

Generierung von Mastzellen aus humanen Stammzellen durch lentiviralen Gentransfer

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Patricia Sophia Preuße
(geb. Valentin)

aus Berlin

2018

Der vorliegende experimentelle Teil der Dissertation wurde im Zeitraum 01.2015 - 12.2017 in der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie der Charité Campus Mitte unter der Leitung von Prof. Dr. med. Marcus Maurer angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Marcus Maurer

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Rupert Mutzel

Disputation am: 19.12.2018

Inhaltsverzeichnis

I. Danksagung	VI
II. Abkürzungsverzeichnis	VII
III. Zusammenfassung	X
III. Abstract	XI
1. Einleitung	1
1.1. Hämatopoetische Stammzellen (HSZ).....	1
1.2. Die Mastzelle (MZ).....	4
1.3. Transkriptionsfaktoren (TF).....	6
1.4. Relevante TF für MZ im murinen und humanen System.....	8
1.5. Lentivirale Expressionssysteme für den Gentransfer in HSZ.....	13
1.6. Zielsetzung der Arbeit	15
2. Material	16
2.1. Zellen und Zelllinien	16
2.2. Plasmide.....	16
2.3. Zellkulturmedien und Zusätze	17
2.4. Puffer, Reagenzien und Chemikalien.....	17
2.5. Zytokine.....	19
2.6. Restriktionsenzyme	19
2.7. Antikörper	19
2.8. Kommerzielle Kits.....	20
2.9. Verbrauchsmaterialien	20
2.10. Zusätzliche Materialien.....	21
2.11. Geräte	21
2.12. Zusätzliche Geräte im S2 Labor.....	22
2.13. Software zur Datenanalyse	22
2.14. Hersteller und Vertreiber	23
3. Methoden	25
3.1. Methoden für Zellkultur.....	25
3.1.1. Herstellung der Master- und Arbeitszellbank der 293FT-, HT1080- und SeAx- Zellen.....	25
3.1.2. Subkultivierung der Zelllinien	25
3.1.3. Isolierung und Expansion von CD34 ⁺ Zellen.....	26
3.1.4. Bestimmung der Blasticidin Sensitivität der CD34 ⁺ Zellen	27
3.1.5. Bestimmung der Blasticidin Sensitivität der HT1080 Zellen.....	27

3.1.6. Zellzählung	28
3.1.7. Messung der β -Hexosaminidase Aktivität	28
3.1.8. Messung des Histamingehalts	29
3.2. Molekularbiologische Methoden.....	30
3.2.1. Herstellung der TF enthaltenden Eingangsvektoren	30
3.2.2. Komponenten zur Herstellung der Transfervektoren	30
3.2.3. Komponenten für Struktur und Verpackung der lentiviralen Partikel.....	33
3.2.4. Kontrollvektoren CS-CDF-EG-PRE und CS-CA-GFP	35
3.2.5. Multisite Gateway LR Rekombination	36
3.2.6 Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	38
3.2.7. Anzucht von <i>E. coli</i>	38
3.2.8. PureYield™ Plasmid MINI- und MAXIpräp System.....	38
3.2.9. Testverdau der Plasmid-DNS mit Agarosegelelektrophorese	39
3.3. Virologische Methoden.....	40
3.3.1. Vergleich der DNS Menge für die Transfektion.....	40
3.3.2. RetroNektin und Vitronectin für Virus-Zell-Bindung.....	40
3.3.3. Transiente Transfektion zur Generierung lentiviraler Partikel	41
3.3.4. Transduktion der CD34 ⁺ Zellen	42
3.3.5. Titration	43
3.4. Durchflusszytometrische Färbung.....	44
3.5. Methoden der Histologie	45
3.5.1. Herstellung von Dünnschichtpräparaten (sog. Cytospins)	45
3.6. Statistische Auswertung	45
4. Ergebnisse.....	46
4.1. Eingangsvektoren für TF können erfolgreich in Zielvektoren kloniert werden.....	46
4.2. CD34 ⁺ SZ können erfolgreich mit Kontrollvektoren transduziert werden	49
4.3. TF-übertragende lentivirale Partikel können HT1080 und 293FT Zellen infizieren.....	51
4.4. Die Infektion von CD34 ⁺ SZ mit TF im pLenti führt zu doppelt-positiven Zellen für mastzellspezifische Marker	53
4.5. Die Anzahl an YFP positiven Zellen nimmt während der dreiwöchigen Kultivierung nach Transduktion mit pVenus-TF ab	61
4.6. Die Infektion mit pVenus-TF führt zu doppelt positiven Zellen für mastzellspezifische Marker	62
4.7. pVenus-HMOX1 und pVenus-MITF beeinflussen die Viabilität der Zellen.....	65
4.8. TF beeinflussen die Anzahl und Größe der Zellen.....	65
4.9. Aus CD34 ⁺ SZ generierte Zellen setzen β -Hexosaminidase nach Aktivierung über IgE frei	68

5. Diskussion	70
5.1. Diskrepanz bei Kontrollverdau der pVenus-TF	70
5.2. Die Infektion mit einem TF führt zu MZ aus CD34 ⁺ SZ	71
5.3. Die Infektion von CD34 ⁺ SZ mit HMOX1 und GATA-3 im pLenti oder pVenus führen zu MZ	74
5.4. Es besteht kein Zusammenhang zwischen Größe der TF und Virustiter oder Anzahl an generierten Zellen mit mastzellspezifischen Markern.....	77
5.5. Niedrige Transduktionseffizienz der pVenus-TF	79
5.6. Pseudotransduktion und transiente Expression von nicht-integrierten Vektoren	81
5.7. Hohe spontane Freisetzung an β -Hexosaminidase bei den generierten Zellen	82
5.8. HMOX1 als neuer Faktor für die MZ Entwicklung	83
5.9. Limitationen, Schlussfolgerung und Ausblick	85
6. Abbildungsverzeichnis	88
7. Tabellenverzeichnis	89
8. Referenzen	90
9. Publikationsliste	100
10. Anhang	101

I. Danksagung

Ich sehe diese Arbeit als eine gemeinschaftliche Leistung an und will die nachfolgenden Zeilen nutzen, den wichtigsten Mitwirkenden persönlich zu danken.

Zunächst will ich Prof. Dr. med. Marcus Maurer und sein Team nennen. Prof. Maurer hat meinen Weg durch die Doktorarbeit begleitet und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden, dafür möchte ich mich hier in aller Form bedanken.

Meinen Supervisors, Dr. Oliver Schmetzer und Dr. Jörg Scheffel, danke ich für kompetente Hilfe bei der wissenschaftlichen Arbeit.

Mein besonderer Dank an Prof. Dr. rer. nat. Rupert Mutzel für die Betreuung meiner Promotionsarbeit.

Ich habe mich über die Zeit in das Laborteam der AG Maurer integriert und der Abschied fiel mir schwer, aber es bleibt ein Zugehörigkeitsgefühl. Die Unterstützung und der Zuspruch vor allem vom Laborteam hat mir sehr geholfen so manche schwierige Phase zu meistern und daran zu wachsen. Hier seien im Besonderen Evi, Ullrike, Inga, Frieda und Carolina erwähnt. Vielen Dank an Euch für Hilfe bei praktischen und persönlichen Belangen. Ein herzliches Dankeschön auch an meine früheren Weggefährten Carolin, Janine, Andrey, Jelle, Anna u.v.a. der AG Maurer. Ihr alle habt zu einer tollen Arbeitsatmosphäre beigetragen.

Ein besonderes Dankeschön an Astrid, Sabine und Frank für die sehr angenehme und produktive Zusammenarbeit, auf wissenschaftlicher und persönlicher Ebene.

Erwähnen will ich hier auch Kollegen aus anderen Arbeitsgruppen, die mir oft aushalfen und immer ein offenes Ohr hatten.

Danken will ich auch meinen langjährigen Freunden, die meinen Weg mitverfolgt und mir den Rücken gestärkt haben.

Meiner Familie, insbesondere meiner Mutter und Tomas, kann ich nur sagen, dass ich es wohl ohne Euch nicht bis hierher geschafft hätte. Danke für eure immerwährende Bereitschaft mir zuzuhören und durch Hilfestellungen das Überwinden so mancher Hürde der letzten Jahre zu bewältigen. Ein Dankeschön an meinen Ehemann für Begleitung und Motivation, die streckenweise kräftezehrende Zeit durchzuhalten.

Am Ende hat sich alles zu einem Großen und Ganzen gefügt und gibt mir das nötige Vertrauen für anstehende neue Aufgaben.

II. Abkürzungsverzeichnis

Tab I Liste der Abkürzungen

AD	Atopische Dermatitis
APC	Allophycocyanin
AZB	Arbeitszellbank
α	Alpha
BCL-XL	Protein des bcl2l1 Gens für die Protein Phosphatase 1
BHLHE40	Protein des bhlhe-40 Gens für den Helix-Loop-Helix Faktor E40
CCR	Chemokinrezeptor
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (Unterscheidungsgruppen)
CLP	<i>Common lymphoid progenitor</i> (Lymphatische Progenitorzelle)
CMP	<i>Common myloid progenitor</i> (Myeloische Progenitorzelle)
CMV	Zytomegalievirus
COS-7	Fibroblasten-ähnliche Zelllinie
CXCR	Chemokinrezeptor
DNS	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF1	Elongationsfaktor-1
Fc	<i>fragment crystallisable</i> (kristallisierbares Fragment)
Fc ϵ RI	Hoch affiner Rezeptor für den Fc-Teil des IgE Rezeptors
FCS	Fetales Kälberserum
Flt3L	<i>FMS-like tyrosine kinase 3 ligand</i> (Ligand der FMS-ähnlichen Tyrosinkinase)
g	Erdbeschleunigung
GATA-1	Protein des gata-1 Gens für GATA-bindendes Protein 1
GATA-2	Protein des gata-2 Gens für GATA-bindendes Protein 2
GATA-3	Protein des gata-3 Gens für GATA-bindendes Protein 3
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> (Grün fluoreszierendes Protein=
GM-CSF	<i>Granulocytes-makrophage colony-stimulating factor</i> (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor)
GMP	<i>Granulocyte-macrophage progenitor</i> (Granulozyten-Makrophagen Progenitorzelle)
h	Stunde
HAES	Hydroxyethylstärke

HEK	Menschliche embryonale Nierenzellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HES-1	Protein des hes-1 Gens für Helix-Loop-Helix Protein 39
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HSA	Humanes Albumin
HSZ	Hämatopoetische Stammzellen
HMOX1	Protein des hmox1 Gens für Häm Oxygenase 1
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRES	Interne ribosomale Eintrittsstelle
JAK2	Protein des jak2 Gens für Janus Kinase 2
LB	<i>Lysogeny broth</i> (Komplexes Nährmedium für Bakterien)
LDL	<i>Low density lipoprotein</i> (Lipoprotein niedriger Dichte)
LIF	Leukämiehemmender Faktor
LL	Cathelicidin
LTB	Leukotrien B
LT-HSZ	Long term hematopoetic stem cells (Langzeit HSZ)
LTC	Leukotrien C
LTR	<i>Long terminal repeat</i> (DNS Wiederholungseinheit)
MAZR	Protein des patz1 Gens für Myc-assoziiertes Zink Finger Faktor
MEP	<i>Megakaryocyte-erythroid progenitor</i> (Megakaryozyten-Erythrozyten Progenitorzelle)
min	Min
MIP	Makrophagen Migrations-inhibierender Faktor
MITF	Protein des mitf Gens für Mikrophtalmie-assoziiertes TF
MOI	<i>Multiplicity of infection</i> (Multiplizität der Infektion)
MPP	<i>Multi-potent progenitor</i> (Multipotente Progenitorzelle)
mRNS	<i>Messenger RNA</i> (Boten RNS)
MZ	Mastzellen
MZB	Masterzellbank
MZP	Mastzellprogenitoren
NR1D1	Protein des nr1d1 Gens für Nuklear Rezeptor Unterfamilie 1, Gruppe D
OT	Objekträger
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid

PGE	Prostaglandin E
PGD	Prostaglandin D
PU.1	Protein des spi1 Gens für Spi-1 Protoonkogen
REPRIMO	<i>Protein des rprm Gens für TP53 abhängige G2 Mediator Homolog</i>
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	<i>Revolutions per minute</i> (Umdrehung pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SCF	<i>Stem cell factor</i> (Stammzellfaktor)
SFEM	<i>Serum free expansion medium</i> (Serum freies Expansionsmedium)
SIN	<i>Self inactivating vector</i> (Selbst-inaktivierender Vektor)
siRNS	<i>Small interfering RNA</i> (kleine eingreifende RNS)
S.O.C.	<i>Super optimal broth</i> (komplexes Nährmedium)
ST2	<i>Interleukin 1 receptor-like 1</i> (Interleukin 1 Rezeptor-ähnlich 1)
ST-HSZ	<i>Short term hematopoietic stem cells</i> (Kurzzeit HSZ)
STAT	Protein des stat Gens für Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription
SZ	Stammzellen
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TF	Transkriptionsfaktor
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
TNF	Tumornekrosefaktor
TPO	Thrombopoetin
VEGF	Endothelwachstumsfaktor
VLA	Integrinrezeptor
VPF	Vaskulärer Permeabilitätsfaktor
VSV-G	Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis Virus
YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i> (Gelb fluoreszierendes Protein)

III. Zusammenfassung

Mastzellen (MZ) gehören neben basophilen Granulozyten zu wichtigen Effektorzellen bei IgE-vermittelten allergischen Reaktionen (z.B. allergisches Asthma) und sind als Zellen des angeborenen und des erworbenen Immunsystems auch bei der Abwehr von Pathogenen und in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen (z.B. Urtikaria) involviert. MZ sind weiterhin in der Pathogenese von Mastozytose bedeutsam. MZ stammen, wie alle hämatopoetischen Zellen, aus dem Knochenmark, zirkulieren als Mastzellprogenitoren (MZP) im peripheren Blut und reifen im Gewebe (Haut, Schleimhäute und Lungengewebe) vollständig aus. Die nähere Charakterisierung dieser Vorläuferzellen im peripheren Blut ist bislang nur unzureichend möglich. Die Entwicklung der MZ aus hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) wird unter Anderem durch das Zusammenspiel von Transkriptionsfaktoren (TF) maßgeblich bestimmt. Im Mausmodell konnten in den letzten Jahren, auf der Suche nach den Entwicklungsstufen der MZ, einige bedeutsame TF identifiziert werden. Für das humane System sind bisher nur wenige relevante TF identifiziert und bestätigt. Die bisher unzureichende Charakterisierung der MZ-Vorläuferzellen erschwert experimentelle Studien darüber, welche TF in den einzelnen Entwicklungsstufen der MZ bedeutsam und aktiv sind. Die genetische Modifikation von humanen HSZ durch beispielsweise lentivirale Vektoren ist eine Methode, die nähere Aussagen über die Differenzierung der MZ aus HSZ ermöglicht. Die vorliegende Austestung relevanter TF mit zwei Gruppen lentiviraler Viren konnte die TF GATA-3 und HMOX1 identifizieren, um aus humanen HSZ MZ zu generieren. Diese Ergebnisse bestätigen den bereits bekannten Einfluss des GATA-3 auf die MZ Entwicklung. Das HMOX1 Protein konnte bereits in neoplastischen MZ von Mastozytose Patienten nachgewiesen werden und kann durch die vorliegenden Ergebnisse auch genutzt werden, MZ-Vorläuferzellen in der Pathogenese der Mastozytose näher zu charakterisieren.

III. Abstract

Together with basophil granulocytes mast cells (MCs) are important effector cells in IgE-mediated allergic reactions (e.g. allergic asthma). MCs belong to the innate and the adapted immune system and contribute to the pathogenesis of urticaria and mastocytosis. Most of the hematopoietic cells are released into the peripheral blood in a mature developmental state. In contrast, MCs derive from stem cells within the bone marrow, mast cell progenitors circulate in the blood stream and complete their maturation within peripheral tissues such as the mucosa, skin and airways. The differentiation of MCs out of hematopoietic stem cells is highly regulated by transcription factors (TFs) and other substances like cytokines and growth factors. Over the last decades some important TFs have been identified to play a role in the development of MCs. Most of the knowledge is gained from mouse models and studies with murine stem cells or murine MCs. To date, the search for MC progenitor cells in the human system is less clarified. Successful studies about activity and significance of TFs during MC development are hindered by the rudimental knowledge about MC progenitor cells in the human system. The genetic modification of human hematopoietic stem cells is one possibility to obtain new insights in the developmental process. The present study identified GATA-3 and HMOX1 to drive MC differentiation in human CD34⁺ stem cells. The results were confirmed by two lentiviral vectors and proved the previous known importance of GATA-3 in MC maturation. The HMOX1 protein was already found in neoplastic cells from mastocytosis patients. Together with current results, HMOX1 can be used to further characterize MC progenitor cells in the pathogenesis of mastocytosis.

1. Einleitung

1.1. Hämatopoetische Stammzellen (HSZ)

Im postembryonalen Knochenmark, im zentralen Blut und im Nabelschnurblut sind hämatopoetische Stammzellen (HSZ) als Ursprung des humanen Blutsystems zu finden. Im adulten Knochenmark finden sich neben den HSZ auch mesenchymale Stammzellen und endotheliale Stamm- oder Vorläuferzellen. Während sich aus den HSZ alle Blutzellen bilden, differenzieren die mesenchymalen Stammzellen u.a. zu Knorpel-, Fett-, Knochen- und Bindegewebe. Die endothelialen Progenitoren bilden die Zellen der Blutgefäße [1]. Die Existenz von HSZ, als Ursprung der Hämatopoese, wurde erstmalig 1961 von E. McCollough und J. Till [2] bestätigt. Sie bestrahlten Mäuse mit Röntgenstrahlen und transplantierten anschließend Zellen aus dem Knochenmark. Aus Zellkolonien in der Milz der Mäuse entwickelten sich daraufhin die verschiedenen Blutzellen. 1988 schließlich konnte I. Weissmann [3] HSZ aus Mäusen isolieren und den endgültigen Beweis liefern, dass aus diesen Zellen myeloide- und lymphoide Zellen entstehen können. Für die Identifizierung der HSZ wurde ein *in-vivo*-Nachweis, wie nachfolgend beschrieben, durchgeführt. Werden Mäuse mit einer Röntgenstrahlung von 10 Gray behandelt, verlieren die HSZ die Fähigkeit Zellen des Blutes zu bilden. Eine Repopulation des Knochenmarks ist durch die intravenöse Gabe von HSZ möglich. Die Maus überlebt durch die transplantierten HSZ den Verlust der Blutzellen. Man kann hieraus eine einzigartige Eigenschaft dieser Zellen ableiten, die Fähigkeit der HSZ zur Repopulation und Selbsterneuerung. Auch konnte mit dieser Methode die Fähigkeit zur Koloniebildung in der Milz untersucht werden und eine weitere Eigenschaft der HSZ abgeleitet werden: die Multipotenz der Zellen. Aufgrund ihrer funktionellen Eigenschaften wurden HSZ 1994 von Spangrude et al. [4] in drei Populationen eingeteilt: die *long term - hematopoietic stem cells* (LT-HSZ), die *short term - hematopoietic stem cells* (ST-HSZ) und die *multipotential progenitors* (MPP). Die bisher bekannten molekularen Marker für LT-HSZ, ST-HSZ und MPP sind in Tab. 1.1. aufgeführt.

Tab. 1.1. Unterscheidung der HSZ aufgrund ihrer molekularen Marker. Diese Marker lassen eine Unterteilung in drei Untergruppen zu, die *long term-hematopetic stem cells* (LT-HSZ), die *short term-hematopetic stem cells* (ST-HSZ) und die *multipotential progenitors* (MPP). (nach S. und M. Kühl: Stammzellbiologie, S. 107 [1])

Subpopulation	LT-HSZ	ST-HSZ	MPP
Oberflächenmarker	Lin ⁻ , Sca1 ⁺ , Kit ⁺ , Flt3 ⁻ , CD34 ^{low} N ⁻ Cad ⁺ , Tie2 ⁺	Lin ⁻ , Sca1 ⁺ , Kit ⁺ , Flt3 ⁻ , CD34 ⁺	Lin ⁻ , Sca1 ⁺ , Kit ⁺ , Flt3 ⁺ , CD34 ⁺

Alle drei Populationen sind undifferenziert und tragen auf ihrer Oberfläche keine der typischen *cluster of differentiation* Marker (CD Marker), wie sie auf differenzierten hämatopetischen Zellen wie z.B. Leukozyten zu finden sind, und werden daher als Lin⁻ bezeichnet. Weiterhin exprimieren alle drei HSZ Untergruppen *stem cell antigen 1* (Sca1) und den c-KIT Tyrosinkinase-Rezeptor (c-KIT bzw. CD117). Die *Fms-like tyrosine kinase 3* (Flt3) ist an der normalen Proliferation von hämatopoetischen Progenitorzellen maßgeblich beteiligt und wird von MPP exprimiert. Das Transmembranprotein CD34 wird als Marker für HSZ genutzt und ist auch auf primitiven, aus dem KM entstandenen Progenitorzellen nachzuweisen [5]. LT-HSZ weisen das größte Potenzial zur Langzeit-Repopulation auf und sind zusätzlich positiv für das Zelladhäsionsmolekül N-Cadherin und den Tyrosinkinase-Rezeptor Tie2 [1]. Das Potenzial zur Selbsterneuerung ist bei den ST-HSZ nur begrenzt, MPPs haben die Kapazität zur Selbsterneuerung verloren [6]. Mit den beiden einzigartigen Eigenschaften der Selbsterneuerung und Multipotenz, können aus den HSZ die verschiedenen Zelltypen des humanen Blutsystems entstehen [7]. Es wird unterschieden in Myelo-, Erythro- und Lymphopoese. Während die Ontogenese vieler hämatopoetischer Zellen bereits beschrieben ist, ist die Entwicklung der humanen Mastzellen aus HSZ bisher nur unvollständig bekannt (Abb. 1.1.).

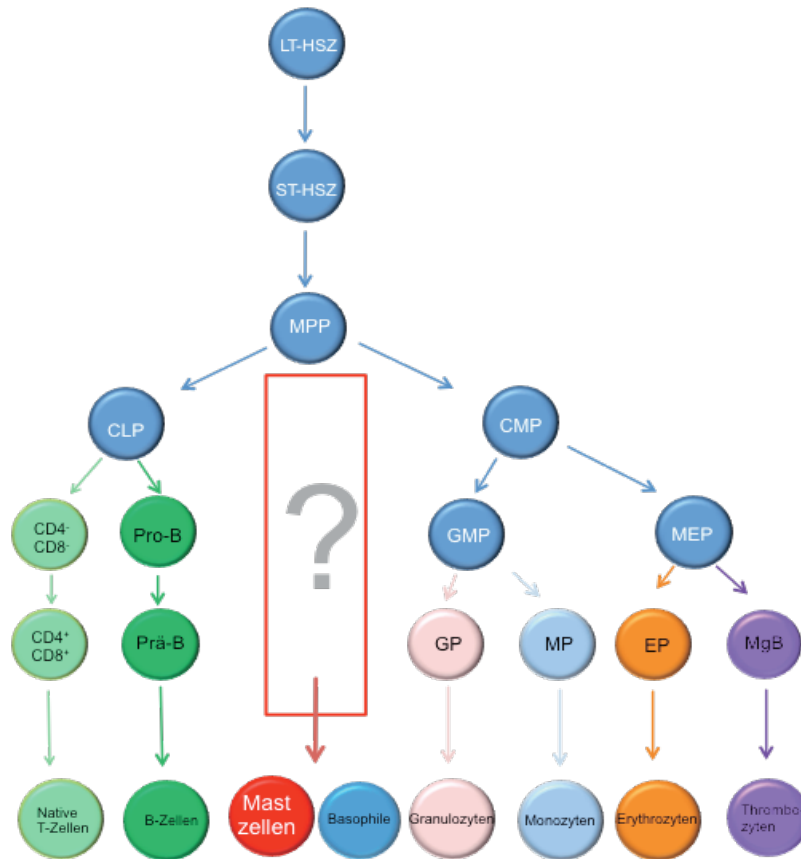


Abb. 1.1. Darstellung der normalen Hämatopoese im menschlichen Knochenmark und lymphatischen Organen. Aus Langzeit-HSZ (LT-HSZ) entstehen über Kurzzeit-HSZ (ST-HSZ) multipotente Progenitorzellen (MPP), die sich zu lymphatischen Progenitorzellen (CLP) oder myeloischen Progenitorzellen (CMP) weiterentwickeln können. CMP werden zu Progenitorzellen für Granulozyten-Makrophagen (GMP) oder Megakaryozyten-Erythrozyten (MEP). Aus CLPs werden CD4 und CD8 positive T-Zellvorläufer und Pro-B-Zellen, die weiter zu B-Zellen ausreifen [8].

Für das murine System existieren verschiedene Modelle, welche den Ursprung und die einzelnen Entwicklungsstufen der MZ Differenzierung aus HSZ beschreiben (Abb. 1.2.). Es existieren zwei grundlegende Theorien über die Vorläuferzellen der murinen MZ. Mastzellprogenitoren (MZP) entwickeln sich direkt aus multipotenten oder myeloischen Progenitorzellen (MPP oder CMP) oder aus bipotenten Vorläuferzellen (BMCP oder Prä-BMP). Die Hypothese einer gemeinsamen Entwicklungsstufe könnte die Ähnlichkeiten der MZ und basophilen Granulozyten erklären. Beide Zelltypen exprimieren den hoch-affinen IgE Rezeptor $Fc\epsilon RI$ und sind unter anderem als Immunmodulatoren bei IgE-vermittelten, allergischen Reaktionen bekannt. Auch die MZP im Blut von z.B. BALB/c Mäusen sind bereits durch Oberflächenmarker charakterisiert und werden als Lin^{-} , $c-KIT^{hoch}$, $ST2^{+}$, $Integrin \beta 7^{hoch}$, $CD16/32^{hoch}$ und $Fc\epsilon RI^{+}$ beschrieben [9].

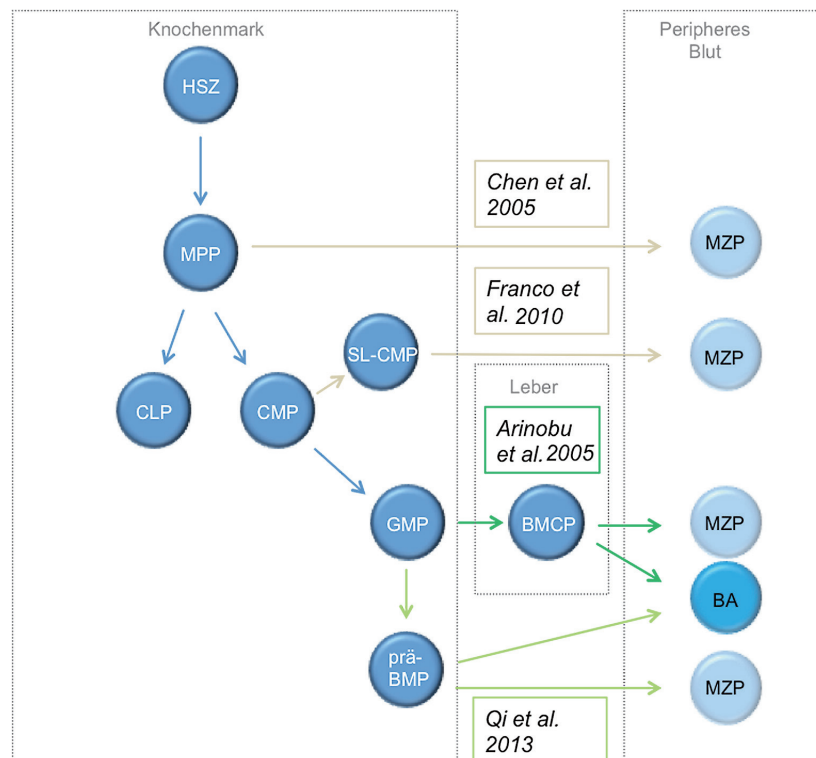


Abb. 1.2. Dargestellt sind die unterschiedlichen Hypothesen der Entwicklung muriner MZ aus HSZ im Knochenmark. Mastzellprogenitoren (MZP) entstehen aus multipotenten Progenitorzellen (MPP) oder gemeinsamen myeloischen Progenitorzellen (CMP) des Knochenmarks. Auch ist eine Differenzierung aus Progenitorzellen der Granulozyten/Monozyten (GMP) möglich. Nachfolgend entstehen aus diesen GMPs entweder gemeinsame Progenitorzellen für MZ und basophile Granulozyten (BMCP) in der Leber oder eine weitere Vorstufe: die präbasophile Granulozyten/MZ Progenitorzellen (Prä-BMP). Gemeinsam ist den Modelvorstellungen, dass die endgültige Ausreifung der Zellen erst im Blut (Basophile) bzw. in den Zielorganen (Mastzellen) vonstatten geht [8].

Die Entwicklung der MZ aus humanen HSZ, welche CD34 als hämatopoetisches Vorläuferzellantigen exprimieren, wurde in der vorliegenden Arbeit näher untersucht.

1.2. Die Mastzelle (MZ)

Gemeinsam mit basophilen Granulozyten bilden die MZ die wichtigsten Effektorzellen bei allergischen Reaktionen vom Typ 1. So sind MZ in die Pathogenese von allergischer Rhinitis, atopischer Dermatitis und Asthma involviert. Des Weiteren sind MZ maßgeblich für Mastozytose und akute/chronische Urtikaria verantwortlich. Bei der Mastozytose kommt es zu einer gesteigerten Anzahl an MZ in einem oder mehreren Organen [10]. Symptome wie Pruritus, Ulzera, Diarrhöe oder kognitive Symptome sind vor allem auf die Effekte der freigesetzten MZ Mediatoren (z.B. Histamin) zurückzuführen. Man unterscheidet systemische und kutane Mastozytoseformen [10].

MZ können neben diesen schädlichen, immunologischen Reaktionen auch protektive Effekte für den Organismus vermitteln. In einem Mausmodell der septischen Peritonitis z.B. konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von MZ die Sterblichkeit der Mäuse, im Vergleich zum Wildtyp, erhöhte [11, 12]. Viele weitere Beispiele zeigen, dass eine Erhöhung der MZ Anzahl Vorteile bedeuten können, um Infektionen zu kontrollieren und die Folgen zu bestimmen. Andererseits jedoch können MZ im Zuge eines anaphylaktischen Schocks rasch zum Tod führen [8].

Eine Vielzahl an Rezeptoren auf der Zelloberfläche der MZ beeinflussen und steuern die Proliferation, Migration und Aktivierung der Zellen. Die wichtigsten Rezeptoren für die Regulation der Zellfunktionen sind der c-KIT Rezeptor und der hochaffine IgE Rezeptor FcεRI [13]. Infolge der Sensibilisierung gegen Allergene wird spezifisches IgE gebildet und FcεRI Rezeptoren auf MZ gebunden. Der erneute Antigenkontakt führt zur Aggregation der FcεRI Rezeptoren durch Quervernetzung von antigenspezifischem IgE und schlussendlich zur MZ Degranulation und zur Freisetzung präformierter Mediatoren. MZ produzieren nach dieser durch IgE induzierten Aktivierung außerdem ein großes Spektrum von Lipiden, Mediatoren und Zytokinen.

Generell unterscheidet man 4 Gruppen an sezernierten Produkten [14] der MZ, die je nach Auslöser, pro-oder antiinflammatorisch sein können:

- a) Vorgeformte, granuläre Mediatoren: z.B. Histamin, Tryptase, Chymase, Serotonin, Heparin, Hydrolasen, Cathepsin, Carboxypeptidasen, Peroxidase
- b) Lipidmediatoren: z.B. LTB₄, PGE₂, PGD₂, LTC₄, PAF
- c) Zytokine: z.B. IFN-α, IFN-β, IFN-γ, TNF^d, TGF-β, MIP-1α, VEGF, LIF, GM-CSF, CP-1, IL-1α, IL-1β, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-6, IL-10, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-18, IL-25
- d) Antimikrobielle Peptide: z.B. Cathelicidine wie LL-37

Neben der Freisetzung von Histamin als wichtiger Aktivierungsmarker der MZ kann das Enzym β-Hexosaminidase nach erfolgter Degranulation bestimmt werden. Das Enzym β-Hexosaminidase spielt eine wesentliche Rolle in der Aufrechterhaltung der Zellhomöostase und ist in Lysosomen nachweisbar. In MZ wurde β-Hexosaminidase in

anderen Granula als in Lysosomen nachgewiesen und wird nach IgE vermittelter Quervernetzung der Fc ϵ RI Rezeptoren freigesetzt. Diese MZ Degranulation erfolgt beispielsweise auch nach Kontakt mit Bakterien [15], bakteriellen Bestandteilen [16] oder bakteriellen Toxinen [17, 18]. Die β -Hexosaminidase wird als nicht selektiver Marker für MZ Degranulation genutzt, die physiologische oder pathophysiologische Rolle des Enzyms in MZ ist bisher weitestgehend unklar. Fukuishi et al. [19] haben 2014 β -Hexosaminidase in MZ näher untersucht und konnten eine Funktion bei der Bekämpfung spezifischer Bakterien (*S. epidermidis*) bestätigen, jedoch keine Relevanz bei allergischen Reaktionen erkennen.

MZ entwickeln sich aus HSZ und reifen im Zielgewebe vollständig aus [20-22]. Das Überleben der MZ im Gewebe und die vollständige Differenzierung hängen stark von der Expression von CD117 und dem Vorhandensein seines Liganden *stem cell factor* (SCF) ab. Mäuse mit einer *loss-of-function* Mutation im Gen für CD117 oder SCF zeigen ein vollständiges Fehlen von MZ [23]. Reife MZ sind meist in der Nähe von Blutgefäßen, Nerven und Epithelien v.a. der Haut, der Atemwege und des Gastrointestinaltrakts zu finden. MZ sind langlebig und können durch erneuten Eintritt in den Zellzyklus lokal proliferieren [24, 25].

Auch wenn die Ontogenese der MZ bisher nicht ausreichend beschrieben ist, ist heute klar, dass TF maßgeblich an deren Differenzierung aus HSZ beteiligt sind, da diese die Genexpression direkt regulieren [26, 27].

1.3. Transkriptionsfaktoren (TF)

Die Differenzierung von MZ aus HSZ wird durch Änderungen im Genexpressionsmuster reguliert. Regulatoren hierfür sind beispielsweise mikro-RNSs, Zytokine und TF [28]. TF wirken aktivierend oder inhibierend auf die Transkription (lat.: transcriptio=Umschrift) von Genen. Sie enthalten DNS Bindedomänen (z.B. *helix-turn-helix*-Domäne, Zink-Finger-Domäne oder HMG-Box-Domäne) über die das Anheften an DNS Abschnitte nahe eines zu regulierenden Gens möglich ist. Aktivierende TF besitzen zusätzlich zur Domäne für die DNS Bindung spezifische Regionen, welche die Transkription durch Interaktion mit Komponenten des basalen Präinitiationskomplexes stimulieren können. Dieser Komplex besteht aus der RNS Polymerase II, einem Promotor und einigen TF,

welche die Positionierung und korrekte Bindung der RNS Polymerase koordinieren [29]. Inhibierende Faktoren hingegen können durch Interferenz mit der Aktivität eines positiv wirkenden Faktors dessen Effekt stören. Diese Inhibition ist z.B. durch das Verhindern der Bindung des aktivierenden Faktors möglich oder durch direkte Interaktion mit dem Faktor und die Blockierung der aktivierenden Domäne.

Die Aktivität der TF kann generell durch mehrere, nachfolgend aufgeführte Mechanismen beeinflusst werden:

- Regulation der Synthese
- Aktivierung (Ligandenbindung, Phosphorylierung, Interaktion mit anderen Faktoren)
- Verfügbarkeit von Cofaktoren

Eine Regulation des Syntheseorts erfolgt beispielweise durch das Vorhandensein eines TF in nur einem bestimmten Gewebe oder in nur einem Zelltyp (z.B. Myogener Faktor 3, welcher nur in Skelettmuskeln synthetisiert wird) [30]. Manche TF sind weiterhin nur aktiv, wenn zuvor ein externer Stimulus wirkt. So wird z.B. *nuclear factor for IL-6 expression* (NFIL-6 β) als Reaktion auf eine Exposition mit IL-6 synthetisiert [31]. TF können ebenfalls durch die Aktivierung von bereits vorhandenen TF reguliert werden. Die NFIL-6 β -Synthese, induziert durch IL-6, wird ergänzt durch die Aktivierung von NFIL-6 und STAT-3, die bereits in unstimulierten Zellen inaktiv vorhanden sind [32]. Auch durch Phosphorylierung kann ein TF reguliert werden. So wird in dem oben genannten Beispiel STAT-3 durch eine Janus Kinase (JAK) phosphoryliert, kann somit dimerisieren, in den Kern migrieren und die Genexpression aktivieren [33].

Änderungen der TF können massive Auswirkungen haben und sich z.B. wie folgt äußern:

- Zu Entwicklungsstörungen führen (z.B. Inaktivierung des Gens für *CREB-Binding-Protein* (CBP) beim Rubinstein-Taybi Syndrom)
- Erkrankungen des Hormonhaushaltes fördern (z.B. mutierte Thyroid-Hormon Rezeptoren verursachen mentale Retardation)

- Krebsentstehung fördern (z.B. Mutation im Gen für p53 beim Li-Fraumeni-Syndrom)

Die durch TF beeinflusste Entwicklung humaner MZ aus HSZ steht im Fokus dieser Arbeit, wobei bereits veröffentlichte Studien die Auswahl der zu testenden TF bestimmten. Hierbei wurden TF ausgesucht, die nachweislich die Entwicklung der MZ beeinflussen (z.B. TF der GATA-Familie; Spl1 Protoonkogen). Weiterhin wurden TF gewählt, die erst bei reifen MZ eine Rolle spielen (z.B. *Myc associated zinc finger protein* (MAZR)) oder einen Einfluss auf die Funktionalität der Zellen (z.B. STAT Faktoren) haben.

Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit ist, ob durch den Einfluss eines TF MZ aus CD34⁺ SZ differenzierbar sind. Von den nachfolgend ausführlich beschriebenen TF war bekannt, dass sie für MZ Differenzierung oder Effektorfunktionen relevant sind.

1.4. Relevante TF für MZ im murinen und humanen System

Bisher sind für das humane System nur wenige TF bestätigt, die für die MZ Entwicklung und deren Funktion eine Rolle spielen. Das Wissen über relevante TF stammt daher vorrangig aus Studien mit genmanipulierten Mäusen bzw. Untersuchungen an primären, murinen MZ. Nachfolgend werden die TF näher erläutert, welche zur Beantwortung der Fragestellung dieser Arbeit getestet wurden.

Der TF GATA-1 wurde für die Entwicklung von murinen und humanen MZ als relevant beschrieben. Im murinen System wird GATA-1 als Regulator mit der MZ Entwicklung in Zusammenhang gebracht, da eine Unterexpression mit morphologisch abnormen, unreifen MZ assoziiert ist [34]. Das GATA-1 Transkript lässt sich auch in humanen Haut MZ nachweisen. Eine hohe Expression wird hier jedoch von Babina et al. [35] mit einem niedrigen Entwicklungsgrad der Zellen in Zusammenhang gebracht.

Der TF GATA-2 wurde von Walsh et al. [36] in Kombination mit PU.1 als essenziell für die murine MZ Entwicklung beschrieben, als wichtiger Faktor für das Überleben und die Proliferation von MZ Vorläuferzellen. Im Einklang mit diesen Ergebnissen wird GATA-2

auch als eines der häufigsten Transkripte in humanen Haut MZ beschrieben [35]. Babina et al. [35] haben weitere TF gefunden, die in humanen MZ hoch exprimiert sind. Dazu gehören *stem cell leukemia* (SCL), *ETS domain transcription factor 1* (ELF-1) und das Fos Proto-Onkogen C-FOS. Auch die Expression des FcεRI Rezeptors wird durch die TF PU.1, GATA-1 und GATA-2 beeinflusst. Inage et al. zeigten, dass siRNS gegen diese drei Faktoren das α-Transkript des FcεRI Rezeptors in LAD2 und primären humanen MZ inhibiert und auch die IgE abhängige Degranulation verhindern konnte. GATA-2 spezifische siRNS blockierte des Weiteren auch die Transkription der β Unter-einheit [37]. Eine Verbindung von GATA-2 und STAT5 wurde 2015 von Li et al. [38] beschrieben, dieser Signalweg spielt eine kritische Rolle in der MZ Entwicklung und Aufrechterhaltung. Nachfolgende Untersuchungen von Li et al. [39] zeigten, dass GATA-2 die Expression des Histamingens reguliert und weitere TF wie MITF und BHLHE-40 beeinflusst. BHLHE-40 ist dabei nicht, wie MITF, an der IgE-abhängigen MZ vermittelten Anaphylaxis beteiligt [39].

Der TF GATA-3 wurde zusammen mit GATA-1 und GATA-2 in MZ detektiert und reguliert die Promotoraktivität des Gens für die MZ Carboxypeptidase A [40]. Weiterhin fördert die Koexpression von HES-1 und GATA-3 die Differenzierung zu MZ in murinen GMPs oder CMPs, wobei die Faktoren einzeln untersucht diesen Effekt nicht haben [41].

Auch STAT-Proteine, die über den Jak-STAT-Signalweg an Zellproliferation und Homeostase beteiligt sind, wurden als relevant für die MZ Funktionen beschrieben [42]. Eine Studie mit Phospholipase C defizienten Mäusen als Model für atopische Dermatitis (AD) zeigte eine Erhöhung der MZ Zahl in der Haut der Mäuse. Diese Erhöhung wurde auf eine gesteigerte STAT5b Aktivität zurückgeführt. Die PLC-β3-Expression von MZ korreliert negativ mit der phosphorylierten Form von STAT5b. Die vermehrte Anzahl an MZ in Läsionen von AD Patienten ist wohl die hohen Level an phosphoryliertem STAT5b zurückzuführen. Die Regulation von STAT5b in MZ erscheint daher wichtig für die Pathogenese von AD [43]. Auch konnte 2006 von Barnstein et al. [44] gezeigt werden, dass STAT5b eine regulatorische Wirkung auf die IgE-vermittelte Zytokinproduktion hat. STAT5b defiziente Mäuse reagierten mit erniedrigter IL-6- und IL-13-Produktion nach IgE-vermittelter systemischer Anaphylaxie. In MZ aktivieren die Zytokine IL-3 und SCF STAT5a und STAT5b *in vivo* und *in vitro* [45] als wichtige

Regulatoren für Zellentwicklung und Überleben. Ein knockout des STAT5a Gens in Mäusen führte zu gesteigerter Apoptose und reduzierter Expression des *B-cell lymphoma-extra large* Gens (BCL-XL) [46]. Studien mit siRNS gegen STAT5a oder STAT5b bestätigten den Einfluss von STAT5b auf die Produktion und Regulation der IgE-induzierten Zytokine IL-13 und MIP-1 α [47]. Ein weiterer Faktor aus der Familie der STAT - Faktoren ist STAT4. Das STAT4 Protein wurde 2005 von Kataoka et al. [48] in *connective tissue type mast cells* (CTMCs), nicht aber in *mucosal mast cells* (MMC) bei Mäusen nachgewiesen. Der Faktor induzierte eine Verschiebung des Zytokinmusters von T-Helferzellen zu einer Th1-Immunantwort durch Hochregulation von Interferon- γ (IFN- γ) und IL-18R α . Ein weiterer Faktor der in der vorliegenden Studie untersucht wurde ist JAK2. Transgene Mäuse, welche die JAK2V617F Mutation aufweisen, zeigen den Phänotypen der Polyzythaemia vera [49], eine seltene myeloproliferative Erkrankung, bei der Patienten häufig auch an Pruritus (Juckreiz) leiden. Jin et al. konnten in der Haut von Prurituspatienten eine massive Ansammlung von MZ beobachten. *In vitro* kultivierte MZ der Patienten zeigten, bei normaler Morphologie der Zellen, eine gesteigerte Proliferation und Wachstumsvorteile gegenüber Kontroll-MZ durch eine Resistenz vor Zelltod [49].

Für die TF STAT5b, JAK2 und GATA-2 sind bereits Mutationen bekannt, die für die vorliegende Studie genutzt wurden. Die in der vorliegenden Arbeit genutzten Mutationen Y665F und N642H im STAT5 Gen wurden von Rajala et al. 2013 [50] in mononukleären Zellen von Patienten mit *T-Large Granular Lymphocyte*-Leukämie entdeckt. Diese Mutationen sind aktivierend und steigern die Transkription des STAT5b durch Erhöhung der Phosphorylierung. Im Zuge eines Screenings bei Down-Syndrom Patienten, welche häufig an akuten Leukämien leiden, wurde die *gain-of-function* Mutation R683G im JAK2 Gen gefunden. Diese führt unabhängig von Wachstumsfaktoren zu einer grundsätzlichen Aktivierung des JAK/STAT Signalwegs und somit zu einer Überproduktion an Blutzellen [51]. Für den TF GATA-2 wurden in DNS Proben von Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie zwei neue Mutationen in der kodierenden Region des Gens gefunden. Eine der Mutationen (L359V) führt dabei zu einer gesteigerten Aktivität des GATA-2 [52] und wurde für die vorliegende Studie genutzt.

Die mutierten Sequenzen der TF STAT5b und GATA-2 wurden genutzt, da bereits eine Relevanz für die MZ Entwicklung beschrieben wurde und um die Expression der Gene in den CD34⁺ SZ zu gewährleisten. Da JAK2 die generelle Produktion von Blutzellen fördert, wurde der TF auf seine Wirkung speziell auf die Produktion von MZ untersucht.

Weiterhin wurde der *Microphthalmia-associated transcription factor* (MITF) als TF getestet. Dieser wurde im murinen System von Calero-Nieto et al. [53] und Kitamura et al. [54] als wichtig für die Entwicklung von normalen MZ beschrieben. Lee et al. [55] konnten 2010 eine Splicevariante des MITF, das MITF-A, in MZ beschreiben, die aus humanen CD34⁺ Zellen generiert wurden. Insgesamt existieren mindestens 9 Isoformen des MITF, unter anderem auch das MZ spezifische MITF-MC [56]. Murakami et al. konnten mit ihrer Studie weiterhin bestätigen, dass in murinen MZ die MITF Isoformen A, E, H, J und M exprimiert werden [56]. In der vorliegenden Studie wurde die MITF-MC Isoform genutzt. Für das murine System wurde von Morii et al. MAZR als direkter Partner von MITF gefunden [57]. Simultane Transfektion mit MAZR und MITF aktivierte das Gen für *mouse mast cell protease 6* (mMCP-6). MCP-6 ist eine β -Tryptase, welche nach Aktivierung der MZ freigesetzt wird und eine Rolle in der Pathogenese von Asthma und andere allergischen Erkrankungen in Mausmodellen haben soll [58]. Eine weitere Studie mit murinen, MAZR defizienten MZ aus dem Knochenmark zeigte, dass MAZR alleine als Repression der Transkription dient und eine eher geringere Rolle bei der Regulation der frühen und späten Effektorfunktionen als Reaktion auf Fc ϵ RI Stimulation spielt [59]. Ein weiterer Faktor ist das antiapoptotisch wirkende Molekül BCL-XL, welches 2014 von Wang et al. [60] als fördernd für das Überleben von MZ im murinen und auch humanen System beschrieben wurde. Hierbei wirkt es über die IL-33/ST2 Achse und kann somit zu einer Vermehrung der MZ während inflammatorischer Prozesse führen. Die membrangebundene Form des ST2, der Rezeptor für das proinflammatorische Zytokin IL-33, aktiviert den MyD88/NF- κ B Signalweg und steigert so die Funktionen von Mastzellen, regulatorischen T-Zellen und den *innate lymphoid cells type 2* [61]. Auch Mekori et al. konnten 2001 bestätigen, dass die Apoptose humaner MZ durch die Proteine *B-cell lymphoma 2* (BCL-2) und BCL-XL reguliert wird. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass SCF die BCL-2- und BCL-XL- assoziierte Apoptose unterdrückt und somit ein wichtiger Überlebensfaktor für MZ ist [62]. Da sich allergische Reaktionen zu wiederkehrenden Zeiten zeigen untersuchten Baumann et al. [63] das Vorhandensein einer biologischen Uhr in MZ, als wichtige Effektorzellen bei

Allergien. Die Existenz und Funktionalität der zirkadianen Uhr in MZ konnte bestätigt werden. Als ein regulatorisches Gen dieser zirkadianen Uhr [64] wurde in der vorliegenden Arbeit der TF NR1D1 untersucht.

Die beschriebenen TF wurden z.B. durch die Verwendung von siRNS [37], Mausmodellen [44, 57] oder quantitativer Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion [35] als wichtige Faktoren für die MZ Entwicklung bestätigt. Eine weitere Möglichkeit relevante TF zu untersuchen, besteht darin, die TF-kodierenden Gene durch lentivirale Vektoren direkt in das Genom der HSZ zu integrieren. Diese Methode wurde in der vorliegenden Arbeit angewendet. Die Gensequenzen der oben beschriebenen TF (GATA-1, -2 und -3, BHLHE-40, PU.1, HES-1, STAT5b und STAT4, JAK2, MITF, MAZR, BCL-XL, NR1D1) wurden hierfür von der Firma Thermo Fischer Scientific synthetisch hergestellt. Zusätzlich wurden nachfolgende TF hergestellt, für die ein direkter Einfluss auf MZ oder ihre Entwicklung bisher nicht beschrieben ist:

- HMOX1 konnte in neoplastischen MZ von Mastozytose Patienten nachgewiesen werden [65].
- REPRIMO ist ein Tumorsuppressorgen, welches die Reparatur und Apoptose von geschädigter DNS reguliert [66, 67].

Des Weiterem wurde eine Kombination aus jeweils vier TF synthetisch hergestellt, die bereits in der frühen Entwicklungsphase der MZ eine Rolle spielen. Die Konstrukte GATA-2-PU1-HES1 und MITF-GATA-1-PU1 wurden dabei jeweils mit dem Faktor BCL-XL kombiniert, welcher als antiapoptotischer Überlebensfaktor bekannt ist.

Die insgesamt hergestellten 17 TF wurden für die vorliegende Studie in zwei lentivirale Zielvektoren ligiert und nach Generierung lentiviraler Partikel durch Infektion in das Genom von HSZ übertragen. Das Ziel war die Ausdifferenzierung der HSZ zu MZ durch den Effekt eines TF bzw. durch die Kombination von vier TF.

1.5. Lentivirale Expressionssysteme für den Gentransfer in HSZ

Der Gentransfer in HSZ kann generell durch virale oder nicht-virale Systeme erfolgen. Als Techniken für den nicht-viralen Weg unterscheidet man die chemische (z.B. Lipofectamin) und mechanische (Elektroporation) Übertragung von Plasmiden, welche das Zielgen enthalten [68]. Die genetische Manipulation von HSZ wird durch die schlechte Effizienz des Gentransfers erschwert. Als Ursache hierfür wird beispielsweise die durch Elektroporation verursachte Apoptose der HSZ beschrieben [69] oder toxische Effekte des Lipofectamins, welche mit der Zeit zu einem sukzessiven Verlust der transfizierten Zellen führen [68]. Virale Methoden basieren auf dem viralen DNS-Rückgrat von beispielsweise Retro - oder Lentiviren, welche das zu übertragende Zielgen enthalten.

Zur Beantwortung der Fragestellung, ob sich CD34⁺ SZ durch den Einfluss eines TF zu MZ ausdifferenzieren lassen, wurden in der vorliegenden Arbeit lentivirale Expressionssysteme verwendet. Die genetische Modifikation von HSZ durch solche lentiviralen Vektoren steht im Fokus der Wissenschaft, um z.B. hämatologische Erkrankungen zu behandeln oder die humane Hämatopoese näher zu untersuchen. Da Lentiviren (bekanntester Vertreter ist das Humane Immundefizienz Virus (HIV)) als Besonderheit auch nicht-proliferierende Zellen infizieren können, werden sie zunehmend in der Gentherapie eingesetzt [70]. Seitdem die ersten, auf HIV-1 basierenden, lentiviralen Vektoren entwickelt wurden, die nicht-teilende Zellen *in vitro* und *in vivo* infizieren konnten [71], erfolgte eine fortwährende Optimierung. Letztendlich sollten nur die für Verpackung und Freisetzung der lentiviralen Partikel essenziellen Gene des HIV-1 Genoms genutzt werden. In Abbildung 1.3. ist das komplette Genom des HI-1 Virus dargestellt. HIV-1 besitzt neben den Strukturgenen *gag*, *pol* und *env* die regulatorischen Gene *rev* und *tat*, welche für die virale Replikation notwendig sind. Das Zusammenspiel von *tat* und *rev* ermöglicht die Expression der Strukturgene und die Produktion neuer Viruspartikel. Dull et al. konnten 1998 [72] zeigen, dass die *trans* wirkende Funktion des *tat* Elements entbehrlich ist, wenn ein Teil des vorgelagerten LTR im Transfervektor durch konstitutiv aktive Promotersequenzen ersetzt wird. Somit ist die Expression des Transferplasmid nicht länger von einer *tat* Aktivierung abhängig, und es sind nur noch drei (*gag*, *pol* und *rev*) anstelle von neun HIV-1 Genen notwendig, um lentivirale Partikel zu produzieren.

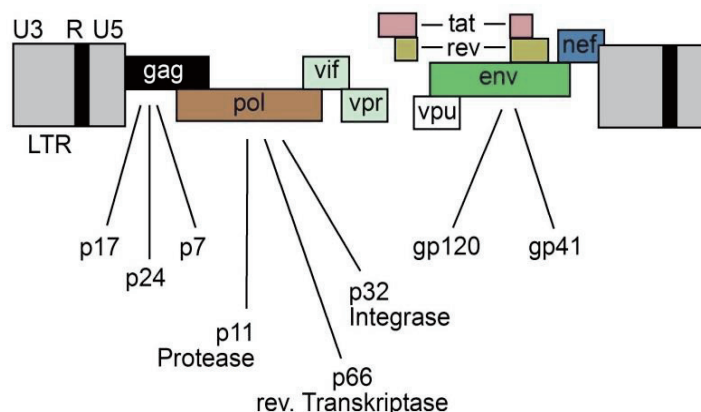


Abb. 1.3. Aufbau des retroviralen Genoms (HIV-1). Das gruppenspezifische Antigen (gag), die Polymerase (pol) und die Hülle (env) bilden die verhältnismäßig größten Gene und werden von den LTRs (long terminal repeats) begrenzt. Zusätzlich sind die viralen Proteine R (vpr) und U (vpu) und das Produkt des vif Gens für die virale Infektiosität enthalten. Der Transaktivator (tat), der Regulator der viralen Expression (rev) und der Negativ-Regulator (nef) steuern des Weiteren die Transkription der Viren [73].

Drei Generationen lentiviraler Verpackungssysteme wurden (aufbauend auf dem HIV-1 Genom) bereits entwickelt, wobei die dritte Generation des Systems zu Beginn dieser Arbeit die größtmögliche Sicherheit bot. Die Aufteilung (Abb. 1.4.) in ein Expressionssystem mit vier Plasmiden (zwei Verpackungsplasmide (*gag/pol* und *rev*), ein Hüllprotein (*env*) und ein Transferplasmid) minimiert weiterhin die Möglichkeit, dass sich teilungsfähige Viren durch Rekombination bilden. Die Gefahr des zufälligen Einbaus des Provirus in das Genom des Wirts wurde durch die Entwicklung sogenannter Selbstinaktivierender (SIN) Transfervektoren bewältigt, denen die viralen Sequenzen für Enhancer und Promotor fehlen [74]. Die Selbstinaktivierung basiert auf einer Deletion in der U3 Region des 3' *long terminal repeat* (LTR) der DNS, die zur Produktion der viralen RNS verwendet wird. Diese Deletion wird während der reversen Transkription auf den 5' LTR der proviralen DNS übertragen. Das Auflösen der Aktivität der LTRs während der Transkription verhindert die Produktion von sogenannten *replication-competent lentivirus* (RCLs) in den transduzierten Zellen [75]. Weiterhin wird auch das Risiko der Insertionsmutagenese, welche durch den zufälligen Einbau eines DNS Fragments eine Mutation eines Gens erzeugt, minimiert.

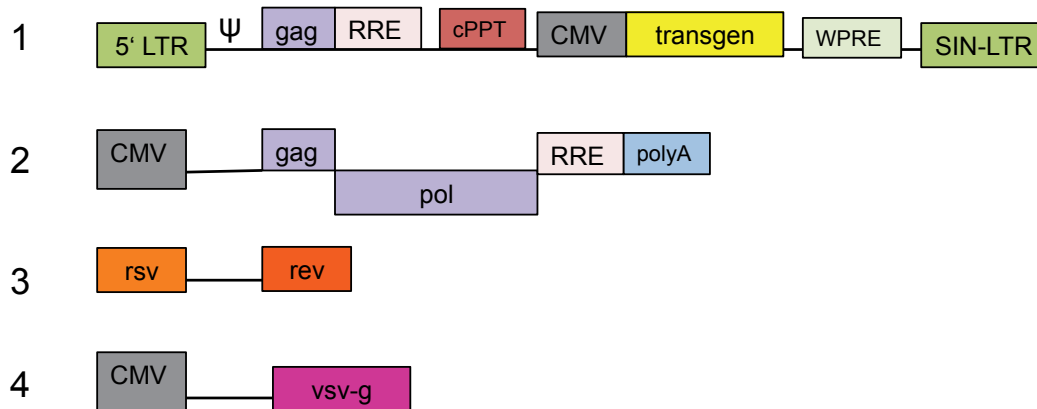


Abb. 1.4. Dargestellt sind die Bestandteile des lentiviralen Expressionssystems der dritten Generation. Die Komponenten sind hier auf vier Plasmide aufgeteilt. Der Transfervektor (1) enthält den selbst-inaktivierenden 3' LTR (SIN-LTR), das *rev response element* (RRE), das *Whoodchuck Hepatitis Virus Post-Transcriptional Element* (WPRE) und das Ψ -Element (*psi*). In dieser Abbildung wird der CMV Promotor genutzt, dieser ist durch z.B. den EF-1 α , PGK oder CAG Promotor austauschbar. Das Verpackungsplasmid (2) enthält die *gag* und *pol* Gene und ebenfalls das RRE Element. Durch das *rev* Plasmid (3) wird der Transport in den Zellkern von RRE enthaltenden Plasmiden gewährleistet. Das Hüllplasmid (4) kodiert als Alternative zur HIV-1 Hülle das Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV) (modifiziert nach [76]).

Die einzelnen Komponenten der verwendeten lentiviralen Expressionssysteme werden im Methodenteil anhand der eingesetzten Vektoren näher erläutert.

1.6. Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Studie war die Generierung von MZ aus humanen CD34⁺ HSZ durch die Wirkung eines TF oder einer TF Kombination. Im Hauptfokus der Arbeit stand hierbei die Frage, ob durch den Effekt einzelner TF die MZ Entwicklung aus humanen HSZ möglich ist und ob die Ergebnisse mit den Studien im murinen System korrelieren. Nach erfolgter Infektion der humanen CD34⁺ HSZ, mit jeweils einem TF oder der kombinierten TF, wurden die Zellen daher nach zwei oder drei Wochen auf die Expression von mastzellspezifischen Markern hin überprüft. Weiterhin wurde die Effizienz dieser Gen-übertragung durch Messung des fluoreszierenden Markers analysiert und die Funktionalität der Zellen durch Messung von mastzellspezifischen Granula untersucht. Zudem sollte die Studie klären, ob der Einfluss der TF die MZ Entwicklung, im Vergleich zu IL-3/SCF kultivierten PSCMCs, beschleunigt. Hier war auch von Interesse, ob sich die Anzahl an ausdifferenzierten MZ erhöht.

2. Material

2.1. Zellen und Zelllinien

Tab. 2.1. Zellen und Zelllinien

Zellen	Herkunft	Referenz
293FT	Schnell wachsende Variante der HEK (<i>human embryonic kidney cells</i>) 293 Zellen	[77]
CD34 ⁺ SZ	Isoliert aus humanen, autologen Stammzellkonzentraten	[78]
HT1080	Humane Fibrosarkom Zelllinie	[79]
LAD2	Differenziert aus Mastozytose Patienten	[80]
One Shot Top10/Stbl3 <i>E. coli</i>	Chemisch kompetente <i>E. coli</i> Zellen	[81]
SeAx	Zelllinie von Patienten mit Sézary Syndrom	[82]

2.2. Plasmide

Tab. 2.2. Plasmide

Plasmide	Funktion	Hersteller
CS-CA-RfA-IRES2-Venus	Zielvektor	RIKEN
CS-CA-GFP	Kontrollvektor	RIKEN
CS-CDF-EG-PRE	Kontrollvektor	RIKEN
MITF, STAT5b, GATA-1, JAK2, BCL-XL, BHLHE40, STAT4, PU.1, MAZR, REPRIMO, HES-1, HMOX1, NR1D1, GATA-2, , MITFGATA1PU1BCLXL, GATA2PU1HES1BCLXL	Eingangsvektoren	Thermo Fischer Scientific
MDLg/pRRE	Verpackungsvektor	Addgene
pCMV-VSV-G	Hüllvektor	Addgene

pENTR5'/EF1 α p	Eingangsvektor	Thermo Fischer Scientific
pLenti6.4/R4R2/V5-Dest	Zielvektor	Invitrogen
pRSV-Rev	Regulatorischer Vektor	Addgene

2.3. Zellkulturmedien und Zusätze

Tab. 2.3. Zellkulturmedien und Zusätze

Produkt	Hersteller
CD34 ⁺ Expansionszusatz	STEMCELL Technologies
Fetales Kälberserum	Gibco
Humanes Lipoprotein	STEMCELL Technologies
LB Agar	Thermo Fischer Scientific
LB Medium	Thermo Fischer Scientific
L-Glutamin	Sigma-Aldrich
Natrium Pyruvat	Sigma-Aldrich
Penicillin und Streptomycin	Sigma-Aldrich
RPMI-1640	Merck Biochrom
SFEM I	STEMCELL Technologies

2.4. Puffer, Reagenzien und Chemikalien

Tab. 2.4. Puffer, Reagenzien und Chemikalien

Produkt	Hersteller
Agarose	Biozym
Aceton	Sigma-Aldrich
Blasticidin	Thermo Fischer Scientific
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich

EDTA	Hollborn & Söhne
Ethanol (100%)	Herbeta
Geneticin (G418)	Thermo Fischer Scientific
Gentamicin	Biochrom
5000 IE Heparin	Ratiopharm
Humanes Serumalbumin (20%)	Baxter
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	Biochrom
Hydroxyethylstärke 6%	Fresenius Kabi
IgE	Millipore
Ionomycin	Sigma-Aldrich
4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid-hydrat	Sigma-Aldrich
Natrumdodecylsulfat	RefLab
Perchlorsäure	RefLab
o-Pfthaldialdehyd	RefLab
Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfon Säure)	RefLab
Phosphatgepufferte Salzsäure	Sigma-Aldrich
PicoGreen	Thermo Fischer Scientific
Privigen	CSL Behring
Sytox Green	Thermo Fischer Scientific
TRIS-Acetat-EDTA Puffer	AppliChem
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trypanblau	Merck-Millipore
Trypsin EDTA	Lonza
Verdünnungsmedium	RPML-1640 mit 5000 IE Heparin
Vitronectin	Thermo Fischer Scientific
Xylol	Roth

2.5. Zytokine

Tab. 2.5. Zytokine

Produkt	Hersteller
CD34 ⁺ Expansionszusatz (Flt3-L, TPO, IL-6, IL-3, SCF)	STEMCELL Technologies
IL-3	Biologend
SCF	Miltenyi

2.6. Restriktionsenzyme

Tab. 2.6. Restriktionsenzyme

Enzym	Hersteller
EcoRV	Thermo Fischer Scientific
XhoI	Thermo Fischer Scientific
Apal	Thermo Fischer Scientific

2.7. Antikörper

Tab. 2.7. Antikörper

Produkt	Fluorophor	Klon	Hersteller
Anti-Human-CD117	PE	104D2	Biologend
Anti-Human-CD34	APC	561	Biologend
Anti-Human-IgE	Kein Marker	MHE-18	Biologend
Anti-Human-Fc epsilon Rezeptor	APC	AER-37	Biologend
IgG2b kappa Isotyp	APC	MPC-11	Biologend
IgG1 kappa Isotyp	PE	RMG1-1	Biologend

2.8. Kommerzielle Kits

Tab. 2.8. Kommerzielle Kits

Produkt	Hersteller
<i>EasySep Human CD34 Positive Selection Kit</i>	STEMCELL Technologies
Effectene Transfektionsreagenz	Quiagen
Gateway LR Clonase II Enzym Mix	Thermo Fischer Scientific
PureYield Plasmid MAXIpräp System	Promega
PureYield Plasmid MINIpräp System	Promega
RLA 210 Histamin KIT	RefLab
RLA 216 Kalibrations KIT	RefLab
RLA 700 Reagenz KIT	RefLab

2.9. Verbrauchsmaterialien

Tab. 2.9. Verbrauchsmaterialien

Produkt	Model	Hersteller
Einmalkanülen	0,3 x 12 mm	Braun
Omnifix Einmalspritzen	20 ml	Braun
Petrischalen	94 x 16 mm	Greiner Bio-one
Polystyrolröhrchen	5 ml	Corning
Reaktionsgefäße	1,5 ml, 2 ml	Eppendorf
Röhrchen	50 ml	Falcon
Sterile Einmalfilter	40 µm, 100 µm	Falcon
Sterile serologische Pipetten	5 ml, 10 ml, 25 ml	Falcon
Mikrotiterplatte	96-Well	Greiner Bio-one
Mikrotiterplatte (schwarz)	96-Well	Corning
Objektträger	SuperFrost	Sarstedt

Pipettenspitzen	10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt
Pipettenspitzen mit Filter	1000 µl	Biozym
Zellkulturflaschen	175 cm ²	Sarstedt
Zellkulturflaschen	75 cm ²	Falcon
Zellkulturplatten für Suspensionszellen	6-Well, 12-Well	Falcon
Zellkulturplatten für Gewebekultur	6-Well, 12-Well	Falcon
Zellschaber	2-Positionen-Klinge	Sarstedt

2.10. Zusätzliche Materialien

Tab. 2.10. Zusätzliche Materialien

Produkt	Hersteller
EasySep Magnet	STEMCELL Technologies
Autoklavierbarer Zellfilter	Sigma-Aldrich

2.11. Geräte

Tab. 2.11. Geräte

Gerät	Model	Hersteller
CO ₂ Inkubator	Heracell150	Thermo Fischer Scientific
Durchflusszytometer	MACS Quant	Miltenyi
Durchlichtmikroskop	CKX 41	Olympus
Geldokumentation	Quantum ST5	Vilber
Histamin Messung	Histareader 501	RefLab
Kamera	DP 27	Olympus
UV-Spektralphotometer	BioSpectrometer	Eppendorf
Neubauer Zählkammer	0,1 mm	Marienfeld
Pipetten	0,1 µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf
Pipetus	100-240 Volt	Hirschmann

Sicherheitswerkbank	BIOWIZARD (BSK 6 MP)	Kojair Tech Oy Antair
Mikrotiterplatten Leser	Victor X5	Perkin Elmer
Vortexer	REAX1	Heidolph
Wasserbad	Typ 103	GFL
Zentrifugen	5810 R	Eppendorf

2.12. Zusätzliche Geräte im S2 Labor

Tab. 2.12. Zusätzliche Geräte im S2 Labor

Gerät	Model	Hersteller
CO ₂ Inkubator	Heracell 150i	Thermo Fischer Scientific
Durchflusszytometer	Calibur	BD Biosciences
Durchlichtmikroskop	VisiScope 100	VWR
Fluoreszenzmikroskop	EVOS	Thermo Fischer Scientific
Sicherheitswerkbank	Herasafe KS	Thermo Fischer Scientific
Zentrifuge	Megafuge 16R	Thermo Fischer Scientific

2.13. Software zur Datenanalyse

Tab. 2.12. Software zur Datenanalyse

Programm	Verwendung	Hersteller
NEBcutter	Darstellung der Schnittstellen für Restriktionsenzyme	New England BioLabs
FlowJo	Auswertung durchflusszytometrischer Messungen	Treestar
Prism	Statistische Auswertung	GraphPad
SnapGene Viewer	Darstellung von Plasmiden	GSL Biotech

2.14. Hersteller und Vertreiber

Tab. 2.14. Hersteller und Vertreiber

Hersteller	Vertreiber
Addgene	Addgene, LGC Standards, Teddington, UK
AppliChem	AmmliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Baxter	Baxter, Unterschleißheim, Deutschland
BD	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Behring	CSL Behring, Marburg, Deutschland
BioLegend	BioLegend, San Diego, CA, USA
Braun	B Braun AG, Melsungen, Deutschland
Biozym	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Corning	Corning, New York, USA
Eppendorf	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
GraphPad	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA
Greiner Bio-One	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Heraeus	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Hollborn & Söhne	Dr. K. Hollborn & Söhne GmbH & Co. KG, Leipzig, Deutschland
Invitrogen	Invitrogen AG, Carlsbad, CA, USA
Koyair Tech Oy	Koyair Tech Oy, Vilppula, Finnland
life technologies	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Marienfeld	Marienfeld GmbH & Co. KG, Königshofen, Deutschland
Merck	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Miltenyi	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Perkin Elmer	Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA
Qiagen	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Ratiopharm	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
RefLab	Kopenhagen, Dänemark

RIKEN	RIKEN, Japan
ROTH	Carl ROTH GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Sarstedt	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht-Rommelsdorf, Deutschland
Sigma-Aldrich	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Stemcell	STEMCELL Technologies, Vancouver, Kanada
Thermo Fischer Scientific	Thermo Fischer Scientific Inc., Walldorf, Deutschland
Vilber	Vilber Lourmat GmbH, Eberhardzell, Deutschland

3. Methoden

3.1. Methoden für Zellkultur

3.1.1. Herstellung der Master- und Arbeitszellbank der 293FT-, HT1080- und SeAx-Zellen

Das Benutzen einer Zelllinie über mehrere Zyklen erfordert das Herstellen einer Master- und Arbeitszellbank (MZB und AZB). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde für die virusproduzierenden 293FT-Zellen, die zur Virustitration genutzten HT1080-Zellen und die als Kontrolle genutzten SeAx-Zellen jeweils eine MZB und AZB hergestellt. Die gefrorenen Originalzellen wurden hierfür soweit expandiert, bis 15 T175 Flaschen konfluent bewachsen waren. Dies entsprach einer Zellzahl von ca. 20×10^6 Zellen pro Flasche. Die Zellen wurden jeweils mit 10 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen, dann mit je 2 ml kalter Trypsin/EDTA- Lösung vom Boden der Zellkulturflasche gelöst, vereint und nach Zugabe von 5 ml fetalem Kälberserum (FCS) abzentrifugiert ($100 \times g$, 8 min, 4°C). Es erfolgte das Resuspendieren in kaltem Einfriermedium (90% FCS, 10% DMSO). Die Zellen (ca. 1×10^6) wurden zu je 1 ml/Kryoröhrchen in einem Gefrierbehälter bei -80°C eingefroren. Mit diesem Behälter ist die Konservierung von Zellen durch eine Kühlrate von $-1^\circ\text{C}/\text{Minute}$ optimiert. Nach zwei Tagen wurden diese Zellen als MZB bei -140°C eingefroren und ein Röhrchen erneut in Kultur genommen. Es erfolgte erneut die Expansion auf 10 T175 Flaschen und das Einfrieren in Kryoröhrchen nachdem die Zellen zu 90% konfluent waren. Diese Zellen wurden als AZB bei -140°C für die weitere Benutzung aufbewahrt.

3.1.2. Subkultivierung der Zelllinien

Die humanen Zelllinien 293FT und HT1080 wurden alle 2-3 Tage mit einer Trypsin/EDTA- Lösung behandelt. Hierfür wurde das verbrauchte Kulturmedium entfernt, einmal mit PBS gewaschen und im Anschluss mit jeweils 2 ml Trypsin/EDTA- Lösung für 2 min bei RT inkubiert. Die nicht bereits gelösten Zellen wurden mit einem Zellschaber vorsichtig vom Boden der Zellkulturflasche gelöst, wobei jeweils nur 1/3 der Zellen zur Erhaltung der Kultur weiterverwendet wurden. Die restliche Zellsuspension wurde mit PBS aufgefüllt, abzentrifugiert ($200 \times g$, 3 min, RT) und anschließend mit

20 ml Kulturmedium neu eingesät. Die Zelllinie SeAx wurde alle 3-4 Tage 1:10 verdünnt und das Medium durch Zentrifugation (200 x g, 3 min, RT) gewechselt.

3.1.3. Isolierung und Expansion von CD34⁺ Zellen

Die CD34⁺ wurden nach Schmetzer et al. [78] aus gefrorenen, autologen Stammzellkonzentraten isoliert. Hierfür wurden die Konzentrate langsam bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und anschließend durch die Zugabe von 15 ml HSA (Stocklösung: 20%), 50 ml Hydroxyethylstärke-Lösung (Stocklösung: 6%) und 40 ml Verdünnungsmedium vorsichtig über 30 min bei konstanten Schwenkbewegungen verdünnt. Die aufgetauten Zellen wurden anschließend durch einen 60 µm Metallfilter gegeben, um die toten Zellen zu entfernen. Nach Aufteilung auf 50 ml Röhren erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 120 x g und RT. Die in einem Röhren vereinten Zellpellets wurden anschließend ein zweites Mal durch 100 µm Einmalfilter gegeben und nachfolgend mit 200 µl humanem IgG (Firma Privigen) für 15 min und bei Raumtemperatur geblockt. Der Zugabe von 200 µl CD34-Antikörpern (Firma STEMCELL) (15 min, RT) folgten für 10 min 100 µl magnetische Partikel (Firma STEMCELL). Die positive Selektion wurde mittels EasySep Magneten durchgeführt, jeweils 2 ml Zellsuspension für je 5-minütige Inkubationen. Nach zweimaligem Waschen mit PBS (wiederum 5 min Inkubation pro Waschschrift) konnten die Zellen mit Trypanblau angefärbt und in einer Neubauer Zählkammer gezählt werden. Es folgte die Bestimmung der Reinheit mittels durchflusszytometrischer Analyse durch Färbung des CD34⁺ Rezeptors auf den isolierten Zellen. Im Schnitt wurde, während der Arbeit, mit dieser Methode eine Reinheit von 84% CD34⁺ Zellen (n=10, SD=9,8%) erreicht. Die Zellen wurden abschließend mit SFEM Medium auf 1×10^6 /ml eingestellt und mit je 100 ng/ml IL-3 und SCF (nachfolgend alle 2-3 Tage 20 ng/ml IL-3 und SCF) in Kultur genommen. Zusätzlich wurden 10 µl LDL/ml Medium in die Kultur gegeben. Frisch isolierte CD34⁺-Zellen wurden zu 50.000/ml SFEM Medium mit CD34 Expansionszusatz für eine Woche kultiviert. Der Expansionszusatz enthält unter anderem Flt3L, SCF, IL-3, IL-6 und TPO, um selektiv die Expansion von CD34⁺ Zellen zu fördern.

