

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Rolle des Transkriptionsfaktors Klf4
in murinen Monozyten

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anja K. Bentler

aus Freiburg i. Br.

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. O. Liesenfeld
 2. Prof. Dr. med. L. Uharek
 3. Prof. Dr. med. D. Reinhold

Datum der Promotion: 30.11.2012

Inhaltsverzeichnis

Seite

A.	Einleitung	1
A.1.	Überblick	1
A.2.	Transkriptionsfaktoren	1
A.2.1.	Die Familie der KLF (<i>Krüppel-like factors</i>)	1
A.2.1.1.	Die Zinkfingerstruktur	3
A.2.1.2.	Klf4	4
A.2.1.2.1.	Die Domänen von <i>Klf4</i>	6
A.3.	Die Entwicklung von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen	7
A.3.1.	Monozyten	9
A.3.1.1.	Menschliche Monozyten	9
A.3.1.2.	Murine Monozyten	9
A.3.2.	Regulierung der Entwicklung von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen	11
A.3.2.1.	Zytokine in der Entwicklung von Monozyten und Makrophagen	11
A.3.2.2.	Transkriptionsfaktoren in der Entwicklung von Monozyten und Makrophagen	12
A.3.2.3.	Das Zusammenspiel von Transkriptionsfaktoren und Zytokinen	14
A.4.	Möglichkeiten der Proteinausschaltung in der Maus	15
A.4.1.	Konditionelle Deletion eines Proteins durch Vav-Cre-Rekombinase	15
A.4.2.	Deletion durch homologe Rekombination	16
A.4.3.	Generierung von adulten Chimären per Knochenmarktransplantation	17
A.5.	Retroviraler Gentransfer	18
A.6.	Das Prinzip der induzierbaren Aktivierung eines nukleären Proteins durch Translokation in den Zellkern	19
A.7.	Retronektin	19
B.	Herleitung der Aufgabenstellung	21
C.	Material	23
C.1.	Chemikalien und Reagenzien	23
C.2.	Puffer	23
C.3.	Antikörper	23
C.4.	Rekombinante Zytokine und Proteine	24
C.5.	Enzyme	24
C.6.	Kits	24
C.7.	Zellkulturmedium	24
C.8.	Oligonukleotide	24

C.9.	Equipment	25
C.10.	Mäuse	25
D.	Methoden	26
D.1.	Isolierung und Kultivierung primärer muriner Zellen	26
D.2.	Depletion von Knochenmarkszellen durch 5-Fluorouracil-Behandlung der Mäuse	26
D.3.	Retrovirale Konstrukte	27
D.3.1.	Vektor	27
D.3.2.	Herstellung von Virusvektorüberständen durch Transfektion per Lipofektion	27
D.3.3.	Infektion der Zellen mit den Vektoren	27
D.3.4.	Durch 4-OHT induzierbare Aktivierung des nukleären Proteins durch Translokation in den Zellkern	28
D.4.	<i>Fluorescence assisted cell sorting</i> (FACS)	29
D.4.1.	FACS-Analyse der Zellen deletierter Mäuse	29
D.4.2.	Zellsortierung mit Selektion per FACS	29
D.5.	Analyse hämatopoetischer Parameter	30
D.6.	Isolierung der Gesamt-RNA	30
D.7.	Photometrische Determinierung des RNA-Gehalts	31
D.8.	Genexpressionsanalyse	32
D.9.	Reverse Transkriptase der RNA zur Generierung von cDNA	32
D.10.	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i> - PCR)	33
D.10.1.	Quantitative und semiquantitative PCR (Gradient-PCR)	33
D.10.2.	<i>Real time</i> quantitative PCR	34
D.11.	Herstellung und Beladung eines Agarosegels	35
D.12.	Mikroskopie	35
D.12.1.	Vorbereitung des Objektträgers	35
D.12.2.	<i>Pappenheim</i> -Färbung	35
D.12.3.	Fluoreszenzmikroskop	36
E.	Ergebnisse	37
E.1.	Deletion von <i>Klf4</i> hat Auswirkungen auf Ly6C ^{high} -Monozyten	37
E.1.1.	Verminderte Anzahl von Ly6C ^{high} -Monozyten im peripheren Blut von Klf4 ^{fl/fl} -VAV-Cre-Mäusen	38
E.1.2.	Ly6C ^{high} -Monozyten aus dem Knochenmark von Klf4 ^{fl/fl} - und Klf4 ^{WT} -VAV-Cre-Mäusen	40
E.1.2.1.	Reduzierte Anzahl Ly6C ^{high} -Monozyten im Knochenmark von Klf4 ^{fl/fl} VAV-Cre-Mäusen	41

E.1.2.2.	Morphologie der Ly6C ^{high} -Monozyten des Knochenmarks von Klf4 ^{fl/fl} VAV-Cre-Mäusen und Wildtypen	41
E.1.2.3.	Genexpressionsanalysen aus der Monozyten-RNA im Vergleich	42
E.1.3.	Verminderte Anzahl von Ly6C ^{high} -Monozyten in Knochenmark und Milz von Chimären mit konventioneller Deletion im hämatopoetischen System	55
E.2.	Überexpression von Klf4 beeinflussen dessen mutmaßliche Zielgene	57
E.2.1.	Auswahl der per <i>real time</i> PCR zu messenden Zielgene von Klf4	58
E.2.1.1.	Expression der Transkripte in Klf4-überexprimierenden im Vergleich zu nativen Zellen	60
E.2.1.2.	Funktion der einzelnen Domänen des <i>Klf4</i> -Gens	61
F.	Diskussion	63
F.1.	Deletion von <i>Klf4</i> vermindert die Anzahl von Ly6C ^{high} -Monozyten	63
F.1.1.	Verminderte Anzahl in Blut und Knochenmark von Klf4 ^{fl/fl} -VAV-Cre-Mäusen	63
F.1.1.1.	Morphologie der Ly6C ^{high} -Monozyten des Knochenmarks von Klf4 ^{fl/fl} -VAV-Cre-Mäusen und Wildtypen	65
F.1.2.	Genexpressionsanalysen aus der Monozyten-RNA im Vergleich	65
F.1.3.	Verminderte Anzahl von Ly6C ^{high} -Monozyten in Knochenmark und Milz von Chimären mit konventioneller Deletion im hämatopoetischen System	70
F.2.	Überexpression von Klf4 beeinflussen dessen mutmaßliche Zielgene	71
F.2.1.	Auswahl der per <i>real time</i> PCR zu messenden Zielgene von Klf4	71
F.2.1.1.	Expression der Transkripte in Klf4-überexprimierenden im Vergleich zu nativen Zellen	72
F.2.1.2.	Funktion der einzelnen Domänen des <i>Klf4</i> -Gens	74
G.	Zusammenfassung	78
	Literaturnachweise	80
	Anhang	99

A. Einleitung

A.1. Überblick

Diese Arbeit ist auf die Rolle des Transkriptionsfaktors Klf4 in der Entwicklung von Monozyten fokussiert. Bevor auf die Arbeit an sich näher eingegangen wird, soll in der Einleitung zunächst ein kurzer Überblick über wichtige Bestandteile dieser Arbeit gegeben werden, wie Transkriptionsfaktoren und deren Bedeutung für die Entwicklung von Zellen, den Transkriptionsfaktor Klf4 und dessen Familie, die funktionellen Domänen von Klf4 und die Entwicklung von Monozyten und deren verwandte Zellen.

Des Weiteren werden einige Methoden erläutert, die für diese Arbeit von zentraler Bedeutung sind.

A.2. Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die spezifisch an die DNA binden und die Transkription genetischer Informationen von der DNA auf die mRNA kontrollieren bzw. beeinflussen (Latchman 1997). Dabei agieren sie allein oder in Komplexen mit anderen Transkriptionsfaktoren, indem sie die RNA-Polymerase (Katalysatoren der Synthese von erblicher Information enthaltender RNA) entweder aktivieren oder aber blockieren (Roeder 1996). Transkriptionsfaktoren enthalten, im Gegensatz zu anderen Proteinen der Genregulierung, DNA-bindende Domänen, durch die sie an einen spezifischen Ort der DNA neben das/die zu regulierende/n Gen/e binden können (Brivanlou et al. 2002). Transkriptionsfaktoren sind unentbehrlich für die Regulierung von Genen und in jedem Organismus, in steigender Zahl in Korrelation mit der Genomgröße, vorhanden (van Nimwegen 2003).

A.2.1. Die Familie der KLF (*Krüppel-like factors*)

Heute sind 17 Mitglieder der KLF-Familie bekannt, nummeriert von eins bis 17 chronologisch nach ihrer Entdeckung (aktuelle Nomenklatur). Allesamt sind sie Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren und unterscheiden sich von anderen zinkfingerenthaltenden Proteinen durch eine hochkonservierte DNA-bindende Domäne, die drei C2H2-Zinkfinger am C-Terminus enthält (Motherwell et al. 2000). Dadurch können sie an menschliche und murine β -Globin CACCC-Elemente und GC-reiche Domänen, die an der Kontrolle über Genexpression beteiligt sind, binden. Eine weitere Gemeinsamkeit ist die hochkonservierte, sieben Reste umfassende TGEKP(Y/F)X-Sequenz zwischen den Zinkfingern (Bieker 1996). Diese Domäne unterscheidet

sich bei den Mitgliedern der KLF-Familie erheblich. So können einige als Transkriptionsaktivatoren, andere als Transkriptionsrepressoren fungieren (Cao et al. 2010, Domänen s. Abb. A.1.).

Ursprünglich wurde der *Krüppel-Faktor* in der *Drosophila melanogaster* von deutschen Forschern als eine homozygote Mutation charakterisiert, die zur Abwesenheit von Thorax und Abdomen im Embryo führte (Nusslein-Volhard et al. 1980). Daher rührt der bezeichnende Name *Krüppel*. 1986 wurde eine Familie nukleärer Proteine detektiert, die für den *Krüppel-Faktor* der *Drosophila* kodiert und auffällige Ähnlichkeit zum DNA-bindenden Fingermotiv des Transkriptionsfaktors IIIA aufweist (Schuh et al. 1986). 1993 wurde der erste *Krüppel-Faktor* im Säugetier entdeckt, dessen kodierendes Gen zunächst als EKLF (aktuell als KLF1) bezeichnet wurde (wegen seiner spezifischen Expression in erythroiden Zellen; Miller et al. 1993). Später wurde die wichtige Funktion von EKLF untermauert, indem Studien bei Mäusen mit EKLF-Deletion eine fatale β -Thalassämie während der Fetogenese aufzeigten (Perkins et al. 1995).

Besonders in der Entwicklung und Regulierung von Leukozyten wird der KLF-Familie eine wichtige Rolle zugeschrieben. Beispielsweise sind an der Differenzierung und Aktivierung von Monozyten und Makrophagen KLF1, KLF2, KLF3 und KLF4 entscheidend beteiligt. Auch für T-Lymphozyten sind KLF2, KLF4, KLF5, KLF6, KLF10, KLF13 in diverser Hinsicht wichtig (Cao et al. 2010). Darüber hinaus wird für einige Mitglieder eine wesentliche Rolle in Zellproliferation, -differenzierung und -aktivierung (Ghaleb et al. 2005) sowie Apoptose unter physiologischen Bedingungen, wie auch bei verschiedenen Erkrankungen vermutet (Feinberg et al. 2004).

KLF sind hochgradig homolog zur Sp1-Familie (*specificity protein family*), welche auch als übergeordnete Familie der KLF-Familie betrachtet wird. Beide haben die DNA-bindende Domäne gemein, die drei *Krüppel-like* Zinkfinger beinhaltet, und binden ebenfalls an CACCC- und GC-reiche Domänen. So können sie etwa diese Domänen an Stelle von EKLF aktivieren und somit die Expression bestimmter Gene auch bei Abwesenheit von EKLF sicherstellen (Donze et al. 1995).

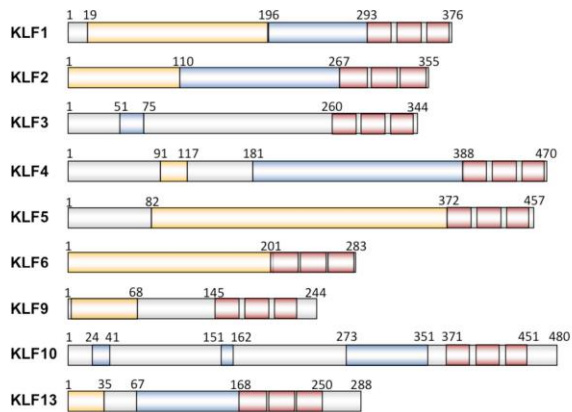


Abb. A.1.: Schematische Darstellung der Domänen einiger KLF-Mitglieder: Zinkfinger (rote Kästen), Transaktivierungsdomäne (gelbe Kästen), Transrepressionsdomäne (blaue Kästen). Cao et al. 2010.

A.2.1.1. Die Zinkfingerstruktur

Zinkfingerstrukturen sind Motive in DNA- und RNA-bindenden Proteinen von *Krüppel-like* Faktoren. Ihre Aminosäuren sind zu einer einzigen Struktur um ein Zinkatom gefaltet. In ursprünglicher Form ist im Zinkfinger ein Zinkatom an zwei Cysteine und zwei Histidine in einem Chelatkomplex gebunden. Zwischen den Cysteinen und den Histidinen befinden sich zwölf Reste, die eine DNA-bindende Fingerkuppe formen. Durch Abwandlungen der Sequenz in der Fingerkuppe, der Anzahl und des Intervalls der *tandem repeats* eines Motivs sowie durch Proteininteraktionen können Zinkfinger jedoch viele verschiedene sequenzspezifische Bindestellen bilden (Song et al. 2002). In Sp1-verwandten Proteinen ist diese Sequenz jedoch hochkonserviert, variiert also kaum (66,7 % Übereinstimmung; Kaczynski et al. 2003) und erkennt alle GC-Elemente (s. A.2.1.). Dabei bindet jeder Finger an drei bestimmte Basenpaare. Das Expressionsprofil und die Aktivierungs- oder Repressionsdomäne sind innerhalb der Familie dagegen nicht identisch (Turner J 1999).

Jeder Zinkfinger der Sp1-/KLF-Familie besteht aus der Sequenz C-X2-5-C-X3-(F/Y)-X5-ψ-X2-H-X3-5-H, wobei X jegliche Aminosäure und ψ einen hydrophoben Rest darstellt (Wolfe et al. 2000).

Die Zinkfinger sind über charakteristische *Krüppel*-Verbindungen miteinander verknüpft: Phe/Tyr-X-Cys-X2-4-Cys-X3-Phe-X5-Leu-X2-His-X-Arg/Lys-X-His oder Thr/Ser-Gly-Glu-Arg/Lys-Pro. Es gibt Hinweise auf die Bedeutung dieser Verknüpfungssequenzen für die hohe Affinität zu GC- und CACCC-reichen Domänen (Wolfe et al. 2000).

A.2.1.2. Klf4

Klf4 wurde zunächst beschrieben als epithelialer Transkriptionsfaktor, vorkommend in Darm, Haut, Gefäßendothel (Shields et al. 1996) und embryonalen Stammzellen (Li et al. 2005). Zuerst wurde seine Funktion im Wachstumsarrest entdeckt (Shields et al. 1996). Weitere Arbeiten hierzu zeigten bei konstitutiver Klf4-Expression: Inhibition der DNA-Synthese (Ton-That et al. 1997), Unterdrückung der Expression von Cyclin D (Shie et al. 2000), Cyclin B1 und Zellzyklusarrest zwischen der G1- und S-Phase, einhergehend mit Expression des Zellzyklusinhibitors p21 (Yoon et al. 2004).

Gezielte Gendelektion wurde von zwei voneinander unabhängigen Gruppen durchgeführt (Segre et al. 1999; Katz et al. 2002). Beide beobachteten einen Defekt in der terminalen Differenzierung von epithelialem und endothelialem Gewebe. Segre et al. beschrieben als Grund für den Tod kurz nach der Geburt die fehlende Hautentwicklung und –barriere. Katz et al. zeigten die starke Reduktion von Becherzellen im Darm.

Mithilfe der In-vivo-Studien wurde Klf4 eine entscheidende Rolle in der terminalen Differenzierung von Epithelzellen des Intestinums (Shields 1996) und der Epidermis (Segre et al. 1999) zugeschrieben. Er soll differenzierungsabhängige Gene in epithelialem Gewebe regulieren, wie Cytochrom P450-1A1 (Zhang et al. 1998), Laminin 3A (Miller et al. 2001), Laminin γ 1 (Higaki et al. 2002), *Smooth muscle protein 22-alpha/Transgelin* (Adam et al. 2000), *Intestinal-type alkaline phosphatase*, Villin-2, Desmoglein-2 und eine Vielzahl von keratinkodierenden Genen (Okano et al. 2000). Darüber hinaus hat Klf4 sowohl antiproliferative als auch wachstumsfördernde Effekte. Aktuelle Studien bestätigten die antiproliferative und vor Arteriosklerose schützende Rolle für die glatte Gefäßmuskulatur (Wang et al. 2011; Sivritas et al. 2011). Auch in der Differenzierung und Proliferation von Makrophagen und Monozyten sowie in zahlreichen immunologischen Prozessen hat Klf4/KLF4 eine unerlässliche Aufgabe (s. unten).

Die Tumorforschung hat gezeigt, dass KLF4 vielfach als Tumorsuppressor fungiert, wie beispielsweise in der Genese des Kolon-, Lungen- oder Pankreaskarzinoms (Patel et al. 2010; Hu et al. 2009; Zammarchi et al. 2011). Dagegen wurde eine deutlich höhere Expression von Klf4 in Mammakarzinom-Zellen gefunden (Chen et al. 2011).

Über die Rolle von Klf4 im hämatopoetischen System war lange nichts bekannt.

Versuche dieser Arbeitsgruppe identifizierten Klf4 als Initiator der Th17-Immunantwort und als myeloidzellspezifischen Transkriptionsfaktor. Anlass dazu gab u.a. die Erkenntnis von Terszowski et al. über die starke Expression von Klf4 in myeloiden Progenitoren (GMP)

gegenüber erythroiden Progenitoren (EP) (Terszowski et al. 2005). Weiter Experimente dieser Arbeitsgruppe zeigten eine Resistenz *Klf4*-deletierter Mäuse gegenüber autoimmunen Krankheiten, wie Kontakthypersensitivität und experimenteller Autoimmunenzephalitis. Eine aktuelle Veröffentlichung bestätigte diese Beobachtung (An et al. 2011).

Weitere Arbeiten beschrieben die Beteiligung von *Klf4* in der Regulierung von *Cd11d*, einem Makrophagenaktivierungsmarker (Noti et al. 2005), und in der inflammatorischen Antwort von Makrophagen (Feinberg et al. 2005; Liao et al. 2011). *KLF4* ist Zielgen von $\text{IFN}\gamma$, einem Makrophagenaktivator (Chen et al. 2002). M. Milanovic (ebenfalls Arbeitsgruppe Dr. D. Carstanjen) konnte in ihrer Dissertation die aktive Rolle von *Klf4* in der Makrophagenaktivierung bestätigen. Sie beschrieb, dass *Klf4*-Überexpression die Anzahl von M-CFU's (*monocyte colony forming units*) erhöht (Milanovic 2005). Weitere Versuche dieser Arbeitsgruppe zeigten, dass die Expression von *Klf4* die Monozytendifferenzierung induziert und Myeloidzellen in Richtung der Monozytendifferenzierung eingrenzt. Es folgte die Publikation von Feinberg et al. 2007, die Folgendes zeigte: *KLF4*-Überexpression in humanen Zelllinien schränkt Vorläuferzellen in Richtung der Monozytendifferenzierung ein. *KLF4* kann die Monozytendifferenzierung bewerkstelligen, auch bei Abwesenheit des Transkriptionsfaktors PU.1, der als entscheidend für die Myelopoese gilt. *KLF4* ist PU.1-Zielgen. Beide Transkriptionsfaktoren initiieren die Bestimmung und Differenzierung von Monozyten.

Auch an der frühesten Entwicklung auf Ebene der hämatopoetischen Stammzellen ist *Klf4* beteiligt. Er ist zur Reprogrammierung pluripotenter embryonaler Stammzellen aus differenziertem Gewebe befähigt (Zhang et al. 2010; Zaehres et al. 2007).

KLF4/Klf4 scheint also wie ein Chamäleon zu sein, das sich seiner Umgebung anpasst, sie beeinflusst, aber auch selbst in seiner Funktion beeinflusst wird. Der Grund dafür könnte in der Tatsache liegen, dass *KLF4/Klf4* größtenteils intrinsisch unstrukturiert vorliegt, also keine von der Aminosäure vorgegebene Tertiärstruktur annimmt, was ihm erlaubt, sich an die umgebenden Proteine anzuschmiegen und damit ihre Funktion zu beeinflussen.

Diese Beobachtungen gaben Anlass für diese Arbeit über die Rolle von *Klf4* in Monozyten und dessen Auswirkung auf das Expressionsmuster sowie auf mögliche Zielgene.

Zu Beginn der Experimente für diese Arbeit gab es noch keine Veröffentlichungen hierzu. Im Februar 2008 wurde publiziert, was auch für diese Arbeit zu diesem Zeitpunkt untersucht wurde und im Folgenden beschrieben wird: Die signifikante Reduktion von inflammatorischen Monozyten bei *Klf4*-Deletion (Alder et al. 2008).

A.2.1.2.1. Die Domänen von *Klf4*

Neben der bereits erwähnten Zinkfingerdomäne wurden weitere Domänen innerhalb von *Klf4* beschrieben, von denen man glaubt, dass sie wesentliche Funktionen übernehmen. Drei Domänen wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht und werden im folgenden Abschnitt beschrieben (schematische Darstellung s. Abb. 2.).

Die SH3-bindende Domäne (*Src homology 3*) ist eine ca. 50 Aminosäuren umfassende Region, die in erster Linie prolinreiche Aminosäuresequenzen bindet (Shields et al. 1996). Sie ist in einer Vielzahl intrazellulärer und membranassoziierter Proteine zu finden, u.a. in Proteinen mit enzymatischer Aktivität, Adaptorproteinen oder zytoskelettalen Proteinen. Diese Domäne wird als proteinbindendes Molekül beschrieben, das an der Vermittlung von Tyrosinkinasesignalen von der Zelloberfläche zu den Effektorproteinen beteiligt sein soll (Oh et al. 1997). Sie soll auch eine Vielzahl von Prozessen beeinflussen, wie lokale Erhöhung der Proteinkonzentration, Bestimmung der Lokalisation auf subzellulärer Ebene und Vermittlung der Anordnung großer Multiproteinkomplexe (Morton et al. 1994). Die Vektormutante, bei der die prolinreiche SH3-bindende Domäne fehlt, wird in dieser Arbeit *Klf4dSH3b-ERT2*, kurz *DeltaSH3b*, genannt.

Die N-terminale Transaktivierungsdomäne (*acidic activation domain*, Aminosäuren 1-157, bereits oben als Nicht-DNA-bindende Domäne bezeichnet) aktiviert die Transkription, indem sie als Bindeglied zwischen der DNA-bindenden Domäne und anderen Komponenten der Transkriptionsmaschinerie, u.a. mit p300/CBP (Evans et al. 2007), interagiert. Sie wurde von Geiman et al. 2000 als 109 Aminosäuren langer Rest des N-Terminus identifiziert. Zwei angrenzende Cluster saurer Reste innerhalb dieser Region sind für aktivierende Effekte zuständig. Sie ist reich an Prolin und liegt neben einer hemmenden Domäne (AS 158-385; Yet et al. 1998), gefolgt von einer Kernlokalisationssequenz.

Die Vektormutante, bei der die Transaktivierungsdomäne fehlt (Aminosäuren 402-483), wird in dieser Arbeit *Klf4dN-ERT2*, kurz *DeltaN*, genannt.

Die Anwesenheit von Aktivierungs- und Repressionsdomänen lässt *Klf4* vermutlich zwischen seiner aktivierenden und reprimierenden Funktion wechseln, abhängig davon, in welchem Gewebe er exprimiert wird (Garrett-Sinha et al. 1996; Geiman et al. 2000; Zheng et al. 2009a).

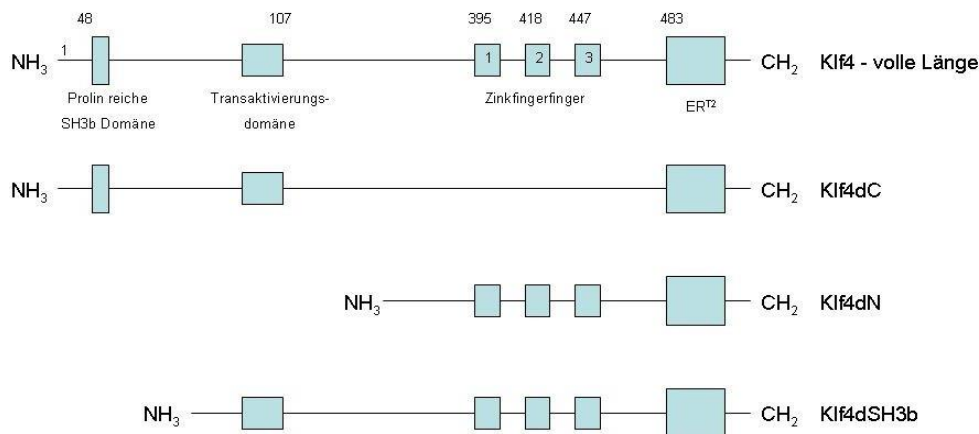


Abb. A.2.: Schematisch dargestellte cDNA der Vektormutanten von *Klf4*, die in myeloide Vorläuferzellen transduziert wurden.

A.3. Die Entwicklung von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen

Leukozyten (weiße Blutzellen) stellen eine heterogene Gruppe von Zelltypen dar, die in der Immunabwehr eine wichtige Rolle spielen. Sie finden ihren Ursprung in der hämatogenen Stammzelle im Knochenmark und differenzieren in unterschiedliche Richtungen je nach Funktion in Abhängigkeit von äußeren und inneren Einflüssen. Leukozyten befinden sich in der Blutzirkulation und im lymphatischen Gewebe und werden im Falle eines Gewebeschadens oder einer Infektion an den Ort des Geschehens gelockt.

Eine Untergruppe stellt das sogenannte mononukleäre phagozytäre System (MPS) dar. Es gehört zu den aus dem Knochenmark gereiften myeloiden Zellen. Teil des MPS sind Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen. Das MPS übernimmt die wichtige Aufgabe der antipathogenen Abwehr und der Beseitigung von toten Zellen, Pathogenen und anderen Molekülen durch Phagozytose und Endozytose (Banchereau et al. 1998). Bestimmte Monozyten, zum Beispiel, produzieren als Effektorzellen vor Ort inflammatorische Zytokine und nehmen Zellen und toxische Moleküle auf (Serbina et al. 2008b).

Makrophagen, ebenfalls phagozytäre Zellen, lassen sich in einen „inflammatorischen“ (M1) und in einen „antiinflammatorischen“ Typen (M2) einteilen. Ersterer wird in einer frühen Phase zum Entzündungsort gelockt und unterhält die Inflammation. Letzterer fördert die Regeneration und Wundheilung (Sutterwala et al. 1997; Jenkins et al. 2011).

Die diversen Untergruppen der dendritischen Zellen sind für die Antigenprozessierung und – präsentation zuständig (Banchereau et al. 1998; Bogunovic et al. 2009; Edelson et al. 2010).

Neuere Erkenntnisse lassen vermuten, dass sich Monozyten, viele Makrophagen und die meisten dendritischen Zellen aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle entwickeln (Fogg et al. 2006). Sie stammt der hämatopoetischen Stammzelle ab und besitzt das Potential für die myeloide Differenzierung, welche zunächst im Knochenmark stattfindet. Aus einem gemeinsamen myeloiden Vorläufer (*common myeloid progenitor*) entwickeln sich Granulozyten-Makrophagen-Vorläufer (*granulocyte-macrophage precursors*) und schließlich Makrophagen-dendritische Zellen-Vorläufer (*macrophage/DC progenitors; MDPs* s. Abb. A.3.). Aus diesen Zellen, die phänotypisch anderen myeloiden Vorläuferzellen ähneln, entstehen schließlich Monozyten, Makrophagen und *common dendritic cells*, nicht jedoch Granulozyten, eine weitere Untergruppe myeloider Zellen.

Aus *common dendritic cells* entstehen Untergruppen der dendritischen Zellen (s. Abb.). Monozyten treten in die Blutbahn über und können in Gewebe eindringen bzw. sich zu den Entzündungsorten begeben. Aus ihnen wiederum können sich Makrophagen und inflammatorische dendritische Zellen entwickeln, nicht jedoch andere Untergruppen der dendritischen Zellen (wie *common DCs* und *plasmacytic DC (PDCs)*, s. Abb. A.3.; Liu et al. 2009).

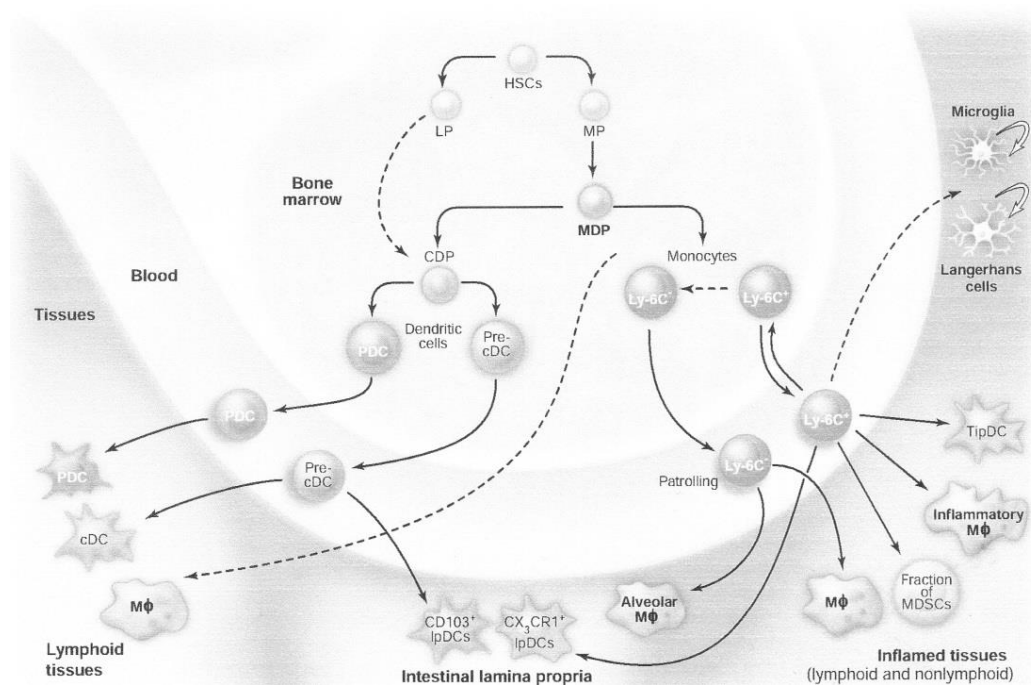


Abb. A.3.: Vorläufer von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen (Geissmann et al. 2010).

A.3.1. Monozyten

Monozyten sind im Blut zirkulierende Leukozyten mit wichtiger Funktion in der angeborenen Immunabwehr gegen Pathogene. Sie sind im peripheren Blut als große, runde Zellen mit reichlich Zytoplasma und einem bohnenförmigen Kern zu erkennen (s. Abb. A.4.). Im peripheren Gewebe sorgen Monozyten v.a. unter inflammatorischen Bedingungen für Nachschub an Makrophagen und dendritischen Zellen, indem sie sich ausdifferenzieren. Dies wird durch die makrophagenstimulierenden und -aktivierenden Chemokine M-CSF und GM-CSF vermittelt. Makrophagen und dendritische Zellen sind auch Teil des angeborenen Immunsystems und spielen eine wesentliche Rolle in der Antigenpräsentation und Phagozytose am Schnittpunkt zum erworbenen Immunsystem (Serbina et al. 2008a).

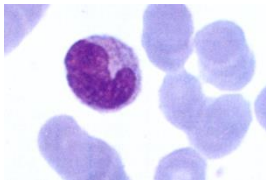


Abb. A.4.: Monozyt – lichtmikroskopisches Bild.

A.3.1.1. Menschliche Monozyten

Im menschlichen Blut zirkulierende Monozyten werden anhand der Expression zweier Rezeptoren in zwei Subpopulationen unterteilt: CD14 ist eine Komponente des Lipopolysaccharidkomplexes, CD16 ist ein FcγRIII-Immunglobulinrezeptor.

Eine Population exprimiert CD14 stark, CD16 dagegen nicht. Diese Monozyten sind relativ groß und machen ca. 80 bis 90 % der zirkulierenden Monozyten aus.

Die andere Population exprimiert CD14 schwach und CD16 stark. Die Zellen sind kleiner und mit nur zehn % an der Gesamtzahl der Monozytenzahl im Blut beteiligt. Sie vermehren sich während Infektionen und produzieren proinflammatorische Zytokine, wie Tumornekrosefaktoren (TNF). Sie können daher als proinflammatorische Monozyten bezeichnet werden (Serbina et al. 2008a).

A.3.1.2. Murine Monozyten

Nach aktuellem Forschungsstand werden auch bei der Maus zwei Populationen von Monozyten unterschieden, deren Entwicklung noch nicht vollständig verstanden ist (Auffray et al. 2009b). Murine Monozyten exprimieren statt CD14 und CD16 den CSF1-Rezeptor CD115 und CD11b, einen makrophagenstimulierenden Rezeptor sowie das F4/80-Antigen. Man unterscheidet die

Subpopulationen anhand der Expression von Ly6C, CX3CR1, CCR2 und 7/4. Es konnten zwei Populationen detektiert werden, die den menschlichen Subgruppen ähneln:

Die eine Population exprimiert CX3CR1^{low}, CCR2^{high}, Ly6C^{high} (in dieser Arbeit Ly6C^{high}-Monozyten genannt). Die andere Population exprimiert CX3CR1^{high}, Ly6C^{negative}, CCR2^{negative} (in dieser Arbeit Ly6C^{neg.}-Monozyten genannt, in der Literatur auch oft Ly6C^{low}).

Die Ly6C^{high}-Monozyten sind stärker granuliert und größer. Sie sind in peripherem Gewebe beherbergt, um auf inflammatorische Stimuli reagieren zu können. Besonders die Milz scheint als Verweilort beider Monozytenpopulationen eine wichtige Funktion zu übernehmen (Swirski et al. 2009). Am Ort der Inflammation sind Ly6C^{high}-Monozyten, auch inflammatorische Monozyten genannt, für die Verdauung des geschädigten Gewebes zuständig (Nahrendorf et al. 2007). Nach Rekrutierung zum Ort der Inflammation werden CD11c und MHC-II hochreguliert. Anschließend wandern die Ly6C^{high}-Monozyten in die Lymphknoten, um die T-Zell-Proliferation zu fördern. Außerdem wird vermutet, dass sich Ly6C^{high}-Monozyten in Ly6C^{neg.}-Monozyten umwandeln, da Ly6C^{high}-Monozyten die Expression von Ly6C verlieren (Varol et al. 2009, Yrlid et al. 2006). Bei Abwesenheit der Ly6C^{high}-Monozyten ist die Population der Ly6C^{neg.}-Monozyten jedoch nicht vermindert (Feinberg et al. 2007, Alder et al. 2008). Hier bedarf es weiterer Investigationen.

Monozyten der Subpopulation Ly6C^{neg.}, auch als residente Monozyten bezeichnet, sind langlebiger, verweilen länger im Blut und sind auch in nichtinfiziertem Gewebe zu finden. Ob sie, wie bisher angenommen, bei Inflammation in einer späten Phase zum Ort der Entzündung gelockt werden, ist keineswegs sicher. Es gibt Versuche, die Ly6C^{neg.}-Monozyten als erste am Entzündungsort eintreffende Zellen sahen, die hier Tumornekrosefaktoren (TNF) und Chemokine sezernieren (Auffray et al. 2007).

Am Entzündungsort differenzieren Monozyten rasch in Makrophagen und dendritische Zellen und aktivieren oder hemmen in Abhängigkeit von unterschiedlichen Signalen die Immunantwort (Serbina et al. 2008a; Robben et al. 2005). Möglicherweise existieren hier aber auch unterschiedliche Zellpopulationen nebeneinander. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass präventive Csf-1-Therapie die Graft-versus-Host-Reaktion unterdrückt, indem der Anteil der „inflammatorischen“ (M1) zugunsten der „supprimierenden“ (M2) Makrophagen reduziert wurde (Hashimoto et al. 2011). In einer ebenfalls kürzlich veröffentlichten Studie konnte das gewebedestruierende und metastasenfördernde Potential von „inflammatorischen“ Makrophagen gezeigt werden (Qian et al. 2011).

Es fehlen Erkenntnisse für die Annahme, dass Monozyten direkt an der Heilung von Gewebeschäden beteiligt (Geissmann et al. 2010) oder für die Angiogenese entscheidend sind (Grunewald et al. 2006, De Palma et al. 2005).

Eine dritte, sehr kleine Population (fünf Prozent aller zirkulierenden Monozyten) exprimiert Ly6C moderat (Serbina et al. 2008a).

A.3.2. Regulierung der Entwicklung von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen

Für die Regulierung der myeloiden Zelle sind unterschiedlichste Faktoren und Einflüsse von Bedeutung. Entzündungsreaktionen beispielsweise steigern die Anzahl der Monozyten durch vermehrte Ausschüttung aus dem Knochenmark. Für die Makrophagendifferenzierung scheint der Zellzyklus einen Einfluss zu haben.

Wesentliche Regulatoren der Monozytenentwicklung sind jedoch v.a. Zytokine und Transkriptionsfaktoren.

Wie im oberen Abschnitt beschrieben, entwickeln sich Monozyten aus myeloiden Vorläuferzellen des Knochenmarks. Jeder dieser Entwicklungsschritte setzt eine Entscheidung über den Differenzierungsweg der Zelle voraus. Dadurch werden sukzessiv die verschiedenen Möglichkeiten der Weiterentwicklung eingeschränkt.

In den letzten Jahren wurde deutlich, welche Mechanismen diese Entwicklung steuern. (Auffray et al. 2009b)

A.3.2.1. Zytokine in der Entwicklung von Monozyten und Makrophagen

Zytokine sind extrazelluläre Moleküle, die mit membrangebundenen Rezeptoren interagieren. Diese wiederum senden die Signale weiter in den Zellkern, wo sie umgesetzt werden. So wird die adäquate Produktion der Vorläuferzellen je nach Bedarf reguliert, ohne die es zu unangemessener Abgabe der Zellen kommt. Heute ist unbestritten, dass Zytokine wesentlich Überleben, Proliferation und Aktivierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen und ausdifferenzierten Blutzellen beeinflussen (Barreda et al. 2004).

Die Entwicklung von Blutmonozyten ist abhängig vom Wachstumsfaktor Csf-1 (auch M-CSF und CD115 genannt). Deletionsversuche haben die Wichtigkeit des Csf-1-Rezeptors und seines Liganden Csf-1 für Monozyten im peripheren Blut und deren Differenzierung gezeigt (Cecchini et al. 1994; Dai et al. 2002). Der Rezeptor wird im sog. mononukleären phagozytären System (MPS, s. A.3.), also auf der Zelloberfläche von Monozyten, Makrophagen und dendritischen

Zellen sowie auf deren Progenitoren exprimiert. Entscheidende Liganden dieses Rezeptors sind Csf-1/M-CSF (Kawasaki et al. 1985) und Il-34 (Lin et al. 2008), beide wichtig für die Entwicklung dieser Zellen. Csf-1, wie auch weitere hämatopoetische Zytokine, wird über Il-1-Rezeptoren und TLR induziert (Delano et al. 2007).

Der in der Randzone der Milz gebundene Chemokinligand CX₃CL₁ rekrutiert in erster Linie Ly6C^{neg.}- (Auffray et al. 2007), aber auch Ly6C^{high}-Monozyten (Auffray et al. 2009) in einer sehr frühen Entzündungsphase und fördert darüber hinaus das Überleben der Ly6C^{neg.}-Monozyten während Ruhephasen (Landsman et al. 2009).

