Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Klaus Pfeffer

Charakterisierung der PSD93 Expression in Interferon β-produzierenden plasmazytoiden dendritischen Zellen auf mRNAund Proteinebene

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

> vorgelegt von Alexander Hoven

> > 2019

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan:	UnivProf. Dr. Nikolaj Klöcker
Erstgutachterin:	UnivProf. Dr. Stefanie Scheu
Zweitgutacher:	UnivProf. Dr. Orhan Aktas

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Ali, S., Hoven, A., Dress, R.J., Schaal, H., Alferink, J., Scheu, S., 2018. Identification of a novel Dlg2 isoform differentially expressed in IFN β -producing plasmacytoid dendritic cells. *BMC Genomics*, 19:194 (1-12)

Zusammenfassung

In vorausgehenden Arbeiten konnte in einer Transkriptom-Analyse von ex vivosortierten plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs) aus der Milz gezeigt werden, dass PSD93 (Postsynaptic density protein 93) stark differenziell von Interferon (IFN) β produzierenden pDCs gegenüber pDCs exprimiert wird, die kein IFNβ produzieren. PSD93 ist aus den Neurowissenschaften u.a. zur Stabilisierung von Glutamatrezeptoren in der postsynaptischen Membran bekannt, und im Mausmodell konnte die Relevanz für komplexe kognitive Leistungen wie Lernen und Gedächtnis gezeigt werden. Das Vorkommen und die Hochregulation von Psd93 nach Stimulation in pDCs war überraschend, da bislang keine Funktion in Immunzellen beschrieben war. Diese Arbeit charakterisiert PSD93, welches in pDCs und anderen Immunzellen vorkommt, auf mRNA- und Proteinebene. Im Fokus dieser Arbeit stehen die unterschiedlichen Spleißvarianten von Psd93. Als Ausgangsmaterial dienten Knochenmark(KM)-differenzierte FMS-like tyrosine kinase 3 ligand (Flt3L) Kulturen aus IFNβ-Reportermäusen, die nach Stimulation mit CpG über die Expression von *yellow fluorescent protein* (YFP) in IFNβ/YFP+ und IFNβ/YFP⁻ Dendritische Zellen (DCs) FACS-sortiert wurden. Mit konventioneller RT-PCR wurde die Expression von Psd93-Transkripten überprüft und durch Sequenzierung bestätigt. Die gRT-PCR stellte die differenzielle Expression von Psd93 in YFP⁺ im Vergleich zu YFP⁻ DCs dar. Vorrangig wurde die Expression in pDCs untersucht, jedoch konnten Teile der Versuche auch an Material aus konventionellen DCs und Makrophagen durchgeführt werden. Anschließend sollten PSD93-Protein-Isoformen mittels Immunpräzipitation und Western-Blot gezeigt werden. Im Vorfeld führten wir eine Datenbankrecherche durch, was zur Etablierung einer modifizerten Gen-Nomenklatur für Psd93 führte. Diese diente als Ausgangspunkt zur Einordnung der amplifizierten *Psd93*-Transkripte. Die Expressionssteigerung von Psd93 konnte für in vitro Flt3L-Kulturen bestätigt werden. Als einziges Transkript ließ sich die y-lsoform mit der RT-PCR darstellen. In einem parallel durchgeführten 5'RACE-PCR-Ansatz wurde mit einem kürzeren n-Transkript eine weitere N-terminale Isoform amplifiziert. In einem Bereich alternativen Spleißens ergaben sowohl RT-PCR als auch RACE-PCR dieselbe vom Spleißverhalten in Neuronen abweichende Exon-Sequenz mit Exon 18-19-20-23 und der Abwesenheit von Exon 21 und 22 in Transkripten aus pDCs. Zusammenfassend lässt sich von einem pDC-spezifischen Spleißmuster sprechen. Auf Proteinebene konnte die genannte y- und n-lsoform von PSD93 durch Größenvergleich mit überexprimierten Protein-Isoformen gezeigt werden. Die in den Neurowissenschaften genutzte PSD93^{-/-} Maus stellt keinen vollständigen Knockout für die kurze n-lsoform dar, welche von uns auch in Proben aus Gehirn detektiert werden konnte. Für unsere Zwecke wurde die Nomenklatur dahingehend auf PSD93^{Δ9/Δ9} geändert. Zur weiteren Untersuchung der Funktion der η-Variante von PSD93 erscheint die Generierung eines vollständigen Knockout-Modells notwendig.

[I]

Abstract

In previous studies using transcriptome analysis of ex vivo sorted plasmacytoid dendritic cells (pDCs) from the spleen it was shown, that PSD93 (Postsynaptic density protein 93) is highly differentially expressed in Interferon (IFN) β-producing pDCs vs. pDCs not producing this cytokine. PSD93 is known from neuroscience where it i.a. stabilizes glutamate receptors in the postsynaptic membrane and in the mouse its relevance for complex cognitive functions such as learning and memory could be displayed. The existence and upregulation of *Psd93* after stimulation in pDCs was surprising, because no function for this protein was described in immune cells, so far. This thesis characterizes PSD93 expression in pDCs and other immune cells on mRNA and protein level. The focus of this thesis lies on the Psd93 splice variants. As starting material served bone marrow-derived FMS-like tyrosine kinase 3 ligand (FIt3I) cultures from IFNß reporter mice which were FACS-sorted for the expression of yellow fluorescent protein (YFP) into IFNB/YFP⁺ and IFNB/YFP⁻ dendritic cells (DCs) after stimulation with CpG. The expression of Psd93 transcripts was checked with conventional RT-PCR and confirmed through sequencing. gRT-PCR illustrated the differential expression of *Psd93* in YFP⁺ compared to YFP⁻ DCs. The primary goal was the examination of the expression in pDCs, however additional experiments could be performed with material from conventional DCs and macrophages. After that, PSD93 protein isoforms were analysed through immunoprecipitation and Western blotting.

We have previously performed a database analysis that established a modified gene nomenclature for *Psd93* which was used as reference for the integration of our amplified transcripts. The increased expression of *Psd93* could be confirmed for *in vitro* Flt3l cultures. Only the γ -isoform could be found as transcript by RT-PCR. The 5'RACE-PCR performed in parallel could amplify a shorter η -transcript as an additional N-terminal isoform. In a gene area of alternative splicing both RT-PCR as well as RACE-PCR showed the same splicing pattern with the exon sequence 18-19-20-23 and the absence of exon 21 and 22 in transcripts from pDCs which is different from neurons. In conclusion, a pDC-specific splicing pattern was established.

On protein level, the already described γ - and η -isoforms of PSD93 could be shown through size comparison of the overexpressed protein. The PSD93^{-/-} mouse used in neuroscience so far is not a full knockout for the short η -isoform which we also detected in material taken from brain. For our purposes the nomenclature for this mouse was changed to PSD93^{Δ 9/ Δ 9}. For future investigations of the functional role of PSD93 η -variant the generation of a full knockout is necessary.

Abkürzungsverzeichnis

Definierte sprachliche Abkürzungen (z.B., z.T., u.a., vgl., s., etc.), Bezeichnungen von Chemikalien und Fluorophoren (Kapitel 2), sowie Ländercodes (nach ISO 3166 *ALPHA-3*) sind in diesem Abkürzungsverzeichnis nicht enthalten.

% Prozent °C Grad Celsius Basenpaare bp Zentimeter cm cm² Quadratzentimeter g Gramm Stunde(n) h Kilodalton kDa М Molar mΑ Milliampere Minute(n) min ml Milliliter Millimolar mΜ Nanometer nm Umdrehung(en) pro Minute rpm Sekunde(n) sec Units U ۷ Volt v/v Volumen pro Volumen Gewicht pro Volumen w/v Mikrogramm μg Mikroliter μl Abkürzungen negativ(e)

(SI-)Einheiten

	···· 9-··· (-)
+	positiv(e)
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AMPAR	α-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionsäure-Rezeptor
APC	Antigenpräsentierende Zelle
BMDMs	Bonemarrow-derived macrophages
CD	Cluster of differentiation
cDCs	Konventionelle dendritische Zellen
cDNA	Komplementäre DNA
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
СР	Crossing point
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin
DC(s)	Dendritische Zelle(n)
DLG	Discs large homolog
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
Flt3L	FMS-like tyrosine kinase 3 ligand

FSC	Forward scatter
fwd	Forward (5´-3´)
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GK	Guanylate kinase-like
GRC	Genome Reference Consortium
(d)H ₂ O	(destilliertes) Wasser
HRP	Horse-Raddish-Peroxidase
IFNAR	IFNa-Rezeptor
IFN(s)	Interferon
IFNβ	Interferon β
lg	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
KM	Knochenmark
КО	Knockout
LC(s)	Langerhans-Zelle(n)
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MDP(s)	Monozyten/DC-Progenitor(en)
MHC	Major Histocompatibility Complex
moDC(s)	Monocyte-derived dendritic cell(s)
mRNA	Messenger RNA
MS	Multiple Sklerose
NCBI	National Center for Biochtechnology Information
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
ODN	Oligodesoxynukleotide
ORF	Open reading frame
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAMP(s)	Pathogen-associated molecular pattern(s)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pDC(s)	Plasmazytoide dendritische Zelle(n)
PDZ	PSD95, Discs large 1, Zonula occludentes 1
PRR(s)	Pattern recognition receptor(s)
PSD	Postsynaptic density
PSD93	Postsynaptic density protein 93
qPCR	Real-time PCR
RACE	Rapid amplification of cDNA ends
rev	Reverse (3 -5)
	Ribonukleinsaure
RI-PCR	Reverse-Iranskriptase-PCR
SAP	Synapse-associated protein
SH3	SRC nomology 3
550	Sideward scatter
	Tollallysal
	Tumernelreesefekter
	Unstitutien Untranslationter Boroich
	Wostorn Blot(c)
	Wildtyn
VED	Vellow fluorescent protein
7NS	Zentralnervensvetem
Λ	
–	Dona

Inhaltsverzeichnis

Zusan	nmenfassungI
Abstra	actII
Abkür	zungsverzeichnisIII
Inhalts	sverzeichnisV
1 El	NLEITUNG1
1.1 1.2 1.3 1.4 1.5	Myeloide Zellen1Dendritische Zellen2Interferone10PSD9314Ziele der Arbeit23
2 M	ATERIAL UND METHODEN24
2.1 2.2 2.3 2.4 2.5 2.6 2.7 2.8 2.9	Bezugsquellennachweis24Medien und Puffer27Primer und Antikörper29Stellungnahme zur Tierversuchsgenehmigung31Organentnahme32Molekularbiologische Methoden33Zellbiologische Methoden39Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)41Proteinanalytische Methoden44
3 EF	RGEBNISSE
3.1 3.2	Abänderung der Gen-Nomenklatur nach Datenbankanalyse <i>in silico</i> für <i>Psd93</i>
3.3 3.4	Nachweis von <i>Psd93</i> γ in pDCs und cDCs durch RT-PCR der N- terminalen <i>Psd93</i> -Isoformen

	3.5 3.6	Die 5´RACE-PCR als komplementärer Ansatz zur RT-PCR zeig Expression von <i>Psd93</i> η in YFP ⁺ pDCs	ונ 6 7
	3.7	Expression von <i>Psd93</i> in BMDMs7	1
4	DI	SKUSSION7	3
	4.1 4.2	<i>Psd93</i> -Isoformen in RT-PCR und 5´-RACE-PCR	3 1- 4
	4.3 4.4 4.5	Psd93-Expression in unterschiedlichen Zelltypen	6 8 2
5	LI	TERATURVERZEICHNIS8	5
6	AN	NHANG9	5
A	bbild	ungsverzeichnis9	6
Т	abell	enverzeichnis9	6

1 EINLEITUNG

1.1 Myeloide Zellen

In dieser Arbeit werden mit den dendritischen Zellen (DCs) Mitglieder der myeloiden Zelllinie genutzt. Neben den DCs gehen aus einer gemeinsamen myeloiden Vorläuferzelle im Knochenmark (KM) außerdem weitere Immunzellen wie Monozyten, Granulozyten und Mastzellen hervor. Auch die Vorläufer von Erythrozyten (rote Blutkörperchen) und Thrombozyten (Blutplättchen) gehen auf diese Vorläuferzelle zurück (Murphy, 2014).

Monozyten nutzen die Blutströmung, um ständig überall patrouillieren zu können, und sind fähig, in Gewebe einzuwandern und sich dort zu gewebsspezifischen, residenten Makrophagen zu differenzieren. Makrophagen können Fremdpartikel und Mikroorganismen phagozytieren und nach Prozessierung als antigenpräsentierende Zelle (APC) fungieren. Im KM besitzen Monozyten und DCs eine gemeinsame Vorläuferzelle. Aus diesen Monozyten/DC-Vorläuferzellen (MDPs) differenzieren sich die meisten Makrophagen- und DC-Subpopulationen. Einem kleinen Teil der ausgereiften Monozyten ist es möglich, sich in Lymphknoten zu DCs zu differenzieren (Geissmann et al., 2010; Murphy, 2014; Randolph et al., 1999).

Granulozyten bzw. polymorphkernige Leukozyten werden nach der Farbe ihrer Granula in drei Untergruppen eingeteilt: neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten. Neutrophile nutzen als Hauptabwehrmechanismus, ähnlich wie Makrophagen, die Phagozytose. Diese beiden Zelltypen erkennen Pathogenassoziierte molekulare Muster (PAMPs) über Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) auf ihrer Zellmembran. Nach Aufnahme der Mikroorganismen in ein Phagosom und Verschmelzen der Phagosomen mit Lysosomen werden diese u.a. durch Ansäuerung, antimikrobielle Peptide und Enzyme wie dem Lysozym zerstört. Insgesamt machen die neutrophilen Granulozyten den Hauptteil unter den Granulozyten und der zellulären Abwehr des angeborenen Immunsystems aus (Murphy, 2014). Eosinophile Granulozyten entwickeln sich ebenfalls im KM, werden in das periphere Blut abgegeben und wandern u.a. in Gewebe des Atmungstrakts ein. Anlockung und Aktivierung werden hauptsächlich durch Interleukin (IL)-5 und Chemokine der Eotaxin-Familie vollzogen. Sie können nach Degranulation zytotoxische Effektorfunktion ausüben, aber auch mit anderen Immunzellen wie

etwa T-Zellen interagieren. Von besonderer Relevanz sind sie bei der Bekämpfung von Parasiten oder allergischen Reaktionen. Letztere beeinflussen eosinophile Granulozyten über ein pathologisches Ungleichgewicht ihrer Aktivierung und Degranulation (Rosenberg et al., 2013). Als letzte und seltenste unter den Granulozyten verbleiben die Basophilen, die ähnlich wie die im Folgenden beschrieben Mastzellen in der Lage sind, eine Typ 2-Immunantwort zu triggern, die durch Typ-2-T-Helferzellen (TH2), hohe Immunglobulin (Ig)-E-Spiegel und Eosinophilie bestimmt wird. Eine derartige Immunantwort wird bei Allergien und der Bekämpfung von Parasiten ausgelöst. Es gibt Modelle, die zeigen, dass Basophile und Mastzellen entwicklungsgeschichtlich aus einer Vorläuferzelle entstanden sind, was die ähnliche Funktion und Genexpression erklären könnte (Voehringer, 2013). Mastzellen spielen eine Rolle in der Genese von Allergien. Neben dieser als pathologisch zu betrachtenden Reaktion wird verstärkt die physiologische Abwehrfunktion von Mastzellen z.B. im Rahmen parasitärer oder bakteriologischer Infektionen in der aktuellen Forschung untersucht. Dort können Mastzellen nach IgE-abhängiger Aktivierung sowohl direkt bei der Beseitigung eines Pathogens mitwirken, als auch über die Ausschüttung von Chemokinen wie IL-8 und Tumornekrosefaktor (TNF) z.B. neutrophile Granulozyten anlocken. Die wohl bekannteste Substanz in den Granula von Mastzellen ist Histamin, das zu gesteigerter Gefäßpermeabilität und erhöhtem lokalen Blutfluss führt (Murphy, 2014; Urb & Sheppard, 2012).

1.2 Dendritische Zellen

Die Entdeckung der ersten DC gelang bereits 1868 durch Paul Langerhans, der in Hautschnitten verschiedener Körperregionen immer wieder die gleichen Zellen von nervenähnlicher Gestalt fand, die dann auch nach ihm benannt wurden. Fälschlicherweise nahm er an, dass es sich hierbei tatsächlich um Nervenzellen handelte (Langerhans, 1868). 1973 beschrieb Ralph Steinman einen neuen Zelltyp in peripheren lymphatischen Organen und prägte erstmals den Begriff "dendritische Zelle" (Steinman & Cohn, 1973).

Die Gruppe der DCs, wie wir sie heute kennen, besteht zum einen aus den konventionellen oder klassischen DCs (cDCs), zum anderen aus den nichtklassischen DCs, worunter plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs), Langerhans-Zellen (LCs) und aus Monozyten abgeleitete DCs (moDCs) gezählt werden (Abb. 1.1) (Mildner & Jung, 2014).

DCs können Funktionen in angeborener und spezifischer Immunabwehr gleichermaßen einleiten und fortführen. Sie nehmen Antigene wie z.B. infektiöse Partikel, Tumorproteine oder körpereigene Proteine auf, reifen und migrieren zu den Lymphknoten, wo sie naiven T-Zellen über MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle diese Antigene präsentieren sowie costimulatorische Moleküle wie CD80, CD86 und CD40 exprimieren (prototypisch: cDCs). Außerdem können sie große Mengen Typ-I-Interferon (IFN) produzieren (prototypisch: pDCs). Nach Reifung im KM besitzen sie die Fähigkeit zur Migration in lymphatische Organe wie Thymus, Milz oder Lymphknoten sowie periphere, nicht-lymphatische Organe wie die Haut. Die Vorläufer von cDCs (pre-cDCs) reifen im KM aus, während pDCs bereits ausgereift das KM verlassen (Abb. 1.1) (Worbs et al., 2017). DCs können auf der einen Seite Toleranz vermitteln, indem sie z.B. regulatorische T-Zellen (T_{REGs}) fördern und somit vor Autoimmunität schützen, auf der anderen Seite aber auch durch ihre stark ausgeprägte Fähigkeit zur Antigenpräsentation das Entstehen von selbstreaktiven T-Zellen in der Autoimmunität bedingen (Ganguly et al., 2013). Die in dieser Arbeit verwendeten cDCs und pDCs werden in entsprechenden Kapiteln genauer beschrieben.

LCs besiedeln die Epidermis, wo sie sowohl in Kontakt mit Pathogenen kommen, die in die Epidermis eingedrungen sind, als auch mit epidermalen Neoplasien. Nach Prozessierung der aufgenommenen Antigene wandern LCs zu den ableitenden Lymphknoten der Haut, um naiven T-Zellen und T-Gedächtniszellen die aufgenommenen Antigene zu präsentieren. Typischerweise exprimieren LCs den C-Typ-Lektin-Rezeptor Langerin, der auch für die Ausbildung der charakteristischen Birbeck-Granula verantwortlich ist. Neben den LCs gibt es weitere DCs in der Haut: dermale Langerin⁺ und Langerin⁻ DCs. Die Langerin⁺ dermalen DCs wurden lange Zeit für LCs gehalten, die sich auf dem Weg durch die Dermis zu den regionalen Lymphknoten befinden. Im Vergleich zu den Langerin⁻ DCs machen sie nur einen Bruchteil der dermalen DCs aus. Eine Erkrankung, bei der die Akkumulation von Langerin⁺ DCs pathognomonisch ist, ist die Langerhanszell-Histiozytose. Die Histiozyten lagern sich in Knochen, Haut und vielen weiteren Geweben ab und lassen sich immunhistochemisch durch den Nachweis von Langerin bestimmen. Die Krankheit zeigt Merkmale einer malignen Neoplasie, aber auch einer Entzündung der beteiligten Gewebe, weshalb bis heute eine genaue Einordnung unklar ist (Kaplan, 2010; Romani et al., 2010).



Abb. 1.1 Reifung und Gruppeneinteilung von dendritischen Zellen (DCs)

pDCs, cDCs und moDCs besitzen gemeinsame Vorläuferzellen (CDPs und MDPs), deren Stellung zueinander in der Literatur unterschiedlich bewertet wird. pDCs verlassen das KM ausgereift und ähneln morphologisch Plasmazellen. cDCs reifen erst peripher aus, sind von typischer sternförmiger Morphologie und lassen sich grob in CD8α⁺ und CD103⁺ cDC1s auf der einen, sowie CD 11b⁺ cDC2s auf der anderen Seite unterscheiden. HSC = Hämatopoetische Stammzelle; CDP = common DC-Progenitor restliche Abkürzungen im Abkürzungsverzeichnis enthalten (Breton et al., 2015; Merad et al., 2013; Schraml & Reis e Sousa, 2015)

Murine Monozyten besitzen die Fähigkeit, sich im naiven Zustand und bei Entzündung zu DCs zu differenzieren. Diese moDCs können Funktionen der angeborenen und spezifischen Immunabwehr übernehmen und bewirken in unterschiedlichen Infektionsmodellen u.a. die CD4⁺ T-Zell-Aktivierung oder auch die Produktion von TNF und induzierbarer NO-Synthase (iNOS) zur direkten Abtötung von Bakterien (Abb. 1.1). Hier sind Monozyten zu nennen, die Ly-6C auf ihrer Oberfläche exprimieren, im Vergleich mit Ly-6C⁻ Monozyten die größere Gruppe der zirkulierenden Monozyten ausmachen und sich bei Entzündung zu DCs differenzieren können. Es muss aber angemerkt werden, dass auch residente, interstitielle DC-Subpopulationen im stationären Zustand abseits von entzündlichen Prozessen Monozyten als Vorläufer besitzen können. Dies gilt z.B. für DCs im Lungenparenchym oder der Lamina propria des Intestinums (León & Ardavín, 2008).

1.2.1 Konventionelle dendritische Zellen

cDCs zeigen die typische Morphologie, die ursprünglich namensgebend für diesen Zelltyp war: zytoplasmatische Ausläufer, die in ihrer Form an die Äste eines Baumes erinnern und sich dadurch von allen anderen Zelltypen in lymphatischen Organen unterscheiden (Steinman & Cohn, 1973). Naive cDCs bevölkern die peripheren, nicht-lymphatischen Organe und die Marginalzone der Milz, um dort Antigene aus den Geweben oder dem Blut aufnehmen zu können. Je nach Lokalisation ergeben sich Subgruppen mit spezifischen Mustern an Oberflächenmolekülen (Merad et al., 2013). cDCs sind in Abhängigkeit vom CC-Chemokin-Rezeptor CCR7 und dessen Liganden CCL19 und CCL21 zur Migration aus den peripheren Organen in Richtung T-Zell-Zonen der Lymphknoten und der Milz befähigt, wo sie naive T-Zellen prägen (sogenanntes Priming), T-Gedächtniszellen restimulieren oder auch die Aktivität von T-Zellen unterdrücken können (Mildner & Jung, 2014). Hauptaufgabe der cDCs ist die Prozessierung von Antigenen und die Präsentation von Peptidfragmenten auf MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Molekülen (Abb. 1.2). Exogene Antigene werden nach Endozytose und Prozessierung auf MHC-Klasse-II-Molekülen den CD4⁺ T-Zellen präsentiert, die wiederum B-Zellen zur Antikörper-Produktion anregen. Endogene Antigene gelangen auf MHC-Klasse-I-Moleküle und können anschließend von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen erkannt und zerstört werden. Eine Besonderheit der cDCs ist die sogenannte Kreuzpräsentation. Hierbei können von exogen aufgenommene Antigene über einen alternativen Weg der Endozytose schlussendlich auch auf MHC-I-Molekülen präsentiert werden und dadurch mit CD8⁺ T-Zellen interagieren. (Mildner & Jung, 2014; Murphy, 2014).





Abb. 1.2 Funktion der Typ-I-Interferone in der Immunabwehr

(A) Virusinfizierte Zellen können nach Verarbeitung von viralen Proteinen über PRRs die Transkription von IFN-stimulierten Genen (ISGs) und die Ausschüttung von Typ-I-Interferonen steigern, um einen antiviralen Zustand, auch in nicht-virusinfizierten Zellen, herzustellen.

(B) Makrophagen, pDCs und cDCs können Interferone ausschütten. pDCs sind jedoch der Hauptproduzent von Typ-I-Interferonen. cDCs fungieren hauptsächlich als APCs und steigern somit die antigenspezifische adaptive Immunantwort über T- und B-Zellen. modifiziert nach (Ivashkiv & Donlin, 2014)

TZR = T-Zell-Rezeptor; restliche Abkürzungen im Abkürzungsverzeichnis enthalten

Im murinen System lassen sich CD8α⁺ und CD103⁺ cDC1s auf der einen und CD11b⁺ cDC2s auf der anderen Seite abgrenzen, die sich phänotypisch wie auch anhand ihrer Lokalisation unterscheiden (Abb. 1.1). In den peripheren, nichtlymphatischen Organen gibt es die Subgruppen der CD11b⁺ und der CD103⁺ cDCs, die je nach Gewebe etwa 1-5% der Zellen ausmachen. Diese beiden Subgruppen sind es auch, die unter Änderung ihrer Oberflächenmarker im naiven Zustand sowie bei Entzündung verstärkt in Richtung der regionalen Lymphknoten wandern. Neben diesen cDCs gibt es auch in lymphatischen Organen residente Subgruppen. Hier sind besonders die CD8α⁺ cDCs hervorzuheben. Sie machen etwa 20-40% der cDC-Population in Lymphknoten und Milz sowie die Mehrheit der cDCs im Thymus aus. CD8α⁺ cDCs teilen sich phänotypisch viele Eigenschaften mit den CD103⁺ cDCs und werden daher auch als deren Entsprechung in lymphatischen Organen gesehen. CD11b⁺ cDCs kommen ebenfalls in lymphatischen Organen vor und machen außer im Thymus die Mehrheit der cDC-Population aus. Zur *in vitro* Generierung von cDCs sind zwei Modelle bekannt, die entweder *FMS-like tyrosine kinase* 3 *ligand* (Flt3L) oder *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) als Stimulus für KM-Kulturen nutzen. In dieser Arbeit wurde mit der Kultivierung durch Flt3L gearbeitet, mit der sich große Mengen CD11b⁺CD8α⁻ cDCs und B220⁺ pDCs differenzieren lassen (Merad et al., 2013).

1.2.2 Plasmazytoide dendritische Zellen

Anders als cDCs sind pDCs von rundlicher Morphologie und ähneln Plasmazellen, woher auch die Namensgebung resultiert. An ihrer Oberfläche befinden sich verglichen mit cDCs geringe Mengen MHC-Klasse-II- und costimulatorische Moleküle. Murine pDCs sind CD11c^{int} aber deutlich positiv für die B220-Isoform von CD45. Weitere spezifische murine pDC-Marker sind SiglecH und Bst2, spezifische humane Marker sind BDCA-2 und ILT7. pDCs entwickeln sich im KM aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle mit cDCs (CDPs) (Reizis et al., 2011). Die Stellung bzw. Abgrenzung der CDPs zu den MDPs wird in der Literatur unterschiedlich beschrieben und unterliegt einiger Diskussion (Abb. 1.1) (Merad et al., 2013; Reizis et al., 2011; Schraml & Reis e Sousa, 2015). Beispielsweise gibt es Befürworter einer intermediären Stellung der CDPs zwischen den MDPs und den DCs, aber auch die einer Stellung neben den MDPs als eigenständige Vorläuferzellreihe. Für die Entwicklung von pDCs aus CDPs ist das Protein E2-2 der spezifische Transkriptionsfaktor, der die Differenzierung im murinen und humanen System fördert. In cDCs wird E2-2 durch den Inhibitor Id2 reguliert (Cisse et al., 2008). Ein weiterer bedeutsamer Faktor für die Entstehung von pDCs im KM ist der zuvor genannte Flt3L. Nach der Ausreifung patrouillieren pDCs im Blut und werden über Chemokine im naiven Zustand und z.B. bei einer Entzündung in u.a. Lymphknoten, die weiße Pulpa der Milz oder die Haut rekrutiert (Swiecki & Colonna, 2015).

Die wichtigste Funktion von pDCs ist die massive Produktion von Typ-I-Interferonen bei viraler Infektion (Abb. 1.2). Dieser Mechanismus hängt mit der Expression von bestimmten PRRs zusammen: den Toll-like Rezeptoren 7 und 9 (TLR7/9). Diese TLRs befinden sich intrazellulär in der Membran von Endosomen und erkennen virale Nukleinsäuren. TLR7 wird benötigt, um einzelsträngige Ribonukleinsäure (RNA) von z.B. Influenza-Viren zu detektieren. TLR9 hingegen reagiert auf Kontakt unmethylierter. Cytosin-Phosphat-Guanin (CpG)-reicher zu Desoxyribonukleinsäure (DNA) wie sie bei Bakterien und Viren, z.B. bei Herpes simplex-Viren auftritt (Gilliet et al., 2008). Um in der Folge eine starke Ausschüttung von Typ-I-Interferonen zu erreichen, sind der Interferon regulatory factor 7 (IRF7) und das Adapterprotein Myeloid differentiation primary response protein 88 (MyD88) in frühen Endosomen nötig. Hier besteht auch ein wesentlicher Unterschied zu cDCs, der bedingt, dass cDCs weniger Typ-I-Interferone produzieren. Der TLR9-Ligand CpG Klasse A Oligodesoxynukleotid (ODN) formt in frühen endosomalen Vesikeln von pDCs über einen längeren Zeitraum stabile Komplexe mit MyD88-IRF7 (Swiecki & Colonna, 2015). Im Unterschied dazu wird CpG A in cDCs schnell in lysosomale Vesikel verbracht, und es entstehen keine TLR9-MyD88-IRF7-Komplexe, die für die Induktion der IFN-Gene nötig wären (Honda et al., 2005). CpG Klasse B hingegen gelangt in pDCs in endolysosomale Vesikel, wo es ebenfalls nach Interaktion mit TLRs den MyD88-nuclear factorkappa B (NF-KB) Signalweg startet, der die Produktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine bewirkt. Es entscheidet also das Zellkompartiment in der die Interaktion von CpG mit den TLRs stattfindet, ob Typ-I-Interferone oder proinflammatorische Zytokine produziert werden (Swiecki & Colonna, 2015). Außerdem ist es pDCs in wesentlich geringerem Ausmaß als cDCs möglich, T-Zellen Antigene zu präsentieren. pDCs können über die Ausschüttung von IL-12 und IL-18 Natürliche Killerzellen aktivieren. Typ-I-IFN und IL-12 stimulieren CD8+ T-Zellen in ihrer Effektorfunktion und helfen, CD4⁺ T-Zellen in Richtung TH1-Zellen zu prägen. Der TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) und Granzym B können nach Sekretion durch pDCs die Apoptose von infizierten T-Zellen einleiten und die Proliferation von T-Zellen stoppen. Neben diesen beschriebenen Funktionen von pDCs existieren viele weitere in der angeborenen und spezifischen Immunabwehr (Swiecki & Colonna, 2015). Es gibt einige Subgruppen unter den pDCs, die zurzeit stark beforscht werden. Eine mögliche Einteilung humaner pDCs erfolgt anhand der Expression von CD2. CD2^{high} und CD2^{low} pDCs zeigen abweichenden Phänotyp und Funktionen (Matsui et al., 2009). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Produktion von IFNβ in murinen pDCs der Milz nach TLR9-Stimulation Aufgabe einer CCR9⁺CD9⁻ Subgruppe ist, die T-Zellen rekrutiert und aktiviert (Bauer et al., 2016).

pDCs sind insbesondere an der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen wie Systemischem Lupus erythematodes (SLE) und Multipler Sklerose (MS) beteiligt. SLE-Patienten weisen erhöhte Serumspiegel von Typ-I-Interferonen, v.a. IFNa, auf. Autoantikörper gegen Nukleinsäuren aus apoptotischen, körpereigenen Zellen werden normalerweise schnell abgebaut. Bei SLE-Patienten hingegen bilden die Nukleinsäurereste als Autoantigene und die Antikörper (AK) Immunkomplexe, die nach Internalisierung im Endosom TLRs stimulieren und die Produktion von IFNa in Gang bringen (Ronnblom et al., 2009). Bei der Psoriasis vermittelt LL37, ein antimikrobielles Peptid aus der Gruppe der Cathelicidine, in der befallenen Haut die Umwandlung von eigentlich unproblematischen DNA-Resten in Trigger für die Produktion von IFNa. Es bilden sich kondensierte Strukturen, die in endozytotische Prozesse in pDCs eingeschleust und nachfolgend von TLR9 erkannt werden können. Somit werden auch hier Toleranzmechanismen durchbrochen (Lande et 2007). Zentralnervensystem (ZNS) DCs al., Im sind im Rahmen neuroinflammatorischer Prozesse der MS und deren Mausmodell, der Experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), krankheitsrelevant. Es wird vermutet, dass die chronisch-inflammatorische und demyelinisierende MS durch DC-getriggerte Aktivierung von Myelin-reaktiven T-Zellen ausgelöst wird. In der Folge wandern CD4⁺ T-Zellen ins ZNS ein und können dort von residenten APCs reaktiviert werden. Die anschließende Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine schädigt das neuronale Gewebe. pDCs akkumulieren im Liguor von MS-Patienten und im Blut dieser Patienten zeigen die pDCs einen dysfunktionalen Phänotyp, wobei die Beschreibungen variieren. Für pDCs wird eine regulatorische Funktion bei der MS angenommen (Galicia & Gommerman, 2013). Im EAE-Modell konnte gezeigt werden, dass ein adoptiver Transfer naiver pDCs nach Ausbruch der Erkrankung zu einer deutlichen Besserung der klinischen Scores führt. Deshalb wird neben der allogenen Stammzelltransplantation auch der pDC-Transfer als Behandlungsmethode für Autoimmunerkrankungen wie die MS diskutiert (Duraes et al., 2016).