3.1.4. Bestimmung der Blastocidin Sensitivität der CD34⁺ Zellen

Die Arbeitskonzentration von Blastocidin für Säugetierzelllinien liegt zwischen 1-10 µg/ml. Um CD34⁺ Stammzellen erfolgreich unter Zugabe von Blastocidin zu selektionieren, wurde zunächst die optimale Konzentration bestimmt, um die Zielzellen zu töten. Hierfür wurden die CD34⁺ Zellen jeweils mit verschiedenen Konzentrationen an Blastocidin kultiviert. Die CD34⁺ Stammzellen wurden mit 0, 2, 4, 6, 8 oder 10 µg/ml Blastocidin in CD34 Expansionsmedium inkubiert. Nach 3 Tagen wurde die Menge an lebenden Zellen mittels Propidiumiodid (PI) Färbung im Durchflusszytometer bestimmt. Für die Färbung wurden jeweils 100 µl Zellen in PBS mit 100 µl kalter PI Lösung (1:1000 in PBS) vermischt und sofort gemessen. Hierbei konnte für die weiteren Experimente eine Arbeitskonzentration von 10 µg/ml (n=2) ermittelt werden, da bei dieser Konzentration 50% der Zellen PI positiv und somit tot waren.

3.1.5. Bestimmung der Blastocidin Sensitivität der HT1080 Zellen

Für die spätere Titrierung der Blastocidin-resistenten Viren wurde für die HT1080 Zellen die Blastocidin Sensitivität bestimmt. Hierfür wurden konfluent gewachsene HT1080 Zellen in T175 mit jeweils 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 2 min bei RT inkubiert. Die nicht bereits gelösten Zellen wurden mit einem Zellschaber vorsichtig vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und in 50 ml Röhrchen überführt. Die Zellen wurden mit PBS aufgefüllt, abzentrifugiert (200 x g, 3 min, RT) und anschließend zu je 1 ml in eine 6-Well Platte eingesät (ca. 2×10^5 Zellen/Well). Die Zellen wurden für 2 Tage weiter kultiviert, wobei das Medium jeden Tag ersetzt wurde. Anschließend wurde das Medium alle 2-3 Tage mit 0, 2, 4, 6, 8 oder 10 µg/ml Blastocidin-enthaltendem Medium ersetzt. Nach 12-14 Tagen Selektion erfolgte die Färbung der antibiotikaresistenten Kolonien der HT1080 Zellen mittels Crystal Violet Färbelösung. Hierzu wurden die Platte 2x mit PBS gewaschen, anschließend für 20 min mit jeweils 1 ml Crystal Violet gefärbt und wiederum 2x mit PBS gewaschen. Das Auszählen der Kolonien erfolgte makroskopisch. Es wurde eine Konzentration von 4 µg/ml (n=3) Blastocidin ermittelt, bei der keine adhärennten und Blastocidin-resistenten HT1080-Zellen mehr zu erkennen waren.

3.1.6. Zellzählung

Die Zellzählung der CD34⁺ Zellen, 293FT Zellen, HT1080 Zellen und SeAx Zellen erfolgte mit der Neubauer-Zählkammer. Das Zählgitter besteht aus 3 x 3 Großquadraten mit je 1 mm Kantenlänge was einem Gesamtvolumen von 1 mm³ entspricht. Weiterhin ist das zentral gelegene Großquadrat in 5 x 5 kleinere Quadrate unterteilt, welche eine Fläche von 0,04 mm² haben. Die Zellen wurden für die Zählung resuspendiert um das Vorliegen von Einzelzellen zu gewährleisten. Dann wurden 20 µl Zellen mit 20 µl Trypanblau für die Lebend/Totfärbung vermischt und anschließend 20 µl auf die Zählkammer gegeben. Für die Zählung der Zellen wurden jeweils 4 große Eckquadrate ausgezählt und aus der Summe der Mittelwert gebildet. Dieser wurde mit dem Faktor 10.000 multipliziert, zusätzlich wurde der Verdünnungsfaktor 2 miteinbezogen, um die Zellzahl pro ml zu erhalten. Die Zellen wurden verwendet, wenn mindestens 80% Vitalität vorlag.

3.1.7. Messung der β -Hexosaminidase Aktivität

Die Überprüfung der Funktionalität der Zellen erfolgte durch IgE-basierte Aktivierung der Zellen und nachfolgender Messung der Freisetzung an β -Hexosaminidase. Physiologisch wird das Enzym β -Hexosaminidase, in MZ Granula lokalisiert, nach Quervernetzung der Fc ϵ RI Rezeptoren durch IgE in das umliegende Gewebe freigesetzt. Als typischer Marker für MZ Degranulation [19] wurde dieser in der vorliegenden Arbeit auch für die generelle Aktivierbarkeit der Zellen herangezogen. Für die Messung wurden 2000 Zellen/Ansatz in Wells einer 96-Well Platte pipettiert, in die zuvor erwärmter Tyrodes Puffer vorgelegt wurde. Nach einem Zentrifugationsschritt (220 x g, 3 min, RT) wurde das überschüssige Medium entfernt und die Zellen in IgE (final 4 µg/ml)-haltigem Tyrodes Puffer resuspendiert. Nach einer 1-stündigen Inkubation bei 37 °C und einem Zentrifugationsschritt (220 x g, 3 min, RT) wurden die Zellen mit anti-IgE (final 10 µg/ml) oder Ionomycin (final 1 µM) oder nur Tyrodes Puffer wiederum für 1 h bei 37 °C inkubiert. Erneut wurde abzentrifugiert, der Überstand in eine neue 96-Well Platte überführt und bei -80 °C eingefroren. Die Zellpellets wurden durch Zugabe von H₂O lysiert und für die Messung des intrazellulären β -Hexosaminidase Gehalts bei -80 °C eingefroren. Für die Messung wurden die Überstände und lysierten Zellpellets aufgetaut und je 50 µl in die Wells einer schwarzen 96-Well

Rundbodenplatte überführt. Pro Ansatz wurden 50 µl 4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronid-hydrat (final 1 µM) Lösung hinzupipettiert. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion mit einer Na₂CO₃-NaHCO₃-Lösung (pH 10.7) gestoppt und die Fluoreszenz bei 535/40 nm gemessen.

3.1.8. Messung des Histamingehalts

Für die weitere funktionelle Überprüfung der Zellen wurde der Histamingehalt in den unter Kapitel 3.1.7. generierten Zellüberständen gemessen. Der für die Messung verwendete Histareader 501 wurde initial gespült (mit destilliertem H₂O und Detergenz) und somit kalibriert. Im Anschluss wurde zunächst eine 96-Well Kalibrationsplatte (RLA 216) für die Messung vorbereitet. Je 50 µl PIPES Puffer wurden pro Well hinzugegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Platte wurde anschließend zehnmal mit destilliertem H₂O gewaschen, überschüssiges Wasser wurde entfernt und je 75 µl Coupling Reagenz (1 g o-Pfthaldialdehyd (OPA) gelöst in 100 ml Methanol) pro Well hinzupipettiert. Nach 10-minütiger Inkubation wurde je 75 µl Stopp Reagenz (HClO₄, 0,59%) pro Well hinzugegeben. Die Kalibrationsplatte wurde anschließend nach Vorgaben des Herstellers mit dem Histareader 501 gemessen. Auf einer Histaminplatte (RLA 210) wurde in den Reihen A und B 1-12, sowie in den Reihen 1 und 2 A-H je 50 µl PIPES Puffer verteilt. Die restlichen Wells wurden mit je 25 µl PIPES Puffer gefüllt. Zu den 25 µl PIPES Puffer wurden je 25 µl aufgetauter Zellüberstand hinzugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Einem Waschschrift (zehnmal mit destilliertem H₂O) folgte das Inkubieren mit je 175 µl Natriumdodecylsulfat (SDS) für 30 min bei 37 °C. Die Platte wurde erneut gewaschen ((zehnmal mit destilliertem H₂O), überschüssiges Wasser wurde entfernt und je 75 µl Coupling Reagenz (1 g o-Pfthaldialdehyd (OPA) gelöst in 100 ml Methanol) pro Well hinzupipettiert. Nach 10-minütiger Inkubation wurde je 75 µl Stopp Reagenz (HClO₄, 0,59%) pro Well hinzugegeben. Die Messung erfolgte nach Vorgaben des Herstellers mit dem Histareader 501.

3.2. Molekularbiologische Methoden

3.2.1. Herstellung der TF enthaltenden Eingangsvektoren

Die Eingangsvektoren, die verschiedene TF enthalten, wurden von der Firma Thermo Fischer Scientific wie nachfolgend beschrieben synthetisch und Codon-optimiert hergestellt. Durch die experimentelle Strategie der Codon-Optimierung sollte sichergestellt werden, dass die Proteinsynthese der einzelnen TF durch das Translationssystem der CD34⁺ SZ optimal ablaufen kann [83]. Für die Faktoren MITF, STAT5b, GATA-1, JAK2, BCL-XL, BHLHE40, STAT4, PU.1, MAZR, REPRIMO, HMOX1, NR1D1, GATA-2 und HES-1 wurden die aus synthetischen Oligonukleotiden und/oder PCR Produkten gewonnenen Genfragmente in den pMK-RQ (Kanamycinresistenz) kloniert, mit der *sfil/sfil* Klonierungsstelle. Die beiden großen Vektoren, mehrere TF enthaltend, MITF-GATA-1-PU1-BCLXL und GATA-2-PU1-HES1-BCLXL wurden in den pMA über die Klonierungsstellen *KpnI* und *sacI* kloniert. Das synthetische Gen für GATA-3 wurde in den pMS-RQ (Spectinomycin Resistenz) über die *SfiI* und *SfiI* Klonierungsstellen in den Vektor kloniert. Die Plasmid-DNS wurde aus transformierten *E. coli* K12 isoliert, gereinigt und die Konzentration mit UV Spektroskopie gemessen. Die finalen Vektoren wurden zur Überprüfung sequenziert. Jeweils 5 µg Plasmid-DNS wurde von der Firma zur Verfügung gestellt. Die DNS wurde je in 50 µl destilliertem Wasser gelöst.

3.2.2. Komponenten zur Herstellung der Transfervektoren

In der vorliegenden Arbeit wurde die Übertragung der Gene für 17 TF durch lentiviralen Gentransfer untersucht mit dem Ziel aus humanen CD34⁺ HSZ MZ zu generieren. Für die Testung der 17 TF mussten zunächst die Transfervektoren hergestellt werden. Es werden hierfür zwei verschiedene Zielvektoren (pLenti6.4/R4R2/V5-Dest und CS-CA-Rfa-IRES2-Venus) verwendet. Der Zielvektor pLenti6.4/R2R4/V5-DEST wurde hierbei mit den TF enthaltenden Eingangsvektoren und dem EF1- α Promotor (zweiter Eingangsvektor) rekombiniert. Der zweite Zielvektor, CS-CA-Rfa-IRES2-Venus, wurde nur mit den TF enthaltenden Eingangsvektoren rekombiniert.

Eingangsvektor pENTRTM5'/EF1 α p als Promotor

Als Promotor für die erfolgreiche Expression der TF in CD34⁺ SZ wurde der pENTRTM5'/EF1 α p genutzt. Dieser enthält die α -Untereinheit des humanen Elongationsfaktor 1 als Promotor, welcher bereits in vielen Säugerzelltypen, Stammzellen und primären Zellen zu einer starken Expression führte [84, 85]. Das kodierte EF1- α Enzym katalysiert die GFP-abhängige Bindung von Aminoacyl-tRNS an Ribosomen. Im Gegensatz zu dem humanen CMV Promotor, welcher in einigen Zelllinien durch Methylierung [86] oder Histon Deacetylierung [87] herabreguliert wird, wird mit dem EF1- α Promotor eine dauerhafte Expression des Zielgenes erreicht. Die enthaltenen *attL4* und *attR1* Rekombinationsstellen erlauben die Kombination mit entsprechenden Zielgenen und dem Gateway Zielvektor pLenti6.4/R2R4/V5-DEST um Transfervektoren zu generieren. Nachfolgend (Abb.3.1.) ist die Plasmidkarte des pENTRTM5'/EF1 α p abgebildet.

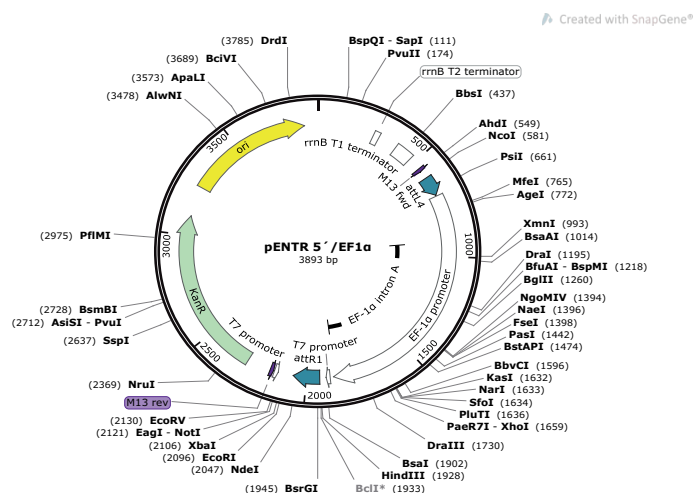


Abb. 3.1. Plasmidkarte des pENTRTM5'/EF1 α p (Invitrogen).

Eingangsvektoren für die Transkriptionsfaktoren

Für das Übertragen der TF Gene auf CD34⁺ SZ über lentivirale Vektoren, mussten die entsprechenden DNS Fragmente zunächst in Standardvektoren kloniert werden. Diese Gensynthese wurde von der Firma Thermo Fischer Scientific durchgeführt und wurde in Kapitel 3.2.1. erläutert. Die Plasmidkarten der einzelnen Eingangsvektoren sind im Anhang abgebildet. Zusätzlich zu verschiedenen Schnittstellen, für Restriktionsenzyme, der Antibiotikaresistenz und dem *ColE1*-Replikationsursprung enthalten diese

Eingangsvektoren jeweils die *attL1* und *attL2* Stellen für die L/R Multisite Gateway Rekombination.

Erster Zielvektor pLenti6.4/R2R4/V5-DEST (pLenti)

Der pLenti Zielvektor (Abb. 3.2.) wurde genutzt, um gleichzeitig den gewünschten EF1 α -Promotor und die TF Eingangsvektoren mittels der Multisite Gateway[®] Technik in den Vektor zu klonieren. Dieser enthält im Anhang aufgeführte Modifikationen, um ein sicheres und erfolgreiches Arbeiten zu gewährleisten.

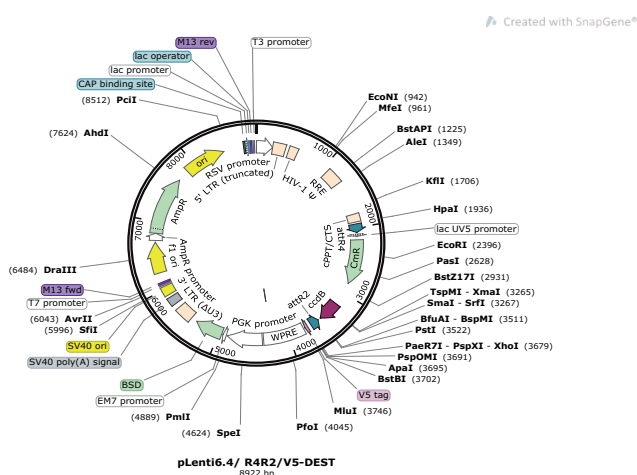


Abb. 3.2. Plasmidkarte des pLenti6.4/R4R2/V5-DEST (Invitrogen).

Die Multisite Gateway Rekombination wird durch die enthaltenen Rekombinationsstellen *attR2* und *attR4* möglich. Somit kann das Zielgen, hier die TF Sequenzen, von einem Eingangsvektor kloniert werden. Das zwischen den Rekombinationsstellen befindliche *ccdB* Gen wird hierbei ausgetauscht und erlaubt die negative Selektion. Durch die übertragene Ampicillin Resistenz können nur erfolgreich transformierte *E. coli* Zellen auf dem Selektionsmedium wachsen. Die spätere Selektion der transduzierten Zielzellen wird durch die Blasticidin Resistenz [88] des pLenti möglich. Des Weiteren enthält der Vektor die Verpackungssequenz Ψ [89], den RSV Promotor für die *tat* unabhängige Produktion der viralen mRNS [72] und das RRE für den Rev-abhängigen nuklearen Export nicht gesplicter viraler mRNS [90].

Zweiter Zielvektor CS-CA-Rfa-IRES2-Venus (pVenus)

Die TF Eingangsvektoren wurden, wiederum über die Gateway Rekombination, weiterhin in den Zielvektor pVenus kloniert (Abb. 3.3.). Über die enthaltenden *attR* Regionen ist eine Rekombination mit *attL* Regionen der TF Eingangsvektoren möglich.

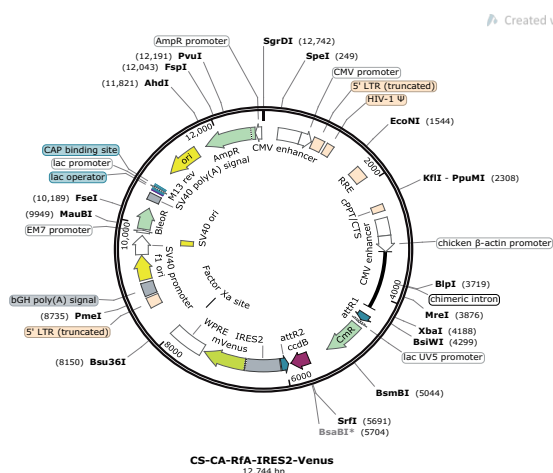


Abb. 3.3. Plasmidkarte des CS-CA-Rfa-IRES2-Venus (RIKEN).

Für hohe Level an Genexpression ist der synthetisch erzeugte CAG Promotor [91] bereits enthalten. Dieser besteht aus einem Enhancer Element des Zytomegalievirus, dem Promotor des beta-aktin Genes (Huhn) und dem Akzeptor des beta-globulin Genes (Kaninchen). Weitere wichtige Komponenten des pVenus sind im Anhang aufgelistet. Durch die eingefügte interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) Sequenz kann die Produktion von Proteinen unabhängig von zellulären Faktoren ablaufen. Weiterhin ist die Produktion von zwei Proteinen aus einer mRNA möglich, eine Modifikation die bei lentiviralen Systemen der 3. Generation eingefügt wurde. Somit ist sowohl die Expression des Gens für das Venusprotein, welches unterhalb der IRES Sequenz lokalisiert ist, als auch die Expression des Transgens (oberhalb der IRES Sequenz) gewährleistet.

3.2.3. Komponenten für Struktur und Verpackung der lentiviralen Partikel

Das Plasmid pMDLg/pRRE (Abb. 3.4.) enthält nur die kodierenden Sequenzen für die Gene *gag* und *pol* des HIV-1 Genoms. Zusätzlich wurde die RRE Sequenz des HIV-1,

direkt nach der *pol* kodierenden Sequenz, hinzugefügt, um die Bindung des REV Proteins zu ermöglichen.

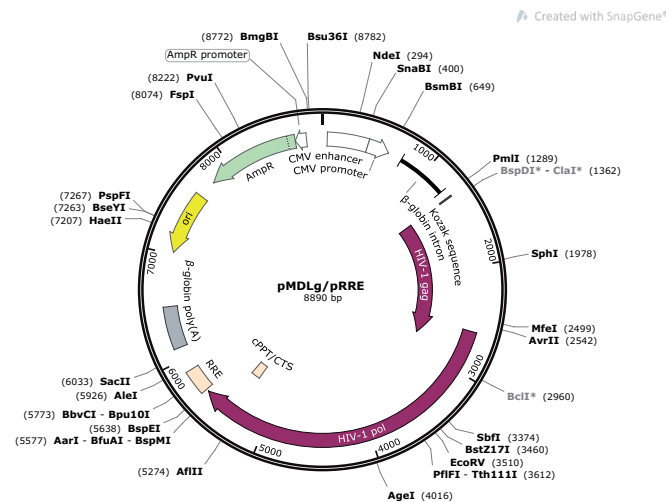


Abb. 3.4. Plasmidkarte des pMDLg/pRRE (Addgene).

Als Hüllprotein für die viralen Partikel wurde das Plasmid pCMV-VSV-G (Abb. 3.5.) verwendet. Dieses exprimiert das Glykoprotein G des vesikulären Stomatitis Virus (VSV-G) unter Kontrolle des CMV Promoters.

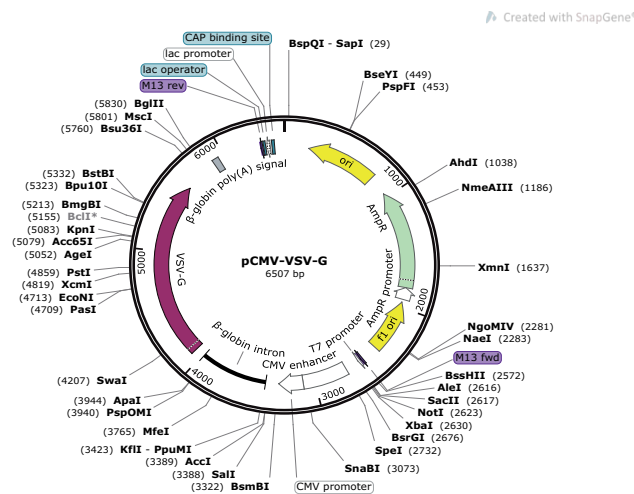


Abb. 3.5. Plasmidkarte des pCMV-VSV-G (Addgene).

Das VSV-G interagiert mit Phospholipiden in der Zellmembran der Zielzellen und fördert die Fusion der viralen Membran mit der zellulären Membran. Ein Rezeptor auf der Zelloberfläche für VSV-G wird nicht benötigt, die kodierende Sequenz ersetzt das HIV-1 Gen für *env*. Für die erfolgreiche Generierung lentiviraler Partikel ist zusätzlich das Plasmid pRSV-Rev (Abb. 3.6.) notwendig. Dieses kodiert für das Protein REV welches

an RRE (*rev response element*) bindet und somit den Export der RNS aus dem Nukleus ermöglicht.

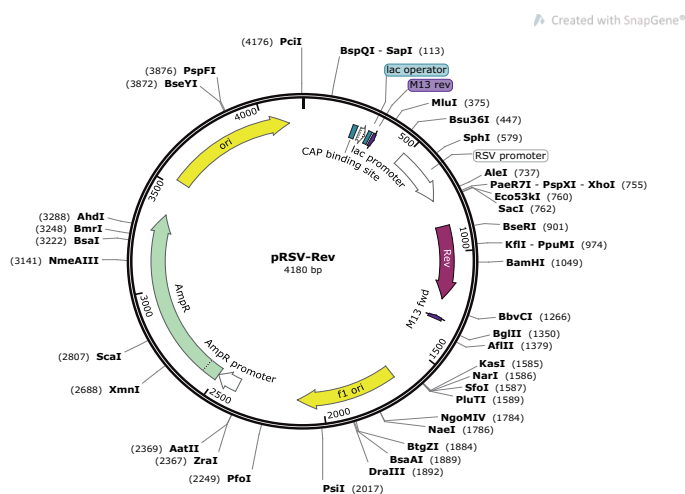


Abb. 3.6. Plasmidkarte des pRSV^{Rev} (Addgene).

3.2.4. Kontrollvektoren CS-CDF-EG-PRE und CS-CA-GFP

Für die Kontrolle der Transduktion wurden die Vektoren CS-CDF-EG-PRE und CS-CA-GFP der Firma RIKEN genutzt. Der CS-CDF-EG-PRE wurde für die Ansätze der TF im pLenti genutzt, da dieser ebenso den EF1-Promotor aufweist. Für die Ansätze der TF im pVenus wurde der CS-CA-GFP verwendet, welcher auch den CAG-Promotor enthält. Anhand der GFP-Expression beider Vektoren konnten während der Etablierung 5-10% infizierte CD34⁺ SZ gemessen werden. Die Abb. 3.7. zeigt die Plasmidkarten beider Vektoren.

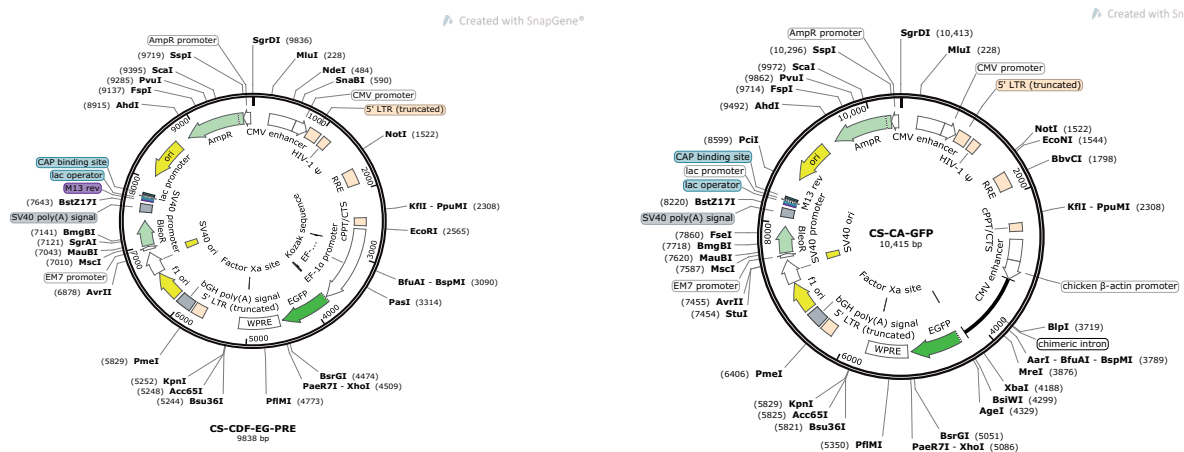


Abb. 3.7. Plasmidkarten des Kontrollvektoren CS-CDF-EG-PRE und CS-CA-GFP (RIKEN).

3.2.5. Multisite Gateway LR Rekombination

Als Klonierungsmethode zur Herstellung der lentiviralen Transfervektoren pLenti-TF wurde die Multisite Gateway LR Rekombination verwendet (Invitrogen). Hier wird die sequenzspezifische Rekombinationsfähigkeit des Bakteriophagen Lambda genutzt [92]. Für die Gateway Technologie wurden einzelne Komponenten des Lambda Rekombinationssystems modifiziert, wodurch das System eine hohe Effizienz und Spezifität hat [93]. Schematisch für die pLenti-TF zeigt Abbildung 3.8. die Multisite Gateway LR Rekombination.

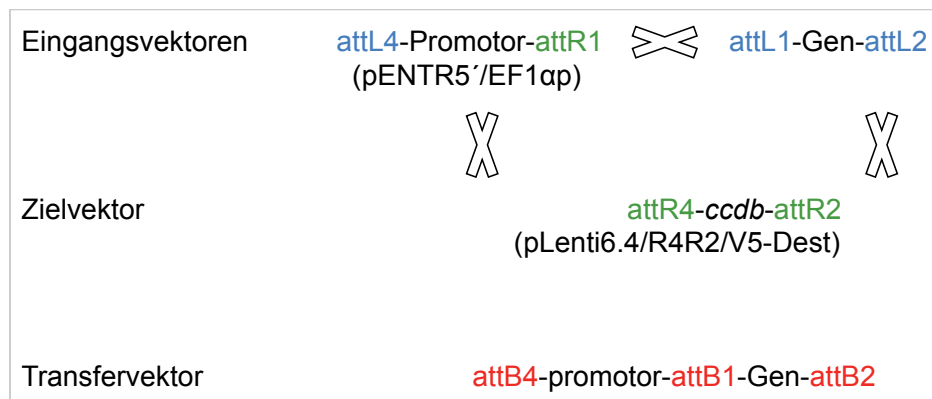


Abb. 3.8. Darstellung der Multisite Gateway LR Rekombination zur Generierung der Transfervektoren pLenti-TF. Die Klonierung kann durch die *att* Seiten der Vektoren stattfinden. Hier reagieren *attL* und *attR* Seiten zu neuen *attB* Seiten. Dadurch ist es möglich, zwei Eingangsvektoren gleichzeitig (Zielgen und den gewünschten Promotor) in den Zielvektor zu klonieren und Expressionsvektoren zu generieren (Modifiziert nach Invitrogen 2010).

Die Multisite Gateway LR Rekombination wird durch den Enzym Mix LR Clonase II plus katalysiert. Hierbei findet *in vitro* die Rekombination zwischen *attL* Regionen der Eingangsvektoren (Promotor und TF enthaltende Vektoren) und *attR* Regionen der Zielvektoren statt, wodurch *attB* Regionen-enthaltende Transfervektoren generiert werden.

Für die Herstellung der Transfervektoren pVenus-TF wurde das Enzym LR Clonase genutzt. Es findet wiederum eine Rekombination zwischen den *attL* und *attR* Regionen statt. Da der Zielvektor pVenus bereits den gewünschten CAG Promotor enthält, fand hier nur die Rekombination zwischen den TF enthaltenden Eingangsvektoren und dem Zielvektor statt.

In einem 0,5 ml Reaktionsgefäß wurden pro Ansatz 10 fmol der Eingangsvektoren (Promotor und TF oder nur TF) und 20 fmol des Zielvektors (pLenti oder pVenus) eingesetzt und mit TE Puffer, pH 8,0, auf 8 µl aufgefüllt und gemischt. Die LR Clonase oder LR Clonase II plus wurde auf Eis aufgetaut und nach zweimaligem Vortexen jeweils 2 µl zu den Ansätzen gegeben. Eine Durchmischung der Probe erfolgte durch auf- und ab- pipettieren. Für die Negativkontrollen wurde LR Clonase oder LR Clonase II plus weggelassen. Ein Abstoppen der Reaktion erfolgte am Folgetag, nach Inkubation bei Raumtemperatur, durch Zugabe von je 1 µl Proteinase K und 10-minütiger Inkubation bei 37 °C. Jeweils 3 µl der Ansätze wurden sofort für die Transformation von One Shot Top10 chemisch kompetenten *E. coli* Zellen verwendet. Die Ansätze für die

großen TF 4 und 11 mussten vor der Multisite Rekombination linearisiert werden. Sie wurden hierfür mit dem Restriktionsenzym *XhoI* 10 min bei 37 °C inkubiert und anschließend 10 min bei 95 °C gekocht. Anschließend erfolgte die Multisite Gateway LR Rekombination wie bereits beschrieben.

3.2.6 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Die Transformation chemisch kompetenter *E. coli* (Top10 oder Stbl3) erfolgte in vereinfachter Form nach dem Protokoll von Hanahan [94]. Nach 30-minütigem Auftauen der Zellen auf Eis wurden entweder 1 µl Plasmid oder 3 µl LR Ligationsmix zu je 50 µl Zellsuspension gegeben, wobei vorsichtig gerührt und nicht gemixt wurde. Die Zellen inkubierten für 30 min auf Eis und wurden anschließend einem Hitzeschock bei 42 °C für 30 Sekunden im Wasserbad unterzogen. Weiteren 2 min Inkubation auf Eis folgte die Zugabe von je 250 µl S.O.C. Medium. Die einzelnen Röhrcchen wurden anschließend für 60 min bei 300 rpm und 37 °C geschüttelt. Danach erfolgte das sterile Ausplattieren der Ansätze auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum und die Inkubation über Nacht *E. coli* bei 37 °C im Brutschrank.

3.2.7. Anzucht von *E. coli*

E. coli Zellen wurden nach erfolgter Transformation auf LB Agar mit 100 µg/ml Ampicillin über Nacht kultiviert. Die Anzucht für die Isolation der Plasmid-DNS erfolgte dann in 3 ml oder 100 ml (für Mini- oder Maxi Plasmid Präparation) LB Medium mit je 100 µg/ml Ampicillin.

3.2.8. PureYield™ Plasmid MINI- und MAXIpräp System

Für die Herstellung der Transfervektoren wurde durch MAXI Präparation gereinigte Plasmid DNS genutzt. Zuvor wurden MINI Präparationen der Plasmid-DNS für die Zielvektoren (pLenti oder pVenus) und Eingangsvektoren (Promotor und TF enthaltend) hergestellt und diese durch Restriktionsenzymverdau auf korrekte Ligation geprüft. Aus den korrekten Klonen wurde im Anschluss eine MAXI Präparation durchgeführt. Die Isolierung von Plasmid DNS aus *E. coli* Zellen basiert auf der Kombination der alkalischen Lyse mit DNS Extraktion, welche bereits 1979 von Birnboim und Doly [95]

beschrieben wurde. Es wurde das PureYield™ Plasmid MINI- bzw. MAXIpräp System von Promega für die Reinigung der Plasmid-DNS genutzt. Für eine MAXIpräp Isolation wurde zunächst eine Vorkultur (3 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin) des *E. coli* Stocks (Agarplatte oder MINIpräp Kultur) angesetzt (über Nacht, 37 °C, 250 rpm). Am Folgetag wurden jeweils 100 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 1:1000 verdünnte *E. coli* Vorkultur unter gleichen Bedingungen inkubiert. Ein zusätzlich im System enthaltener Waschschrift entfernt überschüssige Proteine, RNS und Verunreinigungen durch Endotoxine. Bei Endotoxinen handelt es sich um Lipopolysaccharide (LPS), die in der Außenmembran von Gram negativen Bakterien, wie *E. coli*, vorkommen. Es wurden jeweils 2 ml bzw. 100 ml Bakteriensuspension verwendet und die Reinigung der Plasmid DNS mit den Lösungen und dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die DNS wurde im letzten Schritt mit jeweils 30 µl bzw. 1500 µl Nuklease freiem Wasser eluiert und für spätere Versuche bei -20 °C eingefroren. Zur Messung der DNS Konzentration und Reinheit wurde ein Spektralphotometer genutzt. Das Verhältnis der Extinktion der Probe bei 260 nm und 280 nm ($A_{260/280}$) ermöglicht eine Aussage über die Reinheit der DNS. Der Wert sollte zwischen 1,8 und 1,9 liegen. In der vorliegenden Arbeit wurde durch MAXI Präparation gereinigte Plasmid DNS mit einem Verhältnis $A_{260/280}$ unter 2,0 für die finalen Experimente genutzt.

3.2.9. Testverdau der Plasmid-DNS mit Agarosegelelektrophorese

DNS Moleküle können durch Elektrophorese in einem Agarosegel nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Die poröse Polysaccharidstruktur des Agarosegels ermöglicht die Separation der DNS-Moleküle nach ihrer Größe. Hierbei können kleinere, negativ geladene Moleküle die Agarose schneller zur positiv geladenen Elektrode passieren als längere Moleküle. Die zurückgelegten Abstände sind umgekehrt proportional zu dem \log_{10} Wert des Molekulargewichts. Somit kann die Größe des linearen DNS Fragments aus dem Vergleich mit einem DNS Marker bekannter DNS Längen bestimmt werden. Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Analyse der Plasmid-DNS genutzt, um Transformanten mit korrekten Plasmiden zu bestimmen. Es wurden jeweils 1%ige Agarosegele für die Testverdaue genutzt. 200 ml TAE Puffer wurde mit 2 g Agarose versetzt und aufgekocht. Nach kurzem Abkühlen wurde die Flüssigkeit mit 5 µl PicoGreen versetzt. Für die Analyse der Testverdaue wurden jeweils 1 ng DNS mit 1 µl

der Restriktionsenzyme *EcoRV* oder *XhoI* und *ApaI* versetzt und inkubiert (10 min, 37 °C). Die Ansätze wurden anschließend zusammen mit einem DNS Marker (1 kb oder 2 kb) auf das erstarrte Gel aufgetragen und für 90 min bei einer Spannung von 60 V aufgetrennt. Anhand der Fragmentgröße des DNS Markers (in bp) und der Distanz im Gel (in cm) konnte eine Standardkurve inklusive Gleichung erstellt werden. Die resultierende Gleichung wurde genutzt, um die Größe der Banden für die einzelnen TF zu berechnen und so die Richtigkeit der Klonierung zu bestätigen (siehe Ergebnis Kapitel 4.1.).

3.3. Virologische Methoden

3.3.1. Vergleich der DNS Menge für die Transfektion

Für die Transfektion der 293FT Zellen wurde die optimale DNS Menge getestet. Es wurden 293FT Zellen in 75 cm² Flaschen mit 4, 8 und 20 µg DNS (n=2) transfiziert und nach 48 h die GFP positiven Zellen im Durchflusszytometer bestimmt. Für 4 µg wurden 2,3% (SD=0,2%) GFP positive Zellen gemessen, für 8 µg DNS 20,5% (SD=9,3%) und für 20 µg 18,4% (SD=4,9%). Ausgehend von diesem Ergebnis wurde weiterhin mit 8 µg DNS gearbeitet.

3.3.2. RetroNektin und Vitronectin für Virus-Zell-Bindung

Bereits 1996 zeigten Hanenberg et al. [96], dass die eher schlechte Effizienz des Gentransfers bei hämatopoetischen Zellen durch das Verwenden von Fibronectin-Fragmenten erheblich gesteigert werden konnte. Die Co-Lokalisation zwischen Virus und Zielzellen auf den Fibronectinpeptiden ermöglicht einzigartige Ligand/Rezeptor Interaktionen. RetroNektin ist ein rekombinantes Peptid, bestehend aus verschiedenen Fibronectin-Fragmenten, die entweder das Virus oder die Zelloberfläche binden. Das Peptid enthält drei funktionelle Domänen: ein RGDS (Arg-Gly-Asp Aminosäuren) Motiv für die Bindung an VLA-5 Integrinrezeptor auf Zelloberflächen, eine Heparin-Bindungs-Domäne für die Bindung viraler Partikel und die CS-1 Sequenz für die Bindung des VLA-4 Integrinrezeptors. Durch diese Strukturen wird die räumliche Nähe zwischen Virus und Zielzelle ermöglicht und die Frequenz des Gentransfers erhöht. Vitronectin (Abb. 2.9.) ist ein 75 kDa Glykoprotein und enthält ebenfalls eine RGD Domäne als

Bindungsstelle für membrangebundene Intergrine und eine Heparinbindungsstelle für Viruspartikel. Die während dieser Arbeit durchgeführten Transduktionen von HT1080 zeigte eine bessere Effizienz bei Vitronectin (20,7% (SD=2%, n=4) als mit RetroNektin 13,1% (SD=1,4%, n=2), so dass weiterhin mit Vitronectin gearbeitet wurde.

