Optimierte Hämatopoetische Gentherapie für die Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Diseases

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

in der Medizinischen Hochschule Hannover

vorgelegt von

Jan Niklas Schiller

aus Hannover

Hannover 2018

Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule Hannover am 01.07.2021

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover.

Präsident:	Prof. Dr. med. Michael P. Manns
Betreuer der Arbeit:	Prof. Dr. rer. nat. Nico Lachmann
Co-Betreuer:	Prof. Dr. med. Ulrich Baumann
1. Referent:	Prof. Dr. med. Tobias Cantz
2. Referentin:	PD Dr. med. Anna-Maria Dittrich
Tag der mündlichen Prüfung:	01.07.2021

Prüfungsausschuss:

Vorsitz:	Prof. Dr. med. Torsten Witte
1. Prüfer:	Prof. Dr. med. Bernhard Schmidt
2. Prüferin:	Prof.‘in Dr. med. Bettina Wedi

Dieses Projekt wurde vom Deutschen Zentrum für Infektionsforschung gefördert.

Angefertigt im Rahmen der strukturierten Doktorandenausbildung „Strucmed“

Die Versuche wurden im REBIRTH Cluster of Excellence in der JRG Translational Hematology of Congenital Diseases durchgeführt

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis V

Abkürzungen VIII

1 Einleitung 1

1.1 Hämatopoese 1

1.1.1 Frühe Hämatopoese 1

1.1.2 Adulte Hämatopoese 2

1.1.3 Makrophagen 3

1.2 Gentherapie 4

1.2.1 Klinische hämatopoetische Gentherapie 5

1.2.2 Hämatopoetische Gentherapie bei primären Immundefekten 6

1.2.3 Optimierung der Gentherapie 7

1.3 Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Diseases – MSMD 8

1.3.1 Ätiologie 9

1.3.2 Krankheitsbild 10

1.3.3 Aktuelle Therapie 11

2 Ziel der Arbeit 13

3 Material und Versuchsdurchführung 14

3.1 Zellkultur – Zelllinien 14

3.2 Isolation muriner hämatopoetischer Stammzellen aus dem Knochenmark 14

3.3 Zellkultur – murine hämatopoetische Stammzellen (mHSZ) 15

3.4 Vektoren 16

3.5 Restriktionsverdau 17

3.6 Durchflusszytometrie 17

3.6.1 Zellsortierung – Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) 17

3.6.2 Antikörper-Färbung 18

3.7 Lentivirale Partikel 18

3.7.1 Produktion lentiviraler Partikel 18

3.7.2 Virustiterbestimmung 19

3.8 Transduktion 19

3.8.1 Zelllinie 19

3.8.2 Murine Hämatopoetische Stammzellen 20

3.9 Evaluation der Teilungsrate 20

3.10 Evaluation der Zellviabilität 20

3.11 Evaluation der STAT5 Phosphorylierung nach Stimulation 20

3.12 Evaluation BCG-Elimination nach *in vitro* Infektion 21

3.13 Western Blot 21

3.14 Mikroskopische Aufnahmen 23

3.15 Cytospins 23

3.16 Statistische Auswertung 24

4 Ergebnisse 25

4.1 Virale Vektoren 25

4.2 Virusproduktion 28

4.3 Evaluation der Vektoren 29

4.3.1 Evaluation der Vektoren in der RAW264.7-Zelllinie 29

4.3.2 Evaluation der Vektoren in Knochenmark-abgeleiteten Makrophagen 31

4.4 Evaluation der Vektorensicherheit 35

4.4.1 Evaluation der Vektorensicherheit in der RAW264.7-Zelllinie 35

4.4.2 Evaluation der Vektorensicherheit in Knochenmark-abgeleiteten Makrophagen 38

4.5 Evaluation der zellulären Immunantwort nach IFNγ-Stimulation transduzierter Knochenmark-abgeleiteten Makrophagen 46

4.5.1 Evaluation des intrazellulären Abbaus von Bacillus Calmette-Guérin in transduzierten Knochenmark-abgeleiteten Makrophagen 46

