

**Die Identifikation von Differenzierungsgenen in der
Entwicklung von hämatopoetischen Stammzellen zu
dendritischen Zellen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn**

**vorgelegt von
Min-Seop Son
aus Bonn**

2009

**Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn**

1. Gutachter: PD Dr. med. T. Neuhaus

2. Gutachter: Professor Dr. med. B. Pöttsch

Tag der Mündlichen Prüfung: 06. August 2009

**Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität Bonn
Ehemaliger Direktor Professor Dr. med. H. Vetter
Jetziger Direktor Professor Dr. med. P. Brossart**

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis	Seiten
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	- 6 -
1. EINLEITUNG	- 7 -
1.1 HÄMATOPOESE	- 7 -
1.2 DENDRITISCHE ZELLEN	- 8 -
1.3 ZYKINE	- 15 -
1.4 ENTWICKLUNG DENDRITISCHER ZELLEN <i>IN VITRO</i>	- 19 -
1.5 SUPPRESSIVE SUBTRAKTIVE HYBRIDISIERUNG (SSH)	- 20 -
1.6 ZIEL DER ARBEIT	- 23 -
2. MATERIAL UND METHODEN	- 24 -
2.1 MATERIAL	- 24 -
2.2 ISOLATION DER CD34 ⁺ ZELLEN	- 27 -
2.4 STIMULATION MIT HUMANEN REKOMBINANTEN ZYKINEN	- 29 -
2.5 ISOLIERUNG DER RNA	- 29 -
2.6 RNA-QUANTIFIZIERUNG	- 30 -
2.7 RNA-GEL	- 31 -
2.8 SUPPRESSIVE SUBTRAKTIVE HYBRIDISIERUNG (SSH)	- 32 -
2.8.1 Isolierung von poly(A) ⁺ RNA und cDNA-Synthese	- 32 -
2.8.2 RSA-I-Verdau	- 33 -
2.8.3 Adapter-Ligation	- 34 -
2.8.4 Erste und zweite Hybridisierung	- 34 -
2.9 AMPLIFIKATION DER DIFFERENTIELL EXPRIMIERTEN GENE MITTELS DER POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)	- 35 -
2.10 POLYACRYLAMID-GEL ZUR DARSTELLUNG DER SUBTRAHIERTEN CDNA FRAGMENTE UND REAMPLIFIKATION	- 35 -
2.11 TOPO-TA CLONING	- 36 -
2.12 GELELEKTROPHORESE	- 37 -
2.13 SEQUENZIERUNG	- 37 -
2.14 BLAST	- 37 -
2.15 STIMULATIONSKINETIK	- 38 -
2.16 PRIMER-KONSTRUKTION UND BESTIMMUNG EXPONENTIELLER PHASEN MITTELS REVERSE TRANSKRIPTION/ POLYMERASE KETTENREAKTION (RT-PCR)	- 38 -
2.17 STATISTIK	- 40 -
3. ERGEBNISSE	- 41 -
3.1 ERGEBNISSE DER SSH	- 41 -
3.2 ÜBERPRÜFUNG DER EXPRESSION AUSGESUCHTER GENE UNTER ZELLSTIMULATION	- 47 -
4. DISKUSSION	- 51 -
4.1 DARSTELLUNG DER IDENTIFIZIERTEN GENE	- 51 -
4.2 NUTZEN UND BEDEUTUNG DER SUPPRESSIVEN SUBTRAKTIVEN HYBRIDISIERUNG (SSH) ZUR IDENTIFIZIERUNG VON DIFFERENZIERUNGSGENEN	- 58 -
5. ZUSAMMENFASSUNG	- 59 -
LITERATURVERZEICHNIS	- 61 -
DANKSAGUNG	- 78 -

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APC	antigenpräsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
BCG	Bacillus Calmette-Guéri
BSA	Rinderserumalbumin
CTL	zytotoxische T-Zelle
CTP	Cytidintriphosphat
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
DC	dendritische Zelle
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FCS	fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
GTP	Guanosintriphosphat
Hepes	2-[4-(1-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HGF	hämatopoetische Wachstumsfaktor
HSC	hämatopoetische Stammzelle
Il	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
MMLV	Moloney-murine-leukemia-virus
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NTP	Nukleosidtriphosphat
PBS	physiologischer Phosphatpuffer
PBSC	Peripheral Blood Stem Cell
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	round per minute
RT	reverse Transkriptase
SCF	Stem Cell Factor
SSH	Suppressive Subtraktive Hybridisierung
TCR	t-cell antigen receptor
TNF	Tumornekrosefaktor

1. Einleitung

Biologische Prozesse in höheren Eukaryonten wie z.B. zelluläres Wachstum und Organogenese werden auf molekularbiologischer Ebene von sogenannten Differenzierungsgenen initiiert. Um diese molekularen Vorgänge zu verstehen, ist es von großer Relevanz, die jeweils beteiligten Differenzierungsgene zu identifizieren.

Gegenstand dieser Arbeit war die Untersuchung der Entwicklung von hämatopoetischen Stammzellen zu dendritischen Zellen.

Hierbei wurden hämatopoetische Stammzellen *in vitro* mit spezifischen Zytokinen stimuliert und somit die Differenzierung in dendritische Zellen getriggert. Zielsetzung war die Identifikation der hierbei beteiligten Gene mittels der Suppressiven Subtraktiven Hybridisierung (SSH).

1.1 Hämatopoese

Als Hämatopoese wird die Bildung und Reifung der Blutzellen bezeichnet, ausgehend von der hämatopoetischen Stammzelle, die sich beim erwachsenen Menschen im Knochenmark befindet.

Die wichtigsten Merkmale von hämatopoetischen Stammzellen sind zum einen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zum anderen die Differenzierung über Vorläuferzellen zu Zelltypen mit charakteristischem Aussehen und spezialisierter Funktion. Bei einem Mann von 70 kg liegt der Umsatz bei knapp 1 Billionen Zellen am Tag, einschließlich 200 Milliarden Erythrozyten und 70 Milliarden neutrophile Leukozyten (Ogawa, 1993).

Die Entwicklung der verschiedenen Blutzellen steht unter dem Einfluss von Zytokinen und kann in eine Myelopoese mit Erythrozytopoese, Thrombozytopoese (Megakaryozytopoese), Monozytopoese und Granulozytopoese sowie in eine Lymphopoese unterteilt werden. Während

die Myelopoese ausschließlich im Knochenmark stattfindet, kommt die Lymphopoese auch im lymphatischen Gewebe vor.

Hierbei entwickeln sich aus den sich selbst erneuernden, pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen durch Zellteilung die für die Myelopoese und Lymphopoese typischen Zellreihen. Aus den sogenannten myeloischen Progenitoren entwickeln sich letztendlich die Erythrozyten, Granulozyten, Megakaryozyten/Thrombozyten und Monozyten/Myelozyten. Die lymphoiden Progenitoren wiederum entwickeln sich in Plasmazellen, T- und B-Lymphozyten.

Primitive hämatopoetische Zellen lassen sich mittels ihrer Oberflächenmarker identifizieren. CD34, zum Beispiel, ist ein Oberflächenantigen, das von hämatopoetischen Stammzellen und Vorläuferzellen, aber nicht von reiferen Zellen exprimiert wird (Civin et al., 1990). Da aber CD34⁺-Zellen heterogen, teilweise nicht mehr pluripotent sind und sowohl lymphoide wie auch myeloerythroide Zellen enthalten, werden weitere Oberflächenmarker benötigt, um die primitiven Zellen des Knochenmarks zu charakterisieren. Hämatopoetische Stammzellen sind durch die fehlende Expression von HLA-DR, CD38 und weiteren Antigenen, die nur von differenzierteren Zellen exprimiert werden, gekennzeichnet (Srouf et al., 1991). Diese Merkmale lassen sich nutzen, um Stammzellen durchflusszytometrisch aus einem großen Zellpool zu isolieren.

1.2 Dendritische Zellen

Eine Komponente der immunologischen Antwort stellt das dendritische Zell- (DC) System von antigenpräsentierenden Zellen (APCs) dar, welches als Initiator und Modulator der Immunantwort dient. Dendritische Zellen leiten sich von hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark ab. Sie wandern in die Peripherie und fungieren dort als Wächter des Immunsystems.

Dendritische Zellen wurden erstmalig 1973 als Isolat aus der Milz von Mäusen durch Steinman und Cohn beschrieben (Steinman und Cohn, 1973). Wie der Name ausdrückt (griechisch: dendros, deutsch: Baum) lassen sich mikroskopisch bäumchenartig Ausläufer erkennen, welche die Lymphozyten umfassen.

Lange war bekannt, dass 'akzessorische' Zellen notwendig waren, um eine erste Antikörperantwort *in vitro* zu erzeugen, aber nachdem DCs identifiziert und von Lymphozyten und Makrophagen separiert werden konnten, war es möglich deren charakteristische Funktion als APCs zu erforschen.

Drei verschiedene Subpopulationen mit jeweils charakteristischen Merkmalen und Funktionen sind beim Menschen beschrieben: Myeloide dendritische Zellen, lymphoide dendritische Zellen und Langerhanszellen der Haut. Dendritische Zellen stellen also eine heterogene Zellpopulation mit unterschiedlichen Phänotypen und Funktionen dar.

Die Aktivierung einer reinen T-Zell-Abwehrreaktion im menschlichen Körper ist sehr komplex und bedarf bestimmter Voraussetzungen. Zunächst müssen Peptide von infizierten Zellen, die als Antigene fungieren, von T-Zellen lokalisiert und erkannt werden. Die Menge an sogenannten major histocompatibility complex (MHC)-kompatiblen Antigenen von Tumoren und infizierten Zellen ist allerdings sehr gering (einhundert oder weniger pro Zelle), und sie müssen von wenigen T-Zell-Klonen lokalisiert und erkannt werden. Hinzu kommt eine relativ geringe Affinität der T-Zell Antigen Rezeptoren (TCR) in Hinblick auf diese Antigene. Zudem fehlt es infizierten Zellen und Tumoren häufig an co-stimulierenden Molekülen, die eine Vermehrung der T-Zellen unter Produktion von Zytokinen anregt und eine Entwicklung in T-Killerzellen fördert.

Daher spielen DCs eine wichtige Rolle, weil sie Antigene erkennen und verarbeiten, um sie dann über eine große Anzahl von MHC-Komplexen zu präsentieren (Gallucci et al., 1999).

Hierzu erkennen T-Zellen mit speziellen TCRs Fragmente der an MHC-gebundene Antigenkomplexe auf der Zelloberfläche einer APC.

Es gibt zwei unterschiedliche MHC-Typen -Klasse I und II-, welche zytotoxische T-Zellen (CTLs) beziehungsweise T-Helferzellen stimulieren.

Über das MHC-Klasse I Molekül werden körpereigene oder virale Antigene von APCs präsentiert und somit von CTLs ($CD8^+$ -Lymphozyten) erkannt. Über weitere Signale, die durch co-stimulierende Moleküle (zum Beispiel CD80 und CD86) vermittelt werden, werden diese CTLs schließlich vollständig aktiviert (Wilson et al., 2003).

Extrazelluläre Antigene hingegen werden im Allgemeinen an MHC-Klasse II Moleküle gebunden. Diese Antigene werden hierdurch T-Helferzellen ($CD4^+$ -Lymphozyten) präsentiert, die durch Sezernierung von Zytokinen B-Zellen aktivieren und letztendlich nach Reifung neuer Plasmazellen die Bildung von Antikörpern induzieren (Ferlazzo et al., 2002; Marusic-Galesic et al., 1988) (s. Abbildung 1).

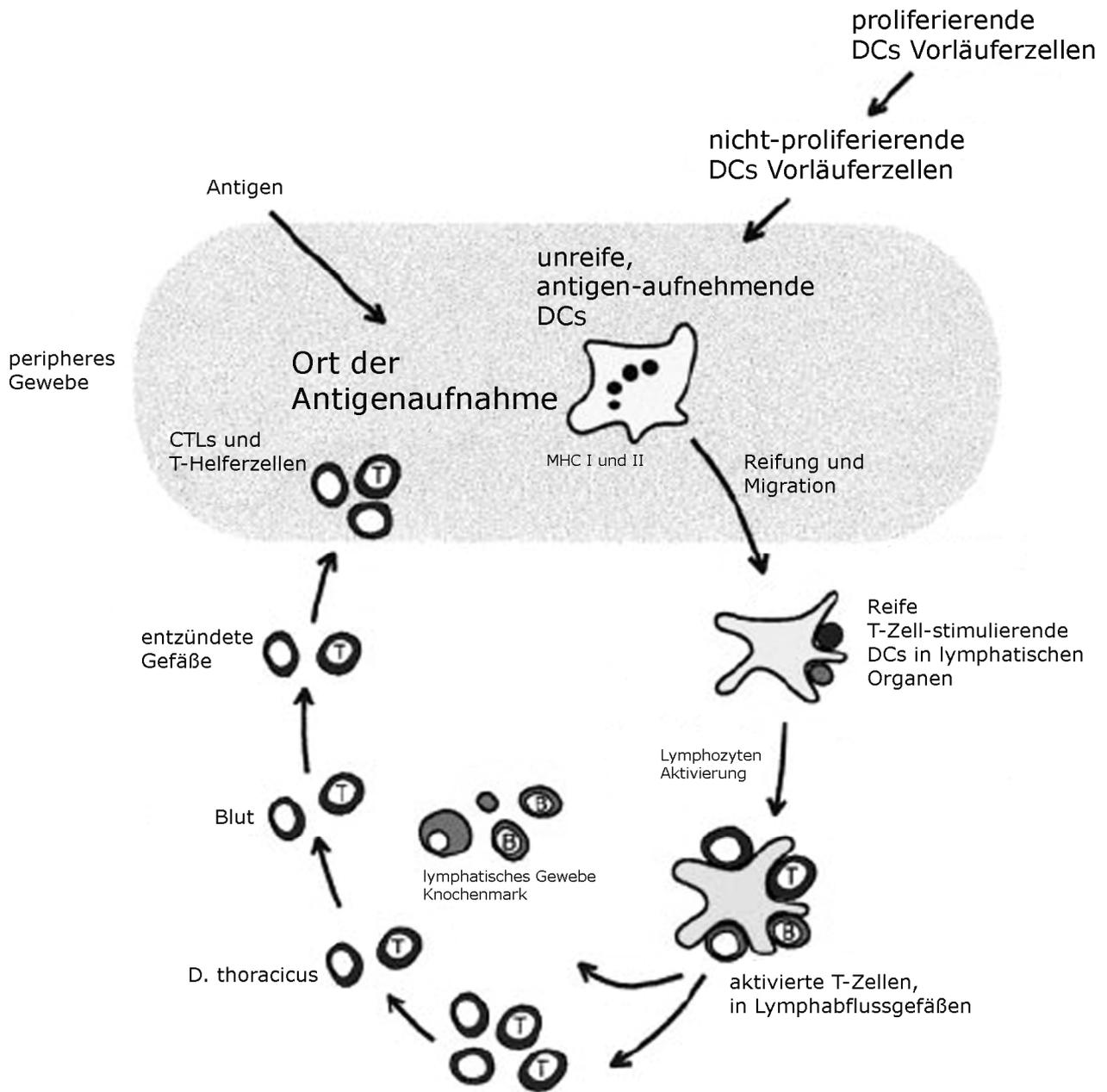


Abb.1: Durch dendritische Zellen (DCs) getriggerte Immunabwehr (Banchereau und Steinman, 1998).

Antigene werden von unreifen dendritischen Zellen (DCs) erkannt und verarbeitet. Nach Reifung der DCs werden diese Antigene über major histocompatibility complex (MHC) zytotoxischen T-Zellen (CTLs) beziehungsweise T-Helferzellen präsentiert. Die so stimulierten und aktivierten CTLs und T-Helferzellen gelangen über Blut- und Lymphgefäße in das periphere Gewebe und bewirken eine Immunabwehr.

Bei diesem Vorgang dürfen nur fremde oder erkrankte Zellen angegriffen werden, um Autoimmunprozesse zu minimieren. Auch dies wird durch dendritische Zellen vermittelt (Steinman, 2003). Normalerweise reagieren T-Zellen nicht auf Eigenpeptide, die ihnen präsentiert werden: Während ihrer Entwicklung reifen nur jene T-Zellen, die keine oder nur eine geringe Affinität zu den im Thymus gegenwärtig befindlichen Antigenen besitzen. Aber nicht alle körpereigenen Peptide werden im Thymus präsentiert.