3.3.3. Transiente Transfektion zur Generierung lentiviraler Partikel

Diese Methode ist ein effektiver Weg, DNS in eukaryotische Zellen zu transferieren. In Kombination mit einem Enhancer Reagenz und einem DNS-kondensierenden Puffer (EC Buffer) wird das Effectene Reagenz genutzt, um hohe Transfektionsraten zu erreichen (Abb. 3.9.). Die 293FT Zellen (präselektiert mit G418 und unter 20 Passagen) wurden am Tag vor der Transfektion trypsiniert und in entsprechende Platten/Flaschen zu 1×10^6 /ml in RPMI Medium eingesät. Zum Zeitpunkt der Transfektion waren die 293FT Zellen zu 70-90% konfluent. Die Transfektion mit Effectene wurde in T75 Zellkulturflaschen mit 8 µg Gesamtmenge DNS durchgeführt. Für die Virusherstellung wurden 1,2 µg pCMV-VSV-G, 2,4 µg pMDLg, 1,2 µg pRSV-Prev und 3 µg Transferplasmid verwendet. In einem Reaktionsgefäß wurden in 300 µl EC Buffer die DNS und 32 µl Enhancer durch 5 Sekunden vortexen gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 64 µl Effectene hinzugegeben, wiederum kurz durch vortexen gemischt und für 20 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurde das Kulturmedium aus den Platten/Flaschen verworfen. Die DNS-Effectene Komplexe wurden tröpfchenweise auf die Zellen gegeben, anschließend mit je 2 ml RPMI für Transfektion und 20 mM HEPES bei 37 °C inkubiert. Nach 6 Stunden wurde das Medium gewechselt und nun mit komplettem RPMI weiter kultiviert. Nach insgesamt 48 Stunden erfolgte die Ernte der Viren durch Zentrifugation (2000 x g, 15 min, 4 °C) und das Aliquotieren für den -86 °C Stock, um wiederholtes Auftauen und Einfrieren zu vermeiden. Mit dieser Methode konnten bei den Vorversuchen (n=3) im Schnitt 79,1% (SD=23,3%) der 293FT Zellen transfiziert werden. Die anschließende Titrierung der Viren ergab durchschnittlich einen Titer von $2,5 \times 10^7$ (n=3).

Transfektion

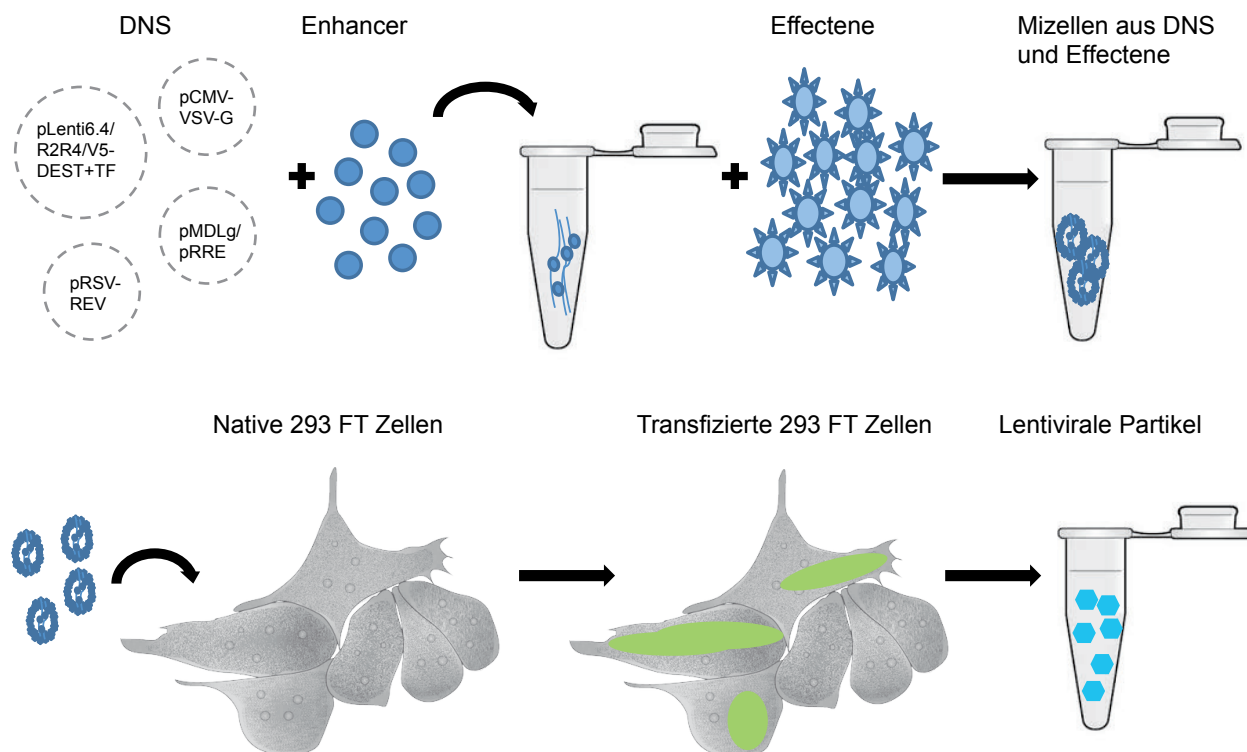


Abb. 3.9. Die transiente Transfektion der 293FT Zellen erfolgte mit dem Effectene Reagenz. Zuvor wurden die Plasmide mit dem Enhancer vermischt, so dass sich Komplexe bilden. Diesen Komplexen wurde das Effectene Reagenz beigemischt. Entstandene Mizellen aus DNS und Effectene wurden auf die 293FT Zellen gegeben. Nach 48 h wurden die lentiviralen Partikel durch Zentrifugation geerntet, aliquotiert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Dargestellt ist die Transfektion mit dem Zielvektor pLenti/6.4R4R2/V5-Dest und den drei weiteren Komponenten pCMV-VSV-G, pRSV-Rev und pMDLg.

3.3.4. Transduktion der CD34^+ Zellen

Die Isolation der CD34^+ - Zellen erfolgte wie beschrieben (Kapitel 3.1.3.) am Vortag der Transduktion. Die Zellen wurden über Nacht in SFEM Medium mit 10 ng SCF [97] inkubiert, um die Transduktionseffizienz zu erhöhen. Für die Transduktion wurden 12-Well Platten mit Vitronectin ($5\text{ }\mu\text{g/ml}$) beschichtet (2 h, RT) und anschließend mit 2% HSA in PBS für 30 min bei RT geblockt. Pro Ansatz wurden 1×10^6 oder unverdünnte Viren frisch aufgetaut, in je ein 12-well gegeben und für 2 h bei 2000 g und $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Spinokulation. Jeweils 50.000 CD34^+ (MOI von 20) in SFEM wurden pro Ansatz hinzugegeben und wiederum zentrifugiert ($1,5\text{ h}$, $800 \times \text{g}$, $32\text{ }^{\circ}\text{C}$). Nach der Zentrifugation wurde je 1 ml frisches SFEM Medium/Well hinzu-

gegeben und für 48h bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden dann in Expansionsmedium mit/ohne 10 µg/ml Blasticidin überführt und für sieben Tage weiterkultiviert. Die Zellen wurden anschließend in frisches SFEM Medium überführt und für weitere sieben bzw. 14 Tage kultiviert. Schematisch ist die Transduktion in Abb. 3.10. dargestellt.

Transduktion

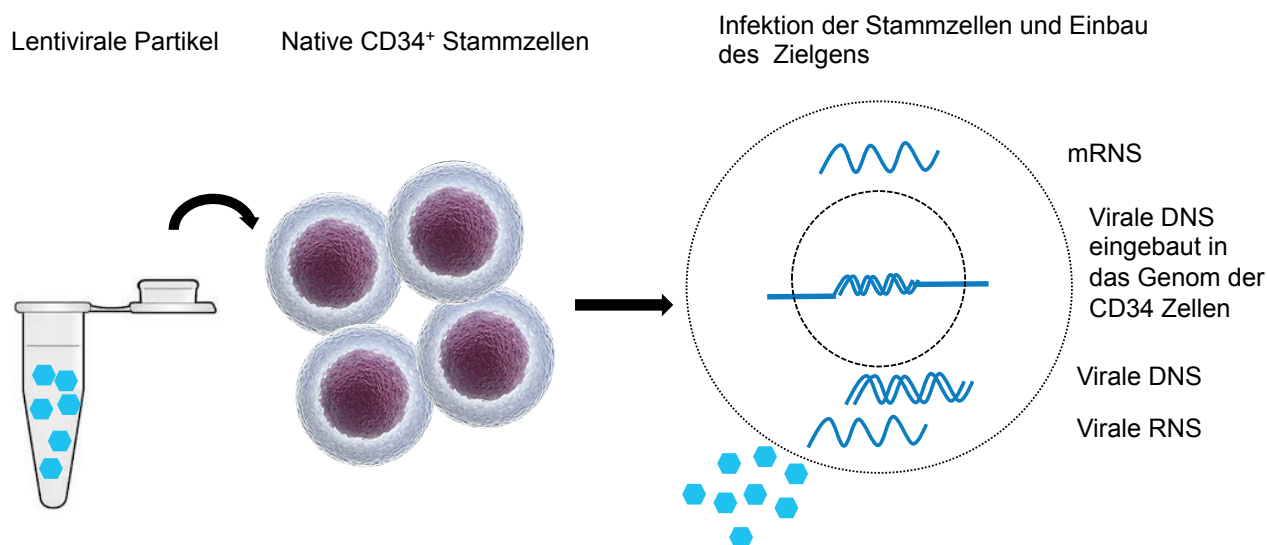


Abb. 3.10. Die Transduktion der CD34⁺ Zielzellen erfolgte in 12-well Platten, die zuvor mit Vitronectin beschichtet wurden und mit PBS/HSA geblockt wurden. Die Infektion der Stammzellen mit den lentiviralen Partikeln erfolgte anschließend durch Spinokulation.

3.3.5. Titration

Für die Bestimmung der Multiplizität der Infektion (MOI) wurden die Viren nach der Ernte titriert. Hierfür wurden am Vortag HT1080 Zellen trypsiniert und in 6-well Platten eingesät, so dass zum Zeitpunkt der Transduktion eine 25-30%ige Konfluenz zu sehen war. Der Virusüberstand wurde am Tag der Transduktion aufgetaut und eine 10-fach serielle Verdünnungsreihe von 10^{-1} bis 10^{-6} in jeweils 1 ml Gesamtvolumen angesetzt. Nach dem Entfernen des Kulturmediums wurden die einzelnen Verdünnungen auf die entsprechenden Wells gegeben. Zusätzlich wurden je 6 µg/ml Polybrene zugesetzt um die Transduktionseffizienz zu erhöhen. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C erfolgte

am Folgetag ein Mediumwechsel, anschließend wurden die Zellen in jeweils 2 ml Kulturmedium erneut über Nacht inkubiert. Schließlich wurde dem Kulturmedium 4 µg/ml Blasticidin (siehe Kapitel 3.1.5.) zugesetzt, um eine Selektion der HT1080 zu beginnen. Das Blasticidin-haltige Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Nach 12-14 Tagen Selektion erfolgte die Färbung der antibiotikaresistenten Kolonien mittels Crystal Violett Färbelösung. Hierzu wurden die Platten 2x mit PBS gewaschen, anschließend für 20 min mit jeweils 1 ml Crystal Violett gefärbt und wiederum 2x gewaschen. Das Auszählen der Kolonien erfolgte makroskopisch.

3.4. Durchflusszytometrische Färbung

Für die nähere Analyse der Zellen wurden mittels fluorophor-konjugierten Antikörpern bestimmte Oberflächenrezeptoren, insbesondere die mastzellspezifischen Marker CD117 und FcεRI, angefärbt. Die Zellen ($0,2 \times 10^6$) wurden hierfür einmal mit PBS gewaschen (200 x g, 3 min, RT) und anschließend in je 200 µl PBS aufgenommen. Je 100 µl der Zellsuspension wurde auf Röhrchen für die Färbung verteilt. Es erfolgte die Zugabe von Fc-Block und Antikörpern bzw. Isotypen. Nach einer 20-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und schließlich in je 250 µl PBS aufgenommen und gemessen. Die Farbkombinationen, die für die Messung der finalen Ergebnisse genutzt wurden, sind in Tab. 3.1. aufgelistet.

Tab. 3.1. Kombination der Antikörper und Fluorochrome der durchflusszytometrischen Analysen

Zellen	Antikörper gegen	Kombination der Fluorochrome
Stammzellen	CD34, CD45	APC, FITC
Mastzellen, PSCMCs	CD117, FcεRI	APC, PE

3.5. Methoden der Histologie

3.5.1. Herstellung von Dünnschichtpräparaten (sog. Cytospins)

Um die Morphologie der Zellen besser beurteilen zu können, wurden Cytospins angefertigt. Es wurden ca. 2.000 Zellen aus der Kultur entnommen, einmal mit PBS gewaschen (200 x g, 3 min, RT) und schließlich in je 160 µl PBS aufgenommen. Um die Haftung der Zellen auf dem Objektträger (OT) zu erhöhen, wurde zunächst PBS in die beiden Röhrchen des Cytospin-Einsatzes gegeben. Nach Zentrifugation (200 x g, 3 min, RT) wurden jeweils 80 µl der Zellsuspension in die Röhrchen pipettiert. Nach einer Zentrifugation von 7 min bei 200 x g und RT, wurden die Filterpapiere vorsichtig entfernt und die OT über Nacht getrocknet. Die Zellen wurden am Folgetag für 1 h bei -20 °C in Aceton fixiert und mindestens eine weitere Stunde getrocknet.

3.6. Statistische Auswertung

Die Messwerte sind als Mittelwerte bzw. Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Für die statistische Auswertung wurde das Programm Graph Pad Prism (7.0 für MAC OS X) verwendet. Die Datensätze mit $n=5$ bzw. $n=3$ wurden durch Verwendung des Mann-Whitney-U-Tests analysiert. Der Mann-Whitney-U-Test wird für unabhängige Stichproben verwendet, genauer ob es einen Unterschied der zentralen Tendenzen dieser unabhängigen Stichproben gibt. Er stellt das nichtparametrische Gegenstück zum t-Test für unabhängige Stichproben dar und findet bei kleinen Stichproben, wie in der vorliegenden Studie, Anwendung. Differenzen der Messwerte wurden mit $*p<0.05$ und $**p<0.01$ als statistisch signifikant beurteilt. Werte mit $p<0.05$ wurden als nicht-statistisch signifikant (n.s.) klassifiziert.

4. Ergebnisse

4.1. Eingangsvektoren für TF können erfolgreich in Zielvektoren kloniert werden

Durch die Multisite Gateway Klonierung wurden jeweils 17 verschiedene Transfervektoren hergestellt. Die Rekombination erfolgte zwischen dem Promotor pENTR™5/EF1αp und den Eingangsvektoren für die einzelnen TF mit dem Zielvektor pLenti. Für den Zielvektor pVenus erfolgte die Rekombination mit den Eingangsvektoren für die einzelnen TF. Die Klonierungen wurden durch enzymatischen Kontrollverdau mit den Restriktionsenzymen *EcoRV* oder *XhoI* und *ApaI* überprüft. In der Abb. 4.1. und 4.2. sind die Agarosegelbilder des Testverdaus der pLenti-TF mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* dargestellt. Die pLenti-TF 4 und 11 wurden zunächst mit dem Restriktionsenzym *XhoI* linearisiert und anschließend mit *EcoRV* geschnitten (Abb. 4.2.).

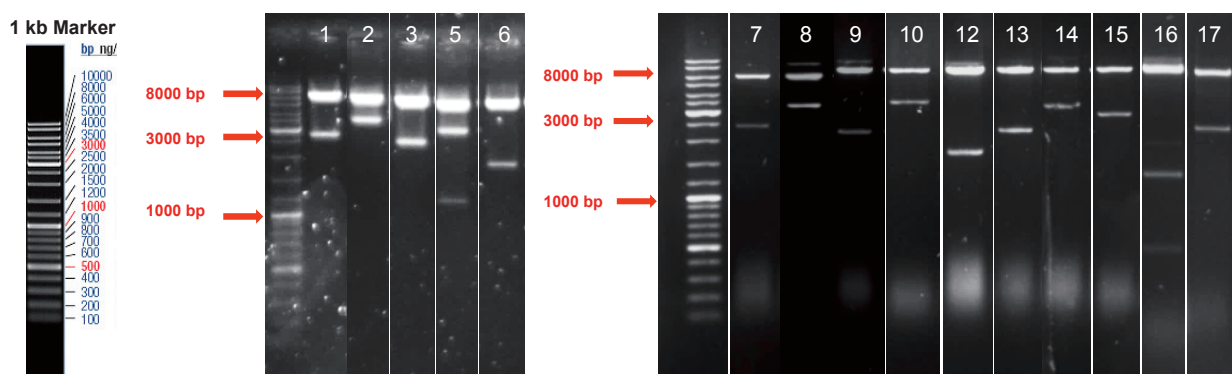


Abb. 4.1. Kontrollverdau der Transfervektoren: Eingangsvektoren für TF 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16 und 17 mit dem Eingangsvektor pENTR™5/EF1αp im Zielvektor pLenti. Die zu erwartenden Banden sind in der Tab. 4.1. aufgelistet. Der Kontrollverdau erfolgte mit jeweils 1 ng DNS und dem Restriktionsenzym *EcoRV* (10 min bei 37 °C) und die anschließende Auftrennung mit einem 1% Agarosegel für 1,5 h bei 60 V.

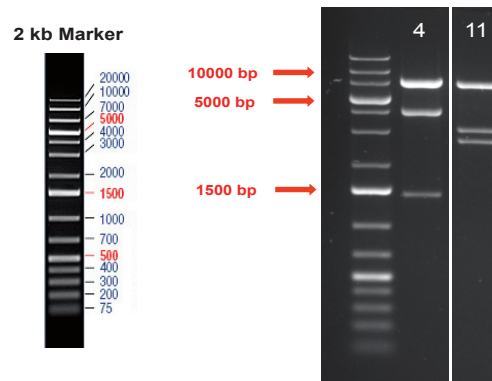


Abb. 4.2. Kontrollverdau der Transfervektoren: Eingangsvektoren für TF 4 und 11 mit dem Eingangsvektor pENTR™5/EF1αp im Zielvektor pLenti. Die zu erwartenden Banden sind in der Tab. 3.3.4. aufgelistet. Vor der Multisite Gateway Rekombination erfolgte hier die Linearisierung der Vektoren durch Inkubation mit *XhoI* (10 min bei 37 °C). Der Kontrollverdau erfolgte mit jeweils 1 ng DNS und dem Restriktionsenzym *EcoRV* (10 min bei 37 °C) und anschließender Auftrennung mit einem 1%igen Agarosegel für 1,5 h bei 60 V.

Aus der Fragmentgröße des DNS Markers (bp) und der Distanz dieser Fragmente im Gel (cm) wurde eine Standardkurve erstellt. Abb. 4.3. zeigt die Kurve mit entsprechender Gleichung und Bestimmtheitsmaß R^2 für den Testverdau der pLenti-TF. Die Gleichung wurde verwendet, um die Fragmentgröße der einzelnen TF zu berechnen und die erfolgreiche Klonierung zu überprüfen.

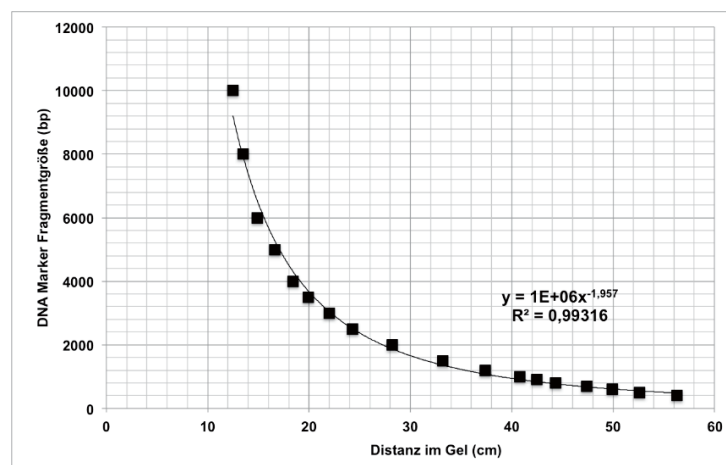


Abb. 4.3. Darstellung der errechneten Standardkurve aus der Fragmentgröße des DNS Markers (in bp) und der Distanz im Gel (in cm). Die Gleichung aus der potentiellen Trendkurve wurde genutzt um die Fragmentgrößen der pLenti-TF zu berechnen. Das Bestimmtheitsmaß R^2 liegt bei 0,99 und ist somit geeignet, die abhängige Variable y vorherzusagen.

Nachfolgend aufgeführt sind die aus der Standardkurve für den Kontrollverdau der pLenti-TF errechneten Banden nach Auftrennung durch Agarosegele (Tab. 4.1.).

Tab. 4.1. Darstellung der Größe (bp) der einzelnen pLenti-TF und die errechneten Banden (bp) nach dem Kontrollverdau mit dem Enzym *EcoRV*

Transkriptionsfaktor	Banden nach Testverdau mit <i>EcoRV</i>	Gesamtgröße (bp)
1 MITF	7023, 2359	9382
2 STAT5b	7023, 3949	10972
3 GATA-1	7023, 2163	9186
4 GATA2PU1HES1BCLXL	7023, 3572, 1592	12187
5 JAK2	7023, 2584, 900	10507
6 BCL-XL	7023, 1701	8724
7 BHLHE40	7023, 2163	9186
8 STAT4	7023, 3143	10166
9 PU.1	7023, 1990	9013
10 MAZR	7023, 3143	10166
11 MITFGATA1PU1BCLXL	7023, 2359, 2023	11405
12 REPRIMO	7023, 1740	8763
13 HMOX1	7023, 2359	9382
14 NR1D1	7023, 3277	10300
15 GATA-2	7023, 2584	9607
16 HES-1	7023, 1740, 581	9344
17 GATA-3	7023, 2109	9132

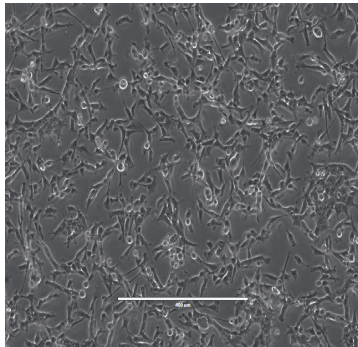
Unter Verwendung der Standardkurve wurden die einzelnen Fragmentgrößen berechnet. Die Gesamtgröße der Transfervektoren entspricht nahezu der zuvor durch Analyse der vollständigen DNS Sequenzen errechneten Fragmente mittels *NEBcutter*.

Für die Analyse mittels enzymatischen Kontrollverdau wurden pro Plasmid mehrere Klone getestet. Die Abbildungen 4.1. und 4.2. zeigen jeweils den Kontrollverdau des Plasmids, welches für die weiteren Experimente genutzt wurde. Die erfolgreiche Klonierung aller pLenti-TF konnte durch die Kontrollverdaue bestätigt werden. Ausgehend von diesem Ergebnis und der Verifizierung der Reinheit der Plasmid-DNS durch Messung des Verhältnisses A260/280 (1,8-1,9), konnten die generierten Transfervektoren für die nachfolgenden Experimente genutzt werden. Die Kontrollverdaue für die pVenus-TF sind im Anhang dargestellt. Bei TF 1 wurde, auch nach dreimaligem Wiederholen, eine zusätzliche Bande bei 1800 bp vermerkt. Bei TF 3 ist die Bande bei ca. 2000 bp sehr schwach auszumachen. Die Auftrennung bei TF 4 ist schlecht zu erkennen, wobei die Ursache hierfür in der Vergrößerung auf eine einheitliche Größe der Gelbilder liegt. Banden ab ca. 500 bp sind teilweise sehr schwach und somit schlecht auszumachen.

4.2. CD34⁺ SZ können erfolgreich mit Kontrollvektoren transduziert werden

Die sichere und effektive genetische Modifikation von HSZ mit lentiviralen Partikeln steht im Fokus der Gentherapie [98]. Eine erfolgreiche Transduktion ist von vielen Aspekten, wie Reinheit der Zellen und Toxizität der Vektoren, abhängig. Die Kontrollvektoren CS-CDF-EG-PRE oder CS-CA-GFP wurden in der vorliegenden Arbeit genutzt, um die Transfektion und Transduktion zu etablieren und z.B. einen eventuellen toxischen Einfluss der Vektoren auf die Zellen zu untersuchen. Die GFP Expression wurde sowohl mikroskopisch als auch durch Analyse am Durchflusszytometer bestimmt. Die Abbildung 4.4. zeigt 293FT Zellen vor der Transfektion und SeAx bzw. CD34⁺ Zellen in Kultur vor der Transduktion mit lentiviralen Partikeln. 293FT Zellen transfiziert mit dem CS-CDF-EG-PRE (a und b) oder CS-CA-GFP (c) nach 48 h in Kultur und vor Ernte der lentiviralen Partikel sind in Abbildung 4.5. dargestellt. Zur Etablierung der Transduktion wurden SeAx Zellen genutzt. Abbildung 4.6. zeigt SeAx Zellen nach Transduktion mit dem Kontrollvektor nach 48 h (a und b) und nach 7 (c) Tagen. Nach 48 h in Kultur sind erfolgreich transduzierte CD34⁺ SZ nach Analyse der GFP Expression im Durchflusszytometer (Abb. 4.7.a) und im Mikroskop (Abb. 4.7.c) abgebildet. Für die Verlaufskontrolle ist weiterhin die GFP Expression nach zwei Wochen in Kultur (Abb. 4.7.b) dargestellt.

293FT Zellen in Kultur



SeAx Zellen in Kultur

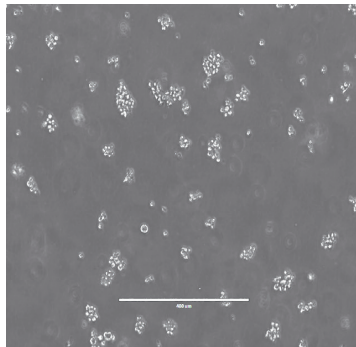
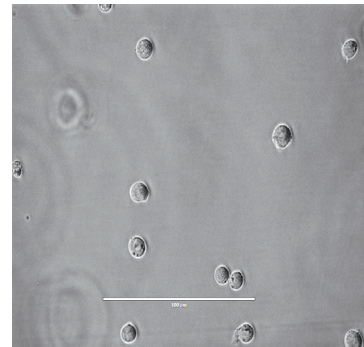
CD34⁺ Zellen in Kultur

Abb. 4.4. Dargestellt sind 293FT Zellen vor der Transfektion und SeAx bzw. CD34⁺ Zellen in Kultur vor der Transduktion mit dem Kontrollplasmid CS-CDF-EG-PRE oder CS-CA-GFP in 10-facher (293FT Zellen und SeAx Zellen) bzw. 40-facher (CD34⁺ Zellen) Vergrößerung.

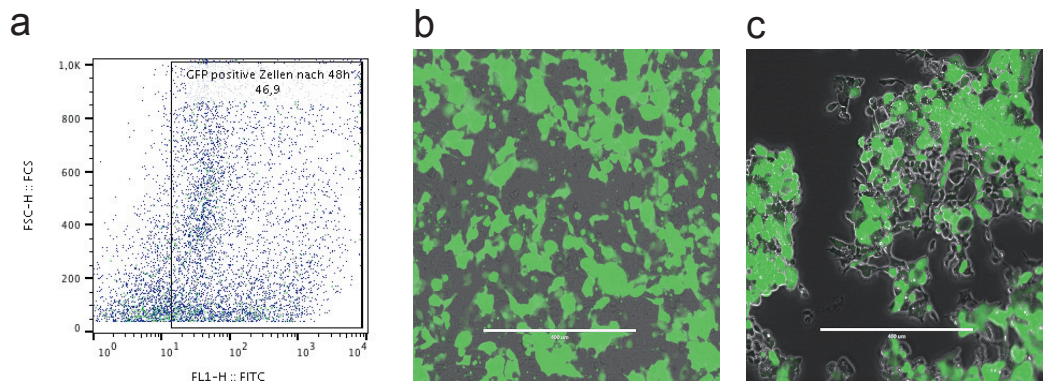


Abb. 4.5. 293FT Zellen transfiziert mit dem Kontrollplasmid CS-CDF-EG-PRE (a und b) oder CS-CA-GFP (c) nach 48 h Inkubation in 10-facher Vergrößerung.

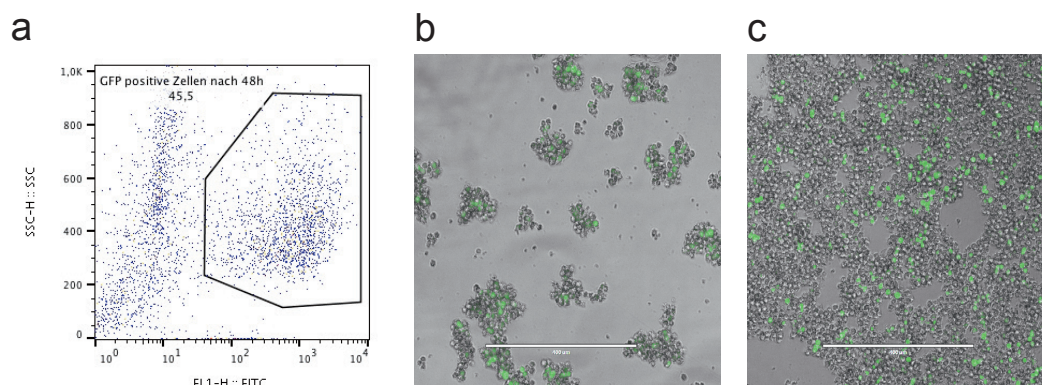


Abb. 4.6. SeAx Zellen transduziert mit dem Kontrollplasmid CS-CDF-EG-PRE (a und b) 48 h und nach 7 Tagen (c) in Kultur in 10-facher Vergrößerung.

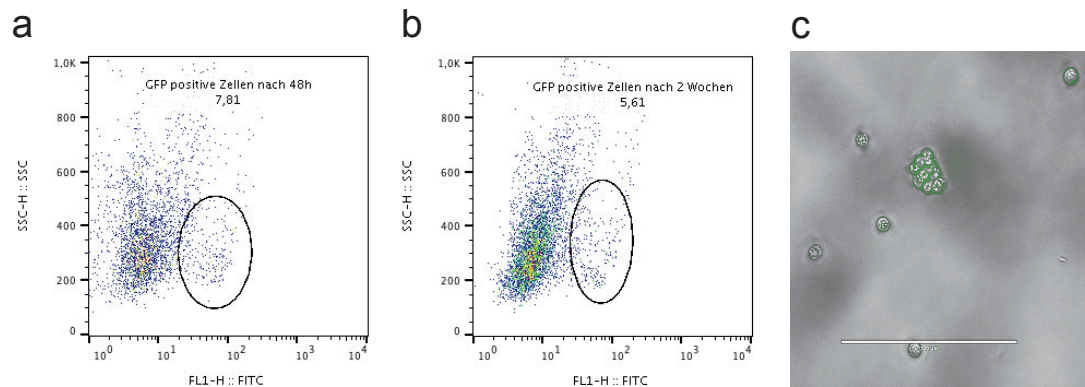
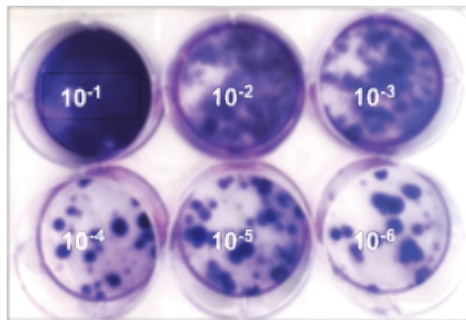


Abb. 4.7. CD34⁺ SZ transduziert mit dem Kontrollplasmid CS-CDF-EG-PRE nach 48 h (a und c) und zwei Wochen (b) in Kultur in 40-facher Vergrößerung.

Nach erfolgter Etablierung der Transfektion und Transduktion war es möglich, lentivirale Partikel, die für die TF kodieren, über Infektion von 293FT Zellen zu generieren und CD34⁺ SZ zu infizieren. Zunächst wurden die Titer der generierten lentiviralen Partikel bestimmt, um weitergehend ein optimales Verhältnis zwischen CD34⁺ SZ und Viren zu finden.

4.3. TF-übertragende lentivirale Partikel können HT1080 und 293FT Zellen infizieren

Die lentiviralen Partikel pLenti-TF wurden, wie im Methodenteil (Kapitel 3.3.3.) beschrieben, in 293FT Zellen generiert und die Titer durch Selektion mit Blasticidin über einen Zeitraum von 12 Tagen bestimmt. Nach Färbung mit Crystal Violet konnten die resistenten Kolonien gezählt werden und so die Transduktionseinheiten (TU/ml) berechnet werden. Lentivirale Partikel mit einem Titer ab 10^5 wurden für die Versuche genutzt. Die Abb. 4.8. zeigt die Titer der pLenti-TF.



Beispiel Berechnung TF 12:

10^{-6} Verdünnung: 15 Kolonien
 $\rightarrow 1,5 \times 10^7$ TU / ml

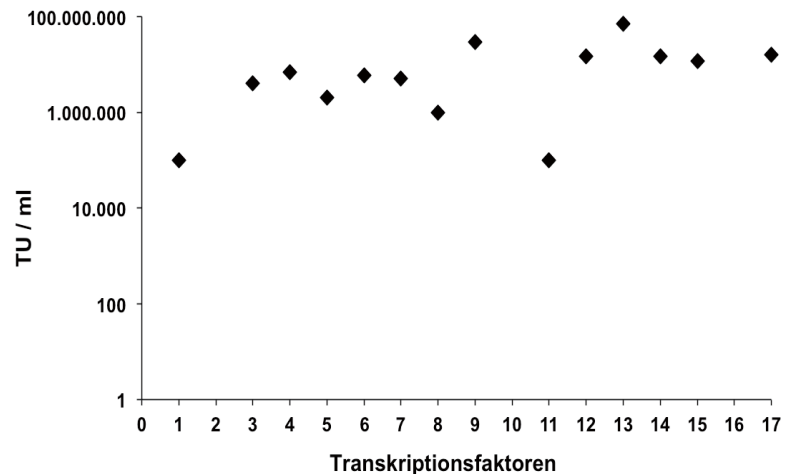
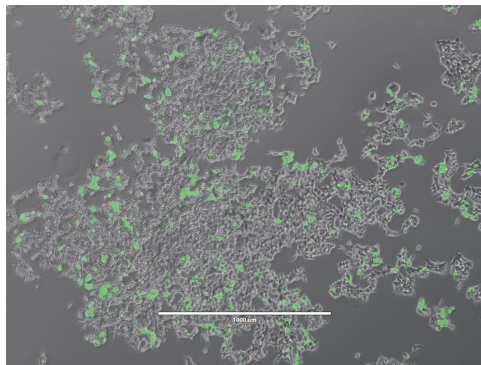


Abb. 4.8. Darstellung der Virustiter der pLenti-TF nach Infektion von HT1080 Zellen der Verdünnungsstufen 10^{-1} - 10^{-6} . Die Titrierung erfolgte über 12 Tage durch den Zusatz des Selektionsantibiotikums Blastizidin. Abschließend wurden die resistenten Kolonien mit Crystal violett angefärbt und zur Bestimmung der TU/ml ausgezählt. Beispielhaft sind die resistenten Kolonien für den TF 12 in einer 6-Well Platte im Verhältnis 1:1 nach 12 Tagen Inkubation mit Blastizidin abgebildet. Hier konnten bei der Verdünnungsstufe 10^{-6} 15 resistente Kolonien bestimmt werden, was einem Titer von $1,5 \times 10^7$ Transduktionseinheiten pro ml entspricht.

Ein Titer von mindestens 10^5 konnte für die TF 2, 10 und 16 auch nach mehrmaliger Wiederholung (n=4) der Transfektion von 293FT Zellen nicht erreicht werden.

Für die Titrierung der lentiviralen Partikel pVenus-TF wurden 293FT Zellen mit den generierten lentiviralen Partikeln infiziert. Die Titer ergaben sich durch mikroskopische Bestimmung der YFP-positiven 293FT Zellen nach 48 h Kultivierung. Hierbei wurde für TF 6 und TF 16 ein Titer von 10^6 TU/ml erreicht, alle weiteren Viren konnten 293FT Zellen der Verdünnungsstufen 10^4 oder 10^5 infizieren (Abb. 4.9.). Auch nach mehrmaliger Wiederholung (n=3) der Transfektion konnten keine höheren Titer erreicht werden. Für die nachfolgenden Versuche mit den pLenti-TF wurden die frisch isolierten $CD34^+$ SZ mit einer MOI von 20 (z.B. 50.000 Zellen mit 1×10^6 lentiviralen Partikeln) infiziert. Die lentiviralen Partikel der pVenus-TF, welche einen geringeren Titer als 10^6 aufwiesen, wurden unverdünnt genutzt.