5 Diskussion 49

6 Zusammenfassung 59

Referenzen 59

Appendix 69

Virusproduktion 69

Lebend-Gate 69

GFP-Gate 70

Rohdaten der Evaluation der Teilungsrate transduzierter Zellen 70

Rohdaten der Evaluation der Zellviabilität transduzierter Zellen 71

Vollständige Gele der Restriktionsverdaue 72

Vollständige Aufnahmen der Western Blots 73

Vollständige Sequenz der cDNA des verwendeten Interferon-γ-Rezeptor-1 Gens 74

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis 75

Abbildungsverzeichnis 75

Tabellenverzeichnis 76

Publikationsbeiträge 77

Curriculum Vitae 78

Erklärung 79

Danksagung 80

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADA	Adenosin-Desaminase
AGM	Aorten-Gonaden-Mesonephros Region
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
Bp	Basenpaar/e
BSA	Rinderartiges Serum Albumin (Bovine Serum Albumin)
bzw.	Beziehungsweise
CAR	Chimärer Antigenrezeptor
CD	Unterscheidungsgruppen (Cluster of Differentiation)
CFU	Kolonie-formende Einheiten (Colony Forming Units)
CFU-E	Erythrozytäre Kolonie-formende Einheiten (Erythroid Colony-Forming Units)
CLP	Gemeinsamer Lymphoider Vorläufer (Common Lymphoid Precursor)
CMP	Gemeinsamer Myeloider Vorläufer (Common Myeloid Precursor)
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat
CT	Computertomographie
FACS	Durchflusszytometrie-Sortierer (Fluorescence-Activated Cell Sorting)
Gen.	Generation
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein (Green Fluorescent Protein)
GFP^+	Grün-fluoreszierendes Protein exprimierend (Green Fluorescent Protein positive)
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (Granulozytes-Macrophages Colony Stimulating Factor)
h	Stunde(n) (Hour(s))
HBSS	Hanks ausgeglichene Salzlösung (Hank's Balanced Salt Solution)
HEK	Humane Embryonale Nierenzellen (Human Embryonic Kidney Cells)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
hFGF-1	Humaner Fibroblasten Wachstumsfaktor 1 (Human Fibroblast Growth Factor-1)
hIGF-2	Humaner Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor 2 (Human Insulin-like Growth Factor-2)
HLA	Humanes Leukozyten Antigen (Human Leucocyte Antigen)
HR	Homologe Reparatur
HRP	Meerrettich-Peroxidase (Horseradish Peroxidase)
HSZ	Hämatopoetische Stammzelle
HSV	Herpes Simplex Virus
IFN	Interferon
IFNα	Interferon α
IFNγ	Interferon γ
IFNγR1	Interferon-γ-Rezeptor 1
Ifnγr1	Interferon-γ-Rezeptor 1 Gen [murin]
IFNGR1	Interferon-γ-Rezeptor 1 Gen [human]
iNOS	Induzierbare Stickstoff Synthase
iPSZ	Induzierte pluripotente Stammzelle(n)
kBp	Kilo Basenpaare
kDa	Kilo Dalton
KI	Konfidenzintervall
KM	Knochenmark
LPS	Lipopolysaccharide
LT-HSZ	Langzeit-repopulierende HSZ (Long-Term Repopulating HSZ)
LTR	Lange Terminale Wiederholung (Long Terminal Repeat)
M.	Mykobakterium
MAC	Mycobacterium avium intracellulare
MFI	Mittlere Fluoreszierende Intensität (Mean Fluorescence Intensity)
mHSZ	Murine Hämatopoetische Stammzelle
min	Minute
mM-CSF	Muriner Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (Murine Macrophage-Colony Stimulating Factor)
ml	Milliliter
MLV	Muriner Leukämie Virus (Murine Leukemia Virus)
MΦ	Makrophage(n)
MOI	Multiplizität der Infektion (Multiplicity of Infection)
MPP	Multipotente Vorläuferzelle (Multipotent Progenitor Cell)