Aus intaktem Gewebe erreichen dendritische Zellen den Lymphknoten im nicht-aktivierten Zustand. Diese nicht-aktivierten dendritischen Zellen tragen zur Toleranz gegenüber dem präsentierten Antigen bei, wodurch Autoimmunprozesse minimiert werden können (Banchereau und Steinman, 1998; Steinman, 2003).

Im Rahmen dieses Reifungsprozesses verändern dendritische Zellen mit ihrer Funktion auch ihren Phänotyp. Einige Oberflächenmarker, wie CD83, CD80 und CD86, werden nach diesem Prozess überexprimiert. CD83 ist einer der Hauptmarker für die Identifikation von reifen dendritischen Zellen (Prechtel et al., 2007). CD83⁺-Zellen exprimieren, verglichen mit anderen Leukozytenlinien, den höchsten Level an MHC-II Molekülen (Iking-Konert et al., 2002). Im Gegensatz dazu nimmt die Expression des Fc-Rezeptors bei der Ausreifung der dendritischen Zelle kontinuierlich ab. Sowohl myeloide als auch lymphoide dendritische Zellen exprimieren einen hohen Grad an CD11c, MHC II und co-stimulierende Moleküle wie CD86 und CD40. Der wichtigste Marker zur Unterscheidung dieser zwei Subpopulationen ist CD8a, welcher durch lymphoide dendritische, aber nicht durch myeloide dendritischen Zellen exprimiert wird (Banchereau et al., 2000).

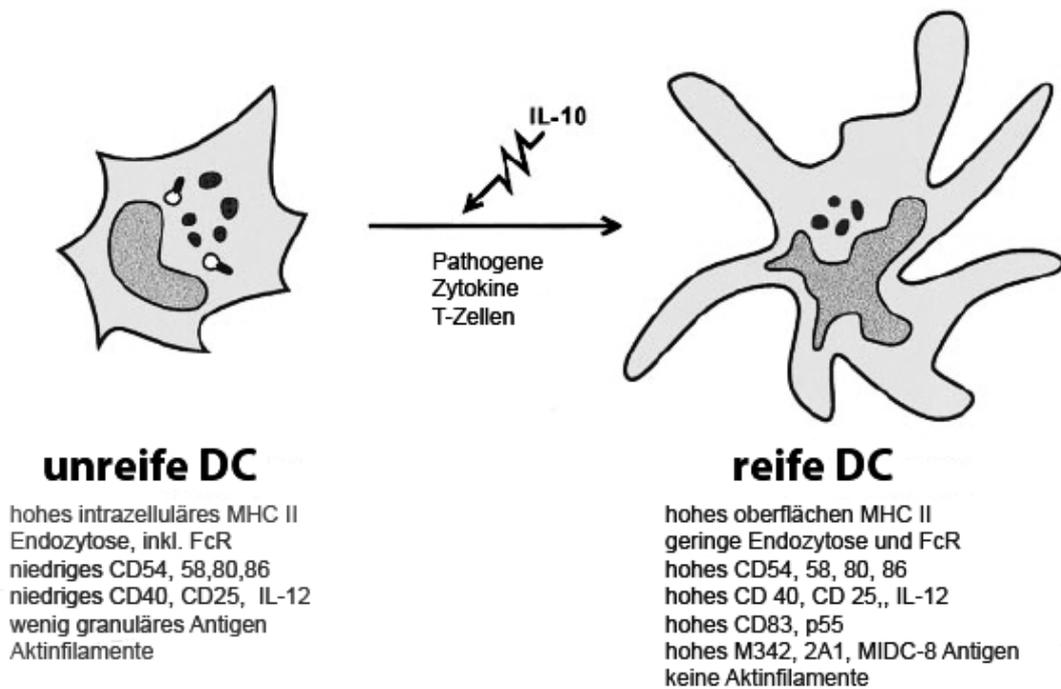


Abb.2: Veränderung der dendritischen Zelle während der Reifung (Banchereau und Steinman, 1998).

Nach Antigenaufnahme findet im Rahmen der Zellreifung eine Veränderung des Phänotyps der dendritischen Zelle statt. Merkmale, wie MHC (major histocompatibility complex) und FcR (fragment crystallizable-Rezeptor), die zur Antigenaufnahme benötigt werden, werden herunter reguliert. Faktoren, wie CD40, CD54 und CD86 (Cluster of Differentiation), die zur T-Zell-Stimulation benötigt werden, werden dagegen überexprimiert.

Interleukin 10 (IL-10) hemmt die Reifung der dendritischen Zelle.

Wie bereits erwähnt, sind dendritische Zellen in der Lage, durch Antigenpräsentation eine spezifische Immunantwort zu initiieren. In verschiedenen Modellen konnte diese Fähigkeit genutzt werden, Immunantworten gegen bestimmte Proteine von Tumorzellen, sogenannte tumorassoziierte Antigene, zu generieren. Tumorzellen wiederum besitzen allerdings zahlreiche Strategien (Sekretion von immunsupprimierenden

Faktoren und Downregulation einer MHC I Antigenpräsentation), um einer effektiven Immunantwort zu entgehen. Hinzu kommt eine geringe Affinität der T-Zell-Rezeptoren in Bezug auf tumorassoziierte Antigene (Gilboa, 1999). Hieraus erwuchs die Hoffnung, einen neuen Therapieansatz, basierend auf tumorimmunologischen Grundlagen, mit dendritischen Zellen als Tumorstoffimpfung entwickeln zu können.

Neue Tumorstoffimpfungen konzentrieren sich darauf, autologe dendritische Zellen von Patienten mit Tumorerkrankungen *in vitro* mit tumorspezifischen Antigenen zu beladen, um nach Retransplantation der Zellen eine tumorspezifische T-Zell vermittelte Immunantwort *in vivo* zu stimulieren.

Untersuchungen von auf dendritische Zellen basierende Immuntherapien beleuchten Aspekte wie optimale Ausgangszellen (CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen vs. Monozyten), optimales Reifungsstadium der Zellen, Zelldosierung, optimale Antigen-Präparation, Vermeidung von „tumor-escape“, optimale Zellapplikation und geeignetes Monitoring der Immunantwort sowohl am Tiermodell als auch in klinischen Studien.

Studien im Tiermodell konnten bereits eine positive Wirkung dieses neuen Therapieansatzes mit Protektion gegen Tumoren und Größenreduktion bestehender Tumoren nachweisen (Flamand et al., 1994; Mayordomo et al., 1997; Ossevoort et al., 1995; Schuler und Steinman, 1997; Song et al., 1997; Specht et al., 1997; Tuting et al., 1997; Zitvogel et al., 1996).

Verschiedene Ansätze umfassen die *in vitro* Beladung dendritischer Zellen mit definierten Tumorantigenen, Tumorzelllysaten, Tumorzellfraktionen wie eluierten Proteinen, isolierten Heatshock Proteinen und mRNA (Ashley et al., 1997; Boczkowski et al., 1996; Paglia et al., 1996).

Auch wurden dendritische Zellen des Menschen unter Verwendung adenoviraler oder retroviraler Vektoren erfolgreich mit tumorantigenkodierenden Genen transfiziert und konnten *in vitro* primäre antigenspezifische zytotoxische T-Zellen induzieren (Reeves et al., 1996).

Die ersten klinischen Studien untersuchten die Effizienz und Sicherheit dendritischer Zellen in der Behandlung von Patienten u.a. mit Glioblastom (De Vleeschouwer et al., 2008), Nierenzellkarzinom (Avigan et al., 2007; Kim et al., 2007), AML (Roddie et al., 2006), B-Zelllymphomen (Hsu et al., 1996), multiplen Myelom (Curti et al., 2007), Prostatakarzinom (Burch et al., 2000; Gilboa und Vieweg, 2004; Murphy et al., 1999), medulläres Schilddrüsenkarzinom (Schott et al., 2001), metastasierten Melanomen (Banchereau et al., 2001; Cella et al., 1997; Hersey et al., 2007; Mukherji et al., 1995; Schuler und Steinman, 1997; Tuting et al., 1997), Uterussarkom und Ovarialkarzinom (Hernando et al., 2002).

Ein oft genanntes Problem dieser Phase-I/II-Studien ist die schlechte Vergleichbarkeit aufgrund mangelnder Standards. Insgesamt konnte aber gezeigt werden, dass die Immuntherapie mit dendritischen Zellen nicht toxisch wirkt, gut verträglich ist, tumor-spezifische T-Zellen induziert und eine klinische Rückbildung des Tumors erzielen kann. Obwohl die Tumorthherapie mittels dendritischer Zellen als Vakzine vielversprechend erscheint, bleiben allerdings weitere Untersuchungen abzuwarten.

1.3 Zytokine

Das Knochenmark hat die Fähigkeit, den Organismus zu schützen, indem es Zellen bedarfsgerecht produziert. Dies geschieht ohne dabei mit unkontrollierter Produktion eine Erschöpfung der Hämatopoese zu riskieren. Auch in Stresssituationen werden mithin nur die Zellen gebildet, die benötigt werden.

Viele Untersuchungen der letzten Jahre haben ergeben, dass das Knochenmark bei der Bildung von Zellen von der Verfügbarkeit von Wachstumsfaktoren, sogenannten Zytokinen, abhängig ist. Diese Wachstumsfaktoren können dabei unterschiedlichste Funktionen haben. Es

gibt Wachstumsfaktoren zur Produktionsstimulation, Produktionshemmung, Differenzierung, Produktionssteigerung in Stresssituationen und wahrscheinlich zur Selbsterneuerung der hämatopoetischen Stammzelle. Diese Funktionen können sowohl linienspezifisch sein als auch mehrere Linien betreffen. Insgesamt besteht im Knochenmark ein sehr komplexes und effizientes interzelluläres Kommunikationssystem (s. Abbildung 3).

Während hämatopoetische Wachstumsfaktoren (HGF) wie der Granulozytenkoloniestimulierende Faktor (G-CSF), Granulozyten-Monozytenkoloniestimulierender Faktor (GM-CSF), Erythropoetin (EPO) und Thrombopoetin (TPO) zu einer raschen Regeneration linienspezifischer Zellpopulationen führt, wirken Interleukin-1 (IL-1), IL-3, IL-6 und IL-11 auf multipotente Vorläuferzellen und aktivieren ein breites Zellspektrum. Der sogenannte Stammzellefaktor (SCF=Kit-Ligand) und Flt-Ligand stimulieren wiederum pluripotente Vorläuferzellen (Dalmau und Freitas, 1991; Koubek et al., 1998; Mannoni, 1993; Wickenhauser und Thiele, 1995).

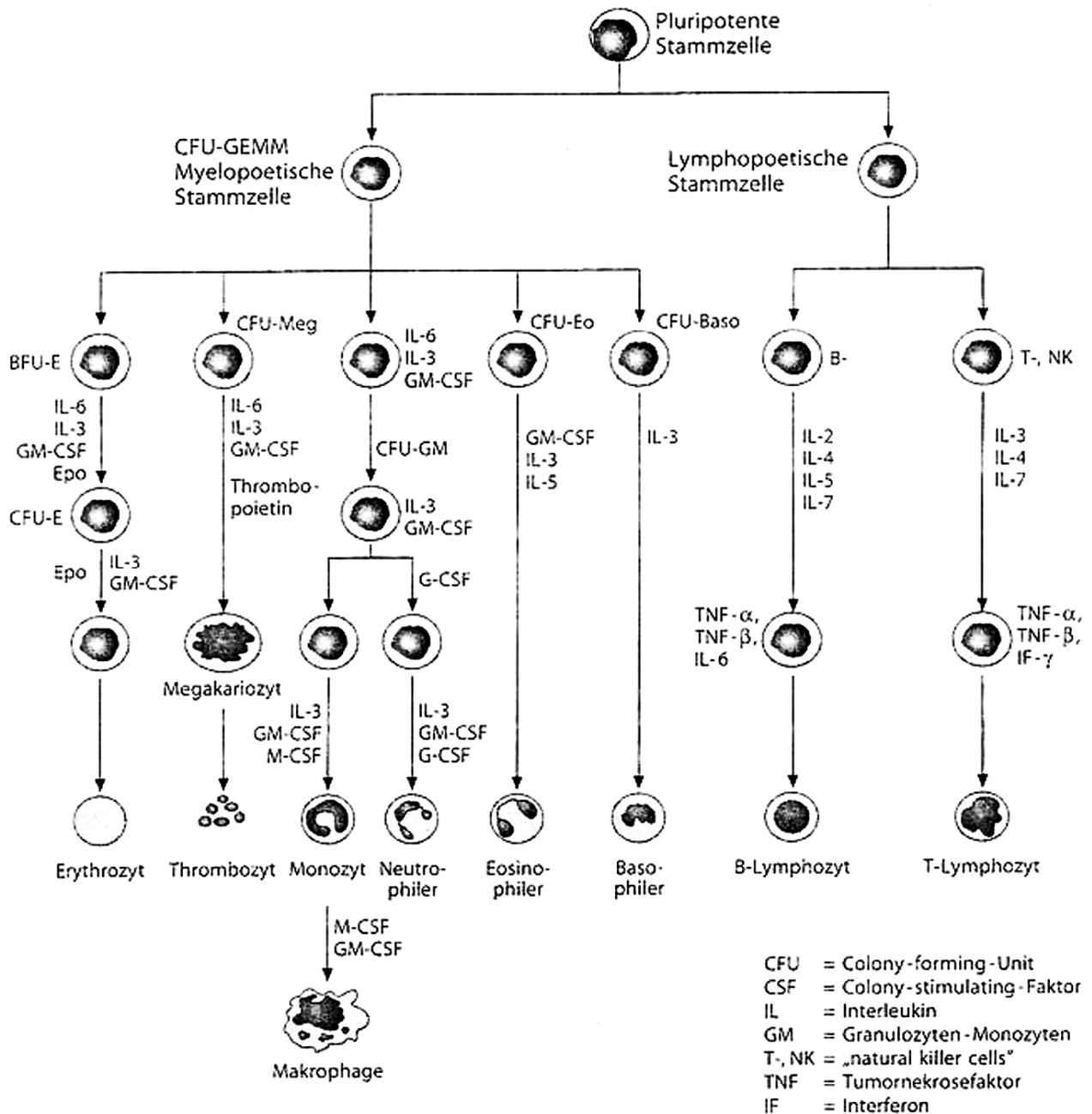


Abb.3: Schematische Darstellung der Hämatopoese (Bildentnahme aus Löffler et al., 2004, Seite 25).

Aus pluripotenten Stammzellen entwickeln sich in Anwesenheit verschiedenster Zytokine die einzelnen Blutzellen der Myelopoese mit Erythrozytopoese, Thrombozytopoese (Megakaryozytopoese), Monozytopoese und Granulozytopoese sowie der Lymphopoese (untere Reihe v.l.n.r.).

Im Folgenden wird näher auf die Zytokine eingegangen werden, die in dieser Arbeit Verwendung finden.

Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF) ist ein unter anderem von Mastzellen und Endothelzellen gebildetes Zytokin. In therapeutischer Anwendung führt GM-CSF zu einer verstärkten Bildung von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und eosinophilen Granulozyten (Vadhan-Raj et al., 1988). Damit stellt es einen wichtigen Wachstumsfaktor in der Bildung von Phagozyten dar und hat einen klar linienspezifischen Effekt.

Tumor necrosis factor (TNF) ist ein die Entzündungsreaktion förderndes Zytokin, welches überwiegend von Monozyten und Makrophagen gebildet wird. TNF aktiviert verschiedenste Zellen der Immunantwort und kann den Zelltod, die Zellproliferation, die Zellmigration, die Zelldifferenzierung und die Ausschüttung anderer Zytokine anregen (Rahman und McFadden, 2006).

Des Weiteren spielt es eine Rolle in der Ausbildung der Insulinresistenz, hat endotheliale Funktionen, wirkt auf den Fettstoffwechsel und das Gerinnungssystem (Pennica et al., 1984; Shirai et al., 1985).

Macrophage-Colony Stimulating Factor (M-CSF) cDNA wurde erstmalig 1985 durch Kawasaki et al. isoliert (Kawasaki et al., 1985). Obwohl es nur als sogenanntes single-copy im gesamten Genom vorkommt, resultiert die Transkription in viele verschiedene mRNAs unterschiedlichster Größen von 1.5 bis 4.5 kb.

M-CSF wird durch Monozyten, Granulozyten, endotheliale Zellen und Fibroblasten produziert. Nach einer Aktivierung sind B- und T-Zellen wie auch einige Tumorzellen in der Lage M-CSF zu synthetisieren.