Infizierte 293 FT Zellen der Verdünnungsstufe 10^{-6} für TF 6

→ 10^6 TU / ml

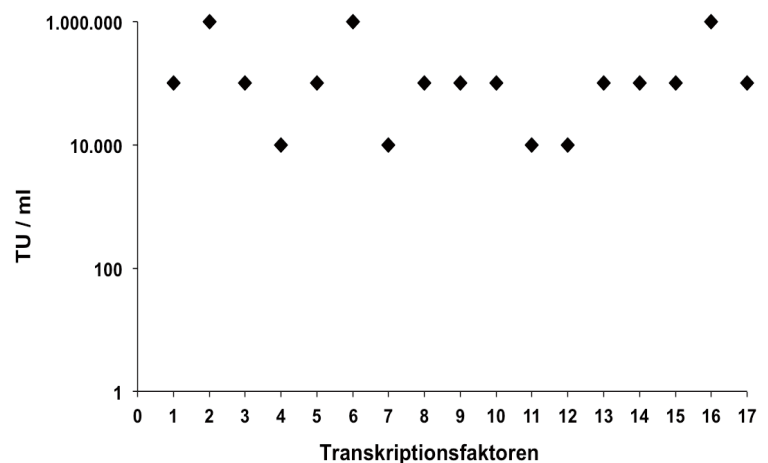


Abb. 4.9. Darstellung der Virustiter der pVenus-TF nach Infektion von 293FT Zellen der Verdünnungsstufen 10^{-1} - 10^{-6} . Die YFP positiven 293FT Zellen wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie nach 24 h identifiziert. Beispielhaft für den TF 6 ist die Verdünnungsstufe 10^{-6} in 4-facher Vergrößerung abgebildet, der Titer entspricht 10^6 Transduktionseinheiten pro ml.

4.4. Die Infektion von $CD34^+$ SZ mit TF im pLenti führt zu doppelt-positiven Zellen für mastzellspezifische Marker

Um die Relevanz der einzelnen TF für die Entwicklung von MZ aus $CD34^+$ SZ zu überprüfen, wurden die über Nacht mit SCF inkubierten SZ mit den lentiviralen Partikeln infiziert. Hierbei wurden die SZ mit jeweils nur einem Faktor pro Ansatz transduziert. Die Ansätze wurden nach einer und nach zwei Wochen im Durchflusszytometer auf die Expression der mastzellspezifischen Marker $CD117$ und $Fc\epsilon RI$ analysiert. Die Zellen wurden während der Kultivierung über das Selektionsantibiotikum Blasticidin selektioniert. Nach einer Woche in Kultur waren bei allen Ansätzen $\leq 1\%$ aller Zellen doppelt positiv für $CD117$ und $Fc\epsilon RI$. Mit IL-3/SCF kultivierte PSCMCs sind nach einer Woche zu $2\% \pm 0,4\%$ positiv für beide Marker.

Ausgehend von diesem Ergebnis führte die Infektion der $CD34^+$ SZ nach einer Woche nicht zu einer höheren Anzahl an MZ in der Kultur. Hierbei wurde die statistische Signifikanz gegen PSCMCs getestet. Die pLenti-TF, außer pLenti-REPRIMO, JAK2 und BHLHE-40, zeigten eine signifikant erniedrigte doppelte Expression der mastzellspezifischen Marker $CD117$ und $Fc\epsilon RI$ im Vergleich zu IL3/SCF-kultivierten PSCMCs.

Nach einer Woche Infektion mit pLenti-BHLHE-40 waren $14,2\% \pm 18,8\%$ der Zellen positiv für Fc ϵ RI, der höchste Wert im Vergleich zu PSCMCs ($10,2\% \pm 6,3\%$) und MOCK ($1,2\% \pm 1,3\%$) transduzierten CD34⁺ SZ. Mit pLenti-MITF transduzierte CD34⁺ SZ waren zu $6,0\% \pm 2,1\%$ positiv für den Oberflächenrezeptor CD117, im Vergleich zu PSCMCs ($6,4\% \pm 4,4\%$) und MOCK ($3,8\% \pm 1,2\%$) transduzierten CD34⁺ SZ. In Abb. 4.10.a sind die positiven Zellen (in %) für beide Marker (CD117/Fc ϵ RI) in aufsteigender Reihenfolge dargestellt. In Abb. 4.10.b und c sind die Werte der einzelpositiven Zellen für die Marker CD117 und Fc ϵ RI in der Kultur abgebildet.

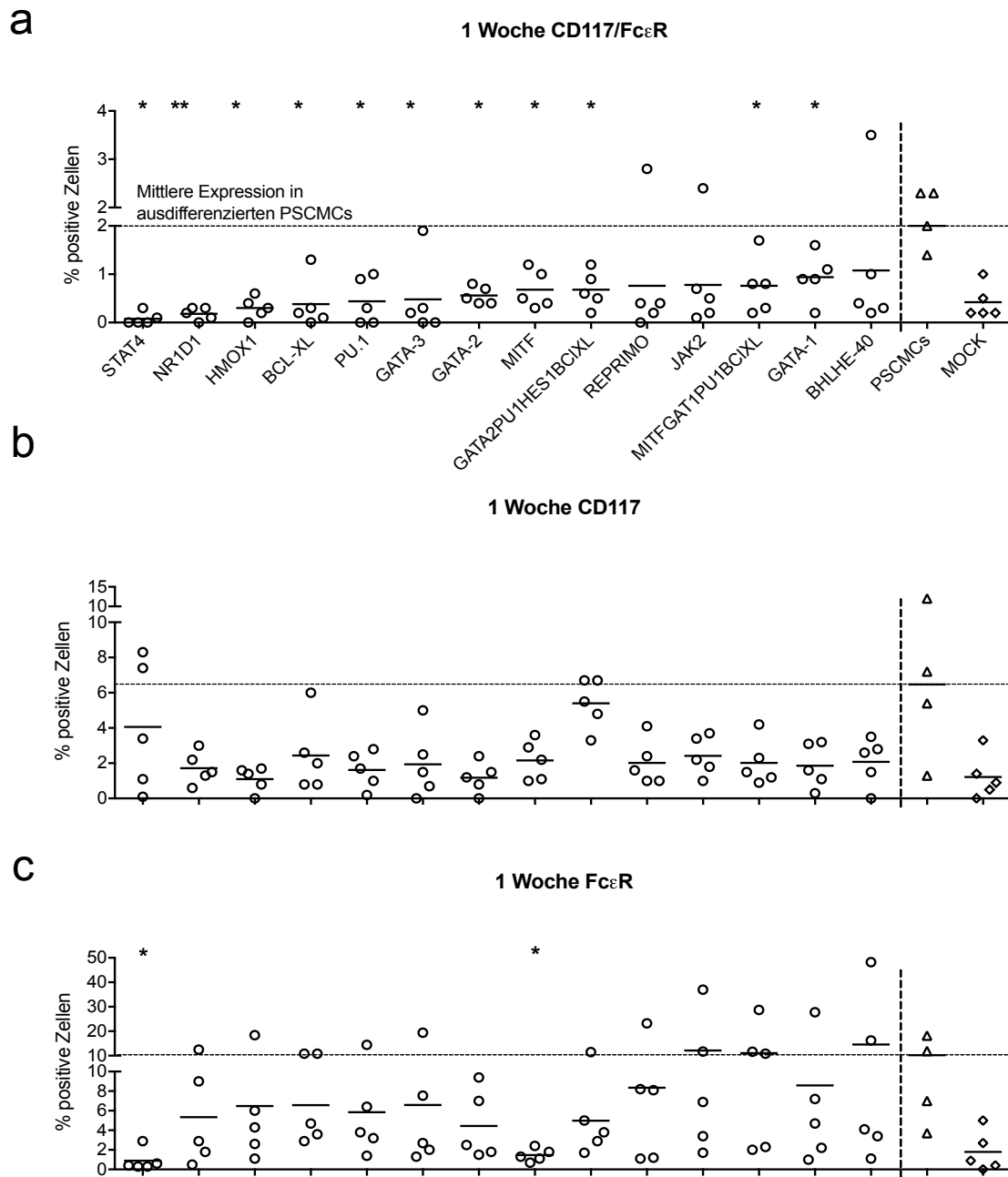


Abb. 4.10.a-c CD34⁺ SZ kultiviert für eine Woche nach Infektion mit lentiviralen Partikeln pLenti-TF. Nach einer Woche in Kultur sind $2 \pm 0,4\%$ der PSCMCs doppelt positiv für die mastzellspezifischen Marker CD117 und FcεRI ($n=5$) im Vergleich zur MOCK ($1,1\% \pm 1,2\%$, $n=5$). Dargestellt sind Mittelwerte und Einzelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten, geordnet nach aufsteigender Anzahl an % positiver Zellen für die jeweiligen Marker. Für die statistische Analyse wurde der Mann-Whitney-U-Test für nicht-parametrische Daten verwendet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Die Beschriftung für b und c entspricht der Abb.a.

Bei Betrachtung der 17 pLenti-TF infizierten CD34⁺ SZ nach zwei Wochen in Kultur, dargestellt in Abbildung 4.11.a, konnten bei den pLenti-TF GATA-2, BHLHE-40, GATA-3 und HMOX1 infizierten CD34⁺ SZ 3,2%-5% doppelt positive Zellen für CD117 und FcεRI gemessen werden. Im Vergleich haben $7,9\% \pm 4,9\%$ der PSCMCs und $1,1\% \pm$

1,3% MOCK transduzierte Zellen beide Oberflächenrezeptoren (CD117 und FcεRI) exprimiert. Bei den pLenti-TF REPRIMO, BHLHE-40, HMOX1 und GATA-3 lag der prozentuale Anteil (9-13%) an Zellen, die nur den FcεRI Rezeptor exprimieren, hingegen deutlich über dem Messwert ($5\% \pm 4,7\%$) der PSCMCs (Abb. 4.11.c). Bei den pLenti-TF STAT4 und MITF infizierten CD34⁺ SZ konnten ähnlich hohe Werte (13,5% bzw. 9%), wie bei PSCMCs (16,8%), für den Rezeptor CD117 im Durchflusszytometer gemessen werden (Abb. 4.11.b). Für pLenti-HMOX1 (ca. 1 kb) wurden prozentual die meisten doppelt positiven Zellen für CD117/FcεRI gemessen (4.11.a). Auch konnte für pLenti-HMOX1 der höchste Virustiter (7×10^7 TU/ml) erzielt werden (Abb. 4.8.).

Ausgehend von diesem Ergebnis führte die Infektion der CD34⁺ SZ auch nach zwei Wochen nicht zu einer höheren Anzahl an MZ in der Kultur. Hierbei wurde die statistische Signifikanz gegen PSCMCs getestet. Die Hälfte der pLenti-TF zeigten eine signifikant erniedrigte doppelte Expression der mastzellspezifischen Marker CD117 und FcεRI im Vergleich zu IL3/SCF-kultivierten PSCMCs (Abb. 4.11.a). Die andere Hälfte der TF sind statistisch nicht signifikant (n.s.) Für die pLenti TF GATA-3 und HMOX1 wurde der höchste prozentuale Anteil an CD117/ FcεRI⁺ aller infizierten Zellen gemessen (3,7% bzw. 5%). Auch wurden hier bei einem Experiment die insgesamt höchsten Werte detektiert (11% bzw. 17,5%). Exemplarisch sind die Dotplots der durchflusszytometrischen Analyse dieses Experiments in Abb. 4.13. dargestellt.

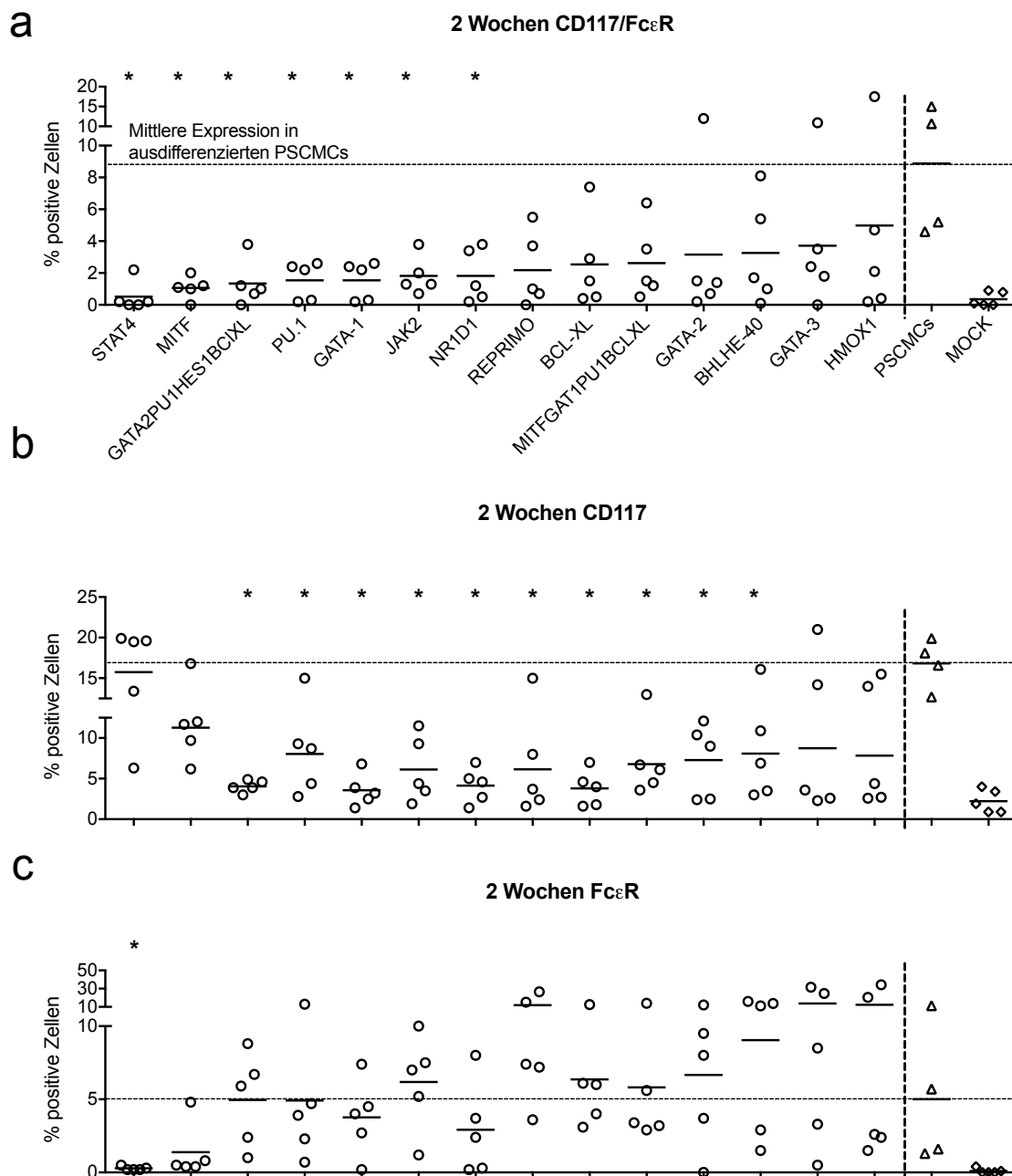


Abb. 4.11.a-c CD34⁺ SZ kultiviert für zwei Wochen nach Infektion mit lentiviralen Partikeln aller pLenti-TF und Analyse auf die Expression von CD117 und FcεRI. 7,9% ± 4,9% der PSCMCs sind doppelt positiv für die mastzellspezifischen Marker CD117 und FcεRI (n=4) im Vergleich zur MOCK Kontrolle (1,1% ± 1,3%, n=5). Die pLenti-TF GATA-2, BHLHE-40, GATA-3 und HMOX1 führten nach zwei Wochen im Durchschnitt zu 3 - 5% Zellen mit mastzellspezifischen Markern. Dargestellt sind Mittelwerte und Einzelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten, geordnet nach aufsteigender Anzahl an % positiver Zellen für die jeweiligen Marker. Für die statistische Analyse wurde der Mann-Whitney-U-Test für nicht-parametrische Daten verwendet. Es wurden alle pLenti-TF gegen PSCMCs getestet * p<0.05. Die Beschriftung für b und c entspricht der Abb. a.

In Abbildung 4.12. wurden die Daten aus Abb. 4.11.a in Abhängigkeit der Größe der TF dargestellt. Für den kleinsten pLenti-TF REPRIMO konnten im direkten Vergleich zum größten pLenti-TF MITFGAT1PU1BCLXL keine erhöhte Anzahl an CD117/FcεRI⁺ Zellen

detektiert werden. Eine Korrelation zwischen Größe des Inserts und Anzahl an doppelt positiven Zellen für die mastzellspezifischen Marker CD117 und FcεRI konnte in der vorliegenden Studie nicht festgestellt werden.

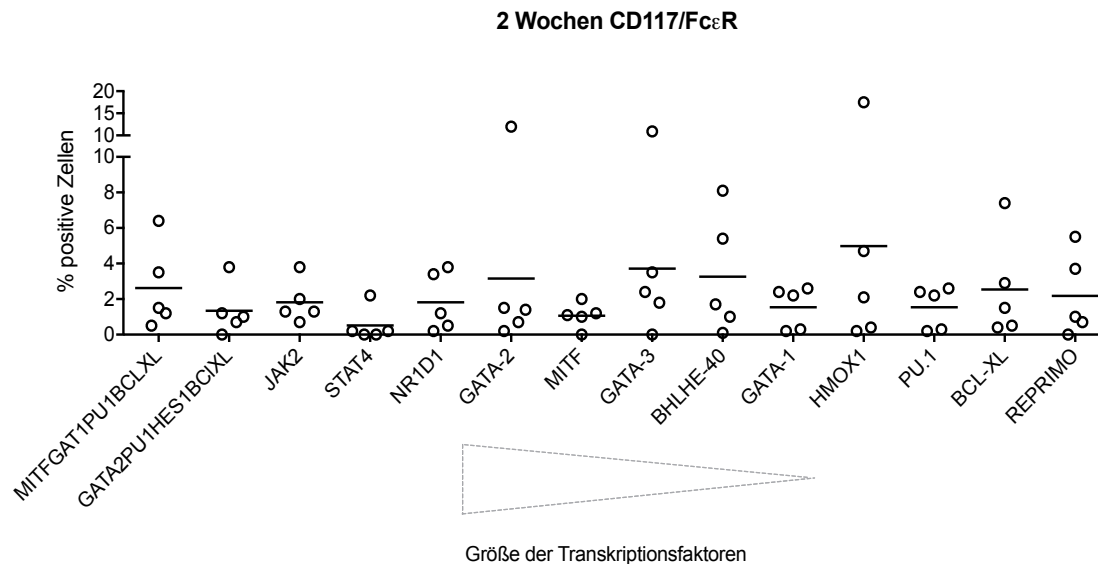


Abb. 4.12. CD34⁺ SZ kultiviert für zwei Wochen nach Infektion mit lentiviralen Partikeln der pLenti-TF. Aus CD34⁺ SZ, die mit den größten Inserts (MITFGAT1PU1BCLXL (4664 bp) und GATA2PU1HES1BCLXL (4196 bp)) infiziert wurden, sind 2,6% ± 1,4% aller Zellen nach zwei Wochen positiv für die mastzellspezifischen Marker CD117 und FcεRI. Bei den Ansätzen mit wesentlich kleineren TF wie HMOX1 (1088 bp) und GATA-3 (1556 bp) konnten nach zwei Wochen 5% ± 7,2% bzw. 3,7% ± 4,2% Zellen gemessen werden, die CD117 und FcεRI auf ihrer Oberfläche exprimieren. Dargestellt sind Mittelwerte und Einzelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten, geordnet nach Größe der Inserts.

In der Abbildung 4.13. ist die durchflusszytometrische Analyse für die Expression von CD117 und FcεRI der Zellen nach zwei Wochen in Kultur als Dotplots für die pLenti-TF MITF, GATA2PU1HES1BCLXL, HMOX1, GATA-3 und Kontrollen dargestellt. Ebenso wie bei PSCMCs (Abb. 4.13.f) sind bei HMOX1 (Abb. 4.13.c) und GATA-3 (Abb. 4.13.d) infizierten CD34⁺ SZ drei Zellpopulationen zu erkennen. Diese drei Zellpopulationen sind bei MITF- und GATA2PU1HES1BCLXL-infizierten Zellen nicht auszumachen. Es ist das Experiment mit den höchsten Messwerten für CD117/ FcεRI nach Infektion der Zellen mit pLenti-HMOX1 und GATA-3 abgebildet.

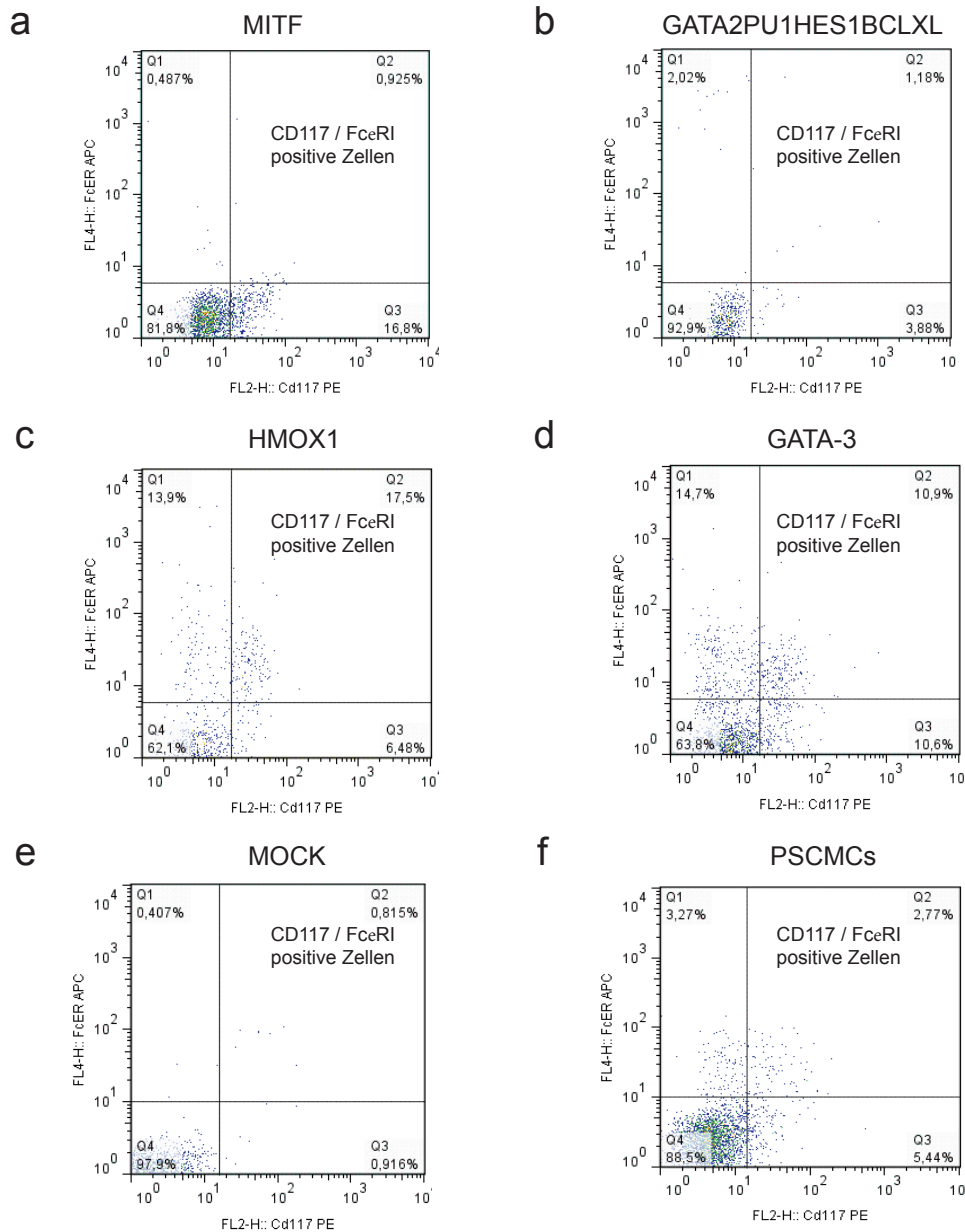


Abb. 4.13. CD34⁺ SZ kultiviert für zwei Wochen mit den pLenti-TF MITF (a), GATA2PU1HES1BCLXL (b), HMOX1 (c), GATA-3 (d) oder MOCK (e) nach durchflusszytometrischer Analyse auf die mastzellspezifischen Marker CD117 und FcεRI. Im Vergleich sind MOCK infizierte Zellen (e) und IL3/SCF-kultivierte PSCMCs (f) dargestellt. Diese waren nach zwei Wochen zu 2,8% doppelt positiv für CD117/FcεRI. Die Abbildung zeigt Dotplots des Experiments (aller fünf Ansätze) mit den höchsten Messwerten für CD117/FcεRI bei pLenti-HMOX1 (17,5%) und GATA-3 (10,9%) infizierten Zellen.

Zusammenfassend betrachtet war die prozentuale Anzahl an Zellen, die im Durchflusszytometer positiv für CD117/FcεRI gemessen wurde, bei allen Ansätzen niedriger als bei IL-3/SCF kultivierten PSCMCs. Für die nähere Analyse wurden zusätzlich die absoluten Zellzahlen der Gesamtkultur (Abb. 4.14.a) und die absolute Anzahl doppelt positiver Zellen für CD117 und FcεRI (Abb. 4.14.b) herangezogen. pLenti-MITF kultivierte Zellen wiesen nach zwei Wochen die höchste absolute Zellzahl auf (22×10^3 Zellen/ml). Für pLenti-HMOX1 und pLenti-GATA-3 infizierte Zellen wurden

Werte von ca. 10×10^3 Zellen/ml gemessen. Die daraus detektierte Zellzahl > 100 doppelt positiver Zellen für CD117 und FcεRI konnte für die pLenti-TF MITF, GATA-1 und GATA-3 gemessen werden. Dies entspricht z.B. bei MITF einem prozentualen Anteil von 0,5% an CD117/FcεRI⁺ Zellen der Gesamtkultur.

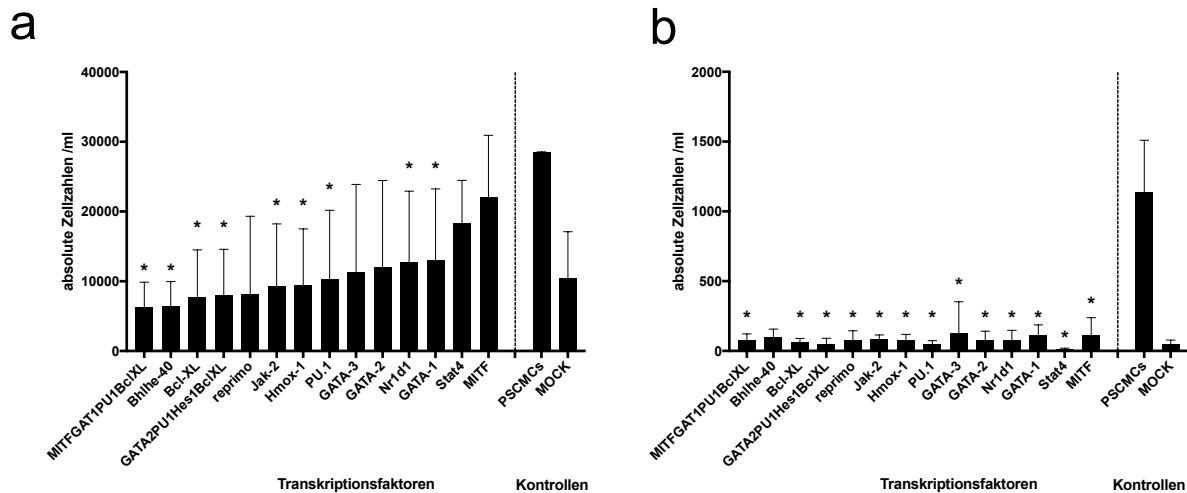


Abb. 4.14. Die absoluten Zellzahlen sind nach zwei Wochen in Kultur für alle Ansätze der pLenti-TF dargestellt (a), im Vergleich zu MOCK infizierten CD34⁺ SZ und PSCMCs. Die höchste Zellzahl wurde bei pLenti-MITF generierten Zellen (22×10^3 Zellen/ml) erreicht. Weiterhin ist die Anzahl doppelt positiver Zellen für CD117 und FcεRI dargestellt (b). Hier konnte bei pLenti-GATA-3 infizierten Zellen der höchste Wert (128 Zellen/ml) gemessen werden. Für die pLenti-TF MITF, GATA-1 und BHLHE-40 wurden > 100 Zellen/ml detektiert, bei allen weiteren TF lag die Zellzahl darunter. Es sind die Mittelwerte \pm SD aus fünf unabhängigen Experimenten dargestellt (a), geordnet nach aufsteigender Zellzahl. Diese Reihenfolge wurde für (b) beibehalten. Für die statistische Analyse wurde der Mann-Whitney-U-Test für nicht-parametrische Daten verwendet. Es wurden alle pLenti-TF gegen PSCMCs getestet. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Durch das Fehlen eines fluoreszierenden Markers im Genom der lentiviralen Partikel konnte eine Differenzierung zwischen transduzierten und nicht-transduzierten Zellen nicht erfolgen. Für die weitere Untersuchung der Fragestellung, ob eine Differenzierung von MZ aus CD34⁺ SZ durch einen TF möglich ist, wurden die Gene für die einzelnen TF in den Vektor pVenus kloniert. Die anschließend generierten lentiviralen Partikel enthalten zusätzlich die Sequenz für ein YFP fluoreszierendes Protein, welches zusammen mit dem Gen für die einzelnen TF in das Genom der Zielzellen integriert wird.

4.5. Die Anzahl an YFP positiven Zellen nimmt während der dreiwöchigen Kultivierung nach Transduktion mit pVenus-TF ab

Für die Überprüfung der Transduktionseffizienz wurden die CD34⁺ SZ mit lentiviralen Partikeln der pVenus-TF infiziert. Die Sequenz für das YFP fluoreszierendes Protein wird dabei zusätzlich zu den TF in das Genom der Zielzellen integriert, so dass eine Analyse der erfolgreich transduzierten Zellen im Durchflusszytometer möglich ist. Eine Überprüfung der Zellen erfolgte nach 24 h und nach drei Wochen Kultivierung. Für die pVenus-TF MITF (12,2% ± 11%) HES-1 (7% ± 5,2%), und BCL-XL (5,7% ± 2,2%) konnten nach 24 h Kultur die höchsten YFP-Werte gemessen werden. Bei MOCK (ohne TF, aber mit YFP Marker) transduzierten CD34⁺ SZ wurden 5 ± 1% YFP-positive Zellen detektiert. Die Werte für die weiteren TF lagen nach 24 h Infektion zwischen 0,3-4,7% (Abb. 4.15.a). Die Werte für PSCMCs sind zusätzlich eingefügt, um eine mögliche Autofluoreszenz der Zellen auszuschließen.

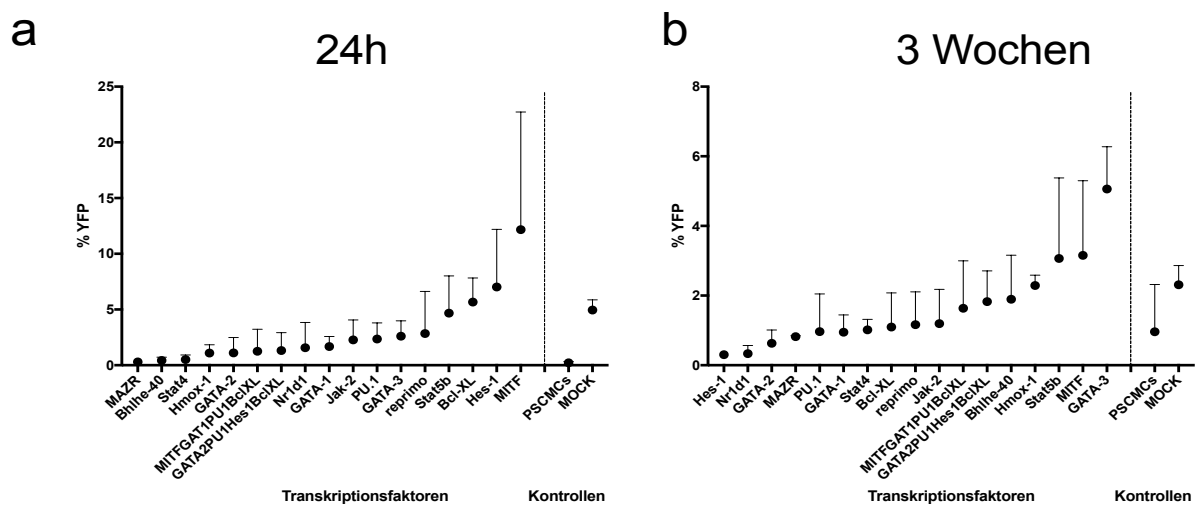


Abb. 4.15. Dargestellt ist die YFP Expression der CD34⁺ SZ nach 24 h Infektion mit lentiviralen Partikeln der pVenus-TF (a) und nach drei Wochen in Kultur (b). Nach 24 h waren 5% ± 0,9% der MOCK transduzierten CD34⁺ SZ positiv für YFP, nach drei Wochen 2,3% ± 0,6% der Zellen. Die maximale YFP Expression nach 24 h Infektion wurde bei dem Faktor pVenus-MITF (12,2% ± 11%) gemessen, diese verringerte sich nach drei Wochen auf 3,2% ± 2,2% YFP positive Zellen. Es sind die Mittelwerte ± SD aus vier (a) bzw. zwei (b) unabhängigen Experimenten dargestellt, geordnet nach aufsteigender YFP Expression.

Nach drei Wochen in Kultur lag die YFP Expression bei allen Ansätzen ≤ 5% (Abb. 4.15.b). Einzig für pVenus-GATA-3 infizierte CD34⁺ SZ konnte ein zweifacher Anstieg des YFP Signals, von 2,6% auf 5% aller Zellen, vermerkt werden. Für pVenus-MITF infizierte CD34⁺ SZ wurde bei 3,2% ± 2,1% aller Zellen ein positives Signal für

YFP gemessen, der Wert fiel damit 4-fach geringer aus, als nach 24 h Infektion. Auch für die Ansätze mit den pVenus-TF HES-1 (0,3%) und STAT5b (3%) wurden, im Vergleich zur 24 h-Messung, weniger Zellen mit YFP Expression detektiert. Auch bei den MOCK transduzierten CD34⁺ SZ sank der Wert für YFP von 5% auf 2,3%. Das Protein für YFP wird analog zu den TF exprimiert, so dass dessen Expressionsstärke als Marker für die Aktivität der einzelnen TF betrachtet werden kann.

Die nachfolgenden Analysen der pVenus-TF wurden für alle 17 TF bzw. TF-Kombinationen durchgeführt, jedoch wurde die Darstellung der Ergebnisse auf 5 TF beschränkt. Diese TF wurden nach vorheriger Prüfung aller Daten (z.B. Konsistenz mit pLenti-Ergebnissen) ausgewählt.

4.6. Die Infektion mit pVenus-TF führt zu doppelt positiven Zellen für mastzellspezifische Marker

Nach dreiwöchiger Kultivierung der Zellen wurden diese auf die mastzellspezifischen Marker CD117 und FcεRI hin analysiert. Die absoluten Zellzahlen wurden für die nähere Analyse herangezogen, um die Anzahl an Zellen, die mastzellspezifische Marker und YFP exprimierten, weiter zu beschreiben. Die höchste Anzahl an YFP-positiven Zellen konnte für pVenus-MITF infizierte CD34⁺ SZ gemessen werden, wobei die Hälfte der Zellen zusätzlich positiv für CD117/FcεRI waren (Abb. 4.16.a). Wie bereits unter Kapitel 4.5. beschrieben, nahm die Anzahl YFP positiver Zellen bei pVenus-MITF infizierten Zellen nach drei Wochen stark ab, stellt jedoch bezogen auf alle Ansätze den höchsten Wert da. Diese Abnahme bestätigt sich bei Betrachtung der absoluten Zellzahlen. Nach 24 h waren ca. 6000/ml Zellen positiv für YFP, nach drei Wochen nur noch ca. 1000/ml Zellen. Die Abnahme der absoluten Zellzahlen und einhergehend die Abnahme der YFP positiven Zellen wurde bei allen Ansätzen beobachtet. Eine Ausnahme bildet der Anstieg an YFP positiven Zellen bei pVenus-GATA-3 infizierten CD34⁺ SZ (Kapitel 4.5.). Die nähere Analyse der absoluten Zellzahlen zeigt jedoch, dass die Anzahl an YFP positiven Zellen von ca. 1300 auf ca. 650 Zellen gesunken ist.

