

8. ZUSAMMENFASSUNG

Wie bekannt ist, verändert die Deletion des Transkriptionsfaktors *Icsbp* das Differenzierungsprogramm myeloider Progenitoren, was sich in einer erhöhten Produktion von Granulozyten und einer erniedrigten Produktion von Makrophagen manifestiert. Um den zugrunde liegenden Mechanismen für diese Veränderung auf die Spur zu kommen, wurden bipotente Granulozyten-Makrophagen-Vorläuferzellen (GMP) aus *Icsbp*^{+/+} und *Icsbp*^{-/-} Mäusen isoliert und ihre Expressionsmuster mittels Affymetrix-Chips verglichen. Aus der beobachteten Deregulierung mehrerer hämatopoetischer Transkriptionsfaktoren ergab sich die Hypothese, dass die defekte Myelopoese in *Icsbp*^{-/-} Mäusen nicht allein durch das Fehlen des *Icsbp* verursacht wird, sondern durch die Deregulierung mehrerer Transkriptionsfaktoren. Ziel dieser Arbeit war es, den Beitrag einer dieser zusätzlichen Expressionsunterschiede, und zwar der verminderten Expression des Transkriptionsfaktors *Klf4*, zum *Icsbp*^{-/-} Phänotyp zu untersuchen.

Klf4 ist einer der Faktoren deren Expression in den *Icsbp*^{-/-} Progenitoren am stärksten herabreguliert ist (10 fach). Zu Beginn dieser Studie war über die Expression von *Klf4* im hämatopoetischen System nichts bekannt. Seine essentielle Rolle in der Differenzierung epithelialer Gewebe sowie die Bedeutung der analogen Faktoren *Klf1* und *Klf2* in erythroiden bzw. lymphoiden Zellen hat uns dazu bewegt, die Rolle von *Klf4* in der Entwicklung myeloider Zellen zu analysieren.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass *Klf4* die Entwicklung myeloider Progenitoren durch Steuerung der Differenzierung entlang der Makrophagenlinie erheblich beeinflusst. Das lässt sich anhand der signifikant erhöhten Prozentzahlen von Makrophagenkolonien, die sich aus *Klf4-ER*^{T2} überexprimierenden myeloiden Progenitoren entwickeln, erkennen. *Klf4-ER*^{T2} Überexpression führt auch zu vermehrter Makrophagenreifung, wenn die Kolonien in G-CSF kultiviert werden oder wenn *Klf4-ER*^{T2} in *Icsbp*^{-/-} Zellen exprimiert wird (*Icsbp*^{-/-} Zellen haben, aufgrund ihres genetischen Defektes eine verstärkte Neigung, Granulozyten zu bilden). Durch die *Klf4* Überexpression können sowohl extrazelluläre als auch intrazelluläre Granulozyten-fördernde Faktoren außer Kraft gesetzt und die Entwicklung der Zellen in Richtung Makrophagen gesteuert werden. Die Analyse der Genexpression in *Klf4* überexprimierenden Progenitoren ergab eine erhöhte Expression mehrerer mutmaßlich Makrophagen-spezifischer Gene und eine reduzierte Expression von Genen, die in die Granulozytenentwicklung involviert sind. Dies deutet darauf hin, dass *Klf4* seinen Makrophagen-fördernden Effekt durch die Koordinierung molekularer Veränderungen ausübt, die der Festlegung auf diese Linie vorausgehen.

Ein weiteres Merkmal der *Klf4* Überexpression besteht in einem starken zytostatischen Effekt auf die sich entwickelnden myeloiden Zellen, was sich in einer signifikanten Verminderung der Gesamtkoloniezahl zeigt. Diese Wachstumsinhibierung bei *Klf4* Überexpression einerseits und der Makrophagen-fördernde Effekt andererseits deuten auf eine Funktion von *Klf4* als Proliferations/Differenzierungsschalter in der myeloiden Entwicklung hin.

Der Effekt von Klf4 auf die Makrophagenentwicklung ist von Icsbp unabhängig: weder die Funktion von Klf4 in Icsbp^{-/-} Zellen ist beeinträchtigt, noch die Funktion von Icsbp in Klf4^{-/-} Zellen.

Im Gegensatz zu Icsbp^{-/-} Mäusen zeigen Mäuse mit konditioneller Deletion von Klf4 keine offensichtliche Deregulierung in der haematopoetischen Entwicklung. Die Rolle von Klf4 in der Hematopoese scheint redundant zu sein. Möglicherweise wird Klf4 in Stress-induzierten Situationen gebraucht: etwa für die Abwehr von Infektionen (Klf4 führt zu einer vermehrten Expression von Makrophagenmarkern) oder zum Schutz vor onkogenischen Vorgängen (Klf4 führt zu verstärkter Expression von p21^{Waf1}, Zellreifung und Stopp des Zellzyklus).