mSCF	Muriner Stammzellen Faktor (Muriner Stemcell Factor)
MSMD	Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Diseases
MSP	Myeloid Spezifischer Promoter
mTPO	Murines Thrombopoietin (Murine Thrombopoietin)
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
ng	Nanogramm
NHEJ	Non-Homologous End-Joining
PAM	Vorabstandshalter-angrenzendes Motiv (Protospacer adjacent motif)
PAP	Alveolarproteinose (Pulmonary Alveolar Proteinosis)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (Phosphate Buffered Saline)
p.c.	*Post conceptionem*
p.i.	*Post infectionem*
PFA	Paraformaldehyd
pH	Negativer Dekadischer Logarithmus des Wasserstoff-Ionen Anteils einer Lösung
PI	Propidiumiodid
pSTAT1	Phosphorylierter Signal Transducer and Activator of Transcription 1
pSTAT5	Phosphorylierter Signal Transducer and Activator of Transcription 5
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RCL	Rote Blutkörperchen Lyse (Red Cell Lysis)
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic Acid)
RT	Raumtemperatur
SCID	Schwere kombinierte Immundefizienz (Severe Combined Immune-Deficiency)
SA	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacryamidgelelektrophorese
SFFV	Spleen-Focus-Forming Virus
sgRNA	Single Guide RNA
SIN	Selbst-Inaktivierend (Self-Inactivating)
ST-HSZ	Kurzzeit-repopulierende HSZ (Short-Term Repopulating HSZ)
STAT1	Signal Transducer and Activator of Transcription 1
STAT5	Signal Transducer and Activator of Transcription 5
Tab.	Tabelle
TALE	Transkriptionsaktivatorartiger Effektor (Transcription Activator-like Effector)
TALEN	Transkriptionsaktivatorartige Effektornuklease (Transcription Activator-like Effector Nuclease)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
V.a.	Verdacht auf
WAS	Wiscott-Aldrich Syndrom
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)
X-CGD	X-chromosomal vererbte septische Granulomatose (X-linked Chronic Granulomatous Disease)

1 Einleitung

1.1 Hämatopoese

1.1.1 Frühe Hämatopoese

Bereits 400 Jahre vor Christus waren sich die Ärzte der lebenswichtigen Eigenschaften des Blutes bewusst: *"[...] and so they think that blood composes the soul of the man*."[1] Die Entschlüsselung der Entstehung der eben erwähnten „Seele des Menschen" begann allerdings erst im zweiten Drittel des 19. Jahrhunderts. Ernst Neumann formulierte als erster die Hypothese, dass die Blutproduktion im Knochenmark und aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle aller hämatopoetischen Zelltypen stattfindet(1). Heutzutage, gut 150 Jahre später, gilt Neumanns Hypothese als generell anerkannt, aber viele Aspekte der Hämatopoese sind noch immer unentschlüsselt. Die lebenslange Produktion des Blutes wird durch die Fähigkeiten der hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) zur Selbsterhaltung und Differenzierung in alle im Blut vorkommenden Zellen ermöglicht(2). Die ersten murinen hämatopoetischen Stammzellen entstehen im Dottersack 7-7,5 Tage *post conceptionem* (*p.c.*)(3), hier lassen sich auch die ersten hämatopoetisch-differenzierten Zellen nachweisen(4). Ebenso finden sich 10,5 Tage *p.c.* intra-embryonal erste HSZ in der Aorten-, Gonaden- und Mesonephrosregion (AGM)(5). Die sich entwickelnden hämatopoetischen Organe werden dann im Laufe ihrer Entwicklung von HSZ kolonisiert(6–9) und erlangen so ihre Fähigkeit zur Hämatopoese (siehe **Abb. 1**). Es ist noch nicht endgültig geklärt, ob die hämatopoetischen Organe kolonierenden HSZ dem Dottersack oder der Aortenregion entspringen(10,11). In der menschlichen Entstehung finden sich erste HSZ im Dottersack frühestens 27 Tage nach der Befruchtung der Eizelle. Das Vorkommen von Makrophagen- und Granulozyten-Vorläuferzellen korreliert im Dottersack allerdings negativ mit dem Gestationsalter(12), anders als die erythroiden Vorläuferzellen (CFU-E), welche sich konstant in annähernd gleichen Zellzahlen im Dottersack nachweisen lassen(13). Im humanen Embryo lassen sich erste $CD34^+$-Zellen (Oberflächenmarker zur Identifikation von HSZ) ebenfalls 27 Tage nach der Konzeption im periumbilicalen Bereich der Aorta nachweisen(5,14). Diese Zellen sind in hohem Maße teilungsaktiv und besitzen die Fähigkeit, in alle Zelltypen der myeloiden oder lymphatischen Reihe zu differenzieren(15). Aufgrund dieser aktuellen Datenlage wird daher diskutiert, ob HSZ der AGM-Region später die hämatopoetischen Organe besiedeln und HSZ des Dottersacks nur für die frühe embryonale Hämatopoese verantwortlich sind.

