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

### Funktion von Cdc42 in plasmazytoiden dendritischen Zellen

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

> vorgelegt von Ina Kugler aus Tübingen

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. Thomas Brocker
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. Sabine Steffens
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	15.03.2021

# Inhaltsverzeichnis

Inhalts	sverz	eichnis	I
Abkürz	zung	sverzeichnis	V
1.	Sun	nmary	1
2.	Zus	ammenfassung	2
3.	Einl	eitung	3
3.1.	pDC	S	3
3.1.1	1.	Phänotyp der pDCs	3
3.1.2	2.	Entwicklung und Lebensspanne der pDCs	4
3.1.3	3.	pDC-vermittelte Immunantwort	5
3.1	1.3.1	pDCs erkennen Nukleinsäuren durch TLR7 und TLR9	6
3.	1.3.2	Aufnahme der TLR7-/TLR9-Liganden	6
3.	1.3.3	. Der TLR7-/TLR9-Signalweg	7
3.	1.3.4	. Fehlregulation der TLR7-/TLR9-vermittelten Immunantwort	9
3.1.4	4.	pDC-Metabolismus	9
3.2.	Rho	GTPasen1	1
3.2.1	1.	Cdc42 als Regulator des Aktin-Cytoskeletts1	2
3.2.2	2.	Cdc42 als Regulator des intrazellulären Transports1	2
3.2.3	3.	Cdc42 beeinflusst die Proliferation und Apoptose	3
3.2.4	4.	Einfluss von Cdc42 auf den Zellmetabolismus 1-	4
3.2.5	5.	Funktion von Cdc42 in pDCs 14	4
3.3.	Cdc	42-ko Mausmodell	4
3.4.	Ziel	der Arbeit1	6
4.	Mat	erial und Methoden1	7
4.1.	Mat	erialien1	7
4.1.1	1.	Geräte 1	7
4.1.2	2.	Verbrauchsmaterialien	8

4.1.3.	Reagenzien	. 19
4.1.4.	Antikörper und Farbstoffe	. 20
4.1.5.	Puffer und Medien	. 23
416	Oligonukleotide	27
4 4 7	Manaliaian	· _ ·
4.1.7.	Mausimen	. 28
4.1.8.	Software	. 28
4.2. Met	hoden	. 29
4.2.1.	Immunologische und zellbiologische Methoden	. 29
4.2.1.1	. Organentnahme und Herstellung von Einzelzellsuspensionen	. 29
4.2.1.2	Zellkultur	. 29
4.2.1.3	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) und fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung	. 31
4.2.1.4	In vitro TLR-Stimulation	. 33
4.2.1.5	. TLR-Ligand-Aufnahme	. 33
4.2.1.6	Glucose-Aufnahme	. 33
4.2.1.7	Behandlung der pDC-Kultur mit Inhibitoren	. 34
4.2.1.8	<ol> <li>Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)</li> </ol>	. 34
4.2.2.	Molekularbiologische und biochemische Methoden	. 35
4.2.2.1	. DNA-Isolierung aus Gewebebiopsien	. 35
4.2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion	. 35
4.2.2.3	Gelelektrophorese	. 36
4.2.2.4	RNA-Isolierung	. 37
4.2.2.5	cDNA-Generierung	. 37
4226	Quantitative PCR (gPCR)	37
4227	Western Blot	. 38
4.2.2.8	<ul> <li>Statistische Analyse</li> </ul>	. 38
5. Erg	ebnisse	. 39
5.1. Cdo	42-ko ex vivo pDC-Phänotyp	. 39
5.1.1.	Cdc42 beeinflusst pDC-Proliferation nicht	. 39
512	Cdc42 kontrolliert LAMP-1-Oberflächenexpression in ex vivo nDCs	40
0.1.2.		. +0
5.1.3.	Cdc42 beeinflusst Reifungsmarker-Level in ex vivo pDCs	. 41
5.2. Au	s Cdc42-ko Hoxb8-Zellen lassen sich pDCs nicht effizient generieren	. 43
5.3. Cdo	242-ko Phänotyp <i>in vitro</i> kultivierter pDCs	. 45
5.3.1.	Generierung von Cdc42-ko pDCs in vitro	. 45

5.3.2	2.	Cdc42-ko pDCs zeigen normale Oberflächenexpression pDC-assoziierter Proteine im	
		Steady State	. 46
5.3.3	3.	Phänotypische Reifung in vitro kultivierter Cdc42-ko pDCs	. 47
5.3.4	4.	In vitro kultivierte Cdc42-ko pDCs sind funktionell unverändert	. 50
5.	.3.4.1	Cdc42 kontrolliert CpG-FITC-Aufnahme nicht	. 50
5.	.3.4.2	2. Steady State TLR9-Expressionslevel ist in Cdc42-ko pDCs unverändert	. 51
5.	.3.4.3	<ol> <li>Cdc42 beeinflusst IFNAR-Expressionslevel im Steady State nicht</li> </ol>	. 52
5.	.3.4.4	<ol> <li>Cdc42 kontrolliert den endosomalen/lysosomalen Transportweg in pDCs nach</li> </ol>	
		Stimulation	. 53
5	.3.4.5	5. Cdc42 beeinträchtigt IFNα-Sezernierung in pDCs nicht	. 54
5.3.	5.	Cdc42 beeinflusst Flt3-Expressionslevel nicht und wirkt sich unwesentlich auf die Apopt	ose
		von <i>in vitro</i> kultivierten pDCs aus	. 56
5.3.	6.	Cdc42 beeinflusst basalen pDC-Metabolismus nicht	. 58
5.	.3.6.1	I. Vergleichbares mRNA-Level Glykolyse-assoziierter Gene	. 58
5.	.3.6.2	2. Glucose-Aufnahme ist in Cdc42-ko pDCs unverändert	. 58
5.	.3.6.3	3. Cdc42-ko pDCs zeigen eine normale mitochondriale Biomasse und ein unveränderte	es
		mitochondriales Membranpotenzial	. 59
5.4.	Eint	fluss des Cdc42-Inhibitors ML141 auf pDCs	. 61
5.4.	1.	pDC-Reifungsstatus ist durch Cdc42-Inhibition mittels ML141 nicht beeinflusst	. 62
5.4.2	2.	ML141-vermittelte Cdc42-Inhibition beeinflusst endosomales/lysosomales Kompartimen	ıt
		nicht	. 63
5.4.3	3.	Glucose-Aufnahme ist nach Cdc42-Inhibition durch ML141-Behandlung leicht erhöht	. 65
5.5.	Das	s Überleben von pDCs korreliert mit der Integrität des Aktin-Cytoskeletts	. 67
5.5.	1.	Der pDC-Reifungsstatus ist unverändert durch Inhibition des Aktin-Cytoskeletts	. 68
5.5.2	2.	Aktin-Cytoskelett-Inhibition beeinflusst endosomales/lysosomales Kompartiment in pDC	s
		nicht	. 69
6.	Dis	kussion	. 71
6.1.	Cdo	c42-ko pDCs zeigen unverändertes CD86-Oberflächen-Level	. 71
6.2.	Cdo	c42 beeinflusst Typ-I-IFN Sezernierung nicht	. 72
6.3.	Glu	cose-Aufnahme ist in Cdc42-ko pDCs unverändert	. 74
6.4.	Pro	liferation und Apoptose wird durch Cdc42 nicht beeinflusst	. 75
6.5.	Mö	glicherweise erfolgt eine Adaption an das reduzierte Cdc42-Level	. 76

6.6.	Schlussfolgerung	7
Refere	nzen7	8
Danks	agung	0
Eidess	stattliche Versicherung	1

# Abkürzungsverzeichnis

Arp2/3	actin related protein 2/3
BMDC	bone marrow-derived dendritic cell
BrdU	Bromdesoxiuridin
Cbl	casitas B-lineage lymphoma
CD	Differenzierungscluster (cluster of differentiation)
cDC	Konventionelle dendritische Zelle (conventional dendritic cell)
Cdc42	cell division cycle protein 42
CpG	CpG-Oligonukleotid
CpG-FITC	FITC-gekoppeltes CpG
CytD	Cytochalasin D
DC	Dendritische Zelle (dendritic cell)
DMEM-Medium	dulbecco's modified eagle-Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	epithelial growth factor receptor
FACS	fluorescence activated cell sorter
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum, FCS)
FHOD4	formin homology domain-containing protein 4
Flt3	fms-like kinase 3
Flt3L	fms-like kinase 3 ligand
FSC	forward scatter
GAP	GTPase aktivierendes Protein (GTPase-activating protein)
GDI	Guanin-Nukleotid Dissoziationsinhibitor (guanine nucleotide dissociation inhibitor)
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guaninnukleotid-Austauschfaktor (guanine nucleotide exchange factor)

GLUT	Glucosetransporter
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
HIF1α	hypoxia-inducible factor 1α
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
HSV	Herpes-simplex-Virus
IC	Intrazellulär
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon Typ-I-Rezeptor
lgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IRF	Interferonregulatorischer Faktor (interferon regulatory factor)
iTreg-Zellen	induzierte regulatorische T-Zellen
KM	Knochenmark
Ktr	Kontroll/Kontrolle
LAMP	lysosomal-associated membrane protein family member
LatB	Latrunculin B
LD	live-dead
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
MFI	median fluorescence intensity
mRNA	messenger RNA
NEAA	Nicht essentielle Aminosäuren (non-essential amino acids)
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
N-WASP	Neuronales WAS-Protein
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
pDC	Plasmazytoide dendritische Zelle (plasmacytoid dendritic cell)
POM	progenitor outgrowth medium

RNA	Ribonukleinsäure
Rho GTPase	Rho Familie der Guanosintriphosphatase
Rac1	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institute-Medium
R848	Resiquimod
SDS	sodium dodecyl sulfat
Siglec-H	sialic acid binding Ig-like lectin-H
Slc2a3	solute carrier family 2 member 3
SSC	side scatter
ssRNA	Einzelsträngige RNA (single stranded RNA)
TH17-Zellen	T-Helferzellen 17
TLR	toll-like-receptor
ΤΝϜα	Tumornekrosefaktor $\alpha$
UbiC	Ubiquitin C
WAS	Wiskott-Aldrich-Syndrom
WASP	WAS-Protein
WT	Wildtyp

# 1. Summary

Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) are key players during viral infections as they release large amounts of type I interferon in response to viral nucleic acids, which are sensed by the toll-like-receptor (TLR) 7 and TLR9.

Studies showed an influence of cell division cycle 42 (Cdc42) on processes which are crucial for TLR7/TLR9-mediated immune responses. Moreover, Cdc42 is known as an important regulator of several cellular mechanism, such as actin cytoskeleton organization, proliferation, apoptosis and cell metabolism.

To assess the importance of Cdc42 for antiviral responses and cellular functions in pDCs, we analyzed bone marrow-derived Cdc42-ko pDCs under steady state conditions or after stimulation.

We could not detect an impact of Cdc42 on the surface level of the maturation marker CD86 under steady state conditions. Furthermore *in vitro* stimulation failed to produce differences in CD86 surface levels between control pDCs and Cdc42-ko pDCs. However, Cdc42-ko pDCs showed an increased total LAMP-1 level after TLR stimulation indicating an altered endosomal/lysosomal compartment. This effect was not caused by enhanced TLR ligand uptake and was not accompanied by aberrant IFN $\alpha$  secretion.

Additional factors influencing pDCs or their functions, such as the surface expression levels of the growth-factor-receptor flt3, type I interferon receptor, glucose uptake or apoptosis were analyzed under steady state conditions but no clear difference between Cdc42-ko pDCs and control pDCs were found.

In conclusion our data show no distinct role for Cdc42 in type I interferon secretion, survival and metabolism in pDCs in the applied experimental setup.

# 2. Zusammenfassung

Bei der Bekämpfung viraler Erkrankungen spielen pDCs eine entscheidende Rolle. Als Reaktion auf virale Nukleinsäuren, die pDCs durch TLR7 und TLR9 erkennen, sezernieren sie schnell große Mengen Typ-I-Interferon.

Studien zeigen einen Einfluss von Cdc42 auf Abläufe, die für die TLR7-/TLR9-vermittelte Immunantwort entscheidend sind. Zudem ist Cdc42 als bedeutender Regulator einer Vielzahl weiterer zellulärer Prozesse wie der Organisation des Aktin-Cytoskeletts, der Proliferation, der Apoptose oder des Zellmetabolismus beschrieben.

Um den Einfluss von Cdc42 auf die antivirale Antwort und die zellulären Funktionen der pDCs zu untersuchen, wurden *in vitro* differenzierte Cdc42-ko pDCs im Steady State oder nach TLR-Stimulierung analysiert.

Dabei zeigte sich kein Einfluss von Cdc42 auf die Expression des pDC-Reifungsmarkers CD86 in nicht stimulierten pDCs. Auch nach *in vitro* TLR-Stimulation ergab sich kein Unterschied in der CD86-Oberflächenexpression in Cdc42-ko pDCs gegenüber Kontroll pDCs. Cdc42-ko pDCs zeigten jedoch ein erhöhtes totales LAMP-1-Level nach TLR-Stimulation, das auf ein verändertes endosomales/lysosomales Kompartiment hinweist. Dieser Effekt wurde allerdings nicht durch eine vermehrte Aufnahme des TLR-Liganden verursacht und nicht von einer veränderten IFNα-Sezernierung begleitet.

Auch die Untersuchung weiterer Faktoren, die pDCs oder deren Funktionalität beeinflussen, wie die Oberflächenexpression des Wachstumsfaktor-Rezeptors Flt3, des Typ-I-Interferon-Rezeptors, die Glucose-Aufnahme oder die Apoptoserate, zeigte keine auffallenden Unterschiede zwischen Cdc42-ko pDCs und Kontroll pDCs im Steady State.

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse unter den untersuchten Bedingungen keinen prägnanten Einfluss von Cdc42 auf die Typ-I-Interferon-Sezernierung, das Überleben und den Metabolismus in pDCs.

# 3. Einleitung

Für einen wirksamen Schutz gegen Krankheitserreger nutzen höhere Organismen zwei miteinander verbundene Abwehrsysteme, das angeborene und das adaptive Immunsystem. Das angeborene Immunsystem reagiert schnell auf Pathogene, weist jedoch nur eine beschränkte Spezifität gegen diese auf. Zellen des angeborenen Immunsystems aktivieren und rekrutieren Zellen des adaptiven Immunsystems. Diese reagieren spezifisch auf Antigene und bekämpfen Pathogene effizient. Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems zählen die dendritischen Zellen (*dendritic cells*, DCs), die als antigenpräsentierende Zellen Pathogene erkennen und von diesen stammende Antigene an Zellen des adaptiven Immunsystems, an T-Zellen, präsentieren. DCs werden derzeit in mehrere Untergruppen unterteilt, unter anderem in konventionelle DCs (cDCs) und pDCs.

## 3.1. pDCs

1958 berichteten Lennert und Remmele als Erste von einem Zelltyp in der T-Zell-Zone des menschlichen Lymphknotens mit Plasmazell-ähnlicher Morphologie [1]. Aufgrund dieser Morphologie und der Expression von Monozyten-Markern wurden diese Zellen zunächst als plasmazytoide Monozyten bezeichnet [2]. 1978 wurden Trinchieri und Kollegen auf eine kleine Zellpopulation im menschlichen Blut aufmerksam, die nach Inkubation mit Virus oder mit Virus infizierten Zellen für die Typ-I-Interferon-Produktion (Typ-I-IFN-Produktion) verantwortlich sind [3]. In den 1990er-Jahren wurden dann Ähnlichkeiten von stimulierten (CD40 Ligand, Interleukin (IL)-3) plasmazytoiden Monozyten mit dendritischen Zellen beschrieben [4]. Letztendlich brachten die Studien von Cella et al. und Siegal et al. 1999 Klarheit: Bei den von Lennert und Remmele beschriebenen plasmazytoiden Monozyten, die nach Stimulation dendritischen Zellen ähneln sowie bei den von Trinchieri identifizierten Interferon-produzierenden Zellen handelt es sich um denselben Zelltyp, um pDCs [5, 6].

### 3.1.1. Phänotyp der pDCs

pDCs sind eine seltene Immunzell-Population. Im menschlichen Blut sowie in murinen lymphatischen Organen sind nur 0,3-0,5% dieser Zellen zu finden. pDCs haben eine runde Form, ein ausgeprägtes endoplasmatisches Retikulum und damit die Morphologie eines sekretorischen Lymphozyts, was ihnen auch früh zu dem Namen "plasmazytoide" (dendritische) Zelle verhalf [1, 7]. Als Oberflächenmarker für murine pDCs gelten *sialic acid binding Ig-like* 

*lectin-H* (Siglec-H) sowie PDCA1 (auch bekannt als *bone marrow stromal antigen 2*) [8, 9]. Zudem wird B220 von pDCs exprimiert, wohingegen CD11b nicht oder nur in geringem Maße auf der Oberfläche dieser Zellen zu finden ist [10]. Im Vergleich zu cDCs exprimieren pDCs ein geringes Level an CD11c, an Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*; MHC)-Klasse-II sowie an kostimulatorischen Molekülen, die jedoch nach Stimulation, genauso wie das Expressionslevel von MHC-Klasse-II, aufreguliert werden [11-13]. Ein weiterer Marker, der den Aktivierungszustand der pDCs anzeigt, ist der frühe Aktivierungsmarker CD69. Dessen Expressionslevel wird ebenfalls durch die Stimulation der pDCs erhöht, wird aber auch direkt durch Typ-I-IFN modelliert [14].

### 3.1.2. Entwicklung und Lebensspanne der pDCs

pDCs entwickeln sich kontinuierlich im Knochenmark (KM) aus hämatopoetischen Stammzellen in Abhängigkeit des *fms-like kinase 3 ligand* (Flt3L) und dessen Rezeptor *fms-like kinase 3* (Flt3) (auch bekannt als CD135). Flt3L und dessen Rezeptor sind entscheidend für die Entwicklung, das Überleben und die Kontrolle der Vorläufer-Expansion [15, 16]. Mäuse, denen Flt3 oder der Flt3-Ligand fehlt, zeigen eine reduzierte Anzahl an pDCs sowie an cDCs [17]. Demgegenüber führt eine Überexpression oder exzessive Behandlung mit Flt3L zu einer erhöhten Anzahl an pDCs und an cDCs [18-21].

Die Entwicklung der pDCs ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. Für cDCs werden in erster Linie Zellen der myeloiden Lineage als Vorläufer angesehen. Im Gegensatz dazu ist für pDCs eine Entwicklung aus myeloiden Vorläufern aber insbesondere aus lymphatischen Vorläufern publiziert [22-27]. Einer aktuellen Studie zu Folge ist die Entstehung der pDCs ausschließlich auf lymphoide Vorläufer und damit auf eine von der myeloiden cDC Lineage unabhängige Entwicklung zurückzuführen [25].

Ausdifferenzierte pDCs verlassen das KM, zirkulieren im Blut und gelangen über hochendotheliale Venolen in den Lymphknoten. Abgesehen von sekundären lymphatischen Organen gelangen pDCs auch über das Blut in periphere Gewebe [5, 28-30]. Während im KM Flt3L die Differenzierung und Proliferation von pDC-Vorläufern fördert und sich etwa 3% der pDCs im Zellzyklus befinden, sind in Milz und Lymphknoten kaum proliferierende pDCs (<0,5%) vorhanden [31, 32].

Hinsichtlich der Langlebigkeit von pDCs gibt es kontroverse Studien. Parabiose-Experimente, bei denen zwei Mäuse mit verschiedenem Allotyp (CD45.1 und CD45.2) chirurgisch so miteinander verbunden wurden, dass sie sich einen Blutkreislauf teilen, zeigten nach der Trennung der Parabionten ein im Vergleich zu cDCs schnelleres Verschwinden der aus dem Parabiont-Partner stammenden pDCs. Dieser Befund spricht für eine kurze Lebenszeit der

pDCs [31]. Im Gegensatz dazu wurde eine langsame Inkorporation des Nukleosid-Analogons Bromdesoxiuridin (BrdU), das sich in die DNA von sich teilenden Zellen einlagert, von Milz pDCs im Vergleich zu cDCs, beschrieben. Dieser Befund wurde zunächst auf die Langlebigkeit der pDCs zurückgeführt [33, 34]. Die Studie von Zhan et al. machte darauf aufmerksam, dass die langsame BrdU-Inkorporationsrate auf die Migrationszeit der pDCs vom KM in die Milz zurückzuführen ist und damit die Lebenszeit von pDCs kürzer ist als durch die BrdU-Inkorporations-Experimente angenommen wurde. In dieser Studie wird eine, wie durch die Parabiose-Experimente aufgezeigt, eher kürzere Lebenszeit von pDCs vermutet [32]. Die Lebensspanne von pDCs wird zudem durch die pDC-Aktivierung sowie die IFNα-Präsenz beeinflusst. Unabhängig von seinem Ursprung (virale Infektion, TLR-Stimulation, rekombinantes IFN $\alpha$ ), induziert Typ-I-IFN Apoptose der pDCs und führt damit zu einer verringerten pDC-Population in vivo [35]. Für in vitro kultivierte pDCs hingegen wurde eine verbesserte Überlebensfähigkeit in Anwesenheit von IFNa beschrieben [36-38]. Zudem ist IFNa auch für die Entwicklung und das Überleben von pDC-Vorläufern in einem Typ-I-Interferon-Rezeptor (IFNAR)- und Flt3L-abhängigen Signalweg eine zentrale Komponente [16].

#### 3.1.3. pDC-vermittelte Immunantwort

Als Reaktion auf verschiedene Viren produzieren pDCs über 95% des durch periphere Blutzellen produzierten Typ-I-IFN, das dem 200- bis 1000-fachen des Typ-I-IFN, das von anderen Blutzellen produziert wird, entspricht [6, 39]. Dabei exprimieren stimulierte pDCs ein großes Spektrum an Typ-I-IFN, zu denen IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  und IFN $\omega$  zählen, sowie Typ-III Interferone (IFNλ1, IFNλ2, IFNλ3) [24, 40-42]. Typ-I-IFN wirken inhibierend auf die virale Infektion und dämmen damit die Ausbreitung dieser ein. Zudem induzieren Typ-I-IFN die Aktivierung weiterer Immunzellen der angeborenen Immunantwort wie natürliche Killer-Zellen oder cDCs und beeinflussen Zellen der adaptiven Immunantwort wie z. B. T-Zellen [36, 41, 43-46]. Außerdem sekretieren stimulierte pDCs pro-inflammatorische Zytokine wie IL-6 oder Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) und regulieren die Expression von kostimulatorischen Molekülen, wie CD86 sowie von MHC-Klasse-II, auf. Dies befähigt pDCs Antigene zu präsentieren und damit T-Zellen zu aktivieren [7, 47-49]. Die Effizienz der Antigenpräsentation wird jedoch kontrovers diskutiert [48-51]. Vorgeschlagen wird, dass durch den hohen MHC-Klasse-II-Turnover der pDCs eine Akkumulation von langlebigem MHC-Klasse-II-Peptid-Komplex auf der Zelloberfläche verhindert wird und dies eine im Vergleich zu cDCs eher weniger effiziente Antigenpräsentation zur Folge hat [13, 52]. Zudem wurde ein Einfluss verschiedener Faktoren auf die Effizienz der Antigenpräsentation der pDCs, wie zum Beispiel eine vorherige TLR-Stimulation, beschrieben [50, 53].

#### 3.1.3.1. pDCs erkennen Nukleinsäuren durch TLR7 und TLR9

Das breite Spektrum an Typ-I-IFN und die hohe Produktionsgeschwindigkeit zusammen mit der sekretorischen Fähigkeit diese massive Menge an IFN freizusetzen, verdeutlichen die besonderen Fähigkeiten der pDCs als "professionell IFN-produzierende Zellen". Diese Fähigkeiten sind mit besonderen Eigenschaften der pDCs sowie mit einem streng regulierten Aktivierungs-Signalweg assoziiert [24, 39, 41, 54].

Pathogene Bestandteile werden von pDCs durch die zu den *pattern recognition receptors* zählenden TLRs erkannt. pDCs exprimieren die intrazellulär lokalisierten TLRs, TLR7 und TLR9. Diese sind ohne Stimulus im endoplasmatischen Retikulum zu finden und werden von dort erst nach Stimulation in Abhängigkeit des endoplasmatischen Retikulum-ständigen Membranproteins UNC93B1 (*uncoordinated 93 homologue B1*) in das endosomale Kompartiment transportiert [55].

Für TLR9, jedoch nicht für TLR7, wird zunächst ein Transport an die Plasmamembran und nachfolgend über eine Clathrin-abhängige Endozytose der Weg in das endosomale Kompartiment postuliert. Für TLR7 hingegen ist ein direkter Transport in das endosomale Kompartiment beschrieben [56].

Durch die Reifung der Endosomen und die damit verbundene Ansäuerung erfolgt die enzymatische Abspaltung der TLR7- bzw. TLR9-Ektodomäne (durch Asparagin-Endopeptidasen und verschiedene Cathepsine), sodass ein funktionell aktiver TLR7 bzw. TLR9 entsteht [57-59]. Im endosomalen Kompartiment kommt es zur Interaktion zwischen TLR7 und Guanosin- oder Uridin-reicher einzelsträngiger RNA (*single stranded RNA*, ssRNA) von Viren oder zur Erkennung von synthetischen Verbindungen wie R848 [60-62]. Damit erkennen pDCs mittels TLR7 ssRNA Viren wie z. B. das Influenza-Virus. Zum anderen detektiert TLR9 im endosomalen Kompartiment DNA-Moleküle mit unmethylierten CpG-Oligonukleotiden und somit Viren mit doppelsträngiger DNA, wie z.B. Herpes-simplex-Viren sowie Bakterien [41, 63, 64].

#### 3.1.3.2. Aufnahme der TLR7-/TLR9-Liganden

Die Mechanismen, die zur Aufnahme des TLR7- oder TLR9-Liganden führen, sind bisher nicht vollständig verstanden. Da physikalisch (UV-Licht oder Hitze) inaktivierter Herpes-simplex-Virus oder inaktivierter Influenza-Virus eine effektive IFNα-Antwort in pDCs auslösen, wird vermutet, dass die Aufnahme und Erkennung von Nukleinsäuren unabhängig von einer viralen Infektion der pDC selbst ist [6, 10, 60, 65]. Im Gegensatz dazu induzieren andere Viren, wie der Vesicular stomatitis Virus, ein ssRNA Virus, nur als aktiv replizierender Virus eine Typ-I-IFN-Antwort in pDCs. Hierfür wird Autophagie als Mechanismus vorgeschlagen, der den Zugang von viralen Replikations-Intermediaten in Endosome ermöglicht und zur Aktivierung von TLR7 führt [66, 67].

Für pDCs wurde ein Mechanismus beschrieben, bei dem die Erkennung der viralen RNA, beispielsweise aus dem Hepatitis-C-Virus, dem Dengue-Virus oder dem Zika-Virus in Abhängigkeit des Kontakts zwischen pDC und infizierter Zelle, jedoch ohne Infektion der pDCs selbst, erfolgt. Dabei wird an der Kontaktseite eine spezialisierte Plattform gebildet, die den Transfer viraler RNA von der infizierten Zelle mittels Transportern, wie z. B. Exosomen, zu pDCs ermöglicht und entscheidend für die pDC-vermittelte IFN-Antwort ist [68-73]. Zu diesem Zell-Zell-Kontakt trägt das Aktin-Cytoskelett entscheidend bei [72, 73]. Eine Inhibition des Aktin-Cytoskeletts oder dessen Regulatoren actin related protein (Arp) 2/3 oder Cdc42 führen zu einer verminderten IFN<sub>α</sub>-Produktion [72]. Außerdem führt die Inhibition der Clathrin-abhängigen Endozytose, ein Endozytose-Mechanismus, der von der Clathrin-Anlagerung abhängig ist, sowie die Inhibition von Dynamin, das an der Abschnürung von beispielsweise Clathrinbeschichteten-Vesikeln beteiligt ist, zu einer verringerten Typ-I-IFN-Antwort der pDCs. Im Gegensatz dazu ist die IFNα-Produktion durch Blockierung der Makropinozytose, einem Aktinabhängigen Mechanismus, bei welchem extrazelluläre Flüssigkeiten und die darin gelösten Substanzen in die Zelle aufgenommen werden, nicht verändert [72, 73]. Damit scheint die Aufnahme durch diesen Zell-Zell-Kontakt-abhängigen Mechanismus Makropinozytoseunabhängig aber Clathrin- sowie Dynamin-abhängig zu sein [72, 73]. Über die Aufnahme von synthetisch hergestellten CpG-Oligonukleotiden in pDCs ist wenig bekannt. In der Publikation von Latz et al. wird von einem Caveolea-unabhängigen Aufnahmemechanismus in pDCs berichtet [55].

#### 3.1.3.3. Der TLR7-/TLR9-Signalweg

Die Interaktion zwischen proteolytisch geschnittenem TLR7/TLR9 und seinem Liganden induziert in Abhängigkeit der Lokalisation dieser Interaktion entweder die Typ-I-IFN-Produktion (*interferon regulatory factor* 7- Signalweg, (IRF7-Signalweg)) oder die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF $\alpha$  oder IL-6 sowie die Expression von Reifungsmarkern wie CD86 (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*-Signalweg, (NF- $\kappa$ B-Signalweg)) [30, 74-76]. Um eine entsprechende Reaktion koordinieren zu können, nutzen pDCs einen speziellen Regulationsmechanismus ihres endosomalen/lysosomalen Kompartiments. Dieser regelt den Zugang des TLR und seines Liganden zu verschiedenen Endosomen (frühe Endosome oder späte Endosome) und damit die Stimulierung des entsprechenden Signalweges [39, 76].

Für die Initiierung beider Signalwege erfolgt zunächst die MyD88 (*myeloid differentiation primary response 88*)-Rekrutierung. In frühen Endosomen führt die TLR-Stimulation zur

Einleitung des IRF7-Signalwegs. Dabei haben pDCs die einzigartige Fähigkeit Typ-A-CpG-Oligonukleotide, die spontan multimere Strukturen bilden und durch TLR9 erkannt werden, in frühen Endosomen zurückzuhalten. Dadurch wird eine intensive Aktivierung des IRF7-Signalwegs hervorgerufen [74, 77]. Diese Aktivierung führt letztendlich zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung von IRF7. Phosphoryliertes IRF7 transloziert in den Zellkern und induziert dort die Transkription der Typ-I-IFN-Gene und wird daher als Regulator der Typ-I-IFN-Immunantwort angesehen [39, 75] (Abbildung 1).