Die Synthese von M-CSF kann durch Faktoren wie IL-1, TNF- α , IFN- δ , GM-CSF und PDGF induziert werden. Prostaglandine, Glucocorticoide, TGF-beta

und Substanzen, die die intrazelluläre Konzentration von cAMP erhöhen, hemmen wiederum die Synthese von M-CSF.

M-CSF wirkt auf die Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen zu Makrophagen, ebenso nimmt es eine Hauptfunktion in der Differenzierung, im Überleben und in der Funktion von Monozyten ein. M-CSF ist somit ein sehr zelllinienspezifisches Zytokin.

In menschlichen Makrophagen induziert M-CSF die antikörpervermittelte zelluläre Toxizität. Hierbei binden, durch Zytokine und Interferone aktivierte, natürliche Killerzellen (NK) an IgG-markierte Zielzellen und zerstören diese mittels Ausschüttung von NK-Granula (Ralph und Sampson-Johannes, 1990).

1.4 Entwicklung dendritischer Zellen *in vitro*

Für die Anzüchtung von dendritischen Zellen *in vitro* kommen zwei Ausgangszellen in Frage: CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen und Monozyten.

Hierbei sind unterschiedliche Zytokine beteiligt: Bei der Entwicklung aus Monozyten Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF) und Interleukin-4 (IL-4); bei der Entwicklung aus CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF) und Tumor necrosis factor (TNF)- α .

Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass die Stimulation mit Macrophage-Colony Stimulating Factor (M-CSF) sowohl von Monozyten als auch von hämatopoetischen Vorläuferzellen in die Entwicklung von Makrophagen mündet (Barbaroux et al., 2006; Loudovaris et al., 2001; Mollah et al., 2002; Mollah et al., 2003; Mollah et al., 2003; Shortman und Caux, 1997; Syme et al., 2005).

Das Wissen um diese unterschiedlichen Einflüsse auf die Entwicklungskaskade dendritischer Zellen sowohl von GM-CSF und TNF- α als

auch von M-CSF bildete die Grundlage für die in dieser Arbeit durchgeführten Suppressiven Subtraktiven Hybridisierung (SSH).

1.5 Suppressive Subtraktive Hybridisierung (SSH)

In den letzten Jahren sind verschiedene Methoden eingeführt worden, um die Genexpressionsmuster unterschiedlichster Zellen zu untersuchen und differentiell exprimierte Gene zu identifizieren. Die Nachteile vieler Methoden sind allerdings die aufwendigen Arbeitsschritte oder die erforderliche große Menge an RNA. Eine Optimierung der verschiedenen Methoden hinsichtlich der oben genannten Aspekte war wünschenswert.

Eine in den letzten Jahren entwickelte Methode ist die sogenannte Suppressive Subtraktive Hybridisierung (SSH). Die SSH stellt eine Methode dar, um zwei verschiedene mRNA-Populationen miteinander zu vergleichen und diejenigen Gene zu klonieren, die spezifisch nur in einer der beiden Populationen verstärkt exprimiert werden (Diatchenko et al., 1996; Diatchenko et al., 1999; Rebrikov et al., 2002).

Dabei werden die zu vergleichenden zwei Proben, nachdem die mRNA in cDNA umgeschrieben worden ist, als Tester und Driver benannt. Die Tester-cDNA ist die Probe mit den differentiell exprimierten Transkripten. Die Driver-cDNA enthält die Transkriptkopien, die gemeinsam in beiden cDNA-Populationen vorkommen. Das Ziel ist die Entfernung dieser Kopien aus der Tester-cDNA (d.h. der „Driver“ wird vom „Tester“ „subtrahiert“).

Hierzu wird die Tester-cDNA in zwei Fraktionen aufgeteilt und jede mit einem anderen zweiteiligen Adapter (Adapter-1 und -2) ligiert, der wegen der darin vorhandenen Primersequenzen für die spätere PCR-Amplifikation benötigt wird. Im nächsten Schritt hybridisieren in zwei getrennten Reaktionen die beiden Populationen von Tester-cDNA-Einzelsträngen mit in 5-fach hohem

Überschuss zugegebener einzelsträngiger Driver-cDNA, die keine Primer-Bindungsstellen (=Adapter) besitzt.

In der nun folgenden zweiten Hybridisierung verbinden sich die in beiden Ansätzen identischen, aber mit unterschiedlichen Adaptern ligierten Tester-cDNA-Populationen und damit spezifischen Tester-Transkripte und bilden somit ein doppelsträngiges cDNA-Molekül mit zwei verschiedenen Primer-Bindungsstellen an den Enden.

In der folgenden PCR werden diese Hybride unter Einsatz der entsprechenden Primer exponentiell amplifiziert. Die Amplifikation von relativ häufigen Tester-cDNA-spezifischen Doppelsträngen, die sich schon im ersten Hybridisierungsschritt vereinigt haben und an beiden Enden identische Adapter tragen, wird durch die in der PCR bevorzugte Ausbildung einer sog. Pfannenstiel-Struktur („pan handle“) weitestgehend unterdrückt. Dies entspricht einer weiteren Normalisierung und dem Suppressionseffekt dieser Methode.

Die nun amplifizierten testerspezifischen Gene können anschließend identifiziert werden.

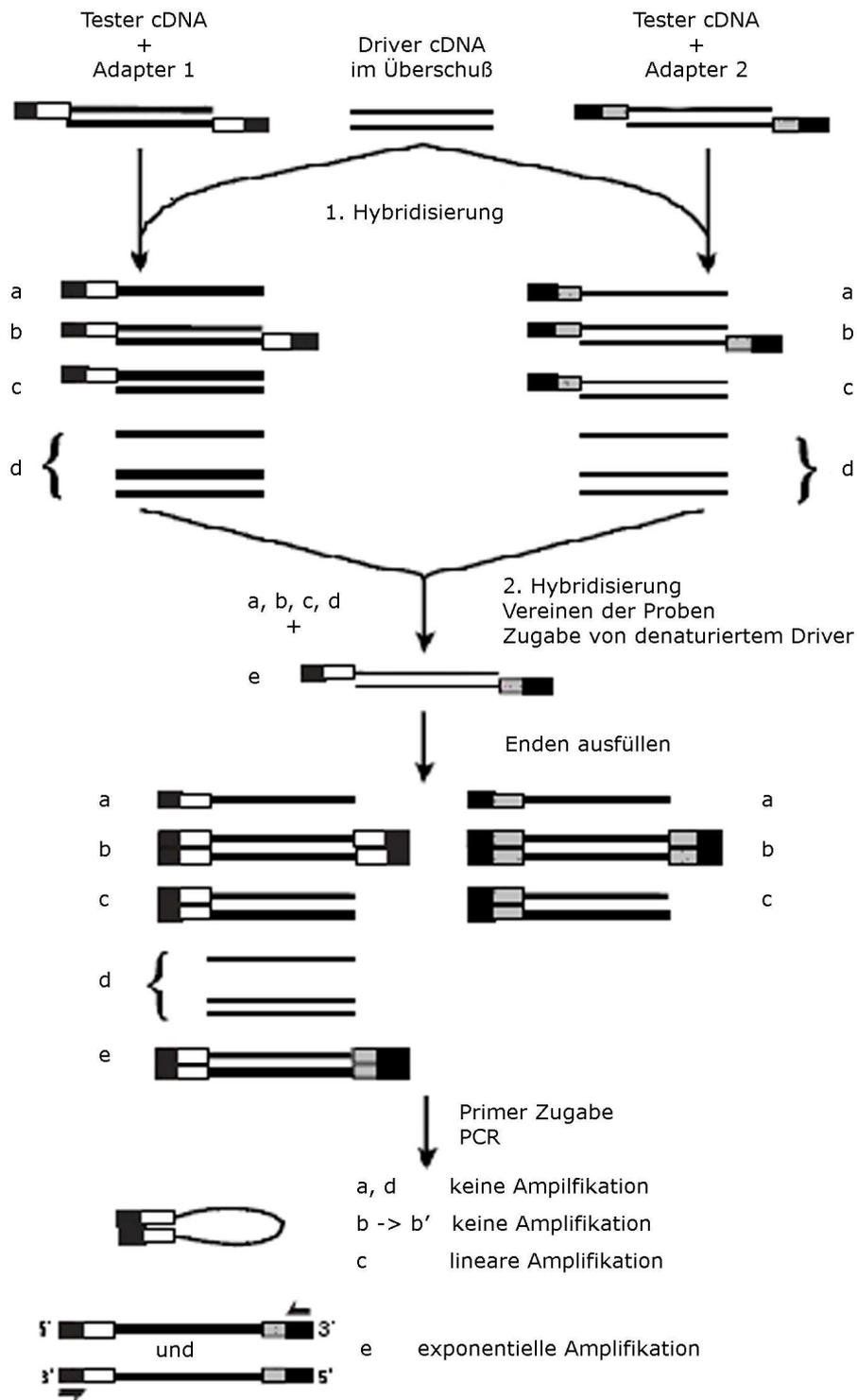


Abb.5: Schematische Darstellung der SSH (Diatchenko et al., 1999).

Zwei cDNA-Populationen (Tester und Driver) werden in zwei Schritten hybridisiert. Die hierbei nicht-hybridisierten Sequenzen (e) entsprechen den differentiell exprimierten Transkripten. Diese werden in einer weiteren PCR (Polymerasekettenreaktion) exponentiell amplifiziert.

1.6 Ziel der Arbeit

Dendritische Zellen bilden ein heterogenes System aus dem Knochenmark stammender, antigenpräsentierender Zellen, die nach Bindung und Prozessieren von Antigenen die primäre T-Zell Immunantwort initiieren.

Das zunehmende Verständnis über die Funktion dendritischer Zellen und die Fähigkeit, größere Mengen an dendritischen Zellen *in vitro* aus CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen herzustellen, haben die Möglichkeit eröffnet, molekulare und zellbiologische Untersuchungen durchzuführen und dendritische Zellen zur therapeutischen Manipulation des Immunsystems zu nutzen (Tuting et al., 1997). Zugrunde liegt die Hypothese, dass *in vivo* eine unzureichende oder fehlende Tumorantigen-Präsentation durch dendritische Zellen eine T-Zell-vermittelte Eradikation des Tumors verhindert (Schuler und Steinman, 1997).

Die Gene, die die Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen zu dendritischen Zellen steuern, sind allerdings vollständig unbekannt. Das Ziel der Arbeit lag in der Identifizierung dieser Differenzierungsgene. Hierzu wurden CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen entweder mit GM-CSF und TNF- α oder mit M-CSF stimuliert.

Anschließend erfolgte mittels der Suppressiven Subtraktiven Hybridisierung die Selektion und im Weiteren die Identifikation der hierbei differentiell exprimierten Gene.

2. Material und Methoden

2.1 Material

G-CSF	Roche Diagnostics
GM-CSF	
TNF- α	
DEPC Wasser	
MMLV Reverse Transkriptase	Gibco-BRL
RNA-Guard	Pharmacia
Taq-Polymerase	Perkin-Elmer
Random-Primer	
dATP, dCTP, dTTP, dGTP	
sämtliche Primer	MWG-Biotech
TOPO-TA Cloning Vector	Invitrogen
One-Shot Cells	
cDNA Subtraktion Kit	Clontech
IMDM Medium	Dulbeco
Penicillin/Streptomycin	Gibco-BRL
Fetal Calf Serum (FCS)	Sigma
TRI-Reagenz	
Phosphatpuffer (PBS)	LifeTech
Kulturgefäße	Falcon
CliniMACS Systeme	Miltenyi-Biotech
CD34 MACS Cell Isolation Kit	
CD34 Fluorescein Isothiocyanate (FITC)	Becton Dickinson
CD34 Fluorescein Phycoerythrin (PE)	
1,5 ml sterile Eppendorfggefäße	Greiner
15 ml sterile Plastikröhrchen	

Puffer und Lösungen:

50x TA-Puffer	242 g Trisma 57,1 ml Eisessig 100 ml 0,5 M EDTA Aufgefüllt mit H ₂ O auf 1000 ml und mit NaOH auf pH 8,5 titriert.
10x Sample Buffer	10 mM Tris-HCl pH 7,5 1 mM EDTA 5 M NaCl
Low Salt Buffer	10 mM Tris-HCl pH 7,5 1 mM EDTA 0,1 M NaCl
Elution Buffer	10 Mm Tris-HCl pH 7,5 1 mM EDTA
RT-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 8,3 3 mM MgCl ₂ 75 mM KCl
10x PCR-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8,3 50 mM KCl 1,5 mM MgCl ₂ 0,001 % Gelatine
LB-Medium	1 % Tryptone 0,5 % Yeast Extract 1 % NaCl Mit NaOH auf pH 7 titriert
Gelloading Buffer	0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol 25% Glycerin

Die übrigen Chemikalien und Substanzen wurden von der Firma Sigma, Merck und Serva bezogen.

Geräte:

Elektrophoresekammer	BioRad
Ultrazentrifuge	Kontron TGA 50
Zentrifuge	Kontron Hermle ZK 364
Zentrifuge für Zellkulturen	Heraeus Megafuge
Photometer	Shimadzu UV 160
FACS	Becton Dickinson
Inkubator	Labotect Forma Scientific 3035
Sterilbank	Gelair ICN Biomedicals TC 60
Thermo Cycler	Perkin Elmer Mod. 480
Kamera	MP 4 Polaroidkamera

2.2 Isolation der CD34⁺ Zellen

Die für die SSH benötigten Zellen wurden von einem gesunden Probanden, welcher drei Tage lang mit 300 µg Filgrastim (G-CSF) stimuliert wurden, mithilfe einer COBE® Spectra Large-Scale-Apheresis (Gambro BCT) gewonnen. Die Selektion der CD34⁺ Zellen, die in der Fraktion der mononukleären Zellen ($>5 \cdot 10^{10}$ Zellen) waren, erfolgte anschließend mithilfe des CliniMACS Systems (Miltenyi Biotech) unter Verwendung magnetisch gekoppelter monoklonaler Antikörper. Diese so markierten Zellen können sich in einem magnetischen Feld anreichern. Dazu diente bei kleineren Zellzahlen (bis $2 \cdot 10^{10}$ Zellen) das MACS Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotech), das nach dem gleichen Prinzip arbeitet.

Die für die spätere Stimulation benötigten CD34⁺ Zellen wurden von Patienten verwendet, die im Rahmen einer autologen Stammzelltransplantation über 3 Tage mit 300 µg Filgrastim (G-CSF) zur Stammzellmobilisation stimuliert wurden. Für die Verwendung von Patientenstammzellen besteht ein positives Ethikvotum der Universität Bonn. Das Stammzellkonzentrat wurde zuerst in einen Puffer (PBS; 0,5 % HSA; 0,6 % ACD-A) in einem Verhältnis von 1:2 suspendiert. Dieses wurde nun durch ein 30 µm Zellfilter gegeben und anschließend mehrfach gewaschen. Dieser Waschschritt beinhaltet das Zentrifugieren bei 13.000 rpm für 5 min und abpipettieren des Überstandes. Die Probe wurde nach nochmaligem Zentrifugieren auf 300 µl PBS pro 10^8 Gesamtzellen abpipettiert. Hierzu wurde zuvor maschinell die Gesamtzellzahl bestimmt.

Die so vorbereitete Probe wurde nun mit den magnetisch gekoppelten monoklonalen Antikörpern gegen das CD34-Antigen inkubiert. Hierzu wurde zunächst 100 µl FcR blocking reagent (human Ig) pro 10^8 Zellen dazugegeben und durch Auf- und Abpipettieren vermischt. Im Anschluss wurden 100 µl einer Hapten-CD34-Antikörper-Lösung pro 10^8 Zellen dazugegeben und in gleicher Weise vermischt. Nun erfolgte die Inkubation

bei 6 °C über 15 Minuten. Nach dieser Zeit wurden die Zellen mit der 10-fachen Menge an PBS Puffer bei 1.500 rpm zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und die Zellen in 400 µl PBS Puffer pro 10⁸ Zellen resuspendiert. Die Suspension wurde nun mit 100 µl Anti-Hapten-Antikörper pro 10⁸ Zellen aufgefüllt, vermischt und erneut bei 6 °C für 15 Minuten inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen erneut mit der 10-fachen Menge an PBS Puffer aufgefüllt und bei 1.500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und in 500 µl PBS Puffer pro 10⁸ Zellen resuspendiert.

Nach der erfolgten Markierung der Zellen konnten diese nun in einem magnetischen Feld des MACS™ Separators der Firma Miltenyi Biotech isoliert werden. Je nach zu erwartender Zellzahl wurde hierzu entweder eine MiniMACS-Säule (MS) oder MidiMACS-Säule (LS) verwendet.

