Zellen stammen, die sich bereits im Differenzierungsprozeß mit einem monozytären Stadium befinden oder aus den 15 % der Zellen, die keine Expression für CD34 mehr aufwiesen (Abb. 3.2), da sie bereits differenzierte Blutzellen sind.

Die durchschnittlich erhaltene Expansionsrate der vorliegenden Arbeit liegt über der von Heike *et al.* beschriebenen Expansionsrate für die Zytokinkombination CC100 (Heike and Nakanata 2002). Aufgrund der Expansionsrate und der geringen Differenzierungsinduktion der Zytokinkombination CC100, wurde diese für die weiterführenden Untersuchungen eingesetzt.

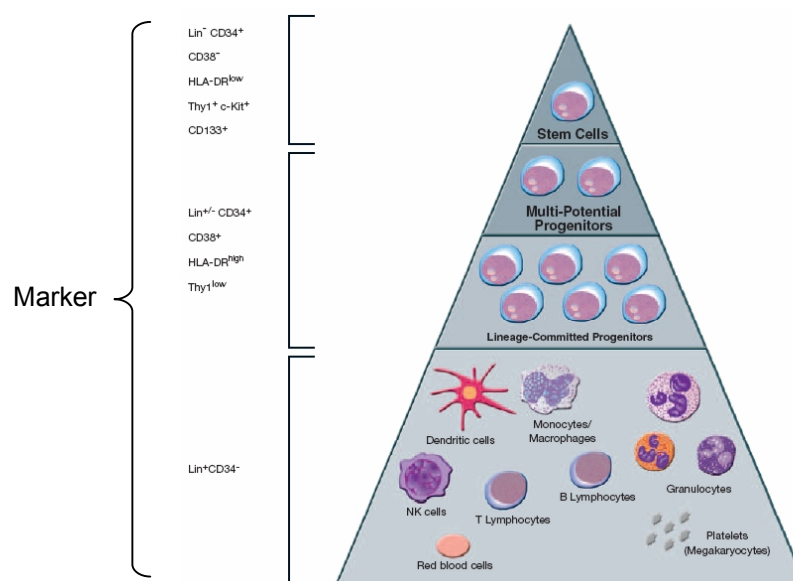


Abbildung 4.1: Schematische Abbildung des Differenzierungsmodelles. Modell nach StemCell Technologies (www.stemcell.com); Abkürzung: Lin = lineage marker

4.2 Etablierung der myeloiden dendritischen Zelldifferenzierung aus humanen hämatopoetischen Stammzellen

DCs spielen eine zentrale Rolle im Immunsystem und finden vielfältige Anwendung, zum Beispiel bei der Impfstoffentwicklung oder in der Krebstherapie. In dieser Arbeit wurde die Differenzierung von humanen HSCs zu DCs als myeloides Modellsystem verwendet. Als Grundlage für die Etablierung des Differenzierungsprotokolles dienten die Arbeiten von Curti *et al.*, Luft *et al.* und Steinman *et al.* (Curti, *et al* 2001), (Luft, *et al* 1998), (Steinman 1991). Wie in diesen Arbeiten beschrieben wurde, erfolgte die Differenzierung der CD34⁺ Zellen zu DCs dabei durch die Zytokinkombination von GM-CSF und IL-4. Diese Kombination wurde daher in der vorliegenden Arbeit getestet. Nach 5 Tagen zeigten die Zellen bereits deutliche morphologische und phänotypische Veränderungen (Abb. 3.3), definiert durch lange Zellausläufer und der Fähigkeit zur Adhäsion am Plattenboden der Kulturschale. Diese Veränderungen konnten durch die Zugabe von TNF- α verstärkt werden. Der Einfluß dieses proinflammatorischen Zytokins auf die Differenzierung von Dendritischen Zellen wurde bereits von Jonuleit *et al.* beschrieben (Jonuleit, *et al* 1996). Die differenzierten Zellen wurden mit Hilfe von Oberflächenmarkern, mRNA Expression und Zytokinsekretion auf ihren dendritischen Phänotyp und auf ihre Funktionalität hin überprüft.

Als fremdantigenpräsentierende Zellen besitzen reife DCs die Oberflächenmarker HLA-DR (MHC II) und Aktivierungsmarkern wie z.B. CD86 oder CD83. Die Expression dieser Marker wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit im Laserscan-Mikroskop durch Antikörperfärbung überprüft (Abb. 3.4). Die Dendritischen Zellen zeigten eine deutliche Expression von MHC II, welches zum Großteil mit Aktin kolokalisiert war und daher mit der Zelloberfläche assoziiert ist.. Diese Beobachtung lässt vermuten, daß es sich dabei um beladenes MHC II handelt und nicht um MHC II, welches sich im ER der Zelle befindet. Neben HLA-DR wurde auch die Expression von CD86 nachgewiesen, welches ebenfalls mit Aktin kolokalisierte. Dies war ein weiterer Hinweis auf ausgereifte antigenpräsentierende DC, da Zou *et al.* zeigen konnte, daß die CD86 Expression erst durch Antigenaufnahme und Ausreifung der Dendritischen Zellen initialisiert wird (Zou and Hu 2005). Diese Beobachtungen gaben den ersten Hinweis darauf, daß es sich bei den differenzierten Dendritischen Zellen um funktionsfähige antigenpräsentierende Zellen handelte. Hashimoto *et al.* charakterisierten aus Monozyten gereifte humane Dendritische Zellen erstmals anhand ihres spezifischen Genexpressionsprofils. Sie konnten zeigen, daß DCs spezifisch Cathepsin-C und MCP-4 exprimieren (Hashimoto, *et al* 1999). Spätere Untersuchungen von Geijtenbeek *et al.* und Tan *et al.* konnten zusätzlich die spezifischen dendritischen Marker DC-CK1, DC-SIGN und CD11b nachweisen (Geijtenbeek, *et al* 2000a), (Tan, *et al* 2000). Die Dendritischen Zellen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus HSCs differenziert wurden, wurden auf die Expression der in der Literatur genannten spezifischen DC Marker mittels RT-PCR überprüft. Die Dendritischen Zellen aus den ausgereiften HSCs waren für alle fünf

Marker positiv. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß die differenzierten DCs im Vergleich zu den aus Monozyten gereiften DCs das gleiche Expressionsprofil aufweisen (Abb. 3.5). Dies läßt auf eine erfolgreiche Differenzierung der HSCs zu myeloiden DC-Effektorzellen schließen.

Die meisten Untersuchungen zur Charakterisierung der DCs vergleichen die Regulation bekannter Antigene, z. B. stärkere Expression der MHC-II- Antigene oder schwächere Expression des CD14-Antigens bei DCs im Vergleich zu Monozyten. Dies liegt daran, daß es gegenwärtig kein spezifisches DC-Oberflächenepitop gibt, das nur vom DC-Zelltyp exprimiert wird. Für die vorliegende Arbeit wurde daher die Kombination der auf DC exprimierten Oberflächenmarker CD1a, HLA-DR, CD11c und ILT-3 verwendet. Ca. 30 % der aus HSC differenzierten DCs waren für alle vier Marker positiv und gleichzeitig negativ für die Stammzellmarker CD34 und CD117. Damit zeigen sie das typische Expressionsprofil von unreifen DCs. Ca. 70 % der Zellen wiesen jedoch keine Expression von CD1a auf. Damit handelte es sich um reife DCs, da diese bei der Reifung mit dem zugeführten TNF- α die Expression dieses Markers verlieren oder um andere Effektorzellen. Gründe für die Entstehung anderer Effektorzellen könnten darin liegen, daß während des Differenzierungsprozesses die Stammzellen das duale Signal von GM-CSF und IL-4 benötigen, um in Richtung von Dendritischen Zellen zu differenzieren. Bindet nun nur GM-CSF an die Stammzelle, so wird der Differenzierungsprozeß in Richtung der Granulozyten eingeleitet, wodurch die Zellen für die Dendritendifferenzierung verloren gehen. Diese Funktion von GM-CSF bei der Granulopoese konnte von Haeuber *et al.* und Quesenberry *et al.* in ihrer Studie zur zytokinabhängigen Granulozytenbildung gezeigt werden (Haeuber and DiJulio 1989), (Quesenberry and Lowry 1992). Interessanterweise wurde nur ein geringer Prozentsatz an CD14⁺ Zellen detektiert. CD14 ist ein Monozytenmarker und wird von Zellen, die sich in einem monozytären Übergangszustand der Differenzierung befinden, exprimiert. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung zeigt die Arbeit von Caux *et al.*, welche zwei Differenzierungswege zu DCs aus CD34⁺ Stammzellen postuliert. Caux beschrieb in seiner Arbeit das Konzept der *in vitro* Generation von DCs aus den CD34⁺ Knochenmarksstammzellen, die in Gegenwart von GM-CSF und TNF- α kultiviert, entweder direkt zu CD1a⁺ DCs werden oder über CD14⁺ Vorläuferzellen (monozytäre Übergangsstufen) zu im Blut zirkulierenden DCs differenzieren. Snoeck *et al.* konnte zeigen, daß unter der Einwirkung von IL-4 die Monozytenentwicklung bei der Differenzierung unterdrückt wird und es entstehen direkt myeloide DCs (Lardon, *et al* 1997).

Die Arbeit von Joshi *et al.* vergleicht die aus Nabelschnurblut differenzierten DCs mit aus Monozyten gereiften Dendritischen Zellen und konnte zeigen, daß beide Zellpopulationen in der Lage waren Antigen aufzunehmen und T-Zellen zu präsentieren (Joshi, *et al* 2002). Die Antigenaufnahme wurde in der vorliegenden Arbeit als Indikator für biologisch funktionale Dendritische Effektorzellen verwendet. Sowohl in der May-Grünwald-Färbung (Abb. 3.3) als auch im „antigen uptake assay“ (im Anhang der Arbeit) konnte die Aufnahme von Antigen in Vesikeln über

Pinozytose beobachtet werden. In der May-Grünwald-Färbung zeigte sich diese durch helle „Bläschen“ im Zytoplasma der Dendritischen Zellen. Im „antigen uptake assay“ konnte die Aufnahme von Fremdkörpern (FITC-markierte Latexbeads) über Makro-Pinozytose beobachtet werden. Diese Beobachtung läßt darauf schließen, daß die aus den Stammzellen differenzierten Dendritischen Zellen (DCs) ihre natürliche Funktion der Antigenaufnahme erfüllen. Untersuchungen von Thurnher *et al.* und Henderson *et al.* zeigten, daß DCs Latexbeads verschiedener Größen über Pinozytose aufnehmen. Die Aufnahme von Latexpartikeln führte jedoch im Gegensatz zur Aufnahme von Bakterien zu keiner Zytokinproduktion und keiner Ausreifung der unreifen DCs (Thurnher, *et al* 1997), (Henderson, *et al* 1997). Die Zytokinsekretion wurde daher als zweiter Indikator für die biologische Funktionalität der Zellen verwendet.

Zur Überprüfung der Zytokinproduktion der unreifen Dendritischen Zellen wurden diese mit bakteriellem LPS stimuliert und die Sekretion verschiedener Zytokine und Chemokine im Protein Array (Abb.3.7 A), sowie im ELISA (Abb.3.7 B) zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen. In der vorliegenden Arbeit konnte bereits nach 6 Stunden eine deutliche Sekretion von IL-6, TNF- α und MCP-1 nachgewiesen werden. Nach 18 Stunden wurde zusätzlich die Sekretion von RANTES detektiert. Die aus HSCs differenzierten myeloiden Dendritischen Zellen sind daher in der Lage nach Antigenkontakt spezifische Zytokine und Chemokine zu synthetisieren und in das Medium abzugeben. Sie zeigen damit eine charakteristische Funktion der natürlichen dendritischen Effektorzelle. In der Literatur sind alle vier Immunmodulatoren *in vitro* im Zusammenhang mit einer bakteriellen Infektion beschrieben worden. Rescigno *et al.* konnte in seiner Arbeit zeigen, daß es bereits nach wenigen Stunden einer bakteriellen Infektion zu einem schnellen Anstieg der IL-6 und TNF- α Synthese und Sekretion kommt (Rescigno, *et al* 1998), (Winzler, *et al* 1997b). Merck *et al.* konnte in seiner Arbeit zeigen, daß LPS zu einer Verstärkung der MCP-1 Sekretion führt (Merck, *et al* 2005). Nagorsen *et al.* konnte die Sekretion von RANTES, sowie der anderen drei Immunomodulatoren im „multiprotein platform array“ nach LPS Stimulation nachweisen (Nagorsen, *et al* 2004).

Die verschiedenen angewandten Untersuchungsmethoden zur Charakterisierung der aus humanen hämatopoetischen Stammzellen differenzierten myeloiden Dendritischen Zellen lassen die Schlußfolgerung zu, daß mit dem etablierten Differenzierungsprotokoll funktionsfähige humane Dendritische Zellen entstehen.

4.3 Charakterisierung intrazellulärer Signalwege bei der Differenzierung von HSCs

Eine der Kernuntersuchungen dieser Arbeit war die Analyse der an der Differenzierung von humanen HSCs zu DCs beteiligten intrazellulären Signalwege. Die Signalwege bei der Differenzierung sind noch weitgehend unerforscht und

unverstanden. In der Literatur finden sich wenige Hinweise auf die Beteiligung von Signalkaskaden. Die Untersuchungen fanden dabei hauptsächlich im murinen und nicht in dem in dieser Arbeit verwendeten humanen System statt oder untersuchten die Wirkung der Zytokine in Zelllinien. Wie zu einem späteren Zeitpunkt in dieser Arbeit noch diskutiert werden wird, entspricht das Aktivierungsspektrum von Zelllinien nur entfernt den Beobachtungen in HSCs. Sie lieferten jedoch erste Hinweise auf Signalwege, die in dieser Arbeit auch bei den HSCs beobachtet wurden.

Für GM-CSF ergaben sich folgende Hinweise: Die Arbeit von Zheng *et al.* konnte zeigen, daß GM-CSF-Stimulation in TF-1 Zellen zu einer Aktivierung der ERK-Signalkaskade führt (Zheng, *et al* 2004). Caldenhoven *et al.* konnte in seiner Arbeit zeigen, daß die von IL-5 und GM-CSF induzierte eosinophile und neutrophile Granulopoese mit einer Aktivierung von STAT5 verknüpft ist (Caldenhoven, *et al* 1998). Lehtonen *et al.* konnte in humanen Monozyten die Aktivierung von STAT5 durch GM-CSF-Stimulation nachweisen (Lehtonen, *et al* 2002). Für IL-4 ergaben sich folgende Hinweise: Die Arbeit von David *et al.* konnte zeigen, daß IL-4-Stimulation in der humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT zu einer Aktivierung von ERK führt (David, *et al* 2001). Diese Beobachtung konnte von Guo *et al.* auch für murine B-Zellen bestätigt werden (Guo and Rothstein 2005). Die Arbeiten von Takeda *et al.*, Jiang *et al.* und Hebenstreit *et al.* konnten zeigen, daß IL-4 eine entscheidende Rolle bei der Immunmodulation einnimmt und zu STAT6 Aktivierung führt (Hebenstreit, *et al* 2006), (Jiang, *et al* 2000), (Takeda, *et al* 1997). Ikizawa *et al.* konnte zeigen, daß die Aktivierung von humanen B-Zellen über IL-4 durch PKC δ Aktivierung erfolgt (Ikizawa, *et al* 2001). Die Arbeit von Mischak *et al.* zeigte, daß PKC δ eine Schlüsselfunktion bei der myeloiden Differenzierung von murinen 32D Zellen einnimmt (Mischak, *et al* 1993).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß GM-CSF und IL-4 Stimulation zu einer sehr schnellen Aktivierung der MAPK/ERK führte. Diese Aktivierung war über die Zeitspanne von 7 Min. zeitlich begrenzt. Es wurde keine Aktivierung der MAP-Kinasen JNK und p38 festgestellt (Abb.3.8). Für STAT5 und STAT6 konnte ebenfalls eine zeitlich begrenzte Aktivierung nachgewiesen werden. Diese Aktivierung erfolgte innerhalb der ersten 7 min. und war zu der vorgeschalteten Januskinaseaktivierung zeitlich in ihrem Maximum leicht verschoben, was sich durch die nacheinander geschaltete Signalkaskade erklärt. Für STAT5 (Abb. 3.9) erfolgte sie über eine Zeitspanne von ca. 30 min., wohingegen für STAT6 (Abb. 3.10) eine Zeitspanne von über 45 min. beobachtet wurde. Auch für PKC δ konnte eine zeitlich begrenzte Aktivierung innerhalb von 30 min. beobachtet werden. Die in der Literatur für Zelllinien, humane Granulozyten, Monozyten und B-Zellen beschriebenen Signalwege konnten damit in den humanen hämatopoetischen Stammzellen ebenfalls bestätigt werden. Erstaunlicherweise waren die Aktivierungszeiträume der beobachteten Signalkaskaden von sehr kurzer Dauer. Besonders deutlich war dies bei der Aktivierung von ERK zu beobachten, dessen Aktivierung und Deaktivierung innerhalb von 10 min. stattfand (Abb. 3.8). Die Stammzellen unterschieden sich in diesem Punkt deutlich von vielen Beobachtungen in den bereits genannten Zellen