[1] Aus: "Nature of man" von Hippokrates, zu finden in: „Hippocrates" von Hippocrates; Heraclitus, of Ephesus; Jones, W. H. S. (William Henry Samuel), 1876-1963; Potter, Paul, 1944-; Withington, E. T. (Edward Theodore); Smith, Wesley D., 1930-; publiziert 1923

Sicher ist, dass unreife HSZ in die fetale Leber wandern, dort maturieren und die Leber so, bis zum Beginn der adulten Blutproduktion im Knochenmark, die Hämatopoese für den sich entwickelnden Organismus übernimmt(16).

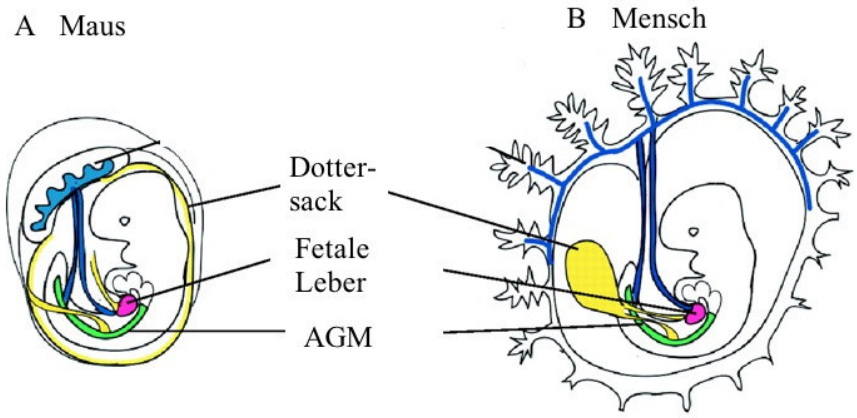


Abb. 1 **Hämatopoetische Organe in der Embryonalentwicklung**
Die Abbildung zeigt die hämatopoetischen Organe im murinen und humanen Embryo im Gestationsalter von 11 Tagen bzw. 5 Wochen.
Modifiziert von (17) (**Copyright** vorhanden)

1.1.2 Adulte Hämatopoese

Die adulte Hämatopoese beginnt mit der Geburt und findet physiologisch im Knochenmark statt, in Ausnahmefällen können aber auch die Leber, Milz oder der Thymus Orte der Blutentstehung sein(18). Unter den hämatopoetischen Zellen besteht eine strikte Hierarchie und so lassen sich verschiedene Differenzierungsstufen der Blutzellen im Knochenmark finden (siehe **Abb. 2**). Die Basis des Blutstammbaums wird von den Langzeit-repopulierenden HSZ (LT-HSZ) gebildet. Die oben bereits erwähnten Eigenschaften der HSZ in Kombination mit einer quasi-unendlichen Reproduktionsfähigkeit ermöglichen die lebenslange Hämatopoese vermittelt durch die LT-HSZ(19,20). Die Kurzzeit-repopulierenden HSZ (ST-HSZ), welche die nächste hierarchische Stufe darstellen, teilen sich häufiger als die LT-HSZ und sind Ausgangspunkt für die Entstehung der Multipotenten Progenitorzelle (MPP). Eine Progenitorzelle verliert die Stammzell-Eigenschaft der Selbstreproduktion. Somit differenzieren alle Tochterzellen und die Zelle selbst. Die MPP wiederrum ist Vorläuferzelle der Gemeinsamen Myeloiden und Gemeinsamen Lymphatischen Progenitorzelle (CMP und CLP)(21).