Die Aktivierung des TLR7 durch ssRNA oder die Stimulierung des TLR9 mittels unmethyliertem CpG induzieren in Abhängigkeit der Lokalisation zwei Signalwege. In frühen Endosomen wird der IRF7-Signalweg stimuliert, der zur Typ-I-IFN-Produktion führt. In späten Endosomen wird der NF-κB-Signalweg induziert, der die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und TNFα auslöst sowie zur Expression von Reifungsmarkern, wie CD80, CD86 und CD40 führt. Abgeändert übernommen von [39].

Im Gegensatz zu den meisten Immunzellen ist in pDCs die IRF7-Expression unabhängig von der IFNα induzierten IFNAR-Stimulation [78]. pDCs exprimieren ein stetig hohes Level an endogenem IRF7, das ihnen eine schnelle Typ-I-IFN-Produktion ermöglicht [42, 75].

Obwohl der IFNAR für pDCs nicht entscheidend für das IRF7-Level ist, spielt dieser Rezeptor dennoch eine wesentliche Rolle für die pDC induzierte Immunantwort. Wie aus Experimenten mit IFNAR<sup>-/-</sup> Mäusen hervorgeht, ist IFNAR essentiell für die Induktion einer vollständigen Typ-I-IFN-Antwort gegen synthetische TLR-Liganden *in vivo* sowie gegen bestimmte Viren *in vitro* [79-82].

Die Interaktion des TLR mit seinem Liganden in späten Endosomen und Lysosomen, die durch das Transmembranprotein *lysosomal-associated membrane protein-*1 (LAMP-1) gekennzeichnet sind, induziert den NF- $\kappa$ B-Signalweg [41, 74, 76]. Dieser führt zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B, das zusammen mit der MAPK (*mitogen activated protein kinase*) und IRF5 zur Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und TNF $\alpha$  führt [83]. Zudem wird

dadurch die Expression von Reifungsmarkern wie CD86 induziert und damit die adaptive Immunreaktion gefördert (Abbildung 1). Dieser Signalweg wird beispielsweise durch monomere Typ-B-CpG-Oligonukleotide induziert, die schnell von frühen Endosomen in späte Endosomen transportiert werden [74, 77].

#### 3.1.3.4. Fehlregulation der TLR7-/TLR9-vermittelten Immunantwort

Obwohl die TLR7-/TLR9-vermittelte Immunantwort streng reguliert wird, können auch unerwünschte TLR7-/TLR9-Aktivierungen in pDCs hervorgerufen werden, beispielsweise durch Immunreaktionen auf körpereigene Nukleinsäure, wie bei systemischem Lupus erythematodes. pDCs tragen durch die Sezernierung von großen Mengen an Typ-I-IFN zu dieser Autoimmunkrankheit bei. Dabei binden Komplexe aus körpereigener Nukleinsäure und Autoantikörper oder anti-mikrobiellem Peptid an Rezeptoren auf der Oberfläche der pDCs. Nach Internalisierung gelangen diese Komplexe in das endosomale/lysosomale Kompartiment, in dem sie die Typ-I-IFN-Sezernierung induzieren [24, 84].

Eine Fehlregulation des TLR7-/TLR9-Transportwegs wurde beispielsweise mit dem Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS) in Zusammenhang gebracht. Dabei handelt es sich um eine erbliche Erkrankung, bei der unter anderem eine chronische pDC-Aktivierung sowie ein erhöhtes Typ-I-IFN-Level festgestellt wurde. Als Ursache dafür wird eine Fehlregulation des intrazellulären Transports sowie der Kompartimentierung des TLR9-Liganden durch nicht funktionelles WAS-Protein (WASP), einem Regulator des Aktin-Cytoskeletts, beschrieben [85].

Auch Veränderungen der endosomalen Membranprotein-Zusammensetzung wirken sich stark auf die Aktivierung des IRF7-Signalwegs bzw. des NF-κB-Signalweges aus. So induziert beispielsweise die Abwesenheit der IRAP (*insulin- responsive aminopeptidase*), einer endosomal lokalisierten Transmembran-Aminopeptidase, einen beschleunigten TLR9- sowie CpG-Transport in DCs, der eine übermäßige TLR9-Aktivierung zur Folge hat [86]. Auch für LAMP-5, einem endosomalen Transmembranprotein, wurde eine regulierende Funktion des TLR9-Transports in humanen pDCs beschrieben. Dabei wurden bei veränderter LAMP-5-Expression starke Auswirkungen auf die Typ-I-IFN-Antwort sowie auf den NF-κB-Signalweg beobachtet [76].

### 3.1.4. pDC-Metabolismus

Die Aktivierung von Immunzellen durch beispielsweise *pattern recognition receptors* oder Zytokin-Rezeptoren induziert eine Umprogrammierung des Zellmetabolismus, die entscheidend für die Funktionalität der Zellen ist [87]. Hinsichtlich des Zellmetabolismus, den pDCs nach

Stimulation verstärkt nutzen, gibt es kontroverse Studien [88-90]. Die darin postulierten unterschiedlichen Stoffwechselwege sind nachfolgend kurz erläutert.

Nach der Aufnahme von extrazellulärer Glucose durch Glucosetransporter (GLUT) in die Zelle erfolgt im Zytoplasma der schrittweise Abbau der Glucose in Pyruvat (Glykolyse). Pyruvat kann durch einen energetisch ineffizienten Prozess in Lactat umgewandelt werden. Energetisch günstiger, jedoch nur in Anwesenheit von Sauerstoff möglich, ist die Einspeisung des Pyruvats in den Zitratzyklus mit nachfolgender oxidativer Phosphorylierung, die zur ATP (Adenosintriphosphat)-Generierung in den Mitochondrien führt. Zudem kann auch Glutamin durch Glutaminolyse in ein Zwischenprodukt des Zitratzyklus umgesetzt werden und damit in diesen einfließen.

Das aus Glucose entstandene Pyruvat kann in Acetyl-CoenzymA, einem Baustein für die *de novo* Fettsäuresynthese, umgewandelt werden. Fettsäuren können gespeichert oder in den Mitochondrien oxidiert (Fettsäureoxidation) werden, um den Zitratzyklus und anschließend die oxidative Phosphorylierung anzutreiben [91, 92].

Hinsichtlich der metabolischen Umprogrammierung, hervorgerufen durch die Stimulierung der pDCs *in vitro* mittels CpG, wurde eine vermehrte oxidative Phosphorylierung sowie Fettsäureoxidation in Abhängigkeit von IFN $\alpha$  und IFNAR postuliert. Dabei führte die Inhibition der *de novo* Fettsäuresynthese oder der Fettsäureoxidation zu einer verminderten pDC-Aktivierung, die sich durch eine reduzierte IFN $\alpha$ -Produktion sowie verminderte CD86-Expression zeigte [89]. Auch Basit et al. stellten eine vermehrte oxidative Phosphorylierung in human pDCs nach Stimulation mit ssmRNA fest. Angetrieben wird die oxidative Phosphorylierung, dieser Studie nach, durch verstärkte Glutaminolyse. Die Inhibition der Glutaminolyse oder die der oxidativen Phosphorylierung verhinderte die pDC-Aktivierung. Außerdem wurde für pDCs nach TLR-Stimulation eine vermehrte Expression von Proteinen, die sich positiv auf die Fusion von Mitochondrien auswirken, sowie eine erhöhte mitochondriale Masse festgestellt [90].

Im Gegensatz zu der von Wu et al. sowie Basit et al. gezeigten vermehrten oxidativen Phosphorylierung nach TLR-Stimulation beobachteten Bajwa et al. eine verstärkte Glykolyse nach Aktivierung humaner pDCs mit Rhino-Virus oder Influenza-Virus. Die Inhibition der Glykolyse führte zu einer verminderten pDC-Aktivierung nach Stimulation [88].

### 3.2. Rho GTPasen

Guanosintriphosphatasen (GTPasen) der Rho Familie (Rho GTPasen) sind in Eukaryonten konservierte molekulare Schalter. In Säugetierzellen wurden insgesamt 22 Gene identifiziert, die für Rho GTPasen codieren. Zu den am besten charakterisierten und konservierten Rho GTPasen zählen RhoA, *ras-related C3 botulinum toxin substrate 1* (Rac1) und Cdc42 [93, 94]. Als molekulare Schalter regulieren Rho GTPasen eine Vielzahl an zellulären Prozessen. Dazu alternieren Rho GTPasen zwischen einem aktiven (Guanosintriphosphat (GTP)-gebundenen) und einem inaktiven (Guanosindiphosphat (GDP)-gebundenen) Zustand hin und her. Dieser Prozess wird streng durch *guanine nucleotide exchange factors* (GEFs), *GTPase-activating proteins* (GAPs) sowie *guanine nucleotide dissociations inhibitors* (GDIs) reguliert. GEFs fördern den Austausch von GDP zu GTP und damit die aktive Form der Rho GTPase. Aktive Rho GTPasen interagieren mit ihren Effektor-Proteinen und induzieren nachgeschaltete Signalwege. Im Gegensatz dazu sind GAPs negative Regulatoren der Rho GTPase-Aktivität, indem sie durch Verstärkung der GTPase-Aktivität die Hydrolyse von GTP zu GDP induzieren. Zudem kann die Aktivität von Rho GTPasen durch GDIs blockiert werden. Diese stabilisieren die Rho GTPase in einem inaktiven, GDP-gebunden Zustand [95].



#### Abbildung 2: Regulationszyklus der Rho GTPasen.

Rho GTPasen schalten zwischen einem aktiven (GTP-gebundenen) und einem inaktiven (GDP-gebundenen) Zustand hin und her. Reguliert wird dieser Zyklus durch GEFs, die aktivierend auf Rho GTPase wirken, indem sie die GDP Freisetzung fördern. Aktive Rho GTPasen interagieren mit Effektor-Proteinen und lösen nachfolgende Signalwege aus. GAPs regen die Rho GTPase zur Hydrolyse des GTP zu GDP an und wirken damit inhibierend auf die Rho GTPase. Der inaktive Zustand der Rho GTPase (GDP gebunden) kann von GDIs stabilisiert werden. Abgeändert übernommen von [96].

Rho GTPasen regulieren eine Vielzahl zellulärer Prozesse. Nachfolgend wird auf ausgewählte, für diese Arbeit relevante Prozesse, eingegangen.

#### 3.2.1. Cdc42 als Regulator des Aktin-Cytoskeletts

Ein Mitglied der Rho GTPase-Familie ist Cdc42, das insbesondere als Regulator des Aktin-Cytoskeletts und der Zellpolarität bekannt ist [95]. Cdc42-GTP wirkt über eine Reihe von Effektor-Proteinen, zu denen die WASP, N-WASP und Formine gehören, auf das Aktin-Netzwerk. WASP und N-WASP verbinden Cdc42 mit dem Arp2/3-Komplex, welcher die Aktin-Keimbildung sowie die Polymerisation verzweigter Filamente induziert [95, 97-99]. Zudem werden Formine durch Cdc42 gefördert. Diese induzieren die Aktin-Keimzentrumbildung sowie die unverzweigten Filamente und deren Wachstum [95, 96, 100, 101].

Diese durch Cdc42 geförderte Aktin-Assemblierung ist entscheidend für beispielsweise die Form der Zellen sowie für die Ausbildung filamentöser Strukturen wie Stressfasern, Lamellipodien oder Filopodien [95, 96].

### 3.2.2. Cdc42 als Regulator des intrazellulären Transports

Die Polarisierung der Zelle ist ein durch Cdc42 regulierter Prozess der beispielsweise für die asymmetrische Zellteilung oder für die gerichtete Migration Voraussetzung ist [102]. In Epithelzellen führt die Expression eines nicht funktionellen Cdc42 (dominant negative Cdc42-Mutante) zu einem Verlust der basolateralen Polarität, die mit Fehltransporten von neu synthetisierten sowie von endozytierten Proteinen einhergeht [103].

Cdc42 steht außerdem mit weiteren intrazellulären Transportwegen in Zusammenhang. Die Endozytose kann in eine Clathrin-abhängige Endozytose und eine Clathrin-unabhängige Endozytose, die mehrere Aufnahmemechanismen einbezieht, unterteilt werden. Einige Studien geben Hinweise auf einen Einfluss von Cdc42 auf die Clathrin-abhängige Endozytose. Beschrieben ist ein Einfluss von Cdc42 auf die ACK-2 (*activated Cdc42-associated tyrosine kinase 2*), ein Cdc42-Effektor-Protein, das die Assemblierung von Clathrinen fördert [104]. Auch die Studie von Bu et al. zeigt einen Einfluss von Cdc42 auf die Clathrin-abhängige Endozytose, indem Cdc42 die Komplexbildung mit Toca-1 (*transducer of Cdc42-dependent actin assembly*) und N-WASP sowie die Aktivierung dieses Komplexes fördert. Diese Aktivierung führt zur Bildung einer tubulären Membraneinstülpung sowie zur Vesikelbildung, die im Zusammenhang mit Clathrinen steht [105].

Jedoch ist Cdc42 auch an der Regulierung mehrerer Clathrin-unabhängiger Endozytose-Mechanismen beteiligt. Beispielsweise ist in der Studie von Sabharanjak et al. ein Clathrinunabhängiger durch Cdc42 regulierter Transport von Glykosylphosphatidylinositol-Anker-Proteinen gezeigt [106].

Für DCs ist in einigen Studien, jedoch nicht in allen, eine Cdc42-Abhängigkeit der Antigen-Aufnahme beschrieben [107-110]. Zudem wurde Cdc42 kürzlich als positiv Regulator der Autophagie beschrieben sowie im Zusammenhang mit dem endosomalen/lysosomalen Kompartiment publiziert [111]. Eine bedeutende Rolle von Cdc42 für die lysosomale Integrität von cDCs konnte bereits von unserer Arbeitsgruppe aufgezeigt werden. Dabei führt der Verlust von Cdc42 in cDCs zu einer unkontrollierten und verstärkten Sekretion des lysosomalen Inhalts, die sich signifikant auf die Funktionalität der cDCs auswirkt [109]. Interessanterweise ist zudem *formin homology domain-containing protein* 4 (FHOD4), das entscheidend an der Transportgeschwindigkeit von TLR9-Endosomen beteiligt ist, als Cdc42-Effektor-Protein beschrieben. Ein FHOD4-Verlust durch *small hairpin* RNA in *in vitro* kultivierten, aus dem Knochenmark stammenden DCs hat eine verstärkte Sekretion an pro-inflammatorischen Zytokinen zur Folge [86, 112].

### 3.2.3. Cdc42 beeinflusst die Proliferation und Apoptose

Cdc42 wurde mit einer Vielzahl von humanen Tumoren (z. B. Brustkrebs, Darmkrebs, Hautkrebs) in Zusammenhang gebracht [113]. Beispielsweise verhindert konstitutiv aktives Cdc42 die c-Cbl (*casitas B-lineage lymphoma*)-vermittelte Degradierung des *epithelial growth factor receptors* (EGFR) und führt damit zur Akkumulation des EGFRs auf der Zelloberfläche. Die nachgeschalteten Signalwege dieses Rezeptors induzieren die Zellteilung und fördern das Überleben der Zelle [114, 115].

Jedoch wirkt Cdc42 auch direkt auf den Zellzyklus, indem es die G1/S Phase und damit die DNA-Replikation fördert [116, 117]. Die Unterdrückung der Cdc42-Expression durch *small interfering* RNA ist daher mit einer Inhibition des Zellzyklus assoziiert [118]. Während der Mitose reguliert Cdc42 sowie dessen Effektor-Protein mDia3 die Anlagerung der Chromosomen an die Mikrotubuli und erwies sich daher auch als entscheidend für eine fehlerfrei ablaufende Mitose [119].

Hinsichtlich des Einflusses von Cdc42 auf die Apoptose gibt es widersprüchliche Studien. Beispielsweise fördert die Überexpression von aktivem Cdc42 die Apoptose in Jurkat T-Zellen [120]. Auch in Osteoklasten scheint Cdc42 ein positiver Regulator des programmierten Zelltods zu sein [121]. Im Gegensatz dazu induziert Cdc42 in NIH3T3-Fibroblasten anti-apoptotische Signalwege und fördert das Überleben der Zellen [122].

### 3.2.4. Einfluss von Cdc42 auf den Zellmetabolismus

Kürzlich wurde von Kalim et al. publiziert, dass Cdc42 den Th17-Zellmetabolismus reguliert, der die Pathogenität dieser Zellen entscheidend beeinflusst. Dieser Studie zu Folge führt der Cdc42-Verlust sowohl zu einer verstärkten Expression an Glykolyse-assoziierten Proteinen als auch zu einer damit verbundenen verstärkten Glykolyse an sich [123]. Zu diesen Proteinen zählt der *hypoxia-inducible factor* 1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ), ein Transkriptionsfaktor, der zentral für die Expression von Proteinen der Glykolyse (z. B. Hexokinase1, Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase, GLUT1, GLUT3) ist und dessen Expression mit der Neuprogrammierung verschiedener Immunzellmetabolismen in Zusammenhang steht [124-127]. In der Studie von Kalim et al. wird der veränderte Metabolismus durch einen Cdc42-abhängigen Signalweg, der zur Unterdrückung von HIF1 $\alpha$  und zur Regulierung der Glykolyse führt, begründet [123]. Im Gegensatz dazu zeigte Kalim et al. in dieser Studie für iTreg-Zellen (induzierte regulatorische T-Zellen), dass die Cdc42-Abwesenheit eine verminderte Glykolyse und geringere Stabilität dieser Zellen zur Folge hat [123].

### 3.2.5. Funktion von Cdc42 in pDCs

Beschrieben wurde der Einfluss von Cdc42 auf verschiedene zelluläre Prozesse, die für pDCs und deren Funktionalität entscheidend sind und deutet damit auf eine Funktion von Cdc42 für pDCs hin. Bisher gibt es jedoch nur eine Studie, die Einblicke in die Rolle von Cdc42 für pDCs gibt. In dieser kürzlich veröffentlichten Studie wird auf eine Funktion von Cdc42 für die IFN-vermittelte antivirale Immunantwort der pDCs hingewiesen [72].

Um die Funktion von Cdc42 in pDCs aufzuklären, wurde eine knock out Maus verwendet, die durch das loxP/Cre-Rekombinations-System eine gezielte Cdc42-Deletion in CD11c positiven Zellen trägt.

## 3.3. Cdc42-ko Mausmodell

Da kein pDC spezifisches Cre-Rekombinase Maus-System existiert, pDCs aber CD11c exprimieren, nutzten wir Tg(Itgax-cre)1-1Reiz Mäuse, die wir zur Vereinfachung nachfolgend CD11c-Cre Mäuse nennen [7, 10, 128, 129]. Diese Tiere wurden zur Generierung von Cdc42-defizienten pDCs mit Cdc42tm1Brak Mäusen, die im folgenden Cdc42fl/fl benannt werden, verpaart [130].

Die unter dem CD11c-Promotor stehende Cre-Rekombinase (Cre) bindet an die loxP-Seiten, die sich im Exon 2 des Cdc42-Gens befinden. Die Cre-vermittelte Rekombination der loxP-Seiten führt zur Entfernung der loxP-flankierten Region und zur Entstehung einer nicht funktionellen Cdc42-mRNA in CD11c exprimierenden Zellen (Cdc42-Mutante) (Abbildung 3).



Abbildung 3: Schematische Darstellung der konditionellen Cdc42-Deletion in CD11c Cre Mäusen. Die unter der Kontrolle des CD11c-Promotors exprimierte Cre-Rekombinase bindet an die loxP-flankierende Region des Cdc42-Gens (Exon 2). Die Rekombination führt zur Entstehung einer nicht funktionellen Cdc42-mRNA. Abgeändert übernommen von [131].

### 3.4. Ziel der Arbeit

pDCs sind eine kleine Zellpopulation des angeborenen Immunsystems, die als Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort fungieren. pDCs agieren in erster Linie als sekretorische Zellen, indem sie als Reaktion auf TLR7- oder TLR9-Stimulation große Mengen Typ-I-IFN sezernieren aber auch pro-inflammatorische Zytokine freisetzen. Einige Studien zeigen eine Funktion von Cdc42 für Abläufe, die zur TLR7-/TLR9-vermittelten Immunantwort beitragen, wie beispielsweise für die Liganden-Aufnahme oder für die Funktionalität des endosomalen/lysosomalen Kompartiments [72, 86, 108-110]. Ob Cdc42 auch den endosomalen/lysosomalen Transport in pDCs und damit die Typ-I-IFN-Antwort dieser Zellen reguliert, ist bisher nicht bekannt. Die Stimulation der pDCs induziert jedoch nicht nur die Typ-I-IFN-Antwort, sondern auch ein erhöhtes Zelloberflächen-Level an kostimulierenden Molekülen, deren Level in *bone marrow-derived dendritic cells* (BMDCs) durch Cdc42 beeinflusst wird [109]. Auf der Grundlage dieser Publikationen bestand ein Ziel dieser Arbeit darin, den Einfluss von Cdc42 auf die Funktionalität der pDCs zu analysieren.

Cdc42 ist zudem als Regulator weiterer zellulärer Prozesse, wie der Proliferation, dem Zellmetabolismus oder der Apoptose, beschrieben [114-117, 120-123]. Dabei variiert die Funktion von Cdc42 in Abhängigkeit des Zelltyps. Welchen Einfluss Cdc42 auf diese zellulären Prozesse in pDCs hat, war bisher nicht bekannt und ist ebenfalls Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

Interessanterweise zeigten dieser Arbeit vorausgegangene Daten (generiert von Frau Dr. rer. nat. S. Stutte) eine erhöhte Zahl an pDCs im KM von Cdc42-ko Mäusen, wohingegen die Zahl an pDCs in peripheren Organen (Milz, Leber, Blut) dieser Mäuse reduziert war.





Absolute Zahl an pDCs im KM, Milz, Leber oder Blut von CD11c-Cre (Cre)- und Cdc42-ko Mäusen. Die Daten wurden von Frau Dr. rer. nat. S. Stutte generiert (nicht publiziert).

Auf diesem Befund basierend entstand die Hypothese, dass eine veränderte Proliferationskapazität oder Überlebensfähigkeit der Cdc42-ko pDCs möglicherweise eine Akkumulation dieser Zellen im KM verursacht (Abbildung 4). Damit lieferten diese Daten eine erste Grundlage zur Analyse der Funktion von Cdc42 im Kontext der pDC-Biologie.

# 4. Material und Methoden

## 4.1. Materialien

### 4.1.1. Geräte

 Gerät	
Agarosegel Dokumentation	Gel Doc; Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Chemikalienwaage	Kern & Sohn, Balingen, Deutschland
Durchflusszytometer	FACS Canto II, FACS Aria III; BD Bioscience Heidelberg, Deutschland
Elektronischer Dispenser	Multipette Xstream; Eppendorf, Hamburg, Deutschland
ELISA-Lesegerät	vmax kinetic microplate reader; Molecular Devices, Biberach, Germany
Feinwaage	Adventurer; Ohaus corporation, Pine Brooks, New York, USA
Inkubator	New Brunswick Galaxy 170S; Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kühltischzentrifuge	MIKRO 220R; Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Nanodrop	ND1000 Spectrophotometer; peqlab biotechnologie, Erlangen, Deutschland
PCR Machine	Biometra; Goettingen, Deutschland
pH-Meter	InoLab, Weilheim, Deutschland
Pipette	Gilson, Middelton, Wisconsin, USA
Real-time PCR Machine	CFX96 Real Time System; Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Spannungsversorger	Enduro 300V; Labnet, Edison, New Jersey, USA und Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Sterilbank	Flowsafe B [Max Pro] <sup>2</sup> 160; Berner, Elmshorn, Deutschland

Gerät	
Tischzentrifuge	MIKRO 200; Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Vakuum Pumpe	KNF Neuberger, Munzingen, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
Wasserbad	Grant Instruments Ltd. Barrington Cambridge, Großbritannien
Western blot Entwickler	Optimax; Protec, Oberstenfeld, Deutschland
Zellzähler	CASY cell counter and analyzer; OLS OMNI life science, Bremen, Deutschland
Zentrifuge	Heraeus Multifuge X3R; Thermo Fischer Scientific, Schwerte, Deutschland

## 4.1.2. Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
Einweginjektionsnadel (26 G x 1/2")	Braun, Melsungen, Deutschland
Einwegspritze (5 ml)	Braun, Melsungen, Deutschland
Einweg Zellenfilter (100 $\mu$ m)	Miltenyi biotech Bergisch-Gladbach, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße	VWR International, West, Belgien
Plastik Petrischalen	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
qPCR-Reaktionsgefäße	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße (15 ml; 50 ml)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsröhrchen 5 ml (FACS)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Serologische Pipetten (steril)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflaschen (T75, 2T5)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatten 96 Well U	Thermo Fischer Scientific, Schwerte, Deutschland

# 4.1.3. Reagenzien

Reagenz	Bezugsquelle
ß-Östradiol	Sigma Aldrich, Seelze, Deutschland
p-Ostradior	Signa Aidhch, Seeize, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Gibco life technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Cell Counting Beads	Thermo Fischer Scientific, Schwerte, Deutschland
COmplete EDTA free protease Inhibitor Tablets Cocktail	Roche, Basel, Schweiz
CpG-A (ODN1585)	InvivoGen, San Diego, Kalifornien, USA
CpG-FITC (ODN1585-FITC)	InvivoGen, San Diego, Kalifornien, USA
Cytochalasin D (CytD)	Sigma Aldrich, Seelze, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle (DMEM)-Medium	Gibco life technologies, Carlsbad, Kalifornien USA
DNA-Marker (1kb)	New England biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA
dNTP-mix	Genaxxon Bioscience, Ulm, Deutschland
ECL	PerkinElmer Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum ( <i>Fetal calf serum</i> , FCS)	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
Histopaque-1083	Sigma Aldrich, Seelze, Deutschland
Latrunculin B (LatB)	Calbiochem EMD Milipore, Billerica, Massachusetts, USA
Lipofectamin	Thermo Fischer Scientific, Schwerte, Deutschland
ML141	Sigma Aldrich, Seelze, Deutschland
NH4 (10x), MgCl <sub>2</sub>	PAN biotech, Aidenbach, Deutschland
Pharm lyse	BD Pharming, San Diego, Kalifornien, USA

Reagenz	Bezugsquelle
Nicht essentielle Aminosäuren (NEAA)	Gibco life technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Penicillin/Streptomycin (100x)	Gibco life technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Phosphate-buffered saline (PBS) (Zellkultur)	Sigma Aldrich, Seelze, Deutschland
Protein-Marker ( <i>Page Ruler plus prestained</i> )	Thermo Fischer Scientific, Schwerte, Deutschland
R848 (Resiquimod)	InvivoGen, San Diego, Kalifornien, USA
Rekombinantes murines IL-3	PeproTech, Rocky Hill, New Jersey, USA
Rekombinantes murines IL-6	PrepoTech, Rocky Hill, New Jersey, USA
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640+GlutaMAX-Medium	Gibco life technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Sodium Pyruvat	Gibco life technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
SsoFast EvaGreen Supermix	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
TRIzol	Lifetechnologies, Carlsbad, Kalifornien, USA

# 4.1.4. Antikörper und Farbstoffe

Antigen	Klon	Konjugat	Bezugsquelle
CD11b	M1/70	APC-Cy7	Invitrogen
		PE-Cy7 PE	Biolegend Biolegend
CD11c	N418	APC PE-Cy7	eBioscience Biolegend
CD19	6D5 1A8	PE-Cy7 PerCP	Biolegend Biolegend
	1D3/CD19	APC	Biolegend

FACS-Antikörper:

Antigen	Klon	Konjugat	Bezugsquelle
CD26	H194-112	APC PE	Biolegend Biolegend
CD45R (B220)	RA3-6B2	FITC <i>Brilliant Violet</i> APC PerCP	Biolegend Biolegend Biolegend Biolegend
CD62L	MEL-14	FITC	eBioscience
CD69	H1.2F3	PerCP PE	BD BD
CD86	GL-1	PE PerCP <i>Brilliant Violet</i>	eBioscience Biolegend Biolegend
CD107a (LAMP-1)	1D4B	FITC PE PE-CY7	Biolegend Biolegend Biolegend
CD135 (Flt3)	A2F10	APC	Biolegend
CD289 (TLR9)	M9.D6	FITC	Invitrogen
CD317 (PDCA1)	927	PE	Biolegend
IFNAR	MAR1-5A3	APC	Biolegend
Ki67	B56	PE	BD
Siglec-H	551	APC PerCP	Biolegend Biolegend
<u>Isotyp:</u>			

Rat IgG2a, κ

FITC

Biolegend

#### Farbstoffe:

Fluorophor/Fluoreszenz-gekoppelte Proteine	Bezugsquelle
Annexin V	abcam
MitoTracker Red CMXRos	life technologies
LysoTracker Green DND-26	molecular probes
MitoTracker Green FM	molecular probes

Die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen erfolgte mit Hilfe des *fixable viability dye eFluore 780* von eBioscience oder *zombie aqua fixable viability kits.* 

#### Western Blot Antikörper:

Antigen	Klon	lsotyp	Bezugsquelle
Cdc42	11A11	Kaninchen IgG	Cell Signaling
Tubulin	B-5-1-2	Maus IgG	SantaCruz

Der mit Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) konjungierte Esel anti-Hase IgG sowie der Esel anti Maus-HRP-IgG wurden von Jackson Immuno Research Laboratories (West Grove) bezogen.

#### Kits und ELISAs:

QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Fixation/Permeabilization Solution Kit	BD, San Diego, USA
Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set	BD, San Diego, USA
MyTaq Polymerase Kit	Bioline, London, Großbritanien
Mouse IFN $\alpha$ All Subtype ELISA Kit (High Sensitivity)	PBL, New York, USA

Sofern nicht anders angegeben, wurden Reagenzien und Chemikalien von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma (St. Louis, MO, USA) gekauft.