Versuche mit Deletion der Chemokinrezeptoren CCR1 und CCR5 lassen vermuten, dass diese Rezeptoren und ihre multiplen Liganden für das Anlocken der Monozyten in inflammatorisches Gewebe ebenfalls von großer Bedeutung sind. Es wurde gezeigt, dass sie an der Entstehung von Arteriosklerose, multipler Sklerose und rheumatoider Arthritis beteiligt sind (Charo et al. 2006). Auch die Deletion von CCR2 hatte eine Reduktion der Monozytenemigration um 80 % zufolge. Insbesondere dessen Liganden CCL2 und CCL7 haben also hier offensichtlich eine entscheidende Rolle inne (Jia et al. 2009). NOD2 in intestinalen Zellen ist sensibel für CCL2 und lockt somit Scharen von Monozyten in das Kolon, wo sie zu sog. inflammatorischen Makrophagen werden (Kim et al. 2011). Dieser Rezeptor scheint eine komplexe Rolle in der Monozytenaktivierung zu spielen. Über die Thrombozytenaggregation am Entzündungsort wird CCL2 produziert, was wiederum Monozyten aus dem Knochenmark mobilisiert (Goncalves et al. 2011). Wird CCL2 über TLR-Agonisten in mesenchymalen Knochenmarkzellen induziert, kommt es zur Mobilisierung von Monozyten aus dem Knochenmark in die Zirkulation unter Umgehung des Monozytenreservoirs der Milz, was eine Erklärung für die Rekrutierung aus dem Knochenmark infolge peripherer Reize sein kann (Shi et al. 2011).

Zwar für Monozyten weniger entscheidend, jedoch wegführend für Makrophagen und dendritische Zellen sind die Zytokine GM-CSF, Flt3 und Lymphotoxin α 1 β 2 für deren Entwicklung und Homöostase (McKenna et al. 2000; Waskow et al. 2008; Kabashima et al. 2005).

A.3.2.2. Transkriptionsfaktoren in der Entwicklung von Monozyten und Makrophagen

Als zweite wichtige Gruppe mit regulatorischer Funktion für die Monozyten-Makrophagen-Entwicklung sind Transkriptionsfaktoren (s. Abschnitt A.2.). Unentbehrlich für die Induktion in Richtung der myeloiden Reihe ist Pu.1, ein Transkriptionsfaktor aus der Ets-Familie. In der

frühen Myelopoese bestimmt Pu.1 das Schicksal der unreifen multipotenten Vorläuferzelle (Nerlov et al. 1998) und die Generierung der CMP (*common myeloid progenitors*) (Dakic et al. 2005; Iwasaki et al. 2005). Auch später in der Myelopoese spielt Pu.1 eine entscheidende Rolle. Durch die Antagonisierung anderer Transkriptionsfaktoren bestimmt Pu.1 die Differenzierung entlang des myelo-monozytären Wegs. So inhibiert er GATA-1 und damit den Megakaryozyten-Erythrozyten-Weg sowie GATA-2 (Walsh et al. 2002) und die Entwicklung von Mastzellen. Auf Niveau der bipotenten GMP (*granulocyte macrophage progenitors*) bewirkt Pu.1 die Differenzierung in Monozyten auf Kosten von Granulozyten. Dies geschieht durch die Antagonisierung des Transkriptionsfaktors C/EBPalpha (Dahl et al. 2003). Pu.1 bewirkt also die erfolgreiche Monozytenentwicklung durch Ausschalten von Regulatoren anderer Differenzierungswege. Diese Entscheidungen sind wahrscheinlich abhängig von der Expressionsstärke der Regulatoren und deren Gleichgewicht. Überexpression von Pu.1 beispielsweise führt zu genannten Effekten, während geringere oder gleich starke Expression zur Kooperation zwischen den Regulatoren führt. C/EBPalpha und Pu.1 können im Zusammenspiel Makrophagendifferenzierung aus B-Zellen durch Reprogrammierung bewirken (Xie et al. 2004). Dies kann erklärt werden durch die quantitätsabhängige Koaktivierung der inhibitorischen *downstream* gelegenen Regulatoren Gfi-1 und Egr/Nab (Laslo et al. 2006). So aktiviert Pu.1 den Transkriptionsfaktor Egr und seinen Kofaktor Nab für die spezifische Differenzierung in Makrophagen (Walsh et al. 2002, Dahl et al. 2003).

Neuste Erkenntnisse geben Anlass zur Annahme, dass sich die Auswirkungen von Pu.1 nicht nur durch seine Aufgabe als Transkriptionsfaktor erklären lassen, sondern auch durch seine Interaktion mit bestimmten zellspezifischen Genomregionen, in dem Fall *lysine 4 in histone H3* (H3K4me1). Auf diese Weise hat er die gesamtgenomische Kontrolle über die Makrophagen (Natoli 2010).

Eine Reihe weiterer Faktoren bestimmt die Monozytendifferenzierung mit. So kann der Transkriptionsfaktor ICSBP/IRF-8 ebenfalls die Monozyten-/Makrophagendifferenzierung initiieren, vermutlich sogar in direkter Interaktion mit Pu.1 (Tamura et al. 2000).

Irf4 erscheint wichtig für die Differenzierung von M2 Makrophagen (Satoh et al. 2010; s. A.3.).

Neuste Erkenntnisse zeigen, dass NUR77 (kodiert durch Nr4a1) unerlässlich für die Entwicklung der Ly6c^{neg}-Monozyten ist (Hanna et al. 2011).

MafB und cMaf sind stark exprimierte Transkriptionsfaktoren in Monozyten und Makrophagen und können selektiv die Monozytendifferenzierung in myeloiden Vorläuferzellen initiieren (Gemelli et al. 2006, Kelly et al. 2000, Hedge et al. 1998). Entsprechend der in der Literatur beschriebenen Theorie hängt die Funktion der Regulatoren von ihrem quantitativen Vorkommen

ab. Somit wird auch hier angenommen, dass geringe Mengen an Pu.1 MafB in der Makrophagendifferenzierung unterstützen, wohingegen höhere Pu.1-Mengen MafB antagonisieren.

Des Weiteren wird angenommen, dass der cyclinabhängige Kinaseinhibitor p21cip eine Rolle in der Entwicklung und Differenzierung von Monozyten spielt (Scatizzi 2006). Auch der Fas-Signalweg soll die Homöostase von Monozyten regulieren, wahrscheinlich indem er das Überleben der Monozyten kontrolliert (Brown et al. 2004).

Der Jak-Stat-Signalweg scheint in erster Linie für Makrophagen, besonders für deren Polarisierung, entscheidend zu sein. Die Aktivität von Stat1 zeigte sich v.a. für M1 Makrophagen (s. A.3.) unerlässlich (Toshchakov et al. 2002).

Über die Rolle von Klf4 in der myeloiden Entwicklung ist in den letzten Jahren einiges bekannt geworden. Hierauf wurde bereits im Abschnitt A.2.1.2. eingegangen. In dieser Arbeit soll seine Rolle für Monozyten untersucht werden.

A.3.2.3. Das Zusammenspiel von Transkriptionsfaktoren und Zytokinen

Transkriptionsfaktoren regulieren die Expression von Proteinen in der Zelle. Dadurch werden Entwicklungsmöglichkeiten der Zelle vorgegeben, die wiederum durch Zytokine beeinflusst werden können. Transkriptionsfaktoren und Zytokine ergeben oft erst in ihrem Zusammenspiel das Schicksal der Zelle. Beispielsweise haben Versuche gezeigt, dass bei Deletion von Pu.1 in myeloiden Vorläuferzellen der Zytokinrezeptor c-fms nicht exprimiert wird und dadurch der Wachstumsfaktor Csf-1 seine Wirkung nicht entfalten kann (DeKoter et al. 1998). Genauso wenig kann der c-Fms-Signalweg bei Abwesenheit von Pu.1 die Makrophagendifferenzierung bewerkstelligen. Im frühen Stadium der Zelle ist Pu.1 bereits im Zellchromatin vorhanden, sowohl am proximalen Promotor, als auch am FIRE (*fms-intronic regulatory element enhancer*), welcher für die Egr-Rekrutierung gebraucht wird (Tagoh et al. 2002). Das lässt vermuten, dass bereits zellintrinsische Mechanismen den C-fms-Rezeptor hochregulieren, was die Monozytenproliferation und deren Überleben fördert (Lagasse et al. 1997). C-Fms ist bereits im frühen Vorläuferstadium vorhanden (Kondo et al. 2000). Es stellt sich die Frage, welche transkriptionellen Aktivitäten die c-Fms-Signalisierung kontrolliert.

Csf-1 ist auch in die Aktivierung der Onkogene c-Myb und c-Myc über die Transkriptionsfaktoren Ets-1 und -2 involviert (Sullivan et al. 1997). Hierdurch wird der myelomonozytäre Vorläufer- und Makrophagenzellzyklus in Gang gehalten.

Darüber hinaus stellen Adhäsionsmoleküle einen weiteren Baustein im komplexen Zusammenspiel der verschiedenen Faktoren dar. Entscheidend für die Leukozytenadhäsion und -

migration exprimieren Ly6C^{high}-Monozyten L-Selectin, P-Selectin-Glykoproteinligand 1, *lymphocyte function-associated antigen 1*, den Makrophagenrezeptor MAC1, *platelet endothelial cell adhesion molecule* PECAM1 sowie das *very late antigen 4* (Ley et al. 2007).

A.4. Möglichkeiten der Proteinausschaltung in der Maus

Für die Untersuchung der Rolle von Klf4 in Monozyten wurden Möglichkeiten der Proteinausschaltung im Genom der Maus angewandt. So konnten die Auswirkungen, die das fehlende Protein zu Folge hat, beobachtet werden.

Hier gibt es unterschiedliche Methoden.

A.4.1. Konditionelle Deletion eines Proteins durch Vav-Cre-Rekombinase

Durch die Herstellung Cre-transgener Mäuse können spezifische Sequenzen im Genom herausgeschnitten werden (Nagy 2000). Diese Sequenzen müssen von einer LoxP-Sequenz flankiert sein, damit sie von der Cre-Rekombinase erkannt werden. Stellt man die Expression des Cre-Transgens unter die Kontrolle eines Vav-Gen-Regulators, werden die spezifischen Sequenzen nur im hämatopoetischen System der Maus ausgeschnitten und somit inaktiviert (Georgiades et al. 2002). Andere Beispiele für die Inaktivierung von Sequenzen spezifisch im hämatopoetischen System sind: LysM-Cre (Makrophagen und Granulozyten; Clausen et al. 1999), p56lck-Cre (T-Lymphozyten; Takahama et al. 1998), CD19-Cre (B-Lymphozyten; Rickert et al. 1997) und GATA1-Cre (Erythrozyten und Megakaryozyten; Jasinski et al. 2001). Jedoch können Gene bisher nur durch den Vav-Regulator im gesamten hämatopoetischen System inaktiviert werden (Georgiades et al. 2002). Das Vav-Gen kodiert für ein Guanin-Nukleotid-Austauschprotein und wird neben dem hämatopoetischen System (Ogilvy et al. 1998) auch noch in testikulären Keimzellen (Okumura et al. 1997), Zähnen im Entwicklungsstadium (Bustelo et al. 1993) und wahrscheinlich im Trophoblasten der Plazenta (Schuebel et al. 1996, Zmuidzinas et al. 1995) exprimiert.

Die Erstbeschreiber Georgiades et al. koppelten die murine Vav-Regulator-Sequenz an die P1-Bakteriophage Cre-Rekombinase, um das pvavCre-Plasmid herzustellen (s. Abb. A.5.). Dadurch wurde schließlich eine transgene Maus generiert. Um hinreichenden Umfang der Cre-vermittelten Rekombination sicherzustellen, wurden die plasmidtragenden Mäuse mit Mäusen gekreuzt, die das R26R-Transgen mit dem LacZ-Reportergen trugen (Soriano 1999). Das LacZ-Reportergen wurde nur dann exprimiert, wenn Cre-vermittelte Rekombination von LoxP-Sequenzen stattgefunden hatte. Nur im Vav-Cre-Rekombinase tragenden Gewebe konnte die

gewünschte Rekombination festgestellt werden. Dabei wurde in Leukozyten eine Expressionsrate von 80 bis 90 % erreicht, in anderen hämatopoetischen Zellen erreichte die Expression 60 bis 70 %, in Erythrozyten war sie sehr niedrig.

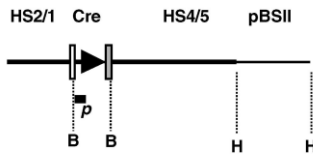
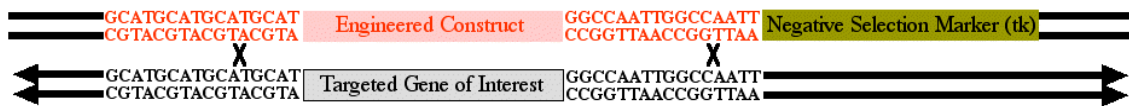


Abb. A.5.: Das Vav-Cre-Plasmid: Cre-Rekombinase cDNA (Cre), VAV-Regulator-Sequenz (HS2/1 und HS4/5), Plasmidvektor (pBSII), SV40 Intron (weißer Kasten), SV40 PolyA Box (grauer Kasten). Georgiades et al. 2002.

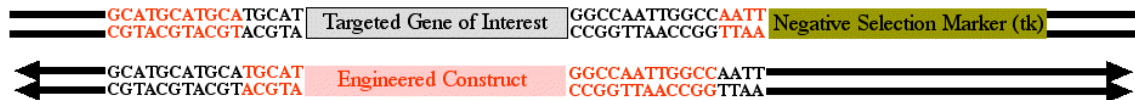
A.4.2. Deletion durch homologe Rekombination

Die Herstellung einer Maus mit gezielter Deletion in der *Klf4*-Gensequenz kann durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen erreicht werden (Segre et al. 1999). Hierbei wird eine bestimmte Gensequenz aus dem Genom durch eine willkürliche ersetzt (s. Abb. A.6.). Zunächst muss die *Klf4*-Gensequenz durch Isolierung und Lokalisierung mit Hilfe des Southern Blots charakterisiert werden. Für die Deletion von *Klf4* wird ein Zielvektor hergestellt, der die *Klf4*-Gensequenz ersetzen soll. Er enthält u.a. flankierende DNA-Sequenzen, identisch zu den Sequenzen, die den zu ersetzenden Locus flankieren sowie einen positiven (ein Antibiotikaresistenzgen enthaltenden) und einen negativen (ein Tymidinkinasegen enthaltenden) Selektionsmarker (s. Abb. A.6.). Dieses Konstrukt wird zu Zellen gegeben, die die zu ersetzende Gensequenz enthalten. Durch Effekte, die bei der Zellteilung stattfinden (Meiose und Mitose während der Metaphase), wird die zu ersetzende Gensequenz durch das hergestellte Konstrukt ersetzt (homologe Rekombination). Durch Zugabe von Antibiotika können die Zellen detektiert werden, die durch homologe Rekombination resistent für das Antibiotikum sind. Diese Methode dient als positiver Selektionsmarker (Segre 1999). Der negative Selektionsmarker wird bei der homologen Rekombination nicht mit dem Konstrukt inseriert. Durch Zugabe von Ganciclovir, das Zellen mit Tymidinkinase abtötet, werden Zellen mit versehentlich inserierter Tymidinkinase, was durch nicht-homologe Rekombination zustande kommen kann, aussortiert. Zunächst ist nur ein Allel betroffen. Durch Fortpflanzung kann nach einigen Generationen ein Genom generiert werden, das die Mutation in beiden Allelen trägt. Man spricht nun von Knock-out.

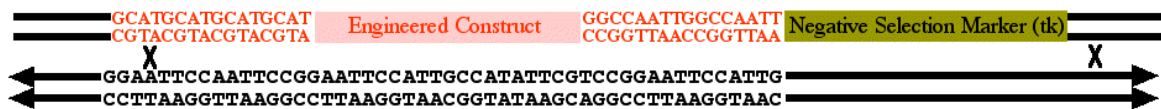
Abb. A.6.:



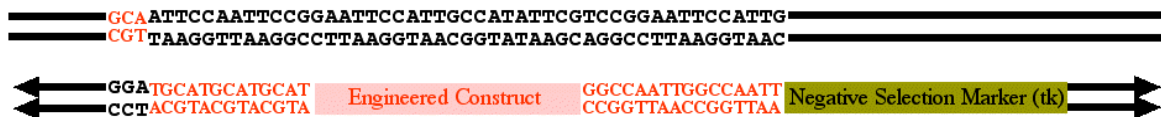
Kurz vor homologer Rekombination: Das hergestellte Konstrukt (*engineered construct*) mit flankierenden DNA-Sequenzen (rot), die den flankierenden Sequenzen (schwarz) des zu ersetzenden Gens (*target gene of interest*) entsprechen.



Nach homologer Rekombination: Das Chromosom enthält einen Teil der flankierenden Sequenzen und das hergestellte Konstrukt (*engineered construct*), das den Platz des zu ersetzenden Gens (*target gene of interest*) vollständig ersetzt hat.



Kurz vor nicht-homologer Rekombination: Hier findet die Rekombination zufällig statt. Der negative Selektionsmarker (tk) wird hierbei mit übertragen.



Nach nicht-homologer Rekombination: Der positive und negative Selektionsmarker wurde in die Rekombination einbezogen. Ganciclovir tötet diese Zellen mit modifiziertem Chromosom ab. Quelle: www.bio.davidson.edu.

A.4.3. Generierung von adulten Chimären per Knochenmarktransplantation

Klf4-deletierte Mäuse, hergestellt durch homologe Rekombination, sind nicht lebensfähig (Segre et al. 1999). Um dennoch *Klf4* im hämatopoetischen System adulter Mäuse zu untersuchen, kann man hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen von *Klf4*-deletierten Mäusen in wildtypische Mäuse durch Knochenmarktransplantation übertragen. Dazu müssen die Wildtypen zuvor bestrahlt werden, um ihre eigenen Knochenmarkzellen (hämatopoetische Zellen) zu eliminieren (Alder et al. 2008). Anschließend werden die Knochenmarkstammzellen aus *Klf4*-deletierten Mäusen und als Kontrolle von Wildtypen in sechs bis acht Wochen alte C57BL/6-Ly5.2 (CD45.1⁺) Mäuse transplantiert. Einige Wochen nach Transplantation können die hämatopoetischen Zellen untersucht werden.

A.5. Retroviraler Gentransfer

Retroviren sind einzelsträngige RNA-Viren, die sich mithilfe einer reversen Transkriptase in doppelsträngige DNA umschreiben, sich in das Genom einer Wirtszelle integrieren und somit transkribiert werden. In der Wissenschaft kann dieser Mechanismus zur Einbringung einer beliebigen Gensequenz ins Genom einer Zelle dienen. Hauptsächlich wird hierfür ein Typ C-Retrovirus, meist ein modifiziertes murines Leukämievirus (MLV), verwendet. Andere Beispiele sind Lentiviren und Spumaviren (Schwantes et al. 2002). In der Regel werden replikationsinkompetente Retroviren verwendet, um eine potentielle Pathogenität und nicht erwünschte Replikation der Viren nach Infektion der Wirtszelle zu vermeiden. Ein replikationsinkompetentes Retrovirus enthält die gewünschte zu übertragende Gensequenz und zusätzlich Cis-agierende Elemente. Diese weisen die Grundstruktur des viralen Genoms auf und dienen als Vektor (auch Helfervirus) mit den notwendigen regulatorischen Sequenzen für virale Verpackung, reverse Transkription und Integration. Lediglich ihre genetische Information wird später in das Virion verpackt. So können nach Infektion keine neuen Viruspartikel gebildet werden. Die viralen Gene pol, env und gag werden in trans-Position gebracht und nicht in das Virion verpackt, was die Produktion replikationsdefizienter infektiöser Partikel zufolge hat und eine Virusreplikation verhindert.

Auf MLV basierend infizieren die Virusvektoren nur proliferierende Zellen (Roe et al. 1993). Für die Depletion unbrauchbarer reifer Knochenmarkzellen wurde den Mäusen für diese Arbeit 72 Stunden vor Tötung 5-Fluorouracil (5-FU) injiziert, ein Uracilanalogen mit zytostatischem Effekt auf alle sich teilenden Zellen.

Hämatopoetische Stammzellen wurden als ruhende (Ogawa 1993) bzw. sich sehr langsam teilende (Bradford et al. 1997) Zellen identifiziert und entgehen somit der Wirkung von 5-FU. Weiter entwickelte Vorläuferzellen mit hoher Proliferation werden hingegen getötet. Dies hat zur Folge, dass die Reproduktion primitiver Vorläuferzellen durch Stimulation der Stammzellen aktiviert wird. Der gewünschte Effekt angereicherter Stammzell- sowie primitiven Vorläuferzellpopulationen tritt somit ein (Yeager et al. 1983).

Nach Aufarbeitung der Zellen und vor Transduktion wurden die Zellen für diese Arbeit in Flüssigmedium mit der Zytokinkombination G-CSF, SCF und TPO für 48 Stunden kultiviert. In diesem Zeitraum sollten sich die Zellen in den Zellzyklus begeben, um später durch die viralen Vektoren infiziert werden zu können. Die oben genannte Zytokinkombination wurde unter möglichen anderen gewählt, da sie in früheren *colony forming assays* die größte relative Zunahme von M-CFUs und damit die Differenzierung in Richtung Monozyten/Makrophagen beschränkte Zellen gezeigt hat (Milanovic, 2005).

A.6. Das Prinzip der induzierbaren Aktivierung eines nukleären Proteins durch Translokation in den Zellkern

Wie im vorangehenden Abschnitt beschrieben werden die murinen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen mit dem Virusvektor infiziert, um das transduzierte Fremdgen zu exprimieren. Dies wird jedoch zunächst verhindert, indem man die Translokation in den Zellkern blockiert. Dadurch wird vermieden, dass das transduzierte Gen schon vor der Sortierung durch FACS und der anschließenden Kultivierung aktiv ist und somit eine Präselektion einiger Vorläuferzellen vornimmt, was zur Verfälschung der Quantifizierung führen kann. Deshalb wurde die in das Zytoplasma der Wirtszellen eingebrachte Virusvektoren-cDNA mit den Hormonbindungsdomänen E und F eines Östrogenrezeptors fusioniert. Diese werden durch 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT), einer mutierten Variante des humanen Östrogens, aktiviert. Um zu verhindern, dass andere Östrogene (enthalten im fetalen Kalbserum des Zellkulturmediums) Einfluss nehmen, ist der fusionierte Östrogenrezeptor mutiert (MER) und damit spezifisch für 4-OHT. Bei Abwesenheit des Hormons binden Hitzeschockproteine wie Hsp90 an die Hormonbindungsdomäne und verhindern die Translokation des Fusionsproteins in den Zellkern (maskieren dadurch auch die funktionelle Domäne des Fusionspartners). Erst bei Zugabe des Hormons, z.B. 4-OHT, dissoziiert das Hitzeschockprotein. Das transduzierte Gen Klf4 transloziert in den Zellkern und induziert die Transkription seiner Zielgene.

In früheren Experimenten wurde von M. Milanovic (Dissertation 2005) die hier angewandte induzierbare Aktivierung des Proteins mit der konstitutiven Überexpression (bei der die Expression nicht erst verhindert wird) verglichen. Es konnte eine veränderte Spezifität der Fusion von ERT2 und Transkriptionsfaktor ausgeschlossen werden. Aufgrund dieser Erkenntnis und der Vorteile der induzierbaren Methode wurde nur diese in der vorliegenden Arbeit angewandt.

A.7. Retronektin

Eine Methode, die Infektion der Wirtszelle mit dem Virusvektor physikalisch durchführbar zu machen, ist Retronektin.

Retronektin ist ein rekombinantes, humanes Fibronektinfragment. Beschichtung von Brutplatten, auf denen die Gentransduktion stattfinden soll, bewirkt, dass Wirtszellen und Virusvektoren an entsprechende Bindungsstellen des Retronektins binden und durch räumliche Annäherung leichter fusionieren (Hanenberg et al. 1996) und von inhibierenden Agens im Medium weniger leicht beeinträchtigt werden (Chono et al. 2001).

Die Wirtszellen exprimieren an ihrer Oberfläche die Integrinrezeptoren VLA-4 und -5, die an die *connecting*-Sequenz-1 bzw. die zellbindende zentrale Domäne des Retronektins binden. Die viralen Vektoren binden unterdessen an eine dritte funktionelle Domäne des Retronektins, die heparinbindende Domäne (Hanenberg et al. 1996).

Um die erfolgreich transduzierten Zellen selektionieren zu können, enthielten die retroviralen Vektoren in dieser Arbeit eGFP- (*enhanced green fluorescence protein*) kodierende Sequenzen. Sie werden zusammen mit der cDNA von *Klf4* respektive der anderen Mutanten als bicistronisches (auf derselben mRNA lokalisiertes) Transkript exprimiert und von der *internal ribosome entry site* (IRES) des viralen Vektors translatiert. Wird das Protein nach erfolgreicher Transduktion (Infektion der Zelle mit viralem Genom) exprimiert, kann diese nach 24 bis 48 Stunden unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von 470 bis 490 nm sichtbar gemacht werden. Dies dient als grober Anhalt für die erfolgte Transduktion.

B. Herleitung der Aufgabenstellung

In den letzten Jahren wurden über den Transkriptionsfaktor Klf4 vor allem Erkenntnisse über die Rolle in Myeloidzellen erlangt. In unserer Arbeitsgruppe war darüber bereits geforscht worden, was M. Milanovic (Arbeitsgruppe von Dr. D. Carstanjen) in ihrer Dissertation 2005 beschrieb. Klf4 wurde als myeloidzellspezifischer Transkriptionsfaktor und außerdem als Initiator der Th17-Immunantwort entlarvt. Zuvor hatten Terszowski et al. 2005 über die starke Expression von Klf4 in myeloiden Vorläuferzellen gegenüber erythroiden Vorläuferzellen berichtet, was den Anlass zu weiteren Untersuchungen gegeben hatte. Innerhalb der Arbeitsgruppe zeigte sich, dass Ly6C^{high}-Monozyten bei *Klf4*-Deletion im Knochenmark stark reduziert waren, nachdem zunächst vergeblich die Auswirkung von Klf4 auf Makrophagen untersucht worden war. Dies warf weitere Fragen auf, denen in Versuchen zu dieser Arbeit auf den Grund gegangen werden sollten.

Es sollte die Beobachtung der Monozytenreduktion bei *Klf4*-Deletion bestätigt werden. Um andersartige Einflüsse als die Deletion selbst auszuschließen, wurde dieser Versuch an zwei unterschiedlichen Deletionstypen durchgeführt.

- Zunächst wurde der Frage nachgegangen, ob die Anzahl der Monozytenpopulationen Ly6C^{high}, Ly6C^{negative} sowie der neutrophilen Granulozyten (Ly6C^{intermediate}) im peripheren Blut von Cre-Rekombinase tragenden LoxP-flankierten und damit *Klf4*-deletierten Mäusen im Vergleich zu Wildtypen verringert war.
- Daraus resultierte eine weitere Frage: War der Defekt nur in der Peripherie, also im Blut, vorhanden oder war er bereits während der Entwicklung im Knochenmark zu finden und in welchem Ausmaß?
- Wie machte sich der Unterschied zwischen deletierten und wildtypischen Mäusen auf Ebene der Genexpression bemerkbar? Welche weiteren Gene waren von der Deletion betroffen? Eine Genexpressionsanalyse beider Typen wurde durchgeführt.

Um die Hypothese der Monozytenverminderung bei *Klf4*-Deletion zu untermauern und mögliche andere Einflüsse des Deletionstyps auszuschließen, wurde die Zellzahl auch in Knochenmarkchimären (durch Transplantation deletierter hämatopoetischer Zellen in zuvor letal bestrahlte Mäuse) gemessen.

- Welches Bild zeigte sich bei diesem Deletionstypen in der Körperperipherie? Ein weiteres Organ der Immunzellen, die Milz, wurde auf Anzahl der Monozyten untersucht.

Im zweiten Abschnitt zu dieser Arbeit wurde die Auswirkung der *Klf4*-Deletion auf die Expression weiterer Gene, in der Genexpressionsanalyse gezeigt, noch näher untersucht:

- Welche Schnittmenge ergab sich im Vergleich der Genexpressionsanalyse von Ly6^{high}-Monozyten aus *Klf4*-deletierten Mäusen (s. oben) mit der Genexpressionsanalyse von Myeloidzellen, in denen *Klf4* durch Einbringen der *Klf4*-Sequenz überexprimiert wurde (letztere war zuvor von der Arbeitsgruppe Dr. D. Carstanjen durchgeführt worden). Welche Schnittmenge ergab sich im Vergleich beider Genexpressionsanalysen?
- War der Einfluss der *Klf4*-Deletion auf die Expression von mutmaßlichen Zielgenen auch zu sehen, wenn wir *Klf4* in myeloiden Zellen überexprimieren und per PCR messen würden? Das würde den direkten Einfluss von *Klf4* auf diese Gene beweisen.

Nicht nur die Auswirkung von *Klf4* als vollständige Gensequenz sollte in dieser Arbeit untersucht werden. Auch die einzelnen Domänen der *Klf4*-Sequenz waren von Interesse:

- Welche Folgen hatte die Überexpression der unvollständigen *Klf4*-Sequenz, der wahlweise eine Domäne fehlte? Den deletierten Domänen wurden in der Literatur entscheidende Funktionen in der Transkription zugeschrieben. Wäre die Transkriptmenge des Zielgens von *Klf4* niedriger im Vergleich zu Zellen, die das vollständige *Klf4*-Gen trugen?

C. Material

C.1. Chemikalien und Reagenzien

dNTP (0.1M)	MBI Fermentas, St.Leon Rot, Ger.
Ethanol 99 %	Merck, Darmstadt, Germany
Ethidiumbromid	Sigma, Steinheim
5-Fluorouracil	GRY-Phrama, Kirchzarten
Giemsa-Färbelösung	Sigma, Steinheim
4-Hydroxytamoxifen	Sigma, Steinheim
2-Mercaptoethanol 50mM steril	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
May-Grünwaldlösung	Sigma, Steinheim
Giemsa-Lösung	Sigma, Steinheim, Germany
peqGOLD TriFast™	Peqlab Biotechnology, Erlangen, Ger
DMSO-Puffer	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Agar Noble	Difco Laboratories, USA

C.2. Puffer

PD Pharm Lyse Erythrozytenlysepuffer	BD Biosciences PharMingen, Karlsruhe
Casyton isotonischer Puffer	Innovatis Ag Reutlingen
Cell dissociation buffer (enzyme free)	GIBCO Invitrogen, Paisley, Schottland
DEPC-H ² O	1ml DEPC aufgelöst in 1L H ₂ O, inkubiert übernacht und autoklaviert
FACS-Puffer	Zwei % FCS, zwei mM EDTA, 0.1 % NaN ₃ in PBS
PBS (Dulbecco's) without Ca&Mg	PAA, Pasching, Österreich
TAE-Puffer (50x)	Zwei M Tris, 57 % Acetonessigsäure, 100 mM EDTA, pH 8.0

C.3. Antikörper

Antigen	Klon	Fluorochrom	
Ly6C	AL-21	FITC	BD Biosciences PharMingen, San Diego, USA
Cd11b	3A33	APC	BD Biosciences PharMingen, San Diego, USA
Cd11b	M1/70	PE	BD Biosciences PharMingen, San Diego, USA
CD45R/B220	RA3-6B2	PE	BD Biosciences PharMingen, San Diego, USA
CD45R/B220	RA-6B2	APC	BD Biosciences PharMingen, San Diego, USA
Streptavidin		PE Cy5	BD Biosciences PharMingen, San Diego, USA
Sca-1	E13-161.7	FITC	BD Biosciences PharMingen, San Diego, USA
Lin-Biotin			BD Biosciences PharMingen, San Diego, USA
Cd8a (Ly2)	53-6.7	FITC	BD Biosciences PharMingen, San Diego, USA
Cd4 (L3T4)	RM4-5	PE	BD Biosciences PharMingen, San Diego, USA
Cd3e	145-2C11	APC	BD Biosciences PharMingen, San Diego, USA
Cd45.1 Biotin			BD Biosciences PharMingen, San Diego, USA
c-kit		APC	BD Biosciences PharMingen, San Diego, USA

C.4. Rekombinante Zytokine und Proteine

Rekombinantes Protein	Ursprung	Konzentration	Vertreiber
SCF	Ratte	50ng/ml	PePro Tech, N.Y., U.S.A.
G-CSF	Mensch	100ng/ml	PePro Tech, N.Y., U.S.A.
TPO	Mensch	100ng/ml	PePro Tech, N.Y., U.S.A.
Retronektin	Rekombinantes humanes Retronektinfragment	4mg/cm ²	Takara Bio, Otsu, Shiga, Japan

C.5. Enzyme

Restriktionsenzyme	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot, Germany
RNAse A	Roche, Mannheim, Germany
Taq-Polymerase	Bioline, Luckenwalde, Germany
PowerScript™ Reverse Transkriptase	BD Biosciences Clontech, Mountain View, CA, USA
T ₄ -DNA-Ligase	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot, Germany

C.6. Kits

Microspin Total RNA Kit	Peqlab, Erlangen
PowerScript Reverse Transkriptase	BD Biosciences Clontech, Mountain View, CA, USA
Fast Start DNA Masterplus CYBR Green1 Kit	Roche Diagnostics, Mannheim

C.7. Zellkulturmedium

IMDM mit L-Glutamin	PAA, Pasching, Österreich
Penicillin Streptomycin	Cambrex, Verviers, Belgium
Fetales Kalbsserum (Komplement inaktiviert 30min bei 56°C)	Biochrom, Berlin, Germany

C.8. Oligonukleotide

Hprt

HPRT as CACAGGACTAGAACACCTGC
3x7.8F GTTGGATACAGGCCAGAGTTTGT

Adora2b: NM_007413.4, Ort: 1..1844, Chr.11

Adora2b 5.0 CGCCATCCCCTTTGCCATCACCAT, 295..318
3.0 CCACCCCAGGAACGGAGTCAATC, 550..528

Bst1: NM_009763.3, Ort: 1..2336, Chr.5

Bst1 5.0 CTGGGGGCAAGAGCGCGGTGGCA, 101..124
3.0 GGAATGGGGTGCCTGGAGAG, 318..299

Ifi44: NM_133871.2, Ort: 1..2916, Chr.3

Ifi44 5.0 TTGGTGGGCTGTGATGAAGATGG, 822..844

3.0 TCGGATGGTTTGATGTGATTGGTT, 1041..1018

Irf7: NM_016850.2, Ort: 1..1830, Chr.7

Irf7 5.0 GATGCCGGGGACCTCTTGCTTCA, 946..968

3.0 GATCACCGGCTGGGGCTCTG, 1272..1253

Usp18: NM_011909.1, Ort: 1..1748, Chr.6

Usp18 5.2 AGCCCTCATGGTCTGGTTGGTT, 364..385

3.2 TGTGTCCGTGATCTGGTCCTTAGT, 690..667

C.9. Equipment

Automated Veterinary Hematological Counter	SCIL GmbH, Viernheim
CASY® Technology Cell Counter	Roche, Mannheim, Germany
Flow Cytometer FACS Calibur mit CellQuestSoftware	BD Biosciences, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop Leica	Visitronsystems GmbH Puchheim
Lichtmikroskop Leica	DMIL, Wetzlar
Mastercycler® Gradient	Eppendorf, Hamburg
LightCycler™ System	Roche Diagnostics, Mannheim
Image Reader	Herolab GmbH, Wiesloch
Begaster Inkubator: 37°C, 6.5-7 % CO2	Heraeus instruments, Hanau
Hettich Zentrifugen	Tuttlingen
Megafuge 1.0R	Heraeus instruments, Hanau
Eppendorf Centrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg
Laminar flow benches	Heraeus instruments, Hanau

C.10. Mäuse

Die Cre-Rekombinase tragenden LoxP-flankierten Mäuse wurden bereits vor Beginn dieser Arbeit wie in der Literatur beschrieben hergestellt (s. Einleitung, A.4.1.; Katz et al. 2002; Croker et al. 2004). Die konditionell deletierbare Linie wurde freundlicherweise von KH Kästner, Universität von Pennsylvania, USA, zur Verfügung gestellt und mit VAV-Cre Tieren gekreuzt, die panhämatopoetisch deletieren, freundlicherweise von Andrew Roberts, WEHI Institute, Melbourne, Australien, zur Verfügung gestellt.

Die Knochenmarkchimäre wurden wie beschrieben hergestellt (s. Einleitung, A.4.3.).

Die Tierversuche wurden nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

D. Methoden

D.1. Isolierung und Kultivierung primärer muriner Zellen

Die Tiere wurden durch CO₂-Inhalation getötet. Um die Knochenmarkzellen zu gewinnen, wurden den Tieren beide Hinterbeinknochen entnommen, mit sterilem PBS (*phosphate buffered saline*) abgewaschen und auf Eis in PBS zwischengelagert. Die anschließende Säuberung der Knochen sowie die Knochenmarkentnahme und weitere Behandlung der Zellen wurde an der sterilen Werkbank (*laminar flow bench*) durchgeführt. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden Handschuhe und Gefäßoberflächen desinfiziert. Die Femura wurden von Muskelgewebe gereinigt und mit Hilfe einer scharfen Schere auf einer Seite quer eröffnet. Mit einer Spritze mit 24G-Kanüle wurde steriles PBS in die Röhrenknochen mehrmals injiziert und aspiriert und das Knochenmark dadurch ausgewaschen. Nach Zentrifugieren und Verwerfen des PBS-Überstandes wurde das Zellpellet in fünf ml sterilem Erythrozytenlysepuffer (*PD Pharm Lyse* in Verdünnung 1:10 mit sterilem ddH₂O) resuspendiert und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Erythrozytenkontamination zu reduzieren. Nach Zentrifugieren und Verwerfen des flüssigen Überstandes wurde das Zellpellet in zehn ml sterilem Medium (IMDM + zehn % FCS, ein % P/S) aufgenommen. Um die Zelldichte von 2 bis 3 x 10⁶ zu errechnen, wurde die Zellzahl per Zellzähler bestimmt, die Zellsuspension anschließend mit gleichem Medium entsprechend verdünnt.

Nach Zugabe der Zytokine rrSCF, rhu-TPO und rhuG-CSF (zwei µl/ml Medium) wurde die Zellsuspension auf 75 cm² Flaschen mit Deckelfilter ausplattiert. Die Inkubationszeit im Brutschrank betrug zwei Nächte.

D.2. Depletion von Knochenmarkzellen durch 5-Fluorouracil-Behandlung der Mäuse

72 Stunden vor Tötung der Tiere und Entnahme der Knochen für die Herstellung einer primären Zellkultur (s. D.1.1.) wurde den Wildtypmäusen C57B16 5-Fluorouracil i.p. (0.15 mg/g Körpergewicht) injiziert zur Depletion reiferer Knochenmarkzellen (Erklärung s. Einleitung, A.5.). Nach 72 Stunden wurden die Tiere getötet, die Femura entnommen, unter der sterilen Werkbank von Muskeln gesäubert und das Knochenmark entnommen (Prozedur s. D.1.), das idealerweise nur noch hämatopoetische Progentorzellen enthalten sollte.

D.3. Retrovirale Konstrukte

D.3.1. Vektor

Als zu integrierender retroviraler Vektor diente MIEG3, welcher auf einem bicistronischen murinen Stammzellvirus (MSCV) basiert und interne Ribosomen-Eintrittsstellen (*internal ribosomal entry sites*, IRES) des Enzephalomyokarditisvirus enthält. Diese stehen dem eGFP- (*enhanced green fluorescence protein*) kodierenden Gen unmittelbar voran. Analyse der Zellen von Interesse mittels FACS oder Fluoreszenzmikroskop wird durch die Koexpression von eGFP mit dem Gen von Interesse ermöglicht. Polylinker (*multiple cloning sites*; enthalten verschiedene Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen) erlauben eine passende Insertion des Zielgens vor die IRES. MSCV als starker Promotor ermöglicht eine hohe Expression in der Zielzelle. Der MIEG3-Vektor enthält zusätzlich ein Ampicillinresistenzgen als Selektionsmarker.

D.3.2. Herstellung von Virusvektorüberständen durch Transfektion per Lipofektion

Die Virusvektorüberstände waren bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden. Die viralen Konstrukte waren zunächst geklont worden. Dies beinhaltete die Amplifikation der gewünschten *Klf4*-Sequenz per PCR. Das PCR-Produkt wurde von EcoRI und XhoI, sowie mit der ERT₂-Sequenz flankiert.

