

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Heinrich-Pette-Institut  
Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie  
Wissenschaftlicher Direktor: Prof. Dr. Thomas Dobner

## **Der Einfluss der Transkriptionsfaktoren Mef2c und Mef2d auf die Hämatopoese**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Friderike Schlenker (geb. Hauschildt)  
aus Kiel

Hamburg 2017

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 13.12.2018

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Boris Fehse

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Walter Fiedler

Die vorliegende Doktorarbeit entstand von Oktober 2014 bis April 2016 in der Forschungsgruppe Retrovirale Pathogenese am Heinrich-Pette-Institut - Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie unter der Leitung von Carol Stocking, Ph.D.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Funktionen und Bestandteile des Blutes .....	1
1.2 Die Hämatopoese .....	4
1.3 Die B-Zell-Differenzierung .....	7
1.3.1 Transkriptionsfaktoren in der B-Zell-Differenzierung .....	8
1.4 MEF2-Transkriptionsfaktoren .....	10
1.5 Die Expression von Mef2-Proteinen in der Hämatopoese .....	11
1.6 MEF2-Proteine bei der Entstehung akuter Leukämien .....	13
1.7 Die Funktion der Mef2-Proteine in der Hämatopoese .....	15
1.8 Dendritische Zellen .....	17
1.8.1 Charakterisierung dendritischer Zellen .....	18
1.8.2 Subtypen dendritischer Zellen und ihre Funktion .....	19
1.8.2.1 Klassische dendritische Zellen (cDCs) .....	19
1.8.2.2 Plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs) .....	20
1.8.2.3 Dendritische Zellen der monozytären Linie .....	20
1.8.2.4 Langerhans-Zellen (LC) .....	21
1.8.3 Differenzierung der dendritischen Linie .....	21
1.8.4 Transkriptionsfaktoren in der Differenzierung der pDCs .....	23
1.8.4.1 E2-2 ( <i>Tcf4</i> ) .....	23
1.8.4.2 Spi-B .....	24
1.8.4.3 Irf7 und Irf8 .....	25
1.8.4.4 Runx2 .....	25
1.8.4.5 Bcl11a .....	26
<b>2 Fragestellung</b> .....	<b>27</b>
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>28</b>
3.1 Material .....	28
3.1.1 Geräte .....	28
3.1.1.1 Software .....	28
3.1.2 Kits .....	29
3.1.3 Reagenzien und Lösungen für die Zellkultur .....	29
3.1.4 Lösungen für die Mausversuche .....	29
3.1.5 Medien und Puffer für die Zellkultur .....	29
3.1.6 Zytokine .....	29
3.1.7 Reagenzien für DNA-analytische Methoden .....	30
3.1.8 Enzyme und Reagenzien für cDNA-Synthese und Realtime-PCR .....	30

3.1.9	Antikörper .....	30
3.1.10	Mausstämme .....	31
3.1.10.1	<i>Mef2c<sup>fl/fl</sup>Mef2d<sup>-/-</sup>-VavCre</i> .....	31
3.1.10.2	<i>Mef2c<sup>fl/fl</sup>Mef2d<sup>-/-</sup>-Cd79a<sup>hCre/+</sup></i> .....	32
3.1.11	Zellen.....	32
3.2	Methoden.....	33
3.2.1	Tier-experimentelle Methoden.....	33
3.2.1.1	Isolierung muriner Knochenmarkzellen .....	33
3.2.1.2	Anreicherung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen .....	33
3.2.2	Zellbiologische Methoden.....	33
3.2.2.1	In vitro Differenzierung dendritischer Zellen .....	33
3.2.2.2	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) .....	34
3.2.2.3	Durchflusszytometrische Sortierung.....	35
3.2.3	Nukleinsäure-analytische Methoden .....	35
3.2.3.1	RNA-Isolierung .....	35
3.2.3.2	Reverse Transkription (cDNA-Synthese) .....	36
3.2.3.3	Quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR) .....	36
3.2.3.4	Agarose-Elektrophorese.....	37
3.2.3.5	RNA- <i>Sequencing</i> .....	37
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>38</b>
4.1	Der Differenzierungsblock der B-Zell-Entwicklung in <i>Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-VavCre</i> -Mäusen... 38	
4.2	Charakterisierung des Differenzierungsblocks im <i>Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-VavCre</i> -Mausmodell. 40	
4.2.1	Der <i>Mef2c/d</i> -Knockout führt zu einer Anreicherung Vcam-negativer Zellen .....	40
4.2.2	Identifizierung von B-Zell-spezifischen Zielgenen von <i>Mef2c</i> und <i>Mef2d</i> .....	43
4.3	Der Einfluss von <i>Mef2c</i> und <i>Mef2d</i> auf weitere lymphatische Linien .....	45
4.3.1	Reife T-Lymphozyten werden durch <i>Mef2c</i> und <i>Mef2d</i> kaum beeinträchtigt .....	45
4.3.2	Ein Knockout von <i>Mef2c</i> und <i>Mef2d</i> beeinflusst die Anzahl reifer NK-Zellen nicht.. 47	
4.4	Welchen Einfluss hat der <i>Mef2c/d</i> -Knockout auf die myeloische Differenzierung? .48	
4.4.1	Der <i>Mef2c/d</i> -Knockout führt zur Anreicherung myeloischer Progenitoren .....	48
4.4.2	Monozyten und Granulozyten reichern sich im <i>Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup></i> -Mausmodell an .....	50
4.5	Beeinflussen <i>Mef2c</i> und <i>Mef2d</i> auch die dendritische Differenzierung? .....	51
4.5.1	Durchflusszytometrische Charakterisierung dendritischer Zellen und ihrer Progenitoren .....	51
4.5.1.1	Die dendritische Differenzierung in <i>Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-VavCre</i> -Mäusen ist stark beeinträchtigt.....	53
4.5.1.2	In vitro Kultivierung dendritischer Zellen ( <i>Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-VavCre</i> -Mausmodell).....	55
4.5.1.3	<i>Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-Cd79aCre</i> -Mäuse haben eine normale dendritische Differenzierung.....	56

---

4.5.1.4	In vitro Kultivierung dendritischer Zellen ( <i>Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup></i> -Cd79aCre-Mausmodell) .....	57
4.5.2	Identifizierung potentieller Zielgene von <i>Mef2c</i> und <i>Mef2d</i> für die pDC-Differenzierung .....	59
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>61</b>
5.1	Der <i>Mef2c/d</i> -Knockout führt nicht nur zu einem Differenzierungsblock der B-Zell-Linie .....	61
5.2	Der Differenzierungsblock im <i>Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup></i> -VavCre-Mausmodell .....	63
5.3	<i>Mef2c</i> und <i>Mef2d</i> als Regulatoren der lymphatischen Differenzierung .....	64
5.3.1	Die zweizeitige Regulation der B-Zell-Entwicklung durch <i>Mef2c</i> und <i>Mef2d</i> .....	64
5.3.2	<i>Pax5</i> und <i>Ebf1</i> sind potentielle Zielgene von <i>Mef2c</i> und <i>Mef2d</i> .....	65
5.3.3	T-Lymphozyten und NK-Zellen im <i>Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup></i> -VavCre-Mausmodell.....	66
5.4	Die Anreicherung myeloischer Populationen im <i>Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup></i> -VavCre-Mausmodell ...	66
5.5	<i>Mef2c</i> und <i>Mef2d</i> sind Regulatoren der dendritischen Differenzierung.....	68
5.5.1	pDCs entstammen nicht nur der myeloischen Linie .....	69
5.5.1.1	Mögliche weitere Progenitoren der pDCs.....	71
5.5.1.2	Die verschiedenen Differenzierungswege dendritischer Zellen.....	72
5.5.2	Regulatorisches Netzwerk der dendritischen Differenzierung.....	73
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>76</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b> .....	<b>79</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>81</b>
<b>9</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>84</b>
<b>10</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>98</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>100</b>
<b>12</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung</b> .....	<b>101</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Funktionen und Bestandteile des Blutes

Jede Zelle des menschlichen Körpers ist über das Herz-Kreislauf-System an die Blutversorgung angeschlossen. Das Blut ist ein spezialisiertes Gewebe, das Nährstoffe und Sauerstoff zu den Zellen transportiert und metabolische Abbauprodukte sowie Kohlendioxid wieder entfernt. Der Gasaustausch findet an der Alveolarmembran in der Lunge statt. Kohlenstoffdioxid wird über die Alveolen abgeatmet und Sauerstoff in das Blut übertragen. Angetrieben durch die regelmäßige Kontraktion des Herzens gelangt das oxygenierte Blut in die gesamte Peripherie. Weitere wichtige Funktionen übernimmt das Blut unter anderem in der Immunabwehr, der Blutgerinnung und der Wärmeregulation.

Das Gesamtvolumen des Blutes eines Menschen beträgt etwa fünf bis sechs Liter. Durch Zentrifugation des Blutes entsteht das Blutplasma, ein wässriger Überstand, der Plasmaproteine, Glucose, Elektrolyte, Hormone und weitere Stoffwechselmetabolite enthält. Der zelluläre Volumenanteil des Vollblutes wird Hämatokrit genannt. Den weitaus größten Anteil haben hieran die roten Blutkörperchen, die Erythrozyten. Zusammen mit den weißen Blutzellen, den Leukozyten, und den Blutplättchen, den Thrombozyten, liegt der Hämatokrit insgesamt bei ca. 45 % des Blutvolumens (Müller-Newen & Petrides 2014).

Im Blut befinden sich ca. vier bis sechs Millionen Erythrozyten pro Mikroliter ( $\mu\text{l}$ ). Ihre Hauptaufgabe ist der Sauerstofftransport von der Lunge in die verschiedenen Gewebe des Körpers. Dieser wird durch einen hohen Anteil an Hämoglobin in den Erythrozyten gewährleistet. Das Hämoglobin-Molekül besteht aus vier Globin-Ketten mit jeweils einem Eisen-haltigen Häm-Komplex. Über die Eisen-Ionen können pro Hämoglobin-Molekül insgesamt vier Sauerstoffmoleküle gebunden werden. Erythrozyten besitzen weder Zellkern noch Organellen und sind aufgrund ihres speziellen Zytoskeletts leicht verformbar. Dies ermöglicht es den Erythrozyten, auch sehr enge Kapillaren zu passieren, wodurch jede Zelle ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden kann (Schechter 2008, Viallat & Abkarian 2014).

Thrombozyten bilden mit 150.000 bis 450.000 Zellen pro  $\mu\text{l}$  den zweitgrößten zellulären Bestandteil des Blutes. Sie sind kernlose Zytoplasmafragmente, die durch Abschnürung von Zellfortsätzen der Megakaryozyten im Knochenmark gebildet werden. Die Thrombozyten nehmen eine wichtige Rolle in der primären Blutstillung (Hämostase) ein, indem sie die Integrität des Gefäßendothels überwachen. Bei einer Schädigung des Endothels kommt es zur Freilegung subendothelialer Strukturen, wie zum Beispiel Kollagen, an der extrazellulären Matrix. Thrombozyten erkennen diese Strukturen und können so am beschädigten Endothel akkumulieren. Gleichzeitig werden die Thrombozyten aktiviert, sodass die Hämostase weiter voranschreiten kann (Wagner & Burger 2003, Semple *et al.* 2011).

Die dritte und kleinste Gruppe der hämatopoetischen Zellen bilden mit 4.500 bis 11.000 Zellen pro  $\mu\text{l}$  die Leukozyten. Trotz ihrer geringen Anzahl sind sie wichtige Effektorzellen des Immunsystems, wobei die Leukozyten das Blut genau genommen nur als Transportmedium verwenden. Ihre eigentliche Funktion führen die Leukozyten in verschiedenen Geweben aus, wo sie an der Bekämpfung körperfremder Erreger beteiligt sind.

Die Leukozyten werden in myeloische und lymphatische Leukozyten unterteilt. Zur myeloischen Reihe gehören die Granulozyten und die Monozyten, die beide zelluläre Bestandteile des angeborenen Immunsystems sind. Zur lymphatischen Linie werden die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) sowie die B- und die T-Lymphozyten gezählt. Die NK-Zellen sind ebenfalls ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems, wohingegen die Lymphozyten zum adaptiven Immunsystem gezählt werden.

Aufgrund ihres Färbeverhaltens nach Pappenheim können die Granulozyten weiter in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten unterschieden werden. Eosinophile und basophile Granulozyten machen mit insgesamt ca. 9 % nur einen geringen Anteil der Leukozyten aus. Ihre Aufgabe besteht insbesondere in der Abwehr von Parasiten.

Die neutrophilen Granulozyten bilden den Hauptanteil der Leukozyten (40 - 70 %). Chemotaktische Reize eines Entzündungsherdes locken die neutrophilen Granulozyten aus dem Blut ins Gewebe. Dort angekommen, erkennen sie konservierte Strukturen von Pathogenen (*Pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs), die sie mit Hilfe sogenannter *pattern recognition receptors* (PRRs), wie zum Beispiel den Toll-like Rezeptoren (TLR), auf ihrer Zelloberfläche spezifisch binden. Bakterielle Krankheitserreger oder andere Fremdkörper werden auf diese Weise erkannt und phagozytiert. Intrazellulär entsteht ein Phagosom, das mit den Granula und Lysosomen der neutrophilen Granulozyten verschmilzt. Darin befindliche Hydrolasen und andere antimikrobielle Substanzen werden in das Lumen des Phagosoms ausgeschüttet und der sich so verändernde pH-Wert führt zur Abtötung der Pathogene. Eine weitere Möglichkeit, Pathogene nach der Phagozytose abzutöten, ist der sogenannte *oxidative burst*. Hierbei werden großen Mengen reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) erzeugt. Die entstehenden Radikale tragen wesentlich zum Abtöten von Krankheitserregern bei. Die neutrophilen Granulozyten sterben nach der Vernichtung der Pathogene ebenfalls ab (Müller-Newen & Petrides 2014).

Etwa 4 -10 % der Leukozyten sind Monozyten. Wie die Granulozyten wandern die Monozyten im Falle einer Entzündung in das Gewebe ein, wo sie zu Makrophagen oder dendritischen Zellen der monozytären Linie differenzieren. Im Gegensatz zu den Granulozyten sterben Makrophagen nach der Phagozytose von Pathogenen nicht ab, sondern werden zu sogenannten antigenpräsentierenden Zellen (APC). Sie präsentieren prozessierte Peptidantigenfragmente auf den Haupthistokompatibilitätskomplexen II (*major histocompatibility complex II*, MHCII) an ihrer Zelloberfläche, die von T-Lymphozyten erkannt



werden. Auf diese Weise stellen Makrophagen eine wichtige zelluläre Verbindung zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem her (Müller-Newen & Petrides 2014).

Lymphozyten machen 20 - 40 % der Leukozyten aus. Zu ihnen gehören die NK-Zellen, die mit Hilfe einer Vielzahl von Rezeptoren in der Lage sind, infizierte, gealterte oder sogar Tumorzellen zu erkennen und diese zu lysieren. Sie werden somit wie die Granulozyten und Monozyten generell zum angeborenen Immunsystem gezählt. Mittlerweile werden den NK-Zellen aber auch immer mehr Eigenschaften zugeschrieben, die eigentlich zum adaptiven Immunsystem gezählt werden, wie zum Beispiel das Priming oder ein immunologisches Gedächtnis (Vivier *et al.* 2008, O'Sullivan *et al.* 2015).

B- und T-Lymphozyten vermitteln die adaptive Immunantwort. T-Lymphozyten werden in CD8-positive zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) und CD4-positive T-Helferzellen unterteilt. Zytotoxische T-Zellen induzieren in von Pathogenen infizierten Zellen den programmierten Zelltod (Apoptose). Mit Hilfe des T-Zell-Rezeptors erkennen sie Antigenfragmente, die auf MHC-I-Molekülen an der Oberfläche infizierter Zellen präsentiert werden. Durch diesen Kontakt kommt es seitens der zytotoxischen T-Zelle zur Ausschüttung von Granula, die einen Komplex aus Perforin, Granzym und Granulysin enthalten. Über das Perforin gelangt der Inhalt der Granula in die Zielzelle und leitet dort die Apoptose ein (Voskoboinik *et al.* 2015).

T-Helferzellen besitzen eine Vielzahl von Effektormechanismen in der zellulären adaptiven Immunantwort. Die Aktivierung von T-Helferzellen erfolgt durch die Erkennung von Antigenfragmenten auf antigenpräsentierenden Zellen in sekundär lymphatischen Organen, wie zum Beispiel den Lymphknoten. Dabei werden Antigenfragmente den T-Zell-Rezeptoren über MHC-II-Moleküle präsentiert. Nach der Aktivierung produzieren und sezernieren T-Helferzellen eine Vielzahl von Zytokinen. Auf diese Weise können sie verschiedene Zellpopulationen, wie zum Beispiel Makrophagen, aktivieren oder auch Zellen zur Proliferation anregen (Heinrich *et al.* 2014).

Auch B-Lymphozyten werden in den sekundär lymphatischen Organen durch T-Helferzellen aktiviert. B-Lymphozyten binden ein Antigen über den B-Zell-Rezeptor (BZR), woraufhin dieser Komplex internalisiert und proteolytisch gespalten wird. Die Peptidfragmente des Antigens werden über MHC-II-Moleküle auf der B-Zelloberfläche einem T-Lymphozyten präsentiert, wodurch es zur Aktivierung des B-Lymphozyten kommt. Diese T-Zell-abhängige B-Zell-Aktivierung führt zur klonalen Expansion der B-Zelle und schließlich zur terminalen Differenzierung entweder zu einer Plasma- oder Gedächtniszelle. Plasmazellen produzieren und sezernieren spezifische Antikörper, um Pathogene gezielt zu bekämpfen, Gedächtniszellen können über Jahre im Körper verweilen. Bei wiederholtem Kontakt mit einem bereits bekannten Antigen können Gedächtniszellen sehr schnell aktiviert werden und mit der Antikörperproduktion beginnen (Heinrich *et al.* 2014). Des Weiteren können B-

Lymphozyten auch regulatorische Aufgaben übernehmen. Durch die Suppression inflammatorischer Lymphozyten und Aktivierung immunsuppressiver T-Lymphozyten sind B-Lymphozyten an der Ausbildung einer immunologischen Toleranz beteiligt (Rosser & Mauri 2015).

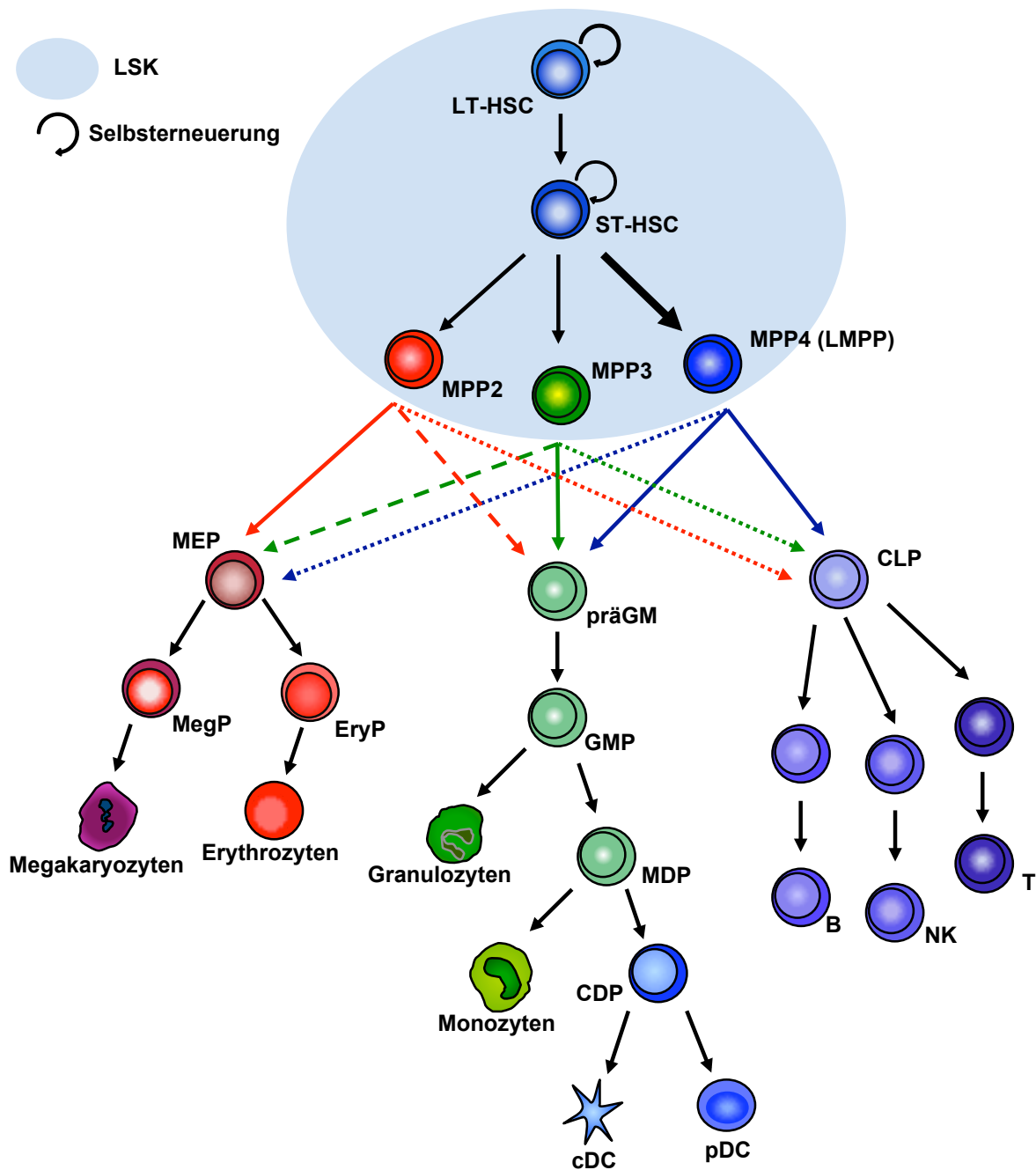
Eine weitere Zellpopulation des hämatopoetischen Systems sind die dendritischen Zellen (DCs). Sie gehören, wie die Monozyten und B-Lymphozyten, zu den antigenpräsentierenden Zellen. Da sie ein wichtiger Bestandteil dieser Doktorarbeit sind, werden sie im Detail in Abschnitt 1.8 besprochen.

## 1.2 Die Hämatopoese

Die Hämatopoese beschreibt den Prozess der Bildung aller Zellen des Blut bildenden Systems. Dabei wird die primitive von der adulten Hämatopoese unterschieden.

Die primitive oder auch embryonale Hämatopoese beginnt etwa an Tag 7 post conceptionem (p.c.) der Embryonalentwicklung im Mesoderm des Dottersacks. Von Endothelzellen umgebene Erythrozyten bilden dort sogenannte Blutinseln. Diese noch kernhaltigen und daher auch als primitiv bezeichneten Erythrozyten sind nach Ausbildung erster Blutgefäße an der Versorgung des Embryos mit Sauerstoff beteiligt. Mit Voranschreiten der Organogenese sind hämatopoetische Zellen auch in der Plazenta oder embryonalen Arterien, wie der Arteria vitellina und der Arteria umbilicalis, zu finden. Eine weitere Region, die beispielsweise an der Ausbildung lymphatischer Zellen beteiligt ist, ist die AGM-Region (Aorta-, Gonaden- und Mesonephros-Region). Später wird die fetale Leber das Hauptorgan aller hämatopoetischen Aktivität und bleibt es solange, bis die Blutzellentwicklung kurz vor der Geburt in das Knochenmark verlagert wird, dem lebenslangen Ort der adulten Hämatopoese (Cumano & Godin 2007, Costa *et al.* 2012).

Die adulte Hämatopoese findet bei Vertebraten im roten Knochenmark statt. Da die einzelnen Zellpopulationen des Blutes eine relativ geringe Überlebensdauer haben, müssen sie kontinuierlich erneuert werden. An der Spitze der adulten Hämatopoese stehen die multipotenten hämatopoetischen Stammzellen (HSC), die zwei für sie charakteristische Eigenschaften besitzen: zum einen sind sie in der Lage, sich in alle Zellen des hämatopoetischen Systems zu differenzieren (Multipotenz), zum anderen besitzen sie die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, um so dauerhaft die Bildung von Blutzellen zu gewährleisten (Weissman 2000). Unter physiologischen Bedingungen befinden sich die hämatopoetischen Stammzellen meist in einem ruhenden Zustand, der ihr Potential zur Repopulation bewahrt und sie vor äußeren Einflüssen schützt. Kommt es zu einer Anämie oder inflammatorischen Prozessen, werden sie zur Teilung angeregt.



**Abbildung 1.1: Schematische Übersicht der Hämatopoese**

Dargestellt ist eine stark vereinfachte Übersicht der Hämatopoese. Alle Zellen des hämatopoetischen Systems stammen von hämatopoetischen Stammzellen (HSC) ab. Die HSC differenzieren über viele Vorläuferpopulationen in alle Zellen des Blutes. Die Pfeile zeigen das bevorzugte Differenzierungspotential, wobei ein durchgezogener Pfeil ein ausgeprägteres Potential beschreibt als ein gestrichelter Pfeil. LT-HSC: Langzeit-hämatopoetische Stammzellen, ST-HSC: Kurzzeit-hämatopoetische Stammzellen; LSK: Lin<sup>-</sup>Sca<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>, MPP 1 (2, 3): multipotente Progenitor-Population 1 (2, 3); LMPP: lymphatisch geprägte Progenitor-Population; B: B-Lymphozyt; T: T-Lymphozyt; NK: Natürliche Killerzelle; präGM: prä-Granulozyten-Makrophagen-Progenitor; GM: Granulozyten-Makrophagen-Progenitor; MDP: Makrophagen-und-dendritische-Zellen-Progenitor; CDP: allgemeiner dendritischer Progenitor; cDC: klassische dendritische Zellen, pDC: plasmazytoide dendritische Zellen; MEP: Megakaryozyten-Erythrozyten-Progenitor; MegP: Megakaryozyten-Progenitor; EryP: Erythrozyten-Progenitor. Adaptiert nach Passegué *et al.* 2003, Pietras *et al.* 2015, Laiosa *et al.* 2006, Cedar & Bergman 2011 und Poltorak & Schraml 2015.

Im Knochenmark halten sich die hämatopoetischen Stammzellen entweder in der endostalen oder der vaskulären Nische auf, wo sie mit Endothel-, Stroma- und ossären Zellen in Kontakt stehen, die den Zustand und die Funktion der Stammzellen beeinflussen.

In der endostalen Nische, also im Bereich des Endosts, werden die Stammzellen in einem ruhenden Zustand gehalten. Angrenzend zu Blutgefäßen, in der vaskulären Nische, kommt es unter Einfluss der interagierenden Zellen zur Proliferation und Differenzierung der HSC (Wilson *et al.* 2007, Morrison & Scadden 2014, Boulais & Frenette 2015).

Bislang wurden mit Hilfe von Transplantationsstudien im Mausmodell drei Arten von hämatopoetischen Stammzellen identifiziert, die sich in ihrer Fähigkeit, sich selbst zu erneuern, unterscheiden. *Long-term* HSC (LT-HSC) besitzen uneingeschränktes Selbsterneuerungspotential, wohingegen *intermediate-term* HSC (IT-HSC) auf einen Zeitraum von sechs bis acht Monaten begrenzt sind. *Short-term* HSC (ST-HSC) sind nur für ca. acht Wochen in der Lage, sich selbst zu erneuern (Morrison & Weissman 1994, Benveniste *et al.* 2010). Die hämatopoetischen Stammzellen differenzieren sich weiter in multipotente Vorläuferzellen (MPP), die ein sehr eingeschränktes Selbsterneuerungspotential besitzen, sich dafür aber durch eine starke Proliferation auszeichnen (Morrison *et al.* 1997).

Die HSC und die MPPs lassen sich anhand ihrer Oberflächenproteine zu einer großen Population zusammenfassen. Ihnen gemein ist, dass sie noch keine Marker reifer Blutzellen exprimieren ( $Lin^-$ ). Sie tragen aber bereits das Stammzellantigen Sca ( $Sca^+$ ) und den Stammzellrezeptor-Kit ( $c-Kit^+$ ) auf ihrer Oberfläche, sodass sie gemeinsam die  $Lin^-Sca^+c-Kit^+$ -Population (LSK-Population) bilden.

Die MPPs sind eine sehr heterogene Population, die aus mindestens drei Subpopulationen besteht (Pietras *et al.* 2015). Zwei dieser Populationen (MPP2 und MPP3) sind myeloisch geprägt, wobei die MPP2-Population überwiegend megakaryozytäres-erythrozytäres und die MPP3-Population vor allem granulozytäres und monozytäres Potential besitzt. Die lymphatisch geprägte MPP4-Population, auch LMPPs genannt (*lymphoid primed multipotent progenitors*), bildet den weitaus größten Anteil der MPPs. Alle drei MPP-Populationen sind in der Lage, auch in Zellen der anderen Linie zu differenzieren. Während MPP2 und MPP3 ihr Linien-Potential jedoch überwiegend beibehalten, können insbesondere Zellen der MPP4-Subpopulation ihr Zellschicksal verändern und zur Regeneration des myeloischen Kompartiments beitragen.

Die Subpopulationen der MPPs bringen somit die verschiedenen Linien der Hämatopoese hervor. Die Entwicklung der Erythrozyten und Thrombozyten beginnt mit der Megakaryozyten-Erythrozyten-Vorläuferpopulation (MEPs). Diese differenziert sich über weitere linienspezifische Progenitoren (Erythrozyten-Vorläuferzellen (EryPs),

Megakaryozyten-Progenitoren (MegPs)) schließlich in Erythrozyten und Megakaryozyten, wobei sich aus Letzteren die Thrombozyten abschnüren (Laiosa *et al.* 2006).

Monozyten und Granulozyten differenzieren sich aus den GMPs (Granulozyten-Monozyten-Vorläuferzellpopulation). Ihnen vorangestellt sind noch die sogenannten prä-Granulozyten-Monozyten-Progenitoren (präGMs), die sich von den GMPs durch die fehlende Expression eines Oberflächenrezeptors, dem Fcγ-Rezeptor (CD16/32), unterscheiden (Pronk *et al.* 2007).

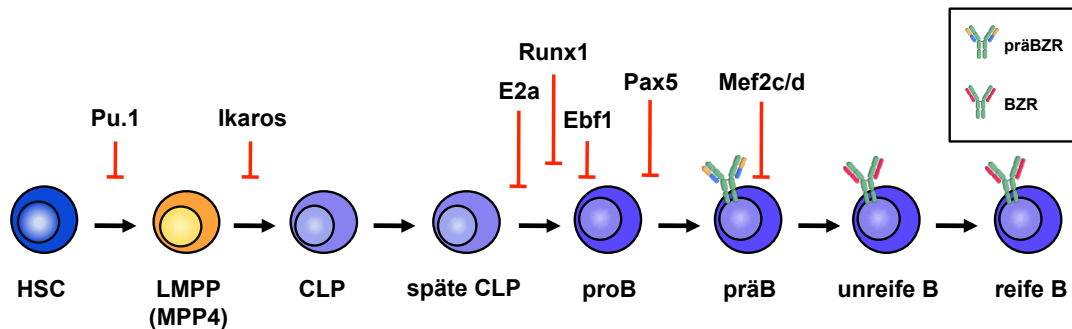
Die lymphatische Differenzierung aus der MPP4-Population (LMPPs) beginnt mit der allgemeinen lymphatischen Progenitor-Population, den CLPs (Lai & Kondo 2006). Diese entwickeln sich über linienspezifische Vorläufer weiter in die reifen lymphatischen Zellpopulationen, die B- und T-Lymphozyten sowie die NK-Zellen (Kondo *et al.* 1997). Auf die B-Zell-Entwicklung wird in Abschnitt 1.3 genauer eingegangen.

Die dendritischen Zellen entwickeln sich im klassischen Modell der dendritischen Differenzierung ebenfalls aus der myeloischen Linie. Da ihre Differenzierung ein wichtiger Bestandteil dieser Doktorarbeit ist, wird sie ausführlich in Abschnitt 1.8.3 beschrieben.

### 1.3 Die B-Zell-Differenzierung

Die HSC schlagen über die MPP4-Population (LMPPs) den Weg der lymphatischen Differenzierung ein. Aus der MPP4-Population entstehen die CLPs (Abbildung 1.2), welche durch die Expression des Oberflächenmarkers Ly6d noch einmal unterteilt werden. Während Ly6d-negative Zellen noch in alle lymphatischen Linien differenzieren, sind die späten Ly6d-positiven CLPs bereits auf die B-lymphatische Linie geprägt (Inlay *et al.* 2009). Von dort aus beginnt die B-Zell-Differenzierung, deren verschiedene Stadien durch die Expression der Oberflächenmarker CD43, B220 und CD19 charakterisiert werden. Das erste B-Zell-Stadium ist das proB-Zellstadium, in dem der B-Lymphozyten-Marker CD19 erstmals exprimiert wird und die Bildung des B-Zell-Rezeptors beginnt. Mit Hilfe der Proteine Rag1 und Rag2, die durch die *recombination activating genes 1* und *2* (*Rag1* und *Rag2*) kodiert werden, finden hier bereits erste Rekombinationsprozesse der B-Zell-Rezeptorketten statt (Welinder *et al.* 2011).

Im darauffolgenden präB-Zellstadium wird ein präB-Zell-Rezeptor gebildet und auf der Zelloberfläche exprimiert (Melchers *et al.* 1975). Der präB-Zell-Rezeptor besteht wie der reife B-Zell-Rezeptor aus einer schweren Immunoglobulinkette, er besitzt jedoch als Ersatz für die leichte Kette zunächst noch die sogenannte *surrogate light chain* (SLC, Kudo & Melchers 1987). Diese wird im weiteren Verlauf der Differenzierung durch die leichte Immunoglobulinkette ersetzt, sodass in den unreifen B-Zellen ein funktionaler B-Zell-Rezeptor entsteht.



**Abbildung 1.2: Frühe B-Zell-Differenzierung im Knochenmark und regulierende Transkriptionsfaktoren**  
 Die lymphatische Differenzierung beginnt mit dem LMPP- (MPP4-) und dem darauffolgenden CLP-Stadium. Die B-Lymphozyten differenzieren sich über das proB-, präB- und unreife B-Zellstadium in die reifen B-Lymphozyten. In rot ist immer der Zeitpunkt markiert, an dem ein Knockout des jeweiligen Transkriptionsfaktors im Mausmodell zu einem Differenzierungsblock führt. Adaptiert nach Boller & Grosschedl 2014, Fuxa & Skok 2007 und Nutt & Kee 2007.

Durch die Expression der beiden Subtypen der leichten Immunoglobulinkette, der  $\kappa$ - oder der  $\lambda$ -Kette, kann das unreife B-Zellstadium vom präB-Zellstadium unterschieden werden (Melchers *et al.* 2000, Hardy *et al.* 2007). Die unreifen B-Lymphozyten differenzieren weiter in reife B-Lymphozyten, die nun das Knochenmark verlassen und an der Abwehr von Pathogenen im Rahmen der adaptiven Immunantwort teilnehmen können.

### 1.3.1 Transkriptionsfaktoren in der B-Zell-Differenzierung

Die Differenzierung in der Hämatopoese ist ein fein abgestimmter Prozess. Signale von Zell-Zell-Interaktionen, Wachstumsfaktoren oder Zytokinen regulieren die Differenzierung von extrazellulär und werden über Rezeptoren auf der Zelloberfläche in die Zelle weitergeleitet. Intrazellulär sind Transkriptionsfaktoren für die Regulation der Hämatopoese verantwortlich. Transkriptionsfaktoren sind DNA-bindende Proteine, die durch die Bindung an Promotor-Regionen, die Transkription von Genen induzieren oder auch hemmen. Durch die Bindung von weiteren Proteinen an *Enhancer*- oder *Silencer*-Regionen stromauf- oder stromabwärts der Promotor-Region kann die Transkription entweder verstärkt oder abgeschwächt werden.

Die Bedeutung von Transkriptionsfaktoren für die Hämatopoese lässt sich besonders gut in Knockout-Mausmodellen nachvollziehen, in denen einzelne Transkriptionsfaktoren gezielt ausgeschaltet werden. Dabei werden konstitutive von konditionalen Knockout-Mausmodellen unterschieden. Bei einem konstitutiven Knockout wird das Gen eines Transkriptionsfaktors bereits in der Keimbahn und somit im gesamten Organismus deletiert. Mit Hilfe des Cre/loxP-Systems können konditionale Knockout-Mausmodelle generiert werden, in denen die Deletion in spezifischen Stadien der hämatopoetischen Differenzierung induziert wird. Dabei erfolgt Exzision durch die sogenannte Cre-Rekombinase, die einen von loxP-Abschnitten flankierten DNA-Bereich erkennt und herausschneidet. Um die Deletion zu einem bestimmten Zeitpunkt der Hämatopoese zu gewährleisten, wird die Expression der Cre-Rekombinase unter die Kontrolle eines spezifischen Promotors gestellt. Bei einer Regulation durch den Vav-Promotor erfolgt die Exzision beispielsweise bereits ab den

hämatopoetischen Stammzellen. Der Cd79a-Promotor wird hingegen erst ab den späten CLPs exprimiert und führt somit auch zu einer späteren Deletion.

Ist ein Transkriptionsfaktor zu einem bestimmten Zeitpunkt essentiell für die Differenzierung einer spezifischen Linie, führt dessen Knockout zu einem Differenzierungsblock und zum Verlust aller darauffolgenden Populationen. Exemplarisch ist dies für die B-Zell-Differenzierung in Abbildung 1.2 gezeigt. Dabei ist in rot immer der Zeitpunkt markiert, an dem es in einem Knockout-Mausmodell des jeweiligen Transkriptionsfaktors zu einem Differenzierungsblock kommt, sodass alle darauffolgenden Stadien der Differenzierung nicht mehr vorhanden sind. Dies gibt auch einen Hinweis darauf, zu welchem Zeitpunkt der Differenzierung ein Transkriptionsfaktor entscheidende Funktionen ausüben könnte (Fuxa & Skok 2007, Nutt & Kee 2007).

Ein wichtiger Punkt der B-Zell-Differenzierung ist der Übergang von den CLPs in das proB-Zellstadium, da hier die endgültige Linienentscheidung vollzogen wird. Einige Transkriptionsfaktoren greifen genau zu diesem Zeitpunkt in die Regulation der B-Zell-Differenzierung ein (z.B. E2a, Ebf1, Runx1, Abbildung 1.2). Besonders deutlich machen dies verschiedene Knockout-Mausmodelle desselben Transkriptionsfaktors. So führt beispielsweise eine Deletion von *Ebf1* ab den hämatopoetischen Stammzellen (*Ebf1*<sup>Δ/Δ</sup>-VavCre) genauso wie ein Knockout-Mausmodell, in dem *Ebf1* erst in den späten CLPs deletiert wird (*Ebf1*<sup>Δ/Δ</sup>-Cd79aCre), zu einem Differenzierungsblock zwischen den CLPs und den proB-Zellen (Lin & Grosschedl 1995, Vilagos *et al.* 2012, Boller & Grosschedl 2014). Im *Ebf1*<sup>Δ/Δ</sup>-VavCre-Mausmodell kann die Differenzierung also auch ohne Expression von *Ebf1* bis zu den CLPs ungehindert voranschreiten. Erst hier entfaltet der Transkriptionsfaktor im Zusammenspiel mit anderen Faktoren seine Wirkung, sodass sein Knockout zu einem Differenzierungsblock führt. Ähnliche Ergebnisse lassen sich auch in den Knockout-Mausmodellen von E2a und Runx1 zeigen, was verdeutlicht, dass diese Transkriptionsfaktoren zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Hämatopoese relevant werden (Kwon *et al.* 2008, Niebuhr *et al.* 2013).

Eine Transkriptionsfaktor-Familie, für die in den letzten Jahren vermehrt eine Rolle in der Hämatopoese beschrieben wurde, ist die *Myocyte Enhancer Factor 2-* (MEF2-) Familie (siehe auch Abschnitt 1.7). Für die Familien-Mitglieder Mef2c und Mef2d wurde in unserer Arbeitsgruppe ein Doppel-Knockout-Mausmodell generiert, in dem *Mef2c* und *Mef2d* gemeinsam ab den späten CLPs deletiert sind (*Mef2c/d*<sup>Δ/Δ</sup>-Cd79aCre). Auch in diesem Mausmodell kommt es zu einem Differenzierungsblock in der B-Zell-Entwicklung. Allerdings führt die Deletion von *Mef2c* und *Mef2d* erst ab dem späten präB-Zellstadium zu einer deutlichen Reduktion und einer sich anschließenden Blockade der B-Zell-Entwicklung (Hauschildt, Masterarbeit 2012, Herglotz *et al.* 2016, siehe auch Abschnitt 1.7).

Ein zweites *Mef2c/d*-Doppel-Knockout-Mausmodell, in dem *Mef2c* und *Mef2d* bereits ab den HSC deletiert sind (*Mef2c/d*<sup>Δ/Δ</sup>-VavCre-Mausmodell), wurde ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe generiert und im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

#### 1.4 MEF2-Transkriptionsfaktoren

MEF2-Proteine gehören zur MADS-Box-Familie der Transkriptionsfaktoren. Proteine dieser Familie besitzen eine hohe Sequenzhomologie und sind in einer Vielzahl eukaryotischer Organismen wie Hefen, Pflanzen, Insekten, Amphibien und Säugetieren zu finden. Der Begriff MADS-Box steht für eine konservierte DNA-Bindungsdomäne in der Sequenz dieser Proteine und der Name wird aus den vier ursprünglich gefundenen Mitgliedern abgeleitet: MCM1 aus *Saccharomyces cerevisiae*, Agamous aus *Arabidopsis thaliana*, Deficiens aus *Antirrhinum majus* und Serum-Response-Factor (SRF) aus *Homo sapiens* (Shore & Sharrocks 1995, Potthoff & Olson 2007).