Hierzu wurden die erneut in einem 30 µl Filter gefilterten Zellen in die zuvor mit 1 ml PBS Puffer gespülte Säule pipettiert und dreimal mit PBS gespült, abhängig von der verwendeten Säule mit jeweils 500 µl Puffer für die MS-Säule oder 2000 µl Puffer für die LS-Säule. Anschließend wurde die Säule aus dem magnetischen Feld entfernt und die in der Säule verbliebenen CD34⁺ Zellen mit einem Gummistopfen in 1 ml PBS-Puffer (MS) bzw. 5 ml PBS (LS) herausgepresst. Diese Zellsuspension wurde erneut über eine Säule gegeben und in 500 µl (MS) bzw. 2,5 ml (LS) PBS-Puffer gelöst.

Diese Zellen konnten nun nach einer FACS-Analyse für die weiteren Versuche verwendet werden.

2.3 Fluoreszenz aktivierter Zellsortierer (FACS) Analyse

Um den Reinheitsgrad der isolierten CD34⁺ Zellen zu bestimmen, wurde eine FACS-Analyse (Durchflusszytometrie) durchgeführt. Hierzu wurden CD34-fluorescein isothiocynata- (FITC) und CD34-Phycoerythrin- (PE) Antikörper (Becton Dickinson) verwendet. Die Analyse wurde an einem FACS-Sort

(Becton Dickinson) durchgeführt und erreichte in allen Durchgängen eine Reinheit von >90 %.

2.4 Stimulation mit humanen rekombinanten Zytokinen

Die Zellen wurden dann in IMDM (Iscove's Modifiziertes Dulbecco Medium) mit Penicillin/Streptomycin und LPS-freiem 10 % FCS bei 37 °C und einem CO₂-Raumluftanteil von 5 % für 4 Stunden gehungert. Die Zellen werden hierfür in 100 cm² Kulturflaschen mit einer Dichte von 5x 10⁵ Zellen/ml Medium gegeben.

Für die Stimulation wurde der Zellpool in zwei gleich große Proben geteilt. Die erste Probe wurde mit GM-CSF (100 ng/ml) und TNF-α (2,5 ng/ml) stimuliert. Die zweite Probe mit M-CSF (20 ng/ml). Nun wurden die zwei Proben für 1 Stunde bei 37 °C und einem CO₂-Raumluftanteil von 5 % in einem Inkubator kultiviert.

2.5 Isolierung der RNA

Ziel der RNA-Extraktion ist die Trennung der RNA von den restlichen Zellbestandteilen (Proteine, DNA).

Nach Stimulation der Zellen wurde die Reaktion mit 1 ml TRI-Reagenz (Phenol und Guanidinthiocyanat) lysiert und das Medium jeder Probe sorgfältig abpipettiert. Die am Boden der Zellkulturflasche anhaftenden Zellen wurden mittels eines Plastikschabers gelöst und anschließend ebenfalls in das Reaktionsgefäß überführt.

Diesem nun trüben Gemisch wurden 200 µl/ml Chloroform (Raumtemperatur) hinzugefügt. Nach Mischen und fünfminütiger Inkubation

bei Raumtemperatur wurde die Lösung in einer auf 4 °C heruntergekühlten Zentrifuge bei 12.000 rpm 15 min zentrifugiert.

So entstanden 3 Phasen. Am Boden des Gefäßes eine wässrig rote Phase aus TRI-Reagenz, in der Mitte eine DNA-haltige Suspension und oben die RNA-haltige Lösung, welche unter Vermeidung einer Kontamination mit der darunter liegenden Schicht abpipettiert wurde. Jener Überstand wurde mit 2-Propanol (Isopropanol) bei Raumtemperatur in einem Volumenverhältnis von 1:1 gemischt (insgesamt ca. 1200 µl). Dieses Gemisch konnte nach mehrmaligem Schwenken über Nacht bei -20 °C gelagert werden.

Nach anschließender Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 12.000 rpm wurde der Überstand dekantiert und das am Boden haftende Pellet in 1 ml eines Ethanol-DEPC-Wasser-Gemisches (70 % Ethanol; 30 % DEPC; -20 °C) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (4 °C, 10 min, 12.000 rpm), wurde der Überstand wiederum verworfen und das Pellet für 20 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

Anschließend wurde das kaum noch sichtbare Pellet in mit DEPC versetztes Aqua bidest. aufgenommen und für 5 min bei 60 °C in einem Thermoblock gelöst. Eine eventuelle Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.6 RNA-Quantifizierung

Die Konzentration der RNA wurde spektralphotometrisch bei 260 nm bestimmt. Hierzu wurde 1 µl der Probe mit 50 µl Aqua bidest. in einer 50 µl Quarzküvette gegen eine Küvette mit 50 µl reinen Aqua bidest. gemessen.

Durch die Messung der Extinktion der Proben konnte die RNA-Konzentration bestimmt werden. Durch Messung der Absorption bei 280 nm wurden mögliche Verunreinigungen durch Proteine festgestellt. Der Quotient A_{260}/A_{280} (=Ratio) zeigt die Qualität der RNA an. Lag der Wert zwischen 1,7 und 2,0 konnte ein hoher Reinheitsgrad angenommen werden. Bei einem

Quotienten unter 1,6 wurde eine Proteinverunreinigung angenommen und eine weitere RNA-Isolierung durchgeführt.

2.7 RNA-Gel

Die Qualität der RNA wurde in einem denaturierenden Formaldehyd-Agarose Gel analysiert. Hierzu wurde 3 g Agarose in 225 ml DEPC-Wasser aufgekocht und anschließend mit 25 ml 10x Hepes versetzt. Nach Abkühlung des Gels wurden noch 45 ml 37 %iges Formaldehyd hinzugegeben. Das jetzt vollständig abgekühlte und erstarrte RNA-Gel wurde in eine mit 1x Hepes gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt. In vorgeformten Gel-Slots konnten nun die RNA-Proben-Gemische pipettiert werden. Dieser bestand aus 2,5 µl 10x Hepes, 10,0 µl Formamid, 4,4 µl Formaldehyd, 2,0 µl Gelloadingbuffer, 0,2 Ethidiumbromid, 11,0 µl DEPC-Wasser und 2 µg RNA. Die Proben wurden für 5 Minuten bei 65°C erhitzt und bis zur Beladung der Gel-Slots auf Eis gelagert.

Nach ca. 5 Minuten bei 220 Volt lies sich eine Trennung von zwei blauen Banden erkennen. Dieses wurde durch eine unterschiedliche Laufgeschwindigkeit der Bestandteile des Gelloadingbuffers (Xylencyanol; Bromphenolblau) bedingt. Nach ca. 45 Minuten bei 170 Volt konnte die Elektrophorese beendet werden. Das Gel wurde der Kammer entnommen und unter einer UV-Licht-Lampe begutachtet und fotodokumentiert.

2.8 Suppressive Subtraktive Hybridisierung (SSH)

2.8.1 Isolierung von poly(A)⁺RNA und cDNA-Synthese

Die Suppressive Subtraktive Hybridisierung (SSH) erfolgte gemäß der von Diatchenko et al. beschriebenen Methode zwischen CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen die einerseits mit GM-CSF und TNF- α und andererseits mit M-CSF stimuliert wurden. Hierbei wird die Driver-Probe von der Tester-Probe subtrahiert. Als Tester diente die Population, die mit GM-CSF und TNF- α stimuliert wurde, Driver war somit die mit M-CSF stimulierte Probe.

Als Verfahrensansatz wurden $5 \cdot 10^6$ CD34⁺ selektionierte und stimulierte Zellen verwendet.

Die Gesamt-RNA wurde mittels TRI-Reagens extrahiert (wie unter 2.5 beschrieben). Die RNA wurde spektrofotometrisch quantifiziert und deren Reinheit mittels Elektrophorese auf einem 1%igen, ethidiumbromidhaltigen Agarose-Gel nachgewiesen (siehe 2.7.).

Die Isolierung der mRNA erfolgte nach dem Protokoll des Poly(A)Quick-Kit (Stratagene). Hierzu wurden die RNA Proben für 5 Minuten bei 65 °C erhitzt und mit 10x Sample Buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 5 M NaCl) auf eine Konzentration von 1x Sample gebracht. Danach wurden diese verdünnten Proben über eine zuvor mit High-Salt Buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 0,5 M NaCl) gespülte Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule erneut mit High-Salt Buffer und Low-Salt Buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 0,1 M NaCl) gespült. Die mRNA wurde mittels einer auf 65 °C erhitzten Elution Buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA) in 200 μ l Proben gelöst.

Die Durchführung der nachfolgenden Schritte orientierte sich an den Anweisungen des PCR-SelectTMcDNA Subtraction Kit.

Für die 'first-strand' cDNA-Synthese wurde jeweils 1 µg der isolierten tester- und driver-poly(A)RNA mit dem cDNA-Synthese Primer für 2 Minuten bei 70 °C inkubiert und anschließend unmittelbar auf Eis abgekühlt. Die Reaktion zur reversen Transkription (RT) erfolgte in 1x RT-buffer (50 mM Tris-HCl, 6 mM MgCl₂ und 75 mM KCl) mit 1 mM dNTP und 200 U moloney murine leukemia virus (MMLV) Reverse Transkriptase für 90 Minuten bei 42°C.

Im unmittelbaren Anschluss wurde die 'second strand' cDNA-Synthese durchgeführt. In 1x 'second strand'-Puffer (100 mM KCl, 10 mM Ammoniumsulfate, 5 mM MgCl₂, 0.15 mM β-NAD, 20 mM Tris-HCl, 0.05 mg/ml Serumalbumin vom Rind) wurde die 'first strand' cDNA mit 1 mM dNTPs, 0,3 U/µl DNA-Polymerase I, 0,01 U/µl RNase H und 0,06 U/µl E. coli DNA-Ligase bei 16 °C für 2 Stunden inkubiert. Die doppelsträngige (ds) cDNA wurde durch die Zugabe von T4 DNA-Polymerase (30 min bei 16°C) geschnitten. Diese Reaktion wurde durch Zugabe von EDTA/Glykogen gestoppt, gefolgt von einer Präzipitation der ds cDNA mit 4 M Ammoniumacetat und 80 % Ethanol.

2.8.2 RSA-I-Verdau

Mit dem Ziel kürzere cDNA-Fragmente zu erhalten, wurde die 'second strand' cDNA durch RSA I verdaut. Hierzu wurde die ds cDNA in 1x RSA I Restriktionspuffer (10 mM Bis Tris Propane-HCl (pH 7,0), 10 mM MgCl₂ und 0,1 mM DTT) mit 15 U RSA I bei 37 °C für 90 Minuten inkubiert. Der Verdauungsprozess wurde durch die Zugabe von EDTA/Glykogen beendet und die verdaute dsDNA wurde präzipitiert.

2.8.3 Adapter-Ligation

Die Ligation der Adapter wurde nur mit der mittels Reverse Transkriptase hergestellten und verdauten Tester-cDNA durchgeführt. Die cDNA der mit M-CSF stimulierten CD34⁺ Zellen (=Driver) wurde nicht ligiert. Eine Hälfte der Tester-ds cDNA wurde mit 2 µM des Adapters 1, die andere Hälfte mit 2 µM des Adapters 2 in einem Ligationspuffer (50 mM Tris-HCl (pH 7,8), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM ATP und 5 % Polyethylenglykol) unter der Verwendung von 0,5 U T4 DNA Ligase bei 16 °C über Nacht ligiert. Diese Reaktion wurde durch die Zugabe von EDTA/Glykogen gestoppt und die Ligase durch das Erhitzen der Proben auf 72 °C für 5 Minuten inaktiviert.

2.8.4 Erste und zweite Hybridisierung

Für die erste Hybridisierung wurde zu den zwei Tester cDNA-Proben, jeweils ligiert mit Adapter 1 oder 2, ein Überschuss an Driver cDNA hinzugegeben. Nach der Denaturation bei 98 °C für 1,5 Minuten wurde die erste Hybridisierung in einem Hybridisierungspuffer bei 68 °C für 8 Stunden durchgeführt.

Für die zweite Hybridisierung wurden die zwei Proben der ersten Hybridisierung gemischt und bei 68 °C über Nacht denaturiert. Beendet wurde die Reaktion mittels der Zugabe von 200 µl eines Verdünnungspuffers und des Erhitzens auf 75 °C für 7 Minuten.

2.9 Amplifikation der differentiell exprimierten Gene mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die folgende Polymerasekettenreaktion diente zur selektiven Amplifikation der differentiell exprimierten Gensequenzen. Die hierzu verwendeten Primer waren der zuvor verwendeten Adaptorssequenzen angepasst.

Die erste Amplifikation wurde mit 1 µl der verdünnten hybridisierten cDNA, in einem Gesamtvolumen von 25 µl bestehend aus 400 nM von jedem Primer, 0,2 mM von jedem dNTP, 0,5 µl des Advantage KlenTaq Polymerase-Gemisches und 2,5 µl eines 10x PCR Puffers (10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,001 % Gelatine) durchgeführt. Folgende Parameter kamen für die PCR zur Anwendung:

Zunächst die Denaturierung bei 75 °C für 7 Minuten, anschließend folgten 30 Zyklen Denaturierung bei 94 °C für 30 Sekunden, Primer-Hybridisierung bei 68 °C für 30 Sekunden und DNA-Synthese bei 72 °C für 1,5 Minuten.

1 µl des Amplifikationsproduktes wurde in einer zweiten PCR für 30 Zyklen mit adapterspezifischen Primerpaaren mit den gleichen Konzentrationen von PCR-Puffer, dNTP und Taq-Polymerase wie für die erste PCR mit identischen Zyklenbedingungen eingesetzt.

2.10 Polyacrylamid-Gel zur Darstellung der subtrahierten cDNA Fragmente und Reamplifikation

Die Darstellung der subtrahierten cDNA Fragmente erfolgte mithilfe einer Gelelektrophorese in einer horizontalen Polyacrylamid-Elektrophorese-Kammer. Hierzu wurden 7 µl der amplifizierten cDNA auf ein long-run Gel in drei Vertiefungen pipettiert und anschließend bei 140 Volt aufgetrennt. Das Gel wurde daraufhin auf Höhe der Mitte der zweiten Laufbahn durchgeschnitten und die eine Hälfte mit Silber gefärbt. Mittels der nun

sichtbaren Banden konnten in der ungefärbten Hälfte des Gels die korrespondierenden Bande ausgeschnitten werden. Die ausgeschnittenen Bande dienten als Substrat für eine erneute PCR, die unter den gleichen Bedingungen wie die vorangegangene PCR erfolgte. Die Ergebnisse dieser Amplifikation wurden auf einem weiteren Polyacrylamid-Gel sichtbar gemacht.

2.11 TOPO-TA Cloning

Die Produkte der reamplifizierten cDNA Fragmente wurde mittels des TOPO-TA Cloning[®]-Kits der Firma Invitrogen in einen pCR[®]-2.1-TOPO-Klonvektor eingefügt. Hierzu wurden 2 µl des PCR-Produktes mit 1 µl des Klonvektors und 2 µl H₂O für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf Eis gelegt. Von jeder Probe wurden 2 µl dieses Ligationsproduktes in ein Gefäß mit Top10-One Shot Zellen übertragen und vorsichtig vermischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert.

Diese Reaktion wurde durch Erwärmen auf 42 °C für 30 Sekunden gestoppt und sofort für 2 Minuten auf Eis gelegt. Nun wurden 250 µl vom SOC-Medium (2 % Bactrotryptone, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂-6H₂O, 20 mM Glukose) hinzugefügt und für 1 Stunde bei 37°C bei 200 rpm horizontal geschüttelt. Die Zellsuspension wurde auf ampicillin-getränkte, vorgewärmt Agarplatten ausgestrichen und unter Zugabe von 1,4 µg β-X-Gal und 100 µM IPTG, bei 37 °C über Nacht inkubiert. Weiße Kolonien wurden abgetragen und jeweils in ein Well einer 96-Mikrotiterplatte überführt. Jedes Well beinhaltete 200 µl LB-Medium mit 50 mg/ml Ampicillin. Anschließend wurde die Platte für 4 Stunden bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln (150 rpm) inkubiert. Je 5 µl der Bakteriensuspension wurden mit 15 µl H₂O verdünnt und durch Erhitzen auf 100 °C für 10 Minuten lysiert.