und in erythroiden sowie myeloiden Modellzelllinien wie z. B. TF-1 (Abb. 3.12), HL60 (Kaplinsky, *et al* 1986) oder KG1 und scheinen somit in der Lage zu sein, auf externe Veränderungen schneller zu reagieren. Die rasche Deaktivierung der Signalkaskaden wie z. B. ERK könnte dabei durch inhibitorische „Feedbackmechanismen“ ausgelöst werden. Für den MAPK/ERK Signalweg wurde in der Arbeit von Dougherty *et al.* gezeigt, daß ERK die in der Signalkaskade darüber liegende Raf-1 Kinase phosphorylieren kann und dadurch Raf-1 inaktiviert und die Signalkaskade ausschaltet (Dougherty, *et al* 2005). Dieser Mechanismus führt zu einer schnellen Inaktivierung und schützt die Zelle vor Überreizung und einer damit verbundenen Apoptose. Eine weitere Möglichkeit der Inaktivierung der Signalwege könnte durch eine schnelle Internalisierung der jeweiligen Rezeptoren erreicht werden. IL-4 und GM-CSF wären dadurch nicht mehr in der Lage erneut an den Rezeptor zu binden und das Signal zu verstärken und zu verlängern. Für GM-CSF konnte eine solche Rezeptorinternalisierung in den Arbeiten von Peleraux *et al.*, Walker *et al.* und Sacchini *et al.* gezeigt werden (Peleraux, *et al* 1990), (Walker and Burgess 1987), (Stacchini, *et al* 1995). Ein im Anhang dieser Arbeit gezeigtes Experiment zeigte, daß die Aktivierung in Intervallen mit dazwischen liegenden Ruhephasen (Inaktivierungen) zu erfolgen scheint (Anhang Abb. A1).

In der Arbeit von St Louis *et al.* wurde gezeigt, daß der Phorbolster TPA als Ersatz für GM-CSF und IL-4 bei der myeloiden DC-Differenzierung aus der CD34⁺ Progenitorzelllinie KG1 verwendet werden kann (St Louis, *et al* 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Sachverhalt für humane hämatopoetische Stammzellen überprüft. Für die Stammzellen konnte dabei ebenfalls unter der Einwirkung von TPA eine rasche Differenzierung der Zellen mit dendritischem Phänotyp beobachtet werden. TPA aktivierte dabei PKC δ und ERK. Diese Kinasen scheinen für die Differenzierung zu myeloiden DCs ausreichend zu sein, da keine Aktivierung von STAT5 und STAT6 beobachtet wurde (Abb. 3.13). In diesem Punkt unterscheidet sich die durch die Zytokine GM-CSF und IL-4 induzierte Differenzierung von der, durch TPA hervorgerufenen. Durch die Stimulation mit TPA brgannen die Zellen bereits nach 24 h an zu adhären und es konnte im Vergleich zu GM-CSF und IL-4 eine stark verminderte Proliferation der Zellen über den gesamten Differenzierungszeitraum von 5 Tagen beobachtet werden. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, daß die Aktivierung von STAT5 und STAT6 für die Proliferation der Zellen während der Differenzierung verantwortlich ist und parallel zur Effektorzellreifung abläuft (Reifeteilungen). Im „colony forming assay“ kann dieser Vorgang anhand der Bildung von Zellkolonien aus einer Stamm- bzw. Progenitorzelle verfolgt werden. Ein weiterer Hinweis auf die Funktion der STAT-Aktivierung während der Differenzierung zeigte sich durch den Einsatz eines Januskinaseinhibitors im „colony forming assay“. Durch die Blockierung der STAT-Aktivierung zeigte sich ein dramatischer Rückgang in der Gesamtzahl der gebildeten Zellkolonien (Abb. 3.17). Die Arbeit von Schuringa *et al.* bestätigt diese Beobachtungen, da sie zeigen konnte, daß STAT5 Aktivierung zu Proliferation und Selbsterneuerung von HSCs führt (Schuringa, *et al* 2004).

4.4 Modulation der Differenzierung durch Blockierung der beobachteten Signalwege

Die Bedeutung der Aktivierung der beobachteten Signalwege bei der Differenzierung von humanen hämatopoetischen Stammzellen ist noch weitgehend unerforscht und unverstanden. Die Arbeit von Nagata *et al.*, konnte zeigen, daß bei der Erythropoese Erythropoetin zu Aktivierung von p38 und JNK führt und dabei ERK inaktiviert wird und daß die Differenzierung von diesen Signalwegen abhängt. Sie konnte zeigen, daß die durch G-CSF induzierte myeloide Differenzierung der murinen Zelllinie 32 Dc I3 von der Aktivierung des MEK/ERK Signalwegs abhängig ist (Nagata and Todokoro 1999). Myklebust *et al.* zeigte, daß PKC α für die Erythropoese eine zentrale Rolle spielt (Myklebust, *et al* 2000).

Zur Überprüfung der Funktion dieser Signalwege wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene spezifische Inhibitoren eingesetzt. Im ersten Schritt wurde die Aktivierung des PKC- und MAPK/ERK-Signalwegs durch den Einsatz von TPA als Ersatz für GM-CSF und IL-4 untersucht. Die jeweilige Dosis der Inhibitoren wurde zuvor in der humanen hämatopoetischen Zelllinie KG-1a ermittelt (Abb. 3.14 und 3.15). Der Einsatz des PKC Inhibitors, sowie des MEK Inhibitors führten zu einer Blockierung der myeloiden dendritischen Differenzierung, die durch TPA induziert wurde. Der Einsatz des MEK Inhibitors läßt dabei die darüber liegende Aktivierung von PKC in den Zellen zu. Diese Aktivierung von PKC scheint für eine Ausdifferenzierung der Zellen jedoch nicht ausreichend zu sein. Es wurde lediglich ein proliferativer Effekt der Zellen beobachtet. Diese Beobachtung gab den ersten Hinweis darauf, daß die Aktivierung von PKC und ERK für die Differenzierung zu DCs von entscheidender Bedeutung ist und durch den Einsatz der Inhibitoren blockiert werden kann (Abb. 4.2). Der Entzug der Inhibitoren führte zu einer Ausdifferenzierung der Zellen. Diese Beobachtung zeigte, daß die Stammzellen ihr Potenzial durch den Einsatz der Inhibitoren nicht verloren haben oder in die Apoptose übergegangen sind.

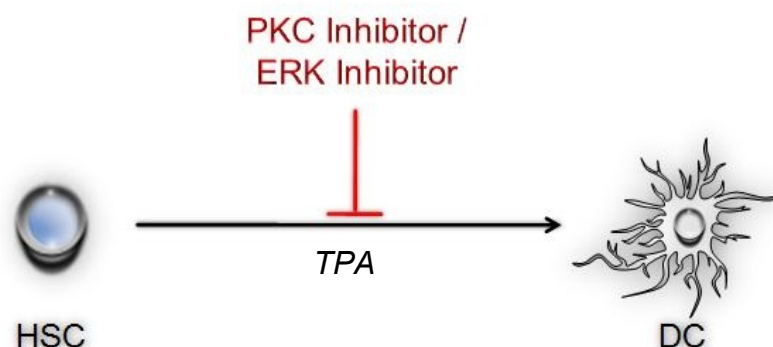


Abbildung 4.2: Inhibitionsmodell 1: Schematische Abbildung der TPA induzierten DC Differenzierung.
Der Einsatz von PKC oder ERK spezifischen Inhibitoren führt zur Blockierung der Differenzierung von HSCs zu DCs.

Da es sich bei TPA um ein synthetisches Signal handelt und somit nicht dem natürlichen Differenzierungssignal mit mehreren Zytokine entspricht, sollte im

nächsten Schritt der vorliegenden Arbeit die Auswirkung der PKC-, ERK- und Januskinaseinhibition im vielschichtigem Differenzierungssystem, dem „colony forming assay“ untersucht werden. Diese Untersuchung ist aus pharmazeutischen Gesichtspunkten von besonderer Bedeutung, da sich viele verwendete Kinaseinhibitoren derzeit in klinischer Prüfung zur Behandlung von Leukämien und zur Tumorthherapie befinden z. B. der Raf-1-Inhibitor Sorafenib. Die Studie von Tong *et al.* konnte dabei zeigen, daß gerade CD34⁺ Stammzellen viel sensitiver auf Sorafenib reagierten als andere Zelltypen (Tong, *et al* 2006). Studien zu veränderter Hämatopoese wurden bis heute jedoch für keinen der pharmazeutisch genutzten Inhibitoren angefertigt. Die Daten aus der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch deutlich, daß der Einsatz von Kinaseinhibitoren zu einer Veränderung der Hämatopoese führt. Die Inhibitoren konnten in diesem Assay jedoch nur einmal gegeben werden und hatten nur eine durchschnittliche Aktivitätsdauer von 48h (Daten nicht gezeigt). Da der Differenzierungsprozeß jedoch über 10 - 14 Tage andauert, geben die beobachteten Effekte nur eine Tendenz wieder. Der eigentliche Effekt auf die Differenzierung ist wahrscheinlich bei anhaltender Blockierung der Signalwege viel stärker. Der Einsatz des MEK-Inhibitors U0126 führte zu einer deutlichen Reduktion der Makrophagenkolonien. Dies läßt darauf schließen, daß die Bildung von Monozyten und damit auch die Bildung von Makrophagen und DCs gestört wurde. Die Arbeiten von Miranda *et al.* konnten für murine Zelllinien und für die humane Zelllinie HL-60 zeigen, daß die Differenzierung der Zelllinien zu Monozyten durch die Inhibition von ERK mit dem Inhibitor U0126 blockiert werden kann (Miranda, *et al* 2002, Miranda, *et al* 2005). Die Differenzierung von Monozyten und daraus hervorgehenden Makrophagen oder Dendritischen Zellen ist nach diesen Arbeiten von der Aktivierung der MAPK/ERK abhängig und bestätigen die Resultate der HSC Differenzierung in der vorliegenden Arbeit. Erythrozyten- und Granulozytenkolonien wurden durch die Inhibition des MAPK/ERK-Signalweges begünstigt. Dies gibt den Hinweis darauf, daß die Differenzierung von Erythrozyten und Granulozyten von der MAPK/ERK-Signalkaskade unabhängig oder sogar unterbunden zu werden scheint. Die Arbeit von Woessmann *et al.* konnte zeigen, daß in der Erythroleukämiezelllinie K-562 der U0126 Inhibitor zu einem Abschalten des MAPK/ERK-Signalweges führte und dadurch eine Differenzierung der Zellen zu Erythrozyten ausgelöst wurde (Woessmann, *et al* 2004). Der Einsatz des c-Abl Inhibitors STI571 in K-562 Zellen führte in der Arbeit von Kohmura *et al.* zu einer Aktivierung von p38 und einer Deaktivierung von ERK (Kohmura, *et al* 2004). Diese Beobachtung bestätigt die Beobachtung der erhöhten Erythrozytenkoloniebildung in der vorliegenden Arbeit. Die erhöhte Bildung von Granulozytenkolonien in der vorliegenden Arbeit widerspricht den Beobachtungen von Miranda *et al.*, da der Einsatz des Inhibitors U0126 dort zu einer Inhibition der Granulozytendifferenzierung der untersuchten murinen und humanen Zelllinien führte. Dieser Unterschied könnte daran liegen, daß die Aktivierung der Signalkaskaden in einigen Zelllinien stark von der natürlichen Situation in hämatopoetischen Stammzellen abweicht (Abb.3.12). Eine weitere Möglichkeit könnte die zeitlich begrenzte Wirksamkeit des Inhibitors sein. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Inhibitoren waren nur max. 48h in dem verwendeten Zellkultursystem wirksam und daher in einem sehr frühen Stadium der

Differenzierung. Die Initialisierung der Granulopoese könnte daher von der Aktivierung der MAPK/ERK negativ beeinflusst werden, wohingegen eine Aktivierung zu einem späteren Zeitpunkt der Differenzierung zur vollständigen Ausreifung benötigt würde. Zelllinien haben dieses frühe Stadium oftmals schon überschritten und befinden sich in einem späteren Stadium des Differenzierungsprozesses. Dies gilt z. B. auch für die in der Literatur verwendete Zelllinie HL-60.

Der PKC Inhibitor zeigte in der vorliegenden Arbeit nur deutliche Auswirkung auf die Bildung von Makrophagenkolonien. Der Einsatz dieses Inhibitors führte zu einer Reduktion der Makrophagenkolonien. Die Differenzierung von Makrophagen und demnach auch von DCs scheint stark von der Aktivierung von PKC abhängig zu sein. Die Arbeiten von St Louis *et al.* und Cejas *et al.* zeigte, daß die myeloide Differenzierung von DCs mit einer PKC Aktivierung verbunden ist und eine Inhibition von PKC zu einem Block in der Ausreifung von DCs aus KG1 und K-562 Zellen führt (Cejas, *et al* 2005) (St Louis, *et al* 1999). Es kann daher daraus geschlossen werden, daß eine PKC Aktivierung für die Differenzierung der HSCs zu Makrophagen- und Dendritischen Effektorzellen benötigt wird. Durch die Blockierung der Januskinasen und der damit verbundenen STAT Aktivierung zeigte sich ein dramatischer Rückgang in der Gesamtzahl der gebildeten Zellkolonien. Die Arbeit von Schuringa *et al.* konnte zeigen, daß STAT5 Aktivierung zu Proliferation und Selbsterneuerung von HSCs führt (Schuringa, *et al* 2004). Es kann daher angenommen werden, daß STAT Aktivierung für das Überleben und die Proliferation der Zellen während der Differenzierung benötigt wird. Die durch die Inhibitoren induzierten Modulationen der Differenzierung sind in dem folgenden Modell (Abb. 4.3) zusammengefasst.

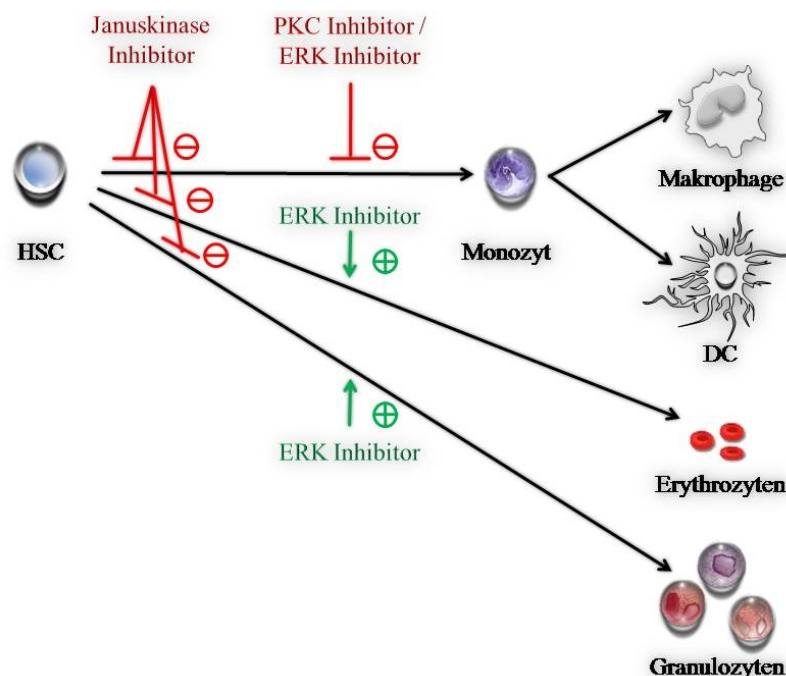


Abbildung 4.3: Inhibitionsmodell 2: Schematische Abbildung der Inhibition verschiedener Signalwege bei der Differenzierung von HSC im „colony forming assay“. Der Einsatz von PKC ERK Inhibitoren führt zur Blockierung der Differenzierung von HSCs zu Makrophagen (-) und demzufolge auch zur Blockierung der Monozyten als Makrophagen und DC Vorläufer. Der ERK-Inhibitor begünstigte die Bildung von Erythrozyten und Granulozyten (+). Die Inhibition der Januskinasen führt zu einer Blockierung der gesamten Differenzierung.