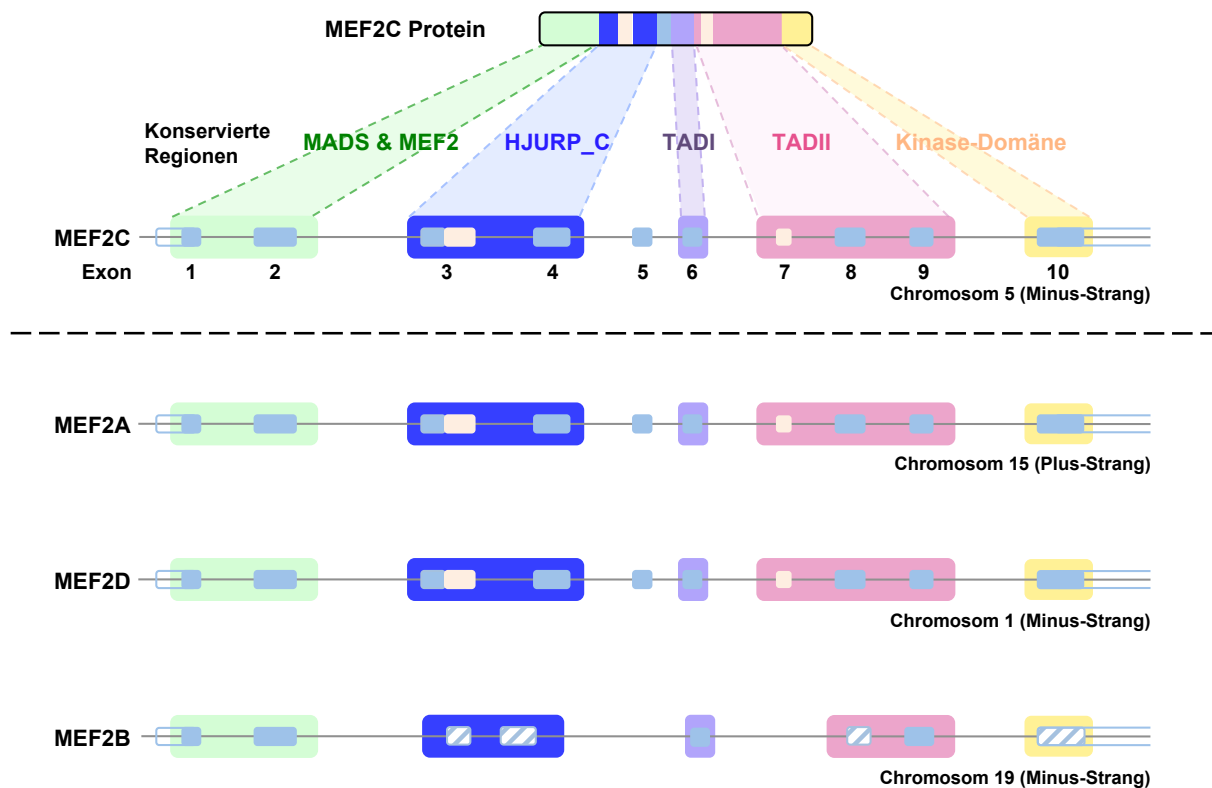
Zu den MEF2-Proteinen der Vertebraten gehören vier Transkriptionsfaktoren: MEF2A, MEF2B, MEF2C und MEF2D. Abbildung 1.3 zeigt die vier MEF2-Proteine, wobei die Exon-Abfolge von MEF2C mit der Abfolge der drei anderen Proteine verglichen wird. Zusätzlich ist das vollständige MEF2C-Protein mit den einzelnen Domänen dargestellt. Die höchste Homologie besitzt MEF2C mit MEF2A. Auch MEF2D zeigt starke Homologien zu MEF2C, wohingegen MEF2B bereits deutliche Unterschiede aufweist.

Alle vier MEF2-Faktoren besitzen N-terminal eine konservierte MADS-Box-Domäne, an die sich eine MEF2-Domäne anschließt. Ursprünglich wurden MADS-Box-Transkriptionsfaktoren als Regulatoren der Muskel-Differenzierung beschrieben, in der diese beiden Domänen für die DNA-Bindung an Promoter-Regionen von muskelspezifischen Genen und für die Dimerisierung und Interaktion mit myogenen *basic helix-loop-helix*- (bHLH-) Proteinen erforderlich sind (Gossett *et al.* 1989, Shore & Sharrocks 1995, Black & Olson 1998). MEF2-Proteine binden dabei als Homo- oder Heterodimer an die DNA-Konsensussequenz YTA(A/T)<sub>4</sub>TAR. Für die Aktivierung der Transkription von Zielgenen ist zudem die Rekrutierung weiterer Faktoren notwendig.

Des Weiteren besitzen MEF2-Proteine eine *Holiday Junction Regulator Protein Family C Terminal-Repeat*-Domäne (HJURP\_C), deren Funktion nicht weiter bekannt ist. C-terminal befinden sich zwei Transaktivierungsdomänen (TADI und TADII) sowie eine Kinase-Domäne. Die TAD-Domänen weisen im Gegensatz zu den MADS- und MEF2-Domänen eine relativ hohe Variabilität in den einzelnen MEF2-Proteinen auf. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die MEF2-Transkriptionsfaktoren unterschiedliche Funktionen besitzen und tatsächlich wurde die Expression von MEF2-Proteinen mittlerweile in einer Vielzahl weiterer Gewebe nachgewiesen, wobei die höchste Expression in der Skelettmuskulatur, im Herzmuskel, im Gehirn und in der Niere zu finden ist (Potthoff & Olson 2007, Cante-Barrett



et al. 2014). Zudem wird MEF2-Proteinen zunehmend eine entscheidende Rolle bei der Entstehung maligner Erkrankungen in vielen unterschiedlichen Geweben zugeschrieben (Pon & Marra 2016).



**Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der vier homologen Gene *MEF2A*, *MEF2B*, *MEF2C* und *MEF2D***  
 Die Gene *MEF2A*, *MEF2B* und *MEF2D* werden mit *MEF2C* (oberhalb der gestrichelten Linie) verglichen, wobei sich der 5'-UTR links und der 3'-UTR rechts befindet. Die größte Homologie besitzt *MEF2C* mit *MEF2A*, gefolgt von *MEF2D* und *MEF2B*. Konservierte Exons sind in hellblau dargestellt. Gestreifte Exons markieren eine geringe Sequenzhomologie im Vergleich zu *MEF2C*. Alternativ gespleißte Exons sind beigefarbt. Konservierte Regionen umrahmen die Exons, wobei die Farben denen der Domänen des *MEF2C*-Proteins entsprechen (oben). Die Intron- und Exonsequenzen sind nicht skaliert. Grün: MADS-Box und MEF2-Domäne; dunkelblau: HJURP\_C (*Holiday Junction Regulator Protein Family C Terminal-Repeat*); lila: Transaktivierungsdomäne I (TADI); rosa: Transaktivierungsdomäne II (TADII); gelb: Kinase-Domäne. Nach Cante-Barrett 2014.

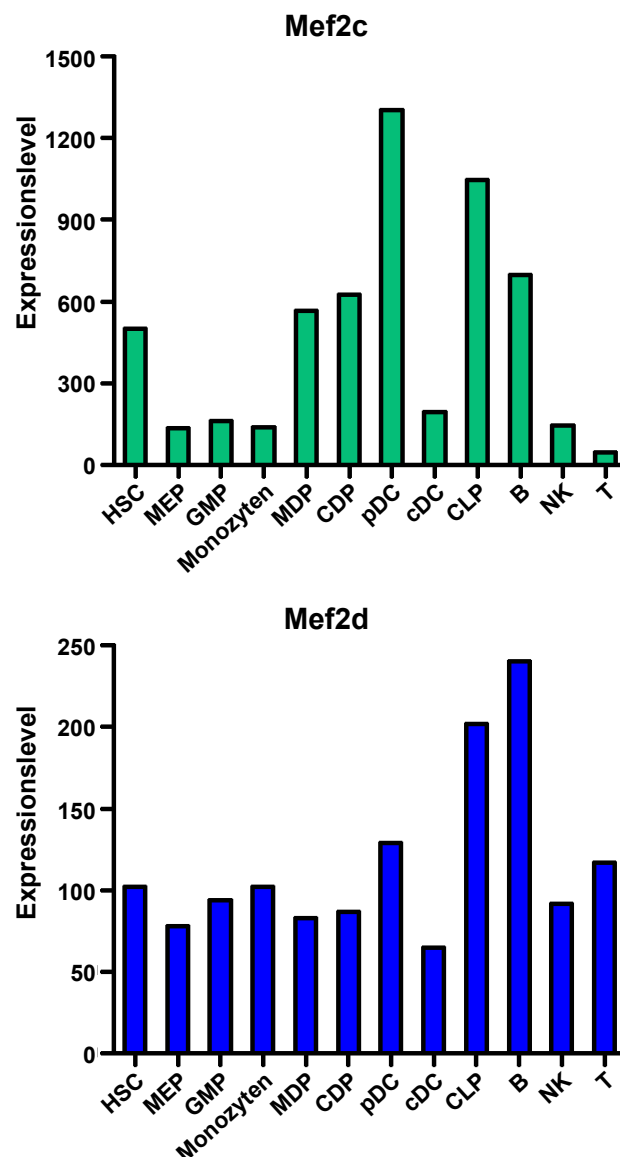
### 1.5 Die Expression von Mef2-Proteinen in der Hämatopoese

Auch in hämatopoetischen Zellpopulationen werden Mef2-Proteine exprimiert und die Rolle dieser Transkriptionsfaktoren für die Differenzierung wird zunehmend untersucht. Dabei werden insbesondere Mef2c immer mehr Funktionen in der Hämatopoese zugeschrieben (siehe Abschnitt 1.7). Abbildung 1.4 zeigt die Expressionslevel für Mef2c und Mef2d in murinen hämatopoetischen Progenitoren.

Die Expression von Mef2c variiert in den unterschiedlichen Populationen der Hämatopoese. Im Vergleich zu den hämatopoetischen Stammzellen verringert sich die Expression im Laufe der myeloischen Differenzierung. Sowohl myeloische Progenitoren (GMPs und MEPs) als auch reife myeloische Zellen (Monozyten) besitzen nur geringe Mef2c-Expressionslevel. In Zellen der dendritischen Differenzierung zeigt sich hingegen ein anderes Bild. Dendritische Vorläuferpopulationen exprimieren im Vergleich zu anderen myeloischen Populationen

deutlich mehr Mef2c. In den reifen pDCs steigt die Mef2c-Expression noch einmal deutlich an, wohingegen cDCs wiederum nur geringe Mef2c-Level aufweisen. Die lymphatische Progenitor-Population der CLPs besitzt sehr hohe Expressionslevel. Diese werden in den B-Zell-Vorläuferpopulationen und den reifen B-Zellen beibehalten. In den ebenfalls lymphatischen NK- und T-Zellen sind die Expressionslevel wiederum gering.

Für den Transkriptionsfaktor Mef2d zeigen sich in allen Populationen deutlich geringere Expressionslevel. Doch auch für Mef2d kommt es zu einem Anstieg der Expression in den pDCs, den CLPs und den B-Lymphozyten (Heng *et al.* 2008).



**Abbildung 1.4: Expressionslevel von Mef2c und Mef2d in verschiedenen hämatopoetischen Populationen**

Mef2c wird ab den HSC exprimiert. Im Vergleich zu der HSC-Expression ist die Expression in myeloischen Populationen (GMPs oder Monozyten) vermindert. Dendritische Vorläuferpopulationen (MDP, CDP) besitzen ähnliche Expressionslevel wie die HSC, in den adulten pDCs ist die Expression allerdings stark erhöht, wohingegen cDCs nur geringe Mef2c-Level aufweisen. CLPs zeigen sehr hohe Mef2c-Expressionslevel, die in den B-Lymphozyten beibehalten werden. Die Expressionlevel von Mef2d sind insgesamt deutlich geringer als die von Mef2c, doch auch hier zeigt sich ein deutlicher Anstieg in den pDCs, CLPs und B-Lymphozyten. Adaptiert nach Daten des *Immunological Genome Project ImmGene* (Heng *et al.* 2008).

## 1.6 MEF2-Proteine bei der Entstehung akuter Leukämien

Akute Leukämien sind Krebserkrankungen des Blut bildenden Systems. Durch Mutationen oder Translokationen gerät der Differenzierungsprozess hämatopoetischer Vorläuferzellen außer Kontrolle. Leukämische Zellen beginnen sich unkontrolliert zu teilen und akkumulieren im Knochenmark. Diese sogenannten Blasten sind funktionslose hämatopoetische Progenitoren. Sie haben die Fähigkeit verloren, sich zu den reifen Zellen des Blutes zu entwickeln und es kommt zu einem Differenzierungsblock. Durch die Verdrängung der normalen Hämatopoese zeigen sich bei den Betroffenen eine Anämie, Granulozytopenie und Thrombozytopenie, deren Folge Schwäche, bakterielle Infekte und Blutungsneigung sind. Auch die Differenzierung der B- und der T-Lymphozyten ist beeinträchtigt, was ebenfalls mit einer erhöhten Infektanfälligkeit einhergeht. Die Blasten schwemmen schließlich in das periphere Blut aus und infiltrieren andere Organe, was zu weiteren organbezogenen Symptomen führen kann (Gilliland & Tallman 2002, Herold 2017).

Akute Leukämien zeichnen sich durch einen plötzlichen und fulminanten Verlauf aus, der unbehandelt innerhalb weniger Monate zum Tode führt. Bei chronischen Leukämien ist die Differenzierung in reife Zellen zunächst noch nicht beeinträchtigt, sodass die Erkrankung über Jahre persistieren kann, bevor die ersten Symptome auftreten.

Bei den akuten Leukämien unterscheidet man zwischen der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) und der akuten myeloischen Leukämie (AML). Die Inzidenz für die ALL und die AML beträgt 1,5 / 100.000 bzw. 3,7 / 100.000. Die Häufigkeit der akuten Leukämie ist zweigipfelig. Im Kindesalter sind 80 % der akuten Leukämien lymphatischen Ursprungs und gleichzeitig ist dies die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter. 80 % der akuten Leukämien im Erwachsenenalter gehören der AML an, wobei die Häufigkeit mit dem Alter ansteigt (Herold 2017).

Es sind zahlreiche chromosomale Anomalien bekannt, die eine akute Leukämie verursachen können. Sie reichen von numerischen und strukturellen Aberrationen, Inversionen und Translokationen bis hin zu einfachen Punktmutationen. Leukämische Zellen besitzen gegenüber normalen hämatopoetischen Vorläuferzellen zwei Merkmale. Zum einen haben leukämische Zellen einen Proliferations- und Überlebensvorteil, das heißt sie teilen sich unkontrolliert und sind in der Lage, apoptotischen Signalen zu entgehen. Zum anderen ist ihr Differenzierungsprogramm so gestört, dass die leukämischen Blasten im Knochenmark akkumulieren und die reifen Zellen aus dem Knochenmark verdrängen (Dash & Gilliland 2001, Pui *et al.* 2004).

Den Proliferations- oder Überlebensvorteil erhalten leukämische Zellen durch die aberrante Aktivierung von Signaltransduktionswegen. Häufig sind dabei Rezeptortyrosinkinasen oder deren nachgeschaltete Signalmoleküle konstitutiv aktiviert. Ein Beispiel hierfür ist die Rezeptortyrosinkinase FLT3, die bei ca. 30 % aller AML-Patienten mutiert ist (Gilliland &

Tallman 2002). Auch die Translokation t(9;22)(q34;q11) ist ein Beispiel einer mutierten Tyrosinkinase. Bei diesem sogenannten Philadelphia-Chromosom wird der C-Terminus der ABL-Tyrosinkinase mit dem N-Terminus des *breaking cluster region* (BCR-) Proteins fusioniert, sodass die Tyrosinkinase konstitutiv aktiviert ist. Das Philadelphia-Chromosom ist bei etwa 25-30 % der erwachsenen ALL-Patienten nachweisbar und mit einer schlechten Prognose assoziiert (Kurzrock *et al.* 2003, Herold 2017).

Das Differenzierungspotential leukämischer Zellen wird meist durch Mutationen in Genen von Transkriptionsfaktoren oder ihren Co-Faktoren beeinflusst. In akuten lymphatischen Leukämien konnten zahlreiche mutiert vorliegende Transkriptionsfaktor-Gene identifiziert werden. Darunter sind beispielsweise die Gene der Transkriptionsfaktoren PAX5, IKAROS, EBF1 oder E2A (Mullighan *et al.* 2007, Mullighan & Downing 2008, Mullighan *et al.* 2009). Dies alles sind Transkriptionsfaktoren, die in der B-Zell-Differenzierung wichtige Funktionen übernehmen (vgl. 1.3). Die Aberration von Transkriptionsfaktoren und ihre Beteiligung an der Entstehung von Leukämien sind somit weitere wichtige Hinweise darauf, dass ein Transkriptionsfaktor für die Differenzierung in der Hämatopoese von Bedeutung ist.

Auch den MEF2-Proteinen wird eine Rolle in der Leukämogenese zugeschrieben. Der Transkriptionsfaktor Mef2c wurde in akuten myeloischen und *Mixed Lineage* Leukämien als Onkogen identifiziert. Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten im Mausmodell, dass solche Formen der Leukämie mit einer aberranten Expression von *Mef2c* einhergehen können, was die Latenz bis zur Entstehung der Leukämie verkürzen kann (Du *et al.* 2005, Krivtsov *et al.* 2006, Schwieger *et al.* 2009).

Auch in humanen Patientenproben wurde eine Überexpression von MEF2C in AML-Patientenproben gefunden (Valk *et al.* 2004, Schwieger *et al.* 2009). Eine weitere Studie zeigte zudem, dass besonders hohe Expressionslevel von MEF2C mit einem schlechteren Behandlungsergebnis assoziiert sind. AML-Patienten mit hohen Expressionslevel von MEF2C erreichen seltener eine komplette Remission nach einem Zyklus Chemotherapie. Sie haben zudem ein geringeres Gesamtüberleben bzw. ereignisfreies Überleben sowie ein höheres Rückfall-Risiko (Laszlo *et al.* 2015).

Des Weiteren wurde Mef2c in den Zusammenhang mit der Entstehung chronischer myeloischer Leukämien (CML) gestellt. Das Transfusionsgen BCR-ABL, das in 95 % aller CML-Fälle vorkommt, führt zu einer Repression der miRNA miR-223 und erhöhten Expressionslevel von MEF2C (Agatheeswaran *et al.* 2013).

Auch in akuten lymphatischen Leukämien (ALL) wurden Mutationen und veränderte Expressionslevel von MEF2C gefunden. In Zell-Linien der T-ALL wurde eine verstärkte Expression von *MEF2C* detektiert. Als Ursache wurden entweder die Regulation durch das Onkogen NKX2-5 oder direkte chromosomale Aberrationen von *MEF2C* beschrieben (Nagel *et al.* 2008). Die Beteiligung von MEF2C an der Entstehung einer T-ALL konnte auch in

humanen Patientenproben bestätigt werden (Homminga *et al.* 2011). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass veränderte Expressionslevel von MEF2C in pädiatrischer T-ALL zu einem verminderten Therapie-Ansprechen führen (Colomer-Lahiguera *et al.* 2017).

Obwohl Mef2c in der normalen Hämatopoese in lymphatischen Vorläuferzellen (CLPs) und in allen Stadien der B-Lymphozyten stark exprimiert wird (vgl. Abbildung 1.4), konnte bislang kein Zusammenhang zwischen MEF2C und der Entstehung einer B-ALL gefunden werden. Allerdings wurde der MEF2-Transkriptionsfaktor MEF2D in Patientenproben von verschiedenen B-Progenitor-ALL-Formen als Translokation vorliegend identifiziert. So bildet MEF2D beispielsweise mit DAZAP1 (*Deleted in Azoospermia-Associated Protein 1*) oder der Rezeptortyrosinkinase CSFR1 ein onkogenes Fusionsgen (Yuki *et al.* 2004, Prima *et al.* 2005, Prima & Hunger 2007, Lilljebjörn *et al.* 2014). Neuere Studien identifizierten darüber hinaus weitere Fusionspartner von MEF2D, wie zum Beispiel BCL9, HNRNPUL1, SS18 oder FOXJ2, wobei das MEF2D-BCL9-Fusionsgen mit einer sehr schlechten Prognose einhergeht (Gu *et al.* 2016, Suzuki *et al.* 2016). Des Weiteren wurden auch in Non-Hodgkin-Lymphomen, wie dem diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom (DLBCL) oder dem folliculären Lymphom, Mutationen in MEF2-Genen gefunden. Diese betrafen insbesondere das MEF2B- und in geringerem Maße das MEF2C-Gen (Morin *et al.* 2011, Pasqualucci *et al.* 2011). MEF2B wurde zudem als potentieller histologischer Marker für das kleinzellige B-Zell-Lymphom beschrieben (Krenács *et al.* 2015).

### 1.7 Die Funktion der Mef2-Proteine in der Hämatopoese

Sowohl die Expressionslevel von Mef2-Proteinen im hämatopoetischen Kompartiment als auch die mögliche Fehlregulation von Mef2c und Mef2d bei der Entstehung akuter Leukämien zeigen, dass Mef2-Transkriptionsfaktoren im Rahmen der Hämatopoese regulatorisch wirksam sind.

Von allen Mef2-Proteinen wurde der Einfluss von Mef2c auf die Hämatopoese am ausführlichsten untersucht. Mäuse mit einem konstitutiven Knockout von *Mef2c* sterben bereits an Tag 9.5 der Embryonalentwicklung aufgrund der essentiellen Funktion von Mef2c für die Differenzierung von Gehirn, Herz und Muskeln (Potthoff & Olson 2007). Daher wurde der Einfluss von Mef2c auf die Hämatopoese, insbesondere mit Hilfe verschiedener konditionaler *Mef2c*-Knockout-Mausmodelle untersucht.

Mef2c besitzt einen Einfluss auf das myeloische Kompartiment, indem es die Differenzierung von Monozyten gegenüber der Granulopoese fördert (Schüler *et al.* 2008). Außerdem ist Mef2c an der myeloisch-lymphatischen Linien-Entscheidung beteiligt, indem die Expression von Mef2c die lymphatische Differenzierung fördert und gleichzeitig die myeloische Differenzierung unterdrückt (Stehling-Sun *et al.* 2009).

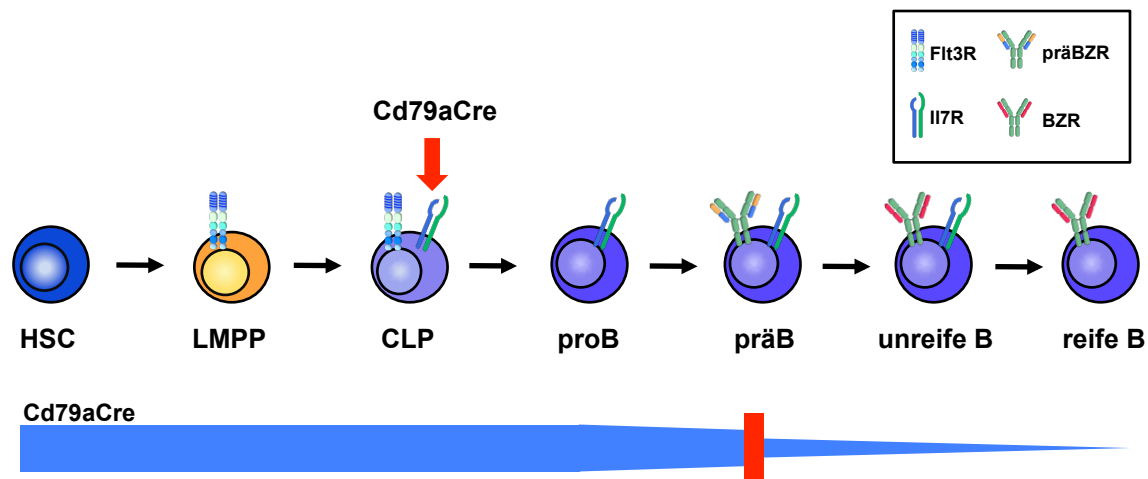
Obwohl *Mef2c* normalerweise eine sehr hohe Expression im B-Zell-Kompartiment aufweist, beeinträchtigt die konditionale Deletion von *Mef2c* das B-Zell-Kompartiment nur in geringem Maße (Khiem *et al.* 2008, Wilker *et al.* 2008, Stehling-Sun *et al.* 2009, Debnath *et al.* 2013). Dabei macht es keinen Unterschied, ob *Mef2c* bereits in den hämatopoetischen Stammzellen deletiert wird (Stehling-Sun *et al.* bzw. 2009, Gekas *et al.* 2009) oder ob der Knockout erst zu einem späteren Zeitpunkt in der B-Zell-Entwicklung erfolgt, wie zum Beispiel ab dem späten CLP- (Debnath *et al.* 2013) oder dem proB-Zellstadium (Khiem *et al.* 2008, Wilker *et al.* 2008).

Mit Hilfe eines *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-VavCre*-Mausmodells konnte gezeigt werden, dass *Mef2c* einen direkten Einfluss auf die DNA-Reparatur, das VDJ-Rearrangement sowie das Zellüberleben hat und somit die B-Zell-Lymphopoese während Stresssituationen schützen kann (Wang *et al.* 2016).

In unserer Arbeitsgruppe wurde der Einfluss von *Mef2*-Proteinen auf die Hämatopoese ebenfalls untersucht. Da *Mef2d* eine große Homologie zu *Mef2c* besitzt, ein ähnliches hämatopoetisches Expressionsmuster aufweist (Abbildung 1.4) und zudem in verschiedenen akuten Formen der B-ALL als Translokation vorliegt, wurde neben *Mef2c* auch dieser Faktor analysiert. Wie es schon bei Debnath *et al.* beschrieben wurde, beeinträchtigt ein Einzel-Knockout von *Mef2c* mit Hilfe der *Cd79aCre*-Rekombinase die B-Zell-Differenzierung im Vergleich zu Kontroll-Mäusen kaum. Bei einem Gesamt-Knockout des *Mef2*-Transkriptionsfaktors *Mef2d* (*Mef2d<sup>-/-</sup>*) kann gar kein Effekt auf die B-Zell-Differenzierung identifiziert werden (Herglotz *et al.* 2016).

In unserer Arbeitsgruppe wurde zudem ein *Mef2c/Mef2d*-Doppel-Knockout-Mausmodell (*Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>*) generiert, um zu untersuchen, ob *Mef2c* und *Mef2d* gemeinsam einen stärkeren Einfluss auf die B-Zell-Entwicklung haben. Dabei wurde ein konstitutiver *Mef2d*-Knockout mit einem konditionalen *Mef2c*-Knockout kombiniert, in dem *Mef2c* ab den späten CLPs deletiert wurde (*Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-Cd79aCre*, siehe auch Abschnitt 3.1.10). Dieses *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-Cd79aCre*-Mausmodell wurde in der Forschungsgruppe Retrovirale Pathogenese ausführlich analysiert (Hauschildt, Masterarbeit 2012, Herglotz *et al.* 2016). Mit Hilfe von durchflusszytometrischen Analysen des Knochenmarks von *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-Cd79aCre*-Mäusen im Vergleich zu Kontroll-Mäusen konnte gezeigt werden, dass der Knockout von *Mef2c* und *Mef2d* ab den späten CLPs zu einem Differenzierungsblock führt, der die späten präB-Zellen sowie alle darauffolgenden Stadien der B-Zell-Entwicklung umfasst. Das davor gelegene proB-Zellstadium sowie die frühen präB-Zellen sind durch den Doppel-Knockout hingegen kaum beeinträchtigt (Abbildung 1.5). Weitere Analysen zeigten, dass *Mef2c* und *Mef2d* durch das Signaling des präBZR<sub>s</sub> translational modifiziert und so verstärkt aktiviert werden. Außerdem sind *Mef2c* und *Mef2d* für die Transition der präB-Zellen essentiell, indem sie verschiedene *Immediate Early Genes* (IEGs) regulieren. Unter ihnen sind zum Beispiel die Zielgene *Klf2*,

*Jun* oder *Irf4* (Herglotz *et al.* 2016). Auch der Transkriptionsfaktor Ikaros (*Ikzf*), ein wichtiger Regulator der B-Zell-Differenzierung, und *Rag1*, ein Gen, das für die Bildung des B-Zell-Rezeptors essentiell ist, wurden als Zielgene von *Mef2c* und *Mef2d* identifiziert (Hauschildt, Masterarbeit 2012).



**Abbildung 1.5: Differenzierungsblock des Mausmodells *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-Cd79aCre***

Im *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-Cd79aCre*-Mausmodell wird die Cre-Rekombinase ab den späten CLPs exprimiert. Dies führt zu einem Differenzierungsblock der B-Zell-Entwicklung, der im späten präB-Zellstadium beginnt und alle darauffolgenden B-Zell-Entwicklungsstadien im Knochenmark betrifft.

In unserer Arbeitsgruppe wurde ein weiteres *Mef2c/d*-Doppel-Knockout-Mausmodell generiert. In diesem Mausmodell sind *Mef2c* und *Mef2d* ab den hämatopoetischen Stammzellen deletiert (*Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-VavCre*-Mausmodell). Dieses Mausmodell wurde bisher noch nicht ausführlich untersucht. Erste Analysen zeigten aber, dass auch hier ein Differenzierungsblock der B-Zell-Entwicklung vorliegt. Dieser befindet sich allerdings sehr viel früher als bei einem Knockout von *Mef2c* und *Mef2d* ab den späten CLPs (Hauschildt, Masterarbeit 2012).

*Mef2c* und *Mef2d* sind somit nicht wie andere wichtige Transkriptionsfaktoren der B-Zell-Entwicklung (z.B. E2a, Ebf1, Runx1) allein an der B-lymphatischen Linienentscheidung in den CLPs beteiligt, sondern nehmen wahrscheinlich zu verschiedenen Zeitpunkten eine entscheidende Rolle in der B-Zell-Differenzierung ein: einerseits sind sie an der Transition der präB-Zellen beteiligt (*Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-Cd79aCre*-Mausmodell) und andererseits beeinflussen *Mef2c* und *Mef2d* die B-Zell-Entwicklung schon sehr viel früher und sind möglicherweise auch an der lymphatischen Linienentscheidung beteiligt (*Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-VavCre*-Mausmodell).

## 1.8 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen wurden erstmals in den 70er Jahren von Ralph Steinman und Zanvil Cohn beschrieben. Sie entdeckten in der Milz von Mäusen eine seltene Zellpopulation mit sternförmiger Morphologie und Zellausläufern (Steinman & Cohn 1973). In Anlehnung an das

griechische Wort für Baum (Δενδρον, Dendron), nannten sie diese Zellen dendritische Zellen (Steinman & Cohn 1973). Deren wichtige immunologische Funktion, von der Steinman von Beginn an überzeugt war, wurde über mehrere Jahre kritisch betrachtet. In weiteren Jahren intensiver Forschung konnte Steinman zusammen mit seinen Kollegen jedoch die einzigartige Stellung dieses neuen Zelltyps in der Immunologie beweisen. Er demonstrierte, dass dendritische Zellen sowohl MHC I- als auch MHC II-Moleküle auf ihrer Oberfläche tragen und potente Stimulatoren von T-Zellen sind (Steinman & Witmer 1978, Steinman *et al.* 1979, Nussenzweig *et al.* 1980). Außerdem zeigte Steinman, dass diese Zellen Antigene prozessieren und eine Antigen-spezifische zelluläre Immunantwort induzieren können (Nussenzweig *et al.* 1980).

Seine gesamte wissenschaftliche Laufbahn widmete Steinman den dendritischen Zellen und erforschte zuletzt unter anderem ihre Rolle bei der Therapie von Transplantationsabstoßungen, Autoimmunerkrankungen oder Infektionen. Für seine herausragende Arbeit auf dem Gebiet der dendritischen Zellen wurde Ralph Steinman 2011 posthum mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin ausgezeichnet (Mildner & Jung 2014).

### **1.8.1 Charakterisierung dendritischer Zellen**

Generell können dendritische Zellen aufgrund ihrer charakteristischen Morphologie und ihrer hohen Expression von MHC II-Molekülen und des Integrins CD11c identifiziert werden. Außerdem ist ihnen gemeinsam, dass sie aus peripheren Geweben in sekundär lymphatische Organe migrieren und dort naive T-Zellen aktivieren können. Diese Charakteristika sind jedoch nicht absolut und können sich unter bestimmten Bedingungen, wie Inflammation oder Infektion, verändern (Shortman & Naik 2007, Hashimoto *et al.* 2011, Mildner *et al.* 2013, Guilliams *et al.* 2014). So weisen beispielsweise auch andere Leukozyten eine charakteristische dendritische Morphologie auf (Ariotti *et al.* 2012). Die Morphologie der pDCs ähnelt hingegen eher der einer Plasmazelle. MHC II-Moleküle werden auch von B-Lymphozyten exprimiert und NK-Zellen tragen den DC-Oberflächenmarker CD11c auf ihrer Oberfläche. Auch die für dendritische Zellen herausragende Eigenschaft, naive T-Lymphozyten zu aktivieren, kann von anderen Zellpopulationen übernommen werden (Perie & Naik 2015).

Anhand einzelner Merkmale sind dendritische Zellen somit nicht einfach zu identifizieren. Mit der Gesamtheit ihrer zellulären Eigenschaften im Zusammenspiel mit der Analyse von spezifischen Oberflächenmarkern lässt sich die dendritische Linie jedoch gut analysieren und in ihre einzelnen Populationen unterteilen (vgl. auch Abschnitt 4.5.1).

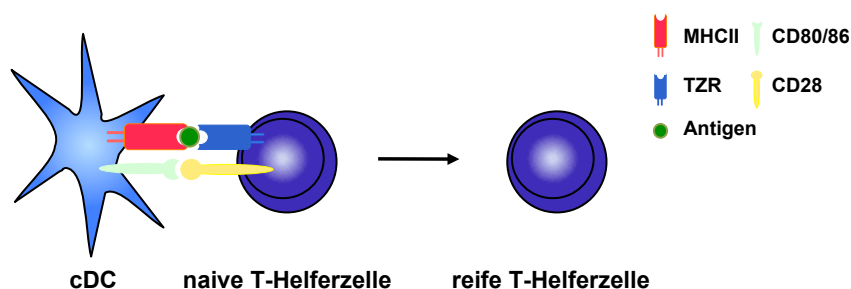


## 1.8.2 Subtypen dendritischer Zellen und ihre Funktion

Die von Steinman entdeckten und beschriebenen Zellen werden klassische dendritische Zellen (*classical dendritic cells*, cDCs) genannt. Daneben existieren auch nicht klassische dendritische Zellen. Zu ihnen gehören die plasmazytoiden dendritischen Zellen (*plasmacytoid dendritic cells*, pDCs), die dendritischen Zellen der monozytären Linie sowie die Langerhans-Zellen, die ebenfalls monozytären Ursprungs sind (Satpathy *et al.* 2012, Mildner & Jung 2014).

### 1.8.2.1 Klassische dendritische Zellen (cDCs)

cDCs sind hoch phagozytäre und spezialisierte antigenpräsentierende Zellen mit einer relativ geringen Überlebensdauer von 3 - 5 Tagen. Nachdem sie in der Peripherie Antigene erkannt und phagozytiert haben, migrieren sie über afferente lymphatische Gefäße in die T-Zell-Zonen von sekundär lymphatischen Organen. Im Zusammenspiel mit kostimulatorischen Molekülen induzieren cDCs die Aktivierung von naiven T-Zellen. Exemplarisch ist in Abbildung 1.6 die Aktivierung einer T-Helferzelle gezeigt. Die dendritische Zelle präsentiert auf einem MHCII-Molekül das prozessierte Antigen, welches vom T-Zellrezeptor (TZR) der naiven T-Helferzelle erkannt wird. Wenn auf der Oberfläche der dendritischen Zelle weitere kostimulatorische Signale, wie CD80 oder CD86, exprimiert sind, werden diese vom CD28-Molekül auf der Oberfläche des T-Lymphozyten erkannt und die T-Helferzelle wird aktiviert. Werden CD80 oder CD86 nicht exprimiert, geht die T-Helferzelle in einen anergischen Zustand oder in die Apoptose über. Die Interaktion mit CD80/86 kann mit Hilfe inhibitorischer Rezeptoren, wie zum Beispiel CTLA-4 unterdrückt werden. Wenn CTLA-4 auf der Oberfläche des zu aktivierenden T-Lymphozyten exprimiert wird, findet keine Aktivierung mehr statt, sondern der T-Lymphozyt geht in den Zellzyklusarrest über (Alegre *et al.* 2001, Müller-Newen & Petrides 2014).



**Abbildung 1.6: Aktivierung einer naiven T-Helferzelle durch eine dendritische Zelle**

Eine dendritische Zelle erkennt ein Antigen, phagozytiert und prozessiert es. Anschließend wird das Antigen in sekundär lymphatischen Organen auf einem MHCII-Molekül der naiven T-Helferzelle präsentiert. Diese erkennt das Antigen mit dem TZR. Sind weitere kostimulatorische Signale vorhanden, wie zum Beispiel die Interaktion von CD80/86 mit CD28, kommt es zur Aktivierung und Reifung der naiven T-Zelle. TZR: T-Zell-Rezeptor, CD: *Cluster of Differentiation*; MHC: Haupthistokompatibilitätskomplex. Adaptiert nach Alegre *et al.* 2001.

Die Aktivierung naiver CD4-positiver T-Helferzellen und CD8-positiver zytotoxischer T-Zellen ist nicht die einzige Aufgabe der cDCs. Sie aktivieren außerdem regulatorische T-

Lymphozyten (Tregs) und regen diese zur klonalen Expansion an. Auch die Toleranz von T-Lymphozyten gegenüber körpereigenen Antigenen wird durch dendritische Zellen vermittelt. Erkennt ein T-Lymphozyt mit seinem T-Zell-Rezeptor ein körpereigenes Antigen, das durch eine dendritische Zelle präsentiert wird, induzieren nachgeschaltete Signalwege im T-Lymphozyten die Apoptose (Reis e Sousa 2006). Die Funktion von B-Lymphozyten kann ebenfalls durch dendritische Zellen beeinflusst werden. Dies geschieht normalerweise durch komplexe Interaktionen, die auch Signale von bereits aktivierten T-Lymphozyten beinhalten. Dendritische Zellen induzieren zudem entweder durch Zell-Zell-Kontakt oder durch die Ausschüttung von Zytokinen die Aktivierung von NK-Zellen. Von dendritischen Zellen erzeugte Signale erleichtern außerdem die NK-Zell-medierte Zytolyse sowie die Produktion von Zytokinen seitens der NK-Zellen. Umgekehrt sind NK-Zellen an der Reifung und der Lyse von dendritischen Zellen beteiligt (Degli-Esposti & Smyth 2005, Marcenaro *et al.* 2012, Mahmood *et al.* 2015).

#### **1.8.2.2 Plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs)**

Die pDCs sind mit 0,3-0,5 % ein relativ seltener Vertreter der dendritischen Zellen in lymphatischen Organen (Reizis *et al.* 2011). Die primäre Funktion und einzigartige Eigenschaft der pDCs ist die Sekretion von Interferon Typ I (Inf- $\alpha/\beta$ ) als Antwort auf Viren oder von Viren stammenden Nukleinsäuren. pDCs haben im Gegensatz zu cDCs eine runde Morphologie, ähnlich der von sekretorischen Lymphozyten, und auch ihr Expressionsprofil ähnelt dem von Lymphozyten. So exprimieren pDCs beispielsweise den B-Lymphozyten-Marker B220, besitzen aber auch pDC-spezifische Oberflächenmarker wie PDCA (McKenna *et al.* 2005, Blasius *et al.* 2006, Reizis *et al.* 2011).

pDCs exprimieren endosomal die Toll-like Rezeptoren (TLRs) TLR7 und TLR9, die einzelsträngige bzw. unmethylierte CpG-haltige DNA erkennen. Auf diesen Stimulus antworten die pDCs mit einer schnellen und starken Interferon-Sekretion, die 1000-fach stärker ist als in anderen Zellpopulationen (Liu 2005). Des Weiteren sezernieren so aktivierte pDCs auch andere Zytokine, wie TNF- $\alpha$  oder Interleukin-12 (IL-12). Durch diese Vielfalt von Mediatoren aktivieren pDCs nicht nur T-Lymphozyten, sondern sind auch an der Rekrutierung und Aktivierung von anderen Immunzellen, wie zum Beispiel NK- oder Plasmazellen, beteiligt (Jego *et al.* 2003, Krug *et al.* 2004). So sorgen pDCs für eine konzertierte Immunantwort auf eine Virusinfektion und sind ein wichtiger Vermittler zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort.

#### **1.8.2.3 Dendritische Zellen der monozytären Linie**

In lymphatischen und nicht lymphatischen Geweben werden auch Zellen gefunden, die zwar monozytären Ursprungs sind, jedoch eine hohe Expression der dendritischen Oberflächenmarker MHCII und CD11c aufweisen. Aus diesem Grund werden solche Zellen

ebenfalls zu den dendritischen Zellen gezählt. Die Differenzierung der Monozyten ist dabei zeit- und kontextabhängig. Infiltrieren Monozyten das inflammatorische Gewebe zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion, an dem die bakteriellen Titer noch hoch und mikrobielle Produkte vorhanden sind, differenzieren sie vor allem in dendritische Zellen, die große Mengen an Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (*tumor-necrosis-factor- $\alpha$* , TNF $\alpha$ ) und induzierbarer Stickstoffmonoxid-Synthase (*inducible nitric oxide synthase*, iNOS) produzieren. Diese Zellen werden daher auch TNF $\alpha$ - und iNOS-produzierende Zellen (TipDCs) oder Effektor-Monozyten genannt. Mit abnehmenden bakteriellen Titern ändert sich das inflammatorische Milieu und Monozyten differenzieren vorrangig in sogenannte monozytäre DCs (moDCs). Diese Zellen wurden historisch primär durch ihre Expression von CD11c und CD11b als dendritische Zellen identifiziert, allerdings zeigen nicht alle Zellen dieser moDCs dendritische Eigenschaften, wie zum Beispiel die Fähigkeit zur Antigenpräsentation und die Aktivierung von T-Lymphozyten in sekundär lymphatischen Organen (Shortman & Naik 2007, Mildner *et al.* 2013, Segura & Amigorena 2013).

#### **1.8.2.4 Langerhans-Zellen (LC)**

Langerhans-Zellen sind dendritische Zellen in der Epidermis der Haut. Sie machen 3 - 5 % der epidermalen Zellen aus. LCs differenzieren sich ebenfalls aus Monozyten und ähneln gewebsspezifischen Makrophagen in vielerlei Hinsicht. So exprimieren sie beispielsweise den Makrophagen-spezifischen Oberflächenmarker F4/80 und zeigen insgesamt ein Genexpressionsprofil, das dem von Makrophagen sehr ähnlich ist. Sie besitzen aber eindeutig auch Eigenschaften dendritischer Zellen: Langerhans-Zellen phagozytieren Antigene der Haut und wandern in regionäre Lymphknoten ein, wo sie das prozessierte Antigen den Lymphozyten präsentieren und diese so aktivieren (Schuler & Steinman 1985, Wilson & Villadangos 2004).