Die Vektorüberstände, die das zu übertragende Fremdgen trugen, wurden per transienter Transfektion hergestellt. Transfektion ist das Einbringen von Fremd-DNA, enthalten in einem Plasmid, in eukaryotische Kulturzellen. Dies wurde in diesem Fall transient durchgeführt, das Plasmid wurde also nur zeitweise in die Wirtszelle eingebracht; es blieb extrachromosomal. Die Einschleusung der Plasmid-DNA in In-vitro-Kulturzellen geschah per Lipofektion. Dies bedeutet das Einbringen des genetischen Materials in die Zelle per Vesikel, die mit der Wirtszellmembran fusionierten. Das Transfektionsreagenz Lipofectamine (*Lipofectamine, LifeTechnologies*) verändert die Zellmembran und erleichtert so die Fusion.

D.3.3. Infektion der Zellen mit den Vektoren

Diese Methode wurde an der sterilen Werkbank unter Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen durchgeführt. Die Zellkulturen inkubierten bei 37 °C unter CO₂-Zufuhr (fünf %). Die Vorbereitungen für diesen Versuch wurden am Vorabend getroffen. Über Nacht inkubierten zwei ml Retronektin in Petrischalen mit mehreren Vertiefungen (*wells*) im Kühlschrank, die am

nächsten Morgen vor weiterer Verwendung der *wells* vorsichtig ins Ausgangsgefäß zurück überführt und bei -20 °C für weitere Verwendungen eingefroren wurden.

Die oben genannten Vektoren waren bei -80 °C eingefroren, wurden im 37 °C warmen Wasserbad erwärmt und anschließend in einer Menge von jeweils zwei ml auf die retronektinbeschichteten *wells* überführt. Nach 30-minütiger Inkubation der Vektoren auf den *wells* im Brutschrank wurden die Überstände verworfen. Jedes *well* wurde mit einem ml des gleichen Vektorüberstands und einem ml der Zellsuspension (je nach Ausbeute 2×10^6 bis 3.5×10^6 Zellen pro *well*) beschichtet und für vier bis sechs Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit konnten unter dem Lichtmikroskop Zellvitalität sowie Zellteilungen beobachtet werden.

Der Überstand auf den *wells* wurde vorsichtig abgesaugt, um nur die am Boden adhärierenden Zellen zu bewahren. Über Nacht inkubierten die *wells* erneut im Brutschrank mit einer Beschichtung von je zwei ml zytokinhaltigem Medium (zwei μ l pro ml Medium der Zytokine rrSCF, rhuTPO, rhuG-CSF). War die Zellzahl offensichtlich gering, wurde der Überstand zentrifugiert statt verworfen und in zytokinhaltigem Medium zurück auf die *wells* gegeben.

Das Procedere wiederholte sich am nächsten Tag in ähnlicher Form. Dazu wurden zunächst die Überstände von den *wells* in Tubes überführt, zentrifugiert und in geringerer Menge (ein ml pro *well*) desselben Überstands über dem Pellet resuspendiert. Nach Behandlung der *wells* in gleicher Form wie am Vortag (30-minütige Inkubation der Vektorüberstände auf den *wells*) wurde die Zellsuspension auf die *wells* aufgeteilt, je ein ml des entsprechenden Vektorüberstands zugegeben und bis zur Sortierung der eGFP-exprimierenden Zellen (s. D.4.2.) im Brutschrank inkubiert.

D.3.4. Durch 4-OHT induzierbare Aktivierung des nukleären Proteins durch Translokation in den Zellkern

Nach Infektion der Zellen durch virale Vektoren (s. D.3.3.) und Sortierung der eGFP-markierten Zellen (s. D.4.2.) musste nun die Expression des in die Zellen eingebrachten Gens aktiviert werden. Nach dem Zählen der FACS-sortierten Zellen per Zellzähler wurde Zellmedium (IMDM, zehn % FCS, ein % P/S) mit Wachstumsmediatoren (zwei μ L SCF, G-CSF, TPO pro ml Medium) angesetzt und mit einem μ L 4-OHT pro ml Medium versetzt. Das Gemisch wurde ins Eppendorfreagenzglas überführt und bei 4500 rpm zentrifugiert. Die Zellen wurden im vorbereiteten, 4-OHT haltigen Medium einer Konzentration von 1×10^6 resuspendiert. Anschließend wurden sie für 18 Stunden im Brutschrank inkubiert und dann der Überstand nach Zentrifugieren abgesaugt und die Zellen bei -18 °C eingefroren.

D.4. Fluorescence assisted cell sorting (FACS)

D.4.1. FACS-Analyse der Zellen deletierter Mäuse

Für die FACS-Analyse (*fluorescence assisted cell sorting*, Vierfarben-Durchflusszytometer) der lymphatischen Zellen aus dem peripheren Blut von *Klf4^{fl/fl}*- und *Klf4^{WT}*-Mäusen wurde zehn bis 20 μ l Blut jedes Versuchstiers mit den Antigen-Antikörper-Komplexen Ly6C FITC, B220 PE und CD11b APC gekoppelt an Streptavidin, markiert. Dazu wurden die Blutproben mit 0.2 μ l jedes Antikörpers pro Probe, gelöst in 90 μ l FACS-Puffer pro Probe, bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht 20 Minuten schwenkend inkubiert, FACS-Puffer im Überschuss hinzugefügt und zentrifugiert (Tischzentrifuge 4500 rpm für fünf Minuten bei vier °C). In einem zweiten Schritt wurde mit Streptavidin in 100 ml FACS-Puffer pro Probe im Verhältnis 1:1000 gelöst und für 15 Minuten inkubiert.

Nach Lysieren der Erythrozyten mittels 10x Lysepuffer (in 1:10 Verdünnung mit ddH₂O) und zehnminütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben ein Mal gewaschen und in je 250 μ l FACS-Puffer aufgenommen und mittels FACS analysiert.

Für die FACS-Analyse der Monozyten aus Milz und Knochenmark von Knochenmarkchimären wurden den Tieren Milz und Knochenmark entnommen. Die Milz wurde jeweils mit einem Stempel ausgedrückt, um die Zellverbände so gut wie möglich zu lösen. Die gelösten Zellen wurden in einen ml Zellkulturmedium gegeben. Das Knochenmark wurde nach Reinigung der Knochen unter der sterilen Werkbank entnommen. Milzzellsuspension sowie Knochenmarksuspension wurden mit einem Gemisch aus den Antikörpern Ly6C (Al-21), Cd11b, B220 und Cd45 durch Mischen von 100 μ l FACS-Puffer pro Zellprobe und 0,2 μ l jedes Antikörpers pro Zellprobe für 20 Minuten unter Ausschluss von Licht und wie im oberen Abschnitt beschrieben mit Streptavidin inkubiert sowie von Erythrozyten befreit. Nach Resuspension der Zellpellets in 250 μ l FACS-Puffer ohne Natrium-Azid wurden die Zellen per FACS analysiert.

D.4.2. Zellsortierung mit Selektion per FACS

Für die Zellsortierung und -selektion der Ly6C^{high}-Monozyten aus den Knochenmarkzellen von *Klf4^{fl/fl}*- und *Klf4^{WT}*-Mäusen wurde das Knochenmark der Tiere, wie in Abschnitt D.1. beschrieben, entnommen und behandelt. Die Knochenmarkzellen wurden mit den Antikörpern gegen Ly6C^{high} und Cd11b angefärbt (0,02 μ l jedes Antikörpers pro 10⁵ Zellen zusammen mit Zellmedium in 100facher Menge, Inkubation 20 Minuten im Dunkeln) und in 500 μ l FACS-Puffer ohne Natrium-

Azid resuspendiert. Die Zellsortierung samt Selektion (Sammeln) der Zellen fand im Deutschen Rheumaforschungszentrum Berlin statt.

Für die Zellsortierung und –selektion der mit den retroviralen Konstrukten samt eGFP-transduzierten hämatopoetischen Progenitoren wurden die Zellsuspensionen jeweils in 15 ml-Reagenzgläser überführt. Um auch die adhärierenden Zellen aus den *wells* entnehmen zu können, wurde der Boden der *wells* mit kaltem sterilen PBS durch mehrmaliges Pipettieren abgewaschen und der Überstand in dieselben Reagenzgläser überführt. Aus demselben Grund wurde je ein ml *cell dissociation buffer* (mit EDTA) auf die *wells* gegeben, zehn Minuten auf Eis gelagert und in dieselben Reagenzgläser überführt. Der Erfolg wurde unter dem Lichtmikroskop überprüft.

Nach Zentrifugation der Zellsuspensionen bei 1500 rpm, fünf Minuten, vier °C und Verwerfen des flüssigen Überstandes über den Pellets wurden diese in je 300 µl sterilem Medium aufgenommen und zum Abfangen von ungelösten Zellverbänden mit Hilfe von Filterreagenzgläsern gesiebt.

Nach Sortierung der eGFP-markierten Zellen im deutschen Rheumaforschungszentrum wurden diese in drei ml sterilem Medium aufgefangen und –wegen der semisterilen Bedingungen des FACS-Sorters- vor weiterem Vorgehen ein Mal mit Medium gewaschen. Die durch Zentrifugation erhaltenen Zellpellets wurden in zytokinhaltigem Medium resuspendiert in der Menge für eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml. Auf 48- oder 96-*well*-Platten inkubierten die Zellen zwei bis drei Nächte im Brutschrank. Der Erfolg der Zellproliferation wurde nach dieser Zeit durch Zellzählung abgeschätzt.

D.5. Analyse hämatopoetischer Parameter

Um das Blutbild von C57Bl/6 Mäusen mit wildtypischem Genom und mit *Klf4*-Deletion zu erstellen, wurden jedem Tier einige ml Blut aus der Schwanzvene entnommen und per automatischem Zellzähler (*automated veterinary hematological counter ABC*) mit dem spezifiziertem Programm für murines Blut analysiert.

D.6. Isolierung der Gesamt-RNA

Die Umsetzung fand unter RNase freien Bedingungen statt, einschließlich der Benutzung sauberer Handschuhe, Einmalpipetten und hitzesterilisierter Gefäße sowie unter Verwendung von DEPC-Wasser als Lösungsmittel. Oberflächen und Material wurden vor Inanspruchnahme mit DEPC-Wasser ausgespült.

Die vollständige RNA der Zellen (einschließlich mRNA, tRNA, rRNA, *small nuclear* RNA) wurde mit Hilfe des *peqGOLD MicroSpin Total RNA Kit (Peqlab Biotechnology)* isoliert.

Eine aufzuschlüsselnde Probe sollte nicht mehr als 5×10^5 Zellen enthalten.

Für die Herstellung der Lösung zur Suspension der eingefrorenen Zellen wurden 359 μ l QVL-Puffer pro Probe mit 20 μ l 2-Mercaptoethanol pro ml QVL-Puffer gemischt. Jedes Pellet wurde mit 350 μ l dieser Lösung resuspendiert und anschließend sieben Mal durch eine 27G-Kanüle passiert. Nun wurden 350 μ l Ethanol (unvergällt, 70 %) hinzu pipettiert, gut gemischt und auf eine im Kit enthaltene, in einem Sammelreagenzglas steckende Säule überführt. Es folgte die Zentrifugation der Proben bei 10.000 g für 15 Sekunden bei Raumtemperatur. Säulendurchfluss und Sammelreagenzgläser wurden verworfen.

Zum Waschen der Proben wurden 500 μ l RNA-Puffer I des Kits auf die Säulen pipettiert, nachdem sie in ein frisches Sammelreagenzglas gesteckt worden waren. Bei 10.000 g wurde für eine Minute zentrifugiert. Eine zweite und dritte Waschung fand auf gleiche Weise statt unter Verwendung des RNA-Waschpuffers II des Kits. Dieser musste vor Versuchsbeginn mit Ethanol (unvergällt, 100 %, vierfache Menge) verdünnt werden. Bei 30.000 g wurde 30 Sekunden zentrifugiert und der Säulendurchfluss anschließend verworfen. Durch Zentrifugation bei Höchstgeschwindigkeit wurden die Proben zwei Minuten lang getrocknet. Für die bevorstehende Elution der RNA wurden die Säulen mit den Proben in frische Sammelreagenzgläser gesteckt. Auf jede Probe wurden – möglichst zentral auf die Membran - 20 μ l DEPC-Wasser (auf 70 °C vorgewärmt) pipettiert und für eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Das Procedere wurde wiederholt: Die Lösung im Sammelreagenzglas wurde erneut auf die Säulenmembran gegeben, drei Minuten bei 70 °C inkubiert und wie vorher zentrifugiert.

Um den RNA-Gehalt zu messen, wurden zwei μ l der eluierten RNA in 68 μ l DECP-Wasser überführt und gemessen (s. folgender Abschnitt).

Die anschließende Lagerung wurde bei –80 °C durchgeführt.

D.7. Photometrische Determinierung des RNA-Gehalts

Um den RNA-Gehalt der Zellen zu bestimmen, wurden die isolierten RNA-Proben im Verhältnis 1:34 mit DECP-Wasser verdünnt und per Photometer bei einer Wellenlänge λ von 260 nm gemessen. ($A_{260\text{nm}}=1$ entspricht einer RNA-Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$). Die RNA-Konzentration wurde automatisch errechnet aus der gemessenen Absorption, des Dilutionsfaktors und des optimalen Dichtefaktors der RNA. Die Reinheit der isolierten Probe wurde durch das Verhältnis der Absorption $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ errechnet (größer als 1,8).

D.8. Genexpressionsanalyse

Die vollständig isolierte, eingefrorene RNA wurde für die Genexpressionsanalyse mit der *Affymetrix® GCOS* Software nach der Methode *GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 microarray* analysiert.

Bei dem Prinzip sind bekannte einzelsträngige Oligonukleotidsequenzen (*probe sets*) des Mausgenoms auf einer beschichteten Glasoberfläche (*microarray*) befestigt. Anhand von elf Paaren der Oligonukleotidsequenzen, bestehend aus passenden (*perfect matches*) und nicht passenden (*mismatches*) Sequenzen, wird die Transkriptionsmenge jeder auf dem *GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 microarray* vertretenen Sequenz gemessen.

Die mRNA von Interesse wird zunächst revers transkribiert, mit einem Fluorophor markiert und hybridisiert und auf den *microarray* aufgetragen, der anschließend abgelesen wird. Sobald die Probe ein Transkript der Sequenz komplementär zum Oligonukleotid des *microarrays* enthält, gibt es genau an diesem spezifischen Ort ein Fluoreszenzsignal. Die Signalintensität ist proportional zur Menge an komplementären Transkripten und lässt so eine quantitative Analyse der mRNA zu. Auf diese Weise analysieren 45.000 Sequenzsonden (*probe sets*) die Expression von über 39.000 Transkripten und Varianten von über 34.000 bekannten Mausgenen.

Entnommen wurden die Sequenzen der *probe sets* aus den Genbanken *dbEST* und *RefSeq*. Das Sequenzcluster wurde nach der *UniGene database* entworfen und dann durch Vergleich mit dem *Whitehead Institute Center for Genome Research* verfeinert.

Diese Methode erlaubte den Vergleich der Genexpression der Monozyten von Mäusen mit *Klf4*-Deletion und von Wildtypen.

D.9. Reverse Transkriptase der RNA zur Generierung von cDNA

Diese Methode dient der Amplifikation von RNA. Da die RNA selbst jedoch nicht in der PCR eingesetzt werden kann, wird sie zunächst mit Hilfe einer reversen Transkriptase in einzelsträngige komplementäre DNA (cDNA) überführt. Dies geschieht durch die RNA-abhängige Polymeraseaktivität der reversen Transkriptase. In dieser Arbeit kam eine aus dem *moloney murine leukemia virus* (MMLV) isolierte und in *E.coli* rekombinant hergestellte reverse Transkriptase zum Einsatz. Eine derartige reverse Transkriptase ermöglicht die Herstellung relativ großer cDNA-Längen und eignet sich daher insbesondere für die Klonierung von cDNA. Außerdem ist für die Reaktion die Anwesenheit von Startermolekülen (Primern), dNTPs und einem geeigneten Puffer notwendig. Die hier verwendeten Oligo(dT)-Primer waren 15 bis 20 nt lang. Derartige Primer können an die RNA binden und hybridisieren im Bereich des Poly(A)-Schwanzes am 3'-Ende der

mRNA, so dass aus der Gesamt-RNA ausschließlich und selektiv mRNA-Moleküle in cDNA umgeschrieben werden. Ein RNase-Inhibitor schützt die RNA vor RNAsen. Die neu entstandene cDNA kann nun für die Polymerase-Kettenreaktion verwendet werden. Selbst geringe Mengen an RNA können mit dieser Methode nachgewiesen werden.

Im ersten Schritt wurde die einzelsträngige cDNA hergestellt. Die RNA diente als Template.

In einem Eppendorfröhrchen wurden sechs µl der RNA mit einem µl OligodT Primer, einem µl dNTP (zehn mM-Mix) und zwei µl RNase freiem Wasser (DEPC-Wasser) gut gemischt und bei 65 °C für fünf Minuten inkubiert, um Primer und RNA zu denaturieren. Anschließend wurde die Probe auf Eis gestellt und ein µl RNase Inhibitor, vier µl *5x PrimeScript Buffer* und 0.5 µl *PrimeScript Enzyme Mix* (RTase) hinzugefügt. Nach vorsichtigem Mischen wurde die Probe bei 42 °C für 60 Minuten inkubiert. Die reverse Transkription fand nun statt. Bei 70 °C wurde die reverse Transkriptase daraufhin während 15 Minuten inaktiviert. Nach Abkühlung auf Eis wurde die cDNA bei -20 °C aufbewahrt.

Erst in einem weiteren Schritt folgte per *real time* PCR die Synthese des komplementären Doppelstrangs und die Amplifikation der cDNA (s. D.10.2.).

D.10. Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction* - PCR)

D.10.1. Quantitative und semiquantitative PCR (Gradient-PCR)

Bevor die eigentliche PCR der gewünschten Proben durchgeführt werden können, muss zunächst die optimale *annealing*-Temperatur jedes Primerpaars, bei der es sich an die cDNA bindet, empirisch bestimmt werden. Dazu amplifizieren die Primer cDNA hämatopoetischer Zellen bei unterschiedlichen *annealing*-Temperaturen. Anschließend kann nach physikalischer Auftrennung der Produkte auf dem Agarosegel erkannt werden, bei welcher Temperatur das Produkt eindeutig und ohne Nebenprodukte amplifiziert wurde.

Für die Herstellung des entsprechenden Gemisches für die PCR wurden je acht µl einer 25 µM-Verdünnungen des *sense* und *antisense* Primers mit 84 µl ddH₂O gemischt und davon je zehn µl in die PCR-Reaktionsgefäße zu einem µl Template (cDNA; 1:10 verdünnt), 0.15 µl Roboklon Taq, 2.5 µl PCR-Puffer B, 0.5 µl dNTP und 10.85 µl ddH₂O gegeben.

Im *Thermocycler* wurden 45 Zyklen nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Initiale Denaturierung: 94°C, 5 min.
Denaturierung: 94°C, 25 sec.
Annealing: 58°C, 25 sec.
Elongation: 72°C, 40 sec.
Finale Elongation: 72°C, 7 min.
Cooling: 4 °C

D.10.2. Real time quantitative PCR

Die quantitative *real time* PCR (*LightCycler*® System) ermöglicht die Erfassung der PCR-Produkte bereits während ihrer Bildung (Echtzeit). In einem Vier-Stufen-Zyklus wird die DNA amplifiziert, bestehend aus Denaturierung (Aufschmelzen der Doppelstränge) bei 95 °C, Anlagerung der Primer (*annealing*) bei primerspezifischer Temperatur, Elongation (Amplifikation) bei 72 °C und Messung der Fluoreszenz. Eine genaue Quantifizierung der Ausgangs- bzw. Zielnukleinsäuren ist mit Hilfe eines DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffs – *SYBR Green* – durch die Messung der Fluoreszenz nach jedem einzelnen Reaktionszyklus möglich. Die Farbstoffmoleküle binden mit hoher Spezifität an die kleine Furche doppelsträngiger DNA. Sie werden durch einen Laserstrahl angeregt und emittieren nach Bindung bei 530 nm. Die Intensität der Fluoreszenz ist direkt proportional zur Menge an gebildeten PCR-Produkten.

Nach dem letzten Zyklus wird die DNA durch Erhitzen auf 95 °C denaturiert, durch Abkühlen auf 55 °C wieder zusammengefügt und durch langsames Erhitzen auf 95 °C erneut denaturiert. Bei diesem Schritt wird in Intervallen von 0.2 °C die Fluoreszenz gemessen und eine Schmelzkurve erstellt. Sie ist abhängig von DNA-Zusammensetzung und -Länge und dadurch spezifisch für jedes PCR-Produkt. Die produktspezifische Schmelztemperatur ist definiert als Temperatur, bei der 50 % der DNA als Doppelstrang und 50 % als Einzelstrang vorliegen. Für die Bestimmung wird das Integral der Schmelzkurve errechnet, wobei der Maximalwert am Umkehrpunkt der Schmelzkurve liegt. Die Temperatur kurz unterhalb der produktspezifischen Schmelzkurve wird bestimmt und als Fluoreszenzmessungstemperatur T_m definiert. Dadurch soll ausgeschlossen werden, dass auch kleinere unspezifische Produkte, wie Primerdimere, gemessen werden und die Messgenauigkeit herabsetzen.

Der erste Schritt der in der vorliegenden Arbeit verwendeten *real time* PCR mit *fast start* beinhaltet eine Vorinkubation für zehn Minuten bei 95 °C. Dadurch wurde die bei Raumtemperatur inaktive Taq-Polymerase aktiviert. So konnte verhindert werden, dass sich vor dem Start der PCR unspezifische Primerbindungen bildeten.

Die für die PCR benötigten Komponenten waren neben der zu amplifizierenden cDNA (für die Verdünnungsreihe 2.5 µl, für die Probe selbst 7.5 µl): Wasser (DNase frei; fünf µl pro Probe), Primer *antisense* und *sense* (zehn µM; ein µl pro Probe) und ein *mastermix* (1.5 µl pro Probe). Dieser wurde zuvor hergestellt, indem 14 µl der Taq-Polymerase zur Reaktionsmischung aus Reaktionspuffer, MgCl₂, *SYBR Green*1 und Desoxyribonukleintriphosphate mit dUTP statt dTTP hinzugegeben wurde.

Das Gemisch wurde in vorgekühlte Kapillaren (*LightCycler*® *Systems*) pipettiert, bei 1800 rpm für zwei Minuten zentrifugiert und mit dem entsprechenden Programm per *real time* PCR amplifiziert und gemessen.

D.11. Herstellung und Beladung eines Agarosegels

Zur Herstellung eines 1,5 prozentigen Agarosegels wurde Agarosepulver in 1,5 prozentiger Konzentration in TAE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle in Lösung gebracht. Nach Abkühlen auf ca. 60 °C wurde Ethidiumbromid (zehn ng/ml) hinzugegeben. Anschließend wurde die Lösung auf eine horizontale Form mit Gelkammern für die aufzutrennende amplifizierte DNA aufgetragen und durch abkühlen erhärtet. Die Proben wurden nach Erhärten auf das Gel aufgetragen und bei einer Stromstärke von 80 V für ca. 45 Minuten aufgetrennt. Anschließend wurde die Auftrennung durch Fotografieren mit der Gelkamera erkenntlich gemacht.

D.12. Mikroskopie

D.12.1. Vorbereitung des Objektträgers

Mit Hilfe der Zellzentrifuge (*Cytospin*) wurden bei 560 rpm für fünf Minuten 100 µl der sortierten Zellsuspension, bestehend aus Ly6C^{high}-Monozyten aus dem Knochenmark von Klf4^{fl/fl}- und Klf4^{WT}-Mäusen resuspendiert in einem ml Nährmedium, unter Erhalt der Zellintegrität einschichtig auf einen Objektträger gebracht. Dies bedeutete eine Zelldichte von ca. 1 bis 10 x 10⁵ Zellen. Vor dem Anfärben wurde der Objektträger mindestens eine Stunde luftgetrocknet und anschließend zehn Minuten lang in Ethanollösung, 99 %, fixiert.

D.12.2. Pappenheim-Färbung

Die *Pappenheim*-Färbung ist eine Färbemethode für alkoholfixiertes Zellmaterial und dient der Unterscheidung verschiedener Zelltypen unter dem Mikroskop. Sie setzt sich aus der *Mayer-Grünwald*- und der *Giemsa*-Färbung zusammen.

Vor der Färbung wurde der zellenbehaftete Objektträger luftgetrocknet und in Ethanol fixiert, dann drei Minuten in *May-Grünwald*-Lösung, direkt im Anschluss 20 Minuten in *Giemsa*-Lösung gebadet und zum Schluss drei bis fünf Minuten mit H₂O gewaschen.

Nun erfolgte die morphologische Begutachtung der sortierten Zellen unter dem Lichtmikroskop mit fotografischer Archivierung (s. Ergebnisse, Abb. E.2.).

D.12.3. Fluoreszenzmikroskop

Um den Erfolg der Transduktion der retroviralen Konstrukte in hämatopoetische Vorläuferzellen zu überprüfen, wurde die eGFP-Expression der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von 470 bis 490 nm betrachtet (s. Einleitung, A.7.).

E. Ergebnisse

E.1. Deletion von *Klf4* hat Auswirkung auf Ly6C^{high}-Monozyten

Anlass für die Untersuchung der Rolle von *Klf4* für Monozyten gaben verschiedene Experimente, die dieser Arbeit vorausgingen. Feinberg et al. beschrieben 2005 die Rolle von KLF4 in der proinflammatorischen Signalübertragung in humanen Makrophagen. In einer weiteren Arbeit zeigten Feinberg et al. 2007, dass KLF4 in humanen Blutmonozyten sowie in weiteren Monozytenzelllinien verstärkt exprimiert wurde. In der HL60-Zelllinie unterstützte KLF4 die Differenzierung in reife Monozyten und induzierte myeloidzellspezifische Marker. In Mausmonozyten konnten Feinberg et al. eine stadiumspezifische Expression von *Klf4* während der Myelopoese zeigen. In dieser Studie wurde auch beschrieben, dass myeloide Vorläuferzellen und hämatopoetische Stammzellen von Mäusen mit *Klf4*-Deletion (Cre-Rekombinase-tragende *Klf4*loxP-Mäuse) 56 % weniger Monozyten und 36 % mehr Granulozyten produzierten.

Innerhalb der Arbeitsgruppe war bekannt, dass *Klf4* in murinen Ly6C^{high}-Monozyten relativ hoch exprimiert wurde und dass bei Deletion von *Klf4* in Knochenmarkchimären diese Subpopulation der Monozyten kaum im Knochenmark vorhanden war.

Alder et al. kamen zu sehr ähnlicher Erkenntnis, was 2008 - kurz nach der Durchführung der Versuche für diese Arbeit - veröffentlicht wurde. Sie zeigten, dass Ly6C^{high}-Monozyten im peripheren Blut von *Klf4*-deletierten Mäusen kaum vorhanden waren.

Ein wesentlicher Schritt in der Erforschung von *Klf4* war die Möglichkeit von In-vivo-Studien durch konditionellen Knockout mit spezifischer Deletion in bestimmten Geweben, so dass die deletierten Tiere überlebensfähig waren (Georgiades et al. 2002).

In diesem Teilabschnitt werden In-vivo-Experimente und Ergebnisse vorgestellt, die den Einfluss der *Klf4*-Deletion auf Monozyten zeigten. Diese Experimente wurden an zwei Deletionstypen durchgeführt, um eine größere Validität zu erreichen, etwa durch Ausschluss von Positionseffekten. Bei dem einen Deletionstypen wurde die Deletion mittels Vav-Cre-transgenen Mäusen erreicht (s. Einleitung, A.4.1.). Derart veränderte Mäuse können dazu verwendet werden, eine LoxP-flankierte Gensequenz in adulten hämatopoetischen und endothelialen Zellen zu inaktivieren. Im murinen Vav-Gen befinden sich regulierende Sequenzen für die direkte panhämatopoetische Expression der Rekombinase Cre, die LoxP-Sequenzen erkennt. Eine Vav-Cre-vermittelte Rekombination tritt in fast allen hämatopoetischen Zellen aller hämatopoetischen Organe, einschließlich im Knochenmark, auf sowie in den meisten Endothel- und Keimzellen,

aber nur vereinzelt in anderen Zellarten. Die derart deletierten Mäuse werden in dieser Arbeit wie folgt abgekürzt: $Klf4^{fl/fl}$, im Vergleich zu Wildtypen mit nativem Genom: $Klf4^{WT}$.

Bei dem anderen hier untersuchten Deletionstypen wurden fetale Leberzellen von Mäusen mit konventioneller $Klf4$ -Deletion (durch homologe Rekombination, s. Einleitung, A.4.2.) in zuvor letal bestrahlte CD45.1-Mäuse transplantiert (Segre et al. 1995, s. Einleitung, A.4.3.). Das erlaubte das Überleben der Tiere, da die Deletion nur im Knochenmark vorhanden war.

Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung waren hierzu noch keine Publikationen vorhanden.

E.1.1. Verminderte Anzahl von $Ly6C^{high}$ -Monozyten im peripheren Blut von $Klf4^{fl/fl}$ -VAV- Cre-Mäusen

Die Folgen einer $Klf4$ -Deletion wurden zunächst an der durch Vav-Cre-Rekombinase deletierten Maus untersucht (s. E.1. und Einleitung, A.4.1.). Von Bedeutung war hier die Deletion im Knochenmark, um myeloide Zellen zu untersuchen. M. Milanovic hatte experimentell gezeigt, dass die Deletion von $Klf4$ zweifelsohne in Vorläuferzellen des Knochenmarks von Mx-Cre-transgenen Mäusen vorhanden war (Milanovic, 2005).

Es sollte die Anzahl der myeloiden Zellen im peripheren Blut von $Klf4^{fl/fl}$ - und $Klf4^{WT}$ -Mäusen verglichen werden. Dafür wurde Blut aus der Schwanzvene der Mäusepopulationen (im Alter von acht bis 16 Wochen) entnommen und mit den Antikörpern gegen Ly6C (AL-21), CD11b, und B220 angefärbt. B-Lymphozyten sind B220 positiv. Um diese auszuschließen, wurden alle Zellen mit B220 angefärbt. Der Antikörper Cd11b markiert Zellen der myeloiden Reihe ($Cd11b^+$, B220⁻).

Ly6C ist ein Marker für Monozyten, wobei spezifisch „inflammatorische“ CCR2-positive Monozyten den entsprechenden Rezeptor hochgradig exprimieren, während er von CCR2-negativen Monozyten kaum exprimiert wird (s. Einleitung, A.3.1.2.). Sie gelten als Ly6C-negativ ($Ly6C^{neg}$) und B220-negativ (B220⁻).

Anschließend wurden die Erythrozyten in den Proben lysiert, da diese hier nicht von Interesse waren und die Analyse gestört hätten.

In der FACS-Analyse waren $Ly6C^{high}$ - (und $Cd11b^+$, B220⁻) Monozyten kaum bis gar nicht im Blut der $Klf4$ -deletierten Mäuse vorhanden (s. Fig. E.1., Fig. E.2.). Sie waren um das 14fache reduziert. Die zweite große Gruppe der murinen Monozyten, $Ly6C^{neg}$ - (und $Cd11b^+$, B220⁻) Monozyten, waren im Blut von $Klf4$ -deletierten Mäusen im Vergleich zum Blut von

Wildtypmäusen nicht signifikant reduziert (Ratio 1,11; s. Fig. E.1.). Auch neutrophile Granulozyten (Ly6C^{int} , Cd11b^+ , B220^-) zeigten nur einen geringen Unterschied in ihrer Anzahl (s. Fig. E.1.).

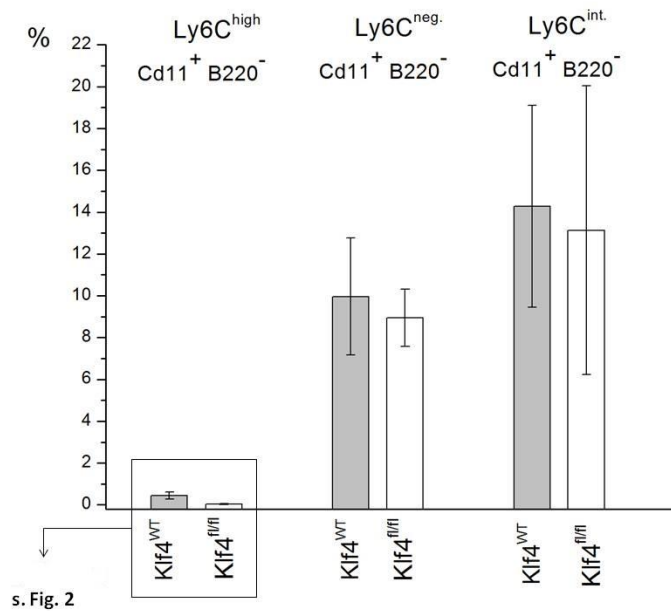


Fig. E.1.: Prozentualer Anteil unterschiedlicher Zellpopulationen wildtypischer (Klf4^{WT}) und deletierter ($\text{Klf4}^{\text{fl/fl}}$) Mäuse im peripheren Blut: $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ - ($\text{Cd11b}^+ \text{B220}^-$) Monozyten, $\text{Ly6C}^{\text{neg.}}$ - ($\text{Cd11b}^+ \text{B220}^-$) Monozyten, $\text{Ly6C}^{\text{int.}}$ - ($\text{Cd11b}^+ \text{B220}^-$) neutrophile Granulozyten.

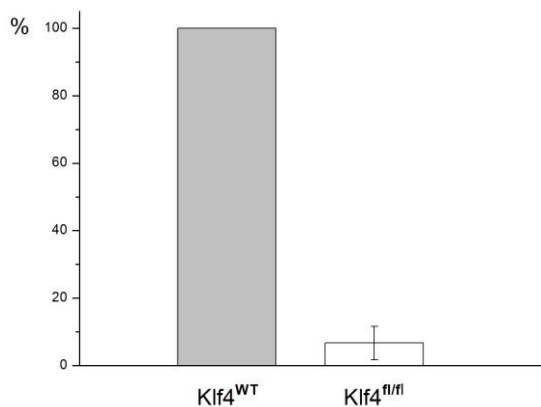


Fig. E.2.: $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ -Monozyten deletierter Mäuse (weißer Balken, $\text{Klf4}^{\text{fl/fl}}$) im Vergleich zu wildtypischen Mäusen (grauer Balken, Klf4^{WT}) im peripheren Blut: Reduktion um ca. 93 %. $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ -Monozyten waren im Blut der $\text{Klf4}^{\text{fl/fl}}$ -Mäuse kaum bis gar nicht vorhanden. Hier wurde die statistische Methode *Boxplot* angewandt.

E.1.2. Ly6C^{high}-Monozyten aus dem Knochenmark von Klf4^{fl/fl}- und Klf4^{WT}-VAV-Cre-Mäusen

Für ein genaues Bild der Ly6C^{high}-Monozyten im Knochenmark der Klf4^{fl/fl}-VAV-Cre-Mäuse wurden diese nach Markierung per FACS detektiert und isoliert. Definitionsgemäß wurden Zellen entsprechend ihres Phänotyps Ly6C^{high}, Cd11b⁺ und B220⁻ selektiert. Dieser Versuch wurde auf beschriebene Weise (s. Methoden, D.4.2.) drei Mal unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Anschließend wurde die Morphologie der Ly6C^{high}-Monozyten aus beiden untersuchten Populationen lichtmikroskopisch betrachtet (s. E.1.2.2.) sowie RNA für eine Genexpressionsanalyse isoliert (durch Affymetrix: GeneChip[®] Mouse Genome 430 2.0 Array, s. E.1.2.3.; Vorgang von der Zellsortierung bis zur Genexpressionsanalyse s. Abb. E.1.)

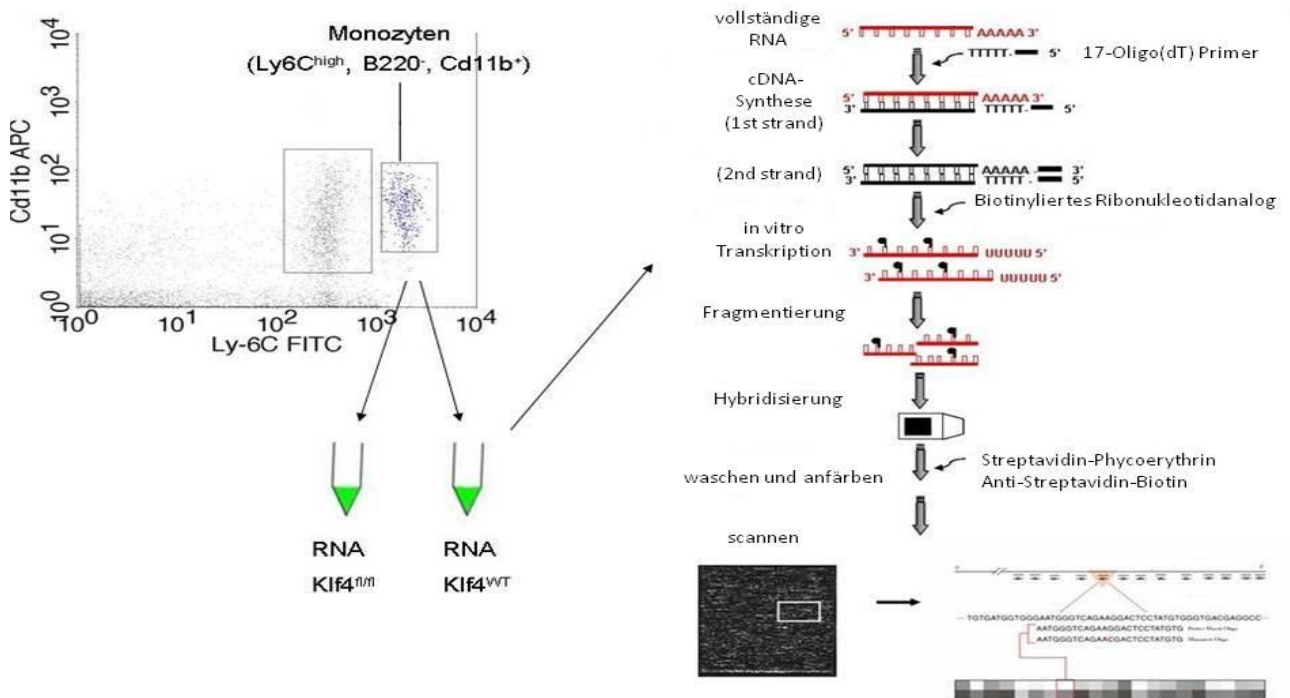


Abb. E.1.: Zellsortierung der Ly6C^{high}-Monozyten (markiert als Ly6C^{high}, B220⁻, Cd11b⁺) von Klf4^{WT}- und Klf4^{fl/fl}-Mäusen und anschließende Genexpressionsanalyse (durchgeführt von Affymetrix GeneChip[®] Mouse Genome 430 2.0 Array; rechter Teil der Abbildung entnommen von Affimetrix; modifiziert). Genauere Erklärung hierzu s. Methoden, D.4.2. bis D.8..

E.1.2.1. Reduzierte Anzahl Ly6C^{high}-Monozyten im Knochenmark von Klf4^{fl/fl}-VAV-Cre-Mäusen

Die Anzahl der positiven Zellen in der *Klf4*-deletierten Gruppe betrug im Mittel 44,6 % im Vergleich zu Kontrollgruppe (s. Fig. E.3.). Dies entspricht einer Reduktion um 55,4 %.

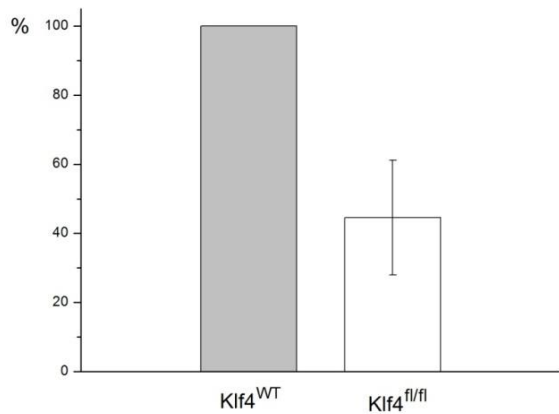


Fig. E.3.: Prozentualer Anteil der Ly6C^{high}-Monozyten deletierter Mäuse (Klf4^{fl/fl}, weißer Balken, ca. 45 %) im Vergleich zu Wildtypen (Klf4^{WT}, grauer Balken, 100 %) im Knochenmark: Reduktion um ca. 55 %.