4.5 Analyse der molekularen Aktivierungsmechanismen von PU.1 durch PKC δ und ERK

Der Transkriptionsfaktor PU.1 ist eines der Schlüsselproteine bei der myeloiden Differenzierung von HSC, da von Voso *et al.* gezeigt werden konnte, daß die Inhibition von PU.1 zu einem Block der Differenzierung führte (Voso, *et al* 1994).

In der Publikation von Vangela *et al.* wird dieser Faktor deshalb auch als „Master regulation factor“ bezeichnet (Vangala, *et al* 2003). Im Review von Gangenahalli *et al.* wird gezeigt, an welchen Schritten der myeloiden Differenzierung PU.1 eine Schlüsselfunktion übernimmt und durch Autoregulation seine Expression steuert (Gangenahalli, *et al* 2005). Eine modifizierte Darstellung befindet sich in der Einleitung der vorliegenden Arbeit (Abb. 1.7). Rosenbauer *et al.* konnte zeigen, daß eine Expressionsverringerung von PU.1 auf 20 % der ursprünglichen Expression im HSC zu einer präleukämischen Bildung von Granulozyten führte. Die Differenzierung von Monozyten, Makrophagen und DCs fand nicht mehr statt (Rosenbauer, *et al* 2004). Von besonderer Bedeutung war die Arbeit von Anderson *et al.*, die die direkte Funktion von PU.1 bei der Differenzierung von DCs zeigen konnte. Ohne den Transkriptionsfaktor PU.1 fand die Differenzierung von Progenitoren zu DCs nicht mehr statt (Anderson, *et al* 2000). Die molekularen Zusammenhänge blieben bis heute jedoch ungeklärt.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Verbindung zwischen PU.1 und den in der DC Differenzierungen von HSC detektierten Signalwegen untersucht werden. Im ersten Schritt wurden verschiedene Zelllinien, sowie die expandierten HSCs auf die Expression von PU.1 überprüft. Es bestätigte sich, daß PU.1 Expression nur in myeloiden Zelllinien, in sehr frühen T-Zelllinien und den hämatopoetischen Stammzellen nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.19). Für die proteinbiochemische Untersuchung wurde der Transkriptionsfaktor PU.1 mit einer N-terminalen HA-Markierung kloniert. Die Markierung erleichterte die Isolation des exprimierten Proteins aus transfizierten Zellen. Zusätzlich wurde diese Methode gewählt, da für PU.1 Antikörper nicht bekannt ist, an welcher Stelle des Proteins sie binden und daher mögliche Phosphorylierungsstelle durch den Antikörper maskiert werden und in der Kinasereaktion nicht mehr zugänglich sind. Die ersten Untersuchungen mit dem HA-markierten Protein zeigten, daß HA-PU.1 in 293T Zellen in einem phosphorylierten Stadium vorlag. Als Expressionszelllinie wurden daher 3T3 Zellen verwendet, da in diesen Zellen PU.1 unphosphoryliert vorlag (Abb. 3.21) und das Protein daher für einen *ex vivo* Kinase-Assay eingesetzt werden konnte. Der unphosphorylierte Zustand von PU.1 in 3T3 Zellen läßt sich vermutlich damit erklären, daß diese Zellen kein PKC δ exprimieren und der MAPK/ERK-Signalweg nicht konstitutiv aktiv ist (Chang, *et al* 1998).

Eine der ersten beschriebenen posttranskriptionellen Modifikationen von PU.1 war die Kaseinkinase II induzierte Phosphorylierung von Serinen im Transaktivatormotiv des Transkriptionsfaktors (Gangenahalli, *et al* 2005). Die Arbeit von Parkel *et al.*

zeigte, daß eine spezifische Serinphosphorylierung in einem Kaseinkinase II-Motiv für die Interaktion des lymphoiden Transkriptionsfaktors PIP mit dem PEST-Motiv von PU.1 verantwortlich ist (Perkel and Atchison 1998). Kaseinkinase II scheint demnach an vielen Modifikationen von PU.1 beteiligt zu sein.

Für die Aktivierung des PKC-Signalwegs wurde eine PKC abhängige Phosphorylierung von PU.1 beschrieben (Carey, *et al* 1996), (Mazzi, *et al* 2004), (Xue, *et al* 1999), (Ikizawa, *et al* 2001). Es ist jedoch unklar, welche PKC-Formen diese Phosphorylierung induziert und ob sie bei der Differenzierung von DCs eine Rolle spielt.

Für die Beteiligung der MAPK an der Aktivierung des Transkriptionsfaktors PU.1 gibt es bislang nur indirekte Hinweise. Lin *et al.* konnte zeigen, daß eine Infektion mit *Ehrlichia chaffeensis* zu einer Inaktivierung der LPS induzierten NF-kappa B, ERK und p38 Aktivierung in Monozyten führte und dies Auswirkungen auf den Transkriptionsfaktor PU.1 zeigte (Lin and Rikihisa 2004). Die Arbeit von Wang *et al.* konnte den Zusammenhang zwischen IL-3 induzierter p38 Aktivierung und PU.1 induzierter mcl-1 Transkription zeigen (Wang, *et al* 2003). Die Rolle von ERK bei der Aktivierung des Transkriptionsfaktors ist bis heute jedoch unklar.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Phosphorylierung von PU.1 durch Kaseinkinase II im Kinase-Assay bestätigt werden und diente als Phosphorylierungskontrolle (Abb. 3.22). Die DAG aktivierte Form von PKC δ war ebenfalls in der Lage PU.1 zu phosphorylieren (Abb. 3.23). Diese Phosphorylierung ist in der Literatur bisher noch nicht beschrieben und sollte daher genauer charakterisiert werden. Der Kinase-Assay mit ERK2 zeigte ein unerwartetes Bild. Obwohl PU.1 in seiner Proteinsequenz verschiedene ERK Minimal-Konsensusmotive besitzt, konnte im Kinase-Assay keine Phosphorylierung von PU.1 beobachtet werden (Abb. 3.24).

Die meisten Ets-Transkriptionsfaktoren werden über die Phosphorylierung der DNA-Bindungsdomäne oder benachbarte Regionen in ihrer transkriptionellen Aktivität und im DNA-Bindungsverhalten gesteuert. Dies wurde z. B. für die Transkriptionsfaktoren Elk-1 und Ets-1 beobachtet. Es konnte gezeigt werden, daß Insulinresistenz in Patienten durch eine verminderte Phosphorylierung von Elk-1 verursacht wird (Knebel, *et al* 2005). Weiterhin zeigte die Arbeit von Pufall *et al.*, daß das DNA-Bindungsverhalten des Transkriptionsfaktor Ets-1 durch Phosphorylierung gesteuert wird (Pufall, *et al* 2005). In der vorliegenden Arbeit wurden die DNA-Bindungsdomäne und benachbarte Bereiche auf mögliche ERK und PKC δ Phosphorylierungsstellen untersucht. Die Analyse der PU.1 Proteinsequenz auf mögliche PKC δ Phosphorylierungsstellen mit dem Programm: <http://scansite.mit.edu/> zeigte, daß es zwei potentielle Phosphorylierungsstellen im Bereich der DNA-Bindungsdomäne gibt (Abb. 4.4).

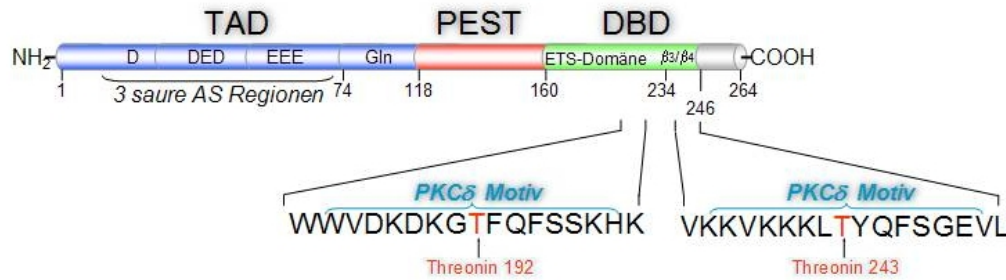


Abbildung 4.4: Schematische Abbildung berechneter PKC δ Phosphorylierungsstellen in PU.1. Computeranalyse von möglichen PKC δ Phosphorylierungsstellen des PU.1 Proteins. Das jeweilige Phosphorylierungsmotiv ist in blau dargestellt. Als mögliche Phosphorylierungsstellen ergaben sich **Threonin 192** und **Threonin 243**.

Diese beiden Phosphorylierungsmotive sind sowohl im Menschen als auch in der Maus identisch (Abb. 4.5). Sie liegen in einem hoch konservierten Ets-Bereich, der in dem Übersichtsartikel von Wasylyk *et al.* diskutiert wurde (Wasylyk, *et al* 1993). Die PKC δ Phosphorylierungsstelle 234 ist zudem im humanen Ets-Transkriptionsfaktor SPI-B in modifizierter Form vorhanden.

			Threonin 192
			↓
PU.1	HUMAN/1-264	LLRSGDMKDSIW	WVDKDKGTFQFSSKHKEAL
PU.1	MOUSE/1-266	LLRSGDMKDSIW	WVDKDKGTFQFSSKHKEAL
SPI-B	HUMAN/1-262	LLTRGDMRECV	WVEPGAGVTFQFSSKHKE
			Threonin 243
			↓
PU.1	HUMAN/1-264	GEV	VKKVKKKLT YQFSGEVL
PU.1	MOUSE/1-266	GEV	VKKVKKKLT YQFSGEVL
SPI-B	HUMAN/1-262	GEIR	VKRKLT YQFDSALLP----

Abbildung 4.5: Sequenzvergleich zwischen humanen, murinem PU.1, sowie dem verwandten Ets-Transkriptionsfaktor SPI-B.

Für die *in vivo* Untersuchung der PU.1 Aktivierung wurde im nächsten Schritt ein auf Luciferase basierendes Reportersystem entwickelt. Die Luciferaseaktivität spiegelte dabei die Aktivität des Transkriptionsfaktors wieder. Es zeigte sich, daß die Aktivität des Transkriptionsfaktors PU.1 durch Phorbolsterstimulation deutlich erhöht war und dieser demzufolge von mitogenen Signalen gesteuert wird. Die Arbeit von Carey *et al.*, unterstützen diese Beobachtung, da ein Anstieg der Phosphorylierung von PU.1 in TPA stimulierten Zellen beobachtet wurde. Sowohl der PKC- als auch MEK- und ERK- Inhibitor führten zu einer deutlichen Hemmung der PU.1 Aktivität (Abb. 3.25). Diese Beobachtung war erstaunlich, da im Kinase-Assay keine direkte Modifikation von PU.1 durch ERK gefunden wurde. Die ERK abhängige Aktivität des Transkriptionsfaktors scheint demzufolge von anderen Faktoren, die mit PU.1 interagieren, abhängig zu sein. Das Review von Gangenahalli *et al.* konnte zeigen, daß basale Transkriptionsfaktor wie z. B. TBP und TFIID an PU.1 binden können und dadurch die transkriptionelle Aktivität gesteuert werden kann (Gangenahalli, *et al*

2005). Die Arbeit von Biggs *et al.* konnte wiederum zeigen, daß der basale Transkriptionsfaktor TBP (TATA-binding protein) durch ERK phosphoryliert wird und dadurch seine transkriptionelle Aktivität reguliert wird (Biggs, *et al* 1998). Der in dieser Arbeit beobachtete ERK Inhibitionseffekt auf die Aktivität von PU.1 könnte demzufolge durch basale Transkriptionsfaktoren ausgelöst werden.

Da es keinen spezifischen PKC δ Inhibitor gibt und Breitbandinhibitoren vermieden werden sollten, wurde für einen spezifischen „knockdown“ der Kinasen die RNAi Technologie verwendet. Diese Untersuchungen zeigten, daß sowohl ERK als auch PKC δ an der Aktivierung des Transkriptionsfaktors PU.1 beteiligt sind. Als Kontrolle diente eine gegen PU.1 gerichtete siRNA. Interessanterweise führte die Expressionsverringerung von PKC δ zu einem Verlust der Basalaktivität des Transkriptionsfaktors. Diese war vergleichbar mit dem siRNA-Effekt, der für die PU.1 spezifische siRNA erreicht wurde. Die im Kinase-Assay beobachtete Phosphorylierung von PU.1 durch PKC δ scheint eine essentielle Funktion von PU.1 zu steuern. Da sich zwei potentielle PKC δ -Motive direkt im DNA-Bindungsmotiv von PU.1 befinden, könnte die DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors über diese Phosphorylierung gesteuert werden. Die Aktivierung von PU.1 durch PKC δ und ERK sind in dem folgenden Modell zusammengefaßt.

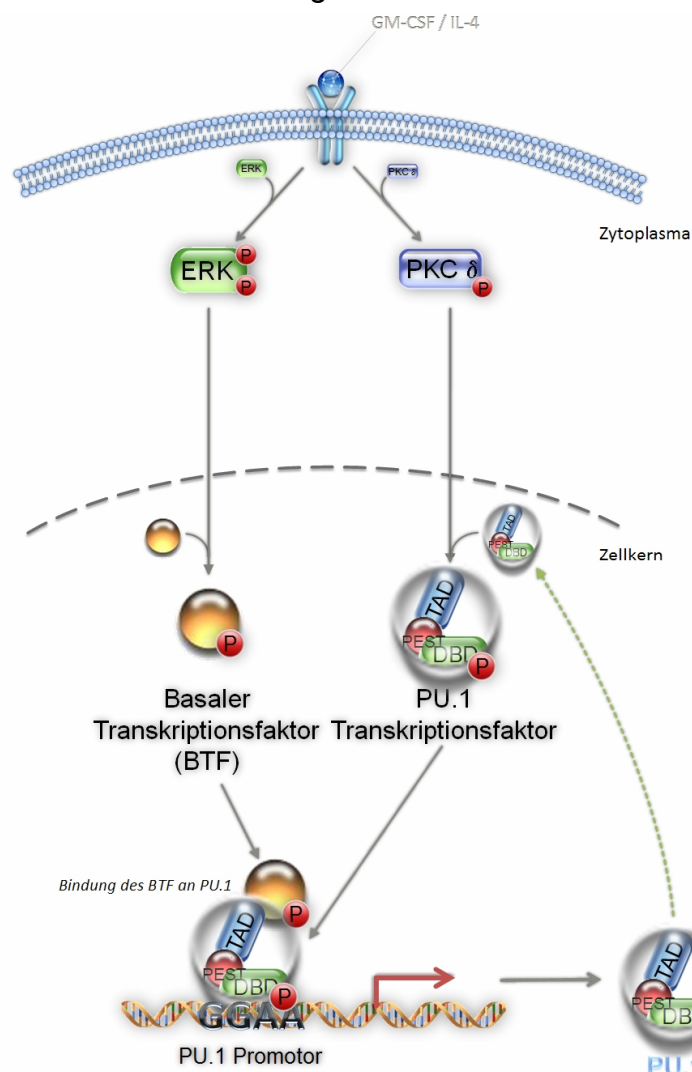


Abbildung 4.6: Modell der Aktivierung des Transkriptionsfaktors PU.1 durch die PKC δ und ERK bei der GM-CSF und IL-4 stimulierten Differenzierung von HSCs

Der Mechanismus der PU.1-Aktivierung durch PKC δ konnte in der vorliegenden Arbeit leider nicht vollständig geklärt werden. Eine Fortführung dieser Arbeit wäre die Untersuchung, ob nach Mutation der beiden potenziellen PKC δ -Phosphorylierungsmotive keine Phosphorylierung durch PKC δ mehr erfolgt bzw. ob die Basalaktivität reduziert wird. Eine Aufklärung des dahinterstehenden Mechanismus könnte zeigen, ob die DNA-Bindung von PU.1 durch Phosphorylierung gesteuert wird und diese Steuerung einen Einfluß auf die Differenzierung von HSCs zu DCs hat.