### 4.1.5. Puffer und Medien

#### Zellkulturmedien:

Einfriermedium:

90% FCS

10% DMSO

Hoxb8-FL- Stammzellmedium:

RPMI 1640 15% FCS (inaktiviert, v/v) 1% Penicillin/Streptomycin 10 ng/ml mIL-3 20 ng/ml mIL-6 1% Stammzell-Faktor

Hoxb8-FL-Differenzierungsmedium:

RPMI 1640+GlutaMAX
10% FCS (inaktiviert, v/v)
1% Penicillin/Streptomycin
30 μM β-Mercaptoethanol
5% Flt3L enthaltender Überstand einer B16-Zelllinie
(freundlicherweise von Frau Dr. Annette Zehrer zur Verfügung gestellt)

Hoxb8-FL-Vorläufer Wachstumsmedium progenitor outgrowth medium (POM):

RPMI 1640+GlutaMAX
10% FCS
1% Penicillin/Streptomycin
30 μM β-Mercaptoethanol
10 μM β-Östradiol
5% Flt3L enthaltender Überstand einer B16-Zelllinie
(freundlicherweise von Frau Dr. Annette Zehrer zur Verfügung gestellt)

pDC-DMEM-Medium:

DMEM 10% FCS (inaktiviert, v/v) 1% Penicillin/Streptomycin 1% Pyruvat 1% NEAA 50 μM β-Mercaptoethanol

pDC-DMEM-Medium ohne Glucose:

10% FCS (inaktiviert, v/v)
1% Penicillin/Streptomycin
1% Pyruvat
1% NEAA
50 μM β-Mercaptoethanol

#### pDC-RPMI-Medium:

RPMI 1640+GlutaMAX 10% FCS (inaktiviert, v/v) 1% Penicillin/Streptomycin 1% Pyruvat 1% NEAA 50 μM β-Mercaptoethanol

#### Puffer und Lösungen:

Zur Herstellung der Puffer und Lösungen wurde doppelt destilliertes Wasser verwendet.

FACS-Puffer:

PBS 2% FCS 2 mM EDTA

10x Gitocher-Puffer:

670 mM Tris, pH 8,8 166 mM Ammoniumsulfat 65 mM MgCl<sub>2</sub> 0,1% Gelatine PBS:

150 mM NaCl
10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
pH 7,4 mit 5 N NaOH einstellen

PBS-T:

1x PBS mit 0,1% Tween-20

sodium dodecyl sulfate (SDS) Lauf-Puffer:

192 mM Glycin 25 mM Tris 0,1% SDS

50x TRIS-Acetat-EDTA-Puffer:

242 g Tris 57,1 ml 100% Essigsäure 100 ml 0,5 M EDTA, (pH 8,0) mit H₂O auf 1 L auffüllen

5x Lade-Puffer:

50% Glycerin250 mM Tris (pH 6,8 mittels HCl eingestellt)500 mM Dithiothreitol10% SDS0,5% Bromphenolblau

Transfer-Puffer:

192 mM Glycin 25 mM Tris 20% Methanol 0,002% SDS 1x Gitocher-Puffer:

5 μl 10x Gitocher Puffer
2,5 μl 10% Triton X-100 (v/v)
0,5 μl β-Mercaptoethanol
3 μl Proteinase K (10 mg/ml)
39 μl H<sub>2</sub>O

SDS-Gel Zusammensetzung:

Die angegebenen Volumina wurden zur Herstellung von zwei SDS-Gelen verwendet.

Trenngel:

H<sub>2</sub>O (6,6 ml) 30% Acrylamid mix (8 ml) 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 (5 ml) 10% SDS (200 μl) 10% Ammoniumpersulfat (200 μl) Tetramethylethylendiamin (TEMED) (20 μl)

Sammelgel:

H<sub>2</sub>O (2,1 ml) 30% Acrylamid mix (500 μl)) 1 M Tris/HCl, pH 6,8 (380 μl) 10% SDS (30 μl) 10% Ammoniumpersulfat (30 μl) Tetramethylethylendiamin (TEMED) (20 μl)

## 4.1.6. Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von idtdna (Coralville, Iowa, USA) bezogen.

Gene	Primer Name	Sequenz
cre	Cre_Links:	5'-GGACATGTTCAGGGATCGCCAGGCG-3'
cre	Cre_Rechts:	5'-GCATAACCAGTGAAACAGCATTGCTG-3'
cdc42	Cdc42_Links:	5'-TCTGCCATCTACACATACAC-3'
cdc42	Cdc42_Rechts:	5'-ATGTAGTGTCTGTCCATTGG-3'
<u>qPCR Prime</u>	er	
Gene	Primer Name	Sequenz
cdc42	Cdc42_Links:	5'-ACAACAAACAAATTCCCATCG-3'
	Cdc42_Rechts:	5'-TTTTTGATACTGCAGGGCAA-3'
slc2a3	Slc2a3_Links:	5'-TTGCCCTGAGAGTCCAAGA-3'
	Slc2a3_Rechts:	5'-ACAAGCGCTGCAGGATCT-3'
hif1 $\alpha$	Hif1 $\alpha$ _Links:	5'-TTGCCCTGAGAGTCCAAGA-3'
	Hif1 $\alpha$ _Rechts:	5'-GTCACCTGGTTGCTGCAATA-2'
irf7	Irf7_Links:	5'-CTTCAGCACTTTCTTCCGAGA-3'
	Irf7_Rechts:	5'-TGTAGTGTGGTGACCCTTGC-3'
ubiC	UbiC_Links:	5'-GACCAGAGGCTGATCTT-3'
	UbiC_Rechts:	5'-CCTCTGAGGCGAAGGACTAA-3'
18S rRNA	18S_Links:	5'GCAATTCCCCATGAACG-5'
	18S Rechts:	5'-GGGACTTAATCAACGCAAGC-3'

Primer für die Genotypisierung
## 4.1.7. Mauslinien

Cdc42fl/fl-CD11c-Cre Mäuse, die nachfolgend Cdc42-ko Mäuse genannt werden, wurden durch die Verpaarung von Cdc42fl/fl Mäusen (Cord Brakebusch) [130] mit CD11c-Cre Mäusen (Boris Reizis) generiert [129].

Sofern verfügbar wurden CD11c-Cre Tiere als Kontrolle verwendet, anderenfalls wurden C57/BL6 Tiere genutzt. Diese beiden verwendeten Mauslinien wurden zusammengefasst als "Kontrollmäuse" (Ktr Mäuse) bezeichnet.

Alle Tiere wurden verpaart und gehalten im Tierstall des Instituts für Immunologie, Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München oder in der *Core Animal Facility* des Biomedizinischen Zentrums, LMU München.

## 4.1.8. Software

Flowjo Version 10	TreeStar, Ashland, Oregon, USA
Prism Version 7	GraphPad Software, La Jolla, Kalifornien, USA
Endnote X9	Clarivate Analytics, USA
FACs Diva	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Affinity Designer	Serif, Nottingham, Vereinigtes Königreich
Microsoft Office	Microsoft, Redmond, Washington, USA

## 4.2. Methoden

## 4.2.1. Immunologische und zellbiologische Methoden

## 4.2.1.1. Organentnahme und Herstellung von Einzelzellsuspensionen

Zur Organentnahme wurden die Tiere mittels CO<sub>2</sub> getötet und äußerlich mit 70% Ethanol desinfiziert. Die Organe wurden mit Hilfe von feinen Scheren und Pinzetten entnommen und bis zur weiteren Aufarbeitung in PBS auf Eis gelagert.

Für die Isolierung von KM-Zellen wurden Femur und Tibia einer Maus entnommen, von Muskeln und Sehnen gesäubert und anschließend die äußersten Enden der Knochen aufgeschnitten. Das KM wurde mit Hilfe einer 26 G Kanüle und einer 5 ml Spritze mit PBS, dem 2 mM EDTA zugesetzt wurde, gespült. Zur Lyse roter Blutzellen wurde die Zellsuspension für 2 min mit BD Pharm Lyse (BD-Pharming) inkubiert. Nach einem Waschschritt mit FACS-Puffer wurden die Zellen über einen 100  $\mu$ m Zellfilter gegeben und in Medium kultiviert (siehe 4.1.5.) oder direkt analysiert.

Zur Isolierung von Zellen aus der Milz wurden diese nach Entnahme enzymatisch für 20 min bei 37 °C verdaut. Hierzu wurde RPMI-Medium, dem die Enzyme Collagenase 4 (250  $\mu$ g/ml) (Worthington Biochemical Corporation) und DNase (400  $\mu$ g/ml) (Roche) zugegeben wurden, an mehreren Stellen in das Organ injiziert. Zur Generierung einer Einzelzellsuspension wurde die Milz anschließend mechanisch mit Hilfe eines Spritzenkolbens durch einen 100  $\mu$ m Zellfilter gerieben. Nach der Lyse der roten Blutzellen wurde die Zellsuspension im gewünschten Puffer aufgenommen.

## 4.2.1.2. Zellkultur

Alle verwendeten Zellkulturen wurden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> im entsprechenden Medium kultiviert.

#### pDC-Kultur Generierung:

Zur Generierung einer pDC-Kultur wurden KM-Zellen aus Femur und Tibia einer Maus, wie unter 4.2.1.1. beschrieben, isoliert. Die gewonnene Zellsuspension wurde in einer Konzentration von 1,5 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml in einer 20 cm Petrischale ausplattiert und für 7-11 Tage in pDC-Medium mit 20 ng/ml rekombinantem Flt3L (eBioscience) oder mit 3% Überstand einer Flt3L produzierenden CHO-Zelllinie (entspricht etwa 30 ng/ml Flt3L) kultiviert. Dieser Flt3L

enthaltende Überstand wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Andrea Musumeci (AG Prof. Dr. A. Krug, Institut für Immunologie, LMU) zur Verfügung gestellt.

#### Generierung der Hoxb8-Zelllinien:

Hoxb8-FL-Zellen wurden von Frau Dr. Annette Zehrer (AG Prof. Dr. B. Walzog, Institut für Kardiovaskuläre Physiologie und Pathophysiologie, LMU) im Rahmen einer Kooperation, wie von Redecke et al. beschrieben, generiert [132].

#### Retrovirus Produktion:

7x10<sup>6</sup> HEK293T-Zellen wurden in 10 ml DMEM ausplattiert. Am nächsten Tag wurden diese Zellen mit dem *pMSCVneo-ERHBD-HOXB8* Plasmid sowie dem Pack-Vektor pCL-EcO mittels Lipofectamin 2000 (ThermoFischer Scientific) ko-transfiziert und über Nacht inkubiert. Nach dem das Medium erneuert wurde, erfolgte eine weitere Inkubation für 48 Stunden. Der Überstand wurde anschließend durch eine Zentrifugation bei 4000 rpm für 10 min geerntet und bei -80 °C gelagert.

#### Generierung der Vorläufer-Zelllinien:

Knochenmark aus CD11c-Cre und Cdc42-ko Mäusen wurde wie unter 4.2.1.1. beschrieben isoliert und in 3 ml PBS mit 1% FCS aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde auf 3 ml Histopaque-1083 (Sigma Aldrich) geladen und für 30 min bei 400 xg zentrifugiert. Die Phase zwischen PBS und Histopaque wurde abgenommen und mit 1% FCS in PBS auf ein Volumen von 50 ml gebracht. Anschließend wurde bei 250 xg für 10 min zentrifugiert, erneut in 5 ml PBS mit 1% FCS resuspendiert und erneut bei 250 xg für 10 min pelletiert. Die Zellsuspension wurde in einer Konzentration von 5x10<sup>5</sup> Zellen/ml in Stammzell-Medium aufgenommen. Nach drei Tagen in Kultur wurden die Zellen geerntet und 3x10<sup>5</sup> Zellen zusammen mit 300 µl Virus enthaltendem Überstand sowie 0,1% Lipofectamin (ThermoFischer) in einem Endvolumen von 1 ml ausplattiert.

Nach Zentrifugation bei 1500 xg für 80 min wurden 1,5 ml frisches POM zugegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nachfolgend wurden 2 ml Medium entfernt und durch frisches Medium ersetzt. In der anschließenden Kultivierungsphase wurden die Zellen alle 3-5 Tage in frischem POM gesplittet bis sie stabil expandierten.

#### Ausdifferenzierung der Hoxb8-FL-Zellen:

5x10<sup>5</sup> Hoxb8-FL-Zellen wurden zunächst in 50 ml PBS mit 1% FCS gewaschen und anschließend in 10 ml Differenzierungsmedium in einer 10 cm Zellkulturschale aufgenommen. Die Analyse der Zellen erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten.

## 4.2.1.3. Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) und fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, welche die Untersuchung von Zellen anhand charakteristischer Merkmale wie Größe (forward scatter, FSC), Granularität (side scatter, SSC) oder molekularen Markern (Fluoreszenzintensität) ermöglicht. Dazu werden Einzelzellsuspensionen mit fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern, die spezifisch gegen bestimmte molekulare Marker der Zelle gerichtet sind, markiert. Diese passieren in einem Flüssigkeitsstrom einen Laser, der den Fluorophor anregt. Das emittierte Licht wird in ein elektronisches Signal umgewandelt und liefert Informationen über die Anzahl analysierter Zellen und über die Intensität der gebundenen fluoreszenz-gekoppelten Antikörper. Somit können mit dieser Methode Zellen mit bestimmten Charakteristika aus einer heterogenen Zellpopulation identifiziert werden.

Für diese Arbeit wurde das Durchflusszytometer FACS Canto II (BD) mit drei Lasern (405 nm, 488 nm und 633 nm) verwendet.

#### Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung:

Zur Zellsortierung von pDCs wurde ein FACS ARIA III Instrument (BD) eingesetzt, mit dessen Hilfe die Sortierung von pDCs anhand bestimmter Charakteristika durch einen elektrostatischen Sortiermechanismus erfolgt.

#### FACS-Oberflächenfärbung:

Zur Analyse von Zelloberflächenmarkern mittels Durchflusszytometrie wurden gleiche Mengen an Zellen in 50-100 µl FACS-Puffer, dem die entsprechenden fluoreszenz-markierten Antikörper (siehe 4.1.4.) zugesetzt wurden, aufgenommen. Dabei wurde jeder Antikörper zuvor titriert, um seine optimale Konzentration sicher zu stellen. Anschließend erfolgte eine Inkubation von 30 min bei 4 °C. Zur Entfernung von nicht gebundenen Antikörpern wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen. Der Ausschluss von toten Zellen erfolgte nach der Färbung der Oberflächenmarker für 10 min bei 4 °C mit *fixable viability dye eFluor 780* (eBioscience) oder mit *zombie Aqua fixable viability Kit* (biolegend), die beide in PBS angesetzt wurden. Zellen, die mittels Duchflusszytometrie als negativ für *fixable viability dye eFluor 780 oder zombie Aqua fixable viability* detektiert wurden, wurden nachfolgend als *live-dead* (LD) negativ (LD<sup>-</sup>) bezeichnet.

Sofern keine intrazelluläre Färbung nachfolgte, wurden die Zellen in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen und am FACS-Canto II analysiert oder zur Analyse am nachfolgenden Tag in 2% PFA fixiert.

#### Intrazelluläre FACS-Färbung:

Zum Nachweis intrazellulär lokalisierter Proteine wurden die Zellen nach der FACS-Oberflächenfärbung fixiert und unter Verwendung des *Cytofix Cytoperm Kits* (BD Biosciences) permeabilisiert.

Hierzu erfolgte zunächst nach der Färbung der Oberflächenproteine ein Waschschritt. Anschließend wurden die Zellen für 20 min mit *Cytofix* (BD Biosciences) im Dunkeln fixiert. Nach einem weiteren Waschschritt mit 1x *Permeabilization*-Puffer (BD Biosciences) wurden die Zellen für 30 min bei 4 °C mit dem entsprechenden Antikörper im Permeabilisierungs-Puffer gefärbt, gewaschen und anschließend am Durchflusszytometer analysiert.

#### Färbung nukleärer Antigene:

Für die Ki67-Färbung wurde das *Foxp3/Transcription Factor Staining buffer set* (eBioscience) verwendet. Hierbei wurden die Zellen nach der Oberflächenfärbung zunächst gewaschen und in *Fixation/Permeabilization* Puffer aufgenommen. Nach einer Inkubation von 20 min im Dunkeln folgte wieder ein Waschschritt mit 1x Permeabilisierungs-Puffer. Nachdem die Zellen für 30 min bei 4 °C mit anti-Ki67-Antikörper in Permeabilisierungs-Puffer gefärbt wurden, erfolgte ein erneuter Waschschritt und nachfolgend die Analyse der Zellen am FACS Canto II.

#### Annexin V-Färbung:

Zur Anfärbung von apoptotischen Zellen mittels Annexin V (abcam) wurden die Zellen einer *in vitro* pDC-Kultur zunächst gewaschen, in gleicher Zellzahl in technischen Replikaten ausplattiert und wie angegeben inkubiert. Anschließend erfolgte die Annexin V-Färbung sowie die FACS-Oberflächenfärbung in calciumhaltigem 1x *Binding*-Puffer.

#### MitoTracker Green FM-Färbung:

Zur Untersuchung der Mitochondrien-Biomasse wurde *MitoTracker Green FM* verwendet, der spezifisch in der mitochondrialen Matrix akkumuliert. 500 000 Zellen einer *in vitro* pDC-Kultur wurden pro Well, in technischen Replikaten, in einer 96 Well Platte ausplattiert. Um den Einfluss des Pipettierens zu reduzieren, wurden die Zellen in entsprechender Zellzahl zunächst für etwa eine Stunde in den Zellkultur-Inkubator gestellt. Anschließend wurde der im vorgewärmten pDC-Medium verdünnte *MitoTracker Green FM* zugegeben (Konzentration: 133 nM) und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Um nicht gebundenen Farbstoff zu entfernen, wurden die Zellen zweimal gewaschen und erneut bei 37 °C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt wurden die Zellen auf Eis gehalten, pDC spezifische Oberflächenproteine (FACS-Oberflächenfärbung) angefärbt und direkt am FACS Canto II analysiert.

#### MitoTracker Red CMXRos-Färbung:

250 000 Zellen einer *in vitro* pDC-Kultur wurden in fünf technischen Replikaten in einer 96 Well Platte ausplattiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen in vorgewärmtem Medium, das 100 nM *MitoTracker Red CMXRos* enthält, aufgenommen und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde zweimal gewaschen und die Zellen erneut für 60 min bei 37 °C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt erfolgte die FACS-Oberflächenfärbung und direkt im Anschluss die Analyse am Canto II.

#### LysoTracker Green DND-26-Färbung:

Nachdem 500 000 Zellen einer *in vitro* pDC-Kultur pro Well, in technischen Duplikaten, ausplattiert und die Zellen für eine Stunde im Brutschrank inkubiert wurden, wurden diese für eine Stunde mit 100 nM *LysoTracker Green DND-26*, der in vorgewärmtem pDC-Medium verdünnt wurde, inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal gewaschen und auf Eis gehalten. Nach der FACS-Oberflächenfärbung erfolgte direkt im Anschluss die Analyse der Zellen am FACS Canto II.

## 4.2.1.4. In vitro TLR-Stimulation

Gleiche Zellzahlen (den experimentellen Voraussetzungen entsprechend  $0.5x10^6$ -1x10<sup>6</sup> Zellen pro Well) einer *in vitro* pDC-Kultur wurden in einer 96 Well Platte ausplattiert. Die Zellen blieben entweder unbehandelt oder wurden mit 10 µg/ml R848 oder 3 µg/ml CpG-A für fünf bis sechs Stunden oder über Nacht bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und zur Analyse mittels Durchflusszytometrie gefärbt.

## 4.2.1.5. TLR-Ligand-Aufnahme

Zur Untersuchung der TLR-Ligand-Aufnahme wurden *in vitro* kultivierte pDCs in gleicher Zellzahl in einer 96 Well Platte in technischen Replikaten ausplattiert und entweder unbehandelt oder mit 3 µg/ml oder mit 10 µg/ml CpG-FITC für sechs Stunden inkubiert. Zum Abstoppen der Aufnahme wurden die Zellen zweimal mit kaltem FACS-Puffer gewaschen und anschließend auf Eis gehalten. Nach der FACS-Oberflächenfärbung erfolgte unmittelbar die Analyse der Zellen mittels Durchflusszytometrie.

#### 4.2.1.6. Glucose-Aufnahme

Um die Glucose-Aufnahme der *in vitro* kultivierten pDCs zu analysieren, wurden am Abend zuvor 250 000 Zellen pro Well in technischen Replikaten in pDC-Medium aufgenommen. Am nachfolgenden Morgen wurden die Zellen zunächst in PBS gewaschen und dann in PBS mit

FCS aufgenommen. Dieser Glucose-Entzug erfolgte für 30 min im Brutschrank. Anschließend wurde 2-NBDG (invitrogen), das in entsprechender Konzentration in vorgewärmtem Medium verdünnt wurde (5 μg/ml, 100 μg/ml), zugegeben und für 20 min inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen stets auf Eis gehalten. Nach zwei Waschschritten erfolgte zur Identifizierung der gewünschten Zellpopulation die Anfärbung entsprechender Oberflächenproteine und im unmittelbaren Anschluss die Analyse der Zellen am FACS Canto II.

## 4.2.1.7. Behandlung der pDC-Kultur mit Inhibitoren

pDCs wurden mit Substanzen behandelt, die zur spezifischen Inhibition bestimmter Prozesse führen. Dazu wurden *in vitro* kultivierte pDCs aus Kontrollmäusen (250 000-500 000 Zellen pro Well) in einer 96 Well Platte in pDC-Medium (pDC-RPMI oder pDC-DMEM) in gleicher Zellzahl ausplattiert und wie angegeben behandelt.

Name des Inhibitors	Zielstruktur	Konzentration	Referenz
CytD	Actin Cytoskelett	10 μg/ml	[109, 133]
LatB	Actin Cytoskelett	1 μg/ml	Dissertation: [134]
ML141	Cdc42	10 μΜ, 25 μΜ, 50 μΜ, 100 μΜ	[72, 135-137]

#### Glucose-Aufnahme von Inhibitor behandelten Zellen:

Zunächst wurden *in vitro* kultivierte Ktr pDC, wie angegeben, mit ML141 behandelt. Nach Entfernen des Mediums und damit der darin enthaltenen Glucose durch zwei Waschschritte, wurde mit DMEM-Medium ohne Glucose aber mit ML141 oder DMSO im Brutschrank für 30 min inkubiert. Vorgewärmtes Medium mit 100 µg/ml 2-NBDG sowie ML141 bzw. DMSO wurde direkt den Zellen zugefügt und erneut für 30 min im Brutschrank inkubiert. Nachdem durch zwei Waschschritte die nicht gebundene Glucose entfernt wurde, erfolgte eine FACS-Färbung der Oberflächenmarker und eine direkte Analyse der Zellen am FACS Canto II.

## 4.2.1.8. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Der Überstand von stimulierten *in vitro* kultivierten pDCs wurde nach Zentrifugation dieser Zellen bei 1500 rpm für 5 min bei 4 °C abgenommen und hinsichtlich des IFN $\alpha$ -Levels untersucht. Dabei wurde der IFN $\alpha$  ELISA (*VeriKine-HS Mouse IFN\alpha- All Subtype* ELISA *kit*, PBL) nach Herstellerangaben verwendet.

## 4.2.2. Molekularbiologische und biochemische Methoden

## 4.2.2.1. DNA-Isolierung aus Gewebebiopsien

Mausohrstanzungen wurden in Reaktionsgefäße überführt und enzymatisch durch Proteinase K für fünf Stunden bei 55 °C verdaut. Anschließend wurde der enzymatische Verdau bei einem siebenminütigen Inkubationsschritt bei 95 °C inaktiviert.

Reaktionsansatz des Biopsieverdaus:

1x Gitocher-Puffer (siehe 4.1.5.)
0,5% Triton-X-100 (v/v)
1% β-Mercaptoethanol
0,4 mg/ml Proteinase K
mit H<sub>2</sub>O auf 50 μl auffüllen

## 4.2.2.2. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode zur *in vitro* Amplifizierung einer DNA-Sequenz, die sich innerhalb zweier bekannter Sequenzen (Primer-Sequenzen) befindet.

PCR-Reaktionsansatz:

l9,9 μl	H₂O
8,5 μl	5x Taq Puffer
0,2 μl	Primer links (100 $\mu$ M)
0,2 μl	Primer rechts (100 $\mu$ M)
0,2 μl	Taq-Polymerase
1 μl	DNA

PCR-Reaktionsansatz (Alternative Cdc42 fl/fl PCR)

22,7 μl H<sub>2</sub>O
3 μl NH<sub>4</sub> (10x)
0,6 μl MgCl<sub>2</sub>
0,25 μl Primer (100 μM)
0,25 μl Primer (100 μM)
1,9 μl dNTPs
0,3 μl Taq-Polymerase
1 μl DNA

Cdc42fl/fl PCR (Produkte: 300 bp flx, 160 bp Wildtyp (WT))

Schritt 1: 95 °C	5 min	
Schritt 2: 95 °C	15 s	
Schritt 3: 55 °C	15 s	
Schritt 4: 72 °C	20 s	→ zurück zu Sch

→ zurück zu Schritt 2 (27x)

Alternative Cdc42fl/fl PCR (Produkte: 300 bp flx, 160 bp WT)

Schritt 1: 95 °C	2 min	
Schritt 2: 65 °C	20 s -ΔT (	°C): -1
Schritt 3: 75 °C	45 s	$\rightarrow$ zurück zu Schritt 1 (10x)
Schritt 4: 95 °C	30 s	
Schritt 5: 55 °C	30 s	
Schritt 6: 72 °C	45 s	→ zurück zu Schritt 4 (35x)

Cre-PCR-Programm (Produkte: 270 bp Cre, keine WT)

Schritt 1: 95 °C	5 min	
Schritt 2: 95 °C	30 s	
Schritt 3: 55 °C	30 s	
Schritt 4: 72 °C	45 s	→ zurück zu Schritt 2 (35x)
Schritt 5: 72 °C	5 min	

#### 4.2.2.3. Gelelektrophorese

Um die während der PCR entstandenen DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufzutrennen, wurde ein 1,5% Agarose-Gel in TRIS-Acetat-EDTA-Puffer gegossen, dem zur Visualisierung

der DNA 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben wurde. Zusätzlich zu den DNA-Proben wurde ein 1 kb DNA-Leiter (*new england biolabs*) auf das Agarose-Gel geladen. Die Analyse der Gele erfolgte mittels UV-Licht (Intas).

## 4.2.2.4. RNA-Isolierung

Zur RNA-Isolierung wurden die Zellen zunächst in 1 ml TRIzol (Life technologies) für 10 min auf Eis lysiert und anschließend mittels Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert. Hierzu wurden 200 µl Chloroform zugegeben, für 5 min inkubiert und bei 12 000 xg für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Nachfolgend wurde die wässrige, RNA beinhaltende, Phase vorsichtig abgenommen, in einem neuen Reaktionsgefäß mit 70% Ethanol gemischt und anschließend auf RNeasy Säulen aus dem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) geladen und nach Herstellerangaben aufgereinigt.

#### 4.2.2.5. cDNA-Generierung

Zur cDNA-Generierung wurde das *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet, das sowohl die Zerstörung der genomischen RNA als auch die anschließende Umschreibung der RNA in cDNA beinhaltet.

## 4.2.2.6. Quantitative PCR (qPCR)

Bei der quantitativen PCR handelt es sich um eine Methode, welche die Quantifizierung einer bestimmten cDNA-Sequenz und damit die Quantifizierung auf mRNA Ebene ermöglicht. Hierzu wurde der *SsoFast EvaGreen Supermix* verwendet. Dieses nutzt einen Farbstoff, der in jede doppelsträngige DNA interkaliert. Die verwendeten Primer sind unter 4.1.6. aufgelistet. Die Analyse erfolgte am *CFX96 Tough Real-Time PCR detection system* (Bio-rad).

Das Expressionslevel wurde zu 18S oder UbiC normalisiert und durch die 2<sup>-ΔC't</sup> Methode berechnet.

Reaktionsansatz qPCR:

10 μl *SsoFast EvaGreen Supermix* 2 μl Primer (100 μM) 3 μl cDNA 5 μl H<sub>2</sub>O

## 4.2.2.7. Western Blot

#### <u>Zelllysate:</u>

Zellen, deren Proteine mittels Western Blot analysiert werden sollten, wurden zunächst zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde pro 1x10<sup>6</sup> Zellen 10 µl 1x RIPA Lysis Puffer (Millipore) zugegeben, dem Protease Inhibitor Cocktail (Roche) zugesetzt wurde. Die Lysis erfolgte für 15 min auf Eis. Nachfolgend wurde bei 140 000 rpm, 4 °C für 15 min zentrifugiert und der klare Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Zur Bestimmung der exakten Proteinkonzentration wurde ein Bicinchoninsäure-Assay (ThermoFischer) durchgeführt. Anschließend wurden gleiche Mengen an Protein in 1x Lade-Puffer für 7 min bei 96 °C denaturiert.

#### SDS-PAGE und Western Blot:

Gleiche Mengen an Protein wurden auf ein 12% SDS-Gel (siehe 4.1.5.) geladen und für etwa 90 min bei 90-100 V aufgetrennt. Als Protein-Leiter wurde zusätzlich der *PageRuler prestained protein Ladder* (Thermo Scientific) geladen.

Nach Auftrennung der Proteine erfolgte der Transfer auf eine Nitrozellulosemembran (Whatmann) bei 90 V für 90 min in einem *tank-blot-system* (Bio-Rad). Anschließend wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 5% Milchpulver in PBS-T unter leichtem Schwenken geblockt und über Nacht mit dem ersten Antikörper, der in 5% *bovine serum albumin* in PBS-T angesetzt wurde, inkubiert.

Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran viermal für 10 min mit PBS-T gewaschen und anschließend mit dem zweiten, HRP-gekoppelten Antikörper, der in 5% Milchpulver in PBS-T verdünnt wurde, für 90 min inkubiert.

Nach abgelaufener Inkubationszeit wurde die Membran erneut viermal für 10 min mit PBS-T gewaschen und dem *Chemilumineszent western blot substrat* (PerkinElmer) ausgesetzt. Nach einer kurzen Inkubationszeit wurde die Membran in Kontakt mit dem *Amersham Hyperfilm* (GE Healthcare) gebracht und anschließend im Entwickler (Optimax) entwickelt.

## 4.2.2.8. Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte mit der PRISM Software (GraphPad).

Soweit nicht anders angegeben, wurde für die Balkendiagramme der Mittelwert +/-Standardabweichung aufgeführt. Die Signifikanzen wurden mittels *Student's t-test* mit nicht signifikant:  $p \ge 0.05$ , \*: p<0.05, \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001, \*\*\*\*: p<0.0001 bestimmt.