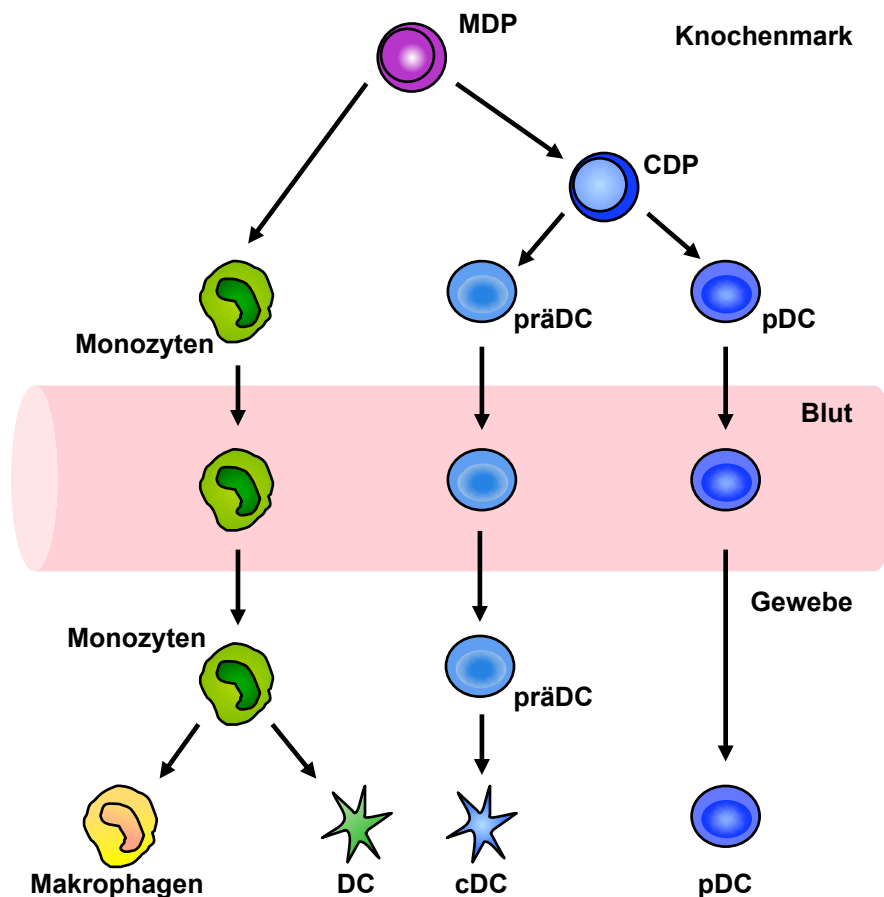
#### **1.8.3 Differenzierung der dendritischen Linie**

Dendritische Zellen sind wie alle Zellen des hämatopoetischen Systems kurzlebig und so müssen sie im Knochenmark kontinuierlich nachproduziert werden. Im klassischen Modell der DC-Entwicklung (Abbildung 1.7) entstammen dendritische Zellen und Makrophagen einem gemeinsamen bipotenten Vorläufer der myeloischen Linie (Poltorak & Schraml 2015). Dieser Makrophagen-und-Dendritische-Zellen-Progenitor (MDP) differenziert sich aus den GMPs und ist in der Lage, cDCs und pDCs sowie Makrophagen zu generieren, er hat jedoch das Potential verloren, sich in Granulozyten zu differenzieren (Fogg *et al.* 2006, Waskow *et al.* 2008, Auffray *et al.* 2009, Paul & Amit 2014). MDPs differenzieren weiter zu allgemeinen dendritischen Progenitoren (CDPs), die nur noch zur Generierung von pDCs und cDCs befähigt sind (Naik *et al.* 2007, Onai *et al.* 2007). pDCs differenzieren terminal im Knochenmark (Dursun *et al.* 2016). Sie verlassen das Knochenmark über das Blut und

gelangen als reife Zellen in die peripheren Organe (Reizis *et al.* 2011, Shortman & Sathe 2013). Für die Entwicklung von cDCs entsteht im Knochenmark hingegen ein cDC-Vorläufer (präDC), der lymphatische und nicht lymphatische Gewebe besiedelt und dort die für dieses Organ typischen cDCs generiert (Naik *et al.* 2006, Ginhoux *et al.* 2009, Liu *et al.* 2009).

Dendritische Zellen der monozytären Linie entwickeln sich aus Monozyten. Diese vervollständigen ihre Entwicklung wie die pDCs im Knochenmark und wandern ins Gewebe aus. Dort differenzieren sie weiter zu TipDCs oder moDCs wie in 1.8.2.3 beschrieben.

Die dendritische Zellentwicklung ist Gegenstand intensiver Forschung und nicht alle Aspekte des klassischen Modells sind vollständig geklärt. So konnten beispielsweise Sathe *et al.* 2014 in ihren Experimenten keine MDP-Population identifizieren, die nur auf die Differenzierung von Makrophagen und cDCs und pDCs begrenzt ist und postulieren, dass eine solche Population nicht existiert (Sathe *et al.* 2014).



**Abbildung 1.7: Klassisches Modell der dendritischen Zellentwicklung**

Nach dem klassischen Modell entstammen alle dendritischen Zellen der myeloischen Linie. Monozyten und dendritische Zellen entstehen dabei aus der bipotenten MDP-Population im Knochenmark. Diese differenziert sich im Knochenmark entweder weiter in Monozyten oder CDPs, den linienspezifischen Progenitoren der pDCs und cDCs. Monozyten wandern über das Blut ins Gewebe ein und differenzieren sich dort entweder in Makrophagen oder in dendritische Zellen der monozytären Linie. CDPs entwickeln sich im Knochenmark entweder weiter zu pDCs, die als reife Zellen ins Blut und weiter in die Peripherie auswandern, oder zu präDCs. präDCs wandern aus dem Knochenmark aus und gelangen an ihren Bestimmungsort in der Peripherie, wo sie in reife cDCs ausdifferenzieren. MDP: Makrophagen- und dendritische-Zellen-Progenitor; CDP: allgemeiner dendritischer Progenitor; DC: dendritische Zelle; pDC: plasmazytoide DC; cDC: klassische DC; präDC: cDC-Progenitor.

Auch die Herkunft der pDCs wird kontrovers diskutiert. In frühen Untersuchungen wurde gezeigt, dass sowohl Vorläuferzellen der lymphatischen Linie, wie zum Beispiel CLPs, als auch myeloische Vorläuferzellen bei einem Transfer in bestrahlte Mäuse, die Fähigkeit besitzen pDCs zu generieren (Manz *et al.* 2001, D'Amico & Wu 2003). Etwas später wurden außerdem in pDCs aus dem Knochenmark und der Milz von Mäusen *Gen-Rearrangements* detektiert, die normalerweise als Indikatoren für eine lymphatische Entwicklung gelten. So wurden sowohl die Expression von *RAG1* als auch *D-J-Rearrangements* im *IgH*-Lokus nachgewiesen (Corcoran *et al.* 2003, Pelayo *et al.* 2005). Eine weitere Studie zeigte, dass IL-7, ein Interleukin, dessen Signalwege essentiell für die Differenzierung der B-Lymphozyten sind, für die Differenzierung von cDCs und pDCs mitverantwortlich ist und folgerte, dass einige dendritische Zellen lymphatischer Abstammung sein müssten (Vogt *et al.* 2009).

Dem gegenüberstehend wurde in einer anderen Studie gezeigt, dass die in pDCs gefundenen *Gen-Rearrangements* nicht nur von lymphatischen sondern auch von myeloischen Progenitoren abstammen (Shigematsu *et al.* 2004). Hier postulierten die Untersucher, dass die *Rearrangements* somit nicht unbedingt ein Hinweis auf eine lymphatische Entwicklung der pDCs sind, sondern eher der Ähnlichkeit der Genexpression von pDCs und B-Lymphozyten geschuldet sind. Außerdem kam es zur Entdeckung der CDPs als gemeinsamen Progenitor der cDCs und pDCs, der von den GMPs abstammt und somit der myeloischen Linie zugeordnet wird. Aus diesem Grund wird auch für die pDCs bislang eine myeloische Differenzierung angenommen, wie sie im klassischen Modell der dendritischen Entwicklung zu finden ist (Abbildung 1.7).

#### **1.8.4 Transkriptionsfaktoren in der Differenzierung der pDCs**

Wie in 1.8.3 beschrieben ist die Differenzierung der dendritischen Linie noch nicht abschließend geklärt und insbesondere die Herkunft der pDCs wird diskutiert. Im Folgenden sollen wichtige Transkriptionsfaktoren der pDC-Differenzierung näher dargestellt werden. Zu ihnen gehören E2-2, Spi-B, Irf7/8, Runx2 und Bcl11a.

##### **1.8.4.1 E2-2 (*Tcf4*)**

Der Transkriptionsfaktor E2-2 gehört zusammen mit Heb, E12 und E47 zu den E-Proteinen, die wiederum Mitglieder der *basic helix-loop-helix*-Familie (bHLH-Familie) sind. Die vier E-Proteine werden durch drei Gene kodiert: E2-2 durch *Tcf4*, Heb durch *Tcf12* und E12 und E47 sind differentiell gespleißte Transkripte des *E2a*-Gens. E-Proteine formen Homo- und Heterodimere mit anderen Familienmitgliedern und binden die DNA bevorzugt an E-Box-Sequenzen (CANNTG), die ein Zytosin oder Guanosin in der mittleren Position tragen. Die Aktivität der E-Proteine wird durch Id-Proteine (Id1-Id4) antagonisiert. Sie gehören ebenfalls zur bHLH-Familie und können mit E-Proteinen Dimere bilden. Da sie jedoch keine DNA-Bindungsdomäne besitzen, bleiben solche Heterodimere funktionslos (Massari & Murre

2000, de Pooter & Kee 2010). Die Aktivität des Id-Proteins Id2 trägt so zum Beispiel zur Differenzierungsentscheidung zwischen cDCs und pDCs bei (Moore & Anderson 2013).

E12 und E47 sind wichtige Regulatoren in der Differenzierung von B-Lymphozyten. *E2a*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen einen vollständigen Verlust aller CD19-positiven B-Zell-Progenitoren und reifen B-Lymphozyten sowie wichtiger linienspezifischer Gene wie *Pax5*, *VpreB* oder *Rag1* (Massari & Murre 2000, Murre 2005). Gemeinsam mit Heb sind E12/E47 außerdem an der Regulation der T-Zell-Entwicklung beteiligt (Zhuang *et al.* 1996, Bergqvist *et al.* 2000, Wikstrom *et al.* 2006).

E2-2 wird als ein wichtiger Regulator der pDC-Differenzierung und Homöostase beschrieben. Im Gegensatz zu den anderen E-Proteinen wird E2-2 in pDCs stark exprimiert (Cisse *et al.* 2008). Eine frühe Deletion des E2-2-Gens (*Tcf4*) führt sowohl in der Maus als auch im Menschen zu einem Verlust der pDC-Population. Heterozygote *Tcf4*<sup>+/-</sup>-Mäuse weisen stark verminderte pDCs auf und besitzen zudem reduzierte Expressionslevel wichtiger direkter Zielgene für die pDC-Differenzierung. Unter ihnen sind *Tlr7*, *Tlr9*, *Irf7*, *Irf8*, *Spi-B* oder *Bcl11a* (Cisse *et al.* 2008, Ghosh *et al.* 2010). Außerdem ist eine kontinuierliche Expression von E2-2 in pDCs wahrscheinlich Voraussetzung, um ihr Zellschicksal beizubehalten. Ein Verlust von E2-2 in reifen pDCs führt nämlich zu einer Differenzierung der pDCs in cDC-ähnliche Zellen (Ghosh *et al.* 2010).

#### 1.8.4.2 Spi-B

Spi-B gehört zu der Ets-Transkriptionsfaktor-Familie, die insgesamt fast 30 Mitglieder umfasst und an einer Vielzahl physiologischer Prozesse beteiligt ist. Alle Mitglieder besitzen eine Ets-Domäne, die aus 85 Aminosäuren besteht und an Purin-reiche DNA-Motive mit einer GGAA/T-Kern-Konsensussequenz binden kann (Sasaki & Kaisho 2014). Zusammen mit Pu.1 und Spi-C gehört Spi-B zu einer Sub-Familie der Ets-Transkriptionsfaktoren mit hoher Sequenzhomologie, die im hämatopoetischen System zu finden ist (Sharrocks 2001).

Pu.1 ist ein zentraler Regulator der Hämatopoese. Ein Knockout von *Sfp1* (Pu.1) führt zu schweren Defekten in verschiedenen hämatopoetischen Linien (Bartel *et al.* 2000). Für Spi-C ist die genaue Funktion noch nicht bekannt, es wird jedoch angenommen, dass Spi-C ein negativer Regulator der B-Zell-Differenzierung ist (Li *et al.* 2015).

Spi-B ist ein Regulator der B-Zell-Entwicklung. Ein gemeinsamer Knockout von *Sfp1* (Pu.1) und *Spi-B* (Spi-B) in der B-Zell-Linie führt zu einer stark beeinträchtigten Differenzierung der B-Lymphozyten (Sokalski *et al.* 2011). Außerdem spielt Spi-B eine Rolle im B-Zell-Rezeptor-Signaling sowie in der T-Zell-abhängigen humoralen Immunantwort (Su *et al.* 1997). Des Weiteren wird Spi-B sowohl in murinen als auch humanen pDCs stark exprimiert (Schotte *et al.* 2003, Cisse *et al.* 2008). Bei der Betrachtung eines Knockouts von *Spi-B* zeigt sich eine Reduktion der pDCs (Sasaki *et al.* 2012) und ein *Knockdown* der humanen *SPI-B*.

*Expression* führt zu einer verminderten Zellzahl von pDCs (Schotte *et al.* 2004). Außerdem ist Spi-B in der Lage, Promotoren des IFN-Typ I zu transaktivieren und wirkt dabei synergistisch mit Irf7 zusammen.

#### 1.8.4.3 Irf7 und Irf8

Die *Interferon Regulatory Factor* (Irf) Transkriptionsfaktor-Familie besteht aus neun Mitgliedern. Sie alle besitzen N-terminal eine konservierte *helix-turn-helix*-DNA-Bindedomäne aus ca. 120 Aminosäuren, mit der ein *Interferon stimulated response element* (ISRE, Konsensussequenz: A/GNGAAANNGAAACT) gebunden werden kann. Mit der C-terminalen IRF-Assoziationsdomäne (IAD) können Irf-Transkriptionsfaktoren mit Familienmitgliedern oder anderen Transkriptionsfaktoren interagieren (Tamura *et al.* 2008). Die Irf-Familie besitzt vielfältige Aufgaben, insbesondere in der innat (angeborenen) Immunabwehr. Viele Irf-Faktoren lösen nach der Bindung konservierter Pathogenstrukturen an der Zelloberfläche (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPs) eine Immunantwort aus. Die Strukturen werden über sogenannte *pattern recognition receptors* (PRRs) erkannt, zu denen beispielsweise auch die TLRs gehören.

Die Hauptaufgabe von pDCs ist es, virale Infektionen zu erkennen und diese durch die Sekretion von Typ I Interferonen wie IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  zu bekämpfen. pDCs tragen auf ihrer Oberfläche die PRRs TLR7 und TLR9, die virale Nukleinsäuren binden können. Dies führt über eine Signalkaskade zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Irf7 und Irf8, die wiederum die Transkription der Interferon-Gene induzieren (Sasaki & Kaisho 2014).

Irf7 wird in hohem Maße in pDCs exprimiert und wird als Master-Regulator der TLR7/9-medierten Induktion von Typ I-Interferon-Genen in pDCs angesehen. Irf7 aktiviert insbesondere die Transkription des Gens für IFN $\alpha$  (*Ifna*) und wirkt dabei synergistisch mit Spi-B zusammen. Für die eigene Aktivierung muss Irf7 phosphoryliert werden und kann anschließend in den Nucleus translozieren, in welchem es an die Ziel-DNA bindet (Sasaki & Kaisho 2014).

Auch Irf8 wird stark in pDCs exprimiert und ein Knockout von *Irf8* führt zu einer Reduktion der pDCs (Schiavoni *et al.* 2002). Irf8 aktiviert vor allem das Gen für IFN $\beta$  und wirkt ebenfalls synergistisch mit Spi-B zusammen (Sasaki & Kaisho 2014).

#### 1.8.4.4 Runx2

Die Familie der *core binding factors* (CBFs) besteht aus drei Mitgliedern: Runx1, Runx2 und Runx3. N-terminal besitzen die Runx-Faktoren die Runt-Domäne, eine hochkonservierte DNA-Bindedomäne aus 128 Aminosäuren. Neben der Interaktion mit der DNA erfolgt über diese Domäne die Heterodimerisierung mit Cbfb (*core binding factor*  $\beta$ ), was die Bindung an die DNA noch verstärkt und den Komplex vor dem Abbau schützt. Die Deletion von *Runx*-Genen im Mausmodell zeigt die unterschiedlichen Funktionen der drei

Transkriptionsfaktoren. Ein *Runx1*-Knockout ist mit einem schweren Defekt der Hämatopoese assoziiert, der mit dem Verlust mehrerer Linien einhergeht. Der konditionale Knockout in der B-Zell-Linie zeigt außerdem, dass Runx1 ein essentieller Faktor der B-Zell-Differenzierung ist (Niebuhr *et al.* 2013). Ein konstitutiver Knockout von *Runx2* führt zu einer defekten Knochenformation und *Runx3*-Knockout-Mäuse weisen eine fehlerhafte Entwicklung zytotoxischer T-Zellen sowie gastrointestinale und neuronale Schädigungen auf (Chuang *et al.* 2013).

Neben seiner Funktion in der Osteogenese ist der Transkriptionsfaktor Runx2 auch in pDCs von Bedeutung. Hier reguliert Runx2 die Migration der pDCs in die Peripherie. Runx2 wird spezifisch in pDCs exprimiert und in *Runx2*-defizienten Mäusen sind die pDCs im Blut und in lymphatischen Geweben reduziert. Es konnte festgestellt werden, dass diese Verminderung peripherer pDCs auf die Reduktion des Chemokin-Rezeptors CCR5 zurückzuführen ist (Sawai *et al.* 2013).

#### 1.8.4.5 Bcl11a

Der Zink-Finger-Transkriptionsfaktor *B-cell chronic lymphocytic leukemia/lymphoma 11A* (*Bcl11a*) wurde erstmals in einer pädiatrischen chronischen lymphatischen Leukämie als Bruchstelle einer Translokation identifiziert und mittlerweile auch in weiteren B-Zell-Neoplasien mutiert vorliegend gefunden (Fell *et al.* 1986, Satterwhite *et al.* 2001, Mitelman *et al.* 2004). Fetale *Bcl11a*-defiziente Embryos weisen ein sehr stark vermindertes B-Zell-Kompartiment auf und auch die T-Zell-Differenzierung ist beeinträchtigt (Liu *et al.* 2003, Yu *et al.* 2012). Die pDCs werden ebenfalls durch *Bcl11a* reguliert. Der konstitutive Knockout von *Bcl11a* führt zum Verlust der pDCs in der fetalen Leber und Milz und ein durch die VavCre-Rekombinase generierter konditionaler Knockout führt zu einem starken Verlust der B-Lymphozyten und pDCs. Zu den direkten Zielgenen von *Bcl11a*, die in der humanen dendritischen Zelllinie CAL-1 identifiziert wurden, gehören unter anderem *Spi-B*, *Tcf4*, *Irf4* und *Id2* (Ippolito *et al.* 2014).



## 2 Fragestellung

In der Arbeitsgruppe Retrovirale Pathogenese wurden zwei Doppel-Knockout-Mausmodelle der Transkriptionsfaktoren *Mef2c* und *Mef2d* etabliert, ein *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-VavCre*- und ein *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-Cd79aCre*-Mausmodell. Für das *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-Cd79aCre*-Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *Mef2c* und *Mef2d* ab den späten CLPs zu einem Differenzierungsblock in der B-Zell-Linie führt und *Mef2c* und *Mef2d* durch die Regulation verschiedener Zielgene, wie zum Beispiel *Jun*, *Klf2* oder *Irf4*, die Transition der präB-Zellen regulieren (Hauschildt, Masterarbeit 2012, Herglotz *et al.* 2016).

Im *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-VavCre*-Mausmodell wurden *Mef2c* und *Mef2d* in allen hämatopoetischen Zellen deletiert. Dieses Mausmodell wurde bislang jedoch noch nicht ausführlich untersucht. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit der in diesem Mausmodell ebenfalls bestehende Differenzierungsblock der B-Zell-Differenzierung mit Hilfe durchflusszytometrischer Analysen erstmals genauer charakterisiert werden.

Zudem sollte erstmals analysiert werden, wie sich der *Mef2c/d*-Doppel-Knockout auf alle Linien der hämatopoetischen Entwicklung auswirkt. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie sollten neben der B-Zell-Linie die weiteren lymphatischen Linien (NK-Zellen, T-Lymphozyten) sowie die myeloischen Progenitoren und reifen Zellen untersucht werden. Ein besonderes Augenmerk sollte auch auf die dendritische Entwicklung gelegt werden. Da für die pDC-Differenzierung neben der klassischen myeloischen Abstammung auch ein lymphatischer Ursprung diskutiert wird, sollte der Einfluss des *Mef2c/d*-Doppel-Knockouts einerseits auf die Populationsgrößen des dendritischen Kompartiments und andererseits auf das Differenzierungspotential von Knochenmarkzellen in die Richtung dendritischer Zellen überprüft werden.

Mit Hilfe genomweiter Genexpressionsanalysen (*RNA-Sequencing*) sollten schließlich potentielle Zielgene von *Mef2c* und *Mef2d* identifiziert werden, die Hinweise auf mögliche Regulationsmechanismen dieser beiden Transkriptionsfaktoren geben könnten.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

Sofern nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien von den Firmen Merck Millipore (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Taufkirchen) bezogen. Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Becton Dickinson (Heidelberg), Braun (Tuttlingen), Greiner (Solingen), Sarstedt (Nümbrecht) und TPP (Trasadingen, Schweiz) verwendet.

##### 3.1.1 Geräte

Brutschrank <i>HeraCell™ 15</i>	Hereaus (Hanau)
Durchflusszytometer <i>FACSCanto</i>	Becton Dickinson (Heidelberg)
Durchflusszytometer <i>FACSCanto II</i>	Becton Dickinson (Heidelberg)
Durchflusszytometer <i>FACSAria</i> mit Sortierfunktion	Becton Dickinson (Heidelberg)
Elektrophorese-System <i>Perfect Blue Mini S</i>	PeqLab Biotechnologie (Erlangen)
Geldokumentation-System <i>BioDoc Analyze</i>	Biometra (Göttingen)
Heizblock <i>Thermomixer compact</i>	Eppendorf (Hamburg)
Light Cycler <i>LightCycler® 480 II</i>	Roche (Mannheim)
Magnetrührer <i>RCT basic</i>	IKA-Werke (Staufen)
Mikroskop <i>Zeiss IM</i>	Zeiss (Oberkochen)
pH-Meter <i>Typ CD842</i>	Schott (Mainz)
Photometer <i>Nanodrop® ND-100</i>	New Brunswick Scientific (Edison, USA)
Sequenzierplattform <i>HiSeq 2500</i>	Illumina (San Diego, USA)
Sicherheitswerkbank <i>Herasafe™</i>	Thermo Scientific (Karlsruhe)
Thermodrucker <i>Mitsubishi P95 DE</i>	Biometra (Göttingen)
Tischzentrifuge <i>5415D</i>	Eppendorf (Hamburg)
Vortexer <i>Vortex-2 Gene</i>	Scientific Industries (Bohemia, USA)
Waage <i>PG503-S DeltaRange®</i>	Mettler Toledo (Gießen)

##### 3.1.1.1 Software

Geräte-Software

BioDoc Analyze	Version 2.67.0.6
FACSCanto	BD FACS Diva™ Software v.5.0.3
FACSCanto II	BD FACS Diva™ Software v.6.1.3
FACSAria	BD FACS Diva™ Software v.6.1.3

HiSeq 2500	Version HCS 2.6.68
LightCycler® 480 II	Version 1.5.039
Nanodrop®	Version 3.8.1

Software für bioinformatische Analysen

Sequenz-Alignment	Bowtie 2, Version 2.2.4
-------------------	-------------------------

### 3.1.2 Kits

EasySep™ Mouse Hematopoietic Progenitor Cell Enrichment Kit	StemCell Technologies (Köln)
PeqGOLD TriFast	PEQLab (Erlangen)
Light Cycler® 480 SYBR Green I Master (2x)	Roche (Mannheim)

### 3.1.3 Reagenzien und Lösungen für die Zellkultur

β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (München)
<i>Fetal calf serum</i> (FCS)	Biochrom (Berlin)
<i>Fetal calf serum</i> (FCS)	PAA (Pasching, Österreich)
Glutamin (200 mM)	Sigma-Aldrich (München)
HEPES (1 M)	PAA (Pasching, Österreich)
Natrium-Pyruvat (100 mM)	PAA (Pasching, Österreich)
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA (Pasching, Österreich)

### 3.1.4 Lösungen für die Mausversuche

Pharm Lyse™ Lysing Buffer (10x)	Becton Dickinson (Heidelberg)
Isofluran (Forene®, 100 % (v/v))	Abbott (Wiesbaden)

### 3.1.5 Medien und Puffer für die Zellkultur

PBS (1x)	140 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,4
PBS/FCS	PBS (1x), 2% (v/v) FCS (Biochrom)
PBS/FCS/EDTA	PBS (1x), 2 % (v/v) FCS (Biochrom), 1 mM EDTA
RPMI	RPMI, 10 % (v/v) FCS (Biochrom), Glutamin (2 mM), Natrium-Pyruvat (1mM), β-Mercaptoethanol (50 µM), 1 % (v/v) Penicillin-Streptomycin

### 3.1.6 Zytokine

Humaner FLT3-Ligand (hFLT3L; Stock: 100 ng/µl)	Peprtech (Hamburg)
Murines GM-CSF (mGM-CSF; Stock: 100 ng/µl)	Peprtech (Hamburg)

### 3.1.7 Reagenzien für DNA-analytische Methoden

LE Agarose	Biozym Scientific GmbH (Oldendorf)
Ethidiumbromid (1 %)	Merck (Darmstadt)
DNA-Loading Dye (6x)	Fermentas (St. Leon-Rot)
GeneRuler 100 bp Plus Ladder	Thermo Scientific (Karlsruhe)
TAE (1x)	40 mM Tris; 1 mM EDTA; 20 mM Essigsäure; pH 8,0

### 3.1.8 Enzyme und Reagenzien für cDNA-Synthese und Realtime-PCR

AMV Reverse Transkriptase (10000 U/ml)	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)
AMV Reverse Transkriptase Puffer (10x)	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)
dNTP-Mix (je 10 mM)	Qiagen (Hilden)
Primer Random (50 A <sub>260</sub> Units)	Roche (Mannheim)
rRNasin <sup>®</sup> Plus RNase Inhibitor	Promega (Mannheim)

### 3.1.9 Antikörper

Tabelle 3.1: Fluoreszenz-markierte Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antigen	Klon	Fluorochrom	Katalognummer	Hersteller
CD3ε	145-2C11	FITC	100306	BioLegend
CD4	GK1.5	Biotin	100404	BioLegend
CD5	53-7.3	Biotin	100604	BioLegend
CD8a	53-6.7	Biotin	100704	BioLegend
CD11b	M1/70	Biotin	101204	BioLegend
CD11c	N418	APC	117310	BioLegend
CD16/32	93	PE	101308	BioLegend
CD19	6D5	PE-Cy7	115520	BioLegend
CD19	6D5	FITC	115506	BioLegend
CD34	MC14.7	FITC	MCA1825FB	AbDSerotec
CD41	MWReg30	FITC	553848	BD Biosciences
CD43	1B11	APC	121214	BioLegend
CD45R (B220)	RA3-6B2	APC-Cy7	103224	BioLegend
CD105	MJ7/18	Pacific Blue	120412	BioLegend
CD106 (VCAM)	429 (MVCAM.A)	APC	105718	BioLegend
CD115	AFS98	APC	135510	BioLegend
CD117	2B8	FITC	105806	BioLegend

CD117	2B8	PE	105808	BioLegend
CD117	2B8	APC	105812	BioLegend
CD127	B12-1	Biotin	555288	BD Biosciences
CD135	A2F10	PE	135306	BioLegend
CD150	TC5-12F12.2	Biotin	115908	BioLegend
CD150	TC5-12F12.2	PE-Cy7	115914	BioLegend
CD202	TEK4	Biotin	124006	BioLegend
CD317 (PDCA)	JF05-1C2.4.1	PE	130-091-962	Miltenyi Biotech
Gr1	RB6-8C5	Biotin	108404	BioLegend
Igκ	187.1	FITC	550003	BioLegend
Igλ	R26-46	FITC	553434	BD Biosciences
NK1.1	PK136	Biotin	108704	BioLegend
NK1.1	PK136	FITC	108706	BioLegend
Sca-1	D7	PE-Cy7	108114	BioLegend
Sca-1	E13-161.7	Biotin	553334	BD Biosciences
Ter119	TER-119	Biotin	116204	BioLegend
Ter119	TER-119	FITC	116206	BioLegend

**Tabelle 3.2: Übersicht aller für die quantitative Realtime-PCR eingesetzten Oligonukleotide**

Für alle PCR-Ansätze wurde dasselbe PCR-Programm verwendet. Nach einer initialen Denaturierung bei 95 °C wurden 40 Zyklen mit Denaturierung, Hybridisierung und Elongation für jeweils 10 Sekunden durchgeführt. Im letzten Schritt wurde die Temperatur schrittweise auf 95 °C erhöht.

Zielgen	Bezeichnung	Fragmentgröße	Annealing-Temperatur	Sequenz (5' → 3')
Hprt	MKF35 (f) MKF36	250 bp	60 °C	GCTGGTGAAAAGGACCTCT CACAGGACTAGAACACCTGC
Ebf1	cs1503 cs1504	202 bp	60 °C	CGGAAATCCAACCTTCTTCCA GGCGCACATAGAAATCCTGT
Pax5	cs814 cs815	217 bp	60 °C	ACTTGCCCATCAAGGTGTC CTGATCTCCCAGGCAAACAT

### 3.1.10 Mausstämme

Die Zucht und Genotypisierung der analysierten Mäuse erfolgte durch U. Müller (Forschungsgruppe Retrovirale Pathogenese, Heinrich-Pette-Institut).

#### 3.1.10.1 *Mef2c<sup>fl/fl</sup>Mef2d<sup>-/-</sup>-VavCre*

In dieser Arbeit wurden überwiegend Mäuse der Linie *Mef2c<sup>fl/fl</sup>Mef2d<sup>-/-</sup>-VavCre* verwendet. Sie werden im weiteren Verlauf *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>-VavCre* bzw. *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>* genannt. Dieses

Mausmodell wurde in der Arbeitsgruppe Retrovirale Pathogenese durch die Verpaarung der Mausstämme *Mef2d*<sup>-/-</sup> (Kim *et al.* 2008) und *Mef2c*<sup>fl/fl</sup> (Lin *et al.* 1997) und mit dem Mausstamm, welches das Transgen VavCre (Stadtfeld & Graf 2005) beinhaltet, generiert. Im *Mef2d*<sup>-/-</sup>-Mausmodell ist das Exon 3 von *Mef2d* konstitutiv deletiert, sodass im gesamten Organismus kein funktionsfähiger Mef2d-Transkriptionsfaktor exprimiert wird. Da ein vollständiger Verlust des Transkriptionsfaktors Mef2c bereits in der Embryonalentwicklung letal ist, wurde ein konditionaler Knockout von *Mef2c* durchgeführt. Hierfür wurden *Mef2c*<sup>fl/fl</sup>-Mäuse, bei denen das Exon 2 durch zwei loxP-Stellen flankiert ist, mit einem VavCre-Mausmodell verpaart. Durch die Cre-Rekombinase wird das loxP-flankierte Exon herausgeschnitten, sodass der Leserahmen des *Mef2c*-Gens verschoben wird und kein funktionales Mef2c-Protein gebildet kann. Im VavCre-Mausmodell steht die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Vav-Promotors. Dieser Promotor wird ab den HSC exprimiert und somit betrifft die Deletion von Mef2c das gesamte hämatopoetische Kompartiment.

Für alle Analysen wurden Mäuse im Alter von 8 bis 14 Wochen verwendet. VavCre-Mäuse (*Mef2c/d*<sup>+/+</sup>-VavCre) desselben Geschlechts und Alters dienten als Kontrollen.

### 3.1.10.2 *Mef2c*<sup>fl/fl</sup>*Mef2d*<sup>-/-</sup>-Cd79a<sup>hCre/+</sup>

Neben dem *Mef2c/d*<sup>Δ/Δ</sup>-VavCre-Mausmodell wurden auch Mäuse des Stammes *Mef2c*<sup>fl/fl</sup>*Mef2d*<sup>-/-</sup>-Cd79a<sup>hCre/wt</sup> verwendet, die in dieser Arbeit *Mef2c/d*<sup>Δ/Δ</sup>-Cd79aCre genannt werden. Dieses Mausmodell wurde ebenfalls in der Arbeitsgruppe Retrovirale Pathogenese etabliert. Die Verpaarung erfolgte wie im *Mef2c/d*<sup>Δ/Δ</sup>-VavCre-Mausmodell mit *Mef2c*<sup>fl/fl</sup>- (Lin *et al.* 1997) und *Mef2d*<sup>-/-</sup>-Mäusen (Kim *et al.* 2008). Außerdem wurde das Cd79aCre-Mausmodell verwendet (Hobeika *et al.* 2006). Bei diesem steht die Cre-Rekombinase unter der Regulation des Cd79a- (Mb1Cre-) Promotors, der ab den späten CLPs exprimiert wird. Eine Deletion von Mef2c findet in diesem Mausmodell somit zu einem späteren Zeitpunkt statt als im VavCre-Mausmodell.

Auch hier wurden für die Analysen Mäuse im Alter von 8 bis 14 Wochen verwendet und Cd79a<sup>hCre/wt</sup>-Mäuse (*Mef2c/d*<sup>+/+</sup>-Cd79aCre) desselben Geschlechts und Alters dienten als Kontroll-Mäuse.

### 3.1.11 Zellen

Mäusen der in 3.1.10 beschriebenen Mausstämme wurden Knochenmarkzellen aus Femur und Tibia entnommen und zur *in vitro* Differenzierung dendritischer Zellen verwendet (3.2.2.1).

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Tier-experimentelle Methoden

#### 3.2.1.1 Isolierung muriner Knochenmarkzellen

5 – 16 Wochen alte Mäuse wurden unter Verwendung des volatilen Anästhetikums Isofluran in eine Inhalationsnarkose versetzt und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Die Tiere wurden in 80 % igem (v/v) Ethanol (EtOH) semi-sterilisiert und Femora und Tibiae unter der Sicherheitswerkbank freigelegt. Anschließend wurde das Knochenmark mit Hilfe einer 1 ml-Spritze sowie einer Kanüle (23 Gauge) isoliert, indem die Knochen mit PBS/FCS durchspült und die Zellen durch mehrfaches Auf- und Abziehen der Suspension vereinzelt wurden. Nach Zentrifugation für 5 Minuten bei 300 x g und Raumtemperatur wurden die Zellen in PBS/FCS aufgenommen und gezählt.

#### 3.2.1.2 Anreicherung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen

Die Anreicherung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen aus isoliertem Knochenmark erfolgte durch das EasySep™ *Mouse Hematopoietic Progenitor Cell Enrichment Cell Kit*, wobei alle Arbeitsschritte nach Herstellerangaben durchgeführt wurden.

Das isolierte Knochenmark wurde zunächst mit biotinylierten Antikörpern gegen spezifische Oberflächenantigene reifer Zellen des Knochenmarks (CD5, CD11b, CD19, B220, Gr-1, Ter119, 7-4) markiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit bispezifischen, tetrameren Antikörperkomplexen (*Tetrameric Antibody Complexes, TACs*), die sowohl Biotin als auch Dextran binden. Durch die Zugabe Dextran-konjugierter, magnetischer Mikropartikel und Inkubation in einem Magneten wurden hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen angereichert und die reifen Zellen des Knochenmarks depletiert.

Die isolierten Stamm- und Vorläuferzellen wurden weiter durchflusszytometrisch analysiert bzw. sortiert (s. Abschnitt 3.2.2.2 bzw. 3.2.2.3).

### 3.2.2 Zellbiologische Methoden

Die Kultivierung von Zellen erfolgte bei 37 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % in einer 5 % igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. Wenn nicht anders beschrieben, wurde mit vorgewärmten Medien und Lösungen gearbeitet. Für einen Waschschrift wurden die Zellen für 5 Minuten bei 300 x g und Raumtemperatur zentrifugiert, in 1 ml PBS resuspendiert, anschließend erneut zentrifugiert und in geeignetem Medium aufgenommen.

#### 3.2.2.1 In vitro Differenzierung dendritischer Zellen

Die Differenzierung plasmazytoider bzw. konventioneller dendritischer Zellen (pDCs bzw. cDCs) aus murinem Knochenmark erfolgte nach einem adaptierten Protokoll (Bornstein *et al.* 2014).

Hierfür wurde zunächst das Knochenmark 6 - 8 Wochen alter VavCre- bzw. *Mef2c<sup>fl/fl</sup>Me2fd<sup>-/-</sup>*-VavCre-Mäuse, wie in Abschnitt 3.2.1.1, beschrieben isoliert. Für die Lyse der Erythrozyten wurden die Knochenmarkzellen in 2 ml PharmLyse-Puffer (1 x) für 2 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von 8 ml PBS gestoppt.

Für die Differenzierung von pDCs wurden  $1 \times 10^7$  Knochenmarkzellen in einer 10 cm Petrischale in 10 ml RPMI-Medium, das mit 100 ng/ml hFLT3L versetzt wurde, kultiviert. An Tag 2, 5 und 7 erfolgte die weitere Zugabe von 3 ml RPMI-Medium (+ 100 ng/ml hFLT3L).

Zur Differenzierung von cDCs wurden  $2 \times 10^6$  Knochenmarkzellen ebenfalls in einer 10 cm Petrischale ausgesät. Die Kultivierung erfolgte jedoch in 10 ml RPMI-Medium mit 20 ng/ml mGM-CSF. Weitere 10 ml RPMI-Medium (+ 20 ng/ml mGM-CSF) wurde an Tag 2 hinzugefügt. An Tag 5 wurden 15 ml Überstand abgenommen und für 5 Minuten bei  $300 \times g$  und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml RPMI-Medium (+ 20 ng/ml mGM-CSF) resuspendiert und wieder auf die verwendete Platte gegeben. An Tag 7 wurden weitere 5 ml RPMI-Medium (+ 20 ng/ml mGM-CSF) hinzugefügt.

Die Erfolgskontrolle der Differenzierung erfolgte sowohl für die pDCs als auch für die cDCs an Tag 10. Die Suspensionszellen wurden vorsichtig abgenommen und nach dem Zählen der Zellen mittels FACS-Analyse untersucht (s. Abschnitt 3.2.2.2).

### 3.2.2.2 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Die Durchflusszytometrie (*Fluorescent Activated Cell Sorting*- (FACS-) Analyse) ist eine Methode, um Zellen in Einzelzellsuspension hinsichtlich ihrer Größe und Struktur, aber auch hinsichtlich ihrer Fluoreszenzeigenschaften zu charakterisieren. Die Zellen werden hierfür in einem Flüssigkeitsstrom mit sehr hoher Geschwindigkeit durch das Durchflusszytometer geleitet. Jede Zelle passiert einzeln den Laserstrahl und das dabei entstehende Streulicht oder Fluoreszenzsignal kann detektiert werden.

Je nachdem in welchem Winkel das Streulicht gemessen wird, können unterschiedliche Informationen generiert werden. Das Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter*, FSC) ist ein Maß für die Beugung im flachen Winkel und korreliert mit der Größe der Zelle. Beim Seitwärtsstreulicht (*Side Scatter*, SSC) wird das Licht hingegen im rechten Winkel gebrochen und beispielsweise von der Dichte, der Beschaffenheit des Zellkerns oder der Granularität der Zelle beeinflusst.

Des Weiteren können mit Hilfe der FACS-Analyse Fluoreszenzsignale detektiert werden, die zuvor mit Hilfe spezifischer Antikörper an die Zelle gekoppelt wurden. Um mehr als einen Fluoreszenzfarbstoff gleichzeitig detektieren zu können, müssen die überlappenden Emissionsspektren der einzelnen Fluorochrome berechnet werden. Hierfür wurde die automatische Kompensationsfunktion des Durchflusszytometers verwendet.



Für die FACS-Analyse wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und in 500 µl PBS aufgenommen. Für die Färbung mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern wurden pro  $1 \times 10^6$  Zellen je 0,2 bis 0,5 µg Antikörper verwendet und die Ansätze für mindestens 30 Minuten bei 4 °C und im Dunkeln inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift mit PBS wurde die Zellen in 300 µl PBS resuspendiert und durchflusszytometrisch analysiert.

### **3.2.2.3 Durchflusszytometrische Sortierung**

Ein Durchflusszytometer mit Sortierfunktion, wie das FACSAria, ist neben der Detektion von Zellpopulationen mit Hilfe von Streu- und Fluoreszenzsignalen (s. 3.2.2.2) in der Lage, diese auch zu isolieren.

Indem der Probenstrom in hochfrequente Schwingung versetzt wird, entstehen einzelne Flüssigkeitströpfchen in konstantem Abstand zueinander, wobei jedes Tröpfchen eine einzelne Zelle enthält. Durch Anlegung einer Spannung können diese Tröpfchen in einem nachgeschalteten elektrischen Feld so abgelenkt werden, dass die Zellen mit den gewünschten Eigenschaften in verschiedene Auffanggefäße sortiert werden.

Die Probenvorbereitung erfolgte wie in Abschnitt 3.2.1.1 beschrieben. Die sortierten Zellen wurden für 5 Minuten bei 300 x g und Raumtemperatur zentrifugiert und in PeqGOLD TriFast (PeqLab, Erlangen) resuspendiert. Im Anschluss erfolgte entweder die RNA-Isolierung wie in Abschnitt 3.2.3.1 beschrieben oder die Zellen wurden bis zur weiteren Verarbeitung in PeqGOLD TriFast (PeqLab, Erlangen) bei -20 °C eingefroren.

## **3.2.3 Nukleinsäure-analytische Methoden**

### **3.2.3.1 RNA-Isolierung**

Für die RNA-Isolierung aus zuvor sortierten Knochenmarkzellen (s. Abschnitt 3.2.2.3) wurden  $5 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen in 1 ml PeqGOLD TriFast (PeqLab, Erlangen) aufgenommen. PeqGOLD TriFast enthält Phenol und Guanidinisothiocyanat, das die Zellen lysiert und RNAsen inaktiviert. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden 200 µl Chloroform zugegeben und der Ansatz 15 Sekunden lang geschüttelt. Nach einer weiteren Inkubation für 3 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte die Zentrifugation bei 12000 x g und 4 °C für 15 Minuten und eine Phasentrennung wurde sichtbar. Die obere wässrige RNA-haltige Phase wurde vorsichtig in ein neues Gefäß überführt. Die DNA-haltige Interphase sowie die untere Protein-haltige Chloroform-Phase wurden verworfen. Die Präzipitation der RNA erfolgte mit 600 µl Isopropanol bei einer Zentrifugation von 12000 x g und 4 °C für 15 Minuten. Anschließend wurde das RNA-Pellet mit 1 ml 75 % igem (v/v) EtOH gewaschen, indem erneut für 15 Minuten bei 12000 x g und 4 °C zentrifugiert wurde. Nach Trocknung des Pellets wurde die RNA in 20 µl RNAase-freiem

Wasser aufgenommen und mit 1 µl RNase-Inhibitor versetzt. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei 55 °C erfolgte die photometrische Konzentrationsbestimmung am Nanodrop.

### 3.2.3.2 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Reverse Transkriptasen sind RNA-abhängige DNA-Polymerasen, die gleichzeitig eine RNase-H- sowie eine DNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität besitzen. Unter Verwendung von *Random*-Primern (Primer Random pd(N)<sub>6</sub>, Roche, Mannheim) erfolgt die Synthese eines komplementären (cDNA-) Stranges. Der noch vorhandene RNA-Strang wird durch die RNase-H-Aktivität degradiert und mit Hilfe der DNA-abhängigen DNA-Polymerase-Aktivität durch einen weiteren cDNA-Strang ersetzt.