5. Zusammenfassung

Humane hämatopoetische Stammzellen (HSCs) besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und übernehmen die kontinuierliche Neubildung aller zellulären Bestandteile des Blutes. Aufgrund der zunehmenden klinischen Bedeutung der HSCs ist es essentiell die molekularen Mechanismen, die den Prozess der Vermehrung und Differenzierung von humanen hämatopoetischen Stammzellen steuern, aufzuklären und deren funktionelle Bedeutung zu verstehen.

Das Ziel der Arbeit war die Identifizierung, Charakterisierung und gerichtete Modulation funktionell relevanter Signalwege, die am Differenzierungsprozess von HSCs zu myeloiden Effektorzellen beteiligt sind. Für diese Untersuchung wurde ein Expansionsprotokoll für humane HSCs, sowie ein Differenzierungsprotokoll für das humane myeloide DC Differenzierungsmodell entwickelt. In der Arbeit wurden drei wichtige Signalwege der Zelle, die Mitogenen Signalkaskade (MAPK), Protein Kinase C (PKC) gekoppelten Prozessen und dem JAK/STAT Signalweg untersucht. Die vorliegende Arbeit zeigt, daß die Stimulation der HSCs mit GM-CSF und IL-4 zu einer zeitlich begrenzten Aktivierung von MAPK/ERK1/2, PKC δ , JAK2, sowie STAT5 und STAT6 führte. Kommerzielle Inhibitoren von MEK, PKC und Januskinase hemmten selektiv diese Aktivierung und führten zu einer veränderten Hämatopoese. Die Aktivierung dieser Signalwege ist daher für die myeloide Differenzierung von HSCs zu Dendritischen Zellen von entscheidender Bedeutung.

Einer der entscheidenden nukleären Faktoren für die myeloide Differenzierung ist der Ets-Transkriptionsfaktor PU.1, dessen Aktivität durch Phosphorylierung reguliert sein könnte. Obwohl die funktionelle Rolle von PU.1 in der Differenzierung von HSC in der vorliegenden Arbeit nicht vollständig geklärt werden konnte, wurde jedoch erstmals im *in vitro* Kinase-Assay gezeigt, daß PU.1 durch PKC δ , aber nicht durch MAPK/ERK2 spezifisch phosphoryliert wird. In einem PU.1-spezifischen Luciferasereporter-Assay wurde die transkriptionelle Aktivität von PU.1 durch die Inhibition von PKC δ und MAPK/ERK1/2 deutlich reduziert.

Weiterführende Experimente in einem komplexen Differenzierungsmodell von humanen HSCs wiesen darauf hin, daß durch den gezielten Einsatz von Signalweginhibitoren eine Verschiebung der Verhältnisse der gebildeten Blutzellkolonieformen erreicht werden kann. So war die Differenzierung zu Erythrozyten von der Mitogenen Signalkaskade unabhängig, wohingegen die Differenzierung zu Makrophagen eine deutliche Abhängigkeit von der Aktivität der Mitogenen Signalkaskade sowie von der Aktivierung des Protein Kinase C Signalwegs zeigte. Im Gegensatz dazu führte die Inhibition der Januskinasen (JAKs) zu einer Hemmung der Differenzierung in allen Kolonieformen.

Insgesamt zeigten die Ergebnisse, daß der MAPK/ERK und PKC δ Signalweg bei der Differenzierung von humanen hämatopoetischen Stammzellen eine wichtige

Rolle spielen und eine gerichtete Steuerung der Differenzierung durch den Einsatz spezifischer Signalweginhibitoren möglich erscheint.

6. Literaturverzeichnis

A

- Adema, G.J., Hartgers, F., Verstraten, R., de Vries, E., Marland, G., Menon, S., Foster, J., Xu, Y., Nooyen, P., McClanahan, T., Bacon, K.B. & Figdor, C.G. (1997) A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature*, **387**, 713-717.
- Aebbersold, D.M., Shaul, Y.D., Yung, Y., Yarom, N., Yao, Z., Hanoch, T. & Seger, R. (2004) Extracellular signal-regulated kinase 1c (ERK1c), a novel 42-kilodalton ERK, demonstrates unique modes of regulation, localization, and function. *Mol Cell Biol*, **24**, 10000-10015.
- Aggarwal, B.B., Shishodia, S., Takada, Y., Jackson-Bernitsas, D., Ahn, K.S., Sethi, G. & Ichikawa, H. (2006) TNF blockade: an inflammatory issue. *Ernst Schering Res Found Workshop*, 161-186.
- Alberts, B. (2004) *Molekularbiologie der Zelle*. Wiley-VCH, Weinheim; [Chichester].
- Anderson, K.L., Perkin, H., Surh, C.D., Venturini, S., Maki, R.A. & Torbett, B.E. (2000) Transcription factor PU.1 is necessary for development of thymic and myeloid progenitor-derived dendritic cells. *J Immunol*, **164**, 1855-1861.
- Anderson, K.L., Smith, K.A., Connors, K., McKercher, S.R., Maki, R.A. & Torbett, B.E. (1998) Myeloid development is selectively disrupted in PU.1 null mice. *Blood*, **91**, 3702-3710.
- Andrews, R.G., Briddell, R.A., Hill, R., Gough, M. & McNiece, I.K. (1999) Engraftment of primates with G-CSF mobilized peripheral blood CD34+ progenitor cells expanded in G-CSF, SCF and MGDF decreases the duration and severity of neutropenia. *Stem Cells*, **17**, 210-218.
- Atar, O. & Levi, B.Z. (2005) PU.1 silencing leads to terminal differentiation of erythroleukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **329**, 1288-1292.

B

- Bachelor, M.A. & Bowden, G.T. (2004) UVA-mediated activation of signaling pathways involved in skin tumor promotion and progression. *Semin Cancer Biol*, **14**, 131-138.
- Back, J., Allman, D., Chan, S. & Kastner, P. (2005) Visualizing PU.1 activity during hematopoiesis. *Exp Hematol*, **33**, 395-402.
- Bassini, A., Zauli, G., Migliaccio, G., Migliaccio, A.R., Pascuccio, M., Pierpaoli, S., Guidotti, L., Capitani, S. & Vitale, M. (1999) Lineage-restricted expression of protein kinase C isoforms in hematopoiesis. *Blood*, **93**, 1178-1188.
- Baum, C.M., Weissman, I.L., Tsukamoto, A.S., Buckle, A.M. & Peault, B. (1992) Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 2804-2808.
- Behre, G., Whitmarsh, A.J., Coghlan, M.P., Hoang, T., Carpenter, C.L., Zhang, D.E., Davis, R.J. & Tenen, D.G. (1999) c-Jun is a JNK-independent coactivator of the PU.1 transcription factor. *J Biol Chem*, **274**, 4939-4946.
- Bethea, M. & Forman, D.T. (1990) Beta 2-microglobulin: its significance and clinical usefulness. *Ann Clin Lab Sci*, **20**, 163-168.

- Biggs, J.R., Ahn, N.G. & Kraft, A.S. (1998) Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in U937 leukemic cells induces phosphorylation of the amino terminus of the TATA-binding protein. *Cell Growth Differ*, **9**, 667-676.
- Bociek, R.G. & Armitage, J.O. (1996) Hematopoietic growth factors. *CA Cancer J Clin*, **46**, 165-184.
- Bos, J.D. & Kapsenberg, M.L. (1993) The skin immune system: progress in cutaneous biology. *Immunol Today*, **14**, 75-78.
- Broudy, V.C. (1997) Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood*, **90**, 1345-1364.
- Brown, J., Greaves, M.F. & Molgaard, H.V. (1991) The gene encoding the stem cell antigen, CD34, is conserved in mouse and expressed in haemopoietic progenitor cell lines, brain, and embryonic fibroblasts. *Int Immunol*, **3**, 175-184.
- Brown, M.G., Driscoll, J. & Monaco, J.J. (1993) MHC-linked low-molecular mass polypeptide subunits define distinct subsets of proteasomes. Implications for divergent function among distinct proteasome subsets. *J Immunol*, **151**, 1193-1204.
- Bruna-Romero, O., Schmiege, J., Del Val, M., Buschle, M. & Tsuji, M. (2003) The dendritic cell-specific chemokine, dendritic cell-derived CC chemokine 1, enhances protective cell-mediated immunity to murine malaria. *J Immunol*, **170**, 3195-3203.

C

- Cai, H., Smola, U., Wixler, V., Eisenmann-Tappe, I., Diaz-Meco, M.T., Moscat, J., Rapp, U. & Cooper, G.M. (1997) Role of diacylglycerol-regulated protein kinase C isoforms in growth factor activation of the Raf-1 protein kinase. *Mol Cell Biol*, **17**, 732-741.
- Cairo, M.S. & Wagner, J.E. (1997) Placental and/or umbilical cord blood: an alternative source of hematopoietic stem cells for transplantation. *Blood*, **90**, 4665-4678.
- Caldenhoven, E., van Dijk, T.B., Tijmensen, A., Raaijmakers, J.A., Lammers, J.W., Koenderman, L. & de Groot, R.P. (1998) Differential activation of functionally distinct STAT5 proteins by IL-5 and GM-CSF during eosinophil and neutrophil differentiation from human CD34+ hematopoietic stem cells. *Stem Cells*, **16**, 397-403.
- Carbone, F.R., Hosken, N.A., Moore, M.W. & Bevan, M.J. (1989) Class I MHC-restricted cytotoxic responses to soluble protein antigen. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **54 Pt 1**, 551-555.
- Carey, J.O., Posekany, K.J., deVente, J.E., Pettit, G.R. & Ways, D.K. (1996) Phorbol ester-stimulated phosphorylation of PU.1: association with leukemic cell growth inhibition. *Blood*, **87**, 4316-4324.
- Caux, C., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D. & Banchereau, J. (1992) GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature*, **360**, 258-261.
- Cejas, P.J., Carlson, L.M., Zhang, J., Padmanabhan, S., Kolonias, D., Lindner, I., Haley, S., Boise, L.H. & Lee, K.P. (2005) Protein kinase C beta11 plays an essential role in dendritic cell differentiation and autoregulates its own expression. *J Biol Chem*, **280**, 28412-28423.
- Cella, M., Engering, A., Pinet, V., Pieters, J. & Lanzavecchia, A. (1997) Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature*, **388**, 782-787.

- Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A. & Colonna, M. (1999) Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med*, **5**, 919-923.
- Chan, J.Y. & Watt, S.M. (2001) Adhesion receptors on haematopoietic progenitor cells. *Br J Haematol*, **112**, 541-557.
- Chang, Y.Y., Kim, S.J., Park, T.K., Kang, S.S., Ha, M.J., Mushinski, J.F. & Chun, J.S. (1998) Modulation of MAP kinase signaling and growth characteristics by the overexpression of protein kinase C in NIH3T3 cells. *Biochem Mol Biol Int*, **45**, 1139-1148.
- Civin, C.I. & Loken, M.R. (1987) Cell surface antigens on human marrow cells: dissection of hematopoietic development using monoclonal antibodies and multiparameter flow cytometry. *Int J Cell Cloning*, **5**, 267-288.
- Clifton, A.D., Young, P.R. & Cohen, P. (1996) A comparison of the substrate specificity of MAPKAP kinase-2 and MAPKAP kinase-3 and their activation by cytokines and cellular stress. *FEBS Lett*, **392**, 209-214.
- Corbit, K.C., Trakul, N., Eves, E.M., Diaz, B., Marshall, M. & Rosner, M.R. (2003) Activation of Raf-1 signaling by protein kinase C through a mechanism involving Raf kinase inhibitory protein. *J Biol Chem*, **278**, 13061-13068.
- Crowley, M., Inaba, K., Witmer-Pack, M. & Steinman, R.M. (1989) The cell surface of mouse dendritic cells: FACS analyses of dendritic cells from different tissues including thymus. *Cell Immunol*, **118**, 108-125.
- Curti, A., Fogli, M., Ratta, M., Biasco, G., Tura, S. & Lemoli, R.M. (2001) Dendritic cell differentiation from hematopoietic CD34+ progenitor cells. *J Biol Regul Homeost Agents*, **15**, 49-52.
- Cylwik, B. & Szmikowski, M. (1997) [Diagnosis usefulness of beta-2 microglobulin in clinical practice]. *Pol Merkuriusz Lek*, **2**, 224-227.
- Czibere, A., Prall, W.C., Zerbini, L.F., Grall, F., Craigie, E.C., Ulrich, S.D., Giagounidis, A.A., Haas, R., Libermann, T.A. & Aivado, M. (2005) The nonsteroidal anti-inflammatory drug Exisulind selectively induces apoptosis via JNK in secondary acute myeloid leukemia after myelodysplastic syndrome. *Cell Cycle*, **4**, 812-817.

D

- Dahl, R. & Simon, M.C. (2003) The importance of PU.1 concentration in hematopoietic lineage commitment and maturation. *Blood Cells Mol Dis*, **31**, 229-233.
- Darnell, J.E., Jr. (1997) STATs and gene regulation. *Science*, **277**, 1630-1635.
- David, M., Ford, D., Bertoglio, J., Maizel, A.L. & Pierre, J. (2001) Induction of the IL-13 receptor alpha2-chain by IL-4 and IL-13 in human keratinocytes: involvement of STAT6, ERK and p38 MAPK pathways. *Oncogene*, **20**, 6660-6668.
- Davis, R.J. (1995) Transcriptional regulation by MAP kinases. *Mol Reprod Dev*, **42**, 459-467.
- Decker, T., Kovarik, P. & Meinke, A. (1997) GAS elements: a few nucleotides with a major impact on cytokine-induced gene expression. *J Interferon Cytokine Res*, **17**, 121-134.
- DeKoter, R.P., Lee, H.J. & Singh, H. (2002) PU.1 regulates expression of the interleukin-7 receptor in lymphoid progenitors. *Immunity*, **16**, 297-309.

- DeKoter, R.P. & Singh, H. (2000) Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science*, **288**, 1439-1441.
- Dent, P., Yacoub, A., Contessa, J., Caron, R., Amorino, G., Valerie, K., Hagan, M.P., Grant, S. & Schmidt-Ullrich, R. (2003) Stress and radiation-induced activation of multiple intracellular signaling pathways. *Radiat Res*, **159**, 283-300.
- Dhanasekaran, N. & Premkumar Reddy, E. (1998) Signaling by dual specificity kinases. *Oncogene*, **17**, 1447-1455.
- Dieu-Nosjean, M.C., Vicari, A., Lebecque, S. & Caux, C. (1999) Regulation of dendritic cell trafficking: a process that involves the participation of selective chemokines. *J Leukoc Biol*, **66**, 252-262.
- Dilioglou, S., Cruse, J.M. & Lewis, R.E. (2003) Costimulatory function of umbilical cord blood CD14+ and CD34+ derived dendritic cells. *Exp Mol Pathol*, **75**, 18-33.
- Dooley, D.C., Xiao, M., Oppenlander, B.K., Plunkett, J.M. & Lyman, S.D. (1997) Flt3 ligand enhances the yield of primitive cells after Ex vivo cultivation of CD34+ CD38dim cells and CD34+ CD38dim CD33dim HLA-DR+ cells. *Blood*, **90**, 3903-3913.
- Dougherty, M.K., Muller, J., Ritt, D.A., Zhou, M., Zhou, X.Z., Copeland, T.D., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Lu, K.P. & Morrison, D.K. (2005) Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation. *Mol Cell*, **17**, 215-224.
- DuBridge, R.B., Tang, P., Hsia, H.C., Leong, P.M., Miller, J.H. & Calos, M.P. (1987) Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol*, **7**, 379-387.

E

- Eisenbeis, C.F., Singh, H. & Storb, U. (1993) PU.1 is a component of a multiprotein complex which binds an essential site in the murine immunoglobulin lambda 2-4 enhancer. *Mol Cell Biol*, **13**, 6452-6461.
- Eisenbeis, C.F., Singh, H. & Storb, U. (1995) Pip, a novel IRF family member, is a lymphoid-specific, PU.1-dependent transcriptional activator. *Genes Dev*, **9**, 1377-1387.
- English, J., Pearson, G., Wilsbacher, J., Swantek, J., Karandikar, M., Xu, S. & Cobb, M.H. (1999) New insights into the control of MAP kinase pathways. *Exp Cell Res*, **253**, 255-270.