## 5. Ergebnisse

## 5.1. Cdc42-ko ex vivo pDC-Phänotyp

## 5.1.1. Cdc42 beeinflusst pDC-Proliferation nicht

Für viele Zelltypen wurde bereits eine bedeutende Rolle von Cdc42 für deren zelluläre Abläufe beschrieben [95, 96]. Über die Funktion von Cdc42 für pDCs ist bisher jedoch nur sehr wenig bekannt.

pDCs entwickeln sich im KM, zirkulieren im Blut und wandern in periphere oder lymphatische Gewebe ein [30]. In vorausgegangenen Experimenten unserer Arbeitsgruppe wurde eine erhöhte absolute Zahl an Cdc42-ko pDCs im KM festgestellt, die auf eine verstärkte Proliferation dieser Zellen hinweisen könnte (Abbildung 4, Daten generiert von Frau Dr. rer. nat. S. Stutte). Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden pDCs aus dem KM von Cdc42-ko Mäusen und von Ktr Mäusen isoliert, für das in kürzlich proliferierten Zellen zu findende nukleäre Ki67 angefärbt und durchflusszytometrisch untersucht [138, 139]. Dabei zeigte sich, dass zwischen 2% und 8% der KM-pDCs positiv für diesen Proliferationsmarker waren (Abbildung 5). Hinsichtlich des Prozentsatzes an Ki67<sup>+</sup> pDCs aus dem KM ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen pDCs aus Ktr und Cdc42-ko Mäusen (Abbildung 5).

Dies weist auf eine Cdc42-unabhängige Proliferation von KM-pDCs hin. Ursache für die in Abbildung 4 (Daten generiert von Frau Dr. rer. nat. S. Stutte) gezeigte Akkumulation der pDCs könnte beispielsweise eine verminderte Auswanderung der pDCs aus dem KM sein.





Zellen aus dem KM von Cdc42-ko und Ktr Mäusen wurden intrazellulär für Ki67 gefärbt und durchflusszytometrisch mit *gating* auf Lymphozyten, Einzelzellen, LD<sup>-</sup>, CD11b<sup>-</sup>, B220<sup>+</sup>, Siglec-H<sup>+</sup> (pDCs) analysiert. Gezeigt sind repräsentative FACS-Plots. Die Zahl im Plot entspricht dem Prozentsatz der Ki67<sup>+</sup> pDCs im gezeigten *gate*. Das Balkendiagramm zeigt die Prozentsätze der Ki67<sup>+</sup> pDCs aus einem Experiment mit n=3 je Gruppe. Gezeigt ist ein Experiment von zweien mit vergleichbarer Tendenz. Die statistische Analyse erfolgte mittels *Student's t-Test* (p-Wert lag über 0,05).

## 5.1.2. Cdc42 kontrolliert LAMP-1-Oberflächenexpression in *ex vivo* pDCs

Während der Analyse von Cdc42-ko pDCs aus dem KM fiel uns ein verändertes LAMP-1-Zelloberflächen-Level auf. LAMP-1 ist in erster Linie in der Membran von späten Endosomen sowie Lysosomen lokalisiert, gelangt jedoch aufgrund von beispielsweise lysosomaler Exozytose auch an die Oberfläche der Zelle [140-142]. Für BMDCs wurde bereits die Regulation der lysosomalen Integrität durch Cdc42 gezeigt. Ein Fehlen von Cdc42 führt in diesen Zellen zu einer unkontrollierten Sekretion des lysosomalen Inhalts und damit zu einem Verlust des intrazellulär lokalisierten LAMP-1 in Cdc42-ko BMDCs [109].

Der Einfluss von Cdc42 auf die lysosomale Integrität der pDCs wurde unter Verwendung des endosomalen/lysosomalen Markers LAMP-1 untersucht. Hierzu wurde dessen Expression auf der Zelloberfläche sowie intrazellulär von pDCs aus dem KM und aus der Milz durchflusszytometrisch bestimmt. Dabei wurde in Cdc42-ko pDCs eine erhöhte Anzahl an LAMP-1<sup>+</sup> pDCs sowohl im KM als auch in der Milz detektiert (Abbildung 6A). Zudem ergab sich ein erhöhtes LAMP-1-Expressionslevel auf der Oberfläche von Cdc42-ko pDCs, wie sich durch die erhöhte  $\Delta$ median fluorescence intensity ( $\Delta$ MFI) der Cdc42-ko pDCs in Abbildung 6B zeigt. Dieser Befund wurde nicht von einem veränderten intrazellulären LAMP-1-Level in Cdc42-ko pDCs begleitet (Abbildung 6C).

Das erhöhte Oberflächen LAMP-1-Level könnte ein Hinweis auf eine vermehrte Freisetzung des lysosomalen Inhalts oder eine reduzierte LAMP-1-Internalisierung in Cdc42-ko pDCs sein. Um diesem Befund weiter nachzugehen, wurde nachfolgend das Oberflächenlevel des membranständigen Reifungsmarkers CD86 untersucht.



#### Abbildung 6: Ex vivo Cdc42-ko-pDCs aus dem KM und der Milz weisen ein erhöhtes LAMP-1-Oberflächenlevel auf.

pDCs aus dem KM und der Milz von Ktr Mäusen und Cdc42-ko Mäusen wurden durch Lymphozyten, Einzelzellen, LD<sup>-</sup>, B220<sup>+</sup>, CD11b<sup>-</sup>, Siglec-H<sup>+</sup>, PDCA1<sup>+</sup> gating identifiziert.

- A)-B) Durchflusszytometrische Analyse der LAMP-1-Oberflächenexpression.
- A) Zeigt repräsentative FACS-Plots mit dem Prozentsatz an LAMP-1<sup>+</sup> pDCs im gezeigten gate. Das Balkendiagramm zeigt die Prozentsätze an LAMP-1<sup>+</sup> pDCs aus einem Experiment mit n=3-4 je Gruppe.
- B) Zeigt repräsentative Histogramme der LAMP-1-Oberflächenexpression sowie die ∆MFI (MFI<sub>(Probe)</sub>-MFI<sub>(ungefärbte Kontrolle)</sub>) LAMP-1-Werte als Balkendiagramm. Die Daten stammen aus einem Experiment mit n=3-4 je Gruppe.
- C) Durchflusszytometrische Analyse des intrazellulären LAMP-1-Levels von fixierten sowie permeabilisierten pDCs. Gezeigt sind repräsentative Histogramme des LAMP-1-IC-Expressionlevels und die ∆MFI (MFI<sub>(Probe)</sub>-MFI<sub>(ungefärbte Kontrolle)</sub>) LAMP-1-IC-Werte im Balkendiagramm. Daten stammen aus einem Experiment mit n=3-4 je Gruppe (IC: intrazellulär).

Die statistische Analyse erfolgte mittels Student's t-Test, mit \*\*: p<0,01.

## 5.1.3. Cdc42 beeinflusst Reifungsmarker-Level in ex vivo pDCs

Aufgrund eines Stimulus erhöhen DCs sowie pDCs das Zelloberflächen-Expressionslevel des kostimulatorischen Moleküls CD86, das entscheidend für die Aktivierung von T-Zellen ist. Für Cdc42-ko DCs ist auch in Abwesenheit eines Stimulus ein vermehrter Transport des kostimulatorischen Moleküls CD86 an die Zelloberfläche publiziert [109].

Um zu prüfen, wie sich Cdc42 auf das CD86-Level in pDCs auswirkt, wurden Primärzellen aus der Milz und dem KM von Cdc42-ko Mäusen und Ktr Mäusen isoliert und pDCs, die durch die Oberflächenmarker B220<sup>+</sup>, CD11b<sup>-</sup>, Siglec-H<sup>+</sup>, PDCA1<sup>+</sup> identifiziert wurden, hinsichtlich ihrer CD86-Oberflächenexpression durchflusszytometrisch untersucht. Dabei ergab sich eine

signifikant reduzierte Anzahl an CD86<sup>+</sup> Cdc42-ko pDCs im KM. Auch für die Anzahl an CD86<sup>+</sup> pDCs in der Milz wurde eine ähnliche Tendenz, die jedoch keine statistische Signifikanz aufwies, beobachtet (Abbildung 7A). Zudem zeigte sich ein reduziertes, jedoch statistisch nicht signifikantes CD86-Oberflächen-Expressionslevel von Cdc42-ko pDCs aus dem KM sowie aus der Milz (Abbildung 7B).



#### Abbildung 7: Ex vivo Cdc42-ko pDCs aus KM und Milz zeigen eine Tendenz zu einem reduzierten CD86-Oberflächen-Level.

pDCs aus dem KM und der Milz von Ktr Mäusen und Cdc42-ko Mäusen wurden durch Lymphozyten, Einzelzellen, LD<sup>-</sup>, B220<sup>+</sup>, CD11b<sup>-</sup>, Siglec-H<sup>+</sup>, PDCA1<sup>+</sup> gating identifiziert und hinsichtlich ihrer CD86-Oberflächenexpression durchflusszytometrisch analysiert.

- A) Zeigt repräsentative FACS-Plots mit dem Prozentsatz der CD86<sup>+</sup> pDCs im gezeigten gate. Im Balkendiagramm sind die Prozentsätze der CD86<sup>+</sup> pDCs aus einem Experiment mit n=3-4 gezeigt.
- B) Zeigt repräsentative Histogramme sowie die ∆MFI (MFI<sub>(Probe)</sub>-MFI<sub>(ungefärbte Kontrolle)</sub>) CD86-Werte aus einem Experiment mit n=3-4 im Balkendiagramm.

Die statistische Analyse erfolgte mittels Student's t-Test, mit \*: p<0,05.

## 5.2. Aus Cdc42-ko Hoxb8-Zellen lassen sich pDCs nicht

## effizient generieren

Die geringe Anzahl an pDCs in der Maus (lymphatische Organe 0,3-0,5%) erschwert die Analyse der pDCs im Maussystem [143]. Daher wollten wir uns das Hoxb8-System, das eine uneingeschränkte pDC-Zellzahl liefert und damit auch eine Reduktion der Anzahl an benötigten Mäusen ermöglichen würde, zunutze machen.

Im Rahmen einer Kooperation wurden von Frau Dr. Annette Zehrer, die in dieser Arbeit verwendeten Hoxb8-FL-Zellen, generiert. Hoxb8-FL-Zellen bilden eine homogene sich selbst erneuernde Zelllinie aus hämatopoetischen Vorläufern, die in Anwesenheit von Flt3L sowie von  $\beta$ -Östradiol (aktivem Hoxb8) in einem undifferenzierten Zustand gehalten werden. Erst durch das Entfernen des  $\beta$ -Östradiols und der damit verbundenen Beendigung der Hoxb8-Expression erfolgt die Differenzierung in DC-Subpopulationen (Abbildung 8A) [132].



#### Abbildung 8: Reduzierte pDC-Zahl nach Ausdifferenzierung von Cdc42-ko Hoxb8-Zellen.

Kontroll Hoxb8- und Cdc42-ko Hoxb8-Zellen wurden im Rahmen einer Kooperation von Frau Dr. Annette Zehrer generiert.  $5x10^5$  Kontroll Hoxb8- bzw. Cdc42-ko Hoxb8-Zellen wurden nach  $\beta$ -Östradiol-Entfernung in Differenzierungsmedium in je drei technischen Replikaten ausdifferenziert. An Tag 0, Tag 3 und Tag 6 wurden Zellen entnommen und durchflusszytometrisch untersucht.

- A) Stellt schematisch die experimentelle Hoxb8-FL-Differenzierung dar.
- **B**) Zeigt repräsentative FACS-Plots unter Angabe des Prozentsatzes an pDCs (*gating*: Lymphozyten, Einzelzellen, LD<sup>-</sup>, CD11b<sup>-</sup>, Siglec-H<sup>+</sup>) im gezeigten *gate* zum angegebenen Zeitpunkt.
- **C)** Zeigt den Mittelwert der absoluten Zahl an pDCs (*gating*: Lymphozyten, Einzelzellen, LD<sup>-</sup>, CD11b<sup>-</sup>, Siglec-H<sup>+</sup>) aus drei technischen Replikaten an Tag 3 und an Tag 6.

Die generierte Kontroll Hoxb8-Zelllinie und die Cdc42-ko Hoxb8-Zelllinie wurden nach β-Östradiol-Entzug und Flt3L-Zugabe für sechs Tage ausdifferenziert. Bereits nach drei Tagen zeigte sich eine reduzierte, prozentuale sowie auch absolute Zahl an lebenden pDCs in der Cdc42-ko Hoxb8-Zelllinie gegenüber der Kontroll-Zelllinie (Abbildung 8B, C). Dieser Befund war auch nach sechs Tagen beständig. An Tag sechs der Ausdifferenzierung zeigten sich abgesehen von pDCs (*gegated*) auch CD11b<sup>+</sup> sowie CD11b<sup>+</sup>Siglec-H<sup>+</sup> Zellen (nicht *gegated*) (Abbildung 8B). Da neben pDCs auch cDCs durch das Hoxb8-FL-System generiert werden, handelt es sich bei den CD11b<sup>+</sup> Zellen vermutlich um CD11b<sup>+</sup> DCs [132]. Die CD11b<sup>+</sup>Siglec-H<sup>+</sup> Zellpopulation konnte durch die im Experiment verwendeten FACS-Antikörper nicht weiter charakterisiert werden.

Auch eine achttägige Ausdifferenzierung oder die Verwendung von rekombinantem Flt3L (100 ng/ml oder 150 ng/ml) konnte keine Verbesserung der Cdc42-ko Hoxb8-Ausdifferenzierung erzielen (Daten nicht gezeigt). Damit war keine effiziente Cdc42-ko pDC-Generierung durch dieses System möglich.

## 5.3. Cdc42-ko Phänotyp in vitro kultivierter pDCs

## 5.3.1. Generierung von Cdc42-ko pDCs in vitro

Wie im Abschnitt zuvor gezeigt (5.2.) war keine effiziente Generierung von Cdc42-ko pDCs durch das Hoxb8-System möglich. Um eine ausreichende Zellzahl an pDCs zur Verfügung zu haben, wurden diese Zellen aus dem KM von Cdc42-ko Mäusen bzw. Ktr Mäusen *in vitro* generiert. Hierzu wurden KM-Zellen für 7-11 Tage mit Hilfe des pDC-Wachstumsfaktors Flt3L zu pDCs ausdifferenziert.

Um zunächst die Effizienz des knock outs in diesem System zu prüfen, wurden *in vitro* generierte pDCs aus Ktr Mäusen (Ktr pDCs) oder Cdc42-ko Mäusen (Cdc42-ko pDCs) hinsichtlich verbliebener *cdc42*-mRNA und CDC42-Protein analysiert. Hierfür wurden die generierten Ktr und Cdc42-ko pDCs mittels fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung sortiert (siehe Abbildung 9A). Die Analyse dieser Zellen ergab ein reduziertes *cdc42*-mRNA-Level sowie CDC42-Protein-Level in den Cdc42-ko pDCs (Abbildung 9B, C).



#### Abbildung 9: Reduziertes cdc42-mRNA-Level sowie CDC42-Protein-Level in Cdc42-ko pDCs.

- A) Exemplarische Zellsortierungsstrategie f
  ür in vitro kultivierte pDCs sowie zugeh
  örige Analyse der sortierten Zellen (Reanalyse). pDCs wurden durch die Oberfl
  ächenmarker B220<sup>+</sup>, CD19<sup>-</sup>, Siglec-H<sup>+</sup>, CD11b<sup>-</sup>, CD11c<sup>+</sup> identifiziert.
- B) In vitro generierte pDCs aus Ktr Mäusen bzw. Cdc42-ko Mäusen wurden mittels fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung isoliert und hinsichtlich ihrer relativen cdc42-mRNA-Expression mittels qPCR untersucht (Daten stammen aus einem Experiment mit Ktr: n=3; Cdc42-ko: n=4). Die statistische Analyse erfolgte mittels Student's t-Test, mit \*\*: p<0,01.</p>
- **C)** Repräsentativer Western-Blot zeigt CDC42-Expression von *in vitro* generierten Ktr und Cdc42-ko pDCs, die mittels fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung isoliert wurden. pDCs aus vier Ktr bzw. vier Cdc42-ko Mäusen wurden gepoolt. Gezeigt ist eines von drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

## 5.3.2. Cdc42-ko pDCs zeigen normale Oberflächenexpression pDC-assoziierter Proteine im Steady State

Um zunächst den Phänotyp der *in vitro* generierten Cdc42-ko pDCs zu charakterisieren, analysierten wir das Expressionslevel von pDC-assoziierten Oberflächenproteinen (B220, Siglec-H, CD11c, CD26, CD62L) durchflusszytometrisch. *In vitro* generierte pDCs wurden in dieser Arbeit, sofern nicht anders angegeben, durch das in Abbildung 10A gezeigte *gating* identifiziert. Für Cdc42-ko pDCs ergab sich ein minimal erhöhtes Zelloberflächen-Level der Protein-Tyrosin-Phosphatase B220, die normalerweise auf der Oberfläche der pDCs stark exprimiert ist. Für Siglec-H ergab sich ebenfalls ein geringfügig erhöhtes Expressionslevel auf der Oberfläche von Cdc42-ko pDCs im Vergleich zu Ktr pDCs. Das Oberflächen-Expressionslevel von CD11c, ein von pDCs exprimiertes Integrin, war auf der Oberfläche von Ktr und Cdc42-ko pDCs vergleichbar. Auch für L-Lektin (CD62L), das für die pDC Migration von Bedeutung ist, und für die Dipeptidylpeptidase CD26, die von pDCs exprimiert wird (Immgen-Datenbank: [144]), wurde kein verändertes Oberflächen-Expressionslevel festgestellt.

Damit ergab sich für Cdc42-ko pDCs im Vergleich zu Ktr pDCs ein unverändertes oder nur leicht verändertes Oberflächen-Expressionslevel der getesteten Proteine.



## Abbildung 10: Vergleichbares Oberflächen-Expressionslevel von pDC-assoziierten Proteinen in Ktr und Cdc42-ko pDCs.

- A) Gating-Strategie zur Identifizierung von in vitro generierten pDCs mittels Durchflusszytometrie.
- B) Die gezeigten Histogramme stellen die Expression der angegebenen Proteine auf der Oberfläche von Ktr und Cdc42-ko pDCs (gating: siehe Abbildung 10A) nach Inkubation für ein bis sechs Stunden in Medium dar. Repräsentative Histogramme wurden aus mindestens drei unabhängigen Experimenten mit n=1-4 (B220, Siglec-H, CD11c) bzw. aus zwei unabhängigen Experimenten mit je n=1 (CD26) ausgewählt bzw. stammen aus einem Experiment mit n=1 (CD62L).

## 5.3.3. Phänotypische Reifung in vitro kultivierter Cdc42-ko pDCs

*Ex vivo* Cdc42-ko pDCs aus der Milz und aus dem KM zeigten im Vergleich zu Ktr pDCs ein reduziertes Level an CD86, das jedoch keine statistische Signifikanz aufwies (Abbildung 7). Im Gegensatz dazu wurde für Cdc42-ko BMDCs im Steady State ein erhöhtes Level von CD86 auf deren Zelloberfläche und damit ein reifer Phänotyp dieser Zellen publiziert [109]. Um den Einfluss von Cdc42 auf den phänotypischen Reifungszustand von pDCs weiter zu untersuchen, wurde das Expressionslevel des Reifungsmarkers CD86 auf der Oberfläche von stimulierten und nicht stimulierten, *in vitro* generierter pDCs analysiert. In unbehandelten Zellen waren etwa 10% der Ktr sowie der Cdc42-ko pDCs CD86<sup>+</sup> (Abbildung 11A, obere Reihe). Damit zeigte sich ein unreifer Phänotyp beider pDC-Genotypen im Steady State. Zur Stimulation der pDCs wurden CpG-Oligonukleotide (CpG) verwendet, die als Ligand des TLR9 wirken. Eine sechsstündige CpG-Stimulation führte zum Anstieg der Anzahl an CD86<sup>+</sup> pDCs sowie zu einem erhöhten CD86-Expressionslevel. Jedoch ergab sich kein Unterschied zwischen Ktr und Cdc42-ko pDCs (Abbildung 11A, B).

Eine CpG-Stimulation für 16-18 Stunden induzierte in beiden pDC-Genotypen eine starke Aufregulation von CD86, die in Ktr sowie in Cdc42-ko pDCs vergleichbar war (Abbildung 11C, D). Da diese 16–18-stündige Stimulation vermehrten Zelltod in beiden pDC-Genotypen zur Folge hatte, wurde in den nachfolgenden Experimenten, sofern nicht anders angegeben, nur für fünf bis sechs Stunden stimuliert.



## Abbildung 11: Cdc42 hat keinen Einfluss auf das CD86-Oberflächen-Expressionslevel in *in vitro* kultivierten pDCs.

Durchflusszytometrische Analyse des CD86-Oberflächen-Expressionslevels von *in vitro* generierten Ktr und Cdc42-ko pDCs (*gating*: siehe Abbildung 10A)

- A)-B) Ohne Stimulation oder nach 5-6 Stunden CpG-Stimulation.
- A) Zeigt repräsentative FACS-Plots mit dem Prozentsatz der CD86<sup>+</sup> pDCs im gezeigten gate. Im Balkendiagramm sind die Prozentsätze der CD86<sup>+</sup> pDCs gepoolt aus vier unabhängigen Experimenten mit je n=1 (ohne Stimulanz) bzw. aus zwei unabhängigen Experimenten mit je n=1 (5-6 h CpG) dargestellt.
- B) Zeigt repräsentative Histogramme der CD86-Expression sowie die im Balkendiagramm aufgetragenen ∆MFI (MFI<sub>(Probe)</sub>-MFI<sub>(ungefärbte Kontrolle)</sub>) CD86-Werte gepoolt aus zwei unabhängigen Experimenten (mit je n=1).
- C)-D) Durchflusszytometrische Analyse des CD86-Expressionslevels ohne Stimulation oder nach 16-18-stündiger CpG-Stimulation.
- C) Zeigt repräsentative FACS-Plots mit dem Prozentsatz der CD86<sup>+</sup> pDCs im gezeigten gate. Im Balkendiagramm sind die Prozentsätze der CD86<sup>+</sup> pDCs aus vier unabhängigen Experimenten (mit n=1 oder n=2-3) gepoolt dargestellt.
- D) Zeigt repräsentative Histogramme der CD86-Expression sowie die im Balkendiagramm aufgetragenen ∆MFI (MFI<sub>(Probe)</sub>-MFI<sub>(ungefärbte Kontrolle)</sub>) CD86-Werte gepoolt aus vier unabhängigen Experimenten (mit n=1 oder n=2-3).

Sofern technische Replikate verwendet wurden, wurde deren Mittelwert gebildet und im Diagramm dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mittels *Student's t-Test* (p-Werte lagen über 0,05).

Ein weiterer Oberflächenmarker, der den Aktivierungszustand von pDCs anzeigt, ist der frühe Aktivierungsmarker CD69, dessen Expression sowohl nach Stimulation als auch nach Inkubation mit IFN $\alpha$  erhöht ist [14].

Vergleichbar zur CD86-Expression auf nicht stimulierten pDCs exprimierten etwa 5% der nicht stimulierten Ktr sowie Cdc42-ko pDCs CD69 auf ihrer Oberfläche (Abbildung 12A). Die CpG-Stimulation führte zu einem leichten Anstieg der Anzahl an CD69<sup>+</sup> Ktr sowie Cdc42-ko pDCs (Abbildung 12B) sowie zu einem signifikant erhöhten CD69-Oberflächen-Level in Cdc42-ko pDCs im Vergleich zu Ktr pDCs (Abbildung 12D). Die Stimulation durch den TLR7-Liganden R848 induzierte nach fünf Stunden einen aktivierten Phänotyp beider pDC-Genotypen, der sich

durch eine verstärkte CD69-Expression auf der Oberfläche der pDCs zeigte. Nach fünfstündiger R848-Stimulation wurden nahezu alle pDCs als CD69<sup>+</sup> detektiert (Abbildung 12C). Dabei ergab sich ein leicht erhöhtes, statistisch signifikantes CD69-Level auf der Oberfläche von Cdc42-ko pDCs im Vergleich zu Ktr pDCs (Abbildung 12E).



## Abbildung 12: Cdc42-ko pDCs zeigen leicht erhöhtes CD69-Oberflächen-Expressionslevel nach Stimulation.

Durchflusszytometrische Analyse des CD69-Oberflächen-Expressionslevels von *in vitro* generierten Ktr und Cdc42ko pDCs (*gating*: siehe Abbildung 10A)

- A) Ohne Stimulation. Gezeigt sind repräsentative FACS-Plots mit dem Prozentsatz der CD69<sup>+</sup> pDCs im gezeigten gate. Im Balkendiagramm sind die Prozentsätze der CD69<sup>+</sup> pDCs aus zwei unabhängigen Experimenten gepoolt (n=1 bzw. n=4) gezeigt.
- **B)-C)** Zeigen repräsentative FACS-Plots mit dem Prozentsatz der CD69<sup>+</sup> pDCs im gezeigten gate. Das Balkendiagramm zeigt die Prozentsätze der CD69<sup>+</sup> pDCs aus einem Experiment mit n=4 nach
- B) Fünf Stunden CpG-Stimulation oder
- **C)** Fünf Stunden R848-Stimulation.
- **D)-E)** Zeigen repräsentative Histogramme der CD69-Expression und die △MFI (MFI<sub>(Probe)</sub>-MFI<sub>(ungefärbte Kontrolle)</sub>) CD69-Werte im Balkendiagramm (Daten stammen aus einem Experiment mit n=4) nach
- **D)** Fünf Stunden CpG-Stimulation oder
- **E)** Fünf Stunden R848-Stimulation.

Sofern technische Replikate verwendet wurden, wurde deren Mittelwert gebildet und im Diagramm dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mittels *Student's t-Test*, mit \*: p<0,05.

Folglich weisen Cdc42-ko pDCs in Abwesenheit eines Stimulus keinen reifen Phänotyp auf, wie es für BMDCs publiziert wurde [109]. Die Stimulation des TLR9 durch CpG sowie die TLR7-Stimulation mittels R848 führte zu einem zwar nur schwach, aber dennoch signifikant erhöhten CD69-Expressionslevel auf der Oberfläche von Cdc42-ko pDCs im Vergleich zu Ktr pDCs. Ursache dafür könnte ein verstärkter CD69-Transport an die Zelloberfläche, ein abgeschwächter Internalisierungsmechanismus, eine veränderte TLR-Aktivierung oder IFN $\alpha$ -Erkennung nach Stimulation sein.

## 5.3.4. In vitro kultivierte Cdc42-ko pDCs sind funktionell unverändert

pDCs sind, insbesondere aufgrund ihrer Fähigkeit große Mengen an IFN $\alpha$  in Reaktion auf ssRNA oder unmethylierte DNA zu sezernieren, bekannt. Nach Aufnahme von ssRNA oder von unmethylierter DNA gelangen diese in das endosomale/lysosomale Kompartiment, in welchem sie mit dem TLR7 bzw. dem TLR9 interagieren. Dies führt zur Aktivierung der pDCs und damit zur Sezernierung von IFN $\alpha$  [41]. In einigen Studien wurde bereits ein Einfluss von Cdc42 oder von dessen Effektor-Proteinen auf Mechanismen beschrieben, die zur TLR7-/TLR9-vermittelten Immunantwort beitragen [85, 86, 108-110, 112]. Die Funktion von Cdc42 ist jedoch zelltypabhängig und über die Funktion von Cdc42 in pDCs ist bisher nur sehr wenig bekannt.

#### 5.3.4.1. Cdc42 kontrolliert CpG-FITC-Aufnahme nicht

Für DCs wurde bereits in einigen Studien, jedoch nicht in allen, eine Cdc42-abhängige Antigen-Aufnahme beschrieben [107-110]. Die Mechanismen, die in pDCs zur Aufnahme des TLR-Liganden führen, sind bisher nicht vollständig verstanden. Vorgeschlagen wird ein Mechanismus, der durch den Kontakt zwischen pDC und infizierter Zelle zur Bildung einer spezialisierten Plattform an der Kontaktseite führt. Diese Plattform ermöglicht den Transfer viraler RNA von infizierten Zellen in pDCs. Die aufgenommene virale RNA führt dann zur TLR7-Stimulation und zur Typ-I-IFN-Antwort der pDCs [68-73]. Dabei wurde eine Abhängigkeit dieses Mechanismus von funktionellem Aktin-Cytoskelett und ein Einfluss von Cdc42 auf die pDCvermittelte IFN-Antwort aufgezeigt [72].

Um den Einfluss von Cdc42 auf die direkte Internalisierung von Nukleinsäuren zu untersuchen, wurden Ktr und Cdc42-ko pDCs mit FITC-gekoppeltem CpG (CpG-FITC) *in vitro* inkubiert und anschließend die Internalisierungskapazität mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Da kein fluoreszierendes R848 (TLR7-Ligand) kommerziell erhältlich war, wurde nachfolgend nur die CpG-Aufnahme mittels CpG-FITC eruiert. Hierbei wurde eine vergleichbare Anzahl an Ktr bzw. Cdc42-ko pDCs, die CpG-FITC aufgenommen haben (CpG-FITC<sup>+</sup> pDCs), detektiert (Abbildung 13A). Auch eine Erhöhung der CpG-FITC-Konzentration, die zwar in beiden pDC-Genotypen zu einer vermehrten CpG-FITC-Aufnahme führte, zeigte keinen Unterschied in der Anzahl an CpG-FITC<sup>+</sup> pDC zwischen den beiden Genotypen (Abbildung 13B). Zudem nahmen Cdc42-ko und Ktr pDCs eine ähnliche Menge an CpG-FITC auf, wie sich durch die vergleichbaren CpG-FITC-Intensitäten zeigt (Abbildung 13C, D).



#### Abbildung 13: Cdc42-ko pDCs zeigen normale CpG-FITC-Aufnahme.

In vitro kultivierte Ktr und Cdc42-ko pDCs (gating: siehe Abbildung 10A) wurden für sechs Stunden mit CpG-FITC inkubiert.