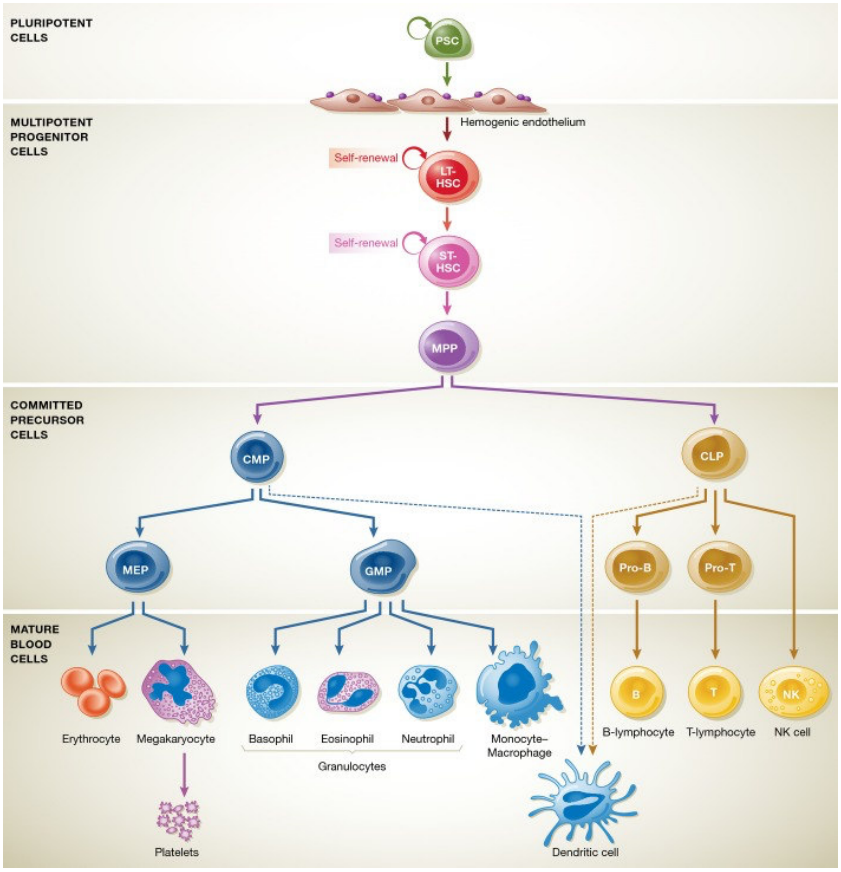


Abb. 2 Adulte Hämatopoese
Schematische Darstellung der Hämatopoese im adulten humanen Organismus und der Entstehung der LT-HSZ's aus pluripotenten embryonalen Stammzellen (grün). Die lymphatische Reihe ist in gelb und die myeloide Reihe in blau abgebildet. Die hierarchische Ordnung des blutbildenden Systems ist sehr gut zu erkennen, ebenso wie die Vielfalt der differenzierten Blutzellen. Die gesamte hämatopoetische Differenzierung findet im Knochenmark statt. Am Ende der Differenzierung wandern die Zellen aus dem Knochenmark in das Blut aus, um dort oder in den primären lymphatischen Organen vollständig zu maturieren.
Modifiziert von (22) (**Copyright** vorhanden)