Als Transkriptionsfaktor ist die Funktion von Klf4 von der Interaktion mit DNA und anderen Faktoren im Zellkern abhängig. Klf4 mit einer Deletion der für Proteininteraktionen verantwortlichen Domäne ist inaktiv. Bei Deletion der DNA-bindenden Domäne ist die Reifung der myeloiden Progenitoren blockiert und es kommt zu einer gesteigerten Proliferation unreifer myeloider Zellen. Dies macht Klf4 zu einem potentiellen Onkogen im myeloiden System.

Eines der durch Klf4 regulierten Gene ist p21^{Waf1}. Um den Beitrag von p21^{Waf1} zu den bei Klf4 Überexpression beobachteten Veränderungen bei der Entwicklung myeloider Progenitoren zu testen, wurde p21^{Waf1} in Klf4^{+/+} und Klf4^{-/-} myeloiden Progenitoren überexprimiert. Zudem wurde die Überexpression von p21^{Waf1} in Zellkompartimenten getestet, indem ein p21-ER^{T2} Konstrukt durch Zugabe des ER^{T2}-Liganden (4-OHT) dazu gebracht wurde, in den Zellkern zu wandern, während es ohne 4-OHT im Cytosol verblieb. Sowohl in Klf4^{+/+} als auch in Klf4^{-/-} Progenitoren wurde eine erhöhte Makrophagenbildung in allen Fällen der p21^{Waf1} Überexpression (konstitutiv, cytosolisch und im Kern) gefunden, was zeigt, dass die verstärkte p21^{Waf1} Expression selbst die Makrophagenreifung erhöht. Das Genexpressionsmuster der p21-ER^{T2} exprimierenden Progenitoren zeigte die gleichen Veränderungen wie bei Klf4 Überexpression. Dies deutet darauf hin, dass p21^{Waf1} für den Phänotyp der Klf4 überexprimierenden Zellen verantwortlich ist. Die vergleichsweise mildereren Auswirkungen bei p21^{Waf1} Überexpression deuten darauf hin, dass Klf4 noch andere zusätzliche Faktoren aktiviert.

Der zytostatische Effekt der Klf4 Überexpression konnte ebenfalls durch p21^{Waf1} Überexpression reproduziert werden, jedoch nur, wenn p21^{Waf1} in den Zellkern translozieren konnte. Die Rollen von p21^{Waf1} bei Zelldifferenzierung und Zellwachstum sind also unabhängig voneinander und sind von der subzellulären Lokalisierung des Faktors abhängig.

Neben der Analyse der Faktoren, die die Entwicklung von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten steuern, wurde noch ein anderer Aspekt der Myelopoese untersucht: die Entwicklung eosinophiler Granulozyten. Der Vergleich der Expressionsmuster der Icsbp^{+/+} und Icsbp^{-/-} GMP ergab eine starke reduzierte Expression mehrerer eosinophil-spezifischer Gene beim Fehlen von Icsbp, was eine gestörte Eosinophilopoese in Icsbp^{-/-} Mäusen vermuten ließ. Tatsächlich konnte eine reduzierte Zahl von eosinophilen Progenitoren in Icsbp^{-/-} Mäusen gemessen werden. Die Icsbp^{-/-} Mäuse hatten zudem eine verminderte Fähigkeit eine Eosinophilenantwort auf Parasiteninfektion oder sterile Entzündung zu entwickeln. Die defekte Proliferation der Icsbp^{-/-} Eosinophilen lässt sich auf eine

verminderte Expression des wichtigsten Wachstumsfaktors $IL5-R\alpha$ und eines wichtigen intrinsischen Faktors $Gata1$ in eosinophilen Zellen zurückführen.

Durch diese Arbeit konnte $Klf4$ als ein neuer Makroplagen-Reifungs-Faktor identifiziert werden, dessen Effekte auf die Myelopoese zumindest teilweise durch sein Zielgen $p21^{Waf1}$ ausgeübt werden. Weiterhin wurde durch den Nachweis einer gestörten Entwicklung von eosinophilen Blutzellen ein bisher unbekannter myelopoetischer Defekt in $Icsbp^{-/-}$ Mäusen entdeckt, wodurch $Icsbp$ als ein wichtiger Faktor in der Eosinophilopoese identifiziert wurde.