

Aus dem Institut für Immunologie der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Thomas Brocker

Überexpression von Ppof2 in dendritischen Zellen und ihre Auswirkung auf die Reifung der Zelle

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu
München



Vorgelegt von
Charlotte Simon
aus München

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Ludwig-
Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Brocker

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Edgar Meinel
Prof. Dr. med. Barbara Schraml-Schotta

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 08.10.2020

Eidesstattliche Versicherung

Simon, Charlotte

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema **Überexpression von Ppef2 in dendritischen Zellen und ihre Auswirkung auf die Reifung der Zelle** selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnungen der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 28.10.2020

Charlotte Simon

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Inhaltsverzeichnis | 1 |
| Abkürzungsverzeichnis | 4 |
| Abbildungsverzeichnis | 6 |
| 1 Zusammenfassung | 7 |
| 2 Einleitung | 9 |
| 2.1 Das Immunsystem der Säugetiere | 9 |
| 2.1.1 Das angeborene Immunsystem | 9 |
| 2.1.2 Das adaptive Immunsystem | 9 |
| 2.2 Dendritische Zellen | 11 |
| 2.2.1 Antigenpräsentation und Reifung der dendritischen Zellen | 11 |
| 2.2.2 DCs und ihre Rolle für Immunität und Toleranz | 13 |
| 2.2.3 Entwicklung der dendritischen Zellen und DC Subtypen | 15 |
| 2.3 Ppof2 | 16 |
| 2.4 Lentiviraler Gentransfer | 19 |
| 2.4.1 Lebenszyklus und Aufbau eines Lentivirus | 19 |
| 2.4.2 Lentivirale Vektoren und ihr sicherer Einsatz in der Wissenschaft | 20 |
| 2.5 Zielsetzung dieser Arbeit | 22 |
| 3 Material und Methoden | 23 |
| 3.1 Material | 23 |
| 3.1.1 Antikörper | 23 |
| 3.1.2 Chemikalien | 23 |
| 3.1.3 Geräte | 24 |
| 3.1.4 Lösungen und Medien | 24 |
| 3.1.5 Mäusestamm | 27 |
| 3.1.6 Vektoren | 28 |
| 3.1.8 Verbrauchsmaterialien | 28 |
| 3.2 Methoden | 29 |
| 3.2.1 Immunologische und zellbiologische Methoden | 29 |
| 3.2.1.1 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) | 29 |
| 3.2.1.2 Entnahme von Knochenmark und Isolierung von Zellen | 30 |
| 3.2.1.3 Mikroskopische Zellaufnahmen | 30 |
| 3.2.1.4 Produktion von lentiviralen Vektoren | 30 |
| 3.2.1.5 Transduktion von Zellen mit lentiviralen Vektoren | 31 |
| 3.2.1.6 Zählen von Zellen | 33 |
| 3.2.1.7 Zellkulturen | 33 |
| 3.2.2 Molekularbiologische Methoden | 34 |
| 3.2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese | 34 |

| | | |
|----------|--|----|
| 3.2.2.2 | Bakterienkultur..... | 35 |
| 3.2.2.3 | Bestimmung von DNS- und RNS-Konzentrationen | 35 |
| 3.2.2.4 | Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarose-Gel..... | 35 |
| 3.2.2.5 | Isolierung von Nukleinsäuren aus Zellen | 36 |
| 3.2.2.6 | Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterien..... | 36 |
| 3.2.2.7 | Ligation von DNS-Fragmenten | 36 |
| 3.2.2.8 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR)..... | 37 |
| 3.2.2.9 | quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)..... | 38 |
| 3.4.4.10 | Spaltung von DNS mittels Restriktionsenzymen | 40 |
| 3.2.2.11 | Transformation von <i>E. coli</i> mittels der CaCl ₂ Methode..... | 41 |
| 3.2.2.12 | Western Blot..... | 41 |
| 3.2.3 | Statistik..... | 42 |
| 4 | Ergebnisse | 43 |
| 4.1 | Suche nach einem geeigneten lentiviralen Vektor zur Überexpression von Ppef2 .. | 43 |
| 4.1.1 | Aufbau der lentiviralen Vektoren | 43 |
| 4.1.2 | Auswahl eines geeigneten lentiviralen Vektors..... | 45 |
| 4.1.3 | Überprüfung der Überexpression von Ppef2 in BMDCs mittels qPCR und Western Blot | 49 |
| 4.2 | Etablierung eines geeigneten Protokolls zur Transduktion von BMDCs..... | 51 |
| 4.2.1 | Erprobung einer Transduktion an Tag 2 und anschließenden FACS-Analysen an Tag 4 und 8 | 51 |
| 4.2.2 | Erprobung einer Transduktion an Tag 3 und FACS-Analysen an Tag 6, 7 und 8..... | 52 |
| 4.2.3 | Erprobung einer Transduktion an Tag 3, 4 und 6 und anschließenden FACS- Analysen jeweils zwei Tage danach | 55 |
| 4.3 | Untersuchung des Aktivierungsverhaltens von transduzierten Zellen mit und ohne LPS-Stimulation..... | 57 |
| 5 | Diskussion..... | 61 |
| 5.1 | Für die Transduktion von BMDCs eignet sich vor allem das lentivirale Konstrukt CMV-Ppef2-IRES-ZsGreen..... | 61 |
| 5.2 | Die Transgenexpression nimmt mit zunehmendem Abstand zur Transduktion ab | 63 |
| 5.3 | Die Transduktion provoziert eine Zellaktivierung, die unabhängig von Ppef2 ist... | 65 |
| 5.4 | Der Zeitpunkt der Transduktion scheint Einfluss auf das Aktivierungsverhalten von BMDCs zu haben..... | 67 |
| 5.5 | Die Transduktion beeinflusst auch Reporter-gen-negative Zellen | 68 |
| 5.6 | Ausblick | 69 |
| 6 | Literaturverzeichnis..... | 73 |
| | Danksagung | 90 |
| | Anhang | 91 |
| | Plasmidkarten..... | 91 |
| | CMV-dsRed-UBC-eGFP (pHAGE-CMV-dsRed-UBC-GFP-W) | 91 |

| | |
|---|----|
| CMV-Ppef2-UBC-eGFP..... | 92 |
| CMV-Ppef2-IRES-eGFP..... | 92 |
| CMV-Ppef2-IRES-ZsGreen/Ppef2_ZsGreen..... | 93 |
| CMV-hCD2-IRES-ZsGreen/hCD2_ZsGreen..... | 93 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|--|
| APC | Antigen-präsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>) |
| Ask1 | Apoptose Signal-regulierende Kinase 1 |
| BDNF | vom Gehirn stammender neurotropher Faktor (<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>) |
| BMDC | aus Knochenmark gewonnene dendritische Zellen (<i>Bone marrow-derived dendritic cells</i>) |
| bp | Basenpaar (<i>base pair</i>) |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| CD | Oberflächenantigen (<i>Cluster of differentiation</i>) |
| cDC | Klassische dendritische Zelle (<i>classical dendritic cell</i>) |
| cDNS | Komplementäre DNS (<i>complementary DNS</i>) |
| CDP | die allgemeine DC-Vorläuferzelle (<i>common DC precursor</i>) |
| CMP | allgemeine myeloische Vorläuferzelle (<i>common myeloid progenitor</i>) |
| CMV | Cytomegalievirus |
| DC | Dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>) |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTPs | Desoxyribonukleosidtriphosphate |
| E. coli | <i>Escherichia coli</i> |
| ECL | verstärkte Chemilumineszenz (<i>enhanced chemiluminescence</i>) |
| eGFP | verstärktes grün fluoreszierendes Protein (<i>enhanced green fluorescence protein</i>) |
| FACS | Fluoreszenzaktivierter Zellsorter (<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>) |
| FCS | fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>) |
| Flt3 | FMS-ähnliche Tyrosinkinase (<i>FMS-like tyrosine kinase</i>) |
| FSC | Vorwärtsstreuung (<i>forward angle light scatter</i>) |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| 293 HEK-Zellen | menschliche embryonale Nierenzellen (<i>human embryonic kidney-Zellen</i>) |
| HIV | humanes Immundefizienz Virus |
| HPRT | Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase |
| IRES | interne ribosomale Eintrittsstelle (<i>internal ribosomal entry site</i>) |
| LTR | lange terminale Wiederholungssequenz (<i>long terminal repeat</i>) |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| MHC | Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>) |
| MOI | Multiplizität der Infektion (<i>Multiplicity of infection</i>) |
| mRNS | <i>Messenger RNS</i> |
| PAMP | Pathogen-assoziiertes molekulares Muster (<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>) |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>) |
| PCR | Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase chain reaction</i>) |
| pDC | plasmazytoide dendritische Zelle (<i>plasmacytoid dendritic cell</i>) |
| PFA | Paraformaldehyd |
| Ppef2 | Proteinphosphatase mit EF-Hand Motiven 2 |
| PRR | Mustererkennungsrezeptor (<i>Pattern-Recognition Receptor</i>) |

| | |
|-------|--|
| qPCR | Quantitative Polymerasekettenreaktion (<i>quantitative Polymerase chain reaction</i>) |
| RNS | Ribonukleinsäure |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>) |
| SIN | selbst inaktivierend (<i>self-inactivating</i>) |
| SSC | Seitwärtsstreulicht (<i>side scatter</i>) |
| TLR | Toll-ähnlicher Rezeptor (<i>toll-like receptor</i>) |
| Treg | regulatorische T-Zelle |
| UBC | Ubiquitin C |
| v/v | Volumenprozent |
| VSV-G | Glykoprotein G des vesikulären Stomatitisvirus (<i>vesicular stomatitis virus glykoprotein G</i>) |
| WPRE | posttranskriptionell regulatorisches Element des Hepatitisvirus des Waldmurmeltiers (<i>Woodchuck Hepatitis post-transcriptional regulatory element</i>) |
| w/v | Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>) |

In der vorliegenden Arbeit werden Formelgrößen mit den international gebräuchlichen SI-Einheiten abgekürzt. Abkürzungen gebräuchlicher deutscher Wörter werden gemäß Duden verwendet.

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|--------------|--|----|
| Abbildung 1 | Expressionsmuster von Ppef2..... | 18 |
| Abbildung 2 | Schematische Darstellung der verschiedenen lentiviralen Vektorkonstrukte..... | 44 |
| Abbildung 3 | Transduktion von NIH3T3-Zellen mit den verschiedenen Vektoren resultiert in Überexpression von Ppef2 und den Reportergenen in allen Fällen | 46 |
| Abbildung 4 | Transduktion von BMDCs mit den jeweiligen Vektorkonstrukten führt nur bei Konstrukt CMV-dsRed-UBC-eGFP und CMV-Ppef2-IRES-ZsGreen zu deutlich detektierbarer Reportergenexpression | 48 |
| Abbildung 5 | Schematische Darstellung der hCD2-Kontrolle (hCD2_ZsGreen)..... | 49 |
| Abbildung 6 | Transduktion von BMDCs mit Ppef2_ZsGreen resultiert in Überexpression von Ppef2 auf transkriptioneller und auf Protein-Ebene...50 | |
| Abbildung 7 | Sowohl das ZsGreen- als auch das hCD2-Signal sind transient..... | 52 |
| Abbildung 8 | ZsGreen-Signal und Reifung von BMDCs an verschiedenen Tagen nach der Transduktion mit den beiden Lentiviren | 54 |
| Abbildung 9 | ZsGreen-Signal und Reifung von BMDCs nach Transduktion mit den beiden Lentiviren an verschiedenen Tagen und FACS-Analyse zwei Tage danach..... | 57 |
| Abbildung 10 | Reifung von BMDCs nach Transduktion mit den beiden lentiviralen Konstrukten mit und ohne LPS-Stimulation | 59 |

1 Zusammenfassung

Ein körpereigenes Abwehrsystem stellt nur dann einen brauchbaren Schutz dar, wenn es gefährliche von unbedenklichen oder körpereigenen Antigenen unterscheiden kann. Dies verdeutlicht, welche herausragende Aufgabe dem Immunsystem mit der Entwicklung von Immunität und Toleranz zu Teil wird. Dass dendritische Zellen (*dendritic cells*, DCs) als Bindeglied zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem genau hierbei eine bedeutende Rolle spielen, ist mittlerweile unbestritten (Birnberg *et al.*, 2008; Jung *et al.*, 2002). Welche Funktionsweisen im Detail hinter diesen Vorgängen stecken, bleibt allerdings weiterhin Gegenstand intensivster Grundlagenforschung.

Bei der Proteinphosphatase mit EF-Hand Motiven 2 (Ppef2) handelt es sich ihrem Namen entsprechend um eine Phosphatase mit EF-Hand Motiven. Neue Studien legen eine Bedeutung von Ppef2 für dendritische Zellen nahe (Edelmann *et al.*, 2011). In ersten Versuchen zeigte sich nach Aktivierung durch LPS eine verminderte Ppef2-Expression in dendritischen Zellen. Diesen Hinweisen auf den Grund gehend, sollte in der vorliegenden Arbeit die Auswirkung einer dauerhaften Ppef2-Expression auf Überleben und Funktion der dendritischen Zelle untersucht werden. Mit dem Ziel, die gewünschte Überexpression durch lentiviralen Gentransfer zu erreichen, wurde zunächst ein geeignetes lentivirales Konstrukt gesucht. Nachdem dieses gefunden und ein Transduktionsprotokoll zur erfolgreichen Überexpression von Ppef2 etabliert wurde, konnten erste funktionelle Analysen durchgeführt werden.

Hierbei wurde deutlich, dass die verwendeten dendritischen Zellen durch die Transduktion mit lentiviralen Vektoren verstärkt aktiviert wurden. Dies geschah in der vorliegenden Arbeit unabhängig davon, ob es sich um die Kontrolle oder den Ppef2-Überexpressionsvektor handelte. Außerdem legen die Ergebnisse dieser Arbeit nahe, dass die beobachtete Aktivierung u.a. davon abhängig war, zu welchem Zeitpunkt der Zellkultur die Transduktion durchgeführt wurde. Überraschenderweise zeigte sich bei einem genaueren Blick auf die transduzierten Zellen, dass vor allem jene Zellen besonders stark aktiviert erschienen, die zwar Teil des Transduktionsansatzes waren, aber nicht erfolgreich transduziert wurden. Ein Aktivierungsmechanismus, der unabhängig von der lentiviralen Transduktion ist, scheint am Ende der Versuche die nächstliegende Erklärung zu sein. Abgesehen davon, dass dies einige neue Fragen zur Aktivierung von dendritischen Zellen aufwirft, kann in diesem Zusammenhang die Eignung des lentiviralen Gentransfers zur Untersuchung des Aktivierungsverhaltens der hoch empfindlichen dendritischen Zellen in

Frage gestellt werden. In einem abschließenden Ausblick wurde in dieser Arbeit auf andere Möglichkeiten der Untersuchung von Ppf2 in dendritischen Zellen eingegangen.

2 Einleitung

2.1 Das Immunsystem der Säugetiere

Da der menschliche Körper fortwährend potenziellen Krankheitserregern wie Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten ausgesetzt ist, benötigt er ein Abwehrsystem, das ihn effektiv vor Erkrankungen schützt. Hierfür steht ihm das Immunsystem zur Verfügung, welches in angeborenes und erworbenes (adaptives) Immunsystem unterteilt werden kann. Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über die Mechanismen des körpereigenen Abwehrsystems dargelegt werden.

2.1.1 Das angeborene Immunsystem

Durchbricht ein Pathogen die zum angeborenen Schutz gehörenden physikalischen und chemischen Barrieren des Körpers, wie z.B. Haut, Schleimhaut oder Magensäure, reagiert zuerst das angeborene Immunsystem. Dieses zeichnet sich vor allem durch seine schnelle Immunantwort aus. Eine wichtige Rolle spielen hierbei Makrophagen, welche Pathogene erkennen und sie phagozytieren können. Durch die gleichzeitige Sekretion von Zytokinen und weiteren Proteinen lösen die aktivierten Makrophagen einen Vorgang aus, der in einer Entzündungsreaktion mündet. Hierdurch werden weitere Zellen, wie z.B. neutrophile Granulozyten, angelockt, die ebenfalls zum angeborenen Immunsystem gehören und an der Bekämpfung des Pathogens beteiligt sind. Auch humorale Bestandteile des angeborenen Immunsystems spielen eine Rolle. Das Komplementsystem, bestehend aus Plasmaproteinen, kann Bakterien anhand ihrer Oberflächenstruktur ebenfalls erkennen. Dies löst eine proteolytische Kaskade aus, die dazu führt, dass die Oberfläche des Mikroorganismus mit Fragmenten des Komplementsystems umlagert wird und dieser damit zur Erkennung durch phagozytierende Zellen markiert ist (Hato *et al.*, 2015; Iwasaki *et al.*, 2015).

2.1.2 Das adaptive Immunsystem

Reicht die Abwehr durch das angeborene Immunsystems nicht aus, steht das deutlich spezifischere adaptive Immunsystem zur Verfügung. Zelluläre Bestandteile sind B- und T-Zellen, während Antikörper ein wichtiger humoraler Bestandteil sind. Im Gegensatz zum

angeborenen braucht das adaptive Immunsystem allerdings nicht Stunden, sondern Tage bis zur vollständigen Aktivierung. Seine Wirkung tritt also insbesondere bei einer Erstinfektion überlappend mit der Abwehr durch das angeborene Immunsystem auf. Wie bereits erwähnt, zeichnet sich das adaptive Immunsystem unter anderem durch seine hohe Spezifität aus. Diese wird erreicht, indem jede naive B- und T-Zelle, die im Körper zirkuliert, eine andere Rezeptorspezifität aufweist, mit der sie gezielt Antigene erkennen kann. Diese unglaubliche Vielzahl an Rezeptorspezifitäten wird durch Rekombination der verfügbaren Gensegmente bei der Entwicklung der Lymphozyten erreicht. Der hierbei entstehenden Gefahr von Rezeptoren, die auf Autoantigene reagieren, wird dabei entgegengewirkt. Dies geschieht, indem Zellen, die solche Rezeptorvarianten besitzen, bereits während sie heranreifen durch negative Selektion aussortiert werden. Damit wird ermöglicht, dass am Ende ihrer Entwicklung fast ausschließlich Zellen die zentralen lymphatischen Organe verlassen, die auf fremde Antigene reagieren und nicht gegen den eigenen Körper gerichtet sind.

Um das erworbene Immunsystem zu aktivieren, braucht es eine Schnittstelle zwischen angeborenen und erworbenen Mechanismen. Hierbei spielen sogenannte antigenpräsentierende Zellen (*antigen-presenting cell*, APC) eine wichtige Rolle. Dendritische Zellen, auf die im folgenden Kapitel detaillierter eingegangen wird und welche im Zentrum dieser Arbeit stehen, sind besonders wichtige Vertreter dieser Gruppe, aber auch Makrophagen und B-Zellen müssen in diesem Zuge genannt werden. Sie besitzen die Fähigkeit Antigene zu erkennen, sie durch Phagozytose aufzunehmen und nach intrazellulärer Fragmentation Teile des Antigens auf ihrer Oberfläche zu präsentieren. Das Antigenfragment wird dabei an ein MHCI- oder MHCII-Molekül (*major histocompatibility complex*, Haupthistokompatibilitätskomplex) gebunden. Durch diese Verbindung aus Antigen und MHC-Molekül werden CD4 oder CD8 T-Zellen aktiviert, deren T-Zell-Rezeptor spezifisch für das Antigenfragment ist. Daraufhin proliferiert die aktivierte T-Zelle und reift heran, so dass sie nach wenigen Tagen zu einer Effektorzelle wird. Deren Aufgaben bestehen maßgeblich in der Bekämpfung intrazellulärer Erreger (CD8⁺ zytotoxische T-Zellen, die mit MHCI-Molekülen interagieren), in der Aktivierung von B-Zellen (CD4⁺ T-Helferzellen, die mit MHCII-Molekülen interagieren) und in der Aktivierung von Makrophagen.

Da B-Zellen in der Regel durch T-Helferzellen aktiviert werden müssen, um zu antikörperproduzierenden Plasmazellen heranzureifen, ist auch dieser Bereich des adaptiven Immunsystems von einer Aktivierung durch die angeborenen Mechanismen abhängig. Als humoraler Bestandteil der adaptiven Immunabwehr wirken Antikörper,

indem sie extrazelluläre Antigene opsonieren, sprich markieren, und damit eine Phagozytose und anschließende Zerstörung dieser Antigene ermöglichen. Außerdem können sie das Komplementsystem aktivieren und Pathogene neutralisieren.

Abschließend ist noch die Fähigkeit zur Ausbildung eines Immungedächtnisses als ein herausragendes Merkmal des erworbenen Immunsystems zu nennen. Kommt der Organismus zum wiederholten Mal mit einem bestimmten Erreger in Kontakt, tritt die Abwehrreaktion schneller und wirksamer auf. Ermöglicht wird diese Immunität dadurch, dass Effektor-B- und -T-Zellen nach einer erfolgreich bekämpften Infektion nicht vollständig untergehen. Ein Teil bleibt erhalten und entwickelt sich zu sogenannten Gedächtniszellen.

Zusammenfassend ist es also ein Zusammenspiel aus angeborenem und erworbenem Immunsystem, das den menschlichen Körper schützt. Während angeborene Mechanismen die vorderste Verteidigungslinie in der Bekämpfung von Pathogenen bilden und schnell einsetzen, kann das adaptive Immunsystem spezifischer und daher teilweise effektiver eingreifen und auch vor zukünftigen Infektionen schützen.

2.2 Dendritische Zellen

Als Bindeglied zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem stellen DCs einen sehr wichtigen Bestandteil der körpereigenen Abwehrkräfte dar. Ihre Fähigkeiten – zu denen eine ausgesprochen effektive Antigenaufnahme und -präsentation, die Fähigkeit zur Migration und die Aktivierung naiver T-Zellen gehören – machen sie zu wichtigen Komponenten in der Entstehung von Immunität und Toleranz (Merad *et al.*, 2013). Da es sich um eine sehr heterogene Zelllinie handelt, unterliegt ihre Einteilung noch immer einem gewissen Wandel. Dennoch ist seit ihrer Erstbeschreibung durch Steinman *et al.* im Jahr 1973 das Verständnis ihrer Entwicklung, ihres Phänotyps und ihrer Funktion deutlich gewachsen. Im Folgenden sollen die wichtigsten Erkenntnisse zusammengefasst wiedergegeben werden.

2.2.1 Antigenpräsentation und Reifung der dendritischen Zellen

DCs erfüllen die bedeutende Aufgabe, Antigene zu prozessieren und an ihrer Oberfläche für T-Zellen zu präsentieren. Zu den Pathogenen, an deren Bekämpfung DCs beteiligt sind, gehören Bakterien (z.B. Listerien), Viren (z.B. RSV und HSV) und Parasiten (z.B. Leishmanien) (Bar-On *et al.*, 2010). Im Rahmen der Antigenpräsentation werden Antigene

innerhalb der Zelle fragmentiert und im Anschluss zusammen mit MHCI- oder MHCII-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert. Hierbei sind zwei Wege zu unterscheiden. Handelt es sich um ein intrazelluläres Antigen, z.B. Proteine, die von Viren stammen oder von der Zelle selbst produziert werden, spricht man vom endogenen Weg. Antigenfragmente werden nach der intrazellulären Prozessierung im Kontext von MHCI präsentiert. Hierdurch wird, unter bestimmten Voraussetzungen, eine Aktivierung (Priming) von zytotoxischen CD8-T-Zellen erreicht (Norbury *et al.*, 2002).

Handelt es sich dagegen um extrazelluläre Antigene, wie z.B. Bakterien oder Toxine, kommt der exogene Weg zum Tragen. Die Antigenaufnahme in die Zelle kann dabei durch Phagozytose, Makropinozytose oder rezeptorvermittelte Endozytose erfolgen. Nach Aufnahme und anschließender Prozessierung, präsentiert die APC im Anschluss das Antigenfragment im Kontext von MHCII (Wilson *et al.*, 2005). Dies kann dann zur Aktivierung der CD4-T-Zellen führen. In gewissen Fällen können auch exogene Antigene in Verbindung mit MHCI-Molekülen präsentiert werden. Dieser Prozess, den man Kreuzpräsentation nennt, wird in Abschnitt 2.2.3 genauer beschrieben.

DCs können – situationsabhängig – sowohl eine Immunantwort auslösen als auch Toleranz induzieren. Um zu verstehen, wie sie diese auf den ersten Blick gegensätzlich wirkenden Funktionen erfüllen, sollte erwähnt werden, dass DCs entweder in einem unreifen oder einem reifen Zustand vorliegen können. Liegt keine Infektion oder Entzündung vor, befinden sich DCs meist in einem unreifen Zustand und exprimieren per Definition nur geringe Mengen an MHCII und kostimulatorischen Molekülen, wie CD80, CD86 oder CD40. In diesem Fall können sie ihrer Funktion der Toleranzinduktion nachgehen, die weiter unten detaillierter beschrieben wird. Liegt allerdings eine Infektion vor, können DCs Pathogene oft schnell erkennen. Ihre Mustererkennungsrezeptoren (*Pattern-Recognition Receptor*, PRR), zu denen unter vielen anderen Toll-ähnliche Rezeptoren (*toll-like receptor*, TLR) gehören, spielen dabei eine große Rolle. Unterschiedliche DC-Subtypen exprimieren dabei auch unterschiedliche Rezeptoren. Es ist anzunehmen, dass dies abhängig von der Funktion geschieht, die sie erfüllen (Dalod *et al.*, 2014). Mit Hilfe der PRRs werden DCs auf sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*Pathogen-associated molecular pattern*, PAMP), wie z.B. Lipopolysaccharide (LPS), aufmerksam (Kawai *et al.*, 2010; Takeuchi *et al.*, 2010). Der Kontakt einer unreifen dendritischen Zelle mit PAMPs zieht ihre Reifung nach sich.

Die Zelle exprimiert nun Zytokinrezeptoren, die ihr die Migration in lymphatisches Gewebe ermöglicht (Grobner *et al.*, 2014; Heuze *et al.*, 2013). Auf dem Weg dorthin durchläuft sie einen Reifungsprozess, der zu einer erhöhten Expression von MHC-, sowie

kostimulatorischen Molekülen (CD80/86) und Zytokinen (z.B. IL-12) führt (Banchereau *et al.*, 1998; Cella *et al.*, 1997; Inaba *et al.*, 1994). Es wird angenommen, dass DCs dabei ihr Vermögen, weiteres Antigen aufzunehmen, weitestgehend verlieren. Allerdings mehren sich mittlerweile die Hinweise, dass es für diese Regel Ausnahmen gibt und gewisse DCs auch im reifen Zustand weiterhin fähig zur begrenzten Antigenaufnahme sind (Kamath *et al.*, 2000; Platt *et al.*, 2010). Im lymphatischen Gewebe angekommen, kann die nun reife und aktivierte DC den naiven T-Zellen prozessierte Antigenteile präsentieren. Unter bestimmten Bedingungen führt dies zur Aktivierung der T-Zelle (Steinman *et al.*, 1978). Mittlerweile werden die Begriffe „reif“ und „unreif“ kritischer gesehen. Dies hängt damit zusammen, dass sie einerseits verwendet werden, um die Zustände zu beschreiben, in denen DCs entweder die Auslösung von Toleranz (unreifer Zustand) oder einer Immunantwort (reifer Zustand) herbeiführen. Andererseits werden sie aber auch verwendet, um einen phänotypischen Zustand zu beschreiben. In diesem Fall gilt beispielsweise die Expression von MHC- und kostimulatorischen-Molekülen als Indikator für eine reife Zelle (Reis e Sousa, 2006). Da jedoch mehrere Studien zeigen konnten, dass Zellen auch ohne vorliegende Infektion einen „reifen Phänotyp“ erlangen können und dabei keine Immunantwort, sondern Toleranz auslösen, sollte womöglich genauer zwischen den Begrifflichkeiten unterschieden werden (Lutz *et al.*, 2002; Menges *et al.*, 2002). Um den funktionellen Zustand einer Zelle zu beschreiben, würde es sich z.B. anbieten, von immunogenen oder tolerogenen DCs zu sprechen, anstatt sie als reif oder unreif zu bezeichnen (Reis e Sousa, 2006).

2.2.2 DCs und ihre Rolle für Immunität und Toleranz

Im vorangegangenen Abschnitt wurde beschrieben, wie es zur Aktivierung der DCs und der damit verbundenen Aktivierung von T-Zellen kommen kann. Diese erfolgt dabei nur, wenn die T-Zelle mit Hilfe des T-Zell Rezeptors das Antigenfragment in Verbindung mit dem zugehörigen MHC-Molekül (Signal 1) erkennt und durch kostimulatorische Moleküle (Signal 2) der DCs zusätzlich aktiviert wird (Probst *et al.*, 2003). Wie unter 2.2.1 beschrieben, hängt es vom MHC-Molekül ab, welche Art von T-Zelle aktiviert wird. Die zur weiteren Differenzierung der T-Zellen zusätzlich nötigen Zytokine (Signal 3) werden ebenfalls von DCs produziert. Abhängig von den Signalen, die DCs erhalten, können sie unterschiedliche Zytokine ausschütten. Daraus folgt, dass sie adäquat auf die momentane Bedrohung durch Pathogene reagieren und durch Zytokinproduktion die weitere Differenzierung der T-Zellen beeinflussen können.

DCs spielen aber nicht nur eine wichtige Rolle für die Reaktion des Immunsystems auf Pathogene, sondern sind ebenso wichtig für eine Toleranzentwicklung gegenüber ungefährlichen oder körpereigenen Antigenen (Probst *et al.*, 2003; Tan *et al.*, 2005a). Wie unter 2.1.2 erwähnt, müssen in der Entwicklung von B- und T-Zellen jene Oberflächenrezeptoren eliminiert werden, die sich gegen körpereigene Antigene richten würden. Hierfür stehen dem Körper zwei Toleranzmechanismen zur Verfügung.

Zum einen gibt es die zentrale Toleranz, die unter 2.1.2 bereits kurz beschrieben wurde. Für T-Zellen gilt, dass bereits im Thymus neben der positiven auch eine negative Selektion stattfindet (Starr *et al.*, 2003). Reagiert eine Zelle zu stark auf einen MHC-Autoantigen-Komplex, wird sie entweder der Apoptose zugeführt oder entwickelt sich zu einer natürlichen regulatorischen T-Zelle (Treg). An diesen Vorgängen sind DCs maßgeblich beteiligt (Brocker *et al.*, 1997; Proietto *et al.*, 2008).