Alle Zellen der lymphatischen Reihe und einige Zellen der myeloiden Reihe werden als Leukozyten zusammengefasst. Zur Gruppe der Leukozyten zählen die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), B- und T-Lymphozyten (lymphatische Reihe), sowie die Monozyten/Makrophagen, dendritischen Zellen, Mastzellen und neutrophilen, basophilen und eosinophilen Granulozyten (myeloide Reihe).
Die Aufgabe der Leukozyten besteht vor allem darin pathogene Organismen und unverträgliche Stoffe unschädlich zu machen und zu beseitigen. Die Zellen der myeloiden Reihe, welche nicht zu den Leukozyten gezählt werden, sind die Erythrozyten und die Thrombozyten. Erythrozyten übernehmen vor allem Transportfunktionen, wie z.B. die Versorgung aller Zellen mit Sauerstoff und den Abtransport des entstehenden Kohlenstoffdioxids. Thrombozyten sind unter anderem für die primäre Hämostase verantwortlich und spielen so eine wichtige Rolle bei Gefäßverletzungen.

1.1.3 Makrophagen

Makrophagen sind Teil des angeborenen Immunsystems und zählen zu den Leukozyten. Sie entstehen aus Monozyten, welche nach Verlassen des Knochenmarks im Blut zirkulieren. Kommt unser Gewebe in Kontakt mit einem Pathogen oder Fremdstoff, sendet es verschiedene Signale wie z.B. Zytokine aus, damit die Monozyten aus dem Blut in das betroffene Gewebe einwandern. Die vorhandenen Chemokine und Pathogene induzieren dann die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen(23,24).

Des Weiteren werden Gewebsmakrophagen in vielen unserer Organe und in verschiedenen Gewebetypen unabhängig von exogenen Faktoren vorgefunden. Die Entstehung neuer Gewebsmakrophagen geschieht durch reproduktionsfähige Vorläuferzellen, die sich im jeweiligen Organ/Gewebe aufhalten. Sie entstammen aus dem fetalen Dottersack und der fetalen Leber(23,25,26). Einige der Gewebsmakrophagen werden nach ihrem Aufenthaltsort benannt: Alveolarmakrophagen (Lunge), Osteoklasten (Knochen), Histiozyten (Bindegewebe), Chondroklasten (Knorpelgewebe) oder auch Kupffer-Sternzellen (Leber).

Weiterhin werden Makrophagen nach ihrer möglichen Aktivität und dementsprechend vorhandenem Antigen- und Zytokin-Expressionsmuster in M1- und M2- Makrophagen unterteilt(23).

Makrophagen übernehmen zahlreiche Funktionen im gesamten Körper, wie z.B. die Regulation der Homöostase, vaskular-modulierende Aufgaben, den Strukturerhalt des Knochens, das Eisenrecycling in der Leber und die Inflammationsregulation. Allem voran spielen Makrophagen eine große Rolle in der physiologischen Immunantwort auf Pathogene(27–33). Die Phagozytose von Pathogenen und körperfremden Stoffen ist eine der Hauptaufgaben der Makrophagen in der primären Immunantwort. Mit der Phagozytose beginnt die Expression und Ausschüttung verschiedener Botenstoffe, unter anderem von IL-12, welches wiederum die Expression und Ausschüttung von Interferon γ (IFNγ) aus T-Zellen induziert(34,35). Die Stimulation von Makrophagen mit IFNγ aktiviert über den *Signal Transducer and Activator of Transcription 1* (STAT1) verschiedene antimikrobielle Mechanismen. Dazu zählen unter anderem die Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen und reaktiven Stickstoffradikalen, sowie eine gesteigerte Phagozytose-Aktivität und Antigenpräsentation(36,37). Diese Vorgänge und Signalwege sind für die physiologische Aktivität der Makrophagen unentbehrlich.

1.2 Gentherapie

Da die Entstehung jeder Blutzelle mit der Mitose einer hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark beginnt, stellt die Anwendung der Gentherapie im blutbildenden System einen erfolgsversprechenden Ansatz dar.