Für die anschließende PCR wurden je Probe 5 µl der Bakteriensuspension verwendet. Hinzugefügt wurden jeweils 10 µM von M13-AP-Forward und M13-AP-Reverse Primern (5'-Primer: 5`-GCT ATT ACG CCA GCT GGC GAA AGG GGG ATG TG-3', 3'-Primer: 5`- CCC CAG GCT TTA CAC TTT ATG CTT CCG GCA CG-3'), welche an den pCR[®]-2.1-TOPO-Klonvektor binden. Mit folgenden Parametern wurde die PCR durchgeführt: Zunächst 7 Minuten bei 74 °C, dann 30 Zyklen mit 94 °C für 1 Minute, 60 °C für 1 Minute und 72 °C für 1 Minute.

2.12 Gelelektrophorese

7 µl des PCR-Produktes wurden auf einem Agarose-Gel aufgetragen, um die korrekte Größe des geklonten PCR-Fragmentes zu erfassen.

2.13 Sequenzierung

Die DNA-Sequenzanalyse erfolgte durch die Firma MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland).

2.14 BLAST

Die Suche nach Homologien der Gensequenz wurde mithilfe des BLAST-Programmes am U.S.-American National Center for Biotechnology Information durchgeführt.

2.15 Stimulationskinetik

Zur exemplarischen Überprüfung der Effektivität der SSH und zur Bestimmung exponentieller Phasen in der Expression der mRNA der in der SSH gefundenen Gene mittels RT-PCR wurden in drei unabhängigen Experimenten hämatopoetische Stammzellen erneut mit GM-CSF (100 ng/ml) und TNF- α (2,5 ng/ml) stimuliert. Hierzu wurden nun einzelne Proben der jeweiligen Kinetiken in ihrer Stimulation nach 0, 30, 60, 120 und 240 min untergebrochen und die RNA wie oben beschrieben isoliert.

2.16 Primer-Konstruktion und Bestimmung exponentieller Phasen mittels Reverse Transkription/ Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Nach Isolierung und Quantifizierung der RNA musste diese vor Verwendung in der Polymerasekettenreaktion (PCR) mit der reversen Transkriptase-Reaktion (RT) in cDNA umgeschrieben werden. Es kam eine Modifikation einer erstmals von Wang et al. (Wang et al., 1989) beschriebenen Methode zum Einsatz.

Zunächst wurde 1 μ g RNA mit HEPES/EDTA-Puffer (10 mM HEPES/0,1 mM EDTA, pH=7,8) auf ein Volumen von 15 μ l aufgefüllt und mit 100 pmol Random Primer (Hexanukleotide) (entspricht 1 μ l) für 5 min bei 95 °C erhitzt (Annealing) und anschließend rasch auf 4 °C abgekühlt.

Anschließend wurde das Reaktionsvolumen auf 40 μ l mit folgenden Reagenzien aufgefüllt: 8 μ l 1xRT-Puffer (50 mM Tris-HCl (pH=8,3), 75 mM KCL, 3 mM MgCl₂), 10 mM (3 μ l) Dithiothreitol DTT, 50 U (2 μ l) eines RNase-Inhibitors (RNA-Guard®), je 0,5 mM (2 μ l) dATP, dCTP, dGTP, dTTP und 200 U (3 μ l) der Moloney-murine-leukemia-virus (MMLV)-Reversen Transkriptase.

Zu jeder Probe wurde eine zweite RT ohne MMLV-Reverse Transkriptase angesetzt, um eventuelle DNA-Verunreinigungen zu detektieren.

Nach gründlichem Durchmischen wurden die Proben in einem Thermocycler mit den folgenden Parametern inkubiert: 5 Minuten bei 25 °C, 5 Minuten bei 30 °C, 90 Minuten bei 37 °C, 5 Minuten bei 95 °C. Anschließend wurden die Proben auf 4 °C abgekühlt.

Für die ausgesuchten identifizierten Gene wurden 5'- und 3'- Primer konstruiert, von MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und das optimale Paar anhand eines aus den oben genannten Stimulationen stammenden cDNA-Pools ausgetestet.

Hierzu wurde mit verschiedenen Primerpaaren unter standardisierten Bedingungen jeweils eine PCR durchgeführt und eine Gelelektrophorese durchgeführt. Es wurde jeweils das Primerpaar verwendet, bei dem in der Gelelektrophorese eine spezifische Bande zu sehen war. Als Versuchskontrolle der PCR diente die Glyceral-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), welches als Enzym der Glykolyse in allen Zellen konstant exprimiert wird.

Jeweils 1 µl des in den Stimulationskinetiken gewonnenen cDNA wurde als Substrat für die anschließende PCR eingesetzt. Mit folgenden Substanzen wurde ein Gesamtvolumen von 50 µl erzeugt bestehend aus: 5 µl 10 x PCR-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,001 % Gelatine), 1 µl (0,02 mM) je dNTP, 1 µl (20 pmol) je konstruierten Primer, 0,5 µl (6,25 U) Taq-DNA-Polymerase und 37,5 µl Aqua bidest. Die PCR wurde mit folgenden Temperaturbedingungen durchgeführt: Zunächst die Denaturierung bei 94 °C für 60 Sekunden. Anschließend folgte die Hybridisierungsphase (=Annealing) der Primer bei 60 °C für 60 Sekunden. Die Synthesephase (=Elongation) der DNA bei 72 °C für 90 Sekunden. Dieser Zyklus wurde 30-mal durchlaufen. Nach Beendigung des letzten

Amplifizierungszyklus erfolgte ein abschließender Syntheseschritt von 20 Minuten bei 72 °C.

Anschließend wurde das cDNA-Amplifikat wie in 2.12 beschrieben in einem 1,5 % Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit UV-Licht sichtbar gemacht.

Die relative Konzentration der mRNA-Expression wurde mithilfe eines Scanners densitometrisch bestimmt und mit der Software Scan Pack (Biometra) ausgewertet. Durch Amplifikation der GAPDH aus demselben RT-Ansatz konnten die Ergebnisse auf die Werte der GAPDH-mRNA-Expression normalisiert werden. Die GAPDH ist ein ubiquitär vorkommendes Enzym der Glykolyse, dessen Expression von der Stimulation der Zellen nahezu unabhängig ist. Der Kontrollwert wurde gleich 100 % gesetzt.

2.17 Statistik

Die Daten in den Graphen sind als Mittelwerte mehrerer Experimente (n=3) mit Standardabweichung, welche mit Microsoft® Office Excel® 2007 berechnet und erstellt wurde, angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der SSH

Zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene in hämatopoetischen Stammzellen unter Stimulation mit Zytokinen wurde eine SSH durchgeführt. Zunächst mussten hierzu die Stammzellen aus Vollblut isoliert werden. Dies geschah unter Kopplung von magnetischer Antikörper und anschließender Auswaschung in dem magnetischen Feld einer Separationssäule. In einem FACS-Gerät konnte nun der prozentuale Anteil (Reinheit) der CD34⁺ Zellen nach entsprechender Färbung der Zellen bestimmt werden.

Abbildung 6 zeigt eine exemplarische Untersuchung der Reinheit einer Probe.

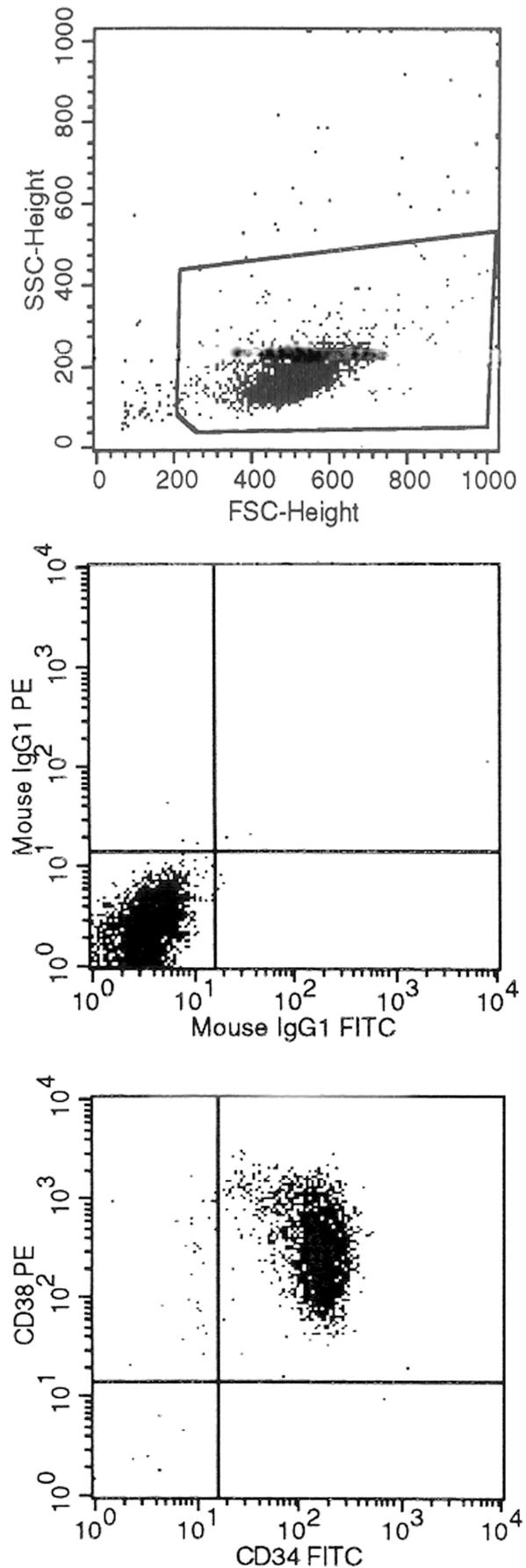
Abb.6: FACS-Analyse der CD34⁺ selektierten Zellen:

Das obere Diagramm zeigt die gemessene Gesamtzellpopulation, der bereits markierte Event beinhaltet 96,13 % der Gesamtzellen. Hierbei werden die relative Zellgröße (Vorwärtsstreulicht-FSC) und die relative Zellgranularität bzw. interne Komplexität (Seitwärtsstreulicht-SSC) bestimmt.

Das mittlere Diagramm stellt die unspezifischen Bindungen dar. Die Messung wurde mit Maus-Antikörpern durchgeführt. Der gemessene Anteil beträgt 0,13 %.

Das untere Diagramm zeigt den totalen CD34⁺ Zellanteil mit 95,80 %. Der Anteil der markierten Zellen ist 98,66 %.

Somit konnte von einer ausreichenden Reinheit für die nachführende Zellstimulation ausgegangen werden.



Für die folgende Zellstimulation wurde die isolierte Stammzellsuspension in drei gleich große Proben geteilt. Die erste Probe wurde mit GM-CSF (100 ng/ml) und TNF- α (2,5 ng/ml) stimuliert, die zweite Probe mit M-CSF (20 ng/ml). Die dritte Probe diente als Kontrollprobe und wurde in ihrer Zusammensetzung belassen. Die mit GM-CSF und TNF- α stimulierten Proben dienten als Tester, die mit M-CSF stimulierten Proben als Driver.

Nach der Stimulation wurde die jeweilige RNA isoliert und anschließend mittels der Reversen Transkriptase in cDNA umgewandelt. Zur Vorbereitung auf die eigentliche SSH wurde die cDNA durch das Enzym RSA I verdaut und hierdurch in kleinere Fragmente geteilt. Die verdaute Tester-cDNA wurde nun in zwei Proben mit jeweils einem Adapter (Adapter 1 und 2) ligiert und mit einem Überschuss an Driver cDNA dem Hybridisieren zugeführt. Anschließend folgte ein zweiter Hybridisierungsschritt, in dem die zwei Ansätze vermischt wurden. Als nächster Schritt wurden zwei PCR mit Adapter-1 und Adapter-2 spezifischen Primern zur Amplifizierung der subtrahierten Gene ohne Denaturierung durchgeführt. Die subtrahierten und amplifizierten cDNA-Fragmente wurden nun in einem Acrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die sichtbaren Banden wurden ausgeschnitten und in einer weiteren PCR reamplifiziert. Mit diesem Schritt konnten diskrete Banden aufgelöst und gut dargestellt werden.

Die Abbildung 7 zeigt das Acrylamidgel mit der ersten und zweiten PCR sowie den für die Reamplifizierung ausgeschnittenen Banden. In Abbildung 8 sieht man die reamplifizierten Gene besser aufgelöst und aufgetrennt.

Die nun amplifizierten Gene wurden zur Erkennung in einen Vektor (TOPO-TA) eingefügt, mittels vektorspezifischen M13 Primern amplifiziert und anschließend sequenziert. Weil in Einzelfällen mehrere Gene zu einem Fragment gehörten, war die Anzahl der amplifizierten Banden (insgesamt 43) höher als die der gefundenen Gene.

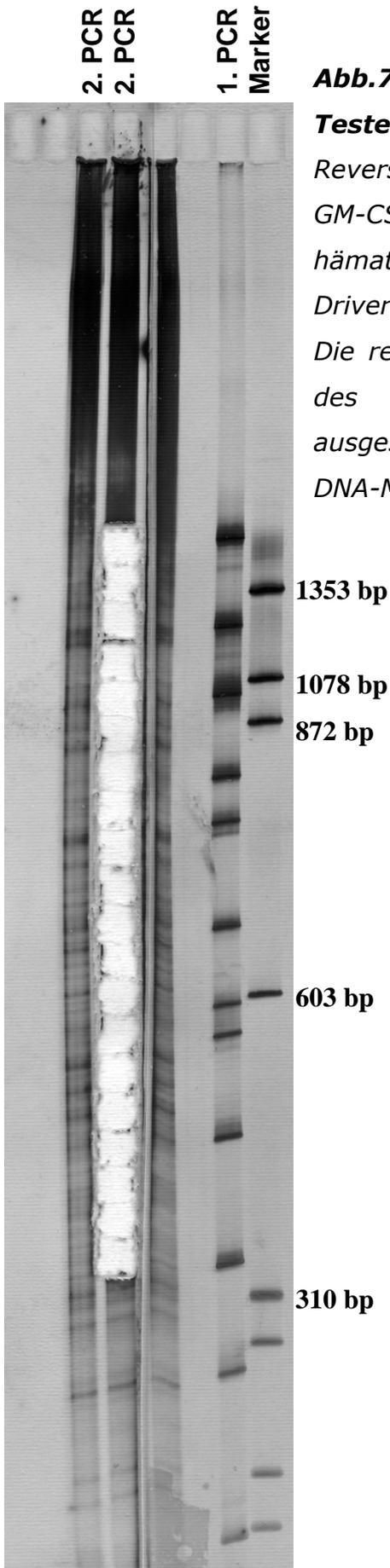


Abb.7: Darstellung der subtrahierten cDNA zwischen Tester und Driver.

Revers-transkribierte und subtrahierte DNA von jeweils mit GM-CSF/TNF- α und mit M-CSF stimulierten hämatopoetischen Stammzellen.

Driver: M-CSF; Tester: GM-CSF/TNF- α

Die resultierenden einzelnen cDNA Fragmente sind mittels des abgebildeten Polyacrylamid-Gels dargestellt und ausgeschnitten worden.

DNA-Marker: HaeIII digest Φ X-174.

Abb.8: Die ausgeschnittenen Banden wurden durch eine Polymerasekettenreaktion reamplifiziert und in einem weiteren Polyacrylamid-Gel besser aufgetrennt.

Driver: M-CSF

Tester: GM-CSF/TNF- α

Marker: 100 bp DNA

Ladder

1200 bp

1000 bp

900 bp

800 bp

700 bp

600 bp

500 bp

400 bp

300 bp

200 bp

100 bp



Folgende Gene konnten identifiziert werden:

Ref.-Seq.	Gen
NM005463.1	Homo sapiens heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like
AL133330.14	SLC1A2 Gen und CD44 Gen
AL021937.1	RFPL3 Gen (ret finger protein-like 3), RFPL3S Gen (ret finger protein-like 3 antisense), BPIL2 Gen
NM001641.1	APEX nuclease
NM000581.1	Glutathione peroxidase 1 (GPX1)
NM016491.1	Hypothetical protein (LOC51253)
Y15155.1	PHOSPHORYLASE KINASE (PHKB)
S42658.1	S3 ribosomal protein
NM002952.1	S2 ribosomal protein (RPS2)
L00016.1	urf4 gene and urf5 Gen
X56998.1	UbA52
AF053069.1	NADH-ubiquinone oxireductase flavoproteine 1 (NDUFV1)
NM002391.1	Midkine (neurite growth-promoting factor 2)
X62691.1	S24 ribosomal protein
AB011149.1	KIAA0577 protein
AK000605.1	KIAA0911 protein
AF275801.1	Unbekannter Clon
AL137000.6	Unbekannter Clon
AC004692.1	Unbekannter Clon
AL357150.7	Unbekannter Clon
AC004080.1	Unbekannter Clon
AL034384.1	Unbekannter Clon
AC003037.1	Unbekannter Clon

Tab.2: Darstellung der identifizierten Gene mit Name der Referenzsequenz (Quelle: U.S.-American National Center for Biotechnology Information).