E.1.2.2. Morphologie der Ly6C^{high}-Monozyten des Knochenmarks von Klf4^{fl/fl}-VAV-Cre-Mäusen und Wildtypen

Mit Hilfe des Zellzentrifuge (*Cytospin*; Auftragen einer Zellschicht auf Objektträger) konnte der Phänotyp der Ly6C^{high}-Monozyten aus dem Knochenmark nach Sortierung der Zellen per FACS beurteilt werden. Unter dem Lichtmikroskop waren keine offensichtlichen Unterschiede zwischen Ly6C^{high}-Monozyten von Klf4^{fl/fl}-VAV-Cre-Mäusen und von Klf4^{WT}-VAV-Cre-Mäusen zu erkennen (Abb. E.2. und Abb. E.3.).

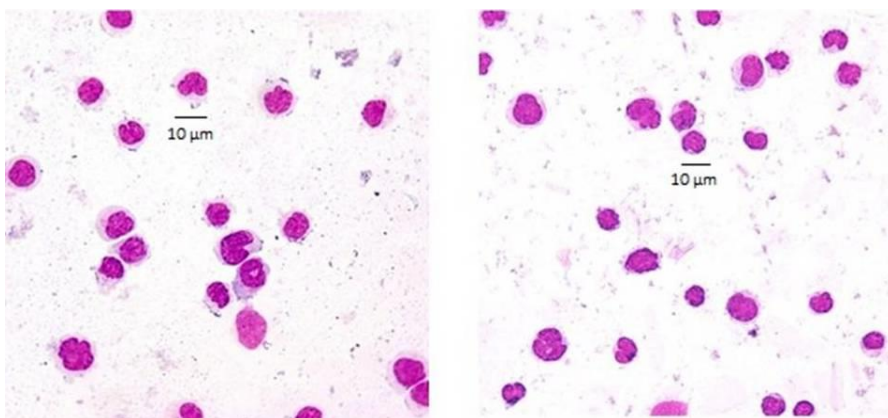


Abb. E.2.: Lichtmikroskopisches Bild der Ly6C^{high}-Monozyten von Wildtypen (linkes Bild) und Klf4^{fl/fl}-VAV-Cre Mäusen (rechtes Bild).



Abb. E.3.: Ly6C^{high}-Monozyt (Wildtyp) in vergrößerter Form.

E.1.2.3. Genexpressionsanalysen der Monozyten-RNA im Vergleich

Nachdem die Auswirkung der *Klf4*-Deletion auf die Anzahl der Ly6C^{high}-Monozyten dargestellt worden war, war nun die Auswirkung auf die genetische Information der Zelle von Interesse:

Welche Folgen hatte die *Klf4*-Deletion für die Genexpression in Ly6C^{high}-Monozyten?

Auf welche Proteine hatte *Klf4* eine regulierende Wirkung, die sich womöglich bei Deletion durch veränderte Expression auswirkt?

Für diesen Zweck wurde eine globale Genexpressionsanalyse aus der RNA der zuvor isolierten Ly6C^{high}-Monozyten durchgeführt (s. Abb. E.1., durchgeführt von *Affymetrix* mittels *GeneChip*[®] *Mouse Genome 430 2.0 Array*). Der Vergleich der Analysen von ca. 45.000 Transkripten aus drei unabhängig voneinander isolierten Probenpaaren ergab die Anzahl von 83 höher und 177 niedriger exprimierten Transkripten der in Wildtypen gereiften Ly6C^{high}-Monozyten im Vergleich zu den in konditionell deletierten Mäusen gereiften Monozyten. Figur E.4. und Tabelle E.1. stellen die in Wildtypen (bei Anwesenheit von *Klf4*) höher exprimierten Gene dar. Figur E.5. und Tabelle E.2. stellen die in Wildtypen niedriger exprimierten Gene dar. Um die Expressionsstärke nachvollziehen zu können, ist in den Diagrammen (Fig. E.4. und Fig. E.5.) jeweils die Ratio der Expression im Wildtyp/*Klf4*-Deletion für jedes Gen dargestellt. Die Grenze für die Signifikanz wurde für durch *Klf4* induzierte Gene bei einer Ratio von 1,69, für durch *Klf4* reprimierte Gene bei 0,59 gezogen (ausgeschlossen sind Gene mit p-Wert der Log-Ratio Variation > 0,01).

Die Gene sind –in Diagramm und Tabelle- nach Expressionsstärke geordnet.

Anzumerken ist, dass die Frage nach direkter oder indirekter Regulierung der Transkripte durch *Klf4* hier nicht geklärt werden konnte. Dieser Frage sollte erst später nachgegangen werden (s. folgender Abschnitt E.2.).

Bei Anwesenheit von Klf4 (Wildtyp) stärker exprimierte Transkripte

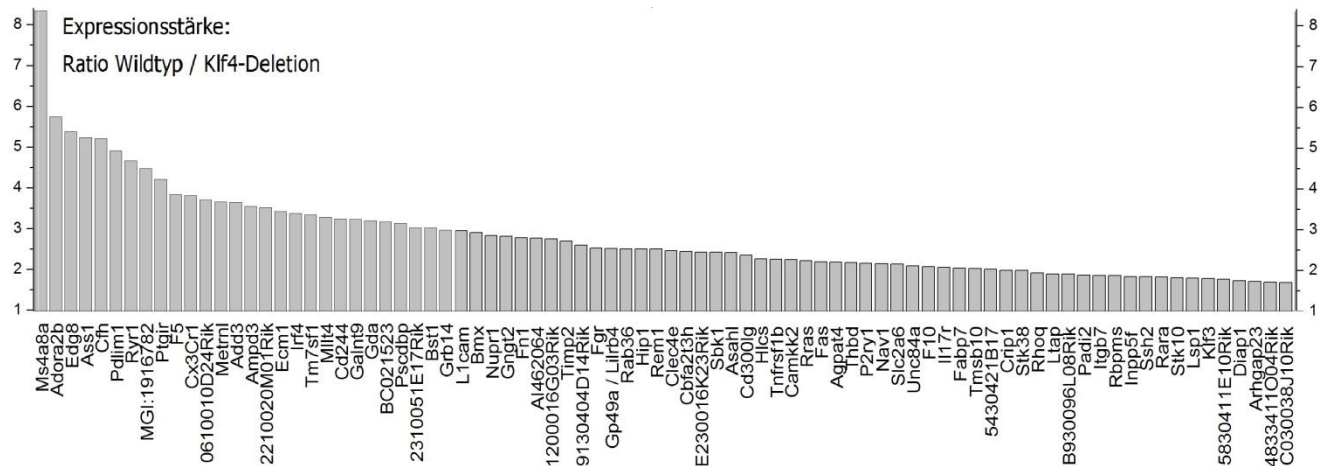


Fig. E.4.: Expressionsstärke der durch Klf4 beeinflussten Gene dargestellt als Ratio der Expressionsstärke in Ly6C^{high}-Monozyten von Wildtypen und *Klf4*-deletierten Mäusen. Ms4a8a ist im Wildtypen 8,34 Mal stärker exprimiert als in der *Klf4*-deletierten Maus und damit am stärksten induziert. Am anderen Ende steht C030038J10Rik. Es ist 1,69 Mal stärker exprimiert. $P \leq 0,01$.

Gen	Protein und beschriebene Funktion	Literaturnachweis	Expressionsstärke (Ratio Wildtyp/Klf4-Deletion)
Ms4a8a	<i>Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 8A</i> , Funktion unbekannt		8,34
Adora2b	<i>Adenosine A2b receptor</i> ; Regulator der Mastzellen	Hua et al. 2007	5,74
Edg8	<i>Sphingosine-1-phosphate receptor 5</i> ; u.a. Zellwachstumsförderung, Apoptoseverhinderung	Racke et al. 2000	5,38
Ass1	<i>Argininosuccinate synthase 1</i> ; Aminosäure-Stoffwechsel	Beaudet et al. 1986	5,23
Cfh	<i>Complement factor H</i> ; Komplementsystemregulator	Monteferrante et al. 2007	5,20
Pdlim1	<i>PDZ and LIM domain protein 1</i> ; Regulator des Zellzyklus von Aktin-Stressfasern	Vallenius et al. 2004	4,90
Ryr1	<i>Ryanodine receptor 1; calcium release channel</i> in Muskelzellen	Zucchi et al. 1997	4,66
MGI:1916782	<i>Homeobox only domain</i> , Funktion unbekannt		4,47
Ptgir	<i>Prostaglandin I2 receptor</i> ; potenter Vasodilatator und Plättcheninhibitor	Cheng et al. 2002	4,20
F5	<i>Coagulation factor V</i> ; Protein der Koagulationskaskade; Co-Faktor bei Prothrombin zu Thrombin	Ortel et al. 1994	3,83
Cx3Cr1	<i>Chemokine (C-X3-C motif) receptor 1</i> ; Lymphozytenrezeptor mit chemotaktischer Funktion insb. für Monozyten	Auffray et al. 2009a	3,81
0610010D24Rik	<i>Coiled-coil domain containing 88C</i> , Funktion unbekannt		3,69
Metrn1	<i>Meteorin, glial cell differentiation regulator-like</i> ; Funktion unbekannt		3,65
Add3	<i>Adducin 3</i> ; skelettale Organisation der Zellmembran	Katagiri et al. 1996	3,64

Ampd3	<i>Adenosine monophosphate deaminase 3</i> ; Katalysierung von AMP zu IMP	Mahnke-Zizelman et al. 1996	3,54
2210020M01Rik	Protein und Funktion unbekannt		3,51
Ecm1	<i>Extracellular matrix protein 1</i> ; Promotor der Angiogenese	Han et al. 2001	3,42
Irf4	<i>Interferon regulatory factor 4</i> ; TLR-Regulator; Th2-Regulator	Negishi et al. 2005; Zheng et al. 2009b	3,37
Tm7sf1	<i>Integral membrane protein GPR137B</i> ; Hochreguliert in Nierenentwicklung	Spangenberg et al. 1998	3,33
Mllt4	<i>Afadin</i> ; Regulierung der Zell-Zell-Adhäsion; assoziiert mit ALL	Taya et al. 1998	3,27
Cd244	<i>Natural killer cell receptor 2B4</i> ; Aktivierung von Leukozyten und NK.-Zellen	Nakajima et al. 1999	3,23
Galnt9	<i>Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 9</i> ; Katalysator der Oligosaccharid-Biosynthese	Toba et al. 2000	3,22
Gda	<i>Guanine deaminase</i> ; Produktion von Xanthin und Ammonium; evtl. Synapsenentwicklung	Firestein et al. 1999	3,19
BC021523	<i>GRAM domain containing 4</i> ; Funktion unbekannt		3,16
Pscdbp	<i>Cytohesin-interacting protein</i> ; Zelladhäsion	Tang et al. 2002	3,12
2310051E17Rik	Protein und Funktion unbekannt		3,02
Bst1	<i>ADP-ribosyl cyclase 2</i> ; Prä-B-Zell-Differenzierung	Kaisho et al. 1994	3,02
Grb14	<i>Growth factor receptor-bound protein 14</i> ; Inhibitor des Rezeptor-Tyrosinkinase- /Insulin-Signalwegs	Holt et al. 2005	2,96
L1cam	<i>L1 cell adhesion molecule</i> ; Neuronales Zelladhäsionsmolekül	Kenwrick et al. 2000	2,96
Bmx	<i>BMX non-receptor tyrosine kinase</i> ; Wachstum und Differenzierung von hämatopoetischen Zellen	Tamagnone et al. 1994	2,91
Nupr1	<i>Nuclear protein 1</i> ; Apoptose von Krebszellen	Chowdhury et al. 2009	2,84
Gngt2	<i>Guanine nucleotide binding protein, gamma transducing activity polypeptide 2</i> ; Rolle in Fotorezeptoren des Auges	Ong et al. 1997	2,82
<td><i>Fibronectin1</i>; extrazelluläres Matrix-Glykoprotein</td> <td>Pankov et al. 2002</td> <td>2,79</td>	<i>Fibronectin1</i> ; extrazelluläres Matrix-Glykoprotein	Pankov et al. 2002	2,79
AI462064	<i>Cytohesin 1 interacting protein</i> , Funktion unbekannt		2,77
1200016G03Rik	Protein und Funktion unbekannt		2,76
Timp2	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases-2</i> ; Inhibitor der Metalloproteinase, vermutlich Metastase-Suppressor	De Clerck et al. 1992	2,70
9130404D14Rik	Protein und Funktion unbekannt		2,60
Fgr	<i>Tyrosine-protein kinase Fgr</i> ; Protein-Protein-Interaktion	Nishizawa et al. 1986	2,53
Gp49a / Lilrb4	<i>Lycoprotein 49a</i> ; Zelloberflächenrezeptor auf Makrophagen, Mastzellen und NK	Lee et al. 2000	2,52
Rab36	<i>Ras-related protein Rab-36</i> ; Onkogen; vesikulärer Transport (intra-Golgi)	Mori et al. 1999	2,51
Hip1	<i>Huntingtin interacting protein 1</i> ; Induktion der Apoptose	Hackam et al. 2000	2,51
Rem1	<i>RAS (RAD and GEM)-like GTP-binding 1</i> ; Inhibitor des Calcium-Einstroms	Yang et al. 2007	2,51
Clec4e	<i>C-type lectin domain family 4, member E</i> ; Malassezia-Rezeptor; Immunabwehr der Makrophagen	Yamasaki et al. 2009	2,47

Cbfa2t3h	<i>Core-binding factor</i> ; AML-Translokation	Gamou et al. 1998	2,45
E230016K23Rik	Protein und Funktion unbekannt		2,43
Sbk1	<i>SH3-binding domain kinase 1</i> ; Funktion unbekannt		2,43
Asahl	<i>Acid Ceramidase-like</i> Protein, Funktion unbekannt	Hong et al. 1999	2,42
Cd300lg	<i>CD300 molecule-like family member g</i> ; Expression auf hämatopoetischen Zellen	Takatsu et al. 2006	2,36
Hlcs	<i>Holocarboxylase synthetase</i> ; Biotinmetabolismus	Suzuki et al. 1994	2,26
Tnfrsf1b	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B</i> ; Rekrutierung inflammatorischer Zellen	Pryhuber et al. 2008	2,26
Camkk2	<i>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2</i> ; Calcium-/Calmodulin-abhängige (CaM) Kinase-Kaskade	Hsu et al. 1998	2,25
Rras	<i>Ras-related protein R-Ras</i> ; Regulator der Aktin-Zytoskelett-Organisation	Ada-Nguema et al. 2006	2,23
Fas	<i>TNF receptor superfamily, member 6</i> ; Induktion der Apoptose	Matsumura et al. 2000	2,20
Agpat4	<i>1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 4</i> ; Enzym der De-novo-Phospholipid-Biosynthese in der Epidermis	Lu et al. 2005	2,19
Thbd	<i>Thrombomodulin</i> ; Blutgerinnung, vorhanden im Plasma und im Urin	Ishii et al. 1985	2,18
P2ry1	<i>Purinergic receptor P2Y</i> ; Plättchenaggregation	Leon et al. 2001	2,16
Nav1	<i>Neuron navigator 1</i> ; Axonale Leitfunktion	Maes et al. 2002	2,16
Slc2a6	<i>Solute carrier family 2 member 6</i> ; Glukosetransportaktivität	Doerge et al. 2000	2,14
Unc84a	<i>Sad1 and UNC84 domain containing 1</i> ; nukleäres Membranprotein: Kernmigration	Hasan et al. 2006	2,10
F10	<i>Coagulation factor X</i> ; Blutungsneigung bei Defekten	Bertina et al. 1990	2,08
Il17r	<i>Interleukin 17 receptor</i> ; Il-17-Aktivität und Il-6-Produktion	Yao et al., 1997	2,07
Fabp7	<i>Fatty acid binding protein 7</i> ; Transkription von Gliazellen in Entwicklung des ZNS	Anthony et al. 2005	2,04
Tmsb10	<i>Thymosin beta 10</i> ; Aktinorganisation und Zellwachstum	Santelli et al. 2002	2,04
5430421B17	Protein und Funktion unbekannt		2,02
Crip1	<i>Cysteine-rich protein 1</i> ; Intestinaler Zinktransport		1,99
Stk38	<i>Serine/threonine kinase 38</i> ; Konservierte nukleäre Serin-(Threonin-) Proteinkinase	Millward et al. 1995	1,99
Rhoq	<i>Rho-related GTP-binding protein RhoQ</i> ; Insulin-stimulierte Glukoseaufnahme	Chang et al. 2002	1,93
Ltap	<i>Vang-like 2</i> ; Schlüsselrolle in Entwicklung, insbesondere <i>planar cell</i> Polarität	Torban, 2004	1,90
B930096L08Rik	Protein und Funktion unbekannt	Hempe et al. 1992	1,90
Padi2	<i>Peptidyl arginine deiminase, type II</i> ; ubiquitär exprimiert, im ZNS und in Makrophagen; Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen	Watanabe et al. 2009	1,87
Itgb7	<i>Integrin, beta 7</i> ; adhäsive Leukozyten-Interaktion in der Darmmukosa	Erle et al. 1994	1,86
Rbpms	<i>RNA binding protein with multiple splicing</i> ; Koaktivator der Transkription	Sun et al. 2006	1,86
Inpp5f	<i>Phosphatidylinositide phosphatase SAC2</i> ; Inositolsignalweg	Minagawa et al. 2001	1,84

Ssh2	<i>Protein phosphatase Slingshot homolog 2</i> ; Rolle in der Aktindynamik	Niwa et al. 2002	1,83
Rara	<i>Retinoic acid receptor alpha</i> ; Mediator der Granulopoese	Fujiki et al. 2009	1,83
Stk10	<i>Serine/threonine kinase 10</i> in humanen Lymphoidzellen	Kuramochi et al. 1999	1,81
Lsp1	<i>Lymphocyte-specific protein 1</i> ; Leukozytenmarker	Pulford et al. 1999	1,80
Klf3	<i>Kruppel-like factor 3</i> ; evtl. Rolle in Adipogenese	Sue et al. 2008	1,79
5830411E10Rik	Protein und Funktion unbekannt		1,77
Diap1	<i>Diaphanous homolog 1 (Drosophila)</i> ; Rolle in Hörkaskade, Innenohr	Lynch et al. 1997	1,73
Arhgap23	<i>Rho GTPase activating protein 23</i> ; GTPase- Aktivator	Katoh et al. 2004	1,72
4833411O04Rik	Protein und Funktion unbekannt		1,70
C030038J10Rik	Protein und Funktion unbekannt		1,69

Tab. E.1.: Gene mit deren Protein und Funktion, die bei Anwesenheit von Klf4 in (wildtypischen) Ly6C^{high}-Monozyten stärker als in Ly6C^{high}-Monozyten mit *Klf4*-Deletion exprimiert wurden. Die Gene sind absteigend geordnet nach Höhe der Expressionsstärke (dargestellt als Ratio Wildtyp/*Klf4*-Deletion). Am Anfang der Tabelle steht also das Gen, das am stärksten durch Klf4 induziert wurde.

Bei Anwesenheit von Klf4 (Wildtyp) schwächer exprimierte Gene

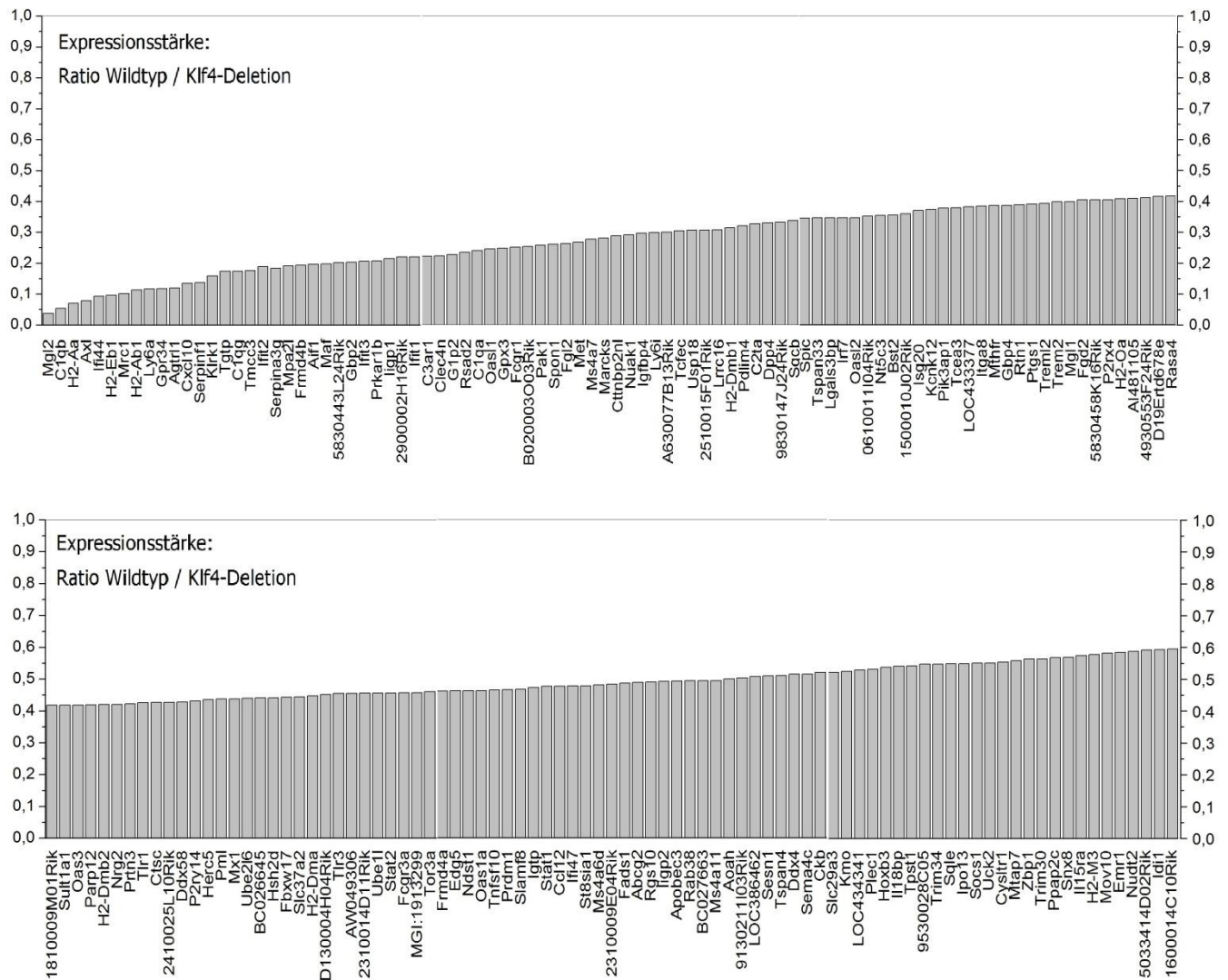


Fig. E.5.: Expressionsstärke der Klf4-beeinflussten Gene dargestellt als Ratio der Expressionsstärke in Ly6C^{high}-Monozyten von Wildtypen und *Klf4*-deletierten Mäusen. *Mgl2* ist im Wildtypen mit einer Ratio von 0,04 wesentlich schwächer exprimiert als in der *Klf4*-deletierten Maus und damit am stärksten reprimiert. Am anderen Ende steht 1600014C10Rik. Es ist mit einer Ratio von 0,59 am wenigsten deutlich durch Klf4 reprimiert. $P \leq 0,01$.

Gen	Funktion	Quelle	Expressionsstärke (Ratio Wildtyp/Klf4-Deletion)
Mgl2	<i>Macrophage lectin 2</i> ; wahrscheinlich Regulator der Immunabwehr; exprimiert in Karzinomzellen	Suzuki et al. 1996	0,038
C1qb	<i>Complement C1q subcomponent subunit B</i> ; Komplement-Komponente	Yonemasu et al. 1981	0,054
H2-Aa	<i>Histocompatibility 2, class II antigen A, alpha</i> ; Antigenprozessierung und -präsentation	Acha-Orbea et al. 1991	0,070
Axl	<i>Tyrosine-protein kinase receptor UFO</i> ; Signaltransduktion zwischen Mesodermzellen	Shimojima et al. 2006	0,078
Ifi44	<i>Interferon-induced protein 44</i> ; induziert durch IFN bei Virusinfektion, antiproliferative Wirkung und Zellzyklusarrest	Kitamura et al. 1994	0,092
H2-Eb1	<i>Histocompatibility 2, class II antigen E beta</i> ;		0,096

	Funktion unbekannt		
Mrc1	<i>Mannose receptor, C type 1</i> ; Mediator der Endozytose in Makrophagen	Shimizu et al. 2008	0,101
H2-Ab1	<i>Histocompatibility 2, class II antigen A, beta 1</i> ; essentiell für die erworbene Immunabwehr	Ladel et al. 1994	0,114
Ly6a	<i>Lymphocyte-Antigen 6 Komplex, Locus A</i> ; Funktion unbekannt		0,117
Gpr34	<i>Probable G-protein coupled receptor 34</i> ; ursächliches Gen für die Nachtblindheit	Jacobi et al. 2000	0,118
Agtrl1	<i>Apelin receptor</i> ; adenosinähnlicher Rezeptor; Ligand Apelin: HIV-Schutz	Cayabyab et al. 2000	0,120
Cxcl10	<i>C-X-C motif chemokine 10</i> ; Chemoattraktion von Monozyten/T-Zellen; Mediator IFN-vermittelte Immunantwort	Luster et al. 1985	0,135
Serpinf1	<i>Pigment epithelium-derived factor</i> ; potenter Inhibitor der Angiogenese	Maik-Rachline et al. 2005	0,137
Klrl1	<i>NKG2-D type II integral membrane protein</i> ; zelluläre Immunantwort, insb. NK-/T-Zellen	Bauer et al. 1999	0,159
Tgtp	<i>T-cell specific GTPase</i> ; IFN α -induzierte GTPase, angeborenes Immunsystem	Carlow et al. 1998	0,173
C1qg	<i>Complement C1q subcomponent subunit C</i> ; Aktivator der Komplementreaktion und IgG	Gaboriaud et al. 2003	0,174
Tmcc3	<i>Transmembrane and coiled-coil domain family 3</i> ; Funktion unbekannt		0,176
Serpina3g	<i>Ubiquitin-like protein ISG15</i> ; Mediator der IFN-Immunantwort	Knight et al. 1991	0,183
Ifit2	<i>Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2</i> ; hemmt LPS-induzierte Genexpression und deren inflammatorische Kaskade	Berchtold et al. 2008	0,189
Mpa2l	<i>Macrophage activation 2 like</i> , Funktion unbekannt		0,191
Frm4b	<i>FERM domain-containing protein 4B</i> ; Funktion unbekannt		0,193
Aif1	<i>Allograft inflammatory factor 1</i> ; Expression nach vaskulärem Trauma	Chen et al. 2004	0,196
Maf	<i>Proto-oncogene c-Maf</i> ; Regulator der Zelldifferenzierung	Dhakshinamoorthy et al. 2002	0,198
5830443L24Rik	Protein und Funktion unbekannt		0,201
Gbp2	<i>Interferon-induced guanylate-binding protein 2</i> ; Virusinhibition	Carter et al. 2005	0,203
Ifit3	<i>Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3</i> ; Funktion unbekannt		0,206
Prkar1b	<i>Protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, beta</i> ; Proteinkinase	Solberg et al. 1992	0,207
Iigp1	<i>Interferon inducible GTPase 1</i> ; intrazelluläre Pathogenabwehr	Uthaiyah et al. 2003	0,215
2900002H16Rik	Protein und Funktion unbekannt		0,220
Ifit1	<i>Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1</i> ; aktiviert in Fibroblasten und lymphoblastischen Zellen	Chebath et al. 1983	0,221
C3ar1	<i>C3a anaphylatoxin chemotactic receptor</i> ; Komplementrezeptor; Stimulation der Chemotaxis, Granulozytenausschwemmung	Crass et al. 1996	0,221
Clec4n	<i>C-type lectin domain family 4, member n</i> ; in dendritischen Zellen exprimiert	Flornes et al. 2004	0,223
G1p2	<i>Ubiquitin-like protein ISG15</i> ; entspricht Isg15, siehe dort		0,227
Rsad2	<i>Radical S-adenosyl methionine domain-containing protein 2</i> ; antivirale Immunabwehr	Chin et al. 2001	0,234

C1qa	<i>Complement C1q subcomponent subunit A</i> ; Aktivierung der ersten Komplementkomponente C1	Gregory et al. 2006	0,240
Oasl1	<i>2'-5' oligoadenylate synthetase-like 1</i> ; Interferon induziert; genaue Funktion unbekannt	Hartmann et al. 1998	0,246
Gpx3	<i>Glutathione peroxidase 3</i> ; Schutz vor oxidativem Zellschaden	Comhair et al. 2002	0,247
Fcgr1	<i>Putative high affinity immunoglobulin gamma Fc receptor I</i> ; bindet möglicherweise an den Fc-Rezeptor von IgG	Maresco et al. 1996	0,250
B020003O03Rik	Protein und Funktion unbekannt		0,253
Pak1	<i>Serine/threonine-protein kinase PAK 1</i> ; Regulator zytoskelettaler Prozesse (Mikrotubuli, Aktin)	Chen et al. 2003a	0,258
Spon1	<i>Spondin-1</i> ; Proliferator von <i>smooth muscle cells</i>	Miyamoto et al. 2001	0,260
Fgl2	<i>Fibroleukin</i> ; Immunabwehr; in T-Lymphozyten sezerniert	Marazzi et al. 1998	0,263
Met	<i>Hepatocyte growth factor receptor</i> ; kodiert Tyrosinkinaseaktivität; Zellproliferation, -überleben	Bottaro et al. 1991	0,267
Ms4a7	<i>Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member</i> ; wahrscheinlich in Signaltransduktion involviert	Ishibashi et al. 2001	0,277
Marcks	<i>Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate</i> ; Zellmotilität/Phagozytose/ Mitogenese	Sakai et al. 1992	0,280
Ctnnbp2nl	<i>CTTNBP2 N-terminal like</i> ; Funktion unbekannt		0,288
Nuak1	<i>SNF-1-like kinase 1</i> ; Repressor der fas-induzierten Apoptose	Suzuki et al. 2003a	0,291
Igfbp4	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 4</i> ; Kontrolle von IGF-vermitteltem Wachstum/Metabolismus	Siwanowicz et al. 2005	0,296
Ly6i	<i>Lymphocyte antigen 6I</i> ; Expression auf diversen Blutzelllinien	Patterson et al. 2000	0,299
A630077B13Rik	Protein und Funktion unbekannt		0,299
Tcfec	<i>Transcription factor EC</i> ; Regulator der Transkription, Effektor für hämatopoetische Stammzellen	Rehli et al. 1999	0,304
Usp18	<i>Ubl carboxyl-terminal hydrolase 18</i> ; Funktion in der hämatopoetischen Zelldifferenzierung	Liu et al. 1999	0,306
2510015F01Rik	Protein und Funktion unbekannt		0,307
Lrrc16	<i>Leucine-rich repeat-containing protein 16A</i> ; Schlüsselenzym in der Aktin-Polymerisierung	Yang et al. 2005	0,307
H2-Dmb1	<i>Class II histocompatibility antigen, M beta 1 chain</i> ; Katalysator der Freisetzung von Peptiden aus HLA	Lindstedt et al. 1995	0,314
Pdlim4	<i>PDZ and LIM domain protein 4</i> ; Zellwachstumskontrolle, Apoptoseinduktion	Boumber et al. 2007	0,320
C2ta	<i>C2ta protein</i> ; MHC II Transaktivator; krankheitsassoziiert	Harnesk et al. 2009	0,326
Dpp4	<i>Dipeptidyl peptidase 4</i> ; Proteolyse und Peptidolyse	Bernard et al. 1994	0,330
9830147J24Rik	Protein und Funktion unbekannt		0,332
Sgcb	<i>Beta-sarcoglycan</i> ; Muskelfasermembran stabilisierung; Konnektion zur extrazellulären Matrix	Crosbie et al. 2000	0,337
Spic	<i>Transcription factor Spi-C</i> ; Entwicklungskontrolle von Makrophagen der roten Pulpa	Kohyama et al. 2009	0,344

Tspan33	<i>Tetraspanin-33</i> ; Wachstumssuppressive Aktivität	Berditchevski 2001	0,346
Lgals3bp	<i>Galectin-3-binding protein</i> ; Aktiviert Immunsystem via Il-2 und Zytokine	Ullrich et al. 1994	0,346
Irf7	<i>Interferon regulatory factor 7</i> ; Hauptregulator der IFN-Antwort; Virusabwehr	Marie et al. 1998	0,346
Oasl2	<i>2'-5' oligoadenylate synthetase-like protein 2</i> ; Funktion unbekannt		0,346
0610011I04Rik	Protein und Funktion unbekannt		0,351
Nt5c3	<i>Cytosolic 5'-nucleotidase 3</i> ; exprimiert auf hämatopoetischen Stammzellen	Zhang et al. 2000	0,354
Bst2	<i>Bone marrow stromal antigen 2</i> ; antivirale Aktivität	Blasius et al. 2006	0,355
1500010J02Rik	Protein und Funktion unbekannt		0,360
Isg20	<i>Interferon-stimulated gene 20 kDa protein</i> ; IFN-stimuliert; möglicherweise an der RNA-Virusabwehr beteiligt	Gongora et al. 1997	0,370
Kcnk12	<i>Potassium channel subfamily K member 12</i> ; Familie der Kalium-Kanal-Proteine	Rajan et al. 2001	0,373
Pik3ap1	<i>Phosphoinositide 3-kinase adapter protein 1</i> ; Erhalt reifer B-Zellen	Yamazaki et al. 2002	0,377
Tcea3	<i>Transcription elongation factor A protein 3</i> ; Transkriptionsfaktor; wahrscheinlich Stimulierung der Nukleaseaktivität	Labhart et al. 1998	0,378
LOC433377	Protein und Funktion unbekannt		0,382
Itga8	<i>Integrin alpha-8</i> ; Zell-Zell-/Zell-extrazell. Matrix-Interaktion; Nierenentwicklung	Muller et al. 1997	0,384
Mthfr	<i>Methylenetetrahydrofolate reductase</i> ; Aminosäurestoffwechsel; Remethylierung Homocystein zu Methionin	Goyette et al. 1994	0,386
Gbp4	<i>Guanylate-binding protein 4</i> ; IFN-induzierte Hydrolyse von GTP zu GDP und GMP	Han et al. 1998	0,386
Rtn1	<i>Reticulon-1</i> ; Regulator der Apoptose	Di Sano et al. 2003	0,389
Ptgs1	<i>Prostaglandin-endoperoxide synthase 1</i> ; Schlüsselenzym Prostaglandinbiosynthese	Bakhle 1999	0,391
Trem12	<i>Trem-like transcript 2 protein</i> ; u.a. exprimiert auf myeloiden Zellen, hochreguliert im Rahmen der Immunabwehr	King et al. 2006	0,392
Trem2	<i>Triggering receptor expressed on myeloid cells 2</i> ; Aktivierung der Immunantwort in Makrophagen und DC	Daws et al. 2001	0,398
Mgl1	<i>Macrophage asialoglycoprotein-binding protein 1</i> ; Interaktion zwischen tumorösen Makrophagen und Tumorzellen	Oda et al. 1988	0,398
Fgd2	<i>FYVE, RhoGEF and PH domain-containing protein 2</i> ; Aktivierung von Ras; Zytoskelett-Wiederaufbau	Pasteris et al. 1999	0,404
5830458K16Rik	Protein und Funktion unbekannt		0,405
P2rx4	<i>P2X purinoceptor 4</i> ; ATP-aktivierter Kanal; hohe Calcium-Permeabilität	Garcia-Guzman et al. 1997	0,405
H2-Oa	<i>Histocompatibility 2, O region alpha locus</i> ; Funktion unbekannt		0,407
AI481105	Protein und Funktion unbekannt		0,409
4930553F24Rik	Protein und Funktion unbekannt		0,411
D19Ertd678e	Protein und Funktion unbekannt		0,415
Rasa4	<i>Ras GTPase-activating protein 4</i> ; Adaptor der FcR vermittelten Phagozytose	Zhang et al. 2005	0,416
1810009M01Rik	Protein und Funktion unbekannt		0,418

Sult1a1	<i>Sulfotransferase 1A1</i> ; thermostabile Phenolsulfotransferase	Kong et al. 1993	0,418
Oas3	<i>2'-5'-oligoadenylate synthetase 3</i> ; IFN-induziertes Protein; Inhibition der Proteinsynthese und viralen Immunabwehr	Hovnanian et al. 1998	0,418
Parp12	<i>Poly [ADP-ribose] polymerase 12</i> ; Funktion unbekannt		0,419
H2-Dmb2	<i>Histocompatibility 2, class II, locus Mb2</i> ; Funktion unbekannt		0,420
Nrg2	<i>Pro-neuregulin-2, membrane-bound isoform</i> ; Ligand von Tyrosinkinasen	Carraway et al. 1997	0,420
Prtn3	<i>Myeloblastin</i> ; Degradierung von Kollagen, Elastin, Fibronectin	Sturrock et al. 1998	0,422
Tlr1	<i>Toll-like receptor 1</i> ; Pathogenerkennung, Aktivierung des angeborenen Immunsystems	Ozinsky et al. 2000	0,426
Ctsc	<i>Dipeptidyl peptidase 1</i> ; Aktivator vieler Serinproteasen in der Immunantwort	Rao et al. 1997	0,427
2410025L10Rik	Protein und Funktion unbekannt		0,427
Ddx58	<i>Probable ATP-dependent RNA helicase DDX58</i> ; involviert in die angeborene Immunantwort gegen Viren; Aktivierung von NF-kappa-B, IRF3, 7.	Kato et al. 2005	0,428
P2ry14	<i>P2Y purinoceptor 14</i> ; Stammzellkompartimentregulierung; neuroimmune Funktion	Lee et al. 2003	0,431
Herc5	<i>Putative uncharacterized protein</i> ; IFN-induzierte ISG-Proteinligase	Mitsui et al. 1999	0,436
Pml	<i>Protein PML</i> ; Transkriptionsfaktor und Tumorsuppressor; p53-Regulierung; RARA-Translokation	Insinga et al. 2004	0,437
Mx1	<i>Interferon-induced GTP-binding protein Mx1</i> ; antivirales Stadium gegen Influenza	Staeheli et al. 1986	0,438
Ube2l6	<i>Ubiquitin/ISG15-conjugating enzyme E2 L6</i> ; Protein-Ubiquitierung/Degradierung	Kumar et al. 1997	0,439
BC026645	Protein und Funktion unbekannt		0,440
Hsh2d	<i>Hematopoietic SH2 domain-containing protein</i> ; Regulierung der Apoptose durch Gewährleistung der mitochondrialen Stabilität	Herrin et al. 2005	0,440
Fbxw17	<i>F-box and WD-40 domain protein 17</i> , Funktion unbekannt		0,443
Slc37a2	<i>Sugar phosphate exchanger 2</i> ; G3P-Transport zwischen zellulären Kompartimenten	Bartoloni et al. 2004	0,444
H2-Dma	<i>Histokompatibilität 2, Klasse II, Locus DMA</i> ; genaue Funktion unbekannt	Hermel et al. 1995	0,447
D130004H04Rik	Protein und Funktion unbekannt		0,451
Tlr3	<i>Toll-like receptor 3</i> ; Aktivierung von NFkB, wesentlicher Bestandteil des angeborenen Immunsystems	Tabeta et al. 2004	0,455
AW049306	Protein und Funktion unbekannt		0,455
2310014D11Rik	Protein und Funktion unbekannt		0,455
Ube1l	<i>Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 7</i> ; Degradierung abnormer Proteine; spezifisch bei der akuten promyeloischen Leukämie	Kitareewan et al. 2002	0,456
Stat2	<i>Signal transducer and activator of transcription 2</i> ; Transaktivator der Transkription als Komplex mit ISRE; IFN α -stimuliert	Li et al. 1996	0,456
Fcgr3a	<i>Fc gamma RIIIa receptor</i> ; Immunantwort der NK-Zellen	Anderson et al. 1990	0,456
MGI:1913299	Protein und Funktion unbekannt		0,457