- A)-B) Zeigen repräsentative FACS-Plots ausgewählt aus drei technischen Replikaten. Die Zahl im Plot entspricht dem Prozentsatz der CpG-FITC<sup>+</sup> pDCs im gezeigten gate. Im Balkendiagramm ist der Mittelwert der Prozentsätze an CpG-FITC<sup>+</sup> pDCs gebildet aus drei technischen Replikaten gezeigt.
- A) Nach Inkubation mit 3 µg/ml CpG-FITC (Daten sind gepoolt aus zwei unabhängigen Experimenten, dabei entspricht Kreis und Dreieck je einem Experiment mit n=1.
- B) Nach Inkubation mit 10 µg/ml CpG-FITC (Daten stammen aus einem Experiment).
- C)-D) Zeigen ein repräsentatives Histogramm des CpG-FITC-Levels sowie den MFI CpG-FITC-Mittelwert gebildet aus mindestens technischen Triplikaten im Balkendiagramm.
- C) Nach Inkubation mit 3 µg/ml CpG-FITC (Daten sind gepoolt aus zwei unabhängigen Experimenten, dabei entspricht Kreis und Dreieck je einem Experiment mit n=1.
- D) Nach Inkubation mit 10 µg/ml CpG-FITC (Daten stammen aus einem Experiment).

## 5.3.4.2. Steady State TLR9-Expressionslevel ist in Cdc42-ko pDCs unverändert

Als nächstes wurde der Einfluss von Cdc42 auf die Expression des in erster Linie endosomal lokalisierten TLR9, einer weiteren, entscheidenden Komponente des Aktivierungs-Signalwegs in pDCs, untersucht. Dabei zeigte Cdc42 keinen Effekt auf das totale (intra- und extrazelluläre) TLR9-Level, wie aus dem in Abbildung 14 dargestellten Histogramm und dem zugehörigen Balkendiagramm hervorgeht.

Da TLR9 weder auf der Zelloberfläche von aktivierten noch auf der von nicht-aktivierten pDCs detektiert werden konnte, handelt es sich bei dem in Abbildung 14 gemessenen totalen TLR9 vermutlich um intrazellulär lokalisiertes TLR9 (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 14: Unverändertes totales TLR9-Expressionslevel in Cdc42-ko pDCs.** *In vitro* kultivierte Cdc42-ko und Ktr pDCs (*gating*: siehe Abbildung 10A) wurden fixiert, permeabilisiert und mit anti-TLR9-Antikörper angefärbt. Gezeigt sind ein repräsentatives Histogramm der totalen (intra- und extrazellulären) TLR9-Expression und die  $\Delta$ MFI (MFI<sub>(Probe)</sub>-MFI<sub>(ungefärbte Kontrolle)</sub>) TLR9-total-Werte im Balkendiagramm. Die Daten stammen aus einem Experiment mit n=3, die statistische Analyse erfolgte mittels *Student's t-Test* (p-Wert lag über 0,05).

#### 5.3.4.3. Cdc42 beeinflusst IFNAR-Expressionslevel im Steady State nicht

Ein weiterer Rezeptor, der für eine effiziente Typ-I-IFN-Antwort von Bedeutung ist, ist der IFNAR. Dieser erkennt IFN $\alpha$  sowie IFN $\beta$  und induziert die Expression von *interferon stimulated genes,* die unter anderem anti-virale Prozesse fördern [145, 146]. Die Abwesenheit dieses Rezeptors wird in der Literatur mit einer verminderten IFN $\alpha$ -Freisetzung in Verbindung gebracht [79-82]. Dieser sowohl für die Funktionalität als auch für das Überleben von pDCs wichtige Rezeptor wurde auf der Oberfläche von Ktr und Cdc42-ko pDCs durchflusszytometrisch analysiert [16].





A) Gezeigt sind repräsentative FACS-Plots mit dem Prozentsatz der IFNAR<sup>+</sup> pDCs im gezeigten gate.

B) Ein repräsentatives Histogramm der IFNAR-Expression, ausgewählt aus drei technischen Replikaten.

Gezeigt ist ein Experiment mit n=1 von zweien mit vergleichbarem Ergebnis.

Die IFNAR-Expression wurde auf der Oberfläche aller pDCs sowohl der Ktr als auch der Cdc42-ko pDCs detektiert (Abbildung 15A). Zudem wurde, wie durch das repräsentative Histogramm gezeigt, ein vergleichbares IFNAR-Expressions-Level auf der Oberfläche von Ktr und Cdc42-ko pDCs festgestellt.

## 5.3.4.4. Cdc42 kontrolliert den endosomalen/lysosomalen Transportweg in pDCs nach Stimulation

Um die Rolle von Cdc42 für den Aktivierungs-Signalweg in pDCs weiter zu untersuchen, lag der Fokus als nächstes auf dem endosomalen/lysosomalen Transportweg. In diesem findet die Interaktion des TLR7 mit seinem Liganden R848 sowie die Interaktion zwischen TLR9 mit CpG statt. Hierfür ist zum einen die korrekte Reifung der Endosomen vom frühen Endosom bis zum Lysosom und zum anderen der fehlerfreie Transport von TLR7/TLR9 und dem entsprechenden Liganden in diesem Kompartiment entscheidend [41]. Eine bedeutende Funktion von Cdc42 für dieses Kompartiment wurde bereits für BMDCs publiziert. Dabei wurde in Cdc42-Abwesenheit ein Defekt in der lysosomalen Integrität der BMDCs, der zu einer unkontrollierten Ausschüttung des lysosomalen Inhalts führt und damit die Funktionalität dieser Zellen stark einschränkt, publiziert [109]. Interessanterweise wurde den Cdc42-Effektor-Proteinen FHOD4 und WASP eine wichtige Funktion für die Regulation des endosomalen Transports, der sich entscheidend auf die TLR9-Aktivierung auswirkt, zugeschrieben [85, 86, 97, 112].

Um die Rolle von Cdc42 für das endosomale/lysosomale Kompartiment zu eruieren, wurde zunächst das Level an späten Endosomen und Lysosomen unter Verwendung des LysoTracker Greens, der in diesen sauren Kompartimenten akkumuliert, untersucht. In nicht stimulierten pDCs zeigte sich hierbei eine vergleichbare LysoTracker Green-Intensität in Ktr und Cdc42-ko pDCs (Abbildung 16A), die auf einen Cdc42-unabhängigen Ansäuerungs-Mechanismus der Endosomen hinweist. Um diesem Befund weiter nachzugehen, wurden in vitro kultivierte pDCs fixiert, permeabilisiert und mit einem LAMP-1-spezifischen Antikörper angefärbt. LAMP-1 kann beispielsweise aufgrund von Exozytose des lysosomalen Inhalts an die Zelloberfläche gelangen, ist jedoch in erster Linie in der Membran von späten Endosomen und Lysosomen und somit intrazellulär vorzufinden [140-142]. Unter Steady State Bedingungen ergab sich ein vergleichbares Level an totalem LAMP-1 in Ktr und Cdc42-ko pDCs (Abbildung 16B). Die Stimulation mittels R848 oder CpG hingegen induzierte ein signifikant erhöhtes totales LAMP-1-Level in Cdc42-ko pDCs, das auf eine Beeinträchtigung des endosomalen/lysosomalen Transports nach Stimulierung in Cdc42-ko pDCs hinweist (Abbildung 16C). Dieser Befund warf die Frage auf, ob die Typ-I-IFN-Antwort der pDCs durch diese Veränderung beeinflusst wird.



Abbildung 16: Cdc42 wirkt sich nach Stimulation auf das endosomale/lysosomale Kompartiment aus.

- A) In vitro kultivierte Ktr und Cdc42-ko pDCs (gating: siehe Abbildung 10A) wurden für eine Stunde mit LysoTracker Green inkubiert, zweimal gewaschen und für pDC-Marker gefärbt. Gezeigt ist ein repräsentatives Histogramm sowie die im Balkendiagramm dargestellten Mittelwerte der ΔMFI (MFI<sub>(Probe)</sub>-MFI<sub>(ungefärbte Kontrolle)</sub>) LysoTracker Green-Werte, die aus technischen Duplikaten gebildet wurden (n=2, Daten stammen aus einem Experiment).
- B)-D) Durchflusszytometrische Analyse des totalen (intra- und extrazellulären) LAMP-1-Levels von *in vitro* kultivierten, fixierten und permeabilisierten Ktr und Cdc42-ko pDCs (*gating*: siehe Abbildung 10A). Gezeigt sind repräsentative Histogramme sowie die ∆MFI (MFI<sub>(Probe)</sub>-MFI<sub>(ungefärbte Kontrolle)</sub>) LAMP-1-total-Werte relativ zum Mittelwert der Ktr ∆MFI (MFI<sub>(Probe)</sub>-MFI<sub>(ungefärbte Kontrolle)</sub>) LAMP-1-total-Wert vom Ktr ∆MFI (MFI<sub>(Probe)</sub>-MFI<sub>(ungefärbte Kontrolle)</sub>) LAMP-1-total-Wert vom Ktr ∆MFI (MFI<sub>(Probe)</sub>-MFI<sub>(ungefärbte Kontrolle)</sub>) LAMP-1-total-Wert.
- B) Ohne Stimulanz (Daten sind gepoolt aus zwei unabhängigen Experimenten mit n=1 bzw. n=4).
- **C)** Nach fünfstündiger R848-Stimulation (Daten stammen aus einem Experiment mit n=4).
- D) Nach fünfstündiger bis sechsstündiger CpG-Stimulation (Daten sind gepoolt aus zwei unabhängigen Experimenten mit n=1 bzw. n=4).

Sofern technische Replikate verwendet wurden, wurde deren Mittelwert gebildet und im Diagramm dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mittels *Student's t-Test* mit \*: p< 0,05, \*\*\*: p<0,001.

#### 5.3.4.5. Cdc42 beeinträchtigt IFNα-Sezernierung in pDCs nicht

Um die IFNα-Sezernierungskapazität von Cdc42-ko pDCs zu untersuchen, wurde zunächst das *irf*7 mRNA-Level unter Steady State Bedingungen analysiert. IRF7 ist ein in pDCs konstitutiv exprimierter Transkriptionsfaktor, der durch die Stimulation von TLR7 und TLR9 aktiviert wird und anschließend die Transkription der Interferon Typ-I-Gene reguliert [42, 75]. Die Analyse dieses Transkriptionsfaktors auf mRNA-Level mittels qPCR ergab unter Steady State Bedingungen keinen signifikanten Unterschied zwischen Ktr und Cdc42-ko pDCs (Abbildung 17A). Das IFN $\alpha$ -Level wurde nach fünfstündiger R848-Stimulation im Zellüberstand mittels ELISA bestimmt. Wie aus Abbildung 17B hervorgeht, konnte im Überstand von nicht stimulierten pDCs kein IFN $\alpha$  detektiert werden. Obwohl eine geringe IFN $\alpha$ -Sezernierung durch pDCs publiziert ist, liegt dieses Level nach fünfstündiger Stimulation unterhalb der Detektionsgrenze des verwendeten ELISAs (Abbildung 17B) [85]. Die R848-Stimulation induziert eine IFN $\alpha$ -Sezernierung, deren Level sich jedoch zwischen Ktr und Cdc42-ko pDCs nicht signifikant unterscheidet. Damit weist dieser Befund auf keinen Einfluss von Cdc42 auf die durch R848 induzierte IFN $\alpha$ -Sezernierung in pDCs hin.



#### Abbildung 17: Cdc42 beeinflusst IFN<sub>α</sub>-Sezernierungslevel nicht.

- A) In vitro generierte Ktr und Cdc42-ko pDCs wurden mittels fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (siehe Abbildung 9A) isoliert und hinsichtlich ihrer relativen *irf7*-mRNA-Expression mittels qPCR analysiert (Daten stammen aus einem Experiment mit n=3-4).

Die statistische Analyse erfolgte mittels Student's t-Test (p-Werte lagen über 0,05).

Zusammenfassend zeigten Cdc42-ko pDCs weder eine veränderte Aufnahme des TLR9-Liganden CpG-FITC noch ein verändertes totales Expressionslevel seines Rezeptors TLR9 oder des Levels an IFNAR. Demgegenüber war ein Einfluss von Cdc42 auf das endosomale/lysosomale Kompartiment nach Stimulation zu beobachten. Dies wirkte sich jedoch nicht auf die IFNα-Sezernierung aus.

# 5.3.5. Cdc42 beeinflusst Flt3-Expressionslevel nicht und wirkt sich unwesentlich auf die Apoptose von *in vitro* kultivierten pDCs aus

Einige Studien berichten, dass sich Cdc42 auf das Überleben der Zellen auswirkt. Publiziert wurde dabei sowohl ein positiver als auch ein negativer Cdc42-Einfluss auf das Überleben der Zellen [120-122]. Diese Cdc42-vermittelten Mechanismen sind jedoch Zelltyp spezifisch und unbekannt für pDCs.

In pDCs reguliert die Rezeptor-Tyrosinkinase Flt3 die Entwicklung sowie die Expansion und das Überleben der pDC-Vorläuferzellen [15, 16]. Um den Einfluss von Cdc42 auf diesen Rezeptor zu untersuchen, wurde dessen Expressionslevel auf der Oberfläche von Ktr und Cdc42-ko pDCs mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Anzahl an Flt3<sup>+</sup> pDCs lag sowohl bei Ktr als auch bei Cdc42-ko pDCs im Mittel bei etwa 40% (Abbildung 18A). Auch hinsichtlich des Flt3-Oberflächen-Levels ergab sich kein Unterschied zwischen Ktr und Cdc42-ko pDCs (Abbildung 18B). Damit zeigte sich kein Einfluss von Cdc42 auf das Flt3-Oberflächen-Level in pDCs.



#### Abbildung 18: Cdc42 beeinträchtigt Flt3-Oberflächen-Level nicht.

*In vitro* kultivierte Cdc42-ko und Ktr pDCs (*gating*: siehe Abbildung 10A) wurden durchflusszytometrisch hinsichtlich ihres Flt3-Oberflächen-Expressionslevels analysiert.

- A) Gezeigt sind repräsentative FACS-Plots mit dem Prozentsatz der Flt3<sup>+</sup> pDCs im gezeigten gate. Im Balkendiagramm sind die Prozentsätze der Flt3<sup>+</sup> pDCs aus zwei unabhängigen Experimenten gepoolt gezeigt (n=1 bzw. n=3). Sofern technische Replikate verwendet wurden, wurde deren Mittelwert gebildet und in die Statistik einbezogen.
- B) Zeigt ein repräsentatives Histogramm der Flt3-Expression und die im Balkendiagramm aufgetragenen MFI Flt3-Werte. Sofern technische Replikate verwendet wurden, wurde deren Mittelwert gebildet und in die Statistik einbezogen (Daten sind gepoolt aus zwei unabhängigen Experimenten mit n=1 bzw. n=3).

Die statistische Analyse erfolgte mittels Student's t-Test (p-Werte lagen über 0,05).

Aufgrund von Studien, die einen Einfluss von Cdc42 auf das Überleben von Jurkat-T-Zellen, Osteoklasten und Fibroblasten zeigen, wurde nachfolgend der Einfluss von Cdc42 auf die Apoptose der pDCs untersucht [120-122]. Hierzu wurde den pDCs zunächst der Wachstumsfaktor Flt3L entzogen und anschließend mit Annexin V, einem Farbstoff, der Phosphatidylserine auf der Plasmamembran bindet, gefärbt. Dabei sind extrazellulär lokalisierte Phosphatidylserine ein charakteristisches Merkmal für apoptotische Zellen [147]. Nach 30 Stunden wurden nur wenige apoptotische Zellen detektiert. Dabei ergab sich kein nennenswerter Unterschied in der Anzahl an Annexin V<sup>+</sup> pDCs (etwa 2%) zwischen Ktr und Cdc42-ko pDCs. Auch nach 72 Stunden ergab sich eine vergleichbare Apoptoserate der beiden pDC-Genotypen (Abbildung 19). Somit scheint Cdc42 die Apoptose der pDCs nur in geringen Maßen zu beeinflussen.



#### Abbildung 19: Geringfügiger Einfluss von Cdc42 auf die Apoptose von pDCs.

*In vitro* kultivierte Ktr und Cdc42-ko pDCs (*gating*: siehe Abbildung 10A) wurden mit Annexin V sowie mit pDC-Markern in Annexin V-*Binding* Puffer gefärbt und durchflusszytometrisch nach Flt3L-Entzug für 30 Stunden oder 72 Stunden analysiert. Gezeigt sind repräsentative FACS-Plots ausgewählt aus technischen Triplikaten. Die Zahl im Plot entspricht dem Prozentsatz der Annexin V<sup>+</sup> pDCs im gezeigten *gate*. Im Balkendiagramm sind die Mittelwerte der Prozentsätze der Annexin V<sup>+</sup> pDCs gebildet aus technischen Triplikaten gezeigt (n=1).

Folglich beeinflusst Cdc42 das Oberflächen-Expressionslevel von Flt3 nicht. Der Einfluss von Cdc42 auf die Apoptose der pDCs ist unter den hier untersuchten Bedingungen nicht konsistent und bedarf weiterer Validierung.

## 5.3.6. Cdc42 beeinflusst basalen pDC-Metabolismus nicht

## 5.3.6.1. Vergleichbares mRNA-Level Glykolyse-assoziierter Gene

Kürzlich wurde für Th17-Zellen sowie für iTreg-Zellen gezeigt, dass deren Metabolismus entscheidend durch Cdc42 reguliert wird. In dieser Publikation wurde in Abwesenheit von Cdc42 für Th17-Zellen eine verstärkte und für iTreg-Zellen eine verminderte Glykolyse beschrieben [123].

Um den Einfluss von Cdc42 auf den pDC-Metabolismus zu untersuchen, wurde zunächst das mRNA-Level von Glykolyse-assoziierten Genen untersucht. Die Expression von Glykolyse-assoziierten Genen wurde nach Cdc42-Verlust in der Publikation von Kalim et al. für Th17-Zellen als verstärkt und für iTreg-Zellen als vermindert gezeigt [123]. Zu diesen Genen zählt das für HIF1 $\alpha$  codierende Gen. Wie in Abbildung 20A gezeigt, ergab sich in Cdc42-ko pDCs kein signifikant verändertes relatives *hif1* $\alpha$ -mRNA-Level. Da pDCs der Immgen Datenbank zufolge vermehrt GLUT3 exprimieren, wurde der Einfluss von Cdc42 auf diesen GLUT, für den eine hohe Glucose-Affinität sowie hohe Transportkapazität beschrieben wurde, analysiert (Immgen Datenbank: [144]), [148]. Im Vergleich zu Ktr pDCs zeigte sich für Cdc42-ko pDCs eine tendenziell leicht erhöhte, jedoch nicht signifikante Veränderung der relativen mRNA-Expression des für GLUT3 codierenden Gens *slc2a3* (*solute carrier family 2 member 3*) (Abbildung 20B).



Abbildung 20: Cdc42 beeinflusst mRNA-Level Glykolyse-assoziierter Gene nicht. *In vitro* kultivierte Ktr und Cdc42-ko pDCs wurden mittels fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (siehe Abbildung 9A) isoliert und hinsichtlich ihrer relativen

A) *hif1 \alpha*-mRNA-Expression

B) slc2a3-mRNA-Expression

mittels qPCR untersucht (Daten stammen aus einem Experiment mit n=3-4).

Die statistische Analyse erfolgte mittels Student's t-Test (p-Werte lagen über 0,05).

## 5.3.6.2. Glucose-Aufnahme ist in Cdc42-ko pDCs unverändert

Um die Glucose-Aufnahmefähigkeit und damit auch die Funktionalität der GLUTs in Cdc42-ko pDCs zu prüfen, wurde die Glucose-Aufnahme in Abhängigkeit von Cdc42 untersucht. Hierzu wurden Ktr und Cdc42-ko pDCs zunächst Glucose entzogen und anschließend mit einem fluoreszierenden Glucose-Analogon (2-NBDG) inkubiert. Die Glucose-Aufnahmefähigkeit der

pDCs wurde nachfolgend mittels Durchflusszytometrie analysiert. Wie in den Histogrammen in Abbildung 21 gezeigt, führte zwar eine Erhöhung der 2-NBDG-Konzentration zu einer vermehrten Aufnahme des fluoreszierenden Glucose-Analogons, jedoch geschah dies in beiden pDC-Genotypen in gleichem Maße (Abbildung 21).



Abbildung 21: Glucose-Aufnahme ist in Cdc42-ko pDCs nicht verändert.

*In vitro* kultivierte Ktr und Cdc42-ko pDCs wurden für 30 min Glucose entzogen und anschließend für 20 min mit 5 µg/ml oder mit 100 µg/ml (*gating*: Lymphozyten, Einzelzellen, CD11b<sup>-</sup>, B220<sup>+</sup>) des fluoreszierenden Glucose-Analogons 2-NBDG inkubiert. Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Die gezeigten Daten sind repräsentative Histogramme aus einem Experiment mit drei technischen Replikaten (n=1).

Somit beeinflusst Cdc42 das relative mRNA-Expressionslevel von HIF1a, das im Zusammenhang mit der Glykolyse steht, nicht, was ein Hinweis für eine verstärkte oder verminderte Glykolyse gewesen wäre (Abbildung 20). Zudem ist die Glucose-Aufnahme in Cdc42-ko pDCs nicht verändert. Eine verstärkte Glykolyse bedingt eine erhöhte Glucose-Aufnahme, um dem Energiebedarf der Zelle gerecht zu werden. Daher liegt aufgrund des unveränderten relativen mRNA-Expressionslevels der Glykolyse-assoziierten Gene sowie der nicht beeinträchtigten Glucose-Aufnahme die Vermutung nahe, dass Cdc42-ko pDCs keine verstärkte Glykolyse zeigen, wie für Th17-Zellen in Abwesenheit von Cdc42 beschrieben ist [123]. Für eine eindeutige Klärung bedarf diese Vermutung jedoch weitere Validierung.

## 5.3.6.3. Cdc42-ko pDCs zeigen eine normale mitochondriale Biomasse und ein unverändertes mitochondriales Membranpotenzial

Die mitochondriale Architektur wurde bereits für Immunzellen mit deren Differenzierung oder (Aktivierungs-) Signalwegen in Zusammenhang gebracht [90, 149-151]. Für die Adaption an den gegenwärtig erforderlichen Energiebedarf der Zelle ist dabei die Mitochondriendynamik, die Balance zwischen Mitochondrienteilung (*fission*) und -fusion, entscheidend [152]. Wie die Publikation von Kandel et al. zeigt, wirkt sich die Inhibition des Aktin-Cytoskeletts auf die Morphologie der Mitochondrien aus, die nach Inhibition vermehrt verkürzt vorlagen [153]. Da die Mitochondriendynamik sowohl im Zusammenhang mit der mitochondrialen Biomasse als

auch mit der mitochondrialen Atmung steht, wurde deren Abhängigkeit von Cdc42 nachfolgend untersucht [154].

Hierfür wurden *in vitro* kultivierte Ktr und Cdc42-ko pDCs mit *MitoTracker Green FM*, einem Farbstoff, der sich in der Membran von Mitochondrien anlagert, angefärbt und mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Dabei zeigte sich kein Einfluss von Cdc42 auf die mitochondriale Biomasse, wie sowohl aus dem in Abbildung 22A dargestellten Histogramm als auch dem zugehörigen Balkendiagramm hervorgeht.

Zudem wurden Ktr und Cdc42-ko pDCs mit *MitoTracker Red CMXRos*, einem Farbstoff, der sich in lebenden Zellen in Abhängigkeit des Membranpotenzials akkumuliert, inkubiert. Der Aufbau eines Membranpotenzials ist entscheidend für die mitochondriale Atmung und damit für die Adenosintriphosphat-Generierung. Da jede lebende Zelle ein Membranpotenzial aufweist, wurde *MitoTracker Red CMXRos* in das *gating* aufgenommen. Dabei ergab sich, wie im Histogramm in Abbildung 22B dargestellt, kein Einfluss von Cdc42 auf das Membranpotenzial der pDCs.

Zusammenfassend war weder ein Einfluss von Cdc42 auf die mitochondriale Biomasse noch auf das Membranpotenzial von *in vitro* kultivierten pDCs nachweisbar.



#### Abbildung 22: Unveränderte mitochondriale Biomasse und unverändertes mitochondriales Membranpotenzial.

A) In vitro generierte Ktr und Cdc42-ko pDCs (gating: siehe Abbildung 10A) wurden für 30 min mit MitoTracker Green FM inkubiert, zweimal gewaschen und erneut bei 37 °C inkubiert.
 Gezeigt ist ein repräsentatives Histogramm des MitoTracker Green FM-Levels sowie die als Balkendiagramm dargestellten Mittelwerte der △MFI (MFI<sub>(Probe)</sub>-MFI<sub>(ungefärbte Kontrolle)</sub>) MitoTracker Green FM-Werte, die aus technischen Duplikaten gebildet wurden (n=3, Daten stammen aus einem Experiment). Die statistische Analyse erfolgte mittels Student's t-Test (p-Wert lag über 0,05).

B) 2,5x10<sup>5</sup> in vitro generierte Ktr und Cdc42-ko pDCs (gating: Lymphozyten, Einzelzellen, B220<sup>+</sup>, CD19<sup>-</sup>, MitoTracker Red CMXRos<sup>+</sup>) wurden für 20 min mit MitoTacker Red CMXRos angefärbt, zweimal gewaschen, erneut bei 37 °C inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Histogramm des MitoTracker Red CMXRos-Levels aus einem Experiment mit fünf technischen Replikaten (n=1).

## 5.4. Einfluss des Cdc42-Inhibitors ML141 auf pDCs

Da Rho GTPasen zum Teil auf die gleichen Effektor-Proteine wirken und auch teils ähnliche Funktionen haben, wäre eine Kompensation des verminderten Cdc42-Levels durch andere Rho GTPasen denkbar [96, 155]. Eine entsprechende Kompensation zwischen Rac1 und Cdc42 wurde bereits in Studien vorgeschlagen [156, 157]. Diese Kompensation würde eine Adaption der pDCs an das reduzierte Cdc42-Level im Verlaufe ihrer Entwicklung ermöglichen und könnte die oben beschriebenen Ergebnisse erklären. Um diese Adaptionsphase drastisch zu verkürzen, wurde der Cdc42-spezifische, nicht kompetitive, allosterische Inhibitor ML141 (CID2950007) eingesetzt. Dieser ist bis zu einer Konzentration von 100 µM hoch selektiv für die Inhibition von Cdc42 gegenüber Ras, Rab2, Rab7 oder Rac1 [135, 136].

Die Inhibition von Cdc42 durch ML141 erfolgt, indem die Bindung eines Guanin-Nukleotids an Cdc42 die Assoziation des Inhibitors ML141 an den Komplex zulässt. Dies fördert die Dissoziation des Guanin-Nukleotids und das dabei entstehende Cdc42-ML141 ist in dieser inaktiven Form fixiert (Abbildung 23A) [135]. Zunächst erfolgte die ML141-Titration im Zusammenhang mit dem Einfluss dieses Inhibitors auf die Lebensfähigkeit der *in vitro* Ktr pDC-Zellkultur nach drei Stunden sowie nach sechs Stunden Inkubation. Wie in Abbildung 23B zu sehen ist, zeigten Konzentrationen von 10–25  $\mu$ M ML141 nach dreistündiger Inkubation kaum Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Zellen. Bei Behandlung der pDC-Kultur mit einer Konzentration von 50  $\mu$ M ML141 sank die Anzahl an lebenden Zellen ab (Abbildung 23B, C). Nach einer sechsstündigen Inkubation zeigte sich ebenfalls bei einer Konzentration von 25  $\mu$ M waren die Zellen unter den angegebenen Bedingungen nicht mehr lebensfähig (Abbildung 23D).

Um die Funktion von Cdc42 in pDCs weiter zu untersuchen, wurde für alle nachfolgenden Experimente eine Konzentration von 25 µM ML141 gewählt. Für diese Konzentration konnte zu keinem der getesteten Zeitpunkte ein Hinweis auf Zytotoxizität festgestellt werden.



#### Abbildung 23: Wirkung und Wirkungsmechanismus des Cdc42-spezifischen Inhibitors ML141 auf pDCs.

- A) Schemata des ML141-Inhibitionsmechanismus: Durch die Bindung des Guanin-Nukleotids an Cdc42 wird die Anlagerung des Inhibitors ML141 ermöglicht, der die Dissoziation des Guanin-Nukleotids induziert. Das entstehende Cdc42-ML141 verbleibt in dieser inaktiven Form (Abbildung abgeändert übernommen von [135]).
- B) In vitro generierte Ktr pDCs wurden in RPMI-Medium mit verschiedenen ML141-Konzentrationen (10 μM, 25 μM, 50 μM oder 100 μM) oder mit DMSO für drei Stunden behandelt. Gezeigt sind repräsentative FACS-Plots nach Ausschluss von *debris* und Zelldubletten, die, sofern vorhanden, aus technischen Replikaten ausgewählt wurden. Die Zahl im Plot entspricht dem Prozentsatz der lebenden Zellen im gezeigten gate (n=1).
- C) Zeigt den Mittelwert gebildet aus technischen Replikaten der Prozentsätze an lebenden Zellen nach Behandlung mit 10 μM, 25 μM, 50 μM oder 100 μM ML141 für drei Stunden sowie den Prozentsatz an Iebenden Zellen nach DMSO-Behandlung (n=1).
- D) In vitro generierte Ktr pDCs wurden in DMEM-Medium in Flt3L-Anwesenheit mit 25 µM oder 50 µM ML141 oder DMSO für sechs Stunden behandelt. Gezeigt sind FACS-Plots nach Ausschluss von debris und Zelldubletten. Die Zahl im Plot entspricht dem Prozentsatz der lebenden Zellen im gezeigten gate (n=1).

## 5.4.1. pDC-Reifungsstatus ist durch Cdc42-Inhibition mittels ML141 nicht beeinflusst

Für Cdc42-ko BMDCs ist in Abwesenheit eines Stimulus ein reifer Phänotyp dieser Zellen beschrieben [109]. Im Gegensatz dazu zeigten *in vitro* kultivierte Cdc42-ko pDCs hinsichtlich ihres Steady State Reifungszustands keinen reifen Phänotyp (Abbildung 11).