Zum anderen steht dem Immunsystem aber auch die periphere Toleranzentwicklung zur Verfügung. Diese ist nötig, da einige autoreaktive T-Zellen die negative Selektion im Thymus überleben und so in die Peripherie gelangen (Bouneaud *et al.*, 2000). Auch hierbei spielen DCs eine wichtige Rolle. Des Weiteren induzieren DCs Toleranz beispielsweise gegen Darmbakterien oder Nahrung, gegen welche im Thymus keine Informationen vorliegen, erst in peripheren lymphatischen Organen. Präsentieren sie solche Antigene ohne weitere stimulatorische Signale, wie kostimulatorische Moleküle oder Zytokine, können sie Toleranz induzieren (Hawiger *et al.*, 2001; Probst *et al.*, 2003). Über einen Vorgang, der als Kreuz-Toleranzinduktion bezeichnet werden kann, präsentieren DCs Peptidfragmente von Autoantigenen z.B. von sterbenden Zellen und können somit Toleranz bewirken (Luckashenak *et al.*, 2008; Qiu *et al.*, 2009). Autoreaktive T-Zellen, die durch periphere Toleranz selektioniert werden, können sich entweder ebenfalls zu regulatorischen T-Zellen entwickeln (in diesem Fall induzierte Tregs genannt), durch Deletion absterben oder in einen Zustand gelangen, in dem sie keine Reaktion mehr auf Antigenkontakt zeigen (Anergie). Die sogenannten Tregs sind Zellen, die u.a. durch die Produktion bestimmter Zytokine die Immunantwort beeinflussen und vor allem auch unterdrücken können. So können die induzierten Tregs u.a. dazu führen, dass DCs weniger kostimulatorische Moleküle exprimieren und somit die T-Zell-Aktivierung regulieren (Sakaguchi *et al.*, 2008).

2.2.3 Entwicklung der dendritischen Zellen und DC Subtypen

Wie eingangs bereits erwähnt, stellen DCs eine sehr heterogene Zellgruppe dar. Grob lassen sie sich in klassische DCs (*classical dendritic cells*, cDCs) und plasmazytoide DCs (*plasmacytoid dendritic cells*, pDCs) einteilen (Belz *et al.*, 2012). Auch Langerhanszellen und von Monozyten abgeleitete DCs sollen hier als DC-Untergruppe erwähnt, aber nicht näher beschrieben werden. Wie alle Zellen des hämatopoetischen Systems stammen auch DCs von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen ab und entwickeln sich über verschiedene Vorläuferstufen. So entwickelt sich aus der Stammzelle vorerst die allgemeine myeloische Vorläuferzelle (*common myeloid progenitor*, CMP), die noch Vorstufe für alle Zellen der myeloischen Reihe sein kann. Letztendlich entsteht über Zwischenstufen die allgemeine DC-Vorläuferzelle (*common DC precursor*, CDP). Sowohl pDCs als auch Vorläufer der cDCs, sogenannte preDCs, können hieraus letztendlich hervorgehen (Geissmann *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2009).

Diese Unterteilung in cDCs und pDCs erlaubt eine erste Orientierung bezüglich der verschiedenen DC-Subtypen. Die plasmazell-ähnlich geformten pDCs zeichnen sich vornehmlich dadurch aus, dass sie als Reaktion auf Viruskontakt große Mengen Interferon Typ 1 sezernieren (Liu, 2005). Während von menschlichen pDCs z.B. typischerweise BDCA-2 und -4 exprimiert wird, stellen u.a. mPDCA-1 und B220 einen typischen Marker in pDCs dar, die von der Maus abstammen (Dzionek *et al.*, 2002; Dzionek *et al.*, 2001; Krug *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu cDCs weisen pDCs abhängig davon, ob sie menschlich sind oder von der Maus abstammen, nur eine geringe oder keine Expression von kostimulatorischen Molekülen, MHCII und CD11c auf (Reizis *et al.*, 2011). Da in dieser Arbeit vornehmlich cDCs behandelt werden, soll auf pDCs im Weiteren nicht weiter eingegangen werden.

Die CD11c- und MHCII- exprimierenden cDCs können auf verschiedene Weise weiter unterteilt werden. Während eine Einteilung sich an der DC-Lokalisation orientiert, also daran, ob die Zellen einer Migration unterliegen oder sich dauerhaft in lymphatischem Gewebe aufhalten (Belz *et al.*, 2012; Merad *et al.*, 2013), orientiert sich eine weitere vornehmlich an ihrem Phänotyp und ihrer Funktion. Letztere soll im Folgenden näher beschrieben werden. Sie teilt die cDCs in CD8⁺/CD103⁻ und in CD11b⁺-cDCs ein (Dalod *et al.*, 2014; Mildner *et al.*, 2014; Satpathy *et al.*, 2012).

CD8⁺-cDCs kommen in lymphatischem Gewebe der Maus vor, doch stellen CD103⁺-DCs den äquivalenten Subtyp in nicht lymphatischem Gewebe dar (Bursch *et al.*, 2007; del Rio *et al.*, 2007; Shortman *et al.*, 2010). Für CD8⁺/CD103⁺-cDCs existieren gemeinsame spezifische Marker, einer davon ist Xcr1 (Bachem *et al.*, 2012). Xcr1 ist auch bei dem

menschlichen DC-Subtyp zu finden, der ähnliche Eigenschaften aufweist, wie die CD8⁺/CD103⁺-cDCs in der Maus (Croizat *et al.*, 2010). Hervorzuheben sind zwei Fähigkeiten der CD8⁺/CD103⁺ DCs: Zum einen sind sie zur Kreuzpräsentation fähig (Bedoui *et al.*, 2009; del Rio *et al.*, 2007; den Haan *et al.*, 2000; Pooley *et al.*, 2001). Durch diese Bezeichnung wird ein Vorgang beschrieben, dessen genaue Funktionsweise noch nicht vollständig geklärt ist. Hierbei werden exogene Antigene durch DCs in Verbindung mit MHCI präsentiert. So können CD8⁺ zytotoxische T-Zellen auch gegen Viren aktiviert werden, die DCs nicht direkt infizieren (Groothuis *et al.*, 2005). Auch für die unter 2.2.2 erwähnte Kreuz-Toleranzinduktion spielt dieser Vorgang eine Rolle. Zum anderen reagieren sie nach Stimulation durch TLR-Liganden mit einer sehr schnell erhöhten Produktion von IL12-p70 (Reis e Sousa *et al.*, 1997; Shortman *et al.*, 2010). IL-12 ist ein Zytokin, das neben der Aktivierung von Natürlichen Killerzellen auch die Differenzierung von T_H1-Zellen aus CD4-T-Zellen beeinflusst (Hsieh *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 2017).

Neben CD11b exprimieren CD11b⁺-cDCs auch DCIR2 (33D1) und lassen sich u.a. anhand ihrer CD4- und in der Milz anhand ihrer ECAM-Expression weiter unterteilen (Dudziak *et al.*, 2007; Lewis *et al.*, 2011). Da die CD11b⁺-cDCs eine sehr heterogene Untergruppe darstellen, wurde eine Abgrenzung häufig anhand der Funktionen vorgenommen, die sie im Vergleich zu CD8⁺/CD103⁺-Zellen nicht erfüllen (Mildner *et al.*, 2014). So verfügen sie z.B. nicht über die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation. Im Gegensatz zu CD8⁺/CD103⁺-Zellen lösen sie allerdings über eine MHCII assoziierte Antigenpräsentation effektiver eine CD4-T-Zell-Antwort aus (Dudziak *et al.*, 2007; Kamphorst *et al.*, 2010). Sie stellen den Subtyp dar, der mit Ausnahme des Thymus (hier sind es CD8⁺-DCs) in lymphatischem Gewebe vorherrschend vertreten ist (Wu *et al.*, 2005). In der neueren Literatur bezeichnet man die o.g. Subtypen mittlerweile eher als cDC1 (CD8⁺/CD103⁺-cDCs) und cDC2 (CD11b⁺-cDCs) (Granot *et al.*, 2017; Williams *et al.*, 2016).

2.3 Ppef2

Bei der Proteinphosphatase mit EF-Hand Motiven namens Ppef2 handelt es sich um eine Serin/Threonin Phosphatase, deren Genfamilie sich von anderen Phosphatasen durch das Vorkommen von eben jenen EF-Hand Motiven unterscheidet. Montini *et al.* stießen 1997 auf ein menschliches Gen, das homolog zu dem *Drosophila retinal degeneration C* (rdgC) Gen war. Es offenbarte erstmals die Existenz einer Proteinphosphatase mit EF-Hand Motiven (kurz PPEF) in Säugetieren. Bei dem Genprodukt von rdgC handelt es sich ebenfalls um

eine Serin/Threonin Phosphatase, die ihrem englischen Namen entsprechend bei *Drosophila*-Fliegen eine wichtige Rolle bei der Verhinderung von degenerativen Veränderungen der Retina spielt (Steele *et al.*, 1990). Ppef2 im Speziellen wurde kurze Zeit später erstmals beschrieben (Sherman *et al.*, 1997).

Ppef2 enthält insgesamt drei EF-Hand-Motive nahe ihres C-terminalen Endes (Sherman *et al.*, 1997). EF-Hand-Motive sind Proteinstrukturen, die in der Lage sind, Kalzium zu binden. Zwei solcher Kalzium-Bindestellen enthalten auch die EF-Hand-Motive von Ppef2. Außerdem besitzt Ppef2 in ihrer N-terminalen Domäne ein IQ-Motiv, welches die Fähigkeit besitzt, Calmodulin zu binden. Es konnte gezeigt werden, dass Calmodulin in Abhängigkeit von Kalzium an Ppef2 bindet. Der Aufbau von Ppef2 legt somit nahe, dass eine Regulation durch Kalzium mindestens durch zwei verschiedene Signalwege stattfindet (Kutuzov *et al.*, 2002). Wie genau diese Regulation abläuft, bleibt allerdings vorerst ungeklärt.

In Abbildung 1 ist mit Hilfe des Datensatzes von BioGPS die Expression von Ppef2 dargestellt (Lattin *et al.*, 2008). Diese und weitere Daten, wie z.B. der Datensatz von TISSUES, zeigen, dass die höchste Expression von Ppef2 in der Retina zu finden ist, während sie in einer Vielzahl an Zellen niedrig, aber dennoch vorhanden ist (Andreeva *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2015). Auch in den bereits beschriebenen CD8⁺ dendritischen Zellen ist die Expression erhöht, was den Bezug zur vorliegenden Arbeit herstellt (Edelmann *et al.*, 2011). Die Ppef2-Expression in den Zellen der Retina – bereits von Sherman *et al.* im Jahr 1997 beschrieben – ist ein Grund für die Vermutung, dass Ppef2 eine Bedeutung für das visuelle System hat. Der zweite Grund ist die schon erwähnte Homologie der Gene von Ppef2 und rdgC. Da man annimmt, dass das Genprodukt von rdgC die Dephosphorylierung von Rhodopsin katalysiert und sich zeigen ließ, dass ein Fehlen von rdgC zur Degeneration der Retina führt, wird eine ähnliche Funktion für Ppef2 vermutet (Steele *et al.*, 1990; Steele *et al.*, 1992). Dies ließ sich jedoch bisher nicht beweisen. Ppef2-Knockout-Mäuse zeigten keinerlei Auffälligkeiten hinsichtlich der untersuchten retinalen Funktionen; weder die Dephosphorylierung von Rhodopsin noch die Histologie der Retina von Ppef2-defizienten Mäusen waren nennenswert verändert (Ramulu *et al.*, 2001). Die Frage, ob für die fehlenden Veränderungen Kompensationsmechanismen verantwortlich sind oder ob Ppef2 trotz seiner erhöhten Expression in der Retina nur eine geringe Bedeutung für deren Funktion hat, bleibt vorerst unbeantwortet.

Somit ist die Funktion von Ppef2 immer noch weitestgehend ungeklärt. Microarray-Analysen legen eine Rolle bei Stressantworten nahe. Außerdem scheint eine Beteiligung an

der Kontrolle von Überleben, Proliferation, Wachstum und bösartiger Entartung der Zelle

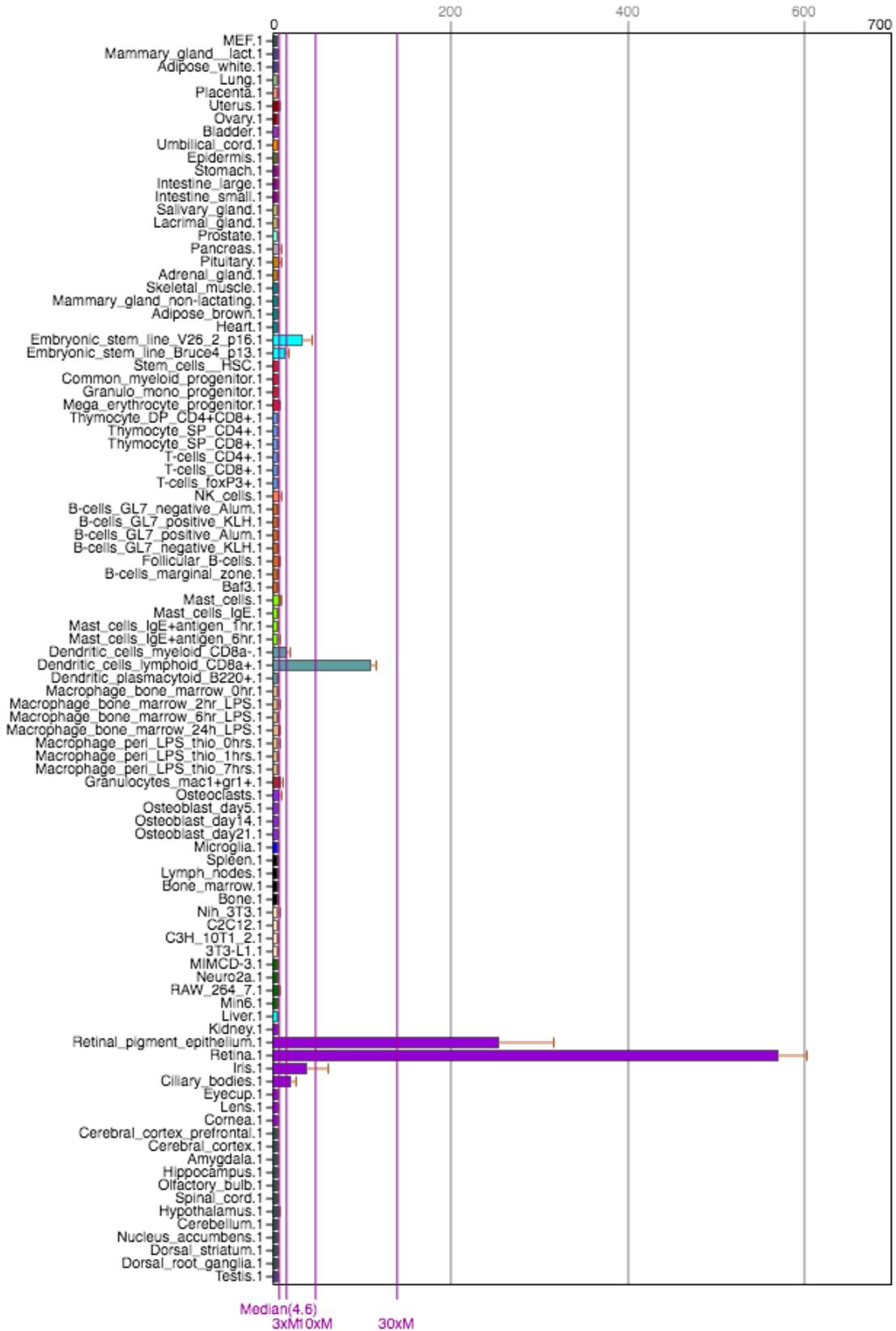


Abbildung 1 Expressionsmuster von Ppof2

Zur Verfügung gestellt wurden die Expressionsdaten von Ppof2 in der Maus durch biogps.org (Lattin et al., 2008). Sie zeigen eine deutlich erhöhte Expression von Ppof2 in Zellen der Retina, sowie in geringerem Ausmaß in CD8⁺ dendritischen Zellen.

wahrscheinlich. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Expression von Ppof2 u.a. in jenen Zellen erhöht war, die gegen Apoptosesignale resistent waren (Andreeva et al., 2009). Dieser Erkenntnis auf den Grund gehend zeigte sich, dass eine starke Interaktion zwischen Ppof2 und der Apoptose Signal-regulierenden Kinase 1 (Ask1) besteht. Ask1 ist eine pro-apoptotische MAP Kinase Kinase Kinase und spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung diverser Erkrankungen, u.a. bei Krebserkrankungen. Als Reaktion auf dauerhaften oxidativen Stress, beispielsweise durch H₂O₂, löst ASK1 proapoptotische und inflammatorische Signale aus. Indem Ppof2 die Aktivität von ASK1 inhibitorisch reguliert, scheint es eine anti-apoptotische Funktion einzunehmen (Kutuzov et al., 2010).

Edelmann et al. beschrieben 2011, dass die Suche nach Genen, die eine ähnliche Promoter-Organisation aufwiesen wie die DC-spezifischen Gene für CD11c und DC-STAMP, sie zu zwei Genen führte: Ppof2, mit dem sich die vorliegende Arbeit beschäftigt, und Pftk1. Sie konnten zeigen, dass Ppof2 in DCs, vornehmlich in CD8⁺ DCs, exprimiert wird und dass diese Expression abhängig von der Dauer der Zellkultur stetig steigt. Nach Stimulation mit LPS zeigte sich dagegen eine deutliche verminderte Expression. Kürzlich veröffentlichte Daten, die sich eingehend mit dem Expressionsmuster von Ppof2 in DCs beschäftigen, weisen darauf hin, dass Ppof2 rapide in aktivierten DCs herunterreguliert wird und belegen eine erhöhte Apoptose in Ppof2-defizienten DCs (Zwick et al., 2019). Aus diesem Grund war das Ziel der vorliegenden Arbeit durch lentivirale Überexpression von Ppof2 dessen natürlichen Verlust zu kompensieren und die Effekte der verlängerten Ppof2-Expression auf DCs zu untersuchen (s. 2.5).

2.4 Lentiviraler Gentransfer

2.4.1 Lebenszyklus und Aufbau eines Lentivirus

Lentiviren bilden eine Untergruppe der Retroviren, deren genetische Information als einzelsträngige Ribonukleinsäure (RNS) vorliegt. Die Besonderheit von Retroviren liegt darin, dass sie dank des Enzyms reverse Transkriptase den normalen Weg der Transkription (Desoxyribonukleinsäure (DNS) in RNS) umkehren und somit RNS in DNS umwandeln können. Der typische Lebenszyklus eines Retrovirus sieht im Grunde folgendermaßen aus: Nachdem eine Wirtszelle durch das Virus infiziert wurde, kommt es

zur reversen Transkription. Das heißt, die virale RNS wird im Zytoplasma der Zelle in DNS umgewandelt. Nachfolgend wird die neu entstandene DNS in das zelluläre Genom integriert. Bis hierhin sind die Abläufe von viralen Proteinen abhängig. Die Schritte, die der Integration folgen, stehen dagegen in Abhängigkeit von der Wirtszelle. Es folgt die Transkription der integrierten DNS in RNS und im nächsten Schritt die Translation der viralen Proteine. Um den Lebenszyklus des Virus zu unterhalten, werden darauffolgend die neu entstandenen Viruspartikel freigesetzt und können nun weitere Zellen infizieren (Frankel *et al.*, 1998; Ramezani *et al.*, 2002).

Einer der bekanntesten Vertreter der Lentiviren ist das humane Immundefizienz Virus (HIV). Da in dieser Arbeit ein lentiviraler Vektor verwendet wurde, der von HIV-1 abgeleitet ist, soll im Folgenden der Aufbau von HIV-1 vereinfacht geschildert werden. Wie alle Retroviren besteht auch dieser aus Kapsid und Hüllmembran. Während sich im Kapsid die viralen Proteine und die genetische Information in Form von zwei identischen RNS-Einzelsträngen befinden, dient die Hüllmembran vor allem der Bindung an Wirtszellen. Die kodierenden Bereiche der RNS enthalten die Strukturgene gag, pol und env, sowie die regulatorischen Gene tat und rev und weitere akzessorische Gene. Während gag für Strukturproteine für Matrix, Kapsid und Nukleokapsid kodiert, sind die Genprodukte von pol die retroviralen Enzyme (reverse Transkriptase, Integrase, Protease). Das Gen env kodiert für die Glykoproteine der Hüllmembran, die die Kommunikation zur Wirtszelle vermitteln (Frankel *et al.*, 1998; Ramezani *et al.*, 2002). Die kodierenden Abschnitte der viralen RNS werden durch nicht kodierende Abschnitte flankiert. Dazu gehören maßgeblich das Verpackungssignal (Ψ) und sogenannte lange terminale Wiederholungssequenzen (*long terminal repeat*, LTR). Diese sind v.a. bedeutend für die Regulation der Genexpression. LTRs bestehen aus je einer U5-, R- und U3-Region. Dabei enthält die U3-Region wichtige Promoter- und Enhancersequenzen (Vogt, 1997).

2.4.2 Lentivirale Vektoren und ihr sicherer Einsatz in der Wissenschaft

Um einen Gentransfer zu wissenschaftlichen oder therapeutischen Zwecken zu erreichen, sind in der Vergangenheit viele verschiedene Wege untersucht worden. Der lentivirale Gentransfer, der lange Zeit Schwierigkeiten bereitete, stellt heute eine gut geeignete Methode zur Transduktion einer Vielzahl von Zelltypen dar (Blomer *et al.*, 1997; Kafri *et al.*, 1997; Zufferey *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu anderen viralen Vektoren können mit Hilfe lentiviraler Vektoren auch Zellen transduziert werden, die nicht teilungsaktiv sind, was einen erheblichen Vorteil darstellt (Naldini *et al.*, 1996). Mittlerweile wurde diese Methode

auch vielfach erfolgreich zum Gentransfer in DCs angewandt (Dresch *et al.*, 2008; Lopes *et al.*, 2008). In der Medizin besteht die große Hoffnung, durch ihren möglichen Einsatz zur Gentherapie und Immunisierung, z.B. gegen verschiedene Tumore oder Viren, Heilungserfolge zu erzielen. Daher bleibt sie weiterhin Gegenstand intensiver Forschung (Hu *et al.*, 2011; Naldini, 2015).

Um die Nutzung von lentiviralen Vektoren sicher zu machen, sind mehrere Schritte unternommen worden, die Replikationsfähigkeit nach der erfolgreichen Transduktion und Integration in die Zelle zu verhindern (Ramezani *et al.*, 2002). So wird die genetische Information auf vier verschiedene Plasmide verteilt und durch Kotransfektion von Produktionszelllinien der fertige Vektor hergestellt. Kurz gefasst wird durch die Verwendung verschiedener Plasmide bei der Herstellung nur die genetische Information des Transgens in die Zielzelle transduziert und nicht die Informationen für virale Proteine. Während diese für die Entstehung eines transduktionsfähigen Vektors noch nötig sind, würde es eine Gefahr darstellen, wenn sie im Rahmen der Vektorproduktion nicht verloren gehen würden. Dabei könnten replikationskompetente Vektoren entstehen (Kay *et al.*, 2001). Die verwendeten Plasmide sind Transfervektor, zwei Verpackungsplasmide und Hüllproteinplasmid. Letzteres enthält in unserem Fall nicht mehr das Gen *env*, da durch seine Genprodukte lediglich eine Bindung an bestimmte Zellen ermöglicht wird. Stattdessen verwendet man im Rahmen einer Pseudotypisierung das Gen für das Glykoprotein G des vesikulären Stomatitisvirus (*vesicular stomatitis virus glykoprotein G*, VSV-G). Dies ermöglicht eine lentivirale Transduktion von deutlich mehr Zellreihen (Cronin *et al.*, 2005).

Der Transfervektor enthält - neben dem zum Gentransfer vorgesehenen Transgen, einem internen Promoter dafür und dem Verpackungssignal Ψ - auf beiden Seiten LTRs (5'LTR und 3'LTR). Eines der Verpackungsplasmide enthält dagegen die genetische Information für die viralen Proteine *gag* und *pol*. Da in der vorliegenden Arbeit Vektoren der 3. Generation verwendet wurden, befinden sich auf ihm keine akzessorischen Gene mehr. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass diese für eine erfolgreiche Verwendung von lentiviralen Vektoren nicht nötig sind (Zufferey *et al.*, 1997). Um einen weiteren bedeutenden Sicherheitsschritt einzubauen, wurden diese Gene daher im Laufe der Entwicklung nicht mehr verwendet. Auch das regulatorische Gen *tat* musste in der dritten Generation der lentiviralen Vektoren letztendlich nicht mehr verwendet werden. Lediglich *rev* bleibt, auf einem zweiten Verpackungsvektor, als regulatorisches Gen in der vorliegenden Arbeit bestehen (Dull *et al.*, 1998). Die Verpackungsplasmide enthalten nicht das Verpackungssignal Ψ . Hiermit wird erreicht, dass die viralen Proteine nicht Teil des

lentiviralen Partikels sind, das letztendlich zur Transduktion verwendet wird (Kay *et al.*, 2001).

Eine weitere wichtige Maßnahme für die sichere Verwendung war die Entwicklung von selbst-inaktivierenden Vektoren (*self inactivating vector*, SIN-Vektor) (Zufferey *et al.*, 1998). Hierbei handelt es sich um Vektoren an deren U3-Region in der 3'LTR eine Deletion vorgenommen wurde. Nach der reversen Transkription befindet sich diese Deletion dann auch in der U3-Region des 5' Endes. Da die U3-Region, wie bereits beschrieben, Promoter- und Enhancersequenzen enthält, ist somit durch ihre Deletion die Transkription des Transgens nur noch vom vorgeschalteten internen Promoter und der zellulären Transkriptionsmaschinerie abhängig. Um einer homologen Rekombination während der Transfektion vorzubeugen, bei der die deletierte U3-Region wieder durch die intakte U3-Region des 5' Endes ersetzt werden könnte, hat man zusätzlich die U3-Region der 5'LTR durch einen CMV-Promoter ersetzt (Ramezani *et al.*, 2002).

2.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Wissen um DCs, ihre Entwicklung, Reifung, Funktion und wie sie diese Funktion ausüben, wächst stetig. Dennoch existieren noch viele unbeantwortete Fragen. Anlass dafür, die Expression von Ppof2 und deren Auswirkung auf DCs genauer zu untersuchen, waren u.a. die o.g. Daten von Edelmann *et al.* im Jahr 2011. Sie konnten zeigen, dass die Ppof2-Expression in DCs einerseits während ihrer Entwicklung stetig ansteigt und andererseits nach deren Aktivierung durch LPS nur noch sehr gering ist.

Aus dieser Tatsache ergab sich die Frage, welchen Effekt eine dauerhafte Expression von Ppof2 in DCs haben würde, auch nach einer Aktivierung der Zellen. Eine möglicherweise verminderte Aktivierung schien im Umkehrschluss zu den vorliegenden Daten denkbar. Um dies zu untersuchen, lag mit dem lentiviralen Gentransfer eine voraussichtlich gut geeignete Methode vor, um eine Überexpression von Ppof2 zu erreichen.

Das Ziel dieser Arbeit war demnach zuerst eine erfolgreiche Überexpression von Ppof2 in DCs durch lentiviralen Gentransfer zu erreichen und anschließend deren Auswirkung auf die Reifung und Funktion der DCs zu untersuchen. Um dies zu erreichen, wurde zu Beginn ein geeignetes Vektorkonstrukt gesucht, im Anschluss ein Transduktionsprotokoll entwickelt und zum Abschluss funktionelle Analysen durchgeführt.

3 Material und Methoden

Sowohl Material als auch Methoden sind in alphabetischer Reihenfolge beschrieben. Firmensitze werden nur bei erster Erwähnung der Firma genannt.

3.1 Material

3.1.1 Antikörper

Tabelle 1 Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie

| Epitop | Konjugat | Klon | Bezugsquelle |
|---------|----------------------------|-------------|--------------|
| CD11c | Pe-Cy7 | N418 | BioLegend |
| CD16/32 | nicht fluorochromgekoppelt | 2.4G2 | BD |
| CD86 | PerCP | GL-1 | BioLegend |
| hCD2 | PE | RPA-2.10 | eBioscience |
| MHC II | APC | M5/114.15.2 | eBioscience |

Tabelle 2 Verwendeter Antikörper für den Western Blot

| Epitop | Klon | Isotyp | Bezugsquelle |
|--------|------------|-----------|---|
| Ppof2 | polyklonal | Ziege IgG | Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dallas, Texas, USA |
| GAPDH | 14C10 | Hase IgG | Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA |

3.1.2 Chemikalien

Falls es nicht anders angegeben ist, wurden alle Chemikalien von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) oder Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA) im höchsten Reinheitsgrad bezogen. Wurden spezielle Reagenzien benötigt, so sind diese samt ihrer Bezugsquelle in der jeweiligen Methodenbeschreibung aufgeführt. Alle Lösungen, Medien und Puffer, die für diese Arbeit verwendet wurden, wurden mit doppelt destilliertem Wasser angesetzt.

3.1.3 Geräte

Brutschrank (Hera cell, Heraeus Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland), Chemikalienwaage (Kern, Albstadt, Deutschland), Durchflusszytometer (FACSCanto II, BD), Feinwaage (Adventurer, Ohaus Corp., Pine Brooks, NJ, USA), Magnetrührer (Ika Labortechnik, Staufen, Deutschland), PCR-Maschine (T3 Thermocycler, Biometra, Göttingen, Deutschland), Pipetten (Gilson, Middleton, WI, USA), Pipettierhilfe (Integra Biosciences, Baar, Schweiz), Real-Time PCR (qPCR) Gerät (Lightcycler, Roche, Basel, Schweiz oder CFX96 Real Time System, BIO-RAD, Hercules, CA, USA), Spannungsquelle (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ, USA), Sterilbank (Heraeus), Tischzentrifuge (Centrifuge 5415 D, Eppendorf, Hamburg, Deutschland), Ultrazentrifuge (L8-70M, Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, USA), UV-Lampe (UVC 30, Kendro, Langenselbold, Deutschland), Vortex-Genie2 (Scientific Industries, Bohemia, NY, USA), Wasserbad (Grant Instruments Ltd., Barrington Cambridge, England), Zellzählgerät (Coulter Counter Z2, Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland), Zentrifuge (Rotixa RP, Hettich, Tuttlingen, Deutschland). Alle anderen verwendeten Geräte sind in den jeweiligen Methodenbeschreibungen aufgeführt.