Tor3a	<i>Torsin3A</i> ; IFN-stimuliert, mit dem endoplasmatischen Retikulum assoziiert, genaue Funktion unbekannt	Dron et al. 2002	0,460
Frmd4a	FERM domain containing 4A; Funktion unbekannt		0,461
Edg5	<i>Endothelial differentiation G-protein coupled receptor 5</i> ; Zellproliferation, -überleben	An et al. 2000	0,462
Ndst1	<i>Bifunctional heparan sulfate N-deacetylase/N-sulfotransferase 1</i> ; unterschiedliche inflammatorische Funktionen	Wang et al. 2005	0,462
Oas1a	<i>2'-5'-oligoadenylate synthase 1A</i> ; Virusresistenz, Zellwachstum, -differenzierung und Apoptose	Mashimo et al. 2003	0,463
Tnfsf10	<i>Tumor necrosis factor ligand superfamily member 10</i> ; Apoptoseinduktion	Wiley et al. 1995	0,464
Prdm1	<i>PR domain zinc finger protein 1</i> ; Reifung von Plasmazellen aus B-Zellen	Turner et al. 1994	0,465
Slamf8	<i>SLAM family member 8</i> ; Mitglied der CD2-Familie; involviert in B-Zell-commitment	Kingsbury et al. 2001	0,467
Igtp	<i>Interferon gamma induced GTPase</i> ; antimikrobielle Abwehr	Taylor et al. 2000	0,472
Stat1	<i>Stat1 protein</i> ; JAK-aktiviert; Regulator vieler Zellprozesse wie Wachstum, Differenzierung	Xia et al. 2002	0,476
Ccl12	<i>C-C motif chemokine 12</i> ; monozytenaktiviertes Chemokin, Rolle bei allergischer Reaktion	Sarafi et al. 1997	0,477
Ifi47	<i>Interferon gamma inducible protein 47</i> ; in B-Zellen induziert	Gilly et al. 1992	0,477
St8sia1	<i>Alpha-N-acetylneuraminide alpha-2,8-sialyltransferase</i> ; negativer Regulator von Zelladhäsion und -wachstum	Sasaki et al. 1993	0,477
Ms4a6d	<i>Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6D</i> , Funktion unbekannt		0,481
2310009E04Rik	Protein und Funktion unbekannt		0,483
Fads1	<i>Fatty acid desaturase 1</i> ; Fettsäure-Stoffwechsel	Marquardt et al. 2000	0,486
Abcg2	<i>ATP-binding cassette sub-family G member 2</i> ; möglicherweise Rolle in der Stammzell-Selbsterneuerung	Zhou et al. 2001	0,488
Rgs10	<i>Regulator of G-protein signaling 10</i> ; Hydrolysekapazität von GTP α	Hunt et al. 1996	0,489
Iigp2	<i>Interferon inducible GTPase 2</i> ; Funktion unbekannt		0,492
Apobec3	<i>DNA dC->dU-editing enzyme APOBEC-3</i> ; Immunantwort gegen Retroviren	Takaori-Kondo 2006	0,493
Rab38	<i>Ras-related protein Rab-38</i> ; melanosomaler Transport	Jager et al. 2000	0,493
BC027663	Protein und Funktion unbekannt		0,494
Ms4a11	<i>Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6D</i> , Funktion unbekannt		0,494
Aoah	<i>Aoah protein</i> ; Fettsäurestoffwechsel phagozytischer Zellen; Immunantwort gegen gramnegative Bakterien	Hagen et al. 1991	0,499
9130211I03Rik	Protein und Funktion unbekannt		0,502
LOC386462	Protein und Funktion unbekannt		0,506
Sesn1	<i>Sesn1 protein</i> ; Regenerierung von Peroxiredoxin	Budanov et al. 2004	0,509
Tspan4	<i>Tetraspanin-4</i> ; Zellwachstum, -motilität	Tachibana et al. 1997	0,510
Ddx4	<i>Probable ATP-dependent RNA helicase DDX4</i> ; Keimzellentwicklung	Chu et al. 2006	0,514

Sema4c	<i>Semaphorin-4C</i> ; Entwicklung von Myozyten	Ko et al. 2005	0,514
Ckb	<i>Creatine kinase B-type</i> ; Energieübertragung in Gewebe mit hohem Energieverbrauch, wie Gehirn	van Deursen et al. 1992	0,519
Slc29a3	<i>Equilibrative nucleoside transporter 3</i> ; Nukleotidsynthese	Baldwin et al. 2005	0,522
Kmo	Enzym Aminosäure-Stoffwechsel	Alberati-Giani et al. 1997	0,524
LOC434341	Protein und Funktion unbekannt		0,528
Plec1	<i>Plec1 protein</i> ; Interaktion zwischen den Komponenten des Zytoskeletts	Svitkina et al. 1996	0,531
Hoxb3	<i>Homeobox protein Hox-B3</i> ; Transkriptionsfaktor; Entwicklung u.a. von HSC	Bjornsson et al. 2003	0,537
Il18bp	<i>Interleukin-18-binding protein</i> ; Inhibitor von Il-18 und damit der frühen TH1-Zytokin-Antwort	Aizawa et al. 1999	0,540
Tpst1	<i>Protein-tyrosine sulfotransferase 1</i> ; Katalysator der Tyrosin-O-Sulfatierung bei Inflammation und Hämostase	Ouyang et al. 1998	0,542
9530028C05	Protein und Funktion unbekannt		0,547
Trim34 /// LOC434218	<i>Tripartite motif-containing protein 34</i> ; antivirale und antimikrobielle Immunabwehr	Ozato et al. 2008	0,547
Sqle	<i>Squalene monooxygenase</i> ; Sterolbiosynthese	Nagai et al. 1997	0,548
Ipo13	<i>Importin-13</i> ; nukleäres Transportprotein	Mingot et al. 2001	0,548
Socs1	<i>Suppressor of cytokine signaling 1</i> ; Inhibitor des Zytokin-Signalwegs durch den Jak/Stat-Signalweg	Yasukawa et al. 1999	0,550
Uck2	<i>Uridine-cytidine kinase 2</i> ; RNA- und DNA-Synthese	Van Rompay et al. 2001	0,551
Cysl1r1	<i>Cysteinyl leukotriene receptor 1</i> ; Leukotrienrezeptor; Funktion in der Vermittlung von bronchialem Asthma durch Mastzellen	Mellor et al. 2001	0,554
Mtap7	<i>Ensconsin</i> ; Reorganisierung der Mikrotubuli,	Suzuki et al. 2003b	0,558
Zbp1	<i>Z-DNA-binding protein 1</i> ; Aktivierung des Immunsystems (u.a. IRF, NFκB)	Takaoka et al. 2007	0,563
Trim30	<i>Tripartite motif-containing protein 30</i> ; antivirale und antimikrobielle Immunabwehr (s. Trim34)	Ozato et al. 2008	0,564
Ppap2c	<i>Ppap2c protein</i> ; De-novo-Synthese von Glycerolipiden	Roberts et al. 1998	0,567
Snx8	<i>Sorting nexin-8</i> ; zelluläre Funktion der Snx-Gruppe	Worby et al. 2002	0,569
Il15ra	<i>Interleukin-15 receptor subunit alpha</i> ; von Mastzellen reguliert	Bulanova et al. 2003	0,574
H2-M3	<i>Histocompatibility 2, M region locus 3</i> ; Funktion unbekannt		0,577
Mov10	<i>Putative helicase MOV-10</i> ; RNA-Spaltung	Meister et al. 2005	0,581
Emr1	<i>EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1</i> ; Hormonrezeptor	Baud et al. 1995	0,584
Nudt2	<i>Bis(5'-nucleosyl)-tetrphosphatase</i> ; mögliches Tumorsuppressorgen	McLennan et al. 1998	0,587
5033414D02Rik	Protein und Funktion unbekannt		0,592
Idi1	<i>Isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase 1</i> ; Cholesterolfstoffwechsel	Hahn et al. 1996	0,593
1600014C10Rik	Protein und Funktion unbekannt		0,595

Tab. E.2.: Gene mit deren Protein und Funktion, die bei *Klf4*-Deletion in Ly6C^{high}-Monozyten stärker als bei Anwesenheit von *Klf4* in (wildtypischen) Ly6C^{high}-Monozyten exprimiert wurden. Die Gene sind aufsteigend geordnet nach Höhe der Expressionsstärke (dargestellt als Ratio Wildtyp/*Klf4*-Deletion). Am Anfang der Tabelle steht also das Gen, das am stärksten durch *Klf4* reprimiert wurde.

Die Transkripte mit bekannter Funktion sind folgenden funktionellen Gruppen zuzuordnen:

Die zahlenmäßig größte Gruppe sind Transkripte, die für Gene in Zusammenhang mit Entzündung und Immunabwehr kodieren, darunter auch makrophagenassoziierte Gene. Von den insgesamt 74 Genen lassen sich weiter die Untergruppen „Interferon regulierende bzw. durch Interferon induzierte Gene“, sowie „Histokompatibilitätsgene“ abgrenzen.

Die Mehrzahl der Transkripte (59) wurde durch Klf4 reprimiert, dagegen 15 induziert.

Unter den reprimierten Genen sind u.a. Proteine für die Prostaglandinbiosynthese, für die Antigenpräsentation, wie Immunglobulinfragmente, Gene, die für die Abwehr von Viren und für die Aktivierung bzw. den Erhalt von Lymphozyten eine Rolle spielen, Komplementsystembestandteile, Immunsystemaktivatoren, ein Serinproteaseaktivator sowie Gene der Immunabwehr. Darunter zu finden ist auch Il18bp, das Il18 inhibiert und dadurch die Makrophagenaktivierung verhindert. Des Weiteren ist eine Reihe von makrophagenaktivierenden Genen zu detektieren, die auch von Klf4 reprimiert wurde, darunter Mpa2l, Lgals3bp und Aif1.

Cx3Cr1, der über seinen Liganden Cx3Cl1 für die Chemoattraktion von Ly6C^{high}-Monozyten entscheidend ist, wurde durch Klf4 induziert.

Unter den induzierten Transkripten sind solche mit repressiver Wirkung auf das Komplementsystem, Tumornekrosefaktoren, Prostaglandinrezeptoren, Regulatoren von Immunzellen, wie ein Mastzellregulator und ein Th2-Zellregulator.

15 von 16 Interferonantwort-regulierende bzw. durch Interferon induzierte Transkripte der Genexpressionsanalyse wurden durch Klf4 reprimiert. Darunter sind Gene, die die inflammatorische Kaskade hemmen, aber auch solche, die eine aktivierende Funktion auf das Immunsystem haben.

Mehrere Gene, die für Histokompatibilitätsantigene kodieren, wurden alle durch Klf4 reprimiert.

Eine weitere Gruppe repräsentiert Gene, die die Zellregulierung involviert sind, darunter Wachstumsfaktoren, (Proto-)Onkogene, Transkriptionsfaktoren, Kinasen, GTPasen und andere Enzyme. Davon wurden 19 durch Klf4 reprimiert und zwölf induziert.

Unter den reprimierten Transkripten waren solche, die das Zellwachstum fördern oder die DNA-/RNA-Synthese unterstützen. Wesentlich weniger Transkripte dieser Gruppe wurden durch Klf4 induziert, darunter Regulatoren der Apoptose, der Angiogenese, spannungsabhängige Calciumkanäle sowie einige Onkogene.

Es wurden auch Gene durch Klf4 beeinflusst, die im Zusammenhang mit dem Zytoskelett stehen.

Drei Gene, die für den Zellkern eine Rolle spielen, wurden durch Klf4 induziert. Die Proteine haben Funktionen in der nukleären Fixation, sind Kernbindfaktor oder nukleäre Proteine.

Des Weiteren lässt sich eine Gruppe von Genen abgrenzen, die für Proteine der Zellinteraktion und der Zelladhäsion kodieren, in der Mehrzahl durch Klf4 induziert.

Eine Reihe von Oberflächenrezeptoren (teilweise bereits in andere Gruppen eingeteilt) wurde in ihrer Expression durch Klf4 beeinflusst. Unter den induzierten Transkripten waren Rezeptoren mit Funktion in der Immunabwehr, genauer in der B-Zell-Proliferation und der Mastzellregulierung, und Proteine der Zell-Zellinteraktion und Zellmigration.

Eine weitere durch Klf4 induzierte Gruppe von Rezeptoren fungiert als Calciumionenkanal bzw. bewirkt oder hemmt die Mobilisierung von Calcium.

Auch Oberflächenrezeptoren mit Funktion in Zellwachstum und Zytoskelettmodulation, Apoptose und Hexosetransport wurden durch Klf4 induziert. Ein Leukotrienrezeptor, ein Rezeptor in neuronalem Gewebe und in der Retina sowie Proteine der Zellentwicklung/-aktivierung, der Motilität und des Wachstum wurden reprimiert.

Eine weitere Gruppe stellen Proteine der extrazellulären Matrix und der Koagulation dar.

In Entwicklung oder Metabolismus des Nervensystems spielen Transkripte eine Rolle, die durch Klf4 induziert wurden.

E.1.3. Verminderte Anzahl von Ly6C^{high}-Monozyten in Knochenmark und Milz von Chimären mit konventioneller Deletion im hämatopoetischen System

Nachdem in den vorangegangenen Abschnitten E.1.2.1 und E.1.2.3. der Einfluss der *Klf4*-Deletion in *Klf4^{fl/fl}-VAV-Cre*-Mäusen auf die Anzahl und genetische Information der Monozyten beschrieben wurde, wird nun ein weiterer Versuch zur Bestätigung der bisherigen Erkenntnisse dargelegt:

Durch die Untersuchung eines weiteren Deletionstypen sollte gezeigt werden, dass die Abwesenheit der Ly6C^{high}-Monozyten im peripheren Blut von *Klf4^{fl/fl}*-Mäusen nicht etwa auf einen zellautonomen Defekt in der myeloiden Entwicklung im Knochenmark zurückzuführen war. Und es sollten Positionseffekte des bisher verwendeten Deletionstypen (durch *Vav-Cre*-Rekombinase) ausgeschlossen werden.

Bei dem nun zu untersuchenden Deletionstypen handelte es sich um Chimäre, die durch Knochenmarktransplantation das hämatopoetische System von *Klf4*-deletierten Mäusen trugen. Die Deletion war durch homologe Rekombination erreicht worden. Derart modifizierte Tiere

sind jedoch nicht lange lebensfähig. Ihre Merkmale können nur durch Transplantation an der adulten Maus untersucht werden (s. Einleitung, A.4.2. und A.4.3.).

Auch bei diesem *Klf4*-Deletionstypen sollten also die Ly6C^{high}-Monozyten gemessen werden. Es war innerhalb der Arbeitsgruppe bereits bekannt, dass das Knochenmark der deletierten Chimäre eine Reduktion der Ly6C^{high}-Monozyten aufwies. Dies sollte in diesem Versuchsansatz noch einmal gezeigt und zusätzlich die Anzahl dieser Monozytensubpopulation in der Milz gemessen werden.

Das Knochenmark und die Milz von Chimäre und Wildtypen wurden entnommen, aufgereinigt und die entsprechende Zellpopulation per FACS analysiert (s. Abb. E.4.). Als Markierung für die ausschließliche Detektierung von Ly6C^{high}-Monozyten dienten auch hier Antikörper gegen Ly6C (Al-21) und der myeloidzellspezifische Marker Cd11b sowie die Charakterisierung B220⁻ und Cd45⁻. Letztere Definition schloss evtl. verbliebene Zellen des Empfängers aus. Sie waren hier nicht von Interesse, denn die Deletion wurde durch Übertragung deletierter Knochenmarkzellen auf einen Empfänger mit zuvor letal bestrahltem Knochenmark erreicht.

Die Anzahl dieser Monozytenpopulation aus dem Knochenmark war um ca. 52 % (s. Fig. E.6.) reduziert im Vergleich zur Kontrollgruppe, die mit fetalen Leberzellen aus Wildtypen transplantiert worden war. In der Milz zeigte sich eine Reduktion der Ly6C^{high}-Monozyten um ca. 82 % (s. Fig. E.7.). Die Anzahl der Ly6C^{neg.}-Monozyten war weder im Knochenmark noch in der Milz beeinträchtigt (Zahlen werden hier nicht gezeigt).

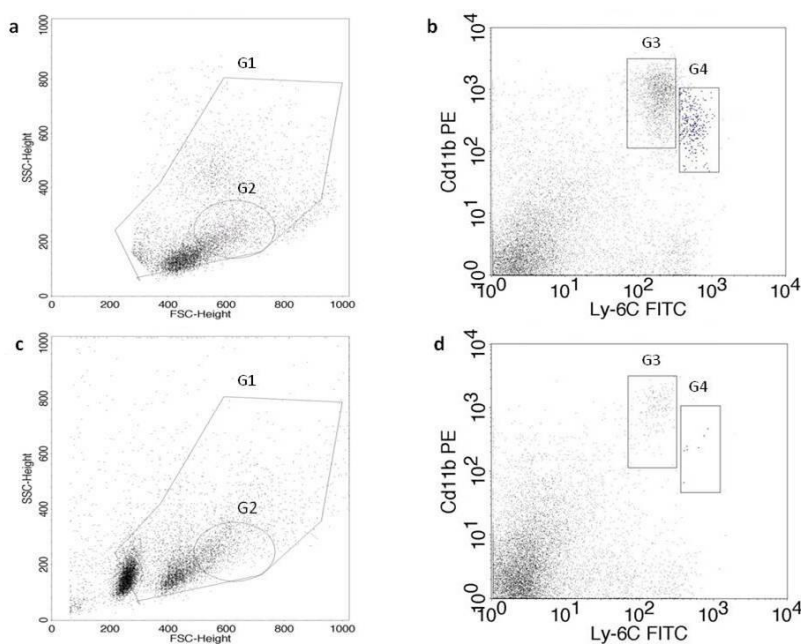


Abb. E.4.: FACS-Analyse der Ly6C^{high}-Monozyten (Gate G2 und G4) und der neutrophilen Granulozyten (Gate G3) in der Milz von Wildtypen (Bilder a, b) und von Mäusen mit *Klf4*-Deletion (Bilder c, d). Gate G1 selektierte alle vitalen Zellen. In der Milz der deletierten Mäuse waren wesentlich weniger Ly6C^{high}-Monozyten detektierbar. Anders als in dieser Darstellung anzunehmen, waren die neutrophilen Granulozyten nicht reduziert.

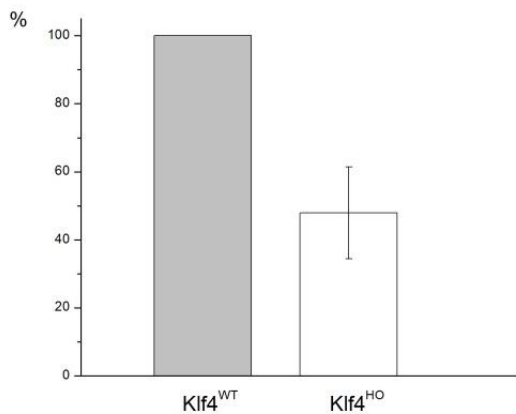


Fig. E.6.: Prozentualer Anteil der Ly6C^{high}- (Cd11b⁺ B220⁻) Monozyten im Knochenmark von wildtypischen Mäusen (Klf4^{WT}) und von Knochenmarkchimären (Klf4^{HO}). Reduktion dieser Monozytensubpopulation um ca. 52 % bei *Klf4*-deletierten Mäusen im Vergleich zu Wildtypen. Hier wurde die statistische Methode *Boxplot* angewandt. Mittelwerte und Standardabweichung.

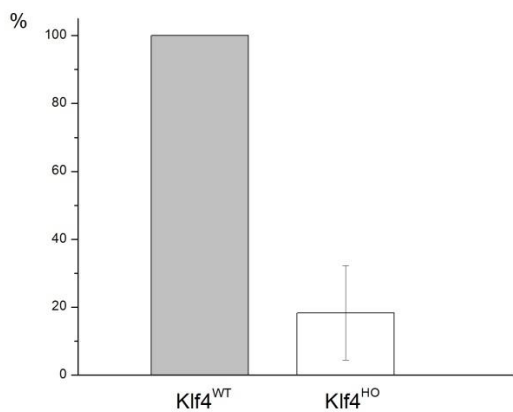


Fig. E.7.: Prozentualer Anteil der Ly6C^{high}- (Cd11b⁺ B220⁻) Monozyten in der Milz von wildtypischen Mäusen (Klf4^{WT}) und von Knochenmarkchimären (Klf4^{HO}). Reduktion dieser Monozytensubpopulation um ca. 82 % bei *Klf4*-deletierten Mäusen im Vergleich zu Wildtypen. Hier wurde die statistische Methode *Boxplot* angewandt.

E.2. Überexpression von *Klf4* beeinflusst dessen mutmaßliche Zielgene

Aus den bisher durchgeführten Experimenten (beschrieben in Unterpunkten von E.1.) wird ersichtlich, dass *Klf4* die Transkription einiger mutmaßlicher Zielgene moduliert. Es war jedoch unklar geblieben, ob *Klf4* die Zielgene direkt oder indirekt reguliert.

Um dieser Frage auf den Grund zu gehen, wurde im Folgend beschriebenen Gegenversuch *Klf4* in myeloiden Vorläuferzellen überexprimiert. Dadurch sollte gezeigt werden, dass *Klf4* die bei Deletion veränderten Gene auch im Umkehrschluss in entsprechende Richtung reguliert. Auch die Rolle der einzelnen Domänen der Gensequenz sollte durch die Überexpression von Vektormutanten der *Klf4*-Sequenz erklärt werden. Dafür wurden neben der vollständigen *Klf4*-

Sequenz auch *Klf4*-Teilsequenzen (s. Abb. E.5.) transduziert, denen jeweils die zu untersuchende Domäne fehlte: Die C-terminale Zinkfingerregion, die N-terminale Transaktivierungsdomäne oder die SH3-bindende Domäne, deren Funktionen im Einleitungsteil A.2.1.2.1. erklärt werden.

Als Positiv- bzw. Negativkontrolle wurden Vektoren mit der kompletten *Klf4*-Sequenz bzw. mit nur der MIEG3-Sequenz transkribiert.

Die Überexpression erfolgte mit MIEG3 retroviralen Vektoren, die murine *Klf4*cDNA bzw. mutierte cDNA enthielten. Dabei wurden die Vorläuferzellen nach Präparation und Kultivierung mit viralen Vektoren (Virusüberständen) unterschiedlichen Designs per retroviralem Gentransfer zwei Mal infiziert (s. Einleitung, A.5. und Methoden, D.3.3.). Der Vektor wurde mit Hilfe von Retronektin (s. Einleitung, A.7. und Methoden, D.3.3.) zunächst in die Zellen transduziert und per FACS selektiert (s. Methoden, D.4.2.). Die Translokation in den Zellkern war jedoch zunächst durch ein Hitzeschockprotein blockiert. Sie wurde aktiviert durch Zugabe von 4-OHT (s. Einleitung, A.6. und Methoden, D.3.4.).

Die Überstände waren bereits von M. Milanovic hergestellt worden (s. Methoden, D.3.2.).

Die RNA der Zellen wurde entnommen, cDNA hergestellt und per PCR analysiert (s. Methoden, D.6., D.9., D.10.2.). Durch *real time* PCR wurde die Transkriptmenge einiger wahrscheinlicher Zieltranskripte von *Klf4* in den überexprimierenden Zellen bestimmt.

Dieses Protokoll wurde drei Mal an unterschiedlichen Tagen unter gleichen Bedingungen durchgeführt.

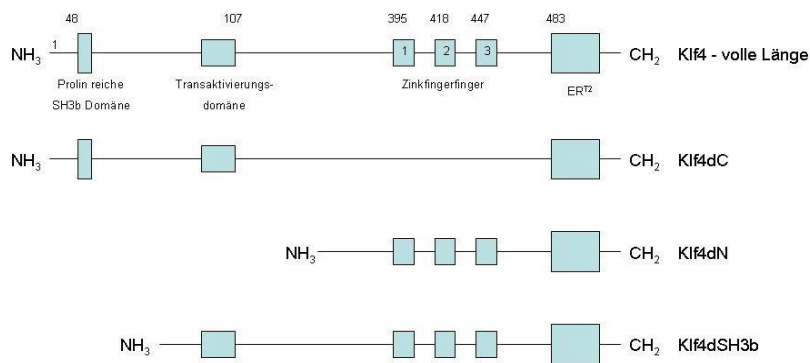


Abb. E.5.: Schema der cDNA der Vektormutanten von *Klf4*, die in myeloide Vorläuferzellen transduziert wurden.

E.2.1. Auswahl der per *real time* PCR zu messenden Zielgene von *Klf4*

Mithilfe der Polymerasekettenreaktion wurde die Expression einiger Transkripte in *Klf4*-überexprimierenden und *Klf4*-Mutanten-überexprimierenden Zellen analysiert. Dabei waren

solche Gene von Interesse, die von Klf4 deutlich beeinflusst wurden. Die Auswahl dieser Transkripte ergab sich aus der Schnittmenge von zwei Genexpressionsanalysen: Erstens wurde im Rahmen dieser Arbeit für den in E.1.2.3. beschriebenen Versuch die Genexpression von Ly6C^{high}-Monozyten mit und ohne *Klf4*-Deletion verglichen. Hier zeigte sich eine Anzahl von 260 signifikant unterschiedlich exprimierten Transkripten. Zweitens war bereits im Vorfeld dieser Arbeit eine Genexpressionsanalyse von Vorläuferzellen durchgeführt worden, die nativ waren und im Vergleich Klf4 überexprimiert hatten.

Die Schnittmenge beider Genexpressionsanalysen ergab 16 Transkripte. Davon wurden zehn durch Klf4 stärker und fünf schwächer exprimiert (s. Tab. E.3.). Tlr13 wurde in der Genexpressionsanalyse dieser Arbeit durch Klf4 reprimiert (s. E.1.2.3.), in der verglichenen Genexpressionsanalyse allerdings induziert.

Durch Klf4 induziert	Durch Klf4 reprimiert
Pdlim1 (<i>Interferon-induced protein 44</i>)	Usp18 (<i>Ubiquitin specific peptidase 18</i>)
Ptgir (<i>Prostaglandin I receptor (IP)</i>)	Irf7 (<i>Interferon regulatory factor 7</i>)
cDNA Sequenz BC021523	Ly6a (<i>Lymphocyte antigen 6 complex, locus A</i>) bzw. sca-1 (<i>stem cell-ag 1</i>)
Hip1 (<i>Huntingtin interacting protein 1</i>)	Ifi44 (<i>Interferon-induced protein 44</i>)
Bst1 (<i>Bone marrow stroMal cell antigen 1</i>)	Tgtp (<i>T-cell specific GTPase</i>)
Metrnl (<i>Meteorin, glial cell differentiation regulator-like</i>)	
Adora2b (<i>Adenosine A2b receptor</i>)	
Nav1 (<i>Neuron navigator 1</i>)	
Tm7sf1 (<i>Transmembrane 7 superfamily member 1</i>)	
RIKEN cDNA 2310051E17 gene	
Tlr13 (<i>Toll-like receptor 13</i>)	Tlr13 (<i>Toll-like receptor 13</i>)

Tab. E.3.: Schnittmenge der von Klf4 beeinflussten Gene zweier Genexpressionsanalysen. Nur Tlr13 wurde in der Genexpressionsanalyse für diese Arbeit durch Klf4 reprimiert, in der verglichenen Genexpressionsanalyse jedoch induziert.

Es wurden exemplarisch solche Gene der Schnittmenge ausgewählt, die eine hohe differenzielle Expression aufwiesen. Die Transkriptmengen dieser Gene sollten in den Klf4-überexprimierenden Zellen bzw. in Klf4-Mutanten-überexprimierenden Zellen anhand der *real time* PCR-Analyse bestimmt werden. Dafür wurden Primer mit den passenden Sequenzen zu den

zu untersuchenden Genen bestellt, die Bedingungen für die Polymerasekettenreaktion eruiert und schließlich die *real time* PCR mithilfe von cDNA aus der Zell-RNA durchgeführt.

Die Etablierung der individuellen PCR-Bedingungen für jeden Primer stellte sich als langwierige Arbeit heraus. Bevor die eigentliche *real time* PCR der gewünschten Proben durchgeführt werden konnten, musste zunächst die optimale *annealing*-Temperatur jedes Primerpaars, bei der es sich an die cDNA bindet, empirisch bestimmt werden. Dazu amplifizierten die Primer cDNA hämatopoetischer Zellen bei unterschiedlichen *annealing*-Temperaturen. Anschließend konnte nach physikalischer Auftrennung der Produkte auf dem Agarosegel erkannt werden, bei welcher Temperatur das Produkt eindeutig und ohne Nebenprodukte amplifiziert worden war (s. Methoden, D.10.1.). Neben der Definition der individuell richtigen *annealing*-Temperatur stellen im Allgemeinen Verunreinigungen der Umgebung mit vom Primer gespaltenen PCR-Produkten ein Problem dar. Daher wurde jedem PCR-Durchlauf eine Negativkontrolle mit Wasser beigefügt, die keine Kontamination mit PCR-Produkten enthalten durfte, um Falschmessungen zu vermeiden. Zudem mussten die Peaks der Schmelzkurve, die abhängig von der Produktlänge sind, in allen gemessenen Proben weitgehend übereinstimmen.

Zu den Transkripten, die erfolgreich in drei Probenansätzen gemessen werden konnten, gehören: *Il-1 β* und *Adora2b*.

Il-1 β kodiert für ein Interleukin. Es diente hier als Positivkontrolle, da durch Vorarbeiten der Arbeitsgruppe bekannt war, dass *Il-1 β* durch *Klf4* induziert wird (Milanovic 2005).

Adenosinrezeptor 2b (*Adora2b*) ist ein Zellmembranrezeptor, dessen Transkription durch *Klf4* gesteigert wird (s. E.1.2.3.). Er hat entscheidende Funktion in der Regulierung von Mastzellen und verhindert wahrscheinlich deren überschießende Immunantwort (Xiaoyang Hua et al. 2007).

E.2.1.1. Expression der Transkripte in *Klf4*-überexprimierenden im Vergleich zu nativen Zellen

Wie bereits bekannt, unterstützt *Klf4* die Expression von *Il-1 β* . Das war auch hier in allen drei Versuchen der Fall. In Versuch A zeigte die PCR-Analyse, dass die native Zelle (mit MIEG-Vektor) kaum *Il-1 β* exprimierte. Die Ratio hier betrug 333,33. In B war *Klf4* 7,69fach und in C 9,09fach stärker exprimiert als der Kontrollvektor (s. E.2.1.2., Fig. E.8.).

Bei der Analyse von *Adora2b* zeigte sich in Versuch A eine Ratio von 8,69, in B von 2,86 und in C war *Klf4* 2,22fach stärker exprimiert (s. E.2.1.2., Fig. E.9.). In allen drei Versuchen wurde *Adora2b* also in Zellen mit komplettem *Klf4*-Vektor stärker exprimiert.

E.2.1.2. Funktion der einzelnen Domänen des *Klf4*-Gens

Auch die Frage nach der Funktion der einzelnen Domänen des *Klf4*-Gens sollte mit diesem Versuchsansatz beantwortet werden.

In allen *Klf4*-Mutanten wurde die Expression der Transkripte *Il-1 β* und *Adora2b* in den drei gleich angelegten Versuchen gemessen (Versuche A, B und C). Die Mutante DeltaC in Versuch C konnte nicht hergestellt werden, da die Zellen während der Kultivierung im Rahmen der Einbringung der Virusvektoren zu Grunde gingen.

Die im Folgenden genannte Ratio wurde jeweils errechnet aus der Transkriptmenge in Zellen mit der jeweiligen *Klf4*-Mutante und der Transkriptmenge in nativen Zellen (mit Nullvektor MIEG3).

Il-1 β wurde in *Klf4*-überexprimierenden Zellen in Versuch A 333fach stärker exprimiert als in Zellen, die den Kontrollvektor trugen. In Zellen mit der *Klf4*-Mutante DeltaN sowie DeltaSH3b war die Expression gar 1000fach stärker (Fig. E.8.). In diesem Versuch wurde *Il-1 β* in DeltaC-Mutanten mit einer Ratio von 200 im Vergleich zu den anderen Mutanten am geringsten, jedoch deutlich mehr als in MIEG3-Mutanten, exprimiert.

Im Versuche B und C exprimierten die Mutanten DeltaN und DeltaSH3b *Il-1 β* am stärksten, im Falle von DeltaN 100fach bzw. 50fach, im Falle von DeltaSH3b 33,33fach bzw. 25fach. DeltaC ist in Versuch B mit 4,17fach stärkerer Expression im Vergleich am wenig deutlichsten.

Ähnliches zeigte sich für das Transkript *Adora2b* (Fig. E.9.). In Versuch A und B wurde *Adora2b* in den Zellen mit DeltaN-Mutanten am stärksten exprimiert, gefolgt von DeltaSH3b: In Versuchen A bzw. B wurde *Adora2b* im Falle von DeltaN 20fach bzw. 11,11fach und im Falle von DelatSH3b 14,29fach bzw. 8,33fach stärker exprimiert im Vergleich zum Kontrollvektor. Zellen mit Mutanten exprimierten *Adora2b* stärker als Zellen mit vollständigem *Klf4*-Gen (Ratio zum Kontrollvektor in Versuch A 8,33, in Versuch B 2,86).

In Versuch C wurde *Adora 2b* nur in Zellen mit vollständigem *Klf4*-Vektor und in Zellen mit DeltaSH3b-Mutante ca. zweifach stärker exprimiert als in Zellen mit Kontrollvektor. Im Falle von DeltaN wurde *Adora2b* nicht induziert (Ratio der Transkriptmengen von Zellen mit DeltaN und Kontrollvektor betrug 0,88).

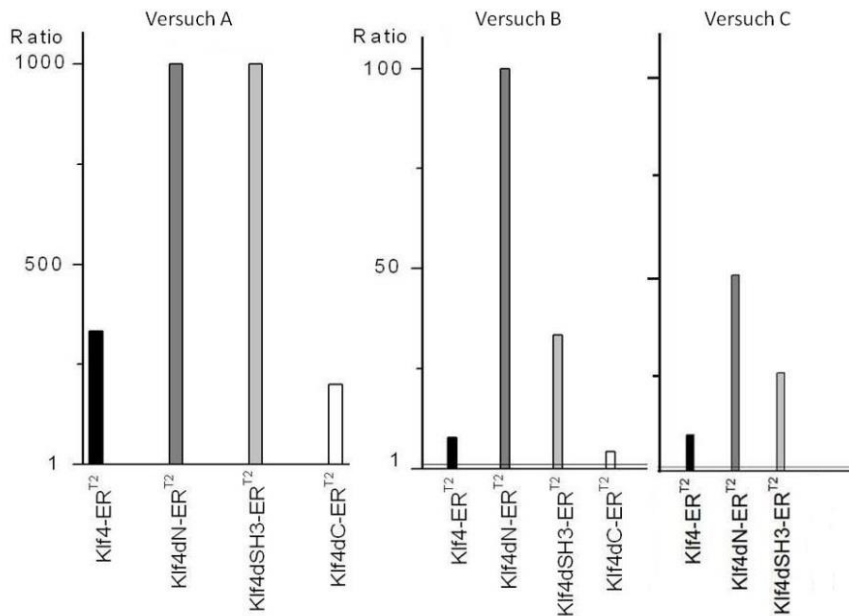


Fig. E.8.: Transkriptmenge von Il-1 β (Angaben im Verhältnis zum Kontrollvektor) in Versuchen A, B und C: Vollständiger Vektor Klf4-ER^{T2} (schwarze Balken), Vektoren mit fehlender N-Domäne Klf4dN- ER^{T2} (dunkelgraue Balken), fehlender SH3b-Domäne Klf4dSH3- ER^{T2} (hellgraue Balken) und fehlender C-terminaler Domäne Klf4dC-ER^{T2} (weiße Balken). Klf4dN-ER^{T2} (dunkelgraue Balken) exprimierten Il-1 β am stärksten, gefolgt von Klf4dSH3b-ERT2 (hellgraue Balken). Klf4dC-ER^{T2} konnte in Versuch C nicht ermittelt werden.

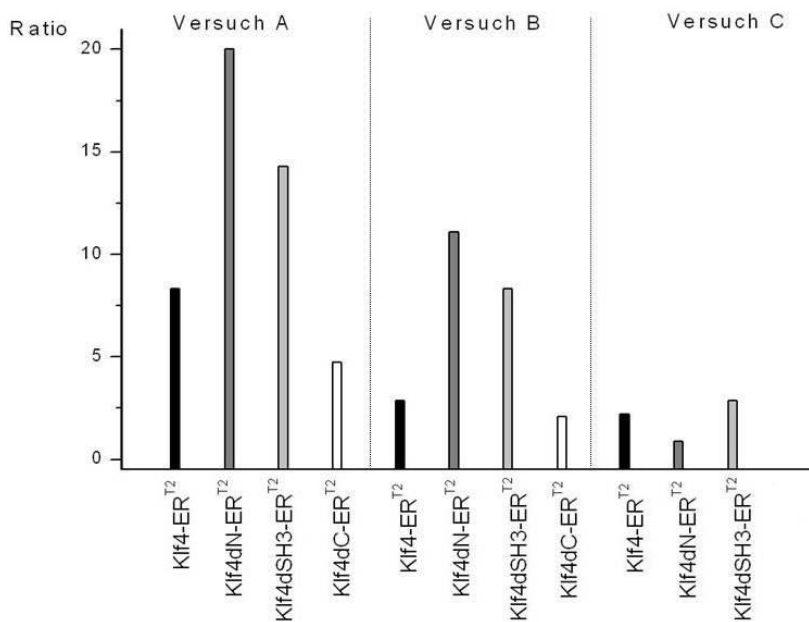


Fig. E.9.: Transkriptmenge von Adora2b in Versuchen A, B und C (Angaben im Verhältnis zum Kontrollvektor): Vollständiger Vektor Klf4-ER^{T2} (schwarze Balken), Vektoren mit fehlender N-Domäne Klf4dN- ER^{T2} (dunkelgraue Balken), fehlender SH3b-Domäne Klf4dSH3- ER^{T2} (hellgraue Balken) und fehlender C-terminaler Domäne Klf4dC-ER^{T2} (weiße Balken). Klf4dN-ER^{T2} (dunkelgraue Balken) exprimierten Adora2b in Versuch A und B am stärksten, gefolgt von Klf4dSH3b-ER^{T2} (hellgraue Balken). Klf4dN-ER^{T2} exprimierten Adora2b in Versuch C etwas weniger stark als der Kontrollvektor (Ratio 0,88, also <1). Klf4dC-ER^{T2} konnte in Versuch C nicht ermittelt werden.

F. Diskussion

F.1. Deletion von *Klf4* hat Auswirkungen auf Ly6C^{high}-Monozyten

F.1.1. Verminderte Anzahl in Blut und Knochenmark von *Klf4*^{fl/fl}-VAV-Cre-Mäusen

Dem Transkriptionsfaktor *Klf4* wurde in den letzten Jahren eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von Myeloidzellen und von Th17-Zellen zugeschrieben. Besonders auf dem Gebiet der Makrophagen in Entwicklung und Aktivierung sowie als Regulator von *Cd11d* und als Zielgen von IFN γ konnte *Klf4* eine wichtige Aufgabe zugeordnet werden. Vor Beginn dieser Arbeit vermutete man bereits seine Rolle in der Monozytendifferenzierung, In-vivo-Studien an *Klf4*-deletierten Mäusen waren bis zu dem Zeitpunkt jedoch nicht bekannt. In dieser Arbeit wurden die beiden Subpopulationen der Monozyten in einer *Klf4*-deletierten VAV-Cre-Maus untersucht, um die Situation bei Abwesenheit von *Klf4* und damit seine Rolle zu erörtern.

Zu erwarten war eine Beeinträchtigung der Monozytenreifung, denn wie Feinberg et al. 2007 beschrieben, bestimmt KLF4 in der HL60-Zelllinie das Schicksal der Vorläuferzelle in Richtung Monozyt und erlaubt seine Ausreifung. Hämatopoetische Stammzellen mit KLF4-Knockout differenzieren weniger häufig in Monozyten. Umgekehrt kann KLF4 die humane Monozytendifferenzierung initiieren, auch bei Abwesenheit von PU.1.

Interessant war nun, in welcher Form sich die Abwesenheit von *Klf4* auf murine Monozyten auswirkte.

Im peripheren Blutbild zeigte sich bei *Klf4*-deletierten Mäusen eine signifikante Reduktion der Monozytensubpopulation der sog. inflammatorischen Monozyten, die sich im FACS als Ly6C^{high} darstellten. Sie waren in den Stichproben kaum bis gar nicht vorhanden und ergaben im Mittel eine 14fache signifikante Reduktion im Vergleich zur Monozytenzahl aus Wildtypmäusen. Sogenannte residente (Ly6C^{neg.}-) Monozyten und neutrophile Granulozyten waren dagegen nicht vermindert.