Für die cDNA-Synthese wurden 1 µg der zuvor isolierten Gesamt-RNA eingesetzt (s. Abschnitt 3.2.3.1). Diese wurde zusammen mit 10 U AMV Reverse Transkriptase (New England Biolabs, Frankfurt a.M.), AMV Reverse Transkriptase Puffer (10 x), 1 µl *Random*-Primern (Roche, Mannheim), 10 mM dNTPs (Qiagen, Hilden) und 40 U rRNase Inhibitor (Promega, Mannheim) in einem 20 µl-Ansatz mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt und für eine Stunde bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurde die cDNA entweder bei -20 °C gelagert oder direkt für die quantitative Realtime-PCR eingesetzt.

Für die qRT-PCR wurden die LSK-Populationen von acht verschiedenen *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>*- bzw. *Mef2c/d<sup>+/+</sup>*-Mäusen isoliert, gepoolt und anschließend für die cDNA-Synthese eingesetzt.

### 3.2.3.3 Quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR ist eine auf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) basierenden molekularbiologische Methode, die es erlaubt, die Transkriptmenge gemessener Gene relativ zu quantifizieren. Die Transkripte wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Sybr Green detektiert. Sybr Green interkaliert mit doppelsträngiger DNA, wobei das Fluoreszenzsignal mit zunehmender DNA-Menge ansteigt.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode nach Pfaffl, wobei das *Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase*- (*Hprt*-) Gen als Referenzgen zur Normalisierung verwendet wurde (Pfaffl 2001). Die mRNA-Expression der untersuchten Zielgene in VavCre-Mäusen wurde auf 1 gesetzt und die Expression in *Mef2c<sup>fl/fl</sup>Mef2d<sup>-/-</sup>*-VavCre-Mäuse im Vergleich zum Wildtyp bestimmt.

Für die qRT-PCR wurde das Light Cycler® 480 SYBR Green I Master Kit (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben verwendet. Sie erfolgte in einem 10 µl-Ansatz, in dem 1 µl cDNA (s. 3.2.3.2) sowie 5 pmol des *forward*- und des *reverse*-Primer eingesetzt wurden. Für alle RT-PCRs wurde dasselbe PCR-Programm verwendet (Tabelle 3.2). Auf eine initiale Denaturierung bei 95 °C folgten 40 Zyklen mit Denaturierung (10 Sekunden), Primer-Hybridisierung (10 Sekunden), Elongation (10 Sekunden). In einem letzten Schritt wurde die

Temperatur schrittweise auf 95 °C erhöht, um die für jedes PCR-Produkt spezifische Schmelzkurve zu generieren.

#### 3.2.3.4 Agarose-Elektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese können Nukleinsäure-Fragmente ihrer Größe nach getrennt werden. Nukleinsäuren wandern aufgrund ihres negativ geladenen Phosphat-Rückgrats in einer Elektrophoresekammer in Richtung Kathode. Kleinere Fragmente gelangen dabei schneller durch die Poren im Agarosegel und werden so von größeren Fragmenten getrennt. Zur Detektion der Fragmente wurde das Agarosegel mit Ethidiumbromid (Merck, Darmstadt) versetzt, einem Farbstoff, der mit Nukleinsäuren interkaliert und unter UV-Licht sichtbar gemacht werden kann.

Zur Überprüfung der qRT-PCR erfolgte eine Detektion der PCR-Produkte durch eine Gelelektrophorese in einem 2 % igen Agarosegel in TAE-Puffer (1 x) bei ca. 90 V. Die Ansätze der qRT-PCR wurden hierfür mit DNA-Loading Dye (Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt und vollständig auf das Agarosegel aufgetragen. Die Bestimmung der Fragmentgröße erfolgte durch Vergleich mit dem ebenfalls aufgetragenen GeneRuler 100 bp Plus Ladder (Thermo Scientific, Karlsruhe).

#### 3.2.3.5 RNA-Sequencing

Um die Genexpression des *Mef2c<sup>fl/fl</sup>Me2fd<sup>-/-</sup>*-VavCre-Mausmodells mit der des VavCre-Wildtyps zu vergleichen, wurde aus sortierten Lin<sup>-</sup>Sca<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>- (LSK-) Populationen die RNA mit Hilfe des PeqGOLD TriFast Kits isoliert (s. Abschnitt 3.2.3.1).

Für die Erstellung einer cDNA-Bibliothek wurde das TruSeq RNA Prep Kit (Illumina, San Diego, USA) verwendet, wobei 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt wurden. Nach der Isolierung der mRNA mit Hilfe einer PolyA-Selektion wurde diese chemisch fragmentiert und anschließend unter Verwendung von *random* Hexamer-Primern in cDNA umgeschrieben. Nach der Ligation von Adaptermolekülen an die fragmentierte cDNA erfolgte die Sequenzierung durch die Sequenzierplattform *Genome Analyzer IIx* (Illumina, San Diego, USA). Für das Alignment an murine cDNA (mm9/UCSC) wurde das Programm Bowtie II verwendet.

## 4 Ergebnisse

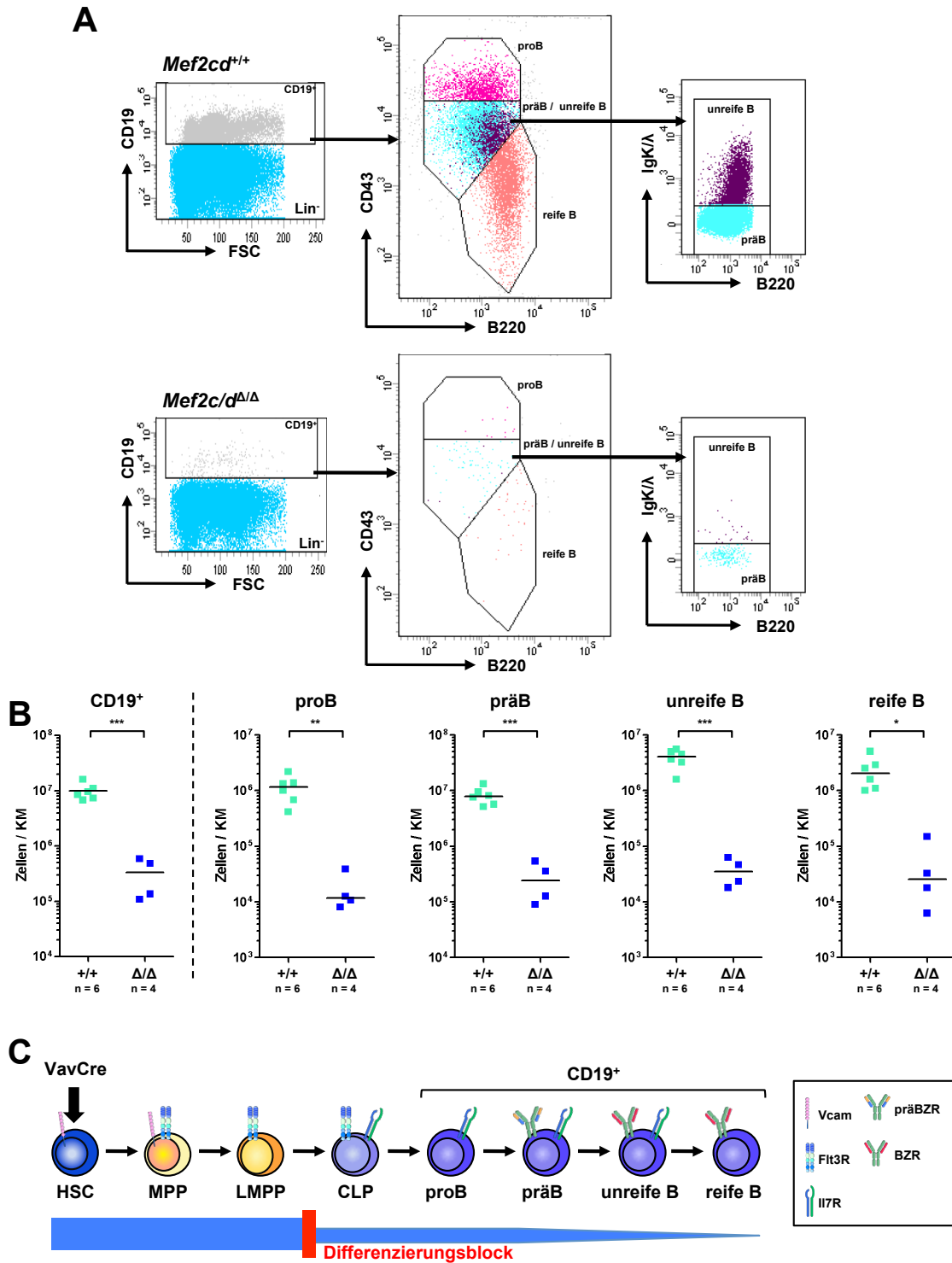
Im Folgenden wird mit *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>* der VavCre-Doppel-Knockout bezeichnet. Kontroll-Mäuse, die die VavCre-Rekombinase exprimieren, werden *Mef2c/d<sup>+/+</sup>* genannt.

### 4.1 Der Differenzierungsblock der B-Zell-Entwicklung in *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>*-VavCre-Mäusen

In einem ersten Experiment sollte der Knockout von *Mef2c* und *Mef2d* im gesamten hämatopoetischen Kompartiment ausführlich untersucht werden. Für die Analyse wurden Knochenmarkszellen aus *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>*- sowie aus Kontroll-Mäusen isoliert und anschließend mit spezifischen, fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen Oberflächenmarker verschiedener B-Zellpopulationen gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dabei wurden die reifen Zellen des Knochenmarks ausgeschlossen ( $\text{Lin}^-$ ) und das CD19-positive B-Zell-Kompartiment untersucht. Die verschiedenen B-Zell-Progenitor-Populationen und auch die reifen B-Zellen wurden anhand ihrer Expression von CD43 und B220 unterschieden. Abbildung 4.6 A zeigt die durchflusszytometrische Analyse exemplarisch für eine Kontroll- (*Mef2c/d<sup>+/+</sup>*-) und eine Knockout- (*Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>*-) Maus.

Die aus den CLPs hervorgehenden proB-Zellen weisen eine starke Expression von CD43 auf, die Expression von B220 ist jedoch noch gering. Mit der weiteren Differenzierung in Richtung präB-Zellen vermindert sich die Expression von CD43. Die präB-Zellen können von den darauffolgenden unreifen B-Zellen durch die Expression der leichten Ketten des präBZR (Igκ/λ) unterschieden werden. Während präB-Zellen noch keine leichten Ketten exprimieren, sind die unreifen B-Zellen positiv für Igκ/λ. Reife B-Zellen besitzen nur noch eine sehr geringe Expression von CD43, jedoch sind die Expressionslevel von B220 im Vergleich zu den B-Zell-Progenitoren erhöht.

In dieser Arbeit konnte durch die Untersuchung mehrerer Kontroll- (n=6) und Knockout-Mäuse (n=4) gezeigt werden, dass im *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>*-VavCre-Mausmodell die Deletion von *Mef2c* und *Mef2d* zu einem Differenzierungsblock der B-Zell-Entwicklung führt (Abbildung 4.6 B). Die CD19-positiven Zellen insgesamt ( $3,3 \times 10^5$ ) waren im Vergleich zum Wildtyp ( $1,0 \times 10^7$ ) stark reduziert. Auch bei der Betrachtung der einzelnen B-Zell-Populationen zeigte sich, dass proB-, präB-, unreife und reife B-Zellen des Knochenmarks in den *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>*-Mäusen im Vergleich zu *Mef2c/d<sup>+/+</sup>*-Mäusen jeweils kaum detektierbar waren. Jede Population für sich war um mehr als 95 % reduziert.



**Abbildung 4.1: Der Knockout von Mef2c und Mef2d in den HSC führt zu einem Differenzierungsblock und Verlust des B-Zell-Kompartiments**

**A)** Repräsentative durchflusszytometrische Analyse des B-Zellkompartiments einer *Mef2c/d<sup>+/+</sup>*- und einer *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>*-Maus. Alle Populationen sind Lin<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>. Untersucht wurden das proB- (B220<sup>+</sup>CD43<sup>-</sup>), das präB- (B220<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>Igk/λ<sup>+</sup>), das unreife (B220<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>Igk/λ<sup>-</sup>) und das reife B-Zellstadium (B220<sup>high</sup>CD43<sup>-</sup>). **B)** Quantitative Auswertung der in A) untersuchten Zellpopulationen sowie des gesamten CD19<sup>+</sup>-Zellkompartiments im Knochenmark von *Mef2c/d<sup>+/+</sup>*- (n = 6) und *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>*-Mäusen (n = 4). Die absoluten Zellzahlen wurden gegen eine logarithmische Skala aufgetragen, wobei jedes Quadrat die Zellzahl einer Maus darstellt und der Mittelwert einer Kohorte durch einen Balken markiert ist. Ein einfacher T-Test ergab für alle B-Zell-Populationen eine statistisch signifikante Reduktion im *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>*-Mausmodell im Vergleich zu Kontroll-Mäusen (*Mef2c/d<sup>+/+</sup>*). **C)** Schematische Darstellung der Blockade der B-Zell-Differenzierung in *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>*-Mäusen. Der Knockout von *Mef2c* und *Mef2d* in den HSC führt zu einer deutlichen Reduktion aller B-Zell-Vorläuferpopulationen (proB-, präB- und unreife B-Zellen) und der reifen B-Zellen im Knochenmark.

Mit diesem Experiment konnte die wichtige regulatorische Funktion von Mef2c und Mef2d für die B-Zell-Differenzierung gezeigt werden. Ein die gesamte Hämatopoese umfassender Knockout dieser beiden Transkriptionsfaktoren führte zu einem Differenzierungsblock, der die B-Zell-Linie vollständig beeinträchtigt (Abbildung 4.1 C). Betrachtet man beide *Mef2c/d*-Doppel-Knockout-Mausmodelle (*Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>-Cd79aCre* und *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>-VavCre*) zeigt sich somit, dass Mef2c und Mef2d die B-Zell-Entwicklung zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten regulieren. Im *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>-Cd79aCre*-Mausmodell zeigt sich der vollständige Differenzierungsblock ab dem späten präB-Zellstadium, wohingegen im *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>-VavCre*-Mausmodell bereits die proB-Population und alle darauffolgenden B-Zell-Populationen deletiert waren.

## 4.2 Charakterisierung des Differenzierungsblocks im *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>-VavCre*-Mausmodell

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die B-Zell-Entwicklung durch die Deletion von *Mef2c* und *Mef2d* vollständig beeinträchtigt wird, erfolgte in einem nächsten Experiment die genauere Charakterisierung des Differenzierungsblocks. Hierfür wurden die vor dem B-Zell-Kompartiment gelegene MPP4- (LMPP-) Population sowie die CLP-Population in *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>*- und in *Mef2c/d<sup>+/+</sup>*-Mäusen quantifiziert. Außerdem erfolgte unter Zuhilfenahme eines weiteren Oberflächenmarkers (*Vcam*) die weitere Eingrenzung des Differenzierungsblocks.

Des Weiteren wurden Zielgene von Mef2c und Mef2d identifiziert, die Aufschluss darüber geben könnten, wie Mef2c und Mef2d die B-Zell-Entwicklung zu einem so frühen Zeitpunkt regulieren könnten.

### 4.2.1 Der *Mef2c/d*-Knockout führt zu einer Anreicherung *Vcam*-negativer Zellen

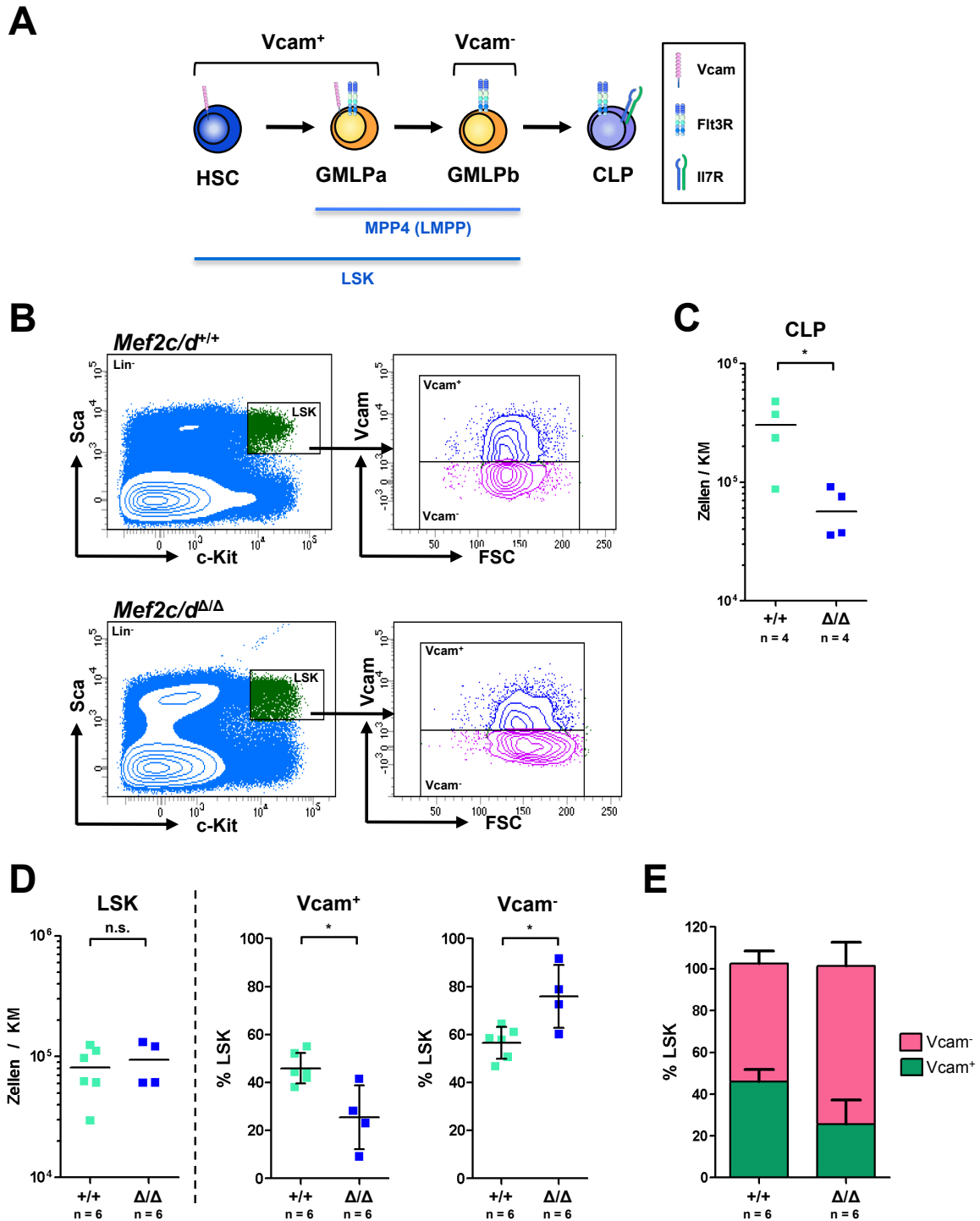
Für die genauere Untersuchung des Differenzierungsblocks wurde das Knochenmark von *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>*-Mäusen sowie von *Mef2c/d<sup>+/+</sup>*-Kontroll-Mäusen isoliert. Anschließend wurden die Progenitoren des Knochenmarks angereichert. Mit Hilfe fluoreszenzgekoppelter Antikörper wurde einerseits die LSK-Population, die die HSC und MPP-Populationen umfasst, sowie die CLP-Population markiert und durchflusszytometrisch untersucht. Außerdem wurde innerhalb der LSK-Population die Expression des Oberflächenproteins *Vcam* (*vascular endothelial adhesion molecule-1*) analysiert. *Vcam* unterteilt die MPP4- (LMPP-) Population noch einmal in zwei Populationen, die *Vcam*-positiven Granulozyten-Monozyten-Lymphozyten-Progenitor-A (GMLPa) und die *Vcam*-negativen GMLPb (Abbildung 4.2 A).

Die LMPPs sind die ersten Zellen in der hämatopoetischen Entwicklung, die lymphatische Gene exprimieren und so den Weg in Richtung lymphatischer Differenzierung einschlagen (Adolfsson et al 2005, Månsson et al 2007). Mit graduellem Verlust der *Vcam*-Expression verliert die MPP4-Population das Potential, in die megakaryozytäre-erythrozytäre oder die monozytäre-granulozytäre Linie zu differenzieren. *Vcam*-negative LMPPs sind somit, bis auf

ein geringes monozytär-granulozytäres Potential, nur noch in der Lage, sich in die allgemeine lymphatische Progenitor-Population (CLP) zu differenzieren (Lai & Kondo 2006), die sich über linienspezifische Vorläufer weiter in die reifen lymphatischen Zellpopulationen, die B- und T-Lymphozyten und die NK-Zellen, entwickeln (Kondo *et al.* 1997).

In *Mef2c/d*<sup>+/+</sup>-Mäusen umfasste die LSK-Population ca.  $9 \times 10^4$  Zellen. Im *Mef2c/d*-Knockout zeigte sich hierzu kein signifikanter Unterschied (ca.  $8 \times 10^4$ ). Die CLPs hingegen waren im Vergleich zum Wildtyp auf etwa ein Fünftel der Populationsgröße reduziert (Abbildung 4.2 C & D). Die LSK-Population wurde weiter hinsichtlich ihrer Vcam-Expression untersucht. Abbildung 4.2 B zeigt exemplarisch die FACS-Strategie für eine *Mef2c/d*-Knockout und für eine Kontroll-Maus. In *Mef2c/d*<sup>+/+</sup>-Mäusen bestand die LSK-Population etwa zur Hälfte aus Vcam-positiven und zur Hälfte aus Vcam-negativen Zellen (Vcam<sup>+</sup>: 45 %, Vcam<sup>-</sup>: 56 %). In *Mef2c/d*<sup>Δ/Δ</sup>-Mäusen kam es allerdings zu einer Anreicherung der Vcam-negativen Zellen. Dabei betrug der Anteil der Vcam-negativen Zellen an der LSK-Population etwa 75 % (Abbildung 4.2 D, E).

Mit diesen Versuchen konnte der Differenzierungsblock in *Mef2c/d*<sup>Δ/Δ</sup>-VavCre-Mäusen charakterisiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Vcam-negativen Zellen der LSK-Population durch die Deletion von *Mef2c* und *Mef2d* akkumulieren, bevor es zur starken Reduktion der CLPs und aller folgenden B-Zell-Populationen kommt.



**Abbildung 4.2: Der Knockout von Mef2c und Mef2d führt zur Anreicherung Vcam-negativer Zellen**

**A)** Schematische Darstellung der frühen lymphatischen Differenzierung, beginnend mit den hämatopoetischen Stammzellen (HSC). **B)** Durchflusszytometrische Analyse der LSK-Population ( $Lin^- Sca^+ c\text{-Kit}^+$ ) und der VCAM-Expression repräsentativ von einer  $Mef2c/d^{+/+}$ - und einer  $Mef2c/d^{\Delta/\Delta}$ -Maus. **C)** Quantifizierung der CLP-Population ( $Lin^- Flt3^+ I17R^+$ ) in  $Mef2c/d^{+/+}$ - und  $Mef2c/d^{\Delta/\Delta}$ -Mäusen (n = 4). Die absolute Zellzahl ist für jede analysierte Maus als Quadrat in einer logarithmischen Skala dargestellt, der Mittelwert ist für die angegebene Stichprobengröße als Balken abgebildet. Ein einfacher T-Test ergab eine statistisch signifikante Reduktion der CLPs in  $Mef2c/d^{+/+}$ - im Vergleich zu  $Mef2c/d^{\Delta/\Delta}$ -Mäusen. **D)** Quantifizierung der LSK-Population sowie der VCAM<sup>+</sup> und VCAM<sup>-</sup>-Populationen in  $Mef2c/d^{+/+}$ - und  $Mef2c/d^{\Delta/\Delta}$ -Mäusen (n = 6). Die VCAM<sup>+</sup>- und VCAM<sup>-</sup>-Populationen sind als Prozent der LSK-Population angegeben. Jedes Quadrat beschreibt eine analysierte Maus und der Mittelwert ist mit Standardfehler als Balken angegeben. Ein einfacher T-Test ergab eine signifikante Reduktion der VCAM<sup>+</sup>- sowie einen Anstieg der VCAM<sup>-</sup>-Population in  $Mef2c/d^{+/+}$ - im Vergleich zu  $Mef2c/d^{\Delta/\Delta}$ -Mäusen. **E)** Darstellung des prozentualen Anteils der VCAM<sup>+</sup>- und VCAM<sup>-</sup>-Population an der LSK-Population in  $Mef2c/d^{+/+}$ - und  $Mef2c/d^{\Delta/\Delta}$ -Mäusen in einem Balkendiagramm.

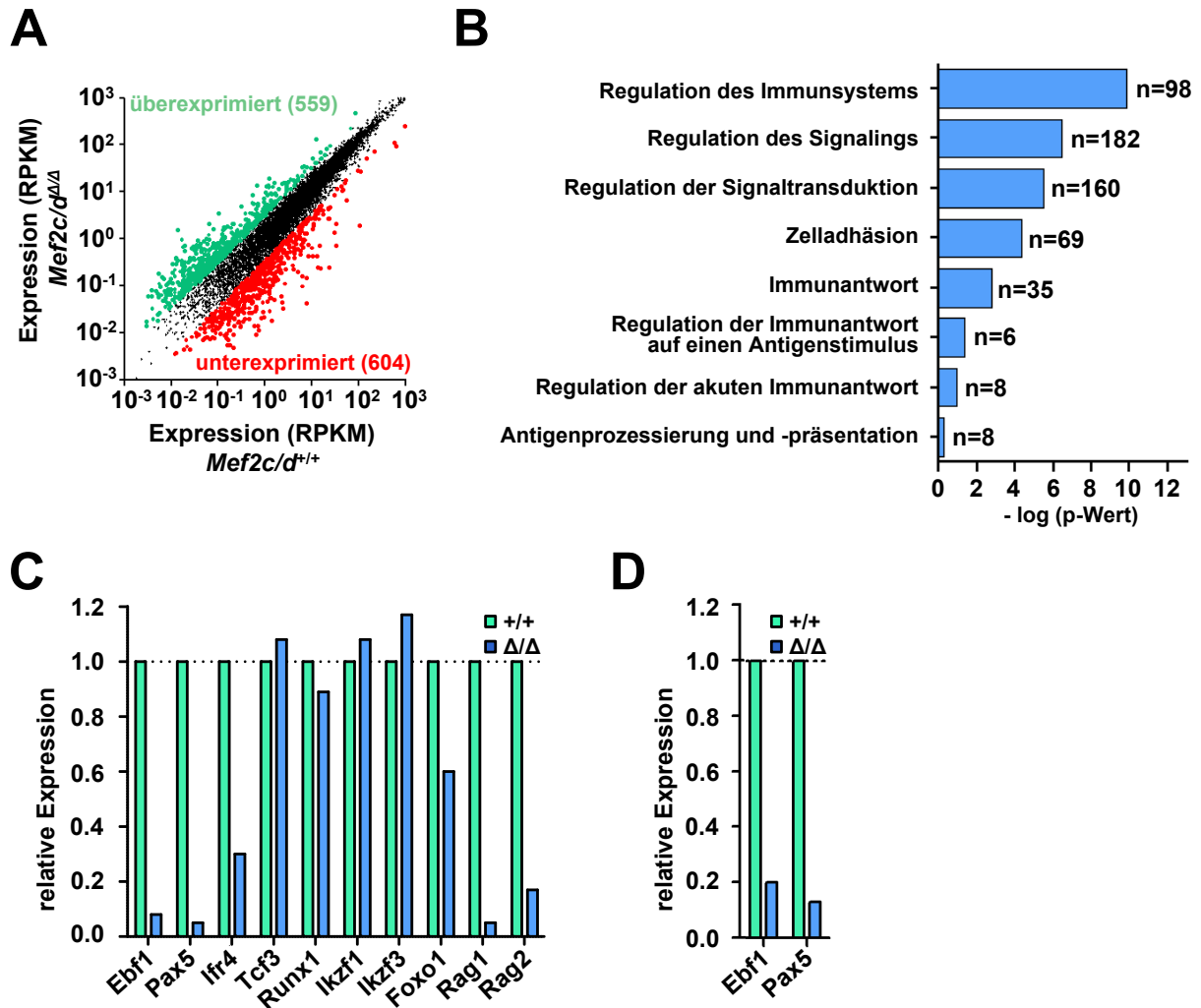


#### 4.2.2 Identifizierung von B-Zell-spezifischen Zielgenen von Mef2c und Mef2d

Um zu untersuchen, wie ein Knockout von Mef2c und Mef2d zu einem Differenzierungsblock in der B-Zell-Linie führen kann, sollten mögliche Zielgene von Mef2c und Mef2d identifiziert werden. Hierfür wurde mittels *RNA-Sequencing* eine genomweite Genexpressionsanalyse der LSK-Population von *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>*-Mäusen und von Wildtyp-Mäusen durchgeführt, die anschließend miteinander verglichen wurden. Das Knochenmark dieser Mäuse wurde isoliert und die LSK-Population sortiert. Nach der RNA-Isolierung wurde die RNA von je acht verschiedenen *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>*- bzw. *Mef2c/d<sup>+/+</sup>*-Mäusen vereint und die cDNA aus dem Ansatz isoliert. Anschließend erfolgte die Sequenzierung des gesamten Transkriptoms.

Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen waren im *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>*-Mausmodell insgesamt 1163 Gene signifikant fehlreguliert, wovon 559 Gene über- und 604 Gene unterexprimiert waren (> 3-fach, FDR korrigierter p-Wert  $\leq 0,05$ , Abbildung 4.3 A). Das Genexpressionsprofil verschiedener Transkriptionsfaktoren der B-Zell-Differenzierung, wie E2a (*Tcf3*), Runx1 (*Runx1*), Ikaros (*Ikzf1*), Aiolos (*Ikzf3*) oder Foxo1 (*Foxo1*), wurde durch die Deletion von Mef2c und Mef2d nicht oder nur leicht beeinflusst (Abbildung 4.3 C). Andere Transkriptionsfaktoren wurden durch den *Mef2c/d*-Knockout allerdings signifikant reduziert. Unter ihnen sind die Transkriptionsfaktoren Ebf1 (*Ebf1*), Pax5 (*Pax5*) und Irf4 (*Irf4*) oder auch die Rag-Proteine (*Rag1*, *Rag2*), die für das Rearrangement der B-Zell-Rezeptorketten verantwortlich sind. Für die Transkriptionsfaktoren *Ebf1* und *Pax5* konnten die verminderten Expressionslevel im *Mef2c/d*-Knockout im Vergleich zum Wildtyp mittels RT-PCR bestätigt werden (Abbildung 4.3 D).

Mit Hilfe der STRING-Datenbank wurden unter den deregulierten Genen (> 3-fach, FDR korrigierter p-Wert  $\leq 0,05$ ) anhand prognostizierter Protein-Interaktionen biologische Prozesse identifiziert, die von Mef2c und Mef2d beeinflusst werden (Szklarczyk *et al.* 2015). In Abbildung 4.3 B ist die Anzahl der Gene, die einem Prozess zugeordnet wurden, sowie die Signifikanz (-log (p-Wert)) angegeben. Unter den Prozessen befanden sich ganz allgemeine zelluläre Prozesse wie das Signaling, die Signaltransduktion oder Zelladhäsion. Es wurden aber auch solche mit immunologischem Hintergrund gefunden. Zu ihnen zählen die Regulation der akuten Immunantwort auf einen Antigenstimulus oder auch die Antigenprozessierung und -präsentation. Dies sind wichtige Prozesse der B-Lymphozyten, was mit dem Differenzierungsblock und den herunterregulierten B-Zell-spezifischen Genen korreliert. Sie treffen aber auch auf andere Populationen der Hämatopoese, wie beispielsweise dendritische Zellen, zu.



**Abbildung 4.3: Genomweite Identifizierung von B-Zell-spezifischen Zielgenen von Mef2c und Mef2d mittels RNA-Sequencing und quantitativer Realtime-PCR**

**A)** Scatter plot differentiell exprimierter Gene ( $> 3$ -fach) in LSK-Populationen von  $Mef2c/d^{\Delta/\Delta}$ - im Vergleich zu Kontroll-Mäusen ( $Mef2c/d^{+/+}$ ).  $Lin^{-}$ ,  $Sca^{+}$ ,  $c-Kit^{+}$  Zellen (LSK-Population) wurden sortiert und die mRNA isoliert. Diese wurde in cDNA umgeschrieben und mit Hilfe des *Genome Analyzer Iix* erfolgte die Sequenzierung. Die Genexpression ist auf *Reads Per Kilobase of transcript per Million reads* (RPKM) normalisiert, wobei jeder Punkt ein Gen repräsentiert. Die Farben indizieren  $> 3$ -fach überexprimierte (grün) bzw. vermindert exprimierte (rot) Gene des Knockouts im Vergleich zum Wildtyp. **B)** Funktionale Klassifizierung signifikant fehlregulierter Gene in der LSK-Population von  $Mef2c/d^{\Delta/\Delta}$ -Mäusen. Mit Hilfe der STRING-Datenbank wurden an Hand der fehlregulierten Gene ( $\geq 3$ -fach) biologische Prozesse identifiziert, die durch den Knockout von  $Mef2c$  und  $Mef2d$  beeinflusst werden. Die Anzahl der Gene pro identifiziertem Prozess sowie die statistische Signifikanz sind angegeben (Szklarczyk *et al.* 2015). **C)** Durch RNA-Sequencing bestimmte relative Expressionslevel von einzelnen Genen in  $Mef2c/d^{\Delta/\Delta}$ -Mäusen im Vergleich zum Wildtyp. Die Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren der B-Zell-Differenzierung. Dargestellt ist die relative Expression, wobei die Expression des Wildtyps auf 1 gesetzt wurde. **D)** Vergleich relativer Expressionslevel ausgewählter Zielgene in  $Mef2c/d^{\Delta/\Delta}$ - und  $Mef2c/d^{+/+}$ -Mäusen mittels qRT-PCR. Für die Analyse wurde das Knochenmark aus  $Mef2c/d^{\Delta/\Delta}$ - und  $Mef2c/d^{+/+}$ -Mäusen isoliert. Nach Anreicherung der Progenitoren wurde die LSK-Population sortiert und daraus die mRNA isoliert. Für die Normalisierung der einzelnen Gene wurden die Expressionslevel von *Hprt* bestimmt.

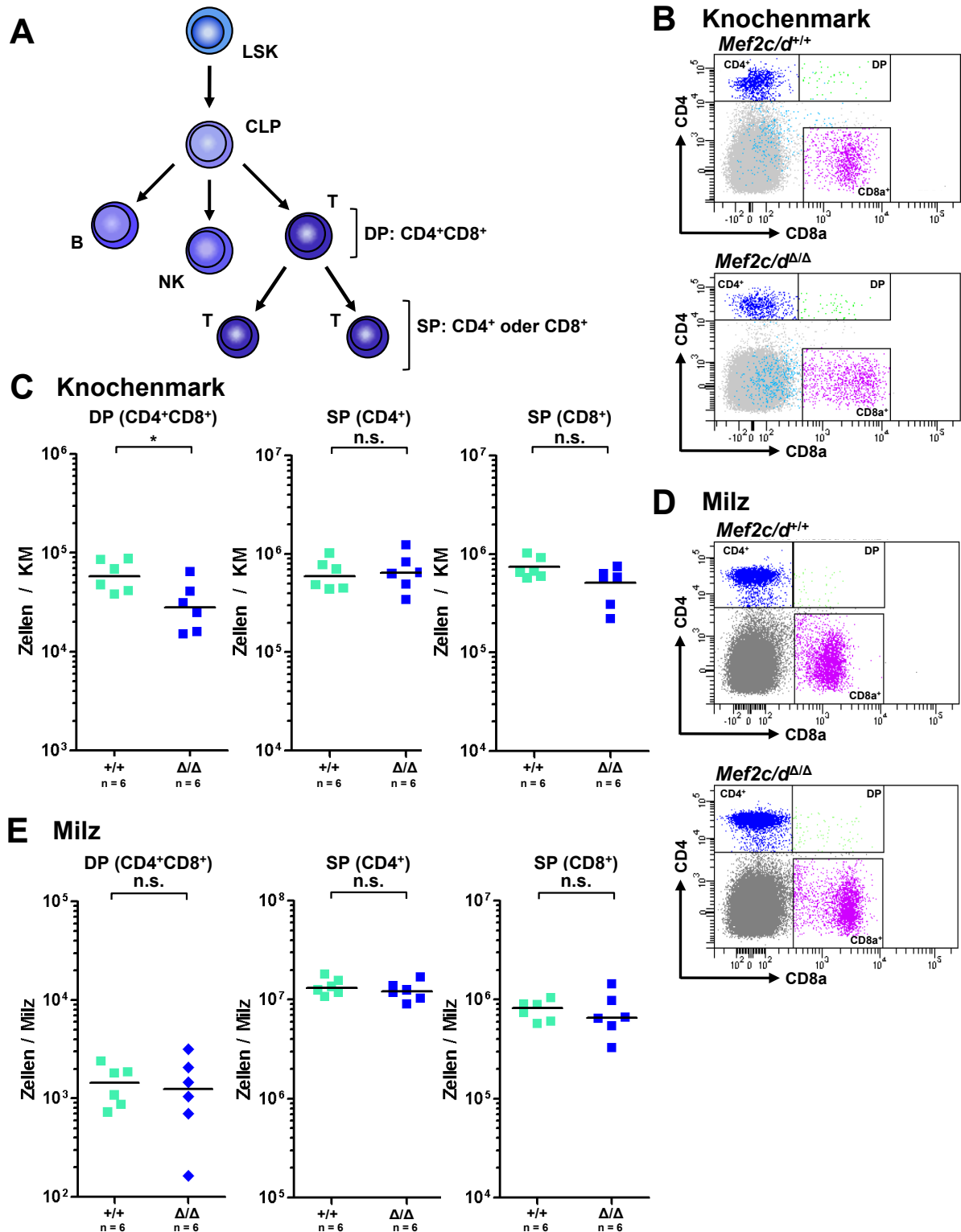
### 4.3 Der Einfluss von Mef2c und Mef2d auf weitere lymphatische Linien

Die lymphatische Linie umfasst die B- und die T-Lymphozyten sowie die NK-Zellen. Sie alle differenzieren sich aus den CLPs über mehrere linienspezifische Progenitoren. Da der Knockout von *Mef2c* und *Mef2d* im VavCre-Mausmodell zu einer deutlichen Reduktion der CLPs führt, sollte im Rahmen dieser Arbeit festgestellt werden, wie sich der Verlust von Mef2c und Mef2d neben dem Verlust der B-Zell-Linie einerseits auf die reifen T-Lymphozyten und andererseits auf die reifen NK-Zellen auswirkt.

#### 4.3.1 Reife T-Lymphozyten werden durch Mef2c und Mef2d kaum beeinträchtigt

Die Differenzierung der T-Lymphozyten erfolgt im Thymus, in dem sich Vorläufer-T-Lymphozyten in der Medulla zunächst in CD4- und CD8-positive positive T-Lymphozyten (*double positive*, DP) entwickeln. Diese können sich im Cortex des Thymus entweder in CD4-positive T-Helferzellen oder CD8-positive zytotoxische T-Lymphozyten (*single positive*, SP) differenzieren (Abbildung 4.4 A). In lymphatischen Organen wie dem Knochenmark oder der Milz sind sowohl doppelt positive als auch einzeln positive T-Lymphozyten zu finden, wobei doppelt positive Zellen deutlich seltener sind. Abbildung 4.4 B und D zeigen die FACS-Untersuchungen dieser beiden Organe. Im Knochenmark waren die doppelt positiven T-Lymphozyten im *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>*-Mausmodell im Vergleich zu *Mef2c/d<sup>+/+</sup>*-Mäusen leicht reduziert. Während *Mef2c/d<sup>+/+</sup>*-Kontroll-Mäuse im Mittel  $6,1 \times 10^4$  doppelt positive Zellen aufwiesen, waren diese im *Mef2c/d*-Knockout auf  $3,2 \times 10^4$  reduziert. CD4- oder CD8-positive T-Lymphozyten waren im Knochenmark durch den Knockout von *Mef2c* und *Mef2d* im Vergleich zum Wildtyp jedoch nicht beeinträchtigt (Abbildung 4.4 C). Im T-Zell-Kompartiment der Milz konnte weder für doppelt noch für einzeln positive T-Lymphozyten ein Unterschied detektiert werden.

Obwohl die CLPs durch den Knockout von *Mef2c* und *Mef2d* deutlich verringert sind, ist die Entwicklung reifer T-Lymphozyten kaum beeinträchtigt. Lediglich die doppelt positiven T-Lymphozyten im Knochenmark waren durch den Knockout von *Mef2c* und *Mef2d* leicht reduziert. Mef2c und Mef2d spielen für die Differenzierung dieser lymphatischen Linie somit wahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle.



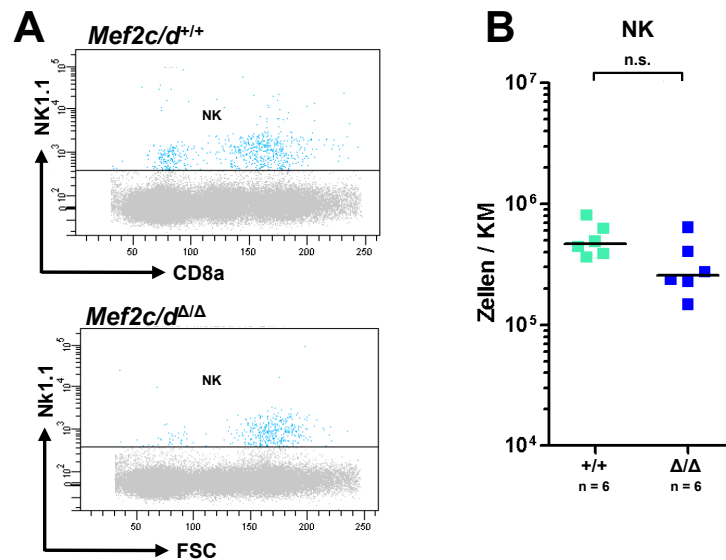
**Abbildung 4.4: Die Deletion von Mef2c und Mef2d beeinflusst das T-Zellkompartiment nur gering**

**A)** Schematische Darstellung der lymphatischen Differenzierung ausgehend von der LSK-Population. Fröhe T-Zell-Vorläuferpopulationen exprimieren sowohl CD4 als auch CD8 auf ihrer Zelloberfläche (*double positive*, DP). Bei der weiteren Differenzierung geht die Expression eines der beiden Oberflächenmoleküle verloren, sodass sie nur noch entweder CD4- oder CD8-positiv sind (*single positive*, SP). **B)** und **D)** Durchflusszytometrische Untersuchung der verschiedenen T-Zell-Vorläuferpopulationen (DP, SP CD4<sup>+</sup>, SP CD8<sup>+</sup>) in Knochenmark (B) und Milz (D) exemplarisch dargestellt für eine *Mef2c/d<sup>+/+</sup>*- und eine *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>*-Maus. **C)** und **E)** Quantifizierung der absoluten Zellzahlen der in B) und D) beschriebenen Populationen, wobei in C) die Quantifizierung des Knochenmarks und in E) die der Milz dargestellt ist (n = 6). Die absolute Zellzahl jeder analysierten Maus ist als Quadrat in einem logarithmischen Graphen aufgetragen. Der Mittelwert ist als Balken dargestellt. Ein einfacher T-Test ergab nur für die DP-Population im Knochenmark (C) einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Kohorten.