F

- Facchetti, F., Candiago, E. & Vermi, W. (1999) Plasmacytoid monocytes express IL3-receptor alpha and differentiate into dendritic cells. *Histopathology*, **35**, 88-89.
- Feldman, S.B., Ferraro, M., Zheng, H.M., Patel, N., Gould-Fogerite, S. & Fitzgerald-Bocarsly, P. (1994) Viral induction of low frequency interferon-alpha producing cells. *Virology*, **204**, 1-7.
- Feng, J., Witthuhn, B.A., Matsuda, T., Kohlhuber, F., Kerr, I.M. & Ihle, J.N. (1997) Activation of Jak2 catalytic activity requires phosphorylation of Y1007 in the kinase activation loop. *Mol Cell Biol*, **17**, 2497-2501.
- Fina, L., Molgaard, H.V., Robertson, D., Bradley, N.J., Monaghan, P., Delia, D., Sutherland, D.R., Baker, M.A. & Greaves, M.F. (1990) Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood*, **75**, 2417-2426.

Fritsch, G., Buchinger, P. & Printz, D. (1993) Use of flow cytometric CD34 analysis to quantify hematopoietic progenitor cells. *Leuk Lymphoma*, **10**, 443-451.

G

- Galabova-Kovacs, G., Kolbus, A., Matzen, D., Meissl, K., Piazzolla, D., Rubiolo, C., Steinitz, K. & Baccarini, M. (2006) ERK and beyond: insights from B-Raf and Raf-1 conditional knockouts. *Cell Cycle*, **5**, 1514-1518.
- Galson, D.L., Hensold, J.O., Bishop, T.R., Schalling, M., D'Andrea, A.D., Jones, C., Auron, P.E. & Housman, D.E. (1993) Mouse beta-globin DNA-binding protein B1 is identical to a proto-oncogene, the transcription factor Spi-1/PU.1, and is restricted in expression to hematopoietic cells and the testis. *Mol Cell Biol*, **13**, 2929-2941.
- Gangenahalli, G.U., Gupta, P., Saluja, D., Verma, Y.K., Kishore, V., Chandra, R., Sharma, R.K. & Ravindranath, T. (2005) Stem cell fate specification: role of master regulatory switch transcription factor PU.1 in differential hematopoiesis. *Stem Cells Dev*, **14**, 140-152.
- Gardner, K.H. & Montminy, M. (2005) Can you hear me now? Regulating transcriptional activators by phosphorylation. *Sci STKE*, **2005**, pe44.
- Geijtenbeek, T.B., Kwon, D.S., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Middel, J., Cornelissen, I.L., Nottet, H.S., KewalRamani, V.N., Littman, D.R., Figdor, C.G. & van Kooyk, Y. (2000a) DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell*, **100**, 587-597.
- Geijtenbeek, T.B., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Adema, G.J., van Kooyk, Y. & Figdor, C.G. (2000b) Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell*, **100**, 575-585.
- Germain, R.N. (1994) MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell*, **76**, 287-299.
- German, R.N., Castellino, F., Han, R., Reis e Sousa, C., Romagnoli, P., Sadegh-Nasseri, S. & Zhong, G.M. (1996) Processing and presentation of endocytically acquired protein antigens by MHC class II and class I molecules. *Immunol Rev*, **151**, 5-30.
- Gluckman, E., Broxmeyer, H.A., Auerbach, A.D., Friedman, H.S., Douglas, G.W., Devergie, A., Esperou, H., Thierry, D., Socie, G., Lehn, P. & et al. (1989) Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med*, **321**, 1174-1178.
- Gouilleux, F., Wakao, H., Mundt, M. & Groner, B. (1994) Prolactin induces phosphorylation of Tyr694 of Stat5 (MGF), a prerequisite for DNA binding and induction of transcription. *Embo J*, **13**, 4361-4369.
- Guerriero, A., Langmuir, P.B., Spain, L.M. & Scott, E.W. (2000) PU.1 is required for myeloid-derived but not lymphoid-derived dendritic cells. *Blood*, **95**, 879-885.
- Guo, B. & Rothstein, T.L. (2005) B cell receptor (BCR) cross-talk: IL-4 creates an alternate pathway for BCR-induced ERK activation that is phosphatidylinositol 3-kinase independent. *J Immunol*, **174**, 5375-5381.

H

- Haeuber, D. & DiJulio, J.E. (1989) Hemopoietic colony stimulating factors: an overview. *Oncol Nurs Forum*, **16**, 247-255.
- Hagemeier, C., Bannister, A.J., Cook, A. & Kouzarides, T. (1993) The activation domain of transcription factor PU.1 binds the retinoblastoma (RB) protein and the transcription factor TFIID in vitro: RB shows sequence similarity to TFIID and TFIIB. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 1580-1584.
- Han, J., Jiang, Y., Li, Z., Kravchenko, V.V. & Ulevitch, R.J. (1997) Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. *Nature*, **386**, 296-299.
- Haq, R., Halupa, A., Beattie, B.K., Mason, J.M., Zanke, B.W. & Barber, D.L. (2002) Regulation of erythropoietin-induced STAT serine phosphorylation by distinct mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem*, **277**, 17359-17366.
- Hart, D.N. (1997) Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood*, **90**, 3245-3287.
- Hart, D.N. & Fabre, J.W. (1981) Major histocompatibility complex antigens in rat kidney, ureter, and bladder. Localization with monoclonal antibodies and demonstration of Ia-positive dendritic cells. *Transplantation*, **31**, 318-325.
- Hartman, A.D., Wilson-Weekes, A., Suvannasankha, A., Burgess, G.S., Phillips, C.A., Hinchey, K.J., Cripe, L.D. & Boswell, H.S. (2006) Constitutive c-jun N-terminal kinase activity in acute myeloid leukemia derives from Flt3 and affects survival and proliferation. *Exp Hematol*, **34**, 1360-1376.
- Hashimoto, S., Suzuki, T., Dong, H.Y., Nagai, S., Yamazaki, N. & Matsushima, K. (1999) Serial analysis of gene expression in human monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, **94**, 845-852.
- Haylock, D.N., Horsfall, M.J., Dowse, T.L., Ramshaw, H.S., Niutta, S., Protopsaltis, S., Peng, L., Burrell, C., Rappold, I., Buhring, H.J. & Simmons, P.J. (1997) Increased recruitment of hematopoietic progenitor cells underlies the ex vivo expansion potential of FLT3 ligand. *Blood*, **90**, 2260-2272.
- Hebenstreit, D., Wirnsberger, G., Horejs-Hoeck, J. & Duschl, A. (2006) Signaling mechanisms, interaction partners, and target genes of STAT6. *Cytokine Growth Factor Rev*, **17**, 173-188.
- Heckner, F. & Freund, M. (2001) *Praktikum der mikroskopischen Hämatologie*. Urban & Fischer, München.
- Heidenreich, O., Neining, A., Schrott, G., Zinck, R., Cahill, M.A., Engel, K., Kotlyarov, A., Kraft, R., Kostka, S., Gaestel, M. & Nordheim, A. (1999) MAPKAP kinase 2 phosphorylates serum response factor in vitro and in vivo. *J Biol Chem*, **274**, 14434-14443.
- Heike, T. & Nakahata, T. (2002) Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells by cytokines. *Biochim Biophys Acta*, **1592**, 313-321.
- Henderson, R.A., Watkins, S.C. & Flynn, J.L. (1997) Activation of human dendritic cells following infection with Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol*, **159**, 635-643.
- Howard, J.C. (1995) Supply and transport of peptides presented by class I MHC molecules. *Curr Opin Immunol*, **7**, 69-76.
- Hromas, R., Orazi, A., Neiman, R.S., Maki, R., Van Beveran, C., Moore, J. & Klemsz, M. (1993) Hematopoietic lineage- and stage-restricted expression of the ETS oncogene family member PU.1. *Blood*, **82**, 2998-3004.

- Hu, Z.B., Ma, W., Zaborski, M., MacLeod, R., Quentmeier, H. & Drexler, H.G. (1996) Establishment and characterization of two novel cytokine-responsive acute myeloid and monocytic leukemia cell lines, MUTZ-2 and MUTZ-3. *Leukemia*, **10**, 1025-1040.
- Huang, H.M., Chiou, H.Y. & Chang, J.L. (2006) Activin A induces erythroid gene expressions and inhibits mitogenic cytokine-mediated K562 colony formation by activating p38 MAPK. *J Cell Biochem*, **98**, 789-797.
- Huang, S., Law, P., Francis, K., Palsson, B.O. & Ho, A.D. (1999) Symmetry of initial cell divisions among primitive hematopoietic progenitors is independent of ontogenic age and regulatory molecules. *Blood*, **94**, 2595-2604.

J

- Ikizawa, K., Kajiwara, K., Izuhara, K. & Yanagihara, Y. (2001) PKCdelta and zeta mediate IL-4/IL-13-induced germline epsilon transcription in human B cells: a putative regulation via PU.1 phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*, **288**, 34-41.
- Inaba, K., Inaba, M., Naito, M. & Steinman, R.M. (1993) Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J Exp Med*, **178**, 479-488.
- Iwasaki, H., Somoza, C., Shigematsu, H., Duprez, E.A., Iwasaki-Arai, J., Mizuno, S., Arinobu, Y., Geary, K., Zhang, P., Dayaram, T., Fenyus, M.L., Elf, S., Chan, S., Kastner, P., Huettner, C.S., Murray, R., Tenen, D.G. & Akashi, K. (2005) Distinctive and indispensable roles of PU.1 in maintenance of hematopoietic stem cells and their differentiation. *Blood*, **106**, 1590-1600.

J

- Jainchill, J.L., Aaronson, S.A. & Todaro, G.J. (1969) Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J Virol*, **4**, 549-553.
- Janeway, T., Walport, Shlomchik (2005) *Immunobiology: the immune system in health and disease*. Garland Science, New York; London.
- Janknecht, R. & Hunter, T. (1997) Convergence of MAP kinase pathways on the ternary complex factor Sap-1a. *Embo J*, **16**, 1620-1627.
- Jiang, H., Harris, M.B. & Rothman, P. (2000) IL-4/IL-13 signaling beyond JAK/STAT. *J Allergy Clin Immunol*, **105**, 1063-1070.
- Jiang, W., Swiggard, W.J., Heufler, C., Peng, M., Mirza, A., Steinman, R.M. & Nussenzweig, M.C. (1995) The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature*, **375**, 151-155.
- Joneson, T., Fulton, J.A., Volle, D.J., Chaika, O.V., Bar-Sagi, D. & Lewis, R.E. (1998) Kinase suppressor of Ras inhibits the activation of extracellular ligand-regulated (ERK) mitogen-activated protein (MAP) kinase by growth factors, activated Ras, and Ras effectors. *J Biol Chem*, **273**, 7743-7748.
- Jonuleit, H., Knop, J. & Enk, A.H. (1996) Cytokines and their effects on maturation, differentiation and migration of dendritic cells. *Arch Dermatol Res*, **289**, 1-8.

- Joo, M., Park, G.Y., Wright, J.G., Blackwell, T.S., Atchison, M.L. & Christman, J.W. (2004) Transcriptional regulation of the cyclooxygenase-2 gene in macrophages by PU.1. *J Biol Chem*, **279**, 6658-6665.
- Joshi, S.S., Vu, U.E., Lovgren, T.R., Lorkovic, M., Patel, W., Todd, G.L., Kuszynski, C., Joshi, B.J. & Dave, H.P. (2002) Comparison of phenotypic and functional dendritic cells derived from human umbilical cord blood and peripheral blood mononuclear cells. *J Hematother Stem Cell Res*, **11**, 337-347.
- Josien, R., Wong, B.R., Li, H.L., Steinman, R.M. & Choi, Y. (1999) TRANCE, a TNF family member, is differentially expressed on T cell subsets and induces cytokine production in dendritic cells. *J Immunol*, **162**, 2562-2568.

K

- Kandilci, A. & Grosveld, G.C. (2005) SET-induced calcium signaling and MAPK/ERK pathway activation mediate dendritic cell-like differentiation of U937 cells. *Leukemia*, **19**, 1439-1445.
- Kanoh, Y., Sajan, M.P., Bandyopadhyay, G., Miura, A., Standaert, M.L. & Farese, R.V. (2003) Defective activation of atypical protein kinase C zeta and lambda by insulin and phosphatidylinositol-3,4,5-(PO4)(3) in skeletal muscle of rats following high-fat feeding and streptozotocin-induced diabetes. *Endocrinology*, **144**, 947-954.
- Kaplinsky, C., Estrov, Z., Freedman, M.H. & Cohen, A. (1986) Induction of differentiation in HL-60 promyelocytic cells: a comparative study in two sublines. *Blood Cells*, **11**, 459-468.
- Kaushansky, K. (1998) Thrombopoietin and the hematopoietic stem cell. *Blood*, **92**, 1-3.
- Kaushansky, K. (2006) Lineage-specific hematopoietic growth factors. *N Engl J Med*, **354**, 2034-2045.
- Keller, R. (2001) Dendritic cells: their significance in health and disease. *Immunol Lett*, **78**, 113-122.
- Khwaja, A. (2006) The role of Janus kinases in haemopoiesis and haematological malignancy. *Br J Haematol*, **134**, 366-384.
- Kikkawa, U., Matsuzaki, H. & Yamamoto, T. (2002) Protein kinase C delta (PKC delta): activation mechanisms and functions. *J Biochem (Tokyo)*, **132**, 831-839.
- Kim, J.W., Park, H.Y., Lee, M.J., Jang, M.J., Lee, S.Y., Park, Y.M., Son, D.H., Chang, Y.C., Bae, Y.S. & Kwak, J.Y. (2004) Phosphatidic acid and tumor necrosis factor-alpha induce the expression of CD83 through mitogen activated protein kinase pathway in a CD34+ hematopoietic progenitor cell line, KG1. *Int Immunopharmacol*, **4**, 1603-1613.
- Kitajima, K., Tanaka, M., Zheng, J., Yen, H., Sato, A., Sugiyama, D., Umehara, H., Sakai, E. & Nakano, T. (2006) Redirecting differentiation of hematopoietic progenitors by a transcription factor, GATA-2. *Blood*, **107**, 1857-1863.
- Kitamura, T., Tange, T., Terasawa, T., Chiba, S., Kuwaki, T., Miyagawa, K., Piao, Y.F., Miyazono, K., Urabe, A. & Takaku, F. (1989a) Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin. *J Cell Physiol*, **140**, 323-334.
- Kitamura, T., Tojo, A., Kuwaki, T., Chiba, S., Miyazono, K., Urabe, A. & Takaku, F. (1989b) Identification and analysis of human erythropoietin receptors on a factor-dependent cell line, TF-1. *Blood*, **73**, 375-380.

- Klemsz, M.J., McKercher, S.R., Celada, A., Van Beveren, C. & Maki, R.A. (1990) The macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene. *Cell*, **61**, 113-124.
- Knebel, B., Avci, H., Bullmann, C., Kotzka, J. & Muller-Wieland, D. (2005) Reduced phosphorylation of transcription factor Elk-1 in cultured fibroblasts of a patient with premature aging syndrome and insulin resistance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, **113**, 94-101.
- Knight, S.C., Balfour, B.M., O'Brien, J., Buttifant, L., Summerska, T. & Clarke, J. (1982) Role of veiled cells in lymphocyte activation. *Eur J Immunol*, **12**, 1057-1060.
- Kobayashi, M., Imamura, M., Gotohda, Y., Maeda, S., Iwasaki, H., Sakurada, K., Kasai, M., Hapel, A.J. & Miyazaki, T. (1991) Synergistic effects of interleukin-1 beta and interleukin-3 on the expansion of human hematopoietic progenitor cells in liquid cultures. *Blood*, **78**, 1947-1953.
- Koeffler, H.P. (1983) Induction of differentiation of human acute myelogenous leukemia cells: therapeutic implications. *Blood*, **62**, 709-721.
- Koeffler, H.P. & Golde, D.W. (1978) Acute myelogenous leukemia: a human cell line responsive to colony-stimulating activity. *Science*, **200**, 1153-1154.
- Kohmura, K., Miyakawa, Y., Kawai, Y., Ikeda, Y. & Kizaki, M. (2004) Different roles of p38 MAPK and ERK in STI571-induced multi-lineage differentiation of K562 cells. *J Cell Physiol*, **198**, 370-376.
- Koide, S.L., Inaba, K. & Steinman, R.M. (1987) Interleukin 1 enhances T-dependent immune responses by amplifying the function of dendritic cells. *J Exp Med*, **165**, 515-530.
- Kolenik, S., Ding, T.G. & Longley, J. (1990) Granulocyte macrophage--colony-stimulating factor (GM-CSF) decreases CD1a expression by human Langerhans cells and increases proliferation in the mixed epidermal cell-lymphocyte reaction (MELR). *J Invest Dermatol*, **95**, 359-362.
- Korbling, M. & Estrov, Z. (2003) Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N Engl J Med*, **349**, 570-582.
- Koschmieder, S., Rosenbauer, F., Steidl, U., Owens, B.M. & Tenen, D.G. (2005) Role of transcription factors C/EBPalpha and PU.1 in normal hematopoiesis and leukemia. *Int J Hematol*, **81**, 368-377.
- Krause, D.S., Fackler, M.J., Civin, C.I. & May, W.S. (1996) CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*, **87**, 1-13.
- Kucukkaya, B., Arslan, D.O. & Kan, B. (2006) Role of G proteins and ERK activation in hemin-induced erythroid differentiation of K562 cells. *Life Sci*, **78**, 1217-1224.
- Kyriakis, J.M., App, H., Zhang, X.F., Banerjee, P., Brautigan, D.L., Rapp, U.R. & Avruch, J. (1992) Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature*, **358**, 417-421.