Trotz einer relativ großen Standardabweichung (bei den Proben aus Knockout-Mäusen 70 %, bei den Proben aus Wildtypen 38 %) stützt dieser Versuch die Hypothese, dass *Klf4* unerlässlich für die Entwicklung der Ly6C^{high}-Monozyten, zumindest aber für ihre Anwesenheit im peripheren Blut, ist. Versuche anderer haben gezeigt, dass KLF4 insbesondere unter inflammatorischen Bedingungen an der humanen Makrophagenaktivierung entscheidend beteiligt ist (Feinberg et al. 2005; Liao et al. 2011). Die Genexpressionsanalyse *Klf4*-überexprimierender Myeloidzellen ergab die Aktivierung von v.a. proinflammatorischen Zytokinen (Beobachtung der

Arbeitsgruppe). Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass die Subpopulation der Ly6C^{high}-Monozyten von der *Klf4*-Deletion betroffen ist.

Ein ähnliches Ergebnis wurde kurz nach Durchführung der Experimente von Alder et al. 2008 veröffentlicht. Es zeigte sich auch hier, dass Ly6C^{high}-Monozyten kaum bis gar nicht im peripheren Blut vorhanden waren. Die Deletion wurde hier nicht mit LoxP-flankierten Mäusen erreicht, sondern durch Transplantation von Wildtypen mit *Klf4*-deletierten Zellen, wie in vorliegender Arbeit auch untersucht (s. Ergebnisteil, E.1.3.). Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit waren bei Alder et al. allerdings auch residente (Ly6C^{neg.}) Monozyten um ca. die Hälfte reduziert.

Um der Frage nachzugehen, ob die starke Reduktion der Ly6C^{high}-Monozyten im peripheren Blut auf eine Migrationsstörung aus dem Knochenmark ins Blut oder bereits auf eine Entwicklungsstörung zurückzuführen ist, wurde diese Zellpopulation als nächstes im Knochenmark analysiert. Da sich die Anzahl der Ly6C^{high}-Monozyten im peripheren Blut stark beeinträchtigt zeigte, muss davon ausgegangen werden, dass die Ursachen bereits in Entwicklungsstadien im Knochenmark zu finden sind. Reife Monozyten entstehen aus im Knochenmark reifenden Monoblasten.

Hypothetischer Grund für die geringe Anzahl der Ly6C^{high}-Monozyten im peripheren Blut ist eine mögliche Unfähigkeit der nötigen Verformung der Zellen für die Migration aus dem Knochenmark. Demnach müssten die Zellen schon im Knochenmark einen Defekt aufweisen, der aber nicht zwangsläufig die Anzahl dieser Zellpopulation im Knochenmark beeinträchtigt. Ist die Anzahl jedoch auch im Knochenmark vermindert, spricht dies für einen tiefgreifenden Entwicklungsdefekt der Ly6C^{high}-Monozyten.

Tatsächlich zeigte sich auch bei der Analyse von Ly6C^{high}-Monozyten im Knochenmark von *Klf4*-deletierten Mäusen eine deutliche Reduktion im Vergleich zum Knochenmark von Wildtypen um mehr als die Hälfte. Bei relativ großer Standardabweichung von 36 % können keine genauen Angaben über die Reduktionsrate des hier untersuchten Zelltypen gemacht werden. Eine Reduktion der Ly6C^{high}-Monozyten in *Klf4*-deletierten Mäusen ist jedoch offensichtlich und eindeutig.

Auch Alder et al. beschrieben in der bereits erwähnten Veröffentlichung, dass vermehrt apoptotische Monozyten in Tieren mit *Klf4*-Deletion gefunden wurden (Alder et al. 2008). Lässt sich ein Grund hierfür in der für diese Arbeit durchgeführten Genexpressionsanalyse (s. Ergebnisse, E.1.2.3.) wiederfinden? Werden durch die Deletion von *Klf4* Transkripte stärker exprimiert, die die Apoptose fördern bzw. Transkripte schwächer exprimiert, die das Überleben

der Zelle begünstigen? Tatsächlich lassen sich für diese Hypothese Beispiele finden (s. auch F.1.2.): Eine kleine Gruppe Transkripte, die im Zellkern entscheidende Funktionen (wie Kernfixierung) innehat, wurde durch Klf4 induziert. Bei Abwesenheit von Klf4 könnte das einen Überlebensnachteil für die Zelle bedeuten. Auch Transkripte mit Funktionen in Zelladhäsion und Zellinteraktion waren bei Abwesenheit von Klf4 reprimiert.

Dennoch widerlegt eine Vielzahl von Transkripten diese logisch erscheinende Überlegung: Die Mehrzahl der durch Klf4 induzierten Transkripte, die das Zellwachstum fördern, wurde durch Klf4 reprimiert, also bei Abwesenheit von Klf4 stärker exprimiert. Einige Regulatoren der Apoptose wurden bei *Klf4*-Deletion reprimiert.

Eine einfache Erklärung für die vermehrt auftretende Apoptose in Ly6C^{high}-Monozyten mit *Klf4*-Deletion ist dies also nicht. Eher denkbar ist ein durch die *Klf4*-Deletion entstehendes Ungleichgewicht vieler verschiedener Faktoren, deren physiologisches Zusammenspiel die Entwicklung und das Überleben der Zelle sichert. Experimentell jedenfalls wurde die Wichtigkeit von Klf4 für die Schicksalsentscheidung in der frühen Myelopoese, wie auch deren Rolle in der späten Ausreifung der Monozyten (Feinberg et al. 2007), bereits nachgewiesen.

F.1.1.1. Morphologie der Ly6C^{high}-Monozyten des Knochenmarks von Klf4^{fl/fl}-VAV-Cre-Mäusen und Wildtypen

Betrachtet man den Phänotypen der Ly6C^{high}-Monozyten unter dem Lichtmikroskop, lassen sich offen ersichtlich keine Unterschiede zwischen den wildtypischen und den *Klf4*-deletierten Zellen erkennen. Aufgrund der Beeinträchtigung der deletierten Zellen in ihrer Zahl und vermutlich in ihrer Funktion wäre eine phänotypisch ersichtliche Verformung der Zellen irgendeiner Art denkbar gewesen.

Die Genexpressionsanalyse, im folgenden Abschnitt F.1.3. diskutiert, zeigte die weitgreifende Auswirkung der *Klf4*-Deletion auf andere Gene, u.a. solche, die für das Zytoskelett der Zelle kodieren. Für eine genaue Aussage über den Phänotyp der deletierten Zellen müsste man jedoch mit Hilfe weiterer Methodik eine genauere Analyse des mikroskopischen Bildes durchführen.

F.1.2. Genexpressionsanalysen aus der Monozyten-RNA im Vergleich

Mit der Genexpressionsanalyse von Ly6C^{high}-Monozyten aus Mäusen mit *Klf4*-Deletion im Vergleich mit Wildtypen sollte gezeigt werden, welche Transkripte *downstream* von *Klf4* liegen und dadurch beeinflusst werden. Außerdem war es von Interesse, diese Genexpressionsanalyse mit dem von Klf4-überexprimierenden Myeloidzellen (bereits zuvor in der Arbeitsgruppe

durchgeführt) zu vergleichen. Ähnliche Versuche sind in der Literatur zu finden, die die Expression von Transkripten in Abhängigkeit von KLF4 untersuchten. Allerdings wurden oft humane Zelllinien verwendet, die keinen näheren Bezug zum hämatopoetischen System haben. Dies macht den direkten Vergleich mit den für diese Arbeit verwendeten murinen Zellen aus dem hämatopoetischen System schwierig. Übereinstimmung mit funktionellen Gruppen, die in der Literatur beschrieben wurden, können aber hier erkannt werden (s. unten).

Eine kürzlich veröffentlichte Studie untersuchte die Genexpression von *Klf4*-deletierten murinen embryonalen Fibroblasten (Hagos et al. 2011; s. unten).

Aufgrund des bisherigen Wissens über *Klf4*/KLF4 war zu erwarten, dass dieser Transkriptionsfaktor Transkripte mit diversen Funktionen beeinflussen würde. Man weiß, dass *Klf4*/KLF4 abhängig vom Zielgen als Repressor und Aktivator fungieren kann und die unterschiedlichsten Funktionen innehat, darunter Regulation der Entwicklung, Proliferation, Differenzierung und Unterhaltung verschiedener Gewebe. Wie bereits in der Einleitung (A.2.1.2.) erwähnt, kennt man seine reprimierende Wirkung auf Zellwachstum, Proliferation und seine Fähigkeit zur Induktion des Zellzyklusarrestes. KLF4 kann als Tumorsuppressor und Onkogen wirken (Evans et al. 2007). Im Mammakarzinom korrelierte KLF4 in einer Studie an Hunden beispielsweise mit einer aggressiveren Art, im Kolonkarzinom beim Menschen ist KLF4 dagegen in weniger differenzierten Tumoren weniger exprimiert und könnte somit als Tumormarker und prognostischer Faktor an Bedeutung gewinnen (Chen et al. 2011; Patel et al. 2010). In einer weiteren Untersuchung an Mäusen stellte man die Korrelation zwischen *Klf4*-Expression und weniger Mamma-Metastasenbildung und Metaplasie fest (Yori et al. 2011). Dies zeigt die komplexen Funktionen von *Klf4*/KLF4 auf unterschiedlichste Zellmechanismen im Zusammenspiel mit anderen Faktoren.

Des Weiteren besitzt KLF4 im Zusammenspiel mit anderen Transkriptionsfaktoren die Fähigkeit zur Reprogrammierung von Fibroblasten auf Niveau von embryonalen Stammzellen neben der für diese Arbeit entscheidenden Rolle in der Monozyten- und Makrophagendifferenzierung. (Feinberg et al. 2007; Liao et al. 2011).

Die Genexpressionsanalyse der Ly6C^{high}-Monozyten von Mäusen mit *Klf4*-Deletion im Vergleich mit Wildtypen ergab 83 höher und 177 niedriger exprimierte Transkripte. Sie lassen sich anhand ihrer Funktion in Gruppen einteilen.

Eine der größten Gruppen spielt eine wichtige Rolle in der Immunantwort. Die Mehrzahl dieser Proteine wurde im Versuch für diese Arbeit durch *Klf4* reprimiert. Dies sind Aktivatoren des Immunsystems, darunter Gene der Prostaglandinbiosynthese und Serinproteaseaktivatoren,

Gene der viralen Abwehr, Gene, die im Zusammenhang mit Lymphozytenaktivierung/-unterhalt stehen, Immunglobulinbestandteile, Komplementbestandteile und makrophagenassoziierte Gene. M. Milanovic zeigte in ihrer Dissertation, dass Klf4 die Differenzierung und Aktivierung von Makrophagen fördert (Milanovic 2005). Auch in der Literatur wurde KLF4 eine entscheidende Rolle in der proinflammatorischen Signaltransduktion in Makrophagen zugeschrieben (Feinberg et al. 2005; Lioa et al. 2011). Dies bestätigte sich hier durch die Repression von Il18bp, dessen Funktion in der Inhibition von Il18 besteht und dadurch die Makrophagenaktivierung verhindert. Il18 kann unter Klf4-Einfluss Makrophagen ungestört aktivieren. Paradoxerweise reprimierte Klf4 in der Genexpressionsanalyse jedoch eine Gruppe makrophagenaktivierender Gene, wie Mpa2l, Lgals3bp, Spic und Aif1.

In der Literatur wurde eine starke Aktivität von KLF4 in der Makrophagendifferenzierung von HL60-Zellen beschrieben (Alder et al. 2008). KLF4 soll den Makrophagenaktivierungsmarker Cd11d reprimieren (Noti et al. 2005), und - wie bereits erwähnt - an der proinflammatorischen Signalaktivierung von humanen Makrophagen beteiligt sein (Feinberg et al. 2005). Möglich ist jedoch eine kompetitive Aktivität von Klf4 gegenüber den anderen Makrophagenaktivatoren.

Die aktuellste Studie hierzu von Liao et al. vermutet die Förderung der sog. M2- oder antiinflammatorischen Makrophagen durch KLF4 gegenüber M1- oder proinflammatorischen Makrophagen (Liao et al 2011), was auch eine Erklärung für die unterschiedlich regulierten Zielgene sein könnte.

Mehrere Gene, die für Histokompatibilitätsantigene kodieren, wurden alle durch Klf4 reprimiert. Diese Gene teilen die Eigenschaft, förderlich für das Immunsystem und seine Immunzellen zu sein. Die repressive Auswirkung von Klf4 wird hier deutlich.

Auch die Regulatoren der Interferonantwort wurden in der Mehrzahl durch Klf4 reprimiert, hierunter waren jedoch sowohl Aktivatoren (Irf7, Igtp, Cxcl10), als auch Repressoren (Ifi44, Usp18, Prdm1). Die Repression von CXCL10 durch KLF4 bestätigte eine 2010 veröffentlichte Untersuchung an humanen Lymphom Zelllinien (Guan et al. 2010) sowie die bereits erwähnte Genexpressionsanalyse muriner embryonaler Fibroblasten (Hagos et al. 2011).

Im Gegensatz dazu stehen durch Klf4 induzierte Gene: Bst1, Aktivator der B-Zell-Proliferation; Adora2b mit entscheidender Regulierungsfunktion von Mastzellen; CD244, ein T-Zell und NK-Rezeptor; Cx3Cr1, ein Rezeptor auf Monozyten, Neutrophilen und T-Lymphozyten mit chemotaktischer Funktion und Gp49a, Rezeptor auf Mastzellen, NK und Makrophagen und für die Zytokinexpression zuständig sowie Il-17r, der über NFkB an der proinflammatorischen Immunantwort beteiligt ist. Wie in der Einleitung (s. A.3.2.1.) beschrieben, ist Cx3Cr1 offenbar unerlässlich für Chemoattraktion und Patrouillieren der Ly6C^{high}-Monozyten. In *Klf4*-

Deletionsversuchen zeigten sich deutlich weniger dieser Zellen am Ort der Entzündung sowie deutlich weniger patrouillierende Ly6C^{high}-Monozyten (Auffray et al. 2007 und 2009a). Als lienal exprimierter Ligand soll Cx3Cl1 auch für das sehr frühe Rekrutieren von Ly6C^{neg}-Monozyten verantwortlich sein (Auffray et al. 2009a).

In kürzlich veröffentlichter Literatur wurde eine weitere unserer Beobachtungen bestätigt: An et al. zeigten die direkte Interaktion zwischen Klf4 und Il-17a und die konsekutive positive Regulation des Interleukins (An et al. 2011). Auch Rara, der in die Reifung von hämatopoetischen Zellen involviert ist, befand sich unter den induzierten Transkripten sowie der Prostaglandinrezeptor I2 mit aktivierender Funktion auf das Immunsystem.

Anhand des quantitativen Vergleichs von reprimierten und induzierten Transkripten lässt sich eine eher negativregulierende Rolle von Klf4 auf das Immunsystem vermuten, v.a. innerhalb der Interferon-vermittelten Antwort. Die nicht wenigen Ausnahmen zeigen jedoch, dass der Einfluss von Klf4 offenbar von mehreren Faktoren abhängt. Die augenscheinliche Paradoxität macht auch folgendes Beispiel deutlich: Der von Interleukinen, Interferonen oder Wachstumsfaktoren aktivierte Jak-Stat-Signalweg wird durch Inhibierung von Usp18 durch Klf4 unterstützt, aber wiederum gehemmt durch Inhibierung von Stat1 und Stat2 (s. Ergebnisse, Tab. E.2.).

Die bereits erwähnte Genexpressionsanalyse von *Klf4*-deletierten murinen embryonalen Fibroblasten aus dem Jahr 2011 beschrieb passend zu den Beobachtungen dieser Arbeit die kontrollierende Aufgabe von Klf4 im Immunsystem: Es kam zur Induktion von Genen der Immunantwort und Chemotaxis in *Klf4*-deletierten Zellen. Komplementkomponenten, CD-Antigene, Chemokinliganden, u.a. Cxcl10 wie auch in dieser Arbeit, und weitere zentrale Bausteine im Zusammenspiel des Immunsystems waren dagegen in erster Linie durch Klf4 reprimiert (Hagos et al. 2011).

Die Involvierung von Klf4 in Prozesse, die das Immunsystem betreffen, ist auch zuvor schon vielfach untersucht und bestätigt worden. In der Arbeitsgruppe war bereits bekannt, dass Klf4 die Gene für die Interleukine Il-1 und Il-6 sowie für einige Enzyme des Arachidonsäuresignalwegs aktiviert. Versuche der Arbeitsgruppe wie auch Veröffentlichungen anderer Gruppen zeigten darüber hinaus, dass Klf4 in myeloiden Zellen die Th17-Zellen-Differenzierung initiiert, gar ein myeloidzellspezifischer Transkriptionsfaktor für die Aktivierung von autoimmunen Krankheitsprozessen ist (An et al. 2011). Dies lässt eine regulierende Rolle von Klf4 in der Immunabwehr vermuten, abhängig von Zielgenen und Stellgrößen.

Eine weitere wichtige Gruppe der Genexpressionsanalyse dieser Arbeit lässt sich unter dem Stichwort Zellzyklus/Zellregulierung zusammenfassen. In der bereits zitierten

Genexpressionsanalyse an murinen embryonalen Fibroblasten stellten die Transkripte dieses Bereichs gar die größte in *Klf4*-deletierten Zellen induzierte Gruppe dar. Im Umkehrschluss wurden diese Transkripte bei Anwesenheit von *Klf4* also reprimiert und damit kontrolliert. Diese Transkripte kodieren für Zellzyklusaktivatoren, extrazelluläre Matrix-Proteine, Protoonkogene und Wachstumsfaktoren.

Wie bereits erwähnt, sind in der Literatur weitere Studien zu finden, die die Rolle von KLF4 anhand von Genexpressionsanalysen untersucht haben: Veröffentlichungen aus den Jahren 2003 (Chen et al. 2003b) und 2006 (Whitney et al. 2006) beschrieben die Messung der Expressionsstärken einiger Transkripte in Korrelation zu KLF4 (Genexpressionsanalyse einer humanen Zelllinie EcR-Rko/KLF4). Hier wurde KLF4 mit Panasteron A induziert. Es wurden funktionelle Gruppen beschrieben, die in weiten Teilen mit der Einteilung dieser Arbeit vergleichbar sind, darunter Gene für Zellwachstum, Immunantwort, Metabolismus, strukturelle Integrität, Signaltransduktion und Translationskontrolle. Die größte Gruppe in den Veröffentlichungen machten auch hier Transkripte im Bereich der Zellzykluskontrolle aus. In beiden Studien an humanen Zelllinien waren die meisten durch KLF4 induzierten Transkripte Zellzyklusinhibitoren und die meisten reprimierten Transkripte Zellzykluspromotoren. Das passt zur beschriebenen Rolle von KLF4 als Tumorsuppressorgen.

Auch in der Genexpressionsanalyse dieser Arbeit stellt dies eine große Gruppe dar. Analog zu den in den zitierten Studien beschriebenen Beobachtungen wurden mit wenigen Ausnahmen Gene, die das Zellwachstum fördern (*Axl*, *Tspan4*, *Nrg2*, *c-Met*) und die DNA-/RNA-Synthese unterstützen (*Uck2*, *Parp12*), durch *Klf4* reprimiert. Gene, die repressive Funktion auf die Zellproliferation haben, wurden durch *Klf4* induziert; darunter *Nupr1* und *Hip1*, Regulatoren der Apoptose; *Rem1*, ein negativer Regulator spannungsabhängiger Calciumkanäle und *Rras*, ein Repressor der Angiogenese sowie die Onkogene *Rroq*, *Rem1*, *Rab36*.

Von den in oben genannten Studien aufgeführten Genen dieser Funktion ist allerdings keines in unserer Genexpressionsanalyse enthalten. Dies mag an der unterschiedlichen Zellpopulation liegen. Während hier die Genexpression von murinen *Ly6C^{high}*-Monozyten untersucht wurden, wurden in den verglichenen Studien Zelllinien ohne immunologischen Bezug verwendet.

Die weiteren in den bereits zitierten Genexpressionsanalysen (Hagos et al. 2011; Chen et al. 2003b) beschriebenen funktionellen Gruppen von *Klf4* induzierten Zielgenen lassen sich auch hier wiederfinden, wie extrazelluläre Matrix- und Transportproteine sowie Proteine der Interaktion/Adhäsion zwischen Zellen. Im Versuch an murinen embryonalen Fibroblasten (Hagos et al. 2011) waren unter den reprimierten Transkripten solche, die das Zellwachstum

fördern oder die DNA-/RNA-Synthese unterstützen sowie Proteine der Zellentwicklung/-aktivierung, der Motilität und des Wachstums, analog zu Beobachtungen dieser Arbeit.

Allerdings lassen sich die einzelnen Transkripte der genannten Gruppen in der Literatur so nicht wiederfinden. Umgekehrt wurden in dieser Arbeit die in der Literatur beschriebenen Transkripte nicht detektiert. Das mag an der bereits erwähnten Unterschiedlichkeit der Versuchszellen liegen.

Die Analyse der Genexpression dieser Arbeit bestätigt bereits beschriebene Aufgaben und Involvierungsprozesse von *Klf4* und zeigt darüber hinaus bisher unbekannte Zielgene von *Klf4*.

F.1.3. Verminderte Anzahl von Ly6C^{high}-Monozyten in Knochenmark und Milz von Chimären mit konventioneller Deletion im hämatopoetischen System

Nachdem gezeigt worden war, dass beim verwendeten Deletionstypen die Anzahl der Ly6C^{high}-Monozyten wesentlich reduziert war, wurde dies nun auch bei einem alternativen Deletionstypen untersucht. Bei einem ähnlichen Ergebnis sollte so die Hypothese aus dem ersten Versuch gestützt werden, dass nicht etwa andere Effekte, als die Deletion von *Klf4* selbst, dieses Ergebnis zur Folge hatten oder beeinflussten. Außerdem sollte damit geklärt werden, ob die Abwesenheit von Ly6C^{high}-Monozyten im peripheren Blut von *Klf4^{fl/fl}*-VAV-Cre-Mäusen durch einen zellautonomen Defekt in der myeloiden Entwicklung im Knochenmark zustande kam. Möglich wären auch sogenannte Positionseffekte, die Einfluss nehmen könnten. Bei diesem Phänomen nimmt die heterochromatische Umgebung eines Gens Einfluss auf das entsprechende Gen.

Es wurde nun die Anzahl der Ly6C^{high}-Monozyten bei Knochenmarkchimären gemessen (Segre et al. 1995). Bei diesem Deletionstypen wurden fetale Leberzellen von Mäusen mit konventioneller *Klf4*-Deletion in zuvor letal bestrahlte CD45.1 Mäuse transplantiert. Das erlaubte das Überleben der Tiere, da die Deletion nur im Knochenmark vorhanden war.

Im Knochenmark dieses Deletionstypen im Vergleich zu C57Bl/6 Wildtypen zeigte sich wie erwartet eine reduzierte Anzahl von Ly6C^{high}-Monozyten. Der prozentuale Anteil im Knochenmark betrug ca. 48 % (Reduktion um 52 %). Dies entsprach den Beobachtungen, die bereits innerhalb der Arbeitsgruppe gemacht worden waren und ist vergleichbar mit einer später veröffentlichten Studie von Alder et al. 2008. Sie zeigten beim gleichen Deletionstypen eine Reduktion der Ly6C^{high}-Monozyten im Knochenmark um 43 %. In bereits oben beschriebenen Versuchen mit dem alternativen Deletionstypen betrug der prozentuale Anteil der Ly6C^{high}-Monozyten im Knochenmark von *Klf4^{fl/fl}*-VAV-Cre-Mäusen im Vergleich zu Wildtypen ca. 45 % (Reduktion um 55 %). Bei beiden verwendeten Deletionstypen kam es also zu einer

signifikanten Reduktion der Ly6C^{high}-Monozyten. Allerdings müssten bei erheblicher Standardabweichung der Probenmessungen aus Knockout-Mäusen von 76 % für die Bestimmung der genaueren Reduktionsrate weitere Versuche mit höherem Probenaufkommen folgen.

Auch die Anzahl der Ly6C^{high}-Monozyten in der Milz beider Populationen der Knochenmarkchimäre wurde gemessen. Hier ergab sich eine Reduktion um über 80 %. Alder et al. beschrieben in ihrer Veröffentlichung, dass praktisch keine Ly6C^{high}-Monozyten in der Milz von Klf4^{-/-}-Chimären zu finden waren. Die Beobachtungen bezüglich der Anzahl der Ly6C^{neg.}-Monozyten stimmen mit Alder et al. überein. Sie waren in ihrer Anzahl nicht beeinträchtigt (Daten hier nicht gezeigt).

Im Knochenmark der Klf4^{-/-}-Chimäre war die Anzahl der Ly6C^{high}-Monozyten weniger stark reduziert als in der Milz. Es ist auch hier, wie im Falle des alternativen Deletionstypen, anzunehmen, dass sich die Zellen auf dem Weg in die Peripherie weiter reduzieren. Der Grund hierfür kann in unterschiedlichen Funktionsstörungen vom Austritt aus dem Knochenmark bis hin zu Reifungsvorgängen in der Peripherie liegen.

F.2. Überexpression von Klf4 beeinflusst dessen mutmaßliche Zielgene

F.2.1. Auswahl der per *real time* PCR zu messenden Zielgene von Klf4

Nachdem nun die Auswirkung einer *Klf4*-Deletion auf Monozyten sowie auf das Genexpressionsmuster von Ly6C^{high}-Monozyten untersucht worden war, sollte ein Gegenversuch noch ungeklärte Fragen beantworten bzw. als eine alternative Methodik die bisherige Hypothese stützen. Ungeklärt war bisher, ob die veränderte Expression der Transkripte dem direkten Einfluss durch Klf4 unterlag. Wie im Einleitungsteil erwähnt, ist das Zusammenspiel der regulierenden Faktoren in der Zellentwicklung sehr komplex (s. Einleitung, A.3.3.3). Einzelne Transkriptionsfaktoren beispielsweise können je nach Kontext und Zielgen in unterschiedliche Richtungen regulieren. Eine Gendeletion hat also nicht nur die fehlende Genfunktion selbst zur Folge, sondern auch das veränderte Zusammenspiel des genetischen Umfelds. In der Folge veränderte Signalwege können sich auf die Expression weiterer Gene auswirken.

Ausgewählte Transkripte, die durch *Klf4*-Deletion beeinflusst worden waren (s. Ergebnisse, E.1.2.3.), wurden in diesem Versuchsaufbau weiter untersucht. Es sollte erstens geklärt werden, ob und in welcher Form sie auch im Umkehrschluss durch die Überexpression von Klf4

beeinflusst werden. Zweitens würde das im positiven Fall bedeuten, dass Klf4 eine direkte Regulierungsfunktion auf das entsprechende Transkript hat.

In Tab. E.3. (s. Ergebnisse, Abschnitt E.2.1.) sind die Transkripte aufgeführt, die sowohl in der Genexpressionsanalyse zu dieser Arbeit, als auch in der verglichenen Genexpressionsanalyse derselben Arbeitsgruppe durch Klf4 beeinflusst wurden. Zu dieser Schnittmenge gehören 16 Transkripte, von denen zehn durch Klf4 induziert und fünf reprimiert wurden. Nur Tlr13 ist nicht eindeutig zuzuordnen. Es wurde in *Klf4*-deletierten Zellen reprimiert, wohingegen es in der verglichenen Genexpressionsanalyse bei Überexpression von Klf4 induziert wurde im Vergleich zur nativen Zelle.

Betrachtet man die Schnittmenge, fällt auf, dass die meisten der Gruppe „Entzündung und Immunabwehr“ zuzuordnen sind. Dazu gehören folgende durch Klf4 induzierte Transkripte: *Adora2b*, negativer Regulator der Mastzellen; *Ptgir*, Vasodilatator und Plättcheninhibitor bei Entzündung; *Bst1*, der das Prä-B-Zell-Wachstum fördert. Folgende zur gleichen Gruppe gehörige Transkripte wurden durch Klf4 reprimiert: *Usp18*, negativer Regulator des Interferons und des Jak-Stat-Signalwegs; *Irf7*, der IFN- α und - β induziert; *Ifi44*, der auch IFN- α induziert und antiproliferative Aktivität besitzt; *Tgtp*, wichtig für die T-Zellentwicklung sowie *Ly6a*, das vermutlich in Angiogenese und Inflammation involviert ist. Tlr13 – in dieser Genexpressionsanalyse durch Klf4 reprimiert – induziert NF κ B und IFN-1.

Nicht in die Kategorie „Entzündung und Immunabwehr“ lassen sich folgende, durch Klf4 induzierte Transkripte einordnen: *Pdlim*, das vermutlich eine Rolle im Zytoskelett hat und *Hip1*, ein Apoptoseinitiator. Die Funktionen von *Metrl* und *Tm7sf1* sind bisher nicht bekannt.

F.2.1.1. Expression der Transkripte in Klf4-überexprimierenden im Vergleich zu nativen Zellen

Aus dieser Schnittmenge wurden Gene ausgewählt, deren Transkriptmengen mithilfe der *real time* Polymerasekettenreaktion gemessen werden sollten. Sie mussten in der Genexpressionsanalyse eine gute differenzielle Expression aufweisen und später in der *real time* PCR gut messbar sein.

Es kam aus teilweise unklaren Gründen immer wieder zu Nichtmessungen oder Falschmessungen. Beispielsweise konnte die Messung von kleineren unspezifischen Produkten, wie Primerdimeren, nicht bei allen Messzyklen verhindert werden. Die *real time* PCR ist hierfür besonders anfällig, da die Signalstärke hoch ist (jedes DNA-Molekül bindet mehrere Farbstoffmoleküle) – Artefakte sind also häufig. Diese Hindernisse und Schwierigkeiten

benötigten viel Zeit, konnten aber nur teilweise behoben werden. Dies ist ein wesentlicher Grund, warum am Ende nur wenige Transkripte durch geeignete Primer gemessen werden konnten und plausible, reproduzierbare Ergebnisse boten.

Dies ergab sich im Endeffekt für das Transkript *Adora2b* (kodiert für den Adenosinrezeptor 2b) und *Il-1 β* (Interleukin 1 β). Letzteres wurde als Positivkontrolle für den Erfolg der Klf4-Überexpression gemessen, da in der Arbeitsgruppe bereits bekannt war, dass Klf4 die Expression von Il-1 β unterstützt. In allen drei Versuchen wurde Il-1 β induziert. Dies entspricht der Beobachtung von M. Milanovic und ist ein Hinweis darauf, dass die Gentransduktion mit den Vektormutanten funktioniert hat (Milanovic 2005).

In Versuch A zeigte die PCR-Analyse, dass die native Zelle (mit Mieg-Vektor) kaum Il-1 β exprimierte. Die Ratio hier betrug 333,33 (s. Ergebnisse, E.2.1.1. und Fig. E.8.).

Versuche B und C sind vergleichbar. In B war Klf4 7,69fach und in C 9,09fach stärker exprimiert als der Kontrollvektor.

Adenosin ist ein ubiquitärer Mediator. Durch Expression der Adenosinrezeptoren A2a, A2b, A3 an der Oberfläche der Mastzellen (Marquardt et al. 1978), durch die Homöostase zyklischer Nukleotide und durch Calciumeinfluss kann Adora2b Mastzellen negativ regulieren (Hua et al. 2007). Es wurde die Involvierung in Endothelzellwachstum (Grant et al. 1999), in Apoptose arterieller Muskelzellen (Peyot et al. 2000) und in Gefäßregeneration (Yang et al. 2008) beschrieben. Darüber hinaus spielt der Rezeptor als Sensor für Gewebsschäden während der Inflammation sowie in der Kardioprotektion eine Rolle (Ohta et al. 2001). Aktuellere Veröffentlichungen zeigten auch für Klf4/KLF4 eine kardioprotektive Wirkung in Form von Stressantwort und Schutz vor Myokardhypertrophie (Kee et al. 2009; Liao et al. 2010).

Adora2b wurde in der Genexpressionsanalyse durch Klf4 induziert.

Die Analyse der Expression von *Adora2b* ergab in Versuch A eine Ratio von 8,69, das bedeutet eine 8,69fach stärkere Expression in Zellen mit Klf4-Überexpression. In Versuch B war die Ratio 2,86 und in Versuch C war *Adora2b* in Zellen mit komplettem Klf4-Vektor 2,22fach stärker exprimiert (s. Ergebnisse, E.2.1.1. und Fig. E.9.). In allen drei Versuchen wurde *Adora2b* also in Zellen mit vollständigem Klf4-Vektor stärker exprimiert. Das deckt sich mit der Beobachtung der Genexpressionsanalyse, bei der *Adora2b* in nativen Zellen, also bei Anwesenheit von Klf4, stärker exprimiert wurde als bei Zellen mit *Klf4*-Deletion. Versuch B und C zeigten vergleichbare Ergebnisse der Transkriptmenge, wohingegen Versuch A – wie schon bei der Messung von Il-1 β beobachtet - eine ca. 3,5mal größere Ratio aufwies, als die Versuche B und C. Das bedeutet, die differenzielle Expression (Delta zwischen Expression in Zellen mit

vollständigem Vektor und Zellen mit Nullvektor) war in Versuch A wesentlich größer als in Versuchen B und C. Da die Bedingungen bei der Herstellung der Zellpopulationen und der Expressionsmessung gleich waren, sollten alle drei Versuche eine vergleichbare Transkriptmenge der gemessenen Gensequenzen in den mutierten Zellen im Verhältnis zum Kontrollvektor zeigen. Für beide Transkripte wurden in Versuch A jedoch deutlich höhere Werte der *Klf4*-überexprimierenden bzw. mutierten Zellen als im Kontrollvektor gemessen (s. Ergebnisse, Fig. E.8., E.9.). Der einzige Unterschied ist der Zeitpunkt, an dem die Zellen gezüchtet, mit den Vektoren infiziert, sortiert und schließlich zur Gentransduktion per OHT-Gabe initiiert wurden.

Fehlerquellen können am ehesten in der Vektortransduktion und in der Induktion der Transkription des transduzierten *Klf4*-Gens per Zugabe von OHT liegen.

F.2.1.2. Funktion der einzelnen Domänen des *Klf4*-Gens

Wie bereits im Ergebnisteil genau erläutert, wurden neben der vollständigen *Klf4*-Sequenz und dem Kontrollvektor auch mutierte *Klf4*-Sequenzen überexprimiert, denen ein Teil der Gensequenz fehlte. So sollte gezeigt werden, welche Wichtigkeit die einzelnen Domänen für die Expression der Zielgene haben. Sollte die Expression von *Adora2b* in Zellen mit *Klf4*-Mutanten nicht induziert werden, müsste von der Unerlässlichkeit der hier fehlenden Teilsequenz für die Transkription von *Adora2b* ausgegangen werden. Dies war bei der C-terminalen Zinkfinger-Region und der N-terminalen Transaktivierungsdomäne durchaus zu erwarten. Denn laut Literatur wird vermutet, dass die Domänen jeweils eine wichtige Aufgabe bei der Transkription übernehmen:

Die Zinkfingerdomäne von *Klf4* enthält drei eng benachbarte C2H2-Zinkfinger, C-terminal gelegen (Shields et al. 1996), die an GC- und CACCC-Sequenzen von DNA binden (Kaczinsky et al. 2003). Sie enthält Cystein- und Histidin-*repeats*, die Zinkionen binden und die α -Helix-Struktur falten, so dass hier die DNA binden kann. Transkriptionelle Aktivität besteht jedoch nicht (Yet et al. 1998, Geiman et al. 2000). Ausführlicher ist diese Domäne in der Einleitung, A.2.1.1. beschrieben.

Wie in der Einleitung, Abschnitt A.2.1.2.1. erläutert, aktiviert die N-terminale Transaktivierungsdomäne (*acidic activation domain*, Aminosäuren 1-157) die Transkription, indem sie als Bindeglied zwischen der DNA-bindenden Domäne und anderen Komponenten der Transkriptionsmaschinerie, u.a. mit p300/CBP (Evans et al. 2007), interagiert. Sie wurde von Geiman et al. 2000 als 109 Aminosäuren langer Rest des N-Terminus identifiziert. Zwei angrenzende Cluster saurer Reste innerhalb dieser Region sind für aktivierende Effekte

zuständig. Sie ist reich an Prolin und liegt neben einer hemmenden Domäne (AS 158-385; Shaw-Fang Yet et al. 1998), gefolgt von einer Kernlokalisationssequenz.

Die SH3-bindende Domäne (*Src homology 3*) ist eine ca. 50 Aminosäuren umfassende Region, die in erster Linie prolinreiche Aminosäuresequenzen bindet (Shields et al. 1996). Sie ist in einer Vielzahl intrazellulärer und membranassoziierter Proteine zu finden, u.a. mit enzymatischer Aktivität, in Adaptorproteinen und zytoskelettalen Proteinen. Diese Domäne wird als proteinbindendes Molekül beschrieben, das an der Vermittlung von Tyrosinkinasesignalen von der Zelloberfläche zu den Effektorproteinen beteiligt sein soll (Oh et al. 1997). Sie soll auch eine Vielzahl von Prozessen beeinflussen, wie lokale Erhöhung der Proteinkonzentration, Bestimmung der Lokalisation auf subzellulärer Ebene und Vermittlung der Anordnung großer Multiproteinkomplexe (Morton et al. 1994).

Aufgrund der beschriebenen Erkenntnisse über die Domänen war zu erwarten, dass weder DeltaN noch DeltaC die Transkription der Zielgene bewerkstelligen würden. Die DeltaN-Mutante (nur Zinkfingerdomäne und SH3-bindende Domäne enthaltend) würde DNA binden, die Transkription jedoch nicht aktivieren können. Die DeltaC-Mutante (nur transkriptionsaktivierende und SH3-bindende Domäne enthaltend) würde entsprechend der Literatur gar nicht erst die DNA des Zielgens binden. Es wäre jedoch nicht ausgeschlossen, dass sie mit anderen Proteinen interagieren und die Transkription indirekt aktivieren könnte. Fehlt die SH3-bindende Domäne, könnte die Abwesenheit wichtiger Signalvermittlungen zu ungenügender Transkriptionsaktivität führen.

Als Positiv- bzw. Negativkontrolle wurden Vektoren mit der kompletten *Klf4*-Sequenz bzw. mit nur der *Mieg3*-Sequenz transkribiert.

Beim Betrachten der Versuchsergebnisse fällt zunächst auf, dass die Hypothese der unvollständigen Transkription in den Zellen mit *Klf4*-Mutanten verworfen werden muss. Denn *Il-1 β* wurde in allen Versuchsansätzen induziert im Vergleich zum Kontrollvektor. In Zellen mit der *Klf4*-Mutante DeltaN sowie DeltaSH3b war die Expression gar 1000fach stärker (s. Ergebnisse, E.2.1.1. und Fig. E.8.). Auch im Falle der Mutante DeltaC war die Expression 200fach stärker und damit zwar etwas geringer als die Expression von *Il-1 β* in Zellen mit dem vollständigen *Klf4*-Vektor, aber dennoch signifikant stärker als in Zellen mit Kontrollvektor.

Versuche B und C wiesen, wie schon oben angemerkt, eine deutlich geringere differenzielle Expression der Zielgene auf als Versuch A. Dies äußerte sich nicht nur im Vergleich des vollständigen *Klf4*-Vektors mit dem Kontrollvektor, wie bereits oben analysiert, sondern auch im Vergleich der *Klf4*-Mutanten mit dem Kontrollvektor.

Dennoch lässt sich folgender Vergleich der Versuche B und C mit Versuch A ziehen: Auch in Versuchen B und C wurde Il-1 β in Zellen mit den Mutanten DeltaN und DeltaSH3b am stärksten exprimiert, im Falle von DeltaN 100fach bzw. 50fach, im Falle von DeltaSH3b 33,33fach bzw. 25fach. DeltaC ist in Versuch B, wie schon in Versuch A beobachtet, mit 4,17fach stärkerer Il-1 β -Expression im Vergleich am wenigsten deutlich. Das bedeutet eine 4fach schwächere Expression als im Falle von DeltaN – vergleichbar mit der Ratio in Versuch A: Hier wurde Il-1 β im Falle von DeltaC fünffach schwächer exprimiert als im Falle von DeltaN. Für Versuch C liegt keine Messung von Zellen mit DeltaC-Mutante vor.