Infektionserkrankungen, bei denen pDCs eine Rolle spielen, sind Infektionen mit Hepatitis C-Virus (HCV) und Humane Immundefizienz-Virus (HIV). Direkter Kontakt von pDCs zu HCV-infizierten Zellen resultiert in TLR7-abhängiger Typ-I-IFN-

Produktion. Die beteiligten pDCs benötigen zur Produktion von Typ-I-Interferonen lediglich aktive HCV-RNA-Replikation in den HCV-infizierten Zellen, jedoch keine extrazellulären Viruspartikel oder gar Infektion der pDCs, wodurch sich der Mechanismus für HCV von dem anderer bekannter viraler Infektionen unterscheidet (Takahashi et al., 2010). HIV-infizierte Patienten zeigen geringere Mengen pDCs im peripheren Blut und damit einhergehend eine verminderte IFNa-Produktion. Die absolute pDC-Zahl korreliert mit der Zahl an CD4+ T-Zellen, die für eine effektive Unterdrückung der Virusaktivität benötigt werden und in der Klinik als Verlaufsparameter eingesetzt werden. Mehrere Studien kommen zu dem Schluss, dass erniedrigte pDC-Zahlen und IFNa-Produktion mit einer Progression der Erkrankung korrelieren, weshalb erwogen wird, neben der Viruslast und den CD4+ T-Zellen auch die pDCs im peripheren Blut zu bestimmen, um dem Kliniker ein genaueres Bild über den Immunstatus des HIV-Infizierten zu geben (Fitzgerald-Bocarsly & Jacobs, 2010). Erwähnenswert ist an dieser Stelle, dass pDCs mit CD4 den Hauptrezeptor und CCR5 sowie CXCR4 die Co-Rezeptoren für die Infektion mit HIV-1 exprimieren und deshalb infiziert werden können. Die infizierten pDCs produzieren und sezernieren infektiöse Viruspartikel (Patterson et al., 2001).

1.3 Interferone

Die Erstbeschreibung von Interferonen gelang Isaacs und Lindenmann bei Versuchen mit hitzeinaktivierten Influenzaviren (Isaacs & Lindenmann, 1957). Interferone sind Proteine, die der Gruppe der Zytokine angehören und der Kommunikation zwischen Immunzellen dienen. Die größte Bedeutung der Interferone liegt im Schutz vor viraler Infektion. Es existieren zwei übergeordnete Typen: Typ-I- und Typ-II-IFN sowie einige IFN-ähnliche Zytokine. Unter Typ-I-Interferone fallen die Klassen IFNα, IFNβ, IFNε, IFNκ, IFNω, IFNδ und IFNτ. Beim Menschen gibt es IFNo und IFNT nicht. Die beiden relevantesten Typ-I-Interferone sind IFNa und IFNB. Das humane Genom beinhaltet 14 Gene für IFNa, die für 12 unterschiedliche Proteine kodieren, jedoch nur eines für IFNβ. IFNγ ist das einzige Typ-II-IFN (Pestka et al., 2004). Es kann an einen eigenen IFNy-Rezeptor binden und dient als Warnsignal der Zelle bei Infektion mit intrazellulären Pathogenen an die Umgebung. IFNy beeinflusst insbesondere die Funktion von Makrophagen, kommt, indem Aktivierung Makrophagen es zur der wodurch die Pathogenerkennung und Antigen-Prozessierung verstärkt werden und ein antiviraler Zustand herbeigeführt wird. Hierbei arbeiten IFNγ- und TLR-abhängige Signale synergistisch (Schroder et al., 2006).

Im Folgenden wird auf die Funktion von IFNα und IFNβ, den bekanntesten Typ-I-Interferonen, genauer eingegangen. Die wichtigsten Prinzipien, nach denen Typ-I-Interferone arbeiten, sind: innerhalb von infizierten Zellen und in benachbarten Zellen wird über die Transkription von IFN-stimulierten Genen (ISGs) ein antimikrobieller, v.a. antiviraler Zustand eingeleitet. Sie verstärken die Arbeit von Phagozyten und APCs, also die angeborene Immunabwehr. Gleichermaßen aktivieren sie die Entwicklung einer Antigen-spezifischen Antwort von T- und B-Zellen, u.a. über die Produktion von Virus-spezifischen AK, und somit die erworbene Immunantwort (Abb. 1.2) (Ivashkiv & Donlin, 2014).

Typ-I-Interferone können von nahezu jedem Zelltyp ausgeschüttet werden, jedoch wird aufgrund der deutlich stärksten IFN-Produktion von pDCs als den natürlichen IFN-produzierenden Zellen gesprochen (Trinchieri, 2010). Die Produktion von Typ-I-Interferonen beginnt, nachdem Zellen über PRRs Nukleinsäurereste von Krankheitserregern, insbesondere doppelsträngige RNA, erkannt haben oder auch nach Stimulation mit pro-inflammatorischen Zytokinen wie z.B. TNF. IFNa und IFNB binden an denselben Transmembranrezeptor, den IFNα-Rezeptor (IFNAR), der sich aus den Untereinheiten IFNAR1 und IFNAR2 zusammensetzt. Nach Bindung der Interferone an den IFNAR werden die rezeptorassoziierten Tyrosinkinasen Janus-Kinase 1 (JAK1) sowie die Tyrosin-Kinase 2 (TYK2) aktiviert, um in der Folge den Rezeptor zu phosphorylieren. Die freiliegenden, phosphorylierten Rezeptorenden rekrutieren zytoplasmatische sogenannte STAT-Proteine (signal transducer and activator of transcription). Diese werden phosphoryliert, dimerisieren und gelangen in den Zellkern, wo sie als Transkriptionsfaktoren je nach STAT-Subtyp verschiedene IFN-abhängige Genexpressionsmuster in Gang bringen. Dieser Ablauf wird auch als JAK-STAT-Weg bezeichnet (Ivashkiv & Donlin, 2014).

Neben der Funktion in der Abwehr von Viren sind Typ-I-Interferone auch bei der Immunantwort gegen Infektionen mit intrazellulären Bakterien wie Chlamydien oder Legionellen beteiligt. In beiden Fällen wird die intrazelluläre Vermehrung der Bakterien gestört (Trinchieri, 2010). Andererseits können Typ-I-Interferone aber auch die körpereigene Reaktion auf bakterielle Infektionen schwächen. Beispielsweise konnte für *Mycobacterium tuberculosis*-infizierte Mäuse gezeigt werden, dass hohe Level Typ-I-Interferone im Zusammenhang mit einer erniedrigten, protektiven T_H1-Immunantwort zu frühzeitigem Sterben infizierter Mäuse führt (Manca et al., 2005). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Funktion von Typ-I-Interferonen bei bakterieller Infektion protektiv oder schädlich ausfallen kann, was mit den Eigenschaften des jeweiligen Pathogens zusammenhängt (Trinchieri, 2010). Typ-I-Interferone haben großen Einfluss auf APCs. Sie fördern Reifung und Aktivierung von DCs. Insbesondere die Kreuzpräsentation, also die Prozessierung exogener Antigene und Präsentation auf MHC-I-Molekülen für CD8⁺ T-Zellen, wird gesteigert. Diese Möglichkeit wird als antiviraler und antitumoraler Effektormechanismus beschrieben (Gessani et al., 2014).

Der therapeutische Nutzen von Typ-I-Interferonen liegt daher in der Behandlung maligner Tumoren und viraler Infektionen. In der Krebstherapie werden sie sowohl zur Behandlung hämatologischer (Haarzell-Leukämie, Chronische myeloische Leukämie) als auch solider Neoplasien (Malignes Melanom, Nierenzellkarzinom, Kaposi-Sarkom) eingesetzt (Trinchieri, 2010). IFNa wird insgesamt häufiger verabreicht. Der Einsatz von IFNa birgt die Gefahr vieler und z.T. schwerer Nebenwirkungen. Akut treten bei nahezu allen Patienten grippeartige Symptome auf. Subakut und chronisch am häufigsten beobachtet werden hämatologische Toxizität, erhöhte Transaminasen, Übelkeit, Müdigkeit und psychiatrische Auffälligkeiten (Sleijfer et al., 2005). Der Subtyp IFNa2 hat in der adjuvanten Therapie des Malignen Melanoms signifikanten Einfluss auf rezidivfreies Überleben sowie Gesamtüberleben, wenn es hochdosiert verabreicht wird (Tarhini et al., 2012). Bei der Chronischen myeloischen Leukämie (CML) wird IFNa zusammen mit Tyrosinkinase-Inhibitoren verabreicht. Die mit IFNα therapierten Patienten zeigen erhöhte Zahlen an Natürlichen Killerzellen. Man vermutet, dass die Effektorfunktion der IFNa-Gabe von DCs ausgeht, die schneller differenzieren und befähigt sind CML-spezifische Antigene zu präsentieren (Rohon, 2012). In der Therapie der chronischen Hepatitis C hat sich in den letzten Jahren durch die Einführung der direct acting antivirals (DAAs) der Stellenwert der IFNα-Gabe deutlich verringert. Mit den DAAs besteht für Infizierte die Chance einer vollständigen Heilung mit einer hohen Wahrscheinlichkeit. Heute werden IFN-freie Therapieregime bevorzugt, da viele Patienten, die ursprünglich durch z.B. eine dekompensierte Leberinsuffizienz im Rahmen der Hepatitis C Kontraindikationen für eine IFN-enthaltende Therapie aufwiesen und somit gar nicht behandelt wurden, den neuen Behandlungsoptionen zugänglich werden (D'Ambrosio et al., 2017). IFNβ wird als Erstrangmedikament

bei MS eingesetzt. Es verringert Krankheitsaktivität und Rückfallquote der schubförmig-remittierenden MS (RR-MS), das Risiko neuer Aktivität beim Klinisch Isolierten Syndrom (KIS) und die Rückfallquote der sekundär-progredienten MS (SP-MS). Lediglich für die primär-progrediente Form der MS (PP-MS) sind keine krankheitsbeeinflussenden Effekte bekannt (Torkildsen et al., 2016). Obwohl die Effektivität der IFNβ-Therapie bei der MS nachgewiesen ist, ist der genaue Mechanismus Gegenstand wissenschaftlicher Diskussion. Es wird u.a. eine Begrenzung der Leukozyten-Migration über die Blut-Hirn-Schranke, Induktion eines anti-inflammatorischen Zustands und gesteigerte Reparatur geschädigter Neurone als Folge der IFNβ-Wirkung vermutet. Zentraler Punkt scheint die regulierende Wirkung von IFNβ auf autoreaktive CD4⁺ T-Zellen zu sein (Severa et al., 2015).

1.4 PSD93

1.4.1 PSD93 Protein-Familie

Die Proteine der *Postsynaptic Density* (PSD)-Familie, auch bekannt als *discs large homolog* (DLG)-Proteine, haben ihre Funktion als Gerüstproteine in der postsynaptischen Membran exzitatorischer Synapsen im ZNS. In der sogenannten "Postsynaptischen Dichte" (*postsynaptic density*), einer im Elektronenmikroskop sichtbaren Verdickung der postsynaptischen Membran gegenüber dem Bereich der Präsynapse, der für die Transmitterausschüttung verantwortlich ist, sind die PSD-Proteine in verschiedenen Entwicklungsstadien der Synapse an der Modulation exzitatorischer Signale beteiligt (X. Chen et al., 2015; Kruger et al., 2013; Zheng et al., 2011). Ausdrücklich sei an dieser Stelle auf die Verwendung von PSD93 und nicht DLG2 für das im Folgenden beschriebene Protein und dessen Funktion hingewiesen. Diese bewusste Wahl wurde aufgrund der größeren Nähe des Begriffes *postsynaptic density* (PSD)-Protein zur medizinischen Nomenklatur getroffen, die eine pathophysiologische Beschreibung vorsieht.

Neben PSD93 (auch: DLG2, Chapsyn110) gibt es im Genom der Vertebraten drei weitere Proteine dieser Familie (Abb. 1.3): das wohl bekannteste PSD95 (DLG4), SAP97 (Synapse-associated protein 97, DLG1) und SAP102 (DLG3). DLG5 stellt eine eigene Familie dar (Oliva et al., 2012; Zheng et al., 2011). Die beschriebene Gruppe um PSD93 ist eine Subfamilie der membranassoziierten Guanylatkinasen (MAGUKs). Insgesamt sind zehn Subfamilien bekannt (Oliva et al., 2012). Allen MAGUKs sind eine im Kern konservierte Domänenstruktur und die Anwesenheit in der Postsynaptischen Dichte mit Gerüstfunktion gemein (Zhu et al., 2016). Die Familie um PSD93 ist insbesondere für die korrekte Funktion zweier Typen von Glutamatrezeptoren in der postsynaptischen Membran verantwortlich: a-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionsäure (AMPAR)- und N-Methyl-D-Aspartat (NMDAR)-Rezeptoren (Abb. 1.3). Beide sind ionotrope Glutamatrezeptoren, die in großer Anzahl in der Postsynaptischen Dichte zu finden sind und dort exzitatorische Signale überleiten (X. Chen et al., 2015). AMPARs werden von PSD-MAGUKS indirekt über Proteine aus der Gruppe der transmembrane AMPAR regulatory proteins (TARPs) gebunden und können innerhalb der postsynaptischen Membran von Neuronen bewegt werden (Elias et al., 2006; Nicoll et al., 2006).



Abb. 1.3 PSD93

(A) Domänenstruktur der bekannten PSD-MAGUKs aus Zellen neuronalen Ursprungs: Das typische Muster aller Mitglieder der Proteinfamilie sind drei PDZ-Domänen, gefolgt von einer SH3- sowie einer GK-Domäne. Für PSD93, PSD95 und SAP97 sind die N-terminalen αund β-Domänen sowie die SH3-GK-Linker Region beschrieben.

(B) PSD93 in der Postsynaptischen Dichte eines Neurons:

PSD93 ist beteiligt am Clustern von Glutamatrezeptoren (AMPAR und NMDAR) in der Postsynapse. Dazu können PSD-Proteine über die PDZ3 Oligomere bilden. Fyn ist ein wichtiger Interaktionspartner ebenfalls der PDZ3, über den PSD-Proteine die Aktivität von NMDAR beeinflussen können. Ähnliches gilt für die Interaktion von TARPs mit AMPARs.

L27 = Lin2/7

TARP = *transmembrane* **A***MPAR regulatory* **p***rotein* restliche Abkürzungen im Abkürzungsverzeichnis enthalten (Nicoll et al., 2006; Wei et al., 2015; Zheng et al., 2011; Zhu et al., 2016) Neben dieser hauptsächlich beforschten Rezeptorinteraktion mit Glutamatrezeptoren wird PSD93 auch als komplexbildend mit neuronalen nikotinischen Acetylcholinrezeptoren beschrieben. Vorkommen und Gerüstfunktion in beiden Rezeptortypen könnten Hinweise auf eine konservierte Funktion von PSD93 in glutamatergen und nikotinergen Synapsen des ZNS geben (Parker et al., 2004). Mit einwärts gleichrichtenden Kaliumkanälen, den Kir2.x-Ionenkanälen, wurde ein weiteres Zielmolekül von PSD93 identifiziert, wobei es sich dort lediglich um eine bestimmte Spleißvariante von PSD93 handelt (Leyland & Dart, 2004).

1.4.2 Domänenstruktur von PSD-MAGUKs

Als eine Subfamilie der MAGUKs enthalten die Proteine der PSD93-Familie eine hochgradig konservierte Domänenstruktur bestehend aus typischerweise drei Nterminalen PDZ-Domänen, einer SH3- sowie einer GK-Domäne am C-terminalen Ende (Abb. 1.3). PDZ steht hier für diejenigen Proteine, in denen diese Domäne zuerst beschrieben wurde: PSD95, Discs large 1, Zonula occludens 1. SRC homology 3 (SH3)- und guanylate kinase-like (GK)-Domäne sind direkt hintereinander gekoppelt und bilden ein Supramodul durch intramolekulare Interaktion zwischen den beiden Domänen, die die Bindefähigkeit der GK-Domäne zu anderen Proteinen steuert (Feng & Zhang, 2009; Oliva et al., 2012). Ein weiterer, für die Funktion von PSD93-Proteinen relevanter, Bereich ist die Linker-Region zwischen SH3- und GK-Domäne. Diese Linker-Region vermittelt die Möglichkeit einer intermolekularen Komplexbildung zwischen SH3- und GK-Domänen und somit die Oligomerisation von PSD-Proteinen (Abb. 1.3) (McGee et al., 2001a; Zhu et al., 2016). Die Guanylatkinase hat im Laufe der Evolution ihre katalytische Funktion verloren und übernimmt stattdessen zusammen mit der SH3-Domäne in MAGUKs Aufgaben in der Protein-Protein-Interaktion (te Velthuis et al., 2007; Zhu et al., 2016). Die GK-Domäne fungiert dabei als Bindemotiv für Phosphoproteine (Zhu et al., 2016). PDZ-Domänen binden an C-terminale Motive synaptischer Proteine, die von MAGUKs reguliert werden (te Velthuis et al., 2007; Zhu et al., 2016). Diese transmembranären Interaktionspartner sind Glutamatrezeptoren (AMPAR und NMDAR), Ionenkanäle und Zelladhäsionsmoleküle (X. Chen et al., 2015; Parker et al., 2004; Zheng et al., 2011; Zhu et al., 2016). Damit nehmen PDZ-Domänen Einfluss auf die synaptische Plastizität: sie helfen bei Transport, Cluster-Bildung, aber auch bei der Entfernung der synaptischen Proteine in der Postsynaptischen Dichte (Zhu et al., 2016). Eine Besonderheit der PDZ-Domänen ist, ähnlich der Kopplung von SH3- und GK-Domäne, ihre Fähigkeit Supramodule zu bilden. Hierbei erhöht sich die Bindefähigkeit für Interaktionspartner durch die hintereinander gekoppelten PDZ-Domänen auf ein höheres Niveau als eine schlichte Addition der Bindefähigkeiten der einzelnen, gekoppelten PDZ-Domänen (Feng & Zhang, 2009). Das wohl bekannteste Beispiel ist die Kopplung der PDZ-Domänen PDZ1 und PDZ2 in Proteinen der PSD93-Familie, welches als Supramodul PDZ12 mit den zwei NR2-Untereinheiten des multimeren NMDA-Rezeptors interagieren kann (Abb. 1.3) (Feng & Zhang, 2009; Sato et al., 2008). Die einzelnen PDZ-Domänen sind in der Lage verschiedene Ziele anzusteuern oder als Supramodule gemeinsam z.B. multimere Proteinstrukturen zu binden (Zhu et al., 2016). Ein bekanntes Ziel der PDZ-Domäne PDZ3 ist die Tyrosinkinase Fyn, die NR2-Untereinheiten von NMDA-Rezeptoren phosphoryliert und die Aktivität der Rezeptoren in der Synapse hierüber beeinflussen kann (Abb. 1.3) (Sato et al., 2008; Zhang et al., 2014). PSD93-Proteine sind somit in der Lage mit Rezeptoren oder lonenkanälen zu interagieren und gleichzeitig über die Bindung an regulatorische Proteine deren Aktivität zu verändern. Durch die verschiedenen Möglichkeiten zur Protein-Protein-Interaktion (PDZ-Domänen, SH3-GK-Supramodul) ist es den PSD93-Proteinen auch möglich die Verbindung eines transmembranären Rezeptors zum Zytoskelett zu ermöglichen (Takei et al., 2015). In der PSD sind Proteine mit PDZ-Domänen die am häufigsten vorkommenden Gerüstproteine (Feng & Zhang, 2009).

1.4.3 Isoformen von PSD93 und alternatives Spleißen

Von PSD93 gibt es durch Nutzung mehrerer Promotoren, alternativer N-terminaler Translationsstartcodons, sowie durch alternatives Spleißen im kodierenden Bereich für den Linker zwischen SH3- und GK-Domäne (Exons 19-23) verschiedene Protein-Isoformen (Ali et al., 2018; Kruger et al., 2013).

Bislang sind für PSD93 sechs N-terminale Isoformen beschrieben und damit zeigt es unter den PSD-MAGUKs von Säugetieren das größte Variationsspektrum in diesem Bereich (Kruger et al., 2013). Ursprünglich waren diese sechs N-terminalen Spleißvarianten in autonomen Ganglienzellen entdeckt worden (Parker et al., 2004). In der Nomenklatur gibt es Unterschiede (Parker et al., 2004), weshalb sich im Folgenden auf die von (Kruger et al., 2013) vorgeschlagenen Bezeichnungen für Nterminale Isoformen bezogen wird. Hier werden der eine L27-Domäne enthaltende N-terminale Transkriptionsstart als β und die ein Palmitoylierungs-Motiv enthaltenden Starts als α_1 und α_2 benannt. Zudem existieren drei nur in PSD93 vorkommende N-terminale Isoformen γ , δ und ϵ . Die bekanntesten N-terminalen Isoformen sind PSD93- α und - β , die für PSD95 und SAP97 ebenfalls beschrieben sind (Abb. 1.3) (Schlüter et al., 2006; Zheng et al., 2011). SAP102 hingegen kommt in drei Isoformen vor, die sich durch alternatives Spleißen der N-terminalen Region I1 und der Region I2 im Linker-Bereich zwischen SH3- und GK-Domäne ergeben (Abb. 1.3) (Wei et al., 2015).

Die N-terminale Palmitoylierung der α-Isoformen ermöglicht es den PSD-MAGUKs in Kontakt mit Zellmembranen zu treten und benötigt zwei Cysteinreste in unmittelbarer Nähe zum N-Terminus des Proteins (Topinka & Bredt, 1998). β-Isoformen von PSD-MAGUKs fehlen Palmitoylierungsmotive, dennoch können sie über ihre L27-Domänen effektiv am Clustern der Postsynaptischen Dichte mitwirken (Chetkovich et al., 2002). L27-Domänen, benannt nach dem Vorkommen in den Proteinen Lin2 und Lin7, binden z.B. an die Calcium/Calmodulin-abhängige Serin/Proteinkinase (CASK), das Säugetier-Homolog von Lin2 und ebenfalls ein MAGUK-Protein. Damit wirken L27-Domänen spezifisch an der Zusammensetzung von MAGUK-Komplexen in der PSD mit (Chetkovich et al., 2002).

Die funktionellen Besonderheiten von α - und β -Domänen der MAGUKs sind, wenn auch vorrangig für PSD95 beschrieben, schon einige Zeit entschlüsselt, während solche genauen Aussagen zu den drei einzigartigen N-terminalen Translationsstarts y, δ und ϵ von PSD93 fehlen. Es gibt Vermutungen, dass die δ -Isoform auch über die Möglichkeit verfügt, mit Palmitoylierung an die postsynaptische Membran zu binden (Parker et al., 2004). Außerdem existiert für das humane Homolog von PSD935 die Möglichkeit der Bindung an Kir2.1-Kanäle. Hierzu werden alle drei PDZ-Domänen von PSD93δ genutzt. Die einwärts gleichrichtenden Kir2-Kaliumkanäle sind insbesondere für die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotenzials in Neuronen wichtig (Leyland & Dart, 2004). Überexpression der PSD93-Isoformen α_1 , α_2 , β , γ , δ und ϵ in Hippocampus-Kulturen konnte den Einfluss der verschiedenen Isoformen auf die Funktion der Glutamatrezeptoren beschreiben. Während die Überexpression von PSD935 und PSD93c die Funktion des AMPAR verstärkte, führte die Überexpression von PSD93β und PSD93γ zu keiner Hochregulation der AMPAR-Funktion. Bei Knockdown von PSD95 jedoch, ersetzten PSD93β und PSD93γ die essenzielle Funktion von PSD95 für die AMPARs. Ebenso führte eine Überexpression der

PSD93α-Isoformen zu keiner Verstärkung der exzitatorischen Signaltransduktion über die AMPARs der neuronalen Synapse (Kruger et al., 2013).

Es lässt sich also festhalten, dass PSD93-Isoformen nicht nur für die Etablierung eines Aktionspotenzials (Glutamatrezeptoren), sondern auch für die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotenzials (Kaliumkanäle) in Neuronen gebraucht werden und die verschiedenen Isoformen hierfür eine besondere Rolle einnehmen. Außerdem gibt es enge Verbindungen zu anderen PSD-MAGUKs, wodurch die synaptische Transmission moduliert wird.

1.4.4 PSD93 in neuronaler Physiologie und Pathophysiologie

Durch die Aufrechterhaltung und Modulation exzitatorischer Signale in Synapsen spielen die PSD-MAGUKs eine bedeutende Rolle in der physiologischen Funktion des menschlichen ZNS. Eine Vergleichsstudie mit Touchscreen-Testverfahren konnte die Bedeutung der vier Mitglieder der PSD93-Familie in insgesamt vier Bereichen kognitiver Funktion (Konditionierung und einfaches Lernen, komplexes Lernen, kognitive Flexibilität und Reaktionskontrolle, Aufmerksamkeit) für Mensch und Maus aufzeigen (Nithianantharajah et al., 2013). Hierzu kamen Knockout (KO)-Mäuse für die jeweiligen PSD-Proteine zum Einsatz. Während *Psd95* für einfaches Lernen essentiell schien, konnte gezeigt werden, dass Psd93 und Sap102 in gegensätzlicher Ausprägung für komplexere Formen des Lernens und Gedächtnisses gebraucht werden. Die Ergebnisse konnten für eine Gruppe von Menschen mit Mutationen im kodierenden Bereich von PSD93 bestätigt werden. Auch hier waren komplexe kognitive Funktionen wie visuelle Diskrimination und kognitive Flexibilität oder Aufmerksamkeit im Vergleich zu Individuen ohne PSD93-Mutation beeinträchtigt (Nithianantharajah et al., 2013). Als neuronalen Mechanismus für Lernen und Gedächtnis wird die synaptische Plastizität angesehen, die durch NMDAR- und AMPAR-abhängige Langzeitpotenzierung (LTP) und Langzeitdepression (LTD) induziert wird (Genoux & Montgomery, 2007). Folglich kann eine Störung der synaptischen Plastizität z.B. durch Mutation von MAGUK-Genen zu Abweichungen in physiologischen ZNS-Funktionen und damit zu Pathologien neuronaler Synapsen führen (Grant, 2012; Oliva et al., 2012).

Eine Erkrankung bei der Mutationen u.a. in *PSD93* als ursächlich betrachtet werden, ist die Schizophrenie (Grant, 2012; Kirov et al., 2012; Walsh et al., 2008). Die Schizophrenie ist eine neuropsychiatrische Erkrankung, die meist im späten Jugend- oder frühen Erwachsenenalter erkannt wird und auf deren Entstehung

genetische Veränderungen nachweislich einwirken (Walsh et al., 2008). Für die Beteiligung von *PSD93* und weiteren Genen der Familie, sowie deren Interaktionspartnern, an der Pathogenese werden *de novo* Kopienzahlvariationen, also Gen-Deletionen oder -Duplikationen, diskutiert (Kirov et al., 2012; Walsh et al., 2008). Eine Korrelation dieser seltenen *de novo* Mutationen mit dem Auftreten sporadischer, jedoch nicht familiärer Fälle von Schizophrenie ist vielfach beschrieben (Kirov et al., 2012; Xu et al., 2008). Erst vor Kurzem brachte eine Studie der Kinderklinik der Universität Brüssel Mutationen in *PSD93* generell in Verbindung mit Störungen der Entwicklung des ZNS wie etwa kognitive, behaviorale und psychiatrische Auffälligkeiten in Kindheit und Jugend. Eine besondere Leistung dieser Arbeit ist zum einen die Entdeckung zweier *PSD93*-Promotoren und zweier die Kodierung beginnenden Exons mit pathophysiologischem Mitwirken, zum anderen die Darstellung der *Psd93*-Orthologe im Mausgenom (Reggiani et al., 2017).

Neben dem Vorkommen in Neuropsychiatrie und ZNS-Entwicklungsstörungen gibt es weitere neurologische Krankheiten, an denen PSD93 pathophysiologisch beteiligt ist: der ischämische Schlaganfall und chronische Schmerzzustände (Rong et al., 2016; Tao et al., 2003; Zhang et al., 2014, 2015). Nach einer fokalen zerebralen Ischämie durch Verschluss der Arteria cerebri media hatten PSD93 KOein signifikant verringertes Infarktvolumen und einen besseren Mäuse neurologischen Status im Vergleich mit WT-Individuen (Rong et al., 2016; Zhang et al., 2014, 2015). Zusätzlich wurden proinflammatorische Zytokine wie z.B. Cyclooxygenase-2 (COX-2) oder iNOS nach Ischämie, vermutlich durch Mikroglia ausgeschüttet, herunterund antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 heraufreguliert (Zhang et al., 2015). Als möglichen Mechanismus für diesen neuroprotektiven Effekt wird die verringerte Fyn-abhängige Phosphorylierung der NR2B-Untereinheit von NMDARs nach PSD93-Deletion vermutet (Abb. 1.3) (Zhang et al., 2014). Chronische Schmerzen werden über eine NMDAR-abhängige exzitatorische Signaltransduktion mittels Expression der NR2A- und NR2B-Untereinheiten des NMDAR auf der Membran der Postsynaptischen Dichte von Neuronen im Rückenmarkshinterhorn und Frontalhirn vermittelt (Tao et al., 2003). PSD93 KO-Mäuse zeigen verminderten chronischen neuropathisch sowie inflammatorisch bedingten Schmerz, was PSD93 zu einem möglichen Ziel der Therapie von chronischen Schmerzen macht (Gardoni et al., 2009; Tao et al., 2003). MAGUKs der PSD-Familie werden im jeweiligen Tiermodell auch mit

neurodegenerativen Erkrankungen wie Parkinson und Alzheimer in Verbindung gebracht. Vorrangig wird PSD95 genannt und die pathophysiologische Beteiligung wird auch hier in der veränderten Regulation von NMDARs in Synapsen der beteiligten Hirnareale gesehen (Gardoni et al., 2009). Zusammenfassend lässt sich über PSD93 sagen, dass es bedeutend an vielen ganz unterschiedlichen ZNS-Erkrankungen mitwirkt. Für die Zukunft bedarf es aber noch viel Arbeit zur Aufklärung des genauen mechanistischen Einflusses auf die synaptische Funktion, auch um die Möglichkeiten einer gezielten Therapie über PSD93 zu verstehen.

1.4.5 PSD-Proteine in Kanzerogenese und Immunzellen

Während das einzelne *dlg*-Gen in *Drosophila* einen Tumor-Suppressor darstellt, sind die homologen Gene der Familie um PSD93 in Säugetieren hauptsächlich aufgrund ihres Vorkommens im ZNS beforscht. Daneben kommen diese aber auch in Säugetieren außerhalb des ZNS vor. In Epithelzellen werden die PSD-Proteine exprimiert und üben dort eine wichtige Funktion für die Aufrechterhaltung von Zellpolarität und Kontrolle von Zellproliferation aus (Frese et al., 2006; Humbert et al., 2003; Roberts et al., 2012). Dort sind PSD-Proteine Teil des Polaritätsregulators Scribble (Humbert et al., 2003; Roberts et al., 2012). Da sich die Entstehung von Krebs u.a. durch den Verlust von Zellpolarität und einer unregulierten, überschießenden Zellproliferation auszeichnet, kann spekuliert werden, dass Funktionsstörungen der PSD-Proteine in Epithelzellen zur Kanzerogenese beitragen können (Humbert et al., 2003). Für SAP97 ist bekannt, dass virale Onkoproteine von Humanen Papillomaviren E6, Humane T-Zell Leukämie Viren Typ 1 (HTLV-1) Tax und E4-ORF1 von Adenoviren Typ 9 über ein PDZ-bindendes Motiv explizit SAP97 als Ziel haben (Blot et al., 2004; Roberts et al., 2012). Im Tiermodell wird SAP97 nach Bindung von E4-ORF1 zu einem Onkogen und ermöglicht die Entstehung von Mammakarzinomen (Frese et al., 2006). E4-ORF1 war das erste virale Onkoprotein, in dem ein PDZ-bindendes Motiv nachgewiesen werden konnte (Kong et al., 2014). Beispielhaft sei mit dem Endometriumkarzinom eine epitheliale Tumorentität genannt, bei der der Verlust von SAP97 in Material von Patienten insbesondere mit aggressiverem Tumorwachstum und schlechterer Prognose einherging. Die bestätigte Einwirkung auf die Karzinogenese könnte die SAP97einem molekularen Biomarker für Expression zu die Diagnostik von Endometriumtumoren machen (Sugihara et al., 2016). Die Hochregulation einer Protein-Isoform von PSD93 ohne jegliche N-terminalen PDZ-Domänen ist im

renalen Onkozytom, einem gutartigen epithelialen Nierentumor, beschrieben. Da es verglichen mit anderen Nierentumoren zu einer spezifischen Hochregulation dieser Isoform kommt, scheint eine molekulare Diagnostik über PSD93 im Tumorgewebe möglich (Zubakov et al., 2006). Es ist an dieser Stelle aber wichtig zu erwähnen, dass es sich bei dem beschriebenen Protein um ein Fusionsprotein bzw. um ein Fusionsgen, ähnlich BCR-ABL, handelt. Soll heißen, dass die Beschreibung einer isolierten PSD93-Isoform mindestens diskutabel ist. Außerdem gibt es auch Berichte über PSD93-Mutationen in Osteosarkomen, also Tumoren mesenchymaler Herkunft. Die strukturellen Variationen in *PSD93* wurden neben einer ganzen Reihe weiterer Genmutationen in den sequenzierten Genomen von Tumorproben pädiatrischer Osteosarkome, verglichen mit normalem Gewebe, entdeckt (Chen et al., 2014). Erst kürzlich konnte die Rolle von PSD93 als Tumorsuppressor für Osteosarkome über Speziesgrenzen hinweg (human, murin, canin) nachgewiesen werden. Häufige Mutationen befanden sich in der ersten PDZ-Domäne sowie in der SH3-GK-Linker Region (Shao et al., 2018). Entsprechend ihrem Homolog dlg in Drosophila fungieren **PSD-Proteine** also als Tumor-Suppressoren. Während bislang Darstellungen von PSD93 in Immunzellen fehlen, gibt es Berichte über SAP97 und PSD95 als Gerüstproteine in T-Zellen mit Beteiligung an der "immunologischen Synapse" zwischen T-Zelle und APC (Shaw & Filbert, 2009; Szilágyi et al., 2013). In einem Modell verbindet SAP97 T-Zell-Rezeptoren mit Proteinen, die an intrazellulärer Signalweiterleitung beteiligt sind und Einfluss auf die Gestaltung des Zytoskeletts von T-Zellen haben. Zum Einsatz kommen die klassischen Protein-Protein-Interaktion-vermittelnden PDZ-, SH3- und GK-Domänen (Shaw & Filbert, 2009). Die Frage, ob SAP97 als negativer oder positiver Regulator auf die T-Zell-Proliferation einwirkt, wird unterschiedlich beantwortet (Round et al., 2007; Stephenson et al., 2007). Es wird spekuliert, dass hierbei die Funktion in unterschiedlichen T-Zell-Populationen, also z.B. CD4+/CD8+ T-Zellen oder naiven/aktivierten T-Zellen variiert (Adachi & Davis, 2011; Shaw & Filbert, 2009). Die spezifische Komplexbildung von SAP97 mit T-Zell-Rezeptoren aktivierter T-Zellen könnte ein Faktor für die stärkere und schnellere Immunantwort auf Antigenkontakt sein (Adachi & Davis, 2011). SAP97 interagiert in der Infektion von CD4⁺ T-Zellen direkt mit Hüllglykoproteinen von HTLV-1 und wird für die Transmission des Virus in weitere T-Zellen benötigt. Prozesse im Rahmen der Infektion einer Zielzelle, wie der T-Zelle, laufen unter Ausbildung einer "virologischen Synapse" ab (Blot et al., 2004). Auch für PSD95 ist ein Mitwirken an HTLV-1-Infektionen beschrieben (Roberts et al., 2012).

1.5 Ziele der Arbeit

Nachdem die differenzielle Expression von *Psd93* in IFNβ-produzierenden pDCs in einer Microarray-Datenanalyse beschrieben wurde (Bauer et al., 2016), soll diese Arbeit darlegen, welche Isoformen von Psd93 auf mRNA-Ebene vorkommen. Ein Fokus wird auf die verschiedenen Spleißvarianten innerhalb des genomischen Lokus von *Psd93* gelegt. Da vor Aufnahme der Arbeiten noch keine Daten über PSD93-mRNA oder -Protein in Immunzellen zur Verfügung standen, wird Literatur aus den Neurowissenschaften als Referenz genutzt. Bezüglich differenziellem Spleißen in Neuronen diente die Arbeit von Kruger et al. als Grundlage und wurde mit unseren Zellpopulationen verglichen (Kruger et al., 2013). Vorab wurde in silico eine Referenzkarte der Isoformen und Spleißstellen erstellt, auf die sich im Verlauf bezogen werden konnte. Es konnte in Vorexperimenten zur Expression von Psd93 in pDCs u.a. gezeigt werden, dass die Steigerung der Expression von *Psd93* nach TLR9-Stimulation mit dem Liganden CpG 1668 in IFNβ⁺ ex vivo-sortierten pDCs aus der Milz etwa bei einem Faktor von 150 im Vergleich zu den IFNß pDCs lag (Dress, 2015). In den Expressionsanalysen in dieser Arbeit kam hingegen Material aus in vitro-KM-differenzierten DCs zum Einsatz. Es wurde die Steigerung der Expression auch in mit Flt3L kultivierten DC-Kulturen beschrieben und mittels RT-PCR die vorkommenden Isoformen auf mRNA-Ebene eingegrenzt. Entdeckte Isoformen sollten mittels Sanger-Sequenzierung der PCR-Produkte in ihrem Spleißverhalten dargestellt werden. Im Weiteren wurden auch KM-differenzierte Makrophagen (BMDMs) stimuliert, ihre IFNβ-Produktion möglichst maximiert und Psd93 auch dort versucht, nachzuweisen. Hauptaugenmerk blieb aber auf den IFNβ⁺ pDCs. Hierfür wurden mittels *Fluorescence-activated cell sorting* (FACS) pDCs und cDCs nach ihren Oberflächenmarkern sortiert. Mithilfe von IFNβ-Reportermäusen sollten die Zellpopulationen der IFN^{β+} pDCs bzw. cDCs von den IFNβ⁻ getrennt werden (Scheu et al., 2008). Nach Eingrenzung der in DCs vorkommenden Isoformen auf mRNA-Ebene sollte im weiteren Verlauf mit proteinanalytischen Methoden PSD93 mit der aus Hirnzellen bekannten Proteinsynthese verglichen und in Immunzellen charakterisiert werden. In diesem Zusammenhang wurden auch PSD93^{-/-} Mäuse eingesetzt. Das Ziel der getätigten Arbeiten ist ein besseres Verständnis für das Vorkommen von PSD93 in Zellen des Immunsystems und den Zusammenhang zur IFNβ-Produktion zu ergründen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Bezugsquellennachweis

2.1.1 Reagenzien

Reagenz	Bezugsquelle
Acrylamid/ Bis-Acrylamid	Merck, Darmstadt
Agarose	Biozym, Oldendorf
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ampicillinsulfat	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, Taufkirchen
β-Mercaptoethanol (β-ME)	Invitrogen, Karlsruhe
CpG ODN 2216	TIB Molbiol, Berlin
DAPI (4´,6-Diamidin-2-phenylindol)	Roche, Mannheim
Destilliertes Wasser	Invitrogen, Karlsruhe
Destilliertes Wasser (RNase frei)	Gibco, Paisley, USA
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Karlsruhe
DMEM Medium VLE, 500ml	Biochrom, Berlin
DNA-Ladepuffer	Fermentas, St. Leon-Rot
DNA-Leiter Mix	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
	New England BioLabs, Frankfurt am Main
dNTP-Set (Desoxyribonukleotide)	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
DOTAP (1,2-Dioleoyl-3-Trimethylammonium-	Roche, Mannheim
Propan)	
ECL Western Blotting Detektionsreagenz	GE Healthcare, Freiburg
Eisessig (Essigsäure 96%)	Merck, Darmstadt
Erythrozytenlysepuffer	Morphisto, Frankfurt am Main
Ethanol (EtOH)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Invitrogen, Karlsruhe
FACS Clean Lösung	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Flow Lösung	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Rinse Lösung	BD Biosciences, Heidelberg
Fötales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech, Aidenbach
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Invitrogen, Karlsruhe

Isopropanol	Merck, Darmstadt
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma, Taufkirchen
Methanol	Merck, Darmstadt
MESA GREEN qPCR MasterMix	Eurogentec, Köln
Milchpulver	Oxoid, Basingtoke, GBR
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdesoxycholat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma, Taufkirchen
NP-40	Merck, Darmstadt
Oligo-(dT)-Primer	Life Technologies, Darmstadt
PAGE Ruler Protein Leiter Mix	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), 500ml	Gibco, Paisley, USA
Pierce® Protein G Agarose beads	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
Polyriboinsäure-Polyribocytidylsäure (Poly I:C)	Amersham, Braunschweig
Protease-Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
Re-Blot Plus (Stripping Puffer)	Merck, Darmstadt
RNase Zap	Applied Biosystems/Ambion, Darmstadt
RPMI 1640 Medium VLE, 500ml	Biochrom, Berlin
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
Tris	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma, Taufkirchen
Tween20	Merck, Darmstadt

2.1.2 Kits

Kit	Bezugsquelle
BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
BD Compensation Beads	BD Biosciences, Heidelberg
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche, Mannheim
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche, Mannheim
NucleoSpin®RNA	Macherey-Nagel, Düren
The Original TA Cloning® Kit	Invitrogen, Karlsruhe
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen, Karlsruhe
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.3 Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
DreamTaq [™] DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
<i>Eco</i> RI	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
HindIII	Fermentas, St.Leon-Rot
rDNase	Macherey-Nagel, Düren
SuperScript® III Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
T4 DNA Ligase	New England BioLabs, Frankfurt am Main

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
Glaspipetten (5, 10, 20 ml)	Hirschmann, Eberstadt
Nitrocellulose-Membranen (0,45 µm)	Amersham, Braunschweig
Plastikprodukte/Einwegmaterial	BD Biosciences, Heidelberg
	BD Falcon, Heidelberg
	Corning, Amsterdam, NLD
	Eppendorf, Hamburg
	Greiner Bio-One, Frickenhausen
	Millipore, Schwalbach
	Neolab, Heidelberg
	NUNC, Wiesbaden
	Peqlab, Erlangen
	Sarstedt, Nümbrecht
	StarLab, Hamburg
Spritzen und Kanülen	B. Braun, Melsungen

2.1.5 Geräte

Gerät	Bezugsquelle
Abzug	wrt Laborbau, Stadtlohn
Axiovert 100 (Mikroskop)	Zeiss, Jena
Biofuge A (Zentrifuge)	Heraeus, Hanau
Biofuge fresco (Kühlzentrifuge)	Heraeus, Hanau
C1000 Thermal Cycler	Bio-Rad, München
Chirurgische Instrumente	Roboz, Gaithersburg, USA
Clean Air (Sterilbank)	Kendro, Wien, Österreich

Elektrophoresekammer (Agarosegele)	Hoefer, Amsterdam, NLD
Elektrophoresekammer (SDS-PAGE)	Invitrogen, Karlsruhe
FACS Aria III	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg
Geldokumentationssytem	Intas, Göttingen
Hera Cell 240 (Brutschrank)	Heraeus, Hanau
iQ™5 iCycler	Bio-Rad, München
Milli-Q (Wasseraufbereitungsanlage)	Merck-Millipore, Darmstadt
Minilys (Homogenisator)	Peqlab, Erlangen
Mini Spin (Tischzentrifuge)	Eppendorf, Hamburg
Molecular Imager GelDoc™ XR+	Bio-Rad, München
NanoDrop 1000 (Photometer)	Peqlab, Erlangen
Neubauer Zählkammer	LO-Laboroptik, Friedrichsdorf
peqPOWER 250 (Netzgerät)	Peqlab, Erlangen
Pipetus (Pipettierhilfe)	Hirschmann, Eberstadt
Rotanta 46 RC (Zentrifuge)	Hettich, Tuttlingen
Semi-Dry Blotter	Peqlab, Erlangen
Sunrise (Photometer)	Tecan, Männedorf, CHE
TE2000 (Mikroskop)	Nikon, Düsseldorf
Thermocycler T1	Biometra, Göttingen
Thermocycler T-Gradient	Biometra, Göttingen
Thermomixer compact (Heizschüttler)	Eppendorf, Hamburg
(
VVR (Vortex-Schüttler)	VWR, Darmstadt

2.1.6 Bakterienstämme

Bezeichnung		Genotyp	Bezugsquelle
<i>Escheric</i> DH5α	hia coli	F– Φ80 <i>lac</i> ZΔM15 Δ(<i>lac</i> ZYA- <i>arg</i> F) U169 <i>rec</i> A1 <i>end</i> A1 <i>hsd</i> R17 (rK–, mK+) <i>pho</i> A <i>sup</i> E44 λ– <i>thi</i> -1 <i>gyr</i> A96 <i>rel</i> A1	Medizinische Mikrobiologie & Krankenhaushygiene, Universitätsklinikum Düsseldorf
2.2	Medier	n und Puffer	
2.2.1	Medien		

Zellen	Konzentration	Bestandteil
BMDMs	1 x	RPMI 1640 VLE
	10 % (v/v)	FCS
	15 % (v/v)	L-Sup (aus L929-Überstand)
	0,05 M	β-ΜΕ
Bromphenolblau

Flt3L DCs	1 x 10 % (v/v) 5 %/10 % (v/v) 0 05 M	RPMI 1640 VLE FCS Flt3L (aus CHO K1-Überstand) 6-ME
2.2.2 Puffer	0,00 1	
Puffer	Konzentration	Bestandteil
Block-Puffer	1 x	TBS/T-Puffer
	5 % (w/v)	BSA

Blot-Puffer	192 mM	Glycin
	25 mM	Tris Base
	10 % (v/v)	Methanol
FACS-Puffer	1 x	PBS
	2 % (v/v)	FCS
	2 mM	EDTA
Laemmli-Probenpuffer (3 x)	62 5 mM	1 M Tris [pH 6 8]
	2 % (v/v)	SDS
	10 % (v/v)	Glycerol
	5 % (v/v)	β-Mercaptoethanol

0,005 % (w/v)

LB-Medium	10 g/l 5 g/l	Bacto-Trypton Hefeextrakt
	10 g/l ad 1000 ml mit H ₂ O, [pH 7], autoklaviert	Natriumchlorid
PAGE-Elektrodenpuffer	192 mM 25 mM 0,1 % (v/v)	Glycin Tris Base SDS

RIPA Lysepuffer (-SDS)50 mMTris-HCI [pH 7.5]150 mMNatriumchlorid1% (v/v)NP-400,5% (w/v)Natriumdesoxycholat1 mMNatriumorthovanadat

	1 mM 1 Tablette	EDTA Protease-Inhibitoren
TAE-Puffer (Agarosegele)	40 mM 20 mM 1 mM	Tris-HCI [pH 8] Eisessig EDTA [pH 8]
TBS/T-Puffer	20 mM 137 mM 0,1 % (v/v)	Tris-HCI [pH 7,6] Natriumchlorid Tween20

2.3 Primer und Antikörper

2.3.1 Primer (Oligonukleotide)

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert.

Name	Sequenzen (5´-3´)
Actb Real-Time fwd	TGACAGGATGCAGAAGGAGA
Actb Real-Time rev	CGCTCAGGAGGAGCAATG
Gapdh fwd	CACCACCATGGAGAAGGC
Gapdh rev	GGCATGGACTGTGGTCATGA
Ifnb fwd	CCACAGCCCTCTCCATCAACTATAAGC
<i>lfnb</i> rev	AGCTCTTCAACTGGAGAGCAGTTGAGG
Ifnb Real-Time fwd	CAGGCAACCTTTAACCATCA
Ifnb Real-Time rev	CCTTTGACCTTTCAAATGCAG

Primer für *Psd93*:

Name	Exon	Sequenzen (5´-3´)
<i>Psd93</i> α1 fwd	α1	CTGAGCTCTCACTCAGTGCCTTC
<i>Psd93</i> α ₂ fwd	α2	AGCTGCCGCTCTGTCTAGGCTG
<i>Psd93</i> α₀/β fwd	4	AAGGCAAATGCCCAGCCCAG
<i>Psd93</i> γ fwd	γ	GTGAAGAAGCTATGCAACACGCGT
<i>Psd93</i> δ fwd	δ	GGGAGGAAGCCTTTCTATGCAG
<i>Psd93</i> ε fwd	3	GCCAACTGGATGTGTGTGAGCCG
<i>Psd93</i> rev	11	CGGTGGCCCATAAGGATCAGT
<i>Psd93</i> α₀/β rev	9	TAGAGCCGGCTTCCTTGAG
<i>Psd93</i> γ rev	14	CGAGTTGCAGTACTGTGCTGG
<i>Psd93</i> ε rev	9	CACAACAGTCTCCAATATGGGTCGC
<i>Psd93</i> ζ _a fwd	ζα	AGCTGGCTGTGTTTCCAGTGCC
<i>Psd93</i> ζ _b fwd	ζb	TCCCCAGAGCCCATATAGAGCCA

<i>Psd93</i> η₁ fwd	η1	ACACAACAGCCCCCAAACCAC
<i>Psd93</i> η₂ fwd	η2	ACCGGACAGGAGACAGGAGA
<i>Psd93</i> η rev	17	TGACATACAGGGAGCGTTTCT
<i>Psd93</i> E18 fwd	18	AGAAGGGTCACACTAGATGG
<i>Psd93</i> E19 fwd	19	GTGGAAAGAAAGGAGCGTG
<i>Psd93</i> E20 fwd	20	CCATTCTACAAGAACAAGGAGC
Psd93 E21 fwd	21	ATTAGGTGACGACGGTTATGG
<i>Psd93</i> E20 rev	20	ATCACTGGTTTCCTGCTCAC
<i>Psd93</i> E21 rev	21	GAGTCTTTGTTCCATAACCGTC
<i>Psd93</i> E22 rev	22	AGCTACTTTCGCTATCGCTG
<i>Psd93</i> E23 rev	23	GCCTCGTGACAGGTTCATAG
Psd93 Real-Time fwd	17-18	AAACGCTCCCTGTATGTCAGA
Psd93 Real-Time rev	18	CCCCATCTAGTGTGACCCTTC

Primer *Psd93* α_1 , α_2 , α_0/β , γ , δ , ϵ fwd, sowie *Psd93* rev α_0/β , γ , ϵ rev und E18, E19, E20, E21 fwd sowie E20, E21, E22, E23 rev nach (Kruger et al., 2013) mit Modifikationen von *Psd93* α_1 fwd (-CAC an Positionen 13-15) und *Psd93* γ fwd (C statt T an Position 20 verwendet).

2.3.2 Antikörper

Tabelle 2.1	Antikörper	und	deren	Verwendung
-------------	------------	-----	-------	------------

Antikörper	Klon	Verwendung	Verdünnung	Bezugsquelle
Anti-B220-PerCP	RA3-6B2	FACS	1:100	BD Biosciences Heidelberg
Anti-β-Aktin	8H10D10	WB	1:10000	Cell Signaling, Boston, USA
Anti-CD11b-APC-Cy7	M1/70	FACS	1:100	BD Biosciences Heidelberg
Anti-CD11c-APC	HL3	FACS	1:100	BD Biosciences Heidelberg
Anti-CD69-PE	H1.2F3	FACS	1:100	BD Biosciences Heidelberg
Anti-CD16/CD32	93	FACS	1:50	eBioscience, Frankfurt (Main)
Anti-CD86-Pe-Cy7	GL1	FACS	1:100	BioLegend, London, GBR
Anti-F4/80-PerCP	BM8	FACS	1:100	BioLegend, London, GBR
Anti-GR1-PE	RB6-8C5	FACS	1:100	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-Kaninchen-HRP	Poly1272	WB	1:5000	BD Biosciences Heidelberg
Anti-Kaninchen-HRP leichtkettenspezifisch	5A6-1D10	WB	1:5000	Dianova, Hamburg
Anti-Maus-HRP	polyklonal	WB	1:5000	Dianova, Hamburg
Anti-PSD93	EPR8740	IP	1:125	Abcam, Cambridge, GBR
Anti-PSD93	EPR8740	WB	1:1000	Abcam, Cambridge, GBR
Anti-PSD93	N18/30	WB	1:1000	Merck, Darmstadt
Kaninchen-IgG	polyklonal	Isotypen- Kontrolle	1:100	Southern Biotech, Birmingham, USA

2.4 Stellungnahme zur Tierversuchsgenehmigung

Es wurden keine genehmigungspflichtigen Tierversuche durchgeführt. Im Rahmen einer Organentnahme wurden primäre Knochenmarkzellen gewonnen. Hierzu wurden unter dem Aktenzeichen O44-03 Knochen aus getöteten Mäusen entnommen. Da ich keinen Tierexperimentellen-Kurs besucht habe, wurden die Tiere durch Dr. Shafaqat Ali oder Sonja Kropp, Mitarbeiter des Institutes mit entsprechendem erforderlichem Nachweis (FELASA B), mittels zervikaler Dislokation schmerzfrei getötet. Die Organentnahme aus einem getöteten Tier wurde von mir durchgeführt. Die für diese Dissertation genutzten Mäuse wurden im spezifisch pathogenfreien (SPF)-Bereich der Tierversuchsanlage (ZETT) der Universität Düsseldorf gezüchtet und gehalten.

Tabelle 2.2 Mauslinien

Mausstamm	Details	Abkürzung
C57BL/6N	Wildtyp-Maus	WT
IFNβ ^{mob/mob}	IFNβ Reporter-Maus	МОВ
PSD93-/-	Psd93 Knockout-Maus	КО

Die IFNβ^{mob/mob} und PSD93^{-/-} Mäuse wurden vor Beginn der Versuche mindestens zehn Generationen auf ihren C57BL/6N Hintergrund zurückgekreuzt.

2.4.1 IFNβ/YFP Reporter-Maus

Um auf Einzelzellebene zwischen IFNβ-produzierenden und nicht-IFNβproduzierenden Zellen unterscheiden zu können, wurde die IFN $\beta^{mob/mob}$ Reportermaus genutzt. Hintergrund ist die Beobachtung, dass IFNβ-produzierende pDCs nach TLR9-Stimulation eine signifikant höhere *Psd93*-Expression aufweisen (Dress, 2015, Dissertation). In dieser IFNβ-Knockin Reportermaus wurde eine Expressionskassette für das gelb fluoreszierende Protein (YFP) an das Stoppcodon des endogenen Lokus der *Ifnb*-Expression angefügt. Über eine eigene interne ribosomale Eintrittstelle ist diese Kassette bicistronisch mit der endogenen *Ifnb*mRNA verbunden. Produziert eine Zelle nun z.B. aufgrund eines Stimulus IFNβ, wird gleichzeitig YFP in einem 1:1 Verhältnis exprimiert (Scheu et al., 2008).

2.4.2 *Psd93* Knockout-Maus

Der Zielbereich dieser KO-Maus kodiert im Bereich der zweiten von drei PDZ-Domänen des vollständigen, bekannten PSD93 Proteins (vgl. Abb. 1.3) und entspricht einem einzelnen ausgetauschten Exon mit einer Größe von 170 bp. Im Northern-Blotting blieb eine leichte Intensität der PSD93-mRNA, welche mit Spleißvarianten erklärt wurden, die das entfernte Exon auslassen. Durch das Entfernen des Exons ergibt sich eine Leserasterverschiebung, und infolgedessen kann nach damaligem Kenntnisstand kein funktionsfähiges Protein hergestellt werden. Im Western-Blot (WB) zeigte sich daher kein damals bekanntes PSD93 Protein in diesen Individuen (McGee et al., 2001b).

2.5 Organentnahme

2.5.1 Entnahme von Knochenmark

Es wurden Tiere im Alter von 6 – 14 Wochen zur Anfertigung dieser Arbeit verwendet. Nach einer schmerzfreien zervikalen Dislokation wurden diese Mäuse mit 70 %igem EtOH desinfiziert und zur weiteren Entnahme von KM verwendet. Die untere Extremität wurde unterhalb des Hüftkopfes abgetrennt, die Knochen von Fett- und Muskelgewebe befreit, mit PBS gewaschen und 3 min in 70 %igem EtOH desinfiziert. Nach erneutem Waschen in PBS wurden die Markräume von Femur und Tibia eröffnet und mithilfe einer 10 ml Spritze mit 26 Gauge Kanüle gefüllt mit RPMI-VLE 1640 Medium gespült. Durch mehrfaches Resuspendieren mittels 10 ml Plastikpipette in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt. Diese wurde pelletiert, indem die Zellsuspension 5 min bei 4 °C und 1200 rpm zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde entfernt und im KM vorhandene Erythrozyten, durch eine dreiminütige Inkubation mit 3 ml Erythrozytenlysepuffer, lysiert und dieser enzymatische Vorgang mit 10 ml Medium + 10 % (v/v) FCS gestoppt. Folgend wurden die Zellen durch ein 70 µm Zellsieb filtriert, das Sieb mit 5 ml Medium gespült und die Zellen zentrifugiert (5 min, 1200 rpm). Der Überstand wurde entfernt, die Zellen abschließend in 10 ml Medium aufgenommen und mithilfe einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Hierzu wurde eine 1:10-Verdünnung in Trypanblau hergestellt, um tote von lebenden Zellen differenzieren zu können. Tote Zellen färben sich mit dem Farbstoff an und erscheinen unter dem Mikroskop dunkelblau. Es wurden nur lebende Zellen gezählt, entsprechend der jeweils benötigten Zellzahl ausplattiert und diese Zellen weiter zu myeloiden Zellen differenziert.

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Isolation von RNA

Alle Arbeiten mit RNA wurden auf Eis und an einem extra dafür eingerichteten Arbeitsplatz durchgeführt. Platz und Pipetten wurden vor Arbeitsbeginn mit RNase-Zap (Ambion) von ubiquitär vorkommenden Ribonukleasen (RNasen) befreit, um ein Denaturieren der RNA zu verhindern.

Für die angestrebte Expressionsanalyse wurde RNA aus mindestens 5 x 10⁵ FACSsortierten Zellen mithilfe des NucleoSpin®RNA Kit (Macherey-Nagel) nach Herstellerprotokoll gewonnen. Das Prinzip beruht darauf, dass nach einer Zelllyse die RNA an eine Silica-Membran bindet und mit anschließender Aufreinigung direkt von RNasen sowie genomischer DNA befreit werden kann.

Die Konzentration der eluierten RNA wurde mittels eines Spektrophotometer (NanoDrop 1000; Peqlab) über die Absorption einer Wellenlänge von 260 nm (A260) determiniert. Hierbei entspricht eine A260 von 1 40 µg RNA/ml. Der Absorptionsquotient der Wellenlängen 260/280 nm dient zur Abschätzung der Reinheit von RNA und DNA. Für RNA sollte dieser Quotient möglichst bei 2 liegen (Hauk, 2013). Die isolierte RNA wurde bei -80 °C eingefroren und bis zum Gebrauch gelagert.

2.6.2 cDNA-Synthese mittels reverser Transkription

Die aufgereinigte RNA (2.6.1) konnte im weiteren Verlauf direkt für eine cDNA-Synthese genutzt werden. Als Material wurden, je nach RNA-Konzentration, zwischen 100 und 2000 ng RNA eingesetzt. Die eingesetzte Menge an RNA wurde für alle Proben eines Experimentes angeglichen und nach der Reversen Transkription auf die gleiche Endkonzentration verdünnt.

Im ersten Schritt wurde die RNA nach folgendem Schema pipettiert und anschließend für 5 min bei 65 °C in einem Thermocycler (Biometra) inkubiert:

dH ₂ O	(RNase frei)	2 µl	
dNTPs	(10 μM)	1 µl	
Oligo-(dT)-Primer	(50 μM)	1 µl	
RNA		10 µl	

Um die RNA-Endkonzentration bei allen Proben gleich zu halten, wird sich an der am geringsten konzentrierten Probe orientiert, d.h. höher konzentrierte Proben werden mit dH₂O auf die benötigte Konzentration verdünnt.

Nach einer einminütigen Inkubation auf Eis wird dem Ansatz folgendes Material, u.a. die Reverse Transkriptase, hinzugefügt:

First Strand Buffer	5x	4 µl	
DTT	0,1 M	1 µl	
SuperScript® III	200 U/µl	1 µl	

Nach vorsichtigem Mischen wird der Ansatz zuerst 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und folgend 90 min bei 50 °C von der Reversen Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Diese, als Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) bezeichnete Reaktion, wird abschließend für 15 min bei 70 °C inaktiviert.

Die hierdurch synthetisierte cDNA aus DCs wurde mit RNase freiem H₂O auf eine Konzentration von 5 ng/µl verdünnt und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

2.6.3 Kontrolle der cDNA-Synthese mittels *Gapdh*-PCR

Um den Erfolg der cDNA-Synthese beurteilen zu können, wurde diese in einer PCR mittels eines *housekeeping*-Gens analysiert. Als *housekeeping*-Gen wurde für diese Arbeit die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*Gapdh*) gewählt.

Die PCR wurde nach folgendem Reaktionsansatz pipettiert und dem angegebenen Thermoprofil synthetisiert:

PCR-Master-Mix:	H ₂ O			20,5 µl
	DreamTaq Buffer	10x		3 µl
	dNTPs	10 µM		1 µl
	Gapdh fwd Primer	10 µM		1 µl
	Gapdh rev Primer	10 µM		1 µl
	DreamTaq [™] Polymerase	5 U/µl		0,5 µl
	cDNA	5 ng/µl		3 µl
PCR-Programm:	94 °C	2 min		
Denaturieren	94 °C	30 sec		
Primerhybridisierung	55 °C	30 sec	30 x	
Elongation	72 °C	30 sec		
	72 °C	10 min		
	4 °C	∞		

Im Anschluss wurde den PCR-Produkten ein 10x DNA-Ladepuffer hinzugefügt, bevor jeweils 10 µl in die Taschen eines 2 %igen Agarosegels, welchem 2 µl/100 ml Ethidiumbromid (1 % wässrige Lösung) zugefügt wurde, aufgetragen wurden. Ethidiumbromid interkaliert in Nukleinsäuren wodurch DNA über Floureszenz (UV- Bereich) detektiert weden kann. Mittels Elektrophorese bei einer Spannung von 100 V wurde die DNA entsprechend ihrer Größe im elektrischen Feld über eine Stunde aufgetrennt.

Nach Belichtung mit UV-Licht in einem Geldokumentationssystem (Bio-Rad) konnten die resultierenden Banden detektiert werden und mit einem Größenstandard (GeneRuler 50 bp) verglichen werden. Aus den Primersequenzen ergibt sich für *Gapdh* eine Bande von 235 bp. Die cDNA-Synthese wird abschließend anhand der Größe sowie Intensität der *Gapdh*-Bande bewertet.

2.6.4 Isoformen-PCR von *Psd93*

Zur Identifikation der Expression von *Psd93*-Isoformen in myeloiden Zellen nutzte ich die für Material aus Gehirn bereits validierten Primer nach Kruger *et al.* (Kruger et al., 2013) und modifizierte diese nach Überprüfung der genomischen DNA-Sequenzen (3.1.1). Modifiziert wurden *Psd93* α_1 fwd (-CAC an Positionen 13-15) und *Psd93* γ fwd (Cytosin statt Thymin an Position 20). Primer für die SH3-GK-Linker Region mussten nicht modifiziert werden. Ich erweiterte die N-terminalen Primer entsprechend unserer Nomenklatur um die Primer für den N-terminalen Start von ζ und η . Diese wurden mithilfe der Software "Primer3" generiert (Rozen & Skaletsky, 2000).

PCR-Master-Mix:	H ₂ O			34,5 µl
	DreamTaq Buffer	10x		5 µl
	dNTPs	10 µM		1,5 µl
	Psd93 fwd Primer	10 µM		1,5 µl
	<i>Psd93</i> rev Primer	10 µM		1,5 µl
	DreamTaq™ Polymerase	5 U/µl		1 µl
	cDNA	5 ng/µl		5 µl
PCR-Programm:	94 °C	2 min		
Denaturieren	94 °C	30 sec		
Primerhybridisierung	53 bis 68 °C	30 sec	40 x	
Elongation	72 °C	30 sec / 45 sec		
-	72 °C	10 min		
	4 °C	∞		

Die Isoformen-PCR Reaktionen wurden nach folgendem Ansatz durchgeführt:

Die spezifische Temperatur zur Primerhybridisierung wurde u.a. mittels Gradient-PCR für jedes Primer-Paar optimiert und lag im Bereich von 53 bis 68 °C. Bei Transkripten mit einer Größe von mehr als 500 bp wurde die Zeit für die Elongation entsprechend auf 45 sec verlängert. Den PCR-Produkten wurde, wie in Kapitel 2.6.3 beschrieben, Ladepuffer hinzugefügt, 10 µl in die Taschen von Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegelen pipettiert und mittels Elektrophorese aufgetrennt. Es wurden Agarosegele mit unterschiedlichen Konzentrationen (1 bis 3 % Agarose) genutzt, im Geldokumentationssystem detektiert und die jeweiligen Bandenmuster der Proben mit verschiedenen Größenstandards verglichen (GeneRuler 50 bp, 2-log DNA Ladder). Material aus Gehirnen von unstimulierten C57BL/6N-Mäusen wurde als Positiv-Kontrolle genutzt.

2.6.5 Aufreinigung von PCR-Produkten und Sequenzierung

PCR-Produkte, deren genaue Sequenz determiniert werden sollte, wurden mittels eines Skalpells (mit 70 %igem EtOH gereinigt) unter UV-Licht aus dem Agarosegel geschnitten. Nach dem Wiegen der Gelstücke wurde die enthaltene DNA mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) nach Herstellerangaben aus dem Gel eluiert. Anschließend erfolgte die photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine A260 von 1 entspricht 50 µg DNA/ml und der Quotient aus 260/280 nm sollte für reine doppelsträngige DNA im Bereich von 1,8 liegen (Hauk, 2013).

Die Proben wurden je nach Konzentration aliquotiert und mit den zugehörigen Primern zum Sequenzieren zu Beckman Coulter Genomics (Hope End, GBR) geschickt.

2.6.6 Quantitative real-time PCR zur mRNA Quantifizierung

Durch die Anwendung der *real-time* PCR (qPCR) lassen sich Nukleinsäuren quantifizieren. Man kombiniert hierbei eine herkömmliche PCR zur Amplifikation der gewünschten Nukleinsäure mit Fluoreszenz-Messungen in den einzelnen PCR-Zyklen. Die Amplifikation der PCR-Produkte kann mittels interkalierenden DNA-Farbstoffen wie SYBR Green I nachverfolgt werden, da die Fluoreszenz proportional zu der Menge des Amplifikates zunimmt. Am *Crossing Point* (CP) übersteigt die Fluoreszenz der amplifizierten DNA die Hintergrundfluoreszenz. Über diesen CP-Wert kann die eingesetzte Nukleinsäure nun quantifiziert werden (Pfaffl, 2001). Um mRNA quantifizieren zu können, wird eine Reverse Transkription (RT-PCR 0) gefolgt von einer *real-time* PCR genutzt. Insgesamt spricht man also von einer *real-time* RT-PCR oder auch qRT-PCR (Pfaffl, 2004, 2001).

Zur Auswertung der Expressionsunterschiede nutzte ich die relative Quantifizierung ohne Effizienzkorrektur, bei der die Expression des Zielgens auf die eines Referenzgens normalisiert wird. Als Referenzgen wurde β -Aktin (*Actb*) verwendet. Bei dieser sogenannten $\Delta\Delta$ CP-Methode wird zunächst jede Probe auf das Referenzgen normalisiert (Δ CP) und dieser ermittelte Wert anschließend auf eine Standardprobe bzw. einen internen Kalibrator bezogen ($\Delta\Delta$ CP). Hierdurch ergeben sich die ermittelten Expressionsunterschiede aus der Formel 2^{- $\Delta\Delta$ CP} (Pfaffl, 2004).

Die eingesetzte cDNA von DCs wurde in einem Verhältnis von 1:3 und für die Gehirn-Kontrollen 1:5 verdünnt (0). Die qRT-PCR für *Psd93* führte ich in 96-Loch-Platten für alle Proben in technischen Triplikaten im iQ™5 iCycler (Bio-Rad) nach folgendem Reaktionsansatz durch:

qRT-PCR-Master Mix:	Mesagreen Master-Mix Primer fwd Primer rev H ₂ O eDNA	10 μΜ 10 μΜ	12,5 µl 0,2 µl 0,2 µl 7,1 µl 5 0 µl
	CDINA		5,0 µi

Die qRT-PCR-Ansätze für *Ifnb* und *Actb*, ebenfalls in technischen Triplikaten, setzten sich wie folgt zusammen:

een Master-Mix wd 20 μM ev 20 μM	12,5 µl 0,4 µl 0,4 µl 6,7 µl
	5,0 µi
	een Master-Mix wd 20 μM ev 20 μM

Alle Reaktionen wurden mit folgendem Thermo-Programm durchgeführt:

	50 °C	10 min	
	95 °C	10 min	
	95 °C	15 sec	AEX
	60 °C	1 min	45 X
	95 °C	15 sec	
	60 °C	1 min	
Schmelzkurve	65 °C - 95 °C	jeweils 15 sec	
	(in 0,5 °C-Schritten)		

Zur abschließenden Bewertung der spezifischen Amplifikation sowie Qualitätsskontrolle der Reaktion wurde eine Schmelzkurve erstellt. Zur Auswertung der generierten Daten wurde die Software "CFX-Manager 3.1" (Bio-Rad) sowie "GraphPad PRISM 5" (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) verwendet.

2.6.7 Klonierung von PCR-Produkten

Zur Vervielfältigung der ausgewählten PCR-Produkte wurden diese mithilfe des TA Cloning® Kits (Invitrogen) in ein Vektorsystem kloniert. Nach dem Ausschneiden, Aufreinigen und der Konzentrationsbestimmung von PCR-Produkten (0) wurden der pCR® 2.1 Vektor und die PCR-Produkte nach Herstellerangaben in einem molaren Verhältnis von 1:1 (Vektor zu Insert) ligiert. Die vorangegangene PCR wurde mit einer *Thermus aquaticus* (*Taq*)-DNA-Polymerase durchgeführt, um 3´-Desoxyadenosin-Überhange für die Ligation mit der T4-DNA-Ligase (New England BioLabs) zu generieren. Die Ligationsreaktion wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Zur Transformation wurden DH5a[™] *Escherichia coli* (Medizinische Mikrobiologie & Krankenhaushygiene, Universitätsklinikum Düsseldorf) genutzt. Diese wurden in 100 µl Aliquots auf Eis angetaut, der 10 µl Ligationsansatz hinzugegen, diese Reaktion 30 min auf Eis inkubiert und folgend einem Hitzeschock bei 42 °C von 35 sec Dauer ausgesetzt. 250 µl LB-Medium wurden hinzugefügt und die Reaktion bei 37 °C für 1 h schüttelnd bei 500 rpm inkubiert. Nach Zentrifugation wurden 250 µl des Überstandes abgenommen und das Pellet in dem restlichen Volumen resuspendiert und auf LB-Agarplatten (+ 100 µg/ml Ampicillin zur Selektion der plasmidenthaltenden Bakterien) ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Pro Platte wurden 12 Klone mittels steriler Einmalpipettenspitze in sterile Glasröhrchen, gefüllt mit 4 ml LB-Medium (+ Ampicillin 1 μ l/ml), überführt und diese Flüssigkulturen erneut über Nacht bei 37 °C inkubiert. Plasmid-DNA wurde mithilfe des High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) nach Herstellerangaben extrahiert und schlussendlich in 100 μ l H₂O eluiert, bei -20 °C eingefroren und gelagert.

Die korrekte Klonierung der PCR-Amplifikate wurde über einen Restriktionsverdau mit den Enzymen *Eco*RI und *Hin*dIII überprüft. Hierzu wurde je Enzym ein Verdau folgendermaßen angesetzt und die Reaktionsansätze zwei Stunden bei 37 °C inkubiert:

Restriktionsverdau	H ₂ O	10 µl
	10 x Puffer	2 µl
	<i>Eco</i> RI bzw. <i>Hin</i> dIII	1 µl
	Plasmid DNA	7 µl

20 µl der Verdaureaktionen wurden auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen, das mit Ethidiumbromid gefärbt wurde, wodurch die Restriktion bewertet werden konnte. Die Konzentration extrahierter DNA mit erfolgreicher Restriktion wurde photometrisch bestimmt. Schließlich wurde die Plasmid-DNA bei Beckman Coulter Genomics mit den Universal-Primern M13-26 rev und M13-20 fwd sequenziert.

2.7 Zellbiologische Methoden

2.7.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die aus dem KM gewonnenen primären Zellen (2.5.1) wurden in unbeschichteten 10 cm Zellkulturschalen ausplattiert und in Brutschränken unter wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37 °C und 10 % CO₂ kultiviert. Zellkulturarbeiten erfolgten bei sterilen Bedingungen unter einer Sterilbank.

2.7.2 Differenzierung von myeloiden Zellen aus Knochenmarkszellen

2.7.2.1 Generierung von Flt3L DCs

Als Kultivierungsmethode für murine DC-Kulturen mit einem möglichst hohen Anteil an pDCs hat sich die Supplementierung von Flt3L als geeignet erwiesen. CD11c⁺CD11b⁻B220⁺ DCs von plasmazytoider Morphologie lassen sich hierdurch mit bis zu einem Anteil über 40 % generieren (Gilliet et al., 2002).

An Tag 0 wurden 2 x 10⁷ Zellen aus dem KM mehrerer gepoolter Mäuse in 10 ml Medium (2.2.1) ausplattiert und anschließend im Brutschrank bei 37 °C kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte an Tag 5. Hierzu wurden 5 ml Medium je Schale entnommen und 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Nach dem Abnehmen des Überstandes wurden die im Pellet enthaltenen Zellen in 5 ml frisches Medium suspendiert und zurück auf die Zellkulturschalen gegeben. Stimulation und Ernte der Zellen wurde im weiteren Verlauf an Tag 7 durchgeführt.

2.7.2.2 Generierung von BMDMs

Hierfür wurden $1,5 \times 10^6$ Knochenmarkszellen an Tag 0 in 10 ml Medium aufgenommen, welches mit 15 % (v/v) *Macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) aus L929-Zell-Überstand aus eigener Herstellung suplementiert wurde (2.2.1). Die unreifen Knochenmarkzellen wurden mittels M-CSF zu Makrophagen differenziert. An Tag 3 wurden 5 ml frisches Medium mit 15 % MCSF versetzt. Die weitere Arbeit mit den Zellen erfolgte an den Tagen 6 und 7.

2.7.3 Stimulation und Ernte der Flt3L Kultur

Die DC-Kulturen wurden an Tag 7 mit dem TLR9 Agonisten CpG ODN 2216 stimuliert. Zusätzlich wurde in Kombination DOTAP (Roche) als ein liposomales Transfektionsreagenz eingesetzt, um den Stimulationseffekt von CpG 2216 zu verstärken. Eine optimale CpG-Konzentration, für die Expression von *Psd93* und *lfnb,* wurde mittels Titration ermittelt, um standardisiert stimulieren zu können (Abb. 3.3). 10 μ l CpG (500 μ M), die einer finalen Konzentration von 0,5 μ M je Schale entsprachen, wurden *ad* 100 μ l HBSS aufgefüllt sowie 30 μ l DOTAP *ad* 100 μ l HBSS. Die beiden Lösungen wurden gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie auf die Zellen gegeben wurden. Die Stimulationsdauer betrug, außer in einzelnen Experimenten, sechs Stunden. Wenn nicht anders erwähnt, wurde wie zuvor beschrieben stimuliert.

Nach Ablauf des Stimulationszeitraums wurden die Schalen zum Ablösen der Zellen für 30 min bei 4 °C inkubiert und anschließend mit einem Zellschaber abgekratzt. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde durch wiederholte Resuspendierung in PBS mit anschließender Zentrifugation gewaschen. Schlussendlich wurde das gewaschene, überstandsfreie Pellet für die Zellsortierung oder Proteinanalytik verwendet.

2.7.4 Stimulation der BMDM Kultur

Die mittels M-CSF differenzierten Makrophagen-Kulturen wurden an Tag 6 ausgezählt und jeweils 1 x 10⁶ Zellen auf 6-Loch-Platten ausgesät. Die Zellen wurden in 2 ml Medium aufgenommen und mit verschiedenen TLR-Stimuli inkubiert. Folgende Stimuli wurden verwendet:

TLR-Agonist	Stimulierter PRR	Konzentration
CpG 2216 + DOTAP	TLR9	0,5 µg/ml + 3 µl/ml
LPS	TLR4	1 μg/ml
Poly I:C	TLR3	100 µg/ml

Bei der Stimulation von Makrophagen-Kulturen konnte auf Forschungsergebnisse der Arbeitsgruppe zurückgegriffen werden (Dresing, 2010, Dissertation), bei denen unterschiedliche Stimuli in der IFNβ-Antwort über das IFNβ-Reportermaus-Modell untersucht wurden.

In den in dieser Dissertation beschriebenen Versuchen wurden die Zellen für 6 und 24 h stimuliert. Kontrollen wurden unstimuliert belassen und parallel zu den stimulierten Proben zu den Zeitpunkten 6 und 24 h, wie in 2.7.3 beschrieben, geerntet. Die Zellen wurden zum einen für die Analyse der Oberflächenmarker mittels FACS eingesetzt, zum anderen für die RNA-Isolation mit anschließender RT-PCR auf *Psd93*-Isoformen verwendet.

2.8 *Fluorescence-Activated Cell Sorting* (FACS)

2.8.1 FACS von Flt3L-DCs

Mittels Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) ist es möglich einzelne Zellen aufgrund unterschiedlicher Eigenschaften in getrennte Reaktionsgefäße zu sortieren. Eigenschaften meint in diesem Kontext die Form oder die Expression von Oberflächenantigenen, die mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten AK sichtbar werden. Zellpopulationen, die nach Vorhandensein gemacht von Oberflächenantigenen getrennt werden sollen, müssen vorher mit AK gefärbt werden. Die Zellen werden in einem Flüssigkeitsstrom einzeln durch einen fokussierten Laserstrahl geleitet und das gestreute Licht wird in den Bereichen Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward scatter) und Seitwärtsstreulicht (SSC = Sideward scatter) bewertet. Rückschlüsse auf die Größe der Zellen liefert das FSC, die Granularität wird über das SSC detektiert. Zeitgleich erfolgt die Messung der Fluoreszenz. Zellen werden mit fluoreszenzmarkierten AK gefärbt und können infolgedessen anhand spezifischer emittierter Wellenlängen voneinander getrennt und in unterschiedliche Reaktionsgefäße sortiert werden. Mit dieser Methode ist es ebenfalls möglich lediglich die Zellzahl aufzunehmen und diese nach ihren unterschiedlichen Oberflächenantigenen zu analysieren (Herzenberg et al., 2002).

Zellen aus einer Flt3L-Gesamtkultur (2.7.3) wurden zur Zellsortierung eingesetzt. Zur Blockierung der Fc-Rezeptoren, die sonst unspezifische Bindungen der AK verursachen könnten, wurden die Zellen in 50 µl Anti-CD16/CD32 AK-Lösung (1:50 in FACS-Puffer) resuspendiert und 10 min bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und gefärbt. Die Färbung der Zellen erfolgte in jeweils 100 µl AK-Lösung (1:100 in FACS-Puffer, wenn nicht anders angegeben) für 10 min bei 4 °C im Dunkeln. Nach einmaligem Waschen in 2 ml FACS-Puffer wurde der Überstand vollständig abgenommen und die gefärbten Zellen in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen. Zur Sortierung der Zellen wurden ein FACSAria™ III und die zugehörige Software "FACSDiva™" (BD Biosciences) genutzt. Die Kompensation wurde mit Kompensationsbeads (BD Bioscience) nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Sortierungsvorgang mit dem FACSAria™ III wurde von Dr. Shafaqat Ali vorgenommen. Um nachfolgend eine Expressionsanalyse von *Psd93* in cDCs und pDCs durchführen zu können, wurden diese aus Flt3L-DC-Kulturen anhand folgender Oberflächenmarker getrennt:

cDCs: CD11c⁺ B220⁻ CD11b⁺

pDCs: CD11c^{int} B220+ CD11b⁻

Hierzu wurden folgende fluoreszenzmarkierte AK verwendet:

Anti-CD11c	APC (Allophycocyanin)	
Anti-B220	PerCP (Peridinin Chlorophyll)	
Anti-CD11b	APC-Cy7 (Allophycocyanin-Cyanine 7)	
Anti-CD86	PE-Cy7 (Phycoerythrin-Cyanine 7)	

Mittels FSC und SSC wurden zelltypische Partikel vorsortiert (nicht gezeigt). Anschließend wurden alle CD11c^{+/int} Zellen als DCs klassifiziert (Abb. 2.1 oben). Im Weiteren wurde diese Population in CD11b⁺ cDCs und B220⁺ pDCs unterteilt (Abb. 2.1 Mitte). Da das Material aus den Flt3L-Kulturen entweder stimuliert oder nichtstimuliert wurde, konnten an diesem Punkt aus den fertigen Kulturen vier Proben abgegrenzt werden: stimulierte und nicht-stimulierte pDCs wie cDCs. Als Stimulationskontrolle wurde der Oberflächenmarker CD86 analysiert (nicht gezeigt). Bis zu diesem Schritt konnte mit WT-Mäusen gearbeitet werden. Um die Zellen folgend in IFNβ-produzierende und nicht-produzierende Zellen differenzieren zu können, mussten IFNβ-Reportermäuse eingesetzt werden (2.4.1). Die von YFPemittierte Fluoreszenz von 530 nm wurde im Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Kanal gemessen (untere 4 Panels). Folglich konnten die Populationen der pDCs und cDCs weiter in YFP⁺ und YFP⁻ Zellen unterteilt werden. An dieser Stelle ergibt sich also ein zweites Experimentaldesign für die Zellsortierung. Alle Zellen aus IFNβ-Reportermäusen waren stimuliert und wurden in vier Proben sortiert: YFP+/YFP-YFP⁺/YFP⁻ cDCs. Auf diese beiden unterschiedlichen pDCs und Experimentalansätze und die dazu verwendeten WT- bzw. IFNβ-Reportermäuse wird im Weiteren immer wieder eingegangen. Nach Sortierung wurden die Zellpopulationen in FCS-beschichteten Gefäßen gesammelt und bis zur weiteren Verwendung (2.6.1) auf Eis gelagert.



Abb. 2.1 Sortierung von Flt3L-DCs in pDCs und cDCs

Bei Verwendung der IFNβ^{mob/mob} Maus konnte in YFP⁺ und YFP⁻ pDCs und cDCs sortiert werden (3. Reihe). Die unteren vier Panels (3. und 4. Reihe) zeigen die Situation nach Stimulation von Flt3L-Kulturen aus IFNβ^{mob/mob} Mäusen (3. Reihe für pDCs und cDCs) und die Kontrolle aus C57BL/6N (4. Reihe für pDCs und cDCs). Dargestellt ist hier ein repräsentatives für drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente. Zahlen geben die in den jeweiligen *Gates* enthaltenen Zellen an (Frequenz in %). Beschriftung der schwarzen Pfeile entspricht den jeweiligen Parametern auf der Achse (z.B. Oberflächenmarker oder Streulicht). Graue Pfeile weisen auf nächstes Panel hin.

2.8.2 Färbung und Analyse von stimulierten BMDM-Kulturen

Nach Blockierung der Fc-Rezeptoren (2.8.1) wurden die Zellen in 100 µl AK-Lösung mit den folgenden fluoreszenzmarkierten AK gefärbt:

Anti-CD11b	APC-Cy7 (Allophycocyanin-Cyanine 7)
Anti-GR1	PE (Phycoerythrin)
Anti-CD86	PE-Cy7 (Phycoerythrin-Cyanine 7)

Außer für Anti-CD11b (1:200) wurden die AK 1:100 in FACS-Puffer verdünnt eingesetzt und die Zellen für 10 min bei 4 °C im Dunkeln gefärbt. Abschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen, in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert und mithilfe des FACSCanto[™] II (BD Biosciences) analysiert. DAPI⁺ und demnach tote Zellen wurden in der Analyse ausgeschlossen. CD11b diente als spezifischer Marker für Makrophagen und durch die Verwendung von IFNβ-Reportermäusen, sollten über die YFP-Fluoreszenz Rückschlüsse auf die *Ifnb*-Expression in den Makrophagen-Kulturen gezogen werden.

2.9 Proteinanalytische Methoden

2.9.1 Lyse kultivierter Zellen

Das Zellpellet von Flt3L Kulturen (0) wurde in 500 μ l RIPA Lysepuffer (-SDS, + 10 μ l/ml Natriumorthovanadat, + 1:50 Protease-Inhibitor Cocktail Tabletten in H₂O) resuspendiert und 30 min bei 4 °C rotierend inkubiert. Durch eine 20-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C wurden Zellkerne und –trümmer abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues, steriles Zentrifugenröhrchen überführt. An dieser Stelle wurden Kontrollen des Lysates für den WB abgenommen. Hierfür wurden 60 μ l Totallysat (TL) entnommen und 30 μ l Laemmli-Puffer (3 x) zugegeben. Anschließend wurde das Proteinlysat 10 min bei 95 °C gekocht und konnte bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

2.9.2 Lyse von Gehirngewebe

Das Gehirngewebe wurde abgewogen und das dreifache Gewicht an PBS dazupippettiert. Anschließend wurden die Proben 20 sec in 7 ml Reaktionsgefäßen mit Keramik-*Beads* (Peqlab) in einem Homogenisator (Minilys; Peqlab) homogenisiert. Es wurden 10 µl/ml Natriumorthovanadat und 1:50 Protease-Inhibitor Cocktail Tabletten, in H₂O gelöst, zugegeben. Die eigentliche Zelllyse

wurde mit 5 x RIPA Lysepuffer (-SDS) durchgeführt. Hierbei wurde dieser Ansatz 30 min bei 4 °C rotierend inkubiert und anschließend 20 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen gegeben und es wurden ebenfalls Kontrollen des TL entnommen.

2.9.3 Bestimmung der Protein-Konzentration

Zur Optimierung der Immunpräzipitation (IP) wurde die Protein-Konzentration in den Zelllysaten sowie im Gehirnhomogenisat mittels des BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) determiniert. Die Lysate wurden unverdünnt sowie in 1:100 und 1:500 PBS-Verdünnungen in Duplikaten zur Messung eingesetzt. Nach Herstellerprotokoll wurde eine BSA-Standard-Verdünnungsreihe vorgelegt und die Absorption mittels Photometer Sunrise (Tecan) bei 562 nm von Standard und Proben auf einer 96-Loch-Platte ermittelt. Mithilfe der Software "SoftMax Pro 7" (Molecular Devices) wurde eine Standardkurve erstellt und die Protein-Konzentration der Proben errechnet. Im Folgenden konnte die für die IP eingesetzte Menge an Protein für die unterschiedlichen Proben aus Gehirn oder kultivierten Zellen angeglichen werden. Eine gleiche Verdünnung konnte ebenfalls für die TL-Kontrollen sichergestellt werden.

2.9.4 Immunpräzipitation (IP) mit Anti-PSD93 AK

Zur Konzentrierung von PSD93 aus dem Proteinlysat (2.9.1 und 2.9.2) nutzte ich die Möglichkeit einer IP mittels Anti-PSD93 AK (Abcam). Als Matrix verwendete ich Protein G Agarose (Thermo Fisher Scientific). Diese Protein G Agarose-Partikel (auch *Beads* genannt) koppeln sich an den AK und zusammen wird das zugehörige Antigen in dem Lysat gebunden. Nach Zentrifugation liegen die Antigen-Antikörper-Komplexe mit den Agarose-Partikeln am Boden des Zentrifugenröhrchens und überschüssiges Protein kann mit dem Überstand entfernt werden (Hauk, 2014).

Je Probe wurden 10 µl reine Protein G Agarose-Partikel verwendet, welche vorher 3 x mit 1 ml RIPA Lysepuffer (-SDS, + 0,1 % NP-40) gewaschen wurden und jeweils 1 min bei 1000 rpm und 4 °C zentrifugiert wurden. Vor der IP wurden jegliche Pufferreste von den Agarose-Partikeln abgenommen. Die Proteinlysate wurden mit angeglichener Protein-Konzentration für alle Proben auf die *Beads* gegeben und 3 µl des Anti-PSD93 AK wurden hinzugefügt. Gehirn-Lysate wurde 1:10 verdünnt eingesetzt und die IP wurde über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert. Die Immunpräzipitate wurden dreimal mit RIPA Lysepuffer und zuletzt einmal mit PBS (+ 0,1% NP-40) gewaschen. Zum Schluss wurden 30 µl Laemmli-Puffer (3 x) zugegeben und die Proben wurden 10 min bei 95 °C aufgekocht bevor sie bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert wurden.

2.9.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteine in den Totallysaten sowie in den Immunpräzipitaten wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ihrem Molekulargewicht nach aufgetrennt. Die negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe wandern entlang der angelegten elektrischen Spannung zur Anode. Kleinere Proteine wandern dabei schneller als große, da sie weniger in der Gelmatrix aufgehalten werden (Laemmli, 1970).

Die benötigten Gele (7 x 9 cm²) wurden selbst gegossen und bestanden im oberen Teil aus einem Sammelgel (ca. 2 ml) und im unteren Teil aus einem 10 %igen Trenngel (ca. 5 ml), die sich wie folgt zusammensetzten:

Gel	Bestandteil	Konzentration
Sammelgel	H ₂ O	61 % (v/v)
	1 M Tris/HCI [pH 6,8]	12,5 % (v/v)
	1 % SDS	10 % (v/v)
	30 % Acrylamid / 0,8 % Bis-Acrylamid	16,5 % (v/v)
	TEMED	2,5 µl/ml
	APS (40 %ig in H ₂ O)	2,5 µl/ml
Trenngel (10%)	H ₂ O	31,6 % (v/v)
	1,5 M Tris/HCI [pH 8,8]	25,1 % (v/v)
	1 % SDS	10 % (v/v)
	30 % Acrylamid / 0,8 % Bis-Acrylamid	33,3 % (v/v)
	TEMED	1,4 µl/ml
	APS (40 %ig in H ₂ O)	1,4 µl/ml

Tetramethylethylendiamin (TEMED) und 40%ige Ammoniumperoxodisulfat (APS)-Lösung in H₂O wurden zum Schluss zur Polymerisation dazugegeben.

Die Immunpräzipitate und Totallysate wurden vor der Elektrophorese aufgetaut und erneut 2 min bei 95 °C unter denaturierenden Bedingungen aufgekocht und 2 min bei 1000 rpm abzentrifugiert. Die Proben wurden in die vorher mit einem Kamm gefertigten Taschen gegeben und der restliche freie Platz in den Taschen mit PAGE-Puffer aufgefüllt. Ein Größenstandard wurde nach Herstellerangaben zum Vergleich mit den Proben in eine der Taschen aufgetragen. Die PAGE wurde mit einer Laufgeschwindigkeit von 70 V gestartet, solange sich das Material sichtbar im Bereich des Sammelgels befand und anschließend, im Bereich des Trenngels, mit 100 V fortgesetzt. Sobald das Bromphenolblau im Ladepuffer das untere Ende des Gels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt.

2.9.6 Western-Blot (WB)

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten und im Gel festgehaltenen Proteine wurden in einer Semi-Dry-Transferkammer elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose-Membran mit 0,45 µm Porengröße (Amersham[™]) übertragen. Im weiteren Verlauf sollten Proteine mithilfe spezifischer AK auf der Membran sichtbar gemacht werden, wozu der WB eine schnelle und einfache Methode darstellt (Burnette, 1981).

Hierzu wurden Filterpapiere und die Membran in Blotpuffer getränkt und in folgender Reihenfolge von unten nach oben mit dem Gel in die Transferkammer gelegt: $5 \times Filterpapier > Gel > Membran > 5 \times Filterpapier$. Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten wurden durch Rollen mit einem sterilen Zentrifugenröhrchen beseitigt. Der Proteintransfer wurde über 2 h bei 1 mA pro cm² durchgeführt.

Die freien Proteinbindungsstellen auf der Membran wurden anschließend für 1 h bei Raumtemperatur mit 5 % BSA in *Tris-buffered saline with Tween20* (TBS-T)-Puffer blockiert. Folgend konnte die Membran mit 5 % BSA in TBS-T und einem Primär-AK gegen PSD93 (Merck) über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert werden. Nach Entfernung der Primär-AK-Lösung wurde die Membran dreimal 10 min mit TBS-T gewaschen. Als Sekundär-AK wurde ein HRP (*Horse-Raddish-*Peroxidase)gekoppelter AK (Dianova) eingesetzt. Dieser wurde mit der Membran in TBS-T-Puffer 1 h bei Raumtemperatur rotierend inkubiert. Erneut wurde die Membran dreimal 10 min mit TBS-T gewaschen.

Zum Schluss wurden die Proteine mithilfe des ECL (*Enhanced chemiluminescence*) Prime Western Blotting Detektionsreagenz (GE Healthcare) sichtbar gemacht. Dieses wird als Substrat von der HRP umgesetzt und führt zu einer erhöhten Chemolumineszenz, die von einem Geldokumentationssystem (Intas) detektiert und dokumentiert wurde. Nach Zugabe des ECL-Reagenzes wurde dieses mit der Membran etwa 1 min inkubiert und die Membran anschließend belichtet. Zur genaueren Analyse wurden serielle Aufnahmen mit unterschiedlichen Belichtungsintervallen angefertigt. Anhand des aufgetragenen Protein-Größenstandards konnten die Protein-Bandenmuster differenziert werden. Für den Fall das weitere Proteine auf der Membran detektiert werden sollten, wurde die Membran durch Zugabe der Re-Blot Plus Lösung (Merck) nach Herstellerangaben von den gebundenen AK befreit und konnte erneut geblockt und mit Primär- und Sekundär-AK behandelt werden.

3 ERGEBNISSE

3.1 Abänderung der Gen-Nomenklatur nach Datenbankanalyse *in silico* für *Psd93*

3.1.1 Genomischer Lokus auf murinem Chromosom 7

Nach dem Genome Reference Consortium (GRC), einem Zusammenschluss verschiedener Institutionen der biotechnologischen Forschung, werden einzelnen Genen exakte Positionen auf den Chromosomen bzw. im gesamten Genom zugewiesen. Dies hat zur Folge, dass zur Beschreibung referenzierte Genloki verwendet werden können (Schneider & Church, 2013). Die Arbeiten mit Gendatenbanken in silico führte ich gemeinsam mit Dr. Shafagat Ali durch. Für unsere Analyse der Isoformen von Psd93 nutzten wir zwei Online-Datenbanken, die mit dem GRC arbeiten und Referenzsequenzen beschreiben: die Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene, letzter Aufruf vor Publikation: 23.09.2017) und die ENSEMBL-Datenbank (http://www.ensembl.org/index.html, letzter Aufruf vor Publikation 23.09.2017). Wir arbeiteten mit den Informationen zu Psd93, die nach der letzten größeren Veröffentlichung des GRC für das Mausgenom (GRCm38) zur Verfügung standen. Demnach befindet sich Psd93 auf Chromosom 7 des Mausgenoms (GRCm38:7). Im Weiteren unterscheiden sich jedoch die beiden Datenbanken bei der Menge an Isoformen und der Beschreibung der genauen Position im gesamten Genom.

NCBI zeigte (Stand: 23.09.2017) unter der Gen-Identifikation 23859 für *Psd93* bzw. *Dlg2* 27 Transkripte zwischen Position 90476180 und 92449246 im Mausgenom an. Drei dieser Transkripte sind als proteinkodierend bestätigt und u.a. in (Zhang et al., 2014) publiziert: Referenzsequenzen NM_001243046, NM_001243047 und NM_011807. Die anderen 24 Transkripte (X...-Isoformen) sind vorhergesagte Isoformen und werden mit XM_ und der entsprechenden Referenznummer aufgeführt (Tabelle 3.1). Eine reale Proteinkodierung ist laut Datenbank nicht bestätigt, jedoch möglich. Diese Vorhersage von mRNA-Transkripten wurde von der NCBI-Software "Gnomon" getätigt (Souvorov et al., 2010). Hierzu muss in den mRNA-Transkripten ein *open reading frame* (ORF) enthalten sein. Dies bedeutet, dass in dem Leserahmen (*reading frame*) der Basentripletts ein Startcodon und ein

Stoppcodon liegen. Zusätzlich gibt es für *Psd93* mit AK039754 einen weiteren Eintrag aus einer cDNA-Datenbank bei NCBI.

ENSEMBL beschrieb Psd93 (Stand: 23.09.2017) unter der Gen-Identifikation ENSMUSG00000052572. Für unser Alignment nutzten wir die vier als proteinkodierend ausgewiesenen Isoformen: NM 011807 (ENSMUST00000107196) und NM 001243046 (ENSMUST00000098308) sind zwei ebenfalls in der NCBI-Datenbank vorkommende referenzierte und Transkripte proteinkodierende Isoformen. Dazu kommen noch die ENSMUST00000074273 und ENSMUST00000107193, die aktuell keiner allgemein anwendbaren Referenzseguenz zugeordnet werden können. Außerdem werden weitere Transkripte ohne ORF, d.h. sie können auch nicht zur Proteinkodierung genutzt werden, sowie Transkriptvarianten mit intronischen Sequenzen, aufgeführt.

In der Zusammenschau der Datenbankeinträge entschieden wir uns für das Arbeiten mit den Sequenzen aus der NCBI-Datenbank und der ENSEMBL-Datenbank, um die maximal mögliche Datenbankinformation zu nutzen. Das für die Nomenklatur ausschlaggebende Alignment wurde am 23.09.2017 mithilfe der Software "Geneious" (Biomatters Limited, Auckland, NZL) erstellt. Es wurden alle Exons der in Tabelle 3.1 aufgeführten Transkriptvarianten einbezogen. Für eine detailliertere Aufführung von den Datenbanken entnommenen Exon-Sequenzen verweise ich auf den Anhang unserer Publikation (*Additional file* 3 in Ali et al., 2018).

Referenzsequenzen	Bemerkung	Start-Codon in
XM_006507776	L27-Domäne	β1
XM_006507777	L27-Domäne	β1
XM_006507767	L27-Domäne	β1
XM_006507771	L27-Domäne	β1
XM_006507770	L27-Domäne	β1
XM_006507772	L27-Domäne	β1
XM_006507773	L27-Domäne	β1
XM_006507768	L27-Domäne	β2
XM_006507769	L27-Domäne	β2
XM_006507779	Palmitoylierungsstelle	α ₀
XM_006507784	Palmitoylierungsstelle	α1
XM_006507783	Palmitoylierungsstelle	α1
ENSMUST0000074273	Palmitoylierungsstelle	α1
NM_011807	Palmitoylierungsstelle	α1
ENSMUST00000107196	Palmitoylierungsstelle	α1
XM_006507781	Palmitoylierungsstelle	α2
XM_017322227	Palmitoylierungsstelle	α2
XM_006507782	Palmitoylierungsstelle	α2
XM_006507786		3
XM_006507778	potenzielle Palmitoylierungsstelle	δ
XM_006507780	potenzielle Palmitoylierungsstelle	δ
ENSMUST00000107193	spleißt auf Exon 6	γ (γ1)
XM_006507785	spleißt auf Exon 6	γ (γ1)
XM_011241786	lässt Exon 6 aus, auch: γ₂-Start	γ (γ2)
NM_001243046	nicht-kodierend in ζ_a , kodierend ab ζ_b	ζb
ENSMUST0000098308	nicht-kodierend in ζ_a , kodierend ab ζ_b	ζb
XM_006507789	η1, nicht-kodierend, Translation ab Exon 17	17
XM_006507788	η1, nicht-kodierend, Translation ab Exon 17	17
XM_006507790	η1, nicht-kodierend, Translation ab Exon 17	17
XM_006507787	η2, nicht-kodierend, Translation ab Exon 17	17
NM_001243047	η2, nicht-kodierend, Translation ab Exon 17	17
AK039754	η2, nicht-kodierend, Translation ab Exon 17	17

Tabelle 3.1 Referenzsed	uenzen für Psd93-	Transkripte aus	Datenbanken
-------------------------	-------------------	-----------------	-------------

Im Vorfeld unseres in silico Alignments kam es (Stand: 22.06.2016) in der Datenbank zu kleineren Anpassungen. Seitdem und bis zum Stand vom 23.09.2017 enthielt beispielsweise die NCBI-Datenbank die 27 Transkripte. Die im Vorfeld entfernten Transkripte sind XM 006507774 und -5, die mit den Start-Exons β3 und β₄ begonnen. Diese Exons befinden sich daher nicht mehr in unserer Nomenklatur. In der Spalte "Bemerkung" in Tabelle 3.1 sind die zu den jeweiligen Transkripten assoziierten Domänenstrukturen aufgeführt. Eine wichtige Neuerung unseres Vorschlages besteht u.a. bei Transkript XM_006507779, welches aufgrund seines Palmitoylierungsmotives als Start-Exon mit α₀ bezeichnet wurde. Ursprünglich war die Benennung β_5 . Außerdem konnte, wie bereits von (Parker et al., 2004) beschrieben, eine Palmitoylierungsmöglichkeit in den mit δ-startenden Transkriptvarianten ausgemacht werden. Dennoch blieb aber hier die Konvention, die Start-Exons δ zu nennen, bestehen.

Trotz des Datenbankupdates änderten sich unsere gewählten Primer nicht, weshalb sie weiterhin zur Detektion aller N-terminalen Isoformen verwendet werden konnten.

3.1.2 Die veränderte Nomenklatur von *Psd93*-Isoformen erhält mit ζ und η zwei neue N-terminale Starts

Aus dem *in silico* Alignment generierten wir eine Übersicht über alle Exons von *Psd93*-Isoformen (vergrößerte Darstellung im Anhang).



Abb. 3.1 Nomenklatur von *Psd93*-Isoformen

Psd93 besitzt 12 verschiedene N-terminale Start-Exons und 28 allgemeine Exons. In einigen Regionen kann alternativ gespleißt werden (gezeigt durch alternative Verbindungen).
Oben: Darstellung der skalierten Exon-Struktur (Kästen) von *Psd93* Transkripten: Introns sind nicht gezeigt und die Abstände zwischen den Exons nicht skaliert, Spleißverbindungen (Linien), Translationsstart (Pfeile), allgemeine Exons (arabische Zahlen), N-terminale Starts (griechische Kleinbuchstaben) sind verzeichnet.
Unten: Zoom auf die SH3-GK-Linker Region, Region alternativen Spleißens.
bp = Basenpaare; kb = Kilobasenpaare
5'- bzw. 3'-UTR
Proteinkodierender Bereich

Für die N-terminale Region orientierten wir uns an den von Kruger *et al.* bereits genutzten Termini (Kruger et al., 2013). Diese sechs N-terminalen Spleißvarianten wurden erstmalig von Parker *et al.* in autonomen Ganglienzellen beschrieben (Parker et al., 2004). N-terminale Start-Exons werden demnach als griechische Kleinbuchstaben gekennzeichnet, und alle anderen Exons sind in arabischen Ziffern durchnummeriert. In der Nomenklatur von Kruger *et al.* wurden die L27-Domäne enthaltenen N-terminalen Starts als β und die ein Palmitoylierungs-Motiv enthaltenden Starts α_1 und α_2 benannt. Im Gegensatz zu Kruger *et al.* konnten zwei unterschiedliche β -Isoformen (β_1 und β_2) gefunden werden (Abb. 3.1). Besonders ist die Darstellung des N-terminalen Starts für α_0 , welches eigentlich zu den β -Isoformen gezählt wurde. Für das Transkript (XM_006507779) wurde zwar keine L27-Domäne, jedoch ein Palmitoylierungsmotiv nachgewiesen, weshalb es folgend als α_0 in die Nomenklatur eingefügt wurde (Abb. 3.1). Abgedeckt durch unser

Primer-Design wurde dieser N-terminale Start durch einen gemeinsamen Primer in Exon 4 für *Psd93* β_1 , β_2 und α_0 . Die 5⁻ bzw. 3⁻-UTRs sind als weiß gefüllte und proteinkodierende Bereiche als grau gefüllte Kästen dargestellt. Exons sind über Linien verbunden, während die dazwischenliegenden Introns nicht aufgeführt sind. Zusätzliche Linien zwischen Exons verweisen auf alternative Spleißmöglichkeiten, was z.B. für den N-terminalen Start von β oder y bedeutsam ist, da β1 sowohl auf das allgemeine Exon 1 als auch Exon β₂ gespleißt werden kann. Translatiert wird einzig der Start von Exon β_2 (XM 006507768). Die y₁-Variante spleißt auf das Exon 6, während das gleiche y-Start-Exon auch auf Exon 7 spleißen kann, was die ebenfalls bereits beschriebene y₂-Variante ergibt (Kruger et al., 2013). Weitere bereits geführte N-terminale Exons sind δ und ε . Wir fügten außerdem zusätzliche, neue Starts ein: zum einen ζ_a und ζ_b , die zuerst aneinander und folgend an Exon 15 gespleißt werden, während ζ_a nicht-kodierend ist. Zum anderen η_1 und η_2 , die beide ausschließlich aus UTR bestehen und deren ORF im folgenden Exon 17 beginnt. Mit ζ_a und ζ_b fanden wir den Start des bereits bestätigten Transkripts NM 001243046. n1 dient als möglicher Start für die vorhergesagten Varianten XM 006507788; -89; -90, während n₂ sowohl einen Start einer vorhergesagten Variante (XM 006507787), als auch eines bereits bestätigten Transkripts (NM 001243047) darstellt. Zudem passt auch das Transkript AK039754 zu n2 (Tabelle 3.2).

Zusammengefasst heißt dies für unsere Vorgehensweise, dass wir zwei von Kruger *et al.* nicht beschriebene N-terminale Isoformen von *Psd93* in die Nomenklatur integriert haben, welche sich u.a. bereits bestätigten proteinkodierenden Sequenzen zuordnen lassen (Kruger et al., 2013). Insgesamt ergeben sich aus drei α -, zwei β -, einem γ -, δ - und ϵ - sowie den jeweils zwei ζ - und η -Exons 12 unterschiedliche N-terminale Starts für *Psd93*-Transkripte. 28 weitere Exons können an einzelne, mehrere oder alle N-terminalen Isoformen gespleißt werden, und Exon 28 enthält den 3´-UTR. In Anbetracht dieser unterschiedlichen N-Termini ergeben sich in ihrer Länge erheblich variierende mRNAs. Das bestätigte Transkript NM_011807 z.B. ist 7409 bp lang, wogegen z.B. NM_001243047 mit 5933 bp deutlich kürzer ist. Wenn auf den ersten Blick die Unterschiede in der Größe nicht gravierend wirken, muss festgestellt werden, dass ein Großteil der "kurzen" Isoformen, wie wir ζ und η auch nennen, auf die 3´-UTR mit Exon 28 entfallen (Abb. 3.1). Somit kommt der Größenunterschied also vorrangig im proteinkodierenden Bereich zustande.

Diese Nomenklatur wird im Folgenden dazu genutzt, zu zeigen, wie die *Psd93*-Expression in unserem gewählten biologischen System, den DCs sowie den BMDMs im Detail ausgeprägt ist. Wie auch Kruger *et al.* gingen wir auf unterschiedliches Spleißverhalten in zwei Kernregionen ein: den N-terminalen Starts sowie in der SH3-GK-Linker Region, die von den Exons 19 bis 23 kodiert wird.

3.2 Differenzielle Expression von *Psd93 in vitro* in IFNβ/YFP⁺ pDCs

In vorausgegangenen Experimenten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass *Psd93* nach einer 6 h-Stimulation mit dem TLR9-Liganden CpG 1668 (Klasse B) in *ex vivo*-sortierten YFP⁺ pDCs der Milz von IFNβ-Reportermäusen bis zu 150-fach höher exprimiert ist als in YFP⁻ pDCs (Dress, 2015, Dissertation). Für die etablierte Flt3L-Kultur für DCs wurde eine Stimulation über 6 h mit CpG 2216 (Klasse A) genutzt. Anschließend wurde die Expression in den sortierten KM-differenzierten Zellen analysiert.

Zur Quantifizierung der *Psd93*-Expression aller Isoformen wurde ein Primerpaar benutzt, das in allen in der Datenbank enthaltenden Transkripten an Sequenzen bindet. Der Primer *Psd93* Real-Time fwd liegt in Exon 17 und 18 und der zugehörige rev Primer in Exon 18. Alle bekannten N-terminalen Isoformen werden mit dem gewählten Primerdesign abgedeckt (Abb. 3.2).



Abb. 3.2 Nomenklatur *Psd93* inklusive Real-Time Primer

Exon 17 und 18 werden von allen bekannten Transkripten genutzt, weshalb das gezeigte Primer-Design zur Detektion aller bekannten *Psd93*-Isoformen genutzt werden kann.

kb = Kilobasenpaare

Real-Time Primer

3.2.1 CpG 2216-Titration zur Standardisierung der TLR9-Stimulation

Vor Durchführung der Zellsortierung für IFNB/YFP⁺ und IFNB/YFP⁻ DCs wurden optimale Stimulationsbedingungen etabliert. Hierzu wurden Flt3L-Kulturen aus WT-Mäusen mit unterschiedlichen Konzentrationen CpG 2216 von 0,25 µM bis 8 µM komplexiert mit DOTAP stimuliert. Nachfolgend wurden pDCs und cDCs (nicht gezeigt) sortiert und die mRNA-Expression von Psd93 und Ifnb in den Zellen analysiert (Abb. 3.3). Für die angestrebte Stimulation von Flt3L-Kulturen aus IFNβ-Reportermäusen wurde die Konzentration mit der höchsten Psd93-Expression gesucht. Dies war in zwei voneinander unabhängigen Versuchen bei 0,5 µM der Fall. Zusätzlich konnte bei dieser Konzentration eine starke Ifnb-Expression, mit etwa 1200-facher Steigerung zum unstimulierten Zustand, beobachtet werden. Aufgrund dessen wurde als Standardstimulation für die Zellsortierungen der IFNβ-Reportermäuse CpG 2216 in einer finalen Konzentration von 0,5 µM in der Flt3L-Kultur eingestzt. Die vergleichsweise geringe Steigerung der *Psd93*-Expression im stimulierten Zustand (3 x) erklärt sich aus der Sortierung von pDCs aus WT-Mäusen und nicht YFP⁺ pDCs aus IFNβ-Reportermäusen. Dort ist die differenzielle Expression im Vergleich mit YFP⁻ pDCs größer (vgl. Abb. 3.4).



Abb. 3.3 Titration von CpG 2216

Die stärkste *Psd93*- und *Ifnb*-Expression in CpG 2216-stimulierten pDCs ergab sich bei einer CpG-Konzentration von 0,5 µM und wurde folgend als Standardkonzentration genutzt.

Gezeigt ist die Expressionsänderung von *Psd93* und *Ifnb* in FACS-sortierten pDCs nach titrierter Stimulation von Flt3L-Kulturen mit CpG 2216 komplexiert mit DOTAP über 6 h. Es wurde jeweils in Triplikaten auf β -Aktin normalisiert und die unstimulierten Proben (0 μ M) als interne Referenz genutzt (Expression gleich 1). Die hier gezeigten Daten sind repräsentativ für zwei voneinander unabhängige Experimente.

3.2.2 Signifikant differenzielle Expression von *Psd93* in YFP⁺ pDCs, jedoch nicht in YFP⁺ cDCs im Vergleich zu YFP⁻ DCs

Es konnte in drei voneinander unabhängigen Experimenten gezeigt werden, dass die Expression von *Psd93* in YFP⁺ pDCs im Vergleich zu YFP⁻ pDCs in IFNβ-Reportermäusen signifikant (**p<0,01) erhöht ist [Abb. 3.4 (A)]. Dieser Unterschied ließ sich in den ebenfalls aus Flt3L-Kulturen FACS-sortierten YFP⁺ und YFP⁻ cDCs in drei Experimenten nicht als signifikant detektieren. Die *Ifnb*-Expression der sortierten DC-Populationen ergab für pDCs eine hoch signifikante unterschiedliche Expression (***p<0,001) [Abb. 3.4 (B)]. Aufgrund dieser Beobachtungen resultierte für die Suche nach *Psd93*-Isoformen die Annahme, dass die höchste Expression in YFP⁺ pDCs zu erwarten war.

Bezogen auf vorangegangene Experimente mit *ex vivo*-sortierten pDCs aus der Milz konnte gezeigt werden, dass sich die differenzielle Expression von *Psd93* auch *in vitro* in stimulierten Flt3L-Kulturen reproduzieren lässt. Dies traf jedoch nur auf pDCs, nicht aber auf cDCs zu.



Abb. 3.4 Differenzielle Expression von *Psd93* in IFNβ/YFP⁺ pDCs

(A) *Psd93*-Expression in YFP^{+/-} pDCs und cDCs: Eine signifikante differenzielle Expression von *Psd93* zeigte sich nur in YFP⁺ pDCs im Vergleich mit YFP⁻ pDCs, nicht in YFP^{+/-} cDCs.
(B) *Ifnb*-Expression in YFP^{+/-} pDCs und cDCs: Mit CpG 2216 stimulierte YFP⁺ pDCs exprimierten *Ifnb* hoch signifikant unterschiedlich im Vergleich mit YFP⁻ pDCs. Dies galt nicht für YFP⁺ cDCs.

Dargestellt sind Daten aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit Zellen aus jeweils sechs gepoolten IFN β -Reportermäusen. Stimulation der Flt3L-Kulturen für 6 h mit 0,5 μ M CpG 2216. Es wurde auf β -Aktin normalisiert und die YFP⁻ cDCs als interner Kalibrator verwendet. Deren Expression wurde in (A) und (B) gleich eins gesetzt. Statistischer Test: Two-way ANOVA gefolgt von Bonferroni-Posttests. Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. ns = p > 0,05; * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001

3.3 Nachweis von *Psd93*γ in pDCs und cDCs durch RT PCR der N-terminalen *Psd93*-Isoformen

Die meisten N-terminalen Isoformen konnten für DCs und insbesondere IFNβproduzierende pDCs nicht nachgewiesen werden. Die Begriffe Transkript, Isoform und Variante werden, wenn nicht durch Voranstellung von z.B. "Protein-" gekennzeichnet, in 0 bis 3.5 synonym zur Beschreibung von mRNA-Sequenzen verwendet, die mit RT-PCR differenziert wurden.

3.3.1 α₁-PCR repräsentativ für nicht amplifizierte Isoformen

Im Folgenden werden beispielhaft für alle anderen N-terminalen Isoformen, die sich aus der gewonnenen cDNA der DC-Kulturen nicht amplifizieren ließen, zwei Ansätze der α_1 -PCR gezeigt. Die PCR wurde mit den Primern *Psd93* α_1 fwd und *Psd93* rev durchgeführt. Die Temperatur zur Primerhybridisierung betrug 61 °C. Anders als in Kruger *et al.* beschrieben, wurde bei dem Material aus Gehirnen von C57BL/6N nicht nach einzelnen Hirnarealen differenziert (Kruger et al., 2013). Es wurde RNA aus gesamten Gehirnen extrahiert. Weder in pDCs noch in cDCs aus WT-Kontrollen konnte die α_1 -Isoform amplifiziert werden [Abb. 3.5 (A)]. Auch eine Expression nach Stimulation wurde nicht beobachtet. Jedoch zeigte sich in den Gehirnproben eine spezifische Amplifikation für α_1 bei der kalkulierten Bandengröße von 1060 bp.



Abb. 3.5 Psd93a1-PCR

(A) $Psd93\alpha_1$ in Flt3L-kultivierten pDCs und cDCs von C57BL/6N Mäusen: Keine Expression von $Psd93\alpha_1$ in stimulierten pDCs und cDCs. (B) $Psd93\alpha_1$ in pDCs von IFN $\beta^{mob/mob}$ und PSD93^{-/-} Mäusen: Ebenfalls keine Expression von $Psd93\alpha_1$ in YFP^{+/-} pDCs.

(st = stimuliert, ust = unstimuliert, -ve = H_2O) Stimulation mit 0,5 μ M CpG 2216 + DOTAP über 6 h

In einem zweiten Ansatz wollte ich die Ergebnisse aus den WT-Mäusen mit sortiertem Material aus IFNB-Reportermäusen kontrollieren. Aufgrund der Vorarbeiten erwartete ich in den IFN^{β+} Zellen eine erhöhte Expression von Psd93 und dessen Isoformen. Erst nach Begutachtung der Resultate aus diesen Zellen würde ich zu dem Schluss kommen, dass eine Isoform in den Zellpopulationen nicht vorkommt. Zudem nutzte ich PSD93^{-/-} Mäuse und heterozygote (+/-) Individuen um weiteres Verständnis dieser KO-Maus zu erlangen. Dargestellt wird diese Situation für die α1-PCR in Flt3L-kultivierten pDCs in [Abb. 3.5 (B)]. Zusätzlich ergab sich für pDCs und cDCs (nicht gezeigt) keine spezifische Amplifikation der α_1 -Isoform. In der Gehirnkontrolle konnte die spezifische Bande gezeigt werden, sowie eine weitere schwache Bande von etwa 1000 bp, die durch alternatives Spleißen erklärt werden könnte, aber für uns in dieser Konstellation nicht von weiterem Interesse war. Vergleichbare Ergebnisse beobachtete ich für die N-terminalen PCR-Reaktionen von α_2 , α_0/β , δ , ϵ und den der Nomenklatur hinzugefügten ζ und η Isoformen (nicht gezeigt). Für all diese Isoformen konnte eine spezifische Amplifikation in den Gehirnproben beobachtet werden. Es wurde wie an dieser Stelle für α_1 beschrieben vorgegangen.

3.3.2 γ-Isoform als bestimmende N-terminale Variante und alternatives Spleißen innerhalb dieser Isoform

Im Gegensatz zu den nicht-amplifizierten N-terminalen Isoformen ließ sich mit der γ-PCR eine spezifische Amplifikation erzielen (Abb. 3.6). Diese PCR wurde mit 65 °C zur Primerhybridisierung und den beiden Primern *Psd93* γ fwd und γ rev durchgeführt. Die kalkulierte Größe eines Produktes ohne alternatives Spleißen lag bei 1036 bp (γ₁ oder XM_006507785). Im bereits beschriebenen Ansatz mit Material aus C57BL/6N und sortierten pDCs/cDCs ließen sich in DCs, v.a. pDCs, insgesamt drei Banden abgrenzen [Abb. 3.6 (A)]. Die oberste Bande lag dabei etwas über 1000 bp und konnte somit die gesuchte γ₁-Isoform darstellen. Bestätigt wurde dies nach Aufreinigung des aus dem Gel geschnittenen PCR-Produktes über eine Sequenzierung. Die mittels NCBI *Nucleotide* BLAST® ermittelte Übereinstimmung der sequenzierten und der Referenzsequenz XM_006507785 lag bei über 99 % (Stand: 23.09.2015). Eine weitere Bande von etwa 1000 bp und eine noch etwas kleinere Bande von etwa 900 bp konnten mit dieser Methodik, d.h. der Aufreinigung und direkten Sequenzierung nicht bestimmt werden, da die gewonnene DNA-Konzentration für eine erfolgreiche Sequenzierung zu gering war.

Die obere Bande in pDCs und cDCs weist die stärkste Intensität auf [Abb. 3.6 (A)]. Die mittlere läuft sehr nah an dieser oberen Bande. Im direkten Vergleich zwischen pDCs und cDCs fällt auf, dass die Amplifikation dieser γ -Isoform in den pDCs stärker ist als in den cDCs. Es sind auch in den cDCs alle drei Banden sichtbar, wenn auch die beiden kleineren eine geringe Intensität ausweisen. In den Gehirnproben sah ich vorrangig nur die obere Bande, wenn auch nur mit schwacher Intensität im Vergleich zur Amplifikation von α_1 in mRNA aus dem Gehirn (Abb. 3.5).



Abb. 3.6 *Psd93*γ PCR

(A) *Psd93*γ in Flt3L-kultivierten pDCs und cDCs von C57BL/6N Mäusen: Eine *Psd93*γ Expression wurde in pDCs, jedoch auch in cDCs detektiert. Es zeigen sich konsistent drei Banden, wovon die oberste die stärkste Intensität im Gel aufweist.
(B) *Psd93*γ Expression in pDCs von IFNβ^{mob/mob} und PSD93^{-/-} Mäusen: Starke Expression von *Psd93*γ in YFP⁺ pDCs. Zusätzlich zeigt sich eine erhöhte Intensität in dem jeweils stimulierten Material im Vergleich zu unstimulierten Proben (z.B. PSD93^{+/+}). Auch in pDC-Proben aus PSD93^{-/-} Mäusen sind konsistent drei Banden von schwacher Intensität und jeweils etwa 150-200 bp unter den Banden aus den Proben von PSD93^{+/+} Mäusen erkennbar.
(st = stimuliert, ust = unstimuliert, -ve = H₂O) Stimulation mit 0,5 µM CpG 2216 + DOTAP über 6 h

Abb. 3.6 (B) liefert weitere Informationen zur Amplifikation von γ-Isoformen in IFNβ-Reportermäusen und PSD93^{-/-} Individuen. Gezeigt sind lediglich sortierte pDCs für die unterschiedlichen PSD93-Genotypen sowie die YFP⁺ oder YFP⁻ pDCs nach Stimulation. Zudem sind erneut drei Banden von gleicher Größe wie in den DCs aus Abb. 3.6 (A) erkennbar. Die stärkste Amplifikation liefert das Material aus den IFNβproduzierenden pDCs. Dort ist die Amplifikation für die obere Bande so stark, dass sie sich kaum von der mittleren abgrenzen lässt. In den pDC-Proben aus PSD93^{+/+} Mäusen ist ein vermeintlicher Stimulationseffekt auf die γ-Expression sichtbar, ähnlich wie in den für PSD93^{+/-} Merkmalsträgern. In den pDC-Proben aus der PSD93^{-/-} Maus zeigen sich ebenfalls drei Banden in ähnlichem Abstand zueinander wie in den anderen Exemplaren. Jedoch laufen diese Banden etwa 150-200 bp unter den anderen Genotypen. Dies verdeutlicht, wie (McGee et al., 2001b) diese KO-Maus generierten: es wurde ein Exon von 170 bp Größe entfernt, weshalb keine Translation der mRNA zu Protein erfolgen konnte. Dieses Exon entspricht Exon 9

Ergebnisse

unserer Nomenklatur (vgl. Abb. 3.1). Mit dem Ziel entworfen die "langen" Isoformen wie z.B. α und β auszuknocken, ist es aber weiterhin auf mRNA-Ebene möglich, Transkripte zu erzeugen, die als Spleißvarianten Exon 9 auslassen. Dieses Phänomen könnte in der Amplifikation von drei Transkripten in der γ -PCR von PSD93^{-/-} Individuen gesehen werden, jedoch erfolgte hier keine Spezifitätskontrolle mittels Sequenzierung, weshalb es sich auch um unspezifische Banden handeln könnte. Eine Amplifikation in Gehirnproben ließ sich hier nicht beobachten, wird aber in Kapitel 3.3.3 noch einmal aufgegriffen. In cDCs resultierte ebenfalls eine deutlich stärkere Amplifikation von *Psd93* in den YFP⁺ cDCs verglichen mit YFP⁻ cDCs (nicht gezeigt).

Im Verlauf galt es noch die genaue Sequenz der beiden unteren Banden der γ-PCR in pDCs zu bestimmen, die mit der Sequenzierung ohne vorherige Vervielfältigung mittels Klonierung nicht in ausreichender Konzentration im Gel-Eluat vorlagen. Dazu wurden die drei Banden von YFP⁺ pDCs aus dem Gel ausgeschnitten, um die Materialausbeute zu erhöhen und anschließend nach Aufreinigung kloniert. Nach Sequenzierung mithilfe der Universal-Primer M13fwd-20 und M13rev bei Beckman Coulter Genomics wurden die entstandenen Einzelsequenzen mit der Software "Geneious" zu einer Konsenssequenz zusammengefügt. Für die sequenzierten Klone der oberen Bande (PS1-1 und PS1-2) sowie die ausgewählten Klone der unteren Bande (PS3-3, PS3-4 und PS3-7) ergab sich nach Suche in NCBI *Nucleotide* BLAST® (Stand: 09.12.2015) folgendes Resultat (Tabelle 3.2):

Klone	Konsenssequenz (NCBI Nucleotide BLAST)				
PS1-1	1036 bp 100 % Übereinstimmung XM_006507785 (γ1)				
PS1-2	1036 bp mehr als 99 % (1032/1036bp) Übereinstimmung XM_006507785 (γ1)				
PS3-3	866 bp vgl. XM_006507785 fehlen 170 bp (entsprechend Exon 9)				
PS3-4	880 bp vgl. XM_006507785 fehlen 156 bp (entsprechend Exon 13)				
PS3-7	865 bp vgl. XM_006507785 fehlen 170 bp (entsprechend Exon 9)				

Taballa	2 2	Kloniorung	dor	DCP_Drodukto	
labelle	J.Z	Riomerung	uer	PCh-Flouukle	aus y-run

Die Klone der oberen Bande (PS1-1 und -2) bestätigten das bereits ohne Klonierung erfolgreiche Sequenzieren der γ_1 -Isoform (XM_006507785). Für die untere Bande ergab sich ein gemischtes Bild. Zwei Klone (PS3-3 und -7) waren mit 866 bzw. 865 bp etwa gleich groß und beiden fehlte das Exon 9. Diese Konstellation entspräche ebenfalls der in den PSD93^{-/-} Individuen gezeigten mRNA, die durch

alternatives Spleißen Exon 9 auslässt (McGee et al., 2001b). Der Klon PS3-4 hingegen präsentierte ein anderes Spleißverhalten, bei dem verglichen mit XM_006507785 das Exon 13 mit einer Größe von 156 bp fehlte. Es liegt also nicht nur eine alternative Nutzung für *Psd93*-N-Termini zugrunde, sondern es werden auch innerhalb der γ -Isoform einzelne Exons rausgespleißt (Abb. 3.7).



Abb. 3.7 Klonierte Sequenzen aus γ-PCR von IFNβ/YFP⁺ pDCs

Darstellung der Exon-Sequenzen der klonierten PCR-Amplifikate: Innerhalb der γ -Isoform von *Psd93* gibt es alternatives Spleißen, das wie gezeigt stattfindet.

Primer der PCR für γ-N-Terminus

Als problematisch gestaltete sich die Klonierung und Sequenzierung der mittleren Bande. Es kann jedoch nach Auswertung der Sequenzen durch Vergleich mit NCBI *Nucleotide* BLAST® mit hoher Sicherheit gesagt werden, dass es sich um ein *Psd93*-Transkript handelt. Auch nach mehreren Versuchsansätzen konnte dieses PCR-Produkt nicht in ausreichendem Ausmaß kloniert werden, um es erfolgreich zu sequenzieren. Hierzu wurde u.a. die Klonierung um eine Blau-Weiß-Selektion erweitert, um die Ausbeute an plasmidenthaltenden Klonen zu steigern. Da sich die obere Bande trotz maximaler Laufzeit kaum von der mittleren Bande separieren ließ, spekuliere ich in diesem Kontext auf eine veränderte Struktur der oberen Bande im Gel, die dann als mittlere Bande läuft (Abb. 3.6).

3.3.3 Übersicht des N-Terminus von *Psd93* in YFP⁺ pDCs

Abschließend wurde eine Übersichtsdarstellung über alle angefertigten Nterminalen PCR-Produkte erstellt [Abb. 3.8 (A)]. Wie bereits beschrieben, ließ sich mit unserem Primer-Design lediglich die γ -Isoform in DCs reproduzierbar amplifizieren [Abb. 3.8 (A) oberes Panel]. In den hier gezeigten PCR-Ergebnissen ist auch eine deutliche Amplifikation der γ -Isoform in Gehirnproben zu sehen. Für alle anderen N-Termini ist die spezifische Amplifikation in unstimulierten Gehirnproben gezeigt, d.h. hier werden auch die beiden in die Nomenklatur eingefügten ζ - und η -Isoformen verifiziert. Hier erreichte ich eine spezifische Amplifikation mit unseren Primern aber nur für jeweils das Exon ζ_b und η_2 . Ein semiquantitativer Vergleich der einzelnen Isoformen im Gehirn verbietet sich, da die beiden in Abb. 3.8 (A) oben und unten dargestellten PCR-Produkte aus einer anderen Menge cDNA-Ausgangsmaterial amplifiziert und unterschiedlich lange belichtet wurden. Ein solcher Vergleich wäre lediglich innerhalb des oberen und unteren Panels zulässig.



Abb. 3.8 Zusammenfassung N-terminale Isoformen von Psd93

(A) N-terminale Isoformen-PCR: Lediglich *Psd93* γ wird in YFP⁺ pDCs amplifiziert. Die der Nomenklatur hinzugefügten Isoformen ζ und η lassen sich in Gehirnproben amplifizieren. Eingesetzte cDNA für pDCs im oberen Panel bei 25 ng, im unteren bei 50 ng je PCR-Reaktion. Gehirnproben (C57BL/6N) als Kontrolle, oberes Panel 25 ng cDNA eingesetzt, im unteren Panel 200 ng. -ve = untranskribierte RNA aus YFP⁻ pDCs, 25 ng RNA genutzt.

(B) Links: RT-PCR für das *housekeeping*-Gen *Gapdh*, rechts: RT-PCR für *Ifnb* Eingesetzte cDNA jeweils für pDCs und Gehirnproben (C57BL/6N) 10 ng. -ve = untranskribierte RNA aus YFP⁻ pDCs, 10 ng RNA eingesetzt.

Das für die Quantifizierung aber auch die Isoformen-PCR eingesetzte Material kontrollierte ich hinsichtlich der Expression des *housekeeping*-Gens *Gapdh* [Abb. 3.8 (B) links]. Für *Gapdh* ergab sich stets eine spezifische Amplifikation von 235 bp. Für *Ifnb* demonstriert Abb. 3.8 (B) rechts ein spezifisches PCR-Produkt von 372 bp in YFP⁺ pDCs. Ebenfalls erscheint eine schwache Bande in den YFP⁻ pDCs. Hier muss in Betracht gezogen werden, dass diese pDCs alle stimuliert wurden und auch eine Hintergrund-Expression von IFNβ nach dem Sortieren bestehen mag.

Bedenken möge man dabei auch solche Zellen, die zum Zeitpunkt des Sortierens noch im Ausreifungsprozess begriffen sind.

3.4 Abweichendes Spleißmuster des SH3-GK-Linkers von *Psd93* in DCs

3.4.1 Übersicht des PCR-Designs

Die SH3-GK-Linker Region wird von den Exons 19 bis 23 kodiert, und in diesem Bereich konnte bereits alternatives Spleißen festgestellt werden. Aus den Untersuchungen in den Neurowissenschaften ergaben sich hierzu einige Konventionen: Exon 18 und 19 wurden immer aneinander gespleißt, d.h. wenn Exon 18 in einem Transkript enthalten war, war auch Exon 19 präsent. Zudem wurde belegt, dass Exon 20 und 21 einander ausschließend gespleißt wurden, was bedeutet, dass Transkripte mit Exon 20 kein folgendes Exon 21 enthalten. Daraus folgend kann Exon 22 entweder an Exon 20 oder an Exon 21 gespleißt werden (Kruger et al., 2013).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das in Neuronen festgestellte Spleißverhalten auch in DCs mithilfe von fwd Primern in den Exons 18 bis 21 und rev Primern in den Exons 20 bis 23 überprüft werden.

3.4.2 Vergleich der Unterschiede in der Linker-Sequenz von DCs mit Gehirnproben

Mithilfe der acht soeben erwähnten Primer und diversen möglichen Kombinationen konnte gezeigt werden, dass ein abweichendes Spleißverhalten in DCs im Vergleich zu Gehirnproben vorliegt. In Abb. 3.9 wird mit drei charakteristischen PCR-Ansätzen aufgezeigt, wie dieses alternative Spleißen aussieht.

Abb. 3.9 (A) zeigt die Ergebnisse einer PCR, die mit Primern in den Exons 18 und 23, die die gesamte variable Region einschließen, durchgeführt wurde. Dies fungierte als Screening auf mögliche Spleißvarianten in DCs. Für die Gehirnproben ergaben sich drei Banden mit einer ungefähren Größe von 250 bp. Diese Banden entsprechen den kalkulierten Exon-Kombinationen 18-19-21-23 (226 bp), 18-19-21-22-23 (268 bp) und 18-19-20-23 (280 bp). Die Intensität des kleinsten der drei PCR-Produkte erscheint im Gehirn am stärksten. Dieses Ergebnis deckt sich mit Beobachtungen von Kruger *et al.* (Kruger et al., 2013). Für die DC-Proben ergab
sich lediglich eine Bande, die sich auf Höhe der oberen Bande der Gehirnprobe befindet. Dies entspricht der Exon-Kombination 18-19-20-23. Die Amplifikation erscheint in den YFP⁺ pDCs stärker als in den YFP⁻ pDCs. Ebenfalls gilt dies für pDCs im Vergleich mit cDCs aus PSD93^{+/+} Mäusen. Im Screening wurde also lediglich eine Spleißmöglichkeit gefunden. Nach Ausschneiden der Bande aus Proben von YFP⁺ pDCs wurde durch Sequenzieren des PCR-Produktes die Annahme bestätigt, dass es sich um die Exon-Kombination 18-19-20-23 handelte. Eine Konsenssequenz von 274 bp ergab dieses Resultat nach Suche in NCBI *Nucleotide* BLAST® (Stand: 29.07.2016). Ob wirklich nur eine Möglichkeit alternativen Spleißens in der Region existiert oder dieser PCR-Ansatz diese eine Form favorisierte, wurde anschließend mit weiteren PCRs innerhalb der SH3-GK-Linker Region verifiziert.



Abb. 3.9 SH3-GK-Linker von Psd93 in pDCs und cDCs

Darstellung der Sequenz des SH3-GK-Linkers mit unterschiedlichen Primer-Kombinationen: In Transkripten aus pDCs und cDCs kommen lediglich die Exons 18-19-20 und 23 vor. Exon 21 und 22 fehlen.

(st = stimuliert, ust = unstimuliert) Stimulation mit 0,5 μ M CpG 2216 + DOTAP über 6 h

cDNA-Ausgangsmenge von 25 ng für pDCs, -ve = H_2O

(A) Primer fwd Exon 18, Primer rev Exon 23, Primerhybridisierung bei 58 °C

(B) Primer fwd Exon 18, Primer rev Exon 20, Primerhybridisierung bei 55 °C

(C) Primer fwd Exon 19, Primer rev Exon 21, Primerhybridisierung bei 53 °C

Die Primer-Kombination Exon 18 fwd und Exon 20 rev erzeugte sowohl für Gehirnals auch für DC-Proben lediglich eine Bande bei etwa 200 bp (18-19-20 kalkuliert 228 bp) [Abb. 3.9 (B)]. Dies folgt der beschriebenen Konvention, dass alle Isoformen mit Exon 18 auch Exon 19 einschließen. Um Transkripte mit Exon 21 zu bestätigen oder auszuschließen, dient die PCR mit Primern in den Exons 19 und 21 [Abb. 3.9 (C)]. Im Gegensatz zu DCs ließ sich in Gehirnproben eine Bande zwischen 150 und 200 bp feststellen. Diese Bande entspricht in ihrer Größe der Kombination aus Exon 19-21 (kalkuliert bei 118 bp). Mehrere weitere PCR-Reaktionen mit fwd- und rev-Primern in Exon 21 konnten dieses in DCs nicht reproduzieren. Verglichen mit der stärkeren Expression von Exon 21-enthaltenden Transkripten in Gehirnproben, wird auch hier gewebsspezifisches Spleißen erkennbar.

3.4.3 Favorisierte Linker-Sequenz in YFP⁺ pDCs

Das PCR-Design der Linker-Sequenz von *Psd93* in stimulierten YFP^{+/-} pDCs wird von Abbildung 3.10 zusammengefasst. Abb. 3.10 (A) zeigt vier Primerkombinationen aus der SH3-GK-Linker Region. Eine Amplifikation in pDCs gab es demnach nur für die Exons 18, 19, 20 und 23. In Gehirnproben ließen sich im Gegensatz dazu auch die Exons 21 und 22 amplifizieren. In Abb. 3.10 (B) werden die ausgeschnittenen, aufgereinigten und sequenzierten PCR-Produkte aus YFP⁺ pDCs in einer Schemazeichnung aufgeführt.



Abb. 3.10 Zusammenfassung SH3-GK Linker in YFP⁺ pDCs

(A) Verschiedene Primer-Kombinationen illustrieren den Unterschied in der SH3-GK-Linker Region von YFP⁺ pDCs und Gehirnproben. Exons 21 und 22 kommen im Gehirn, nicht in pDCs vor.

. Eingesetzte cDNA für pDCs und Gehirnproben (C57BL/6N) bei 25 ng, -ve = untranskribierte RNA aus YFP⁻ pDCs, 25 ng RNA genutzt.

(B) Exon-Sequenz der ausgeschnittenen und sequenzierten PCR-Produkte aus YFP⁺ pDCs

3.5 Die 5´RACE-PCR als komplementärer Ansatz zur RT PCR zeigt Expression von *Psd93*η in YFP⁺ pDCs

Neben der RT-PCR zur Suche nach *Psd93*-Spleißvarianten führte Dr. Shafaqat Ali parallel eine 5`*Rapid Amplification of cDNA Ends*-(RACE)-PCR mithilfe des SMARTer® RACE 5′/3′ Kits (Clontech) durch. Hiermit sollten nicht nur die durch Primer festgelegten N-terminalen Isoformen bzw. alternativ gespleißten Exons im SH3-GK-Linker Bereich beschrieben, sondern auch nach möglichen neuen *Psd93*-Isoformen gesucht werden. Ausgangsmaterial waren wie für die RT-PCR aus KM differenzierte Flt3L DCs, die nach einer Stimulation mit CpG 2216 + DOTAP über 6 h in YFP⁺ pDCs sortiert wurden.



Abb. 3.11 Exon-Struktur der Klone aus der 5 RACE-PCR

Amplifikation einer alternativen η-Isoform (16 Klone) in YFP⁺ pDCs, die in der RT-PCR nicht gezeigt werden konnte. Zudem konnten γ-Transkripte (3 Klone) amplifiziert werden, die bereits in der RT-PCR in pDCs identifiziert wurden.

Daten und Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Dr. Shafaqat Ali

Es konnten drei Klone der γ -Isoform (Abb. 3.11 oben und mittig) sequenziert werden, jedoch zeigten mehr Klone (16 aus 19) überraschenderweise ein in der RT-PCR nicht beschriebenes Transkript, das infolgedessen als *Psd93* η_3 in die Nomenklatur eingefügt wurde (Abb. 3.11 unten). Die η_3 -Variante nutzt einen Transkriptionsstart, der 28 Nukleotide aufwärts von Exon 15 liegt, weshalb dieser Start von *Psd93* η_3 Exon 15a genannt wurde. Der kodierende Bereich beginnt wie für die übrigen η -Isoformen in Exon 17. Es konnten keine Klone der α -, β -, δ -, ε -oder ζ -Isoformen generiert werden. Da mit den Ergebnissen der RT-PCR übereinstimmend, wurden zwei neue Referenzsequenzen in die Online-Datenbanken eingepflegt: MF276899 entspricht der in Abb. 3.11 oben gezeigten γ -Isoform, MF276900 der unten dargestellten, deutlich häufigeren η_3 -Isoform. Mit dem Wissen um dieses neue Transkript wurde gezielt nach einer großen (γ) und einer niedermolekularen (η) Isoform von PSD93 auf Proteinebene gesucht.

3.6 Existenz von PSD93γ und PSD93η in pDCs auf Proteinebene

3.6.1 PSD93 in Flt3L DCs und Gehirn

Nach einer IP zur Konzentrierung von PSD93 wurden die Proteine im Zelllysat aus Flt3L-Gesamtkulturen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und via WB auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Sowohl der verwendete Anti-PSD93 AK für die IP (Klon EPR8740, Abcam) als auch der Anti-PSD93 AK für den WB (Klon N18/30, Merck) sollte alle Isoformen detektieren können. Durch die Verwendung zweier unterschiedlicher AK sollte die Spezifität für PSD93 erhöht werden, sowie durch unterschiedliche Speziesreaktivitäten der AK eine unspezifische Bindung der schweren Kette nach zweimaliger Behandlung mit demselben AK vermieden werden. In Gehirnproben aus WT-Mäusen konnte mit dem Anti-PSD93 AK ein Protein der ungefähren Größe von 110 kDa detektiert werden [Abb. 3.12 (A)].



Abb. 3.12 PSD93 in Flt3L-Kulturen von PSD93^{+/+} und PSD93^{-/-} Mäusen

Darstellung mehrerer Proteinbanden aus 6 h CpG 2216-stimulierten Flt3L Kulturen. Im PSD93 KO konnten Banden im niedermolekularen Bereich detektiert werden. In Gehirnproben von WT-Mäusen wurde eine Bande von ca. 110 kDa detektiert, zudem in WT und KO Proben eine Bande um 55 kDa.

Flt3L-Kulturen wurden für 6 h mit CpG 2216 + DOTAP stimuliert oder unstimuliert belassen. Gehirnproben 1:10 verdünnt eingesetzt.

Darstellung erfolgt nach IP mit Anti-PSD93 AK (Abcam), SDS-PAGE und WB:

(A) mit Anti-PSD93 AK (Merck). "Iso" = Isotypenkontrolle mit Kaninchen IgG zur Spezifitätskontrolle
(B) nach *Stripping* der Membran mit Re-Blot Plus und Inkubation mit Anti-Kaninchen IgG

Proben aus PSD93^{-/-} Mäusen, die zur Spezifitätskontrolle für die bekannten, großen Isoformen eingesetzt wurden, zeigten andere Ergebnisse. Die PSD93^{-/-} Maus war mit dem Ziel konzipiert worden, die Proteinexpression bekannter Isoformen aus dem Gehirn wie α oder β mit einer jeweils ähnlichen Größe von etwa 110 kDa zu verhindern (McGee et al., 2001b). Für unstimulierte Proben aus Flt3L-Kulturen konnte in dieser Arbeit eine Bande bei etwa 55 kDa detektiert werden, die in Größe und Intensität der Bande in der Isotypenkontrolle für Kaninchen-IgG entspricht [Abb. 3.12 (A) "Iso"]. Diese Bande wurde dementsprechend als die schwere Kette des verwendeten Anti-PSD93 AK aus Kaninchen gewertet. Für die Kulturen nach 6 h Stimulation wurde jedoch ein anderes Bild deutlich. Ebenfalls im Größenbereich von etwa 55 kDa ergab sich sowohl für Proben aus PSD93+/+ als auch aus PSD93-/-Mäusen eine Intensitätserhöhung der Bande, die ich als tatsächlich vorhandene Proteinstruktur, zusätzlich zu der Hintergrundintensität der schweren Kette des Anti-PSD93 AK für die IP einordnete. Außerdem zeigte sich in den Proben aus den PSD93^{+/+} Mäusen eine Bande mit vergleichbarer Größe (~110 kDa) wie in Gehirnproben. Diese Bande entspricht in der Größe der v-Isoform, die bereits auf mRNA-Transkriptebene bestätigt wurde (Kapitel 3.3). In Ermangelung Isoformspezifischer AK wurde ein Größenvergleich mit in HEK-Zellen überexprimierten PSD93 α -, γ - und η -lsoformen durchgeführt, der unsere Annahme stützte. Die hier gezeigte schwache Darstellung der v-Isoform konnte durch Verlängerung des Stimulationszeitraums verbessert werden (Ali et al., 2018). Jedoch war hier kein zweifelsfreier Nachweis der niedermolekularen PSD93ŋ-Isoform möglich. Dies ließ den Schluss zu, dass der genutzte WB-AK (Klon N18/30, Merck) im Bereich der PDZ-Domänen bindet. Aufgrund dessen wurde in Kapitel 3.6.2 der verwendete Anti-PSD93 AK für die IP (Abcam) auch für den WB genutzt. Die Membran aus Abb. 3.12 (A) wurde mit einer Stripping-Lösung behandelt [Abb. 3.12 (B)], wodurch die AK, die an die auf der Membran befindlichen Proteine gebunden waren, von den Proteinen abgelöst wurden, um erneutes Behandeln der Membran mit Primär- und Sekundär-AK, zu ermöglichen. Es wurde ein AK gegen Kaninchen-IgG genutzt, um die schwere Kette des Anti-PSD93 AK für die IP detektieren zu können. Eine spezifische Bindung wurde in allen Proben mit gleicher Intensität bei etwas mehr als 55 kDa beobachtet. Die Darstellung der schweren Kette in diesem Größenbereich machte einen weiteren Ansatz mit einem leichtkettenspezifischen AK nötig, um mögliche niedermolekulare Isoformen von PSD93 zweifelsfrei detektieren zu können (Kapitel 3.6.2).

3.6.2 Die PSD93η-Isoform

In einem weiteren Ansatz wurde nach IP und WB mit einem Anti-PSD93 AK (Klon EPR8740, Abcam) die Membran mit einem HRP-konjugierten Anti-Kaninchen IgG leichtkettenspezifischen AK (Klon 5A6-1D10, Dianova) behandelt.



Abb. 3.13 Niedermolekulare Isoform von PSD93

(A) Die PSD93η Isoform wird in Flt3L DCs und im Gehirn von PSD93 WT und PSD93 KO gleichermaßen exprimiert. Bestätigt wurde dies durch überexprimiertes PSD93η in HEK-Zellen.

Links: IP und WB von Flt3L-DCs (Flt3L) und Gehirnproben (G) aus PSD93^{+/+} und PSD93^{-/-} Mäusen unstimuliert (-) oder nach 6h-Stimulation mit CpG 2216 (+)

"Iso" = Isotypenkontrolle mit Kaninchen IgG zur Spezifitätskontrolle

Rechts: Überexprimierte Isoformen γ , η und α in HEK-Zellen sowie Leervektor (LV) nach WB

(B) Domänenstruktur der überexprimierten bzw. in Neuronen vorkommenden PSD93α-Isoform sowie der ebenfalls überexprimierten und in pDCs vorkommenden PSD93-Isoformen PSD93γ und PSD93η

Mit dieser Änderung des Versuchsablaufes sollte insbesondere der Bereich zwischen 40 und 60 kDa eindeutiger zu beurteilen sein, wie in Abb. 3.13 (A) dargestellt. In der Isotypenkontrolle ("Iso") konnte keine Bande mehr im Bereich von 40-60 kDa detektiert werden, welche zuvor in Abb. 3.12 als schwere Kette eingeordnet wurde. Somit wurde durch Verwendung des leichtkettenspezifischen AK die Darstellung der schweren Kette folgend vermieden. Links in der Abbildung sind Flt3L-DC- und Gehirnproben dargestellt, bei denen sowohl in den Proben aus PSD93^{+/+} als auch aus PSD93^{-/-} Mäusen eine spezifische Bande bei etwa 43 kDa erkennbar ist, die, wie in 3.6.1 beschrieben, aufgrund der fehlenden Bindefähigkeit des dort verwendeten Anti-PSD93 AK für kurze PSD93-Isoformen nicht zu identifizieren war. Vergleichend wurden verschiedene Isoformen von PSD93 in HEK-Zellen durch Dr. Shafaqat Ali überexprimiert [Abb. 3.13 (A) rechts]. Mit derselben Größe wie die besagte Bande in PSD93^{+/+} und PSD93^{-/-} Mäusen konnte dort die überexprimierte n-Isoform detektiert werden. Dies dient als Nachweis dafür, dass es sich bei der niedermolekularen Isoform tatsächlich um PSD93n handelt. Das Auftreten dieser Isoform auch in den PSD93^{-/-} Mäusen wurde erwartet, da wie beschrieben bei der Konzipierung der KO-Maus Exon 9 deletiert wurde, welches deutlich upstream des eigentlichen Transkriptstart für Psd93n liegt. Jedoch war vor Aufnahme der Arbeiten für die PSD93^{-/-} Maus von einem vollständigen KO ausgegangen worden.

Die überexprimierten γ- und α-Isoformen (nicht gezeigt) liefen bei ungefähr 110 kDa und in PSD93^{-/-} Mäusen ergaben sich keine Banden dieser Größe in Flt3L-DC Kulturen oder Gehirnproben. Proben aus PSD93^{-/-} Mäusen dienten erneut als Spezifitätskontrolle. Weiterhin unklar bleibt jedoch die Bande etwas oberhalb von 55 kDa [Abb. 3.12 (A)]. Es wäre möglich, dass es sich um ein PSD-Protein handelt, was durch überexprimierte Isoformen oder andere proteinanalytische Methoden bestätigt werden müsste.

Zusammenfassend existieren in pDCs also eine größere γ-lsoform und eine kürzere η-lsoform ohne PDZ-Domäne [Abb. 3.13 (B)].

3.7 Expression von *Psd93* in BMDMs

Neben der Beschreibung von *Psd93* in DCs wurde ein Teil der Experimente auch BMDMs mit M-CSF-kultivierten durchgeführt. Die stimulierten M-CSF Gesamtkulturen wurden mittels FACS auf ihre Expression von CD86 (nicht gezeigt), CD11b sowie YFP untersucht (Abb. 3.14). Zunächst wurde kontrolliert, ob sich mit der Kulturmethode möglichst reine Kulturen hinsichtlich der Expression von CD11b erzeugen ließen, die im Bereich von ca. 90 % angestrebt wurde [Abb. 3.14 (A) und (C)]. Im Folgenden sollte sich nach Stimulation der BMDMs aus IFN^{βmob/mob} Mäusen die größtmögliche Expression von IFNβ/YFP einstellen. Dies war bei Stimulation der BMDMs über 24 h mit Poly I:C der Fall, wo bis zu 10 % der Zellen IFNB/YFP+ waren. Zusätzlich zu den in Abb. 3.14 (A) gezeigten Proben aus IFNβ^{mob/mob} Mäusen sowie entsprechend stimulierten WT-Proben wurde aus den gleich behandelten Kulturen RNA extrahiert und für eine gRT-PCR auf Psd93 und Ifnb verwendet. Diese wurde, wie oben beschrieben, vergleichbar mit der qRT-PCR in DCs durchgeführt. Eine Darstellung erfolgt nicht, da sich lediglich eine verwertbare Expression in den 24 h Poly I:C-stimulierten BMDMs und nicht in 6/24 h anders stimulierten BMDM-Proben ergab.

Für Abb. 3.14 (B) wurde eine Isoformen-PCR für Psd93 mit u.a. jener 24 h Poly I:C-Probe durchgeführt. Es wurde wieder das auch in DCs gezeigte Bandenmuster der y-Isoform mit drei Banden sichtbar, von denen die größte bei etwa 1000 bp lief und am stärksten amplifiziert wurde. Auch hier ist der Unterschied zu Gehirnproben erkennbar, bei denen die beiden kleineren Banden eine erheblich stärkere Intensität aufwiesen. In den Proben, die im FACS eine geringere IFNB/YFP-Expression zeigten, konnte Psd93 weder in der gRT-PCR, noch in der y-PCR amplifiziert werden. Es besteht methodisch eine Abweichung zu dem Vorgehen für DCs: es wurden nicht die IFNβ/YFP⁺ BMDMs sortiert und die Genexpression dort analysiert, sondern stimulierte Gesamtkulturen für FACS oder RNA-Extraktion genutzt. In dem Kontext sollen die hier vorgestellten Ergebnisse in BMDMs lediglich als eine Art Screening auf Psd93 verstanden werden. Möglicherweise ließe sich in sortierten IFNβ/YFP⁺ BMDMs nach Stimulation eine höhere *Psd93*-Expression detektieren, jedoch wissen wir, dass die IFNβ-produzierende BMDM-Population verglichen mit pDCs deutlich geringer ist und es daher schwierig werden dürfte, ausreichend Zellen für die RNA-Extraktion sortieren zu können. Trotz der methodischen Unterschiede ergibt sich aber ein ähnliches Gesamtbild.



Abb. 3.14 BMDM-Analyse

Poly I:C-Stimulation von BMDMs über 24 h führt zur größten IFNß/YFP-Expression im Vergleich mit anderen TLR-Stimuli. In diesen Proben wird *Psd93* verprimiert. (A) FACS-Analyse nach 6 h und 24 h-Stimulation (LPS, Poly I:C, CpG) von BMDMs aus IFNβ^{mob/mob} Mäusen

Ø = unstimuliert. Zahlen geben die in den jeweiligen *Gates* enthaltenen Zellen an (relativ).

Beschriftung der Pfeile entspricht den jeweiligen Parametern auf der Achse. (B) *Psd93*γ-PCR aus 24 h Poly I:C-stimulierten IFNβ^{mob/mob} Mäusen [s. (A)] und Gehirnproben aus C57BL/6N Mäusen

ust = unstimuliert; $-ve = H_2O$

(C) FACS-Kontrolle von 24 h Poly I:C-stimulierten bzw. naiven BMDMs aus C57BL/6N WT-Mäusen

4 DISKUSSION

Unsere Arbeitsgruppe konnte in einer Transkriptom-Analyse zeigen, dass *Psd93* in IFNβ/YFP⁺ pDCs von IFNβ-Reportermäusen zu den am stärksten differenziell exprimierten Genen nach Stimulation des TLR9 zählt (Bauer et al., 2016). Neben der Hochregulierung von *Psd93* in *ex vivo*-sortierten IFNβ/YFP⁺ pDCs aus der murinen Milz konnten wir diese differenzielle Expression ebenfalls *in vitro* für KM-differenzierte IFNβ/YFP⁺ pDCs bestätigen (Ali et al., 2018; Bauer et al., 2016). Für PSD93 war bisher kein Vorkommen in Immunzellen beschrieben.

Psd93 zeigt eine große Variabilität hinsichtlich der N-terminalen Start-Exons und der Möglichkeit alternativen Spleißens in weiter C-terminal gelegenen Bereichen (Ali et al., 2018; Kruger et al., 2013). Zur funktionellen Untersuchung in der Neurophysiologie steht eine *Psd93^{/-}* Maus zur Verfügung, die durch Deletion von Exon 9 der in Neuronen bekannten Isoformen generiert worden ist (McGee et al., 2001b). Zur weiteren Eingrenzung der in pDCs vorkommenden Psd93-Transkripte wurden in dieser Arbeit für die jeweiligen N-Termini angefertigte Primer genutzt sowie die Möglichkeit der Sequenzierung von PCR-Produkten. Mittels dieser Methodik ließ sich die y-lsoform mit zusätzlich alternativem Spleißen innerhalb dieses Transkriptes sowie eine favorisierte SH3-GK-Linker Sequenz für Psd93 abweichend von den Ergebnissen in Neuronen beschreiben. Die Ergebnisse der parallel zur Primer-basierten Isoformen-Suche durchgeführten 5`RACE-PCR zeigten im Vergleich mit Psd93y überraschenderweise ein wesentlich häufigeres Psd93n-Transkript. Aufgrund dessen sollten neben der Beschreibung auf mRNA-Ebene zusätzlich durch IP und WB PSD93-Protein-Isoformen untersucht werden. Auf dieser Ebene gelang der Nachweis der y-Isoform und ebenso der neuen, von uns als n bezeichneten Protein-Isoform von PSD93 (Ali et al., 2018).

4.1 *Psd93*-Isoformen in RT-PCR und 5'-RACE-PCR

Neben der in dieser Arbeit für jede zuvor beschriebene N-terminale Isoform durchgeführten RT-PCR wurde von Dr. Shafaqat Ali parallel eine 5´RACE-PCR als Vervollständigung der Suche nach mRNA-Isoformen von *Psd93* angefertigt. Im Vergleich ist diese RT-PCR basierend auf Isoform-spezifischen Primern abhängig von der Korrektheit, mit der im Vorfeld der Experimente in Datenbanken entsprechende Ansatzpunkte für das Primer-Design gefunden wurden. Es kann hier nur das amplifiziert werden, was vorher bekannt ist und als komplementärer Primer

Diskussion

festgelegt wurde. Im Gegensatz dazu bietet die 5´RACE-PCR den Vorteil, dass verschiedene, auch unbekannte, Transkripte nebeneinander amplifiziert werden können. Insbesondere moderne, kommerzielle Kits versprechen eine vollständige Amplifikation bis an das 5´-Ende und ermöglichen somit die Gegenüberstellung alternativer 5´-Enden (Scotto–Lavino et al., 2006), die gerade bei *Psd93* von großer Bedeutung erscheinen (Kruger et al., 2013). Als Alternative zu 5´RACE- und RT-PCR kam die Etablierung eines 5´*Cap*-spezifischen AK für die Markierung aller mRNAs gefolgt von einem Northern-Blot in Betracht. Solche 5´-*Cap* AK werden jedoch nicht mehr angeboten, da nach Meinung kommerzieller Anbieter die 5´RACE-PCR einfacher und schneller vollständige mRNA-Sequenzen liefern würde.

RT-PCR und Der Vergleich der Ergebnisse von 5'RACE-PCR ergab Gemeinsamkeiten in der y-Isoform, die durch beide Methoden als N-terminale Isoform bestätigt werden konnte. Lediglich in der RT-PCR konnten Spleißvarianten innerhalb der y-Isoform entdeckt werden. Zudem ließ sich mit beiden Methoden dasselbe Spleißverhalten im Bereich des SH3-GK-Linker feststellen: die Exons 21 und 22 sind in Transkripten in pDCs nicht enthalten. Es wird also von Exon 20 auf Exon 23 gespleißt. Beiden Methoden war zudem gemeinsam, dass keine der Nterminalen Starts α , β , δ , ϵ , $\zeta_{a/b}$ oder $\eta_{1/2}$ amplifiziert werden konnten. Der große Unterschied ergab sich in der kurzen Psd93 - Variante, die durch konventionelle RT-PCR nicht zu belegen war. Grund hierfür ist die Tatsache, dass nicht die beiden neu in die Gen-Nomenklatur eingefügten η_1 - und η_2 -Exons als Start genutzt wurden, sondern 28 Nukleotide aufwärts von Exon 15. Das neue Exon wurde als Exon 15a bezeichnet. Wie bei Nutzung von n1 und n2 liegt der Translationsstart hierbei in Exon 17. Die entstandene Variante erhielt den Namen *Psd93*n₃. Dieses Transkript war in der 5 RACE deutlich häufiger als die y-Transkripte. Insgesamt lässt sich festhalten, dass für Psd93 in pDCs ein spezifisches alternatives Spleißprogramm existiert, das aus einer langen y-lsoform und einer kurzen n-lsoform besteht (Ali et al., 2018).

4.2 Bedeutung der *Psd93^{-/-}* Maus für das Spleißen und die Protein-Isoformen in pDCs

Die Ergebnisse für das alternative Spleißen und die Proteinsynthese in pDCs wie auch in Lysaten aus ganzen Maushirnen belegen das Vorkommen einer neuen, kurzen PSD93η-Isoform, die keine PDZ-Domänen besitzt, neben der bekannten Isoform PSD93γ (Ali et al., 2018). Die PSD93η-Isoform ließ sich ebenfalls in *Psd93*^{-/-} Individuen detektieren. Vor dem Hintergrund des unvollständigen KO wurde in dieser Arbeit die Bezeichnung der von uns eingesetzten Mauslinie von PSD93^{-/-} hin zu PSD93^{Δ E9/ Δ E9</sub> geändert. Die ursprüngliche Konzeption der PSD93^{-/-} Maus hatte, wie bereits beschrieben, zum Ziel, die langen, aus Neuronen bekannten Isoformen für die Untersuchung von deren Funktion auszuschalten. Hierzu wurde Exon 9, welches im Bereich der zweiten PDZ-Domäne kodiert, deletiert (McGee et al., 2001b). Ich konnte für die γ -Isoform auf mRNA-Ebene Transkripte zeigen, die Exon 9 auslassen. Dennoch findet eine Translation zu Protein nicht statt.}

Da sich die n-Isoform diesem Knockoutmodell jedoch komplett entzieht, wäre zur Klärung der funktionellen Bedeutung in pDCs die Generierung eines vollständigen KO nötig. Für die Untersuchung der PDZ-Domänen oder als Spezifitätskontrolle für die bekannten, langen Isoformen reicht weiterhin die PSD93^{ΔE9/ΔE9} Maus. Es erscheint, als sei bei der Kontrolle dieses KO ein AK genutzt worden, der durch Nterminale Bindung das Vorhandensein weiter C-terminal startender Isoformen nicht ausschließen konnte (McGee et al., 2001b). Dasselbe Problem zeigte sich bei den ersten WBs dieser Arbeit, die zunächst keinen Anhalt für ein Vorhandensein von PSD93n ergaben. Neben den zukünftigen Studien der Proteinsynthese von PSD93 in pDCs und anderen myeloiden Zellen begründet dies aber auch die Notwendigkeit einer Re-Interpretation bzw. erneuter Durchführung bereits getätigter Arbeiten mit dem PSD93^{ΔE9/ΔE9}-Modell in Neuronen (Elias et al., 2006; Nithianantharajah et al., 2013; Parker et al., 2004). Da in dieser Arbeit Totallysate aus ganzen Maushirnen als Kontrolle eingesetzt wurden, kann keine weitere Aussage zum Vorkommen der PSD93-Isoformen in unterschiedlichen Hirnregionen getroffen werden. Ebenso lassen sich keine Rückschlüsse auf die beteiligten Zelltypen, wie etwa Neuronen oder Gliazellen, ziehen. Beispielweise scheint in autonomen Ganglienzellen von PSD93^{AE9/AE9} Mäusen PSD93 nicht essenziell für die Ansammlung von nikotinischen Acetylcholinrezeptoren in der Postsynapse (Parker et al., 2004). Die Entwicklung der Synapsen von zerebellären Purkinje-Zellen verlief in PSD93^{ΔE9/ΔE9} Individuen ohne Störung (McGee et al., 2001b). Beispielhaft würde für beide Zelltypen eine Kontrolle der Ergebnisse mit einer vollständigen KO-Maus sicherlich Sinn machen. Zwar erscheint auf den ersten Blick die kurze n-Isoform ohne PDZ-Domäne als Hauptfunktionsdomäne als möglicherweise funktionell weniger relevant, jedoch kann eine signifikante Beteiligung an Prozessen in der Postsynaptischen Dichte, wie etwa der Anordnung von Glutamatrezeptoren nicht ausgeschlossen werden.

4.3 *Psd93*-Expression in unterschiedlichen Zelltypen

Ausgangspunkt der Arbeiten mit *Psd93* war eine Transkriptom-Analyse von IFNβproduzierenden pDCs, die Psd93 als das am stärksten hochregulierte Gen im Vergleich zu nicht-IFNβ-produzierenden pDCs zeigte (Bauer et al., 2016). Die Flt3L DC-Kulturen in dieser Arbeit waren mit dem TLR9-Liganden CpG 2216 (Klasse A) stimuliert worden, um eine möglichst hohe Expression von IFNβ/YFP in den Zellen zu erzeugen. Da bei den Flt3L DC-Kulturen immer auch Flt3L cDCs (CD11c+ B220-CD11b⁺) mitsortiert wurden, konnte das RT- bzw. gRT-PCR-Konzept parallel zu den pDCs auch für cDCs angewendet werden. cDCs exprimieren ebenfalls den TLR9, sind aber im Gegensatz zu pDCs nicht in der Lage nach CpG-A-Stimulation große Mengen Typ-I-Interferone zu produzieren, da sich TLR9-MyD88-IRF7-Komplexe nicht in dem Maße bilden können, wie sie für eine hocheffiziente Induktion der IFN-Gene essenziell sind (Honda et al., 2005). Psd93 wird ebenfalls von cDCs exprimiert, wenn auch zu einem geringeren Level. Eine signifikante differenzielle Expression von *Psd93* in IFNβ/YFP⁺ cDCs im Vergleich mit IFNβ/YFP⁻ cDCs wurde hier jedoch nicht festgestellt. Interessanterweise entsprachen die Transkripte aus der RT-PCR von cDCs aber jenen von pDCs. Es konnte die N-terminale y-Isoform und die Exon-Kombination aus 18-19-20-23 amplifiziert werden. Möglicherweise ist also das Spleißverhalten in DCs evolutionär konserviert. Da wir für IFNB/YFP+ cDCs keine 5'RACE-PCR durchführten, kann keine Aussage über das Psd93n3-Transkript getroffen werden.

Auch in IFN β /YFP⁺ M-CSF-differenzierten BMDMs aus IFN $\beta^{mob/mob}$ Mäusen konnte die Expression von *Psd93* γ gezeigt werden. Hier mussten jedoch größere Mengen cDNA zur Amplifikation eingesetzt werden, was auf eine insgesamt deutlich geringere Expression von *Psd93* γ in Makrophagen als in DCs schließen lässt. Eine Hochregulation nach Stimulation mit dem TLR3-Agonisten Poly I:C konnte semiquantitativ für *Psd93* γ festgestellt werden. Dies zeigt eine möglicherweise in Makrophagen und DCs konservierte Funktion für PSD93 nach TLR-Stimulation. TLR3 erkennt im Gegensatz zu TLR9 doppelsträngige RNA von einem Virus oder einer virusinfizierten Zelle, aktiviert in der Folge den *TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon* β (TRIF)-Signalweg und nutzt daher nicht wie TLR7 und TLR9 in pDCs das Adapterprotein MyD88. Der TRIF-Signalweg nach TLR3-Stimulation führt final über IRF3 zu einer Produktion von Typ-I-Interferonen und/oder über NF- κ B zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine (Kawai & Akira, 2010). Die Ziele der Signalwege (Typ-I-IFN, proinflammatorische Zytokine) sind also bei den verschiedenen TLRs ähnlich, jedoch unterscheiden sich die genutzten Signalwege (TRIF, MyD88) ganz erheblich. Außerdem unterscheidet sich für verschiedene Zelltypen die Ausstattung mit TLRs. pDCs exprimieren vorrangig TLR7 und TLR9, während cDCs und Makrophagen TLR2, TLR3, TLR4 und TLR5 exprimieren. Außerdem kommen TLRs unterschiedlich lokalisiert vor: in der Plasmamembran, in Endosomen, in Lysosomen oder Endolysosomen. (Kawai & Akira, 2010). Die Verbindung von PSD93 zu TLR-Signalwegen wird für die vermutete funktionelle Bedeutung von PSD93 in pDCs wieder aufgegriffen (Kapitel 4.4).

Da neben pDCs auch B-Zellen TLR9 konstitutiv exprimieren und eine Stimulation mit CpG möglich ist, wurden murine B-Zellen auf eine Hochregulation von *Psd93* nach Stimulation mit CpG 2216 (Klasse A) ODN und DOTAP untersucht (Ali et al., 2018; Hua & Hou, 2013). Dabei zeigte sich die Expression von *Psd93* und *lfnb* im Vergleich zu pDCs als deutlich geringer. Die nach CpG-Stimulation auftretende Subgruppe der CD27⁺ B-Zellen wurde mittels FACS sortiert, jedoch ergab sich im Vergleich mit den CD27⁻ B-Zellen keine signifikant erhöhte *Psd93*- oder *lfnb*-Expression (Ali et al., 2018). Zusammenfassend lässt sich aus den Daten für pDCs, cDCs, BMDMs und CD27⁺ B-Zellen eine pDC-spezifische Expression und Hochregulation nach TLR9-Stimulation von *Psd93* ableiten.

Abseits dieser Arbeit gibt es für unterschiedliche andere Ausgangsmaterialen, wie auch für Immunzellen, Online-Datenbanken, wie etwa BioGPS, die die Expression referenzierter Gene in den jeweiligen murinen Zellen oder Geweben guantitativ bemessen (Wu et al., 2009). BioGPS zeigt unter der auch in NCBI und ENSEMBL Referenznummer 23859 für gültigen Psd93 (http://biogps.org/#goto=genereport&id=23859, letzter Aufruf: 29.08.2018) eine Expression von Psd93 in Mastzellen, die dort höher angegeben wird als in B220+ pDCs. Hier muss angemerkt werden, dass keine stimulierten pDCs für diese Expressionsanalysen genutzt wurden. Wie bereits beschrieben sind Mastzellen an der direkten und indirekten Abwehr parasitärer und bakterieller Infektionen, sowie an der Pathogenese allergischer Erkrankungen beteiligt (Urb & Sheppard, 2012). Es gibt für Erkrankungen aus dem allergischen Spektrum sogar direkte Hinweise auf eine Beteiligung von PSD93 (W. Chen et al., 2015; Gref et al., 2017). Erst kürzlich wurde der Einfluss von Luftverschmutzung z.B. mit Stickoxiden auf die Methylierung und Expression von PSD93 im Rahmen der Entstehung von kindlichem Asthma bronchiale beschrieben (Gref et al., 2017).

Ein Experimentalstrang, der in dieser Arbeit nicht weiterverfolgt wurde, sollte eine Isoformen-spezifische qRT-PCR für *Psd93* etablieren. Idee war es, zu zeigen, welche Isoformen (γ , η oder beide) in IFN β /YFP⁺ pDCs und anderen myeloiden Zellen nach Stimulation hochreguliert würden. Die Konzeption einer solchen qRT-PCR gestaltete sich aufgrund des bereits beschriebenen abweichenden η_3 -Starts als problematisch. Es ließ sich kein η_3 -spezifischer Primer erstellen, da diese Isoform mit Exon 15 ein allen Isoformen gemeinsames Exon zum Start nutzt. Ein Ansatz mit einem γ -spezifischen und dem für alle Isoformen einsetzbaren Primer könnte durch das Subtrahieren des Expressionslevels der γ -Isoformen von dem Expressionslevel aller *Psd93*-Isoformen zusammengefasst auf die verbliebene η_3 -Isoform schließen lassen. In Anbetracht der methodischen Unsicherheiten habe ich mich letztlich gegen die Darstellung dieser Ergebnisse entschieden und auf die Isoformen-qRT-PCR vor und nach Stimulation verzichtet.

4.4 Funktion von PSD93 in pDCs

Unsere Ergebnisse bezüglich des Vorkommens von PSD93-Isoformen ergaben zusammengefasst, dass in pDCs mit PSD93y und PSD93n zwei unterschiedliche Isoformen vorhanden sind. Nachdem die Frage, welche Isoformen in pDCs vorkommen, von uns mit verschiedenen Methoden beantwortet werden konnte, stellt sich aber weiterhin die Frage, welche Funktion PSD93 in pDCs übernimmt. Hierzu erschien es sinnvoll, über die Beschreibung der bekannten Funktion der enthaltenen Domänen z.B. in Neuronen weitere Anknüpfungspunkte zu setzen und die beiden Isoformen genauer zu analysieren. PSD93y enthält N-terminal weder ein Palmitoylierungsmotiv wie die bekannte α -lsoform noch eine L27-Domäne der β -Isoformen. Beide Domänen sind an der Cluster-Bildung der Postsynaptischen Dichte und der enthaltenen PSD-MAGUKs beteiligt (Chetkovich et al., 2002; Topinka & Bredt, 1998). Genaue Modelle der möglicherweise speziellen Interaktionsmöglichkeiten der y-Isoformen fehlen. PSD93y besitzt im Gegensatz zu PSD93n jedoch drei PDZ-Domänen, die als bekannte Protein-Protein-Interaktionvermittelnde Domänen an C-terminale Bindemotive synaptischer Proteine binden können (te Velthuis et al., 2007; Zhu et al., 2016). Die Bandbreite der bekannten Interaktionspartner ist mit Glutamatrezeptoren, Ionenkanälen oder Proteinen des Zytoskelettes groß und lässt daher auch für pDCs einigen Interpretationsspielraum (X. Chen et al., 2015; Parker et al., 2004; Zhu et al., 2016). Besonders interessant ist auch die unterschiedliche Präferenz einzelner PDZ-Domänen hinsichtlich eines

Bindungspartners oder der intra- bzw. intermolekularen Komplexbildung. PSD93n kommt ohne diese PDZ-Domänen aus und besitzt lediglich eine SH3- und GK-Domäne. SH3- und GK-Domänen fungieren ebenfalls in der Protein-Protein-Interaktion und sind in den MAGUKs für inter- und intramolekulare Komplexbildung verantwortlich (Feng & Zhang, 2009; Oliva et al., 2012; Zhu et al., 2016). Es darf für pDCs eine ähnliche Rolle in der Bildung von Clustern mit PSD93 und den Bindungspartnern angenommen werden. Von besonderem Interesse ist der Linker-Bereich zwischen SH3- und GK-Domäne, der in den aus Neuronen bekannten PSD-MAGUKs für die Oligomerisation von PSD-Proteinen verantwortlich ist (McGee et al., 2001a; Zheng et al., 2011). Ich konnte in diesem Bereich ein pDC-spezifisches Spleißverhalten dokumentieren, was möglicherweise in einer Veränderung der Proteinfunktion resultiert. Sowohl PSD93y als auch PSD93n zeigten dasselbe Spleißen des SH3-GK-Linkers, was ähnliche Bindungspartner bzw. Bindemotive vermuten lässt. Die GK-Domänen haben ihre katalytische Funktion als Phosphokinasen verloren, sind aber in der Lage Phosphoproteine zu binden, was für die Interaktion mit Bindungspartnern zusätzlich von Belang sein dürfte (Zhu et al., 2016). Möglicherweise gibt es analog zu den PSD-MAGUK-Oligomeren in Neuronen auch Komplexe aus PSD93y und PSD93n in pDCs über deren Protein-Protein-Interaktion-vermittelnde Domänen. Völlig offen ist in dieser Hinsicht auch, ob sich beide Isoformen in ihrer Funktion beeinflussen. Dies könnte man herausfinden, indem nach Generierung eines vollständigen PSD93 KO durch Rekonstitution der jeweiligen PSD93-Isoformen mittels Überexpression die Isoformen hinsichtlich der Beeinflussung ihrer Funktion vergleicht. Allerdings sind wir noch entfernt davon, zu sagen, was die eigentliche Funktion von PSD93 in pDCs ist und sollten dies zunächst klären, um dann Experimente zur möglichen Beeinflussung zu entwickeln.

Da PSD-MAGUKs in der Lage sind, über ihre Protein-bindenden Domänen als Gerüstprotein an Aktinfilamente des Zytoskeletts der Nervenzelle zu binden (Zheng et al., 2011), kann auch eine ähnliche Funktion in pDCs vermutet werden. Beispielsweise könnten dynamische Prozesse im Rahmen der Veränderung der Zellmorphologie bei der Migration von pDCs mittels PSD93 gesteuert werden.

Eine mögliche Verbindung von pDC-Funktion zu PSD93 stellt die Tyrosinkinase Fyn dar, deren Interaktion mit PSD93 aus Neuronen beschrieben ist. Fyn wird von pDCs konstitutiv exprimiert und beeinflusst die Antwort von pDCs auf Stimulation u.a. von TLR9. Fyn wird in pDCs als positiver Regulator der Typ-I-IFN-Antwort nach TLR-

Diskussion

Stimulation gesehen (Dallari et al., 2017). In diesem Kontext erscheint Fyn als lohnendes zukünftiges Ziel der Untersuchungen von IFNβ-produzierenden pDCs hinsichtlich der Funktion von PSD93. Zudem ergibt sich eine Verbindung zur Funktion von PSD93 beim ischämischen Schlaganfall, an dem möglicherweise in das ZNS eingewanderte pDCs beteiligt sind und für die Veränderung der Ausschüttung pro- und antiinflammatorischer Zytokine im PSD93 KO sorgen (Zhang et al., 2015). Die Verminderung inflammatorischer Aktivität stellt chronischentzündliche ZNS-Erkrankungen, wie die MS, in den Fokus kommender Untersuchungen. Es ist bekannt, dass migrierende pDCs hier pathogenetisch beteiligt sind, wenngleich weiterhin unklar ist, ob krankheitserzeugend oder - abwehrend (Duraes et al., 2016). Vergleichende Experimente im EAE-Modell zur Inflammation in PSD93 WT und einem vollständigen PSD93 KO erscheinen sinnvoll und könnten PSD93 in den Fokus der Erzeugung therapeutischer Optionen der MS rücken.

Weiteren Informationsgewinn sollten Experimente zur exakten intrazellulären Lokalisation von PSD93-Isoformen bringen. Hierzu wurden von Dr. Shafagat Ali Fusionsproteine der Isoformen in pDCs (PSD93y und PSD93n) und als Referenz von PSD93a mit green fluorescent protein (GFP) hergestellt und NIH3T3-Fibroblasten mit den Konstrukten transfiziert. Aus Epithelzellen ist eine unterschiedliche subzelluläre Verteilung von den verschiedenen PSD-MAGUKs bekannt (Roberts et al., 2012). Ein ähnliches Verhalten nehme ich auch für PSD93-Isoformen an, da wir beispielsweise wissen, dass die α-Isoformen mit ihrem Palmitoylierungsmotiv in der Lage sind, an Membranen zu binden (Topinka & Bredt, 1998), während PSD93y und PSD93n kein solches Motiv besitzen. Die α-Isoform zeigte in der Konfokalmikroskopie auch im GFP-System eine bevorzugte Lokalisation an die Zellmembran und zusätzlich eine zytoplasmatische Anreicherung, die aufgrund der direkten Nähe zum Zellkern am ehesten dem endoplasmatischen Retikulum entspricht (Ali et al., 2018). Im Gegensatz dazu bot sich für die beiden pDC-spezifischen Isoformen als GFP-Fusionsproteine ein anderes Bild. PSD93y fand sich vorrangig im Zytoplasma und geringer konzentriert im Zellkern. Dahingegen war PSD93n in gleichem Maße in Zytoplasma und Zellkern vorhanden (Ali et al., 2018). Unsere Vermutungen einer Isoformen-spezifischen Lokalisation haben sich bestätigt und im Weiteren bekräftigte dieses Experiment unsere Hypothese von einer Isoformen-spezifischen Funktion von PSD93y und

PSD93n, welche sich schon bei der Beschreibung der Unterschiede in den vorhandenen Protein-Domänen ergeben hatte.

Eine besonders wichtige Eigenschaft ist bislang in den Annahmen zur Funktion von PSD93 in pDCs noch nicht ausreichend erwähnt worden: die pDCs steigern ihre Genexpression von *Ifnb* nach TLR9-Stimulation. Eine der Kernfragen dieser Arbeit ist der Bezug von *Psd93-* zu *lfnb*-Expression. Hierbei war insbesondere PSD93n von Bedeutung, da wie beschrieben eine höhere Konzentration im Zellkern im Vergleich mit PSD93y zu detektieren war und demnach einen Einfluss von PSD93n auf die Expression von Ifnb vermuten lässt. Hierzu wurde der Einfluss ektopischer Expression von PSD93-Isoformen auf die Ifnb-Promotoraktivität mittels eines Luciferase-Reportergen-Assays in NIH3T3-Fibroblasten von Dr. Shafagat Ali überprüft. Wie bereits geschildert, stand mit der PSD93^{ΔE9/ΔE9} Maus kein geeigneter KO für PSD93n zur Verfügung. Überexpression von PSD93n führte jedoch zu verminderter Aktivität des Ifnb-Promotors. Ähnliches ließ sich, wenn auch in geringerem Maße, für PSD93y feststellen. Im Gegensatz dazu bewirkte die Überexpression einer Kontrolle mit PSD93a keine Verringerung der *Ifnb*-Promotor-Aktivität (Ali et al., 2018). Zusammenfassend lässt sich für die beiden PSD93-Isoformen in pDCs eine Rolle als negative Regulatoren der Ifnb-Expression vermuten. Da PSD93 in Neuronen Rezeptoren in der Zellmembran verankert und reguliert, von uns spezifisch in Zellen nach TLR-Stimulation detektiert wurde und einen Einfluss auf die Expression von Typ-I-Interferonen und proinflammatorischen Zytokinen hat, darf spekuliert werden, dass PSD93 an Transport, Stabilisation und Regulation der Aktivität von TLRs in Immunzellen beteiligt ist. Grundsätzlich kann PSD93 auch an jedem weiteren Schritt des Signalweges von TLR-Aktivierung bis zu Ifnb-Expression arbeiten, jedoch erscheint das Wirken in der Protein-Protein-Interaktion nahe der Zellmembran insbesondere für die PSD93y-Isoform plausibel.

Weitere Anhaltspunkte für die Funktion von PSD93 in pDCs könnte der Vergleich mit anderen PSD-MAGUKs, etwa SAP97 oder PSD95, erbringen, die schon in Immunzellen beschrieben sind (Shaw & Filbert, 2009; Szilágyi et al., 2013). Das Vorkommen von PSD-Proteinen in der Interaktion zwischen zwischen T-Zelle und APC stellt eine Analogie zu dem in neuronalen Synapsen dar. Möglicherweise kann auch für PSD93 ein Nachweis in der "immunologischen Synapse" gelingen.

Einen weiteren Bereich der PSD93-Funktion, den diese Arbeit nicht zum Thema hatte, gilt es jedoch in Zukunft im Blick zu halten: PSD93 in der Kanzerogenese.

Bereits bestätigt ist eine spezifische Hochregulation der Expression einer PSD93-Isoform für das renale Onkozytom. Diese Isoform ähnelt der in pDCs neu beschriebenen n-Isoform, da der längste ORF ebenfalls nur den kodierenden Bereich für SH3- und GK-Domäne und keine der PDZ-Domänen enthält. Außerdem werden in den Tumorzellen andere PSD93-Isoformen vermindert exprimiert (Zubakov et al., 2006). Es ist hier aber fraglich, ob über die Relevanz von PSD93 Aussagen getroffen werden dürfen, da sich die dortige Isoform in einem Fusionsprotein wiederfindet. Ebenfalls bereits beschrieben wurde das Vorhandensein von *PSD93* in Osteosarkomen als Tumorsuppressor (Chen et al., 2014; Shao et al., 2018). Bislang ist die Beteiligung von PSD-Proteinen an der Kanzerogenese jedoch noch unzureichend verstanden, sodass wir entfernt von einem Tumormarker PSD93 sind. Zunächst sollten Studien an deutlich größeren Kohorten erfolgen, um die Relevanz von PSD-Proteinen für Diagnostik und Therapie maligner Tumoren festzustellen. Für das Osteosarkom wird PSD93 aber bereits zu einem interessanten Ziel für die Entwicklung von gezielten Krebstherapien wie z.B. monoklonale AK oder *small molecules*. Da Osteosarkome aber zu den selteneren Tumorentitäten gehören, ist ein breites Interesse der Pharmaindustrie eher unwahrscheinlich.

4.5 Rückblick und Ausblick

Da im Laufe der Versuche eine Proteinexpression von PSD93ŋ auch in der vorher als PSD93^{-/-} genutzten Mauslinie detektiert wurde, ergibt sich für die weitere funktionelle Beschreibung von PSD93ŋ in pDCs und anderen myeloiden Zellen die Notwendigkeit eines vollständigen KO. Wie erläutert, änderten wir entsprechend die Nomenklatur der genutzten Mauslinie zu PSD93^{Δ9/Δ9}. Neurophysiologische Arbeiten benötigen eine kritische Durchsicht, ob nicht ein vollständiger KO zur Aufrechterhaltung von abgeleiteten Hypothesen aus der PSD93^{Δ9/Δ9}-Mauslinie vonnöten ist.

Zur Beschreibung der PSD93-Isoformen in pDCs wurden überexprimierte Isoformen als Kontrolle verwendet, jedoch ohne Isoformen-spezifische AK. Zur weiteren Proteinanalytik wäre es beispielsweise möglich, die Zielproteine aus der Membran oder nach Färbung direkt aus den SDS-Polyacrylamid-Gelen zu schneiden. Dies bietet eine höhere Materialausbeute und Coomassie-Brilliant-Blauoder Silberfärbungen sind in der Durchführung einfach anwendbar (Brunelle & Green, 2014). Im Anschluss wäre eine massenspektrometrische Untersuchung der ausgeschnittenen Proteine möglich. Hierbei könnten auch Fragen der posttranslationalen Modifikation beantwortet werden.

Weiterhin wurden in dieser Arbeit keine spezifischen Interaktionspartner für PSD93 in pDCs definiert. Daher sollte die Suche nach ebendiesen Proteinen einer der Schwerpunkte für zukünftige Untersuchungen sein. Ein mögliches Vorgehen könnte sowohl ergebnisoffene als auch gezielte Suchmethoden einschließen. Zur Suche aller möglichen und noch unbekannten Bindungspartner für PSD93 wäre eine Massenspektrometrie nach Immunpräzipitation mit einem Anti-PSD93 AK ein geeignetes Verfahren. Alternativ könnte ein Hefe-Zwei-Hybrid-System genutzt werden (Fields & Song, 1989). Ein besonders interessanter Kandidat der gezielten Suche ist die Tyrosinkinase Fyn. Wie bereits beschrieben, wird dieses Protein von pDCs exprimiert und nach TLR9-Stimulation aktiviert wird. Außerdem ist es als Reaktion darauf regulierend an der Typ-I-IFN-Antwort sowie der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine beteiligt (Dallari et al., 2017). Daher passt es gut in das vorhandene Experimentaldesign mit TLR9-Stimulation und Sortierung von IFN β /YFP+ DCs. Ob Fyn in pDCs ein Bindungspartner von PSD93 ist, ließe sich z.B. mit einer Co-Immunpräzipitation zeigen.

Die Daten aus BioGPS für die hohe Expression von *Psd93* in Mastzellen als Immunzellen mit Effektorfunktionen und die veränderte Expression von *PSD93* bei Erkrankungen, an deren Pathogenese Mastzellen beteiligt sind, macht diesen Zelltyp zu einem lohnenden Ziel für kommende Untersuchungen. Hier kann in zwei Richtungen spekuliert werden. Zum einen könnte für PSD93 eine konservierte Funktion in Immunzellen abseits der Typ-I-IFN-Produktion bestehen, zum anderen wäre auch in Mastzellen eine Expression von *Psd93* in einer IFNβ-produzierenden Subgruppe denkbar. Hierzu könnte das von uns vorrangig an DCs durchgeführte Experimentaldesign auch auf KM-kultivierte Mastzellen angewendet werden, um dort mRNA- und Protein-Isoformen von PSD93 abzugrenzen.

Die moderne Forschung zeigt uns wie häufig innerhalb eines Organismus dieselben Strukturen und Abläufe vorkommen. Daher wird der ursprünglich im ZNS definierte Begriff "Synapse" mittlerweile auch auf z.B. eine "immunologische" oder "virologische" Synapse ausgeweitet (Blot et al., 2004; Shaw & Filbert, 2009). Auch diese Arbeit führt auf, dass dieselben strukturgebenden Proteine, PSD-MAGUKs, in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden. Daher wird in Zukunft dem gewebeabhängigen, alternativen Spleißen als Grundmechanismus eine größere Rolle zufallen und möglicherweise können weitere PSD93-Isoformen in anderen Zellen und Geweben z.B. durch *Next-generation sequencing* (NGS) entdeckt werden.

Abschließend lässt sich über diese Arbeit festhalten, dass die gründliche Suche mit mehreren Methoden nach *Psd93*-Isoformen in IFNβ-produzierenden pDCs mit *Psd93γ-* und *Psd93η* zwei strukturell unterschiedliche Isoformen aus dem komplexen, neu annotierten, *Psd93*-Gen hervorbrachte. Die Bestätigung der Protein-Isoformen gestaltete sich mangels Isoformen-spezifischer AK und eines unvollständigen PSD93 KO schwieriger als anfangs gedacht, es konnten aber letztlich PSD93γ und PSD93η durch Überexpression bestätigt werden. Trotz erster vielversprechender Ergebnisse hinsichtlich zellulärer Lokalisation von PSD93 und dem Zusammenhang zur *Ifnb*-Expression bleiben viele offene Fragen, die die genaue Funktion von PSD93 in der Immunantwort betreffen, die jedoch in ihrer Komplexität nicht Teil dieser Arbeit sein sollte. Diese Fragen können womöglich in Zukunft u.a. mit einer vollständigen PSD93^{-/-} Maus beantwortet werden.

5 LITERATURVERZEICHNIS

- Adachi, K., Davis, M.M., 2011. T-cell receptor ligation induces distinct signaling pathways in naive vs. antigen-experienced T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108, 1549–1554. https://doi.org/10.1073/pnas.1017340108
- Ali, S., Hoven, A., Dress, R.J., Schaal, H., Alferink, J., Scheu, S., 2018. Identification of a novel DIg2 isoform differentially expressed in IFNβ-producing plasmacytoid dendritic cells. BMC Genomics 19, 194. https://doi.org/10.1186/s12864-018-4573-5
- Bauer, J., Dress, R.J., Schulze, A., Dresing, P., Ali, S., Deenen, R., Alferink, J., Scheu, S., 2016. Cutting Edge: IFN-β Expression in the Spleen Is Restricted to a Subpopulation of Plasmacytoid Dendritic Cells Exhibiting a Specific Immune Modulatory Transcriptome Signature. J. Immunol. 1500383. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500383
- Blot, V., Delamarre, L., Perugi, F., Pham, D., Bénichou, S., Benarous, R., Hanada, T., Chishti, A.H., Dokhélar, M.-C., Pique, C., 2004. Human Dlg protein binds to the envelope glycoproteins of human T-cell leukemia virus type 1 and regulates envelope mediated cell-cell fusion in T lymphocytes. J. Cell Sci. 117, 3983–3993. https://doi.org/10.1242/jcs.01266
- Breton, G., Lee, J., Liu, K., Nussenzweig, M.C., 2015. Defining human dendritic cell progenitors by multiparametric flow cytometry. Nat. Protoc. 10, 1407–1422. https://doi.org/10.1038/nprot.2015.092
- Brunelle, J.L., Green, R., 2014. Chapter Thirteen Coomassie Blue Staining, in: Lorsch, J. (Ed.), Methods in Enzymology, Laboratory Methods in Enzymology: Protein Part C. Academic Press, pp. 161–167. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00013-6
- Burnette, W.N., 1981. "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal. Biochem. 112, 195–203. https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90281-5
- Chen, W., Brehm, J.M., Manichaikul, A., Cho, M.H., Boutaoui, N., Yan, Q., Burkart, K.M., Enright, P.L., Rotter, J.I., Petersen, H., Leng, S., Obeidat, M., Bossé, Y., Brandsma, C.-A., Hao, K., Rich, S.S., Powell, R., Avila, L., Soto-Quiros, M., Silverman, E.K., Tesfaigzi, Y., Barr, R.G., Celedón, J.C., 2015. A Genome-Wide Association Study of Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Hispanics. Ann. Am. Thorac. Soc. 12, 340–348. https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201408-380OC
- Chen, X., Bahrami, A., Pappo, A., Easton, J., Dalton, J., Hedlund, E., Ellison, D., Shurtleff, S., Wu, G., Wei, L., Parker, M., Rusch, M., Nagahawatti, P., Wu, J., Mao, S., Boggs, K., Mulder, H., Yergeau, D., Lu, C., Ding, L., Edmonson, M., Qu, C., Wang, J., Li, Y., Navid, F., Daw, N., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Downing, J.R., Zhang, J., Dyer, M.A., 2014. Recurrent Somatic Structural

Variations Contribute to Tumorigenesis in Pediatric Osteosarcoma. Cell Rep. 7, 104–112. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.003

- Chen, X., Levy, J.M., Hou, A., Winters, C., Azzam, R., Sousa, A.A., Leapman, R.D., Nicoll, R.A., Reese, T.S., 2015. PSD-95 family MAGUKs are essential for anchoring AMPA and NMDA receptor complexes at the postsynaptic density. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 112, E6983–E6992. https://doi.org/10.1073/pnas.1517045112
- Chetkovich, D.M., Bunn, R.C., Kuo, S.-H., Kawasaki, Y., Kohwi, M., Bredt, D.S., 2002. Postsynaptic targeting of alternative postsynaptic density-95 isoforms by distinct mechanisms. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 22, 6415–6425. https://doi.org/20026598
- Cisse, B., Caton, M.L., Lehner, M., Maeda, T., Scheu, S., Locksley, R., Holmberg, D., Zweier, C., den Hollander, N.S., Kant, S.G., Holter, W., Rauch, A., Zhuang, Y., Reizis, B., 2008. Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development. Cell 135, 37– 48. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.09.016
- Dallari, S., Macal, M., Loureiro, M.E., Jo, Y., Swanson, L., Hesser, C., Ghosh, P., Zuniga, E.I., 2017. Src family kinases Fyn and Lyn are constitutively activated and mediate plasmacytoid dendritic cell responses. Nat. Commun. 8. https://doi.org/10.1038/ncomms14830
- D'Ambrosio, R., Degasperi, E., Colombo, M., Aghemo, A., 2017. Direct-acting antivirals: the endgame for hepatitis C? Curr. Opin. Virol. 24, 31–37. https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.03.017
- Dresing, P., 2010. In vitro und in vivo Charakterisierung von IFN beta exprimierenden Zellen mittels eines bicistronischen Fluoreszenz-Reporter-Mausmodells (Dissertation). Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Dress, R., 2015. Characterization of a subset of splenic plasmacytoid dendritic cells specialized for production of IFNβ and the role of type I interferon during Toxoplasma gondii infection (Dissertation). Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Duraes, F.V., Lippens, C., Steinbach, K., Dubrot, J., Brighouse, D., Bendriss-Vermare, N., Issazadeh-Navikas, S., Merkler, D., Hugues, S., 2016. pDC therapy induces recovery from EAE by recruiting endogenous pDC to sites of CNS inflammation. J. Autoimmun. 67, 8–18. https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.08.014
- Elias, G.M., Funke, L., Stein, V., Grant, S.G., Bredt, D.S., Nicoll, R.A., 2006. Synapse-Specific and Developmentally Regulated Targeting of AMPA Receptors by a Family of MAGUK Scaffolding Proteins. Neuron 52, 307–320. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.09.012
- Feng, W., Zhang, M., 2009. Organization and dynamics of PDZ-domain-related supramodules in the postsynaptic density. Nat. Rev. Neurosci. 10, 87. https://doi.org/10.1038/nrn2540

- Fields, S., Song, O., 1989. A novel genetic system to detect proteinprotein interactions. Nature 340, 245–246. https://doi.org/10.1038/340245a0
- Fitzgerald-Bocarsly, P., Jacobs, E.S., 2010. Plasmacytoid dendritic cells in HIV infection: striking a delicate balance. J. Leukoc. Biol. 87, 609–620. https://doi.org/10.1189/jlb.0909635
- Frese, K.K., Latorre, I.J., Chung, S.-H., Caruana, G., Bernstein, A., Jones, S.N., Donehower, L.A., Justice, M.J., Garner, C.C., Javier, R.T., 2006. Oncogenic function for the Dlg1 mammalian homolog of the Drosophila discs-large tumor suppressor. EMBO J. 25, 1406–1417. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601030
- Galicia, G., Gommerman, J.L., 2013. Plasmacytoid dendritic cells and autoimmune inflammation. Biol. Chem. 395, 335–346. https://doi.org/10.1515/hsz-2013-0213
- Ganguly, D., Haak, S., Sisirak, V., Reizis, B., 2013. The role of dendritic cells in autoimmunity. Nat. Rev. Immunol. 13, 566–577. https://doi.org/10.1038/nri3477
- Gardoni, F., Marcello, E., Di Luca, M., 2009. Postsynaptic density-membrane associated guanylate kinase proteins (PSD-MAGUKs) and their role in CNS disorders. Neuroscience 158, 324–333. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.07.068
- Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., Ley, K., 2010. Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. Science 327, 656–661. https://doi.org/10.1126/science.1178331
- Genoux, D., Montgomery, J.M., 2007. Glutamate Receptor Plasticity at Excitatory Synapses in the Brain. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 34, 1058–1063. https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2007.04722.x
- Gessani, S., Conti, L., Cornò, M.D., Belardelli, F., 2014. Type I Interferons as Regulators of Human Antigen Presenting Cell Functions. Toxins 6, 1696– 1723. https://doi.org/10.3390/toxins6061696
- Gilliet, M., Boonstra, A., Paturel, C., Antonenko, S., Xu, X.-L., Trinchieri, G., O'Garra, A., Liu, Y.-J., 2002. The Development of Murine Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors Is Differentially Regulated by FLT3-ligand and Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor. J. Exp. Med. 195, 953– 958. https://doi.org/10.1084/jem.20020045
- Gilliet, M., Cao, W., Liu, Y.-J., 2008. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. Nat. Rev. Immunol. 8, 594–606. https://doi.org/10.1038/nri2358
- Grant, S.G.N., 2012. Synaptopathies: diseases of the synaptome. Curr. Opin. Neurobiol. 22, 522–529. https://doi.org/10.1016/j.conb.2012.02.002
- Gref, A., Merid, S.K., Gruzieva, O., Ballereau, S., Becker, A., Bellander, T., Bergström, A., Bossé, Y., Bottai, M., Chan-Yeung, M., Fuertes, E., Ierodiakonou, D., Jiang, R., Joly, S., Jones, M., Kobor, M.S., Korek, M., Kozyrskyj, A.L., Kumar, A., Lemonnier, N., MacIntyre, E., Ménard, C., Nickle,

D., Obeidat, M., Pellet, J., Standl, M., Sääf, A., Söderhäll, C., Tiesler, C.M.T., van den Berge, M., Vonk, J.M., Vora, H., Xu, C.-J., Antó, J.M., Auffray, C., Brauer, M., Bousquet, J., Brunekreef, B., Gauderman, W.J., Heinrich, J., Kere, J., Koppelman, G.H., Postma, D., Carlsten, C., Pershagen, G., Melén, E., 2017. Genome-Wide Interaction Analysis of Air Pollution Exposure and Childhood Asthma with Functional Follow-up. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 195, 1373–1383. https://doi.org/10.1164/rccm.201605-1026OC

- Hauk, A., 2014. Proteinen durch Immunpräzipitation auf der Spur. Biol. Unserer Zeit 44, 18–18. https://doi.org/10.1002/biuz.201490007
- Hauk, A., 2013. Quantifizierung von DNA durch Absorptionsmessung. Biol. Unserer Zeit 43, 278–278. https://doi.org/10.1002/biuz.201390093
- Herzenberg, Leonard A., Parks, D., Sahaf, B., Perez, O., Roederer, M., Herzenberg, Leonore A., 2002. The History and Future of the Fluorescence Activated Cell Sorter and Flow Cytometry: A View from Stanford. Clin. Chem. 48, 1819– 1827.
- Honda, K., Ohba, Y., Yanai, H., Negishi, H., Mizutani, T., Takaoka, A., Taya, C., Taniguchi, T., 2005. Spatiotemporal regulation of MyD88–IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. Nature 434, 1035–1040. https://doi.org/10.1038/nature03547
- Hua, Z., Hou, B., 2013. TLR signaling in B-cell development and activation. Cell. Mol. Immunol. 10, 103–106. https://doi.org/10.1038/cmi.2012.61
- Humbert, P., Russell, S., Richardson, H., 2003. Dlg, Scribble and Lgl in cell polarity, cell proliferation and cancer. BioEssays 25, 542–553. https://doi.org/10.1002/bies.10286
- Isaacs, A., Lindenmann, J., 1957. Virus interference. I. The interferon. Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 147, 258–267.
- Ivashkiv, L.B., Donlin, L.T., 2014. Regulation of type I interferon responses. Nat. Rev. Immunol. 14, 36–49. https://doi.org/10.1038/nri3581
- Kaplan, D.H., 2010. In vivo function of Langerhans cells and dermal dendritic cells. Trends Immunol., Special FocusThe Langerhans cell: standing out from the dendritic cell crowd 31, 446–451. https://doi.org/10.1016/j.it.2010.08.006
- Kawai, T., Akira, S., 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. Nat. Immunol. 11, 373–384. https://doi.org/10.1038/ni.1863
- Kirov, G., Pocklington, A.J., Holmans, P., Ivanov, D., Ikeda, M., Ruderfer, D., Moran, J., Chambert, K., Toncheva, D., Georgieva, L., Grozeva, D., Fjodorova, M., Wollerton, R., Rees, E., Nikolov, I., Lagemaat, L.N. van de, Bayés, À., Fernandez, E., Olason, P.I., Böttcher, Y., Komiyama, N.H., Collins, M.O., Choudhary, J., Stefansson, K., Stefansson, H., Grant, S.G.N., Purcell, S., Sklar, P., O'Donovan, M.C., Owen, M.J., 2012. *De novo* CNV analysis implicates specific abnormalities of postsynaptic signalling complexes in the pathogenesis of schizophrenia. Mol. Psychiatry 17, 142. https://doi.org/10.1038/mp.2011.154

- Kong, K., Kumar, M., Taruishi, M., Javier, R.T., 2014. The Human Adenovirus E4-ORF1 Protein Subverts Discs Large 1 to Mediate Membrane Recruitment and Dysregulation of Phosphatidylinositol 3-Kinase. PLoS Pathog. 10. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004102
- Kruger, J.M., Favaro, P.D., Liu, M., Kitlinska, A., Huang, X., Raabe, M., Akad, D.S., Liu, Y., Urlaub, H., Dong, Y., Xu, W., Schluter, O.M., 2013. Differential Roles of Postsynaptic Density-93 Isoforms in Regulating Synaptic Transmission. J. Neurosci. 33, 15504–15517. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0019-12.2013
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature 227, 680–685. https://doi.org/10.1038/227680a0
- Lande, R., Gregorio, J., Facchinetti, V., Chatterjee, B., Wang, Yi-Hong, Homey, B., Cao, W., Wang, Yui-Hsi, Su, B., Nestle, F.O., Zal, T., Mellman, I., Schröder, J.-M., Liu, Y.-J., Gilliet, M., 2007. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. Nature 449, 564–569. https://doi.org/10.1038/nature06116
- Langerhans, P., 1868. Ueber die Nerven der menschlichen Haut. Arch. Für Pathol. Anat. Physiol. Für Klin. Med. 44, 325–337. https://doi.org/10.1007/BF01959006
- León, B., Ardavín, C., 2008. Monocyte-derived dendritic cells in innate and adaptive immunity. Immunol. Cell Biol. 86, 320–324. https://doi.org/10.1038/icb.2008.14
- Leyland, M.L., Dart, C., 2004. An alternatively spliced isoform of PSD-93/chapsyn 110 binds to the inwardly rectifying potassium channel, Kir2.1. J. Biol. Chem. 279, 43427–43436. https://doi.org/10.1074/jbc.M407575200
- Manca, C., Tsenova, L., Freeman, S., Barczak, A.K., Tovey, M., Murray, P.J., Barry, C., Kaplan, G., 2005. Hypervirulent M. tuberculosis W/Beijing Strains Upregulate Type I IFNs and Increase Expression of Negative Regulators of the Jak-Stat Pathway. J. Interferon Cytokine Res. 25, 694–701. https://doi.org/10.1089/jir.2005.25.694
- Matsui, T., Connolly, J.E., Michnevitz, M., Chaussabel, D., Yu, C.-I., Glaser, C., Tindle, S., Pypaert, M., Freitas, H., Piqueras, B., Banchereau, J., Palucka, A.K., 2009. CD2 distinguishes two subsets of human plasmacytoid dendritic cells with distinct phenotype and functions. J. Immunol. Baltim. Md 1950 182, 6815–6823. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802008
- McGee, A.W., Dakoji, S.R., Olsen, O., Bredt, D.S., Lim, W.A., Prehoda, K.E., 2001a. Structure of the SH3-Guanylate Kinase Module from PSD-95 Suggests a Mechanism for Regulated Assembly of MAGUK Scaffolding Proteins. Mol. Cell 8, 1291–1301. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00411-7
- McGee, A.W., Topinka, J.R., Hashimoto, K., Petralia, R.S., Kakizawa, S., Kauer, F., Aguilera-Moreno, A., Wenthold, R.J., Kano, M., Bredt, D.S., 2001b. PSD-93 Knock-Out Mice Reveal That Neuronal MAGUKs Are Not Required for

Development or Function of Parallel Fiber Synapses in Cerebellum. J. Neurosci. 21, 3085–3091.

- Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., Mortha, A., 2013. The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. Annu. Rev. Immunol. 31. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074950
- Mildner, A., Jung, S., 2014. Development and Function of Dendritic Cell Subsets. Immunity 40, 642–656. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.04.016
- Murphy, K.M., 2014. Janeway Immunologie, 7. Aufl., korrigierter Nachdr. 2014. ed. Springer Spektrum.
- Nicoll, R.A., Tomita, S., Bredt, D.S., 2006. Auxiliary subunits assist AMPA-type glutamate receptors. Science 311, 1253–1256. https://doi.org/10.1126/science.1123339
- Nithianantharajah, J., Komiyama, N.H., McKechanie, A., Johnstone, M., Blackwood, D.H., Clair, D.S., Emes, R.D., van de Lagemaat, L.N., Saksida, L.M., Bussey, T.J., Grant, S.G.N., 2013. Synaptic scaffold evolution generated components of vertebrate cognitive complexity. Nat. Neurosci. 16, 16–24. https://doi.org/10.1038/nn.3276
- Oliva, C., Escobedo, P., Astorga, C., Molina, C., Sierralta, J., 2012. Role of the maguk protein family in synapse formation and function. Dev. Neurobiol. 72, 57–72. https://doi.org/10.1002/dneu.20949
- Parker, M.J., Zhao, S., Bredt, D.S., Sanes, J.R., Feng, G., 2004. PSD93 Regulates Synaptic Stability at Neuronal Cholinergic Synapses. J. Neurosci. 24, 378– 388. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3865-03.2004
- Patterson, S., Rae, A., Hockey, N., Gilmour, J., Gotch, F., 2001. Plasmacytoid Dendritic Cells Are Highly Susceptible to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection and Release Infectious Virus. J. Virol. 75, 6710–6713. https://doi.org/10.1128/JVI.75.14.6710-6713.2001
- Pestka, S., Krause, C.D., Walter, M.R., 2004. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. Immunol. Rev. 202, 8–32. https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00204.x
- Pfaffl, M.W., 2004. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. BIOspektrum 1, 92–5.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. Nucleic Acids Res. 29, e45.
- Randolph, G.J., Inaba, K., Robbiani, D.F., Steinman, R.M., Muller, W.A., 1999. Differentiation of Phagocytic Monocytes into Lymph Node Dendritic Cells In Vivo. Immunity 11, 753–761. https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80149-1
- Reggiani, C., Coppens, S., Sekhara, T., Dimov, I., Pichon, B., Lufin, N., Addor, M.-C., Belligni, E.F., Digilio, M.C., Faletra, F., Ferrero, G.B., Gerard, M., Isidor, B., Joss, S., Niel-Bütschi, F., Perrone, M.D., Petit, F., Renieri, A., Romana,

S., Topa, A., Vermeesch, J.R., Lenaerts, T., Casimir, G., Abramowicz, M., Bontempi, G., Vilain, C., Deconinck, N., Smits, G., 2017. Novel promoters and coding first exons in DLG2 linked to developmental disorders and intellectual disability. Genome Med. 9. https://doi.org/10.1186/s13073-017-0452-y

- Reizis, B., Bunin, A., Ghosh, H.S., Lewis, K.L., Sisirak, V., 2011. Plasmacytoid Dendritic Cells: Recent Progress and Open Questions. Annu. Rev. Immunol. 29, 163–183. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101345
- Roberts, S., Delury, C., Marsh, E., 2012. The PDZ protein discs-large (DLG): the 'Jekyll and Hyde' of the epithelial polarity proteins. FEBS J. 279, 3549–3558. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08729.x
- Rohon, P., 2012. Biological therapy and the immune system in patients with chronic myeloid leukemia. Int. J. Hematol. 96, 1–9. https://doi.org/10.1007/s12185-012-1116-8
- Romani, N., Clausen, B.E., Stoitzner, P., 2010. Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin. Immunol. Rev. 234, 120–141. https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2009.00886.x
- Rong, R., Yang, H., Rong, L., Wei, X., Li, Q., Liu, X., Gao, H., Xu, Y., Zhang, Q., 2016. Proteomic analysis of PSD-93 knockout mice following the induction of ischemic cerebral injury. Neurotoxicology 53, 1–11. https://doi.org/10.1016/j.neuro.2015.12.005
- Ronnblom, L., Alm, G.V., Eloranta, M.-L., 2009. Type I interferon and lupus. Curr. Opin. Rheumatol. 21, 471–477. https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e32832e089e
- Rosenberg, H.F., Dyer, K.D., Foster, P.S., 2013. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. Nat. Rev. Immunol. 13, 9–22. https://doi.org/10.1038/nri3341
- Round, J.L., Humphries, L.A., Tomassian, T., Mittelstadt, P., Zhang, M., Miceli, M.C., 2007. Scaffold protein Dlgh1 coordinates alternative p38 kinase activation, directing T cell receptor signals toward NFAT but not NF-κB transcription factors. Nat. Immunol. 8, 154. https://doi.org/10.1038/ni1422
- Rozen, S., Skaletsky, H., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Methods Mol. Biol. Clifton NJ 132, 365–386.
- Sato, Y., Tao, Y.-X., Su, Q., Johns, R.A., 2008. PSD-93 mediates tyrosinephosphorylation of the N-Methyl-D-Aspartate Receptors. Neuroscience 153, 700–708. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.03.006
- Scheu, S., Dresing, P., Locksley, R.M., 2008. Visualization of IFN production by plasmacytoid versus conventional dendritic cells under specific stimulation conditions in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. 105, 20416–20421. https://doi.org/10.1073/pnas.0808537105
- Schlüter, O.M., Xu, W., Malenka, R.C., 2006. Alternative N-terminal domains of PSD-95 and SAP97 govern activity-dependent regulation of synaptic AMPA

receptor	function.	Neuron	51,	99–111.
https://doi.org/10.1	1016/j.neuroi	n.2006.05.016		

- Schneider, V., Church, D., 2013. Genome Reference Consortium. National Center for Biotechnology Information (US).
- Schraml, B.U., Reis e Sousa, C., 2015. Defining dendritic cells. Curr. Opin. Immunol. 32, 13–20. https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.11.001
- Schroder, K., Sweet, M.J., Hume, D.A., 2006. Signal integration between IFNγ and TLR signalling pathways in macrophages. Immunobiology, European Macrophage and Dendritic Cell Society 211, 511–524. https://doi.org/10.1016/j.imbio.2006.05.007
- Scotto–Lavino, E., Du, G., Frohman, M.A., 2006. 5' end cDNA amplification using classic RACE. Nat. Protoc. 1, 2555–2562. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.480
- Severa, M., Rizzo, F., Giacomini, E., Salvetti, M., Coccia, E.M., 2015. IFN-β and multiple sclerosis: Cross-talking of immune cells and integration of immunoregulatory networks. Cytokine Growth Factor Rev., Interferon Fundamentals: A tribute to the scientific vision of GB Rossi 26, 229–239. https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.11.005
- Shao, Y.W., Wood, G.A., Lu, J., Tang, Q.-L., Liu, J., Molyneux, S., Chen, Y., Fang, H., Adissu, H., McKee, T., Waterhouse, P., Khokha, R., 2018. Cross-species genomics identifies DLG2 as a tumor suppressor in osteosarcoma. Oncogene 1. https://doi.org/10.1038/s41388-018-0444-4
- Shaw, A.S., Filbert, E.L., 2009. Scaffold proteins and immune-cell signalling. Nat. Rev. Immunol. 9, 47. https://doi.org/10.1038/nri2473
- Sleijfer, S., Bannink, M., Gool, A.R.V., Kruit, W.H.J., Stoter, G., 2005. Side Effects of Interferon-α Therapy. Pharm. World Sci. 27, 423. https://doi.org/10.1007/s11096-005-1319-7
- Souvorov, A., Kapustin, Y., Kiryutin, B., Chetvernin, V., Tatusova, T., Lipman, D., 2010. Gnomon–NCBI eukaryotic gene prediction tool. Natl. Cent. Biotechnol. Inf. 1–24.
- Steinman, R.M., Cohn, Z.A., 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. J. Exp. Med. 137, 1142–1162.
- Stephenson, L.M., Sammut, B., Graham, D.B., Chan-Wang, J., Brim, K.L., Huett, A.S., Miletic, A.V., Kloeppel, T., Landry, A., Xavier, R., Swat, W., 2007. DLGH1 is a negative regulator of T-lymphocyte proliferation. Mol. Cell. Biol. 27, 7574–7581. https://doi.org/10.1128/MCB.00439-07
- Sugihara, T., Nakagawa, S., Sasajima, Y., Ichinose, T., Hiraike, H., Kondo, F., Uozaki, H., Fukusato, T., Ayabe, T., 2016. Loss of the cell polarity determinant human Discs-large is a novel molecular marker of nodal involvement and poor prognosis in endometrial cancer. Br. J. Cancer 114, 1012–1018. https://doi.org/10.1038/bjc.2016.24

- Swiecki, M., Colonna, M., 2015. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. Nat. Rev. Immunol. 15, 471–485. https://doi.org/10.1038/nri3865
- Szilágyi, O., Boratkó, A., Panyi, G., Hajdu, P., 2013. The role of PSD-95 in the rearrangement of Kv1.3 channels to the immunological synapse. Pflugers Arch. 465, 1341–1353. https://doi.org/10.1007/s00424-013-1256-6
- Takahashi, K., Asabe, S., Wieland, S., Garaigorta, U., Gastaminza, P., Isogawa, M., Chisari, F.V., 2010. Plasmacytoid dendritic cells sense hepatitis C virus– infected cells, produce interferon, and inhibit infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107, 7431–7436. https://doi.org/10.1073/pnas.1002301107
- Takei, Y., Kikkawa, Y.S., Atapour, N., Hensch, T.K., Hirokawa, N., 2015. Defects in Synaptic Plasticity, Reduced NMDA-Receptor Transport, and Instability of Postsynaptic Density Proteins in Mice Lacking Microtubule-Associated Protein 1A. J. Neurosci. 35, 15539–15554. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2671-15.2015
- Tao, Y.-X., Rumbaugh, G., Wang, G.-D., Petralia, R.S., Zhao, C., Kauer, F.W., Tao, F., Zhuo, M., Wenthold, R.J., Raja, S.N., Huganir, R.L., Bredt, D.S., Johns, R.A., 2003. Impaired NMDA receptor-mediated postsynaptic function and blunted NMDA receptor-dependent persistent pain in mice lacking postsynaptic density-93 protein. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 23, 6703– 6712.
- Tarhini, A.A., Gogas, H., Kirkwood, J.M., 2012. IFN-α in the Treatment of Melanoma. J. Immunol. Baltim. Md 1950 189, 3789–3793. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1290060
- te Velthuis, A.J., Admiraal, J.F., Bagowski, C.P., 2007. Molecular evolution of the MAGUK family in metazoan genomes. BMC Evol. Biol. 7, 129. https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-129
- Topinka, J.R., Bredt, D.S., 1998. N-terminal palmitoylation of PSD-95 regulates association with cell membranes and interaction with K+ channel Kv1.4. Neuron 20, 125–134.
- Torkildsen, Ø., Myhr, K.-M., Bø, L., 2016. Disease-modifying treatments for multiple sclerosis a review of approved medications. Eur. J. Neurol. 23, 18–27. https://doi.org/10.1111/ene.12883
- Trinchieri, G., 2010. Type I interferon: friend or foe? J. Exp. Med. 207, 2053–2063. https://doi.org/10.1084/jem.20101664
- Urb, M., Sheppard, D.C., 2012. The Role of Mast Cells in the Defence against Pathogens. PLoS Pathog. 8. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002619
- Voehringer, D., 2013. Protective and pathological roles of mast cells and basophils. Nat. Rev. Immunol. 13, 362–375. https://doi.org/10.1038/nri3427
- Walsh, T., McClellan, J.M., McCarthy, S.E., Addington, A.M., Pierce, S.B., Cooper, G.M., Nord, A.S., Kusenda, M., Malhotra, D., Bhandari, A., Stray, S.M., Rippey, C.F., Roccanova, P., Makarov, V., Lakshmi, B., Findling, R.L., Sikich, L., Stromberg, T., Merriman, B., Gogtay, N., Butler, P., Eckstrand, K., Noory, L., Gochman, P., Long, R., Chen, Z., Davis, S., Baker, C., Eichler, E.E.,

Meltzer, P.S., Nelson, S.F., Singleton, A.B., Lee, M.K., Rapoport, J.L., King, M.-C., Sebat, J., 2008. Rare structural variants disrupt multiple genes in neurodevelopmental pathways in schizophrenia. Science 320, 539–543. https://doi.org/10.1126/science.1155174

- Wei, Z., Behrman, B., Wu, W.-H., Chen, B.-S., 2015. Subunit-specific Regulation of N-Methyl-d-aspartate (NMDA) Receptor Trafficking by SAP102 Protein Splice Variants. J. Biol. Chem. 290, 5105–5116. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.599969
- Worbs, T., Hammerschmidt, S.I., Förster, R., 2017. Dendritic cell migration in health and disease. Nat. Rev. Immunol. 17, 30–48. https://doi.org/10.1038/nri.2016.116
- Wu, C., Orozco, C., Boyer, J., Leglise, M., Goodale, J., Batalov, S., Hodge, C.L., Haase, J., Janes, J., Huss, J.W., Su, A.I., 2009. BioGPS: an extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources. Genome Biol. 10, R130. https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-11-r130
- Xu, B., Roos, J.L., Levy, S., Rensburg, E.J. van, Gogos, J.A., Karayiorgou, M., 2008. Strong association of *de novo* copy number mutations with sporadic schizophrenia. Nat. Genet. 40, 880. https://doi.org/10.1038/ng.162
- Zhang, M., Li, Q., Chen, L., Li, J., Zhang, X., Chen, X., Zhang, Q., Shao, Y., Xu, Y., 2014. PSD-93 deletion inhibits Fyn-mediated phosphorylation of NR2B and protects against focal cerebral ischemia. Neurobiol. Dis. 68, 104–111. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.04.010
- Zhang, Q., Cheng, H., Rong, R., Yang, H., Ji, Q., Li, Q., Rong, L., Hu, G., Xu, Y., 2015. The Effect of PSD-93 Deficiency on the Expression of Early Inflammatory Cytokines Induced by Ischemic Brain Injury. Cell Biochem. Biophys. 73, 695–700. https://doi.org/10.1007/s12013-015-0666-9
- Zheng, C.-Y., Seabold, G.K., Horak, M., Petralia, R.S., 2011. MAGUKs, Synaptic Development, and Synaptic Plasticity. Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry 17, 493–512. https://doi.org/10.1177/1073858410386384
- Zhu, J., Shang, Y., Zhang, M., 2016. Mechanistic basis of MAGUK-organized complexes in synaptic development and signalling. Nat. Rev. Neurosci. 17, 209. https://doi.org/10.1038/nrn.2016.18
- Zubakov, D., Stupar, Z., Kovacs, G., 2006. Differential expression of a new isoform of DLG2 in renal oncocytoma. BMC Cancer 6, 106. https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-106

6 ANHANG



Abb. Nomenklatur von Psd93-Isoformen (vergrößert, siehe Abb. 3.1)

oben: Darstellung der skalierten Exon-Struktur (Kästen) von Psd93 Transkripten:

Introns sind nicht gezeigt und die Abstände zwischen den Exons nicht skaliert

Spleißverbindungen (Linien), Translationsstart (Pfeile), allgemeine Exons (arabische Zahlen), N-terminale Starts (griechische Kleinbuchstaben) unten: Zoom auf den SH3-GK-Linker Region, Region alternativen Spleißens

5′- bzw. 3′-UTR

Proteinkodierender Bereich

Abbildungsverzeichnis

Abb.	1.1 Reifung und Gruppeneinteilung von dendritischen Zellen (DCs)	1
Abb.	1.2 Funktion der Typ-I-Interferone in der Immunabwehr	3
Abb.	1.3 PSD93 15	5
Abb.	2.1 Sortierung von Flt3L-DCs in pDCs und cDCs	3
Abb.	3.1 Nomenklatur von <i>Psd93</i> -Isoformen	1
Abb.	3.2 Nomenklatur <i>Psd93</i> inklusive Real-Time Primer	3
Abb.	3.3 Titration von CpG 221654	1
Abb.	3.4 Differenzielle Expression von <i>Psd93</i> in IFNβ/YFP+ pDCs	5
Abb.	3.5 <i>Psd93</i> α ₁ -PCR	7
Abb.	3.6 <i>Psd93</i> γ PCR	9
Abb.	3.7 Klonierte Sequenzen aus γ -PCR von IFN β /YFP ⁺ pDCs	1
Abb.	3.8 Zusammenfassung N-terminale Isoformen von <i>Psd93</i> 62	2
Abb.	3.9 SH3-GK-Linker von <i>Psd93</i> in pDCs und cDCs64	1
Abb.	3.10 Zusammenfassung SH3-GK Linker in YFP+ pDCs68	5
Abb.	3.11 Exon-Struktur der Klone aus der 5'RACE-PCR66	3
Abb.	3.12 PSD93 in Flt3L-Kulturen von PSD93 ^{+/+} und PSD93 ^{-/-} Mäusen67	7
Abb.	3.13 Niedermolekulare Isoform von PSD9369	9
Abb.	3.14 BMDM-Analyse72	2

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Antikörper und deren Verwendung	30
Tabelle 2.2 Mauslinien	31
Tabelle 3.1 Referenzsequenzen f	50
Tabelle 3.2 Klonierung der PCR-Produkte aus γ-PCR	60

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich bei meiner Arbeit und dem Kapitel Forschung unterstützt und gefördert haben.

Zuallererst gilt mein Dank Prof. Dr. Stefanie Scheu für die Chance als erster Medizindoktorand in Ihrer Arbeitsgruppe tätig werden zu dürfen. Zudem möchte ich mich für die ausgezeichnete Betreuung und die diskussionsfördernde Atmosphäre bedanken, an der sich jeder zukünftige Arbeitgeber messen lassen muss. Einen besonderen Dank möchte ich für die Möglichkeiten der sportlichen und kulturellen Weiterbildung im Rahmen zahlreicher Exkursionen, ob bei Regen oder Hitze, mit der ganzen Arbeitsgruppe aussprechen.

Bei Dr. Shafaqat Ali möchte ich mich für die geduldige und motivierende Betreuung meiner Arbeiten im Labor bedanken. Insbesondere seine ruhige Art konnte mich immer wieder davon überzeugen, dass sogar ich im Labor etwas ans Laufen bekommen werde. Außerdem möchte ich ihm für sein Teaching in biotechnologischen Methoden danken, ohne das ich so manches Mal ziemlich aufgeschmissen gewesen wäre. Auch die viele Zeit, die er am Sorter für meine Zellen verbracht hat, soll nicht unerwähnt bleiben.

Weiterhin gilt mein Dank Prof. Dr. Klaus Pfeffer für die Möglichkeit der Aufnahme einer experimentellen Promotion am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene unter hervorragenden wissenschaftlichen und menschlichen Bedingungen.

Im Besonderen möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe bedanken, mit denen ich zusammenarbeiten durfte. Bei Regine für die Überlassung von PSD93 als Forschungsziel, bei Anja für zahlreiche Diskussionen über den Stand der Wissenschaft, bei Sonja für unkomplizierte und schnelle Hilfe im Labor. Im Weiteren bei Ann-Kathrin, Jasmin, Jens, Lisa und Ritu. Euch allen vielen Dank für die schöne Zeit am Institut, konstruktive Diskussionen und den Spaß auf unseren Ausflügen abseits der Forschung.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für Unterstützung, Entspannung und daraus resultierende Kraft für Studium und wissenschaftliche Arbeit. Meine Freundin Nicole hat mich über das ganze Studium und die ganze Promotion immer wieder aufgebaut und oft auf mich verzichtet. Vielen Dank, dass du das alles mit einem Lächeln mitgetragen hast.