**4.3.2 Ein Knockout von *Mef2c* und *Mef2d* beeinflusst die Anzahl reifer NK-Zellen nicht**  
 Genauso wie die B- und T-Lymphozyten stammen die NK-Zellen von den CLPs ab. Sie reifen im Knochenmark, bevor sie als reife NK-Zellen verschiedene Gewebe besiedeln und ihren Aufgaben im Rahmen der angeborenen Immunantwort nachgehen.

Die reifen NK-Zellen des Knochenmarks wurden im *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>*-Mausmodell im Vergleich zu Kontroll-Mäusen mit Hilfe des Oberflächenmarkers NK1.1 durchflusszytometrisch untersucht (Abbildung 4.5 A). Kontroll-Mäuse besaßen etwa  $5,22 \times 10^6$  Zellen, die positiv für NK1.1 waren. Für den Knockout zeigte sich eine leichte Reduktion der NK-Zellen, diese war jedoch nicht signifikant ( $3,23 \times 10^6$ ).

Genau wie die Differenzierung reifer T-Lymphozyten wurde somit auch die Entwicklung der reifen NK-Zellen durch einen Knockout von *Mef2c* und *Mef2d* nicht beeinträchtigt.



**Abbildung 4.5: Die NK-Population wird durch eine Deletion von *Mef2c* und *Mef2d* nicht beeinflusst**

**A)** Repräsentative durchflusszytometrische Analyse der NK-Zellen (NK1.1<sup>+</sup>) im Knochenmark einer *Mef2c/d<sup>+/+</sup>*- und einer *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>*-Maus. **B)** Quantifizierung der absoluten Zellzahlen der in A) beschriebenen NK-Population (n = 6). Die absoluten Zellzahlen sind gegen eine logarithmische Skala aufgetragen, wobei jede analysierte Maus mit einem Quadrat dargestellt ist und der Mittelwert mit einem Balken gekennzeichnet ist. Ein einfacher T-Test zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen *Mef2c/d<sup>+/+</sup>*- und *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>*-Mäusen.

#### 4.4 Welchen Einfluss hat der *Mef2c/d*-Knockout auf die myeloische Differenzierung?

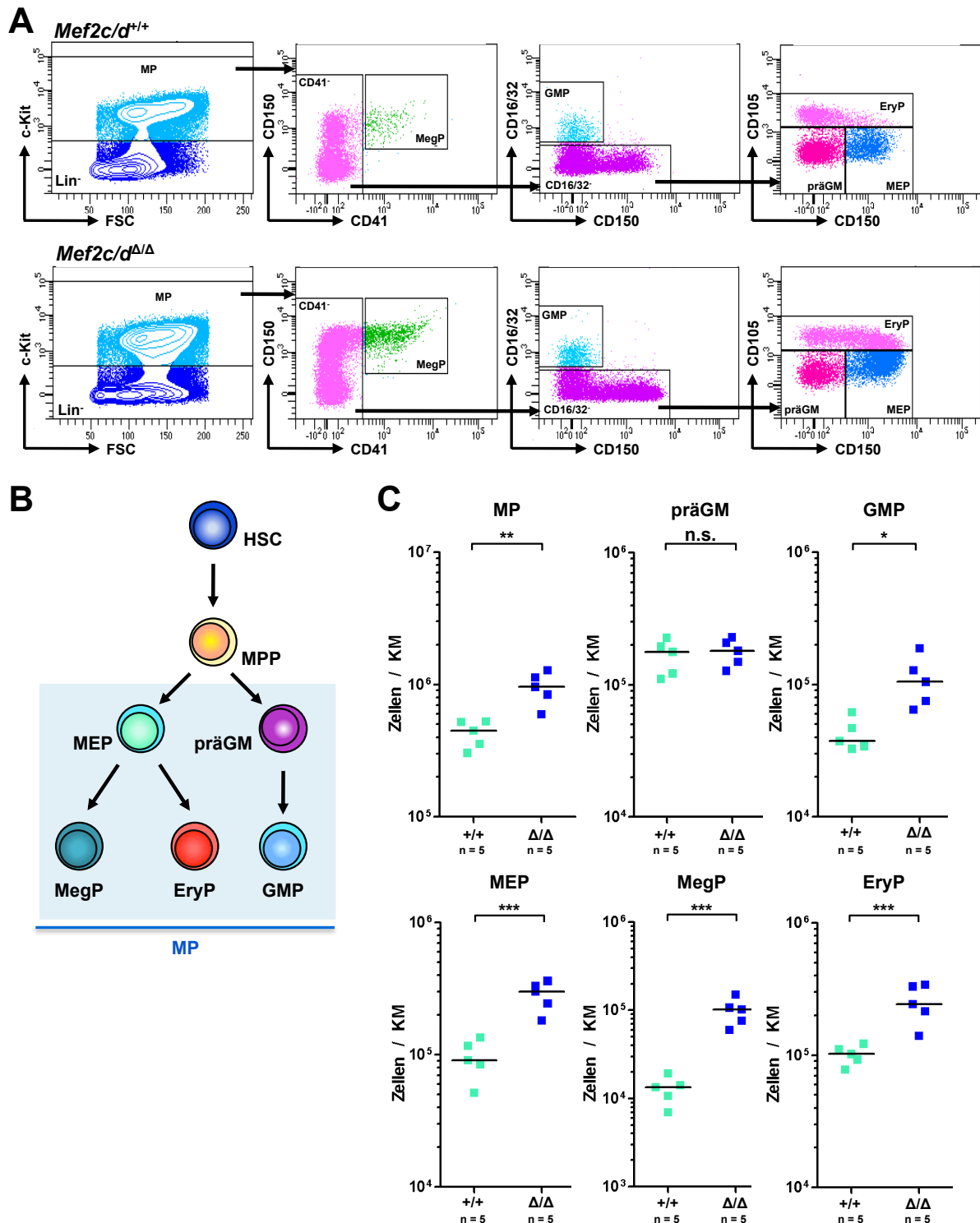
Die bisherigen Ergebnisse zeigten einen Verlust der B-lymphatischen Differenzierung und damit einhergehend eine Akkumulation innerhalb des MPP4- (LMPP-) Kompartiments. Da dieses Kompartiment auch in der Lage ist, myeloische Zellen hervorzubringen (vgl. Abschnitt 1.2), wurde untersucht, welche Auswirkungen der Verlust von *Mef2c* und *Mef2d* auf die myeloischen Progenitor-Populationen sowie die Granulozyten und Monozyten hat.

##### 4.4.1 Der *Mef2c/d*-Knockout führt zur Anreicherung myeloischer Progenitoren

In einem ersten Experiment wurde untersucht, welche Bedeutung ein Knockout von *Mef2c* und *Mef2d* für myeloische Progenitor-Populationen hat. Dafür wurde aus *Mef2c/d*<sup>+/+</sup> und *Mef2c/d*<sup>Δ/Δ</sup>-Mäusen das Knochenmark isoliert und die Progenitorzellen angereichert. Anschließend wurden die Zellen mit spezifischen Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Abbildung 4.6 A zeigt beispielhaft die Analyse für eine Kontroll- und eine Doppel-Knockout-Maus und in Abbildung 4.6 B ist die Differenzierung myeloischer Progenitoren aus den HSC und den darauffolgenden MPPs dargestellt. Alle myeloischen Progenitoren zeichnen sich durch die Expression von c-Kit aus und bilden gemeinsam eine c-Kit-positive Population myeloischer Progenitoren (MP).

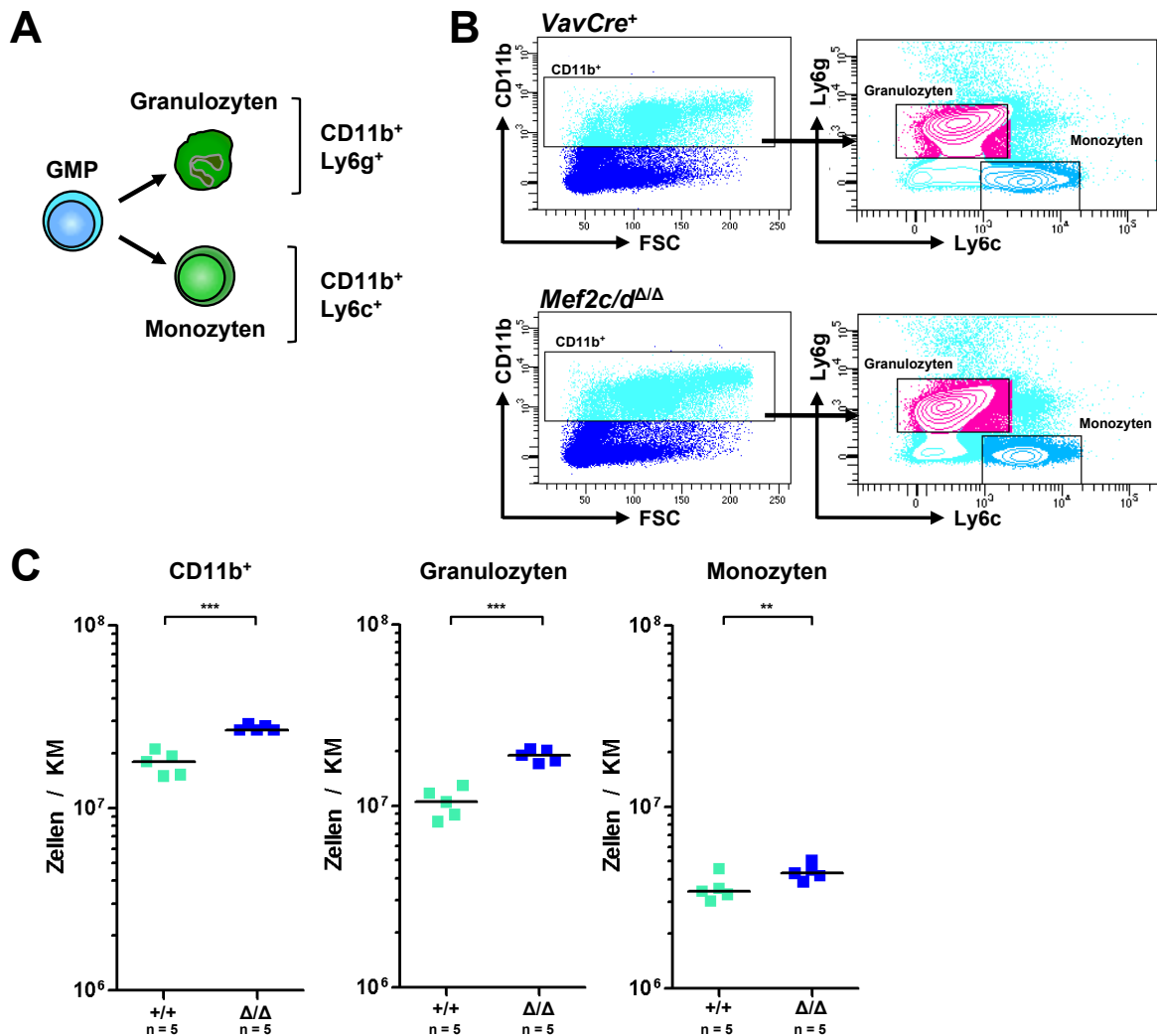
Der Knockout von *Mef2c* und *Mef2d* führte zu einer leichten Vergrößerung des gesamten myeloischen Kompartiments. Während die MP-Population in *Mef2c/d*<sup>+/+</sup>-Mäusen  $4,3 \times 10^5$  Zellen umfasste, wurde sie durch den Knockout von *Mef2c* und *Mef2d* mehr als verdoppelt ( $9,6 \times 10^5$  Zellen, Abbildung 4.6 C). Die MPPs differenzieren entweder über die prä-Granulozyten-Monozyten-Progenitoren (präGMs) in die Granulozyten-Monozyten-Progenitoren (GMPs) oder sie entwickeln sich über eine gemeinsame Megakaryozyten-Erythrozyten-Progenitor-Population (MEP) in eine Megakaryozyten-Progenitor- (MegP) oder eine Erythrozyten-Progenitor-Population (EryP). Während sich in der präGM-Population kein Unterschied zwischen Doppel-Knockout und Kontroll-Mäusen zeigte, war die GMP-Population in der *Mef2c/d*-Knockout-Mäusen um den Faktor 2,6 erhöht. Auch alle Progenitor-Populationen der erythrozytären-megakaryozytären Linie wurden durch den Knockout von *Mef2c* und *Mef2d* angereichert. Die Population der MEPs verdreifachte sich im *Mef2c/d*<sup>Δ/Δ</sup>-Mausmodell im Vergleich zu Kontroll-Mäusen, die EryPs waren um den Faktor 2,5, die MegP-Population sogar um den Faktor 7,7 erhöht.

Insgesamt wurde das myeloische Progenitor-Kompartiment durch den Knockout von *Mef2c* und *Mef2d* somit leicht expandiert, wovon sowohl Monozyten-Granulozyten- als auch Erythrozyten-Megakaryozyten-Vorläufer betroffen waren.



**Abbildung 4.6: Der Verlust von Mef2c und Mef2d führt zu einer Anreicherung myeloischer Progenitoren**  
**A)** Repräsentative durchflusszytometrische Analyse früher myeloischer Progenitoren im Knochenmark einer *Mef2c/d<sup>+/+</sup>*- und einer *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>*-Maus (n = 5). Dargestellt ist die Analyse von MP (Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>), präGM (CD41<sup>-</sup>CD16/32<sup>-</sup>CD150<sup>+</sup>), GMP (CD41<sup>-</sup>CD16/32<sup>+/+</sup>CD150<sup>+</sup>), MEP (CD41<sup>-</sup>CD16/30<sup>-</sup>CD150<sup>+</sup>), MegP (CD41<sup>+</sup>CD150<sup>+</sup>) und EryP (CD41<sup>-</sup>CD16/32<sup>-</sup>CD105<sup>+</sup>). **B)** Schematische Darstellung der frühen myeloischen Differenzierung. Das c-Kit positive MP-Stadium umfasst die MEP-, MegP-, EryP-, präGM- und GMP-Population. **C)** Quantifizierung der in A) dargestellten myeloischen Progenitor-Populationen. Dargestellt sind die absoluten Zellzahlen, wobei eine untersuchte Maus einem Quadrat entspricht und der Mittelwert durch einen Balken markiert ist. Ein einfacher T-Test zeigt für alle Populationen außer den präGM eine statistisch signifikante Anreicherung im *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>*-Mausmodell im Vergleich zum *Mef2c/d<sup>+/+</sup>*-Mausmodell.

#### 4.4.2 Monozyten und Granulozyten reichern sich im *Mef2c/d*<sup>Δ/Δ</sup>-Mausmodell an



**Abbildung 4.7: Granulozyten und Monozyten reichern sich im *Mef2c/d*<sup>Δ/Δ</sup>-VavCre-Mausmodell signifikant an**

**A)** Schematische Darstellung der Differenzierung von Granulozyten und Monozyten aus der GMP-Population. **B)** Repräsentative durchflusszytometrische Analyse der Granulozyten und Monozyten im Knochenmark einer *Mef2c/d*<sup>+/+</sup>- und einer *Mef2c/d*<sup>Δ/Δ</sup>-Maus. Sowohl Monozyten als auch Granulozyten sind Cd11b positiv und exprimieren zusätzlich entweder Ly6g (Granulozyten) oder Ly6c (Monozyten). **C)** Quantifizierung der absoluten Zellzahlen CD11b-positiver Zellen, Monozyten und Granulozyten (n = 5) in einer logarithmischen Skala. Jedes Quadrat stellt eine analysierte Maus dar, der Mittelwert ist durch einen Balken markiert. Die statistische Signifikanz wurde anhand eines einfachen T-Tests berechnet.

In einem weiteren Experiment wurden die Monozyten und die Granulozyten als reife Vertreter der myeloischen Linie durchflusszytometrisch untersucht. Monozyten und Granulozyten stammen von den GMPs ab und exprimieren beide den Oberflächenrezeptor CD11b (Abbildung 4.7 A). Unterschieden werden Monozyten und Granulozyten über die Expression von Ly6g (Granulozyten) und Ly6c (Monozyten). Die Untersuchung zeigte, dass die Cd11b-positiven Zellen, die sowohl die Granulozyten als auch die Monozyten umfassen, bei einem Doppel-Knockout von *Mef2c* und *Mef2d* leicht erhöht vorlagen (1,5-fach, Abbildung 4.7 B & C). Auch die Monozyten und die Granulozyten waren im *Mef2c/d*<sup>Δ/Δ</sup>-Mausmodell im Vergleich zu Kontroll-Mäusen signifikant erhöht, wobei die Anreicherung der Granulozyten (1,8-fach) etwas deutlicher war als die der Monozyten (1,2-fach).



Die Anreicherung der myeloischen Progenitoren (4.4.1) im *Mef2c/d*-Doppel-Knockout führt also auch zu einem milden Anstieg reifer myeloischer Zellen wie den Monozyten und Granulozyten.

#### **4.5 Beeinflussen *Mef2c* und *Mef2d* auch die dendritische Differenzierung?**

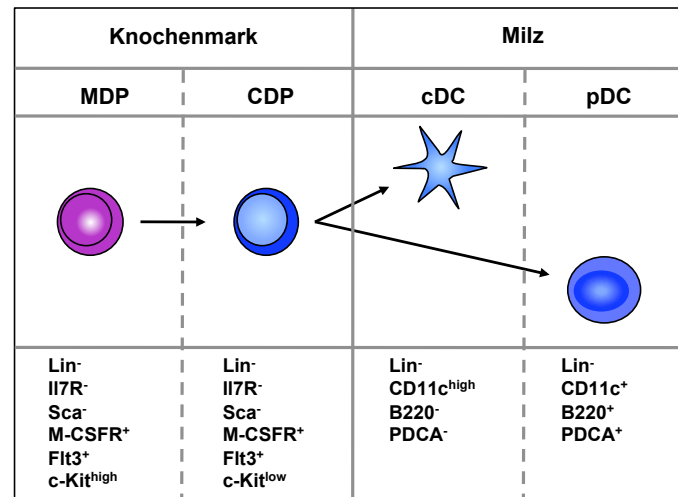
Das klassische Modell der dendritischen Differenzierung postuliert, dass alle dendritischen Zellen myeloischen Ursprungs sind. Für die pDCs wird allerdings auch eine lymphatische Abstammung diskutiert. Denn mittlerweile gibt es verschiedene Hinweise darauf, dass pDCs und B-Lymphozyten einen gemeinsamen Ursprung haben könnten (vgl. Abschnitt 1.8.3). Zum Beispiel regulieren verschiedene Transkriptionsfaktoren wie E2-2, Spi-B oder Bcl11a, denen eigentlich eine Funktion in der B-Zell-Entwicklung zugeschrieben wurde, auch die Differenzierung der pDCs (siehe Abschnitt 1.8.4).

Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht, ob auch ein Knockout von *Mef2c* und *Mef2d* Auswirkungen auf die verschiedenen Populationen der dendritischen Linie haben könnte. In einem weiteren Experiment wurde analysiert, ob sich Knochenmarkzellen aus *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>*-VavCre-Mäusen *in vitro* in die Richtung dendritischer Zellen differenzieren lassen und wie sich das Differenzierungspotential im Vergleich zu Kontroll-Mäusen verhält. Des Weiteren wurden Zielgene von *Mef2c* und *Mef2d* identifiziert, die in der dendritischen Differenzierung eine Rolle spielen.

##### **4.5.1 Durchflusszytometrische Charakterisierung dendritischer Zellen und ihrer Progenitoren**

In dieser Arbeit wurde der Fokus auf die Differenzierung der cDCs und pDCs aus ihren Vorläuferpopulationen, der Makrophagen- und Dendritische-Zellen-Progenitor-Population (MDPs) und der allgemeinen dendritischen Progenitor-Population (CDPs), gelegt (vgl. 1.8.3). Für die Charakterisierung der Zellpopulationen wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt, bei denen einzelne Zellen anhand der Proteine auf ihrer Oberfläche identifiziert werden können (Abbildung 4.8).

Die MDP- und die CDP-Population wurden in dieser Arbeit aus dem Knochenmark von Mäusen isoliert und untersucht. Keine der beiden Populationen trägt linienspezifische Marker auf seiner Oberfläche (*lineage negative*, Lin<sup>-</sup>). Zellen, die den Interleukin-7-Rezeptor (IL7R) oder das Stammzellantigen (Morrison & Scadden) auf der Oberfläche tragen, wurden ebenfalls ausgeschlossen, um die MDP- und die CDP-Population zu charakterisieren. Der IL7R ist ein Rezeptor, der insbesondere auf der Oberfläche von B-Lymphozyten-Progenitoren zu finden ist und der Oberflächenmarker Sca wird normalerweise auf Stammzellen und sehr frühen Progenitoren exprimiert.



**Abbildung 4.8: Charakterisierung der Oberflächenmarker von Zellen der dendritischen Linie**

Die Analyse der dendritischen Progenitoren, den MDPs und CDPs, erfolgte aus isolierten Zellen murinen Knochenmarks. pDCs und cDCs wurden aus der Milz von Mäusen isoliert. MDPs werden als Lin<sup>-</sup>Il7R<sup>-</sup>Sca<sup>-</sup>M-CSFR<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>c-Kit<sup>high</sup> charakterisiert und unterscheiden sich von den CDPs durch die Expression von c-Kit [Lin<sup>-</sup>Il7R<sup>-</sup>Sca<sup>-</sup>M-CSFR<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>c-Kit<sup>low</sup>]. cDCs in der Milz werden durch die Marker-Kombination Lin<sup>-</sup>CD11c<sup>high</sup>B220<sup>-</sup>PDCA<sup>-</sup> beschrieben; pDCs sind hingegen als Lin<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>PDCA<sup>+</sup> charakterisiert. MDP: Makrophagen- und dendritische-Zellen-Progenitor; CDP: allgemeiner dendritischer Progenitor; pDC: plasmazytoide DC; cDC: klassische DC.

MDPs und CDPs exprimieren beide den *colony stimulating factor 1 receptor* (CSF1R), ein Rezeptor, der insbesondere in der myeloischen Differenzierung eine Rolle spielt. Außerdem exprimieren sie die *Fms-like tyrosine kinase 3* (Flt3). Neben der Expression auf MDPs und CDPs ist Flt3 vor allem auf der Oberfläche früher lymphatischer Progenitoren zu finden.

Die durchflusszytometrische Unterscheidung von MDPs und CDPs erfolgt über die Expression des Stammzellrezeptors c-Kit. Während MDPs eine hohe Expression von c-Kit aufweisen (cKit<sup>high</sup>), ist die Expression auf CDPs nur gering (c-Kit<sup>low</sup>).

Somit wurden MDPs und CDPs mit folgendem Expressionsprofil in der durchflusszytometrischen Analyse identifiziert: MDPs sind Lin<sup>-</sup>Il7R<sup>-</sup>Sca<sup>-</sup>CSF1R<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>c-Kit<sup>high</sup> und CDPs Lin<sup>-</sup>Il7R<sup>-</sup>Sca<sup>-</sup>CSF1R<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>c-Kit<sup>low</sup>.

Die reifen Zellen der dendritischen Linie, die cDCs und pDCs, wurden aus der Milz von Mäusen isoliert. cDCs und pDCs haben die Expression von CD11c gemeinsam, wobei cDCs sehr viel mehr CD11c exprimieren als pDCs (Reizis *et al.* 2011). Reife cDCs exprimieren, je nachdem in welchem Gewebe sie sich befinden, verschiedene Oberflächenmarker, wie zum Beispiel CD11b, CD8α oder CD103, und können so noch weiter in Subtypen unterteilt werden. Die Charakterisierung von pDCs erfolgt über die Expression des B-Lymphozytenmarkers B220 und die Expression des für pDCs spezifischen Oberflächenmarkers PDCA (McKenna *et al.* 2005, Blasius *et al.* 2006, Reizis *et al.* 2011). In dieser Doktorarbeit stand die generelle Unterscheidung von cDCs und pDCs im Vordergrund, sodass auf eine weitere Unterteilung der cDCs verzichtet wurde. cDCs wurden somit als CD11c<sup>high</sup>B220<sup>-</sup>PDCA<sup>-</sup> und pDCs als CD11c<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>PDCA<sup>+</sup> charakterisiert.

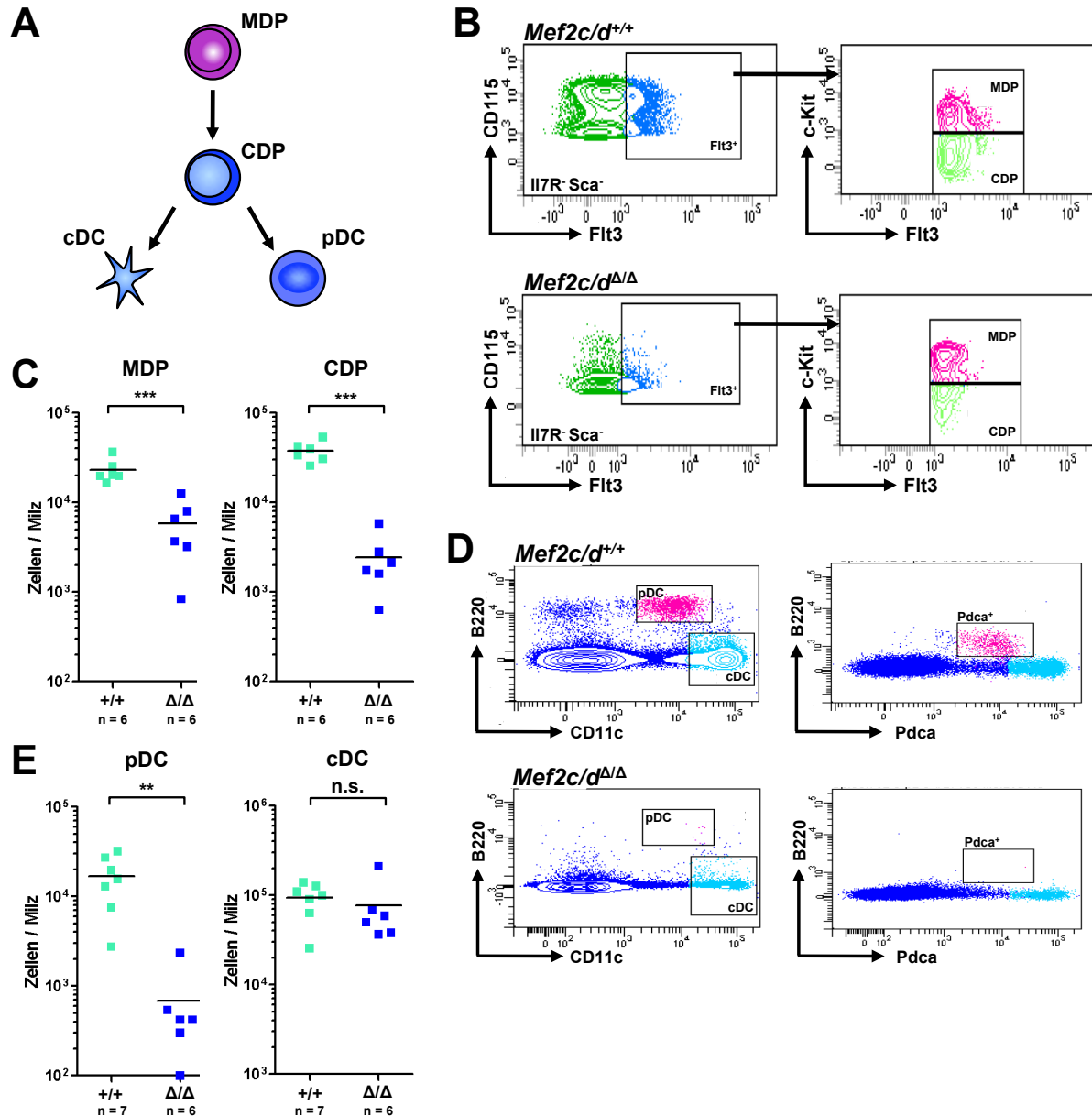
#### 4.5.1.1 Die dendritische Differenzierung in *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>*-VavCre-Mäusen ist stark beeinträchtigt

In einem ersten Experiment zur Untersuchung des Einflusses von *Mef2c* und *Mef2d* auf die dendritische Differenzierung wurden die beiden Progenitor-Populationen (MDPs und CDPs) des *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>*-Mausmodells sowie von Kontroll-Mäusen (*Mef2c/d<sup>+/+</sup>*) analysiert. Dafür wurden die Progenitorzellen der Knockout- sowie die der Kontroll-Mäuse angereichert und anschließend mit Hilfe von Oberflächenmarkern gefärbt. Abbildung 4.9 B zeigt beispielhaft die durchflusszytometrische Analyse einer Kontroll- (*Mef2c/d<sup>+/+</sup>*-) und einer *Mef2c/d*-Doppel-Knockout-Maus (*Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>*). Sowohl die MDPs als auch die CDPs lagen in den Doppel-Knockout-Mäusen signifikant reduziert vor. Die MDP-Population in den Knockout-Mäusen ( $5,8 \times 10^3$ ) entsprach nur noch etwa einem Viertel der MDP-Population in den Kontroll-Mäusen ( $2,3 \times 10^4$ ), die Reduktion der CDP-Population war sogar noch deutlicher. Die CDPs waren durch den *Mef2c/d*-Knockout nämlich um etwa 97 % verringert (*Mef2c/d<sup>+/+</sup>*:  $3,8 \times 10^4$ , *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>*:  $2,5 \times 10^3$ ).

In einem weiteren Experiment wurden die reifen dendritischen Zellen, die pDCs und die cDCs, analysiert. Es sollte untersucht werden, ob der Knockout von *Mef2c* und *Mef2d* und die damit verbundene Reduktion der MDPs und CDPs auch die Populationen der pDCs und cDCs verändert. Für die Untersuchung wurden Zellen der Milz aus *Mef2c/d<sup>+/+</sup>*- und *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>*-Mäusen isoliert und durchflusszytometrisch untersucht. Abbildung 4.9 D zeigt die durchflusszytometrische Analyse.

Interessanterweise zeigte sich für die cDCs und für die pDCs ein unterschiedliches Ergebnis. Die Anzahl der cDCs war im *Mef2c/d*-Doppel-Knockout-Mausmodell im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen nicht signifikant verändert. Die pDCs waren jedoch deutlich reduziert. Während in den Kontroll-Mäusen noch  $1,7 \times 10^4$  pDCs detektiert wurden, waren im Knockout-Mausmodell nur noch  $6,9 \times 10^2$  pDCs vorhanden (Reduktion um etwa 96 %, Abbildung 4.9 D & E).

Diese Daten zeigen, dass *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>*-VavCre-Mäuse nicht nur einen Differenzierungsblock in der B-Zell-Entwicklung aufweisen, sondern dass der Knockout von *Mef2c* und *Mef2d* auch die dendritische Entwicklung stark beeinflusst. Dies betrifft jedoch nicht das gesamte dendritische Kompartiment. Die MDPs liegen nur leicht reduziert vor und die cDC-Population wird durch einen *Mef2c/d*-Knockout nicht verändert. Die CDPs und die pDCs werden durch den Knockout jedoch so stark beeinträchtigt, dass diese beiden Populationen kaum noch detektierbar sind. Somit zeigt sich im *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>*-VavCre-Mausmodell nicht nur ein Verlust des B-Zell-Kompartiments. Auch die dendritische Differenzierung ist vom Differenzierungsblock betroffen, wobei dieser in den dendritischen Progenitoren beginnt und zu einem fast vollständigen Verlust der pDCs führt.

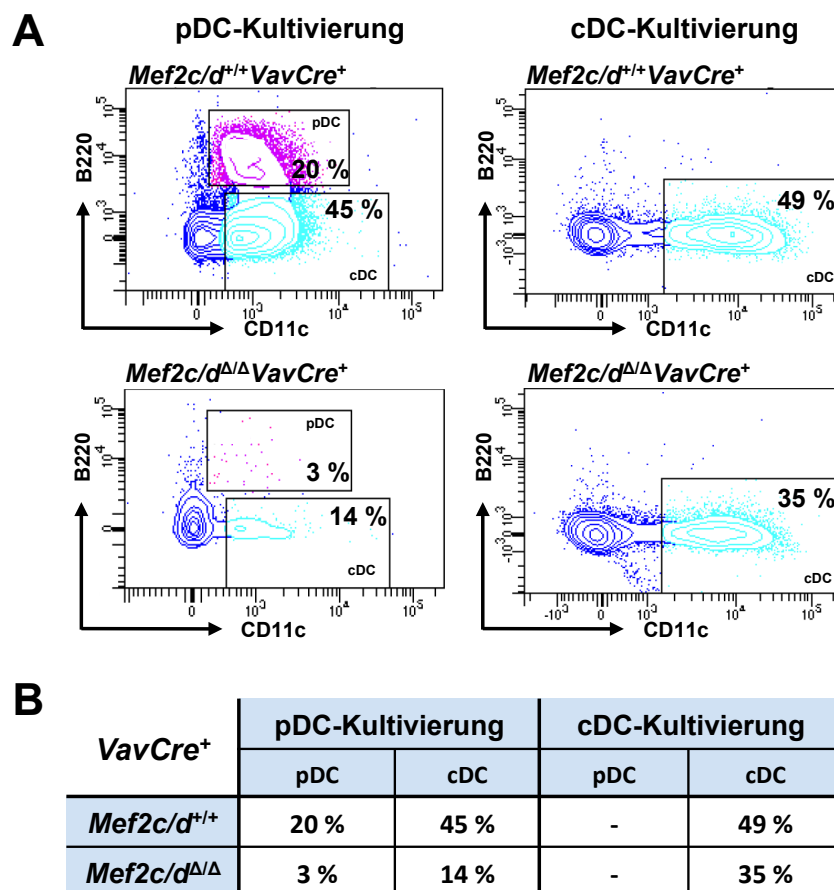


**Abbildung 4.9: Der Knockout von *Mef2c* und *Mef2d* im gesamten hämatopoetischen Kompartiment führt zur beeinträchtigten dendritischen Differenzierung**

**A)** Klassisches Modell der dendritischen Differenzierung. In diesem Modell entstammen die dendritischen Zellen der myeloischen Linie. Aus den MDPs differenzieren sich über die CDPs sowohl die cDCs als auch die pDCs. **B)** und **D)** Repräsentative durchflusszytometrische Analyse der MDPs und CDPs im Knochenmark (**B**) sowie der pDCs und cDCs aus der Milz (**D**) von *Mef2c/d<sup>+/+</sup>*-Kontroll-Mäusen und *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>*-Mäusen. Für die Untersuchung der MDPs und CDPs wurden die Progenitoren des Knochenmarks angereichert und anschließend durchflusszytometrisch untersucht. MDPs:  $\text{Lin}^{-}\text{Il7R}^{+}\text{Sca}^{+}\text{M-CSFR}^{+}\text{Flt3}^{+}\text{c-Kit}^{\text{high}}$ ; CDPs:  $\text{Lin}^{-}\text{Il7R}^{+}\text{Sca}^{+}\text{M-CSFR}^{+}\text{Flt3}^{+}\text{c-Kit}^{\text{low}}$ . Die pDCs der Milz wurden durch die Oberflächenmarker  $\text{Lin}^{-}\text{CD11c}^{+}\text{B220}^{+}\text{PDCA}^{+}$  identifiziert, cDCs durch die Marker-Kombination  $\text{Lin}^{-}\text{CD11c}^{\text{high}}\text{B220}^{-}\text{PDCA}^{-}$ . **C)** und **E)** Quantifizierung der in **B)** und **D)** untersuchten Zellpopulationen (n = 6). Die absoluten Zellzahlen wurden gegen eine logarithmische Skala aufgetragen, wobei jedes Quadrat die Zellzahl einer Maus darstellt und der Mittelwert einer Kohorte durch einen Balken markiert ist. Ein einfacher T-Test ergab für die MDPs und CDPs (**C**) und auch für die pDCs (**E**) eine statistisch signifikante Reduktion im *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>*-Mausmodell im Vergleich zu Kontroll-Mäusen (*Mef2c/d<sup>+/+</sup>*). Für die cDCs war keine signifikante Reduktion detektierbar. MDP: Makrophagen-und-dendritische-Zellen-Progenitor; CDP: allgemeiner dendritischer Progenitor; pDC: plasmazytoide DC; cDC: klassische DC.

#### 4.5.1.2 In vitro Kultivierung dendritischer Zellen (*Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>*-VavCre-Mausmodell)

Durch den vorherigen Versuch wurde gezeigt, dass *Mef2c* und *Mef2d* in der Differenzierung dendritischer Zellen in vivo eine regulatorische Funktion einnehmen und der Knockout von *Mef2c* und *Mef2d* im gesamten hämatopoetischen Kompartiment zu einer starken Reduktion der CDPs und der pDCs führt. Um den Einfluss von *Mef2c* und *Mef2d* auf die Differenzierung noch weiter zu analysieren, wurde ein in vitro Experiment durchgeführt. Bei diesem Experiment wurden Knochenmarkszellen aus *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>*-VavCre-Mäusen sowie aus Kontrollmäusen isoliert und die Zellen anschließend in Kultur genommen. Die Zellen wurden dabei in zwei verschiedenen Medien gehalten, einerseits in einem hFLT3L-haltigen Medium, das die pDC-Differenzierung fördert, andererseits in einem mGM-CSF-haltigen Medium für die cDC-Differenzierung (vgl. 3.2.2.1). Nach 10 Tagen wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 4.10).



**Abbildung 4.10: In vitro Differenzierung dendritischer Zellen aus *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>*-VavCre-Mäusen**

**A)** Knochenmarkszellen aus *Mef2c/d<sup>+/+</sup>*-VavCre-Kontroll-Mäusen und *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>*-VavCre-Mäusen wurden isoliert und in vitro entweder in einem hFLT3L- (pDC) oder mGM-CSF- (cDC) haltigem Medium kultiviert. Nach 10 Tagen wurden die Zellen durchflusszytometrisch hinsichtlich einer Differenzierung in pDCs oder cDCs untersucht. pDCs: Lin<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>, cDCs: Lin<sup>-</sup>CD11c<sup>high</sup>B220<sup>-</sup>. **B)** Tabellarischer Überblick der prozentualen Anteile der pDCs und cDCs an den kultivierten Knochenmarkszellen (siehe A).

Von den Knochenmarkzellen der VavCre-Kontroll-Mäuse waren im hFLT3L-Medium am 10. Tag 20 % der Zellen in pDCs und 45 % in cDCs differenziert. Im Gegensatz dazu ließen sich Zellen aus *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>*-VavCre-Mäusen nur sehr schlecht in hFLT3L-Medium kultivieren und ein Großteil der Zellen starb ab. Von denen, die an Tag 10 noch analysiert werden konnten, waren nur noch 14 % als cDCs und 13 % als pDCs detektierbar (Abbildung 4.10 A links & B).

Die Kultivierung von cDCs in mGM-CSF-Medium zeigte nur einen geringen Unterschied im VavCre-Knockout (35 %) im Vergleich zu VavCre-Kontroll-Mäusen (49 %). Erwartungsgemäß differenzierten sich weder im Knockout noch in den Kontroll-Mäusen pDCs im mGM-CSF-haltigen Medium (Abbildung 4.10 A rechts & B).

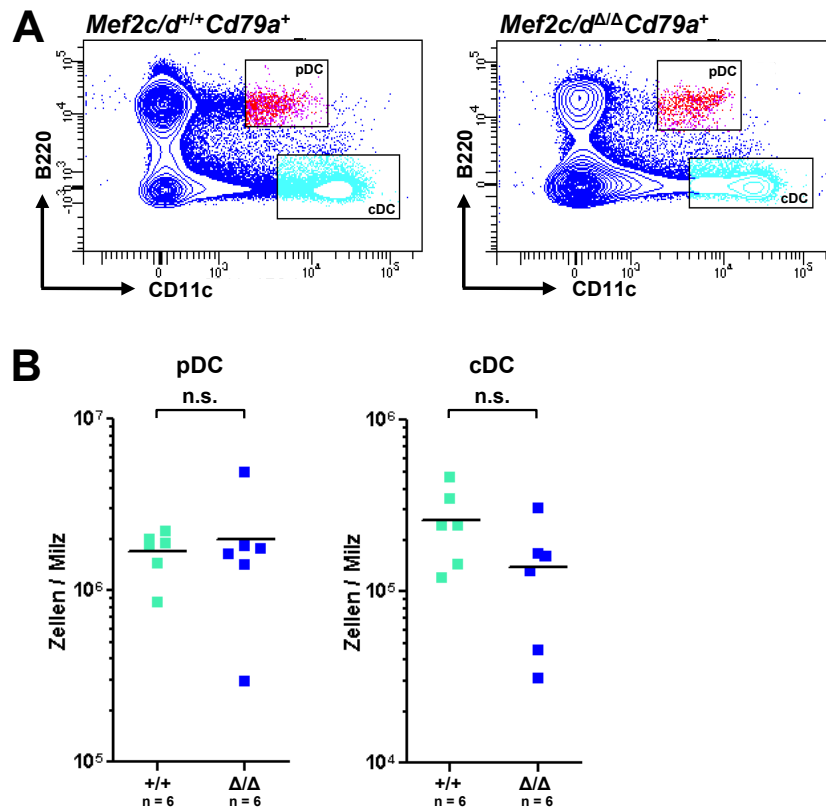
Zusammengefasst war die in vitro Differenzierung von pDCs in einem FLT3L-haltigen Medium durch den *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>*-VavCre-Knockout stark beeinträchtigt. Die Differenzierung von cDCs war durch den Knockout von *Mef2c* und *Mef2d* hingegen kaum eingeschränkt.

#### 4.5.1.3 *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>*-Cd79aCre-Mäuse haben eine normale dendritische Differenzierung

Die vorangegangenen Experimente machten deutlich, dass die Deletion von *Mef2c* und *Mef2d* neben der B-Zell-Entwicklung auch die Differenzierung der pDCs beeinträchtigt. Es konnte jedoch nicht gezeigt werden, zu welchem Zeitpunkt *Mef2c* und *Mef2d* in die Differenzierung der dendritischen Zellen eingreifen. Aus diesem Grund wurde das dendritische Kompartiment auch im *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>*-Cd79aCre-Mausmodell untersucht. In diesem Mausmodell wird die Cre-Rekombinase erst ab den späten CLPs exprimiert, sodass *Mef2c* erst ab diesem Zeitpunkt und in allen auf die späten CLPs folgenden Stadien deletiert ist. So sollte untersucht werden, ob ein so später Verlust von *Mef2c* und *Mef2d*, die dendritische Differenzierung ebenfalls beeinträchtigt oder ob die Regulation der pDC-Differenzierung durch *Mef2c* und *Mef2d* sich bereits früher ereignet.

Für die Analyse der pDCs und cDCs im *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>*-Cd79aCre-Mausmodell wurde genauso verfahren, wie in 4.5.1.1 für das *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>*-VavCre-Mausmodell beschrieben. Abbildung 4.11 A zeigt die durchflusszytometrische Analyse einer Kontroll- (*Mef2c/d<sup>+/+</sup>*-Cd79a) und einer *Mef2c/d*-Doppel-Knockout-Maus (*Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>*-Cd79aCre). Im Gegensatz zum VavCre-Mausmodell waren jedoch weder die pDCs noch die cDCs im Vergleich zu Kontroll-Mäusen signifikant verändert (Abbildung 4.11 A & B).

Diese Ergebnisse machen somit deutlich, dass *Mef2c* und *Mef2d* die dendritische Differenzierung zu einem früheren Zeitpunkt als den späten CLPs regulieren.



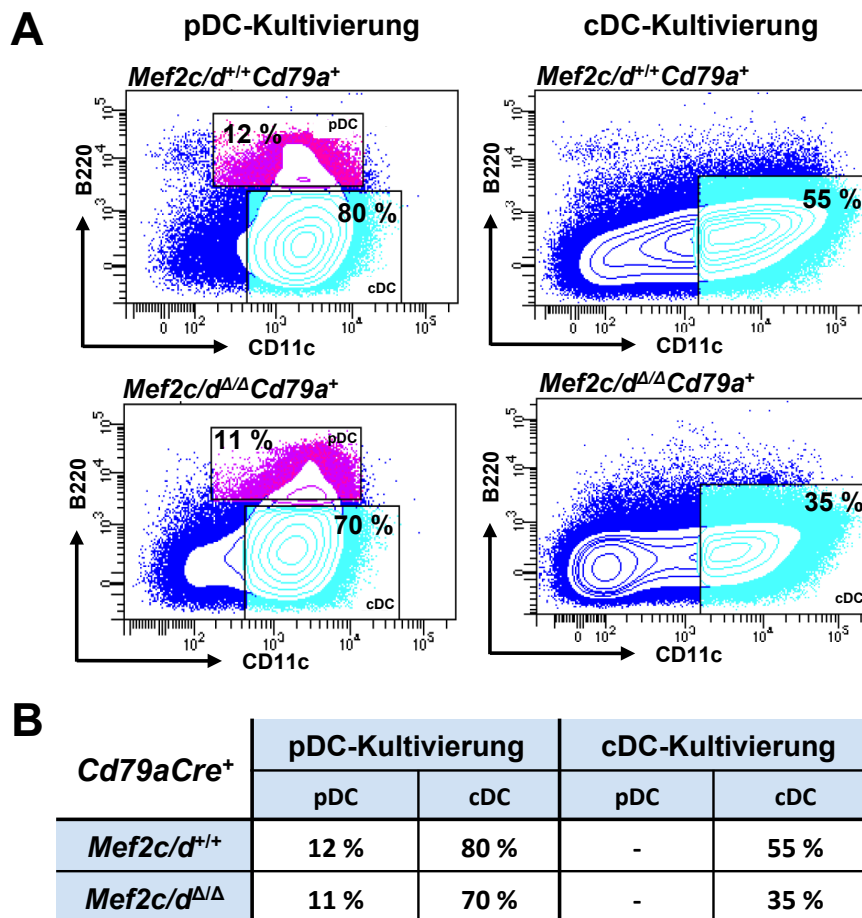
**Abbildung 4.11:** Im *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>-Cd79aCre*-Mausmodell ist die dendritische Differenzierung nicht beeinträchtigt

**A)** Repräsentative durchflusszytometrische Analyse der pDCs und cDCs aus der Milz von *Mef2c/d<sup>+/+</sup>*-Kontrollmäusen und *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>-Cd79aCre*-Mäusen. pDCs: Lin<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>PDCA<sup>+</sup>, cDCs: Lin<sup>-</sup>CD11c<sup>high</sup>B220<sup>-</sup>PDCA<sup>-</sup>. **B)** Quantifizierung der in A) untersuchten pDCs und cDCs (n = 6). Die absoluten Zellzahlen wurden gegen eine logarithmische Skala aufgetragen, wobei jedes Quadrat die Zellzahl einer Maus darstellt und der Mittelwert der Kohorte durch einen Balken markiert ist. Weder für die pDCs noch für die cDCs konnte in diesem Mausmodell ein signifikanter Unterschied festgestellt werden (einfacher T-Test).

#### 4.5.1.4 In vitro Kultivierung dendritischer Zellen (*Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>-Cd79aCre*-Mausmodell)

Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurde auch die in vitro Kultivierung mit Knochenmarkszellen aus *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>-Cd79aCre*-Mäusen wiederholt. Die Knochenmarkszellen von Cd79aCre-Doppel-Knockout-Mäusen und Kontrollmäusen wurden wie beim vorherigen Experiment für 10 Tage entweder in Medium für die pDC-Differenzierung (hFLT3L) oder für die cDC-Differenzierung (mGM-CSF) kultiviert und anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Untersuchung der Zellen (Abbildung 4.12 A).

Wie schon beim VavCre-Doppel-Knockout zeigte sich bei der Kultivierung der cDCs kaum ein Unterschied zwischen dem Cd79aCre-Doppel-Knockout und den Zellen der Kontrollmäuse (Abbildung 4.12 B). Im Gegensatz zum VavCre-Doppel-Knockout war jedoch auch die Kultivierung der pDCs durch den Cd79aCre-Knockout nicht beeinträchtigt. Die Zellzahlen der pDCs und auch der cDCs blieben bei der Kultivierung im FLT3L-haltigen Medium in etwa konstant.



**Abbildung 4.12: In vitro Differenzierung dendritischer Zellen aus *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>-Cd79aCre*-Mäusen**

**A)** Knochenmarkszellen aus *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>-Cd79aCre*-Mäusen und Kontroll-Mäusen (*Mef2c/d<sup>+/+</sup>-Cd79aCre*) wurden isoliert und in vitro kultiviert. Für die Kultivierung von pDCs wurde Medium mit hFLT3L und für die der cDCs mGM-CSF haltiges Medium verwendet. Nach 10 Tagen erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der Knochenmarkszellen. pDCs: Lin<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>, cDCs: Lin<sup>-</sup>CD11c<sup>high</sup>B220<sup>-</sup>. **B)** Tabellarischer Überblick der prozentualen Anteile der pDCs und cDCs an den kultivierten Knochenmarkszellen (siehe A).

Insgesamt zeigen die verschiedenen Experimente, dass *Mef2c* und *Mef2d* einen Einfluss auf die Differenzierung der dendritischen Zellen haben und wichtige Regulatoren der pDC-Differenzierung sein könnten. Ein Knockout von *Mef2c* und *Mef2d*, der die gesamte Hämatopoese umfasst (*Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>-VavCre*), führte zu einer Reduktion der MDP-Population auf ein Viertel. Die Reduktion der CDPs und der pDCs war sogar noch sehr viel deutlicher. Beide Populationen wurden um mehr als 96 % reduziert. Die CDP-Population war im Vergleich zu Kontroll-Mäusen unverändert. Dieser Doppel-Knockout von *Mef2c* und *Mef2d* führt somit sowohl zum Verlust der B-Lymphozyten als auch zu einem Differenzierungsblock in der dendritischen Entwicklung. Auch die in vitro Kultivierung der pDCs war aus Knochenmarkszellen des *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>-VavCre*-Mausmodells nicht möglich.

Eine weiteres Knockout-Modell, bei dem *Mef2c* und *Mef2d* erst ab den späten CLPs deletiert sind (*Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>-Cd79aCre*-Mausmodell), zeigte diesen Differenzierungsblock der dendritischen Zell-Entwicklung nicht und auch die in vitro Differenzierung war bei diesem Mausmodell unverändert. Diese Ergebnisse lassen somit darauf schließen, dass die



Regulation der dendritischen Entwicklung durch Mef2c und Mef2d bereits früher und somit vor den späten CLPs erfolgt.

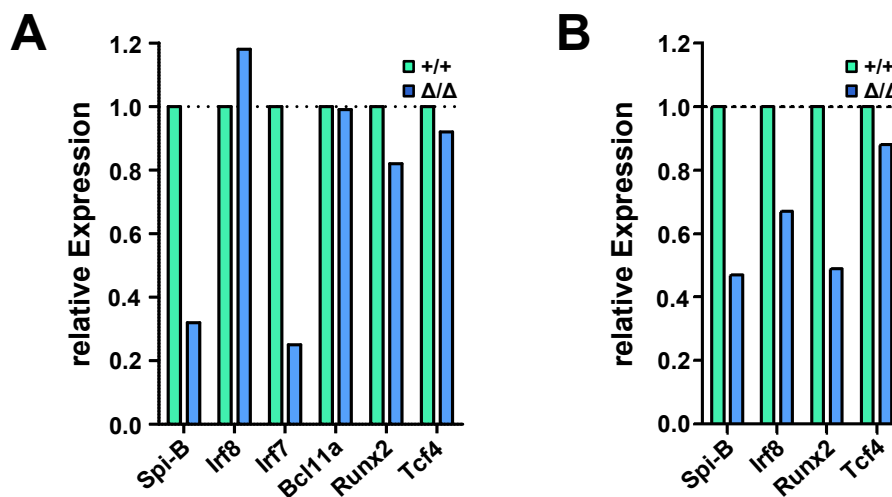
#### 4.5.2 Identifizierung potentieller Zielgene von Mef2c und Mef2d für die pDC-Differenzierung

Anhand der durchgeführten Ergebnisse wurden Mef2c und Mef2d als potentielle Regulatoren der pDC-Differenzierung identifiziert. Aus diesem Grund wurde die bereits beschriebene genomweite Genexpressionsanalyse der LSK-Population in *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>*-VavCre- und Kontrollmäusen auch hinsichtlich potentieller Zielgene der pDC-Differenzierung analysiert (vgl. Abschnitt 4.2.2).

Die Analyse aller Zielgene mit Hilfe der STRING-Datenbank ergab, dass die Zielgene Prozessen wie der Regulation der akuten Immunantwort auf einen Antigenstimulus oder der Antigenprozessierung und -präsentation zugeordnet werden können (Abschnitt 4.2.2). Dendritische Zellen sind ebenfalls an der akuten Immunantwort beteiligt, indem sie Antigene erkennen, prozessieren und schließlich anderen Zellen für deren Aktivierung präsentieren.

Tatsächlich zeigten die RNA-*Sequencing*-Analysen, dass die Deletion von *Mef2c* und *Mef2d* in der LSK-Population zu einer Reduktion von Genen führt, die für die dendritische Differenzierung und dort insbesondere für die Entwicklung der pDCs wichtig sind.

*Spi-B* (*Spi-B*) ist ein wichtiger Regulator der pDC-Differenzierung, der synergistisch mit *Irf7* (*Irf7*) interagiert. Zusammen aktivieren sie die Transkription von Genen des IFN-Typ I,



**Abbildung 4.13: Genomweite Identifizierung dendritischer Zielgene von Mef2c und Mef2d mittels RNA-Sequencing und quantitativer Realtime-PCR**

**A)** Durch RNA-*Sequencing* bestimmte relative Expressionslevel von einzelnen Genen in *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>*-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp. Die Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren der dendritischen Differenzierung. Dargestellt ist die relative Expression, wobei die Expression des Wildtyps auf 1 gesetzt wurde. **B)** Vergleich relativer Expressionslevel ausgewählter Zielgene in *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>*- und *Mef2c/d<sup>+/+</sup>*-Mäusen mittels qRT-PCR. Für die Analyse wurde das Knochenmark aus *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>*- und *Mef2c/d<sup>+/+</sup>*-Mäusen isoliert. Nach Anreicherung der Progenitoren wurde die LSK-Population sortiert und daraus die mRNA isoliert. Für die Normalisierung der einzelnen Gene wurden die Expressionslevel von *Hprt* bestimmt.

welches für die Immunantwort von pDCs entscheidend ist. Sowohl *Spi-B* als auch *Irf7* waren im *Mef2c/d*-Knockout im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert (Abbildung 4.3 A). Für *Spi-B* konnte dies auch mittels RT-PCR bestätigt werden (Abbildung 4.3 B). Die Genexpression anderer Transkriptionsfaktoren, die in der pDC-Differenzierung eine Rolle spielen, wie *Bcl11a* (*Bcl11a*), *Runx2* (*Runx2*), *E2-2* (*Tcf4*) oder *Irf8* (*Irf8*), war durch den Knockout von *Mef2c* und *Mef2d* nur gering oder gar nicht verändert. Für *Runx2*, *Tcf4* und *Irf8* konnte aber in der RT-PCR der LSK-Population von Knockout-Mäusen eine leichte Reduktion im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden (Abbildung 4.3 A und B).

Somit wurden *Mef2c* und *Mef2d* nicht nur als essentielle Faktoren der B-Zell-Differenzierung identifiziert, sondern es konnte auch gezeigt werden, dass sie mit *Spi-B*, *Irf7* und *Irf8* oder auch *Runx2* entscheidende Gene der pDC-Differenzierung regulieren. Damit stellen *Mef2c* und *Mef2d* zwei Transkriptionsfaktoren dar, die die B-Zell- und die pDC-Differenzierung gleichermaßen beeinflussen, was zudem das Modell eines gemeinsamen Ursprungs der B-Zellen und der pDCs unterstützt.

## 5 Diskussion

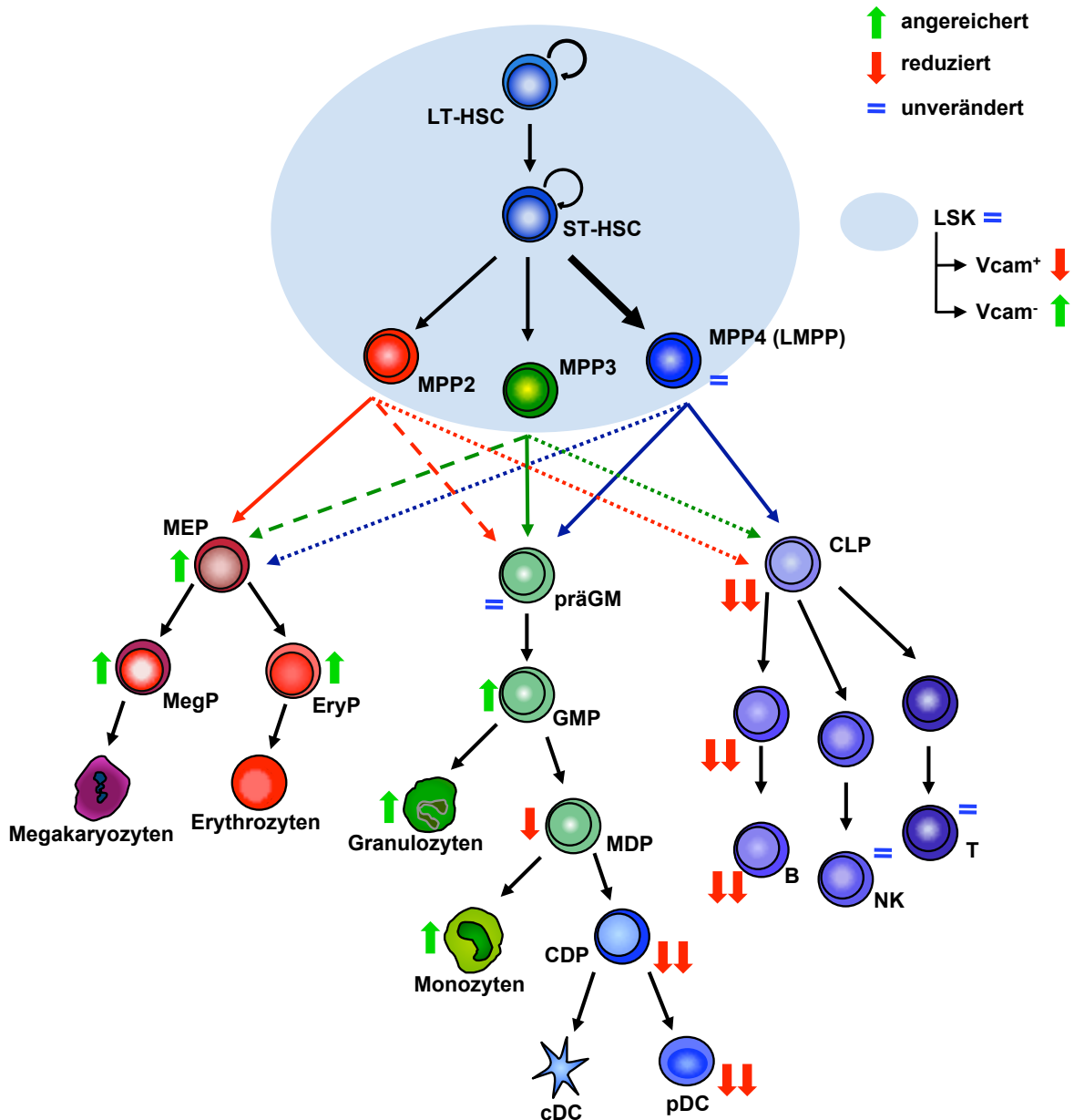
In der Regulation der hämatopoetischen Differenzierung nehmen Transkriptionsfaktoren eine herausragende Stellung ein. Die Bedeutung eines Transkriptionsfaktors für die Hämatopoese oder die Differenzierung einzelner Linien kann häufig dadurch nachvollzogen werden, dass eine aktivierende Mutation dieses Transkriptionsfaktors zur Ausbildung einer Leukämie führt. Ebenso resultiert der Knockout eines bedeutenden Faktors im Mausmodell häufig in einer Beeinträchtigung der Blutbildung bis hin zum Differenzierungsblock einzelner Linien oder sogar der gesamten Hämatopoese.

Der Transkriptionsfaktor *Mef2c* agiert in verschiedenen Formen der akuten Leukämie als Onkogen (Valk *et al.* 2004, Homminga *et al.* 2011). Außerdem zeigen verschiedene konditionale Knockout-Mausmodelle, dass die Deletion von *Mef2c* die hämatopoetische Differenzierung, insbesondere die B-Zell-Differenzierung, zwar beeinflusst, dies jedoch nicht zu einem Differenzierungsblock führt (zusammengefasst in Cante-Barrett, 2014). Neben *Mef2c* weist auch *Mef2d* hohe Expressionslevel in der Hämatopoese auf (ImmGene, Heng *et al.* 2008) und auch für *Mef2d* sind Leukämie-auslösende Mutationen bekannt (Prima *et al.* 2005, Prima & Hunger 2007, Gu *et al.* 2016). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein *Mef2c/d*-Doppel-Knockout-Mausmodell, in dem *Mef2c* und *Mef2d* mit Hilfe einer VavCre-Rekombinase in der gesamten Hämatopoese deletiert sind, genauer betrachtet.

Die Ziele dieser Arbeit waren es, den Differenzierungsblock sowie den Einfluss der Doppel-Knockouts auf weitere hämatopoetische Linien zu untersuchen. Ein besonderer Fokus wurde dabei auf die Differenzierung der dendritischen Zellen gelegt. Die Ergebnisse dieser Arbeit werden im Folgenden diskutiert. Abschließend sollen die für die dendritische Differenzierung gewonnenen Erkenntnisse in einem neuen dendritischen Differenzierungsmodell zusammengefasst werden.

### 5.1 Der *Mef2c/d*-Knockout führt nicht nur zu einem Differenzierungsblock der B-Zell-Linie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das *Mef2c/d*<sup>ΔΔ</sup>-VavCre-Mausmodell hinsichtlich veränderter Zellzahlen in der Hämatopoese im Vergleich zu Kontroll-Mäusen mit Hilfe durchflusszytometrischer Analysen untersucht. Dabei wurden sowohl die Populationen der B-Zell-Entwicklung als auch die verschiedenen anderen hämatopoetischen Linien analysiert. Abbildung 5.1 fasst die Ergebnisse in einem Schema zusammen.



**Abbildung 5.1: Zellpopulationen der Hämatopoese im *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>*-VavCre-Mausmodell**

Dargestellt sind die Zellpopulationen der Hämatopoese im *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>*-VavCre-Mausmodell und wie sie sich im Vergleich zum VavCre-Kontroll-Mausmodell verändern. Durch den Knockout von *Mef2c* und *Mef2d* kommt es zur Anreicherung der Vcam-negativen Zellen in der LSK-Population, während die Vcam-positiven Zellen reduziert vorliegen. Die CLPs und das gesamte B-Zell-Kompartiment sind sehr stark reduziert, ebenso die MDPs, die CDPs und die pDCs. Im Gegensatz dazu kommt es zur Anreicherung von Zellen des myeloischen Kompartiments. Die Zellzahlen der MEPs, MegPs und EryPs sowie der GMPs, Granulozyten und Monozyten sind im Vergleich zu Kontroll-Mäusen gestiegen.

Der vollständige Knockout von *Mef2c* und *Mef2d* in der Hämatopoese führte zu einem Differenzierungsblock der B-Zell-Linie. Alle B-Vorläuferpopulationen sowie die reifen B-Lymphozyten des Knochenmarks waren im Vergleich zu VavCre-Kontroll-Mäusen deutlich reduziert. Die CLPs waren ebenfalls stark verringert. Dies führte jedoch kaum zu einer Veränderung anderer lymphatischer Linien. Die LSK-Population insgesamt wurde durch den Knockout von *Mef2c* und *Mef2d* ebenfalls nicht verändert. Eine genauere Analyse der Subpopulationen der LSK erfolgte jedoch nicht. Die Betrachtung des Oberflächenmarkers

Vcam in der LSK-Population lässt allerdings vermuten, dass durch die Deletion von *Mef2c* und *Mef2d* innerhalb der LSK eine Verschiebung einzelner Populationen stattfindet (s. Abschnitt 5.2).

Die Progenitoren der megakaryozytären-erythrozytären Linie, die MEPs, EryPs und die MegPs, waren erhöht und auch in der myeloischen Linie zeigte sich ein Anstieg der GMP-Population sowie der Monozyten und der Granulozyten. Bei den dendritischen Zellen, die klassischerweise ebenfalls zur myeloischen Linie gezählt werden, zeigte sich ein anderes Bild. Die dendritischen Progenitoren, die CDPs, waren ebenso wie die pDCs bei einem Knockout von *Mef2c* und *Mef2d* stark reduziert. Auch die MDP-Population war reduziert, wohingegen die cDCs unverändert vorlagen.

In dieser Arbeit wurde somit erstmals gezeigt, dass die Abwesenheit von *Mef2c* und *Mef2d* nicht nur zum Verlust aller B-Lymphozyten führt, sondern auch andere Linien der hämatopoetischen Entwicklung durch die Deletion beeinträchtigt wurden, wobei der Einfluss auf die dendritische Differenzierung am deutlichsten war.

## 5.2 Der Differenzierungsblock im *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-VavCre-Mausmodell*

In ersten Experimenten wurde der Differenzierungsblock im *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-VavCre-Mausmodell* genauer untersucht. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die LSK-Population, die die HSC und die MPP-Populationen umfasst, im Doppel-Knockout-Mausmodell unverändert im Vergleich zu Kontroll-Mäusen vorlag. Die CLPs besaßen hingegen nur noch ein Fünftel ihrer Populationsgröße im Vergleich zu Kontroll-Mäusen. Der Differenzierungsblock im *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-VavCre-Mausmodell* liegt somit zwischen der LSK-Population und den CLPs.

Innerhalb der LSK-Population wurde der Differenzierungsblock mit Hilfe des Oberflächenmarkers Vcam weiter charakterisiert. Vcam unterteilt die LMPP-Population in Vcam-positive und Vcam-negative und somit in myeloisch-geprägte und lymphatisch geprägte LMPP-Zellen. Mit dem graduellen Verlust von Vcam innerhalb dieser Population geht auch das megakaryozytäre-erythrozytäre Potential verloren, sodass die Vcam-negativen Zellen neben einem sehr geringen myeloischen Potential nur noch lymphatisches Potential besitzen (Lai *et al.* 2005). Damit einhergehend werden auch Gene der lymphatischen Differenzierung, wie *IL7Ra* oder *RAG1*, in der Vcam-negativen Population erstmals exprimiert (Lai & Kondo 2006).

Für das *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-VavCre-Mausmodell* wurde eine Anreicherung der Vcam-negativen Zellen detektiert, während sich die Vcam-positiven Zellen verringerten. Somit führte die Deletion von *Mef2c* und *Mef2d* zur Akkumulation der bereits auf die lymphatische Linie geprägten Vcam-negativen Zellen. B-Zell-spezifische Zielgene von *Mef2c* und *Mef2d*, wie zum Beispiel *Ii7r* oder *Rag1*, die bereits in den Vcam-negativen Zellen exprimiert werden,

lagen im Gegensatz dazu bei der Analyse der gesamten LSK-Population bei einem Knockout von *Mef2c* und *Mef2d* deutlich reduziert vor (siehe Abschnitt 4.2.2.).

### 5.3 *Mef2c* und *Mef2d* als Regulatoren der lymphatischen Differenzierung

#### 5.3.1 Die zweizeitige Regulation der B-Zell-Entwicklung durch *Mef2c* und *Mef2d*

Die Rolle von *Mef2c* in der hämatopoetischen Entwicklung wurde bereits ausführlich untersucht (siehe auch Abschnitt 1.7). Unterschiedliche Einzel-Knockout-Mausmodelle von *Mef2c* wurden generiert, in denen *Mef2c* zu verschiedenen Zeitpunkten der Hämatopoese deletiert wurde. Sie alle zeigen, dass *Mef2c* in B-Lymphozyten regulatorisch aktiv ist. Doch sowohl ein die gesamte Hämatopoese umfassender Knockout als auch die B-Zell-spezifische Deletion von *Mef2c* führt, wenn überhaupt, nur zu einem milden Effekt auf die Zellzahlen lymphatischer Populationen (Khiem *et al.* 2008, Wilker *et al.* 2008, Gekas *et al.* 2009, Debnath *et al.* 2013).

Einen sehr viel deutlicheren Effekt auf die Hämatopoese bewirkt ein *Mef2c/d*-Doppel-Knockout, in dem neben *Mef2c* auch *Mef2d* deletiert wird. Zwei solcher Mausmodelle wurden in unserer Arbeitsgruppe generiert und untersucht. Das *Mef2c/d*<sup>ΔΔ</sup>-Cd79aCre-Mausmodell, in dem *Mef2c* ab den späten CLPs deletiert wurde, führt zu einem Differenzierungsblock ab den späten präB-Zellen, wobei *Mef2c* und *Mef2d* die Transition der präB-Zellen durch die Regulation verschiedener Zielgene, wie *Klf2*, *Irf4* oder *Jun* entscheidend mit beeinflussen (Hauschildt, Masterarbeit 2012, Herglotz *et al.* 2016).

In dieser Arbeit wurde das *Mef2c/d*<sup>ΔΔ</sup>-VavCre-Mausmodell analysiert. Auch in diesem Mausmodell führte die Deletion der beiden Transkriptionsfaktoren zu einem vollständigen Differenzierungsblock. Alle B-Zell-Populationen des Knochenmarks (proB-, präB-, unreife und reife B-Zellen) waren dabei um mehr als 95 % reduziert, wobei der Differenzierungsblock sogar noch vor den CLPs lag, die ebenfalls stark reduziert waren.

*Mef2c* und *Mef2d* regulieren die B-Zell-Entwicklung demnach nicht nur bei der präB-Zell-Transition, sondern auch zu einem zweiten früheren Zeitpunkt beeinflussen diese beiden Transkriptionsfaktoren die Linienentscheidung maßgeblich mit. Da die CLPs im *Mef2c/d*<sup>ΔΔ</sup>-VavCre-Mausmodell die erste durch den *Mef2c/d*-Knockout stark reduzierte Population ausmachen, wäre eine entscheidende Regulation der B-Zell-Entwicklung durch *Mef2c* und *Mef2d* zu diesem Zeitpunkt denkbar. Doch auch schon zu einem früheren Zeitpunkt könnten *Mef2c* und *Mef2d* regulatorisch aktiv sein, wobei sich der vollständige Effekt eines Knockouts erst im Stadium der CLPs äußert.

### 5.3.2 *Pax5* und *Ebf1* sind potentielle Zielgene von *Mef2c* und *Mef2d*

Um zu untersuchen, wie *Mef2c* und *Mef2d* zu einem so frühen Zeitpunkt der Hämatopoese die B-Zell-Differenzierung regulieren könnten, wurde das Genexpressionsprofil der LSK-Population von *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-VavCre*-Mäusen mit dem von Kontroll-Mäusen verglichen. So konnten wichtige Gene der B-Zell-Entwicklung als potentielle Zielgene identifiziert werden. Unter ihnen waren beispielsweise *Ii7r*, *Ebf1*, *Pax5*, *Rag1/2*, *Irf4* oder auch *Foxo1*. Einige Gene wurden bereits als mögliche Zielgene von *Mef2c* und *Mef2d* beschrieben. Dabei erfolgte die Analyse allerdings während des proB-Zellstadiums und andere Gene wurden zu diesem Zeitpunkt als relevante Zielgene identifiziert. Zu ihnen gehören beispielsweise *immediate early* Gene, die die Proliferation infolge des prä-BCR-Signallings vorantreiben (Herglotz *et al.* 2016, siehe auch Abschnitt 1.7).

Zwei in dieser Arbeit neu identifizierte potentielle Zielgene von *Mef2c* und *Mef2d* könnten die Gene der Transkriptionsfaktoren *Ebf1* und *Pax5* sein. Es zeigte sich, dass *Ebf1* und *Pax5* in der LSK-Population von *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-VavCre*-Mäusen um mehr als 90 % reduziert waren. Diese Reduktion konnte auch mittels quantitativer Realtime-PCR bestätigt werden. Beide Transkriptionsfaktoren sind entscheidende Regulatoren der B-Zell-Entwicklung, deren Deletion im Mausmodell zu einer Blockade in der B-Zell-Differenzierung führt. Zudem wurde für beide Faktoren beschrieben, dass ihre Expression die myeloische Entwicklung antagonisiert (Cobaleda *et al.* 2007, Pongubala *et al.* 2008). Dies könnte eine Erklärung dafür sein, warum der *Mef2c/d*-Doppel-Knockout nicht nur zur Blockade der B-Zell-Differenzierung führt, sondern sich bei einer Deletion von *Mef2c* und *Mef2d* auch myeloische Zellen anreichern (vgl. Abschnitt 4.4.1). Gegen eine Regulation von *Pax5* und auch *Ebf1* durch *Mef2c* und *Mef2d* spricht, dass diese beiden Faktoren erst ab dem proB-Zellstadium besonders hoch exprimiert werden und insbesondere dort ihre Wirkung entfalten. Der Differenzierungsblock im *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-VavCre*-Mausmodell entsteht jedoch bereits vor den CLPs, weswegen auch die Identifizierung der Zielgene in der LSK-Population erfolgte. Außerdem konnte *Pax5* in *Mef2c*-defizienten MPPs nicht als Zielgen von *Mef2c* identifiziert werden (Stehling-Sun *et al.* 2009).

Ob *Pax5* und *Ebf1* so frühzeitig in der Hämatopoese Zielgene von *Mef2c* und *Mef2d* sein könnten, muss daher durch weitere Experimente bestätigt werden. Durch die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) könnte untersucht werden, ob *Mef2c* und *Mef2d* direkt an Promotoren von *Ebf1* und *Pax5* binden. Außerdem könnten Überexpressionsmodelle von *Mef2c* und *Mef2d* generiert werden, in denen untersucht wird, ob die *Mef2c/d*-Überexpression auch die Expression von *Pax5* und *Ebf1* erhöht. Für ein solches Modell würde sich beispielsweise die HSC-ähnliche Zell-Linie HPC-7 eignen. In dieser Zell-Linie konnte auch schon gezeigt werden, dass *Mef2c* an Promoter-Regionen von *Ebf1* und *Pax5* bindet (Kong *et al.* 2016). Des Weiteren könnte untersucht werden, ob ein durch die Deletion

von *Mef2c* und *Mef2d* generierter Differenzierungsblock durch die Überexpression von Pax5 und oder Ebf1 wieder aufgehoben werden könnte.

### 5.3.3 T-Lymphozyten und NK-Zellen im *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-VavCre-Mausmodell*

Die gemeinsame Progenitor-Population der lymphatischen Linien ist die CLP-Population. Da diese durch den *Mef2c/d*-Doppel-Knockout stark reduziert vorlag, wurden auch die anderen lymphatischen Linien hinsichtlich veränderter Populationsgrößen untersucht. Interessanterweise wurden die Populationen der NK-Zellen und der T-Lymphozyten durch den Verlust von *Mef2c* und *Mef2d* kaum beeinträchtigt. Während die NK-Zellen im *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>*-Mausmodell nicht signifikant verändert waren, zeigte sich im T-Zell-Kompartiment dieser Mäuse nur bei den doppelt-positiven T-Lymphozyten im Knochenmark eine leichte Reduktion im Vergleich zu Kontroll-Mäusen. Alle anderen untersuchten T-Zell-Populationen in Knochenmark und Milz waren nicht signifikant verändert.

Eine mögliche Erklärung hierfür bieten die Arbeiten von Månsson und Kollegen (Månsson *et al.* 2010). Unter anderem mit Hilfe von Einzel-Zell-Analysen zeigten sie, dass die CLPs aus drei verschiedenen Subpopulationen mit unterschiedlichem Differenzierungspotential bestehen. Dabei verlieren die „klassischen“ CLPs zuerst das NK-Differenzierungspotential und differenzieren in B-/T-restringierte Progenitoren. Schließlich verlieren diese auch das Potential, in T-Lymphozyten zu differenzieren und reifen zu B-Zell-spezifischen Progenitoren innerhalb der CLP-Population (Månsson *et al.* 2010). Möglicherweise betrifft die starke Reduktion der CLPs im *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-VavCre-Mausmodell* also insbesondere die B-Zell-spezifische Population der CLPs.

Die Einteilung dieser Subpopulationen erfolgte unter anderem durch die Expression von *Rag1* innerhalb der CLPs. Mit zunehmender B-Spezifisierung steigt die *Rag1*-Expression in den CLPs an. Da *Rag1* ein Zielgen von *Mef2c* und *Mef2d* ist, wäre dies ein weiterer Hinweis darauf, warum nur die B-Zell-Differenzierung von einem *Mef2c/d*-Doppel-Knockout betroffen ist, obwohl auch die CLPs stark reduziert vorliegen.

## 5.4 Die Anreicherung myeloischer Populationen im *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-VavCre-Mausmodell*

In verschiedenen akuten Leukämie-Formen liegt *Mef2c* als Translokation vor. Obwohl *Mef2c* vor allem ein wichtiger Regulator der B-Zell-Differenzierung ist, konnte bisher jedoch noch keine *MEF2C*-Translokation in einer B-ALL nachgewiesen werden. In den meisten Fällen findet sich die *MEF2C*-Translokation in akuten myeloischen Leukämien und *Mixed-Lineage-Leukämien* (MLL). In der MLL reichern sich frühe Vorläuferzellen, sogenannte Blasten an, die durch die Expression von Oberflächenmarkern sowohl der lymphatischen als auch der myeloischen Linie charakterisiert sind. Dies legt die Vermutung nahe, dass *Mef2c* vielleicht auch die myeloische Differenzierung beeinflusst. Zudem führt der Differenzierungsblock im



*Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>*-VavCre-Mausmodell zur Akkumulation Vcam-negativer Zellen der LSK-Population, die zwar vorrangig in Richtung der B-Lymphozyten differenzieren, aber noch geringes myeloisches Potential besitzen.

Aus diesen Gründen wurde das myeloische Kompartiment im *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>*-VavCre-Mausmodell ebenfalls untersucht. Tatsächlich kam es zur Anreicherung des gesamten myeloischen Kompartiments, das sich im Vergleich zu Kontroll-Mäusen mehr als verdoppelte. Innerhalb des myeloischen Kompartiments reicherten sich dabei einerseits die Progenitoren der megakaryozytären-erythrozytären Linie (MEPs, EryPs, MegPs) an, andererseits führte der *Mef2c/d*-Doppel-Knockout auch zur Akkumulation von GMPs sowie der Monozyten und der Granulozyten.

Da die Vcam-negativen Zellen kein megakaryozytäres-erythrozytäres Potential mehr besitzen (Lai & Kondo 2006), lassen sich durch die Akkumulation dieser Zellen im *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>*-VavCre-Mausmodell die vergrößerten MEP-, EryP- und MegP-Populationen nicht erklären. Vielleicht führt aber auch allein das Fehlen des gesamten B-lymphatischen Kompartiments bereits zur Expansion der myeloischen Linien.

Möglicherweise könnten Mef2c und Mef2d auch als Repressoren myeloischer Gene fungieren. Die Herunterregulation von MEF2C mittels siRNA in der Zellkultur führte zu einer verstärkten Expression des Gens *Cebpa*, welches für den myeloischen Transkriptionsfaktor CEBPα kodiert (Agatheeswaran & Chakraborty 2016). Stehling-Sun *et al.* identifizierten bei der Kultivierung von *Mef2c*-defizienten MPPs ebenfalls eine verstärkte Differenzierung in die myeloische Richtung und zeigte eine Heraufregulation des *Cebpa*-Gens. Stehling-Sun *et al.* postulierten als Erklärung, dass Mef2c möglicherweise nicht nur die B-lymphatische Differenzierung fördert, sondern gleichzeitig die Myelopoese antagonisiert (Stehling-Sun *et al.* 2009). Dagegen spricht jedoch, dass CEBPα nicht nur als Aktivator sondern auch als Repressor der myeloiden Differenzierung agiert (Ohlsson *et al.* 2016). Im *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>*-VavCre-Mausmodell konnte *Cebpa* nicht als Zielgen von Mef2c und Mef2d identifiziert werden. Allerdings waren andere Gene der myeloischen Entwicklung in der LSK-Population von *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>*-VavCre-Mäusen durchaus heraufreguliert (Daten nicht gezeigt). Zu ihnen gehören beispielsweise *Adgre1* (F4/80), *Sfp1* (Pu.1), *Csf1r* (M-Csfr) oder *Csf2ra* (GM-CSFR). Ob diese Gene jedoch tatsächlich direkte Zielgene von Mef2c und Mef2d sind, muss in weiteren Experimenten genauer untersucht werden.

Ein vielversprechendes Zielgen von Mef2c und Mef2d, das möglicherweise die Anreicherung myeloischer Zellen erklärt, könnte zudem *Socs2* sein, das zur *suppressor of cytokine signaling*- (SOCS-) Familie gehört. In hämatopoetischen Zellen erfolgt die Signaltransduktion von verschiedenen Zytokinen in den meisten Fällen durch den JAK/STAT-Signalweg. In diesem Signalweg fungieren die Socs-Mitglieder als negative Regulatoren. Nach der Behandlung mit 5-Fluoruracil, was zur Depletion des Knochenmarks führt, zeigten *Socs2*-

defiziente Mäuse (*Socs<sup>-/-</sup>*) im Vergleich zum Wildtyp eine verstärktes Proliferations- und Regenerationspotential, da der JAK/STAT durch *Socs2* nicht mehr negativ reguliert werden kann (Vitali *et al.* 2015). Insbesondere das myeloproliferative Potential ist in Abwesenheit von *Socs2* verstärkt. Wie *Mef2c* ist auch *Socs2* in verschiedenen akuten Leukämien fehlreguliert. Bioinformatische Analysen regulatorischer Netzwerke zeigten sowohl in der normalen Hämatopoese als auch in akuten Leukämien zudem Übereinstimmungen zwischen SOCS2 und MEF2C. Das Expressionsprofil von MEF2C und SOCS2 in der normalen Hämatopoese ist sehr ähnlich. Außerdem zeigen die AML- und MLL-Typen, die eine Überexpression von MEF2C aufweisen, gleichzeitig die höchste Expression von SOCS2. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von *Mef2c* in der LSK-Population zu einer verstärkten Expression von *Socs2* führt (Vitali *et al.* 2015).

In der LSK-Population des *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-VavCre*-Mausmodells ist die Expression von *Socs2* sehr stark herunterreguliert (Daten nicht gezeigt). Durch die verminderte Expression von *Socs2* fällt möglicherweise die negative Regulation Zytokin-induzierter Signalwege über den JAK/STAT-Signalweg weg, was zu einer Anreicherung myeloischer Zellen führen könnte.

*Socs2* scheint demnach ein aussichtsreicher Kandidat für ein Zielgen von *Mef2c* und *Mef2d* zu sein, wobei bei einer Deletion von *Mef2c* und *Mef2d* der hemmende Einfluss von *Socs2* auf das myeloische Kompartiment unterdrückt wird und es so zu einer Expansion des myeloischen Kompartiments kommt. Es bedarf jedoch noch weiterer Analysen, um *Socs2* eindeutig als Zielgen der *Mef2c*-Proteine zu identifizieren.

## 5.5 *Mef2c* und *Mef2d* sind Regulatoren der dendritischen Differenzierung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass *Mef2c* und *Mef2d* auch in der Differenzierung der dendritischen Zellen regulatorisch aktiv sind. Dabei wurde deutlich, dass insbesondere die CDPs und die pDCs durch den Knockout von *Mef2c* und *Mef2d* ab den HSC (*Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-VavCre*) beeinträchtigt wurden, wohingegen MDPs und die cDCs nahezu unbeeinflusst blieben. Diese Untersuchungen wurden durch in vitro Differenzierungsanalysen und auch durch die Untersuchung des dendritischen Kompartiments in *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-Cd79Cre*-Mäusen vervollständigt.

Dass *Mef2c* und *Mef2d* Regulatoren der pDC-Differenzierung sind, unterstützt die vielfach diskutierte Möglichkeit, dass pDCs lymphatischen Ursprungs sind (vgl. Abschnitt 1.8.3). Schon allein die Tatsache, dass pDCs Charakteristika von lymphatischen Zellen besitzen, wie zum Beispiel die runde lymphatische Zellmorphologie sowie die Expression B-lymphatischer Oberflächenmarker (B220), unterstreicht diese Möglichkeit und wurde daher intensiv untersucht.

Im Folgenden sollen die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse mit dem aktuellen Stand der Forschung in Zusammenhang gebracht werden. Dabei soll das klassische Modell der

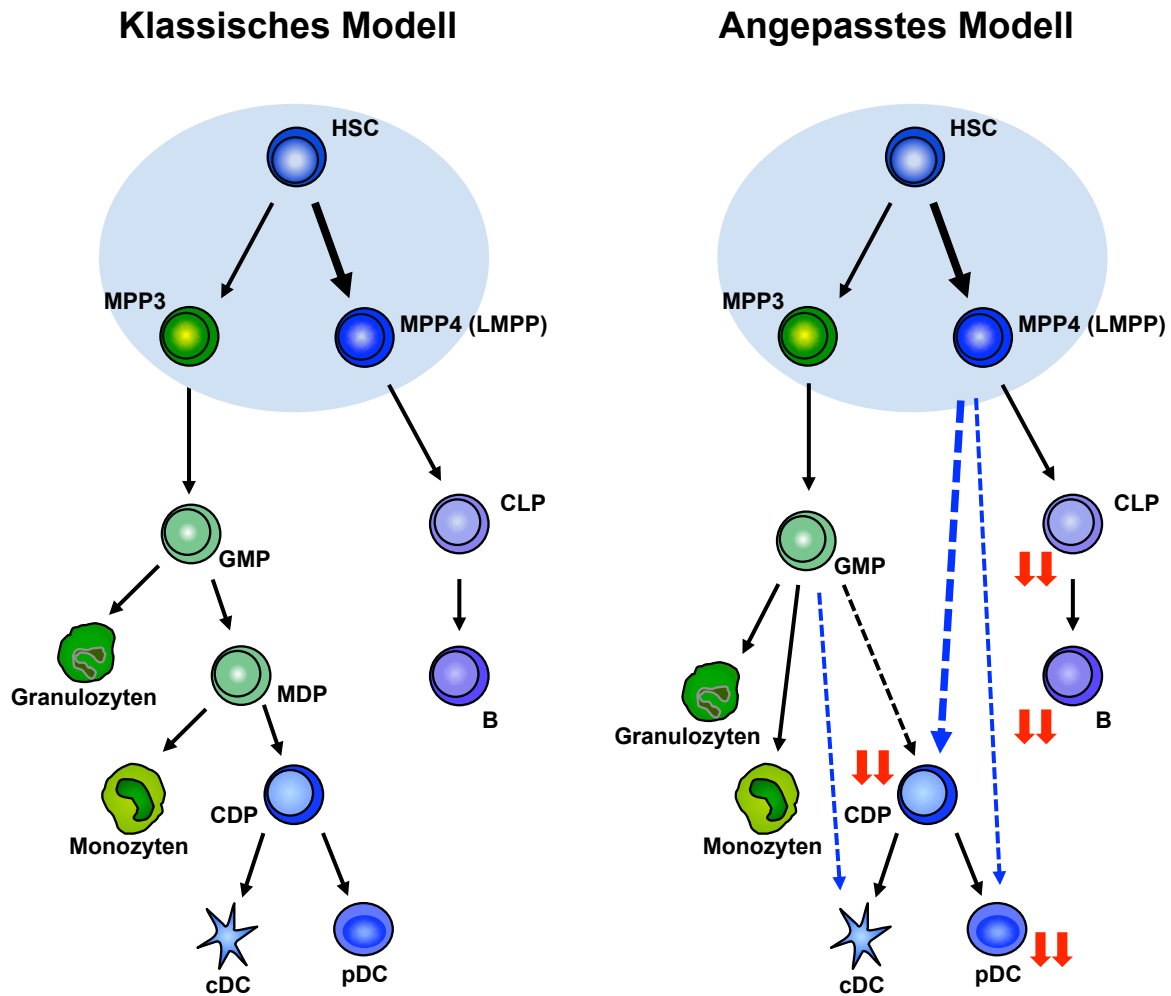
dendritischen Differenzierung unter Berücksichtigung der in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse angepasst und außerdem ein potentielles Netzwerk von Transkriptionsfaktoren der pDC-Differenzierung erstellt werden, das erstmals auch *Mef2c* und *Mef2d* beinhaltet.

### 5.5.1 pDCs entstammen nicht nur der myeloischen Linie

Die Tatsache, dass im *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-VavCre*-Mausmodell ein Differenzierungsblock vorliegt, der die gesamte B-Zell-Linie sowie die CDPs und die pDCs umfasst, legt die Vermutung nahe, dass B-Lymphozyten und pDCs einen gemeinsamen Differenzierungsweg einschlagen und im Gegensatz zur Beschreibung im klassischen Modell der dendritischen Differenzierung zumindest nicht ausschließlich zur myeloischen Linie gerechnet werden. Abbildung 5.2 stellt eine Übersicht des klassischen Modells (links) den Ergebnissen dieser Arbeit und einem daraus resultierenden angepassten Modell der dendritischen Differenzierung (rechts) gegenüber. Die roten Pfeile zeigen die Populationen an, die bei einem *Mef2c/d*-Doppel-Knockout vom Differenzierungsblock betroffen waren (CLPs, Populationen des B-Zell-Kompartiments, CDPs, pDCs). Alle anderen myeloischen, dendritischen und lymphatischen Populationen lagen im Vergleich zu Kontroll-Mäusen entweder nur leicht oder unverändert vor (siehe auch Abbildung 5.1). Die blauen Pfeile markieren potentielle neue Differenzierungswege.

Während die vollständige Deletion von *Mef2c* und *Mef2d* (*Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-VavCre*) die CDP- und pDC-Differenzierung stark einschränkte, führte ein *Mef2c/d*-Knockout ab den späten CLPs (*Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-Cd79aCre*) zu keinerlei Beeinträchtigung des dendritischen Kompartiments. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die B-Lymphozyten und die pDCs ihren gemeinsamen Ursprung bereits in der MPP4-Population (LMPP) bzw. einer anderen Population des LSK-Kompartiments besitzen.

In anderen Experimenten konnte auch für die CLPs dendritisches Differenzierungspotential nachgewiesen werden. Dabei waren die CLPs in der Lage, pDCs aber keine CDPs hervorzubringen (Onai *et al.* 2013, Sathe *et al.* 2013). Da die Untersuchungen des *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-Cd79aCre*-Mausmodells jedoch zeigten, dass das Fehlen von *Mef2c* und *Mef2d* ab den späten CLPs keinerlei Auswirkungen auf die dendritische Differenzierung hat, erscheint eine Abstammung der pDCs von den CLPs im Rahmen der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse als unwahrscheinlich. Zudem ließe sich die starke Reduktion der CDPs im *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-VavCre*-Mausmodell nicht durch den Verlust der CLPs erklären.



**Abbildung 5.2: Alternatives Modell der dendritischen Differenzierung**

Im klassischen Modell der dendritischen Differenzierung (links) entstehen die cDCs und die pDCs aus einem allgemeinen dendritischen Progenitor (CDP), der der myeloischen Linie entstammt. Den CDPs vorangestellt ist der Makrophagen- und dendritischen Zellen-Progenitor (MDP). In einem adaptierten Modell (rechts), beruhend auf den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen am *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-VavCre*-Mausmodell, besitzen die B-Lymphozyten und die pDCs einen gemeinsamen Ursprung. CLPs, B-Lymphozyten, CDPs und pDCs sind im *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-VavCre*-Mausmodell stark reduziert (rote Pfeile). Ausgehend von diesen Ergebnissen könnten die pDCs aus den LMPPs bzw. anderen Vorläuferzellen der LSK-Population entstehen. Dabei differenzieren sie möglicherweise auch über den dendritischen Progenitor der CDPs (blaue Pfeile). Da die cDCs vom Differenzierungsblock nicht betroffen sind, werden diese Zellen möglicherweise auch noch über einen CDP-unabhängigen Weg generiert. Im angepassten Modell sind die MDPs nicht dargestellt, da eine solche Population vermutlich nicht existiert (Sathe *et al.* 2014).

Die cDCs sind von dem Differenzierungsblock nicht betroffen. Eine Erklärung könnte sein, dass CDPs generell sehr viel mehr cDCs als pDCs generieren (Onai *et al.* 2013). Die noch verbleibenden CDPs im *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-VavCre*-Mausmodell sind daher möglicherweise ausreichend, um die gesamte cDC-Population hervorzubringen. Die cDCs könnten sich zusätzlich auch noch über einen CDP-unabhängigen Weg differenzieren (Abbildung 5.2).

Die im klassischen Modell als bipotenter Progenitor der Monozyten und dendritischen Zellen beschriebene MDP-Population war im *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-VavCre*-Mausmodell reduziert. Die aus der MDP-Population hervorgehenden Monozyten lagen jedoch wie auch alle anderen myeloischen Populationen bei einem *Mef2c/d*-Doppel-Knockout leicht vermehrt vor. Die

Reduktion der MDP-Population im *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>-VavCre*-Mausmodell ist daher schwer zu erklären. Für diesen vermeintlichen Widerspruch liefern Sathe *et al.* eine Erklärung (Sathe *et al.* 2014). Sie zeigten nämlich in verschiedenen Experimenten, dass die MDPs auch signifikante Mengen an Granulozyten hervorbringen und folgerten daraus, dass kein bipotenter Progenitor der Monozyten und dendritischen Zellen existiert. Dies ist auch mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen vereinbar, weswegen die MDP-Population im angepassten Modell der dendritischen Differenzierung nicht dargestellt wurde.

#### 5.5.1.1 Mögliche weitere Progenitoren der pDCs

Die Experimente am *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>-VavCre*-Mausmodell unterstützen ein Modell, in dem B-Lymphozyten und pDCs gemeinsam der lymphatischen Linie entspringen. Welchen Weg diese beiden Populationen gemeinsam nehmen und wo die Trennung der Linien erfolgt, konnte in dieser Arbeit noch nicht gezeigt werden. Im Rahmen von Untersuchungen zu dieser Fragestellung wurden zwei weitere dendritische Progenitor-Populationen identifiziert.

Sathe *et al.* zeigten stromabwärts der CLPs eine neue Population, die bereits den pDC-spezifischen Marker PDCA exprimiert, jedoch noch CD11c-negativ ist (Sathe *et al.* 2013). Diese Population produzierte sowohl B-Lymphozyten als auch pDCs, wohingegen sie das Potential verloren hat, in T-Lymphozyten oder NK-Zellen zu differenzieren. Diese Ergebnisse sind damit vereinbar, dass auch im *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>-VavCre*-Mausmodell die T-Lymphozyten und NK-Zellen durch die Deletion von *Mef2c* und *Mef2d* unverändert vorlagen. Diese späte Abzweigung der pDCs von der gemeinsamen Differenzierung mit den B-Lymphozyten steht jedoch im Widerspruch zu den anhand des *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>-Cd79aCre*-Mausmodells erzielten Ergebnissen, bei denen die pDC-Differenzierung durch die Deletion ab den späten CLPs nicht beeinträchtigt war.

Eine zweite Progenitor-Population wurde von Onai *et al.* identifiziert. Diese ist der CDP-Population zwar sehr ähnlich, sie exprimiert im Gegensatz zu den CDPs jedoch kein M-CSFR (Onai *et al.* 2013). Sowohl die CDPs als auch die neu identifizierte M-CSFR-negative Population sind Progenitoren der cDCs und pDCs. Während die CDP-Population aber insbesondere cDCs hervorbringt, zeichnet sich die M-CSFR-negative Population durch eine starke pDC-Produktion aus (Shortman & Sathe 2013).

Onai *et al.* halten es für denkbar, dass die M-CSFR-negative Population durch Herunterregulation von M-CSFR aus den CDPs hervorgeht. Interessanterweise wird *M-Csfr* in der LSK-Population von *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>-VavCre*-Mäusen auf das Fünffache heraufreguliert. Somit besteht die Möglichkeit, dass *M-Csfr* ein Zielgen von *Mef2c* und *Mef2d* sein könnte. Im *Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup>-VavCre*-Mausmodell wäre die Herunterregulation von *M-Csfr* durch die Deletion von *Mef2c* und *Mef2d* nicht mehr gewährleistet, wodurch die M-CSFR-negative Population und damit vorrangig die pDCs nicht mehr hervorgebracht werden können.

Eine weitere Möglichkeit, die von Onai *et al.* untersucht wurde, ist die Abstammung der CDPs und M-CSFR-negativen Progenitoren von der MPP4-Population (LMPPs). Tatsächlich ist diese Population in der Lage, M-CSFR-negative Progenitoren und auch CDPs zu generieren und bilden so einen möglichen Entstehungsort der dendritischen Differenzierung (Shortman & Sathe 2013). Diese Ergebnisse sind auch mit der starken Reduktion der CDPs im *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-VavCre*-Mausmodell vereinbar und könnten somit auch durch den Knockout von *Mef2c* und *Mef2d* schon in der MPP4-Population erklärt werden.

### 5.5.1.2 Die verschiedenen Differenzierungswege dendritischer Zellen

Um die Rolle der MPP4-Population in der dendritischen Differenzierung weiter zu untersuchen, wurden mit Hilfe des sogenannten Barcodings Einzelzell-Analysen dieser Population durchgeführt (Naik *et al.* 2013). Dabei zeigte sich, dass ein Großteil der Zellen dendritisches Potential besitzt und bereits zu einem so frühen Zeitpunkt auf die dendritische Linie geprägt ist. Etwa 50 % der MPP4-Population differenzierte ausschließlich in dendritische Zellen. 10 % dieser Zellen differenzierte vorrangig in B-Lymphozyten und weitere 10 % in myeloische Zellen. Nur etwa 3 % der MPP4-Population besaß tatsächlich multipotentes Potential. Häufig waren die Zellen auch bipotent und differenzierten zum Beispiel in die B-lymphatische und dendritische Linie (Naik *et al.* 2013). Warum ein Großteil der MPP4-Population bereits auf die dendritische Linie geprägt ist, die dendritischen Zellen selber jedoch einen relativ geringen Anteil im Vergleich zu anderen Linien ausmachen, blieb offen. Möglicherweise proliferieren die einen Zellen schneller als andere oder besitzen einen kompetitiven Vorteil (Poltorak & Schraml 2015).

Übereinstimmend mit den Barcoding-Experimenten zeigten mathematische Analysen, dass dendritische Zellen an vielfachen Punkten der murinen Hämatopoese abzweigen können. Diese beinhalten sowohl Zeitpunkte der myeloischen oder der lymphatischen Linie oder aber die dendritischen Zellen differenzieren sich bereits aus multipotenten Progenitoren, wie zum Beispiel der MPP4-Population (Perie *et al.* 2014, Perie & Naik 2015, Poltorak & Schraml 2015).

Insgesamt zeigt sich damit für die Differenzierung der dendritischen Linie ein sehr variables Bild. Für die Entstehung der dendritischen Zellen aus der lymphatischen Linie wurde die MPP4-Population als möglicher Entstehungsort identifiziert, wobei auch hier ein sehr heterogenes Bild besteht.

Die Deletion von *Mef2c* und *Mef2d*, die in dieser Arbeit anhand des *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-VavCre*-Mausmodells untersucht wurde, führte zu keiner Beeinträchtigung der MPP4- bzw. der LSK-Population. Lediglich eine Akkumulation Vcam-negativer Zellen konnte detektiert werden. Dennoch waren die pDCs fast vollständig deletiert. Festzuhalten bleibt somit, dass *Mef2c* und *Mef2d* neben ihrer wichtigen Funktion in der B-lymphatischen Entwicklung eine essentielle

Rolle in der dendritischen Differenzierung einnehmen. Nur in Anwesenheit dieser beiden Transkriptionsfaktoren ist eine adäquate Entwicklung der pDCs und auch der B-Lymphozyten möglich. Möglicherweise regulieren Mef2c und Mef2d dabei in der MPP4-Population die Differenzierung der dendritischen Zellen. Allerdings macht sich die Deletion von *Mef2c* und *Mef2d* nicht in der Veränderung der Größe des MPP4-Kompartiments bemerkbar. Interessant wäre es, die MPP4-Population des *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-VavCre*-Mausmodells ebenfalls mittels Einzelzell-Analyse zu untersuchen, um so herauszufinden, ob sich das dendritische Differenzierungspotential dieser Zellen verändert.

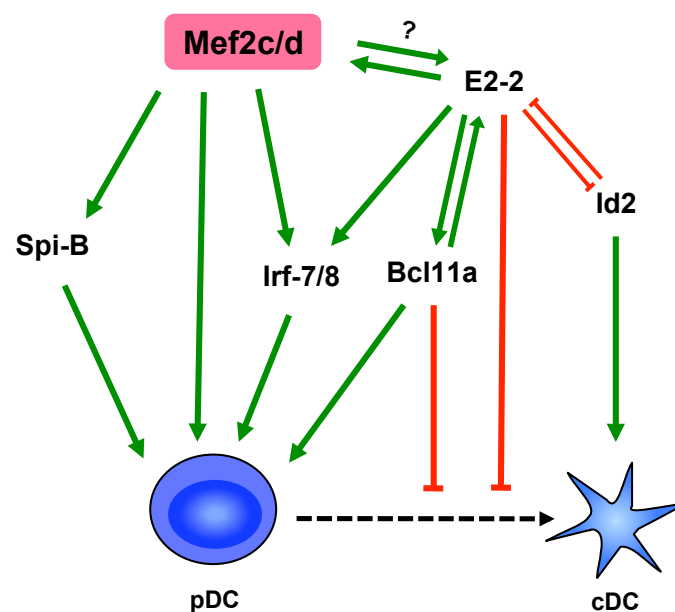
Vielleicht regulieren Mef2c und Mef2d die Expression von M-CSFR herunter, sodass über die M-CSFR-negativen CDPs die pDCs entstehen können. Aber auch andere wichtige Gene der dendritischen Differenzierung könnten durch Mef2c und Mef2d maßgeblich reguliert werden (siehe Abschnitt 4.2.2 und 5.5.2).

### 5.5.2 Regulatorisches Netzwerk der dendritischen Differenzierung

Mit Hilfe von *RNA-Sequencing*-Analysen der LSK-Population von *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-VavCre*-Mäusen wurden potentielle Zielgene identifiziert, durch dessen Regulation Mef2c und Mef2d die pDC-Differenzierung beeinflussen könnten. Abbildung 5.3 zeigt ein Modell der Differenzierungsregulation der pDCs durch Transkriptionsfaktoren, das einerseits die Ergebnisse dieser Arbeit und andererseits bereits bekannte Regulationsmechanismen zusammenfasst. Als aussichtsreiche Zielgen-Kandidaten, die durch Mef2c und Mef2d reguliert werden, konnten *Spi-B* und *Irf7/8* ausgemacht werden.

Der Master-Regulator der pDC-Differenzierung ist allerdings E2-2 (*Tcf4*). E2-2 wird besonders stark in pDCs exprimiert und die Deletion von *Tcf4* führt zum Verlust der pDCs, während alle hämatopoetischen Linien unverändert vorliegen (Cisse *et al.* 2008, Ghosh *et al.* 2010). Zudem reguliert E2-2 eine Vielzahl essentieller Gene für die pDC-Differenzierung. So fördert E2-2 nicht nur Entwicklung der pDCs, sondern unterdrückt durch die Herunterregulation von *Id2* auch die cDC-Differenzierung (Abbildung 5.3). Mit Hilfe von *RNA-Sequencing*-Analysen wurde untersucht, ob die Deletion von *Mef2c* und *Mef2d* auch die *Tcf4*-Expression beeinflusst. Dies würde bedeuten, dass Mef2c und Mef2d in der pDC-Differenzierungskaskade noch über E2-2 (*Tcf4*) stehen. Die *Tcf4*-Expression wurde durch den *Mef2c/d*-Doppel-Knockout in der LSK-Population jedoch nur sehr leicht reduziert. Auch in den Realtime-Analysen zeigte sich keine deutlichere Reduktion von *Tcf4*. In *ChiP-on-ChiP*-Experimenten konnte aber gezeigt werden, dass *Mef2d* ein potentielles direkt Zielgen von E2-2 ist (Ghosh *et al.* 2010). Somit wäre es möglich, dass E2-2 in seiner Rolle als Master-Regulator, die dendritische Differenzierung über die Bindung an Promotorbereiche von *Mef2d* beeinflusst. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass Mef2c und E2-2 gemeinsam die pDC-Differenzierung regulieren.

Spi-B wird ebenfalls in pDCs stark exprimiert und der Verlust von *Spi-B* führt zu einer deutlichen Reduktion der pDCs im Knochenmark (Schotte *et al.* 2003, Sasaki *et al.* 2012). In dieser Arbeit zeigte sich, dass die *Spi-B*-Expression in der *Mef2c/d*-deletierten LSK-Population um mehr als die Hälfte reduziert war, was mit Hilfe der Realtime-PCR bestätigt werden konnte. Spi-B reguliert die pDC-Differenzierung unter anderen durch die Aktivierung von *Irf7* und *Irf8*. Diese beiden Faktoren regulieren in pDCs die Interferon-Antwort, indem sie die Transkription von Typ-I-Interferon-Genen in pDCs aktivieren. Auch *Irf7* wurde durch den Doppel-Knockout von *Mef2c* und *Mef2d* deutlich reduziert. Bei den Realtime-Analysen zeigte sich außerdem eine leichte Reduktion der *Irf8*-Expression. Mef2c und Mef2d könnten demnach einerseits über die Aktivierung von *Spi-B* die pDC-Differenzierung regulieren (Abbildung 5.3). Andererseits könnten Mef2c und Mef2d auch direkt die Expression von *Irf7* und *Irf8* aktivieren, indem die beiden Transkriptionsfaktoren an Promotor-Regionen dieser Gene binden. Auch eine direkte Regulation der pDC-Differenzierung über andere noch nicht identifizierte Zielgene wäre möglich. Um *Spi-B* und *Irf7/8* als Zielgene von Mef2c und Mef2d zu bestätigen, müssen allerdings noch weitere Versuche durchgeführt werden. Einerseits sollte das RNA-Sequencing noch einmal wiederholt werden. Idealerweise würde sich dafür die MPP4-Population eignen, um genau die Population zu verwenden, in der Mef2c und Mef2d möglicherweise regulatorisch aktiv sind. Andererseits könnten ChIP-Experimente durchgeführt werden, um nachzuweisen, dass *Spi-B* und *Irf7/8* auch direkte Zielgene von Mef2c und Mef2d sind.



**Abbildung 5.3: Transkriptionsfaktoren in der dendritischen Differenzierung**

Mef2c/d reguliert die pDC-Differenzierung über *Spi-B* oder *Irf7/8*. Auch eine Differenzierung über weitere noch nicht bekannte Faktoren ist möglich. Ob Mef2c und Mef2d auch in der Lage sind, *Tcf4* (E2-2) zu aktivieren oder aber *Mef2c/d* durch E2-2 reguliert wird, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Ein weiterer pDC-Transkriptionsfaktor ist Bcl11a. Eine Regulation durch Mef2c und Mef2d konnte in dieser Arbeit jedoch nicht festgestellt werden. Angepasst an Ghosh *et al.* 2010, Moore & Anderson 2013 und Ippolito *et al.* 2014.



Auch *Runx2* wird als Regulator der pDC-Differenzierung beschrieben. Die RNA-Sequencing-Ergebnisse zeigten allerdings nur einen sehr geringen Effekt des *Mef2c/d*-Doppel-Knockouts auf die *Runx2*-Expression. In den Realtime-Analysen war die Expression von *Runx2* deutlicher reduziert. *Runx2* steuert vor allem die Migration von pDCs in peripheren Geweben. Da *Mef2c* und *Mef2d* vor allem die Differenzierung in frühen Stadien regulieren, ist *Runx2* als Zielgen von *Mef2c* und *Mef2d* jedoch eher unwahrscheinlich.

Ein weiterer wichtiger Regulator der pDC-Differenzierung ist *Bcl11a*. Dabei weist dieser Faktor im Vergleich zu *Mef2c* und *Mef2d* sehr ähnliche Eigenschaften auf. Ein *Bcl11a*-VavCre-Knockout-Mausmodell zeigte wie auch das *Mef2c/d*<sup>ΔΔ</sup>-VavCre-Mausmodell einen Verlust des B-Zell-Kompartiments und der pDCs, während andere Linien unbeeinträchtigt blieben (Ippolito *et al.* 2014). Der Differenzierungsblock in der B-Zell-Linie beginnt dabei ebenfalls mit einer starken Reduktion der CLPs. Zudem konnten *Ebf1* und *Pax5* als Zielgene vom *Bcl11a* in der B-Zell-Entwicklung identifiziert werden (Liu *et al.* 2003).

Die pDC-Differenzierung reguliert *Bcl11a* unter anderem durch die direkte Bindung an Promotoren von *Spi-B* und *Tcf4*. Im *Mef2c/d*<sup>ΔΔ</sup>-VavCre-Mausmodell konnte *Bcl11a* jedoch nicht als potentiell Zielgen von *Mef2c* und *Mef2d* identifiziert werden. Umgekehrt ist bisher auch keine Regulation der Mef2-Proteine durch *Bcl11a* bekannt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *Mef2c* und *Mef2d* die pDC-Differenzierung über die Bindung von Promotor-Regionen von *Spi-B* und/oder *Irf7/8* regulieren (Abbildung 5.3). Möglicherweise stehen die Mef2-Proteine dabei auch unter der Regulation von E2-2, dem Master-Regulator der pDC-Differenzierung. Eine mögliche Beeinflussung von *Tcf4* (E2-2) durch die Mef2-Proteine konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Vielleicht orchestrieren die Mef2-Proteine und E2-2 die pDC-Differenzierung aber auch gemeinsam. *Bcl11a* konnte in dieser Arbeit ebenfalls nicht als Zielgen von *Mef2c* und *Mef2d* identifiziert werden, obwohl dieser Transkriptionsfaktor sowohl in der B-Zell- als auch in der pDC-Differenzierung Übereinstimmungen mit *Mef2c* und *Mef2d* aufweist.

## 6 Zusammenfassung

Die Hämatopoese ist ein fein abgestimmter Prozess, in dem die Differenzierung maßgeblich durch die Aktivität von Transkriptionsfaktoren reguliert wird. Die Wichtigkeit eines Transkriptionsfaktors für die Hämatopoese wird immer dann besonders deutlich, wenn dieser Faktor fehlreguliert ist und die Hämatopoese nicht mehr regelgerecht ablaufen kann. So können Translokationen oder die irreguläre Expression eines Transkriptionsfaktors zur malignen Entartung hämatopoetischer Zellen und damit zur Ausbildung einer Leukämie führen. Eine solche Fehlregulation konnte in Genen, die für Mitglieder der MEF2-Transkriptionsfaktor-Familie kodieren, gezeigt werden. Hohe Expressionslevel von MEF2C wurden in Formen akuter myeloischer Leukämien, ausgelöst durch eine *MLL*-Translokation, gefunden und sind mit einer schlechten Prognose assoziiert. Auch chromosomale Translokationen des *MEF2D*-Gens wurden in verschiedenen akuten B-lymphatischen Leukämien gefunden. Um die Rolle dieser zwei Transkriptionsfaktoren in der Hämatopoese besser verstehen zu können, wurden *Mef2c*- bzw. *Mef2d*-Einzel-Knockout-Mausmodelle untersucht, wobei jedoch nur ein geringer Effekt auf die Hämatopoese beobachtet werden konnte. Ein Grund hierfür könnten kompensatorische Mechanismen dieser zwei eng verwandten Faktoren sein, weswegen in der hier vorliegenden Arbeit ein *Mef2c/d*-Doppel-Knockout-Mausmodell (*Mef2c/d*<sup>ΔΔ</sup>-VavCre), in dem *Mef2c* und *Mef2d* in allen hämatopoetischen Zellen deletiert sind, untersucht werden sollte. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen zum einen, dass *Mef2c* und *Mef2d* für die Entwicklung der B-Lymphozyten und der plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs) essentiell sind. Zum anderen liefern sie neue Erkenntnisse über die Linienentscheidung einzelner Populationen der Hämatopoese sowie deren Differenzierungswege.

Die ersten Ergebnisse dieser Arbeit wurden bei der Untersuchung des B-Zell-Kompartiments in *Mef2c/d*<sup>ΔΔ</sup>-VavCre-Mäusen erzielt. Alle B-Zell-Populationen des Knochenmarks (proB-, präB, unreife und reife B-Zellen) waren im Vergleich zu Kontroll-Mäusen um mehr als 95 % reduziert. Andere lymphatische Linien, wie die T-Lymphozyten und die NK-Zellen, wurden durch die Deletion von *Mef2c* und *Mef2d* hingegen nur wenig beeinträchtigt. Alle drei lymphatischen Linien haben ihren Ursprung in einer gemeinsamen lymphatischen Progenitor-Population, den *common lymphoid progenitors* (CLPs). Interessanterweise konnten jedoch keine CLPs im Knochenmark von *Mef2c/d*-Doppel-Knockout-Mäusen detektiert werden. Diese Ergebnisse zeigen einerseits, dass der B-lymphatische Differenzierungsblock bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt der lymphatischen Entwicklung auftritt und andererseits, dass die T-Lymphozyten und NK-Zellen auch noch einen anderen Ursprung als die CLPs besitzen müssen. Die CLPs differenzieren aus multipotenten Progenitoren (MPPs), die zusammen mit den hämatopoetischen Stammzellen (HSC) das so genannte LSK- (Lin<sup>-</sup>Sca<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>-) Kompartiment ausmachen. Obwohl die Gesamtzellzahl der

LSK-Population durch die Deletion von *Mef2c* und *Mef2d* nicht beeinflusst wurde, war der Anteil lymphatisch geprägter Zellen (Vcam<sup>-</sup>) innerhalb der LSK-Population erhöht.

Zur Identifizierung potentieller Zielgene von *Mef2c* und *Mef2d* wurden RNA-*Sequencing*-Analysen durchgeführt, in denen genomweite Genexpressionsprofile der LSK-Population aus *Mef2c/d*<sup>Δ/Δ</sup>-VavCre-Mäusen mit denen aus Kontroll-Mäusen verglichen wurden. Dabei konnten vielversprechende Zielgene von *Mef2c* und *Mef2d* identifiziert werden. Viele dieser Zielgene kodieren für Transkriptionsfaktoren, die maßgeblich an der B-lymphatischen Linienentscheidung beteiligt sind. So waren *Ebf1* und *Pax5* in *Mef2c/d*<sup>Δ/Δ</sup>-VavCre-Mäusen beispielsweise um mehr als 90 % herunterreguliert, was mittels quantitativer Realtime-PCR bestätigt wurde.

Die Untersuchung des myeloischen Kompartiments zeigte, dass alle Progenitor-Populationen (granulozytär-monozytär, megakaryozytär und/oder erythrozytär) vergrößert waren. Dies lässt vermuten, dass *Mef2c* und *Mef2d* die myeloische Differenzierung entweder inhibieren oder die Expansion des myeloischen Kompartiments unterdrücken. Interessanterweise wurden die Gene *Csf1r* und *Socs1* im LSK-Kompartiment von *Mef2c/d*<sup>Δ/Δ</sup>-VavCre-Mäusen heraufreguliert. *Csf1r* kodiert für einen wichtigen myeloischen Rezeptor und *Socs1* für einen Inhibitor des JAK/STAT-Signalweges, was die Hypothese der Unterdrückung der myeloischen Expansion unterstützen könnte.

In dieser Arbeit konnte zudem erstmals gezeigt werden, dass *Mef2c* und *Mef2d* die dendritische Differenzierung regulieren. Während die Deletion von *Mef2c* und *Mef2d* zwar keinen Einfluss auf die klassischen (c)DCs hatte, waren die pDCs hingegen sehr stark reduziert bzw. nicht vorhanden, was auch in vitro bestätigt werden konnte. Bemerkenswerterweise war die gemeinsame Progenitor-Population (CDP) ebenfalls reduziert, was damit erklärt werden könnte, dass die cDCs noch eine unabhängige Progenitor-Population besitzen. Im klassischen Modell der dendritischen Differenzierung entstammen die cDCs und die pDCs der myeloischen Linie. Ein lymphatischer Ursprung der pDCs wird jedoch vielfach diskutiert. Der lymphatische Differenzierungsblock in *Mef2c/d*<sup>Δ/Δ</sup>-VavCre-Mäusen könnte die Hypothese eines gemeinsamen Ursprungs von B-Lymphozyten und pDCs unterstützen. Die Analysen von *Mef2c/d*<sup>Δ/Δ</sup>-Cd79aCre-Mäusen, in denen die Deletion von *Mef2c* und *Mef2d* erst in den späten CLPs erfolgt, zeigten jedoch eine normale pDC-Differenzierung. Diese Ergebnisse könnten allerdings durch einen gemeinsamen Progenitor der pDCs und B-Lymphozyten oberhalb der späten CLPs (zb. innerhalb der MPP-Population) erklärt werden. Interessanterweise waren Gene, die für den dendritischen Transkriptionsfaktor SpiB und die *Interferon response factors* (Irf) 7 und 8 kodieren, im LSK-Kompartiment von *Mef2c/d*<sup>Δ/Δ</sup>-VavCre-Mäusen herunterreguliert und kommen somit als potentielle Zielgene von *Mef2c* und *Mef2d* in Frage.

Zusammengefasst zeigt diese Arbeit, dass Mef2c und Mef2d zentrale Regulatoren der Hämatopoese sind. Die Deletion dieser beiden Transkriptionsfaktoren in einem Mausmodell führt zu einem Differenzierungsblock der B-Zell- und auch der pDC-Linie. Verschiedene Transkriptionsfaktoren, die die Differenzierung dieser beiden Linien regulieren, wurden als potentielle Zielgene von Mef2c und Mef2d identifiziert. Zusätzlich unterstützt diese Arbeit die Hypothese eines gemeinsamen lymphatischen Ursprungs der B-Lymphozyten und der pDCs und unterstreicht die Variabilität der Linienentscheidungen innerhalb des stark heterogenen MPP-Kompartiments.

## 7 Summary

Hematopoiesis is a tightly coordinated process, in which differentiation is regulated by the activity of transcription factors. The importance of a transcription factor for hematopoiesis becomes obvious when the factor is dysregulated and hematopoiesis cannot proceed regularly. Thus, disruption or abnormal expression of a transcription factor might lead to malignant aberration of hematopoietic cells and consequently to development of leukemia. Such a dysregulation has been observed in genes encoding members of the MEF2 family of transcription factors. For one, high expression levels of MEF2C are found in acute myeloid leukemia carrying *MLL*-translocations and are associated with poor prognosis. Also chromosomal translocations involving the *MEF2D* gene have been identified in different types of B-lymphatic acute leukemia. To better understand the role of these two transcription factors in hematopoiesis, single *Mef2c* or *Mef2d* knockout mice have been investigated, but only a subtle effect on hematopoiesis was observed. As this may be attributable to compensatory mechanisms of these two closely related factors, the aim of this work was to investigate a *Mef2c/d* double knockout mouse model (*Mef2c/d*<sup>ΔΔ</sup>-VavCre), in which *Mef2c* and *Mef2d* are deleted in all hematopoietic cells. The analysis reported here demonstrates that *Mef2c* and *Mef2d* are essential for the development of two important immune cell types, B-lymphocytes and plasmacytoid dendritic cells (pDCs), but also revealed novel insight into models of lineage commitment and differentiation.

The first clear result came from examination of the B-cell compartment in *Mef2c/d*<sup>ΔΔ</sup>-VavCre mice. All B cell populations of the bone marrow (proB, preB, immature and mature lymphocytes) were reduced by more than 95% as compared to controls. In contrast, other lymphatic lineages, such as T lymphocytes and NK cells were only minimally impaired by deletion of *Mef2c* and *Mef2d*. All three lymphoid lineages are postulated to arise from a common lymphoid progenitor (CLP), but interestingly, no CLPs could be detected in the double knockout mice. This result demonstrates that the severe block to B-cell differentiation occurs at a very early stage of lymphoid commitment, but also shows that T and NK lymphocytes can arise from alternative progenitors. The CLPs differentiate from multipotent progenitors (MPP) that together with the hematopoietic stem cells (HSC) are found within a so-called "LSK" compartment. Although the number of cells within the LSK compartment was not impacted by loss of the *Mef2* proteins, phenotypic characterization suggested a skewing toward lymphoid-primed cells (e.g. VCAM<sup>neg</sup>). To identify potential *Mef2c/d* target genes, RNA sequencing analysis was performed, in which genome-wide gene expression profiles of LSKs in *Mef2c/d*<sup>ΔΔ</sup>-VavCre mice were compared with the profiles of control mice. Promising *Mef2* candidates target genes encoding transcription factors necessary for commitment toward B-cell differentiation were identified. *Ebf1* and *Pax5* were down-regulated by more than 90 % in *Mef2c/d* knockout mice, which was confirmed by quantitative real-time analysis.

The second observation was made within the myeloid compartment, where an overall increase in progenitors committed to megakaryocytic, erythroid, monocytic, and/or granulocytic compartments was shown, suggesting the Mef2 factors are necessary to either inhibit myeloid differentiation or to suppress their expansion. Strikingly, evidence for the later hypothesis was obtained by the observation that the *Csf1r* and *Socs2* genes, encoding a key myeloid receptor and an inhibitor of JAK/STAT signaling pathways, respectively, are upregulated in the LSK compartment.

Finally, for the first time, the regulation of dendritic differentiation by Mef2c and Mef2d was discovered. *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-VavCre* mice contained normal levels of conventional (c)DCs, but no or greatly reduced levels of pDC – a finding verified with *in vitro* culture experiments. Interestingly, the absolute level of their proposed common progenitor (CDP) was also reduced, raising the possibility that the cDCs arose from an independent progenitor in these mice. In the classic model of dendritic differentiation, cDCs and pDCs derive from the myeloid line. However, a lymphatic origin of pDCs is widely debated. In view of the observed differential block in B-cell development in *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-VavCre* mice, these data may support a common origin of B lymphocytes and pDCs. However, analysis of *Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-Cd79aCre* mice, in which deletion of *Mef2c* and *Mef2d* occurs in late CLPs, did not result in compromised pDC differentiation. Nevertheless, we cannot rule out that a common progenitor of pDCs and B lymphocyte is located above the late CLP, e.g. in a MPP. Interestingly, the genes encoding the dendritic transcription factors SpiB and the interferon response factors (Irf) 7 and 8 were both downregulated in the LSK compartment of the double knockout mouse, and thus are potential key Mef2 target genes that regulate pDC differentiation.

Taken together, this work reveals Mef2c and Mef2d as central regulators of hematopoiesis. Deletion of these two transcription factors in a mouse model leads to a differentiation block in both the B-cell and pDC lineages. Several key transcription factors that regulate differentiation of these lineages were identified as potential Mef2 target genes. Finally, these data support the theory of a common lymphatic origin of these two populations and underline the fluidity of lineage decisions within the highly heterogeneous MPP compartment.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Prozent (Volumen/Volumen), <i>percent (volume per volume)</i>
% (w/v)	Prozent (Gewicht/Volumen), <i>percent (weight per volume)</i>
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
AML	akute myeloische Leukämie
ALL	akute lymphatische Leukämie
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>
BZR	B-Zell-Rezeptor
ca.	circa
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDC	klassische DC ( <i>common DC</i> )
cDNA	<i>copyDNA</i>
CDP	allgemeiner dendritischer Progenitor ( <i>common DC progenitor</i> )
CML	chronische myeloische Leukämie
CLP	allgemeiner lymphatischer Progenitor ( <i>common lymphoid progenitor</i> )
Cre	<i>causes recombination</i>
DAZAP1	Deleted in Azoospermia-Associated Protein 1
DC	dendritische Zelle ( <i>dendritic cell</i> )
DLBCL	diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
dNTP(s)	Desoxyribonukleotridiphosphat
EBF	<i>early B cell factor</i>
EtOH	Ethanol
DN	doppelt negativ ( <i>double negative</i> )
DP	doppelt positiv ( <i>double positive</i> )
EryP	Erythrozyten-Progenitor ( <i>erythroid progenitor</i> )
FACS	<i>fluorescent-activated cell sorting</i>
Flt3	FMS-like tyrosine kinase 3

FSC	Vorwärtsstreulicht ( <i>forward scatter</i> )
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GMP	Granulozyten-Monozyten-Progenitor ( <i>granulocyte monocyte progenitor</i> )
Hprt	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HJURP_C	Holiday Junction Regulator Protein Family C Terminal-Repeat
HSC	Hämatopoetische Stammzelle ( <i>hematopoietic stem cell</i> )
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase ( <i>inducible nitric oxide synthase</i> )
KM	Knochenmark
KO	Knockout
LMPP	lymphatisch geprägter multipotenter Progenitor ( <i>lymphoid-primed multipotent progenitor</i> )
LT	Langzeit- ( <i>long term-</i> )
MADS	MCM1, AGAMOUS, DEFICIENS, SRF
MDP	Makrophagen-und-Dendritische-Zellen-Progenitor ( <i>macrophage- and DC-restricted progenitor</i> )
Mef2	myocyte enhancer factor
MEP	Megakaryozyten-Erythrozyten Progenitor ( <i>megakaryocyte erythroid progenitor</i> )
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
miRNA	mikroRNA
MLL	mixed lineage leukemia
mM	Millimolar
MP	myeloide Progenitoren ( <i>myeloid progenitor</i> )
MPP	multipotenter Progenitor ( <i>multipotent progenitor</i> )
muLV	murines Leukämie-Virus
NK	Natürliche Killerzelle ( <i>natural killer cell</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
pDC	plasmazytoide dendritische Zelle ( <i>plasmacytoid dendritic cell</i> )
p.c.	post conceptionem
präDC	cDC-Progenitor ( <i>pre dendritic cell</i> , preDC)
präGM	prä-Granulozyten-Monozyten-Progenitor (pre granulocyte and monocyte precursor)
qRT-PCR	quantitative Realtime-PCR



---

RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RPKM	Reads Per Kilobase of transcript per Million reads
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SSC	Seitwärtsstreulicht ( <i>side scatter</i> )
ST	Kurzzeit ( <i>short term</i> )
TLR	Toll-like Rezeptor ( <i>toll-like receptor</i> )
TipDC	TNF $\alpha$ - und iNOS-produzierende dendritische Zellen (TNF $\alpha$ - <i>and</i> iNOS <i>producing dendritic cells</i> )
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ ( <i>tumor-necrosis-factor-<math>\alpha</math></i> )
vgl	vergleiche
x g	Fallbeschleunigung

## 9 Literatur

Agatheeswaran, S. und S. Chakraborty (2016). "MEF2C and CEBPA: Possible co-regulators in chronic myeloid leukemia disease progression." Int J Biochem Cell Biol **77**(Pt A): 165-170.

Agatheeswaran, S., S. Singh, S. Biswas, G. Biswas, N. Chandra Pattnayak und S. Chakraborty (2013). "BCR-ABL mediated repression of miR-223 results in the activation of MEF2C and PTBP2 in chronic myeloid leukemia." Leukemia **27**(7): 1578-1580.

Alegre, M. L., K. A. Frauwirth und C. B. Thompson (2001). "T-cell regulation by CD28 and CTLA-4." Nat Rev Immunol **1**(3): 220-228.

Ariotti, S., J. B. Haanen und T. N. Schumacher (2012). "Behavior and function of tissue-resident memory T cells." Adv Immunol **114**: 203-216.

Auffray, C., D. K. Fogg, E. Narni-Mancinelli, B. Senechal, C. Trouillet, N. Saederup, J. Leemput, K. Bigot, L. Campisi, M. Abitbol, T. Molina, I. Charo, D. A. Hume, A. Cumanò, G. Lauvau und F. Geissmann (2009). "CX3CR1+ CD115+ CD135+ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation." J Exp Med **206**(3): 595-606.

Bartel, F. O., T. Higuchi und D. D. Spyropoulos (2000). "Mouse models in the study of the Ets family of transcription factors." Oncogene **19**(55): 6443-6454.

Benveniste, P., C. Frelin, S. Janmohamed, M. Barbara, R. Herrington, D. Hyam und N. N. Iscove (2010). "Intermediate-term hematopoietic stem cells with extended but time-limited reconstitution potential." Cell Stem Cell **6**(1): 48-58.

Bergqvist, I., M. Eriksson, J. Saarikettu, B. Eriksson, B. Corneliussen, T. Grundstrom und D. Holmberg (2000). "The basic helix-loop-helix transcription factor E2-2 is involved in T lymphocyte development." Eur J Immunol **30**(10): 2857-2863.

Black, B. L. und E. N. Olson (1998). "Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins." Annu Rev Cell Dev Biol **14**: 167-196.

Blasius, A. L., E. Giurisato, M. Cella, R. D. Schreiber, A. S. Shaw und M. Colonna (2006). "Bone marrow stromal cell antigen 2 is a specific marker of type I IFN-producing cells in the naive mouse, but a promiscuous cell surface antigen following IFN stimulation." J Immunol **177**(5): 3260-3265.

Boller, S. und R. Grosschedl (2014). "The regulatory network of B-cell differentiation: a focused view of early B-cell factor 1 function." Immunol Rev **261**(1): 102-115.

Bornstein, C., D. Winter, Z. Barnett-Itzhaki, E. David, S. Kadri, M. Garber und I. Amit (2014). "A negative feedback loop of transcription factors specifies alternative dendritic cell chromatin States." Mol Cell **56**(6): 749-762.

Boulais, P. E. und P. S. Frenette (2015). "Making sense of hematopoietic stem cell niches." Blood **125**(17): 2621-2629.

Cante-Barrett, K., R. Pieters und J. P. Meijerink (2014). "Myocyte enhancer factor 2C in hematopoiesis and leukemia." Oncogene **33**(4): 403-410.

Cedar, H. und Y. Bergman (2011). "Epigenetics of haematopoietic cell development." Nat Rev Immunol **11**(7): 478-488.

Chuang, L. S., K. Ito und Y. Ito (2013). "RUNX family: Regulation and diversification of roles through interacting proteins." Int J Cancer **132**(6): 1260-1271.

Cisse, B., M. L. Caton, M. Lehner, T. Maeda, S. Scheu, R. Locksley, D. Holmberg, C. Zweier, N. S. den Hollander, S. G. Kant, W. Holter, A. Rauch, Y. Zhuang und B. Reizis (2008). "Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development." Cell **135**(1): 37-48.

Cobaleda, C., A. Schebesta, A. Delogu und M. Busslinger (2007). "Pax5: the guardian of B cell identity and function." Nat Immunol **8**(5): 463-470.

Colomer-Lahiguera, S., M. Pisecker, M. Konig, K. Nebral, W. F. Pickl, M. O. Kauer, O. A. Haas, R. Ullmann, A. Attarbaschi, M. N. Dworzak und S. Strehl (2017). "MEF2C-dysregulated pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia is associated with CDKN1B deletions and a poor response to glucocorticoid therapy." Leuk Lymphoma **58**(12): 2895-2904.

Corcoran, L., I. Ferrero, D. Vremec, K. Lucas, J. Waithman, M. O'Keeffe, L. Wu, A. Wilson und K. Shortman (2003). "The lymphoid past of mouse plasmacytoid cells and thymic dendritic cells." J Immunol **170**(10): 4926-4932.

Costa, G., V. Kouskoff und G. Lacaud (2012). "Origin of blood cells and HSC production in the embryo." Trends Immunol **33**(5): 215-223.

Cumano, A. und I. Godin (2007). "Ontogeny of the hematopoietic system." Annu Rev Immunol **25**: 745-785.

D'Amico, A. und L. Wu (2003). "The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid predendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3." J Exp Med **198**(2): 293-303.

Dash, A. und D. G. Gilliland (2001). "Molecular genetics of acute myeloid leukaemia." Best Pract Res Clin Haematol **14**(1): 49-64.

de Pooter, R. F. und B. L. Kee (2010). "E proteins and the regulation of early lymphocyte development." Immunol Rev **238**(1): 93-109.

Debnath, I., K. M. Roundy, P. D. Pioli, J. J. Weis und J. H. Weis (2013). "Bone marrow-induced Mef2c deficiency delays B-cell development and alters the expression of key B-cell regulatory proteins." Int Immunol **25**(2): 99-115.

Degli-Esposti, M. A. und M. J. Smyth (2005). "Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage." Nat Rev Immunol **5**(2): 112-124.

Du, Y., S. E. Spence, N. A. Jenkins und N. G. Copeland (2005). "Cooperating cancer-gene identification through oncogenic-retrovirus-induced insertional mutagenesis." Blood **106**(7): 2498-2505.

Dursun, E., M. Endeke, A. Musumeci, H. Failmezger, S. H. Wang, A. Tresch, T. Schroeder und A. B. Krug (2016). "Continuous single cell imaging reveals sequential steps of plasmacytoid dendritic cell development from common dendritic cell progenitors." Sci Rep **6**: 37462.

Fell, H. P., R. G. Smith und P. W. Tucker (1986). "Molecular analysis of the t(2;14) translocation of childhood chronic lymphocytic leukemia." Science **232**(4749): 491-494.

Fogg, D. K., C. Sibon, C. Miled, S. Jung, P. Aucouturier, D. R. Littman, A. Cumano und F. Geissmann (2006). "A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells." Science **311**(5757): 83-87.

Fuxa, M. und J. A. Skok (2007). "Transcriptional regulation in early B cell development." Curr Opin Immunol **19**(2): 129-136.

Gekas, C., K. E. Rhodes, L. M. Gereige, H. Helgadottir, R. Ferrari, S. K. Kurdistani, E. Montecino-Rodriguez, R. Bassel-Duby, E. Olson, A. V. Krivtsov, S. Armstrong, S. H. Orkin, M. Pellegrini und H. K. Mikkola (2009). "Mef2C is a lineage-restricted target of Scf/Tal1 and regulates megakaryopoiesis and B-cell homeostasis." Blood **113**(15): 3461-3471.

Ghosh, H. S., B. Cisse, A. Bunin, K. L. Lewis und B. Reizis (2010). "Continuous expression of the transcription factor e2-2 maintains the cell fate of mature plasmacytoid dendritic cells." Immunity **33**(6): 905-916.

Gilliland, D. G. und M. S. Tallman (2002). "Focus on acute leukemias." Cancer Cell **1**(5): 417-420.

Ginhoux, F., K. Liu, J. Helft, M. Bogunovic, M. Greter, D. Hashimoto, J. Price, N. Yin, J. Bromberg, S. A. Lira, E. R. Stanley, M. Nussenzweig und M. Merad (2009). "The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs." J Exp Med **206**(13): 3115-3130.

Gossett, L. A., D. J. Kelvin, E. A. Sternberg und E. N. Olson (1989). "A new myocyte-specific enhancer-binding factor that recognizes a conserved element associated with multiple muscle-specific genes." Mol Cell Biol **9**(11): 5022-5033.

Gu, Z., M. Churchman, K. Roberts, Y. Li, Y. Liu, R. C. Harvey, K. McCastlain, S. C. Reshmi, D. Payne-Turner, I. Iacobucci, Y. Shao, I. M. Chen, M. Valentine, D. Pei, K. L. Mungall, A. J. Mungall, Y. Ma, R. Moore, M. Marra, E. Stonerock, J. M. Gastier-Foster, M. Devidas, Y. Dai, B. Wood, M. Borowitz, E. E. Larsen, K. Maloney, L. A. Mattano, Jr., A. Angiolillo, W. L. Salzer, M. J. Burke, F. Gianni, O. Spinelli, J. P. Radich, M. D. Minden, A. V. Moorman, B. Patel, A. K. Fielding, J. M. Rowe, S. M. Luger, R. Bhatia, I. Aldoss, S. J. Forman, J. Kohlschmidt, K. Mrozek, G. Marcucci, C. D. Bloomfield, W. Stock, S. Kornblau, H. M. Kantarjian, M. Konopleva, E. Paietta, C. L. Willman, M. L. Loh, S. P. Hunger und C. G. Mullighan (2016). "Genomic analyses identify recurrent MEF2D fusions in acute lymphoblastic leukaemia." Nat Commun **7**: 13331.

Guilliams, M., F. Ginhoux, C. Jakubzick, S. H. Naik, N. Onai, B. U. Schraml, E. Segura, R. Tussiwand und S. Yona (2014). "Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny." Nat Rev Immunol **14**(8): 571-578.

Hardy, R. R., P. W. Kincade und K. Dorshkind (2007). "The protean nature of cells in the B lymphocyte lineage." Immunity **26**(6): 703-714.

Hashimoto, D., J. Miller und M. Merad (2011). "Dendritic cell and macrophage heterogeneity in vivo." Immunity **35**(3): 323-335.

Heinrich, P. C., M. Müller und L. Graeve (2014). Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Springer-Lehrbuch. Berlin [u.a.], Springer: Online-Ressource (XXIX, 1073 S.).

Heng, T. S., M. W. Painter und C. Immunological Genome Project (2008). "The Immunological Genome Project: networks of gene expression in immune cells." Nat Immunol **9**(10): 1091-1094.

Herglotz, J., L. Unrau, F. Hauschildt, M. Fischer, N. Kriebitzsch, M. Alawi, D. Indenbirken, M. Spohn, U. Müller, M. Ziegler, W. Schuh, H. M. Jack und C. Stocking (2016). "Essential control of early B-cell development by Mef2 transcription factors." Blood **127**(5): 572-581.

Herold, G. (2017). Innere Medizin. Köln.

Hobeika, E., S. Thiemann, B. Storch, H. Jumaa, P. J. Nielsen, R. Pelanda und M. Reth (2006). "Testing gene function early in the B cell lineage in mb1-cre mice." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(37): 13789-13794.

Homminga, I., R. Pieters, A. W. Langerak, J. J. de Rooi, A. Stubbs, M. Verstegen, M. Vuerhard, J. Buijs-Gladdines, C. Kooi, P. Klous, P. van Vlierberghe, A. A. Ferrando, J. M. Cayuela, B. Verhaaf, H. B. Beverloo, M. Horstmann, V. de Haas, A. S. Wiekmeijer, K. Pike-Overzet, F. J. Staal, W. de Laat, J. Soulier, F. Sigaux und J. P. Meijerink (2011). "Integrated transcript and genome analyses reveal NKX2-1 and MEF2C as potential oncogenes in T cell acute lymphoblastic leukemia." Cancer Cell **19**(4): 484-497.

Inlay, M. A., D. Bhattacharya, D. Sahoo, T. Serwold, J. Seita, H. Karsunky, S. K. Plevritis, D. L. Dill und I. L. Weissman (2009). "Ly6d marks the earliest stage of B-cell specification and identifies the branchpoint between B-cell and T-cell development." Genes Dev **23**(20): 2376-2381.

Ippolito, G. C., J. D. Dekker, Y. H. Wang, B. K. Lee, A. L. Shaffer, 3rd, J. Lin, J. K. Wall, B. S. Lee, L. M. Staudt, Y. J. Liu, V. R. Iyer und H. O. Tucker (2014). "Dendritic cell fate is determined by BCL11A." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(11): E998-1006.

Jego, G., A. K. Palucka, J. P. Blanck, C. Chalouni, V. Pascual und J. Banchereau (2003). "Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6." Immunity **19**(2): 225-234.

Khiem, D., J. G. Cyster, J. J. Schwarz und B. L. Black (2008). "A p38 MAPK-MEF2C pathway regulates B-cell proliferation." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(44): 17067-17072.

Kim, Y., D. Phan, E. van Rooij, D. Z. Wang, J. McAnally, X. Qi, J. A. Richardson, J. A. Hill, R. Bassel-Duby und E. N. Olson (2008). "The MEF2D transcription factor mediates stress-dependent cardiac remodeling in mice." J Clin Invest **118**(1): 124-132.

Kondo, M., I. L. Weissman und K. Akashi (1997). "Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow." Cell **91**(5): 661-672.

Kong, N. R., M. Davis, L. Chai, A. Winoto und R. Tjian (2016). "MEF2C and EBF1 Co-regulate B Cell-Specific Transcription." PLoS Genet **12**(2): e1005845.

Krenács, D., Z. Borbenyi, J. Bedekovics, G. Mehes, E. Bagdi und L. Krenacs (2015). "Pattern of MEF2B expression in lymphoid tissues and in malignant lymphomas." Virchows Arch **467**(3): 345-355.

Krivtsov, A. V., D. Twomey, Z. Feng, M. C. Stubbs, Y. Wang, J. Faber, J. E. Levine, J. Wang, W. C. Hahn, D. G. Gilliland, T. R. Golub und S. A. Armstrong (2006). "Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9." Nature **442**(7104): 818-822.

Krug, A., A. R. French, W. Barchet, J. A. Fischer, A. Dzionek, J. T. Pingel, M. M. Orihuela, S. Akira, W. M. Yokoyama und M. Colonna (2004). "TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function." Immunity **21**(1): 107-119.

Kudo, A. und F. Melchers (1987). "A second gene, VpreB in the lambda 5 locus of the mouse, which appears to be selectively expressed in pre-B lymphocytes." EMBO J **6**(8): 2267-2272.

Kurzrock, R., H. M. Kantarjian, B. J. Druker und M. Talpaz (2003). "Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics." Ann Intern Med **138**(10): 819-830.

Kwon, K., C. Hutter, Q. Sun, I. Bilic, C. Cobaleda, S. Malin und M. Busslinger (2008). "Instructive role of the transcription factor E2A in early B lymphopoiesis and germinal center B cell development." Immunity **28**(6): 751-762.

Lai, A. Y. und M. Kondo (2006). "Asymmetrical lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors." J Exp Med **203**(8): 1867-1873.

Lai, A. Y., S. M. Lin und M. Kondo (2005). "Heterogeneity of Flt3-expressing multipotent progenitors in mouse bone marrow." J Immunol **175**(8): 5016-5023.

Laiosa, C. V., M. Stadtfeld und T. Graf (2006). "Determinants of lymphoid-myeloid lineage diversification." Annu Rev Immunol **24**: 705-738.

Laszlo, G. S., T. A. Alonzo, C. J. Gudgeon, K. H. Harrington, A. Kentsis, R. B. Gerbing, Y. C. Wang, R. E. Ries, S. C. Raimondi, B. A. Hirsch, A. S. Gamis, S. Meshinchi und R. B. Walter (2015). "High expression of myocyte enhancer factor 2C (MEF2C) is associated with

adverse-risk features and poor outcome in pediatric acute myeloid leukemia: a report from the Children's Oncology Group." J Hematol Oncol **8**(1): 115.

Li, S. K., L. A. Solomon, P. C. Fulkerson und R. P. DeKoter (2015). "Identification of a negative regulatory role for spi-C in the murine B cell lineage." J Immunol **194**(8): 3798-3807.

Lilljebjörn, H., H. Agerstam, C. Orsmark-Pietras, M. Rissler, H. Ehrencrona, L. Nilsson, J. Richter und T. Fioretos (2014). "RNA-seq identifies clinically relevant fusion genes in leukemia including a novel MEF2D/CSF1R fusion responsive to imatinib." Leukemia **28**(4): 977-979.

Lin, H. und R. Grosschedl (1995). "Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF." Nature **376**(6537): 263-267.

Lin, Q., J. Schwarz, C. Bucana und E. N. Olson (1997). "Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C." Science **276**(5317): 1404-1407.

Liu, K., G. D. Victora, T. A. Schwickert, P. Guernonprez, M. M. Meredith, K. Yao, F. F. Chu, G. J. Randolph, A. Y. Rudensky und M. Nussenzweig (2009). "In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis." Science **324**(5925): 392-397.

Liu, P., J. R. Keller, M. Ortiz, L. Tessarollo, R. A. Rachel, T. Nakamura, N. A. Jenkins und N. G. Copeland (2003). "Bcl11a is essential for normal lymphoid development." Nat Immunol **4**(6): 525-532.

Liu, Y. J. (2005). "IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors." Annu Rev Immunol **23**: 275-306.

Mahmood, S., D. Upreti, I. Sow, A. Amari, S. Nandagopal und S. K. Kung (2015). "Bidirectional interactions of NK cells and dendritic cells in immunotherapy: current and future perspective." Immunotherapy **7**(3): 301-308.

Månsson, R., S. Zandi, E. Welinder, P. Tsapogas, N. Sakaguchi, D. Bryder und M. Sigvardsson (2010). "Single-cell analysis of the common lymphoid progenitor compartment reveals functional and molecular heterogeneity." Blood **115**(13): 2601-2609.

Manz, M. G., D. Traver, T. Miyamoto, I. L. Weissman und K. Akashi (2001). "Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors." Blood **97**(11): 3333-3341.

Marcenaro, E., S. Carlomagno, S. Pesce, A. Moretta und S. Sivori (2012). "NK/DC crosstalk in anti-viral response." Adv Exp Med Biol **946**: 295-308.

Massari, M. E. und C. Murre (2000). "Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms." Mol Cell Biol **20**(2): 429-440.

McKenna, K., A. S. Beignon und N. Bhardwaj (2005). "Plasmacytoid dendritic cells: linking innate and adaptive immunity." J Virol **79**(1): 17-27.

Melchers, F., E. ten Boekel, T. Seidl, X. C. Kong, T. Yamagami, K. Onishi, T. Shimizu, A. G. Rolink und J. Andersson (2000). "Repertoire selection by pre-B-cell receptors and B-cell receptors, and genetic control of B-cell development from immature to mature B cells." Immunol Rev **175**: 33-46.

Melchers, F., H. Von Boehmer und R. A. Phillips (1975). "B-lymphocyte subpopulations in the mouse. Organ distribution and ontogeny of immunoglobulin-synthesizing and of mitogen-sensitive cells." Transplant Rev **25**: 26-58.

Mildner, A. und S. Jung (2014). "Development and function of dendritic cell subsets." Immunity **40**(5): 642-656.

Mildner, A., S. Yona und S. Jung (2013). "A close encounter of the third kind: monocyte-derived cells." Adv Immunol **120**: 69-103.

Mitelman, F., B. Johansson und F. Mertens (2004). "Fusion genes and rearranged genes as a linear function of chromosome aberrations in cancer." Nat Genet **36**(4): 331-334.

Moore, A. J. und M. K. Anderson (2013). "Dendritic cell development: a choose-your-own-adventure story." Adv Hematol **2013**: 949513.

Morin, R. D., M. Mendez-Lago, A. J. Mungall, R. Goya, K. L. Mungall, R. D. Corbett, N. A. Johnson, T. M. Severson, R. Chiu, M. Field, S. Jackman, M. Krzywinski, D. W. Scott, D. L. Trinh, J. Tamura-Wells, S. Li, M. R. Firme, S. Rogic, M. Griffith, S. Chan, O. Yakovenko, I. M. Meyer, E. Y. Zhao, D. Smailus, M. Moksa, S. Chittaranjan, L. Rimsza, A. Brooks-Wilson, J. J. Spinelli, S. Ben-Neriah, B. Meissner, B. Woolcock, M. Boyle, H. McDonald, A. Tam, Y. Zhao, A. Delaney, T. Zeng, K. Tse, Y. Butterfield, I. Birol, R. Holt, J. Schein, D. E. Horsman, R. Moore, S. J. Jones, J. M. Connors, M. Hirst, R. D. Gascoyne und M. A. Marra (2011). "Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma." Nature **476**(7360): 298-303.

Morrison, S. J. und D. T. Scadden (2014). "The bone marrow niche for haematopoietic stem cells." Nature **505**(7483): 327-334.

Morrison, S. J., A. M. Wandycz, H. D. Hemmati, D. E. Wright und I. L. Weissman (1997). "Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors." Development **124**(10): 1929-1939.

Morrison, S. J. und I. L. Weissman (1994). "The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype." Immunity **1**(8): 661-673.

Müller-Newen, G. und P. E. Petrides (2014). Blut – Thrombocyten und Leukocyten. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. P. C. Heinrich, M. Müller and L. Graeve. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 877-892.

Mullighan, C. und J. Downing (2008). "Ikaros and acute leukemia." Leuk Lymphoma **49**(5): 847-849.



Mullighan, C. G., S. Goorha, I. Radtke, C. B. Miller, E. Coustan-Smith, J. D. Dalton, K. Girtman, S. Mathew, J. Ma, S. B. Pounds, X. Su, C. H. Pui, M. V. Relling, W. E. Evans, S. A. Shurtleff und J. R. Downing (2007). "Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia." Nature **446**(7137): 758-764.

Mullighan, C. G., X. Su, J. Zhang, I. Radtke, L. A. Phillips, C. B. Miller, J. Ma, W. Liu, C. Cheng, B. A. Schulman, R. C. Harvey, I. M. Chen, R. J. Clifford, W. L. Carroll, G. Reaman, W. P. Bowman, M. Devidas, D. S. Gerhard, W. Yang, M. V. Relling, S. A. Shurtleff, D. Campana, M. J. Borowitz, C. H. Pui, M. Smith, S. P. Hunger, C. L. Willman und J. R. Downing (2009). "Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia." N Engl J Med **360**(5): 470-480.

Murre, C. (2005). "Helix-loop-helix proteins and lymphocyte development." Nat Immunol **6**(11): 1079-1086.

Nagel, S., C. Meyer, H. Quentmeier, M. Kaufmann, H. G. Drexler und R. A. MacLeod (2008). "MEF2C is activated by multiple mechanisms in a subset of T-acute lymphoblastic leukemia cell lines." Leukemia **22**(3): 600-607.

Naik, S. H., D. Metcalf, A. van Nieuwenhuijze, I. Wicks, L. Wu, M. O'Keeffe und K. Shortman (2006). "Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes." Nat Immunol **7**(6): 663-671.

Naik, S. H., L. Perie, E. Swart, C. Gerlach, N. van Rooij, R. J. de Boer und T. N. Schumacher (2013). "Diverse and heritable lineage imprinting of early haematopoietic progenitors." Nature **496**(7444): 229-232.

Naik, S. H., P. Sathe, H. Y. Park, D. Metcalf, A. I. Proietto, A. Dakic, S. Carotta, M. O'Keeffe, M. Bahlo, A. Papenfuss, J. Y. Kwak, L. Wu und K. Shortman (2007). "Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo." Nat Immunol **8**(11): 1217-1226.

Niebuhr, B., N. Kriebitzsch, M. Fischer, K. Behrens, T. Gunther, M. Alawi, U. Bergholz, U. Muller, S. Roscher, M. Ziegler, F. Buchholz, A. Grundhoff und C. Stocking (2013). "Runx1 is essential at two stages of early murine B-cell development." Blood **122**(3): 413-423.

Nussenzweig, M. C., R. M. Steinman, B. Gutchinov und Z. A. Cohn (1980). "Dendritic cells are accessory cells for the development of anti-trinitrophenyl cytotoxic T lymphocytes." J Exp Med **152**(4): 1070-1084.

Nutt, S. L. und B. L. Kee (2007). "The transcriptional regulation of B cell lineage commitment." Immunity **26**(6): 715-725.

O'Sullivan, T. E., J. C. Sun und L. L. Lanier (2015). "Natural Killer Cell Memory." Immunity **43**(4): 634-645.

Ohlsson, E., M. B. Schuster, M. Hasemann und B. T. Porse (2016). "The multifaceted functions of C/EBPalpha in normal and malignant haematopoiesis." Leukemia **30**(4): 767-775.

Onai, N., K. Kurabayashi, M. Hosoi-Amakie, N. Toyama-Sorimachi, K. Matsushima, K. Inaba und T. Ohteki (2013). "A clonogenic progenitor with prominent plasmacytoid dendritic cell developmental potential." Immunity **38**(5): 943-957.

Onai, N., A. Obata-Onai, M. A. Schmid, T. Ohteki, D. Jarrossay und M. G. Manz (2007). "Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow." Nat Immunol **8**(11): 1207-1216.

Pasqualucci, L., V. Trifonov, G. Fabbri, J. Ma, D. Rossi, A. Chiarenza, V. A. Wells, A. Grunn, M. Messina, O. Elliot, J. Chan, G. Bhagat, A. Chadburn, G. Gaidano, C. G. Mullighan, R. Rabadan und R. Dalla-Favera (2011). "Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma." Nat Genet **43**(9): 830-837.

Passegué, E., C. H. Jamieson, L. E. Ailles und I. L. Weissman (2003). "Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics?" Proc Natl Acad Sci U S A **100 Suppl 1**: 11842-11849.

Paul, F. und I. Amit (2014). "Plasticity in the transcriptional and epigenetic circuits regulating dendritic cell lineage specification and function." Curr Opin Immunol **30**: 1-8.

Pelayo, R., J. Hirose, J. Huang, K. P. Garrett, A. Delogu, M. Busslinger und P. W. Kincade (2005). "Derivation of 2 categories of plasmacytoid dendritic cells in murine bone marrow." Blood **105**(11): 4407-4415.

Perie, L., P. D. Hodgkin, S. H. Naik, T. N. Schumacher, R. J. de Boer und K. R. Duffy (2014). "Determining lineage pathways from cellular barcoding experiments." Cell Rep **6**(4): 617-624.

Perie, L. und S. H. Naik (2015). "Toward defining a 'lineage'--The case for dendritic cells." Semin Cell Dev Biol **41**: 3-8.

Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Res **29**(9): e45.

Pietras, E. M., D. Reynaud, Y. A. Kang, D. Carlin, F. J. Calero-Nieto, A. D. Leavitt, J. M. Stuart, B. Gottgens und E. Passegue (2015). "Functionally Distinct Subsets of Lineage-Biased Multipotent Progenitors Control Blood Production in Normal and Regenerative Conditions." Cell Stem Cell **17**(1): 35-46.

Poltorak, M. P. und B. U. Schraml (2015). "Fate mapping of dendritic cells." Front Immunol **6**: 199.

Pon, J. R. und M. A. Marra (2016). "MEF2 transcription factors: developmental regulators and emerging cancer genes." Oncotarget **7**(3): 2297-2312.

Pongubala, J. M., D. L. Northrup, D. W. Lancki, K. L. Medina, T. Treiber, E. Bertolino, M. Thomas, R. Grosschedl, D. Allman und H. Singh (2008). "Transcription factor EBF restricts alternative lineage options and promotes B cell fate commitment independently of Pax5." Nat Immunol **9**(2): 203-215.

Potthoff, M. J. und E. N. Olson (2007). "MEF2: a central regulator of diverse developmental programs." Development **134**(23): 4131-4140.

Prima, V., L. Gore, A. Caires, T. Boomer, M. Yoshinari, M. Imaizumi, M. Varella-Garcia und S. P. Hunger (2005). "Cloning and functional characterization of MEF2D/DAZAP1 and DAZAP1/MEF2D fusion proteins created by a variant t(1;19)(q23;p13.3) in acute lymphoblastic leukemia." Leukemia **19**(5): 806-813.

Prima, V. und S. P. Hunger (2007). "Cooperative transformation by MEF2D/DAZAP1 and DAZAP1/MEF2D fusion proteins generated by the variant t(1;19) in acute lymphoblastic leukemia." Leukemia **21**(12): 2470-2475.

Pronk, C. J., D. J. Rossi, R. Mansson, J. L. Attema, G. L. Norddahl, C. K. Chan, M. Sigvardsson, I. L. Weissman und D. Bryder (2007). "Elucidation of the phenotypic, functional, and molecular topography of a myeloerythroid progenitor cell hierarchy." Cell Stem Cell **1**(4): 428-442.

Pui, C. H., M. V. Relling und J. R. Downing (2004). "Acute lymphoblastic leukemia." N Engl J Med **350**(15): 1535-1548.

Reis e Sousa, C. (2006). "Dendritic cells in a mature age." Nat Rev Immunol **6**(6): 476-483.

Reizis, B., A. Bunin, H. S. Ghosh, K. L. Lewis und V. Sisirak (2011). "Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions." Annu Rev Immunol **29**: 163-183.

Rosser, E. C. und C. Mauri (2015). "Regulatory B cells: origin, phenotype, and function." Immunity **42**(4): 607-612.

Sasaki, I., K. Hoshino, T. Sugiyama, C. Yamazaki, T. Yano, A. Iizuka, H. Hemmi, T. Tanaka, M. Saito, M. Sugiyama, Y. Fukuda, T. Ohta, K. Sato, A. Aina, T. Suzuki, H. Hasegawa, N. Toyama-Sorimachi, H. Kohara, T. Nagasawa und T. Kaisho (2012). "Spi-B is critical for plasmacytoid dendritic cell function and development." Blood **120**(24): 4733-4743.

Sasaki, I. und T. Kaisho (2014). "Transcriptional control of dendritic cell differentiation." Curr Top Microbiol Immunol **381**: 257-278.

Sathe, P., D. Metcalf, D. Vremec, S. H. Naik, W. Y. Langdon, N. D. Huntington, L. Wu und K. Shortman (2014). "Lymphoid tissue and plasmacytoid dendritic cells and macrophages do not share a common macrophage-dendritic cell-restricted progenitor." Immunity **41**(1): 104-115.

Sathe, P., D. Vremec, L. Wu, L. Corcoran und K. Shortman (2013). "Convergent differentiation: myeloid and lymphoid pathways to murine plasmacytoid dendritic cells." Blood **121**(1): 11-19.

Satpathy, A. T., X. Wu, J. C. Albring und K. M. Murphy (2012). "Re(de)fining the dendritic cell lineage." Nat Immunol **13**(12): 1145-1154.

Satterwhite, E., T. Sonoki, T. G. Willis, L. Harder, R. Nowak, E. L. Arriola, H. Liu, H. P. Price, S. Gesk, D. Steinemann, B. Schlegelberger, D. G. Oscier, R. Siebert, P. W. Tucker und M. J.

Dyer (2001). "The BCL11 gene family: involvement of BCL11A in lymphoid malignancies." Blood **98**(12): 3413-3420.

Sawai, C. M., V. Sisirak, H. S. Ghosh, E. Z. Hou, M. Ceribelli, L. M. Staudt und B. Reizis (2013). "Transcription factor Runx2 controls the development and migration of plasmacytoid dendritic cells." J Exp Med **210**(11): 2151-2159.

Schechter, A. N. (2008). "Hemoglobin research and the origins of molecular medicine." Blood **112**(10): 3927-3938.

Schiavoni, G., F. Mattei, P. Sestili, P. Borghi, M. Venditti, H. C. Morse, 3rd, F. Belardelli und L. Gabriele (2002). "ICSBP is essential for the development of mouse type I interferon-producing cells and for the generation and activation of CD8alpha(+) dendritic cells." J Exp Med **196**(11): 1415-1425.

Schotte, R., M. Nagasawa, K. Weijer, H. Spits und B. Blom (2004). "The ETS transcription factor Spi-B is required for human plasmacytoid dendritic cell development." J Exp Med **200**(11): 1503-1509.

Schotte, R., M. C. Rissoan, N. Bendriss-Vermare, J. M. Bridon, T. Duhon, K. Weijer, F. Briere und H. Spits (2003). "The transcription factor Spi-B is expressed in plasmacytoid DC precursors and inhibits T-, B-, and NK-cell development." Blood **101**(3): 1015-1023.

Schüler, A., M. Schwieger, A. Engelmann, K. Weber, S. Horn, U. Müller, M. A. Arnold, E. N. Olson und C. Stocking (2008). "The MADS transcription factor Mef2c is a pivotal modulator of myeloid cell fate." Blood **111**(9): 4532-4541.

Schuler, G. und R. M. Steinman (1985). "Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro." J Exp Med **161**(3): 526-546.

Schwieger, M., A. Schüler, M. Forster, A. Engelmann, M. A. Arnold, R. Delwel, P. J. Valk, J. Lohler, R. K. Slany, E. N. Olson und C. Stocking (2009). "Homing and invasiveness of MLL/ENL leukemic cells is regulated by MEF2C." Blood **114**(12): 2476-2488.

Segura, E. und S. Amigorena (2013). "Inflammatory dendritic cells in mice and humans." Trends Immunol **34**(9): 440-445.

Semple, J. W., J. E. Italiano, Jr. und J. Freedman (2011). "Platelets and the immune continuum." Nat Rev Immunol **11**(4): 264-274.

Sharrocks, A. D. (2001). "The ETS-domain transcription factor family." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(11): 827-837.

Shigematsu, H., B. Reizis, H. Iwasaki, S. Mizuno, D. Hu, D. Traver, P. Leder, N. Sakaguchi und K. Akashi (2004). "Plasmacytoid dendritic cells activate lymphoid-specific genetic programs irrespective of their cellular origin." Immunity **21**(1): 43-53.

Shore, P. und A. D. Sharrocks (1995). "The MADS-box family of transcription factors." Eur J Biochem **229**(1): 1-13.

Shortman, K. und S. H. Naik (2007). "Steady-state and inflammatory dendritic-cell development." Nat Rev Immunol **7**(1): 19-30.

Shortman, K. und P. Sathe (2013). "Another heritage for plasmacytoid dendritic cells." Immunity **38**(5): 845-846.

Sokalski, K. M., S. K. Li, I. Welch, H. A. Cadieux-Pitre, M. R. Gruca und R. P. DeKoter (2011). "Deletion of genes encoding PU.1 and Spi-B in B cells impairs differentiation and induces pre-B cell acute lymphoblastic leukemia." Blood **118**(10): 2801-2808.

Stadtfeld, M. und T. Graf (2005). "Assessing the role of hematopoietic plasticity for endothelial and hepatocyte development by non-invasive lineage tracing." Development **132**(1): 203-213.

Stehling-Sun, S., J. Dade, S. L. Nutt, R. P. DeKoter und F. D. Camargo (2009). "Regulation of lymphoid versus myeloid fate 'choice' by the transcription factor Mef2c." Nat Immunol **10**(3): 289-296.

Steinman, R. M. und Z. A. Cohn (1973). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution." J Exp Med **137**(5): 1142-1162.

Steinman, R. M., G. Kaplan, M. D. Witmer und Z. A. Cohn (1979). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro." J Exp Med **149**(1): 1-16.

Steinman, R. M. und M. D. Witmer (1978). "Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(10): 5132-5136.

Su, G. H., H. M. Chen, N. Muthusamy, L. A. Garrett-Sinha, D. Baunoch, D. G. Tenen und M. C. Simon (1997). "Defective B cell receptor-mediated responses in mice lacking the Ets protein, Spi-B." EMBO J **16**(23): 7118-7129.

Suzuki, K., Y. Okuno, N. Kawashima, H. Muramatsu, T. Okuno, X. Wang, S. Kataoka, Y. Sekiya, M. Hamada, N. Murakami, D. Kojima, K. Narita, A. Narita, H. Sakaguchi, K. Sakaguchi, N. Yoshida, N. Nishio, A. Hama, Y. Takahashi, K. Kudo, K. Kato und S. Kojima (2016). "MEF2D-BCL9 Fusion Gene Is Associated With High-Risk Acute B-Cell Precursor Lymphoblastic Leukemia in Adolescents." J Clin Oncol **34**(28): 3451-3459.

Szklarczyk, D., A. Franceschini, S. Wyder, K. Forslund, D. Heller, J. Huerta-Cepas, M. Simonovic, A. Roth, A. Santos, K. P. Tsafou, M. Kuhn, P. Bork, L. J. Jensen und C. von Mering (2015). "STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life." Nucleic Acids Res **43**(Database issue): D447-452.

Tamura, T., H. Yanai, D. Savitsky und T. Taniguchi (2008). "The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis." Annu Rev Immunol **26**: 535-584.

Valk, P. J., R. G. Verhaak, M. A. Beijen, C. A. Erpelinck, S. Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani, J. M. Boer, H. B. Beverloo, M. J. Moorhouse, P. J. van der Spek, B.

Lowenberg und R. Delwel (2004). "Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia." N Engl J Med **350**(16): 1617-1628.

Viallat, A. und M. Abkarian (2014). "Red blood cell: from its mechanics to its motion in shear flow." Int J Lab Hematol **36**(3): 237-243.

Vilagos, B., M. Hoffmann, A. Souabni, Q. Sun, B. Werner, J. Medvedovic, I. Bilic, M. Minnich, E. Axelsson, M. Jaritz und M. Busslinger (2012). "Essential role of EBF1 in the generation and function of distinct mature B cell types." J Exp Med **209**(4): 775-792.

Vitali, C., C. Bassani, C. Chiodoni, E. Fellini, C. Guarnotta, S. Miotti, S. Sangaletti, F. Fuligni, L. De Cecco, P. P. Piccaluga, M. P. Colombo und C. Tripodo (2015). "SOCS2 Controls Proliferation and Stemness of Hematopoietic Cells under Stress Conditions and Its Deregulation Marks Unfavorable Acute Leukemias." Cancer Res **75**(11): 2387-2399.

Vivier, E., E. Tomasello, M. Baratin, T. Walzer und S. Ugolini (2008). "Functions of natural killer cells." Nat Immunol **9**(5): 503-510.

Vogt, T. K., A. Link, J. Perrin, D. Finke und S. A. Luther (2009). "Novel function for interleukin-7 in dendritic cell development." Blood **113**(17): 3961-3968.

Voskoboinik, I., J. C. Whisstock und J. A. Trapani (2015). "Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology." Nat Rev Immunol **15**(6): 388-400.

Wagner, D. D. und P. C. Burger (2003). "Platelets in inflammation and thrombosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(12): 2131-2137.

Wang, W., T. Org, A. Montel-Hagen, P. D. Pioli, D. Duan, E. Israely, D. Malkin, T. Su, J. Flach, S. K. Kurdistani, R. H. Schiestl und H. K. Mikkola (2016). "MEF2C protects bone marrow B-lymphoid progenitors during stress haematopoiesis." Nat Commun **7**: 12376.

Waskow, C., K. Liu, G. Darrasse-Jeze, P. Guermonprez, F. Ginhoux, M. Merad, T. Shengelia, K. Yao und M. Nussenzweig (2008). "The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues." Nat Immunol **9**(6): 676-683.

Weissman, I. L. (2000). "Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution." Cell **100**(1): 157-168.

Welinder, E., J. Ahsberg und M. Sigvardsson (2011). "B-lymphocyte commitment: identifying the point of no return." Semin Immunol **23**(5): 335-340.

Wikstrom, I., J. Forssell, M. Goncalves, F. Colucci und D. Holmberg (2006). "E2-2 regulates the expansion of pro-B cells and follicular versus marginal zone decisions." J Immunol **177**(10): 6723-6729.

Wilker, P. R., M. Kohyama, M. M. Sandau, J. C. Albring, O. Nakagawa, J. J. Schwarz und K. M. Murphy (2008). "Transcription factor Mef2c is required for B cell proliferation and survival after antigen receptor stimulation." Nat Immunol **9**(6): 603-612.

Wilson, A., G. M. Oser, M. Jaworski, W. E. Blanco-Bose, E. Laurenti, C. Adolphe, M. A. Essers, H. R. Macdonald und A. Trumpp (2007). "Dormant and self-renewing hematopoietic stem cells and their niches." Ann N Y Acad Sci **1106**: 64-75.

Wilson, N. S. und J. A. Villadangos (2004). "Lymphoid organ dendritic cells: beyond the Langerhans cells paradigm." Immunol Cell Biol **82**(1): 91-98.

Yu, Y., J. Wang, W. Khaled, S. Burke, P. Li, X. Chen, W. Yang, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, S. Zhang und P. Liu (2012). "Bcl11a is essential for lymphoid development and negatively regulates p53." J Exp Med **209**(13): 2467-2483.

Yuki, Y., I. Imoto, M. Imaizumi, S. Hibi, Y. Kaneko, T. Amagasa und J. Inazawa (2004). "Identification of a novel fusion gene in a pre-B acute lymphoblastic leukemia with t(1;19)(q23;p13)." Cancer Sci **95**(6): 503-507.

Zhuang, Y., P. Cheng und H. Weintraub (1996). "B-lymphocyte development is regulated by the combined dosage of three basic helix-loop-helix genes, E2A, E2-2, and HEB." Mol Cell Biol **16**(6): 2898-2905.

## 10 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Schematische Übersicht der Hämatopoese .....	5
Abbildung 1.2:	Frühe B-Zell-Differenzierung im Knochenmark und regulierende Transkriptionsfaktoren .....	8
Abbildung 1.3:	Schematische Darstellung der vier homologen Gene <i>MEF2A</i> , <i>MEF2B</i> , <i>MEF2C</i> und <i>MEF2D</i> .....	11
Abbildung 1.4:	Expressionslevel von <i>Mef2c</i> und <i>Mef2d</i> in verschiedenen hämatopoetischen Populationen .....	12
Abbildung 1.5:	Differenzierungsblock des Mausmodells <i>Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-Cd79aCre</i> .....	17
Abbildung 1.6:	Aktivierung einer naiven T-Helferzelle durch eine dendritische Zelle .....	19
Abbildung 1.7:	Klassisches Modell der dendritischen Zellentwicklung .....	22
Abbildung 4.1:	Der Knockout von <i>Mef2c</i> und <i>Mef2d</i> in den HSC führt zu einem Differenzierungsblock und Verlust des B-Zell-Kompartiments .....	39
Abbildung 4.2:	Der Knockout von <i>Mef2c</i> und <i>Mef2d</i> führt zur Anreicherung Vcam-negativer Zellen .....	42
Abbildung 4.3:	Genomweite Identifizierung von B-Zell-spezifischen Zielgenen von <i>Mef2c</i> und <i>Mef2d</i> mittels <i>RNA-Sequencing</i> und quantitativer Realtime-PCR .....	44
Abbildung 4.4:	Die Deletion von <i>Mef2c</i> und <i>Mef2d</i> beeinflusst das T-Zellkompartiment nur gering .....	46
Abbildung 4.5:	Die NK-Population wird durch eine Deletion von <i>Mef2c</i> und <i>Mef2d</i> nicht beeinflusst .....	47
Abbildung 4.6:	Der Verlust von <i>Mef2c</i> und <i>Mef2d</i> führt zu einer Anreicherung myeloischer Progenitoren .....	49
Abbildung 4.7:	Granulozyten und Monozyten reichern sich im <i>Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-VavCre</i> -Mausmodell signifikant an .....	50
Abbildung 4.8:	Charakterisierung der Oberflächenmarker von Zellen der dendritischen Linie .....	52
Abbildung 4.9:	Der Knockout von <i>Mef2c</i> und <i>Mef2d</i> im gesamten hämatopoetischen Kompartiment führt zur beeinträchtigten dendritischen Differenzierung .....	54
Abbildung 4.10:	In vitro Differenzierung dendritischer Zellen aus <i>Mef2c/d<sup>ΔΔ</sup>-VavCre</i> -Mäusen .....	55



Abbildung 4.11: Im <i>Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup></i> -Cd79aCre-Mausmodell ist die dendritische Differenzierung nicht beeinträchtigt .....	57
Abbildung 4.12: In vitro Differenzierung dendritischer Zellen aus <i>Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup></i> -Cd79aCre-Mäusen .....	58
Abbildung 4.13: Genomweite Identifizierung dendritischer Zielgene von Mef2c und Mef2d mittels RNA- <i>Sequencing</i> und quantitativer Realtime-PCR .....	59
Abbildung 5.1: Zellpopulationen der Hämatopoese im <i>Mef2c/d<sup>Δ/Δ</sup></i> -VavCre-Mausmodell ...	62
Abbildung 5.2: Alternatives Modell der dendritischen Differenzierung .....	70
Abbildung 5.3: Transkriptionsfaktoren in der dendritischen Differenzierung .....	74

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 3.1: Fluoreszenz-markierte Antikörper für die Durchflusszytometrie .....	30
Tabelle 3.2: Übersicht aller für die quantitative Realtime-PCR eingesetzten Oligonukleotide	31

## 11 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Carol Stocking, Ph.D., für die Bereitstellung dieses überaus interessanten Themas und die Möglichkeit, meine medizinische Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe durchzuführen. Vielen Dank für deine Unterstützung und die hervorragende Betreuung während meiner gesamten Zeit in der Arbeitsgruppe Retrovirale Pathogenese am Heinrich-Pette-Institut.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Prof. Boris Fehse, der sich freundlicherweise bereit erklärt hat, meine Arbeit als Doktorvater zu betreuen.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Frau Dr. Julia Preukschas bedanken, die mir immer mit Rat zur Seite stand.

Ein großes Dankeschön gilt außerdem allen Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe Retrovirale Pathogenese für eine großartige Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft während meiner gesamten Zeit.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch meiner Familie und meinen Freunden, die immer ein offenes Ohr für mich hatten und mir während der gesamten Zeit beiseitestanden. Vielen Dank auch dafür, dass ihr mich in meiner Entscheidung, noch einmal ein Medizinstudium zu beginnen, immer unterstützt habt!

## 12 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Hamburg, den

---

Friderike Schlenker (geb. Hauschildt)