Vergleicht man die Diagramme der Expression von Il-1 β (s. Ergebnisse, E.2.1.1 und Fig. E.8.) mit der von Adora2b (s. Ergebnisse, E.2.1.1. und E.9.), zeigen sich durchaus Parallelen.

In Versuch A und B wurde auch Adora2b in den Zellen mit DeltaN-Mutanten am stärksten exprimiert, gefolgt von DeltaSH3b. Auch hier war die differenzielle Expression in Versuch A höher als in Versuch B, nämlich knapp doppelt so hoch. Auch hier ergab sich also keine gestörte Transkription von *Adora2b* trotz fehlender Teilsequenzen von *Klf4*. Zellen mit Mutanten exprimierten Adora2b gar stärker als Zellen mit vollständigem *Klf4*-Gen (Ratio zum Kontrollvektor in Versuch A 8,33, in Versuch B 2,86).

Versuch C lässt sich nicht mit den anderen vergleichen. Eine ca. zweifach stärkere – und damit geringe – Expression von Adora2b zeigte sich in Zellen mit vollständigem *Klf4*-Vektor und in Zellen mit DeltaSH3b-Mutante. Im Falle der DeltaN-Mutante wurde Adora2b nicht induziert.

Mögliche Ursachen sind im Prozess vor der Messung per *real time* PCR zu suchen. Die Transduktion von *Klf4* in die Zellen sollte zwar funktioniert haben, denn dies wurde ja durch die Expression von eGFP kontrolliert. Die Induktion der Transkription mit OHT unterlag jedoch keiner visuellen Kontrolle. Hier kann die Fehlerquelle liegen, obwohl die Bedingungen für die Generierung für alle Versuche gleich waren.

Diesen Teilversuch im Überblick betrachtet, muss resümiert werden, dass zwar die entsprechenden Einzelmessungen der Versuche nicht zu einem Mittelwert zusammengefasst werden konnten; dafür waren die Messungsschwankungen entschieden zu groß. Dennoch lässt sich die wichtigste Frage nach der Unerlässlichkeit der *Klf4*-Domänen in gewisser Weise beantworten: Durch Fehlen der Domänen ist kein Nachteil für die Transkription des Zielgens zu erwarten. Im Gegenteil: Il-1 β und Adora2b wurden in den meisten Fällen bei Anwesenheit der *Klf4*-Mutanten gar noch stärker exprimiert als in Zellen mit vollständigem *Klf4*-Gen. Der Grund dafür kann in der Länge des transduzierten Vektors liegen. Ein kürzerer Vektor lässt sich

möglicherweise leichter transduzieren und damit die Transkription des Zielgens in größerer Menge bewerkstelligen.

G. Zusammenfassung

Die Fragen, die sich vor Beginn der Arbeit stellten (s. Teil B. Herleitung der Aufgabenstellung), konnten anhand der Versuche zu dieser Arbeit weitgehend beantwortet werden. Die Hauptfrage war, inwieweit *Klf4* Monozyten beeinflusst, sowohl in ihrer Anzahl als auch in ihrem Expressionsmuster. Eine weitergehende Frage beschäftigte sich mit den Aufgaben der einzelnen Domänen des *Klf4*-Gens, indem untersucht wurde, inwieweit das *Klf4*-Gen, dem eine entscheidende Sequenz fehlte, in der Lage war, Einfluss auf die Expression weiterer Gene zu nehmen.

Zunächst sollten die Hinweise unserer Arbeitsgruppe auf Auswirkung der Deletion von *Klf4* auf Monozyten, insbesondere $\text{Ly6C}^{\text{high}}$, bestätigt werden. Bekannt war bereits der Einfluss von *Klf4* als myeloidzellspezifischer Transkriptionsfaktor und dessen verstärkte Expression in myeloiden Vorläuferzellen und humanen Monozyten und die Aufgabe in der proinflammatorischen Signalübertragung in humanen Makrophagen.

Es zeigte sich im peripheren Blut von *Klf4*-deletierten Mäusen (Cre-Rekombinase tragend, LoxP-flankiert) eine sehr starke Reduktion der $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ -Subpopulation der Monozyten, während die zweite große Subpopulation, $\text{Ly6C}^{\text{neg.}}$, nicht beeinträchtigt war.

Auch die Reduktion im Knochenmark dieser Tiere um ca. 55 % lässt auf einen Defekt durch die Deletion von *Klf4* bereits in der Entwicklung der Zellen schließen.

Nachdem nun eine signifikante Einflussnahme von *Klf4* auf die Entwicklung von $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ -Monozyten gezeigt worden war, sollte als nächstes ein weiterer Parameter analysiert werden: die Expression von *Klf4*-Zielgenen. Es zeigte sich ein unterschiedliches Expressionsmuster bei 260 Transkripten, die sich in thematische Gruppen einteilen lassen. Dies lässt Vermutungen über die weit gestreuten Aufgaben von *Klf4* aufstellen. In erster Linie fällt die große Gruppe der Transkripte der Entzündungs- und Immunantwort auf, die auf offenbar komplexe Weise durch *Klf4* beeinflusst wurden, teils durch *Klf4* induziert, teils reprimiert. Dies spricht summa summarum eher für eine negativregulierende Rolle von *Klf4*, was aber auch durch nicht wenige Beispiele widerlegt wurde.

Eine weitere große Gruppe stellten Transkripte des Zellmechanismus im weiteren Sinne dar, wie u.a. Wachstumsfaktoren, (Proto-) Onkogene und Transkriptionsfaktoren. Dies bestätigten in der Literatur beschriebene Beobachtungen: *Klf4* wirkt in erster Linie wachstumshemmend, kann aber sowohl als Tumorsuppressor, als auch als Onkogen wirken, abhängig vom zellulären Kontext und vom Zielgen selbst.

Weitere Einflussgebiete zeigten sich auf den Gebieten Zytoskelett, Zellkern, Zelladhäsion-/Interaktion, Oberflächenrezeptoren, extrazelluläre Matrix, Koagulation und Nervensystem.

Die genannten Versuche wurden mit dem Deletionstypen der Cre-Rekombinase tragenden LoxP-flankierten Mäuse durchgeführt. Um die Schlussfolgerungen aus den Versuchen zu untermauern und um mögliche Einflussnahmen anderer Faktoren, als die Deletion von *Klf4* selbst, auszuschließen, wurde ein weiterer Deletionstyp untersucht. Auch hier zeigte sich eine deutliche Reduktion von ca. 52 % der Ly6C^{high}-Monozyten im Knochenmark sowie eine Reduktion von ca. 82 % in der Milz.

Der zweite Abschnitt der Arbeit beschäftigte sich mit der Auswirkung der *Klf4*-Deletion auf die Expression mutmaßlicher Zielgene, die in der Genexpressionsanalyse bereits gezeigt wurde. Der Einfluss der *Klf4*-Deletion war deutlich geworden. Aber war er direkt durch Klf4 zustande gekommen? Auch die Frage, ob die Einflussnahme von Klf4 auch im Umkehrschluss, bei verstärkter Expression von Klf4 anstelle der Deletion, stattfand, wurde hier beantwortet. Dafür wurde in myeloide Vorläuferzellen ein Virusvektor mit der *Klf4*-Sequenz eingebracht, so dass die Zellen Klf4 überexprimierten. In der PCR-Analyse zeigte sich, dass *Adora2b*, bei *Klf4*-Deletion schwächer exprimiert, nun in Klf4-überexprimierenden Zellen stärker induziert wurde als in nativen Zellen. Dies wies auf die direkte Einflussnahme von Klf4 auf dieses Zielgen hin.

Ein weiterer Unterpunkt, die Frage nach der Wichtigkeit der einzelnen Domänen der *Klf4*-Sequenz, konnte in dieser Arbeit beantwortet werden: Neben dem vollständigen *Klf4*-Vektor wurden auch Vektormutanten, denen jeweils eine Domäne fehlte, in myeloide Zellen eingebracht und die Transkriptmengen von *Adora2b* per PCR gemessen. Unter den Domänen war die SH3-bindende Domäne (die als proteinbindende Domäne für Signalwege eine Rolle spielen soll), eine transkriptionsaktivierende Domäne sowie die DNA-bindende Zinkfingerdomäne. Es zeigte sich erstaunlicherweise, dass keine der hier untersuchten Domänen für die Expression des Zielgens *Adora2b* unerlässlich war.

Diese Arbeit zeigt die Wichtigkeit des Transkriptionsfaktors Klf4 für die terminale Differenzierung von Ly6C^{high}-Monozyten im Knochenmark.

Literaturnachweise

1. Acha-Orbea, H., Scarpellino, L. (1991). Nonobese diabetic and nonobese nondiabetic mice have unique MHC class II haplotypes. *Immunogenetics* 34, 57-9.
2. Ada-Nguema, A. S., Xenias, H., Hofman, J. M., et al. (2006). The small GTPase R-Ras regulates organization of actin and drives membrane protrusions through the activity of PLCepsilon. *Journal of cell science* 119, 1307-19.
3. Adam, P. J., Regan, C. P., Hautmann, M. B., Owens, G. K. (2000). Positive- and negative-acting Kruppel-like transcription factors bind a transforming growth factor beta control element required for expression of the smooth muscle cell differentiation marker SM22alpha in vivo. *The Journal of biological chemistry* 275, 37798-806.
4. Aizawa, Y., Akita, K., Taniai, M., et al. (1999). Cloning and expression of interleukin-18 binding protein. *FEBS letters* 445, 338-42.
5. Alberati-Giani, D., Malherbe, P., Ricciardi-Castagnoli, P., et al. (1997). Differential regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase expression by nitric oxide and inflammatory mediators in IFN-gamma-activated murine macrophages and microglial cells. *Journal of immunology* 159, 419-26.
6. Alder, J. K., Georgantas, R. W., 3rd, Hildreth, R. L., et al. (2008). Kruppel-like factor 4 is essential for inflammatory monocyte differentiation in vivo. *Journal of immunology* 180, 5645-52.
7. An, J., Golech, S., Klaewsongkram, J., et al. (2011). Kruppel-like factor 4 (KLF4) directly regulates proliferation in thymocyte development and IL-17 expression during Th17 differentiation. *FASEB J* 25, 3634-45.
8. An, S., Zheng, Y., Bleu, T. (2000). Sphingosine 1-phosphate-induced cell proliferation, survival, and related signaling events mediated by G protein-coupled receptors Edg3 and Edg5. *The Journal of biological chemistry* 275, 288-96.
9. Anderson, P., Caligiuri, M., O'Brien, C., et al. (1990). Fc gamma receptor type III (CD16) is included in the zeta NK receptor complex expressed by human natural killer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 2274-8.
10. Anthony, T. E., Mason, H. A., Gridley, T., Fishell, G., Heintz, N. (2005). Brain lipid-binding protein is a direct target of Notch signaling in radial glial cells. *Genes Dev* 19, 1028-33.
11. Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., et al. (2007). Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 317, 666-70.
12. Auffray, C., Fogg, D. K., Narni-Mancinelli, E., et al. (2009a). CX3CR1+ CD115+ CD135+ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation. *J Exp Med* 206, 595-606.
13. Auffray, C., Sieweke, M. H., Geissmann, F. (2009b). Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 27, 669-92.
14. Bakhle, Y. S. (1999). Structure of COX-1 and COX-2 enzymes and their interaction with inhibitors. *Drugs Today (Barc)* 35, 237-50.
15. Baldwin, S. A., Yao, S. Y., Hyde, R. J., et al. (2005). Functional characterization of novel human and mouse equilibrative nucleoside transporters (hENT3 and mENT3) located in intracellular membranes. *The Journal of biological chemistry* 280, 15880-7.
16. Banchereau, J., Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-52.
17. Barreda, D. R., Hanington, P. C., Belosevic, M. (2004). Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Dev Comp Immunol* 28, 509-54.

18. Bartoloni, L., Antonarakis, S. E. (2004). The human sugar-phosphate/phosphate exchanger family SLC37. *Pflugers Arch* 447, 780-3.
19. Baud, V., Chissoe, S. L., Viegas-Pequignot, E., et al. (1995). EMR1, an unusual member in the family of hormone receptors with seven transmembrane segments. *Genomics* 26, 334-44.
20. Bauer, S., Groh, V., Wu, J., et al. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285, 727-9.
21. Beaudet, A. L., O'Brien, W. E., Bock, H. G., Freytag, S. O., Su, T. S. (1986). The human argininosuccinate synthetase locus and citrullinemia. *Adv Hum Genet* 15, 161-96, 291-2.
22. Berchtold, S., Manncke, B., Klenk, J., et al. (2008). Forced IFIT-2 expression represses LPS induced TNF-alpha expression at posttranscriptional levels. *BMC Immunol* 9, 75.
23. Berditchevski, F. (2001). Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. *Journal of cell science* 114, 4143-51.
24. Bernard, A. M., Mattei, M. G., Pierres, M., Marguet, D. (1994). Structure of the mouse dipeptidyl peptidase IV (CD26) gene. *Biochemistry* 33, 15204-14.
25. Bertina, R. M., van der Linden, I. K., Mannucci, P. M., et al. (1990). Mutations in hemophilia Bm occur at the Arg180-Val activation site or in the catalytic domain of factor IX. *The Journal of biological chemistry* 265, 10876-83.
26. Bieker, J. J. (1996). Isolation, genomic structure, and expression of human erythroid Kruppel-like factor (EKLF). *DNA Cell Biol* 15, 347-52.
27. Bjornsson, J. M., Larsson, N., Brun, A. C., et al. (2003). Reduced proliferative capacity of hematopoietic stem cells deficient in Hoxb3 and Hoxb4. *Mol Cell Biol* 23, 3872-83.
28. Blasius, A. L., Giurisato, E., Cella, M., et al. (2006). Bone marrow stromal cell antigen 2 is a specific marker of type I IFN-producing cells in the naive mouse, but a promiscuous cell surface antigen following IFN stimulation. *Journal of immunology* 177, 3260-5.
29. Bogunovic, M., Ginhoux, F., Helft, J., et al. (2009). Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity* 31, 513-25.
30. Bottaro, D. P., Rubin, J. S., Faletto, D. L., et al. (1991). Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* 251, 802-4.
31. Bumber, Y. A., Kondo, Y., Chen, X., et al. (2007). RIL, a LIM gene on 5q31, is silenced by methylation in cancer and sensitizes cancer cells to apoptosis. *Cancer research* 67, 1997-2005.
32. Bradford, G. B., Williams, B., Rossi, R., Bertoncello, I. (1997). Quiescence, cycling, and turnover in the primitive hematopoietic stem cell compartment. *Exp Hematol* 25, 445-53.
33. Brivanlou, A. H., Darnell, J. E., Jr. (2002). Signal transduction and the control of gene expression. *Science* 295, 813-8.
34. Brown, N. J., Hutcheson, J., Bickel, E., et al. (2004). Fas death receptor signaling represses monocyte numbers and macrophage activation in vivo. *Journal of immunology* 173, 7584-93.
35. Budanov, A. V., Sablina, A. A., Feinstein, E., Koonin, E. V., Chumakov, P. M. (2004). Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD. *Science* 304, 596-600.
36. Bulanova, E., Budagian, V., Orinska, Z., et al. (2003). Mast cells express novel functional IL-15 receptor alpha isoforms. *Journal of immunology* 170, 5045-55.
37. Bustelo, X. R., Rubin, S. D., Suen, K. L., Carrasco, D., Barbacid, M. (1993). Developmental expression of the vav protooncogene. *Cell growth & differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 4, 297-308.
38. Cao, Z., Sun, X., Icli, B., Wara, A. K., Feinberg, M. W. (2010). Role of Kruppel-like factors in leukocyte development, function, and disease. *Blood* 116, 4404-14.

39. Carlow, D. A., Teh, S. J., Teh, H. S. (1998). Specific antiviral activity demonstrated by TGTP, a member of a new family of interferon-induced GTPases. *Journal of immunology* 161, 2348-55.
40. Carraway, K. L., 3rd, Weber, J. L., Unger, M. J., et al. (1997). Neuregulin-2, a new ligand of ErbB3/ErbB4-receptor tyrosine kinases. *Nature* 387, 512-6.
41. Carter, C. C., Gorbacheva, V. Y., Vestal, D. J. (2005). Inhibition of VSV and EMCV replication by the interferon-induced GTPase, mGBP-2: differential requirement for wild-type GTP binding domain. *Archives of virology* 150, 1213-20.
42. Cayabyab, M., Hinuma, S., Farzan, M., et al. (2000). Apelin, the natural ligand of the orphan seven-transmembrane receptor APJ, inhibits human immunodeficiency virus type 1 entry. *Journal of virology* 74, 11972-6.
43. Cecchini, M. G., Dominguez, M. G., Mocci, S., et al. (1994). Role of colony stimulating factor-1 in the establishment and regulation of tissue macrophages during postnatal development of the mouse. *Development* 120, 1357-72.
44. Chang, L., Adams, R. D., Saltiel, A. R. (2002). The TC10-interacting protein CIP4/2 is required for insulin-stimulated Glut4 translocation in 3T3L1 adipocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 12835-40.
45. Charo, I. F., Ransohoff, R. M. (2006). The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 354, 610-21.
46. Chebath, J., Merlin, G., Metz, R., Benech, P., Revel, M. (1983). Interferon-induced 56,000 Mr protein and its mRNA in human cells: molecular cloning and partial sequence of the cDNA. *Nucleic Acids Res* 11, 1213-26.
47. Chen, C. J., Lin, S. E., Lin, Y. M., et al. (2011). Association of Expression of Kruppel-Like Factor 4 and Kruppel-Like Factor 5 with the Clinical Manifestations of Breast Cancer. *Pathol Oncol Res*.
48. Chen, S., Yin, X., Zhu, X., et al. (2003a). The C-terminal kinase domain of the p34cdc2-related PITSLRE protein kinase (p110C) associates with p21-activated kinase 1 and inhibits its activity during anoikis. *The Journal of biological chemistry* 278, 20029-36.
49. Chen, X., Kelemen, S. E., Autieri, M. V. (2004). AIF-1 expression modulates proliferation of human vascular smooth muscle cells by autocrine expression of G-CSF. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 1217-22.
50. Chen, X., Whitney, E. M., Gao, S. Y., Yang, V. W. (2003b). Transcriptional profiling of Kruppel-like factor 4 reveals a function in cell cycle regulation and epithelial differentiation. *Journal of molecular biology* 326, 665-77.
51. Chen, Z. Y., Shie, J. L., Tseng, C. C. (2002). STAT1 is required for IFN-gamma-mediated gut-enriched Kruppel-like factor expression. *Experimental cell research* 281, 19-27.
52. Cheng, Y., Austin, S. C., Rocca, B., et al. (2002). Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A2. *Science* 296, 539-41.
53. Chin, K. C., Cresswell, P. (2001). Viperin (cig5), an IFN-inducible antiviral protein directly induced by human cytomegalovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 15125-30.
54. Chono, H., Yoshioka, H., Ueno, M., Kato, I. (2001). Removal of inhibitory substances with recombinant fibronectin-CH-296 plates enhances the retroviral transduction efficiency of CD34(+)CD38(-) bone marrow cells. *J Biochem* 130, 331-4.
55. Chowdhury, U. R., Samant, R. S., Fodstad, O., Shevde, L. A. (2009). Emerging role of nuclear protein 1 (NUPR1) in cancer biology. *Cancer Metastasis Rev* 28, 225-32.
56. Chu, D. S., Liu, H., Nix, P., et al. (2006). Sperm chromatin proteomics identifies evolutionarily conserved fertility factors. *Nature* 443, 101-5.

57. Clausen, B. E., Burkhardt, C., Reith, W., Renkawitz, R., Forster, I. (1999). Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res* 8, 265-77.
58. Comhair, S. A., Erzurum, S. C. (2002). Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283, L246-55.
59. Crass, T., Raffetseder, U., Martin, U., et al. (1996). Expression cloning of the human C3a anaphylatoxin receptor (C3aR) from differentiated U-937 cells. *European journal of immunology* 26, 1944-50.
60. Croker, B. A., Metcalf, D., Robb, L., et al. (2004). SOCS3 is a critical physiological negative regulator of G-CSF signaling and emergency granulopoiesis. *Immunity* 20, 153-65.
61. Crosbie, R. H., Lim, L. E., Moore, S. A., et al. (2000). Molecular and genetic characterization of sarcospan: insights into sarcoglycan-sarcospan interactions. *Human molecular genetics* 9, 2019-27.
62. Dahl, R., Walsh, J. C., Lancki, D., et al. (2003). Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the PU.1:C/EBPalpha ratio and granulocyte colony-stimulating factor. *Nat Immunol* 4, 1029-36.
63. Dai, X. M., Ryan, G. R., Hapel, A. J., et al. (2002). Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood* 99, 111-20.
64. Dakic, A., Metcalf, D., Di Rago, L., et al. (2005). PU.1 regulates the commitment of adult hematopoietic progenitors and restricts granulopoiesis. *J Exp Med* 201, 1487-502.
65. Daws, M. R., Lanier, L. L., Seaman, W. E., Ryan, J. C. (2001). Cloning and characterization of a novel mouse myeloid DAP12-associated receptor family. *European journal of immunology* 31, 783-91.
66. De Clerck, Y., Szpirer, C., Aly, M. S., et al. (1992). The gene for tissue inhibitor of metalloproteinases-2 is localized on human chromosome arm 17q25. *Genomics* 14, 782-4.
67. De Palma, M., Venneri, M. A., Galli, R., et al. (2005). Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell* 8, 211-26.
68. DeKoter, R. P., Walsh, J. C., Singh, H. (1998). PU.1 regulates both cytokine-dependent proliferation and differentiation of granulocyte/macrophage progenitors. *The EMBO journal* 17, 4456-68.
69. Delano, M. J., Scumpia, P. O., Weinstein, J. S., et al. (2007). MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *J Exp Med* 204, 1463-74.
70. Dhakshinamoorthy, S., Jaiswal, A. K. (2002). c-Maf negatively regulates ARE-mediated detoxifying enzyme genes expression and anti-oxidant induction. *Oncogene* 21, 5301-12.
71. Di Sano, F., Fazi, B., Citro, G., et al. (2003). Glucosylceramide synthase and its functional interaction with RTN-1C regulate chemotherapeutic-induced apoptosis in neuroepithelioma cells. *Cancer research* 63, 3860-5.
72. Doege, H., Bocianski, A., Joost, H. G., Schurmann, A. (2000). Activity and genomic organization of human glucose transporter 9 (GLUT9), a novel member of the family of sugar-transport facilitators predominantly expressed in brain and leucocytes. *The Biochemical journal* 350 Pt 3, 771-6.
73. Donze, D., Townes, T. M., Bieker, J. J. (1995). Role of erythroid Kruppel-like factor in human gamma- to beta-globin gene switching. *The Journal of biological chemistry* 270, 1955-9.

74. Dron, M., Meritet, J. F., Dandoy-Dron, F., et al. (2002). Molecular cloning of ADIR, a novel interferon responsive gene encoding a protein related to the torsins. *Genomics* 79, 315-25.
75. Edelson, B. T., Kc, W., Juang, R., et al. (2010). Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8alpha+ conventional dendritic cells. *J Exp Med* 207, 823-36.
76. Erle, D. J., Briskin, M. J., Butcher, E. C., et al. (1994). Expression and function of the MAdCAM-1 receptor, integrin alpha 4 beta 7, on human leukocytes. *Journal of immunology* 153, 517-28.
77. Evans, P. M., Zhang, W., Chen, X., et al. (2007). Kruppel-like factor 4 is acetylated by p300 and regulates gene transcription via modulation of histone acetylation. *The Journal of biological chemistry* 282, 33994-4002.
78. Feinberg, M. W., Cao, Z., Wara, A. K., et al. (2005). Kruppel-like factor 4 is a mediator of proinflammatory signaling in macrophages. *The Journal of biological chemistry* 280, 38247-58.
79. Feinberg, M. W., Lin, Z., Fisch, S., Jain, M. K. (2004). An emerging role for Kruppel-like factors in vascular biology. *Trends Cardiovasc Med* 14, 241-6.
80. Feinberg, M. W., Wara, A. K., Cao, Z., et al. (2007). The Kruppel-like factor KLF4 is a critical regulator of monocyte differentiation. *The EMBO journal* 26, 4138-48.
81. Firestein, B. L., Brenman, J. E., Aoki, C., et al. (1999). Cypin: a cytosolic regulator of PSD-95 postsynaptic targeting. *Neuron* 24, 659-72.
82. Flornes, L. M., Bryceson, Y. T., Spurkland, A., et al. (2004). Identification of lectin-like receptors expressed by antigen presenting cells and neutrophils and their mapping to a novel gene complex. *Immunogenetics* 56, 506-17.
83. Fogg, D. K., Sibon, C., Miled, C., et al. (2006). A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* 311, 83-7.
84. Fujiki, R., Chikanishi, T., Hashiba, W., et al. (2009). GlcNAcylation of a histone methyltransferase in retinoic-acid-induced granulopoiesis. *Nature* 459, 455-9.
85. Gaboriaud, C., Juanhuix, J., Gruez, A., et al. (2003). The crystal structure of the globular head of complement protein C1q provides a basis for its versatile recognition properties. *The Journal of biological chemistry* 278, 46974-82.
86. Gamou, T., Kitamura, E., Hosoda, F., et al. (1998). The partner gene of AML1 in t(16;21) myeloid malignancies is a novel member of the MTG8(ETO) family. *Blood* 91, 4028-37.
87. Garcia-Guzman, M., Soto, F., Gomez-Hernandez, J. M., Lund, P. E., Stuhmer, W. (1997). Characterization of recombinant human P2X4 receptor reveals pharmacological differences to the rat homologue. *Mol Pharmacol* 51, 109-18.
88. Garrett-Sinha, L. A., Eberspaecher, H., Seldin, M. F., de Crombrughe, B. (1996). A gene for a novel zinc-finger protein expressed in differentiated epithelial cells and transiently in certain mesenchymal cells. *The Journal of biological chemistry* 271, 31384-90.
89. Geiman, D. E., Ton-That, H., Johnson, J. M., Yang, V. W. (2000). Transactivation and growth suppression by the gut-enriched Kruppel-like factor (Kruppel-like factor 4) are dependent on acidic amino acid residues and protein-protein interaction. *Nucleic Acids Res* 28, 1106-13.
90. Geissmann, F., Manz, M. G., Jung, S., et al. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327, 656-61.
91. Gemelli, C., Montanari, M., Tenedini, E., et al. (2006). Virally mediated MafB transduction induces the monocyte commitment of human CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells. *Cell Death Differ* 13, 1686-96.

92. Georgiades, P., Ogilvy, S., Duval, H., et al. (2002). VavCre transgenic mice: a tool for mutagenesis in hematopoietic and endothelial lineages. *Genesis* 34, 251-6.
93. Ghaleb, A. M., Nandan, M. O., Chanchevalap, S., et al. (2005). Kruppel-like factors 4 and 5: the yin and yang regulators of cellular proliferation. *Cell Res* 15, 92-6.
94. Gilly, M., Wall, R. (1992). The IRG-47 gene is IFN-gamma induced in B cells and encodes a protein with GTP-binding motifs. *Journal of immunology* 148, 3275-81.
95. Goncalves, R., Zhang, X., Cohen, H., Debrabant, A., Mosser, D. M. (2011). Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of *Leishmania major* infection. *J Exp Med* 208, 1253-65.
96. Gongora, C., David, G., Pintard, L., et al. (1997). Molecular cloning of a new interferon-induced PML nuclear body-associated protein. *The Journal of biological chemistry* 272, 19457-63.
97. Goyette, P., Sumner, J. S., Milos, R., et al. (1994). Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA mapping and mutation identification. *Nature genetics* 7, 551.
98. Grant, M. B., Tarnuzzer, R. W., Caballero, S., et al. (1999). Adenosine receptor activation induces vascular endothelial growth factor in human retinal endothelial cells. *Circ Res* 85, 699-706.
99. Gregory, S. G., Barlow, K. F., McLay, K. E., et al. (2006). The DNA sequence and biological annotation of human chromosome 1. *Nature* 441, 315-21.
100. Grunewald, M., Avraham, I., Dor, Y., et al. (2006). VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* 124, 175-89.
101. Guan, H., Xie, L., Leithauser, F., et al. (2010). KLF4 is a tumor suppressor in B-cell non-Hodgkin lymphoma and in classic Hodgkin lymphoma. *Blood* 116, 1469-78.
102. Hackam, A. S., Yassa, A. S., Singaraja, R., et al. (2000). Huntingtin interacting protein 1 induces apoptosis via a novel caspase-dependent death effector domain. *The Journal of biological chemistry* 275, 41299-308.
103. Hagen, F. S., Grant, F. J., Kuijper, J. L., et al. (1991). Expression and characterization of recombinant human acyloxyacyl hydrolase, a leukocyte enzyme that deacylates bacterial lipopolysaccharides. *Biochemistry* 30, 8415-23.
104. Hagos, E. G., Ghaleb, A. M., Kumar, A., Neish, A. S., Yang, V. W. (2011). Expression profiling and pathway analysis of Kruppel-like factor 4 in mouse embryonic fibroblasts. *Am J Cancer Res* 1, 85-97.
105. Hahn, F. M., Xuan, J. W., Chambers, A. F., Poulter, C. D. (1996). Human isopentenyl diphosphate: dimethylallyl diphosphate isomerase: overproduction, purification, and characterization. *Arch Biochem Biophys* 332, 30-4.
106. Han, B. H., Park, D. J., Lim, R. W., Im, J. H., Kim, H. D. (1998). Cloning, expression, and characterization of a novel guanylate-binding protein, GBP3 in murine erythroid progenitor cells. *Biochimica et biophysica acta* 1384, 373-86.
107. Han, Z., Ni, J., Smits, P., et al. (2001). Extracellular matrix protein 1 (ECM1) has angiogenic properties and is expressed by breast tumor cells. *FASEB J* 15, 988-94.
108. Hanenberg, H., Xiao, X. L., Dilloo, D., et al. (1996). Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells. *Nature medicine* 2, 876-82.
109. Hanna, R. N., Carlin, L. M., Hubbeling, H. G., et al. (2011). The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C-monocytes. *Nat Immunol* 12, 778-85.
110. Harnesk, K., Swanberg, M., Diez, M., et al. (2009). Differential nerve injury-induced expression of MHC class II in the mouse correlates to genetic variability in the type I promoter of C2ta. *J Neuroimmunol* 212, 44-52.

111. Hartmann, R., Olsen, H. S., Widder, S., Jorgensen, R., Justesen, J. (1998). p59OASL, a 2'-5' oligoadenylate synthetase like protein: a novel human gene related to the 2'-5' oligoadenylate synthetase family. *Nucleic Acids Res* 26, 4121-8.
112. Hasan, S., Guttinger, S., Muhlhauser, P., et al. (2006). Nuclear envelope localization of human UNC84A does not require nuclear lamins. *FEBS letters* 580, 1263-8.
113. Hashimoto, D., Chow, A., Greter, M., et al. (2011). Pretransplant CSF-1 therapy expands recipient macrophages and ameliorates GVHD after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Exp Med* 208, 1069-82.
114. Hedge, S. P., Kumar, A., Kurschner, C., Shapiro, L. H. (1998). c-Maf interacts with c-Myb to regulate transcription of an early myeloid gene during differentiation. *Mol Cell Biol* 18, 2729-37.
115. Hempe, J. M., Cousins, R. J. (1992). Cysteine-rich intestinal protein and intestinal metallothionein: an inverse relationship as a conceptual model for zinc absorption in rats. *J Nutr* 122, 89-95.
116. Hermel, E., Monaco, J. J. (1995). RT1.DMa and RT1.DMb: the rat homologues of H2-DMa and H2-DMb. *Immunogenetics* 42, 446-7.
117. Herrin, B. R., Groeger, A. L., Justement, L. B. (2005). The adaptor protein HSH2 attenuates apoptosis in response to ligation of the B cell antigen receptor complex on the B lymphoma cell line, WEHI-231. *The Journal of biological chemistry* 280, 3507-15.
118. Higaki, Y., Schullery, D., Kawata, Y., et al. (2002). Synergistic activation of the rat laminin gamma1 chain promoter by the gut-enriched Kruppel-like factor (GKLF/KLF4) and Sp1. *Nucleic Acids Res* 30, 2270-9.
119. Holt, L. J., Siddle, K. (2005). Grb10 and Grb14: enigmatic regulators of insulin action--and more? *The Biochemical journal* 388, 393-406.
120. Hong, S. B., Li, C. M., Rhee, H. J., et al. (1999). Molecular cloning and characterization of a human cDNA and gene encoding a novel acid ceramidase-like protein. *Genomics* 62, 232-41.
121. Hovnanian, A., Rebouillat, D., Mattei, M. G., et al. (1998). The human 2',5'-oligoadenylate synthetase locus is composed of three distinct genes clustered on chromosome 12q24.2 encoding the 100-, 69-, and 40-kDa forms. *Genomics* 52, 267-77.
122. Hsu, L. S., Tsou, A. P., Chi, C. W., Lee, C. H., Chen, J. Y. (1998). Cloning, expression and chromosomal localization of human Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase. *J Biomed Sci* 5, 141-9.
123. Hu, W., Hofstetter, W. L., Li, H., et al. (2009). Putative tumor-suppressive function of Kruppel-like factor 4 in primary lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 15, 5688-95.
124. Hua, X., Erikson, C. J., Chason, K. D., et al. (2007). Involvement of A1 adenosine receptors and neural pathways in adenosine-induced bronchoconstriction in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293, L25-32.
125. Hunt, T. W., Fields, T. A., Casey, P. J., Peralta, E. G. (1996). RGS10 is a selective activator of G alpha i GTPase activity. *Nature* 383, 175-7.
126. Insinga, A., Monestiroli, S., Ronzoni, S., et al. (2004). Impairment of p53 acetylation, stability and function by an oncogenic transcription factor. *The EMBO journal* 23, 1144-54.
127. Ishibashi, K., Suzuki, M., Sasaki, S., Imai, M. (2001). Identification of a new multigene four-transmembrane family (MS4A) related to CD20, HTm4 and beta subunit of the high-affinity IgE receptor. *Gene* 264, 87-93.
128. Ishii, H., Majerus, P. W. (1985). Thrombomodulin is present in human plasma and urine. *J Clin Invest* 76, 2178-81.

129. Iwasaki, H., Somoza, C., Shigematsu, H., et al. (2005). Distinctive and indispensable roles of PU.1 in maintenance of hematopoietic stem cells and their differentiation. *Blood* 106, 1590-600.
130. Jacobi, F. K., Broghammer, M., Pesch, K., et al. (2000). Physical mapping and exclusion of GPR34 as the causative gene for congenital stationary night blindness type 1. *Hum Genet* 107, 89-91.
131. Jager, D., Stockert, E., Jager, E., et al. (2000). Serological cloning of a melanocyte rab guanosine 5'-triphosphate-binding protein and a chromosome condensation protein from a melanoma complementary DNA library. *Cancer research* 60, 3584-91.
132. Jasinski, M., Keller, P., Fujiwara, Y., Orkin, S. H., Bessler, M. (2001). GATA1-Cre mediates Piga gene inactivation in the erythroid/megakaryocytic lineage and leads to circulating red cells with a partial deficiency in glycosyl phosphatidylinositol-linked proteins (paroxysmal nocturnal hemoglobinuria type II cells). *Blood* 98, 2248-55.
133. Jenkins, S. J., Ruckerl, D., Cook, P. C., et al. (2011). Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science* 332, 1284-8.
134. Jia, T., Leiner, I., Dorothee, G., Brandl, K., Pamer, E. G. (2009). MyD88 and Type I interferon receptor-mediated chemokine induction and monocyte recruitment during *Listeria monocytogenes* infection. *Journal of immunology* 183, 1271-8.
135. Kabashima, K., Banks, T. A., Ansel, K. M., et al. (2005). Intrinsic lymphotoxin-beta receptor requirement for homeostasis of lymphoid tissue dendritic cells. *Immunity* 22, 439-50.
136. Kaczynski, J., Cook, T., Urrutia, R. (2003). Sp1- and Kruppel-like transcription factors. *Genome biology* 4, 206.
137. Kaisho, T., Ishikawa, J., Oritani, K., et al. (1994). BST-1, a surface molecule of bone marrow stromal cell lines that facilitates pre-B-cell growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 5325-9.
138. Katagiri, T., Ozaki, K., Fujiwara, T., et al. (1996). Cloning, expression and chromosome mapping of adducin-like 70 (ADDL), a human cDNA highly homologous to human erythrocyte adducin. *Cytogenet Cell Genet* 74, 90-5.
139. Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., et al. (2005). Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* 23, 19-28.
140. Katoh, Y., Katoh, M. (2004). Identification and characterization of ARHGAP27 gene in silico. *Int J Mol Med* 14, 943-7.
141. Katz, J. P., Perreault, N., Goldstein, B. G., et al. (2002). The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon. *Development* 129, 2619-28.
142. Kawasaki, E. S., Ladner, M. B., Wang, A. M., et al. (1985). Molecular cloning of a complementary DNA encoding human macrophage-specific colony-stimulating factor (CSF-1). *Science* 230, 291-6.
143. Kee, H. J., Kook, H. (2009). Kruppel-like factor 4 mediates histone deacetylase inhibitor-induced prevention of cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 47, 770-80.
144. Kelly, L. M., Englmeier, U., Lafon, I., Sieweke, M. H., Graf, T. (2000). MafB is an inducer of monocytic differentiation. *The EMBO journal* 19, 1987-97.
145. Kenwrick, S., Watkins, A., De Angelis, E. (2000). Neural cell recognition molecule L1: relating biological complexity to human disease mutations. *Human molecular genetics* 9, 879-86.
146. Kim, Y. G., Kamada, N., Shaw, M. H., et al. (2011). The Nod2 sensor promotes intestinal pathogen eradication via the chemokine CCL2-dependent recruitment of inflammatory monocytes. *Immunity* 34, 769-80.

147. King, R. G., Herrin, B. R., Justement, L. B. (2006). Trem-like transcript 2 is expressed on cells of the myeloid/granuloid and B lymphoid lineage and is up-regulated in response to inflammation. *Journal of immunology* 176, 6012-21.
148. Kingsbury, G. A., Feeney, L. A., Nong, Y., et al. (2001). Cloning, expression, and function of BLAME, a novel member of the CD2 family. *Journal of immunology* 166, 5675-80.
149. Kitamura, A., Takahashi, K., Okajima, A., Kitamura, N. (1994). Induction of the human gene for p44, a hepatitis-C-associated microtubular aggregate protein, by interferon-alpha/beta. *European journal of biochemistry / FEBS* 224, 877-83.
150. Kitareewan, S., Pitha-Rowe, I., Sekula, D., et al. (2002). UBE1L is a retinoid target that triggers PML/RARalpha degradation and apoptosis in acute promyelocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 3806-11.
151. Knight, E., Jr., Cordova, B. (1991). IFN-induced 15-kDa protein is released from human lymphocytes and monocytes. *Journal of immunology* 146, 2280-4.
152. Ko, J. A., Gondo, T., Inagaki, S., Inui, M. (2005). Requirement of the transmembrane semaphorin Sema4C for myogenic differentiation. *FEBS letters* 579, 2236-42.
153. Kohyama, M., Ise, W., Edelson, B. T., et al. (2009). Role for Spi-C in the development of red pulp macrophages and splenic iron homeostasis. *Nature* 457, 318-21.
154. Kondo, M., Scherer, D. C., Miyamoto, T., et al. (2000). Cell-fate conversion of lymphoid-committed progenitors by instructive actions of cytokines. *Nature* 407, 383-6.
155. Kong, A. N., Ma, M., Tao, D., Yang, L. (1993). Molecular cloning of cDNA encoding the phenol/aryl form of sulfotransferase (mSTp1) from mouse liver. *Biochimica et biophysica acta* 1171, 315-8.
156. Kumar, S., Kao, W. H., Howley, P. M. (1997). Physical interaction between specific E2 and Hect E3 enzymes determines functional cooperativity. *The Journal of biological chemistry* 272, 13548-54.
157. Kuramochi, S., Matsuda, Y., Okamoto, M., et al. (1999). Molecular cloning of the human gene STK10 encoding lymphocyte-oriented kinase, and comparative chromosomal mapping of the human, mouse, and rat homologues. *Immunogenetics* 49, 369-75.
158. Labhart, P., Morgan, G. T. (1998). Identification of novel genes encoding transcription elongation factor TFIIS (TCEA) in vertebrates: conservation of three distinct TFIIS isoforms in frog, mouse, and human. *Genomics* 52, 278-88.
159. Ladel, C. H., Flesch, I. E., Arnoldi, J., Kaufmann, S. H. (1994). Studies with MHC-deficient knock-out mice reveal impact of both MHC I- and MHC II-dependent T cell responses on *Listeria monocytogenes* infection. *Journal of immunology* 153, 3116-22.
160. Lagasse, E., Weissman, I. L. (1997). Enforced expression of Bcl-2 in monocytes rescues macrophages and partially reverses osteopetrosis in op/op mice. *Cell* 89, 1021-31.
161. Landsman, L., Bar-On, L., Zerneck, A., et al. (2009). CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. *Blood* 113, 963-72.
162. Laslo, P., Spooner, C. J., Warmflash, A., et al. (2006). Multilineage transcriptional priming and determination of alternate hematopoietic cell fates. *Cell* 126, 755-66.
163. Latchman, D. S. (1997). Transcription factors: an overview. *Int J Biochem Cell Biol* 29, 1305-12.
164. Lee, B. C., Cheng, T., Adams, G. B., et al. (2003). P2Y-like receptor, GPR105 (P2Y14), identifies and mediates chemotaxis of bone-marrow hematopoietic stem cells. *Genes Dev* 17, 1592-604.
165. Lee, K. H., Ono, M., Inui, M., Yuasa, T., Takai, T. (2000). Stimulatory function of gp49A, a murine Ig-like receptor, in rat basophilic leukemia cells. *Journal of immunology* 165, 4970-7.

166. Leon, C., Freund, M., Ravanat, C., et al. (2001). Key role of the P2Y(1) receptor in tissue factor-induced thrombin-dependent acute thromboembolism: studies in P2Y(1)-knockout mice and mice treated with a P2Y(1) antagonist. *Circulation* 103, 718-23.
167. Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I., Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7, 678-89.
168. Li, X., Leung, S., Qureshi, S., Darnell, J. E., Jr., Stark, G. R. (1996). Formation of STAT1-STAT2 heterodimers and their role in the activation of IRF-1 gene transcription by interferon-alpha. *The Journal of biological chemistry* 271, 5790-4.
169. Li, Y., McClintick, J., Zhong, L., et al. (2005). Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood* 105, 635-7.
170. Liao, X., Haldar, S. M., Lu, Y., et al. (2010). Kruppel-like factor 4 regulates pressure-induced cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 49, 334-8.
171. Liao, X., Sharma, N., Kapadia, F., et al. (2011). Kruppel-like factor 4 regulates macrophage polarization. *J Clin Invest* 121, 2736-49.
172. Lin, H., Lee, E., Hestir, K., et al. (2008). Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. *Science* 320, 807-11.
173. Lindstedt, R., Liljedahl, M., Peleraux, A., Peterson, P. A., Karlsson, L. (1995). The MHC class II molecule H2-M is targeted to an endosomal compartment by a tyrosine-based targeting motif. *Immunity* 3, 561-72.
174. Liu, K., Vitorica, G. D., Schwickert, T. A., et al. (2009). In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science* 324, 392-7.
175. Liu, L. Q., Ilaria, R., Jr., Kingsley, P. D., et al. (1999). A novel ubiquitin-specific protease, UBP43, cloned from leukemia fusion protein AML1-ETO-expressing mice, functions in hematopoietic cell differentiation. *Mol Cell Biol* 19, 3029-38.
176. Lu, B., Jiang, Y. J., Man, M. Q., et al. (2005). Expression and regulation of 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferases in the epidermis. *J Lipid Res* 46, 2448-57.
177. Luster, A. D., Unkeless, J. C., Ravetch, J. V. (1985). Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins. *Nature* 315, 672-6.
178. Lynch, E. D., Lee, M. K., Morrow, J. E., et al. (1997). Nonsyndromic deafness DFNA1 associated with mutation of a human homolog of the Drosophila gene diaphanous. *Science* 278, 1315-8.
179. Maes, T., Barcelo, A., Buesa, C. (2002). Neuron navigator: a human gene family with homology to unc-53, a cell guidance gene from Caenorhabditis elegans. *Genomics* 80, 21-30.
180. Mahnke-Zizelman, D. K., Eddy, R., Shows, T. B., Sabina, R. L. (1996). Characterization of the human AMPD3 gene reveals that 5' exon useage is subject to transcriptional control by three tandem promoters and alternative splicing. *Biochimica et biophysica acta* 1306, 75-92.
181. Maik-Rachline, G., Shaltiel, S., Seger, R. (2005). Extracellular phosphorylation converts pigment epithelium-derived factor from a neurotrophic to an antiangiogenic factor. *Blood* 105, 670-8.
182. Marazzi, S., Blum, S., Hartmann, R., et al. (1998). Characterization of human fibroleukin, a fibrinogen-like protein secreted by T lymphocytes. *Journal of immunology* 161, 138-47.
183. Maresco, D. L., Chang, E., Theil, K. S., Francke, U., Anderson, C. L. (1996). The three genes of the human FCGR1 gene family encoding Fc gamma RI flank the centromere of chromosome 1 at 1p12 and 1q21. *Cytogenet Cell Genet* 73, 157-63.

184. Marie, I., Durbin, J. E., Levy, D. E. (1998). Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *The EMBO journal* 17, 6660-9.
185. Marquardt, A., Stohr, H., White, K., Weber, B. H. (2000). cDNA cloning, genomic structure, and chromosomal localization of three members of the human fatty acid desaturase family. *Genomics* 66, 175-83.
186. Marquardt, D. L., Parker, C. W., Sullivan, T. J. (1978). Potentiation of mast cell mediator release by adenosine. *Journal of immunology* 120, 871-8.
187. Mashimo, T., Glaser, P., Lucas, M., et al. (2003). Structural and functional genomics and evolutionary relationships in the cluster of genes encoding murine 2',5'-oligoadenylate synthetases. *Genomics* 82, 537-52.
188. Matsumura, H., Shimizu, Y., Ohsawa, Y., et al. (2000). Necrotic death pathway in Fas receptor signaling. *The Journal of cell biology* 151, 1247-56.
189. McKenna, H. J., Stocking, K. L., Miller, R. E., et al. (2000). Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* 95, 3489-97.
190. McLennan, A. G., Flannery, A. V., Morten, J. E., Ridanpaa, M. (1998). Chromosomal localization of the human diadenosine 5',5'''-P1,P4-tetraphosphate pyrophosphohydrolase (Ap4A hydrolase) gene (APAH1) to 9p13. *Genomics* 47, 307-9.
191. Meister, G., Landthaler, M., Peters, L., et al. (2005). Identification of novel argonaute-associated proteins. *Current biology : CB* 15, 2149-55.
192. Mellor, E. A., Maekawa, A., Austen, K. F., Boyce, J. A. (2001). Cysteinyl leukotriene receptor 1 is also a pyrimidinergic receptor and is expressed by human mast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 7964-9.
193. Milanovic, M. (2005). The role of transcription factors Klf4 and Icsb in the development of myeloid cells. *Freie Universität Berlin*.
194. Miller, I. J., Bieker, J. J. (1993). A novel, erythroid cell-specific murine transcription factor that binds to the CACCC element and is related to the Kruppel family of nuclear proteins. *Mol Cell Biol* 13, 2776-86.
195. Miller, K. A., Eklund, E. A., Peddinghaus, M. L., et al. (2001). Kruppel-like factor 4 regulates laminin alpha 3A expression in mammary epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* 276, 42863-8.
196. Millward, T., Cron, P., Hemmings, B. A. (1995). Molecular cloning and characterization of a conserved nuclear serine(threonine) protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 5022-6.
197. Minagawa, T., Ijuin, T., Mochizuki, Y., Takenawa, T. (2001). Identification and characterization of a sac domain-containing phosphoinositide 5-phosphatase. *The Journal of biological chemistry* 276, 22011-5.
198. Mingot, J. M., Kostka, S., Kraft, R., Hartmann, E., Gorlich, D. (2001). Importin 13: a novel mediator of nuclear import and export. *The EMBO journal* 20, 3685-94.
199. Mitsui, K., Nakanishi, M., Ohtsuka, S., et al. (1999). A novel human gene encoding HECT domain and RCC1-like repeats interacts with cyclins and is potentially regulated by the tumor suppressor proteins. *Biochemical and biophysical research communications* 266, 115-22.
200. Miyamoto, K., Morishita, Y., Yamazaki, M., et al. (2001). Isolation and characterization of vascular smooth muscle cell growth promoting factor from bovine ovarian follicular fluid and its cDNA cloning from bovine and human ovary. *Arch Biochem Biophys* 390, 93-100.

201. Monteferrante, G., Brioschi, S., Caprioli, J., et al. (2007). Genetic analysis of the complement factor H related 5 gene in haemolytic uraemic syndrome. *Mol Immunol* 44, 1704-8.
202. Mori, T., Fukuda, Y., Kuroda, H., et al. (1999). Cloning and characterization of a novel Rab-family gene, Rab36, within the region at 22q11.2 that is homozygously deleted in malignant rhabdoid tumors. *Biochemical and biophysical research communications* 254, 594-600.
203. Morton, C. J., Campbell, I. D. (1994). SH3 domains. Molecular 'Velcro'. *Current biology : CB* 4, 615-7.
204. Motherwell, W. D., Shields, G. P., Allen, F. H. (2000). Automated assignment of graph-set descriptors for crystallographically symmetric molecules. *Acta crystallographica. Section B, Structural science* 56 (Pt 3), 466-73.
205. Muller, U., Wang, D., Denda, S., et al. (1997). Integrin alpha8beta1 is critically important for epithelial-mesenchymal interactions during kidney morphogenesis. *Cell* 88, 603-13.
206. Nagai, M., Sakakibara, J., Wakui, K., et al. (1997). Localization of the squalene epoxidase gene (SQLE) to human chromosome region 8q24.1. *Genomics* 44, 141-3.
207. Nagy, A. (2000). Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26, 99-109.
208. Nahrendorf, M., Swirski, F. K., Aikawa, E., et al. (2007). The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* 204, 3037-47.
209. Nakajima, H., Cella, M., Langen, H., Friedlein, A., Colonna, M. (1999). Activating interactions in human NK cell recognition: the role of 2B4-CD48. *European journal of immunology* 29, 1676-83.
210. Natoli, G. (2010). Maintaining cell identity through global control of genomic organization. *Immunity* 33, 12-24.
211. Negishi, H., Ohba, Y., Yanai, H., et al. (2005). Negative regulation of Toll-like-receptor signaling by IRF-4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 15989-94.
212. Nerlov, C., Graf, T. (1998). PU.1 induces myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Genes Dev* 12, 2403-12.
213. Nishizawa, M., Semba, K., Yoshida, M. C., et al. (1986). Structure, expression, and chromosomal location of the human c-fgr gene. *Mol Cell Biol* 6, 511-7.
214. Niwa, R., Nagata-Ohashi, K., Takeichi, M., Mizuno, K., Uemura, T. (2002). Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin. *Cell* 108, 233-46.
215. Noti, J. D., Johnson, A. K., Dillon, J. D. (2005). The leukocyte integrin gene CD11d is repressed by gut-enriched Kruppel-like factor 4 in myeloid cells. *The Journal of biological chemistry* 280, 3449-57.
216. Nusslein-Volhard, C., Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795-801.
217. Oda, S., Sato, M., Toyoshima, S., Osawa, T. (1988). Purification and characterization of a lectin-like molecule specific for galactose/N-acetyl-galactosamine from tumoricidal macrophages. *J Biochem* 104, 600-5.
218. Ogawa, M. (1993). Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 81, 2844-53.
219. Ogilvy, S., Elefanty, A. G., Visvader, J., et al. (1998). Transcriptional regulation of vav, a gene expressed throughout the hematopoietic compartment. *Blood* 91, 419-30.

220. Oh, W. K., Yoo, J. C., Jo, D., et al. (1997). Cloning of a SH3 domain-containing proline-rich protein, p85SPR, and its localization in focal adhesion. *Biochemical and biophysical research communications* 235, 794-8.
221. Ohta, A., Sitkovsky, M. (2001). Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature* 414, 916-20.
222. Okano, J., Opitz, O. G., Nakagawa, H., et al. (2000). The Kruppel-like transcriptional factors Zf9 and GKLf coactivate the human keratin 4 promoter and physically interact. *FEBS letters* 473, 95-100.
223. Okumura, K., Kaneko, Y., Nonoguchi, K., et al. (1997). Expression of a novel isoform of Vav, Vav-T, containing a single Src homology 3 domain in murine testicular germ cells. *Oncogene* 14, 713-20.
224. Ong, O. C., Hu, K., Rong, H., Lee, R. H., Fung, B. K. (1997). Gene structure and chromosome localization of the G gamma c subunit of human cone G-protein (GNGT2). *Genomics* 44, 101-9.
225. Ortel, T. L., Quinn-Allen, M. A., Keller, F. G., et al. (1994). Localization of functionally important epitopes within the second C-type domain of coagulation factor V using recombinant chimeras. *The Journal of biological chemistry* 269, 15898-905.
226. Ouyang, Y., Lane, W. S., Moore, K. L. (1998). Tyrosylprotein sulfotransferase: purification and molecular cloning of an enzyme that catalyzes tyrosine O-sulfation, a common posttranslational modification of eukaryotic proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 2896-901.
227. Ozato, K., Shin, D. M., Chang, T. H., Morse, H. C., 3rd. (2008). TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity. *Nat Rev Immunol* 8, 849-60.
228. Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., et al. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 13766-71.
229. Pankov, R., Yamada, K. M. (2002). Fibronectin at a glance. *Journal of cell science* 115, 3861-3.
230. Pasteris, N. G., Gorski, J. L. (1999). Isolation, characterization, and mapping of the mouse and human Fgd2 genes, faciogenital dysplasia (FGD1; Aarskog syndrome) gene homologues. *Genomics* 60, 57-66.
231. Patel, N. V., Ghaleb, A. M., Nandan, M. O., Yang, V. W. (2010). Expression of the tumor suppressor Kruppel-like factor 4 as a prognostic predictor for colon cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 19, 2631-8.
232. Patterson, J. M., Johnson, M. H., Zimonjic, D. B., Graubert, T. A. (2000). Characterization of Ly-6M, a novel member of the Ly-6 family of hematopoietic proteins. *Blood* 95, 3125-32.
233. Perkins, A. C., Sharpe, A. H., Orkin, S. H. (1995). Lethal beta-thalassaemia in mice lacking the erythroid CACCC-transcription factor EKLF. *Nature* 375, 318-22.
234. Peyot, M. L., Gadeau, A. P., Dandre, F., et al. (2000). Extracellular adenosine induces apoptosis of human arterial smooth muscle cells via A(2b)-purinoceptor. *Circ Res* 86, 76-85.
235. Pryhuber, G. S., Huyck, H. L., Bhagwat, S., et al. (2008). Parenchymal cell TNF receptors contribute to inflammatory cell recruitment and respiratory failure in *Pneumocystis carinii*-induced pneumonia. *Journal of immunology* 181, 1409-19.

236. Pulford, K., Jones, M., Banham, A. H., Haralambieva, E., Mason, D. Y. (1999). Lymphocyte-specific protein 1: a specific marker of human leucocytes. *Immunology* 96, 262-71.
237. Qian, B. Z., Li, J., Zhang, H., et al. (2011). CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* 475, 222-5.
238. Racke, K., Hammermann, R., Juergens, U. R. (2000). Potential role of EDG receptors and lysophospholipids as their endogenous ligands in the respiratory tract. *Pulm Pharmacol Ther* 13, 99-114.
239. Rajan, S., Wischmeyer, E., Karschin, C., et al. (2001). THIK-1 and THIK-2, a novel subfamily of tandem pore domain K⁺ channels. *The Journal of biological chemistry* 276, 7302-11.
240. Rao, N. V., Rao, G. V., Hoidal, J. R. (1997). Human dipeptidyl-peptidase I. Gene characterization, localization, and expression. *The Journal of biological chemistry* 272, 10260-5.
241. Rehli, M., Lichanska, A., Cassady, A. I., Ostrowski, M. C., Hume, D. A. (1999). TFEC is a macrophage-restricted member of the microphthalmia-TFE subfamily of basic helix-loop-helix leucine zipper transcription factors. *Journal of immunology* 162, 1559-65.
242. Rickert, R. C., Roes, J., Rajewsky, K. (1997). B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res* 25, 1317-8.
243. Robben, P. M., LaRegina, M., Kuziel, W. A., Sibley, L. D. (2005). Recruitment of Gr-1+ monocytes is essential for control of acute toxoplasmosis. *J Exp Med* 201, 1761-9.
244. Roberts, R., Sciorra, V. A., Morris, A. J. (1998). Human type 2 phosphatidic acid phosphohydrolases. Substrate specificity of the type 2a, 2b, and 2c enzymes and cell surface activity of the 2a isoform. *The Journal of biological chemistry* 273, 22059-67.
245. Roe, T., Reynolds, T. C., Yu, G., Brown, P. O. (1993). Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *The EMBO journal* 12, 2099-108.
246. Roeder, R. G. (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* 21, 327-35.
247. Sakai, K., Hirai, M., Kudoh, J., Minoshima, S., Shimizu, N. (1992). Molecular cloning and chromosomal mapping of a cDNA encoding human 80K-L protein: major substrate for protein kinase C. *Genomics* 14, 175-8.
248. Santelli, G., Bartoli, P. C., Giuliano, A., et al. (2002). Thymosin beta-10 protein synthesis suppression reduces the growth of human thyroid carcinoma cells in semisolid medium. *Thyroid* 12, 765-72.
249. Sarafi, M. N., Garcia-Zepeda, E. A., MacLean, J. A., Charo, I. F., Luster, A. D. (1997). Murine monocyte chemoattractant protein (MCP)-5: a novel CC chemokine that is a structural and functional homologue of human MCP-1. *J Exp Med* 185, 99-109.
250. Sasaki, K., Watanabe, E., Kawashima, K., et al. (1993). Expression cloning of a novel Gal beta (1-3/1-4) GlcNAc alpha 2,3-sialyltransferase using lectin resistance selection. *The Journal of biological chemistry* 268, 22782-7.
251. Satoh, T., Takeuchi, O., Vandenbon, A., et al. (2010). The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. *Nat Immunol* 11, 936-44.
252. Schuebel, K. E., Bustelo, X. R., Nielsen, D. A., et al. (1996). Isolation and characterization of murine vav2, a member of the vav family of proto-oncogenes. *Oncogene* 13, 363-71.
253. Schuh, R., Aicher, W., Gaul, U., et al. (1986). A conserved family of nuclear proteins containing structural elements of the finger protein encoded by Kruppel, a Drosophila segmentation gene. *Cell* 47, 1025-32.

254. Schwantes, A., Ortlepp, I., Lochelt, M. (2002). Construction and functional characterization of feline foamy virus-based retroviral vectors. *Virology* 301, 53-63.
255. Segre, J. A., Bauer, C., Fuchs, E. (1999). Klf4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin. *Nature genetics* 22, 356-60.
256. Serbina, N. V., Jia, T., Hohl, T. M., Pamer, E. G. (2008a). Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol* 26, 421-52.
257. Serbina, N. V., Pamer, E. G. (2008b). Coordinating innate immune cells to optimize microbial killing. *Immunity* 29, 672-4.
258. Shi, C., Jia, T., Mendez-Ferrer, S., et al. (2011). Bone marrow mesenchymal stem and progenitor cells induce monocyte emigration in response to circulating toll-like receptor ligands. *Immunity* 34, 590-601.
259. Shie, J. L., Chen, Z. Y., O'Brien, M. J., et al. (2000). Role of gut-enriched Kruppel-like factor in colonic cell growth and differentiation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279, G806-14.
260. Shields, J. M., Christy, R. J., Yang, V. W. (1996). Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Kruppel-like factor expressed during growth arrest. *J Biol Chem* 271, 20009-17.
261. Shimizu, K., Fujii, S. (2008). An adjuvant role of in situ dendritic cells (DCs) in linking innate and adaptive immunity. *Front Biosci* 13, 6193-201.
262. Shimojima, M., Takada, A., Ebihara, H., et al. (2006). Tyro3 family-mediated cell entry of Ebola and Marburg viruses. *Journal of virology* 80, 10109-16.
263. Sivritas, D., Becher, M. U., Ebrahimian, T., et al. (2011). Antiproliferative effect of estrogen in vascular smooth muscle cells is mediated by Kruppel-like factor-4 and manganese superoxide dismutase. *Basic Res Cardiol* 106, 563-75.
264. Siwanowicz, I., Popowicz, G. M., Wisniewska, M., et al. (2005). Structural basis for the regulation of insulin-like growth factors by IGF binding proteins. *Structure* 13, 155-67.
265. Solberg, R., Sistonen, P., Traskelin, A. L., et al. (1992). Mapping of the regulatory subunits RI beta and RII beta of cAMP-dependent protein kinase genes on human chromosome 7. *Genomics* 14, 63-9.
266. Song, C. Z., Keller, K., Murata, K., Asano, H., Stamatoyannopoulos, G. (2002). Functional interaction between coactivators CBP/p300, PCAF, and transcription factor FKLf2. *The Journal of biological chemistry* 277, 7029-36.
267. Soriano, P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nature genetics* 21, 70-1.
268. Spangenberg, C., Winterpacht, A., Zabel, B. U., Lobbert, R. W. (1998). Cloning and characterization of a novel gene (TM7SF1) encoding a putative seven-pass transmembrane protein that is upregulated during kidney development. *Genomics* 48, 178-85.
269. Staeheli, P., Haller, O., Boll, W., Lindenmann, J., Weissmann, C. (1986). Mx protein: constitutive expression in 3T3 cells transformed with cloned Mx cDNA confers selective resistance to influenza virus. *Cell* 44, 147-58.
270. Sturrock, A., Franklin, K. F., Wu, S., Hoidal, J. R. (1998). Characterization and localization of the genes for mouse proteinase-3 (Prtn3) and neutrophil elastase (Ela2). *Cytogenet Cell Genet* 83, 104-8.
271. Sue, N., Jack, B. H., Eaton, S. A., et al. (2008). Targeted disruption of the basic Kruppel-like factor gene (Klf3) reveals a role in adipogenesis. *Mol Cell Biol* 28, 3967-78.
272. Sullivan, J., Feeley, B., Guerra, J., Boxer, L. M. (1997). Identification of the major positive regulators of c-myb expression in hematopoietic cells of different lineages. *The Journal of biological chemistry* 272, 1943-9.

273. Sun, Y., Ding, L., Zhang, H., et al. (2006). Potentiation of Smad-mediated transcriptional activation by the RNA-binding protein RBPMS. *Nucleic Acids Res* 34, 6314-26.
274. Sutterwala, F. S., Noel, G. J., Clynes, R., Mosser, D. M. (1997). Selective suppression of interleukin-12 induction after macrophage receptor ligation. *J Exp Med* 185, 1977-85.
275. Suzuki, A., Kusakai, G., Kishimoto, A., et al. (2003a). Identification of a novel protein kinase mediating Akt survival signaling to the ATM protein. *The Journal of biological chemistry* 278, 48-53.
276. Suzuki, M., Hirao, A., Mizuno, A. (2003b). Microtubule-associated [corrected] protein 7 increases the membrane expression of transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4). *The Journal of biological chemistry* 278, 51448-53.
277. Suzuki, N., Yamamoto, K., Toyoshima, S., Osawa, T., Irimura, T. (1996). Molecular cloning and expression of cDNA encoding human macrophage C-type lectin. Its unique carbohydrate binding specificity for Tn antigen. *Journal of immunology* 156, 128-35.
278. Suzuki, Y., Aoki, Y., Ishida, Y., et al. (1994). Isolation and characterization of mutations in the human holocarboxylase synthetase cDNA. *Nature genetics* 8, 122-8.
279. Svitkina, T. M., Verkhovskiy, A. B., Borisy, G. G. (1996). Plectin sidearms mediate interaction of intermediate filaments with microtubules and other components of the cytoskeleton. *The Journal of cell biology* 135, 991-1007.
280. Swirski, F. K., Nahrendorf, M., Etzrodt, M., et al. (2009). Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 325, 612-6.
281. Tabeta, K., Georgel, P., Janssen, E., et al. (2004). Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 3516-21.
282. Tachibana, I., Bodorova, J., Berditchevski, F., Zutter, M. M., Hemler, M. E. (1997). NAG-2, a novel transmembrane-4 superfamily (TM4SF) protein that complexes with integrins and other TM4SF proteins. *The Journal of biological chemistry* 272, 29181-9.
283. Tagoh, H., Himes, R., Clarke, D., et al. (2002). Transcription factor complex formation and chromatin fine structure alterations at the murine c-fms (CSF-1 receptor) locus during maturation of myeloid precursor cells. *Genes Dev* 16, 1721-37.
284. Takahama, Y., Ohishi, K., Tokoro, Y., et al. (1998). Functional competence of T cells in the absence of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins caused by T cell-specific disruption of the *Pig-a* gene. *European journal of immunology* 28, 2159-66.
285. Takaoka, A., Wang, Z., Choi, M. K., et al. (2007). DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* 448, 501-5.
286. Takaori-Kondo, A. (2006). APOBEC family proteins: novel antiviral innate immunity. *Int J Hematol* 83, 213-6.
287. Takatsu, H., Hase, K., Ohmae, M., et al. (2006). CD300 antigen like family member G: A novel Ig receptor like protein exclusively expressed on capillary endothelium. *Biochemical and biophysical research communications* 348, 183-91.
288. Tamagnone, L., Lahtinen, I., Mustonen, T., et al. (1994). BMX, a novel nonreceptor tyrosine kinase gene of the BTK/ITK/TEC/TXK family located in chromosome Xp22.2. *Oncogene* 9, 3683-8.
289. Tamura, T., Nagamura-Inoue, T., Shmeltzer, Z., Kuwata, T., Ozato, K. (2000). ICSBP directs bipotential myeloid progenitor cells to differentiate into mature macrophages. *Immunity* 13, 155-65.
290. Tang, P., Cheng, T. P., Agnello, D., et al. (2002). Cybr, a cytokine-inducible protein that binds cytohesin-1 and regulates its activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 2625-9.

291. Taya, S., Yamamoto, T., Kano, K., et al. (1998). The Ras target AF-6 is a substrate of the fam deubiquitinating enzyme. *The Journal of cell biology* 142, 1053-62.
292. Taylor, G. A., Collazo, C. M., Yap, G. S., et al. (2000). Pathogen-specific loss of host resistance in mice lacking the IFN-gamma-inducible gene IGTP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 751-5.
293. Terszowski, G., Waskow, C., Conrad, P., et al. (2005). Prospective isolation and global gene expression analysis of the erythrocyte colony-forming unit (CFU-E). *Blood* 105, 1937-45.
294. Toba, S., Tenno, M., Konishi, M., et al. (2000). Brain-specific expression of a novel human UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase (GalNAc-T9). *Biochimica et biophysica acta* 1493, 264-8.
295. Toshchakov, V., Jones, B. W., Perera, P. Y., et al. (2002). TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages. *Nat Immunol* 3, 392-8.
296. Turner, C. A., Jr., Mack, D. H., Davis, M. M. (1994). Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell* 77, 297-306.
297. Turner J, Crossley M. . (1999). Mammalian Kruppel-like transcription factors: more than just a pretty finger. *Trends Biochem Sci*.
298. Ullrich, A., Sures, I., D'Egidio, M., et al. (1994). The secreted tumor-associated antigen 90K is a potent immune stimulator. *The Journal of biological chemistry* 269, 18401-7.
299. Uthaiyah, R. C., Praefcke, G. J., Howard, J. C., Herrmann, C. (2003). IIGP1, an interferon-gamma-inducible 47-kDa GTPase of the mouse, showing cooperative enzymatic activity and GTP-dependent multimerization. *The Journal of biological chemistry* 278, 29336-43.
300. Vallenius, T., Scharm, B., Vesikansa, A., et al. (2004). The PDZ-LIM protein RIL modulates actin stress fiber turnover and enhances the association of alpha-actinin with F-actin. *Experimental cell research* 293, 117-28.
301. van Deursen, J., Schepens, J., Peters, W., et al. (1992). Genetic variability of the murine creatine kinase B gene locus and related pseudogenes in different inbred strains of mice. *Genomics* 12, 340-9.
302. van Nimwegen, E. (2003). Scaling laws in the functional content of genomes. *Trends Genet* 19, 479-84.
303. Van Rompay, A. R., Norda, A., Linden, K., Johansson, M., Karlsson, A. (2001). Phosphorylation of uridine and cytidine nucleoside analogs by two human uridine-cytidine kinases. *Mol Pharmacol* 59, 1181-6.
304. Varol, C., Vallon-Eberhard, A., Elinav, E., et al. (2009). Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions. *Immunity* 31, 502-12.
305. Walsh, J. C., DeKoter, R. P., Lee, H. J., et al. (2002). Cooperative and antagonistic interplay between PU.1 and GATA-2 in the specification of myeloid cell fates. *Immunity* 17, 665-76.
306. Wang, L., Fuster, M., Sriramarao, P., Esko, J. D. (2005). Endothelial heparan sulfate deficiency impairs L-selectin- and chemokine-mediated neutrophil trafficking during inflammatory responses. *Nat Immunol* 6, 902-10.
307. Wang, Y., Zhao, B., Zhang, Y., et al. (2011). Kruppel-like Factor 4 is Induced by Rapamycin and Mediates the Anti-proliferative Effect of Rapamycin in Balloon-injured Rat Carotid Arteries. *British journal of pharmacology*.
308. Waskow, C., Liu, K., Darrasse-Jeze, G., et al. (2008). The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues. *Nat Immunol* 9, 676-83.

309. Watanabe, Y., Nunokawa, A., Kaneko, N., et al. (2009). A two-stage case-control association study of PADI2 with schizophrenia. *J Hum Genet* 54, 430-2.
310. Whitney, E. M., Ghaleb, A. M., Chen, X., Yang, V. W. (2006). Transcriptional profiling of the cell cycle checkpoint gene kruppel-like factor 4 reveals a global inhibitory function in macromolecular biosynthesis. *Gene Expr* 13, 85-96.
311. Wiley, S. R., Schooley, K., Smolak, P. J., et al. (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3, 673-82.
312. Wolfe, S. A., Nekludova, L., Pabo, C. O. (2000). DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 29, 183-212.
313. Worby, C. A., Dixon, J. E. (2002). Sorting out the cellular functions of sorting nexins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 919-31.
314. Xia, L., Wang, L., Chung, A. S., et al. (2002). Identification of both positive and negative domains within the epidermal growth factor receptor COOH-terminal region for signal transducer and activator of transcription (STAT) activation. *The Journal of biological chemistry* 277, 30716-23.
315. Xie, H., Ye, M., Feng, R., Graf, T. (2004). Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. *Cell* 117, 663-76.
316. Yamasaki, S., Matsumoto, M., Takeuchi, O., et al. (2009). C-type lectin Mincle is an activating receptor for pathogenic fungus, *Malassezia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 1897-902.
317. Yamazaki, T., Takeda, K., Gotoh, K., et al. (2002). Essential immunoregulatory role for BCAP in B cell development and function. *J Exp Med* 195, 535-45.
318. Yang, C., Pring, M., Wear, M. A., et al. (2005). Mammalian CARMIL inhibits actin filament capping by capping protein. *Dev Cell* 9, 209-21.
319. Yang, D., Koupenova, M., McCrann, D. J., et al. (2008). The A2b adenosine receptor protects against vascular injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 792-6.
320. Yang, T., Suhail, Y., Dalton, S., Kernan, T., Colecraft, H. M. (2007). Genetically encoded molecules for inducibly inactivating CaV channels. *Nat Chem Biol* 3, 795-804.
321. Yasukawa, H., Misawa, H., Sakamoto, H., et al. (1999). The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *The EMBO journal* 18, 1309-20.
322. Yeager, A. M., Levin, J., Levin, F. C. (1983). The effects of 5-fluorouracil on hematopoiesis: studies of murine megakaryocyte-CFC, granulocyte-macrophage-CFC, and peripheral blood cell levels. *Exp Hematol* 11, 944-52.
323. Yet, S. F., McANulty, M. M., Folta, S. C., et al. (1998). Human EZF, a Kruppel-like zinc finger protein, is expressed in vascular endothelial cells and contains transcriptional activation and repression domains. *The Journal of biological chemistry* 273, 1026-31.
324. Yonemasu, K., Shinkai, H., Sasaki, T. (1981). Comparable content of hydroxylysine-linked glycosides in subcomponents C1q of the first component of human, bovine and mouse complement. *Coll Relat Res* 1, 385-90.
325. Yoon, H. S., Yang, V. W. (2004). Requirement of Kruppel-like factor 4 in preventing entry into mitosis following DNA damage. *The Journal of biological chemistry* 279, 5035-41.
326. Yori, J. L., Seachrist, D. D., Johnson, E., et al. (2011). Kruppel-like factor 4 inhibits tumorigenic progression and metastasis in a mouse model of breast cancer. *Neoplasia* 13, 601-10.
327. Yrlid, U., Jenkins, C. D., MacPherson, G. G. (2006). Relationships between distinct blood monocyte subsets and migrating intestinal lymph dendritic cells in vivo under steady-state conditions. *Journal of immunology* 176, 4155-62.

328. Zaehres, H. ,Scholer, H. R. (2007). Induction of pluripotency: from mouse to human. *Cell* 131, 834-5.
329. Zammarchi, F., Morelli, M., Menicagli, M., et al. (2011). KLF4 is a novel candidate tumor suppressor gene in pancreatic ductal carcinoma. *The American journal of pathology* 178, 361-72.
330. Zhang, J., Guo, J., Dzhagalov, I. ,He, Y. W. (2005). An essential function for the calcium-promoted Ras inactivator in Fcγ receptor-mediated phagocytosis. *Nat Immunol* 6, 911-9.
331. Zhang, P., Andrianakos, R., Yang, Y., Liu, C. ,Lu, W. (2010). Kruppel-like factor 4 (Klf4) prevents embryonic stem (ES) cell differentiation by regulating Nanog gene expression. *The Journal of biological chemistry* 285, 9180-9.
332. Zhang, Q. H., Ye, M., Wu, X. Y., et al. (2000). Cloning and functional analysis of cDNAs with open reading frames for 300 previously undefined genes expressed in CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells. *Genome Res* 10, 1546-60.
333. Zhang, W., Shields, J. M., Sogawa, K., Fujii-Kuriyama, Y. ,Yang, V. W. (1998). The gut-enriched Kruppel-like factor suppresses the activity of the CYP1A1 promoter in an Sp1-dependent fashion. *The Journal of biological chemistry* 273, 17917-25.
334. Zheng, B., Han, M., Bernier, M., et al. (2009a). Kruppel-like factor 4 inhibits proliferation by platelet-derived growth factor receptor beta-mediated, not by retinoic acid receptor alpha-mediated, phosphatidylinositol 3-kinase and ERK signaling in vascular smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry* 284, 22773-85.
335. Zheng, Y., Chaudhry, A., Kas, A., et al. (2009b). Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses. *Nature* 458, 351-6.
336. Zhou, S., Schuetz, J. D., Bunting, K. D., et al. (2001). The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nature medicine* 7, 1028-34.
337. Zmuidzinas, A., Fischer, K. D., Lira, S. A., et al. (1995). The vav proto-oncogene is required early in embryogenesis but not for hematopoietic development in vitro. *The EMBO journal* 14, 1-11.
338. Zucchi, R. ,Ronca-Testoni, S. (1997). The sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. *Pharmacol Rev* 49, 1-51.

Anhang

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ALPI	<i>alkaline phosphatase, intestinal</i>
APC	Allophycocyanin
Arg	Arginase
°C	Grad Celsius
CCR2	<i>chemokine (C-C motif) receptor 2</i>
cDC	<i>common dendritic cells</i>
Cdk	<i>cyclin-dependent kinase</i>
CMP	<i>common myeloid progenitors</i>
cm ²	Quadratmillimeter
cDNA	<i>complementary desoxyribonukleinsäure</i>
Csf-1	<i>colony stimulating factor 1</i>
CX3CR1	<i>CX3C chemokine receptor 1</i>
Cys	Cystin
DC	dendritische Zelle
dd	<i>double distilled</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	<i>enhanced green fluorescence protein</i>
Egr-1	<i>early growth response protein 1</i>
EKLF	<i>erythroid Krüppel-like factor</i>
ERT2	<i>estrogen receptor 2</i>
Ets	<i>E-twenty six</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FcyRIII	<i>Fc portion of IgG</i>
Fig.	Figur
Flt3	<i>FMS-like tyrosine kinase 3</i>
5-FU	5-Fluorouracil
G	Gauge
g	Gramm
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
GM-CSF	<i>granulocyte monocyte colony stimulating factor</i>
GMP	<i>granulocyte-macrophage precursors</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HPRT	Hypoxanthinphosphoribosyltransferase
HSC	<i>hematopoetic stem cell</i>
Hsp90	Hitzeschutzprotein 90

ICSB	<i>interferon consensus sequence-binding protein</i>
IFN	Interferon
IGFBP	<i>insulin-like growth factor binding protein</i>
Il	Interleukin
IMDM	<i>iscove's mod. dulbecco's - medium</i>
i.p.	intraperitoneal
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
Irf	<i>interferon regulatory factor 1</i>
Klf	<i>Krüppel-like factor</i>
Leu	<i>Leucin</i>
LP	<i>lymphoid progenitor</i>
Ly6C	<i>anti-lymphocyte antigen 6C</i>
Lys	Lysin
Mφ	<i>macrophage</i>
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromol
M-CFU's	<i>monocyte colony forming units</i>
M-CSF	<i>macrophage colony stimulating factor</i>
MDSC	<i>myeloid derived suppressor cells</i>
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MLV	murines Leukämievirus
MMLV	<i>moloney murine leukemia virus</i>
MP	<i>myeloid progenitor</i>
MDP	<i>myeloid dentritic progenitor</i>
MER	<i>mutated estrogene receptor</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mM	Millimol
MPS	mononukleäres phagozytäres System
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MSCV	<i>murine stem cell virus</i>
Nab	<i>NGFI-A binding protein</i>
Neg.	<i>negative</i>
NFκB	Nekrosefaktor kappa B
NK	Nicht-Killerzelle
nm	Nanometer
Nod2	<i>nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2</i>
Nur77	auch NR4A1, <i>nuclear receptor subfamily 4 group A member 1</i>
nt	<i>nucleotides</i>
4-OHT	4-Hydroxytamoxifen
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDC	<i>plasmocytic dendritic cells</i>
PE	Phycoerythrin
Phe	Phenylalanin
Pro	Prolin
rhu	<i>human recombinant</i>

RNAse	Ribonuklease
rpm	<i>revolutions per minute</i>
rr	<i>recombinant rat</i>
rRNA	<i>ribosomal ribonucleic acid</i>
Scf	<i>stem cell factor</i>
Sec.	Sekunde
Ser	Serin
Sfn	Stratifin
Sh3	<i>src homology 3</i>
Sp1	<i>specificity protein family</i>
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TAE	Tris-acetate-EDTA
Th17	T-Helfer-17-Zelle
TNF	Tumornekrosefaktor
Tpo	Thrombopoetin
tRNA	<i>transfer ribonucleic acid</i>
Tyr	Tyrosin
Vla	<i>very late antigen</i>
V	Volt

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Danksagung

Diese Arbeit wurde im Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) durchgeführt in Zusammenarbeit mit dem Mikrobiologischen Institut der Charité.

Herrn Dr. med. Dirk Carstanjen, Leiter der Arbeitsgruppe und des Projekts im FMP, danke ich sehr für die gute und intensive Betreuung insbesondere der praktischen Arbeit im Labor.

Mein besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. med. Oliver Liesenfeld, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Charité, für die freundliche und zuverlässige Doktorvaterschaft.

Des Weiteren danke ich meinen Kollegen aus der Arbeitsgruppe, Herrn Didier Nana und Frau Rosel Blasig, und dem Labor, insbesondere den Mitarbeitern in der Tierpflege, für ihre Unterstützung.

Für die Zurverfügungstellung der Mäuse danke ich KH Kästner, Universität von Pennsylvania, USA sowie Andrew Roberts, WEHI Institute, Melbourne, Australien.

Für die computertechnische Unterstützung und für das Korrekturlesen danke ich Nicolas Rioux und Annabel Bentler.

Meiner Familie und Nicolas danke ich dafür, dass sie mich stets unterstützt haben.

Erklärung

„Ich, Anja Bentler, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Die Rolle des Transkriptionsfaktors Klf4 in murinen Monozyten selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

30.11.2012

Anja K. Bentler