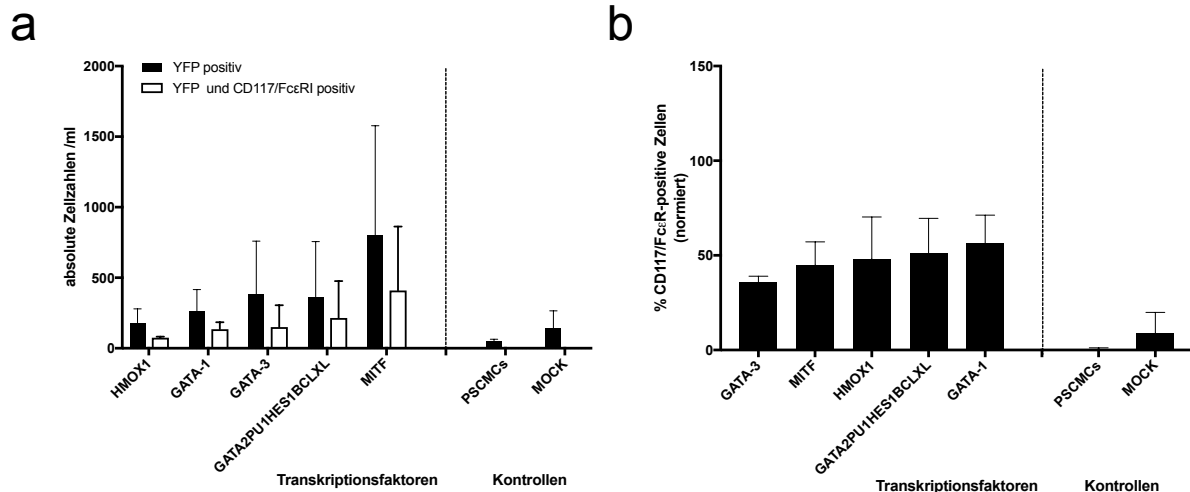


Abb. 4.16. CD34⁺ SZ kultiviert für drei Wochen nach Infektion mit lentiviralen Partikeln pVenus-TF HMOX1, GATA-1, GATA-3, GATA2PU1HES1BCLXL und MITF sind zwischen 35 und 56% doppelt positiv für YFP und die mastzellspezifischen Marker CD117 und FcεRI (n=2). Drei Wochen mit IL-3/SCF kultivierte PSCMCs sind zwischen 30% und 40% (Abb. 4.17.g) doppelt positiv für CD117 und FcεRI. In Abbildung a sind die absoluten Zellzahlen/ml Zellkultur für YFP einzelpositive Zellen und YFP und CD117/FcεRI doppelt positive Zellen dargestellt, sortiert nach steigender doppelter Expression. Abbildung b zeigt nur CD117/FcεRI positive Zellen normiert auf YFP positive Zellen. Es sind Mittelwerte ± SD aus 2 unabhängigen Experimenten gezeigt.

Die Zellen wurden außerdem nach Normierung analysiert, um Unterschiede in den absoluten Zellzahlen bei den einzelnen Ansätzen auszugleichen (Abb. 4.16.b). Bezogen auf die doppelte Expression von YFP und CD117/FcεRI konnte für pVenus-GATA-1 infizierte CD34⁺ SZ der höchste Wert gemessen werden (56,3% ± 14,9%). Über 50% doppelt positive Zellen für YFP und die mastzellspezifischen Marker wurden weiterhin bei den pVenus-TF GATA2PU1HES1BCLXL, HMOX1 und MITF transduzierten Zellen detektiert. Für die pVenus-TF MITF, GATA2PU1HES1BCLXL, HMOX1 und GATA-3 und Kontrollen sind in Abb. 4.17.a-g exemplarisch Dotplots der Analyse auf CD117 und FcεRI dargestellt.

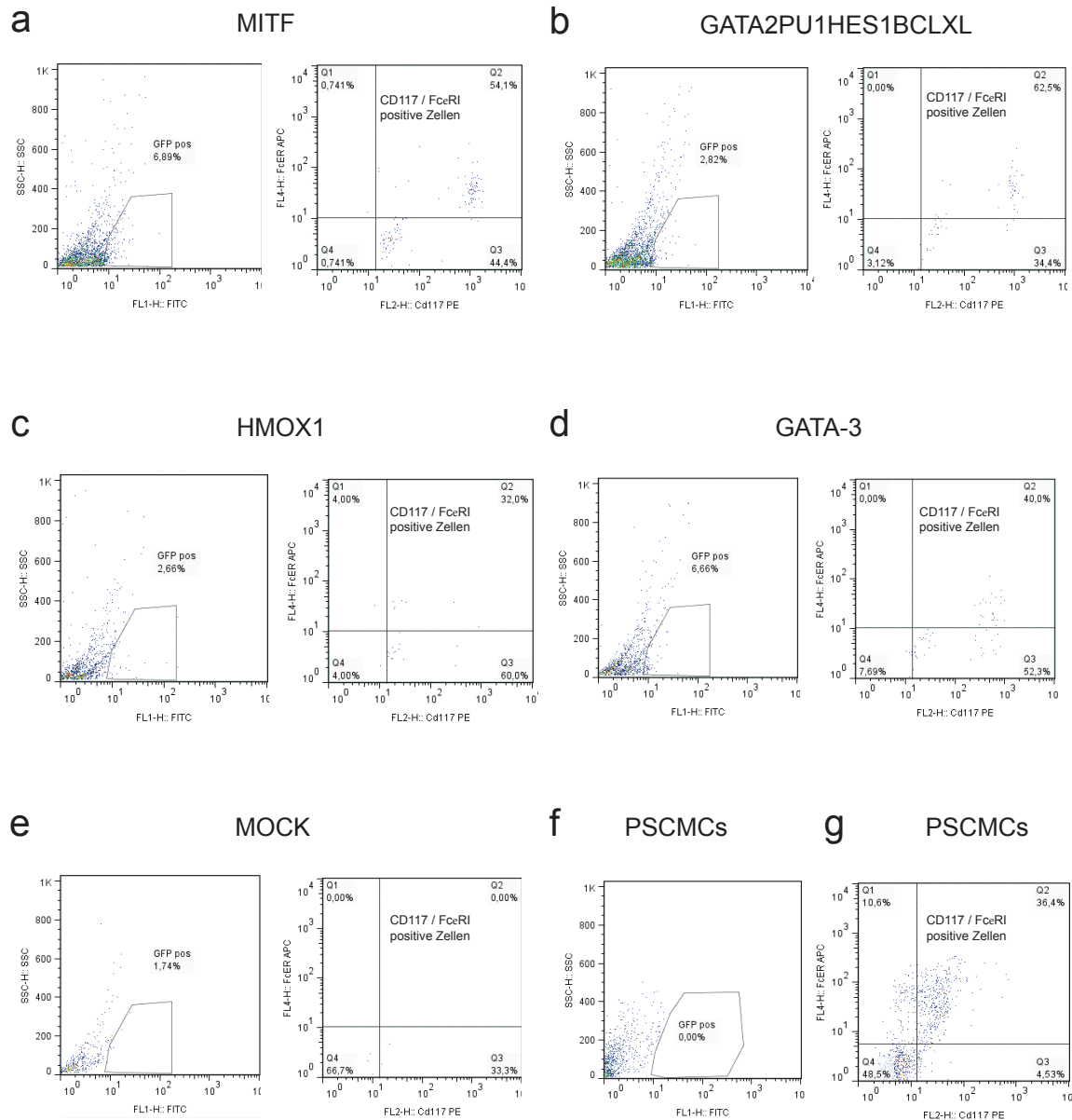


Abb. 4.17. Dargestellt sind die pVenus-TF MITF (a), GATA2PU1HES1BCLXL (b), HMOX1 (c), GATA-3 (d) und MOCK (e) infizierten CD34⁺ SZ nach drei Wochen in Kultur. Im Vergleich zu MOCK infizierten Zellen (e) und mit Zytokinen kultivierten PSCMCs (g). Jeweils dargestellt sind Dotplots der YFP positiven Zellen (a-f) und daraus resultierend die positiven Zellen für die Marker und CD117 und FcεRI (a-e). Bei pVenus-GATA2PU1HES1BCLXL generierten Zellen wurde mit 62,5% doppelt positiver Zellen der höchste Wert gemessen. Bei den IL-3/SCF kultivierten PSCMCs waren nach drei Wochen 36,4% aller Zellen positiv für mastzellspezifische Marker. Gezeigt sind die Dotplots der durchflusszytometrischen Analyse eines Experiments.

Um zu kontrollieren, ob die Transduktion mit lentiviralen Partikeln einen negativen Einfluss auf die CD34⁺ SZ haben, wurde die Viabilität der Zellen überprüft und weitergehend mikroskopische Aufnahmen der Zellen angefertigt.

4.7. pVenus-HMOX1 und pVenus-MITF beeinflussen die Viabilität der Zellen

Die weitere Charakterisierung der generierten Zellen erfolgte durch Bestimmung der Viabilität aller Zellen. Hierfür fand das Nukleinsäure-Färbemittel Sytox Green Anwendung. Als fluoreszierendes Mittel können somit Zellkerne und Chromosomen angefärbt werden, um die Anzahl toter Zellen einer Kultur darzustellen. Die Abb. 4.18.a stellt die Gesamtzellzahl der Ansätze für pVenus-TF GATA-3, HMOX1, GATA-1, GATA2PU1HES1BCLXL und MITF dar. In Abb. 4.18.b sind die lebenden Zellen als prozentualer Anteil dieser Gesamtzellkultur für die entsprechenden Ansätze abgebildet.

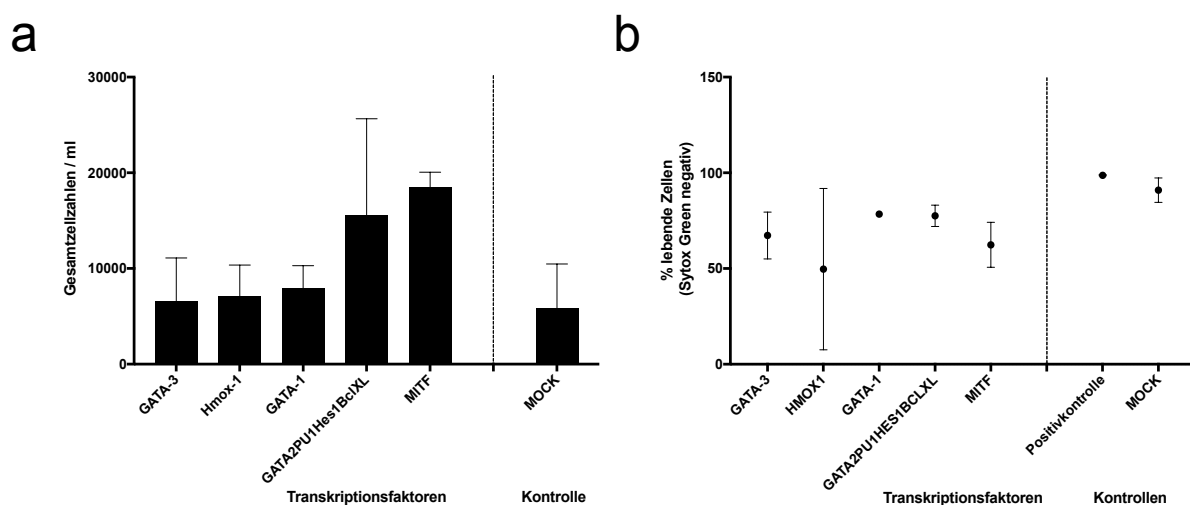


Abb. 4.18. Die Viabilität der pVenus-TF GATA-3, HMOX1, GATA-1, GATA2PU1HES1BCLXL und MITF infizierten CD34⁺ SZ wurde mit Sytox Green zur Anfärbung von Nukleinsäuren im Durchflusszytometer bestimmt. In Abbildung a sind die Gesamtzellzahlen der Kulturen dargestellt. In gleicher Reihenfolge wie in (a) zeigt (b) die Ergebnisse der Sytox Green Färbung. Es sind die Gesamtzellzahlen (a) und die Sytox Green negativen Zellen (b) als Mittelwert \pm SD aus zwei unabhängigen Experimenten abgebildet. Als Positivkontrolle für die Sytox Green Färbung wurden LAD2 Zellen verwendet.

Die Viabilität der mit lentiviralen Partikeln infizierten Zellen lag, für die ausgewählten Faktoren, nach drei Wochen zwischen 67-78%. Ausnahmen bildeten die pVenus-HMOX1 infizierten CD34⁺ SZ mit 49% \pm 42% und die pVenus-MITF infizierten CD34⁺ SZ mit 62% \pm 12%. MOCK infizierte Zellen waren zu 91% \pm 6% Sytox Green negativ.

4.8. TF beeinflussen die Anzahl und Größe der Zellen

Nach drei Wochen in Kultur unterschieden sich die TF infizierten CD34⁺ SZ von frisch isolierten und undifferenzierten CD34⁺ SZ in der Zellzahl und in der Zellmorphologie.

Im Vergleich ist anhand der Zellgröße und Granularität eine Veränderung der Zellen zu erkennen. Frisch isolierte CD34⁺ SZ haben eine Größe von ca. 6,8 µm, drei Wochen kultivierte PSCMCs sind ca. 15,5 µm groß. Alle, in Abb. 4.19. exemplarische gezeigten Zellen, sind nach 3 Wochen in Kultur ca. doppelt so groß wie frisch isolierte CD34⁺ SZ und weisen granuläre Strukturen im Zellinneren auf. Makroskopisch betrachtet, weisen am ehesten pVenus-GATA-3 generierte Zellen, eine den PSCMCs ähnliche Zellgröße und Homogenität auf. Die Kondensation des Chromatins der pVenus-GATA-3 generierten Zellen scheint jedoch weniger stark ausgeprägt als bei den PSCMCs. Die MOCK infizierten Zellen sind, im Vergleich zu den pVenus-infizierten Zellen, nicht granuliert, zeigen aber Anzeichen von Pseudopodien (Scheinfüßchen). Diese Plasmaausstülpungen sind ein Zeichen von Zelldifferenzierung und sind auch bei z.B. MITF-generierten Zellen zu sehen. Die Infektion mit MOCK-Viren führt demnach zu einer unspezifischen Zelldifferenzierung, die im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiter analysiert wurde. Vorhergehende Experimente zeigten, dass CD34⁺ SZ ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren, wie z.B. Zytokinen, zu Zellen mit myeloischen Oberflächenmarkern differenzieren (Daten hier nicht gezeigt).

Die höchsten absoluten Zellzahlen (>15.000) wurden für MITF und GATA2PU1HES1BCLXL gemessen. Diese Faktoren bzw. die Kombination der Faktoren führte hier zu einer Erhöhung der Zellzahlen, im Vergleich zu MOCK-transduzierten Zellen. Niedrige Gesamtzellzahlen wurden für die pVenus-TF GATA-3, HMOX1 und GATA-1 generierten Zellen gemessen. Bei dem Ansatz mit GATA-1 wurden nach drei Wochen weniger als 10.000 in den Kulturen gezählt. Auf dem entsprechenden Bild (Abb. 4.19.) sieht man Zellkonglomerate mit deutlich größeren, granulierter wirkenden Zellen.

In Kapitel 4.7. wurde durch die Färbung mit Sytox Green der Anteil lebender Zellen in der Gesamtkultur bestimmt. Die mit den Faktoren pVenus-HMOX1 und pVenus-MITF infizierten Zellen zeigten eine schlechtere Viabilität im Vergleich zu den anderen Ansätzen. Auch die mikroskopischen Aufnahmen für p-Venus-HMOX1 und pVenus-MITF zeigen das verstärkte Vorhandensein von Zellresten und unterstützt die These des Einflusses dieser Faktoren auf die Viabilität der infizierten CD34⁺ SZ.

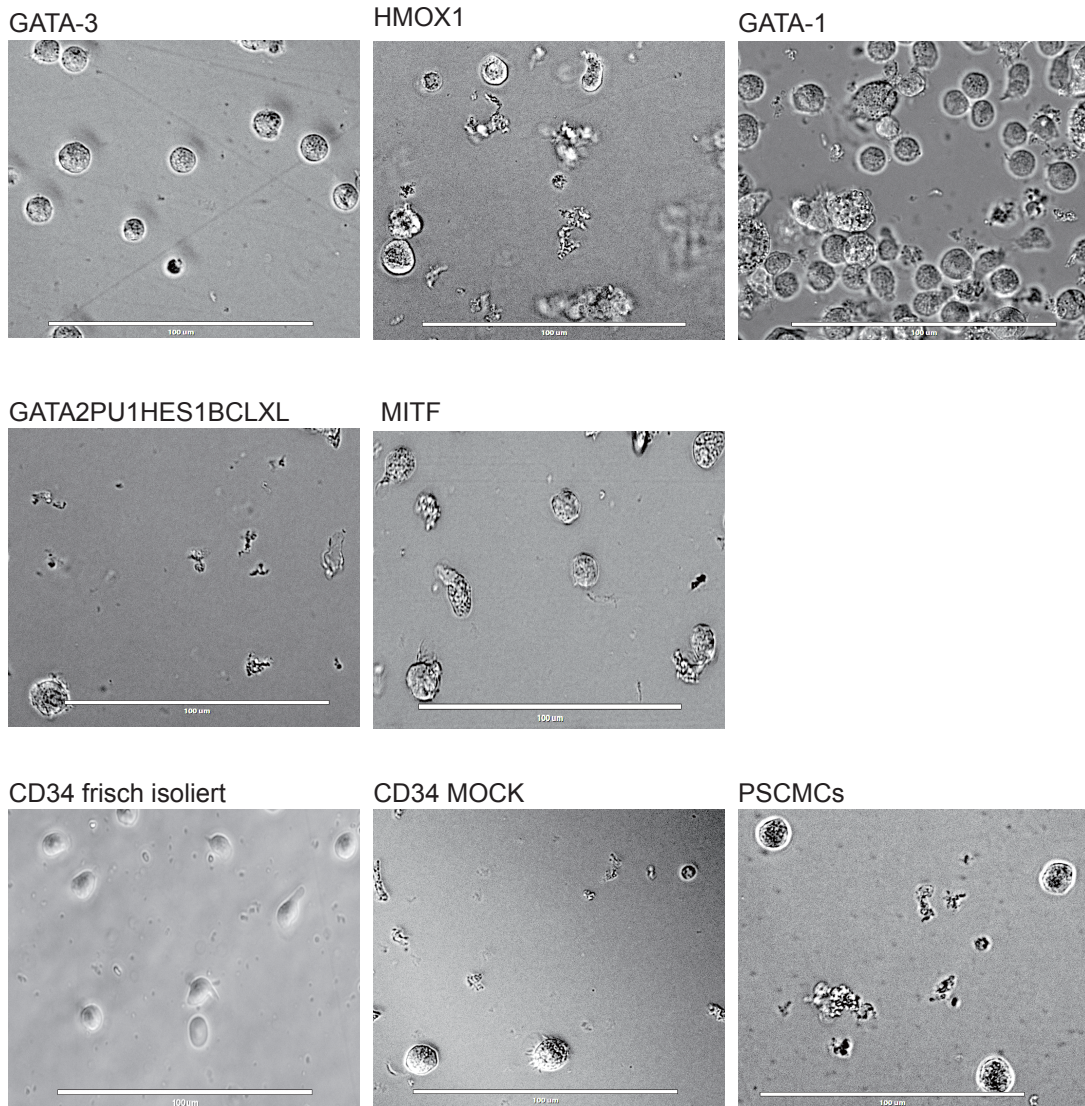


Abb. 4.19. Darstellung der pVenus-TF GATA-3, HMOX1, GATA-1, GATA2PU1HES1BCLXL und MITF im pVenus generierten Zellen nach drei Wochen in Kultur. Die Ansätze mit pVenus-GATA-1 und pVenus-GATA-3 zeigen nach drei Wochen in Kultur eine Erhöhung der Zellzahl. Als Vergleich sind frisch isolierte CD34⁺ SZ, MOCK infizierte CD34⁺ SZ und mit Zytokinen kultivierte PSCMCs abgebildet. Dargestellt sind mikroskopische Aufnahmen in 40-facher Vergrößerung.

Neben der beschriebenen (Kapitel 4.6.) doppelten Expression von CD117 und FcεRI ist zu prüfen, ob die Zellen nach IgE/anti-IgE Stimulation aktivierbar sind und die damit einhergehende Degranulation durch Messung von freigesetzten Mediatoren gemessen werden kann.

4.9. Aus CD34⁺ SZ generierte Zellen setzen β -Hexosaminidase nach Aktivierung über IgE frei

Zur Überprüfung der Funktionalität der aus CD34⁺ SZ generierten Zellen wurden diese zunächst mit IgE stimuliert oder in Puffer belassen. Nach Zugabe des anti-IgE konnte der Gehalt an β -Hexosaminidase im Überstand und im Zellpellet gemessen werden (Abb. 4.20.). Das Ionophor Ionomycin wird hier genutzt, um die generelle Aktivierbarkeit der Zellen zu testen. Ionomycin kann Ca²⁺ Ionen durch Zellmembranen transportieren, was zur Degranulation der MZ führt [99]. Neben β -Hexosaminidase wird hierdurch auch z.B. Histamin freigesetzt.

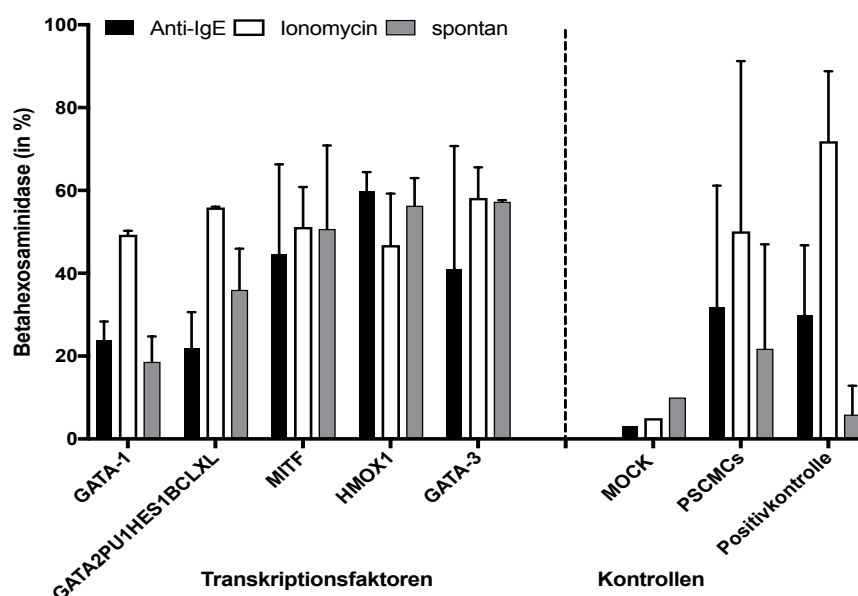


Abb. 4.20. Messung der β -Hexosaminidase Freisetzung (in %) nach Aktivierung der Zellen über den IgE Rezeptor Fc ϵ RI. Die Zellen wurden zuvor für 1 h mit IgE beladen, gewaschen und anschließend mit anti-IgE oder Ionomycin aktiviert. Die Messung der Fluoreszenz nach Umsetzung des Substrates 4-MUG entspricht der β -Hexosaminidase Aktivität. Nach drei Wochen in Kultur setzen PSCMCs 31,8% \pm 29,4% β -Hexosaminidase nach Aktivierung über Fc ϵ RI frei, 50,1% \pm 41,1% nach Aktivierung über Ionomycin und 21,8% \pm 25,2% spontan. LAD2 Zellen als Positivkontrolle setzen 29,9% \pm 16,8% β -Hexosaminidase nach Aktivierung über Fc ϵ RI frei, 71,9% \pm 16,9% nach Ionomycin Zugabe und 5,9% \pm 7% spontan frei. Nur bei pVenus-GATA-1 generierten Zellen konnte eine niedrigere spontane Freisetzung an β -Hexosaminidase (18,6% \pm 6,2%) im Verhältnis zur Aktivierung über Fc ϵ RI (23,8% \pm 4,6%) und Ionomycin (49,3% \pm 1%) gemessen werden. Dargestellt sind Mittelwert \pm SD aus zwei unabhängigen Experimenten, geordnet nach Höhe der spontanen Freisetzung (ohne IgE Beladung und anti-IgE Aktivierung).

Bei allen pVenus-TF generierten Zellen wurde eine spontane Freisetzung an β -Hexosaminidase von > 10% gemessen, im Vergleich zur Positivkontrolle mit LAD2 Zellen (5,9%) und zu MOCK transduzierten CD34⁺ SZ (10%). Nach anti-IgE Zugabe konnte

bei LAD2 Zellen 30% β -Hexosaminidase im Überstand gemessen werden und 72% der Zellen waren insgesamt aktivierbar. Mit Zytokinen generierte PSCMCs konnten zu 32% nach anti-IgE Gabe β -Hexosaminidase freisetzen, wobei maximal 50% aller Zellen nach Ionomycin degranulierten. Durch pVenus-GATA-3 generierte Zellen zeigten den höchsten Wert nach Ionomycin Behandlung (58%), jedoch auch mit > 50% eine sehr hohe spontane Freisetzung. Nach anti-IgE Gabe konnte bei pVenus-HMOX1 behandelten Zellen der maximale Wert von 59,7% bestimmt werden. Auch hier steht diesem Ergebnis eine spontane Freisetzung von >50% gegenüber. Bei pVenus-TF MITF und GATA2PU1HES1BCLXL generierten Zellen lag die allgemeine Aktivierbarkeit der Zellen bei >50%, jedoch wiederum einhergehend mit einer sehr hohen spontanen Freisetzung. Nur bei pVenus-GATA-1 generierten Zellen wurde für die spontane Freisetzung (19%) ein niedrigerer Wert als für die anti-IgE behandelten Zellen (24%) gemessen. Maximal konnten hier 49% β -Hexosaminidase nach Stimulation mit Ionomycin gemessen werden. Eine ähnliche Verteilung der Messdaten konnte, nach Aktivierung der Zellen, auch für Histamin beobachtet werden.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression eines einzelnen TF ausreicht um MZ aus CD34⁺ SZ zu generieren. Die der Arbeit zugrundeliegende Hypothese wurde durch bereits für die MZ Entwicklung relevante TF im murinen und humanen System bestimmt und geformt. Die gewählten 17 TF wurden erstmals durch lentivirale Vektoren verpackt, um MZ durch Transduktion von CD34⁺ SZ zu generieren. Mit der zuerst verwendeten Gruppe an TF kodierenden Viren (pLenti-TF) konnte die experimentelle Durchführbarkeit bestätigt werden. Die Etablierung einer zweiten Gruppe an TF (pVenus-TF) kodierenden Viren, welche einen fluoreszierenden Marker enthalten, ermöglichte zusätzlich die Detektion von erfolgreich transduzierten Zellen. Eine starke Heterogenität der Zellen bei der Transduktionseffizienz und der Anzahl an CD117/FcεRI positiven Zellen konnte, während der Kultivierung, beobachtet werden. In beiden Gruppen an Viren konnten HMOX1 und GATA-3 als TF bestätigt werden, um aus CD34⁺ SZ MZ zu generieren. Jedoch führten auch weitere TF, nach Infektion der CD34⁺ SZ, zur Entwicklung von MZ. Die möglichen Ursachen und Implikation dieser Ergebnisse werden nachfolgend diskutiert.

Der Fokus liegt hierbei auf fünf Faktoren: GATA-1, GATA-3, GATA2PU1HES1BCLXL, MITF und HMOX1.

5.1. Diskrepanz bei Kontrollverdau der pVenus-TF

Die einzelnen Plasmide für die pVenus-TF wurden, wie in Kapitel 4.1. beschrieben, durch enzymatischen Kontrollverdau auf Richtigkeit hin überprüft. Bei dem TF 1 (MITF) wurde, trotz mehrmaliger Wiederholung und der Präparation verschiedener Klone, eine Bande bei ca. 1700 bp erkannt, welche nicht den erwarteten Banden entsprach. Erwartet wurden Banden bei ca. 500 bp und ca. 1200 bp. Möglicherweise war die Schnittstelle für das Enzym *ApaI* durch Methylierung der Erkennungsschnittstelle durch *E. coli* eigene *Dcm* Methylase [100] blockiert.

Weitere Kontaminanten wie Ethanol, zu hohe Salzkonzentrationen oder eine Verunreinigung des Enzyms können soweit ausgeschlossen werden, da die gleichzeitig

verdauter DNS anderer Plasmide korrekt geschnitten wurde. Da die weiteren erwarteten Schnittstellen der Restriktionsenzyme bei TF 1 zu erkennen waren und die Gesamtgröße des Plasmids stimmte, wurde mit der isolierten DNS weitergearbeitet.

Bei weiteren pVenus-TF konnten Banden, die eine sehr ähnliche Größe haben, im Gel nicht eindeutig von einander getrennt werden. So ist bei TF 6 nur eine der zwei erwarteten Banden von ca. 900 bp sichtbar. Das Gleiche gilt für TF 15, hier ist nur eine Bande von ca. 1100 bp zu erkennen. Die Auftrennung der einzelnen Banden bei TF4 ist weiterhin sehr schlecht zu erkennen. Dies ist vor allem durch die Vergrößerung der Abbildung entstanden, um eine einheitliche Größe der Gele zu gewährleisten.

5.2. Die Infektion mit einem TF führt zu MZ aus CD34⁺ SZ

Die Entwicklung von MZ aus HSZ wird maßgeblich von der Aktivität von TF bestimmt. TF beeinflussen direkt die Genexpression und regulieren die zelluläre Antwort auf externe Stimuli, beispielsweise die IgE/anti-IgE Reaktion bei MZ.

Der Faktor HMOX1 führte sowohl im pLenti als auch im pVenus zu MZ. Dieser TF wird in Kapitel 5.8. der Diskussion ausführlicher erörtert und durch weitere Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe in einen wissenschaftlichen Kontext gesetzt.

Die TF der GATA Familie sind im murinen System, wie bereits in der Einleitung ausgeführt, maßgeblich an der MZ Entwicklung beteiligt. Ein Vertreter der GATA-Familie, GATA-3, konnte 2008 von Sakata-Yanagimoto et al. [41] als wichtiger Wegbereiter in der MZ Entwicklung bestätigt werden. CMPs und GMPs konnten nur durch die Kombination aus Notch2 und HES-1/GATA-3 zu MZ differenzieren. In beiden Gruppen an Viren konnten durch den alleinigen Einfluss von GATA-3 MZ generiert werden. Die Ergebnisse liefern somit Anhaltspunkte, dass dieser TF auch im humanen System essentiell für die MZ Differenzierung ist.

Als weiterer TF der GATA-Familie wurde GATA-1 im murinen System als essentiell für die MZ Entwicklung bestätigt. Bei Mäusen bewirkt eine niedrige GATA-1 Expression die Bildung von morphologisch abnormalen und apoptotischen MZ Vorstufen im Binde-

gewebe und der Peritonealflüssigkeit [34, 101]. In der vorliegenden Arbeit führte die Infektion von CD34⁺ SZ mit pVenus-GATA-1 zu über 50% MZ (bezogen auf absolute Zellzahlen) nach drei Wochen in Kultur. Die Infektion mit pLenti-GATA-1 führte in der vorliegenden Studie zu < 2% Zellen mit mastzellspezifischen Markern in der Gesamtkultur. Eine mögliche Ursache für die gegensätzlichen Ergebnisse kann in unterschiedlichen Infektionsraten der pLenti- und pVenus-Viren liegen. Aufgrund der Diskrepanz der Ergebnisse kann in der vorliegenden Studie der Einfluss von GATA-1 auf die MZ-Entwicklung weder bestätigt, noch verneint werden. Die mikroskopische Aufnahme der pVenus-GATA-1 infizierten Zellen (Abb. 4.19.) zeigt größere und stärker granulierte Zellen. Da der TF GATA-1 auch für die Entwicklung von z.B. Megakaryozyten verantwortlich ist, könnte es sich um solche Vorläuferzellen handeln. Diese Zellen wurden nicht näher charakterisiert, so dass hier nur eine Vermutung geäußert werden kann.

GATA-2 wurde als letzter Vertreter der GATA-Familie verwendet. Dieser TF wurde vorab mit einer Mutation (siehe Kapitel 1.4.) synthetisch hergestellt, welche die Expression des TF fördert [52]. Da murine, embryonale SZ mit einem Mangel an GATA-2 nicht zu MZ weiter differenzieren [102] können, wurde durch die Überexpression des GATA-2 ein Anstieg an MZ in der Kultur erwartet. In beiden Gruppen an Viren wurde nach Infektion mit GATA-2 nur eine geringe Anzahl an MZ detektiert. Der Faktor konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht als maßgeblich für die MZ Entwicklung aus humanen CD34⁺ SZ bestätigt werden.

Für die Entwicklung von murinen MZ ist weiterhin der TF MITF von Kitamura et al. [57] näher untersucht worden. Die doppelte Gendosis einer mutierten Form des MITF führte zu phänotypisch abnormalen MZ in Mäusen. Beim Menschen ist bisher beschrieben, dass u.a. MITF-A die Transkription des Gens für Tryptase [55] reguliert, ein Einfluss auf die Entwicklung der Zellen aus HSZ ist bisher nicht bekannt. pVenus-MITF zeigte die höchste Transduktionseffizienz aller TF. Dies wird ausführlicher in Kapitel 5.5. diskutiert. Nach Infektion von CD34⁺ SZ mit pVenus-MITF konnten nach 3 Wochen ca. 50% MZ (bezogen auf absolute Zellzahlen) gemessen werden, die Infektion mit pLenti-MITF führt nur zu ca. 1% CD117/ FcεRI⁺. Ähnlich wie bei den Ansätzen mit GATA-1 kann hier z.B. eine unterschiedliche Infektionsrate eine Ursache für die gegensätzlichen Ergebnisse sein.

Die Kombination der TF (MITF-GATA-1-PU1 bzw. GATA-2-PU1-HES1) war erfolgversprechend. Wie in der Einleitung im Kapitel 1.4. ausführlich beschrieben, sind MITF und GATA-1 essentielle Faktoren bei der normalen Entwicklung von MZ aus HSZ im murinen System. Der TF PU.1 wirkt als Positivregulator auf GATA-1 ein [103], sodass für die vorliegende Studie beide TF zusammen exprimiert werden sollten. Das Zusammenspiel der TF PU.1, GATA-1 und GATA-2 fördert weiterhin die Expression des FcεRI-Rezeptors auf MZ [37]. Dieses Zusammenwirken in Verbindung mit HES1, welcher wiederum die MZ Entwicklung aus GMPs bzw. CMPs im murinen System begünstigt [104], sollte in einer weiteren Kombination getestet werden. Es konnten nur nach Infektion mit pVenus-GATA-2-PU1-HES1-BCLXL relevante Ergebnisse gemessen werden. Diese Ergebnisse geben einen ersten Hinweis darauf, dass die TF-Kombination GATA-2/PU1 auch im humanen System die MZ Entwicklung aus HSZ fördert, da GATA-2 alleine diesen Effekt nicht hatte.

Der Faktor MITF konnte somit weder einzeln noch in Kombination die Entwicklung von MZ aus HSZ fördern. Die schwache Wirksamkeit des TF MITF kann durch die verwendete Isoform MITF-MC erklärt werden. In murinen MZ wurden bisher 6 Isoformen des MITF nachgewiesen (siehe Kapitel 1.4.). In der vorliegenden Studie wurde nur die MITC-MC Isoform genutzt, da diese nur in MZ und Melanozyten exprimiert wird. Die Wirksamkeit der anderen Isoformen auf die humane MZ Entwicklung kann für weiterführende Studien von Interesse sein.

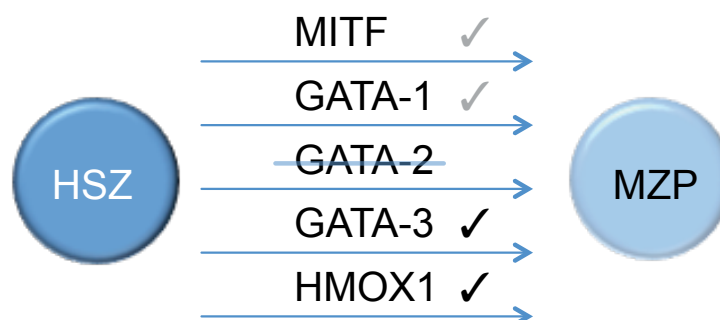


Abb. 5.1. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass die TF GATA-3 und HMOX1 die Entwicklung der MZP aus humanen HSZ fördern. Für die TF GATA-1 und MITF können die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit Hinweise auf deren positiven Einfluss auf die Differenzierung der MZ geben. Der TF GATA-2 konnte im Zuge dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Zusammenfassend betrachtet konnten durch die TF GATA-3 und HMOX1 in beiden Gruppen an Viren MZ aus CD34⁺ SZ generiert werden. Die weiteren, teils widersprüchlichen Ergebnisse der TF übertragenden Viren werden nachfolgend diskutiert.

5.3. Die Infektion von CD34⁺ SZ mit HMOX1 und GATA-3 im pLenti oder pVenus führen zu MZ

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Transfervektoren als lentivirale, HIV-1-basierte Vektoren genutzt, um die TF effizient zu übertragen und die CD34⁺ SZ ohne Zugabe von Zytokinen zu transduzieren [105-107]. Die Genexpression wird dabei durch einen internen Promotor der lentiviralen Vektoren gesteuert. Die genutzten Transfervektoren enthalten entweder den EF1 α -Promotor (pLenti) oder den CAG-Promotor (pVenus). Bei der frühen Entwicklung und Etablierung lentiviraler Vektoren für die Infektion humaner SZ wurde der Fokus zunächst auf den *Cytomegalovirus* (CMV) und den *Phosphoglycerate kinase* (PGK) Promotor gesetzt. Es folgten der *Chicken actin combined with CMV enhancer* (CAG) und der *Elongationfactor-1 α* (EF-1 α) Promotor. Salmon et al. [108] haben die Effizienz der Promotoren CMV, PGK und EF-1 α bei der lentiviralen Transduktion von humanen CD34⁺ aus Nabelschnurblut untersucht. Nach 4 Tagen in Kultur zeigten sich klar abgegrenzte GFP⁺ Populationen bei den Zellen, die mit PGK oder EF-1 α Promotor enthaltenden lentiviralen Vektoren transduziert wurden. Bei CMV basierten lentiviralen Vektoren wurde nur ein geringer Anteil an GFP⁺ Zellen gemessen, verbunden mit einer starken Heterogenität der GFP positiven Zellen. Der EF-1 α Promotor wurde in dieser Studie als sehr wirksam für die

Transduktion von HPCs (*Human hematopoietic precursor cells*) beschrieben, im Gegenzug zeigte der CMV Promotor nur eine sehr niedrige Aktivität in transduzierten HPCs. Vorhergehende Ergebnisse [109-111], das CMV basierte lentivirale Vektoren die Genexpression in HPCs nicht effizient regulieren, konnten somit bestätigt werden. Der CAG und EF-1 α Promotor wurde auch von Ramezani et al. [112] auf Effizienz bei der lentiviralen Transduktion der humanen *Hematopoietic stem/progenitor cells* (HSPC) Linie KG1a untersucht. Auch hier konnten, im Vergleich zu CMV und PGK Promotor, für CAG und EF-1 α Promotor basierte lentivirale Vektoren die höchsten GFP-Werte für transduzierte Zellen gemessen werden.