3.2 Überprüfung der Expression ausgesuchter Gene unter Zellstimulation

Zur Überprüfung der Validität der SSH wurde exemplarisch die Expression der Gene Glutathionperoxidase 1 (GPX 1) und neurite growth-promoting factor 2 (NGPF 2) nach erneuter Stimulation untersucht.

Hierzu wurden in drei unabhängigen Experimenten Stimulationskinetiken an hämatopoetische Stammzellen mit der Zytokinkombination GM-CSF/TNF- α durchgeführt. Die Kinetiken wurden jeweils bei 0, 30, 60, 120 und 240 Minuten gestoppt, um eine zeitabhängige Genexpression zeigen zu können. Nach der RNA-Isolation und nach Konstruktion und Austestung der jeweiligen Primerpaare konnte die Überprüfung der Expression der ausgesuchten Gene mittels RT-PCR durchgeführt werden. In der Tabelle 3 sind die Primerpaare dargestellt. Als Expressionskontrolle wurde dabei das Protein Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet, welches unter der Stimulation konstant exprimiert wird.

Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)		
5'-Primer		
5'	GCCAAAAGGGTCATCATCTC	3'
3'-Primer		
5'	GTAGAGGCAGGGATGATGTTC	3'

Homo sapiens glutathione peroxidase 1 (GPX1)		
5'-Primer		
5'	CTTATCGAGAATGTGGCGTC	3'
3'-Primer		
5'	GGGGTTTTTCATCTATGAGGG	3'

Homo sapiens midkine (neurite growth-promoting factor 2, NGPF 2)		
5'-Primer		
5'	GAAGAAGGCGCGCTACAATG	3'
3'-Primer		
5'	GTGGGGAAGAACAAAAGCGG	3'

Tab. 3: Darstellung der Primer-Sequenzen.

Zur Überprüfung der Validität der SSH (Suppressive Subtraktive Hybridisierung) wurden zwei Gene (GPX 1 und NGPF 2) ausgesucht und für die folgende RT-PCR zur Überprüfung der Genexpression die dargestellten passenden Primer konstruiert. Ebenso dargestellt sind die Primer der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). GAPDH wird in allen Proben identisch exprimiert und kann als Referenz verwendet werden. Somit werden Ergebnisse mit gleichen cDNA-Mengen verglichen.

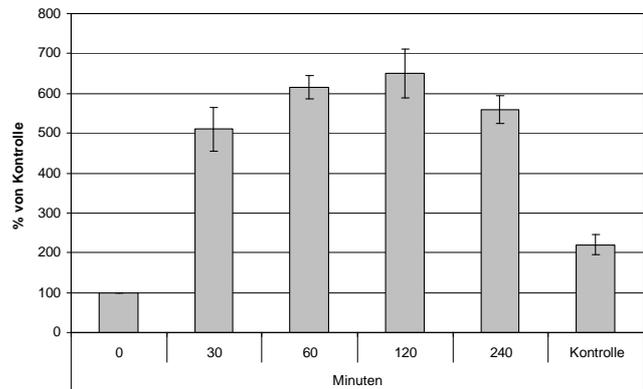
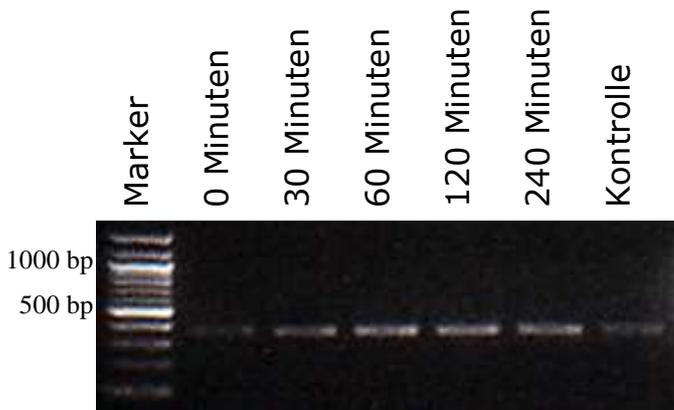
Die PCR wurde mit den unter 2.16 beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Die jeweiligen Amplifikationsprodukte wurden anschließend auf einem ethidiumbromidhaltigen Gel aufgeladen und nach der elektrophoretischen Auftrennung auf UV-Licht fotografiert und dessen Intensität densitometrisch analysiert. Die parallel durchgeführte PCR auf GAPDH diente, wie oben beschrieben, als Kontrolle.

Die Abbildung 9 zeigt die Ergebnisse der RT-PCR von zwei ausgesuchten Genen (NGPF 2 und GPX 1).

Es wird deutlich, dass neurite growth-promoting factor und Glutathionperoxidase die erwartete Überexpression unter Stimulation aufweisen.

Bei beiden Genen lag das Maximum der Expression bei 120 Minuten, aber bereits bei 60 Minuten konnte eine ausgeprägte Überexpression gezeigt werden, was die Validität der SSH, bei der die Stimulationszeit -wie beschrieben- 1 Stunde betrug, bestätigt.

NGPF 2 (a)



GPX 1 (b)

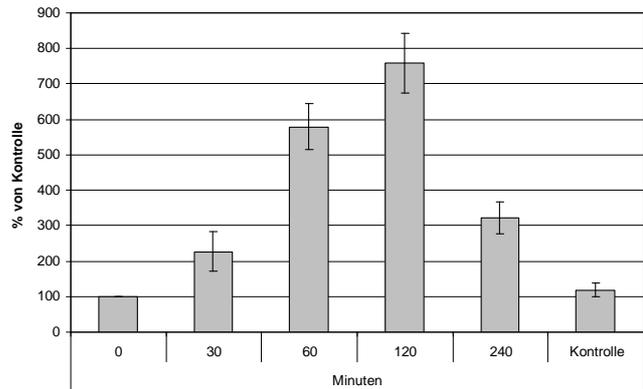
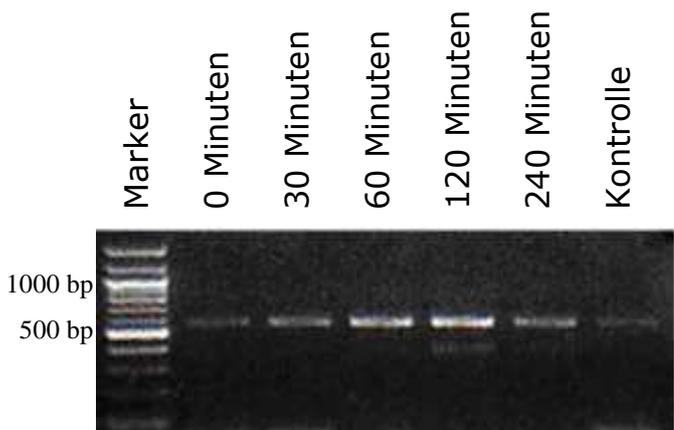


Abb.9: Vermehrte Genexpression der Gene NGPF 2 (a) und GPX 1 (b) unter Stimulation mit GM-CSF und TNF- α .

Links ist jeweils eine repräsentative Gelelektrophorese dargestellt. Marker: 100 bp DNA Ladder.

Rechts ist die densitometrische Auswertung als gemittelttes Ergebnis von 3 unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung dargestellt ($n=3$; $MW \pm SD$). Der 0-Stundenwert wurde gleich 100% gesetzt. Die densitometrische Bestimmung der Expression erfolgte in Relation zu derjenigen des house-keeping-Gens GAPDH, um einen Analysefehler durch wechselnde DNA-Mengen auszuschließen.

4. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, mittels der Suppressiven Subtraktiven Hybridisierung (SSH) diejenigen Gene zu identifizieren, welche unter Stimulation mit GM-CSF und TNF- α in der Entwicklung von hämatopoetischen Stammzellen zu dendritischen Zellen im Vergleich zur Stimulation mit M-CSF vermehrt exprimiert werden. Der Einfluss *in vitro* von GM-CSF und TNF- α auf die Differenzierung von CD34⁺ hämatopoetischer Stammzellen in dendritische Zellen konnte in der Vergangenheit bereits mehrfach gezeigt werden (Caux et al., 1992; Caux et al., 1996; Ferlazzo et al., 2000; Mollah et al., 2003; Syme et al., 2005).

4.1 Darstellung der identifizierten Gene

Es wurden insgesamt 27 Gene identifiziert, für die eine differentielle Genexpression angenommen werden konnte.

Es wurden drei Gene gefunden, die mit dem Zellüberleben in direktem Zusammenhang stehen:

Die **Apurinic/aprimidinic Endonuklease** (APEX) ist ein multifunktionelles Enzym der DNA Reparatur und der Regulation von zellulärer Redoxreaktion. Apurinic/aprimidinic (AP)-Stellen treten häufig in DNS-Molekülen durch spontane Hydrolysen, durch DNS-schädigende Stoffe oder durch DNS-Glycosylasen auf, die bestimmte abnorme Basen beseitigen. AP-Stellen sind prämutagene Läsionen, die die normale DNS-Replikation verhindern können. Das APEX Enzym kann solche AP-Stellen identifizieren und reparieren. Somit scheint es eine wichtige antimutagene Rolle in der DNA-Biogenese zu spielen.

Auch ist es für die normale embryonale Hämatopoese von großer Bedeutung. So war die Entwicklung von Hämangioblasten aus embryonalen Stammzellen mit mittels siRNA herunterregulierter APEX Genexpression um das 2- bis 3-fach reduziert. Dies wurde insbesondere mit der fehlenden Regulation der Redoxreaktion begründet (Akiyama et al., 1995; Ikeda et al., 2002; Ono et al., 1994; Ono et al., 1995; Ono et al., 1995; Raffoul et al., 2004; Sarker et al., 1995; Seki et al., 1991; Zou et al., 2007).

Glutathionperoxidase 1 (GPX1) scheint eine protektive Funktion im Rahmen von zellulärem oxidativem Stress zu haben (Faucher et al., 2003). Als Tripeptid in Erythrozyten (2,5 µmol/ml) schützt es deren Membran vor oxidierenden Substanzen. Dabei wird – katalysiert durch die Glutathionperoxidase – Glutathion-Sulphydryl (GSH) durch H₂O₂ in GSSG (Glutathiondisulfid) oxidiert, woraus durch die Glutathion-reductase mit NADPH als Wasserstoffdonator GSH regeneriert wird. Der Aufbau von GSH erfolgt durch γ-Glutamylcysteinsynthetase und Glutathionsynthetase. Deren Mangel (mit autosomal-rezessivem Erbgang) führt zu einer leichtgradigen hämolytischen Anämie (Paglia und Valentine, 1967).

Phosphorylase-Kinase, ein Enzym, welches Glykogenphosphorylase in Muskel, Leber und anderen Geweben aktiviert, besteht aus vier unterschiedlichen Bausteinen. Der kleine Gammabaustein ist Träger der katalytischen Aktivität. Der Deltabaustein ist Teil der Calmodulin-Gruppe. Es bindet Kalzium und kontrolliert die Reaktion von Phosphorylase-Kinase auf Kalziumionen. Die Alpha- und Betabausteine bilden die größten Einheiten und existieren als vielfache gewebsspezifische Isoformen. Ein Mangel geht mit verschiedensten Erkrankungen einher, wie z.B. die McArdle-Krankheit oder die Hers-Glykogenose (Bashan et al., 1981).

Zwei Gene stehen im Kontext mit transmembranen Transportmechanismen:

Das **SLC1A2-Gen** verschlüsselt eine Untergruppe von Transport Proteinen. Das membrangebundene Eiweiß ist der Haupttransporter für den exzitatorisch wirkenden Neurotransmitter Glutamat aus dem Extrazellularraum der Synapsen im zentralen Nervensystem. Die Glutamat-Clearance ist notwendig für die einwandfreie synaptische Aktivierung und um neuronale Schäden durch übermäßige Aktivierung von Glutamat-Rezeptoren zu verhindern. Veränderungen in Form von verminderter Expression dieser Eiweiße sind mit der amyotrophen Lateralsklerose und der Schizophrenie assoziiert. Allerdings konnten diese Glutamat Transportproteine auch in Drüsengewebe, wie z.B. Tränen- und Speicheldrüsen sowie in perivenösen Hepatozyten und follikulären dendritischen Zellen in Milz und Lymphknoten lokalisiert werden (Berger und Hediger, 2006; Deng et al., 2004).

Das **BPIL-Gen** (bactericidal/permeability-increasing protein-like) ist ein Gen, welches aufgrund der Ähnlichkeit in der Gensequenz wahrscheinlich zur Familie der Lipidtransferproteine gehört. Die biologische Funktion ist weitgehend unbekannt (Mulero et al., 2002).

Vier Gene sind in Zellwachstum und -differenzierung involviert:

CD44 ist ein Zelladhäsionsmolekül der Extrazellulärschicht, und es wird vermutet, dass es eine wichtige Rolle in Tumorwachstum und -verbreitung, der Aktivierung von Lymphozyten und deren Homing in Lymphknoten einnimmt. 1990 konnte nachgewiesen werden, dass CD44 der Hauptoberflächenrezeptor für Hyaluronsäure ist (Aruffo et al., 1990).

Die Stimulation von dendritischen Zellen mit TNF- α führt zu einer Überexpression von CD44-Isoformen (Haegel-Kronenberger et al., 1997).

Außerdem wurde gezeigt, dass die Stimulation von dendritischen Zellen mit Anti-CD44 monoklonalen Antikörpern deren Aggregation induziert. Diese Isoformen scheinen eine wichtige Rolle für die Zellmigration und Funktion von dendritischen Zellen einzunehmen (Weiss et al., 1997).

Interessanterweise geht das Vorliegen von bösartigen Erkrankungen oft mit einem erhöhten Plasmaspiegel von CD44 einher (Cichy et al., 2005).

Im Tiermodell konnte eine effektivere Tumormunität durch eine Vakzination mit dendritischen Zellen in Verbindung mit Anti-CD44-IgG nach Opsonierung mit B16-Melanomzellen gegenüber alleiniger Impfung mit dendritischen Zellen nachgewiesen werden (Pilon-Thomas et al., 2006).

Das **Ret finger Protein** gehört zur Familie der sogenannten B-box zinc finger Gene und reguliert wahrscheinlich das Zellwachstum oder die Zelldifferenzierung. Die genaue biologische Funktion ist bisher jedoch weitgehend unbekannt (Seroussi et al., 1999; Tezel et al., 1999).

Homo sapiens midkine (neurite growth-promoting factor 2) (MDK) ist ein Wachstums- und Differenzierungsfaktor, der bei der Embryogenese und bei Reparaturvorgängen des neuralen Systems vermehrt exprimiert wird. Es besitzt also neurotrophe Eigenschaften und wirkt auf einige Fibroblasten mitogen (Asai et al., 1997; Kaneda et al., 1996; Michikawa et al., 1993).

Die **KIAA0577-** und **KIAA0911-**Proteine konnten erstmalig 1998 aus dem menschlichen Hirn isoliert werden. Obwohl die genaue Funktion noch unbekannt ist, konnten Ähnlichkeiten in der Sequenz zu Genen festgestellt werden, die für Zellkommunikation, -stoffwechsel und -struktur verantwortlich sind (Nagase et al., 1998).

Fünf der klonierten Gene kodieren ribosomale Proteine:

Das Ribosom **S2** des Säugetiers besteht aus ungefähr 80 unterschiedlichen Eiweißen. 1990 konnte ein menschliches Kolon-cDNA isoliert werden, welche das ribosomale Protein S2 (RPS2) verschlüsselt (Slynn et al., 1990). Das RPS2-Eiweiß ist beinahe identisch mit dem Maus-LLRep3-Eiweiß. Dieses RPS2-Gen konnte dem Chromosom 16p13.3 zugeordnet werden (Kenmochi et al., 1998).

Das ribosomale Protein **S3** hat neben der Aufgabe der Protein-Translation unter anderem eine DNA-Reparationsfunktion (Hegde et al., 2004; Hegde et al., 2004; Lee et al., 2006).

S24 ist ein Ribosom, welches in Eukaryonten vorkommt und aus 4 RNA Spezies und mindestens 80 Proteinen besteht. 1990 konnte erstmalig das Gen isoliert werden (Brown et al., 1990). Hierbei konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass das Gen die 40S-Untereinheit verschlüsselt. Als Teil des 80S-Ribosoms ist es Bestandteil der Transkription.

Homo sapiens heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like (HNRPDL) ist ein Housekeeping Gen der mRNA Biogenese und des Metabolismus. Dieses Gen gehört einer Unterfamilie von ubiquitär exprimierten, heterogenen nuclear Ribonukleoproteinen (hnRNPs) an. Die hnRNPs sind RNA-bindende Eiweiße und bilden Komplexe mit heterogener nuklearer RNA (hnRNA). Diese Eiweiße verbinden sich zu Vorstufen der mRNA im Zellkern und scheinen deren Verarbeitung und andere Aspekte des mRNA-Metabolismus und -Transports zu beeinflussen. (Akagi et al., 2000; Kamei et al., 1999; Kawamura et al., 2002). Eine direkte Verbindung zu dendritischen Zellen ist bisher nicht bekannt.

Das **UbA52** ist ein ribosomales Gen, welches wie das UbB- und UbC-Gen eine Untergruppe des Ubiquitin-Gens bildet. Ubiquitin ist ein kleines Eiweiß von 76 Aminosäuren, das ausschließlich in Eukaryonten gefunden wird und eine extreme Kontinuität der Struktur in der Evolution zeigt. Vergleiche von Ubiquitinsequenzen von verschiedenen Spezies, angefangen bei der Hefe bis hin zum Menschen, zeigen, dass 71 der 76 Residuen gleichartig sind. Das menschliche Genom enthält vielfache Ubiquitingene, von denen zahlreiche nichtfunktionelle revers-transkribierte Pseudogene sind. Die transkriptionsfähigen aktiven Gene erzeugen mRNAs von ungefähr 600, 1,000, und 2,500 Nukleotiden (Baker und Board, 1992; Webb et al., 1994).

Drei Gene sind mitochondriale Proteine:

Das **NADH-Ubiquinone Oxireductase Flavoprotein 1** (NDUFV1) ist eine 51-kD Untereinheit des NADH-Ubiquinone Oxidoreductase Komplexes I der mitochondrialen Atmungskette und liegt im Chromosome 11q13 (de Coo et al., 1999). Als Bindungsstelle für NADH nimmt es eine wichtige Rolle ein (Ferlazzo et al., 2000). Ein Mangel dieses Komplexes I ist mit verschiedenen Erkrankungen vergesellschaftet, wie Leukodystrophie, Epilepsie, Ataxie, psychomotorische Retardation oder das Leigh Syndrom (Benit et al., 2001; Laugel et al., 2007; Schuelke et al., 1999).

Das **Urf4- und Urf5-Gen** (oder auch NADH Dehydrogenase subunit 4 genannt) sind 2 von 7 mitochondrialen DNA-codierten Untereinheiten, welche zu den etwa 41 Polypeptiden des sogenannten respiratory complex I (NADH-ubiquinone oxidoreductase) gehören. Dieses respiratory complex I übernimmt Elektronen von NADH, transferiert sie zu Ubiquinon (Coenzym Q10) und nutzt die frei werdende Energie, um Protonen aus der inneren

Membran der Mitochondrien zu pumpen. Urf 4 ist wahrscheinlich ein Teil des hydrophoben Protein Fragments (Ragan, 1990).

Sieben der identifizierten Gene stellten sich als Klone mit noch unbekannter Funktion heraus.

Für einige CD44-Isoformen konnte eine Rolle für die Zellmigration und Funktion von dendritischen Zellen nachgewiesen werden (Weiss et al., 1997). Ein Zusammenhang zwischen den meisten identifizierten Genen und dendritischen Zellen wurde allerdings bisher in der Literatur noch nicht beschrieben.

Ein Grund hierfür könnte in einer zu niedrigen Transkriptionsrate der erwarteten differentiell exprimierten Gene und an einem hohen Anteil an falsch-positiven Genen liegen. Der Anteil an falsch-positiven Ergebnissen ist umso höher, je geringer die Anzahl von differentiell exprimierten mRNA-Sequenzen und je geringer die quantitativen Unterschiede in der Expression zwischen Test- und Vergleichsprobe sind. Es ist bekannt, dass in Abhängigkeit vom Versuchsansatz mehrere hundert Klone analysiert werden müssen, um alle differentiell exprimierten Gene – auch solche mit niedriger Expressionsrate – zu detektieren (Diatchenko et al., 1999; von Stein et al., 1997).

Um die Funktionen der einzelnen, in dieser Arbeit identifizierten Gene und die damit verbundenen Regulierungsmechanismen zu verstehen und ggf. Zusammenhänge zwischen diesen und dendritischen Zellen zu erkennen, sind weitere Untersuchungen erforderlich.

4.2 Nutzen und Bedeutung der Suppressiven Subtraktiven Hybridisierung (SSH) zur Identifizierung von Differenzierungsgenen

In höheren Eukaryonten werden biologische Prozesse wie Zellwachstum und Organentwicklung von Differenzierungsgenen vermittelt. Um molekulare Regulationen dieser Prozesse zu verstehen, müssen differentiell exprimierte Gene identifiziert werden. Die subtraktive cDNA-Hybridisierung erscheint hierfür eine geeignete Methode zu sein.

Diese Methode hat den Vorteil, dass sie durch einen Normalisierungsschritt die Redundanz von Transkripten aufhebt, ohne dass hierbei seltene Transkripte wegfallen. Ein weiterer Vorteil der SSH ist, dass die Methode auch mit geringen Mengen an RNA-Ausgangsmaterial durchführbar ist. Im Gegensatz zu Genexpressionsanalysen mittels DNA-Microarrays besteht in der SSH die Möglichkeit, unbekannte bzw. unerwartete Gene zu identifizieren. Microarrays bieten allerdings den Vorteil die Expression bestimmter Gene schneller analysieren zu können.

Die SSH ist eine einfach durchzuführende Methode und auf viele verschiedene Zellsysteme anwendbar. Zwar können exprimierte Gene identifiziert, aber nicht ihre Expressionsstärke bestimmt werden. Hierzu sind weitere Expressionsanalysen erforderlich. Auch muss eine deutliche, i.e. 5-fache Überexpression vorliegen.

Wie in 4.1 dargestellt konnten 27 Gene mit unterschiedlichsten biologischen Funktionen wie Differenzierung, Zellwachstum, Zellüberleben und der Immunantwort identifiziert werden. Die Validität konnte anhand der Kontrollstimulationen bestätigt werden.

5. Zusammenfassung

Die dendritische Zelle gehört zu den antigenpräsentierenden Zellen und ist der Initiator und Modulator der Immunantwort. Gegenwärtig existieren unterschiedliche Konzepte in Hinblick auf die Therapie von bösartigen Tumoren mit dendritischen Zellen. Voraussetzung für die Erforschung der Grundlagen ist die Anzüchtung von dendritischen Zellen *in vitro* in ausreichender Menge durch Stimulation CD34⁺ hämatopoetischer Stammzellen mit GM-CSF und TNF- α .

Die diesem Differenzierungsschritt zugrunde liegenden Genexpressionsmuster sind allerdings vollständig unbekannt.

Das Ziel der Arbeit lag daher in der Identifizierung von Differenzierungsgenen in der Entwicklung von hämatopoetischen Stammzellen zu dendritischen Zellen. Hierzu wurde eine Suppressive Subtraktive Hybridisierung mit zwei Zellpopulationen durchgeführt. Die eine CD34⁺ Population wurde mit GM-CSF und TNF- α stimuliert und die Zweite mit M-CSF.

Es konnten 27 Gene mit unterschiedlichen biologischen Funktionen wie Regulation der Zelldifferenzierung, -proliferation, -wachstum, -überleben und der Immunantwort identifiziert werden.

Ein Zusammenhang zwischen den meisten dieser Gene und dendritischen Zellen ist bisher in der Literatur noch nicht beschrieben worden. Einzig für einige CD44-Isoformen konnte eine Rolle für die Zellmigration und Funktion von dendritischen Zellen nachgewiesen werden.

Um die Validität der SSH zu bestätigen, wurden weitere Stimulationskinetiken durchgeführt. Von den identifizierten Genen sind exemplarisch zwei ausgesucht (Glutathionperoxidase 1 und Neurite growth-promoting factor 2) und hinsichtlich ihres Expressionsverhaltens untersucht

worden. Mittels RT-PCR konnte die erwartete zeitabhängige Überexpression auf das über 6- bzw. 7-fache nachgewiesen werden.

Zusammenfassend ist die SSH in der Lage, differentiell exprimierte Gene zu identifizieren, aber die Relevanz der in der konkreten Fragestellung gefundenen Differenzierungsgene muss aufgrund fehlender bekannter Assoziationen zu dendritischen Zellen offen bleiben.

Literaturverzeichnis

Akagi T, Kamei D, Tsuchiya N, Nishina Y, Horiguchi H, Matsui M, Kamma H Yamada M. Molecular characterization of a mouse heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like protein JKTBP and its tissue-specific expression. *Gene* 2000; 245: 267-273

Akiyama K, Nagao K, Oshida T, Tsutsui K, Yoshida M C Seki S. Cloning, sequence analysis, and chromosomal assignment of the mouse Apex gene. *Genomics* 1995; 26: 63-69

Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill C B Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 1990; 61: 1303-1313

Asai T, Watanabe K, Ichihara-Tanaka K, Kaneda N, Kojima S, Iguchi A, Inagaki F Muramatsu T. Identification of heparin-binding sites in midkine and their role in neurite-promotion. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 236: 66-70

Ashley D M, Faiola B, Nair S, Hale L P, Bigner D D Gilboa E. Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with tumor extracts or tumor RNA induce antitumor immunity against central nervous system tumors. *J Exp Med* 1997; 186: 1177-1182

Avigan D E, Vasir B, George D J, Oh W K, Atkins M B, McDermott D F, Kantoff P W, Figlin R A, Vasconcelles M J, Xu Y, Kufe D Bukowski R M. Phase I/II study of vaccination with electrofused allogeneic dendritic cells/autologous tumor-derived cells in patients with stage IV renal cell carcinoma. *J Immunother* 2007; 30: 749-761

Baker R T Board P G. The human ubiquitin/52-residue ribosomal protein fusion gene subfamily (UbA52) is composed primarily of processed pseudogenes. *Genomics* 1992; 14: 520-522

Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu Y J, Pulendran B Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 767-811

Banchereau J, Palucka A K, Dhodapkar M, Burkeholder S, Taquet N, Rolland A, Taquet S, Coquery S, Wittkowski K M, Bhardwaj N, Pineiro L, Steinman R Fay J. Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res* 2001; 61: 6451-6458

Banchereau J Steinman R M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-252

Barbaroux J B, Kwan W H, Allam J P, Novak N, Bieber T, Fridman W H, Groves R Mueller C G. Tumor necrosis factor-alpha- and IL-4-independent development of Langerhans cell-like dendritic cells from M-CSF-conditioned precursors. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 114-120

Bashan N, Iancu T C, Lerner A, Fraser D, Potashnik R Moses S W. Glycogenosis due to liver and muscle phosphorylase kinase deficiency. *Pediatr Res* 1981; 15: 299-303

Benit P, Chretien D, Kadhom N, de Lonlay-Debeney P, Cormier-Daire V, Cabral A, Peudenier S, Rustin P, Munnich A Rotig A. Large-scale deletion and point mutations of the nuclear NDUFV1 and NDUFS1 genes in mitochondrial complex I deficiency. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 1344-1352

Berger U V Hediger M A. Distribution of the glutamate transporters GLT-1 (SLC1A2) and GLAST (SLC1A3) in peripheral organs. *Anat Embryol (Berl)* 2006; 211: 595-606

Boczkowski D, Nair S K, Snyder D Gilboa E. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J Exp Med* 1996; 184: 465-472

Brown S J, Jewell A, Maki C G Roufa D J. A cDNA encoding human ribosomal protein S24. *Gene* 1990; 91: 293-296

Burch P A, Breen J K, Buckner J C, Gastineau D A, Kaur J A, Laus R L, Padley D J, Peshwa M V, Pitot H C, Richardson R L, Smits B J, Sopapan P, Strang G, Valone F H Vuk-Pavlovic S. Priming tissue-specific cellular immunity in a phase I trial of autologous dendritic cells for prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2175-2182

Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D Banchereau J. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 1992; 360: 258-261

Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Dezutter-Dambuyant C, de Saint-Vis B, Jacquet C, Yoneda K, Imamura S, Schmitt D Banchereau J. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J Exp Med* 1996; 184: 695-706

Cella M, Sallusto F Lanzavecchia A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 1997; 9: 10-16

Cichy J, Kulig P, Pure E. Regulation of the release and function of tumor cell-derived soluble CD44. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1745: 59-64

Civin C I, Strauss L C, Fackler M J, Trischmann T M, Wiley J M, Loken M R. Positive stem cell selection--basic science. *Prog Clin Biol Res* 1990; 333: 387-401; discussion 402

Curti A, Tosi P, Comoli P, Terragna C, Ferri E, Cellini C, Massaia M, D'Addio A, Giudice V, Di Bello C, Cavo M, Conte R, Gugliotta G, Baccarani M, Lemoli R M. Phase I/II clinical trial of sequential subcutaneous and intravenous delivery of dendritic cell vaccination for refractory multiple myeloma using patient-specific tumour idiotype protein or idiotype (VDJ)-derived class I-restricted peptides. *Br J Haematol* 2007; 139: 415-424

Dalmau S R, Freitas C S. [Hematopoiesis: I. Cytokines involved in its regulation]. *AMB Rev Assoc Med Bras* 1991; 37: 99-106

de Coo R F, Buddiger P A, Smeets H J, van Oost B A. The structure of the human NDUFV1 gene encoding the 51-kDa subunit of mitochondrial complex I. *Mamm Genome* 1999; 10: 49-53

De Vleeschouwer S, Fieuws S, Rutkowski S, Van Calenbergh F, Van Loon J, Goffin J, Sciot R, Wilms G, Demaerel P, Warmuth-Metz M, Soerensen N, Wolff J E, Wagner S, Kaempgen E, Van Gool S W. Postoperative adjuvant dendritic cell-based immunotherapy in patients with relapsed glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 3098-3104

Deng X, Shibata H, Ninomiya H, Tashiro N, Iwata N, Ozaki N, Fukumaki Y. Association study of polymorphisms in the excitatory amino acid transporter 2 gene (SLC1A2) with schizophrenia. *BMC Psychiatry* 2004; 4: 21

Diatchenko L, Lau Y F, Campbell A P, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov E D, Siebert P D. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 6025-6030

Diatchenko L, Lukyanov S, Lau Y F, Siebert P D. Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol* 1999; 303: 349-380

Faucher K, Rabinovitch-Chable H, Barriere G, Cook-Moreau J, Rigaud M. Overexpression of cytosolic glutathione peroxidase (GPX1) delays endothelial cell growth and increases resistance to toxic challenges. *Biochimie* 2003; 85: 611-617

Ferlazzo G, Klein J, Paliard X, Wei W Z, Galy A. Dendritic cells generated from CD34+ progenitor cells with flt3 ligand, c-kit ligand, GM-CSF, IL-4, and TNF-alpha are functional antigen-presenting cells resembling mature monocyte-derived dendritic cells. *J Immunother* 2000; 23: 48-58

Ferlazzo G, Tsang M L, Moretta L, Melioli G, Steinman R M, Munz C. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med* 2002; 195: 343-351

Flamand V, Sornasse T, Thielemans K, Demanet C, Bakkus M, Bazin H, Thielemans F, Leo O, Urbain J, Moser M. Murine dendritic cells pulsed in vitro

with tumor antigen induce tumor resistance in vivo. *Eur J Immunol* 1994; 24: 605-610

Gallucci S, Lolkema M Matzinger P. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med* 1999; 5: 1249-1255

Gilboa E. How tumors escape immune destruction and what we can do about it. *Cancer Immunol Immunother* 1999; 48: 382-385

Gilboa E Vieweg J. Cancer immunotherapy with mRNA-transfected dendritic cells. *Immunol Rev* 2004; 199: 251-263

Haegel-Kronenberger H, de la Salle H, Bohbot A, Galon J, Tartour E, Cazenave J P Hanau D. Regulation of CD44 isoform expression and CD44-mediated signaling in human dendritic cells. *Adv Exp Med Biol* 1997; 417: 83-90

Hegde V, Wang M Deutsch W A. Characterization of human ribosomal protein S3 binding to 7,8-dihydro-8-oxoguanine and abasic sites by surface plasmon resonance. *DNA Repair (Amst)* 2004; 3: 121-126

Hegde V, Wang M Deutsch W A. Human ribosomal protein S3 interacts with DNA base excision repair proteins hAPE/Ref-1 and hOGG1. *Biochemistry* 2004; 43: 14211-14217

Hernando J J, Park T W, Kubler K, Offergeld R, Schlebusch H Bauknecht T. Vaccination with autologous tumour antigen-pulsed dendritic cells in advanced gynaecological malignancies: clinical and immunological evaluation of a phase I trial. *Cancer Immunol Immunother* 2002; 51: 45-52

Hersey P, Halliday G M, Farrelly M L, Desilva C, Lett M Menzies S W. Phase I/II study of treatment with matured dendritic cells with or without low dose IL-2 in patients with disseminated melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 2007;

Hsu F J, Benike C, Fagnoni F, Liles T M, Czerwinski D, Taidi B, Engleman E G Levy R. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1996; 2: 52-58

Ikeda S, Ayabe H, Mori K, Seki Y Seki S. Identification of the functional elements in the bidirectional promoter of the mouse O-sialoglycoprotein endopeptidase and APEX nuclease genes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296: 785-791

Iking-Konert C, Wagner C, Deneffle B, Hug F, Schneider M, Andrassy K Hansch G M. Up-regulation of the dendritic cell marker CD83 on polymorphonuclear neutrophils (PMN): divergent expression in acute bacterial infections and chronic inflammatory disease. *Clin Exp Immunol* 2002; 130: 501-508

Kamei D, Tsuchiya N, Yamazaki M, Meguro H Yamada M. Two forms of expression and genomic structure of the human heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like JKTBP gene (HNRPDL). *Gene* 1999; 228: 13-22

Kaneda N, Talukder A H, Ishihara M, Hara S, Yoshida K Muramatsu T. Structural characteristics of heparin-line domain required for interaction of midkine with embryonic neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 220: 108-112

Kawamura H, Tomozoe Y, Akagi T, Kamei D, Ochiai M Yamada M. Identification of the nucleocytoplasmic shuttling sequence of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like protein JKTBP and its interaction with mRNA. *J Biol Chem* 2002; 277: 2732-2739

Kawasaki E S, Ladner M B, Wang A M, Van Arsdell J, Warren M K, Coyne M Y, Schweickart V L, Lee M T, Wilson K J, Boosman A et al. Molecular cloning of a complementary DNA encoding human macrophage-specific colony-stimulating factor (CSF-1). *Science* 1985; 230: 291-296

Kenmochi N, Kawaguchi T, Rozen S, Davis E, Goodman N, Hudson T J, Tanaka T Page D C. A map of 75 human ribosomal protein genes. *Genome Res* 1998; 8: 509-523

Kim J H, Lee Y, Bae Y S, Kim W S, Kim K, Im H Y, Kang W K, Park K, Choi H Y, Lee H M, Baek S Y, Lee H, Doh H, Kim B M, Kim C Y, Jeon C Jung C W. Phase I/II study of immunotherapy using autologous tumor lysate-pulsed dendritic cells in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Clin Immunol* 2007; 125: 257-267

Koubek K, Skopovy P, Vitek A Jirasek A. [Interactions of cytokines with their receptors in the regulation of hematopoiesis, clinical and diagnostic applications]. *Sb Lek* 1998; 99: 33-51

Laugel V, This-Bernd V, Cormier-Daire V, Speeg-Schatz C, de Saint-Martin A Fischbach M. Early-onset ophthalmoplegia in Leigh-like syndrome due to NDUFV1 mutations. *Pediatr Neurol* 2007; 36: 54-57

Lee C H, Lee K Y, Choe K H, Hong Y C, Noh S I, Eom S Y, Ko Y J, Zhang Y W, Yim D H, Kang J W, Kim H Kim Y D. [Effects of oxidative DNA damage and

genetic polymorphism of the glutathione peroxidase 1 (GPX1) and 8-oxoguanine glycosylase 1 (hOGG1) on lung cancer]. *J Prev Med Pub Health* 2006; 39: 130-134

Loudovaris M, Hansen M, Suen Y, Lee S M, Casing P Bender J G. Differential effects of autologous serum on CD34(+) or monocyte-derived dendritic cells. *J Hematother Stem Cell Res* 2001; 10: 569-578

Löffler, H., Rastetter, J., Haferlach, T. Atlas der klinischen Hämatologie. Heidelberg: Springer-Verlag, 2004.

Mannoni P. [Cytokines and hematopoiesis]. *Rev Prat* 1993; 43: 553-558

Marusic-Galesic S, Stephany D A, Longo D L Kruisbeek A M. Development of CD4-CD8+ cytotoxic T cells requires interactions with class I MHC determinants. *Nature* 1988; 333: 180-183

Mayordomo J I, Zorina T, Storkus W J, Zitvogel L, Garcia-Prats M D, DeLeo A B Lotze M T. Bone marrow-derived dendritic cells serve as potent adjuvants for peptide-based antitumor vaccines. *Stem Cells* 1997; 15: 94-103

Michikawa M, Kikuchi S, Muramatsu H, Muramatsu T Kim S U. Retinoic acid responsive gene product, midkine, has neurotrophic functions for mouse spinal cord and dorsal root ganglion neurons in culture. *J Neurosci Res* 1993; 35: 530-539

Mollah Z U, Aiba S, Manome H, Yoshino Y Tagami H. Cord blood CD34+ cells differentiate into dermal dendritic cells in co-culture with cutaneous fibroblasts or stromal cells. *J Invest Dermatol* 2002; 118: 450-460

Mollah Z U, Aiba S, Nakagawa S, Hara M, Manome H, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y Tagami H. Macrophage colony-stimulating factor in cooperation with transforming growth factor-beta1 induces the differentiation of CD34+ hematopoietic progenitor cells into Langerhans cells under serum-free conditions without granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Invest Dermatol* 2003; 120: 256-265

Mollah Z U, Aiba S, Nakagawa S, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y Tagami H. Interleukin-3 in cooperation with transforming growth factor beta induces granulocyte macrophage colony stimulating factor independent differentiation of human CD34+ hematopoietic progenitor cells into dendritic cells with features of Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 2003; 121: 1397-1401

Mukherji B, Chakraborty N G, Yamasaki S, Okino T, Yamase H, Sporn J R, Kurtzman S K, Ergin M T, Ozols J, Meehan J et al. Induction of antigen-specific cytolytic T cells in situ in human melanoma by immunization with synthetic peptide-pulsed autologous antigen presenting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 8078-8082

Mulero J J, Boyle B J, Bradley S, Bright J M, Nelken S T, Ho T T, Mize N K, Childs J D, Ballinger D G, Ford J E Rupp F. Three new human members of the lipid transfer/lipopolysaccharide binding protein family (LT/LBP). *Immunogenetics* 2002; 54: 293-300

Murphy G P, Tjoa B A, Simmons S J, Jarisch J, Bowes V A, Ragde H, Rogers M, Elgamal A, Kenny G M, Cobb O E, Ireton R C, Troychak M J, Salgaller M L Boynton A L. Infusion of dendritic cells pulsed with HLA-A2-specific prostate-specific membrane antigen peptides: a phase II prostate cancer vaccine trial involving patients with hormone-refractory metastatic disease. *Prostate* 1999; 38: 73-78

Nagase T, Ishikawa K, Miyajima N, Tanaka A, Kotani H, Nomura N Ohara O. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. IX. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which can code for large proteins in vitro. DNA Res 1998; 5: 31-39

Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. Blood 1993; 81: 2844-2853

Ono Y, Furuta T, Ohmoto T, Akiyama K Seki S. Stable expression in rat glioma cells of sense and antisense nucleic acids to a human multifunctional DNA repair enzyme, APEX nuclease. Mutat Res 1994; 315: 55-63

Ono Y, Matsumoto K, Furuta T, Ohmoto T, Akiyama K Seki S. Relationship between expression of a major apurinic/apyrimidinic endonuclease (APEX nuclease) and susceptibility to genotoxic agents in human glioma cell lines. J Neurooncol 1995; 25: 183-192

Ono Y, Watanabe M, Inoue Y, Ohmoto T, Akiyama K, Tsutsui K Seki S. Developmental expression of APEX nuclease, a multifunctional DNA repair enzyme, in mouse brains. Brain Res Dev Brain Res 1995; 86: 1-6

Ossevoort M A, Feltkamp M C, van Veen K J, Melief C J Kast W M. Dendritic cells as carriers for a cytotoxic T-lymphocyte epitope-based peptide vaccine in protection against a human papillomavirus type 16-induced tumor. J Immunother Emphasis Tumor Immunol 1995; 18: 86-94

Paglia D E Valentine W N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med 1967; 70: 158-169

Paglia P, Chiodoni C, Rodolfo M Colombo M P. Murine dendritic cells loaded in vitro with soluble protein prime cytotoxic T lymphocytes against tumor antigen in vivo. *J Exp Med* 1996; 183: 317-322

Pennica D, Nedwin G E, Hayflick J S, Seeburg P H, Derynck R, Palladino M A, Kohr W J, Aggarwal B B Goeddel D V. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 1984; 312: 724-729

Pilon-Thomas S, Verhaegen M, Kuhn L, Riker A Mule J J. Induction of anti-tumor immunity by vaccination with dendritic cells pulsed with anti-CD44 IgG opsonized tumor cells. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55: 1238-1246

Prechtel A T, Turza N M, Theodoridis A A Steinkasserer A. CD83 knockdown in monocyte-derived dendritic cells by small interfering RNA leads to a diminished T cell stimulation. *J Immunol* 2007; 178: 5454-5464

Raffoul J J, Cabelof D C, Nakamura J, Meira L B, Friedberg E C Heydari A R. Apurinic/apyrimidinic endonuclease (APE/REF-1) haploinsufficient mice display tissue-specific differences in DNA polymerase beta-dependent base excision repair. *J Biol Chem* 2004; 279: 18425-18433

Ragan C I. Structure and function of an archetypal respiratory chain complex: NADH-ubiquinone reductase. *Biochem Soc Trans* 1990; 18: 515-516

Rahman M M McFadden G. Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens. *PLoS Pathog* 2006; 2: e4

Ralph P Sampson-Johannes A. Macrophage growth and stimulating factor, M-CSF. *Prog Clin Biol Res* 1990; 338: 43-63

Rebrikov D, Desai S, Kogan Y N, Thornton A M Diatchenko L. Subtractive cloning: new genes for studying inflammatory disorders. *Ann Periodontol* 2002; 7: 17-28

Reeves M E, Royal R E, Lam J S, Rosenberg S A Hwu P. Retroviral transduction of human dendritic cells with a tumor-associated antigen gene. *Cancer Res* 1996; 56: 5672-5677

Roddie H, Klammer M, Thomas C, Thomson R, Atkinson A, Sproul A, Waterfall M, Samuel K, Yin J, Johnson P Turner M. Phase I/II study of vaccination with dendritic-like leukaemia cells for the immunotherapy of acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2006; 133: 152-157

Sarker A H, Watanabe S, Seki S, Akiyama T Okada S. Oxygen radical-induced single-strand DNA breaks and repair of the damage in a cell-free system. *Mutat Res* 1995; 337: 85-95

Schott M, Seissler J, Lettmann M, Fouxon V, Scherbaum W A Feldkamp J. Immunotherapy for medullary thyroid carcinoma by dendritic cell vaccination. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4965-4969

Schuelke M, Smeitink J, Mariman E, Loeffen J, Plecko B, Trijbels F, Stockler-Ipsiroglu S van den Heuvel L. Mutant NDUFV1 subunit of mitochondrial complex I causes leukodystrophy and myoclonic epilepsy. *Nat Genet* 1999; 21: 260-261

Schuler G Steinman R M. Dendritic cells as adjuvants for immune-mediated resistance to tumors. *J Exp Med* 1997; 186: 1183-1187

Seki S, Ikeda S, Watanabe S, Hatsushika M, Tsutsui K, Akiyama K Zhang B. A mouse DNA repair enzyme (APEX nuclease) having exonuclease and apurinic/aprimidinic endonuclease activities: purification and characterization. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1079: 57-64

Seroussi E, Kedra D, Pan H Q, Peyrard M, Schwartz C, Scambler P, Donnai D, Roe B A Dumanski J P. Duplications on human chromosome 22 reveal a novel Ret Finger Protein-like gene family with sense and endogenous antisense transcripts. *Genome Res* 1999; 9: 803-814

Shirai T, Yamaguchi H, Ito H, Todd C W Wallace R B. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for human tumour necrosis factor. *Nature* 1985; 313: 803-806

Shortman K Caux C. Dendritic cell development: multiple pathways to nature's adjuvants. *Stem Cells* 1997; 15: 409-419

Slynn G, Jenner D, Potts W, Elvin P, Morten J E Markham A F. Human cDNA sequence homologous to the mouse LLRep3 gene family. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 681

Song W, Kong H L, Carpenter H, Torii H, Granstein R, Rafii S, Moore M A Crystal R G. Dendritic cells genetically modified with an adenovirus vector encoding the cDNA for a model antigen induce protective and therapeutic antitumor immunity. *J Exp Med* 1997; 186: 1247-1256

Specht J M, Wang G, Do M T, Lam J S, Royal R E, Reeves M E, Rosenberg S A Hwu P. Dendritic cells retrovirally transduced with a model antigen gene are therapeutically effective against established pulmonary metastases. *J Exp Med* 1997; 186: 1213-1221

Srour E F, Brandt J E, Briddell R A, Leemhuis T, van Besien K Hoffman R. Human CD34+ HLA-DR- bone marrow cells contain progenitor cells capable of self-renewal, multilineage differentiation, and long-term in vitro hematopoiesis. *Blood Cells* 1991; 17: 287-295

Steinman R M. The control of immunity and tolerance by dendritic cell. *Pathol Biol (Paris)* 2003; 51: 59-60

Steinman R M Cohn Z A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1973; 137: 1142-1162

Syme R, Bajwa R, Robertson L, Stewart D Gluck S. *Stem Cells* 2005; 23: 74-81

Tezel G, Nagasaka T, Iwahashi N, Asai N, Iwashita T, Sakata K Takahashi M. Different nuclear/cytoplasmic distributions of RET finger protein in different cell types. *Pathol Int* 1999; 49: 881-886

Tuting T, Storkus W J Lotze M T. Gene-based strategies for the immunotherapy of cancer. *J Mol Med* 1997; 75: 478-491

Vadhan-Raj S, Buescher S, Broxmeyer H E, LeMaistre A, Lepe-Zuniga J L, Ventura G, Jeha S, Horwitz L J, Trujillo J M, Gillis S et al. Stimulation of myelopoiesis in patients with aplastic anemia by recombinant human

granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *N Engl J Med* 1988; 319: 1628-1634

von Stein O D, Thies W G Hofmann M. A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 2598-2602

Wang A M, Doyle M V Mark D F. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 9717-9721

Webb G C, Baker R T, Coggan M Board P G. Localization of the human UBA52 ubiquitin fusion gene to chromosome band 19p13.1-p12. *Genomics* 1994; 19: 567-569

Weiss J M, Sleeman J, Renkl A C, Dittmar H, Termeer C C, Taxis S, Howells N, Hofmann M, Kohler G, Schopf E, Ponta H, Herrlich P Simon J C. An essential role for CD44 variant isoforms in epidermal Langerhans cell and blood dendritic cell function. *J Cell Biol* 1997; 137: 1137-1147

Wickenhauser C Thiele J. [Cytokines and hematopoiesis]. *Pathologe* 1995; 16: 181-191

Wilson N S, El-Sukkari D, Belz G T, Smith C M, Steptoe R J, Heath W R, Shortman K Villadangos J A. Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature. *Blood* 2003; 102: 2187-2194

Zitvogel L, Mayordomo J I, Tjandrawan T, DeLeo A B, Clarke M R, Lotze M T Storkus W J. Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells: dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper cell 1-associated cytokines. *J Exp Med* 1996; 183: 87-97

Zou G M, Luo M H, Reed A, Kelley M R Yoder M C. Ape1 regulates hematopoietic differentiation of embryonic stem cells through its redox functional domain. *Blood* 2007; 109: 1917-1922

Danksagung:

Herrn Professor Vetter für die Möglichkeit der Promotion an seiner Klinik.

Herrn Professor Ko für die Betreuung und die Nutzung seiner Laboratorien.

Herrn PD Dr. Neuhaus für die sehr gute Betreuung sowie dem gesamten Laborpersonal.

Mein größter Dank gilt meiner Frau Steffi, die meiner Arbeit viel Verständnis und Geduld entgegenbrachte und ohne deren Unterstützung die Umsetzung meiner Promotion nicht möglich gewesen wäre.