3.1.4 Lösungen und Medien

| | |
|-----------------|---|
| ACK-Puffer | 8,29 g NH_4Cl 1 g KHCO_3 37,2 mg Na_2EDTA H_2O ad 1 l pH 7,2-7,4 mit 1 N HCl einstellen und durch 0,2 μm Filter steril filtrieren |
| CaCl_2 | 2.5 M CaCl_2 durch 0,2 μm Filter steril filtrieren bei -20 °C lagern |
| FACS-Puffer | PBS 2% FCS (v/v) 0,01% NaN_3 (v/v) |

| | |
|--------------------------|---|
| 2x HBS-Puffer | 280 mM NaCl 50 mM HEPES 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ -Dihydrat pH 7,05 mit NaOH einstellen und durch 0,2 µm Filter steril filtrieren bei -20 °C lagern (max. 6 Monate) |
| NP-40 Zell-Lyse-Puffer | 50 mM Tris, pH 8,8 mit HCl einstellen 150 mM NaCl ₂ 1 % NP-40 1/100 Protease Inhibitor Cocktail P8340 (Sigma) 1/100 Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) vor Nutzung hinzufügen |
| PBS | 150 mM NaCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4 mit 5 N NaOH einstellen |
| PBST | PBS 0,05 % Tween-20 |
| SDS Elektrophoresepuffer | 192 mM Glycin 25 mM Tris 0,1% SDS |
| 5x SDS Probenpuffer | 50 % Glycerin 250 mM Tris, pH 6,8 mit HCl einstellen 500 mM DTT 10 % SDS 0,5 % Bromphenolblau |

| | |
|---|--|
| <i>Stripping</i> -Puffer für Western Blot | 62,5 mM Tris, pH 6,7 mit HCl einstellen 2% SDS 100 mM β -Mercaptoethanol |
| 50x TAE Puffer | 242 g Tris 57,1 ml 100% Essigsäure (v/v) 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) H ₂ O ad 1 l |
| Transferpuffer für Western Blot | 192 mM Glycin 25 mM Tris 20% Methanol 0,002% SDS |
| <u>Herstellung der Gele für SDS-PAGE</u> | |
| Sammelgel (5%) | 30 % Acrylamid Mix 1 M Tris, pH 6,8 mit HCl einstellen 1 % SDS 1 % Ammoniumpersulfat 0,1 % TEMED In H ₂ O |
| Trenngel | 30 % Acrylamid Mix 1,5 M Tris, pH 8,8 mit HCl einstellen 1 % SDS 1 % Ammoniumpersulfat 0,04 % TEMED In H ₂ O |
| <u>Zellkulturmedien</u> | |
| BMDC-Medium | Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (Sigma-Aldrich) 10% FCS (Hitze inaktiviert) 500 mM β -Mercaptoethanol |

| | |
|--------------------|--|
| | 100 U/ml Penicillin |
| | 100 µg/ml Streptomycin |
| | 2 mM Glutamin |
| | 20 ng/ml GM-CSF |
| HEK 293FT Medium | Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit Glutamax-I |
| | 10% ml FCS (inaktiviert, v/v) |
| | 100 U/ml Penicillin |
| | 100 µg/ml Streptomycin |
| | 0,1 mM non-essential amino acids (MEM) |
| | 10 mM HEPES |
| | 500 µg/ml Geneticin G418 (Geneticin wurde nicht zugefügt, wenn die Zellen zur Virusproduktion ausgesät wurden bzw. während der Produktion (Tag 5-8)) |
| NIH3T3 Zell Medium | DMEM (Glutamax) |
| | 10 % FCS (nicht inaktiviert, v/v) |
| | 100 U/ml Penicillin |
| | 100 µg/ml Streptomycin |
| | 1 % Pyruvat |

3.1.5 Mausstamm

Die Mäuse wurden in den Mäusestellen des Instituts für Immunologie der LMU München gehalten.

C57BL/6

Der MHC-Haplotyp dieses Mausstammes ist H-2^b. C57BL/6-Mäuse exprimieren das Allel Ly5.2.

3.1.6 Vektoren

Die Vektorkarten der endgültig verwendeten Plasmide, sind im Anhang zu finden. Das Rückgrat pHAGE-CMV-dsRed-UBC-GFP-W (Addgene Plasmid 24526) von Darrell Kotton wurde von Addgene (Cambridge, Massachusetts, USA) bezogen und einerseits als Kontrolle verwendet, andererseits wurde dsRed durch restriktionsenzymatische Spaltung entfernt und anschließend mit Hilfe von Ligation durch Ppef2 ersetzt. Hierdurch wurde ein erstes Konstrukt zur Überexpression von Ppef2 erstellt.

Ein weiteres Rückgrat (pHAGE-CMV-Rheb-IRES-eGFP-W, Addgene Plasmid 32519) von Mustafa Sahin wurde ebenfalls bei Addgene gekauft und zur Klonierung eines weiteren Überexpressionskonstruktes genutzt. Hierfür wurde wie oben bereits beschrieben Rheb durch Ppef2 ersetzt.

Ein weiteres Rückgrat, von David Baltimore hergestellt, wurde ebenfalls bei Addgene erstanden (pHAGE-CMV-hIL7-IRES-ZsGreen-W, Addgene Plasmid 26532). In diesem Fall wurde hIL7 einerseits durch Ppef2 ersetzt und somit ein Überexpressionsvektor gewonnen. Andererseits wurde es durch hCD2 ersetzt.

3.1.8 Verbrauchsmaterialien

| | |
|---------------------------------------|--|
| Centricon Filter | Millipore Corporation, Billerica, MA, USA |
| Einmal-Spritzenfilter (0,2 + 0,45 µm) | Nalgene Nunc Int., Rochester, NJ, USA |
| Einmal-Injektionskanülen 26 G ×1/2“ | Terumo Medical Corporation, Tokyo, Japan |
| Einmalspritzen (1+5 ml) | Braun, Melsungen, Deutschland |
| Flaschenfilter | Nalgene Nunc Int., Rochester, NJ, USA |
| Plastik-Petrischalen | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Reaktionsgefäße 0,2 ml | Nunc, Wiesbaden, Deutschland |
| Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Reaktionsröhrchen 5 ml (für FACS) | Becton, Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ, USA |
| Reaktionsgefäße 15 ml und 50 ml | Greiner, Frickenhausen, Deutschland |

Weitere Zellkulturmaterialien und -plastikwaren wurden von den Firmen Falcon, Becton Dickinson, Nunc und Greiner erworben.

3.2 Methoden

3.2.1 Immunologische und zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Die Durchflusszytometrie (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*, FACS) ist eine Methode mit deren Hilfe eine Aussage über die Zellpopulation, die Eigenschaften und den Zustand einer Zelle möglich ist. Dank verschiedener Charakteristika wie der Zellgröße, der Granulierung oder der Expression von zelltypischen Markern, kann auf die Zelllinie der untersuchten Zelle geschlossen werden.

Jede einzelne Zelle trifft in Suspension auf einen Laserstrahl, wodurch Streulicht entsteht. Dieses Streulicht hängt von der Beschaffenheit der Zelle ab und wird von Detektoren wahrgenommen. Das Vorwärtsstreulicht (*forward angle light scatter*, FSC) gibt dabei Auskunft über die Größe der Zelle, während das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) die Granularität der Zelle misst. Unter Zuhilfenahme von Antikörpern, die mit einem Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt sind, können zusätzlich verschiedene populationstypische Marker bzw. Antigene an der Oberfläche oder im Zellinneren detektiert werden. Dieser Vorgang nennt sich Färbung (*Staining*). Die durch den Laserstrahl angeregte, abgegebene Fluoreszenz wird ebenfalls durch Detektoren aufgenommen.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete FACS-Gerät war FACSCantoII (BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA), das mit drei Lasern (405, 488 und 633 nm) ausgestattet ist. Die gewonnenen Daten wurden mit Hilfe der FlowJo Software (TreeStar, Ashland, Oregon, USA) analysiert.

Zur Färbung der Zellen wurden diese in FACS-Puffer, der in vorher durch Titration bestimmten Konzentrationen die gewünschten Antikörper enthielt, gelöst und für 20 Minuten bei 4 °C in Dunkelheit inkubiert. Die verwendete Menge des FACS-Puffers war hierbei abhängig von der gegebenen Zellzahl (meist 50-100 µl Antikörper-FACS-Puffer-Mischung). Anschließend wurden Maßnahmen zur Entfernung der noch ungebundenen Antikörper ergriffen, um dann die Zellen in einer 1:1 Mischung aus FACS-Puffer und PFA (zur Fixierung der mit lentiviralen Vektoren transduzierten Zellen) zu suspendieren und in ein 5 ml Reaktionsröhrchen zu geben. Auch die hier verwendeten Volumina waren abhängig von der Zellzahl. Bis zur Analyse wurden die Zellen auf Eis und im Dunkeln aufbewahrt.

3.2.1.2 Entnahme von Knochenmark und Isolierung von Zellen

Die Mäuse wurden in einer CO₂-Gaskammer getötet und vor der Organentnahme mit 70-prozentigem Ethanol äußerlich desinfiziert. Um Knochenmark zu gewinnen, wurden Ober- und Unterschenkel der Maus entnommen und Muskeln und Sehnen von den Knochen entfernt. Bis die Isolierung der Knochenmarkszellen fortgesetzt wurde, konnten die Knochen in PBS auf Eis gelagert werden.

Die Knochen wurden schließlich an beiden Enden mit einer feinen Schere geöffnet und mit Hilfe einer dünnen Kanüle und Spritze mit Medium durchspült, um die Knochenmarkszellen in Lösung zu bringen. Die gewonnenen Zellen wurden bei Raumtemperatur für 2 Minuten mit 2 ml ACK Puffer versetzt, um eine Erythrozytenlyse zu erreichen. Diese Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 4 ml Medium wieder gestoppt und die Zellen durch ein Zellsieb (*cell strainer*) gefiltert. Hierauf wurden die Zellen für die gewünschte Zellkultur verwendet.

3.2.1.3 Mikroskopische Zellaufnahmen

Sollten Zellen fotografiert werden, wurden sie mit einem Mikroskop (DMXA-RF8, Leica Microsystems) betrachtet, mit einer Kamera (Sensys CCD, Photometrics, Tucson, AZ, USA) aufgenommen und anschließend die Aufnahmen mit Photoshop (Version CS 5,1 Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA) bearbeitet. Dies war nötig, um Helligkeit und Kontrast an das Druckmedium anzupassen.

3.2.1.4 Produktion von lentiviralen Vektoren

Zur Produktion von lentiviralen Vektoren wurden HEK 293FT Zellen in Kultur genommen, hierfür wurde wie unter 3.2.1.7 beschrieben vorgegangen. Zur Transfektion wurde die Calcium-Phosphat-Präzipitations-Methode angewandt.

Nachdem am Vortag pro Zellkulturplatte (100 mm) 2-4 x 10⁶ Zellen in 10 ml Medium kultiviert worden waren, wurde mit der Vektorproduktion begonnen. Um die Zellen nicht zusätzlich zu belasten, wurde während der gesamten Virusproduktion Geneticin freies Medium verwendet. Alle Medien waren vor Verwendung auf Raumtemperatur gebracht worden.

Es wurde ein Reaktionsansatz mit folgenden Bestandteilen vorbereitet:

Reaktionsansatz: Produktion von lentiviralen Vektoren

| | |
|---------|---------------------------|
| 100 µl | CaCl ₂ |
| 10 µg | pMD2G (kodiert für VSV-G) |
| 15 µg | pCMVΔ8.2 |
| 20 µg | Transfer-Vektor |
| ad 1 ml | H ₂ O |

Zu je 1 ml Reaktionsansatz wurde unter Verwendung eines Vortexmischers 1 ml 2 x HBS-Puffer gegeben. Anschließend wurde dieser Ansatz für 10-15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Daraufhin wurde den Zellen zuerst 10 µl Chloroquin (Sigma-Aldrich) hinzugefügt, um eine erhöhte Wirksamkeit der Transfektion zu erreichen. Danach wurde der oben genannte Reaktionsansatz mit HeBS-Puffer tröpfchenweise auf die Zellen gegeben.

Im Anschluss wurden die Zellen 3,5-5 Stunden bei 37 °C und 10 % CO₂ inkubiert. Um die Transfektion nach dieser Zeit zu beenden, wurde das Medium mit dem Reaktionsansatz verworfen und die Zellen mit 5 ml angewärmtem PBS gewaschen. Mit 10 ml frischem 293FT Medium wurden die Zellen dann erneut über Nacht bei 37 °C und 10 % CO₂ inkubiert. Während all der genannten Vorgänge wurde stets darauf geachtet, die Zellen nicht aus ihrer Einzelschicht auf dem Plattenboden zu lösen und sie so schonend wie möglich zu behandeln.

An den folgenden drei Tagen wurden die Virusüberstände abgenommen. Hierfür wurde das Medium von den Zellen abgesaugt, mit einem 0.45 µm Filter (Nalgene Nunc Int.) gefiltert und bei 4°C gesammelt gelagert. Die Zellen erhielten 10 ml frisches Medium und wurden wieder bei 37 °C und 10 % CO₂ inkubiert.

Am letzten der drei Tage wurden die Virusüberstände schließlich aufkonzentriert. Dies geschah unter Verwendung von Centricon Filtern (Plus-80, Millipore) nach den Angaben des Herstellers. Dieses Verfahren macht sich die Zentrifugalkraft zu nutze. Hierdurch wird die Flüssigkeit der Virusüberstände durch eine Membran gepresst, die nur bis zu einer bestimmten Größe permeabel ist. Alle größeren Partikel, zu denen auch die Viruspartikel gehören, können die Membran nicht passieren und bleiben zurück. Dank dieses Verfahrens ist es möglich den Virus stark aufzukonzentrieren.

Zum Abschluss der lentiviralen Vektor-Produktion wurden passende Virus-Aliquots mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.1.5 Transduktion von Zellen mit lentiviralen Vektoren

Transduktion von aus Knochenmark gewonnenen dendritischen Zellen (*Bone marrow-derived dendritic cells*, BMDCs)

Um Zellen mit den lentiviralen Vektoren zu transduzieren, d.h. um die Vektoren in die Zellen zu bringen, wurden im Laufe der vorliegenden Arbeit verschiedene Vorgehensprotokolle getestet. Diese unterschieden sich hauptsächlich in der Virusmenge und im zeitlichen Abstand zwischen den einzelnen Arbeitsschritten.

Das Protokoll, bei dem im FACS die besten Signale gesehen werden konnten und welches daher etabliert wurde, ist hier beschrieben. BMDCs wurden an Tag 0 in Kultur genommen und an Tag 3 gesplittet (s. 3.2.1.7.). An Tag 6 fand die Transduktion statt. Hierfür wurden jeweils 10^6 Zellen mit einer Virusmenge, die einem MOI zwischen 1 und 10 entsprach, versetzt und anschließend 1 μ l *Polybrene* (Hexadimethrin Bromid, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) hinzugefügt. Mit BMDC-Medium wurde das Reaktionsansatz-Volumen auf 500 μ l erhöht.

In einer 48-Loch-Platte wurde der Ansatz für zwei Stunden mit 1300 rpm bei 32 °C zentrifugiert, um anschließend für vier Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert zu werden. Um die Transduktion zu beenden, wurden die Zellen dann mit PBS gewaschen und zuletzt mit 2 ml BMDC-Medium auf einer 6-Loch-Platte ausgesät und inkubiert. Um Veränderung durch Stimulation untersuchen zu können, wurden dafür vorgesehene Zellen einen Tag später, an Tag 7, mit LPS (2 μ l LPS pro Zellansatz mit je 2 ml Medium) stimuliert. Die Untersuchung der Zellen mittels FACS oder qPCR fand nach dem hier etablierten Protokoll an Tag 8 statt.

Transduktion von NIH3T3 Zellen

Ähnlich wie oben beschrieben, wurde bei der Transduktion von NIH3T3 Zellen zur Ermittlung des viralen Titers vorgegangen. Die NIH Zellen wurden wie unter 3.2.1.7 kultiviert. Am Tag der Transduktion wurden verschiedene Verdünnungen des Virus mit Medium hergestellt (50-, 250-, 1250-, 6250- und 31250-fach) und die Zellen mit 1 ml der jeweiligen Verdünnung und in Anwesenheit von *Polybrene* (Hexadimethrin Bromid, Sigma-Aldrich) für zwei Stunden bei 32 °C mit 1300 rpm zentrifugiert. Nach weiteren vier Stunden Inkubation bei 37 °C und 10% CO₂ wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen und - mit frischem Medium versehen - erneut inkubiert.

Am gleichen Tag wurden beispielhaft die Zellen aus zwei *wells* der 6-Loch-Platten (*6 well plates*) gezählt. Die Zellzahl zum Zeitpunkt der Transduktion wurde für die Ermittlung des Titers benötigt. Die der Transduktion folgende qPCR (s. 3.2.2.9) wurde zwei Tage später durchgeführt.

3.2.1.6 Zählen von Zellen

Um die Zellzahl von mit Virusplasmiden transduzierten Zellen zu bestimmen, wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Hierfür wurden 10 µl Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau vermischt. Dies ermöglichte eine Unterscheidung zwischen toten und lebenden Zellen, da hierdurch nur abgestorbene Zellen angefärbt werden, während lebende ungefärbt bleiben. Es wurden nur lebende Zellen gezählt. Bei der Berechnung der tatsächlichen Zellzahl wurde die oben genannte Verdünnung mit Trypanblau berücksichtigt.

In allen weiteren Fällen wurde der CASY-Zähler (CASY cell counter and analyzer, OMNI life science, Bremen, Deutschland) gemäß den Angaben des Herstellers als Zellzählgerät verwendet.

3.2.1.7 Zellkulturen

Kultur von BMDCs

Die Knochenmarkszellen wurden, wie unter 3.2.1.2 beschrieben, gewonnen und hierauf je 1×10^7 Zellen in 10 ml BMDC-Medium gelöst und in einer Petrischale mit 10 cm Durchmesser bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert.

Abhängig vom verwendeten Protokoll wurden die hierdurch gewonnenen BMDCs anschließend drei bis sechs Tage später mit Lentiviren transduziert. Wurden die Zellen an Tag 3 nicht transduziert, mussten sie dennoch umgesetzt werden. Hierfür wurden die Zellen aller Petrischalen vereint (*gepoolt*), erneut gezählt und wieder 10^7 Zellen in 10 ml Medium in Petrischalen ausgesät. Die in dieser Arbeit letztendlich etablierte Methode sah eine Transduktion an Tag 6 vor.

Kultur von HEK 293FT Zellen

Um lentivirale Vektoren zu produzieren, wurden HEK 293FT Zellen (Invitrogen) in Kultur genommen. Hierfür wurden die in Flüssigstickstoff gelagerten Zellen auf Eis aufgetaut und anschließend in 40 ml geeignetem Medium in einer Zellkulturflasche bei 37 °C und 10% CO₂ inkubiert. Wurde eine zu hohe Konfluenz erreicht (>75%), mussten die Zellen im Laufe der Tage subkultiviert werden. Dazu wurde das Medium verworfen und der Kulturflaschenboden mit 10 ml BPS, das anschließend ebenfalls verworfen wurde, gespült. Nun wurden die Zellen mit 4 ml Trypsin für zwei Minuten inkubiert, um die Adhärenz der Zellen zu lösen. Mit Hilfe von 6 ml Medium, das hinzugegeben wurde,

wurden die Zellen vom Flaschenboden gespült. Anschließend wurden die Zellen auf eine größere Zahl Zellkulturflaschen verteilt und wieder mit 40 ml Medium kultiviert.

Wenn ausreichend Zellen für die Virusproduktion vorhanden waren, wurden sie, wie oben beschrieben, vom Flaschenboden gelöst, gezählt und diesmal $2-4 \times 10^6$ pro 100 mm Zellkulturplatte in 10 ml Geneticin-freiem Medium suspendiert und kultiviert. Am Tag darauf fand die Transfektion mit den gewünschten Plasmiden statt, d.h. die Virusproduktion wurde begonnen (s. 3.2.1.4.).

Kultur von NIH3T3 Zellen

Diese Zellen wurden zur Ermittlung des lentiviralen Titers (s. 3.2.2.9) benötigt. Um die Zellen in Kultur zu nehmen, glich das Vorgehen dem bei 293FT Zellen (s.o.); allerdings wurde ein für NIH Zellen geeignetes Medium verwendet. Auch hier wurden die Zellen bei 37 °C und 10 % CO₂ inkubiert und bei Bedarf wie oben beschrieben subkultiviert. Ein Tag vor der Transduktion mit lentiviralen Vektoren wurden 4×10^4 Zellen in 1 ml Medium auf 24-Loch-Platten (*24 well plates*) kultiviert.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung, Identifizierung und Isolierung von DNS-Restriktionsfragmenten oder PCR-Fragmenten wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Abhängig von der Größe der erwarteten DNS-Fragmente wurden Horizontalgele mit verschiedenen Mengen Agarose hergestellt (0,5 – 2 %). Hierfür wurde die entsprechende Menge Agarose mit TAE-Puffer versetzt. Um die DNS-Banden später unter UV-Licht (312 nm, Intas, Göttingen, Deutschland) sichtbar zu machen und fotografieren zu können, wurde 4 µl pro 150 ml Gelvolumen einer 0,1-prozentigen (w/v) Ethidiumbromidlösung zu der flüssigen Agaroselösung hinzugegeben.

Das nach Abkühlen erstarrte Gel wurde dann mit den DNS-Fragmenten beladen, nachdem diese zu einem Sechstel ihres Volumens mit DNS-Ladepuffer versetzt worden waren. Zur richtigen Größenordnung wurden zusätzlich Längenstandards von 100 bp und 1000 bp auf das Gel aufgetragen (New England Biolabs (NEB), Ipswich, MA, USA).

Die Auftrennung der Banden erfolgte in einer Elektrophorese-Kammer mit 1 x TAE-Laufpuffer bei einer konstanten Spannung von 80V.

3.2.2.2 Bakterienkultur

Da alle Plasmide ein Ampicillin-Resistenzgen enthielten, wurde beim Anlegen von Bakterienkulturen stets Ampicillin zur Selektion erfolgreich transformierter Bakterien zugefügt.

Zur Vermehrung erfolgreich transformierter Bakterien wurden einzelne Kolonien in LB-Medium (Roth, Karlsruhe, Deutschland), das 100 µg/ml Ampicillin enthielt, angeimpft und über Nacht in einem Bakterienschüttler (Infors, Bottmingen, Schweiz) bei 37 °C inkubiert.

Um einzelne Bakterienkolonien zu erhalten, wurden die transformierten Bakterien auf LB-Agarplatten (7.5 g Agar/500 ml LB-Medium, 100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Um Bakterien über längere Zeit zu lagern, wurden Glycerolkulturen (50-prozentiges Glycerol und eine Übernachtskultur in LB-Medium zu gleichen Teilen) angelegt und bei -80 °C gelagert.

3.2.2.3 Bestimmung von DNS- und RNS-Konzentrationen

Die Konzentrationen von Nukleinsäuren nach deren Isolation oder Aufreinigung wurden mittels UV-Absorptionsmessung bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Das dafür verwendete Spektralphotometer (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) wurde vor den Messungen stets auf das jeweilige Lösungsmittel, in dem sich die Nukleinsäure befand, geeicht.

Ein Qubitfluorometer und das dazugehörige dsDNA HS Assay Kit (beides von Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) wurden gemäß den Angaben des Herstellers verwendet, wenn lediglich niedrige DNS-Konzentrationen vorlagen, aber eine hohe Messgenauigkeit benötigt wurde. Dies war insbesondere bei der Ermittlung des lentiviralen Titers mittels qPCR (s. 3.2.2.9) und anschließender absoluter Quantifizierung von großer Bedeutung, da hier für die Herstellung von Standardkurven 100 fache Verdünnungsserien hergestellt wurden.

3.2.2.4 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarose-Gel

Die gewünschten DNS-Fragmente wurden zuerst mit Hilfe eines Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgereinigt. Hierbei wurde gemäß den Angaben des Herstellers vorgegangen.

3.2.2.5 Isolierung von Nukleinsäuren aus Zellen

Zur Isolierung von DNS oder RNS aus Zellen wurden unterschiedliche Kits gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Sollte DNS isoliert werden, wurde das DNEasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Handelte es sich um RNS, stand das RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) zur Verfügung. Eine weitere angewendete Methode zur RNS-Isolierung war außerdem die Phenol-Chloroform-Extraktion. Hierbei wurde neben Chloroform das Reagenz TRIzol (QIAzol Lysis Reagent, Qiagen) verwendet, welches Phenol enthält. Sollte RNS für eine Weile gelagert werden, wurde Natrium-Acetat zu 1/10 ihres Volumens und das 2,5 fache ihres Volumens 100%iges Ethanol hinzugegeben und die RNS bei -80 °C aufbewahrt.

3.2.2.6 Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterien

Zur Isolierung von Plasmid-DNS aus transformierten *Escherichia coli* (*E. coli*) wurde bei kleinen DNS-Mengen (ca. 10 – 20 µg) QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen GmbH, Hilden) verwendet. Wurden größere Mengen DNS benötigt, wurde diese mit Hilfe der EndoFree Plasmid Maxi Kits (Qiagen GmbH, Hilden) isoliert. Die Kits wurden gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Die isolierte DNS wurde in endotoxinfreiem H₂O gelöst und bei -20 °C gelagert.

3.2.2.7 Ligation von DNS-Fragmenten

Um neue Plasmid-Vektoren zu klonieren, wurden DNS-Fragmente mit Hilfe einer Tfx-Ligase (New England Biolabs (NEB), Ipswich, MA, USA) und dem dazugehörigen Puffer ligiert. Vorangestellt war diesem Vorgang stets der restriktionsendonukleolytische Verdau von Vektor-Insert und –Rückgrat. Da beide Fragmente mit den gleichen Enzymen verdaut wurden, entstanden jeweils zueinander komplementäre Enden, die die anschließende Ligation ermöglichten.

Reaktionsansatz: Ligation von DNS-Fragmenten

| | |
|------|-------------------------|
| 6 µl | DNS des Vektor-Insert |
| 2 µl | DNS des Vektor-Rückgrat |
| 1 µl | Tfx-Puffer |
| 1 µl | Tfx-Ligase |

Dieser Ansatz wurde bei 16 °C über Nacht inkubiert und die dadurch gewonnenen Plasmide zur Transformation kompetenter Bakterien verwendet.

3.2.2.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode, die die exponentielle Amplifikation von DNS-Fragmenten ermöglicht. Außerdem erlaubt sie durch Wahl der Primer an beiden Enden des gewünschten DNS-Abschnitts Bereiche zu generieren, die sich zur Spaltung durch Restriktionsenzyme eignen und somit zu Klonierungszwecken verwendet werden können.

Für die Durchführung einer PCR werden Primer benötigt, die den gewünschten DNS-Abschnitt von beiden Seiten einschließen. Außerdem wird eine hitzestabile Polymerase, in diesem Fall Platinum Pfx DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), benötigt, sowie eine kleine Menge der Ausgangs-DNS (vollständiger Reaktionsansatz siehe Tabelle).

Reaktionsansatz: Polymerase-Kettenreaktion

| | |
|----------|-----------------------------|
| 5 µl | Pfx Puffer |
| 0,4 µl | Platinum Pfx DNA Polymerase |
| 0,75 µl | Primer 1 |
| 0,75 µl | Primer 2 |
| 1,5 µl | dNTPs (10 mM) |
| 1 µl | MgSO ₄ (50mM) |
| 1 µl | DNS |
| ad 50 µl | dH ₂ O |

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde mit Hilfe des T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland) wie folgt durchgeführt. Zu Beginn wurde der Ansatz zur Denaturierung für fünf Minuten auf 94 °C erhitzt. Darauf folgten 35 Zyklen mit folgendem Programm:

| | | | |
|-----------|-----------------------|---------|--------|
| Schritt 1 | Denaturierung | 94 °C | 15 sek |
| Schritt 2 | Primer-Hybridisierung | 55,2 °C | 30 sek |
| Schritt 3 | Elongation | 68 °C | 75 sek |

Das gewonnene Material wurde anschließend mittels Gelelektrophorese untersucht und isoliert oder bei 4 °C gelagert.

3.2.2.9 quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die qPCR-Methode ermöglicht in Ergänzung zur PCR eine genaue Aussage über die Menge der amplifizierten DNS. Sie wurde in der vorliegenden Arbeit zum einen mittels der SYBR Green Methode durchgeführt, zum anderen mit Hilfe der Taqman-Sonden Methode. Bei beiden Methoden werden Fluoreszenzmessungen in Echtzeit durchgeführt, die eine Aussage über die Menge der amplifizierten DNS erlauben, da die Fluoreszenz proportional mit der Menge zunimmt.

Bei Taqman-Sonden handelt es sich um Oligonukleotide, die mit einem Farbstoff und einem sogenannten Quencher gekoppelt sind. Dieser unterdrückt bei räumlicher Nähe die Fluoreszenz des Farbstoffes. Die Sonde lagert sich einem komplementären DNS-Strang an und wird dann während der PCR-Reaktion durch die Polymerase wieder verdrängt. Während dieses Vorgangs werden Farbstoff und Quencher räumlich voneinander getrennt und der Farbstoff wird sichtbar. SYBR Green dagegen ist ein Farbstoff, der interkaliert, d.h. er lagert sich zwischen doppelsträngige DNS und nimmt hierbei an Fluoreszenz zu. Somit korreliert die steigende Fluoreszenz mit einer steigenden DNS-Menge.

Taqman Methode

Um die Überexpression eines Gens nach Transduktion durch lentivirale Plasmide verifizieren und quantifizieren zu können, wurde die Taqman Methode eingesetzt. Hierfür wurde zuerst mRNA (*messenger* RNA) extrahiert und diese dann mittels reverser Transkriptase-PCR (RT-PCR) in komplementäre DNS (*complementary* DNS, cDNS) umgewandelt. Zur Herstellung von cDNS wurde das QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) gemäß den Herstellerangaben verwendet.