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden für die vorliegende Arbeit zunächst lentivirale Vektoren, die den EF-1 α Promotor enthalten, verwendet. Hier konnten durch Infektion mit den pLenti-TF HMOX1 und GATA-3 doppelt positive Zellen für die mastzellspezifischen Marker CD117 und Fc ϵ RI generiert werden. Die durchflusszytometrische Analyse der mit pLenti-TF HMOX1 und GATA-3 generierten Zellen zeigte mehrere, voneinander abgrenzbare Zellpopulationen. Die Subpopulationen für Fc ϵ RI $^+$, CD117 $^+$ und CD117/Fc ϵ RI $^+$ Zellen waren klar differenzierbar. Diese Entwicklung ist auch bei IL-3/SCF kultivierten PSCMCs nach zwei Wochen zu sehen. Es ist demnach davon auszugehen, dass die Infektion der CD34 $^+$ SZ mit pLenti-HMOX1 und pLenti-GATA-3 zu MZ führte, wobei der prozentuale Anteil an generierten Zellen im Durchschnitt niedriger (3,4% bzw. 4,6%) ausfiel als bei den PSCMCs (7,9%). In einem Experiment konnten für pLenti-GATA-3 und pLenti-HMOX1 > 10% CD117/Fc ϵ RI $^+$ Zellen gemessen werden (Abb. 4.13). Die Anzahl an generierten PSCMCs lag bei diesem Ansatz auch > 10%. Die CD34 $^+$ SZ wurden von fünf verschiedenen Spendern isoliert und verwendet. Möglich wäre, dass Faktoren im Zellkonzentrat oder aktivierende Mutationen der Zellen die Entwicklung der CD34 $^+$ SZ zu MZ begünstigt haben. Hier wäre eine genauere Charakterisierung der Spenderzellen nötig, um etwaige individuelle Einflüsse weitestgehend auszuschließen. Im Umkehrschluss kann auch die durch pLenti-TF initiierte Entwicklung der MZ durch ebensolche Faktoren oder Mutationen gehemmt worden sein, wodurch kein TF zu einem signifikant besserem Ergebnis im Vergleich zu PSCMCs geführt hat. Die PSCMCs sind nur bedingt als Kontrollzellen anzusehen, da die Wirkung der Zytokine als „Wachstumsfaktoren“ nicht mit einem Eingriff in das genetische Programm einer Zelle gleichzusetzen ist (wie es durch TF erreicht werden sollte). Ein direkter Kontrollansatz mit MZ die durch TF aus CD34 $^+$ SZ

differenziert wurden (z.B. durch eine Bibliothek an TF) war für die vorliegende Studie aus Kostengründen nicht möglich.

Die absoluten Zellzahlen zeigen weiterhin, dass bei pLenti-HMOX1 76 Zellen und bei pLenti-GATA-3 128 Zellen der Gesamtkultur (ca. 10.000 Zellen/ml) die Marker für MZ exprimierten. Im Vergleich zu 1135 Zellen der gesamten PSCMC-Kultur mit ca. 30.000 Zellen/ml (Abb. 4.14.). Die niedrigere Anzahl an CD117/FcεRI⁺ Zellen bestätigt sich demnach sowohl als prozentualer Anteil, wie zuvor beschrieben, als auch als absoluter Anteil an Zellen der gesamten Kultur. Die Ergebnisse der Experimente mit den pLenti-TF untermauern die Hypothese, dass durch Aktivität eines TF MZ aus CD34⁺ SZ generiert werden können, da 3-5% der Zellen durch pLenti-HMOX1 bzw. GATA-3 als CD117/FcεRI⁺ detektiert wurden. Obwohl hier mit dem als sehr wirksam beschriebenen EF-1α Promotor gearbeitet wurde ist davon auszugehen, dass die Transduktionseffizienz der pLenti-TF gering ausfiel, was die niedrige Anzahl an MZ nach erfolgter Kultivierung erklären könnte.

Durch das Fehlen eines fluoreszierenden Markers im Genom des Transfervektors pLenti konnten die erfolgreich transduzierten Zellen nicht als einzelne Population der Gesamtzellen differenziert analysiert werden. Es wurden daher pVenus-TF, den CAG Promotor enthaltend, generiert. Auch nach Infektion der CD34⁺ SZ mit pVenus-TF konnten für HMOX1 und GATA-3 doppelt positive Zellen mit den mastzellspezifischen Markern CD117 und FcεRI detektiert werden. Weiterhin wurden für die pVenus-TF MITF, GATA2PU1HES1BCLXL und GATA-1 doppelt positive Zellen gemessen. Die in Abbildung 4.16. dargestellten Ergebnisse zeigen die YFP positiven Zellen nach drei Wochen Kultur und die sich daraus ergebende Population an CD117 und FcεRI positiven Zellen. Die Anzahl an doppelt positiven Zellen (32% und 40%) entspricht im gezeigten Experiment ungefähr der Anzahl generierter PSCMCs (36%) nach drei Wochen Kultur. Bei Betrachtung der absoluten Zellzahlen sind jedoch nur 75 Zellen (pVenus-HMOX1) bzw. 150 Zellen (pVenus-GATA-3) im Durchschnitt YFP und CD117/FcεRI positiv, somit wiederum ein deutlich geringerer Anteil als bei den PSCMCs (ca. $5,5 \times 10^3$ Zellen CD117/FcεRI⁺).

Zusammenfassend konnte mit beiden Gruppen lentiviraler Vektoren bestätigt werden, dass die Infektion von CD34⁺ SZ mit HMOX1 und GATA-3 zu MZ führt, wenn auch in deutlich geringerer Anzahl als bei der Vergleichskultur mit PSCMCs. Eine Ursache für die niedrigen Zellzahlen kann beispielweise die Stilllegung des Promotors sein. Xia et al. [113] haben 2007 in einer Studie die lentivirale Transduktion humaner und muriner, embryonaler Stammzellen (ES) mit einem Transgen für GFP mit verschiedene Promotoren untersucht. Sie konnten eine starke Abhängigkeit zwischen der Ausschaltung des Transgens und den verwendeten Promotoren feststellen. Bis zu 95% des Transgens unter CMV oder CAG Promotor wurden inaktiviert. Ein Verlust an Expression des Transgens wurde bei der Verwendung des EF-1 α Promotors nicht beobachtet. Bei der zweiten Gruppe an Viren, den CAG Promotor enthaltend, wurde bei dem Großteil der Ansätze eine Abnahme der YFP positiven Zellen beobachtet. Dies würde für einen Verlust des Transgens sprechen. Dieser Diskussionspunkt wird in Kapitel 5.4. noch einmal ausführlicher behandelt.

Neben den verschiedenen, genutzten Promotoren kann auch die Größe der einzelnen TF eine Auswirkung auf die Effizienz der Transduktion haben. Die Größe der TF in der vorliegenden Arbeit variiert stark. Es wurden TF mit einer Größe von ca. 0,5 kb (REPRIMO) bis maximal ca. 4,6 kb (MITFGAT1PU1BCLXL) verwendet. Eine effiziente Verpackung der TF Sequenzen im pLenti ist bei einer Länge bis ca. 5 kb gewährleistet, da dieser Transfervektor eine Größe von 9 kb mit einer Genomlänge (5' LTR bis 3' LTR) von ca. 5 kb aufweist. Die Genomlänge des Transfervektors pVenus beträgt ca. 8 kb, so dass auch hier das Einfügen der TF Sequenzen sichergestellt ist. Nachfolgend wird eine mögliche Auswirkung der TF Größe auf den Virustiter und die Anzahl an generierten CD117/Fc ϵ RI⁺ Zellen diskutiert.

5.4. Es besteht kein Zusammenhang zwischen Größe der TF und Virustiter oder Anzahl an generierten Zellen mit mastzellspezifischen Markern

Die Ergebnisse zeigen, dass durch Transduktion von CD34⁺ SZ mit einem TF, Zellen mit mastzellspezifischen Markern generiert werden können. Gegenüber IL-3/SCF kultivierten PSCMCs konnte die Anzahl an CD117/Fc ϵ RI positiven Zellen bei beiden Gruppen an lentiviralen Vektoren nicht erhöht werden. Eine mögliche Erklärung hierfür kann die zuvor erwähnte Größe der TF sein. Für Retroviren wurde 1997 von Swanstrom

und Wills [114] eine obere Grenze für die effiziente Verpackung der Transgene festgelegt. Demnach können retrovirale Partikel RNSs einschließen, welche gleich lang oder kürzer als die provirale RNS des HIV1-Wildtyps (9,7 kb) sind. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Größe der transduzierten DNS und dem erreichten Virustiter konnte 2001 von Kumar et al. [115] bestätigt werden. Der Virustiter nahm mit zunehmender Größe der Fremd DNS ab. Die Menge der RNS korrelierte demnach positiv mit dem Titer der lentiviralen Partikel. Als Ursache hierfür konnte, bei ansteigender Größe der transduzierten DNS, eine Abnahme der Vektor RNS in den lentiviralen Partikeln festgestellt werden. Aufgrund dessen werden von Wissenschaftlern vorrangig lentivirale Vektorkonstrukte genutzt, bei denen der Provirus kleiner als 10 kb ist.

Die Sequenzen der TF in der vorliegenden Arbeit variieren in ihrer Größe von 0,5 kb (REPRIMO) bis 4,6 kb (MITFGAT1PU1BCLXL). Für pLenti-HMOX1 (1 kb) konnte der höchste Virustiter erzeugt werden (7×10^7). Kleinere TF, wie pLenti-BCLXL (0,9 kb) und pLenti-REPRIMO (0,5 kb), lagen mit dem Virustiter unter diesem Wert. Auch bei den lentiviralen Partikeln pVenus-TF wurden die höchsten Titer nicht bei den kleinsten TF gemessen. Nach Rekombination der großen TF über die *attR1* und *attR2* Seiten im pVenus ist der als Provirus eingebaute Bereich zwischen 5' LTR und 3' LTR größer als 10 kb. Da jedoch auch bei den deutlich kleineren TF niedrige Virustiter erzielt wurden, kann der direkte Zusammenhang zwischen Größe der transduzierten DNS und dem Virustiter nicht bestätigt werden.

Bei der Analyse der Zellen, differenziert durch pLenti-TF, wurde zusätzlich eine mögliche Korrelation zwischen Größe der TF und Anzahl an generierten Zellen mit mastzellspezifischen Markern untersucht (Abb. 4.12.). Es wurden ähnlich viele CD117/Fc ϵ RI⁺ Zellen bei dem größten TF (MITFGAT1PU1BCLXL) und dem kleinsten TF (REPRIMO) generiert (2,6% bzw. 2,2%). Für den pLenti-HMOX1 (1 kb) wurde, neben pLenti-GATA-3 (1,5 kb), insgesamt der höchste Wert für Zellen mit mastzell-spezifischen Markern gemessen (5% bzw. 3,7%). pLenti-GATA-2 (1,6 kb) lieferte ähnliche Ergebnisse (3,2%), das ebenso Große pLenti-GATA-1 (1,4 kb) führte jedoch nur zu 1,7% MZ nach erfolgter Kultivierung. Die Größe der TF korreliert demnach in der vorliegenden Arbeit nicht mit der Anzahl an Zellen, die nach erfolgter Kultivierung CD117 und Fc ϵ RI exprimierten. Trotz adäquater Virustiter und TF Größe fiel,

zusammenfassend gesehen, der prozentuale Anteil an CD117/Fc ϵ RI⁺ Zellen der gesamten Kultur bei den Ansätzen mit dem Transfervektor pLenti eher gering aus. Eine Erklärung hierfür wäre, dass das Resistenzgen für Blastocin in den CD34⁺ SZ nur schwach produziert wurde und daher nur ein geringer Anteil an erfolgreich transduzierten Zellen in der Kultur überlebte.

Durch das Fehlen eines fluoreszierenden Markers konnte die Analyse nicht auf positiv transduzierte Zellen begrenzt werden bzw. eine Aussage über die Effizienz der Transduktion gemacht werden. Das Vorhandensein des YFP-Markers im pVenus machte es möglich, die Transduktionseffizienz zu analysieren und wird im nachfolgenden Kapitel diskutiert.

5.5. Niedrige Transduktionseffizienz der pVenus-TF

Die effiziente Transduktion humaner CD34⁺ HSC durch HIV-basierte Vektoren wurde bereits vielfach untersucht und optimiert [107, 116, 117]. In der in Kapitel 5.3. beschriebenen Studie von Salmon et al. [108] wurde unter Anderem auch die Stabilität der transduzierten Zellen während der Kultur untersucht. Bei CD34⁺ Zellen, infiziert mit EF-1 α enthaltenen lentiviralen Vektoren, blieb der Anteil an GFP⁺ Zellen nach drei Wochen in Kultur konstant und eine Proliferation um den Faktor 100 wurde beobachtet. Wie bereits beschrieben konnten Xia et al. [113] in ihrer Studie die Ausschaltung des Transgens unter CAG Promotor beobachten. Im Gegensatz steht eine Studie von Alexopoulou et al. [118]. Hier wurde der CAG Promotor als beständig für die Langzeitexpression von Transgenen während muriner, embryonaler SZ Differenzierung beschrieben.

Um die Effizienz und Beständigkeit der lentiviralen Transduktion für die verwendeten TF mit CAG Promotor zu analysieren, wurden die Zellen zunächst 24h nach Infektion durchflusszytometrisch auf YFP Expression untersucht. Der durchschnittlich höchste YFP-Wert wurde für MITF (12%) gemessen. Für die pVenus-TF HMOX1, GATA-1, GATA-2 und GATA-3 wurden zwischen 1% und 2,6% YFP positive Zellen detektiert. Die Ergebnisse veranschaulichen eine starke Heterogenität in der Stärke der Transduktionseffizienz bei den einzelnen Ansätzen. Nach drei Wochen in Kultur wurde für die pVenus-TF HMOX1, GATA-3 und GATA2PU1-HES1BCLXL ein Anstieg YFP

positiver Zellen festgestellt. Durch diesen Anstieg an YFP positiven Zellen, kann nicht von einer generellen Stilllegung des CAG Promotors ausgegangen werden.

Des Weiteren kann die geringe Expressionsstärke mit ausbleibender Proliferation der initial infizierten CD34⁺ SZ erklärt werden, diese sollte durch Zugabe des CD34 Expansions Supplements zu Beginn der Zellkultur erreicht werden. Die Expansion der transduzierten CD34⁺ SZ durch die Zytokine Flt3L, TPO und SCF wurde in der Studie von Salmon et al. [108] über 7-14 Tage durchgeführt. Aufgrund der Herstellerangaben wurden die Zellen in der vorliegenden Studie 7 Tage im Zytokin Mix zur Expansion belassen. Somit sollte laut Hersteller eine 10-fache Proliferation der Zellen erreicht werden. In Vorversuchen wurde die optimale Zellzahl pro ml Expansionsmedium auf 50.000 Zellen eingestellt. Während dieser Etablierungsphase wurde ein Anstieg der Zellzahlen um den Faktor 10-15 beobachtet. Durch das Einbeziehen der absoluten Zellzahlen nach erfolgter Kultivierung sollte eine nähere Analyse des Zellwachstums ermöglicht werden. In beiden Gruppen lentiviraler Vektoren wurde nach zwei bzw. drei Wochen Kultur kein Anstieg der Gesamtzellzahl beobachtet. Einzig für den Faktor pVenus-MITF konnte in beiden Ansätzen ein leichter Anstieg auf ca. 60.000 Zellen in der gesamten Kultur verzeichnet werden. Auf Zellproliferation bezogen, ist MITF bereits sowohl als Inhibitor [119, 120] als auch mit fördernder Wirkung beschrieben [121, 122]. Da bei pVenus-MITF infizierten CD34⁺ SZ jedoch die Anzahl an YFP positiven Zellen nach drei Wochen Kultivierung um den Faktor vier abnahm, bezieht sich die Proliferation nicht auf die erfolgreich transduzierten Zellen.

Zusammenfassend konnte nur für drei Faktoren ein prozentualer Anstieg der positiv transduzierten Zellen festgestellt werden, die Proliferation der Zellen weiterhin nur bei einem Faktor. Beide Aspekte können die geringe Anzahl an CD117/FcεRI positiven Zellen nach drei Wochen in Kultur erklären. Bereits 24 h nach erfolgter Transduktion wurde nur ein geringer Prozentsatz an YFP positiven Zellen gemessen. Es kann sich hier auch um teilweise falsch positive Zellen handeln, wodurch wiederum weniger CD34⁺ SZ durch Wirkung der TF ausdifferenzieren konnten. Dieses Phänomen der Pseudotransduktion und der transienten Expression von nicht-integrierten Vektoren wird nachfolgend diskutiert.

5.6. Pseudotransduktion und transiente Expression von nicht-integrierten Vektoren

Als Indikator für die erfolgreiche Transduktion humaner CD34⁺ SZ mit lentiviralen Vektoren wird oftmals die Expression von Markerproteinen gemessen. Hierbei müssen artifiziell, positive Zellen im Durchflusszytometer berücksichtigt werden, wenn die Messung zu früh nach erfolgter Transduktion erfolgt. Diese falsch positiven Zellen können durch zwei Mechanismen entstehen [123].

Bei der Pseudotransduktion wird das Markerprotein (z.B. GFP) durch sein Vorhandensein im viralen Überstand direkt übertragen und führt so zu einem falsch positiven Signal bei der durchflusszytometrischen Analyse. Diesem Phänomen geht voraus, dass die 293FT - Virus verpackenden Zellen bereits lentivirale Partikel produziert haben, die nur das GFP Protein enthalten. In der Studie von Haas et al. wurde 24 h nach der Transduktion eine geringe Anzahl an CD34⁺ Zellen, infiziert durch GFP enthaltende-Pseudo Vektoren, als positiv im Durchflusszytometer gemessen [123].

Als zweiten Mechanismus haben Haas et al. [123] die transiente Expression nicht-integrierter Vektoren untersucht. Hierfür wurden lentivirale Überstände mit einem nicht funktionellen Integrase Protein hergestellt. Virale Partikel ohne das entsprechende *pol* Protein sollten nicht in das Genom der CD34⁺ Zellen integriert werden können. Nach 24 h wurden trotz fehlender Integrase einige GFP positive CD34⁺ Zellen gemessen, welche auch nach 10 Tagen in Kultur noch zu erkennen waren. Haas et al. [123] schlossen daraus, dass die Integration in das Genom der Zielzellen nicht notwendig für die Expression des GFP Proteins ist oder dass es einen weiteren Mechanismus der Integration gibt, welcher Integrase-unabhängig von Statten geht.

Beide Phänomene können in der vorliegenden Arbeit weitestgehend ausgeschlossen werden. Durch die generell geringe Transduktionseffizienz der TF, ist der Anteil an falsch positiven Zellen durch Pseudovektoren zu vernachlässigen. Die durchflusszytometrische Analyse der Zellen auf die Expression von CD117/FcεRI wurde drei Wochen nach Beginn der Kultur durchgeführt (Abb. 4.16.). Zu diesem Zeitpunkt ist nicht mehr mit einer Expression von nicht-integrierten Vektoren oder Pseudovektoren zu rechnen, da diese laut Haas et al. [123] nach 10 Tagen nicht mehr messbar war. Durch

die Messung der CD117/Fc ϵ RI positiven Zellen innerhalb der YFP-positiven Zellen kann davon ausgegangen werden, dass es sich um erfolgreich transduzierte Zellen handelte. Als Kontrolle wurde auch die mögliche YFP Expression der PSCMCs gemessen. Diese zeigten eine unspezifische Fluoreszenz von ca. 2%, innerhalb dieser Zellpopulation wurden jedoch keine CD117/Fc ϵ RI positiven Zellen detektiert.

5.7. Hohe spontane Freisetzung an β -Hexosaminidase bei den generierten Zellen

Die Messung der β -Hexosaminidase wurde durchgeführt, um die allgemeine Aktivierbarkeit der Zellen und im Besonderen die Freisetzung nach IgE/anti-IgE Aktivierung zu analysieren. Als Positivkontrolle für die Messung wurde die β -Hexosaminidasefreisetzung nach erfolgter Degranulation durch Aktivierung der LAD2-Zellen gemessen. Die humane MZ Zelllinie LAD2 wurde von Kirshenbaum et al. 2003 auf zellulärer und molekularer Ebene näher charakterisiert [80]. In dieser Studie wurde unter anderem die β -Hexosaminidasefreisetzung nach Fc ϵ RI-Aggregation gemessen und Werte von nahezu 40% Freisetzung detektiert. Die während der vorliegenden Studie generierten Messwerte spiegeln die zu erwartende Verteilung der Werte untereinander wieder. Der höchste Wert wurde nach Behandlung mit dem Stimulanz Ionomycin gemessen. Dies spricht für eine allgemein gute Aktivierbarkeit der LAD2-Zellen und wird als Kontrolle während des Assay mitgeführt [124]. Die Messwerte für die IgE/anti-IgE spezifische Aktivierung der LAD2-Zellen liegt bei knapp 30%. Dies entspricht u.a. den Ergebnissen von Pundir et al. [124] und Kirshenbaum et al. [80]. Auch bei humanen Hautmastzellen sind Werte von ca. 40% β -Hexosaminidasefreisetzung nach IgE-Sensibilisierung und Fc ϵ RI-Aggregation [125].

Besonders relevant für die Validität des Assay ist die Messung der spontanen Freisetzung an β -Hexosaminidase. Diese sollte maximal 5% betragen [80]. Im Vergleich zu LAD2-Zellen wurden bei PSCMCs höhere Werte für die spontane Freisetzung (>20%) gemessen. Dieses Phänomen wurde auch an anderer Stelle bei generierten PSCMCs im Labor beobachtet. Die Zellen scheinen generell sensibler mit Degranulation auf Aktivierungsstimuli zu reagieren. Da die Werte nach Ionomycin und IgE/anti-IgE Behandlung höher ausfielen, konnte die Messung ausgewertet werden.

Für die pVenus-TF GATA2PU1HES1BCLXL, MITF, HMOX1 und GATA-3 wurden bereits bei der spontanen Freisetzung Werte über 30% für β -Hexosaminidase gemessen. Eine mögliche Ursache für diese hohen Werte kann das Übernehmen von Zellen sein, welche bei der Entnahme der Zellüberstände mitgeführt wurden [126]. Auch nach Behandlung der Zellen mit Ionomycin oder IgE/anti-IgE wurde bei pVenus-GATA2PU1HES1BCLXL, MITF, HMOX1 und GATA-3 β -Hexosaminidase gemessen. Jedoch können diese Werte durch die hohe spontane Freisetzung nicht als spezifisch bezeichnet werden.

Nur bei pVenus-GATA-1 generierten Zellen zeigte sich eine Verteilung der Messwerte wie bei IL-3/SCF kultivierten PSCMCs. Die höchsten Werte wurden jeweils für Ionomycin behandelte Zellen gemessen. Zwischen 20% und 30% β -Hexosaminidase konnten nach IgE/anti-IgE Behandlung detektiert werden. Die spontane Freisetzung an β -Hexosaminidase war, wie bei PSCMCs, auch für pVenus-GATA-1 infizierte Zellen hoch, jedoch niedriger als die IgE/anti-IgE spezifische und allgemeine Aktivierbarkeit der Zellen.

Zusätzlich wurde der Histamingehalt in den Zellüberständen nach drei Wochen in Kultur gemessen. Auch hier wurden hohe Werte bei nicht behandelten Zellen gemessen.

Sowohl β -Hexosaminidase als auch Histamin wurden in der gesamten Zellkultur gemessen, da ein vorheriges isolieren der YFP-positiven Zellen praktisch nicht umzusetzen war. Die unspezifische Freisetzung der MZ Mediatoren kann daher auch durch die anderen, nicht näher beschriebenen Zellen innerhalb der Kulturen verstärkt worden sein. Die Freisetzung nach IgE/anti-IgE Behandlung jedoch ist nur bei MZ oder basophilen Granulozyten beschrieben und kann als positives Ergebnis betrachtet werden.

5.8. HMOX1 als neuer Faktor für die MZ Entwicklung

Durch die lentivirale Transduktion der CD34⁺ SZ mit dem TF HMOX1 konnten in beiden Gruppen an Viren MZ generiert werden, die CD117 und Fc ϵ RI exprimieren. Die durchflusszytometrische Analyse der pLenti-HMOX1 generierten Zellen zeigte eine starke Heterogenität (Abb. 4.11.a) der einzelnen Ansätze. Für alle Ansätze wurden

eingefrorene lentivirale Partikel des selben Virusüberstandes verwendet, somit ist die Varianz der Messwerte nicht durch die generierten Viren zu erklären. Ursächlich kann die Verwendung der Stammzellkonzentrate von verschiedenen Spendern sein. Die Stammzellkonzentrate wurden Patienten als autologe Spenden für eine mögliche Stammzellspende entnommen. Die nähere Krankheitsgeschichte dieser Patienten ist nicht bekannt, kann aber durch z.B. Defekte in der Blutbildung zu genetisch defekten SZ geführt haben, wodurch die Entwicklung der MZ beeinflusst wurde.

HMOX1, auch bekannt als Hitzeschockprotein 32 (Hsp32) oder Häm Oxygenase 1 (HO-1), ist als Faktor für das Überleben und Wachstum von neoplastischen Zellen bekannt [127]. Beispielsweise wirkt das Onkoprotein BCR-ABL in chronisch myeloischer Leukämie positiv auf die Expression von HMOX1 in Leukämiezellen [128]. Auch das Krankheitsbild der systemischen Mastozytose (SM) ist durch eine Anhäufung neoplastischer Zellen, in diesem Fall MZ, gekennzeichnet. Für die Behandlung von Patienten mit einer aggressiver Form der SM oder MZ Leukämie steht die Identifizierung neuer therapeutischer Ziele in neoplastischen MZ im Fokus [129, 130]. Kondo et al. [65] konnten 2007 HMOX1 mRNA und das Protein in der MZ Zelllinie HMC-1.2. und in angereicherten neoplastischen MZ nachweisen. Weiterhin konnten sie einen Zusammenhang zwischen HMOX1 und der D816V-mutierten Form der Tyrosinkinase c-KIT herstellen. Sowohl die mutierte Variante des c-KIT als auch der Wildtyp c-KIT konnten die Promotor Aktivität des HMOX1 und die HMOX1 mRNA induzieren. Diese Expression von HMOX1 und die Zellproliferation der neoplastischen MZ konnte erfolgreich mit Midostaurin (PKC412) gesenkt werden, welches sich gegen die D816V-mutierte Form des c-KIT richtet. HMOX1 konnte mit dieser Studie als Faktor, der das Überleben der neoplastischen MZ fördert, bestätigt werden und wird als Kandidat für neue Therapieansätze weiter erforscht.

HMOX1 ist weiterhin als wichtiges Enzym des Häm Katabolismus bekannt. Es spaltet Häm zur Generierung von Biliverdin, welches zu Bilirubin und Kohlenstoffmonoxid (CO) abgebaut wird. CO ist ein Gasotransmitter, welcher von Endothelzellen im Zuge einer lokalen Entzündung der Haut oder Schleimhäute produziert wird. In einem bisher nicht veröffentlichten Nebenprojekt unserer Arbeitsgruppe wurde der Effekt von CO auf die Degranulation, durch Messung der β -Hexosaminidase, von MZ untersucht. Es zeigte sich, dass CO die Degranulation von MZ nach 24h Exposition, fördert. Der Einfluss von

HMOX1 hat auch in der vorliegenden Arbeit die spontane Freisetzung von β -Hexosaminidase gefördert (Abb. 4.20.).

5.9. Limitationen, Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sich durch den Einfluss eines TF MZ aus CD34⁺ SZ generieren lassen. Die getesteten 17 TF bzw. Kombinationen aus vier TF wurden hierfür durch zwei verschiedene lentivirale Vektoren auf HSZ übertragen.

Wie bereits einleitend beschrieben ist die effiziente Übertragung von Transgenen auf humane HSZ je nach Methode mit Limitationen verbunden. Durch Elektroporation steigt die Anzahl an apoptotischen Zellen [69]. Die nicht-virale Methode über Lipofectamin ist durch eine niedrige Transfektionseffizienz der Transgene beschrieben [68]. Die Übertragung der TF durch lentivirale Vektoren wurde als Alternative zu diesen Methoden für die vorliegende Studie genutzt. Ein Vorteil dieser Methode ist die Infizierbarkeit von ruhenden HSZ durch Lentiviren [110]. Auch wird, im Gegensatz zur Elektroporation, die mechanische Aktivierung der CD34⁺ SZ gesenkt und somit eine frühzeitige Differenzierung der Zellen verhindert.

Die genutzten lentiviralen Vektoren unterschieden sich unter Anderem in ihrer Größe und durch den internen Promotor. Beide Promotoren wurden zuvor als sehr wirksam in HSZ beschrieben. Die Ergebnisse zeigen eine Heterogenität innerhalb der beiden Gruppen an Viren. Ob die Wirksamkeit der Promotoren im genutzten System auch eine Ursache für die niedrige Transduktionseffizienz darstellt kann nur spekuliert werden. Weitergehende Untersuchungen mit anderen Promotoren, wie beispielweise dem PGK Promotor, können näheren Aufschluss liefern.

Zu den Erkenntnissen diese Arbeit zählt, dass die Übertragung von TF durch lentivirale Vektoren generell möglich ist. Durch die Wirkung der TF konnte jedoch die Anzahl an MZ, im Vergleich zu PSCMCs, nicht erhöht werden. Als Ursache für die geringen Zellzahlen nach erfolgter Kultivierung der Zellen kann die Toxizität der DNS angeführt werden. Da bei MOCK transduzierten Zellen kaum apoptotische Zellen messbar waren, ist eine Toxizität der Lentiviren an sich auszuschließen. Die Expression der Transgene scheint hier die Ursache für die geringen Zellzahlen zu sein. Im Schnitt waren 30% der

Zellen nach drei Wochen in Kultur apoptotisch, was die Hypothese des toxischen Einflusses der DNS der Transgene unterstreicht.

Als limitierend für den Erfolg der angewandten Methode können auch die technischen Möglichkeiten im Labor herangezogen werden. Die Viren wurden nur durch Zentrifugation der Virus produzierenden 293FT-Zellen gewonnen. Eine zusätzliche Anreicherung der Viren durch Ultrazentrifugation könnte die Effizienz der HSZ Infektion steigern. Des Weiteren war es nicht möglich die YFP-positiven Zellen, durch ein Zellsortierungsverfahren, aus der gesamten Zellkultur zu isolieren um nur diese Zellen funktionell zu überprüfen. So ist es beispielsweise nur zum Teil möglich eine Aussage über die Funktionalität der durch TF generierten Zellen zu machen. Die Überprüfung der Proteinexpression in den CD34⁺ SZ konnte aufgrund der sehr geringen Zellzahlen nach zwei bzw. dreiwöchiger Kultur nicht durchgeführt werden. Hinzu kamen technische Schwierigkeiten. Bei der Planung der TF Sequenzen wurde aus Kostengründen auf eine zusätzliche Markierung innerhalb der Sequenzen verzichtet. Nachträglich kam die Idee gegen ein kurzes Peptid, welches an jedem TF zu finden ist, ein Antiserum herzustellen. Somit sollte beispielsweise im Western Blot-Verfahren ein Nachweis der hergestellten Peptide möglich sein. Erste Versuche die Proteine in den 293FT Zellen anzufärben, welche für die Titration der pVenus-TF genutzt wurden, zeigte das Vorhandensein von Proteinen und zusätzlich unspezifische Banden. Aufgrund der Beendigung des S2 Projektes war es nicht mehr möglich, weitere Experimente anzufertigen. Neben der hier angewandten Überexpression eines TF wäre auch das gezielte Ausschalten der Gene für TF eine Möglichkeit, die Entwicklung der MZ aus CD34⁺ SZ näher zu untersuchen. So könnte man mRNS von TF, welche im murinen System für die frühe Entwicklung der MZ beschrieben wurden (MITF, GATA-1,...), durch die Verwendung von siRNS blockieren und die Proteinexpression verhindern.

Nach Infektion der HSZ mit den TF HMOX1 und GATA-3 konnten in beiden lentiviralen Systemen MZ detektiert werden. GATA-3 wurde bereits im murinen System in Kombination mit dem TF HES-1 für die Ausdifferenzierung von MZ aus GMPs oder CMPs bestätigt. Die vorliegende Arbeit konnte auch für das humane System eine Relevanz für die MZ Entwicklung bekräftigen.

In der vorliegenden Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass HMOX1 die Differenzierung von MZ aus HSZ fördert. Der Faktor HMOX1 war bisher als mögliches Ziel für die Behandlung der Mastozytose bekannt. Erschwert werden weitere Untersuchungen an MZ von Mastozytose Patienten durch die Verfügbarkeit der Zellen. MZ sind in gesunder Haut lokalisiert, eine Isolation ist daher nur nach operativen Eingriffen möglich, wenn auch gesundes Gewebe mit entfernt werden muss. Als Alternative wurde in unserer Arbeitsgruppe ein Protokoll etabliert, um CD34⁺ SZ aus dem peripheren Blut von Patienten zu isolieren und diese zu MZ weiter zu differenzieren. Der Einfluss von HMOX1 könnte mit dieser Methode bereits während der Ausdifferenzierung der peripheren CD34⁺ SZ zu MZ untersucht werden, um diesen Faktor für eventuelle, neue Therapieansätze weiter zu charakterisieren.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1.	Darstellung der normalen Hämatopoese	S.3
Abb. 1.2.	Modellvorstellungen der murinen MZ Entwicklung	S.4
Abb. 1.3.	Aufbau des retroviralen Genoms	S.14
Abb. 1.4.	Bestandteile des lentiviralen Expressionssystems	S.15
Abb. 3.1.	Plasmidkarte des pENTR™5/EF1αp	S.31
Abb. 3.2.	Plasmidkarte des pLenti6.4/R4R2/V5-DEST	S.32
Abb. 3.3.	Plasmidkarte des CS-CA-Rfa-IRES2-Venus	S.33
Abb. 3.4.	Plasmidkarte des pMDLg/pRRE	S.34
Abb. 3.5.	Plasmidkarte des pCMV-VSV-G	S.34
Abb. 3.6.	Plasmidkarte des pRSV-Rev	S.35
Abb. 3.7.	Plasmidkarten des CS-CDF-EG-PRE und CS-CA-GFP	S.36
Abb. 3.8.	Darstellung der Multisite Gateway LR Rekombination	S.37
Abb. 3.9.	Transiente Transfektion der 293FT Zellen	S.42
Abb. 3.10.	Transduktion der CD34 ⁺ Zielzellen	S.43
Abb. 4.1.	Kontrollverdau der Transfervektoren pLenti-TF	S.46
Abb. 4.2.	Kontrollverdau der Transfervektoren pLenti-TF	S.47
Abb. 4.3.	Standardkurve des DNS-Markers	S.47
Abb. 4.4.	293FT, SeAx und CD34 ⁺ Zellen in Kultur	S.50
Abb. 4.5.	Transfizierte 293FT Zellen	S.50
Abb. 4.6.	Transduzierte SeAx Zellen	S.50
Abb. 4.7.	Transduzierte CD34 ⁺ SZ	S.51
Abb. 4.8.	Virustiter der pLenti-TF	S.52
Abb. 4.9.	Virustiter der pVenus-TF	S.53
Abb. 4.10.	CD34 ⁺ SZ infiziert mit pLenti-TF für eine Woche	S.55
Abb. 4.11.	CD34 ⁺ SZ infiziert mit pLenti-TF für zwei Wochen	S.57
Abb. 4.12.	CD34 ⁺ SZ infiziert mit pLenti-TF für zwei Wochen nach Größe	S.58
Abb. 4.13.	Dotplots der CD34 ⁺ SZ infiziert mit pLenti-TF für zwei Wochen	S.59
Abb. 4.14.	Absolute Zellzahlen der pLenti-TF nach zwei Wochen	S.60
Abb. 4.15.	YFP Expression der pVenus-TF nach 24h und drei Wochen	S.62
Abb. 4.16.	CD34 ⁺ SZ infiziert mit pVenus-TF für drei Wochen	S.63
Abb. 4.17.	Dotplots der CD34 ⁺ SZ infiziert mit pVenus-TF für drei Wochen	S.64
Abb. 4.18.	Viabilität der pVenus-TF nach drei Wochen	S.65
Abb. 4.19.	Mikroskopische Aufnahmen der Zellen	S.67
Abb. 4.20.	β-Hexosaminidase Messung der pVenus-TF	S.68
Abb. 5.1.	Graphische Darstellung der bestätigten TF	S.74

7. Tabellenverzeichnis

Tab I	Liste der Abkürzungen	VII
Tab. 1.1.	Unterscheidung der HSZ aufgrund ihrer molekularen Marker	S.2
Tab. 2.1.	Zellen und Zelllinien	S.16
Tab. 2.2.	Plasmide	S.16
Tab. 2.3.	Zellkulturmedien und Zusätze	S.17
Tab. 2.4.	Puffer, Reagenzien und Chemikalien	S.17
Tab. 2.5.	Zytokine	S.19
Tab. 2.6.	Restriktionsenzyme	S.19
Tab. 2.7.	Antikörper	S.19
Tab. 2.8.	Kommerzielle Kits	S.20
Tab. 2.9.	Verbrauchsmaterialien	S.20
Tab. 2.10.	Zusätzliche Materialien	S.21
Tab. 2.11.	Geräte	S.21
Tab. 2.12.	Zusätzliche Geräte im S2 Labor	S.22
Tab. 2.13.	Software zur Datenanalyse	S.22
Tab. 2.14.	Hersteller und Vertreiber	S.23
Tab. 3.1.	Kombination der Antikörper und Fluorochrome der durchflusszytometrischen Analysen	S.44
Tab. 4.1.	Darstellung der Größe (bp) der einzelnen pLenti-TF nach dem Kontrollverdau mit dem Enzym <i>EcoRV</i>	S.48

8. Referenzen

1. Kühl, S. and M. Kühl, *Stammzellbiologie*. 2012: Ulmer.
2. Till, J.E. and C.E. Mc, *A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells*. Radiat Res, 1961. **14**: p. 213-22.
3. Spangrude, G.J., S. Heimfeld, and I.L. Weissman, *Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells*. Science, 1988. **241**(4861): p. 58-62.
4. Spangrude, G.J., et al., *The stem cell antigens Sca-1 and Sca-2 subdivide thymic and peripheral T lymphocytes into unique subsets*. J Immunol, 1988. **141**(11): p. 3697-707.
5. Sidney, L.E., et al., *Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors*. Stem Cells, 2014. **32**(6): p. 1380-9.
6. Morrison, S.J. and I.L. Weissman, *The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype*. Immunity, 1994. **1**(8): p. 661-73.
7. Seita, J. and I.L. Weissman, *Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation*. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2010. **2**(6): p. 640-53.
8. Schmetzer, O., et al., *Murine and human mast cell progenitors*. Eur J Pharmacol, 2015. Eur J Pharmacol. 2016 May 5;778:2-10.
9. Dahlin, J.S., B. Heyman, and J. Hallgren, *Committed mast cell progenitors in mouse blood differ in maturity between Th1 and Th2 strains*. Allergy, 2013. **68**(10): p. 1333-7.
10. Siebenhaar, F., et al., *Treatment strategies in mastocytosis*. Immunol Allergy Clin North Am, 2014. **34**(2): p. 433-47.
11. Echtenacher, B., D.N. Mannel, and L. Hultner, *Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis*. Nature, 1996. **381**(6577): p. 75-7.
12. Maurer, M., et al., *Skin mast cells control T cell-dependent host defense in Leishmania major infections*. FASEB J, 2006. **20**(14): p. 2460-7.
13. Yokoi, H., et al., *Comparison of human tonsillar mast cell localization and ultrastructural observations between IgE-mediated allergic and nonallergic donors*. Allergy Asthma Proc, 2006. **27**(5): p. 415-21.

14. Galli, S.J., et al., *Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances*. *Annu Rev Immunol*, 2005. **23**: p. 749-86.
15. Siebenhaar, F., et al., *Control of Pseudomonas aeruginosa skin infections in mice is mast cell-dependent*. *Am J Pathol*, 2007. **170**(6): p. 1910-6.
16. Patou, J., et al., *Staphylococcus aureus enterotoxin B, protein A, and lipoteichoic acid stimulations in nasal polyps*. *J Allergy Clin Immunol*, 2008. **121**(1): p. 110-5.
17. Metz, M., et al., *Mast cells determine the magnitude of bacterial toxin-induced skin inflammation*. *Exp Dermatol*, 2009. **18**(2): p. 160-6.
18. Meyer, G.K., et al., *Clostridium difficile toxins A and B directly stimulate human mast cells*. *Infect Immun*, 2007. **75**(8): p. 3868-76.
19. Fukuishi, N., et al., *Does beta-hexosaminidase function only as a degranulation indicator in mast cells? The primary role of beta-hexosaminidase in mast cell granules*. *J Immunol*, 2014. **193**(4): p. 1886-94.
20. Arinobu, Y., H. Iwasaki, and K. Akashi, *Origin of basophils and mast cells*. *Allergol Int*, 2009. **58**(1): p. 21-8.
21. Kitamura, Y., et al., *Development of mast cells from grafted bone marrow cells in irradiated mice*. *Nature*, 1977. **268**(5619): p. 442-3.
22. Metcalfe, D.D., D. Baram, and Y.A. Mekori, *Mast cells*. *Physiol Rev*, 1997. **77**(4): p. 1033-79.
23. Kitamura, Y., S. Go, and K. Hatanaka, *Decrease of mast cells in W/W^v mice and their increase by bone marrow transplantation*. *Blood*, 1978. **52**(2): p. 447-52.
24. Galli, S.J., *Mast cells and basophils*. *Curr Opin Hematol*, 2000. **7**(1): p. 32-9.
25. Iemura, A., et al., *The c-kit ligand, stem cell factor, promotes mast cell survival by suppressing apoptosis*. *Am J Pathol*, 1994. **144**(2): p. 321-8.
26. Todeschini, A.L., A. Georges, and R.A. Veitia, *Transcription factors: specific DNA binding and specific gene regulation*. *Trends Genet*, 2014. **30**(6): p. 211-9.
27. Lee, T.I. and R.A. Young, *Transcriptional regulation and its misregulation in disease*. *Cell*, 2013. **152**(6): p. 1237-51.
28. Sasaki, H., et al., *Transcription factor IRF8 plays a critical role in the development of murine basophils and mast cells*. *Blood*, 2014.
29. Roeder, R.G., *The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II*. *Trends Biochem Sci*, 1996. **21**(9): p. 327-35.

30. Hasty, P., et al., *Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene*. *Nature*, 1993. **364**(6437): p. 501-6.
31. Akira, S., T. Taga, and T. Kishimoto, *Interleukin-6 in biology and medicine*. *Adv Immunol*, 1993. **54**: p. 1-78.
32. Wegenka, U.M., et al., *The interleukin-6-activated acute-phase response factor is antigenically and functionally related to members of the signal transducer and activator of transcription (STAT) family*. *Mol Cell Biol*, 1994. **14**(5): p. 3186-96.
33. Ihle, J.N. and I.M. Kerr, *Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily*. *Trends Genet*, 1995. **11**(2): p. 69-74.
34. Migliaccio, A.R., et al., *GATA-1 as a regulator of mast cell differentiation revealed by the phenotype of the GATA-1^{low} mouse mutant*. *J Exp Med*, 2003. **197**(3): p. 281-96.
35. Babina, M., et al., *The transcription factor profile of human mast cells in comparison with monocytes and granulocytes*. *Cell Mol Life Sci*, 2005. **62**(2): p. 214-26.
36. Walsh, J.C., et al., *Cooperative and antagonistic interplay between PU.1 and GATA-2 in the specification of myeloid cell fates*. *Immunity*, 2002. **17**(5): p. 665-76.
37. Inage, E., et al., *Critical Roles for PU.1, GATA1, and GATA2 in the expression of human FcepsilonRI on mast cells: PU.1 and GATA1 transactivate FCER1A, and GATA2 transactivates FCER1A and MS4A2*. *J Immunol*, 2014. **192**(8): p. 3936-46.
38. Li, Y., et al., *The STAT5-GATA2 pathway is critical in basophil and mast cell differentiation and maintenance*. *J Immunol*, 2015. **194**(9): p. 4328-38.
39. Li, Y., et al., *The transcription factors GATA2 and microphthalmia-associated transcription factor regulate Hdc gene expression in mast cells and are required for IgE/mast cell-mediated anaphylaxis*. *J Allergy Clin Immunol*, 2017.
40. Zon, L.I., et al., *GATA-binding transcription factors in mast cells regulate the promoter of the mast cell carboxypeptidase A gene*. *J Biol Chem*, 1991. **266**(34): p. 22948-53.
41. Sakata-Yanagimoto, M., et al., *Coordinated regulation of transcription factors through Notch2 is an important mediator of mast cell fate*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(22): p. 7839-44.
42. Morales, J.K., et al., *Mast cell homeostasis and the JAK-STAT pathway*. *Genes Immun*, 2010. **11**(8): p. 599-608.
43. Ando, T., et al., *Critical role for mast cell Stat5 activity in skin inflammation*. *Cell Rep*, 2014. **6**(2): p. 366-76.

44. Barnstein, B.O., et al., *Stat5 expression is required for IgE-mediated mast cell function*. J Immunol, 2006. **177**(5): p. 3421-6.
45. Shelburne, C.P., et al., *Stat5 expression is critical for mast cell development and survival*. Blood, 2003. **102**(4): p. 1290-7.
46. Ikeda, K., et al., *Stat5a is essential for the proliferation and survival of murine mast cells*. Int Arch Allergy Immunol, 2005. **137 Suppl 1**: p. 45-50.
47. Pullen, N.A., et al., *Novel mechanism for Fc{epsilon}RI-mediated signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) tyrosine phosphorylation and the selective influence of STAT5B over mast cell cytokine production*. J Biol Chem, 2012. **287**(3): p. 2045-54.
48. Kataoka, T.R., et al., *Involvement of connective tissue-type mast cells in Th1 immune responses via Stat4 expression*. Blood, 2005. **105**(3): p. 1016-20.
49. Jin, X., et al., *Elevated levels of mast cells are involved in pruritus associated with polycythemia vera in JAK2V617F transgenic mice*. J Immunol, 2014. **193**(2): p. 477-84.
50. Rajala, H.L., et al., *Discovery of somatic STAT5b mutations in large granular lymphocytic leukemia*. Blood, 2013. **121**(22): p. 4541-50.
51. Kearney, L., et al., *Specific JAK2 mutation (JAK2R683) and multiple gene deletions in Down syndrome acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 2009. **113**(3): p. 646-8.
52. Zhang, S.J., et al., *Gain-of-function mutation of GATA-2 in acute myeloid transformation of chronic myeloid leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(6): p. 2076-81.
53. Calero-Nieto, F.J., et al., *Key regulators control distinct transcriptional programmes in blood progenitor and mast cells*. EMBO J, 2014. **33**(11): p. 1212-26.
54. Kitamura, Y., et al., *Effect of MITF on mast cell differentiation*. Mol Immunol, 2002. **38**(16-18): p. 1173-6.
55. Lee, S.H., et al., *Involvement of MITF-A, an alternative isoform of mi transcription factor, on the expression of tryptase gene in human mast cells*. Exp Mol Med, 2010. **42**(5): p. 366-75.
56. Murakami, M., Y. Iwata, and M. Funaba, *Expression and transcriptional activity of alternative splice variants of Mitf exon 6*. Mol Cell Biochem, 2007. **303**(1-2): p. 251-7.
57. Morii, E., et al., *Interaction and cooperation of mi transcription factor (MITF) and myc-associated zinc-finger protein-related factor (MAZR) for transcription of mouse mast cell protease 6 gene*. J Biol Chem, 2002. **277**(10): p. 8566-71.

58. Cairns, J.A., *Inhibitors of mast cell tryptase beta as therapeutics for the treatment of asthma and inflammatory disorders*. *Pulm Pharmacol Ther*, 2005. **18**(1): p. 55-66.
59. Abramova, A., et al., *The transcription factor MAZR preferentially acts as a transcriptional repressor in mast cells and plays a minor role in the regulation of effector functions in response to FcepsilonRI stimulation*. *PLoS One*, 2013. **8**(10): p. e77677.
60. Wang, Q., et al., *Down-Regulation of MicroRNA-223 Promotes Degranulation via the PI3K/Akt Pathway by Targeting IGF-1R in Mast Cells*. *PLoS One*, 2015. **10**(4): p. e0123575.
61. Griesenauer, B. and S. Paczesny, *The ST2/IL-33 Axis in Immune Cells during Inflammatory Diseases*. *Front Immunol*, 2017. **8**: p. 475.
62. Mekori, Y.A., et al., *Human mast cell apoptosis is regulated through Bcl-2 and Bcl-XL*. *J Clin Immunol*, 2001. **21**(3): p. 171-4.
63. Baumann, A., et al., *The circadian clock is functional in eosinophils and mast cells*. *Immunology*, 2013. **140**(4): p. 465-74.
64. Vasu, V.T., C.E. Cross, and K. Gohil, *Nr1d1, an important circadian pathway regulatory gene, is suppressed by cigarette smoke in murine lungs*. *Integr Cancer Ther*, 2009. **8**(4): p. 321-8.
65. Kondo, R., et al., *Identification of heat shock protein 32 (Hsp32) as a novel survival factor and therapeutic target in neoplastic mast cells*. *Blood*, 2007. **110**(2): p. 661-9.
66. Saavedra, K., et al., *Loss of Expression of Reprimo, a p53-induced Cell Cycle Arrest Gene, Correlates with Invasive Stage of Tumor Progression and p73 Expression in Gastric Cancer*. *PLoS One*, 2015. **10**(5): p. e0125834.
67. Ohki, R., et al., *Reprimo, a new candidate mediator of the p53-mediated cell cycle arrest at the G2 phase*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(30): p. 22627-30.
68. Sharifi Tabar, M., et al., *Evaluating Electroporation and Lipofectamine Approaches for Transient and Stable Transgene Expressions in Human Fibroblasts and Embryonic Stem Cells*. *Cell J*, 2015. **17**(3): p. 438-50.
69. Li, L.H., P. McCarthy, and S.W. Hui, *High-efficiency electrotransfection of human primary hematopoietic stem cells*. *FASEB J*, 2001. **15**(3): p. 586-8.
70. Woods, N.B., A. Ooka, and S. Karlsson, *Development of gene therapy for hematopoietic stem cells using lentiviral vectors*. *Leukemia*, 2002. **16**(4): p. 563-9.
71. Naldini, L., et al., *Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(21): p. 11382-8.

72. Dull, T., et al., *A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system*. J Virol, 1998. **72**(11): p. 8463-71.
73. Hoffmann, C. and J.K. Rockstroh, *HIV 2015/2016*. 2015: Medizin Fokus Verlag.
74. Miyoshi, H., et al., *Development of a self-inactivating lentivirus vector*. J Virol, 1998. **72**(10): p. 8150-7.
75. Zufferey, R., et al., *Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery*. J Virol, 1998. **72**(12): p. 9873-80.
76. Shaw, A. and K. Cornetta, *Design and potential of non-integrating lentiviral vectors*. Biomedicines, 2014. **2**(1): p. 14-35.
77. Graham, F.L., et al., *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. J Gen Virol, 1977. **36**(1): p. 59-74.
78. Schmetzer, O., et al., *A novel method to generate and culture human mast cells: Peripheral CD34+ stem cell-derived mast cells (PSCMCs)*. J Immunol Methods, 2014. **413**: p. 62-8.
79. Rasheed, S., et al., *Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080)*. Cancer, 1974. **33**(4): p. 1027-33.
80. Kirshenbaum, A.S., et al., *Characterization of novel stem cell factor responsive human mast cell lines LAD 1 and 2 established from a patient with mast cell sarcoma/leukemia; activation following aggregation of FcepsilonRI or FcgammaRI*. Leuk Res, 2003. **27**(8): p. 677-82.
81. Chen, I. and D. Dubnau, *DNA uptake during bacterial transformation*. Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(3): p. 241-9.
82. Kalfott, K., et al., *A continuous T-cell line from a patient with Sezary syndrome*. Arch Dermatol Res, 1987. **279**(5): p. 293-8.
83. Verlag, S.A., *Lexikon der Biologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/Zugegriffen>, 1999. **12**: p. 2016.
84. Goldman, L.A., et al., *Modifications of vectors pEF-BOS, pcDNA1 and pcDNA3 result in improved convenience and expression*. Biotechniques, 1996. **21**(6): p. 1013-5.
85. Mizushima, S. and S. Nagata, *pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector*. Nucleic Acids Res, 1990. **18**(17): p. 5322.
86. Curradi, M., et al., *Molecular mechanisms of gene silencing mediated by DNA methylation*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(9): p. 3157-73.

87. Rietveld, L.E., E. Caldenhoven, and H.G. Stunnenberg, *In vivo repression of an erythroid-specific gene by distinct corepressor complexes*. EMBO J, 2002. **21**(6): p. 1389-97.
88. Kimura, M., A. Takatsuki, and I. Yamaguchi, *Blasticidin S deaminase gene from Aspergillus terreus (BSD): a new drug resistance gene for transfection of mammalian cells*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1219**(3): p. 653-9.
89. Himathongkham, S. and P.A. Luciw, *Restriction of HIV-1 (subtype B) replication at the entry step in rhesus macaque cells*. Virology, 1996. **219**(2): p. 485-8.
90. Kjems, J., et al., *Structural analysis of the interaction between the human immunodeficiency virus Rev protein and the Rev response element*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(3): p. 683-7.
91. Miyazaki, J., et al., *Expression vector system based on the chicken beta-actin promoter directs efficient production of interleukin-5*. Gene, 1989. **79**(2): p. 269-77.
92. Landy, A., *Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination*. Annu Rev Biochem, 1989. **58**: p. 913-49.
93. Bushman, W., et al., *Control of directionality in lambda site specific recombination*. Science, 1985. **230**(4728): p. 906-11.
94. Hanahan, D., *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*. J Mol Biol, 1983. **166**(4): p. 557-80.
95. Birnboim, H.C., *A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA*. Methods Enzymol, 1983. **100**: p. 243-55.
96. Hanenberg, H., et al., *Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells*. Nat Med, 1996. **2**(8): p. 876-82.
97. Millington, M., et al., *Towards a clinically relevant lentiviral transduction protocol for primary human CD34 hematopoietic stem/progenitor cells*. PLoS One, 2009. **4**(7): p. e6461.
98. Escors, D. and K. Breckpot, *Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2010. **58**(2): p. 107-19.
99. Bennett, J.P., S. Cockcroft, and B.D. Gomperts, *Ionomycin stimulates mast cell histamine secretion by forming a lipid-soluble calcium complex*. Nature, 1979. **282**(5741): p. 851-3.
100. Marinus, M.G. and N.R. Morris, *Isolation of deoxyribonucleic acid methylase mutants of Escherichia coli K-12*. J Bacteriol, 1973. **114**(3): p. 1143-50.

101. Ghinassi, B., et al., *The hypomorphic Gata1^{low} mutation alters the proliferation/differentiation potential of the common megakaryocytic-erythroid progenitor*. Blood, 2007. **109**(4): p. 1460-71.
102. Tsai, F.Y., et al., *An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2*. Nature, 1994. **371**(6494): p. 221-6.
103. Takemoto, C.M., et al., *PU.1 positively regulates GATA-1 expression in mast cells*. J Immunol, 2010. **184**(8): p. 4349-61.
104. Dedhia, P., T. Kambayashi, and W.S. Pear, *Notch2 paves the way to mast cells by Hes1 and Gata3*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(22): p. 7629-30.
105. Park, S.W., C.W. Pyo, and S.Y. Choi, *High-efficiency lentiviral transduction of primary human CD34(+) hematopoietic cells with low-dose viral inocula*. Biotechnol Lett, 2015. **37**(2): p. 281-8.
106. Uchida, N., et al., *Optimal conditions for lentiviral transduction of engrafting human CD34+ cells*. Gene Ther, 2011. **18**(11): p. 1078-86.
107. Akkina, R.K., et al., *High-efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G*. J Virol, 1996. **70**(4): p. 2581-5.
108. Salmon, P., et al., *High-level transgene expression in human hematopoietic progenitors and differentiated blood lineages after transduction with improved lentiviral vectors*. Blood, 2000. **96**(10): p. 3392-8.
109. Miyoshi, H., et al., *Transduction of human CD34+ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors*. Science, 1999. **283**(5402): p. 682-6.
110. Case, S.S., et al., *Stable transduction of quiescent CD34(+)CD38(-) human hematopoietic cells by HIV-1-based lentiviral vectors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(6): p. 2988-93.
111. An, D.S., et al., *Marking and gene expression by a lentivirus vector in transplanted human and nonhuman primate CD34(+) cells*. J Virol, 2000. **74**(3): p. 1286-95.
112. Ramezani, A., T.S. Hawley, and R.G. Hawley, *Lentiviral vectors for enhanced gene expression in human hematopoietic cells*. Mol Ther, 2000. **2**(5): p. 458-69.
113. Xia, X., et al., *Transgenes delivered by lentiviral vector are suppressed in human embryonic stem cells in a promoter-dependent manner*. Stem Cells Dev, 2007. **16**(1): p. 167-76.

114. Swanstrom, R. and J.W. Wills, *Synthesis, Assembly, and Processing of Viral Proteins*, in *Retroviruses*, J.M. Coffin, S.H. Hughes, and H.E. Varmus, Editors. 1997: Cold Spring Harbor (NY).
115. Kumar, M., et al., *Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors*. Hum Gene Ther, 2001. **12**(15): p. 1893-905.
116. Sutton, R.E., et al., *Transduction of human progenitor hematopoietic stem cells by human immunodeficiency virus type 1-based vectors is cell cycle dependent*. J Virol, 1999. **73**(5): p. 3649-60.
117. Sirven, A., et al., *Enhanced transgene expression in cord blood CD34(+)-derived hematopoietic cells, including developing T cells and NOD/SCID mouse repopulating cells, following transduction with modified trip lentiviral vectors*. Mol Ther, 2001. **3**(4): p. 438-48.
118. Alexopoulou, A.N., J.R. Couchman, and J.R. Whiteford, *The CMV early enhancer/chicken beta actin (CAG) promoter can be used to drive transgene expression during the differentiation of murine embryonic stem cells into vascular progenitors*. BMC Cell Biol, 2008. **9**: p. 2.
119. Carreira, S., B. Liu, and C.R. Goding, *The gene encoding the T-box factor Tbx2 is a target for the microphthalmia-associated transcription factor in melanocytes*. J Biol Chem, 2000. **275**(29): p. 21920-7.
120. Hornyak, T.J., et al., *Transcription factors in melanocyte development: distinct roles for Pax-3 and Mitf*. Mech Dev, 2001. **101**(1-2): p. 47-59.
121. Du, J., et al., *Critical role of CDK2 for melanoma growth linked to its melanocyte-specific transcriptional regulation by MITF*. Cancer Cell, 2004. **6**(6): p. 565-76.
122. Widlund, H.R., et al., *Beta-catenin-induced melanoma growth requires the downstream target Microphthalmia-associated transcription factor*. J Cell Biol, 2002. **158**(6): p. 1079-87.
123. Haas, D.L., et al., *Critical factors influencing stable transduction of human CD34(+) cells with HIV-1-derived lentiviral vectors*. Mol Ther, 2000. **2**(1): p. 71-80.
124. Pundir, P., C.A. MacDonald, and M. Kulka, *The Novel Receptor C5aR2 Is Required for C5a-Mediated Human Mast Cell Adhesion, Migration, and Proinflammatory Mediator Production*. J Immunol, 2015. **195**(6): p. 2774-87.
125. McHale, C., et al., *Interleukin-6 potentiates FcepsilonRI-induced PGD2 biosynthesis and induces VEGF from human in situ-matured skin mast cells*. Biochim Biophys Acta, 2018. **1862**(5): p. 1069-1078.
126. Kuehn, H.S., M. Radinger, and A.M. Gilfillan, *Measuring mast cell mediator release*. Curr Protoc Immunol, 2010. **Chapter 7**: p. Unit7 38.

127. Doi, K., et al., *Induction of haem oxygenase-1 nitric oxide and ischaemia in experimental solid tumours and implications for tumour growth*. Br J Cancer, 1999. **80**(12): p. 1945-54.
128. Mayerhofer, M., et al., *Identification of heme oxygenase-1 as a novel BCR/ABL-dependent survival factor in chronic myeloid leukemia*. Cancer Res, 2004. **64**(9): p. 3148-54.
129. Valent, P., et al., *Diagnosis and treatment of systemic mastocytosis: state of the art*. Br J Haematol, 2003. **122**(5): p. 695-717.
130. Akin, C. and D.D. Metcalfe, *Systemic mastocytosis*. Annu Rev Med, 2004. **55**: p. 419-32.
131. Luciw, P.A., et al., *Persistent infection of rhesus macaques with T-cell-line-tropic and macrophage-tropic clones of simian/human immunodeficiency viruses (SHIV)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(16): p. 7490-4.
132. Park, F. and M.A. Kay, *Modified HIV-1 based lentiviral vectors have an effect on viral transduction efficiency and gene expression in vitro and in vivo*. Mol Ther, 2001. **4**(3): p. 164-73.
133. Southern, J.A., et al., *Identification of an epitope on the P and V proteins of simian virus 5 that distinguishes between two isolates with different biological characteristics*. J Gen Virol, 1991. **72** (Pt 7): p. 1551-7.

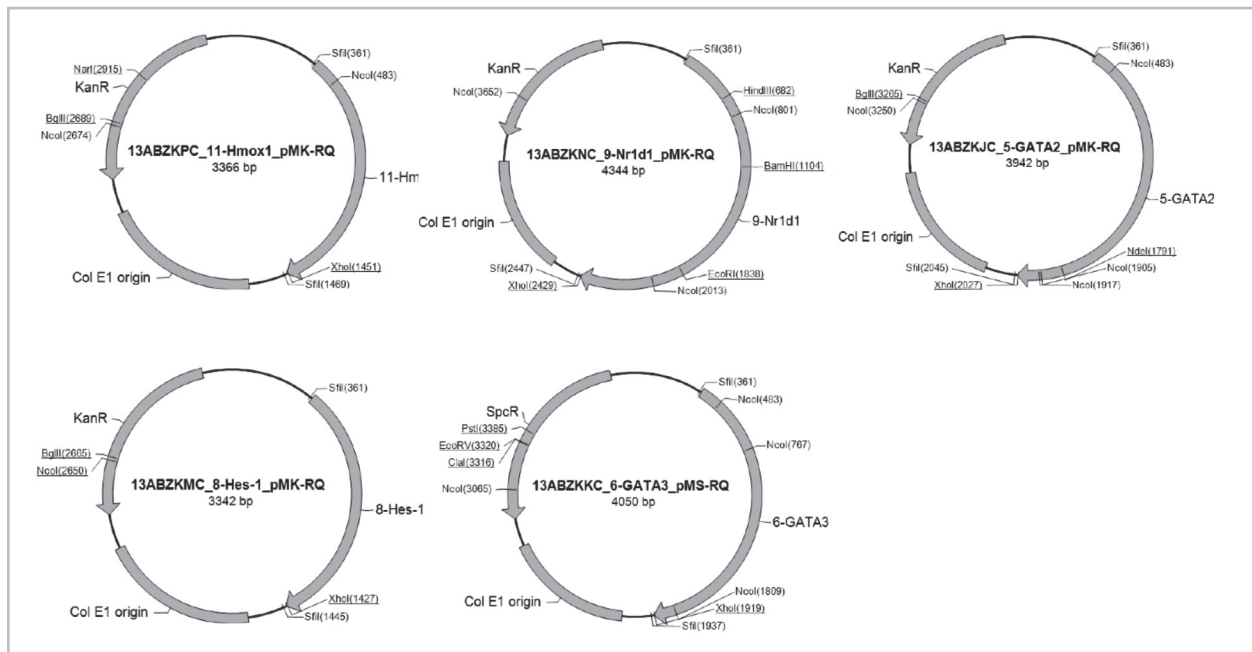
9. Publikationsliste

- 2018 Krauel K., **Preuße P.**, Warkentin T.E. Trabhardt C., Brandt S., Jensch I., Mandelkow M., Hammer E., Hammerschmidt S., Greinacher A. Fibronectin modulates formation of PF4/heparin complexes and is a potential factor for reducing risk of developing HIT.
submitted to Blood
- Suender, C. A., Leist, M., Abrink, M., **Valentin, P.**, Geldmacher, A., Steinhoff, M., Maurer, M. Mast cells are critical for the limitation of thrombin-induced skin inflammation.
Exp. Dermatol., 2018 Jan; 27(1): 50-57.
- 2017 Schmetzer, O., Lakin, E., Topal, F. A., **Preusse, P.**, Freier, D., Church, M. K., & Maurer, M. IL-24 is a common and specific autoantigen of IgE in patients with chronic spontaneous urticaria.
J. Allergy Clin. Immunol. 2017 Dec; S0091-6749 (17) 31875-4.
- 2016 Schmetzer, O., **Valentin, P.**, Church, M. K., Maurer, M., & Siebenhaar, F. Murine and human mast cell progenitors.
Eur. J. Pharmacol. 2016 May; 778:2-10.
- 2014 Schmetzer, O., **Valentin, P.**, Smorodchenko, A., Domenis, R., Gri, G., Siebenhaar, F., Maurer, M. A novel method to generate and culture human mast cells: Peripheral CD34+ stem cell-derived mast cells (PSCMCs).
J. Immunol. Methods; 2014 Nov; 413:62-8.

10. Anhang

1. Plasmidkarten der 17 synthetisch hergestellten Eingangsvektoren für die TF (ThermoFischer Scientific)





2. Auflistung der auf dem pLenti enthaltenen Gene und Sequenzen (Modifiziert nach Invitrogen, 2010)

Gene und Sequenzen	Nutzen
RSV Promoter	Ermöglicht eine <i>tat</i> -unabhängige Produktion der viralen mRNS [72].
HIV-1 5' LTR	Initiiert die reverse Transkription der viralen mRNS und die Verpackung der viralen Partikel [131].
5' Spleißdonor und 3'-Spleißakzeptor	Erhöht die Biosicherheit des Vektors, da die Expression des Zielgens in den transduzierten Zellen durch das Entfernen der Verpackungssequenz Ψ und RRE (<i>rev response element</i>) Rev-unabhängig stattfindet.
HIV-1 psi (Ψ) Verpackungssignal	Verpackung der viralen Partikel [89].
HIV-1 RRE	Ermöglicht den Rev-abhängigen Export ungesplicerter viraler mRNS aus dem Kern [90].
Polypurin Teil des HIV (cPPT)	Erhöht den viralen Titer [132].
attR4 und attLR2	Vom Bakteriophagen λ adaptiertes System, welches das Klonieren und die Rekombination von Gateway Eingangsvektoren erlaubt [92].
Chloramphenicol Resistenzgen	Ermöglicht die Gegenselektion des Plasmids.
<i>ccdB</i> Gen	Die Negativselektion von <i>E. coli</i> wird ermöglicht.
V5 Epitope	Durch anti-V5 Antikörper wird das Erkennen des rekombinanten Fusionsproteins möglich [133].

Woodchuck Posttranskriptionselement (WPRE)	Erhöht die Expression des Transgens [75].
mPGK Promoter	Garantiert die Expression der Selektionsmarker in vielen Säugetierzellen.
EM7 Promoter	Prokaryotischer Promoter für die Expression der Selektionsmarker in <i>E. coli</i> .
Blasticidin (<i>bsd</i>) Resistenzgen	Hierüber erfolgt die Selektion der stabil transduzierten Säugetierzellen [88].
Δ U3/HIV-1 3' LTR	Für die Biosicherheit erfolgt die Verpackung der viralen Partikel mit Selbstinaktivierung des 5' LTR [72].
SV40 Polyadenylierungssignal	Ermöglicht das Beenden der Transkription.
<i>Bla</i> Promoter	Das Ampicillin Resistenzgen wird exprimiert.
Ampicillin Resistenzgen	Erlaubt die Selektion in <i>E. coli</i> .
pUC- Replikationsursprung	Ermöglicht die Vervielfältigung in hoher Anzahl und Aufrechterhaltung in <i>E. coli</i> .

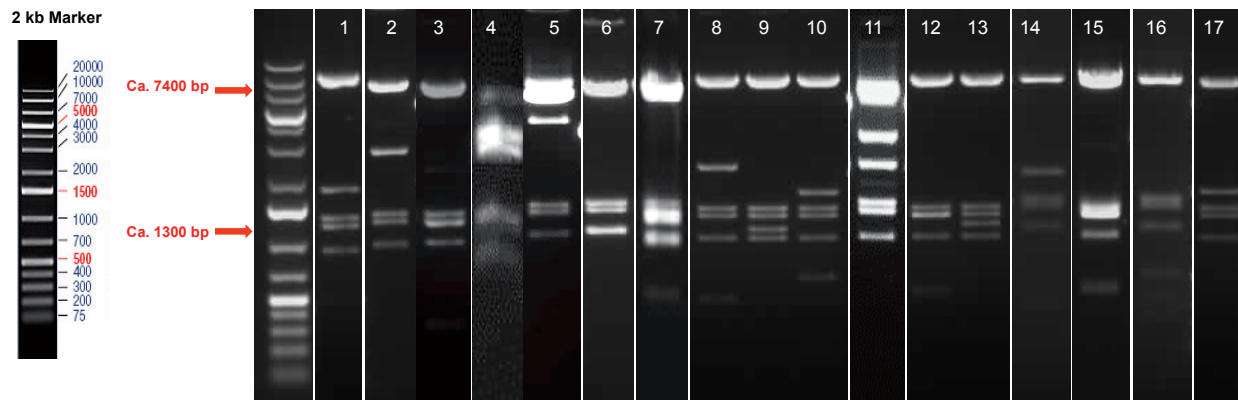
3. Auswahl der im pVenus enthaltenen Gene und Sequenzen

(Modifiziert nach RIKEN)

Gene und Sequenzen	Nutzen
CAG	Promotor bestehend aus dem CMV Enhancerelement, dem ersten nicht translatierten Exon und dem 5' Teil des ersten Introns des beta-Aktin Gens von Hühnern und dem 5' Teil des zweiten Introns und dem 5' Teil des dritten Introns des beta-Globulin Gens von Kaninchen
RfA (reading frame cassette A)	Leserahmen für die Gateway Rekombination, welcher die Chloramphenicol Resistenz (Cm), das <i>ccdb</i> Gen und die attR1 und attR2 Schnittstellen enthält.
IRES2 (Encephalomyocarditis virus interNSI ribosomal entry site) und Venus (variant of yellow fluorescent protein (YFP)) gene	Der IRES2 Sequenz folgt die YFP kodierende Sequenz. Somit wird das Zielgen und YFP separat exprimiert, so dass eine gegenseitige Beeinflussung ausgeschlossen ist.
Ampicillin Resistenzgen	Erlaubt die Selektion in <i>E. coli</i> .
del U3	Deletion der Sequenzen für Enhancer und Promotor in der U3 Region

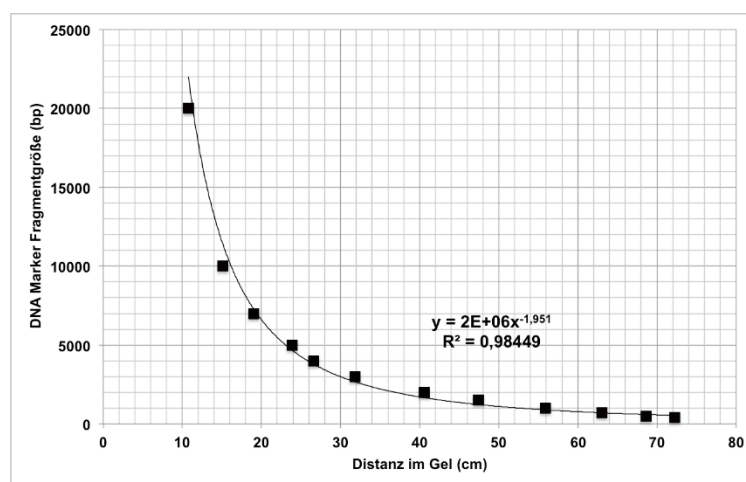
4. Kontrollverdau pVenus-TF

Eingangsvektoren für alle pVenus-TF. Die zu erwartenden Banden sind unter 6. aufgelistet. Der Kontrollverdau erfolgte mit jeweils 1 ng DNS und den Restriktionsenzymen *XhoI* und *ApaI* und die Auftrennung mit einem 1%igen Agarosegel für 1,5 h bei 60 V.



5. Abbildung der errechneten Standardkurve für pVenus-TF

Die Kurve errechnet sich aus der Fragmentgröße des DNS Markers (in bp) und der Distanz im Gel (in cm). Die Gleichung aus der potentiellen Trendkurve wurde genutzt um die Fragmentgrößen der pVenus-TF zu berechnen. Das Bestimmtheitsmaß R^2 liegt bei 0,9 und ist somit geeignet die abhängige Variable y vorherzusagen.



6. Darstellung der Größe (bp) der pVenus-TF und die errechneten Banden (bp) nach dem Kontrollverdau mit den Enzymen *XhoI* und *ApaI*.

Transkriptionsfaktor	Banden nach Testverdau mit <i>XhoI</i> und <i>ApaI</i>	Gesamtgröße (bp)
1 MITF	7112, 1700, 1216, 969,849	11846
2 STAT5b	7112,2129,1053,961,849	12104
3 GATA-1	7112, 1790, 1589, 922, 849	12262
4 GATA2PU1HES1BCLXL	7112, 3470, 2431, 1771, 1057, 849	16690
5 JAK2	7112, 3836, 1111, 1024, 849	13932
6 BCLXL	7112, 1179, 1032, 849	10172
7 BHLHE-40	7112, 1190, 957, 801, 849, 579	11488
8 STAT4	7112, 1752, 1075, 849, 948, 487	12223
9 PU.1	7112, 1066, 984, 858, 849	10869
10 MAZR	7112, 1260, 1066, 992, 849, 533	11812
11 MITFGATA1PU1BCLXL	7112, 2509, 1800, 1130, 1024, 849	14424
12 REPRIMO	7112, 1066, 1003, 849, 528	10558
13 HMOX1	7112, 1088, 1012, 904, 849	10966
14 NR1D1	7112, 1663, 1130, 1084, 849	11838
15 GATA-2	7112, 1066, 976, 849, 533	11241
16 HES-1	7112, 1195, 1066, 849, 591	10813
17 GATA-3	7112, 1300, 1066, 976, 849	11303