Um den Einfluss von Cdc42 auf den Reifungszustand der pDCs zu validieren, wurden Ktr pDCs mit dem Cdc42-spezifischen Inhibitor ML141 inkubiert, durch dessen Verwendung die Adaption der pDCs an das reduzierte Cdc42-Level minimiert wurde. Hierzu wurden Ktr pDCs für eine Stunde oder drei Stunden mit 25 µM ML141 inkubiert und anschließend die CD86-Oberflächenexpression durchflusszytometrisch untersucht. Wie schon für Ktr und Cdc42-ko pDCs in Abschnitt 5.3.3 beschrieben, wurde auch auf etwa 5% der ML141 oder DMSO behandelten pDCs die Expression von CD86 detektiert. Dabei wurde weder durch eine einstündige noch durch eine dreistündige Inkubationszeit ein Unterschied zwischen ML141 behandelten und DMSO behandelten pDCs festgestellt (Abbildung 24A, B). Ein vergleichbarer Befund wurde nach dreistündiger Inkubation mit ML141 oder DMSO in Anwesenheit von Flt3L beobachtet (Daten nicht gezeigt). Folglich führt die Behandlung mit dem Cdc42-Inhibitor ML141 zu keinem veränderten CD86-Oberflächenlevel. Damit ist dieser Befund vergleichbar mit dem, der für Cdc42-ko pDCs hinsichtlich ihrer CD86-Oberflächenexpression festgestellt wurde (Abschnitt 5.3.3).



#### Abbildung 24: ML141-Behandlung beeinflusst Oberflächenexpression des CD86-Reifungsmarkers nicht. *In vitro* generierte Ktr pDCs wurden mit 25 μM ML141 oder mit DMSO für

A) Eine Stunde oder

B) Drei Stunden behandelt und

durchflusszytometrisch analysiert (*gating:* siehe Abbildung 10A). Gezeigt sind repräsentative FACS-Plots. Die Zahl im Plot entspricht dem Prozentsatz der CD86<sup>+</sup> pDCs im gezeigten *gate*. Im Balkendiagramm sind die Prozentsätze der CD86<sup>+</sup> pDCs aus einem Experiment mit n=3 je Gruppe gezeigt.

Die statistische Analyse erfolgte mittels Student's t-Test (p-Werte lagen über 0,05).

## 5.4.2. ML141-vermittelte Cdc42-Inhibition beeinflusst endosomales/lysosomales Kompartiment nicht

Einige Studien weisen auf einen Einfluss von Cdc42 auf das endosomale/lysosomale Kompartiment hin [86, 109, 158]. Für *ex vivo* Cdc42-ko pDCs aus dem KM und der Milz wurden Hinweise auf eine vermehrte Freisetzung des lysosomalen Inhalts, jedoch keine Veränderung des intrazellulären LAMP-1-Levels beobachtet (Abbildung 6). *In vitro* kultivierte Cdc42-ko pDCs zeigten unter Steady State Bedingungen weder hinsichtlich der sauren Kompartimente, die
mittels *LysoTracker Green*-Färbung analysiert wurden (Abbildung 16A), noch hinsichtlich des totalen LAMP-1-Levels (Abbildung 16B) signifikante Unterschiede zu Ktr pDCs. Jedoch induzierte die Stimulation der pDCs ein erhöhtes totales LAMP-1-Level (Abbildung 16C, D). Um den Einfluss von Cdc42 auf den endosomalen/lysosomalen Transportweg zu verifizieren, wurde das Expressionslevel des endosomalen/lysosomalen Markers LAMP-1 in Abhängigkeit einer akuten Cdc42-Inhibition durch ML141-Behandlung analysiert.

Unter Verwendung dieses Inhibitors konnte, wie auch schon für *in vitro* kultivierte Cdc42-ko pDCs, kein Effekt unter Steady State Bedingungen hinsichtlich des totalen LAMP-1-Levels festgestellt werden (Abbildung 25A). Nachfolgend wurde das intrazelluläre LAMP-1-Level, das Hinweise auf die Menge an späten Endosomen sowie Lysosomen gibt, nach ML141-Behandlung separat analysiert. Dabei wurde weder in Abwesenheit noch in Anwesenheit eines Stimulus (R848) ein signifikant verändertes intrazelluläres LAMP-1-Expressionlevel durch die Cdc42-Inhibition beobachtet (Abbildung 25C).



#### **Abbildung 25: ML141-Behandlung wirkt sich nicht auf das endosomale/lysosomale Kompartiment aus.** *In vitro* generierte Ktr pDCs wurden mit 25 µM ML141 oder mit DMSO behandelt und durchflusszytometrisch untersucht (*gating:* siehe Abbildung 10A).

- A) Nach einstündiger oder dreistündiger Behandlung erfolgte die totale (intra- und extrazelluläre) LAMP-1-Färbung. Gezeigt ist ein repräsentatives Histogramm sowie im Balkendiagramm die ΔMFI (MFI<sub>(Probe)</sub>-MFI<sub>(ungefärbte Kontrolle)</sub>) LAMP-1-total-Werte. (Daten stammen aus einem Experiment mit n=3 je Gruppe).
- B) Schematischer experimenteller Ablauf der in C) gezeigten Ergebnisse. In vitro kultivierte Ktr pDCs wurden für fünf Stunden mit 25 µM ML141 oder DMSO in Anwesenheit von Flt3L behandelt. Nachfolgend wurden die Zellen für weitere drei Stunden (B) ohne Stimulation belassen oder C) mit 10 µg/ml R848 behandelt. Die Analyse erfolgte nach Fixierung, Permeabilisierung und intrazellulärer LAMP-1-Färbung mittels Durchflusszytometrie.
- C) Zeigt repräsentative Histogramme von nicht stimulierten oder mit R848 stimulierten *in vitro* kultivierten pDCs sowie im Balkendiagramm die ∆MFI (MFI<sub>(Probe)</sub>-MFI<sub>(ungefärbte Kontrolle)</sub>) LAMP1-IC-Werte aus einem Experiment mit n=3 je Gruppe (IC: intrazellulär).

Die statistische Analyse erfolgte mittels Student's t-Test (p-Werte lagen über 0,05).

# 5.4.3. Glucose-Aufnahme ist nach Cdc42-Inhibition durch ML141-Behandlung leicht erhöht

Für Th17-Zellen wurde eine Verschiebung des Metabolismus hin zu einer verstärkten Glykolyse und für iTreg-Zellen hin zu einer verminderten Glykolyse durch den Verlust von Cdc42 beschrieben [123]. In Cdc42-ko pDCs wurde ein tendenziell erhöhtes mRNA-Level des für GLUT3 codierenden Gens festgestellt. Demgegenüber zeigte sich ein unverändertes *hif1* $\alpha$ -mRNA-Level sowie eine vergleichbare Glucose-Aufnahme in Ktr und Cdc42-ko pDCs (Abbildung 20, Abbildung 21).

Um die Bedeutung von Cdc42 für den pDC-Metabolismus zu validieren, setzten wir eine akute, selektive Cdc42-Inhibition ein. Dazu behandelten wir *in vitro* kultivierte Ktr pDCs zunächst für 12 Stunden mit ML141 oder mit DMSO. Anschließend erfolgte ein Glucose-Entzug sowie die 2-NBDG-Zugabe in Anwesenheit von ML141 bzw. DMSO (Abbildung 26A).

Hierbei wurde ein leicht erhöhtes, statistisch signifikantes 2-NBDG-Level in ML141 behandelten pDCs im nicht stimulierten Zustand gemessen. Dieser Effekt wurde jedoch nach R848-Stimulation nicht hervorgerufen (Abbildung 26C). Dies könnte auf einen geringfügig erhöhten Glucose-Bedarf durch die Cdc42-Inhibition unter Steady State Bedingungen, jedoch nicht nach Stimulation, hindeuten (Abbildung 26B). Um dies abschließend klären zu können sind jedoch weitere Experimente nötig.



#### Abbildung 26: ML141-Behandlung führt zu vermehrter Glucose-Aufnahme.

- A) Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufes der in B) und C) gezeigten Ergebnisse. In vitro generierte Ktr pDCs wurden mit 25 μM ML141 (lila) oder mit DMSO (grau) als Kontrolle für neun Stunden behandelt. Anschließend wurde zu den Zellen Medium gegeben oder die Zellen wurden für drei Stunden mit R848 stimuliert (grau hinterlegt). Nachfolgend wurden die Zellen zweimal gewaschen und für 30 min in Glucose-freiem Medium inkubiert, bevor für 30 min das vorgewärmte Glucoseanalogon 2-NBDG (100 μg/ml) zugegeben wurde (grün markiert).
- B) In vitro kultivierte Ktr pDCs wurden wie in A) beschrieben mit ML141 oder DMSO behandelt, ohne Stimulation mit 2-NBDG inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert (gating: Lymphozyten, Einzelzellen, LD<sup>-</sup>, B220<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>). Gezeigt ist ein repräsentatives Histogramm des 2-NBDG-Levels sowie die im Balkendiagramm dargestellten ΔMFI (MFI<sub>(Probe)</sub>-MFI<sub>(ungefärbte Kontrolle)</sub>) 2-NBDG-Werte (Daten stammen aus einem Experiment mit n=3 je Gruppe).
- C) In vitro kultivierte Ktr pDCs wurden wie in A) beschrieben mit ML141 oder mit DMSO behandelt, nach dreistündiger R848-Stimulation mit 2-NBDG inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert (gating: Lymphozyten, Einzelzellen, LD<sup>-</sup>, B220<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>). Gezeigt ist ein repräsentatives Histogramm des 2-NBDG-Levels sowie die im Balkendiagramm dargestellten △MFI (MFI<sub>(Probe)</sub>-MFI<sub>(ungefärbte Kontrolle)</sub>) 2-NBDG-Werte (Daten stammen aus einem Experimenten mit n=3 je Gruppe).

Die statistische Analyse erfolgte mittels Student's t-Test, mit \*: p<0,05.

Damit konnte unter Verwendung einer ML141-Konzentration, die für pDCs keine zytotoxischen Effekte zeigte, keine Veränderung hinsichtlich des Steady State Reifungszustands oder des totalen sowie des intrazellulären LAMP-1-Levels festgestellt werden. Jedoch wurde eine leicht erhöhte Glucose-Aufnahme unter Steady State Bedingungen, jedoch nicht nach Stimulation, beobachtet.

# 5.5. Das Überleben von pDCs korreliert mit der Integrität

#### des Aktin-Cytoskeletts

Cdc42 ist insbesondere für seine bedeutende Rolle in der Regulation und Organisation des Aktin-Cytoskeletts bekannt. Um die direkte Auswirkung einer zentralen Cdc42-*downstream* Zielstruktur, dem Aktin-Cytoskelett, auf den pDC-Phänotyp ermitteln zu können, wurden Ktr pDCs mit Aktin-Cytoskelett-Inhibitoren behandelt. Diese Inhibitoren wurden bereits eingesetzt, um den Cdc42-ko Phänotyp in BMDCs erfolgreich zu imitieren [109].

Bei den verwendeten Inhibitoren handelt es sich um CytD sowie um LatB. CytD bindet an das positive Ende des Aktin-Filaments und verhindert damit die Assoziation weiterer Aktin-Monomere. Wohingegen LatB durch die Anlagerung an G-Aktin (Aktin-Monomer) die Polymerbildung blockiert (Abbildung 27A) [133, 159, 160]. Um zunächst geeignete Inhibitionsbedingungen zu finden, wurden *in vitro* kultivierte Ktr pDCs für zwei oder sechs Stunden mit CytD oder LatB inkubiert. Nach einer zweistündigen Inkubation mit CytD oder LatB fanden wir eine nur leicht reduzierte Anzahl an lebenden pDCs im Vergleich zu den unbehandelten pDCs. Obwohl Inkubationszeiten von 16 Stunden mit diesen Inhibitoren für BMDCs beschrieben sind (Dissertation: [134]), führte bereits eine sechsstündige Inkubation mit CytD, sowie im geringeren Maß mit LatB, zu einer drastisch reduzierten Zahl an lebenden pDCs (Abbildung 27B, D). Wohingegen die DMSO-Kontrolle keine Auswirkungen auf die Lebensfähigkeit der pDC-Kultur aufzeigte (Abbildung 27C).

Damit deuten diese Daten auf eine hohe Sensitivität der pDCs auf die Inhibition des Aktin-Cytoskeletts hin. Um den Einfluss des Aktin-Cytoskeletts zu untersuchen, verwendeten wir in den nachfolgenden Experimenten eine Inkubationsdauer von zwei Stunden, um den zytotoxischen Effekt der Inhibitoren zu begrenzen.



#### Abbildung 27: Wirkungsmechanismus der Aktin-Inhibitoren CytD und LatB.

- A) CytD ist ein Aktin-Inhibitor, der durch die Bindung an das positive Ende des Aktin-Filaments die Assoziation weiterer Aktin-Monomere blockiert. LatB verhindert die erneute Assoziation der Monomere, indem es sich an G-Aktin anlagert. Mechanismus entnommen aus [133, 159, 160].
- B) In vitro generierte Ktr pDCs wurden mit den Aktin-Inhibitoren CytD oder LatB behandelt oder unbehandelt belassen. Nach zwei oder nach sechs Stunden wurden die pDCs durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind repräsentative FACS-Plots nach Ausschluss von *debris* sowie Zelldubletten mit dem Prozentsatz an lebenden Zellen (erste und dritte Spalte) sowie an lebenden pDCs (*gating:* siehe Abbildung 10A) (zweite und vierte Spalte) ausgewählt aus technischen Triplikaten. Die Zahl im Plot entspricht dem Prozentsatz der Zellen im gezeigten *gate* (n=1).
- **C)** Sechs Stunden DMSO-Kontrolle für die in A) dargestellten mit CytD oder mit LatB behandelten Zellen. Gezeigt sind repräsentative FACS-Plots mit dem Prozentsatz der Zellen im gezeigten *gate* (n=1).
- D) Zeigt den Mittelwert der Prozentsätze an lebenden pDCs (gating: siehe Abbildung 10A), der aus mindestens technischen Triplikaten gebildet wurde (n=1).

# 5.5.1. Der pDC-Reifungsstatus ist unverändert durch Inhibition des Aktin-Cytoskeletts

Beschrieben ist, dass BMDCs durch eine Cdc42-abhängige Aktin-Cytoskelett-Regulation in einem unreifen Zustand gehalten werden. Daher induziert sowohl die genetische Cdc42-Deletion als auch die Inhibition des Aktin-Cytoskeletts einen reifen Phänotyp der BMDCs [109]. Ein veränderter Reifungsphänotyp konnte weder in Cdc42-ko pDCs noch durch Cdc42-Inhibition der Ktr pDCs hervorgerufen werden.

Um zu prüfen, ob eine direkte Inhibition des Aktin-Cytoskeletts den Reifungsphänotyp der pDCs beeinflusst, wurden *in vitro* kultivierte Ktr pDCs mit CytD oder LatB behandelt und hinsichtlich ihrer CD86-Expression untersucht. Wie schon zuvor beschrieben, wurden auch in den unbehandelten pDCs im Mittel etwa 12% CD86<sup>+</sup> pDCs detektiert. Ebenso verhielt es sich mit der Anzahl an CD86<sup>+</sup> pDCs nach CytD oder LatB Behandlung (Abbildung 28). Damit zeigte sich in der Anzahl an CD86<sup>+</sup> pDCs kein Unterschied zwischen unbehandelten und CytD oder LatB behandelten pDCs.



Abbildung 28: Aktin-Inhibitoren beeinflussen die Expression des CD86-Reifungsmarkers auf der Oberfläche von pDCs nicht.

*In vitro* generierte Ktr pDCs wurden mit den Aktin-Inhibitoren CytD oder LatB für zwei Stunden behandelt oder nicht behandelt und hinsichtlich ihrer CD86-Oberflächenexpression durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind repräsentative FACS-Plots ausgewählt aus drei technischen Replikaten mit dem Prozentsatz an CD86<sup>+</sup> pDCs im gezeigten *gate (gating:* siehe Abbildung 10A). Im Balkendiagramm sind die Mittelwerte der Prozentsätze an CD86<sup>+</sup> pDCs gebildet aus technischen Triplikaten gezeigt. Daten sind gepoolt aus drei unabhängigen Experimenten (mit je n=1).

### 5.5.2. Aktin-Cytoskelett-Inhibition beeinflusst endosomales/ lysosomales Kompartiment in pDCs nicht

In *in vitro* kultivierten pDCs ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen Ktr und Cdc42-ko pDCs hinsichtlich des Levels an sauren Kompartimenten, wie aus der *LysoTracker Green*-Färbung hervorging (Abbildung 16). Auch die Verwendung des spezifischen Cdc42-Inhibitors ML141 beeinflusste das intrazelluläre LAMP-1-Level nicht (Abbildung 25). Im Gegensatz dazu ist für BMDCs ein reduziertes intrazelluläres LAMP-1-Level in Cdc42-Abwesenheit sowie ein erhöhtes LAMP-1-Oberflächenlevel nach Inhibition des Aktin-Cytoskeletts gezeigt [109].

Um zu eruieren, wie sich eine direkte, akute Inhibition des Aktin-Cytoskeletts auf das endosomale/lysosomale Kompartiment der pDCs auswirkt, wurden *in vitro* kultivierte Ktr pDCs mit CytD oder LatB behandelt und anschließend für das totale LAMP-1-Level gefärbt. Dabei zeigte sich, wie erwartet, dass über 90% der unbehandelten pDCs positiv für diesen Marker waren. Auch die Anzahl an LAMP-1<sup>+</sup> pDCs nach CytD oder LatB Behandlung lag bei über 90%

(Abbildung 29A). Hinsichtlich des totalen LAMP-1-Expressionslevels ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen unbehandelten und mit Aktin-Inhibitoren behandelten pDCs (Abbildung 29B). Die Analyse des LAMP1-Oberflächenlevels ergab, dass rund 3% der unbehandelten oder der mit Aktin-Inhibitor behandelten pDCs LAMP-1 auf der Oberfläche trugen (Abbildung 28C). Damit liegt die Vermutung nahe, dass das intrazelluläre LAMP-1-Level den Hauptteil des gemessenen totalen LAMP-1-Levels ausmacht.



#### Abbildung 29: Aktin-Inhibitoren beeinflussen das endosomale/Iysosomale Kompartiment nicht. *In vitro* generierte Ktr pDCs (*gating*: siehe Abbildung 10A) wurden mit den Aktin-Inhibitoren CytD oder LatB für zwei

Stunden behandelt oder blieben unbehandelt. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Analyse.

- A) Zeigt repräsentative FACS-Plots mit dem Prozentsatz der LAMP-1 (intra-und extrazellulär)-total<sup>+</sup> pDCs im gezeigten *gate* (Daten stammen aus einem Experiment mit n=4 je Gruppe).
- B) Žeigt die Expression an totalem (intra-und extrazellulärem) LAMP-1 in einem repräsentativen Histogramm sowie die ∆MFI (MFI<sub>(Probe)</sub>-MFI<sub>(ungefärbte Kontrolle)</sub>) LAMP-1-total-Werte im Balkendiagramm (Daten stammen aus einem Experiment mit n=4 je Gruppe).
- **C)** Zeigt repräsentative FACS-Plots mit dem Prozentsatz der LAMP-1-Oberfläche<sup>+</sup> pDCs im gezeigten *gate* (n=1).

Folglich scheinen pDCs sensitiver als BMDCs auf eine Inhibition des Aktin-Cytoskeletts zu reagieren (Dissertation: [134]). Unter Verwendung milder, nicht letaler experimenteller Bedingungen war kein Effekt durch die Inhibition des Aktin-Cytoskeletts auf den Reifungszustand oder das endosomale/lysosomale Kompartiment der pDCs nachzuweisen.

## 6. Diskussion

pDCs sind eine kleine Zellpopulation der angeborenen Immunantwort, die besonders bei der antiviralen Immunantwort eine Rolle spielen. pDCs agieren als sekretorische Zellen, indem sie in Reaktion auf TLR7- oder TLR9-Liganden innerhalb kürzester Zeit massive Mengen an Typ-I-IFN sezernieren [41].

Die Rho GTPase Cdc42 ist ein molekularer Schalter, der eine Vielzahl zellulärer Abläufe reguliert [95, 96]. Bereits publiziert sind Funktionen von Cdc42 für Abläufe, die zur TLR7-/TLR9-vermittelten Immunantwort beitragen. Beispielsweise wird von einem Cdc42-abhängigen Mechanismus der Antigen-Aufnahme sowie von einem Einfluss auf die Funktionalität des endosomalen/lysosomalen Kompartiments berichtet [72, 86, 108-110, 158]. Cdc42 ist jedoch auch als Regulator weiterer zellulärer Prozesse, wie dem der Zellproliferation oder auch der Apoptose, beschrieben [114-117, 120-122]. Dabei sind die Funktionen von Cdc42 Zelltypabhängig. Über die Funktion von Cdc42 für pDCs ist bisher nur sehr wenig bekannt.

Unter Steady State Bedingungen zeigte sich kein Phänotyp der Cdc42-ko pDCs. Die Stimulation führte in Cdc42-ko pDCs zu einem erhöhten Oberflächenlevel des Aktivierungsmarkers CD69 sowie zu einem veränderten endosomalen/lysosomalen Kompartiment, das jedoch keine Auswirkungen auf die Typ-I-IFN-Sezernierung hatte. Die Verwendung eines spezifischen Cdc42-Inhibitors sowie die direkte Inhibition der Cdc42 *downstream* Zielstrukur, dem Aktin-Cytoskelett, zeigten ebenfalls keine prägnanten Effekte. Harschere Cdc42-Blockierungsbedingungen oder Aktin-Cytoskelett-Inhibitionsbedingungen führten zum Zelltod. Damit scheint die Cdc42-Blockade in pDCs keinen Phänotyp zu induzieren ohne Apoptose auszulösen.

#### 6.1. Cdc42-ko pDCs zeigen unverändertes CD86-

#### **Oberflächen-Level**

Die Charakterisierung des Cdc42-ko pDC-Phänotyps begannen wir mit der Untersuchung des Steady State Reifungs-Phänotyps. Dieser wurde im Vorfeld für Cdc42-ko BMDCs aufgrund des vermehrten Transports des kostimulatorischen Moleküls CD86 an die Zelloberfläche, auch in Abwesenheit eines Stimulus, als ein reifer Phänotyp beschrieben [109]. Für *in vitro* differenzierte Cdc42-ko pDCs konnten wir diesen reifen Phänotyp unter Steady State Bedingungen nicht beobachten. *Ex vivo* Cdc42-ko pDCs tendierten sogar zu einem eher reduzierten CD86 Zelloberflächen-Level. Auch die Verwendung des publizierten Cdc42-

spezifischen Inhibitors ML141 oder von Aktin-Inhibitoren (LatB, CytD) führte zu keinem veränderten CD86-Oberflächen-Level.

pDCs weisen ein geringeres Oberflächen-Expressionslevel an kostimulatorischen Molekülen oder auch an MHC-Klasse-II im Vergleich zu cDCs im reifen Zustand wie auch im unreifen Zustand auf [11, 13]. Auch hinsichtlich ihres Protein-Membran-Turnovers sind Unterschiede beschrieben. cDCs haben die Fähigkeit, den MHC-Klasse-II-Peptid-Komplex über eine lange Zeit auf ihrer Oberfläche zu halten [49]. Im Gegensatz dazu weisen pDCs einen hohen MHC-Klasse-II-Turnover auf, der die Akkumulation von MHC-Klasse-II-Peptid-Komplexen an der Zelloberfläche verhindert [13, 49]. Dabei ist dieser unterschiedliche MHC-Klasse-II-Turnover der beiden DC-Subpopulationen auf die ungleiche Regulation der Ubiguitin-Ligase membraneassociated RING-CH1 (March1)-Expression zurückzuführen, die auch für den CD86-Turnover verantwortlich ist [13, 161, 162]. Zudem ist für cDCs ein intrazelluläres CD86-Vorratslager beschrieben, von dem aus CD86 an die Oberfläche transportiert wird [163, 164]. Dessen Präsenz ist in pDCs bisher ungeklärt. Damit gibt die differenziell regulierte Antigen-Präsentationsmaschinerie von cDCs im Vergleich zu pDCs Hinweise auf ein unterschiedlich reguliertes CD86-Oberflächen-Expressionslevel. Dieses könnte zu den verschiedenen Befunden in BMDCs und pDCs hinsichtlich der Cdc42-Abhängigkeit des Reifungs-Phänotyps beigetragen haben.

#### 6.2. Cdc42 beeinflusst Typ-I-IFN Sezernierung nicht

pDCs agieren in erster Linie als sekretorische Zellen, indem sie massive Mengen an Typ-I-IFN in Reaktion auf die Stimulation der endosomal lokalisierten Rezeptoren TLR7 und TLR9 sekretieren. Dazu ist sowohl der Transport des TLR7/TLR9 vom ER in das endosomale Kompartiment als auch die Aufnahme des Liganden und dessen Transport in dieses Kompartiment nötig. Diese Transportwege sind streng reguliert, um eine effiziente und kontrollierte pDC-Immunantwort zu gewährleisten [41].

Die Mechanismen, die zur Aufnahme des Liganden führen, sind in pDCs nicht vollständig verstanden. Vorgeschlagen wurde ein Mechanismus, der in Abhängigkeit des Kontakts zwischen pDC und infizierter Zelle abläuft. Durch die dabei an der Kontaktseite gebildete spezialisierte Plattform gelangt virale Nukleinsäure mittels Transporter wie z. B. Exosomen von der infizierten Zelle zu pDCs, die diese mittels Clathrin-abhängiger Endozytose aufnehmen [68-73]. Dabei wurde eine Abhängigkeit des Aktin-Cytoskeletts sowie dessen Regulator Arp2/3 für den Zell-Zell-Kontakt gezeigt [72, 73]. Jedoch wurde in der Studie von Assil et al. auch nach Cdc42-Inhibition eine verminderte IFNα-Produktion festgestellt, was eine Rolle von Cdc42 für diesen Mechanismus aufzeigt [72]. Interessanterweise ist das Aktin-Cytoskelett zwar zentral für

die Zell-Zell-Kontakt-vermittelte IFN $\alpha$ -Sezernierung, jedoch nicht für die Stimulation mittels Zellfreiem Influenza-Virus, die trotz Anwesenheit des Arp2/3-Inhibitors zu einer unveränderten IFN $\alpha$ -Freisetzung führt [72]. Ähnliches beobachteten wir in Cdc42-ko pDCs, die ebenfalls nach Stimulation mit TLR7-Liganden zu keiner veränderten IFN $\alpha$ -Sezernierung führte.

Zudem wurde für *in vitro* kultivierte pDCs kein Einfluss von Cdc42 auf die CpG-FITC-Aufnahme festgestellt. Im Gegensatz dazu wurde für DCs von einem Einfluss von Cdc42 für die Antigen-Aufnahme in einigen, jedoch nicht in allen, Studien berichtet [107-110]. cDCs sind in der Lage nahezu jegliches extrazelluläres Material effizient zu internalisieren (via Makropinozytose, Phagozytose oder Rezeptor-vermittelte Endozytose) [49, 165]. pDCs hingegen können lösliche Antigene aufnehmen, jedoch ineffizienter als cDCs [13, 166]. In einigen, jedoch nicht in allen, Studien wurde sogar ein Unvermögen der pDCs hinsichtlich der Internalisierung von Partikeln oder apoptotischen Zellen beschrieben [167-170]. Diese beschriebenen unterschiedlichen Internalisierungskapazitäten weisen auf differenziell regulierte Mechanismen in cDCs gegenüber pDCs hin. Die Vorgänge, die zur Aufnahme von freier Nukleinsäure in pDCs führen, sind bisher nicht vollständig verstanden. Interessant könnte hierbei die von Latz et al. beschriebene Clathrin-abhängige CpG-Aufnahme sein, die ebenfalls für die Internalisierung der Nukleinsäure-haltigen Transporter bei Zell-Zell-Kontakt in pDCs publiziert wurde [55, 72, 73]. Zur Verifizierung würden Experimente, in denen die Kolokalisation von CpG-FITC mit Clathrinen in Abhängigkeit von Cdc42 untersucht werden, beitragen.

Nach der Aufnahme gelangt der TLR-Ligand in das endosomale/lysosomale Kompartiment, in welches auch der TLR7/TLR9 transportiert wird. Für BMDCs ist beschrieben, dass die Cdc42-Abwesenheit eine unkontrollierte Freisetzung des lysosomalen Inhalts unter Steady State Bedingungen auslöst [109]. Im Gegensatz dazu zeigte sich für pDCs nach Cdc42-Inhibition oder Aktin-Cytoskelett-Blockade kein Hinweis auf ein verändertes intrazelluläres Level des endosomalen/lysosomalen Proteins LAMP-1.

Für *ex vivo* pDCs ergab sich ein erhöhtes Oberflächen-LAMP-1-Level, das auf eine vermehrte Exozytose des lysosomalen Inhalts hinweist [140-142]. Dieser Befund ließ sich jedoch unter Verwendung von Aktin-Inhibitoren in *in vitro* kultivierten Ktr pDCs nicht bestätigen. Auch erste Ergebnisse in Cdc42-ko pDCs zeigten keinen deutlichen Unterschied im LAMP-1-Oberflächen-Level (Daten nicht gezeigt). Abgesehen von pDCs exprimieren noch weitere Zellen CD11c, wie cDCs, verschiedene Makrophagen-Populationen oder auch eine Untergruppe der B-Zellen. Damit erfolgt auch in diesen Zellen eine Cdc42-Deletion, die eine zusätzliche Beeinflussung der Cdc42-ko pDCs verursachen könnten [171-173].

Das endosmale/lysosomale Kompartiment bietet nach Stimulation die Plattform für die Interaktion zwischen TLR und entsprechendem Liganden. Dabei ist in der Literatur beschrieben, dass sich die Transportgeschwindigkeit entscheidend auf eine angemessene IFNα-

Sezernierung auswirkt. Kürzlich wurde publiziert, dass das Cdc42-Effektor-Protein FHOD4 in DCs entscheidend an der Regulation dieser Transportgeschwindigkeit beteiligt ist [86]. Zudem reguliert die, durch das Cdc42-Effektor-Protein-WASP-vermittelte, Aktin-Dynamik den intrazellulären Transport sowie die Kompartimentierung des TLR9-Liganden. Dies konnte zudem durch die Verwendung einer direkten Aktin-Cytoskelett-Inhibition imitiert werden [85, 97]. Diese Publikationen beschreiben eine übermäßige TLR9-Aktivierung aufgrund des Verlustes eines dieser Cdc42-Effektor-Proteine [85, 86] bzw. durch die Inhibition des Aktin-Cytoskeletts nach Stimulation [85]. Im Gegensatz zu diesen Publikationen zeigten Cdc42-ko pDCs zwar nach Stimulation ein verändertes endosomales/lysosomales Kompartiment, das jedoch keine Auswirkungen auf das IFN $\alpha$ -Sezernierungslevel hatte. Zur weiteren Verifizierung wären Untersuchungen des Cdc42-Protein-Levels und der Cdc42-Aktivität in Abhängigkeit der Stimulation interessant. Zudem könnte eine detaillierte Analyse des endosomalen/lysosomalen Kompartiments unter Betrachtung dieses Kompartiments zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulation sowie der Lokalisation des TLR und dessen Ligand weiterführend sein.