L

- Langerhans, P. (1868) Über die Nerven der menschlichen Haut. *Virchows Arch.*, **44**, 325-327.
- Lanzavecchia, A. (1996) Mechanisms of antigen uptake for presentation. *Curr Opin Immunol*, **8**, 348-354.
- Lappin, T.R., Maxwell, A.P. & Johnston, P.G. (2002) EPO's alter ego: erythropoietin has multiple actions. *Stem Cells*, **20**, 485-492.
- Lardon, F., Snoeck, H.W., Berneman, Z.N., Van Tendeloo, V.F., Nijs, G., Lenjou, M., Henckaerts, E., Boeckxtaens, C.J., Vandenabeele, P., Kestens, L.L., Van

- Bockstaele, D.R. & Vanham, G.L. (1997) Generation of dendritic cells from bone marrow progenitors using GM-CSF, TNF-alpha, and additional cytokines: antagonistic effects of IL-4 and IFN-gamma and selective involvement of TNF-alpha receptor-1. *Immunology*, **91**, 553-559.
- Larsen, C.P., Ritchie, S.C., Pearson, T.C., Linsley, P.S. & Lowry, R.P. (1992) Functional expression of the costimulatory molecule, B7/BB1, on murine dendritic cell populations. *J Exp Med*, **176**, 1215-1220.
- Law, P., Traylor, L. & Recktenwald, D.J. (1999) Cell analysis for hematopoietic stem/progenitor cell transplantation. *Cytometry*, **38**, 47-52.
- Lehner, P.J. & Cresswell, P. (1996) Processing and delivery of peptides presented by MHC class I molecules. *Curr Opin Immunol*, **8**, 59-67.
- Lehtonen, A., Matikainen, S., Miettinen, M. & Julkunen, I. (2002) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-induced STAT5 activation and target-gene expression during human monocyte/macrophage differentiation. *J Leukoc Biol*, **71**, 511-519.
- Leonard, W.J. (2001) Role of Jak kinases and STATs in cytokine signal transduction. *Int J Hematol*, **73**, 271-277.
- Lewis, T.S., Hunt, J.B., Aveline, L.D., Jonscher, K.R., Louie, D.F., Yeh, J.M., Nahreini, T.S., Resing, K.A. & Ahn, N.G. (2000) Identification of novel MAP kinase pathway signaling targets by functional proteomics and mass spectrometry. *Mol Cell*, **6**, 1343-1354.
- Lewis, T.S., Shapiro, P.S. & Ahn, N.G. (1998) Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res*, **74**, 49-139.
- Lin, M. & Rikihisa, Y. (2004) Ehrlichia chaffeensis downregulates surface Toll-like receptors 2/4, CD14 and transcription factors PU.1 and inhibits lipopolysaccharide activation of NF-kappa B, ERK 1/2 and p38 MAPK in host monocytes. *Cell Microbiol*, **6**, 175-186.
- Lipscomb, M.F. & Masten, B.J. (2002) Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev*, **82**, 97-130.
- Liu, A., Takahashi, M., Narita, M., Zheng, Z., Kanazawa, N., Abe, T., Nikkuni, K., Furukawa, T., Toba, K., Fuse, I. & Aizawa, Y. (2002) Generation of functional and mature dendritic cells from cord blood and bone marrow CD34+ cells by two-step culture combined with calcium ionophore treatment. *J Immunol Methods*, **261**, 49-63.
- Liva, S.M., Kahn, M.A., Dopp, J.M. & de Vellis, J. (1999) Signal transduction pathways induced by GM-CSF in microglia: significance in the control of proliferation. *Glia*, **26**, 344-352.
- Lloberas, J., Soler, C. & Celada, A. (1999) The key role of PU.1/SPI-1 in B cells, myeloid cells and macrophages. *Immunol Today*, **20**, 184-189.
- Lodie, T.A., Savedra, R., Jr., Golenbock, D.T., Van Beveren, C.P., Maki, R.A. & Fenton, M.J. (1997) Stimulation of macrophages by lipopolysaccharide alters the phosphorylation state, conformation, and function of PU.1 via activation of casein kinase II. *J Immunol*, **158**, 1848-1856.
- Lotze, M.T. (1999) Not just an antigen-presenting cell: 5th international symposium on dendritic cells in fundamental and clinical immunology. *J Leukoc Biol*, **66**, 195-200.
- Lozzio, B.B., Lozzio, C.B. & Bamberger, E.G. (1973) Human spleen inhibitor of leukaemic cell growth. *Experientia*, **29**, 87-89.
- Lozzio, C.B. & Lozzio, B.B. (1975) Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*, **45**, 321-334.

- Luft, T., Pang, K.C., Thomas, E., Bradley, C.J., Savoia, H., Trapani, J. & Cebon, J. (1998) A serum-free culture model for studying the differentiation of human dendritic cells from adult CD34+ progenitor cells. *Exp Hematol*, **26**, 489-500.
- Lyman, S.D. (1998) Biologic effects and potential clinical applications of Flt3 ligand. *Curr Opin Hematol*, **5**, 192-196.

M

- Macatonia, S.E., Edwards, A.J. & Knight, S.C. (1986) Dendritic cells and the initiation of contact sensitivity to fluorescein isothiocyanate. *Immunology*, **59**, 509-514.
- Mao, M., Fang, X., Lu, Y., Lapushin, R., Bast, R.C., Jr. & Mills, G.B. (2000) Inhibition of growth-factor-induced phosphorylation and activation of protein kinase B/Akt by atypical protein kinase C in breast cancer cells. *Biochem J*, **352 Pt 2**, 475-482.
- Martinez, O., Brackenridge, S., El-Idrissi Mel, A. & Prabhakar, B.S. (2005) DC-SIGN, but not sDC-SIGN, can modulate IL-2 production from PMA- and anti-CD3-stimulated primary human CD4 T cells. *Int Immunol*, **17**, 769-778.
- Masterson, A.J., Sombroek, C.C., De Gruijl, T.D., Graus, Y.M., van der Vliet, H.J., Loughheed, S.M., van den Eertwegh, A.J., Pinedo, H.M. & Scheper, R.J. (2002) MUTZ-3, a human cell line model for the cytokine-induced differentiation of dendritic cells from CD34+ precursors. *Blood*, **100**, 701-703.
- Mastro, A.M. & Pepin, K.G. (1982a) Effect of macrophages on phorbol ester-stimulated comitogenesis in bovine lymphocytes. *Cancer Res*, **42**, 1630-1635.
- Mastro, A.M. & Pepin, K.G. (1982b) Effects of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on lymphocyte proliferation. *Carcinog Compr Surv*, **7**, 439-442.
- Mazo, I.B. & von Andrian, U.H. (1999) Adhesion and homing of blood-borne cells in bone marrow microvessels. *J Leukoc Biol*, **66**, 25-32.
- Mazzi, P., Donini, M., Margotto, D., Wientjes, F. & Dusi, S. (2004) IFN-gamma induces gp91phox expression in human monocytes via protein kinase C-dependent phosphorylation of PU.1. *J Immunol*, **172**, 4941-4947.
- McKenna, H.J., de Vries, P., Brasel, K., Lyman, S.D. & Williams, D.E. (1995) Effect of flt3 ligand on the ex vivo expansion of human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood*, **86**, 3413-3420.
- McKercher, S.R., Torbett, B.E., Anderson, K.L., Henkel, G.W., Vestal, D.J., Baribault, H., Klemsz, M., Feeney, A.J., Wu, G.E., Paige, C.J. & Maki, R.A. (1996) Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *Embo J*, **15**, 5647-5658.
- McNiece, I. & Briddell, R. (2001) Ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells and mature cells. *Exp Hematol*, **29**, 3-11.
- McNiece, I.K. & Briddell, R.A. (1995) Stem cell factor. *J Leukoc Biol*, **58**, 14-22.
- Merck, E., de Saint-Vis, B., Scuiller, M., Gaillard, C., Caux, C., Trinchieri, G. & Bates, E.E. (2005) Fc receptor gamma-chain activation via hOSCAR induces survival and maturation of dendritic cells and modulates Toll-like receptor responses. *Blood*, **105**, 3623-3632.
- Milella, M., Kornblau, S.M. & Andreeff, M. (2003) The mitogen-activated protein kinase signaling module as a therapeutic target in hematologic malignancies. *Rev Clin Exp Hematol*, **7**, 160-190.
- Miranda, M.B., McGuire, T.F. & Johnson, D.E. (2002) Importance of MEK-1/-2 signaling in monocytic and granulocytic differentiation of myeloid cell lines. *Leukemia*, **16**, 683-692.

- Miranda, M.B., Xu, H., Torchia, J.A. & Johnson, D.E. (2005) Cytokine-induced myeloid differentiation is dependent on activation of the MEK/ERK pathway. *Leuk Res*, **29**, 1293-1306.
- Mischak, H., Pierce, J.H., Goodnight, J., Kazanietz, M.G., Blumberg, P.M. & Mushinski, J.F. (1993) Phorbol ester-induced myeloid differentiation is mediated by protein kinase C-alpha and -delta and not by protein kinase C-beta II, -epsilon, -zeta, and -eta. *J Biol Chem*, **268**, 20110-20115.
- Miyazaki, R., Ogata, H. & Kobayashi, Y. (2001) Requirement of thrombopoietin-induced activation of ERK for megakaryocyte differentiation and of p38 for erythroid differentiation. *Ann Hematol*, **80**, 284-291.
- Moll, H., Fuchs, H., Blank, C. & Rollinghoff, M. (1993) Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. *Eur J Immunol*, **23**, 1595-1601.
- Moreau-Gachelin, F., Tavitian, A. & Tambourin, P. (1988) Spi-1 is a putative oncogene in virally induced murine erythroleukaemias. *Nature*, **331**, 277-280.
- Muller, P., Kuttenukeuler, D., Gesellchen, V., Zeidler, M.P. & Boutros, M. (2005) Identification of JAK/STAT signalling components by genome-wide RNA interference. *Nature*, **436**, 871-875.
- Murray, L.J., Young, J.C., Osborne, L.J., Luens, K.M., Scollay, R. & Hill, B.L. (1999) Thrombopoietin, flt3, and kit ligands together suppress apoptosis of human mobilized CD34+ cells and recruit primitive CD34+ Thy-1+ cells into rapid division. *Exp Hematol*, **27**, 1019-1028.
- Murry, C.E., Soonpaa, M.H., Reinecke, H., Nakajima, H., Nakajima, H.O., Rubart, M., Pasumarthi, K.B., Virag, J.I., Bartelmez, S.H., Poppa, V., Bradford, G., Dowell, J.D., Williams, D.A. & Field, L.J. (2004) Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*, **428**, 664-668.
- Myklebust, J.H., Smeland, E.B., Josefsen, D. & Sioud, M. (2000) Protein kinase C-alpha isoform is involved in erythropoietin-induced erythroid differentiation of CD34(+) progenitor cells from human bone marrow. *Blood*, **95**, 510-518.

N

- Nagata, Y. & Todokoro, K. (1999) Requirement of activation of JNK and p38 for environmental stress-induced erythroid differentiation and apoptosis and of inhibition of ERK for apoptosis. *Blood*, **94**, 853-863.
- Nagorsen, D., Marincola, F.M. & Panelli, M.C. (2004) Cytokine and chemokine expression profiles of maturing dendritic cells using multiprotein platform arrays. *Cytokine*, **25**, 31-35.
- Nagulapalli, S., Pongubala, J.M. & Atchison, M.L. (1995) Multiple proteins physically interact with PU.1. Transcriptional synergy with NF-IL6 beta (C/EBP delta, CRP3). *J Immunol*, **155**, 4330-4338.
- Nelms, K., Keegan, A.D., Zamorano, J., Ryan, J.J. & Paul, W.E. (1999) The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol*, **17**, 701-738.
- Nerlov, C., Querfurth, E., Kulesa, H. & Graf, T. (2000) GATA-1 interacts with the myeloid PU.1 transcription factor and represses PU.1-dependent transcription. *Blood*, **95**, 2543-2551.

- Nguyen, V.C., Ray, D., Gross, M.S., de Tand, M.F., Frezal, J. & Moreau-Gachelin, F. (1990) Localization of the human oncogene SPI1 on chromosome 11, region p11.22. *Hum Genet*, **84**, 542-546.
- Nijman, H.W., Kleijmeer, M.J., Ossevoort, M.A., Oorschot, V.M., Vierboom, M.P., van de Keur, M., Kenemans, P., Kast, W.M., Geuze, H.J. & Melief, C.J. (1995) Antigen capture and major histocompatibility class II compartments of freshly isolated and cultured human blood dendritic cells. *J Exp Med*, **182**, 163-174.
- Nishizuka, Y. (1984) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature*, **308**, 693-698.
- Nissen-Druey, C., Tichelli, A. & Meyer-Monard, S. (2005) Human hematopoietic colonies in health and disease. *Acta Haematol*, **113**, 5-96.
- Nygren, J.M., Jovinge, S., Breitbach, M., Sawen, P., Roll, W., Hescheler, J., Taneera, J., Fleischmann, B.K. & Jacobsen, S.E. (2004) Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med*, **10**, 494-501.

O

- O'Doherty, U., Peng, M., Gezelter, S., Swiggard, W.J., Betjes, M., Bhardwaj, N. & Steinman, R.M. (1994) Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology*, **82**, 487-493.
- Ogawa, M. (1993) Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood*, **81**, 2844-2853.
- Ogawa, M., Yonemura, Y. & Ku, H. (1997) In vitro expansion of hematopoietic stem cells. *Stem Cells*, **15 Suppl 1**, 7-11; discussion 12.
- Olweus, J., Terstappen, L.W., Thompson, P.A. & Lund-Johansen, F. (1996) Expression and function of receptors for stem cell factor and erythropoietin during lineage commitment of human hematopoietic progenitor cells. *Blood*, **88**, 1594-1607.
- Oudshoorn, M., Cornelissen, J.J., Fibbe, W.E., de Graeff-Meeder, E.R., Lie, J.L., Schreuder, G.M., Sintnicolaas, K., Willemze, R., Vossen, J.M. & van Rood, J.J. (1997) Problems and possible solutions in finding an unrelated bone marrow donor. Results of consecutive searches for 240 Dutch patients. *Bone Marrow Transplant*, **20**, 1011-1017.

P

- Patterson, S., Rae, A., Hockey, N., Gilmour, J. & Gotch, F. (2001) Plasmacytoid dendritic cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus type 1 infection and release infectious virus. *J Virol*, **75**, 6710-6713.
- Peleraux, A., Eliason, J.F. & Odartchenko, N. (1990) Binding, internalization and degradation of radio-iodinated interleukin 3 and granulocyte-macrophage colony stimulating factor by various hemopoietic cells. *Biochim Biophys Acta*, **1055**, 141-150.
- Perkel, J.M. & Atchison, M.L. (1998) A two-step mechanism for recruitment of Pip by PU.1. *J Immunol*, **160**, 241-252.
- Petrovick, M.S., Hiebert, S.W., Friedman, A.D., Hetherington, C.J., Tenen, D.G. & Zhang, D.E. (1998) Multiple functional domains of AML1: PU.1 and

- C/EBPalpha synergize with different regions of AML1. *Mol Cell Biol*, **18**, 3915-3925.
- Pierre, P., Turley, S.J., Meltzer, J., Mirza, A., Steinman, R. & Mellman, I. (1997) Localization and intracellular transport of MHC class II molecules in bone marrow-derived dendritic cells. *Adv Exp Med Biol*, **417**, 179-182.
- Platanias, L.C. (2003) Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood*, **101**, 4667-4679.
- Platzer, B., Jorgl, A., Taschner, S., Hocher, B. & Strobl, H. (2004) RelB regulates human dendritic cell subset development by promoting monocyte intermediates. *Blood*, **104**, 3655-3663.
- Pongubala, J.M. & Atchison, M.L. (1997) PU.1 can participate in an active enhancer complex without its transcriptional activation domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 127-132.
- Pongubala, J.M., Van Beveren, C., Nagulapalli, S., Klemsz, M.J., McKercher, S.R., Maki, R.A. & Atchison, M.L. (1993) Effect of PU.1 phosphorylation on interaction with NF-EM5 and transcriptional activation. *Science*, **259**, 1622-1625.
- Prickett, T.C., McKenzie, J.L. & Hart, D.N. (1988) Characterization of interstitial dendritic cells in human liver. *Transplantation*, **46**, 754-761.
- Pufall, M.A., Lee, G.M., Nelson, M.L., Kang, H.S., Velyvis, A., Kay, L.E., McIntosh, L.P. & Graves, B.J. (2005) Variable control of Ets-1 DNA binding by multiple phosphates in an unstructured region. *Science*, **309**, 142-145.
- Pugh, C.W., MacPherson, G.G. & Steer, H.W. (1983) Characterization of nonlymphoid cells derived from rat peripheral lymph. *J Exp Med*, **157**, 1758-1779.
- Pure, E., Inaba, K., Crowley, M.T., Tardelli, L., Witmer-Pack, M.D., Ruberti, G., Fathman, G. & Steinman, R.M. (1990) Antigen processing by epidermal Langerhans cells correlates with the level of biosynthesis of major histocompatibility complex class II molecules and expression of invariant chain. *J Exp Med*, **172**, 1459-1469.

Q

- Quesenberry, P.J. & Lowry, P.A. (1992) The colony-stimulating factors. An overview. *Cancer*, **70**, 909-912.

R

- Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J.S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R.J. & Davis, R.J. (1995) Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem*, **270**, 7420-7426.
- Rawlings, J.S., Rosler, K.M. & Harrison, D.A. (2004) The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci*, **117**, 1281-1283.
- Reddy, V.A., Iwama, A., Iotzova, G., Schulz, M., Elsasser, A., Vangala, R.K., Tenen, D.G., Hiddemann, W. & Behre, G. (2002) Granulocyte inducer C/EBPalpha inactivates the myeloid master regulator PU.1: possible role in lineage commitment decisions. *Blood*, **100**, 483-490.

- Reich, N.C. & Liu, L. (2006) Tracking STAT nuclear traffic. *Nat Rev Immunol*, **6**, 602-612.
- Reis e Sousa, C., Stahl, P.D. & Austyn, J.M. (1993) Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J Exp Med*, **178**, 509-519.
- Rekhtman, N., Radparvar, F., Evans, T. & Skoultchi, A.I. (1999) Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells. *Genes Dev*, **13**, 1398-1411.
- Rescigno, M., Citterio, S., Thery, C., Rittig, M., Medaglini, D., Pozzi, G., Amigorena, S. & Ricciardi-Castagnoli, P. (1998) Bacteria-induced neo-biosynthesis, stabilization, and surface expression of functional class I molecules in mouse dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 5229-5234.
- Romani, N., Koide, S., Crowley, M., Witmer-Pack, M., Livingstone, A.M., Fathman, C.G., Inaba, K. & Steinman, R.M. (1989) Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones. Intact protein is presented best by immature, epidermal Langerhans cells. *J Exp Med*, **169**, 1169-1178.
- Romani, N. & Schuler, G. (1989) Structural and functional relationships between epidermal Langerhans cells and dendritic cells. *Res Immunol*, **140**, 895-898; discussion 918-826.
- Rosenbauer, F., Wagner, K., Kutok, J.L., Iwasaki, H., Le Beau, M.M., Okuno, Y., Akashi, K., Fiering, S. & Tenen, D.G. (2004) Acute myeloid leukemia induced by graded reduction of a lineage-specific transcription factor, PU.1. *Nat Genet*, **36**, 624-630.
- Rowley, P.T., Ohlsson-Wilhelm, B.M., Wisniewski, L., Lozzio, C.B. & Lozzio, B.B. (1984) K562 human leukemia cell passages differ in embryonic globin gene expression. *Leuk Res*, **8**, 45-54.

S

- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. & Lanzavecchia, A. (1995) Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med*, **182**, 389-400.
- Sallusto, F. & 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.
- Saltis, J., Habberfield, A.D., Egan, J.J., Londos, C., Simpson, I.A. & Cushman, S.W. (1991) Role of protein kinase C in the regulation of glucose transport in the rat adipose cell. Translocation of glucose transporters without stimulation of glucose transport activity. *J Biol Chem*, **266**, 261-267.
- Schenk, P.W. & Snar-Jagalska, B.E. (1999) Signal perception and transduction: the role of protein kinases. *Biochim Biophys Acta*, **1449**, 1-24.
- Scherer, W.F., Syverton, J.T. & Gey, G.O. (1953) Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med*, **97**, 695-710.
- Schuringa, J.J., Chung, K.Y., Morrone, G. & Moore, M.A. (2004) Constitutive activation of STAT5A promotes human hematopoietic stem cell self-renewal and erythroid differentiation. *J Exp Med*, **200**, 623-635.

- Scott, E.W., Fisher, R.C., Olson, M.C., Kehrl, E.W., Simon, M.C. & Singh, H. (1997) PU.1 functions in a cell-autonomous manner to control the differentiation of multipotential lymphoid-myeloid progenitors. *Immunity*, **6**, 437-447.
- Scott, E.W., Simon, M.C., Anastasi, J. & Singh, H. (1994) Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science*, **265**, 1573-1577.
- Siegal, F.P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P.A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S. & Liu, Y.J. (1999) The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science*, **284**, 1835-1837.
- Singh, H., DeKoter, R.P. & Walsh, J.C. (1999) PU.1, a shared transcriptional regulator of lymphoid and myeloid cell fates. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **64**, 13-20.
- Spitaler, M. & Cantrell, D.A. (2004) Protein kinase C and beyond. *Nat Immunol*, **5**, 785-790.
- Spivak, J.L., Fisher, J., Isaacs, M.A. & Hankins, W.D. (1992) Protein kinases and phosphatases are involved in erythropoietin-mediated signal transduction. *Exp Hematol*, **20**, 500-504.
- Spry, C.J., Pflug, A.J., Janossy, G. & Humphrey, J.H. (1980) Large mononuclear (veiled) cells like 'Ia-like' membrane antigens in human afferent lymph. *Clin Exp Immunol*, **39**, 750-755.
- St Louis, D.C., Woodcock, J.B., Franzoso, G., Blair, P.J., Carlson, L.M., Murillo, M., Wells, M.R., Williams, A.J., Smoot, D.S., Kaushal, S., Grimes, J.L., Harlan, D.M., Chute, J.P., June, C.H., Siebenlist, U. & Lee, K.P. (1999) Evidence for distinct intracellular signaling pathways in CD34+ progenitor to dendritic cell differentiation from a human cell line model. *J Immunol*, **162**, 3237-3248.
- Stacchini, A., Fubini, L., Gatti, E., Mutti, L., Piacibello, W., Sanavio, F., Scagliotti, G., Pozzi, E. & Aglietta, M. (1995) In vivo effect of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) on neutrophil GM-CSF receptors. *Leukemia*, **9**, 665-670.
- Steinman, R.M. (1991) The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol*, **9**, 271-296.
- Steinman, R.M., Adams, J.C. & Cohn, Z.A. (1975) Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution in mouse spleen. *J Exp Med*, **141**, 804-820.
- Steinman, R.M. & Cohn, Z.A. (1973) Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*, **137**, 1142-1162.
- Steinman, R.M. & Cohn, Z.A. (1974) Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J Exp Med*, **139**, 380-397.
- Stirewalt, D.L. (2004) Fine-tuning PU.1. *Nat Genet*, **36**, 550-551.
- Stopka, T., Amanatullah, D.F., Papetti, M. & Skoultschi, A.I. (2005) PU.1 inhibits the erythroid program by binding to GATA-1 on DNA and creating a repressive chromatin structure. *Embo J*, **24**, 3712-3723.
- Stossel, H., Koch, F., Kampgen, E., Stoger, P., Lenz, A., Heufler, C., Romani, N. & Schuler, G. (1990) Disappearance of certain acidic organelles (endosomes and Langerhans cell granules) accompanies loss of antigen processing capacity upon culture of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med*, **172**, 1471-1482.

- Strengell, M., Lehtonen, A., Matikainen, S. & Julkunen, I. (2006) IL-21 enhances SOCS gene expression and inhibits LPS-induced cytokine production in human monocyte-derived dendritic cells. *J Leukoc Biol*, **79**, 1279-1285.
- Strniskova, M., Barancik, M. & Ravingerova, T. (2002) Mitogen-activated protein kinases and their role in regulation of cellular processes. *Gen Physiol Biophys*, **21**, 231-255.
- Strobl, H., Scheinecker, C., Riedl, E., Csmarits, B., Bello-Fernandez, C., Pickl, W.F., Majdic, O. & Knapp, W. (1998) Identification of CD68⁺lin⁻ peripheral blood cells with dendritic precursor characteristics. *J Immunol*, **161**, 740-748.

T

- Takeda, K., Kishimoto, T. & Akira, S. (1997) STAT6: its role in interleukin 4-mediated biological functions. *J Mol Med*, **75**, 317-326.
- Tan, S.L. & Parker, P.J. (2003) Emerging and diverse roles of protein kinase C in immune cell signalling. *Biochem J*, **376**, 545-552.
- Tan, S.M., Hyland, R.H., Al-Shamkhani, A., Douglass, W.A., Shaw, J.M. & Law, S.K. (2000) Effect of integrin beta 2 subunit truncations on LFA-1 (CD11a/CD18) and Mac-1 (CD11b/CD18) assembly, surface expression, and function. *J Immunol*, **165**, 2574-2581.
- Tenen, D.G. (2003) Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nat Rev Cancer*, **3**, 89-101.
- Tenen, D.G., Hromas, R., Licht, J.D. & Zhang, D.E. (1997) Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood*, **90**, 489-519.
- Theml, H. (2002) *Taschenatlas der Hämatologie morphologische und klinische Diagnostik für die Praxis*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Thurnher, M., Ramoner, R., Gastl, G., Radmayr, C., Bock, G., Herold, M., Klocker, H. & Bartsch, G. (1997) Bacillus Calmette-Guerin mycobacteria stimulate human blood dendritic cells. *Int J Cancer*, **70**, 128-134.
- Tibbles, L.A. & Woodgett, J.R. (1999) The stress-activated protein kinase pathways. *Cell Mol Life Sci*, **55**, 1230-1254.
- Tiefenbrun, N. & Kimchi, A. (1991) The involvement of protein kinase C in mediating growth suppressive signals of interferons in hematopoietic cells. *Oncogene*, **6**, 1001-1007.
- Tong, F.K., Chow, S. & Hedley, D. (2006) Pharmacodynamic monitoring of BAY 43-9006 (Sorafenib) in phase I clinical trials involving solid tumor and AML/MDS patients, using flow cytometry to monitor activation of the ERK pathway in peripheral blood cells. *Cytometry B Clin Cytom*, **70**, 107-114.
- Tootle, T.L. & Rebay, I. (2005) Post-translational modifications influence transcription factor activity: a view from the ETS superfamily. *Bioessays*, **27**, 285-298.
- Turk, B., Turk, V. & Turk, D. (1997) Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. *Biol Chem*, **378**, 141-150.
- Turley, S.J., Inaba, K., Garrett, W.S., Ebersold, M., Unternaehrer, J., Steinman, R.M. & Mellman, I. (2000) Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science*, **288**, 522-527.
- Turville, S.G., Arthos, J., Donald, K.M., Lynch, G., Naif, H., Clark, G., Hart, D. & Cunningham, A.L. (2001) HIV gp120 receptors on human dendritic cells. *Blood*, **98**, 2482-2488.

U

- Uddin, S., Ah-Kang, J., Ulaszek, J., Mahmud, D. & Wickrema, A. (2004) Differentiation stage-specific activation of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms in primary human erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 147-152.

V

- van Dam, H., Wilhelm, D., Herr, I., Steffen, A., Herrlich, P. & Angel, P. (1995) ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents. *Embo J*, **14**, 1798-1811.
- Van Voorhis, W.C., Hair, L.S., Steinman, R.M. & Kaplan, G. (1982) Human dendritic cells. Enrichment and characterization from peripheral blood. *J Exp Med*, **155**, 1172-1187.
- Vangala, R.K., Heiss-Neumann, M.S., Rangatia, J.S., Singh, S.M., Schoch, C., Tenen, D.G., Hiddemann, W. & Behre, G. (2003) The myeloid master regulator transcription factor PU.1 is inactivated by AML1-ETO in t(8;21) myeloid leukemia. *Blood*, **101**, 270-277.
- Verhasselt, V., Buelens, C., Willems, F., De Groote, D., Haeffner-Cavaillon, N. & Goldman, M. (1997) Bacterial lipopolysaccharide stimulates the production of cytokines and the expression of costimulatory molecules by human peripheral blood dendritic cells: evidence for a soluble CD14-dependent pathway. *J Immunol*, **158**, 2919-2925.
- Vicari, A.P., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Chiodoni, C., Vaure, C., Ait-Yahia, S., Dercamp, C., Matsos, F., Reynard, O., Taverne, C., Merle, P., Colombo, M.P., O'Garra, A., Trinchieri, G. & Caux, C. (2004) In vivo manipulation of dendritic cell migration and activation to elicit antitumour immunity. *Novartis Found Symp*, **256**, 241-254; discussion 254-269.
- Villadangos, J.A., Cardoso, M., Steptoe, R.J., van Berkel, D., Pooley, J., Carbone, F.R. & Shortman, K. (2001) MHC class II expression is regulated in dendritic cells independently of invariant chain degradation. *Immunity*, **14**, 739-749.
- Villadangos, J.A., Schnorrer, P. & Wilson, N.S. (2005) Control of MHC class II antigen presentation in dendritic cells: a balance between creative and destructive forces. *Immunol Rev*, **207**, 191-205.
- Vissers, J.L., Hartgers, F.C., Lindhout, E., Teunissen, M.B., Figdor, C.G. & Adema, G.J. (2001) Quantitative analysis of chemokine expression by dendritic cell subsets in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol*, **69**, 785-793.
- Voso, M.T., Burn, T.C., Wulf, G., Lim, B., Leone, G. & Tenen, D.G. (1994) Inhibition of hematopoiesis by competitive binding of transcription factor PU.1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 7932-7936.