Die Menge der vorhandenen cDNS wurde dann anschließend mittels qPCR ermittelt, wodurch eine Aussage über die Höhe der Überexpression möglich wurde. Hierfür wurde das LightCycler TaqMan Master Kit (Roche, Basel, Schweiz) und das Universal Probelibrary Set Mouse (Roche) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Expressionsdaten von Ppof2 wurden gegen GAPDH oder HPRT normalisiert und die relative Quantifizierung wurde unter Verwendung der $\Delta\Delta CT$ -Methode ermittelt (Fleige *et al.*, 2006). Das verwendete Protokoll sah folgende Schritte vor:

| | | |
|------------|-------|---------|
| Schritt 1: | 95 °C | 10 Min. |
| Schritt 2: | 95 °C | 30 Sek. |
| Schritt 3: | 60 °C | 30 Sek. |
| Schritt 4: | 40 °C | 30 Sek. |

Schritt 2 – 3 wurden insgesamt 46 mal wiederholt

Reaktionsansatz: qPCR mittels Taqman Methode

| | |
|----------|-----------------------------------|
| 0,1 µl | Primer 1 |
| 0,1 µl | Primer 2 |
| 0,1 µl | Probe |
| 5 µl | 2-facher qPCR Mastermix |
| 2,5 µl | cDNS (2,5 µl entsprechen 12,5 ng) |
| ad 10 µl | dH ₂ O |

Tabelle 3 Primer und Sonden für TaqMan qPCR

| Gen | Primer vorwärts (5'-3') | Primer rückwärts (5'-3') | Sonde |
|-------|-------------------------|--------------------------|-------|
| GAPDH | GGGTTCCCTATAAATACGACTG | CCATTTTGTCTACGGGACGA | 52 |
| | C | | |
| HPRT | TCCTCCTCAGACCGCTTTT | CCTGGTTCATCATCGCTAATC | 95 |
| Ppof2 | TTCTGTCACAACCGCAAGG | TCTGTTGCTGCCAACTTCAT | 16 |

SYBR Green Methode

Die SYBR Green Methode wurde zur Titration der lentiviralen Vektoren eingesetzt. Die DNS von NIH3T3-Zellen wurde zwei Tage nach deren Transduktion durch Lentiviren isoliert. Die qPCR wurde mit Hilfe des Lightcycler FastStart DNA Master PLUS SYBR Green I Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das dabei verwendete Programm lief wie folgt ab:

| | | |
|------------|-------|---------|
| Schritt 1: | 95 °C | 10 Min. |
| Schritt 2: | 95 °C | 10 Sek. |
| Schritt 3: | 60 °C | 10 Sek. |
| Schritt 4: | 72 °C | 10 Sek. |
| Schritt 5: | 95 °C | 10 Sek. |

Schritt 2-4 wurden insgesamt 40-mal wiederholt.

Reaktionsansatz: qPCR mittels SYBR Green Methode

1,5 µl Primer vorwärts (2 µl für BDNF)
 0,5 µl Primer rückwärts (2 µl für BDNF)
 7,5 µl Master SYBR Green I Mix
 5 µl DNS
 ad 20 µl dH₂O

Hierbei wurde die Menge der Integration des Virus (FUGW als Virus spezifisches Amplifikat) pro Zelle (BDNF als *housekeeping*-Gen) untersucht. Zur Erstellung der für die Quantifizierung notwendigen Standardkurven wurde eine Verdünnungsreihe bekannter Konzentration von Plasmiden hergestellt, die die relevante DNS (FUGW oder BDNF) enthielten.

Tabelle 4 Primer für SYBR Green qPCR

| Gen | Primer vorwärts (5'-3') | Primer rückwärts (5'-3') |
|------|-------------------------|--------------------------|
| BDNF | ACGACATCACTGGCTGACAC | CATAGACATGTTTGCGGCATC |
| FUGW | TGAAAGCGAAAGGGAAACCA | CCGTGCGCGCTTCAG |

Um den Virustiter im Anschluss an die qPCR berechnen zu können, wurde absolute Quantifizierung angewandt und abschließend mit folgenden Formeln die Titration abgeschlossen:

$$\text{Virustiter (TU/ml)} = \frac{\text{NIH3T3 Zellzahl} \times \text{Anzahl der Viruskopien pro Genom}}{\text{Virusvolumen (ml)}}$$

$$\text{MOI} = \frac{\text{Virusvolumen (ml)} \times \text{Virustiter (TU/ml)}}{\text{Zellzahl}}$$

3.4.4.10 Spaltung von DNS mittels Restriktionsenzymen

Um neue Plasmide zu klonieren oder Qualitäts- bzw. Identifikationskontrollen durchzuführen, wurden DNS-Fragmente oder -Plasmide mit Hilfe von Restriktionsenzymen (New England Biolabs (NEB), Ipswich, MA, USA) geschnitten. Dies wurde stets nach Angaben des Herstellers und unter Verwendung der entsprechenden Puffer durchgeführt.

Reaktionsansatz: Verdau des Plasmid-Rückgrats zur anschließenden Klonierung

2 µg DNS
1,5 µl Enzym 1
1,5 µl Enzym 2
6 µl Puffer
0,6 µl BSA
ad 60 µl dH₂O

Reaktionsansatz: Verdau des Plasmid-Inserts zur anschließenden Klonierung

26 µl DNS
1,5 µl Enzym 1
1,5 µl Enzym 2
6 µl Puffer
0,6 µl BSA
ad 60 µl dH₂O

Reaktionsansatz: Kontroll-Verdau

1 µl DNS
0,3 µl Enzym 1
0,3 µl Enzym 2
2 µl Puffer
0,2 µl BSA
ad 20 µl dH₂O

Die Reaktionsansätze wurden bei 37 °C für eine Stunde inkubiert.

3.2.2.11 Transformation von *E. coli* mittels der CaCl₂ Methode

Zur Transformation von Plasmid-DNS in CaCl₂-kompetente Bakterien wurden *E. coli* auf Eis aufgetaut und anschließend 1-2 µl der zu transformierenden DNS hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten auf Eis, wurde die Suspension für 45 Sekunden einem Hitzeschock von 45 Grad ausgesetzt und im Anschluss erneut für eine Minute auf Eis gelegt.

Daraufhin wurde der Ansatz auf Ampicillin-haltige LB-Agarplatten ausplattiert, alle verwendeten Plasmide enthielten das Ampicillin-Resistenzgen. Zuletzt wurden die Agarplatten über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2.2.12 Western Blot

Herstellung der Zell-Lysate

Die Zellen wurden in einer Konzentration von $15 \mu\text{l}$ Lyse-Puffer (Nonidet P-40 (NP-40)) auf 1×10^6 Zellen resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Währenddessen wurde der Ansatz in regelmäßigen Abständen mit Hilfe eines Vortexgerätes gemischt. Danach wurde der Ansatz bei 2500 rpm für fünf Minuten zentrifugiert, um Zellreste und vollständige Zellkerne zu entfernen. Der Überstand stellte das Zell-Lysat dar, welches bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert werden konnte. Zur weiteren Nutzung wurden immer gleiche Mengen Protein mit SDS-Probenpuffer bei $96 \text{ }^\circ\text{C}$ für fünf Minuten der Denaturierung zugeführt.

SDS Page

Immer gleiche Mengen Protein wurden auf ein SDS Gel geladen und durch Elektrophorese (ca. eineinhalb Stunden bei 80-100 Volt) aufgetrennt. PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) wurde hierbei als Standard verwendet. Waren die Proteine aufgetrennt, wurden sie unter Verwendung eines TRANK TRANSFER SYSTEMS (BIO-RAD) auf eine Nitrocellulose Membran (Whatman, Sigma-Aldrich) übertragen (ca. eineinhalb Stunden bei 80 Volt). Bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ wurden über Nacht die unspezifischen Bindungsstellen für Antikörper an der Membran mit Hilfe von PBS blockiert, das 0,5% Tween-20 und 5 % Milch enthielt.

Western Blot Analyse

Nachdem die Membran mit spezifischen primären und sekundären Antikörpern inkubiert wurde, konnten die Proteine mit Hilfe von ECL Western Blotting Substrate (PerkinElmer Inc., MA, USA) und der anschließenden Entwicklung auf Amersham Hyperfilm™ (GE Healthcare) sichtbar gemacht werden.

3.2.3 Statistik

Mittelwerte, Standardabweichungen und der Student's T-Test wurden mit dem Programm Prism (Version 5,0b. GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) berechnet.

4 Ergebnisse

Da noch wenig über die Rolle bekannt ist, die Ppof2 in DCs spielt, gibt es eine Vielzahl an unbeantworteten Fragen. Edelmann *et al.* konnten 2011 zeigen, dass Ppof2 in CD8⁺ DCs exprimiert wird und die Expression im Laufe der Zellreifung proportional ansteigt. Nach Stimulation mit LPS nahm die Expression dagegen deutlich ab. Um die Funktion von Ppof2 besser zu verstehen, stellte sich die Frage, welche Auswirkungen eine dauerhafte Expression von Ppof2 auch nach Stimulation mit LPS haben würde. Um eine solche Überexpression zu erreichen, sollten in dieser Arbeit lentivirale Vektoren eingesetzt werden. Hierfür wurde zuerst ein geeignetes lentivirales Vektorkonstrukt gesucht, danach ein Transduktionsprotokoll entwickelt und schließlich erste Reifungsanalysen durchgeführt.

4.1 Suche nach einem geeigneten lentiviralen Vektor zur Überexpression von Ppof2

4.1.1 Aufbau der lentiviralen Vektoren

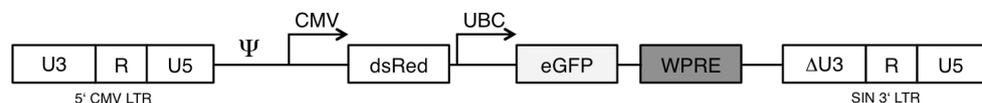
Zu Beginn musste ein geeignetes lentivirales Vektorkonstrukt gefunden werden. Es wurden mehrere Vektorkonstrukte getestet, die im Folgenden näher beschrieben werden und deren Plasmidkarten im Anhang zu finden sind. Als zukünftigen Marker einer erfolgreichen Transduktion enthielten alle Konstrukte, neben dem Gen für Ppof2, Gene für die fluoreszierenden Proteine eGFP oder ZsGreen als Reportergene. Dementsprechend war das erste Ziel, die gleichzeitige Überexpression von Ppof2 und der Gene der fluoreszierenden Proteine in transduzierten Zellen zu zeigen. War dieser Beweis erbracht, konnte in zukünftigen Versuchen davon ausgegangen werden, dass Zellen, die in der FACS-Untersuchung fluoreszierende Proteine enthielten, auch Ppof2 überexprimierten.

Hierfür wurden einerseits durchflusszytometrische Messungen mit dem FACS-Gerät genutzt, um die Expression der Gene für fluoreszierende Proteine zu detektieren. Zusätzlich wurden Fotos von transduzierten Zellen im Fluoreszenz-Mikroskop angefertigt, die ebenfalls die fluoreszierenden Proteine sichtbar machten. Andererseits wurde eine qPCR durchgeführt, um die Überexpression von Ppof2 zu zeigen. Kriterien für ein geeignetes Vektorkonstrukt waren demnach ein deutlicher Signalunterschied bezüglich der

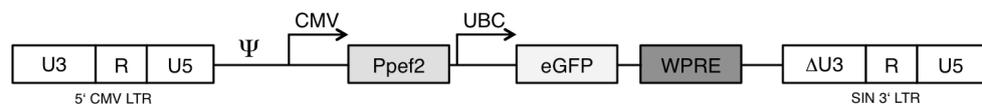
fluoreszierenden Proteine zwischen transduzierten und untransduzierten Zellen im FACS bei gleichzeitiger deutlicher Überexpression von Ppef2.

Abbildung 2 zeigt den schematischen Aufbau der verschiedenen Vektorkonstrukte. Das Konstrukt, das im Folgenden CMV-dsRed-UBC-eGFP (Abbildung 2A) genannt wird, wurde ursprünglich entwickelt, um die Expression zweier Transgene mit Hilfe eines einzelnen lentiviralen Vektors in hämatopoetischen Stammzellen zu erreichen (Wilson *et al.* 2008) und wurde ausgehend von dem pHAGE Vektor hergestellt (Mostoslavsky *et al.*, 2006). Dieser stellt einen lentiviralen, nicht replikationsfähigen SIN-Vektor der dritten Generation dar (2.4.2).

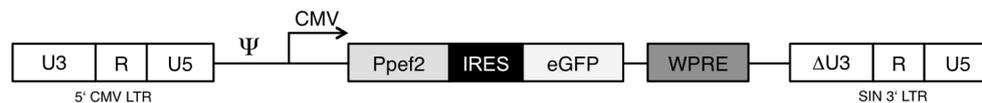
A) CMV-dsRed-UBC-eGFP



B) CMV-Ppef2-UBC-eGFP



C) CMV-Ppef2-IRES-eGFP



D) CMV-Ppef2-IRES-ZsGreen



Abbildung 2 Schematische Darstellung der verschiedenen lentiviralen Vektorkonstrukte

CMV, Cytomegalievirus; Ψ , Verpackungssignal; UBC, Ubiquitin C; SIN, sich selbst inaktivierend (*self-inactivating*); eGFP, verstärktes grün fluoreszierendes Protein (*enhanced green fluorescent protein*); LTR, lange terminale Wiederholungssequenz (*long terminal repeat*); WPRE, posttranskriptionell regulatorisches Element des Hepatitisvirus des Waldmurmeltiers (*woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element*); Δ U3, Deletion in der U3 Region; IRES, interne ribosomale Eintrittsstelle (*internal ribosomal entry site*)

A) Kontrollvektor, enthält an Stelle von Ppef2 das rot fluoreszierende Protein dsRed, enthält zwei verschiedene Promoterfragmente (CMV und UBC) und eGFP als Reporter gen

B) Enthält neben Ppef2 zwei verschiedene Promoterfragmente (CMV und UBC) und eGFP als Reporter gen

C) Enthält neben Ppef2 das CMV-Promoterfragment, IRES und eGFP als Reporter gen

D) Enthält neben Ppef2 das CMV-Promoterfragment, IRES und ZsGreen als Reporter gen

Für die vorliegende Arbeit diente das Vektorkonstrukt CMV-dsRed-UBC-eGFP einerseits als Rückgrat zur Herstellung des Konstruktes CMV-Ppef2-UBC-eGFP und andererseits als Kontrolle. Sie wurde zu Beginn verwendet, als die verschiedenen Konstrukte miteinander verglichen werden sollten. Dieses Konstrukt enthält ein Fragment des CMV-Promoters und darauffolgend das Gen für das rot fluoreszierende Protein der *Discosoma* sp., genannt dsRed. Dem sich anschließenden Promoterfragment von UBC folgt das Gen für eGFP. Außerdem beinhaltet das Vektorkonstrukt das posttranskriptionell regulatorische Element des Hepatitisvirus des Waldmurmeltiers (*Woodchuck Hepatitis post-transcriptional regulatory element*, WPRE), welches dazu dient, die Genexpressionslevel zu erhöhen (Zufferey *et al.*, 1999). Der aus diesem Rückgrat entstandene Vektor CMV-Ppef2-UBC-eGFP (Abbildung 2B) unterscheidet sich von dem gerade beschriebenen Vektorkonstrukt lediglich darin, dass dieser an Stelle von dsRed das Gen für Ppef2 enthält.

Das nächste Vektorkonstrukt, das im Weiteren als CMV-Ppef2-IRES-eGFP (Abbildung 2C) bezeichnet wird, basiert auf einem lentiviralen Vektor, der zum ersten Mal 2010 von Nie *et al.* genutzt wurde und dessen Ursprung ebenfalls ein nicht-replikationsfähiger SIN-Vektor der dritten Generation gewesen ist. Es enthält neben dem CMV-Promoterfragment, ebenfalls eGFP, WPRE und Ppef2. Außerdem wird bei diesem Konstrukt anstelle eines zweiten Promoters eine interne ribosomale Eintrittsstelle (*internal ribosomal entry site*, IRES) verwendet, um die Koexpression von eGFP als Reportergen zu ermöglichen.

Das letzte Konstrukt wird im Folgenden CMV-Ppef2-IRES-ZsGreen (Abbildung 4D) genannt, das ausgehend von einem unveröffentlichten Plasmid von David Baltimore hergestellt wurde. Es ist ähnlich aufgebaut wie CMV-Ppef2-IRES-GFP, allerdings wird in diesem Fall das grün fluoreszierende Protein der *Zoanthus* sp., genannt ZsGreen, verwendet. Mehrere Studien konnten zeigen, dass ZsGreen u.a. in Medaka Melanom Zellen und in Hefezellen eine stärkere Fluoreszenz aufweist als eGFP (Hasegawa *et al.*, 2009; Nakamura *et al.*, 2013). Daher lag die Vermutung nahe, dass möglicherweise auch in der vorliegenden Arbeit der Vektor CMV-Ppef2-IRES-ZsGreen ein stärkeres Signal ermöglichen würde.

4.1.2 Auswahl eines geeigneten lentiviralen Vektors

Als erstes wurden NIH3T3 Zellen mit den Viruspartikeln transduziert und die Zellen zwei Tage später untersucht. Im Fluoreszenz-Mikroskop waren sowohl die grün fluoreszierenden Proteine als auch das rot fluoreszierende Protein dsRed, deutlich sichtbar. Dies galt für alle vier getesteten Konstrukte (Abbildung 3A). Bei der ebenfalls

durchgeführten qPCR zeigte sich eine deutliche Überexpression von Ppef2 mit allen drei Ppef2-Konstrukten im Vergleich zur verwendeten Negativkontrolle CMV-dsRED-UBC-eGFP.

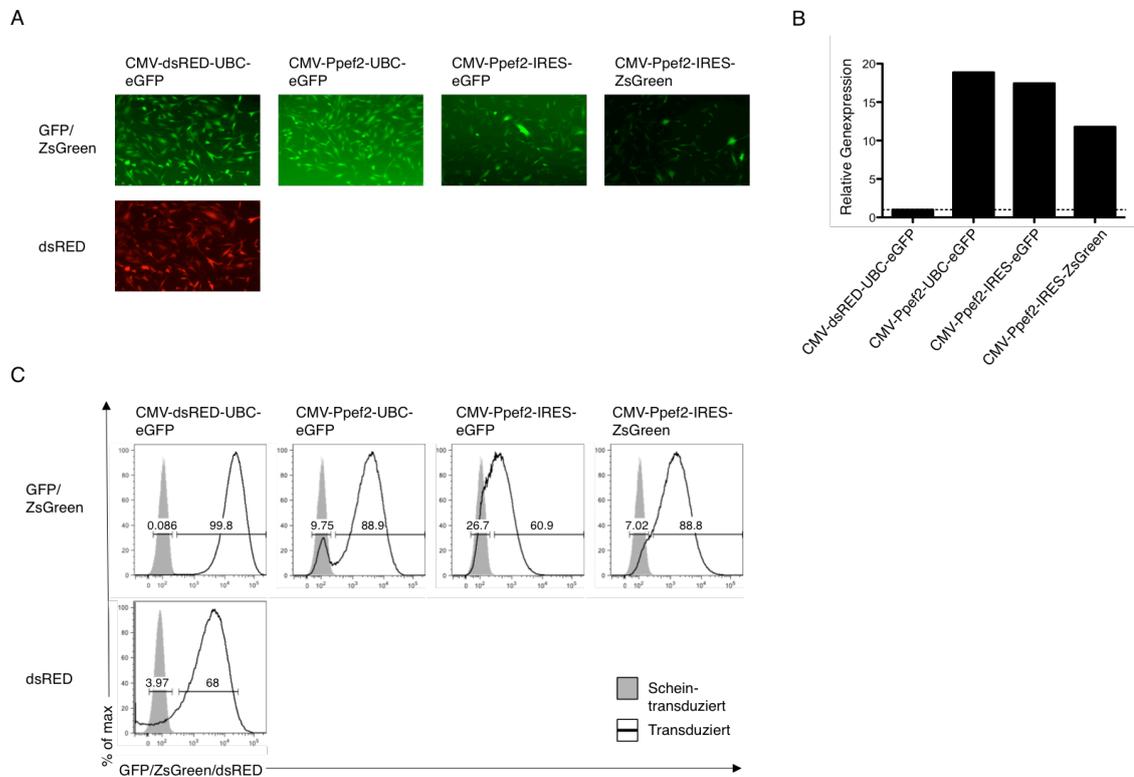


Abbildung 3 Transduktion von NIH3T3-Zellen mit den verschiedenen Vektoren resultiert in Überexpression von Ppef2 und den Reporter genen in allen Fällen

(A) Fotos der transduzierten Zellen durch das Fluoreszenzmikroskop (B) Genexpressionslevel der transduzierten Zellen, ermittelt durch qPCR. Es wurden alle transduzierten Zellen verwendet, es fand vorab keine Sortierung auf eGFP- oder ZsGreen-positive Zellen statt. Die Expressionsdaten wurden gegen GAPDH normalisiert und die relative Quantifizierung wurde mit Hilfe der $\Delta\Delta CT$ -Methode ermittelt (Fleige *et al.*, 2006) ($n=1$). (C) Durchflusszytometrische Analysen der verschiedenen transduzierten NIH-Zellen, dabei wurden die Fluoreszenzsignale aller lebenden Zellen untersucht und mittels eines Histogramms dargestellt. Zum Vergleich wurden zum Schein transduzierte Zellen herangezogen (*mock transduced*, zum Schein transduziert) ($n=1$).

(relativ zur Kontrolle: 18,9-fach mit CMV-Ppef2-UBC-eGFP, 17,4-fach mit CMV-Ppef2-IRES-eGFP, 11,8-fach mit CMV-Ppef2-IRES-ZsGreen) (Abbildung 3B). Im Rahmen von durchflusszytometrischen Messungen zeigte sich erneut für alle vier Vektoren eine deutliche Expression der fluoreszierenden Proteine (Abbildung 3C). Zum Vergleich wurden Schein-transduzierte Zellen ebenfalls im FACS-Gerät untersucht. Diese Zellen wurden dem gleichen Prozedere unterzogen wie die transduzierten Zellen, allerdings ohne

dass ein Virus zum Transduktionsmedium hinzugefügt wurde. Dementsprechend exprimierten diese Zellen keine fluoreszierenden Proteine und waren für die vergleichende Darstellung gut geeignet. Die Zusammenschau dieser Ergebnisse legte den Schluss nahe, dass alle Konstrukte eine Überexpression von Ppef2 bei gleichzeitiger Expression der Reporter gene herbeiführen. Da somit vorerst alle Ppef2-Vektorkonstrukte geeignet schienen, wurden damit in einem weiteren Schritt BMDCs transduziert. Dabei wurden verschiedene Virusverdünnungen getestet. In je einem Ansatz hatten die Viruspartikel ein Fünftel, ein Zehntel oder ein Zwanzigstel am gesamten Transduktionsmedium. Die Transduktion fand an Tag 3 der Zellkultur statt, die durchflusszytometrische Analyse schloss sich an Tag 7 an (Abbildung 4A).

Hierbei zeigte sich lediglich bei Zellen, die mit der Kontrolle CMV-dsRed-UBC-eGFP und dem Konstrukt CMV-Ppef2-IRES-ZsGreen transduziert worden waren, eine deutlich detektierbare Expression der Reporter gene (Abbildung 4B). Gleichzeitig schien die Zahl der Reporter gen-exprimierenden Zellen in beiden Fällen bei abnehmendem Anteil der Viruspartikel am Gesamtmedium ebenfalls abzunehmen. Im Fall der Kontrolle CMV-dsRed-UBC-eGFP fiel außerdem auf, dass zwar eine deutliche eGFP-Expression vorlag, aber gleichzeitig dsRed selbst bei hoher Viruskonzentration nur in geringen Mengen zu sehen war. Auch dies stellte einen Unterschied zur NIH3T3-Transduktion da, bei der auch für dsRed ein deutliches Signal detektiert werden konnte. Da bei der Transduktion von NIH3T3-Zellen auch die anderen Konstrukte eine deutliche Expression der fluoreszierenden Proteine im FACS gezeigt hatten, stellte sich die Frage, warum dies im Falle der BMDCs nicht erreicht werden konnte.

Um eine Überexpression von Ppef2 in BMDCs zu erreichen und um weiterführende Untersuchungen zu ermöglichen, fiel daher die Wahl letztendlich auf das Konstrukt CMV-Ppef2-IRES-ZsGreen. Der Einfachheit halber und weil nun nicht mehr zwischen verschiedenen Konstrukten unterschieden werden muss, wird dieses Viruskonstrukt in der vorliegenden Arbeit ab jetzt Ppef2_ZsGreen genannt. In NIH3T3-Zellen hatte das Konstrukt eine deutliche Expression des Reporter gens bei gleichzeitiger Überexpression von Ppef2 erzielt. In den FACS-Analysen nach Transduktion von BMDCs ergab sich ebenfalls eine deutliche Reporter genexpression, eine gleichzeitige Überexpression von Ppef2 wurde im nächsten Schritt mittels qPCR gezeigt (s. 4.1.3). Damit schien Ppef2_ZsGreen für weitere Versuche am besten geeignet.

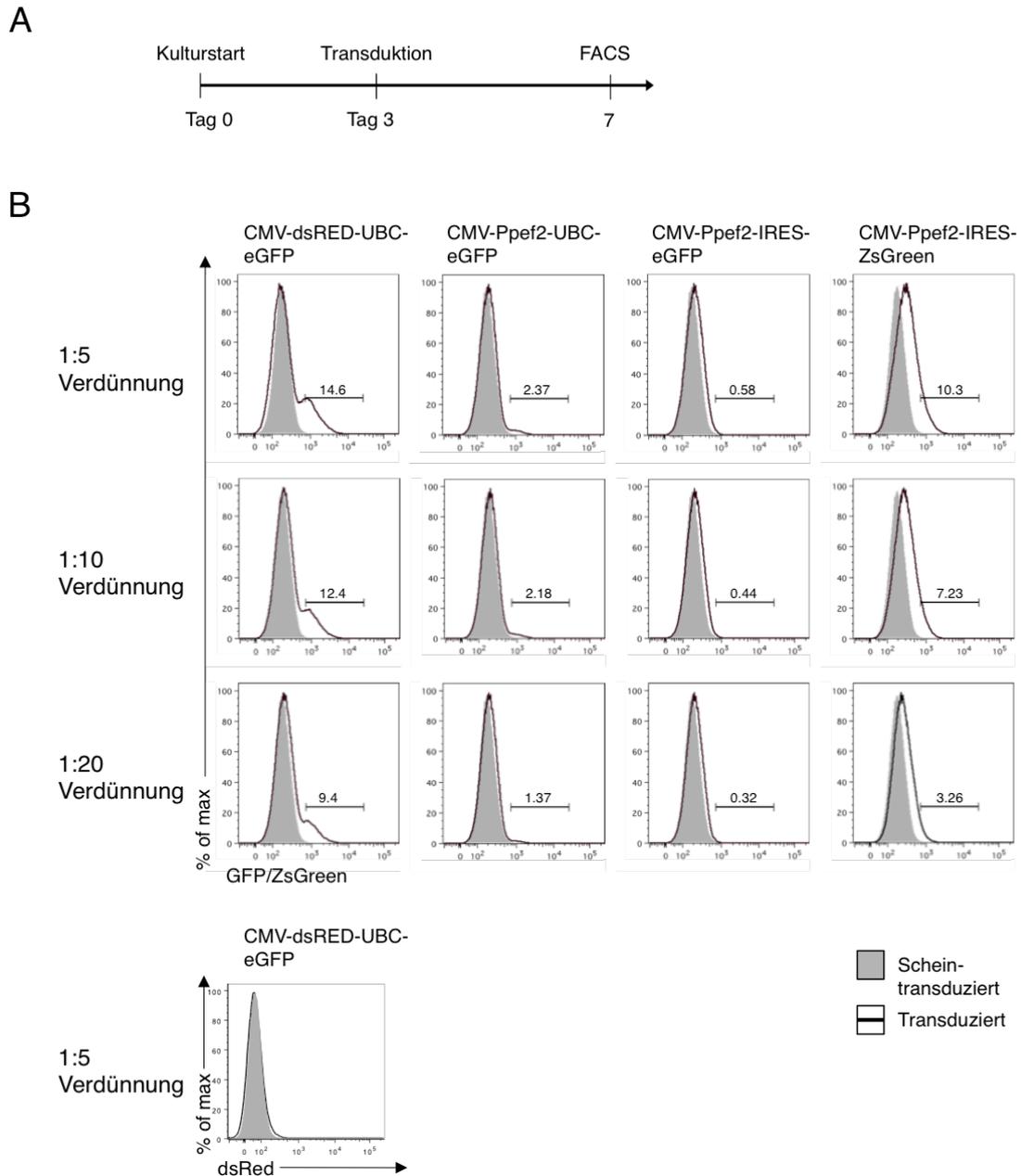


Abbildung 4 Transduktion von BMDCs mit den jeweiligen Vektorkonstrukten führt nur bei Konstrukt CMV-dsRed-UBC-eGFP und CMV-Ppef2-IRES-ZsGreen zu deutlich detektierbarer Reporterexpression

(A) Schematische Darstellung des verwendeten Transduktionsprotokolls: an Tag 3 der Zellkultur wurden die Zellen mit den verschiedenen lentiviralen Vektoren transduziert. Anschließend wurde das Fluoreszenzsignal der Zellen an Tag 7 mittels Durchflusszytometrie untersucht. (n=1)
 (B) Histogramme aller lebenden, transduzierten Zellen. Diese wurden durchflusszytometrisch analysiert, um ihre Reporterexpression darzustellen. Dabei wurden verschiedene Virusverdünnungen im Transduktionsmedium getestet. Zum Vergleich wurden zum Schein transduzierte Zellen herangezogen.

Nachdem ein geeignetes lentivirales Vektorkonstrukt gefunden war, erschien es zusätzlich sinnvoll eine Kontrolle herzustellen, die den exakt gleichen Aufbau wie Ppef2_ZsGreen

hat. Abbildung 5 zeigt den schematischen Aufbau der Kontrolle, die im Folgenden hCD2_ZsGreen genannt wird. Dieser entspricht, bis auf den Ersatz von Ppef2 durch hCD2 (humanes CD2), exakt dem Aufbau von Ppef2_ZsGreen.

CMV-hCD2-IRES-ZsGreen



Abbildung 5 Schematische Darstellung der hCD2-Kontrolle (hCD2_ZsGreen)

Der Vektor wurde als Kontrolle für das letztendlich ausgewählte Viruskonstrukt (im Folgenden Ppef2_ZsGreen genannt) verwendet und enthält neben hCD2 (humans CD2) das CMV-Promoterfragment, IRES und ZsGreen als Reportergen. Im Folgenden wird diese Kontrolle stets als hCD2_ZsGreen bezeichnet.

4.1.3 Überprüfung der Überexpression von Ppef2 in BMDCs mittels qPCR und Western Blot

Nachdem die Kontrolle generiert war, wurden BMDCs mit den beiden Viruskonstrukten transduziert und sowohl die qPCR als auch ein Western Blot durchgeführt. Hiermit sollte einerseits gezeigt werden, dass die Kontrolle ebenfalls funktionierte, d.h. hCD2 und das Reportergen ZsGreen exprimiert. Andererseits war bisher nur eine erfolgreiche Überexpression von Ppef2 in NIH3T3-Zellen nachgewiesen worden und noch nicht in BMDCs. Um die Expression von Ppef2 auch auf Proteinebene nachzuweisen, bot es sich an einen Western Blot durchzuführen. Da sich bei der ersten Transduktion von BMDCs gezeigt hatte, dass deutlich detektierbare Ergebnisse erzielt werden konnten, wenn der Anteil der Viruspartikel am Gesamtmedium ein Fünftel betrug, wurde für qPCR und Western Blot ebenfalls diese Verdünnungsstufe gewählt.

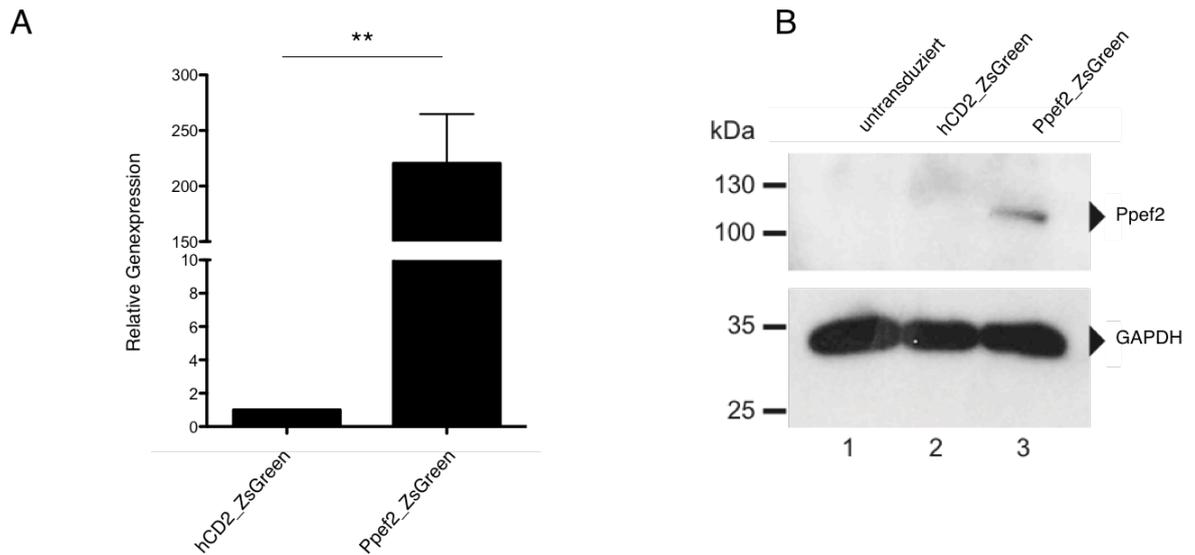


Abbildung 6 Transduktion von BMDCs mit Ppef2_ZsGreen resultiert in Überexpression von Ppef2 auf transkriptioneller und auf Protein-Ebene

(A) Ppef2-Genexpressionslevel der transduzierten Zellen, auf transkriptioneller Ebene ermittelt durch qPCR: Dargestellt ist die Ppef2-Überexpression von BMDCs, die mit Ppef2_ZsGreen transduziert wurden, relativ zur Ppef2-Expression in Zellen, die mit hCD2_ZsGreen transduziert wurden (220,4 fach). Die Expressionsdaten wurden gegen GAPDH normalisiert und die relative Quantifizierung wurde mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode ermittelt. Dargestellt sind die gepoolten Daten aus drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung und zur statistischen Analyse wurde der Student's T-Test verwendet, $p = 0,008$ (*: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$ und ***: $p \leq 0,001$) ($n=3$). (B) Westernblot-Analyse zur Untersuchung der Ppef2-Expression auf Proteinebene. Dargestellt sind neben der Kontrolle hCD2_ZsGreen auch untransduzierte Zellen. GAPDH wurde als ubiquitär vorkommendes Enzym als Lade-Kontrolle verwendet.

In der qPCR zeigte sich für Ppef2_ZsGreen relativ zu hCD2_ZsGreen eine 220,4-fache Expression von Ppef2 (Abbildung 6A). Die Ergebnisse des Western Blots (Abbildung 6B) zeigten ebenfalls deutlich das Vorkommen von Ppef2 in Ppef2_ZsGreen-transduzierten Zellen, während dies bei der hCD2-Kontrolle und bei untransduzierten Zellen nicht der Fall war.

4.2 Etablierung eines geeigneten Protokolls zur Transduktion von BMDCs

4.2.1 Erprobung einer Transduktion an Tag 2 und anschließenden FACS-Analysen an Tag 4 und 8

Um die neu generierte Kontrolle auch im FACS zu testen und Erkenntnisse darüber zu erlangen, wie ein geeignetes Transduktionsprotokoll aussehen könnte, wurde ein Versuchsansatz gewählt, bei dem an Tag 2 der Zellkultur die Transduktion durchgeführt wurde und sowohl Zellen an Tag 4 als auch Zellen an Tag 8 mit Hilfe des FACS untersucht wurden (Abbildung 7A). Da die ersten Versuche darauf hinwiesen, dass eine höhere Viruskonzentration den Transduktionserfolg erhöhte, wurde ein Virusanteil von einem Fünftel am Transduktionsmedium gewählt. Bei den FACS-Analysen (Abbildung 7B) zeigte sich erneut, dass sowohl Ppef2_ZsGreen als auch hCD2_ZsGreen eine deutlich detektierbare ZsGreen-Expression an Tag 4 der Zellkultur herbeiführen. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass die Kontrolle hCD2 exprimiert.

Was diesmal durch die verschiedenen Zeitpunkte der FACS-Analyse neu auffiel, war, dass ZsGreen an Tag 8 praktisch nicht mehr sichtbar war. Ebenso konnte an Tag 8 keine hCD2-Expression mehr nachgewiesen werden. Obwohl vorerst keine der möglichen Erklärungen für diese Daten bewiesen werden konnte, ließen sie dennoch einen Schluss zu: Für die weiteren Analysen bezüglich der Auswirkung einer Ppef2-Überexpression auf dendritische Zellen und ihre Aktivierung musste weiter nach einem Protokoll gesucht werden, das FACS-Analysen zu einem Zeitpunkt vorsah, an dem die transduzierten Zellen deutlich detektierbares ZsGreen exprimierten und idealerweise noch so wenig Reifung der Zellen stattgefunden hatte, dass eine funktionelle Analyse gut möglich war.

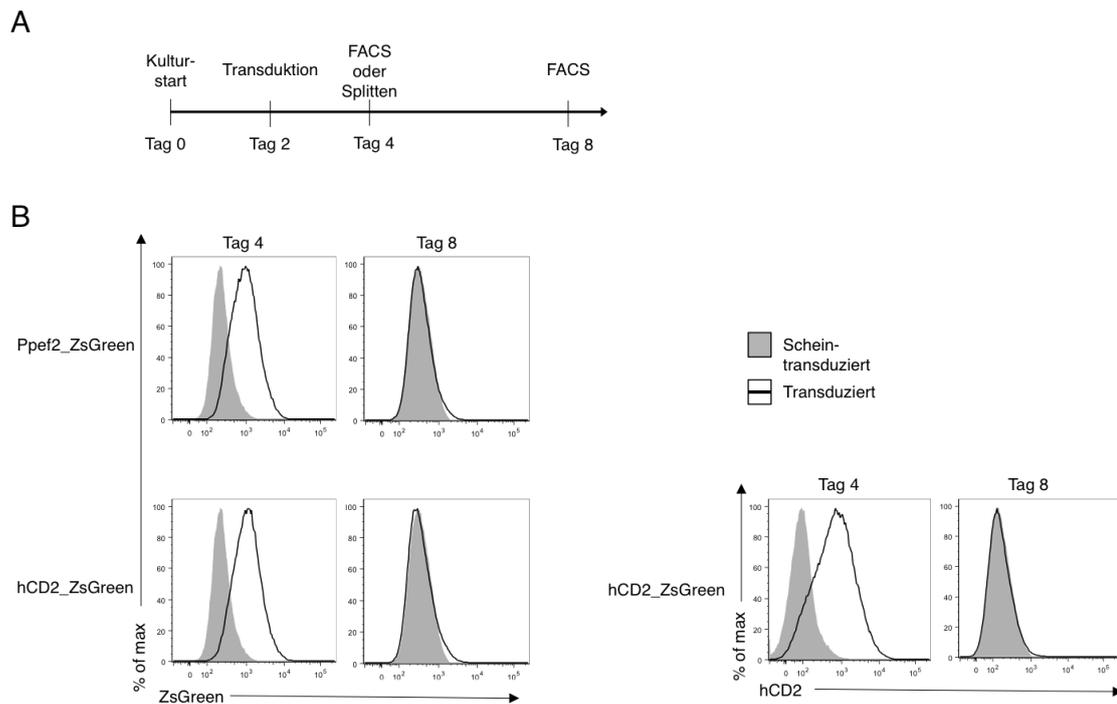


Abbildung 7 Sowohl das ZsGreen- als auch das hCD2-Signal sind transient

(A) Schematische Darstellung des verwendeten Transduktionsprotokolls: an Tag 2 der Zellkultur wurden die Zellen mit dem Ppef2_ZsGreen- oder mit dem hCD2_ZsGreen-Virus transduziert. Anschließend wurden die Zellen an Tag 4 entweder mittels Durchflusszytometrie analysiert oder, mit frischem Medium versehen, ausgesät. In diesem Fall erfolgte die FACS-Analyse an Tag 8. (n=1) (B) Histogramme aller lebenden, transduzierten Zellen. Diese wurden durchflusszytometrisch analysiert, um ihre ZsGreen-Expression, im Falle der Kontrolle auch die hCD2-Expression, an Tag 4 und 8 der Zellkultur darzustellen. Zur Transduktion wurde eine Virusmenge verwendet, die einer 1:5 Verdünnung entsprach. Zum Vergleich wurden Schein-transduzierte Zellen herangezogen.

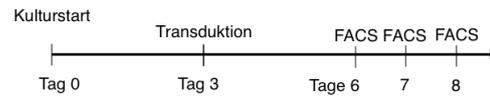
4.2.2 Erprobung einer Transduktion an Tag 3 und FACS-Analysen an Tag 6, 7 und 8

Um weiter nach einem geeigneten Transduktionsprotokoll zu suchen, wurden in einer darauffolgenden Versuchsreihe erneut BMDCs in Kultur genommen. Ziel war es, einerseits herauszufinden, mit welchem Abstand zur Transduktion das bestmögliche ZsGreen-Signal im FACS zu sehen ist und außerdem durch erste Analysen der Zellaktivierung einen Zeitpunkt auszumachen, an dem die Reifung im Vergleich zu unbehandelten Zellen noch nicht zu weit fortgeschritten ist. Um diesem Ziel näher zu kommen, wurden die Zellen an Tag 3 transduziert und dann an Tag 6, 7 und 8 mittels FACS untersucht (Abbildung 8A). Abbildung 8B zeigt, dass die ZsGreen-Expression sowohl mit Ppef2_ZsGreen als auch mit hCD2_ZsGreen mit zunehmendem Abstand zur Transduktion deutlich abnimmt. Es bestätigten sich die Ergebnisse der vorangegangenen Analyse, dass ein zu großer Abstand

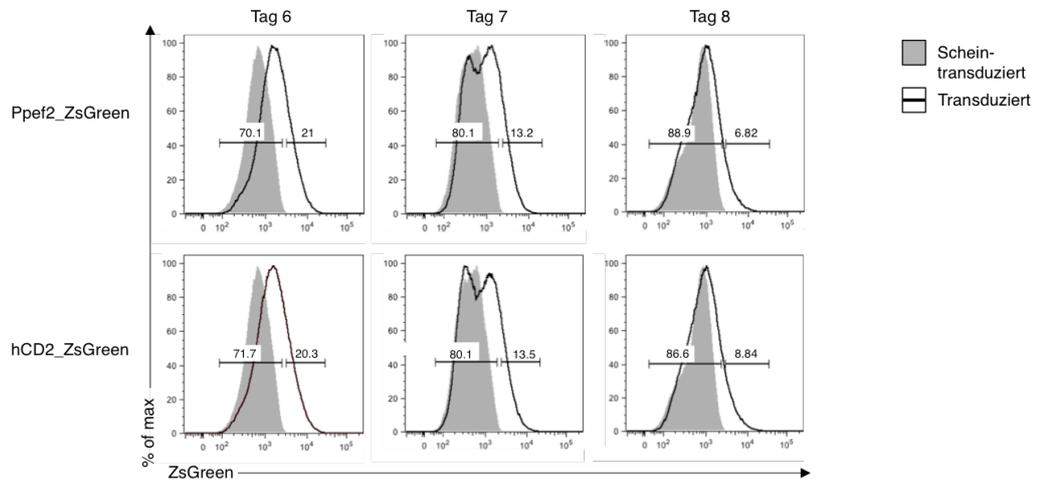
zwischen Transduktion und FACS-Analyse hinderlich für die geplanten Versuche ist, da keine ZsGreen exprimierenden Zellen mehr zur Verfügung stehen.

Außerdem konnten erste Erkenntnisse zur Reifung der Zellen gewonnen werden (Abbildung 8C). Untersucht wurden die Zellen auf ihre Expression von MHCII und CD86, beides Reifungsmarker in dendritischen Zellen (Wilson *et al.*, 2004). Es fiel auf, dass ein deutlich größerer Anteil der transduzierten Zellen gereift, sprich MCHII^{hi}- und CD86^{hi}, war, als bei den unbehandelten Zellen. Dabei kam es nicht darauf an, mit welchem Virus die Transduktion durchgeführt wurde: Sowohl Ppef2_ZsGreen als auch hCD2_ZsGreen führten zu einer ähnlich erhöhten Aktivierung. Dies zeigte sich allerdings nur so deutlich bei der FACS-Analyse an Tag 6 (18,3% reife Zellen mit Ppef2_ZsGreen und 15,8% mit hCD2_ZsGreen im Vergleich zu 7,4% reife Zellen der unbehandelten Zellen) und 8 (23% reife Zellen mit Ppef2_ZsGreen und 21,7% mit hCD2_ZsGreen im Vergleich zu 2,9% reife Zellen der unbehandelten Zellen). An Tag 7 zeigten die transduzierten Zellen ähnliche Reifungssignale wie die unbehandelten (5,7% reife Zellen mit Ppef2_ZsGreen und 4,7% mit hCD2_ZsGreen im Vergleich zu 4,9% reife Zellen der unbehandelten Zellen). Diese Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass die Transduktion mit den hier verwendeten Lentiviren einen aktivierenden Einfluss auf den Reifungsprozess der BMDCs genommen hat, der unabhängig von der Ppef2-Expression der Zellen war. Außerdem ließen die unterschiedlichen Ergebnisse an unterschiedlichen Tagen die Überlegung aufkommen, dass der Zeitpunkt der Transduktion für den Reifungsprozess der BMDCs eine Rolle spielen könnte.

A



B



C

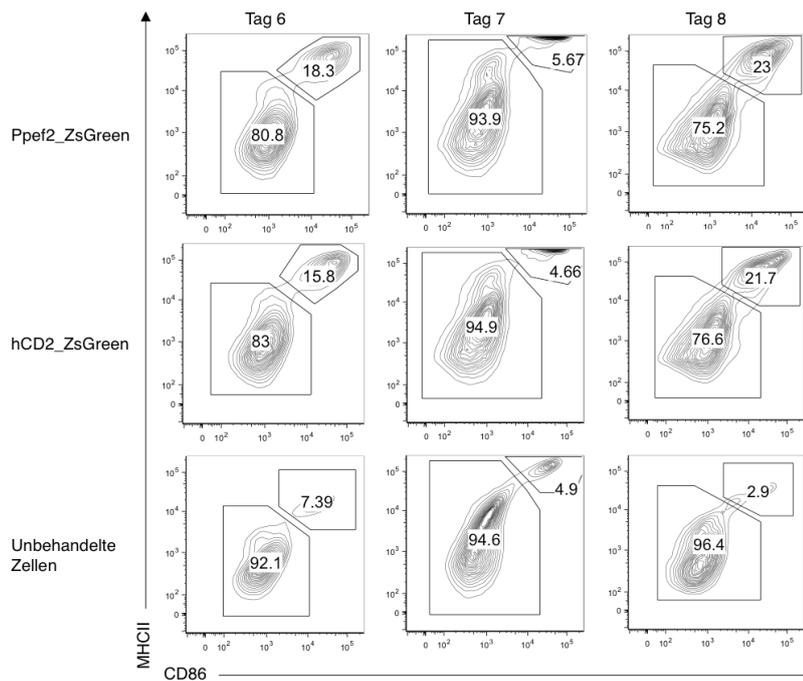


Abbildung 8 ZsGreen-Signal und Reifung von BMDCs an verschiedenen Tagen nach der Transduktion mit den beiden Lentiviren

(A) Schematische Darstellung des verwendeten Transduktionsprotokolls: an Tag 3 der Zellkultur wurden die Zellen mit dem Ppef_ZsGreen- oder mit dem hCD2_ZsGreen-Virus transduziert. Anschließend wurden die Zellen an Tag 6, 7 und 8 mittels Durchflusszytometrie analysiert. Zur Transduktion wurde bei diesem Versuch eine Virusmenge verwendet, die dem $\text{MOI}=15$ entsprach (*multiplicity of infection*, Multiplizität der Infektion). (B) Histogramme der transduzierten BMDCs (CD11c^+). Diese wurden durchflusszytometrisch analysiert, um ihre ZsGreen-Expression an Tag 6, 7 und 8 der Zellkultur darzustellen. Zum Vergleich wurden zum Schein transduzierte Zellen herangezogen. (C) Konturendiagramme der durchflusszytometrischen Reifungsanalysen der transduzierten BMDCs (CD11c^+) an Tag 6, 7

und 8. MHCII^{hi} und CD86^{hi} Zellen (rechts oben) werden als aktivierte Zellen angesehen, MCH^{lo} und CD86^{lo} (links unten) dagegen als nicht aktivierte Zellen. Zum Vergleich wurden unbehandelte Zellen herangezogen. (n=1)

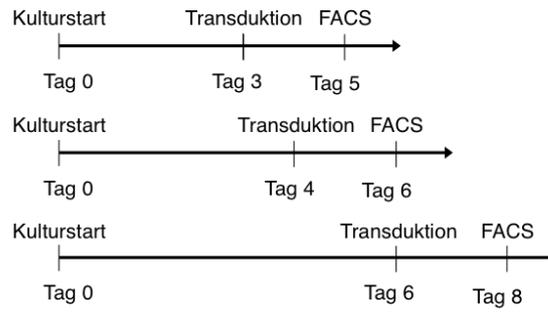
4.2.3 Erprobung einer Transduktion an Tag 3, 4 und 6 und anschließenden FACS-Analysen jeweils zwei Tage danach

Um endgültig ein geeignetes Transduktionsprotokoll zu finden, wurde abschließend eine weitere Vorgehensweise getestet. Da die Vermutung bestand, dass der Zeitpunkt der Transduktion eine Rolle für die Aktivierung der transduzierten Zellen spielt, wurde nun die Transduktion an Tag 3, 4 und 6 der BMDC-Zellkultur durchgeführt (Abbildung 9A). Weil sich gezeigt hatte, dass ein zu großer Abstand zwischen Transduktion und FACS-Analyse zu einer für die durchflusszytometrische Detektion zu niedrigen ZsGreen-Expression führte, wurde ein Abstand von zwei Tagen zwischen Transduktion und Analyse festgelegt. Dieser Abstand schien nach den vorangegangenen Versuchen gut geeignet. Genau wie bereits im Vorfeld, konnte auch in diesem Versuchsansatz eine deutliche Expression von ZsGreen und hCD2 nachgewiesen werden (Abbildung 9B). Dieses Konturendiagramm zeigte, dass mit Ppef2_ZsGreen transduzierte Zellen zum Großteil (Mittelwert aller drei Tage $75,3 \pm 11,3$ %) ZsGreen und mit hCD2_ZsGreen transduzierte Zellen in ähnlichem Maße (Mittelwert aller drei Tage $70,4 \pm 13,1$ %) ZsGreen und hCD2 gleichzeitig exprimieren. Im Vergleich dazu wurden untransduzierte Zellen untersucht.

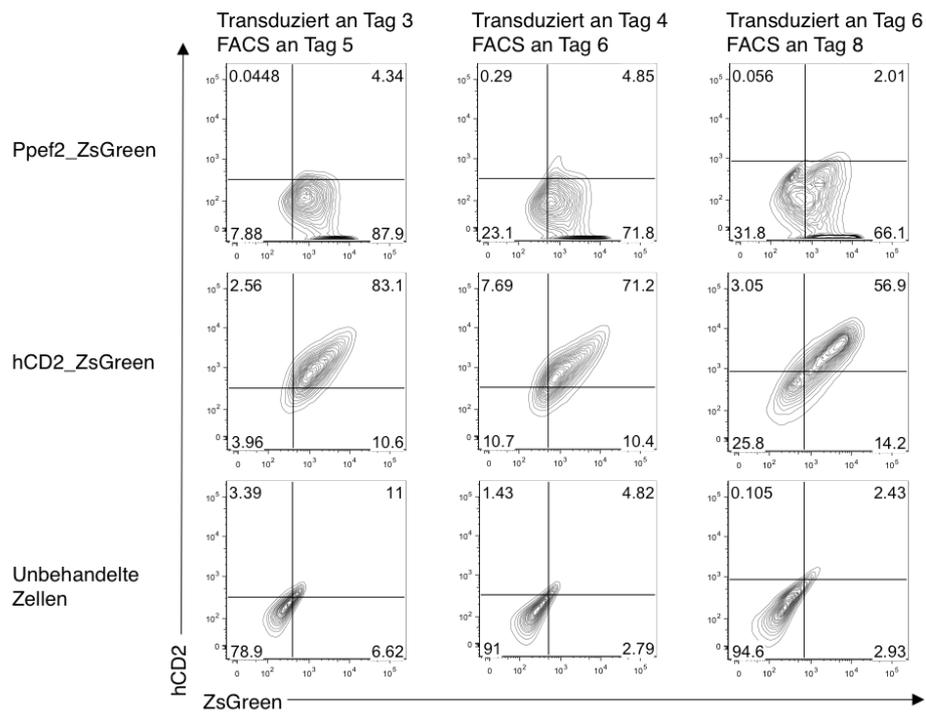
Da erneut eine mehr als ausreichende Expression des Reportergens ZsGreen erreicht wurde, konnte der Abstand von 2 Tagen zwischen Transduktion und FACS abschließend beibehalten werden.

Bei ersten Analysen der Reifung wurden alle CD11c⁺ Zellen untersucht und nicht zwischen ZsGreen⁺ und ZsGreen⁻ unterschieden. Hierbei wurde wieder ein Vergleich mit untransduzierten Zellen herangezogen (Abbildung 9C). Es zeigte sich erneut deutlich, dass transduzierte Zellen, unabhängig davon, mit welchem lentiviralen Konstrukt sie transduziert wurden, stärker aktiviert wurden als unbehandelte Zellen. Dabei unterschied sich an den jeweiligen Tagen der Anteil der gereiften Zellen zwischen den beiden verwendeten Konstrukten kaum. Allerdings gab es deutliche Unterschiede dieses Anteils an den

A



B



C

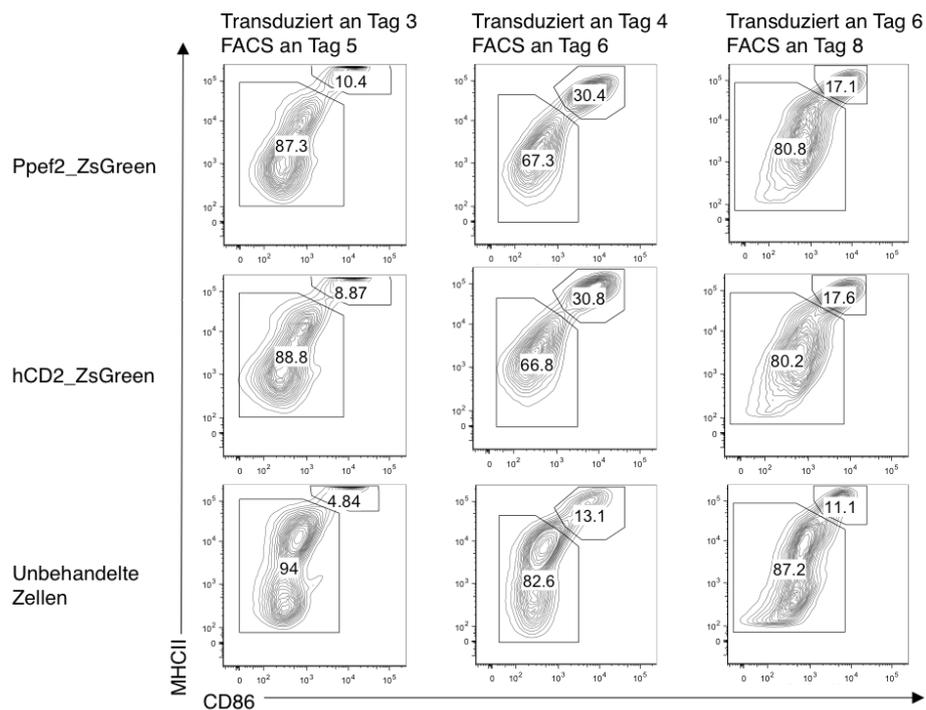


Abbildung 9 ZsGreen-Signal und Reifung von BMDCs nach Transduktion mit den beiden Lentiviren an verschiedenen Tagen und FACS-Analyse zwei Tage danach

(A) Schematische Darstellung der verwendeten Transduktionsprotokolle: die Zellen wurden entweder an Tag 3, Tag 4 oder Tag 6 der Zellkultur mit dem Ppef_ZsGreen- oder mit dem hCD2_ZsGreen-Virus transduziert. Anschließend wurden die Zellen je zwei Tage später (an Tag 5, 6 und 8) mittels Durchflusszytometrie untersucht. Zur Transduktion wurde eine Virusmenge verwendet, die einem MOI von 15 entsprach. (n=1) (B) Konturendiagramme der transduzierten BMDCs (CD11c⁺). Diese wurden durchflusszytometrisch untersucht, um ihre ZsGreen- und hCD2-Expression zwei Tage nach der jeweiligen Transduktion an Tag 3, 4 und 6 der Zellkultur darzustellen. Zum Vergleich wurden unbehandelte Zellen herangezogen. (C) Reifungssignale der transduzierten BMDCs im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Für die Analyse der Reifungssignale wurden erneut nur CD11c⁺, sprich dendritische Zellen, untersucht.

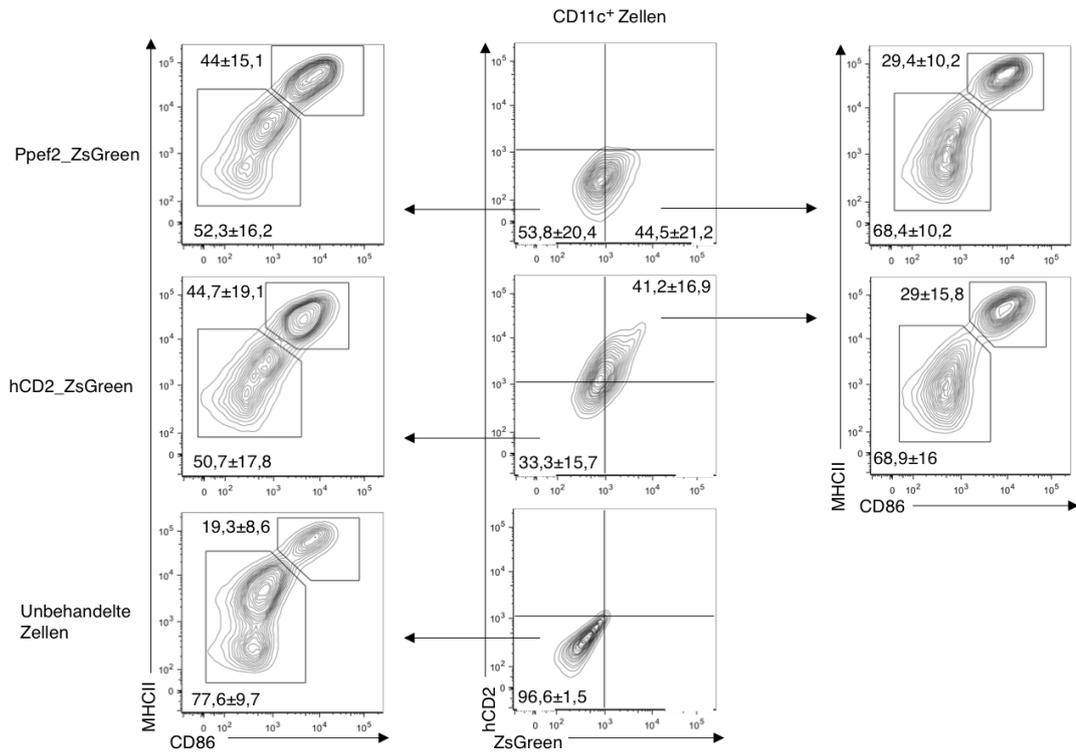
verschiedenen Tagen. Der Anteil der gereiften Zellen war besonders groß, wenn die Transduktion an Tag 4 und die FACS-Analyse an Tag 6 stattfand. Hier lagen 30,4% (Ppef2_ZsGreen) bzw. 30,8% (hCD2_ZsGreen) MHCII^{hi} und CD86^{hi}-Zellen vor im Vergleich zu 13,1% bei untransduzierten Zellen. Im Unterschied dazu lagen bei Transduktion an Tag 3 und FACS-Analyse an Tag 5 deutlich weniger gereifte Zellen vor (10,4% (Ppef2_ZsGreen) bzw. 8,9% (hCD2_ZsGreen) MHCII^{hi} und CD86^{hi}-Zellen im Vergleich zu 4,8% bei untransduzierten Zellen). Bei Transduktion an Tag 6 und FACS-Analyse an Tag 8 waren zwar mehr gereifte Zellen vorhanden als bei der Transduktion an Tag 3, aber dennoch noch deutlich weniger als bei Transduktion an Tag 4 (17,1% (Ppef2_ZsGreen) bzw. 17,6% (hCD2_ZsGreen) MHCII^{hi} und CD86^{hi}-Zellen im Vergleich zu 11,1% bei untransduzierten Zellen). Außerdem war bei Transduktion an Tag 6 und Analyse an Tag 8 der Unterschied zwischen transduzierten Zellen und unbehandelten Zellen am kleinsten. Aus diesem Grund fiel die Wahl für weitere Reifungsanalysen auf dieses Protokoll. Es ermöglichte ein gutes Fluoreszenzsignal im FACS und gleichzeitig bestand die Hoffnung, dass Reifungsanalysen bei Verwendung dieses Protokolls gut möglich sein würden, da der Unterschied zwischen transduzierten und untransduzierten Zellen nicht zu groß schien.