# 6.3. Glucose-Aufnahme ist in Cdc42-ko pDCs unverändert

Die Studie von Kalim et al. zeigt eine bedeutende Funktion von Cdc42 für den Metabolismus in Th17-Zellen auf. Dabei induzierte die Cdc42-Abwesenheit in diesen Zellen eine verstärkte Glykolyse, die mit einer vermehrten Expression Glykolyse-assoziierter Proteine, wie HIF1a, verbunden war [123]. Auch für iTreg-Zellen wurde ein Einfluss von Cdc42 auf deren Metabolismus in dieser Studie beschrieben. Dabei löste in diesen Zellen die Cdc42-Abwesenheit eine verminderte Glykolyse sowie eine reduzierte Expression von Glykolyseassoziierten Proteinen, wie HIF1 $\alpha$  aus [123]. Für Cdc42-ko pDCs ergab sich ein unverändertes hif1a-mRNA-Level und damit kein Hinweis auf eine veränderte Glykolyse. Zudem wurde in Cdc42-ko pDCs eine zu Ktr pDCs vergleichbare Glucose-Aufnahme festgestellt. Da eine verstärkte Glykolyse mit einer vermehrten Glucose-Aufnahme einhergeht, scheint in Cdc42-ko pDCs unter Steady State Bedingungen die Glykolyse nicht verstärkt zu sein, wie es für Th17-Zellen in Cdc42-Abwesenheit beschrieben wurde. Jedoch führte die akute Cdc42-Inhibition durch ML141 zu einer erhöhten Glucose-Aufnahme im Vergleich zur Kontrolle. Zudem wurde eine nicht signifikante leichte Tendenz zu einem erhöhten mRNA-Level des für GLUT3 codierenden Gens (slc2a3) in in vitro kultivierten pDCs festgestellt. Ob dieses leicht erhöhte mRNA-Level sowie die vermehrte Glucose-Aufnahme nach Cdc42-Inhibition im Zusammengang mit einer verstärkten Glykolyse steht, bedarf weiterer Experimente.

Weiterführend wäre hierbei die Analyse des Zellmetabolismus beispielsweise mittels des Seahorse-Analyzers sowie die Bestimmung der Lokalisation und Quantifizierung der GLUTs.

# 6.4. Proliferation und Apoptose wird durch Cdc42 nicht beeinflusst

Bekannt ist, dass sich Cdc42 auf das Voranschreiten des Zellzyklus auswirkt, indem es die G1/S Phase sowie die Mitose beeinflusst [116, 117, 119]. In Langerhans Zellen, DCs der Epidermis, führte der Cdc42-Verlust zu einer nicht signifikanten Reduktion der Proliferationskapazität, die sich durch eine verminderte BrdU-Einlagerung in diese Zellen zeigte [174]. In *ex vivo* pDCs deutete die Färbung des Proliferationsmarkers Ki67 auf keinen Einfluss von Cdc42 auf die pDC-Proliferation hin. Ki67 ist ein Protein, das während der Zellteilung exprimiert wird. Dadurch lässt der Nachweis dieses Proteins indirekte Schlüsse auf die Zellteilung zu [138, 139]. Eine direkte Aussage über die Proliferation einer Zelle könnte mittels *Cell-Tracker-Violet*-Färbung getroffen werden. Dieser Farbstoff lagert sich im Zellinneren an und ermöglicht durch die Verfolgung der Verdünnung des Farbstoffs Rückschlüsse auf die Teilungsrate der Zelle.

Für die Proliferation sowie die Expansion und das Überleben von pDC-Vorläufern ist der Rezeptor Flt3, der den pDC Wachstumsfaktor Flt3L bindet, entscheidend [15, 16]. Das Oberflächen-Expressionslevel dieser Tyrosinkinase war in Cdc42-ko pDCs nicht verändert. Publiziert ist jedoch, dass konstitutiv aktives Cdc42 die c-Cbl-vermittelte Degradierung des EGFRs verhindert und somit zur Akkumulation des EGFRs auf der Oberfläche führt [114, 115]. Obwohl der Flt3-Abbau ebenfalls durch c-Cbl vermittelt wird, scheint Cdc42 diesen Prozess in pDCs nicht zu regulieren [16, 175, 176]. Die in dieser Arbeit gezeigte Cdc42-unabhängige Flt3-Expression könnte durch die ständige Anwesenheit des Liganden Flt3L in der *in vitro* pDC-Kultur beeinflusst worden sein. Daher wäre auch die Analyse des Flt3-Levels in Abwesenheit von Flt3L interessant.

Hinsichtlich des Einflusses von Cdc42 auf die Apoptose gibt es kontroverse Studien, die die Zelltyp-abhängige Funktion von Cdc42 hervorheben. In Jurkat T-Zellen wirkt sich Cdc42 positiv auf die Apoptose aus [120]. Wohingegen in NIH3T3-Fibroblasten von einem anti-apoptotischen Einfluss berichtet wird [122]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte kein prägnanter Einfluss von Cdc42 auf die Apoptose der pDCs beobachtet werden.

# 6.5. Möglicherweise erfolgt eine Adaption an das reduzierte Cdc42-Level

Eine Vielzahl zellulärer Prozesse werden durch Cdc42 reguliert [95, 96]. In der Literatur zeigt sich jedoch, dass die Funktion von Cdc42 stark vom Zelltyp abhängt und je nach Zelltyp sehr unterschiedlich ausfallen kann. Auch innerhalb eines Zelltyps sind in der Literatur unterschiedliche Funktionen für Cdc42 beschrieben, was auf ein sehr komplexes und streng reguliertes System hinweist [107-110].

In der vorliegenden Arbeit konnten nur geringe Veränderungen der pDC-Eigenschaften und -Funktion in *in vitro* kultivierten Cdc42-ko pDCs beobachtet werden.

Durch das in dieser Arbeit verwendete *in vitro* Cdc42-ko pDC-System, könnte das noch bestehende restliche Cdc42 Protein-Level in den pDCs ausreichen, um die Etablierung eines Phänotyps zu verhindern. Publikationen mit konditionellen Cdc42-defizienten Mäusen weisen auf eine Abhängigkeit der Effizienz der Cdc42-Deletion vom Zeitpunkt der Deletion sowie vom Promotor, der die Cre-Expression induziert, hin. Unter Verwendung eines CD19-Cre Systems zur Cdc42-Deletion ist in B-Zellen ein milder Phänotyp publiziert. Im Gegensatz dazu löst die Cdc42-Deletion durch ein *mb1*-Promotor reguliertes Cre System, das bereits früh in der B-Zell-Entwicklung zu einer effizienten Deletion führt, drastische Effekte auf die B-Zell-Entwicklung und ihre Immunantwort aus [177-179].

Jedoch könnten auch die teilweise ähnlichen Funktionen der Rho GTPasen eine Rolle spielen. Insbesondere Cdc42 und Rac1 haben ähnliche zelluläre Funktionen und teilen sich Effektor-Proteine [96, 155, 180]. Dies könnte eine Kompensation des reduzierten Levels an Cdc42 durch andere Rho GTPasen, beispielsweise Rac1, ermöglichen. Derartige Kompensationsmechanismen zwischen Rac1 und Cdc42 wurden bereits für die Aufrechterhaltung der endothelialen Zellbarriere oder für Internalisierungsmechanismen in HeLa-Zellen vorgeschlagen [156, 157]. Inwieweit Rac1-Funktionen in Cdc42-ko pDCs übernimmt, bedarf weiterer Experimente, wie der Bestimmung des Levels an Rac1 sowie an aktivem Rac1-GTP in Cdc42-Abwesenheit.

Für die Generierung von pDCs aus Hoxb8-Zellen scheint Cdc42 von Bedeutung zu sein. Unter Verwendung des Hoxb8-Systems beobachteten wir zwar eine Generierung von Kontroll-pDCs jedoch wurden Cdc42-ko pDCs nur in geringem Maß generiert. In diesem System werden Vorläufer-Zellen durch die konstitutive Induktion der Hoxb8-Expression in einem immortalisierten Zustand gehalten. Erst das Ausschalten der Hoxb8-Expression initiiert die Ausdifferenzierung der Zellen [132]. Abgesehen von der bereits erwähnten Cdc42-Funktion

Diskussion

während der Zellteilung ist auch ein Einfluss von Cdc42 für die Differenzierung verschiedener Zellen beschrieben. Dabei ist Cdc42 als Regulator für die Differenzierung der T-Zellen von CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> zu CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie für die Entwicklung von B-Zellen und deren Differenzierung zu Plasmazellen publiziert [177, 181]. Möglicherweise ist aufgrund der Kultivierung der Hoxb8-Zellen im Vorläuferzustand die Adaption an das reduzierte Cdc42-Level durch beispielsweise andere Rho GTPasen wie Rac1 erschwert und führt daher zu einer ineffizienten pDC-Entstehung. Jedoch bedarf diese Hypothese weitere Validierung. Dabei wäre eine Kinetik, die das Level an Cdc42 sowie Rac1 in Bezug zur pDC-Entstehung setzt, interessant. Auch das Level an Flt3 sowie an E2-2, einem Transkriptionsfaktor, der für die Entstehung von pDCs entscheidend ist, könnten weiterführende Befunde liefern. Zudem könnte die Verfolgung der Zellteilung mittels *Cell-Tracker-Violet*-Färbung weitere Einblicke in die Funktion von Cdc42 für diese Zellen liefern.

Die Cdc42-Inhibition beeinflusste die Lebensfähigkeit von pDCs sehr stark. Lediglich die Verwendung sehr niedriger Konzentrationen ermöglichte das Überleben von pDCs, hatte aber keine Auswirkung auf die untersuchten Cdc42-abhängigen pDC-Funktionen. Ähnliches konnten wir auch bei direkter Inhibition der Cdc42 downstream Zielstruktur, dem Aktin-Cytoskelett, feststellen. Bereits eine, im Vergleich zu der für BMDCs verwendeten Inkubationszeit, deutlich verkürzte Inkubation induziert in pDCs vermehrten Zelltod (Dissertation: [134]). Damit scheinen pDCs ab einem Schwellenwert an Inhibitor sensitiv auf die Cdc42-Inhibition oder auf die Blockierung des Aktin-Cytoskeletts zu reagieren. Denkbar wäre, dass pDCs ein Grundlevel an funktionellem Cdc42 benötigen. Wird dieser Schwellenwert an funktionellem Cdc42 unterschritten, führt dies zum Zelltod der pDCs. Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass wir in dem verwendeten in vitro Cdc42-ko pDC-System zwar eine Reduktion an cdc42-mRNA sowie Cdc42-Protein feststellen konnten, jedoch war sowohl cdc42-mRNA als auch Protein vorhanden. Um dieser Hypothese nach zu gehen, sind jedoch weitere Experimente nötig, die eine engmaschige Titration sowie Kinetik der Cdc42-Blockade einschließen und die Menge an funktionellem Cdc42 mit dem Phänotyp der pDCs sowie dem Level an aktivem Rac1 in Zusammenhang bringen. Interessant wäre zudem die Auswirkung der Inhibition beider Rho GTPasen zu analysieren.

#### 6.6. Schlussfolgerung

In dieser Arbeit zeigte sich unter den untersuchten Bedingungen kein prägnanter Einfluss von Cdc42 auf die pDC-Biologie. Lediglich das endosomale/lysosoamle Kompartiment war durch das reduzierte Cdc42-Level beeinträchtigt, wirkte sich jedoch nicht auf die IFNα-Sezernierung aus. Wir vermuten, dass andere Rho GTPasen, wie Rac1, das reduzierte Cdc42-Level kompensieren.

### Referenzen

- 1. K. Lennert, W. Remmele, [Karyometric research on lymph node cells in man. I. Germinoblasts, lymphoblasts & lymphocytes]. *Acta Haematol* **19**, 99-113 (1958).
- F. Facchetti, C. de Wolf-Peeters, D. Y. Mason, K. Pulford, J. J. van den Oord, V. J. Desmet, Plasmacytoid T cells. Immunohistochemical evidence for their monocyte/macrophage origin. *Am J Pathol* **133**, 15-21 (1988).
- 3. G. Trinchieri, D. Santoli, R. R. Dee, B. B. Knowles, Anti-viral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus-transformed cells. Identification of the anti-viral activity as interferon and characterization of the human effector lymphocyte subpopulation. *J Exp Med* **147**, 1299-1313 (1978).
- 4. G. Grouard, M. C. Rissoan, L. Filgueira, I. Durand, J. Banchereau, Y. J. Liu, The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* **185**, 1101-1111 (1997).
- 5. M. Cella, D. Jarrossay, F. Facchetti, O. Alebardi, H. Nakajima, A. Lanzavecchia, M. Colonna, Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* **5**, 919-923 (1999).
- F. P. Siegal, N. Kadowaki, M. Shodell, P. A. Fitzgerald-Bocarsly, K. Shah, S. Ho, S. Antonenko, Y. J. Liu, The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284, 1835-1837 (1999).
- 7. Y. J. Liu, IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* **23**, 275-306 (2005).
- A. L. Blasius, M. Cella, J. Maldonado, T. Takai, M. Colonna, Siglec-H is an IPC-specific receptor that modulates type I IFN secretion through DAP12. *Blood* **107**, 2474-2476 (2006).
- K. L. Medina, S. N. Tangen, L. M. Seaburg, P. Thapa, K. A. Gwin, V. S. Shapiro, Separation of plasmacytoid dendritic cells from B-cell-biased lymphoid progenitor (BLP) and Pre-pro B cells using PDCA-1. *PLoS One* 8, e78408 (2013).
- 10. C. Asselin-Paturel, A. Boonstra, M. Dalod, I. Durand, N. Yessaad, C. Dezutter-Dambuyant, A. Vicari, A. O'Garra, C. Biron, F. Briere, G. Trinchieri, Mouse type I IFNproducing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol* **2**, 1144-1150 (2001).
- M. Mittelbrunn, G. Martinez del Hoyo, M. Lopez-Bravo, N. B. Martin-Cofreces, A. Scholer, S. Hugues, L. Fetler, S. Amigorena, C. Ardavin, F. Sanchez-Madrid, Imaging of plasmacytoid dendritic cell interactions with T cells. *Blood* **113**, 75-84 (2009).
- U. O'Doherty, M. Peng, S. Gezelter, W. J. Swiggard, M. Betjes, N. Bhardwaj, R. M. Steinman, Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology* 82, 487-493 (1994).
- L. J. Young, N. S. Wilson, P. Schnorrer, A. Proietto, T. ten Broeke, Y. Matsuki, A. M. Mount, G. T. Belz, M. O'Keeffe, M. Ohmura-Hoshino, S. Ishido, W. Stoorvogel, W. R. Heath, K. Shortman, J. A. Villadangos, Differential MHC class II synthesis and ubiquitination confers distinct antigen-presenting properties on conventional and plasmacytoid dendritic cells. *Nat Immunol* 9, 1244-1252 (2008).
- 14. Y. Gao, B. Majchrzak-Kita, E. N. Fish, J. L. Gommerman, Dynamic accumulation of plasmacytoid dendritic cells in lymph nodes is regulated by interferon-beta. *Blood* **114**, 2623-2631 (2009).

- 15. B. Reizis, A. Bunin, H. S. Ghosh, K. L. Lewis, V. Sisirak, Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annu Rev Immunol* **29**, 163-183 (2011).
- 16. Y. L. Chen, T. T. Chen, L. M. Pai, J. Wesoly, H. A. Bluyssen, C. K. Lee, A type I IFN-Flt3 ligand axis augments plasmacytoid dendritic cell development from common lymphoid progenitors. *J Exp Med* **210**, 2515-2522 (2013).
- H. J. McKenna, K. L. Stocking, R. E. Miller, K. Brasel, T. De Smedt, E. Maraskovsky, C. R. Maliszewski, D. H. Lynch, J. Smith, B. Pulendran, E. R. Roux, M. Teepe, S. D. Lyman, J. J. Peschon, Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* **95**, 3489-3497 (2000).
- 18. P. Bjorck, Isolation and characterization of plasmacytoid dendritic cells from Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-treated mice. *Blood* **98**, 3520-3526 (2001).
- 19. D. J. Manfra, S. C. Chen, K. K. Jensen, J. S. Fine, M. T. Wiekowski, S. A. Lira, Conditional expression of murine Flt3 ligand leads to expansion of multiple dendritic cell subsets in peripheral blood and tissues of transgenic mice. *J Immunol* **170**, 2843-2852 (2003).
- 20. E. Maraskovsky, K. Brasel, M. Teepe, E. R. Roux, S. D. Lyman, K. Shortman, H. J. McKenna, Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J Exp Med* **184**, 1953-1962 (1996).
- C. Waskow, K. Liu, G. Darrasse-Jeze, P. Guermonprez, F. Ginhoux, M. Merad, T. Shengelia, K. Yao, M. Nussenzweig, The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues. *Nat Immunol* 9, 676-683 (2008).
- 22. P. Sathe, D. Vremec, L. Wu, L. Corcoran, K. Shortman, Convergent differentiation: myeloid and lymphoid pathways to murine plasmacytoid dendritic cells. *Blood* **121**, 11-19 (2013).
- H. Shigematsu, B. Reizis, H. Iwasaki, S. Mizuno, D. Hu, D. Traver, P. Leder, N. Sakaguchi, K. Akashi, Plasmacytoid dendritic cells activate lymphoid-specific genetic programs irrespective of their cellular origin. *Immunity* 21, 43-53 (2004).
- 24. B. Reizis, Plasmacytoid Dendritic Cells: Development, Regulation, and Function. *Immunity* **50**, 37-50 (2019).
- R. J. Dress, C. A. Dutertre, A. Giladi, A. Schlitzer, I. Low, N. B. Shadan, A. Tay, J. Lum, M. Kairi, Y. Y. Hwang, E. Becht, Y. Cheng, M. Chevrier, A. Larbi, E. W. Newell, I. Amit, J. Chen, F. Ginhoux, Plasmacytoid dendritic cells develop from Ly6D(+) lymphoid progenitors distinct from the myeloid lineage. *Nat Immunol* 20, 852-864 (2019).
- P. F. Rodrigues, L. Alberti-Servera, A. Eremin, G. E. Grajales-Reyes, R. Ivanek, R. Tussiwand, Distinct progenitor lineages contribute to the heterogeneity of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Immunol* **19**, 711-722 (2018).
- 27. A. Musumeci, K. Lutz, E. Winheim, A. B. Krug, What Makes a pDC: Recent Advances in Understanding Plasmacytoid DC Development and Heterogeneity. *Front Immunol* **10**, 1222 (2019).
- 28. G. Penna, S. Sozzani, L. Adorini, Cutting edge: selective usage of chemokine receptors by plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* **167**, 1862-1866 (2001).
- 29. S. Sozzani, W. Vermi, A. Del Prete, F. Facchetti, Trafficking properties of plasmacytoid dendritic cells in health and disease. *Trends Immunol* **31**, 270-277 (2010).
- 30. M. Swiecki, M. Colonna, The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Rev Immunol* **15**, 471-485 (2015).

- 31. K. Liu, C. Waskow, X. Liu, K. Yao, J. Hoh, M. Nussenzweig, Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice. *Nat Immunol* **8**, 578-583 (2007).
- Y. Zhan, K. V. Chow, P. Soo, Z. Xu, J. L. Brady, K. E. Lawlor, S. L. Masters, M. O'Keeffe, K. Shortman, J. G. Zhang, A. M. Lew, Plasmacytoid dendritic cells are short-lived: reappraising the influence of migration, genetic factors and activation on estimation of lifespan. *Sci Rep* 6, 25060 (2016).
- 33. M. Chen, L. Huang, Z. Shabier, J. Wang, Regulation of the lifespan in dendritic cell subsets. *Mol Immunol* **44**, 2558-2565 (2007).
- M. O'Keeffe, H. Hochrein, D. Vremec, I. Caminschi, J. L. Miller, E. M. Anders, L. Wu, M. H. Lahoud, S. Henri, B. Scott, P. Hertzog, L. Tatarczuch, K. Shortman, Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous in surface phenotype and function, that differentiate into CD8(+) dendritic cells only after microbial stimulus. *J Exp Med* **196**, 1307-1319 (2002).
- 35. M. Swiecki, Y. Wang, W. Vermi, S. Gilfillan, R. D. Schreiber, M. Colonna, Type I interferon negatively controls plasmacytoid dendritic cell numbers in vivo. *J Exp Med* **208**, 2367-2374 (2011).
- 36. N. Kadowaki, S. Antonenko, J. Y. Lau, Y. J. Liu, Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J Exp Med* **192**, 219-226 (2000).
- Y. Lepelletier, R. Zollinger, C. Ghirelli, F. Raynaud, R. Hadj-Slimane, A. Cappuccio, O. Hermine, Y. J. Liu, V. Soumelis, Toll-like receptor control of glucocorticoid-induced apoptosis in human plasmacytoid predendritic cells (pDCs). *Blood* **116**, 3389-3397 (2010).
- Y. Zhan, E. M. Carrington, H. J. Ko, I. B. Vikstrom, S. Oon, J. G. Zhang, D. Vremec, J. L. Brady, P. Bouillet, L. Wu, D. C. Huang, I. P. Wicks, E. F. Morand, A. Strasser, A. M. Lew, Bcl-2 antagonists kill plasmacytoid dendritic cells from lupus-prone mice and dampen interferon-alpha production. *Arthritis Rheumatol* 67, 797-808 (2015).
- 39. R. Lande, M. Gilliet, Plasmacytoid dendritic cells: key players in the initiation and regulation of immune responses. *Ann N Y Acad Sci* **1183**, 89-103 (2010).
- E. M. Coccia, M. Severa, E. Giacomini, D. Monneron, M. E. Remoli, I. Julkunen, M. Cella, R. Lande, G. Uze, Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* **34**, 796-805 (2004).
- 41. M. Gilliet, W. Cao, Y. J. Liu, Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* **8**, 594-606 (2008).
- 42. T. Ito, H. Kanzler, O. Duramad, W. Cao, Y. J. Liu, Specialization, kinetics, and repertoire of type 1 interferon responses by human plasmacytoid predendritic cells. *Blood* **107**, 2423-2431 (2006).
- 43. F. Gerosa, A. Gobbi, P. Zorzi, S. Burg, F. Briere, G. Carra, G. Trinchieri, The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions. *J Immunol* **174**, 727-734 (2005).
- 44. G. Jego, A. K. Palucka, J. P. Blanck, C. Chalouni, V. Pascual, J. Banchereau, Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* **19**, 225-234 (2003).
- 45. G. A. Kolumam, S. Thomas, L. J. Thompson, J. Sprent, K. Murali-Krishna, Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *J Exp Med* **202**, 637-650 (2005).
- 46. S. M. Santini, C. Lapenta, M. Logozzi, S. Parlato, M. Spada, T. Di Pucchio, F. Belardelli, Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice. *J Exp Med* **191**, 1777-1788 (2000).

- 47. M. Salio, M. J. Palmowski, A. Atzberger, I. F. Hermans, V. Cerundolo, CpG-matured murine plasmacytoid dendritic cells are capable of in vivo priming of functional CD8 T cell responses to endogenous but not exogenous antigens. *J Exp Med* **199**, 567-579 (2004).
- 48. M. Colonna, G. Trinchieri, Y. J. Liu, Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* **5**, 1219-1226 (2004).
- 49. J. A. Villadangos, L. Young, Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* **29**, 352-361 (2008).
- 50. M. Kool, C. Geurtsvankessel, F. Muskens, F. B. Madeira, M. van Nimwegen, H. Kuipers, K. Thielemans, H. C. Hoogsteden, H. Hammad, B. N. Lambrecht, Facilitated antigen uptake and timed exposure to TLR ligands dictate the antigen-presenting potential of plasmacytoid DCs. *J Leukoc Biol* **90**, 1177-1190 (2011).
- 51. S. Nierkens, J. Tel, E. Janssen, G. J. Adema, Antigen cross-presentation by dendritic cell subsets: one general or all sergeants? *Trends Immunol* **34**, 361-370 (2013).
- 52. S. LeibundGut-Landmann, J. M. Waldburger, C. Reis e Sousa, H. Acha-Orbea, W. Reith, MHC class II expression is differentially regulated in plasmacytoid and conventional dendritic cells. *Nat Immunol* **5**, 899-908 (2004).
- 53. J. Mouries, G. Moron, G. Schlecht, N. Escriou, G. Dadaglio, C. Leclerc, Plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-prime naive T cells in vivo after TLR activation. *Blood* **112**, 3713-3722 (2008).
- 54. P. Fitzgerald-Bocarsly, J. Dai, S. Singh, Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history. *Cytokine Growth Factor Rev* **19**, 3-19 (2008).
- E. Latz, A. Schoenemeyer, A. Visintin, K. A. Fitzgerald, B. G. Monks, C. F. Knetter, E. Lien, N. J. Nilsen, T. Espevik, D. T. Golenbock, TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* 5, 190-198 (2004).
- 56. B. L. Lee, J. E. Moon, J. H. Shu, L. Yuan, Z. R. Newman, R. Schekman, G. M. Barton, UNC93B1 mediates differential trafficking of endosomal TLRs. *Elife* **2**, e00291 (2013).
- 57. S. E. Ewald, A. Engel, J. Lee, M. Wang, M. Bogyo, G. M. Barton, Nucleic acid recognition by Toll-like receptors is coupled to stepwise processing by cathepsins and asparagine endopeptidase. *J Exp Med* **208**, 643-651 (2011).
- 58. S. E. Ewald, B. L. Lee, L. Lau, K. E. Wickliffe, G. P. Shi, H. A. Chapman, G. M. Barton, The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature* **456**, 658-662 (2008).
- R. Fukui, C. Yamamoto, F. Matsumoto, M. Onji, T. Shibata, Y. Murakami, A. Kanno, T. Hayashi, N. Tanimura, N. Yoshida, K. Miyake, Cleavage of Toll-Like Receptor 9 Ectodomain Is Required for In Vivo Responses to Single Strand DNA. *Front Immunol* 9, 1491 (2018).
- S. S. Diebold, T. Kaisho, H. Hemmi, S. Akira, C. Reis e Sousa, Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**, 1529-1531 (2004).
- 61. F. Heil, H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, C. Kirschning, S. Akira, G. Lipford, H. Wagner, S. Bauer, Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303**, 1526-1529 (2004).
- J. M. Lund, L. Alexopoulou, A. Sato, M. Karow, N. C. Adams, N. W. Gale, A. Iwasaki, R. A. Flavell, Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 5598-5603 (2004).

- 63. T. Haas, J. Metzger, F. Schmitz, A. Heit, T. Muller, E. Latz, H. Wagner, The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation. *Immunity* **28**, 315-323 (2008).
- 64. H. Hemmi, O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda, S. Akira, A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**, 740-745 (2000).
- 65. J. Lund, A. Sato, S. Akira, R. Medzhitov, A. Iwasaki, Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* **198**, 513-520 (2003).
- 66. T. Frenz, L. Graalmann, C. N. Detje, M. Doring, E. Grabski, S. Scheu, U. Kalinke, Independent of plasmacytoid dendritic cell (pDC) infection, pDC triggered by virusinfected cells mount enhanced type I IFN responses of different composition as opposed to pDC stimulated with free virus. *J Immunol* **193**, 2496-2503 (2014).
- 67. H. K. Lee, J. M. Lund, B. Ramanathan, N. Mizushima, A. Iwasaki, Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. *Science* **315**, 1398-1401 (2007).
- M. Dreux, U. Garaigorta, B. Boyd, E. Decembre, J. Chung, C. Whitten-Bauer, S. Wieland, F. V. Chisari, Short-range exosomal transfer of viral RNA from infected cells to plasmacytoid dendritic cells triggers innate immunity. *Cell Host Microbe* **12**, 558-570 (2012).
- 69. K. Takahashi, S. Asabe, S. Wieland, U. Garaigorta, P. Gastaminza, M. Isogawa, F. V. Chisari, Plasmacytoid dendritic cells sense hepatitis C virus-infected cells, produce interferon, and inhibit infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 7431-7436 (2010).
- S. F. Wieland, K. Takahashi, B. Boyd, C. Whitten-Bauer, N. Ngo, J. C. de la Torre, F. V. Chisari, Human plasmacytoid dendritic cells sense lymphocytic choriomeningitis virusinfected cells in vitro. *J Virol* 88, 752-757 (2014).
- 71. B. Webster, S. Assil, M. Dreux, Cell-Cell Sensing of Viral Infection by Plasmacytoid Dendritic Cells. *J Virol* **90**, 10050-10053 (2016).
- 72. S. Assil, S. Coleon, C. Dong, E. Decembre, L. Sherry, O. Allatif, B. Webster, M. Dreux, Plasmacytoid Dendritic Cells and Infected Cells Form an Interferogenic Synapse Required for Antiviral Responses. *Cell Host Microbe* **25**, 730-745.e736 (2019).
- 73. E. Decembre, S. Assil, M. L. Hillaire, W. Dejnirattisai, J. Mongkolsapaya, G. R. Screaton, A. D. Davidson, M. Dreux, Sensing of immature particles produced by dengue virus infected cells induces an antiviral response by plasmacytoid dendritic cells. *PLoS Pathog* **10**, e1004434 (2014).
- 74. C. Guiducci, G. Ott, J. H. Chan, E. Damon, C. Calacsan, T. Matray, K. D. Lee, R. L. Coffman, F. J. Barrat, Properties regulating the nature of the plasmacytoid dendritic cell response to Toll-like receptor 9 activation. *J Exp Med* **203**, 1999-2008 (2006).
- K. Honda, H. Yanai, H. Negishi, M. Asagiri, M. Sato, T. Mizutani, N. Shimada, Y. Ohba, A. Takaoka, N. Yoshida, T. Taniguchi, IRF-7 is the master regulator of type-I interferondependent immune responses. *Nature* 434, 772-777 (2005).
- 76. A. Combes, V. Camosseto, P. N'Guessan, R. J. Arguello, J. Mussard, C. Caux, N. Bendriss-Vermare, P. Pierre, E. Gatti, BAD-LAMP controls TLR9 trafficking and signalling in human plasmacytoid dendritic cells. *Nat Commun* **8**, 913 (2017).
- 77. K. Honda, Y. Ohba, H. Yanai, H. Negishi, T. Mizutani, A. Takaoka, C. Taya, T. Taniguchi, Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature* **434**, 1035-1040 (2005).
- 78. W. Barchet, M. Cella, B. Odermatt, C. Asselin-Paturel, M. Colonna, U. Kalinke, Virusinduced interferon alpha production by a dendritic cell subset in the absence of feedback signaling in vivo. *J Exp Med* **195**, 507-516 (2002).