W

- Wagers, A.J., Allsopp, R.C. & Weissman, I.L. (2002) Changes in integrin expression are associated with altered homing properties of Lin(-/lo)Thy1.1(lo)Sca-1(+)-kit(+) hematopoietic stem cells following mobilization by

- cyclophosphamide/granulocyte colony-stimulating factor. *Exp Hematol*, **30**, 176-185.
- Walker, F. & Burgess, A.W. (1987) Internalisation and recycling of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) receptor on a murine myelomonocytic leukemia. *J Cell Physiol*, **130**, 255-261.
- Wang, J.M., Lai, M.Z. & Yang-Yen, H.F. (2003) Interleukin-3 stimulation of mcl-1 gene transcription involves activation of the PU.1 transcription factor through a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *Mol Cell Biol*, **23**, 1896-1909.
- Wang, X.Z. & Ron, D. (1996) Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science*, **272**, 1347-1349.
- Wang, Y., Malabarba, M.G., Nagy, Z.S. & Kirken, R.A. (2004) Interleukin 4 regulates phosphorylation of serine 756 in the transactivation domain of Stat6. Roles for multiple phosphorylation sites and Stat6 function. *J Biol Chem*, **279**, 25196-25203.
- Wasylyk, B., Hahn, S.L. & Giovane, A. (1993) The Ets family of transcription factors. *Eur J Biochem*, **211**, 7-18.
- Watkins, P.C., Eddy, R., Hoffman, N., Stanislovitis, P., Beck, A.K., Galli, J., Vellucci, V., Gusella, J.F. & Shows, T.B. (1986) Regional assignment of the erythropoietin gene to human chromosome region 7pter---q22. *Cytogenet Cell Genet*, **42**, 214-218.
- Watowich, S.S. (1999) Activation of erythropoietin signaling by receptor dimerization. *Int J Biochem Cell Biol*, **31**, 1075-1088.
- Welte, K., Platzer, E., Lu, L., Gabrilove, J.L., Levi, E., Mertelsmann, R. & Moore, M.A. (1985) Purification and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 1526-1530.
- Whetton, A.D., Heyworth, C.M., Nicholls, S.E., Evans, C.A., Lord, J.M., Dexter, T.M. & Owen-Lynch, P.J. (1994) Cytokine-mediated protein kinase C activation is a signal for lineage determination in bipotential granulocyte macrophage colony-forming cells. *J Cell Biol*, **125**, 651-659.
- Whitmarsh, A.J., Shore, P., Sharrocks, A.D. & Davis, R.J. (1995) Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element. *Science*, **269**, 403-407.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B. & Johnson, G.L. (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev*, **79**, 143-180.
- Wilson, N.S. & Villadangos, J.A. (2005) Regulation of antigen presentation and cross-presentation in the dendritic cell network: facts, hypothesis, and immunological implications. *Adv Immunol*, **86**, 241-305.
- Winzler, C., Rovere, P., Rescigno, M., Granucci, F., Penna, G., Adorini, L., Zimmermann, V.S., Davoust, J. & Ricciardi-Castagnoli, P. (1997a) Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J Exp Med*, **185**, 317-328.
- Winzler, C., Rovere, P., Zimmermann, V.S., Davoust, J., Rescigno, M., Citterio, S. & Ricciardi-Castagnoli, P. (1997b) Checkpoints and functional stages in DC maturation. *Adv Exp Med Biol*, **417**, 59-64.
- Woessmann, W. & Mivechi, N.F. (2001) Role of ERK activation in growth and erythroid differentiation of K562 cells. *Exp Cell Res*, **264**, 193-200.

Woessmann, W., Zwanzger, D. & Borkhardt, A. (2004) ERK signaling pathway is differentially involved in erythroid differentiation of K562 cells depending on time and the inducing agent. *Cell Biol Int*, **28**, 403-410.

X

Xue, Y., Alford, P. & Shackelford, R.E. (1999) Protein kinase C activation increases binding of transcription factor PU.1 in murine tissue macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, **254**, 211-214.

Y

Yonemura, Y., Ku, H., Lyman, S.D. & Ogawa, M. (1997) In vitro expansion of hematopoietic progenitors and maintenance of stem cells: comparison between FLT3/FLK-2 ligand and KIT ligand. *Blood*, **89**, 1915-1921.

York, I.A. & Rock, K.L. (1996) Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol*, **14**, 369-396.

Yung, Y., Yao, Z., Hanoch, T. & Seger, R. (2000) ERK1b, a 46-kDa ERK isoform that is differentially regulated by MEK. *J Biol Chem*, **275**, 15799-15808.

Z

Zanaboni, P.B., Bradley, J.D., Webster, R.O. & Dahms, T.E. (1992) Cyclooxygenase inhibition prevents PMA-induced increase in pulmonary vascular permeability to albumin. *J Appl Physiol*, **73**, 2011-2015.

Zandstra, P.W., Conneally, E., Piret, J.M. & Eaves, C.J. (1998) Ontogeny-associated changes in the cytokine responses of primitive human haemopoietic cells. *Br J Haematol*, **101**, 770-778.

Zhang, P., Behre, G., Pan, J., Iwama, A., Wara-Aswapati, N., Radomska, H.S., Auron, P.E., Tenen, D.G. & Sun, Z. (1999) Negative cross-talk between hematopoietic regulators: GATA proteins repress PU.1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 8705-8710.

Zhang, P., Zhang, X., Iwama, A., Yu, C., Smith, K.A., Mueller, B.U., Narravula, S., Torbett, B.E., Orkin, S.H. & Tenen, D.G. (2000) PU.1 inhibits GATA-1 function and erythroid differentiation by blocking GATA-1 DNA binding. *Blood*, **96**, 2641-2648.

Zheng, J.H., Pyatt, D.W., Gross, S.A., Le, A.T., Kerzic, P.J. & Irons, R.D. (2004) Hydroquinone modulates the GM-CSF signaling pathway in TF-1 cells. *Leukemia*, **18**, 1296-1304.

Zheng, Z., Takahashi, M., Narita, M., Toba, K., Liu, A., Furukawa, T., Koike, T. & Aizawa, Y. (2000) Generation of dendritic cells from adherent cells of cord blood by culture with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-4, and tumor necrosis factor-alpha. *J Hematother Stem Cell Res*, **9**, 453-464.

Zink, C. (1997) [2 dictionaries--on disks: the CD-ROM publication of Roche Lexikon Medizin and of the clinical thesaurus]. *Wien Med Wochenschr*, **147**, 110-114.

Zou, G.M. & Hu, W.Y. (2005) LIGHT regulates CD86 expression on dendritic cells through NF-kappaB, but not JNK/AP-1 signal transduction pathway. *J Cell Physiol*, **205**, 437-443.

7. Abkürzungsverzeichnis

° C	Grad Celsius
μ	mikro
A	Ampere
aa	Aminosäure(n)
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AML	„acute myelogenous leukemia“
Amp	Ampicillin
APC	1. „antigen-presenting cells“ Antigenpräsentierende Zellen 2. „amorphous polycarbonate“
aPKC	„apical PKC“
ATP	Adenosintriphosphat
BFU-E	„blast forming unit – erythroid“
BSA	bovines Serumalbumin
CD	„cluster of differentiation“ CD-Oberflächenmerkmalen
CD34 ⁺ Zellen	hämatopoetische Stamm- / Progenitorzellen
CFU	„colony forming units“
CFU-GM	„colony forming unit – granulocyte macrophage“
CFU-Meg	„colony forming unit – megacariocyte“
CIP	Calf Intestinal Phosphatase
CMV	Cytomegalievirus
cPKC	„conventional PKC“

CSF	„colony-stimulating factor“ koloniestimulierender Faktor
DAG	Diacylglycerol
DC	„dendritic cell“ Dendritische Zelle
DMEM	„Dulbecco´s modified Eagle´s Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	„double stranded“ doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	„enhanced chemiluminescence“
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	„enhanced green fluorescent protein“
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“
EPO	Erythropoetin
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERK	„extracellular signal-regulated protein kinase“
FACS	„fluorescence activated cell sorting“
FCS, FKS	„fetal-calf serum“ fötales Kälberserum
FLT-3 ligand	FMS-like tyrosine kinase 3 ligand
GAS-Sequenz	gamma-Interferon-Aktivierungssequenz
G-CSF	„granulocyte colony-stimulating factor“ „colony-stimulating factor 3“
GM-CSF	„granulocyte macrophage colony-stimulating factor“ Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GTP	Guanosintriphosphat

h	Stunden
HA	„influenza hemagglutinin“
HSC	„hematopoietic stem cells“ hämatopoetische Stammzelle
IL(-4, -3, -6)	Interleukin-4, Interleukin-3, Interleukin-6
IP	Immunpräzipitation
IP3	Inosit-1,4,5-triphosphat
JNK	„c-Jun NH2-terminal kinase“
JNK	Januskinase
KA	Kinase-Assay
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KM	Knochenmark
l	Liter
LB	Luria Bertani
Luc	Luciferase
m	milli
M	molar
MAPK	„mitogen-activated protein kinase“
M-CSF	„monocyte colony-stimulating factor“
mDC	myeloide Dendritische Zellen
MHC	„major histocompatibility complex“
Min.	Minute(n)
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	„messenger RNA“
NK-	„natural killer“
NLS	„nuclear localisation signal“

nPKC	„novel PKC“
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	„peripheral blood mononuclear cells“ mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	„phosphate buffered saline“ phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	„polymerase chain reaction“ Polymerasekettenreaktion
pDC	plasmazytoide Dendritische Zellen
PE	Phycoerythrin
PEI	Paul-Ehrlich-Institut
pH	„pondus Hydrogenii“ oder „potentia Hydrogenii“
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
poly (A)	Polyadenylierung
rh	„recombinant human“ rekombinant human
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	„rounds per minute“ Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
SAPK	„stress-activated phospho-kinases“
SCF	„stem cell factor“ Stammzellfaktor
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec.	Sekunde
SFFV	„spleen focus-forming virus“
siRNA	„small interfering RNA“

ss	„single stranded“ einzelsträngig
STAT	„signal transducer and activator of transcription“
TK	„herpes simplex virus thymidine kinase“
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat
TPO	Thrombopoetin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
v/v	„volume per volume“
w/v	„weight per volume“
WB	Western Blot

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN:

Name: Matthias Hamdorf
Anschrift: Nordendstr. 6
64546 Mörfelden-Walldorf
Telefon: +49 (6105) 275742
Geburtsdatum: 09.12.1975
Geburtsort: Villingen
Familienstand: ledig

SCHULAUSSBILDUNG:

09/1987 – 07/1991 Hauptschule Brigachtal
Abschluß: Hauptschulabschluß
09/1991 – 06/1993 Wirtschaftsschule VS
Abschluß: Realschulabschluß
09/1993 – 05/1996 Wirtschaftsgymnasium VS
Abschluß: Abitur

ZIVILDIENTST:

09/1996 – 08/1997 DRK Donaueschingen
Ausbildung zum Rettungshelfer und BHT Fahrer

HOCHSCHULAUSSBILDUNG:

09/1997 – 09/1999 Grundstudium Biochemie
Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt
Abschluß: Vordiplom

10/1999 – 06/2002

Hauptstudium Biochemie
Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt
Abschluß: Diplom

Diplomarbeit in der Abteilung
Medizinische Biotechnologie
am Paul-Ehrlich-Institut in Langen,
unter der Leitung von Prof. Dr. K. Cichutek

Titel der Arbeit:
Entwicklung eines Expressionssystems zur Inhibition von
Zielgenen

seit 9/2002

Promotion in der Abteilung
Medizinische Biotechnologie
am Paul-Ehrlich-Institut in Langen,
unter der Leitung von Prof. Dr. K. Cichutek

Titel der Arbeit:
Identifizierung intrazellulärer Signalwege bei der
Differenzierung humaner hämatopoetischer Stammzellen
zu myeloiden Dendritischen Zellen

Publikationen:

“IL-2 induction by simian immunodeficiency virus involves MAP kinase signaling but is independent of calcineurin/NF-AT activity”

Muckenfuss H, **Hamdorf M**, Avots A, Sanzenbacher R, Tschulena U, Cichutek K, Flory E
Mol Immunol. 2006 Mar;43(8):1172-82. Epub 2005 Aug 24.

“An inducible T7 RNA Polymerase-dependent plasmid system for the Expression of short hairpin RNAs”

Hamdorf M*, Muckenfuss H*, Tschulena U, Pleschka S, Sanzenbacher R, Cickutek K, Flory E
Molecular Biotechnology; May 2006, Volume 33, Issue 1, pps. 13-22 * contributed equally

“APOBEC3 proteins inhibits human LINE-1 retrotransposition”

Hamdorf M*, Muckenfuss H*, Held U, Perković M, Löwer J, Cichutek K, Flory E, Schumann GG, Münk C
J Biol Chem. 2006 Aug 4;281(31):22161-72. Epub 2006 May 30 * contributed equally

Poster

Präsentationen:

“A novel siRNA expression system for human cells mediates specific inhibition of target genes”;

Tschulena U, **Hamdorf M**, Sanzenbacher R, Buchholz CJ, Muckenfuss H, Wenig R, Koenig R, Cichutek K, Flory E
(2002) European Society of Gene Therapy Meeting in Antibes, Frankreich

“A novel siRNA expression system for human cells mediates specific inhibition of target genes”;

Hamdorf M*, Tschulena U*, Sanzenbacher R, Buchholz CJ, Muckenfuss H, Wenig R, Koenig R, Flory E, Cichutek K,
(2003) Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie in Berlin. * contributed equally

“Intracellular MAPK signalling pathways are involved in SIVagm3-induced upregulation of IL-2 gene expression”;

Muckenfuss H, Holznagel E, Sanzenbacher R, Tschulena U, **Hamdorf M**, Avots A, Cichutek K and Flory E
(2003) International Cytokine Society Conference

“Signalwege und Expressionsprofile als intrazelluläre Biosensoren bei der Differenzierung von humanen Stammzellen“

Hamdorf M, Schilling-Leiß D, Sanzenbacher R, Muckenfuss H, Cichutek K, Tönjes R, Flory E
(2005) BMBF-Symposium Dortmund

“Analysis of virus-host cell interactions involved in lentiviral-induced acute lethal enteropathy”

Sanzenbacher R, Tschulena U, Plesker R, Fackler O, Muench J, Kirchhoff F, **Hamdorf M**, Muckenfuss H, Cichutek K, Flory E
(2005) Annual Meeting of the German Society of Immunology (DGfI)

“Activation of mitogen-activated Protein kinases upon binding of HIV-1 to primary human CD4+ T cells”

Sanzenbacher R, Distler E, Muckenfuss H, **Hamdorf M**, Cichutek K, Flory E
(2006) Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie in München

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über „Identifizierung intrazellulärer Signalwege bei der Differenzierung humaner hämatopoetischer Stammzellen zu myeloiden Dendritischen Zellen“ selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, daß aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Mörfelden- Walldorf , den 26. 03. 2007

.....
Matthias Hamdorf

DANKSAGUNG

Prof. Dr. Klaus Cichutek danke ich für die Möglichkeit, am Paul-Ehrlich-Institut unter besten Arbeitsbedingungen meine Promotion anfertigen zu können.

Prof. Dr. Bernd Ludwig danke ich für die fachübergreifende und freundliche Betreuung der Promotion von Seiten der Universität.

Dr. Egbert Flory gilt mein besonderer Dank für seine Unterstützung, Beratung und Betreuung der vorliegenden Arbeit. Er hatte immer ein offenes Ohr für Probleme und hat mich mit seiner Freude an positiven Ergebnissen und seiner Bereitschaft für konstruktive Diskussionen oftmals inspiriert.

Dr. Zoe Waibler möchte ich danken für Ihre Betreuung als Mentor. Sie hat sich immer die Zeit genommen mit mir über Probleme, Versuche oder Plenumsvorträge zu sprechen und mich mit hilfreichen Tipps unterstützt.

Aus meiner Abteilung 6/3 möchte ich Dr. Ralf Sanzenbacher (Käpt'n), Erika Krebil, Christina Schwer und Silvia Panitz für die gute wissenschaftliche Zusammenarbeit und für das tolle Laborklima danken. Mein besonderer Dank gilt Dr. Heide Muckenfuß für die vielen konstruktiven Gespräche wissenschaftlicher und nicht wissenschaftlicher Art, sowie ihrer Hingabe bei der Korrektur dieser Arbeit und Renate Wenig, die mir im Labor immer den Rücken gestärkt hat und durch Höhen und Tiefen des Laboralltags mitgegangen ist.

Allen jetzigen und ehemaligen Mitforschern der Abteilung 6 danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre und für die kompetente Beratung bei Problemen jeglicher Art, sowie die interessanten Diskussionen.

Lydia Dürner danke ich für ihre Begeisterung alle Laborneuerungen auszuprobieren und für die tolle Hörbuchconnection, die mir manche trübe Stunde beim Schreiben dieser Arbeit versüßt hat.

Dr. Jana Mehlhase gilt mein besonderer Dank, da ich mit ihr stundenlange wissenschaftliche Diskussionen führen konnte, sie immer Interesse an meiner Arbeit gezeigt hat und mit mir so manche Frustbewältigung der einen oder anderen Art durchlebt hat.

Dr. Sven Löbrich danke ich für die vielen schönen Studienjahre, sowie die Freundschaft, die daraus entstanden ist und für jedes Kapitel aus seinem Buch über unser Studium. Auch dies hat mich beim Schreiben dieser Arbeit immer wieder inspiriert

Sabine Kranzdorf danke ich für das schnelle Korrekturlesen dieser Arbeit.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie, der Familie Preisendörfer und insbesondere Stefanie Preisendörfer bedanken, die mich immer wieder bestärkten, viel Geduld hatten und mich auf dem ganzen Weg begleitet haben.