4.3 Untersuchung des Aktivierungsverhaltens von transduzierten Zellen mit und ohne LPS-Stimulation

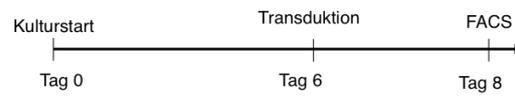
Nachdem ein geeignetes Protokoll gefunden war, das eine Virustransduktion an Tag 6 der Zellkultur und eine FACS-Analyse an Tag 8 vorsah, konnten die BMDCs auf ihr Reifungs- und Aktivierungsverhalten hin untersucht werden. In Abbildung 10A sieht man das Aktivierungsverhalten der Zellen, die gemäß Abbildung 10B der Transduktion unterzogen

wurden. Zellen, die eine Fluoreszenz aufweisen und demnach Ppof2 bzw. hCD2 ebenfalls

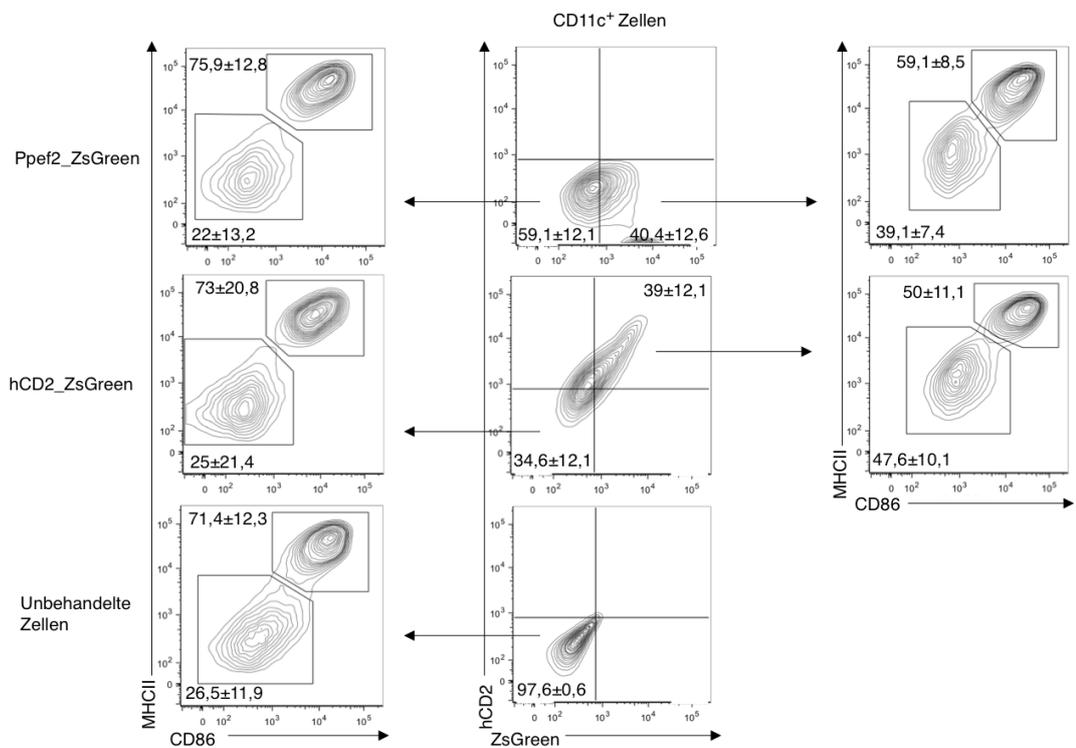
A



B



C



D

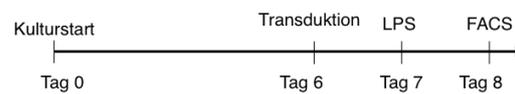


Abbildung 10 Reifung von BMDCs nach Transduktion mit den beiden lentiviralen Konstrukten mit und ohne LPS-Stimulation

(A) Reifungssignale der transduzierten (ZsGreen und/oder hCD2 positiv) BMDCs im Vergleich zu untransduzierten (ZsGreen und hCD2 negativ) und zu unbehandelten Zellen. Für die Analyse der Reportgenexpression und der Reifungssignale wurden nur CD11c⁺, sprich dendritische Zellen, untersucht. Dargestellt sind hier repräsentative Konturendiagramme, inklusive Mittelwert und Standardabweichung, aus 4 unabhängigen Experimenten (n=4). (B) Schematische Darstellung des unter (A) verwendeten Transduktionsprotokolls: die Zellen wurden an Tag 6 der Zellkultur mit dem Ppef_ZsGreen- oder mit dem hCD2_ZsGreen-Virus transduziert. Anschließend wurden die Zellen zwei Tage später an Tag 8 mittels Durchflusszytometrie untersucht. (C) Reifungssignale der transduzierten (ZsGreen und/oder hCD2 positiv) BMDCs im Vergleich zu untransduzierten (ZsGreen und hCD2 negativ) und zu unbehandelten Zellen nach LPS Stimulation. Für die Analyse der Reportgenexpression und der Reifungssignale wurden nur CD11c⁺, sprich dendritische Zellen, untersucht. Dargestellt sind hier repräsentative Konturendiagramme, inklusive Mittelwert und Standardabweichung, aus 4 unabhängigen Experimenten (n=4). (D) Schematische Darstellung des unter (C) verwendeten Transduktionsprotokolls: die Zellen wurden an Tag 6 der Zellkultur mit dem Ppef_ZsGreen- oder mit dem hCD2_ZsGreen-Virus transduziert. Einen Tag später, an Tag 7, wurden die Zellen mit LPS stimuliert. Anschließend wurden die Zellen an Tag 8 mittels Durchflusszytometrie untersucht.

exprimieren sollten, sind im Vergleich zu Zellen, die keine Fluoreszenz aufweisen, dargestellt. Es ist davon auszugehen, dass bei diesen Zellen die Transduktion nicht erfolgreich war und diese demnach weder Ppef2, noch hCD2 oder ZsGreen exprimieren. Zusätzlich wurden auch unbehandelte Zellen untersucht. Erneut ließ sich festhalten, dass Zellen, die mit Virus in Kontakt gekommen waren, stärker aktiviert waren als unbehandelte Zellen (ein Anteil von $19,3 \pm 8,6\%$ MHCII^{hi} und CD86^{hi}-Zellen im Fall der unbehandelten Zellen) und dass es keinen nennenswerten Unterschied zwischen Ppef2_ZsGreen-transduzierten und hCD2_ZsGreen-transduzierten Zellen gab. Dies galt sowohl für Zellen mit Fluoreszenzsignal ($29,4 \pm 10,2\%$ (Ppef2_ZsGreen) bzw. $29,0 \pm 15,8\%$ (hCD2_ZsGreen) MHCII^{hi} und CD86^{hi}-Zellen) als auch für jene, bei denen die Transduktion nicht erfolgreich war und die keine Reportergenexpression aufwiesen ($44,0 \pm 15,1\%$ (Ppef2_ZsGreen) bzw. $44,7 \pm 19,1\%$ (hCD2_ZsGreen) MHCII^{hi} und CD86^{hi}-Zellen). Es fällt zusätzlich auf, dass der Anteil an aktivierten Zellen bei den Zellen mit Fluoreszenzsignal sogar kleiner war als bei den Zellen, bei denen die Transduktion nicht gelang.

Wie Abbildung 10C zeigt, wurde außerdem das Verhalten der transduzierten Zellen nach Stimulation mit LPS untersucht. Hierfür wurden die Zellen einen Tag nach der Transduktion, sprich an Tag 7, mit LPS stimuliert. Wie auch bei den unstimulierten Zellen wurden anschließend die Aktivierungsanalysen an Tag 8 durchgeführt (Abbildung 10D). Diese Untersuchung ergab mehrere Erkenntnisse. Einerseits war auch in diesem Fall kein signifikanter Unterschied zwischen den lentiviral transduzierten Zellen auszumachen. Das heißt, der Anteil an aktivierten BMDCs war sehr ähnlich, unabhängig davon, ob sie Ppef2

überexprimierten oder nicht ($59,1 \pm 8,5\%$ (Ppef2_ZsGreen) bzw. $50,0 \pm 11,1\%$ (hCD2_ZsGreen) MHCII^{hi} und CD86^{hi}-Zellen). Andererseits war erneut auffällig, dass die Zellen, die zwar Teil der transduzierten Zellkultur waren, aber kein Fluoreszenzsignal aufwiesen, deutlich stärker aktiviert waren bzw. einen deutlich größeren Anteil an aktivierten Zellen zeigten ($75,9 \pm 12,8\%$ (Ppef2_ZsGreen) bzw. $73,0 \pm 20,8\%$ (hCD2_ZsGreen) MHCII^{hi} und CD86^{hi}-Zellen). Dieser Anteil entsprach ungefähr dem Anteil an aktivierten Zellen, den die unbehandelten Zellen aufwiesen ($71,4 \pm 12,3\%$ MHCII^{hi} und CD86^{hi}-Zellen). Das heißt, anders als bei den unstimulierten Zellen war nach LPS-Stimulation der Anteil an aktivierten Zellen bei den unbehandelten und nicht erfolgreich transduzierten Zellen größer als bei den erfolgreich lentiviral transduzierten Zellen.

Zusammengefasst ergaben die ersten Aktivierungsanalysen, die dank der erfolgreichen Suche nach einem geeigneten lentiviralen Überexpressionskonstrukt und der Etablierung eines funktionierenden Transduktionsprotokolls möglich waren, folgende Ergebnisse: Erfolgreich transduzierte Zellen weisen einen höheren Anteil an aktivierten Zellen auf als unbehandelte Zellen. Diese Aktivierung scheint unabhängig von der Ppef2-Expression zu sein. Außerdem ließ sich eine noch stärker erhöhte Aktivierungsanzahl bei den Zellen feststellen, die zwar Teil des Transduktionsvorgangs waren, aber die dennoch nicht das Reporter gen und somit höchst wahrscheinlich auch nicht Ppef2 exprimierten, sprich untransduzierte Zellen darstellten. Waren die Zellen einer Stimulation mit LPS ausgesetzt, ließ sich weiterhin kein Unterschied feststellen, der auf eine unterschiedliche Ppef2-Expression zurückzuführen gewesen wäre. Allerdings fiel hier auf, dass unbehandelte und untransduzierte Zellen mehr aktivierte Zellen aufwiesen als die erfolgreich transduzierten Zellen.

5 Diskussion

Über die Rolle von Ppef2 in dendritischen Zellen ist derzeit noch wenig bekannt. Um der Frage nachzugehen, welche Auswirkungen eine Überexpression von Ppef2 auf dendritische Zellen haben würde, wurden in dieser Arbeit lentivirale Überexpressionskonstrukte und verschiedene Transduktionsprotokolle getestet. Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression prinzipiell möglich ist und hohe Ppef2-Expressionslevel erreicht werden können. Da Hinweise vorlagen, dass Ppef2 eine Rolle für Reifung und Aktivierung von dendritischen Zellen spielt, wurden in dieser Arbeit zusätzlich erste Reifungsanalysen der Ppef2 überexprimierenden BMDCs durchgeführt (Edelmann *et al.*, 2011).

5.1 Für die Transduktion von BMDCs eignet sich vor allem das lentivirale Konstrukt CMV-Ppef2-IRES-ZsGreen

Am Beginn dieser Arbeit stand die Suche nach einem geeigneten Konstrukt zur lentiviralen Überexpression von Ppef2. Hierbei fiel auf, dass alle getesteten Konstrukte eine Expression der Reportergene bei gleichzeitiger Überexpression von Ppef2 in NIH3T3-Zellen herbeiführten. Dies war allerdings nicht der Fall bei der Transduktion von BMDCs mit den gleichen Viruskonstrukten. Hier konnte lediglich eine Reportergenexpression durch CMV-dsRed-UBC-eGFP und CMV-Ppef2-IRES-ZsGreen/Ppef2_ZsGreen erreicht werden. Die qPCR-Daten, die eine Überexpression von Ppef2 in NIH3T3-Zellen belegten, zeigten eine höhere Expression im Fall von CMV-Ppef2-UBC-eGFP (18,9-fach) und CMV-Ppef2-IRES-eGFP (17,4-fach) als im Fall von CMV-Ppef2-IRES-ZsGreen/Ppef2_ZsGreen (11,8-fach). Auffällig ist hierbei, dass die beiden Konstrukte, die in BMDCs nur eine marginale Reportergenexpression zeigten, eine höhere Ppef2-Überexpression aufweisen. Eine mögliche Erklärung könnte demnach sein, dass eine zu hohe Expression von Ppef2 letal für BMDCs ist. NIH3T3-Zellen exprimieren Ppef2 im Vergleich zu anderen Zellen wenig bis überhaupt nicht und eine Funktion von Ppef2 ist für NIH3T3-Zellen derzeit nicht bekannt (Santos *et al.*, 2015). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass sein Vorkommen keine Relevanz für die Zelle und demnach auch keinen negativen Einfluss auf ihr Überleben hat.

Diverse Studien legen nahe, dass Ppef2 eine wichtige anti-apoptotische Rolle spielt (Kutuzov *et al.*, 2010). Dennoch ist für Zellen im Allgemeinen eine ausbalancierte Genexpression wichtig (Prelich, 2012). Da die genaue Funktion von Ppef2 in dendritischen

Zellen noch nicht bekannt ist, könnte es durchaus sein, dass eine zu hohe Expression in BMDCs diese Balance aus dem Gleichgewicht bringt und trotz seiner ursprünglichen anti-apoptotischen Wirkung letztendlich zum Zelltod führt.

Eine weitere mögliche Erklärung für das schlechtere Abschneiden der Viruskonstrukte in BMDCs könnte in ihrer Empfindlichkeit gegenüber der Transduktion liegen. Wie unter 5.3 diskutiert, weisen Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass BMDCs sehr empfindlich auf die Virustransduktion reagieren und, unabhängig davon mit welchem Virus sie transduziert wurden, ausreifen. Zum Zeitpunkt der durchflusszytometrischen Untersuchung waren vielleicht keine lebenden Zellen mehr vorhanden, die eine Reporterexpression hätten aufweisen können. Studien weisen darauf hin, dass DCs *in vitro* nach Aktivierung bis zu drei Tage überleben (Nayar *et al.*, 2015). Der gewählte Abstand von vier Tagen war demnach möglicherweise zu lang (siehe hierfür auch 5.2). Dass die Konstrukte CMV-dsRed-UBC-GFP und CMV-Ppef2-IRES-ZsGreen/Ppef2_ZsGreen dennoch Signale im FACS zeigten, stellt diese Überlegung allerdings in Frage.

Weitere Gründe, die erklären könnten, warum in BMDCs nur CMV-dsRed-UBC-GFP und CMV-Ppef2-IRES-ZsGreen/Ppef2_ZsGreen eine deutliche Reporterexpression bewirkten, könnten im Aufbau der verschiedenen Konstrukte zu finden sein. Die verschiedenen Ppef2-Überexpressionskonstrukte weisen zwei wesentliche Unterschiede auf. Einer liegt darin, dass zur Koexpression von Ppef2 und dem Reporter gen entweder zwei unterschiedliche Promoterfragmente verwendet wurden oder hierfür eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) diente. Der zweite Unterschied bestand in der Verwendung zwei verschiedener fluoreszierender Reporterproteine, nämlich eGFP oder ZsGreen. In der Entwicklung der lentiviralen Koexpression zweier Gene mittels eines einzigen Vektors zeigte sich bei der Verwendung von IRES, dass das stromabwärts liegende Gen (IRES-abhängig) häufig deutlich niedrigere Expressionslevel aufwies als das stromaufwärts liegende Gen. In manchen Fällen konnte es sogar überhaupt nicht detektiert werden. Gleichzeitig konnte mehrfach gezeigt werden, dass die Verwendung zweier unabhängiger Promotoren in einer Vielzahl verschiedener Zellen eine deutlich stabilere Koexpression ermöglichte, wenn auch teilweise eine etwas geringere Transgen-Expression beobachtet werden konnte (Chiarella *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2003). Dies könnte erklären, warum das Konstrukt CMV-Ppef2-IRES-eGFP nur eine leichte Reporterexpression ermöglichte. Dass ZsGreen, wie in mehreren Studien gezeigt werden konnte, in verschiedenen Zellen eine höhere Fluoreszenz aufweist als eGFP, könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, dass CMV-Ppef2-IRES-ZsGreen trotz des sehr ähnlichen Aufbaus dennoch eine ZsGreen-Expression im FACS aufwies (Hasegawa *et al.*, 2009; Nakamura *et*

al., 2013). Nach den Erkenntnissen von Qin *et al.* im Jahr 2010 ermöglicht der CMV-Promoter, trotz seiner variablen Genexpression in verschiedenen Zelltypen, generell eine höhere Genexpression als der UBC-Promoter. Mit diesem Wissen könnte sich erklären lassen, warum CMV-Ppof2-UBC-eGFP ein kaum detektierbares eGFP-Signal im FACS zeigte. Widersprüchlich ist hierbei allerdings, dass in der Kontrolle CMV-dsRed-UBC-eGFP sehr wohl ein deutliches eGFP-Signal sichtbar war, sich aber kein dsRed-Signal darstellen ließ. In Zusammenschau all dieser Überlegungen ist nach momentanem Kenntnisstand wohl die Erklärung, dass eine zu hohe Ppof2-Expression letal für BMDCs sein könnte, die wahrscheinlichste: Sowohl die Kontrolle, die kein Ppof2 exprimiert, als auch das Konstrukt, das die niedrigste Ppof2-Expression aufwies, konnten ein Fluoreszenzsignal aufweisen. Aus diesem Grund fiel die Wahl auf CMV-Ppof2-IRES-ZsGreen als lentiviraler Überexpressionsvektor und wird ab hier wieder Ppof2_ZsGreen genannt.

Um Ppof2_ZsGreen für die weiteren Versuche verwenden zu können, musste der Beweis erbracht werden, dass die transduzierten BMDCs nicht nur ZsGreen exprimierten, sondern auch Ppof2. Hierfür wurden eine qPCR und ein Western Blot durchgeführt. Abbildung 6 fasst die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammen: In der qPCR ergab sich eine deutliche Überexpression von Ppof2 in Ppof2_ZsGreen-transduzierten relativ zu hCD2_ZsGreen-transduzierten BMDCs. Im Western Blot zeigte sich eine Ppof2-Expression ebenfalls nur in Ppof2_ZsGreen-transduzierten BMDCs. Diese Ergebnisse lieferten den Beweis, dass Ppof2_ZsGreen im geplanten Sinne funktioniert und von einer Ppof2-Überexpression sowohl auf transkriptioneller als auch auf Protein-Ebene ausgegangen werden kann.

5.2 Die Transgenexpression nimmt mit zunehmendem Abstand zur Transduktion ab

Nachdem die Suche nach einem geeigneten Überexpressionskonstrukt erfolgreich und die dazugehörige Kontrolle hCD2_ZsGreen generiert war, musste ein geeignetes Transduktionsprotokoll gefunden werden. Bei der Erprobung einer Transduktion an Tag 2 und darauffolgender durchflusszytometrischer Untersuchung an Tag 4 und 8 der Zellkultur fiel auf, dass die ZsGreen- und auch die hCD2-Expression an Tag 8 drastisch abgenommen hatte. Im FACS an Tag 4 war noch ein deutlicher Unterschied bezüglich der Reporterexpression zwischen lentiviral und zum Schein transduzierten Zellen darstellbar. Für die Tatsache, dass die Genexpression mit der Zeit nachlässt - eine

Beobachtung, die auch Dullaers *et al.* 2004 machten - gibt es mehrere mögliche Erklärungen.

Es gibt Hinweise dafür, dass bei der Nutzung des CMV-Promoters in adenoviralen Vektoren transkriptionelles *Silencing* (transkriptionelle Stilllegung) auftritt und zu einer deutlich verminderten Transgen-Expression führt. Dies scheint auf Methylierung u.a. der CpG-Stellen in der Promotersequenz zu beruhen (Brooks *et al.*, 2004; Teschendorf *et al.*, 2002). Sollte ein ähnlicher Mechanismus bei der Verwendung von lentiviralen Vektoren auftreten, könnte dies das abnehmende Reporter-gen-Signal erklären.

Außerdem könnte es sein, dass die Zellen nach der Transduktion nur für einen kurzen Zeitraum überleben. Da auch die hCD2_ZsGreen-transduzierten Zellen ein stark vermindertes ZsGreen- und hCD2-Signal zeigten, wäre anzunehmen, dass dieses verkürzte Überleben unabhängig von der Ppof2-Expression ist. Die sich später anschließenden Reifungsanalysen legen nahe, dass Zellen durch den Transduktionsprozess verstärkt aktiviert werden. Nach ihrer Aktivierung, z.B. durch LPS, unterliegen dendritische Zellen in der Regel innerhalb Stunden bis Tagen der Apoptose (Schwiebs *et al.*, 2016; Zanoni *et al.*, 2009). Dies ist unter anderem wichtig, da ihr Akkumulieren die periphere Toleranzregulation stören und zu Autoimmunität führen kann (Chen *et al.*, 2006). Es könnte also sein, dass durch die Transduktion aktivierte Zellen vollständig ausreifen und anschließend nicht 6 weitere Tage leben. Da ohne überlebende transduzierte Zellen auch keine Reporter-gen-expression mehr vorliegt, ließe sich damit das fehlende Signal im FACS erklären. Wie von Kushwah *et al.* 2010 in einem Review zusammengefasst, gibt es viele Wege, die zur Apoptose von dendritischen Zellen führen können. Es können z.B. auch extrinsische Faktoren wie Infektionen durch Bakterien oder Viren die Apoptose auslösen. Das mangelnde ZsGreen-Signal an Tag 8 könnte also auch durch Apoptose zustande kommen, die nicht durch vorangegangene Aktivierung ausgelöst wurde. Da die FACS-Daten relative Verhältnisse zeigen, wäre eine mögliche Erklärung auch, dass die transduzierten Zellen zwar nicht sterben, aber dennoch einen entscheidenden Nachteil gegenüber untransduzierten Zellen aufweisen. Dieser könnte zu einem „Überwachsen“ der transduzierten durch untransduzierte Zellen führen.

Das Verschwinden des ZsGreen-Signals könnte auch mit dem Phänomen der Pseudotransduktion zusammenhängen. Mehrere Studien konnten mittlerweile in einer Vielzahl an Zelltypen zeigen, dass oft kurz nach der Transduktion die gewünschten Reporter-gene nachgewiesen werden, obwohl diese durch die lentivirale Transduktion nicht in das Genom der Wirtszelle integriert wurden (Liu *et al.*, 1996). Offensichtlich kann dies entweder durch ein Einschleusen der mRNA oder des tatsächlichen Proteins in die

Wirtszelle durch den Transduktionsvorgang auftreten (Galla *et al.*, 2004; Geering *et al.*, 2011; Haas *et al.*, 2000; Nash *et al.*, 2004). Sollte Pseudotransduktion der Grund für das abnehmende ZsGreen-Signal sein, könnte das Überexpressionskonstrukt eventuell trotzdem weiterhin verwendet werden. Galla *et al.* konnten 2004 wichtige Hinweise dafür aufzeigen, dass der Vorgang, den sie „*particle-mediated mRNA transfer*“ (durch (Virus-) Partikel vermittelter mRNA-Transfer) nannten, funktionierte, um rezeptorspezifisch bestimmte Proteinfunktionen in transduzierten Zellen vorübergehend zu ermöglichen. Die Daten von Geering *et al.* aus dem Jahr 2011 deuteten allerdings darauf hin, dass der Proteintransfer, der in ihrem Fall die Pseudotransduktion ausgelöst hatte, kein funktionierendes Protein lieferte. Dass Pseudotransduktion auch in dendritischen Zellen auftritt, zeigten Kim *et al.* im Jahr 2017. Ihre Daten werden unter 5.3 eingehender diskutiert. Ein abschließendes Urteil, welcher Mechanismus dem abnehmenden ZsGreen-Signal zu Grunde liegen könnte, war mit den vorliegenden Ergebnissen nicht möglich. Unter 5.6 wird in einem Ausblick eingehender diskutiert, wie man diese Frage abschließend klären könnte.

5.3 Die Transduktion provoziert eine Zellaktivierung, die unabhängig von Ppof2 ist

Den Reifungsanalysen, die anfangs auf der Suche nach einem geeigneten Transduktionsprotokoll durchgeführt wurden und - nachdem dieses gefunden war - der weiteren Analyse der BMDC-Reifung dienten, war allen ein Ergebnis gemeinsam: Die lentivirale Transduktion bewirkte eine Ppof2-unabhängige Aktivierung der BMDCs. Die Expression von CD86 und MHCII war in Ppof2_ZsGreen- und hCD2_ZsGreen-transduzierten Zellen in sehr ähnlichem Maße erhöht. Für die Ppof2-unabhängige Aktivierung der BMDCs könnten mehrere Gründe verantwortlich sein.

Eine Kontamination, z.B. durch mikrobielle Produkte, ist als unwahrscheinlich anzusehen, da sich die verstärkte Aktivierung nach Transduktion in verschiedenen Versuchsansätzen in allen Fällen zeigte.

Es ist bekannt, dass dendritische Zellen *in vitro* spontan ausreifen können (Vremec *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 2003). In der Literatur finden sich gehäuft Hinweise darauf, dass das Adhäsionsverhalten der BMDCs dafür verantwortlich sein könnte. In Kultur kommt es zwischen den Zellen, in Abhängigkeit des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin, zur Clusterbildung. Wird diese Zell-Zell-Adhäsion mechanisch unterbrochen, führt dies zur Ausreifung der BMDCs, der β -Catenin Signalweg scheint dabei eine Rolle zu spielen (Jiang

et al., 2007; Riedl *et al.*, 2000; Vander Lugt *et al.*, 2011). Diese Beobachtung begründet die Überlegung, dass Störungen der Adhäsion womöglich der Grund für die spontane Aktivierung *in vitro* sein könnte.

Vremec *et al.* beschäftigten sich im Jahr 2011 ebenfalls eingehend mit der Frage nach möglichen Auslösern der spontanen Ausreifung *in vitro*. Ihre Ergebnisse legen nahe, dass o.g. mechanische Störungen der Adhäsion der DCs untereinander oder mit der Oberfläche des Aufbewahrungsgefäßes nicht der Grund für die Ausreifung sind. Auch eine Aktivierung durch den Prozess der Isolierung der Zellen aus lymphatischen Organen konnten ihre Versuche nicht belegen. Mögliche inhibitorische Faktoren, die nur *in vivo* und nicht *in vitro* vorliegen, spielen laut Vremec *et al.* ebenfalls nur eine marginale Rolle. Vielmehr legen ihre Ergebnisse nahe, dass es bei hoher DC-Dichte durch Interaktionen zwischen DCs zu der spontanen Ausreifung kommt. Sie konnten zeigen, dass DCs in Kultur deutlich weniger kostimulatorische Faktoren exprimierten, wenn sie stark verdünnt kultiviert wurden und durch eingeschränkte Beweglichkeit an der typischen Clusterbildung gehindert wurden. Es stellte sich zusätzlich heraus, dass lösliche Faktoren, die im Kulturmedium bei hoher DC-Konzentration auftreten, stark verdünnte, unbewegliche DCs ebenfalls aktivieren konnten, wenn sie damit in Kontakt kamen. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass nicht die mechanische Adhäsionsstörung, sondern Selbstaktivierung durch lösliche Faktoren die spontane Ausreifung begründen.

Es gibt in der Literatur außerdem einige Hinweise dafür, dass BMDCs durch die Transduktion mit Lentiviren aktiviert werden können (Breckpot *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2008). Pichlmair *et al.* zeigten 2007, dass bei der Herstellung lentiviraler Vektoren als Nebenprodukt tubulovesikuläre Strukturen anfallen. Diese tragen u.a. jene DNS-Plasmide, die ursprünglich zur Vektorproduktion eingesetzt wurden. Bei der Transduktion von DCs lösen diese deren Aktivierung aus. Dies geschieht über TLR9 und Freisetzung von Typ-I-Interferon. Es zeigte sich außerdem, dass eine zusätzliche Stimulation mit LPS einen synergistischen Effekt für die Aktivierung der Zellen hat (Yang *et al.*, 2008). Darauf, dass an der Aktivierung der dendritischen Zellen auch andere Vektorkomponenten beteiligt sein können als virale Nukleinsäuren, deuten ebenfalls mehrere Studien mit lentivirus-ähnlichen Partikeln hin (Buonaguro *et al.*, 2006; Kuate *et al.*, 2006; Tsunetsugu-Yokota *et al.*, 2003). Kim *et al.* gingen 2017 der Frage nach, welcher Mechanismus der lentiviralen Aktivierung von BMDCs zugrunde liegt. Sie fanden heraus, dass der STING und cGAS-Signalweg dabei eine wichtige Rolle spielt. Er wird durch das Vorkommen von DNS im Zytoplasma, u.a. ein Hinweis auf virale Infektion, aktiviert und löst eine erhöhte Interferon β Produktion aus (Chen *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2013). Sehr wahrscheinlich wird dieser

Signalweg unter lentiviraler Transduktion von BMDCs durch zelluläre DNS aktiviert, die über Vektorpartikel in die Zelle eingeschleust werden. Sie stellten außerdem fest, dass die Fusion des Virus mit der Zelle Voraussetzung für eine Aktivierung ist. Sogar eine aktivierende Komponente der Fusion selbst, unabhängig vom STING und cGAS-Signalweg, scheint vorzuliegen. Kim *et al.* zeigten 2017 auch, dass die Aktivierung in ihrem Fall maßgeblich durch Pseudotransduktion ausgelöst wurde, blieb sie doch von Reverse Transkriptase-Inhibitoren und Vektoren, die unvollständiges Genom enthielten, unbeeinflusst.

5.4 Der Zeitpunkt der Transduktion scheint Einfluss auf das Aktivierungsverhalten von BMDCs zu haben

Auf der Suche nach einem geeigneten Transduktionsprotokoll zeigten sich noch weitere Auffälligkeiten. Es fiel auf, dass abhängig vom Abstand zur Transduktion unterschiedliche Anteile an gereiften Zellen im FACS detektiert werden konnten. Bei einer Transduktion an Tag 3 waren an Tag 6 und 8 mehr Zellen aktiviert als an Tag 7. Was ebenfalls auffiel, war, dass an Tag 7 auch der unter 5.3 beschriebene Unterschied zwischen transduzierten und untransduzierten Zellen nicht zu sehen war. Für diese unterschiedlichen Anteile an gereiften Zellen abhängig vom Abstand zur Transduktion scheint eine Erklärung wahrscheinlich, die mit der Aktivierung der Zellen zu tun hat. Unter 5.3 wurden verschiedene Erklärungen für die Aktivierung der BMDCs diskutiert. Es könnte sein, dass die Zellen während der Transduktion zur Ausreifung stimuliert werden. Ob dies durch den Kontakt mit den Lentiviren oder z.B. durch Störung des Adhäsionsverhaltens zustande kommt, muss hierbei noch geklärt werden. In jedem Fall könnte sich daraus das in den FACS-Analysen gezeigte Bild an unterschiedlichen Tagen ergeben. So könnten an Tag 7 viele der an Tag 6 bereits ausgereiften Zellen abgestorben sein. Hieraus ergibt sich dann ein Bild, das dem der unbehandelten Zellen ähnlich ist. Dass sich einen Tag später, an Tag 8, dann wieder ein anderer Zustand zeigt, ist interessant. Möglicherweise spielt hier dann eine transduktionsunabhängige Aktivierung eine Rolle, die zu diesem späteren Zeitpunkt der Zellkultur zum Tragen kommt (z.B. durch die unter 5.3 beschriebene Selbstaktivierung bei hoher DC-Konzentration (Vremec *et al.*, 2011)).

Bei weiteren Versuchen entstand der Verdacht, dass es einen Einfluss auf die Aktivierung der BMDCs haben könnte, zu welchem Zeitpunkt der Zellkultur die Transduktion stattfindet. Diese Vermutung basiert auf der Beobachtung, dass die Zellen, trotz gleichbleibendem Abstand zwischen Transduktion und FACS-Analyse (hier zwei Tage

Abstand), unterschiedliches Aktivierungsverhalten zeigen, wenn die Untersuchungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Zellkultur durchgeführt werden. Der größte Unterschied zwischen transduzierten und unbehandelten BMDCs zeigte sich, wenn die Transduktion an Tag 4 und die Analyse an Tag 6 stattfand. Hier traten im Vergleich zu den unbehandelten Zellen mehr als doppelt so viele aktivierte Zellen auf, wenn die BMDCs vorher der Transduktion unterzogen wurden. Erfolgte die Transduktion an Tag 3 und die Analyse an Tag 5 waren es ungefähr doppelt so viele, bei der Transduktion an Tag 6 und Analyse an Tag 8 waren es weniger als die Hälfte. Womöglich sind die Zellen zum Zeitpunkt der Transduktion an Tag 4 besonders für eine Aktivierung empfindlich und reifen demnach stärker aus als an anderen Tagen. Es finden sich in der Literatur zahlreiche Daten darüber, zu welchem Zeitpunkt der Zellkultur die Transduktion am erfolgreichsten ist. Zum Teil widersprechen sich diese Feststellungen. Dullaers *et al.* fassten diese 2006 in einem Review zusammen. Auch, dass dendritische Zellen in Kultur auf verschiedene Weisen aktiviert werden können, ist durch viele Daten belegt und unter 5.3 bereits eingehend diskutiert worden. Doch zu der Frage, ob die Zellen zu einem gewissen Zeitpunkt leichter zu aktivieren sind, finden sich derzeit keine verwertbaren Daten. Der Verdacht, dass die Zellen an Tag 4 besonders empfindlich auf die Transduktion reagieren könnten, bleibt somit vorerst ohne wissenschaftliche Belege.

5.5 Die Transduktion beeinflusst auch Reporter-gen-negative Zellen

Nachdem ein Transduktionsprotokoll gefunden war, schlossen sich erste Reifungsanalysen unter LPS-Stimulation an. Die dabei gemachten Beobachtungen, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll, beruhen erneut nicht auf einer erhöhten Ppof2-Expression durch Ppof2_ZsGreen-transduzierte Zellen. Denn wiederum zeigte sich bei allen Auffälligkeiten, dass zwischen Ppof_ZsGreen- und hCD2_ZsGreen-transduzierten Zellen keine nennenswerten Unterschiede vorlagen.

Die transduzierten Zellen wurden erstmalig differenzierter untersucht. Transduzierte Zellen, die im Anschluss ein ZsGreen-Signal bzw. ZsGreen- und hCD2-Signal zeigten, wurden mit jenen Zellen verglichen, die zwar der Transduktion unterzogen wurden, aber keine Reporter-genexpression aufwiesen. Sowohl für die unstimulierten als auch für die LPS-stimulierten Zellen zeigte sich, dass die Zellen stärker aktiviert waren, die Reporter-gen-negativ waren. Waren die Zellen keiner LPS-Stimulation unterzogen worden, zeigten die nicht erfolgreich transduzierten Zellen demnach eine noch höhere Aktivierung

als die erfolgreich transduzierten im Vergleich zu völlig unbehandelten Zellen. Dagegen galt nach der LPS-Stimulation für die Zellen, die Reporter-gen-negativ waren, dass sie einen ähnlich hohen Anteil an aktivierten Zellen aufwiesen wie vollständig unbehandelte BMDCs, die ebenfalls mit LPS stimuliert worden waren. Diese Beobachtungen werfen einige Fragen auf. Geht man davon aus, dass die Reporter-gen-negativen Zellen nicht erfolgreich transduziert wurden, liegt die Überlegung nahe, dass ein Mechanismus, der transduktionsunabhängig ist, die Aktivierung der BMDCs auslöst. Dies würde die unter 5.3 diskutierten Hinweise in der Literatur für eine spontane Ausreifung der Zellen unterstützen. Für transduzierte Zellen wäre dann die Feststellung zu machen, dass sie nach der erfolgreichen Transduktion weniger stark aktiviert werden können. Dies macht sich besonders im Falle der LPS-Stimulation bemerkbar. Hier lagen deutlich mehr aktivierte Zellen bei den vollständig unbehandelten und den nicht erfolgreich transduzierten BMDCs vor als bei den erfolgreich transduzierten Zellen. Vereinzelt finden sich Daten, die darauf hindeuten, dass dendritische Zellen nach lentiviraler Transduktion weniger stark aktiviert werden können. Allerdings wurden diese Daten nicht mit BMDCs, sondern mit dendritischen Zellen, die von Monozyten abgeleitet waren, ermittelt (Chen *et al.*, 2004).

Die Unterscheidung zwischen erfolgreich und nicht erfolgreich transduzierten BMDCs war ein wichtiger Schritt, da andere Schlussfolgerungen daraus hervorgehen als durch die vorangegangenen Reifungsanalysen angenommen. Hatte sich vorher die Vermutung gefestigt, dass transduzierte BMDCs stärker aktiviert werden, stellte sich heraus, dass gerade die nicht erfolgreich transduzierten diesen hohen Anteil an aktivierten Zellen bewirkten. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen waren die erfolgreich transduzierten Zellen nach LPS-Stimulation sogar weniger aktiviert. Sollte sich auch in weiteren Versuchen herausstellen, dass erfolgreich transduzierte Zellen weniger stark aktiviert werden können, stünde dies im Widerspruch zu den unter 5.3 zitierten Studien und bedürfte weiterer Untersuchungen. Um weitere Erkenntnisse zur Reifung und Aktivierung der BMDCs nach lentiviraler Transduktion zu erlangen und um herauszufinden, welche Rolle Ppof2 in diesem Kontext spielen könnte, sind weitere Untersuchungen dringend nötig. Im folgenden Ausblick soll darauf genauer eingegangen werden.

5.6 Ausblick

Obwohl sich in der vorliegenden Arbeit keine phänotypische Veränderung für die Ppof2-überexprimierenden Zellen zeigen ließ, bleibt die Rolle von Ppof2 in dendritischen Zellen weiterhin interessant. Wie unter 2.3 beschrieben mehrten sich die Hinweise auf eine anti-

apoptotische Wirkung von Ppof2 (Kutuzov *et al.*, 2010). Zwick *et al.* konnten 2019 in Ppof2-defizienten Mäusen neben erhöhter Apoptose dendritischer Zellen auch eine damit verbundene verminderte T-Zell-Antwort feststellen. Eine bedeutsame Rolle von Ppof2 für das Überleben und die Funktion von dendritischen Zellen ist demnach sehr wahrscheinlich. Damit bleibt das Interesse an einer erfolgreichen Überexpression von Ppof2, ohne dabei eine Aktivierung der transduzierten Zellen herbeizuführen, weiterhin bestehen. Der im Umkehrschluss zu den Daten von Zwick *et al.* entstehende Gedanke, dass eine dauerhafte Ppof2-Expression einen Schutz vor Apoptose darstellt, könnte auf diesem Wege näher untersucht werden. Es wäre denkbar, dass vor Apoptose geschützte dendritische Zellen vermehrt Autoimmunität auslösen. Auch um dies zu überprüfen wäre eine Ppof2-Überexpression ohne Nebeneffekte wichtig. Es stellt sich dennoch die Frage, ob die lentivirale Überexpression der richtige Weg hierfür ist oder ob andere Möglichkeiten der dauerhaften Ppof2-Expression bestehen. Einige ungelöste Fragen konnten in der vorliegenden Diskussion offengelegt werden. Um weitere Versuche mit lentiviraler Überexpression durchzuführen, sollten diese zuerst geklärt werden.

Unter 5.2 wurden mögliche Gründe für die Tatsache diskutiert, dass die ZsGreen- und hCD2-Expression nach lentiviraler Transduktion mit der Zeit nachlassen. Es wäre wichtig, dies abschließend zu klären und die zu Grunde liegende Ursache, wenn möglich, zu beseitigen. Sollte transkriptionelles *Silencing* der Grund sein, würde es sich z.B. anbieten, Konstrukte mit einem anderen Promoter zu entwickeln. Teschendorf *et al.* verglichen beispielsweise im Jahr 2002 den CMV-Promoter mit dem EF-1 alpha-Promoter und konnten deutlich stabilere Transduktionsergebnisse für letzteren erzielen. Eine weitere diskutierte Möglichkeit besteht in einem verminderten Überleben der erfolgreich transduzierten Zellen. Da sich kein Unterschied zwischen Ppof2_ZsGreen- und hCD2_ZsGreen-transduzierten Zellen zeigte, wäre dies nicht auf eine erhöhte Ppof2-Expression zurückzuführen. Vielmehr könnte der Grund dafür in einer Aktivierung der Zellen, wie unter 5.3 diskutiert, liegen. Würde es gelingen, die Aktivierung der Zellen zu reduzieren, ergäbe sich vielleicht automatisch eine konstantere Reporterexpression.

Sollte Pseudotransduktion der Grund für das abnehmende ZsGreen-Signal sein, so ließe sich dies mit bestimmten Versuchen herausfinden. Sinnvoll wäre hierbei z.B., wie von Geering *et al.* 2011 durchgeführt, eine Inhibition der reversen Transkriptase. Ihrem Beispiel folgend würde es sich im Falle einer Pseudotransduktion ebenfalls anbieten herauszufinden, ob ein mRNA- oder ein Protein-Transfer der Grund dafür ist. Wie bereits beschrieben, gelang es Galla *et al.* 2004 zu zeigen, dass in bestimmten Situationen durch Pseudotransduktion-vermittelte Translation Proteine in den transduzierten Zellen ihre

Funktion erfüllen. Zwar ist dies nur vorübergehend möglich, doch anders als im Vergleich zu einer Transfektion nehmen die Zellen deutlich weniger Schaden durch diese Behandlung. Außerdem ist ein receptorspezifisches Vorgehen möglich. Daher wäre der Beweis einer Pseudotransduktion nicht zwingend ein Grund, die lentivirale Überexpression von Ppef2 für undurchführbar und nicht zielführend zu erklären. Dennoch müsste man dabei einige Faktoren bedenken: Sollte Proteintransfer der Grund für die Pseudotransduktion sein, könnten auch andere Proteine aus dem Transduktionsmedium eingeschleust werden. Die möglichen Folgen sind in ihrem Ausmaß kaum zu kalkulieren. Außerdem müsste der Beweis dafür erbracht werden, dass Ppef2, das durch Pseudotransduktion in BMDCs vorliegt, trotzdem seiner Funktion nachgeht. Dies könnte sich angesichts der Tatsache, dass seine Funktion immer noch weithin unbekannt bleibt, als schwierig herausstellen.

Eine weitere Schwierigkeit, die sich im Laufe dieser Arbeit herauskristallisierte, war die eingehend diskutierte Reifung, der die transduzierten Zellen unterlagen. Es wäre für das weitere Vorgehen nun wichtig, die möglichen Gründe hierfür eindeutig einzugrenzen. Eine Reduzierung der Reifung, sollte sie vermeidbar sein, wäre vor Beginn erneuter Versuche mit lentiviraler Überexpression erstrebenswert. Sollte die Aktivierung z.B. transduktionsunabhängig entstehen, ließen sich eventuell Protokolle finden, die schonender mit den BMDCs umgehen. Beispielsweise könnte man, die von Vremec *et al.* 2011 gefundenen Hinweise beachtend, die Zellen hochverdünnt oder mit eingeschränkter Bewegungsfreiheit kultivieren. Es wäre auch denkbar, geringere Virusdosen zur Transduktion zu verwenden. Einige Belege für eine verstärkte Aktivierung bei hoher Multiplizität der Infektion (*multiplicity of infection*, MOI), sowie Hinweise auf eine dosisabhängige Zytotoxizität sprechen dafür, dieser Idee nachzugehen (Dyall *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 2005b). Wäre die Aktivierung der transduzierten BMDCs tatsächlich auf den Vorgang der Transduktion zurückzuführen, müssten Überlegungen angestellt werden, ob dies zu umgehen ist. In einigen Studien war zu beobachten, dass die lentivirale Transduktion von BMDCs keine nennenswerten Veränderungen in deren Aktivierungsverhalten mit sich brachte (He *et al.*, 2005; Zarei *et al.*, 2002). Diese Hinweise und die Möglichkeit einer Transduktion ohne Aktivierung sollten kritisch überprüft werden.

Eine weitere Überlegung betrifft die Eignung von BMDCs für die vorgesehenen Versuche. Als Esslinger *et al.* im Jahr 2002 die lentivirale Transduktion von dendritischen Zellen testeten, stellten sie eine erhöhte Reifung lediglich für BMDCs, nicht dagegen für von humanen Monozyten abgeleiteten dendritischen Zellen fest. Es würde sich also

möglicherweise lohnen über eine andere Methode zur Gewinnung von dendritischen Zellen *in vitro* nachzudenken. Auch die Generierung von Knochenmarkchimären durch Transduktion von hämatopoetischen Stammzellen wäre interessant. Eine für dendritische Zellen spezifische Aktivierung durch die lentivirale Transduktion wäre somit zu umgehen. Man könnte auch die Gewinnung von BMDCs mittels des Wachstumsfaktor GM-CSF überdenken. Die Studienlage weist darauf hin, dass BMDC-Kulturen, die mit Flt3-(*FMS-like tyrosine kinase 3*) Ligand gewonnen wurden, der *in vivo* Situation näher kommen, da sie eine höhere Vielfalt an Subtypen aufweisen (Brasel *et al.*, 2000; Naik *et al.*, 2005). Es wäre interessant herauszufinden, ob die vorliegenden Ergebnisse auch für die Flt3-Kultur gelten oder ob sich vielleicht sogar bessere Ergebnisse bezüglich der Aktivierung erzielen ließen. Ob der lentivirale Gentransfer abschließend das geeignete Mittel zur Untersuchung einer dauerhaften Ppof2-Expression in dendritischen Zellen darstellt, bleibt also vorerst ungewiss. In der Vergangenheit mussten andere, nicht virale Methoden zum Gentransfer in dendritischen Zellen, wie z.B. Elektroporation und Nukleoporation, aufgrund von niedriger Transduktionseffizienz oder stark reduziertem Überleben der Zellen als kritisch eingestuft werden (Lenz *et al.*, 2003; Strobel *et al.*, 2000). Es ist daher lohnenswert, die Methode der lentiviralen Transduktion weiterhin auf ihre Nutzbarkeit zu überprüfen.

6 Literaturverzeichnis

Andreeva, A. V. und Kutuzov, M. A. (2009). "PPEF/PP7 protein Ser/Thr phosphatases". *Cell Mol Life Sci* 66, 3103-3110

Bachem, A., Hartung, E., Guttler, S., Mora, A., Zhou, X., Hegemann, A., Plantinga, M., Mazzini, E., Stoitzner, P., Gurka, S., Henn, V., Mages, H. W. und Kroczeck, R. A. (2012). "Expression of XCR1 Characterizes the Batf3-Dependent Lineage of Dendritic Cells Capable of Antigen Cross-Presentation". *Front Immunol* 3, 214

Banchereau, J. und Steinman, R. M. (1998). "Dendritic cells and the control of immunity". *Nature* 392, 245-252

Bar-On, L. und Jung, S. (2010). "Defining dendritic cells by conditional and constitutive cell ablation". *Immunol Rev* 234, 76-89

Bedoui, S., Whitney, P. G., Waithman, J., Eidsmo, L., Wakim, L., Caminschi, I., Allan, R. S., Wojtasiak, M., Shortman, K., Carbone, F. R., Brooks, A. G. und Heath, W. R. (2009). "Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells". *Nat Immunol* 10, 488-495

Belz, G. T. und Nutt, S. L. (2012). "Transcriptional programming of the dendritic cell network". *Nat Rev Immunol* 12, 101-113

Birnberg, T., Bar-On, L., Sapozhnikov, A., Caton, M. L., Cervantes-Barragan, L., Makia, D., Krauthgamer, R., Brenner, O., Ludewig, B., Brockschneider, D., Riethmacher, D., Reizis, B. und Jung, S. (2008). "Lack of conventional dendritic cells is compatible with normal development and T cell homeostasis, but causes myeloid proliferative syndrome". *Immunity* 29, 986-997

Blomer, U., Naldini, L., Kafri, T., Trono, D., Verma, I. M. und Gage, F. H. (1997). "Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector". *J Virol* 71, 6641-6649

- Bouneaud, C., Kourilsky, P. und Bousso, P. (2000). "Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion". *Immunity* 13, 829-840
- Brasel, K., De Smedt, T., Smith, J. L. und Maliszewski, C. R. (2000). "Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures". *Blood* 96, 3029-3039
- Breckpot, K., Escors, D., Arce, F., Lopes, L., Karwacz, K., Van Lint, S., Keyaerts, M. und Collins, M. (2010). "HIV-1 lentiviral vector immunogenicity is mediated by Toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR7". *J Virol* 84, 5627-5636
- Brocker, T., Riedinger, M. und Karjalainen, K. (1997). "Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo". *J Exp Med* 185, 541-550
- Brooks, A. R., Harkins, R. N., Wang, P., Qian, H. S., Liu, P. und Rubanyi, G. M. (2004). "Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle". *J Gene Med* 6, 395-404
- Buonaguro, L., Tornesello, M. L., Tagliamonte, M., Gallo, R. C., Wang, L. X., Kamin-Lewis, R., Abdelwahab, S., Lewis, G. K. und Buonaguro, F. M. (2006). "Baculovirus-derived human immunodeficiency virus type 1 virus-like particles activate dendritic cells and induce ex vivo T-cell responses". *J Virol* 80, 9134-9143
- Bursch, L. S., Wang, L., Igyarto, B., Kissenpfennig, A., Malissen, B., Kaplan, D. H. und Hogquist, K. A. (2007). "Identification of a novel population of Langerin+ dendritic cells". *J Exp Med* 204, 3147-3156
- Cella, M., Engering, A., Pinet, V., Pieters, J. und Lanzavecchia, A. (1997). "Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells". *Nature* 388, 782-787
- Chen, M., Wang, Y. H., Wang, Y., Huang, L., Sandoval, H., Liu, Y. J. und Wang, J. (2006). "Dendritic cell apoptosis in the maintenance of immune tolerance". *Science* 311, 1160-1164

- Chen, Q., Sun, L. und Chen, Z. J. (2016). "Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing". *Nat Immunol* 17, 1142-1149
- Chen, X., He, J. und Chang, L. J. (2004). "Alteration of T cell immunity by lentiviral transduction of human monocyte-derived dendritic cells". *Retrovirology* 1, 37
- Chiarella, E., Carra, G., Scicchitano, S., Codispoti, B., Mega, T., Lupia, M., Pelaggi, D., Marafioti, M. G., Aloisio, A., Giordano, M., Nappo, G., Spoletti, C. B., Grillone, T., Giovannone, E. D., Spina, R., Bernaudo, F., Moore, M. A., Bond, H. M., Mesuraca, M. und Morrone, G. (2014). "UMG Lenti: novel lentiviral vectors for efficient transgene- and reporter gene expression in human early hematopoietic progenitors". *PLoS One* 9, e114795
- Cronin, J., Zhang, X. Y. und Reiser, J. (2005). "Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping". *Curr Gene Ther* 5, 387-398
- Crozat, K., Guiton, R., Contreras, V., Feuillet, V., Dutertre, C. A., Ventre, E., Vu Manh, T. P., Baranek, T., Storset, A. K., Marvel, J., Boudinot, P., Hosmalin, A., Schwartz-Cornil, I. und Dalod, M. (2010). "The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8alpha+ dendritic cells". *J Exp Med* 207, 1283-1292
- Dalod, M., Chelbi, R., Malissen, B. und Lawrence, T. (2014). "Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming". *EMBO J* 33, 1104-1116
- del Rio, M. L., Rodriguez-Barbosa, J. I., Kremmer, E. und Forster, R. (2007). "CD103- and CD103+ bronchial lymph node dendritic cells are specialized in presenting and cross-presenting innocuous antigen to CD4+ and CD8+ T cells". *J Immunol* 178, 6861-6866
- den Haan, J. M., Lehar, S. M. und Bevan, M. J. (2000). "CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo". *J Exp Med* 192, 1685-1696
- Dresch, C., Edelmann, S. L., Marconi, P. und Brocker, T. (2008). "Lentiviral-mediated transcriptional targeting of dendritic cells for induction of T cell tolerance in vivo". *J Immunol* 181, 4495-4506

- Dudziak, D., Kamphorst, A. O., Heidkamp, G. F., Buchholz, V. R., Trumfheller, C., Yamazaki, S., Cheong, C., Liu, K., Lee, H. W., Park, C. G., Steinman, R. M. und Nussenzweig, M. C. (2007). "Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo". *Science* 315, 107-111
- Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R. J., Nguyen, M., Trono, D. und Naldini, L. (1998). "A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system". *J Virol* 72, 8463-8471
- Dullaers, M., Breckpot, K., Van Meirvenne, S., Bonehill, A., Tuyaerts, S., Michiels, A., Straetman, L., Heirman, C., De Greef, C., Van Der Bruggen, P. und Thielemans, K. (2004). "Side-by-side comparison of lentivirally transduced and mRNA-electroporated dendritic cells: implications for cancer immunotherapy protocols". *Mol Ther* 10, 768-779
- Dullaers, M. und Thielemans, K. (2006). "From pathogen to medicine: HIV-1-derived lentiviral vectors as vehicles for dendritic cell based cancer immunotherapy". *J Gene Med* 8, 3-17
- Dyall, J., Latouche, J. B., Schnell, S. und Sadelain, M. (2001). "Lentivirus-transduced human monocyte-derived dendritic cells efficiently stimulate antigen-specific cytotoxic T lymphocytes". *Blood* 97, 114-121
- Dzionic, A., Inagaki, Y., Okawa, K., Nagafune, J., Rock, J., Sohma, Y., Winkels, G., Zysk, M., Yamaguchi, Y. und Schmitz, J. (2002). "Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions". *Hum Immunol* 63, 1133-1148
- Dzionic, A., Sohma, Y., Nagafune, J., Cella, M., Colonna, M., Facchetti, F., Gunther, G., Johnston, I., Lanzavecchia, A., Nagasaka, T., Okada, T., Vermi, W., Winkels, G., Yamamoto, T., Zysk, M., Yamaguchi, Y. und Schmitz, J. (2001). "BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction". *J Exp Med* 194, 1823-1834
- Edelmann, S. L., Nelson, P. J. und Brocker, T. (2011). "Comparative promoter analysis in vivo: identification of a dendritic cell-specific promoter module". *Blood* 118, e40-49

- Esslinger, C., Romero, P. und MacDonald, H. R. (2002). "Efficient transduction of dendritic cells and induction of a T-cell response by third-generation lentivectors". *Hum Gene Ther* 13, 1091-1100
- Fleige, S., Walf, V., Huch, S., Prgomet, C., Sehm, J. und Pfaffl, M. W. (2006). "Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR". *Biotechnol Lett* 28, 1601-1613
- Frankel, A. D. und Young, J. A. (1998). "HIV-1: fifteen proteins and an RNA". *Annu Rev Biochem* 67, 1-25
- Galla, M., Will, E., Kraunus, J., Chen, L. und Baum, C. (2004). "Retroviral pseudotransduction for targeted cell manipulation". *Mol Cell* 16, 309-315
- Geering, B., Schmidt-Mende, J., Federzoni, E., Stoeckle, C. und Simon, H. U. (2011). "Protein overexpression following lentiviral infection of primary mature neutrophils is due to pseudotransduction". *J Immunol Methods* 373, 209-218
- Geissmann, F., Manz, M. G., Jung, S., Sieweke, M. H., Merad, M. und Ley, K. (2010). "Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells". *Science* 327, 656-661
- Granot, T., Senda, T., Carpenter, D. J., Matsuoka, N., Weiner, J., Gordon, C. L., Miron, M., Kumar, B. V., Griesemer, A., Ho, S. H., Lerner, H., Thome, J. J. C., Connors, T., Reizis, B. und Farber, D. L. (2017). "Dendritic Cells Display Subset and Tissue-Specific Maturation Dynamics over Human Life". *Immunity* 46, 504-515
- Grobner, S., Lukowski, R., Autenrieth, I. B. und Ruth, P. (2014). "Lipopolysaccharide induces cell volume increase and migration of dendritic cells". *Microbiol Immunol* 58, 61-67
- Groothuis, T. A. und Neefjes, J. (2005). "The many roads to cross-presentation". *J Exp Med* 202, 1313-1318
- Guilliams, M., Dutertre, C. A., Scott, C. L., McGovern, N., Sichien, D., Chakarov, S., Van Gassen, S., Chen, J., Poidinger, M., De Prijck, S., Tavernier, S. J., Low, I., Irac, S. E.,

Mattar, C. N., Sumatoh, H. R., Low, G. H. L., Chung, T. J. K., Chan, D. K. H., Tan, K. K., Hon, T. L. K., Fossum, E., Bogen, B., Choolani, M., Chan, J. K. Y., Larbi, A., Luche, H., Henri, S., Saeys, Y., Newell, E. W., Lambrecht, B. N., Malissen, B. und Ginhoux, F. (2016). "Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species". *Immunity* 45, 669-684

Haas, D. L., Case, S. S., Crooks, G. M. und Kohn, D. B. (2000). "Critical factors influencing stable transduction of human CD34(+) cells with HIV-1-derived lentiviral vectors". *Mol Ther* 2, 71-80

Hasegawa, S., Maruyama, K., Takenaka, H., Furukawa, T. und Saga, T. (2009). "A medaka model of cancer allowing direct observation of transplanted tumor cells in vivo at a cellular-level resolution". *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 13832-13837

Hato, T. und Dagher, P. C. (2015). "How the Innate Immune System Senses Trouble and Causes Trouble". *Clin J Am Soc Nephrol* 10, 1459-1469

Hawiger, D., Inaba, K., Dorsett, Y., Guo, M., Mahnke, K., Rivera, M., Ravetch, J. V., Steinman, R. M. und Nussenzweig, M. C. (2001). "Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo". *J Exp Med* 194, 769-779

He, Y., Zhang, J., Mi, Z., Robbins, P. und Falo, L. D., Jr. (2005). "Immunization with lentiviral vector-transduced dendritic cells induces strong and long-lasting T cell responses and therapeutic immunity". *J Immunol* 174, 3808-3817

Heuze, M. L., Vargas, P., Chabaud, M., Le Berre, M., Liu, Y. J., Collin, O., Solanes, P., Voituriez, R., Piel, M. und Lennon-Dumenil, A. M. (2013). "Migration of dendritic cells: physical principles, molecular mechanisms, and functional implications". *Immunol Rev* 256, 240-254

Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., Tripp, C. S., Wolf, S. F., O'Garra, A. und Murphy, K. M. (1993). "Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages". *Science* 260, 547-549

- Hu, B., Tai, A. und Wang, P. (2011). "Immunization delivered by lentiviral vectors for cancer and infectious diseases". *Immunol Rev* 239, 45-61
- Inaba, K., Witmer-Pack, M., Inaba, M., Hathcock, K. S., Sakuta, H., Azuma, M., Yagita, H., Okumura, K., Linsley, P. S., Ikehara, S., Muramatsu, S., Hodes, R. J. und Steinman, R. M. (1994). "The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro". *J Exp Med* 180, 1849-1860
- Iwasaki, A. und Medzhitov, R. (2015). "Control of adaptive immunity by the innate immune system". *Nat Immunol* 16, 343-353
- Jiang, A., Bloom, O., Ono, S., Cui, W., Unternaehrer, J., Jiang, S., Whitney, J. A., Connolly, J., Banchereau, J. und Mellman, I. (2007). "Disruption of E-cadherin-mediated adhesion induces a functionally distinct pathway of dendritic cell maturation". *Immunity* 27, 610-624
- Jung, S., Unutmaz, D., Wong, P., Sano, G., De los Santos, K., Sparwasser, T., Wu, S., Vuthoori, S., Ko, K., Zavala, F., Pamer, E. G., Littman, D. R. und Lang, R. A. (2002). "In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens". *Immunity* 17, 211-220
- Kafri, T., Blomer, U., Peterson, D. A., Gage, F. H. und Verma, I. M. (1997). "Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors". *Nat Genet* 17, 314-317
- Kamath, A. T., Pooley, J., O'Keeffe, M. A., Vremec, D., Zhan, Y., Lew, A. M., D'Amico, A., Wu, L., Tough, D. F. und Shortman, K. (2000). "The development, maturation, and turnover rate of mouse spleen dendritic cell populations". *J Immunol* 165, 6762-6770
- Kamphorst, A. O., Guermonprez, P., Dudziak, D. und Nussenzweig, M. C. (2010). "Route of antigen uptake differentially impacts presentation by dendritic cells and activated monocytes". *J Immunol* 185, 3426-3435
- Kawai, T. und Akira, S. (2010). "The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors". *Nat Immunol* 11, 373-384

- Kay, M. A., Glorioso, J. C. und Naldini, L. (2001). "Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics". *Nat Med* 7, 33-40
- Kim, J. T., Liu, Y., Kulkarni, R. P., Lee, K. K., Dai, B., Lovely, G., Ouyang, Y., Wang, P., Yang, L. und Baltimore, D. (2017). "Dendritic cell-targeted lentiviral vector immunization uses pseudotransduction and DNA-mediated STING and cGAS activation". *Sci Immunol* 2
- Krug, A., French, A. R., Barchet, W., Fischer, J. A., Dzionek, A., Pingel, J. T., Orihuela, M. M., Akira, S., Yokoyama, W. M. und Colonna, M. (2004). "TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function". *Immunity* 21, 107-119
- Kuate, S., Stahl-Hennig, C., Stoiber, H., Nchinda, G., Floto, A., Franz, M., Sauermann, U., Bredl, S., Deml, L., Ignatius, R., Norley, S., Racz, P., Tenner-Racz, K., Steinman, R. M., Wagner, R. und Uberla, K. (2006). "Immunogenicity and efficacy of immunodeficiency virus-like particles pseudotyped with the G protein of vesicular stomatitis virus". *Virology* 351, 133-144
- Kushwah, R. und Hu, J. (2010). "Dendritic cell apoptosis: regulation of tolerance versus immunity". *J Immunol* 185, 795-802
- Kutuzov, M. A., Bennett, N. und Andreeva, A. V. (2010). "Protein phosphatase with EF-hand domains 2 (PPEF2) is a potent negative regulator of apoptosis signal regulating kinase-1 (ASK1)". *Int J Biochem Cell Biol* 42, 1816-1822
- Kutuzov, M. A., Solov'eva, O. V., Andreeva, A. V. und Bennett, N. (2002). "Protein Ser/Thr phosphatases PPEF interact with calmodulin". *Biochem Biophys Res Commun* 293, 1047-1052
- Lattin, J. E., Schroder, K., Su, A. I., Walker, J. R., Zhang, J., Wiltshire, T., Saijo, K., Glass, C. K., Hume, D. A., Kellie, S. und Sweet, M. J. (2008). "Expression analysis of G Protein-Coupled Receptors in mouse macrophages". *Immunome Res* 4, 5

- Lenz, P., Bacot, S. M., Frazier-Jessen, M. R. und Feldman, G. M. (2003). "Nucleoporation of dendritic cells: efficient gene transfer by electroporation into human monocyte-derived dendritic cells". *FEBS Lett* 538, 149-154
- Lewis, K. L., Caton, M. L., Bogunovic, M., Greter, M., Grajkowska, L. T., Ng, D., Klinakis, A., Charo, I. F., Jung, S., Gommerman, J. L., Ivanov, II, Liu, K., Merad, M. und Reizis, B. (2011). "Notch2 receptor signaling controls functional differentiation of dendritic cells in the spleen and intestine". *Immunity* 35, 780-791
- Liu, K., Victora, G. D., Schwickert, T. A., Guermonprez, P., Meredith, M. M., Yao, K., Chu, F. F., Randolph, G. J., Rudensky, A. Y. und Nussenzweig, M. (2009). "In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis". *Science* 324, 392-397
- Liu, M. L., Winther, B. L. und Kay, M. A. (1996). "Pseudotransduction of hepatocytes by using concentrated pseudotyped vesicular stomatitis virus G glycoprotein (VSV-G)-Moloney murine leukemia virus-derived retrovirus vectors: comparison of VSV-G and amphotropic vectors for hepatic gene transfer". *J Virol* 70, 2497-2502
- Liu, Y. J. (2005). "IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors". *Annu Rev Immunol* 23, 275-306
- Lopes, L., Dewannieux, M., Gileadi, U., Bailey, R., Ikeda, Y., Whittaker, C., Collin, M. P., Cerundolo, V., Tomihari, M., Ariizumi, K. und Collins, M. K. (2008). "Immunization with a lentivector that targets tumor antigen expression to dendritic cells induces potent CD8+ and CD4+ T-cell responses". *J Virol* 82, 86-95
- Luckashenak, N., Schroeder, S., Endt, K., Schmidt, D., Mahnke, K., Bachmann, M. F., Marconi, P., Deeg, C. A. und Brocker, T. (2008). "Constitutive crosspresentation of tissue antigens by dendritic cells controls CD8+ T cell tolerance in vivo". *Immunity* 28, 521-532
- Lutz, M. B. und Schuler, G. (2002). "Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?". *Trends Immunol* 23, 445-449
- Menges, M., Rossner, S., Voigtlander, C., Schindler, H., Kukutsch, N. A., Bogdan, C., Erb, K., Schuler, G. und Lutz, M. B. (2002). "Repetitive injections of dendritic cells matured

with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity". *J Exp Med* 195, 15-21

Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J. und Mortha, A. (2013). "The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting". *Annu Rev Immunol* 31, 563-604

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

Montini, E., Rugarli, E. I., Van de Vosse, E., Andolfi, G., Mariani, M., Puca, A. A., Consalez, G. G., den Dunnen, J. T., Ballabio, A. und Franco, B. (1997). "A novel human serine-threonine phosphatase related to the Drosophila retinal degeneration C (rdgC) gene is selectively expressed in sensory neurons of neural crest origin". *Hum Mol Genet* 6, 1137-1145

Mostoslavsky, G., Fabian, A. J., Rooney, S., Alt, F. W. und Mulligan, R. C. (2006). "Complete correction of murine Artemis immunodeficiency by lentiviral vector-mediated gene transfer". *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 16406-16411

Naik, S. H., Proietto, A. I., Wilson, N. S., Dakic, A., Schnorrer, P., Fuchsberger, M., Lahoud, M. H., O'Keeffe, M., Shao, Q. X., Chen, W. F., Villadangos, J. A., Shortman, K. und Wu, L. (2005). "Cutting edge: generation of splenic CD8+ and CD8- dendritic cell equivalents in Fms-like tyrosine kinase 3 ligand bone marrow cultures". *J Immunol* 174, 6592-6597

Nakamura, Y., Ishii, J. und Kondo, A. (2013). "Bright fluorescence monitoring system utilizing *Zoanthus* sp. green fluorescent protein (ZsGreen) for human G-protein-coupled receptor signaling in microbial yeast cells". *PLoS One* 8, e82237

Naldini, L. (2015). "Gene therapy returns to centre stage". *Nature* 526, 351-360

Naldini, L., Blomer, U., Gally, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., Verma, I. M. und Trono, D. (1996). "In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector". *Science* 272, 263-267

- Nash, K. L. und Lever, A. M. (2004). "Green fluorescent protein: green cells do not always indicate gene expression". *Gene Ther* 11, 882-883
- Nayar, S., Dasgupta, P. und Galustian, C. (2015). "Extending the lifespan and efficacies of immune cells used in adoptive transfer for cancer immunotherapies-A review". *Oncoimmunology* 4, e1002720
- Nie, D., Di Nardo, A., Han, J. M., Baharanyi, H., Kramvis, I., Huynh, T., Dabora, S., Codeluppi, S., Pandolfi, P. P., Pasquale, E. B. und Sahin, M. (2010). "Tsc2-Rheb signaling regulates EphA-mediated axon guidance". *Nat Neurosci* 13, 163-172
- Norbury, C. C., Malide, D., Gibbs, J. S., Bennink, J. R. und Yewdell, J. W. (2002). "Visualizing priming of virus-specific CD8+ T cells by infected dendritic cells in vivo". *Nat Immunol* 3, 265-271
- Pichlmair, A., Diebold, S. S., Gschmeissner, S., Takeuchi, Y., Ikeda, Y., Collins, M. K. und Reis e Sousa, C. (2007). "Tubulovesicular structures within vesicular stomatitis virus G protein-pseudotyped lentiviral vector preparations carry DNA and stimulate antiviral responses via Toll-like receptor 9". *J Virol* 81, 539-547
- Platt, C. D., Ma, J. K., Chalouni, C., Ebersold, M., Bou-Reslan, H., Carano, R. A., Mellman, I. und Delamarre, L. (2010). "Mature dendritic cells use endocytic receptors to capture and present antigens". *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 4287-4292
- Pooley, J. L., Heath, W. R. und Shortman, K. (2001). "Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8- dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8+ dendritic cells". *J Immunol* 166, 5327-5330
- Prelich, G. (2012). "Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation". *Genetics* 190, 841-854
- Probst, H. C., Lagnel, J., Kollias, G. und van den Broek, M. (2003). "Inducible transgenic mice reveal resting dendritic cells as potent inducers of CD8+ T cell tolerance". *Immunity* 18, 713-720

- Proietto, A. I., van Dommelen, S., Zhou, P., Rizzitelli, A., D'Amico, A., Steptoe, R. J., Naik, S. H., Lahoud, M. H., Liu, Y., Zheng, P., Shortman, K. und Wu, L. (2008). "Dendritic cells in the thymus contribute to T-regulatory cell induction". *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 19869-19874
- Qin, J. Y., Zhang, L., Clift, K. L., Hular, I., Xiang, A. P., Ren, B. Z. und Lahn, B. T. (2010). "Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter". *PLoS One* 5, e10611
- Qiu, C. H., Miyake, Y., Kaise, H., Kitamura, H., Ohara, O. und Tanaka, M. (2009). "Novel subset of CD8 {alpha}+ dendritic cells localized in the marginal zone is responsible for tolerance to cell-associated antigens". *J Immunol* 182, 4127-4136
- Ramezani, A. und Hawley, R. G. (2002). "Overview of the HIV-1 Lentiviral Vector System". *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 16, Unit 16 21
- Ramulu, P., Kennedy, M., Xiong, W. H., Williams, J., Cowan, M., Blesh, D., Yau, K. W., Hurley, J. B. und Nathans, J. (2001). "Normal light response, photoreceptor integrity, and rhodopsin dephosphorylation in mice lacking both protein phosphatases with EF hands (PPEF-1 and PPEF-2)". *Mol Cell Biol* 21, 8605-8614
- Reis e Sousa, C. (2006). "Dendritic cells in a mature age". *Nat Rev Immunol* 6, 476-483
- Reis e Sousa, C., Hieny, S., Scharon-Kersten, T., Jankovic, D., Charest, H., Germain, R. N. und Sher, A. (1997). "In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas". *J Exp Med* 186, 1819-1829
- Reizis, B., Bunin, A., Ghosh, H. S., Lewis, K. L. und Sisirak, V. (2011). "Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions". *Annu Rev Immunol* 29, 163-183
- Riedl, E., Stockl, J., Majdic, O., Scheinecker, C., Knapp, W. und Strobl, H. (2000). "Ligation of E-cadherin on in vitro-generated immature Langerhans-type dendritic cells inhibits their maturation". *Blood* 96, 4276-4284

- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T. und Ono, M. (2008). "Regulatory T cells and immune tolerance". *Cell* 133, 775-787
- Santos, A., Tsafo, K., Stolte, C., Pletscher-Frankild, S., O'Donoghue, S. I. und Jensen, L. J. (2015). "Comprehensive comparison of large-scale tissue expression datasets". *PeerJ* 3, e1054
- Satpathy, A. T., Wu, X., Albring, J. C. und Murphy, K. M. (2012). "Re(de)fining the dendritic cell lineage". *Nat Immunol* 13, 1145-1154
- Schwiebs, A., Friesen, O., Katzy, E., Ferreiros, N., Pfeilschifter, J. M. und Radeke, H. H. (2016). "Activation-Induced Cell Death of Dendritic Cells Is Dependent on Sphingosine Kinase 1". *Front Pharmacol* 7, 94
- Sherman, P. M., Sun, H., Macke, J. P., Williams, J., Smallwood, P. M. und Nathans, J. (1997). "Identification and characterization of a conserved family of protein serine/threonine phosphatases homologous to *Drosophila* retinal degeneration C". *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11639-11644
- Shortman, K. und Heath, W. R. (2010). "The CD8+ dendritic cell subset". *Immunol Rev* 234, 18-31
- Starr, T. K., Jameson, S. C. und Hogquist, K. A. (2003). "Positive and negative selection of T cells". *Annu Rev Immunol* 21, 139-176
- Steele, F. und O'Tousa, J. E. (1990). "Rhodopsin activation causes retinal degeneration in *Drosophila* rdgC mutant". *Neuron* 4, 883-890
- Steele, F. R., Washburn, T., Rieger, R. und O'Tousa, J. E. (1992). "*Drosophila* retinal degeneration C (rdgC) encodes a novel serine/threonine protein phosphatase". *Cell* 69, 669-676

- Steinman, R. M. und Cohn, Z. A. (1973). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution". *J Exp Med* 137, 1142-1162
- Steinman, R. M. und Witmer, M. D. (1978). "Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice". *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 5132-5136
- Strobel, I., Berchtold, S., Gotze, A., Schulze, U., Schuler, G. und Steinkasserer, A. (2000). "Human dendritic cells transfected with either RNA or DNA encoding influenza matrix protein M1 differ in their ability to stimulate cytotoxic T lymphocytes". *Gene Ther* 7, 2028-2035
- Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X. und Chen, Z. J. (2013). "Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway". *Science* 339, 786-791
- Takeuchi, O. und Akira, S. (2010). "Pattern recognition receptors and inflammation". *Cell* 140, 805-820
- Tan, J. K. und O'Neill, H. C. (2005a). "Maturation requirements for dendritic cells in T cell stimulation leading to tolerance versus immunity". *J Leukoc Biol* 78, 319-324
- Tan, P. H., Beutelspacher, S. C., Xue, S. A., Wang, Y. H., Mitchell, P., McAlister, J. C., Larkin, D. F., McClure, M. O., Stauss, H. J., Ritter, M. A., Lombardi, G. und George, A. J. (2005b). "Modulation of human dendritic-cell function following transduction with viral vectors: implications for gene therapy". *Blood* 105, 3824-3832
- Teschendorf, C., Warrington, K. H., Jr., Siemann, D. W. und Muzyczka, N. (2002). "Comparison of the EF-1 alpha and the CMV promoter for engineering stable tumor cell lines using recombinant adeno-associated virus". *Anticancer Res* 22, 3325-3330
- Tsunetsugu-Yokota, Y., Morikawa, Y., Isogai, M., Kawana-Tachikawa, A., Odawara, T., Nakamura, T., Grassi, F., Autran, B. und Iwamoto, A. (2003). "Yeast-derived human immunodeficiency virus type 1 p55(gag) virus-like particles activate dendritic cells (DCs)

and induce perforin expression in Gag-specific CD8(+) T cells by cross-presentation of DCs". *J Virol* 77, 10250-10259

Vander Lugt, B., Beck, Z. T., Fuhlbrigge, R. C., Hacohen, N., Campbell, J. J. und Boes, M. (2011). "TGF-beta suppresses beta-catenin-dependent tolerogenic activation program in dendritic cells". *PLoS One* 6, e20099

Vogt, V. M. (1997). Retroviral Virions and Genomes. In: Retroviruses, Hrsg. Coffin, J. M., Hughes, S. H. und Varmus, H. E., Cold Spring Harbor (NY).

Vremec, D., O'Keeffe, M., Wilson, A., Ferrero, I., Koch, U., Radtke, F., Scott, B., Hertzog, P., Villadangos, J. und Shortman, K. (2011). "Factors determining the spontaneous activation of splenic dendritic cells in culture". *Innate Immun* 17, 338-352

Vremec, D. und Shortman, K. (1997). "Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes". *J Immunol* 159, 565-573

Wilson, A. A., Kwok, L. W., Hovav, A. H., Ohle, S. J., Little, F. F., Fine, A. und Kotton, D. N. (2008). "Sustained expression of alpha1-antitrypsin after transplantation of manipulated hematopoietic stem cells". *Am J Respir Cell Mol Biol* 39, 133-141

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

Wilson, N. S., El-Sukkari, D. und Villadangos, J. A. (2004). "Dendritic cells constitutively present self antigens in their immature state in vivo and regulate antigen presentation by controlling the rates of MHC class II synthesis and endocytosis". *Blood* 103, 2187-2195

Wilson, N. S. und Villadangos, J. A. (2005). "Regulation of antigen presentation and cross-presentation in the dendritic cell network: facts, hypothesis, and immunological implications". *Adv Immunol* 86, 241-305

Wu, L. und Shortman, K. (2005). "Heterogeneity of thymic dendritic cells". *Semin Immunol* 17, 304-312

Wu, Y., Tian, Z. und Wei, H. (2017). "Developmental and Functional Control of Natural Killer Cells by Cytokines". *Front Immunol* 8, 930

Yang, L., Yang, H., Rideout, K., Cho, T., Joo, K. I., Ziegler, L., Elliot, A., Walls, A., Yu, D., Baltimore, D. und Wang, P. (2008). "Engineered lentivector targeting of dendritic cells for in vivo immunization". *Nat Biotechnol* 26, 326-334

Yu, X., Zhan, X., D'Costa, J., Tanavde, V. M., Ye, Z., Peng, T., Malehorn, M. T., Yang, X., Civin, C. I. und Cheng, L. (2003). "Lentiviral vectors with two independent internal promoters transfer high-level expression of multiple transgenes to human hematopoietic stem-progenitor cells". *Mol Ther* 7, 827-838

Zanoni, I., Ostuni, R., Capuano, G., Collini, M., Caccia, M., Ronchi, A. E., Rocchetti, M., Mingozzi, F., Foti, M., Chirico, G., Costa, B., Zaza, A., Ricciardi-Castagnoli, P. und Granucci, F. (2009). "CD14 regulates the dendritic cell life cycle after LPS exposure through NFAT activation". *Nature* 460, 264-268

Zarei, S., Leuba, F., Arrighi, J. F., Hauser, C. und Piguet, V. (2002). "Transduction of dendritic cells by antigen-encoding lentiviral vectors permits antigen processing and MHC class I-dependent presentation". *J Allergy Clin Immunol* 109, 988-994

Zufferey, R., Donello, J. E., Trono, D. und Hope, T. J. (1999). "Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors". *J Virol* 73, 2886-2892

Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R. J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L. und Trono, D. (1998). "Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery". *J Virol* 72, 9873-9880

Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R. J., Naldini, L. und Trono, D. (1997). "Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo". *Nat Biotechnol* 15, 871-875

Zwick, M., Ulas, T., Cho, Y. L., Ried, C., Grosse, L., Simon, C., Bernhard, C., Busch, D. H., Schultze, J. L., Buchholz, V. R., Stutte, S. und Brocker, T. (2019). "Expression of the Phosphatase Ppof2 Controls Survival and Function of CD8(+) Dendritic Cells". *Front Immunol* 10, 222

Danksagung

Ich möchte mich bei all den Menschen bedanken, die mich auf dem Weg zur Dissertation begleitet und unterstützt haben. Nachdem diese Reise bereits 2013 ihren Anfang nahm und erst im Jahr 2019 endet, sind dies recht viele Menschen. Jedem Einzelnen bin ich unendlich dankbar, dennoch möchte ich einige Personen hervorheben.

Zuallererst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Thomas Brocker, der es mir ermöglicht hat diese Arbeit unter seiner Betreuung durchzuführen, der mich geduldig begleitet hat und mir stets mit gutem Rat zur Seite stand, wenn ich ihn brauchte.

Ein weiterer großer Dank geht an Dr. Markus Zwick, der mir mit größter Geduld das wissenschaftliche Arbeiten und Ppef2 näher gebracht hat. Danke Dir für die unzähligen Stunden und Deine wertvolle Hilfe. Du hast Dir wirklich einen Orden verdient.

Danke auch an die gesamte AG Brocker. Ihr habt mich aufgenommen, hattet immer ein offenes Ohr und standet mit Ratschlägen bereit, habt mich motiviert und mit unzähligen Mittagspausen und Unternehmungen für gute Laune gesorgt. Ohne Euch wäre dieser Weg um einiges einsamer und eintöniger gewesen.

Andrea Bol und ihrem Team danke ich herzlich für die ausgezeichnete Betreuung der Versuchstiere.

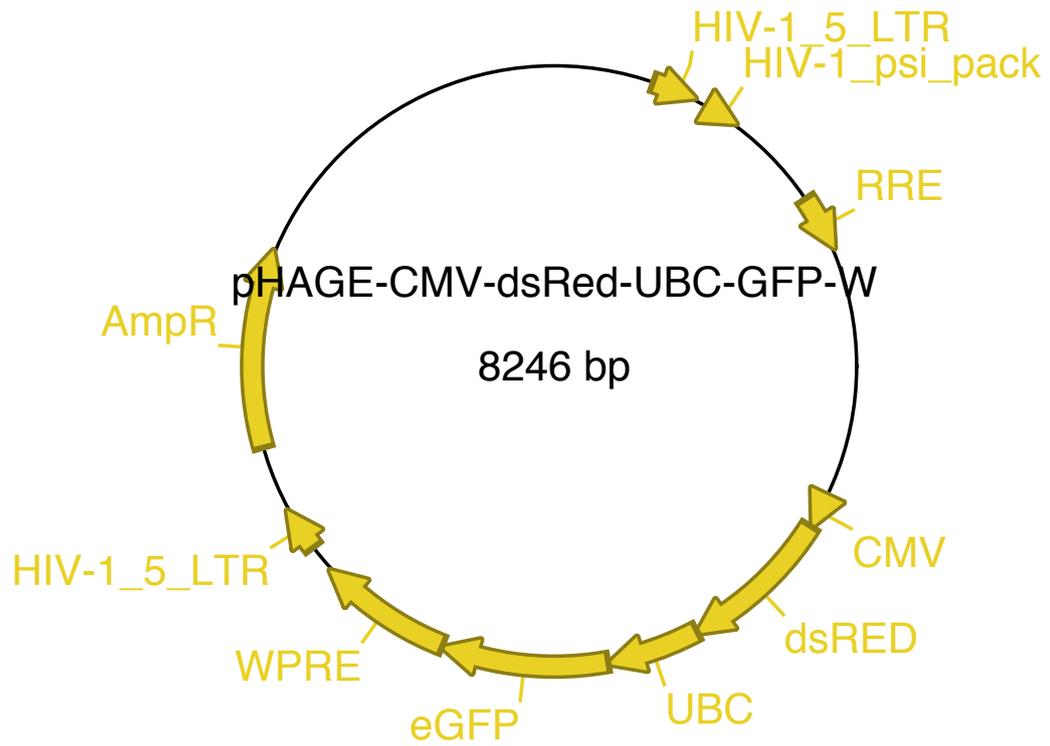
Ich danke meiner Familie, die mich in dieser, wie in jeder anderen Angelegenheit, stets unterstützt hat. Was uns miteinander verbindet, ist unbeschreiblich wertvoll und dafür bin ich für immer dankbar.

Dass diese Arbeit am Ende tatsächlich abgegeben werden kann, verdanke ich außerdem der großen Hilfe meiner Mutter und meiner wundervollen Freundinnen Laura und Leonie. Rechtschreibung, Word, Ppef2 und Doktorarbeitsblues konnte ich nur dank Euch erfolgreich meistern.

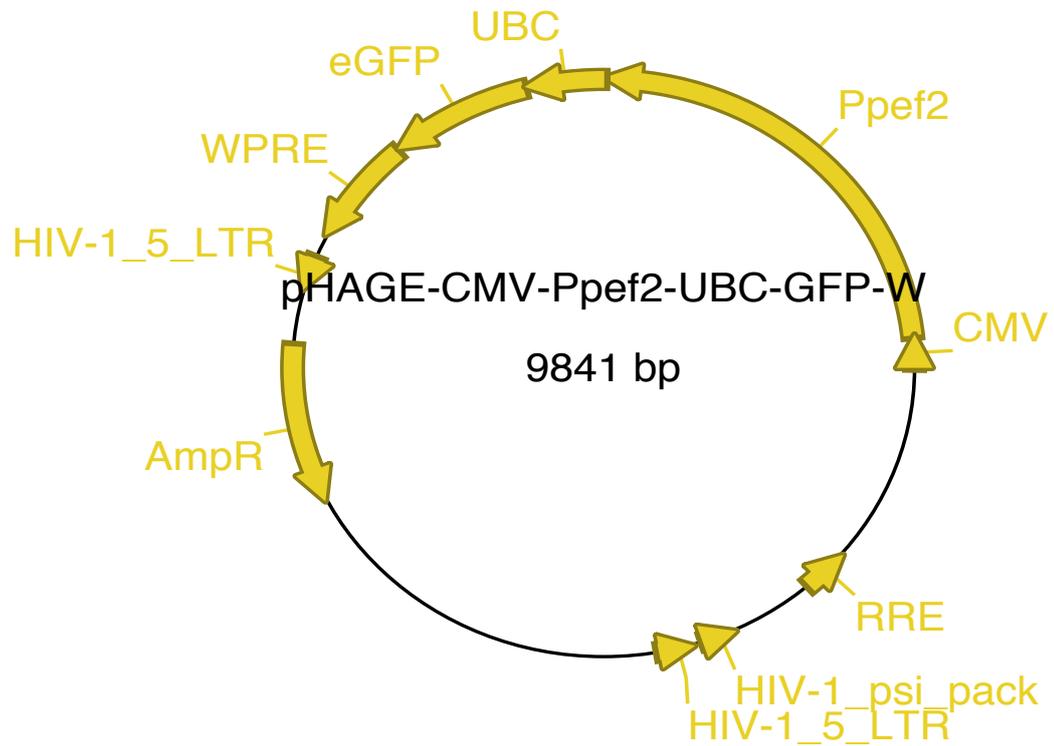
Anhang

Plasmidkarten

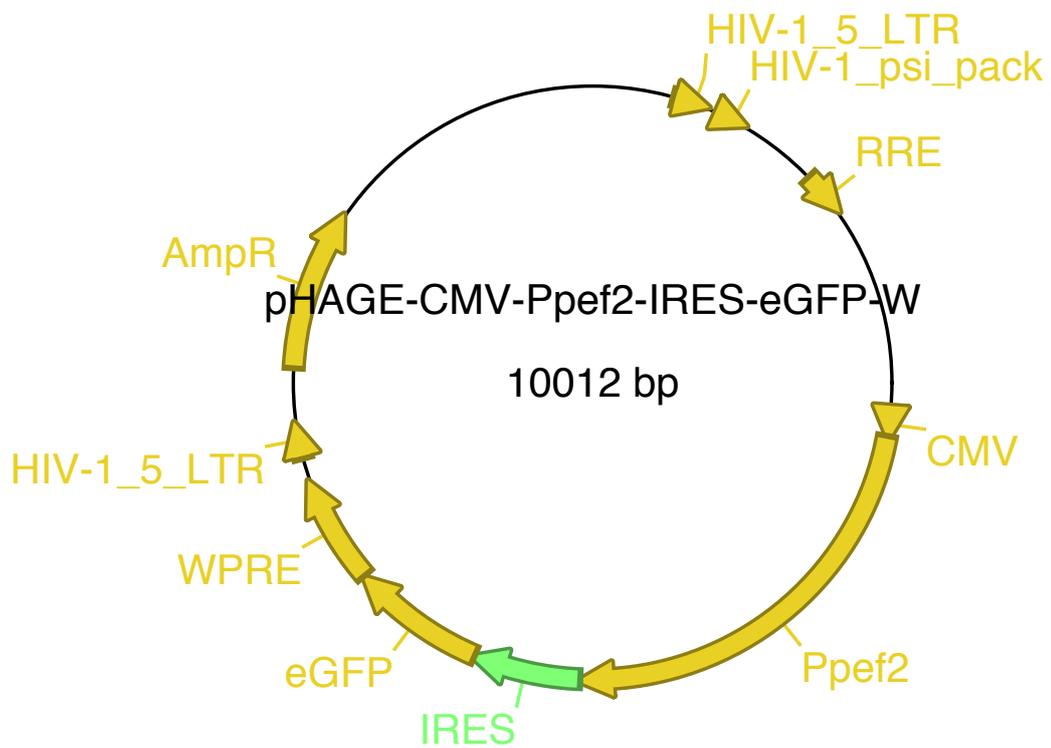
CMV-dsRed-UBC-eGFP (pHAGE-CMV-dsRed-UBC-GFP-W)



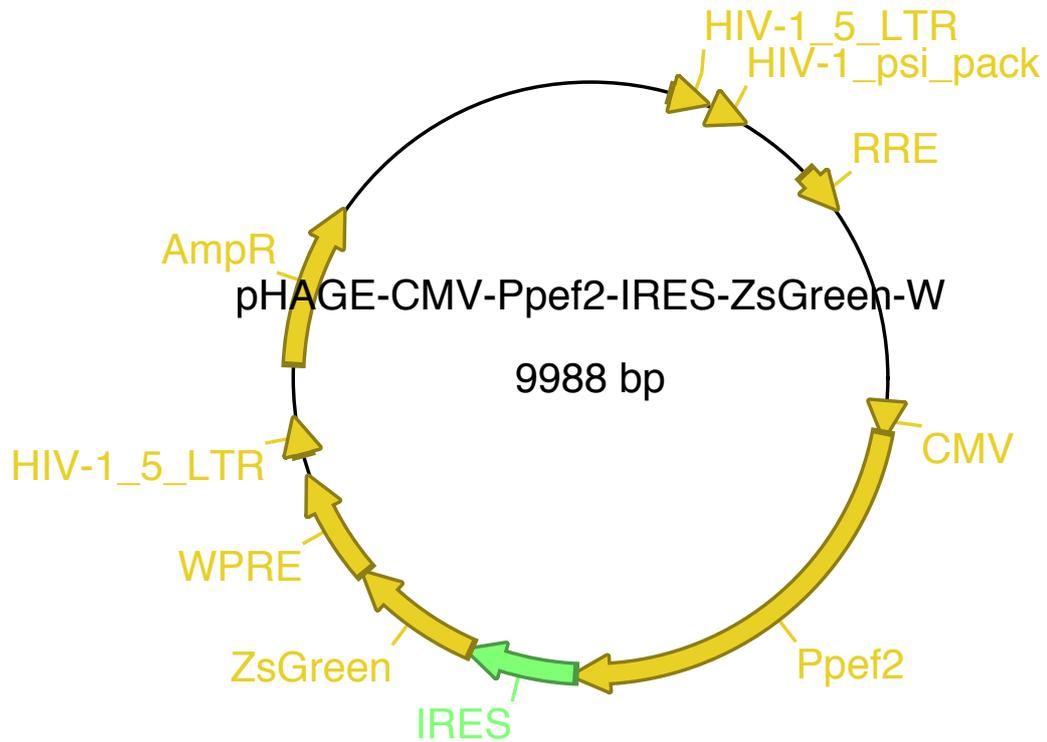
CMV-Ppef2-UBC-eGFP



CMV-Ppef2-IRES-eGFP



CMV-Ppef2-IRES-ZsGreen/Ppef2_ZsGreen



CMV-hCD2-IRES-ZsGreen/hCD2_ZsGreen