- C. Asselin-Paturel, G. Brizard, K. Chemin, A. Boonstra, A. O'Garra, A. Vicari, G. Trinchieri, Type I interferon dependence of plasmacytoid dendritic cell activation and migration. *J Exp Med* **201**, 1157-1167 (2005).
- A. L. Blasius, C. N. Arnold, P. Georgel, S. Rutschmann, Y. Xia, P. Lin, C. Ross, X. Li, N. G. Smart, B. Beutler, Slc15a4, AP-3, and Hermansky-Pudlak syndrome proteins are required for Toll-like receptor signaling in plasmacytoid dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 19973-19978 (2010).
- 81. Y. Kumagai, H. Kumar, S. Koyama, T. Kawai, O. Takeuchi, S. Akira, Cutting Edge: TLR-Dependent viral recognition along with type I IFN positive feedback signaling masks the requirement of viral replication for IFN-{alpha} production in plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* **182**, 3960-3964 (2009).
- E. Tomasello, K. Naciri, R. Chelbi, G. Bessou, A. Fries, E. Gressier, A. Abbas, E. Pollet, P. Pierre, T. Lawrence, T. P. Vu Manh, M. Dalod, Molecular dissection of plasmacytoid dendritic cell activation in vivo during a viral infection. *Embo j* 37 (2018).
- A. Takaoka, H. Yanai, S. Kondo, G. Duncan, H. Negishi, T. Mizutani, S. Kano, K. Honda, Y. Ohba, T. W. Mak, T. Taniguchi, Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 434, 243-249 (2005).
- 84. S. K. Panda, R. Kolbeck, M. A. Sanjuan, Plasmacytoid dendritic cells in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* **44**, 20-25 (2017).
- F. Prete, M. Catucci, M. Labrada, S. Gobessi, M. C. Castiello, E. Bonomi, A. Aiuti, W. Vermi, C. Cancrini, A. Metin, S. Hambleton, R. Bredius, L. D. Notarangelo, M. van der Burg, U. Kalinke, A. Villa, F. Benvenuti, Wiskott-Aldrich syndrome protein-mediated actin dynamics control type-I interferon production in plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 210, 355-374 (2013).
- J. Babdor, D. Descamps, A. C. Adiko, M. Tohme, S. Maschalidi, I. Evnouchidou, L. R. Vasconcellos, M. De Luca, F. X. Mauvais, M. Garfa-Traore, M. M. Brinkmann, M. Chignard, B. Manoury, L. Saveanu, IRAP(+) endosomes restrict TLR9 activation and signaling. *Nat Immunol* 18, 509-518 (2017).
- 87. L. A. O'Neill, E. J. Pearce, Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function. *J Exp Med* **213**, 15-23 (2016).
- 88. G. Bajwa, R. J. DeBerardinis, B. Shao, B. Hall, J. D. Farrar, M. A. Gill, Cutting Edge: Critical Role of Glycolysis in Human Plasmacytoid Dendritic Cell Antiviral Responses. *J Immunol* **196**, 2004-2009 (2016).
- D. Wu, D. E. Sanin, B. Everts, Q. Chen, J. Qiu, M. D. Buck, A. Patterson, A. M. Smith, C. H. Chang, Z. Liu, M. N. Artyomov, E. L. Pearce, M. Cella, E. J. Pearce, Type 1 Interferons Induce Changes in Core Metabolism that Are Critical for Immune Function. *Immunity* 44, 1325-1336 (2016).
- 90. F. Basit, T. Mathan, D. Sancho, I. J. M. de Vries, Human Dendritic Cell Subsets Undergo Distinct Metabolic Reprogramming for Immune Response. *Front Immunol* **9**, 2489 (2018).
- 91. E. L. Pearce, E. J. Pearce, Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. *Immunity* **38**, 633-643 (2013).
- 92. P. Saas, A. Varin, S. Perruche, A. Ceroi, Recent insights into the implications of metabolism in plasmacytoid dendritic cell innate functions: Potential ways to control these functions. *F1000Res* **6**, 456 (2017).
- 93. A. L. Bishop, A. Hall, Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* **348 Pt 2**, 241-255 (2000).
- 94. A. Boureux, E. Vignal, S. Faure, P. Fort, Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes. *Mol Biol Evol* **24**, 203-216 (2007).

- 95. S. J. Heasman, A. J. Ridley, Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 690-701 (2008).
- 96. A. B. Jaffe, A. Hall, Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 247-269 (2005).
- M. Symons, J. M. Derry, B. Karlak, S. Jiang, V. Lemahieu, F. McCormick, U. Francke, A. Abo, Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization. *Cell* 84, 723-734 (1996).
- 98. M. F. Carlier, A. Ducruix, D. Pantaloni, Signalling to actin: the Cdc42-N-WASP-Arp2/3 connection. *Chem Biol* **6**, R235-240 (1999).
- 99. K. Hufner, H. N. Higgs, T. D. Pollard, C. Jacobi, M. Aepfelbacher, S. Linder, The verprolin-like central (vc) region of Wiskott-Aldrich syndrome protein induces Arp2/3 complex-dependent actin nucleation. *J Biol Chem* **276**, 35761-35767 (2001).
- J. Block, D. Breitsprecher, S. Kühn, M. Winterhoff, F. Kage, R. Geffers, P. Duwe, J. L. Rohn, B. Baum, C. Brakebusch, M. Geyer, T. E. Stradal, J. Faix, K. Rottner, FMNL2 drives actin-based protrusion and migration downstream of Cdc42. *Curr Biol* 22, 1005-1012 (2012).
- 101. G. Vogler, J. Liu, T. W. Iafe, E. Migh, J. Mihály, R. Bodmer, Cdc42 and formin activity control non-muscle myosin dynamics during Drosophila heart morphogenesis. *J Cell Biol* **206**, 909-922 (2014).
- 102. S. Etienne-Manneville, Cdc42--the centre of polarity. J Cell Sci 117, 1291-1300 (2004).
- 103. R. Kroschewski, A. Hall, I. Mellman, Cdc42 controls secretory and endocytic transport to the basolateral plasma membrane of MDCK cells. *Nat Cell Biol* **1**, 8-13 (1999).
- 104. W. Yang, C. G. Lo, T. Dispenza, R. A. Cerione, The Cdc42 target ACK2 directly interacts with clathrin and influences clathrin assembly. *J Biol Chem* **276**, 17468-17473 (2001).
- 105. W. Bu, K. B. Lim, Y. H. Yu, A. M. Chou, T. Sudhaharan, S. Ahmed, Cdc42 interaction with N-WASP and Toca-1 regulates membrane tubulation, vesicle formation and vesicle motility: implications for endocytosis. *PLoS One* **5**, e12153 (2010).
- S. Sabharanjak, P. Sharma, R. G. Parton, S. Mayor, GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytic pathway. *Dev Cell* 2, 411-423 (2002).
- 107. M. A. West, A. R. Prescott, E. L. Eskelinen, A. J. Ridley, C. Watts, Rac is required for constitutive macropinocytosis by dendritic cells but does not control its downregulation. *Curr Biol* **10**, 839-848 (2000).
- W. S. Garrett, L. M. Chen, R. Kroschewski, M. Ebersold, S. Turley, S. Trombetta, J. E. Galan, I. Mellman, Developmental control of endocytosis in dendritic cells by Cdc42. *Cell* **102**, 325-334 (2000).
- A. M. Schulz, S. Stutte, S. Hogl, N. Luckashenak, D. Dudziak, C. Leroy, I. Forne, A. Imhof, S. A. Muller, C. H. Brakebusch, S. F. Lichtenthaler, T. Brocker, Cdc42-dependent actin dynamics controls maturation and secretory activity of dendritic cells. *J Cell Biol* 211, 553-567 (2015).
- 110. G. V. Shurin, I. L. Tourkova, G. S. Chatta, G. Schmidt, S. Wei, J. Y. Djeu, M. R. Shurin, Small rho GTPases regulate antigen presentation in dendritic cells. *J Immunol* **174**, 3394-3400 (2005).
- 111. A. Till, R. Saito, D. Merkurjev, J. J. Liu, G. H. Syed, M. Kolnik, A. Siddiqui, M. Glas, B. Scheffler, T. Ideker, S. Subramani, Evolutionary trends and functional anatomy of the human expanded autophagy network. *Autophagy* **11**, 1652-1667 (2015).

- 112. A. Seth, C. Otomo, M. K. Rosen, Autoinhibition regulates cellular localization and actin assembly activity of the diaphanous-related formins FRLalpha and mDia1. *J Cell Biol* **174**, 701-713 (2006).
- 113. K. Stengel, Y. Zheng, Cdc42 in oncogenic transformation, invasion, and tumorigenesis. *Cell Signal* **23**, 1415-1423 (2011).
- 114. R. A. Cerione, Cdc42: new roads to travel. Trends Cell Biol 14, 127-132 (2004).
- 115. W. J. Wu, S. Tu, R. A. Cerione, Activated Cdc42 sequesters c-Cbl and prevents EGF receptor degradation. *Cell* **114**, 715-725 (2003).
- 116. M. M. Chou, J. M. Masuda-Robens, M. L. Gupta, Cdc42 promotes G1 progression through p70 S6 kinase-mediated induction of cyclin E expression. *J Biol Chem* **278**, 35241-35247 (2003).
- 117. M. F. Olson, A. Ashworth, A. Hall, An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science* **269**, 1270-1272 (1995).
- 118. D. S. Du, X. Z. Yang, Q. Wang, W. J. Dai, W. X. Kuai, Y. L. Liu, D. Chu, X. J. Tang, Effects of CDC42 on the proliferation and invasion of gastric cancer cells. *Mol Med Rep* **13**, 550-554 (2016).
- 119. S. Yasuda, F. Oceguera-Yanez, T. Kato, M. Okamoto, S. Yonemura, Y. Terada, T. Ishizaki, S. Narumiya, Cdc42 and mDia3 regulate microtubule attachment to kinetochores. *Nature* **428**, 767-771 (2004).
- 120. T. H. Chuang, K. M. Hahn, J. D. Lee, D. E. Danley, G. M. Bokoch, The small GTPase Cdc42 initiates an apoptotic signaling pathway in Jurkat T lymphocytes. *Mol Biol Cell* **8**, 1687-1698 (1997).
- 121. Y. Ito, S. L. Teitelbaum, W. Zou, Y. Zheng, J. F. Johnson, J. Chappel, F. P. Ross, H. Zhao, Cdc42 regulates bone modeling and remodeling in mice by modulating RANKL/M-CSF signaling and osteoclast polarization. *J Clin Invest* **120**, 1981-1993 (2010).
- 122. S. Tu, R. A. Cerione, Cdc42 is a substrate for caspases and influences Fas-induced apoptosis. *J Biol Chem* **276**, 19656-19663 (2001).
- 123. K. W. Kalim, J. Q. Yang, Y. Li, Y. Meng, Y. Zheng, F. Guo, Reciprocal Regulation of Glycolysis-Driven Th17 Pathogenicity and Regulatory T Cell Stability by Cdc42. *J Immunol* **200**, 2313-2326 (2018).
- 124. G. L. Semenza, Targeting HIF-1 for cancer therapy. Nat Rev Cancer 3, 721-732 (2003).
- 125. T. Wang, H. Liu, G. Lian, S. Y. Zhang, X. Wang, C. Jiang, HIF1alpha-Induced Glycolysis Metabolism Is Essential to the Activation of Inflammatory Macrophages. *Mediators Inflamm* **2017**, 9029327 (2017).
- 126. P. Sadlecki, M. Bodnar, M. Grabiec, A. Marszalek, P. Walentowicz, A. Sokup, J. Zegarska, M. Walentowicz-Sadlecka, The role of Hypoxia-inducible factor-1 alpha, glucose transporter-1, (GLUT-1) and carbon anhydrase IX in endometrial cancer patients. *Biomed Res Int* **2014**, 616850 (2014).
- 127. L. Z. Shi, R. Wang, G. Huang, P. Vogel, G. Neale, D. R. Green, H. Chi, HIF1alphadependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells. *J Exp Med* **208**, 1367-1376 (2011).
- 128. H. Nakano, M. Yanagita, M. D. Gunn, CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* **194**, 1171-1178 (2001).
- 129. M. L. Caton, M. R. Smith-Raska, B. Reizis, Notch-RBP-J signaling controls the homeostasis of CD8- dendritic cells in the spleen. *J Exp Med* **204**, 1653-1664 (2007).

- 130. X. Wu, F. Quondamatteo, T. Lefever, A. Czuchra, H. Meyer, A. Chrostek, R. Paus, L. Langbein, C. Brakebusch, Cdc42 controls progenitor cell differentiation and beta-catenin turnover in skin. *Genes Dev* **20**, 571-585 (2006).
- 131. Y. Benninger, T. Thurnherr, J. A. Pereira, S. Krause, X. Wu, A. Chrostek-Grashoff, D. Herzog, K. A. Nave, R. J. Franklin, D. Meijer, C. Brakebusch, U. Suter, J. B. Relvas, Essential and distinct roles for cdc42 and rac1 in the regulation of Schwann cell biology during peripheral nervous system development. *J Cell Biol* **177**, 1051-1061 (2007).
- 132. V. Redecke, R. Wu, J. Zhou, D. Finkelstein, V. Chaturvedi, A. A. High, H. Hacker, Hematopoietic progenitor cell lines with myeloid and lymphoid potential. *Nat Methods* **10**, 795-803 (2013).
- 133. J. A. Cooper, Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol* **105**, 1473-1478 (1987).
- 134. A. M. Schulz, Rho GTPase Cdc42 controls invariant chain processing and MHC II loading in Dendritic Cells (Dissertation). *Elektronische Hochschulschriften, Ludwig Maximilians-Universität München* **URN:urn:nbn:de:bvb:19-188556** (2013).
- L. Hong, S. R. Kenney, G. K. Phillips, D. Simpson, C. E. Schroeder, J. Noth, E. Romero, S. Swanson, A. Waller, J. J. Strouse, M. Carter, A. Chigaev, O. Ursu, T. Oprea, B. Hjelle, J. E. Golden, J. Aube, L. G. Hudson, T. Buranda, L. A. Sklar, A. Wandinger-Ness, Characterization of a Cdc42 protein inhibitor and its use as a molecular probe. *J Biol Chem* 288, 8531-8543 (2013).
- 136. Z. Surviladze, A. Waller, J. J. Strouse, C. Bologa, O. Ursu, V. Salas, J. F. Parkinson, G. K. Phillips, E. Romero, A. Wandinger-Ness, L. A. Sklar, C. Schroeder, D. Simpson, J. Noth, J. Wang, J. Golden, J. Aube, "A Potent and Selective Inhibitor of Cdc42 GTPase" in Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program. (National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD), 2010).
- 137. M. B. Mues, N. Cheshenko, D. W. Wilson, L. Gunther-Cummins, B. C. Herold, Dynasore disrupts trafficking of herpes simplex virus proteins. *J Virol* **89**, 6673-6684 (2015).
- 138. J. Gerdes, H. Lemke, H. Baisch, H. H. Wacker, U. Schwab, H. Stein, Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* **133**, 1710-1715 (1984).
- M. Bogunovic, F. Ginhoux, A. Wagers, M. Loubeau, L. M. Isola, L. Lubrano, V. Najfeld, R. G. Phelps, C. Grosskreutz, E. Scigliano, P. S. Frenette, M. Merad, Identification of a radio-resistant and cycling dermal dendritic cell population in mice and men. *J Exp Med* 203, 2627-2638 (2006).
- 140. N. W. Andrews, Detection of Lysosomal Exocytosis by Surface Exposure of Lamp1 Luminal Epitopes. *Methods Mol Biol* **1594**, 205-211 (2017).
- 141. J. Rohrer, A. Schweizer, D. Russell, S. Kornfeld, The targeting of Lamp1 to lysosomes is dependent on the spacing of its cytoplasmic tail tyrosine sorting motif relative to the membrane. *J Cell Biol* **132**, 565-576 (1996).
- D. L. Medina, A. Fraldi, V. Bouche, F. Annunziata, G. Mansueto, C. Spampanato, C. Puri, A. Pignata, J. A. Martina, M. Sardiello, M. Palmieri, R. Polishchuk, R. Puertollano, A. Ballabio, Transcriptional activation of lysosomal exocytosis promotes cellular clearance. *Dev Cell* 21, 421-430 (2011).
- 143. B. Reizis, Regulation of plasmacytoid dendritic cell development. *Curr Opin Immunol* **22**, 206-211 (2010).
- 144. T. S. Heng, M. W. Painter, The Immunological Genome Project: networks of gene expression in immune cells. *Nat Immunol* **9**, 1091-1094 (2008).
- 145. L. B. Ivashkiv, L. T. Donlin, Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol* **14**, 36-49 (2014).

- 146. W. M. Schneider, M. D. Chevillotte, C. M. Rice, Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol* **32**, 513-545 (2014).
- 147. S. J. Martin, C. P. Reutelingsperger, A. J. McGahon, J. A. Rader, R. C. van Schie, D. M. LaFace, D. R. Green, Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* **182**, 1545-1556 (1995).
- 148. I. A. Simpson, D. Dwyer, D. Malide, K. H. Moley, A. Travis, S. J. Vannucci, The facilitative glucose transporter GLUT3: 20 years of distinction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **295**, E242-253 (2008).
- 149. S. W. Ryu, E. C. Han, J. Yoon, C. Choi, The mitochondrial fusion-related proteins Mfn2 and OPA1 are transcriptionally induced during differentiation of bone marrow progenitors to immature dendritic cells. *Mol Cells* **38**, 89-94 (2015).
- 150. M. D. Buck, D. O'Sullivan, R. I. Klein Geltink, J. D. Curtis, C. H. Chang, D. E. Sanin, J. Qiu, O. Kretz, D. Braas, G. J. van der Windt, Q. Chen, S. C. Huang, C. M. O'Neill, B. T. Edelson, E. J. Pearce, H. Sesaki, T. B. Huber, A. S. Rambold, E. L. Pearce, Mitochondrial Dynamics Controls T Cell Fate through Metabolic Programming. *Cell* 166, 63-76 (2016).
- 151. A. Angajala, S. Lim, J. B. Phillips, J. H. Kim, C. Yates, Z. You, M. Tan, Diverse Roles of Mitochondria in Immune Responses: Novel Insights Into Immuno-Metabolism. *Front Immunol* **9**, 1605 (2018).
- 152. E. Schrepfer, L. Scorrano, Mitofusins, from Mitochondria to Metabolism. *Mol Cell* **61**, 683-694 (2016).
- 153. J. Kandel, A. A. Angelin, D. C. Wallace, D. M. Eckmann, Mitochondrial respiration is sensitive to cytoarchitectural breakdown. *Integr Biol (Camb)* **8**, 1170-1182 (2016).
- 154. T. Chao, H. Wang, P. C. Ho, Mitochondrial Control and Guidance of Cellular Activities of T Cells. *Front Immunol* **8**, 473 (2017).
- 155. X. R. Bustelo, V. Sauzeau, I. M. Berenjeno, GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays* **29**, 356-370 (2007).
- 156. J. Amado-Azevedo, N. R. Reinhard, J. van Bezu, R. X. de Menezes, V. W. van Beusechem, G. P. van Nieuw Amerongen, V. W. M. van Hinsbergh, P. L. Hordijk, A CDC42-centered signaling unit is a dominant positive regulator of endothelial integrity. *Sci Rep* **7**, 10132 (2017).
- 157. A. Bonfim-Melo, E. R. Ferreira, R. A. Mortara, Rac1/WAVE2 and Cdc42/N-WASP Participation in Actin-Dependent Host Cell Invasion by Extracellular Amastigotes of Trypanosoma cruzi. *Front Microbiol* **9**, 360 (2018).
- 158. X. Chi, S. Wang, Y. Huang, M. Stamnes, J. L. Chen, Roles of rho GTPases in intracellular transport and cellular transformation. *Int J Mol Sci* **14**, 7089-7108 (2013).
- 159. W. Brieher, Mechanisms of actin disassembly. Mol Biol Cell 24, 2299-2302 (2013).
- 160. W. M. Morton, K. R. Ayscough, P. J. McLaughlin, Latrunculin alters the actin-monomer subunit interface to prevent polymerization. *Nat Cell Biol* **2**, 376-378 (2000).
- 161. K. Corcoran, M. Jabbour, C. Bhagwandin, M. J. Deymier, D. L. Theisen, L. Lybarger, Ubiquitin-mediated regulation of CD86 protein expression by the ubiquitin ligase membrane-associated RING-CH-1 (MARCH1). *J Biol Chem* **286**, 37168-37180 (2011).
- 162. A. De Gassart, V. Camosseto, J. Thibodeau, M. Ceppi, N. Catalan, P. Pierre, E. Gatti, MHC class II stabilization at the surface of human dendritic cells is the result of maturation-dependent MARCH I down-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 3491-3496 (2008).

- 163. C. Smyth, G. Logan, R. P. Weinberger, P. B. Rowe, I. E. Alexander, J. A. Smythe, Identification of a dynamic intracellular reservoir of CD86 protein in peripheral blood monocytes that is not associated with the Golgi complex. *J Immunol* **160**, 5390-5396 (1998).
- 164. C. M. Smyth, G. Logan, R. Boadle, P. B. Rowe, J. A. Smythe, I. E. Alexander, Differential subcellular localization of CD86 in human PBMC-derived macrophages and DCs, and ultrastructural characterization by immuno-electron microscopy. *Int Immunol* **17**, 123-132 (2005).
- 165. J. A. Villadangos, P. Schnorrer, Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol* **7**, 543-555 (2007).
- J. Tel, G. Schreibelt, S. P. Sittig, T. S. Mathan, S. I. Buschow, L. J. Cruz, A. J. Lambeck, C. G. Figdor, I. J. de Vries, Human plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-present exogenous Ags to CD8+ T cells despite lower Ag uptake than myeloid dendritic cell subsets. *Blood* **121**, 459-467 (2013).
- 167. J. Dalgaard, K. J. Beckstrom, F. L. Jahnsen, J. E. Brinchmann, Differential capability for phagocytosis of apoptotic and necrotic leukemia cells by human peripheral blood dendritic cell subsets. *J Leukoc Biol* **77**, 689-698 (2005).
- 168. G. Stent, J. C. Reece, D. C. Baylis, K. Ivinson, G. Paukovics, M. Thomson, P. U. Cameron, Heterogeneity of freshly isolated human tonsil dendritic cells demonstrated by intracellular markers, phagocytosis, and membrane dye transfer. *Cytometry* **48**, 167-176 (2002).
- 169. J. C. Ochando, C. Homma, Y. Yang, A. Hidalgo, A. Garin, F. Tacke, V. Angeli, Y. Li, P. Boros, Y. Ding, R. Jessberger, G. Trinchieri, S. A. Lira, G. J. Randolph, J. S. Bromberg, Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat Immunol* 7, 652-662 (2006).
- 170. G. Hoeffel, A. C. Ripoche, D. Matheoud, M. Nascimbeni, N. Escriou, P. Lebon, F. Heshmati, J. G. Guillet, M. Gannage, S. Caillat-Zucman, N. Casartelli, O. Schwartz, H. De la Salle, D. Hanau, A. Hosmalin, C. Maranon, Antigen crosspresentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 27, 481-492 (2007).
- 171. E. L. Gautier, T. Shay, J. Miller, M. Greter, C. Jakubzick, S. Ivanov, J. Helft, A. Chow, K. G. Elpek, S. Gordonov, A. R. Mazloom, A. Ma'ayan, W. J. Chua, T. H. Hansen, S. J. Turley, M. Merad, G. J. Randolph, Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat Immunol* **13**, 1118-1128 (2012).
- 172. A. V. Misharin, L. Morales-Nebreda, G. M. Mutlu, G. R. Budinger, H. Perlman, Flow cytometric analysis of macrophages and dendritic cell subsets in the mouse lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* **49**, 503-510 (2013).
- 173. A. V. Rubtsov, K. Rubtsova, A. Fischer, R. T. Meehan, J. Z. Gillis, J. W. Kappler, P. Marrack, Toll-like receptor 7 (TLR7)-driven accumulation of a novel CD11c(+) B-cell population is important for the development of autoimmunity. *Blood* **118**, 1305-1315 (2011).
- 174. N. Luckashenak, A. Wahe, K. Breit, C. Brakebusch, T. Brocker, Rho-family GTPase Cdc42 controls migration of Langerhans cells in vivo. *J Immunol* **190**, 27-35 (2013).
- 175. G. Oshikawa, T. Nagao, N. Wu, T. Kurosu, O. Miura, c-Cbl and Cbl-b ligases mediate 17-allylaminodemethoxygeldanamycin-induced degradation of autophosphorylated Flt3 kinase with internal tandem duplication through the ubiquitin proteasome pathway. *J Biol Chem* **286**, 30263-30273 (2011).

- B. Sargin, C. Choudhary, N. Crosetto, M. H. H. Schmidt, R. Grundler, M. Rensinghoff, C. Thiessen, L. Tickenbrock, J. Schwable, C. Brandts, B. August, S. Koschmieder, S. R. Bandi, J. Duyster, W. E. Berdel, C. Muller-Tidow, I. Dikic, H. Serve, Flt3-dependent transformation by inactivating c-Cbl mutations in AML. *Blood* **110**, 1004-1012 (2007).
- 177. M. Burbage, S. J. Keppler, F. Gasparrini, N. Martínez-Martín, M. Gaya, C. Feest, M. C. Domart, C. Brakebusch, L. Collinson, A. Bruckbauer, F. D. Batista, Cdc42 is a key regulator of B cell differentiation and is required for antiviral humoral immunity. *J Exp Med* **212**, 53-72 (2015).
- 178. R. C. Rickert, J. Roes, K. Rajewsky, B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res* **25**, 1317-1318 (1997).
- 179. F. Guo, C. S. Velu, H. L. Grimes, Y. Zheng, Rho GTPase Cdc42 is essential for Blymphocyte development and activation. *Blood* **114**, 2909-2916 (2009).
- 180. C. Guilluy, R. Garcia-Mata, K. Burridge, Rho protein crosstalk: another social network? *Trends Cell Biol* **21**, 718-726 (2011).
- F. Guo, S. Zhang, P. Tripathi, J. Mattner, J. Phelan, A. Sproles, J. Mo, M. Wills-Karp, H. L. Grimes, D. Hildeman, Y. Zheng, Distinct roles of Cdc42 in thymopoiesis and effector and memory T cell differentiation. *PLoS One* 6, e18002 (2011).

### Danksagung

Herrn Prof. Dr. Thomas Brocker danke ich ganz besonders für die interessante Themenstellung, für seine konstruktiven Ideen und die Unterstützung dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Susanne Stutte für die Betreuung, die weiterführenden Ratschläge bei fachlichen Fragen, für die Hilfestellungen während der praktischen Arbeit im Labor sowie für die Korrektur meiner Arbeit.

Dem SFB914 und dem IRT914 danke ich für die Finanzierung sowie die Möglichkeit durch Seminare und Workshops mein Wissen zu erweitern. Mein Dank gilt auch Frau Dr. Julia von Blume und Herrn Prof. Dr. Markus Sperandio für das Einbringen ihrer Ideen und die weiterführenden Diskussionen während meiner TAC-Meetings. Zudem möchte ich mich bei Frau Dr. Verena Kochan für ihre Unterstützung bedanken.

Frau Prof. Dr. Barbara Walzog möchte ich für die Kooperationen danken. Mein Dank geht auch an Frau Dr. Annette Zehrer für die Generierung der Hoxb8-Zelllinien sowie für die Hilfestellungen bei der Arbeit mit diesen Zellen. Bei Frau Prof. Dr. Anne Krug sowie Herrn Dr. Andrea Musumeci möchte ich mich für die Zurverfügungstellung des Flt3L-Überstandes bedanken. Herrn Dr. Andrea Musumeci danke ich zudem für die hilfreichen Gespräche und das Teilen seines Wissens, vielen Dank. Mein Dank geht auch an Frau Dr. Hellen Ishikawa-Ankerhold, Frau Dr. Natalia Pacheco Fernandez, Herrn Dr. Robert Pick und Herrn Michael Dudek für die Zusammenarbeit. Frau Dr. Lisa Richter möchte ich meinen Dank für die Hilfe bei Fragen zur Durchflusszytometrie aussprechen. Auch beim Team des Ifl-Maushauses und der CAM möchte ich mich bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Janina Ruf für ihre stetige Hilfsbereitschaft, die Unterstützung bei der Genotypisierung der Mäuse und im Laboralltag sowie für ihre fröhliche Art. Dr. Anne Trefzer und Lisa Rausch bin ich dankbar für die stetige Unterstützung und Hilfe, das Teilen ihres Wissens und ihre Ratschläge. Danke, dass ihr mich durch alle Hochs und Tiefs begleitet habt. Bei Herrn Dr. Jan Kranich möchte ich mich herzlichst für seine Unterstützung, die weiterführenden und hilfreichen Diskussionen sowie die motivierenden Worte bedanken. Allen Mitarbeitern des Instituts für Immunologie danke ich für die positive Atmosphäre sowie das Teilen von Methoden- und Sachwissen. Mein besonderer Dank gilt meinen Kollegen der AG Brocker.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie für die motivierenden Worte und liebevolle Unterstützung. Danke, dass ihr stets hinter mir steht und mich auf diesem Weg begleitet habt! Mein Dank gilt auch Julian - Danke für deine Geduld, dein Verständnis, deine Ermutigungen und deinen Rückhalt. Liebsten Dank auch an Agathe, Franzi, Lisa und Ria, die immer an meiner Seite waren und mich stets unterstützten.

## Eidesstattliche Versicherung



Kugler, Ina

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Funktion von Cdc42 in plasmazytoiden dendritischen Zellen

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 Bezeichnung 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, 8. Mai 2021

Ina Kugler

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand