

Martin Koeppel
Dr. med.

Large-Scale RNA Interference Screen for Regulators of Development and Maturation of Bone Marrow Derived Dendritic Cells

Geboren am 12.08.1979 in Bonn
Staatsexamen am 23.11.2007 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Immunologie
Doktorvater: Prof. Dr. med. vet. M. Kirschfink

Dendritic cells (DCs) play a key role in the initiation and regulation of the immune response. Following the recognition of pathogens by germline encoded pattern recognition receptors (PRRs), including the toll-like receptors (TLRs), DCs are activated and undergo the process of maturation which allows them to become effective antigen presenting cells (APCs). The tight regulation of maturation is crucial for a balanced activity of the immune system and its failure can result in disease. To study the genetic networks underling the process of DC maturation and to find novel components of the maturation pathways, we developed a genetic loss-of-function screen using a large-scale lentiviral RNA interference (RNAi) library, created by the RNAi Consortium (TRC) at the Broad Institute (Cambridge, USA).

The first step of this thesis was the development of a screening assay. We chose to use murine bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) as a source of primary DCs. The BMDCs were generated by routine protocols from murine bone marrow and the RNAi inducing lentiviral infection was successfully integrated into the culture routine. I developed a flow cytometry assay for the surface expression of CD86 (B7-2) as a readout for the screen. CD86 is a costimulatory molecule of the B-7 family, which is strongly upregulated during DC maturation. We induced maturation by co-culture of the BMDCs with *E. coli* bacteria, that can activate multiple TLRs and thus provide a strong stimulus to activate maturation. In a pilot screen I tested the screening assay and developed criteria to ensure the quality of each sample.

The second step was the actual screen. We silenced ~950 genes with each 5 short hairpin RNAs (shRNA) in an arrayed screen. The flow cytometry data was analyzed by a plate-by-plate approach and a z-score for each shRNA construct was calculated from the natural logarithm of the raw FITC-anti-CD86 mean fluorescent intensity data. There were strong variations between the individual constructs of each gene. Many genes showed only a single effective shRNA, but also a number of genes had more than one effective construct. These potential hits included known regulators of maturation, such as NF- κ B p105, IRAK-M and other genes that have been shown to be important for immune signaling. This accumulation of known regulators provided good evidence that the screen was able to identify relevant genes. The detection of two transcription factors that are known regulators of myeloid lineage decisions, PU.1 and C/EBP α , led us to hypothesize that the screen also detected regulators of DC development. The early time point of the infection during the BMDC culture with the lentiviral constructs was a possible explanation for this.

The third step of the project was a secondary screen. I modified the screening assay to also detect the changes in DC development, by staining the cells additionally with antibodies against the DC marker CD11c. To recover false-negative genes from the primary screen, I

chose to use ample cutoffs and to repeat a large number of constructs. Overall ~400 shRNAs targeting almost 250 genes were re-tested in duplicate during the secondary screen. There was a strong reproducibility between the duplicate plates. About 50% of the strong constructs from the primary screen reproduced with a significant phenotype in the secondary screen. Since RNAi has an inherent risk of off-target effects, I decided to focus only on hits with more than one hit construct. The probability that these genes are in fact real regulators is much higher. Overall I found 8 potential negative regulators of CD86 expression, 7 positive regulators of CD86 expression and 8 positive regulators of DC development. The total level of CD11c positive cells was too high to detect any negative regulators of DCs development.

The last step of this work was to validate some of the found hits. We used quantitative PCR (qPCR) to determine the level of mRNA knockdown. While a number of hits showed a good phenotype-knockdown correlation, supporting the validity of these hits, some other hits did not show a clear trend. I considered a complex transcript situation the cause of this observation. In such a case, the value of qPCR as a method to validate hits from RNAi screens is limited. To prove that the detection at protein level can be more precise, I tested the knockdown level of the PU.1 protein by Western blot. The protein level of PU.1 corresponded closely to the observed reduction of CD11c positive cells. This reduction was found to be functionally relevant, since allogenic T cells showed a significantly reduced proliferation in a mixed lymphocyte reaction with these cells. An extra shRNA targeting PU.1 was also tested and showed a significant phenotype. This redundancy adds another layer of confidence and can be generally advised for the validation of RNAi screening results.

In summary, my work was the first RNAi screen in primary DCs. This screen identified a number of interesting regulators, one of which is currently under deeper investigation. The lessons that we learned from this screen resulted in an improved RNAi screen in DCs, that is being carried out now. In general, RNAi screens promise to be a method of great impact for functional gene discovery and the study of genetic networks in immunology and other research areas.

Dendritische Zellen (DCs) haben eine Schlüsselfunktion bei der Initiierung und Regulierung der Immunantwort. Durch die Erkennung von Pathogenen mit Hilfe von in der Keimbahn kodierte Erkennungsrezeptoren (pattern recognition receptors/PRRs), wie z.B. den Toll-like Rezeptoren (TLRs), werden DCs aktiviert und es kommt zu einem Reifungsprozess, der die DCs in effektive Antigen-präsentierende Zellen umwandelt. Eine strikte Kontrolle dieser Reifung ist essentiell für eine balancierte Aktivierung des Immunsystems, und eine Störung dieser Kontrolle kann zu Erkrankungen führen. Um die genetischen Netzwerke des Reifungsprozesses der DCs zu untersuchen und um neue regulatorische Elemente der Signalwege zu finden, haben wir einen genetischen Screen entwickelt, bei dem mit Hilfe einer umfangreichen lentiviralen RNA Interferenz-Bibliothek (vom RNAi Consortium (TRC) am Broad Institut, Cambridge, USA) Gene spezifisch ausgeschaltet werden.

Der erste Schritt meiner Dissertation war die Entwicklung einer geeigneten Messprozedur. Wir haben uns entschieden die Untersuchung an primären DCs durchzuführen, die aus dem Knochenmark von Mäusen gezüchtet werden können, so genannte bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs). Diese Zellen wurden mit Hilfe von Standardprotokollen gewonnen, und es ist uns gelungen einen Infektionsschritt mit dem RNAi auslösenden Lentivirus in den Kulturablauf zu integrieren. Ich etablierte eine Durchflusszytometrieuntersuchung zur Messung der CD86 (B7-2) Expression als Ausgabe für meinen Screen. CD86 ist ein co-stimulatorisches Molekül der B7 Familie, dessen Oberflächenexpression während der DC Reifung stark hochreguliert wird. Die Reifung der DCs wurde durch die Zugabe von *E. coli* Bakterien in die Kultur stimuliert. Die Bakterien aktivieren die Reifung der DCs über verschiedene TLRs. In einem Pilotversuch testete ich die Messprozedur und entwickelte Qualitätskriterien für die Proben.

Der zweite Schritt bestand aus dem eigentlichen Screen selbst. Hierbei überprüfte ich die Rolle von ~950 Genen mit jeweils 5 Haarnadel-RNAs (short hairpin/shRNA) in einem Rasterformat. Die Durchflusszytometriedaten wurden für die jeweilige Mikotiterplatte separat ausgewertet und ein z-Wert aus dem natürlichen Logarithmus der durchschnittlichen Fluoreszenz-Intensität der FITC-anti-CD86 Antikörper berechnet. Insgesamt variierten die z-Werte der einzelnen shRNA Konstrukte eines Genes stark. Viele Gene zeigten nur bei einem der 5 Konstrukte einen signifikanten Phänotyp, bei einigen wenigen Genen dagegen waren 2 oder mehr Konstrukte signifikant. Diese potentiellen Treffer beinhalten eine Anzahl von Genen, die im Zusammenhang mit der DC Reifung bereits beschrieben wurden. So fanden sich unter anderem NF- κ B p105 und IRAK-M, beides bekannte Komponenten von immunologischen Signalkaskaden. Diese Anhäufung von bekannten Genen zeigt, dass der Screen tatsächlich in der Lage war relevante Gene zu identifizieren. Unter diesen Genen befanden sich mit PU.1 und C/EBP α zwei Transkriptionsfaktoren, die im Zusammenhang mit der Differenzierung von myeloischen Vorläuferzellen beschrieben wurden. Dies führte uns zu der Hypothese, dass der Screen zusätzlich Regulatoren der DC Entwicklung detektiert hat. Der frühe Infektionszeitpunkt mit den lentiviralen Konstrukten könnte dafür eine Erklärung sein.

Der dritte Teil des Projektes war die erneute Überprüfung der gefundenen Kandidatenkonstrukte. Um die Veränderungen in der DC Entwicklung bestimmen zu können, änderte ich den Versuchsablauf dahingehend, dass ich die Zellen für die Durchflusszytometrie zusätzlich mit Antikörpern gegen den DC spezifischen Oberflächenmarker CD11c angefärbte. Ich legte die erneute Testung verhältnismäßig breit an, um möglichst viele im ursprünglichen Screen falsch negative shRNAs wiederzugewinnen. Insgesamt testete ich ~400 shRNAs, die gegen ca. 250 Gene gerichtet waren, in diesmal doppelter Messung erneut. Die Ergebnisse der doppelten Messungen waren untereinander in hohem Maße vergleichbar. Etwa 50% der

Konstrukte, die im ursprünglichen Screen einen deutlichen Phänotyp zeigten, wiederholten diesen signifikanten Phänotyp erneut. Da RNAi Reagenzien immer die Gefahr von Off-Target-Effekten mit sich bringen, beschloss ich, meine Aufmerksamkeit auf die Kandidatengene zu richten, bei denen mindestens 2 shRNAs einen signifikanten Phänotyp zeigten. Insgesamt wurden 7 potentielle positive Regulatoren der CD86 Expression, 8 negative Regulatoren der CD86 Expression und 8 positive Regulatoren der DC Entwicklung gefunden. Weil der durchschnittliche Anteil an DCs in den Kulturen sehr hoch war, konnten keine negativen Regulatoren der DC Entwicklung entdeckt werden.

Der letzte Schritt meiner Arbeit war die Validierung einiger gefundener Treffergene. Mit Hilfe von quantitativer PCR (qPCR) haben wir den Knockdown der jeweiligen mRNA gemessen. Einige der getesteten Gene zeigten eine gute Korrelation zwischen dem Phänotyp und dem Knockdown der mRNA, was die Validität dieser Treffer untermauert. Bei anderen Kandidatengenen war keine klare Korrelation erkennbar. Diese Tatsache führte ich in erster Linie darauf zurück, dass möglicherweise verschiedene Transkripte des Gens vorliegen. In solch einem Fall ist die Aussagekraft der qPCR Untersuchung zur Validierung eines RNAi Screen Treffergens begrenzt. Um zu zeigen, dass die Untersuchung des Knockdowns auf Proteinebene bessere Ergebnisse liefern kann, untersuchte ich den Knockdown vom PU.1 Protein durch die shRNAs mittels Western Blot. Es fand sich eine starke Korrelation zwischen der verbleibenden Proteinmenge und der Reduktion der CD11c positiven Zellen in der Kultur. Diese Reduktion war von funktioneller Bedeutung, da es in einer gemischten Lymphozyten Reaktion dieser Zellen mit allogeenen T-Zellen zu einer signifikant geringeren Proliferation kam. Eine zusätzliche shRNA gegen PU.1 wurde produziert und getestet. Auch diese zusätzliche shRNA zeigte im Versuch einen signifikanten Phänotyp. Dieses Prinzip der redundanten RNAi Reagenzien unterstützt die Validität des jeweiligen Treffergens und kann als allgemeines Prinzip für die Validierung von Ergebnissen eines RNAi Screens gelten.

Zusammenfassend bahnte meine Arbeit den Weg für RNAi Screens in Dendritischen Zellen. Unser Screen entdeckte eine Anzahl von interessanten Kandidatengenen, von denen eines momentan gründlicher untersucht wird. Die dabei gewonnenen Erfahrungen sind in die Entwicklung eines verbesserten Screens in DCs geflossen, der zur Zeit durchgeführt wird. Es ist zu erwarten, dass RNAi Screens in Zukunft einen großen Einfluss auf die Entdeckung der Funktion von Genen und die Untersuchung von genetischen Netzwerken haben werden - sowohl im Bereich der Immunologie als auch in anderen Forschungsgebieten.