Die Gentherapie wird mit folgenden Worten von der deutschen Gesellschaft für Gentherapie e.V. zusammengefasst: Gentherapie bezeichnet den Versuch der „Einschleusung (Gentransfer) von Nukleinsäuren (DNS, RNS) in Zellen des menschlichen Körpers […] [um] erworbene oder vererbte Erkrankungen zu behandeln.“[2] Weltweit gab es bereits über 2400 klinische Studien zur Gentherapie im Menschen[3], in Deutschland bereits 92[4]. Die Behandlung kann sowohl *ex vivo*, wie auch *in vivo* (außerhalb

[2] www.dg-gt.de, 20.06.2017, 16:53

[3] http://www.abedia.com/wiley/phases.php, 20.06.2017, 17:34

[4] http://www.abedia.com/wiley/countries.php, 21.06.2017 10:25

bzw. innerhalb des Körpers) und prinzipiell in jeder Körperzelle durchgeführt werden. Verschiedene Methoden werden für den Gentransfer genutzt: die Transduktion (dauerhafte Einbringung der genetischen Information in das Genom mittels eines viralen Konstrukts) oder die Transfektion (chemische oder physikalische Methoden werden zur transienten Einbringung der genetischen Information in die Zelle genutzt). Die Transduktion ist die mit Abstand am häufigsten genutzte Methode zur genetischen Korrektur kranker Zellen[5]. In Deutschland kommt die Gentherapie zurzeit als *ultima ratio* bei schwerkranken Patienten zum Einsatz. Anwendungsgebiete fanden sich anfangs im Bereich der genetischen, vor allem der monogenetischen, Erkrankungen(38), heutzutage umfasst die Gentherapie aber z.B. auch infektiöse(39), neurodegenerative(40) oder Krebserkrankungen(41,42).

1.2.1 Klinische hämatopoetische Gentherapie

Im Jahr 2013 überstieg die Anzahl Knochenmark (KM)-transplantierter Patienten eine Million(43). Eine KM-Transplantation stellt für einige Erkrankungen des blutbildenden Systems die einzige kurative Behandlungsmöglichkeit dar. Allerdings ist eine erfolgreiche allogene Transplantation (Transplantation HSZ eines fremden Spenders) nur mit dem passenden Spender möglich. Die Suche nach einem passenden Spender verläuft teilweise erfolglos, da es mehrere Millionen Möglichkeiten der Kombination der humanen Leukozyten Antigene (HLA)[6], welche als Zelloberflächenmoleküle ausschlaggebend für die Kompatibilität mit dem Spender sind, gibt. Seit ca. 30 Jahren ist neben der allogenen auch eine autologe KM-Transplantation (Entnahme patienteneigener HSZ mit anschließender Rück-Transplantation dieser) möglich, mit welcher unter anderem hämatologische maligne Erkrankungen therapiert werden können(44). Grundlage der hämatopoetischen Gentherapie ist die autologe Stammzelltransplantation. Extrahierte HSZ des Patienten können unter Laborbedingungen transduziert und so genetisch korrigiert werden. Die korrigierten Zellen können dann dem Patienten transplantiert werden und bei vorrangegangener Myeloablation das KM repopulieren oder ohne vorrangegangene Myeloablation durch ihren Wachstumsvorteil die genetisch defekten Zellen ersetzen (45,46). Am 27. Mai 2016 wurde Strimvelis™ auf dem europäischen Markt zugelassen[7] und ist somit eine der ersten klinisch-anwendbaren

[5] http://www.abedia.com/wiley/vectors.php, 21.06.2017 10:30

[6] https://www.zkrd.de/de/fragen_und_antworten/fragen_und_antworten.php, 21.06.2017 16:42

[7] http://us.gsk.com/en-us/media/press-releases/2016/strimvelistm-receives-european-marketing-authorisation-to-treat-very-rare-disease-ada-scid/, 22.06.2017, 17:12

Gentherapien. Strimvelis™ behandelt die dritthäufigste Form des Immundefekts SCID (schwere kombinierte Immunschwäche)(47), namentlich ADA-SCID (Adenosin-Desaminase-SCID), und zeigte in einer vorrangegangenen Studie eine Heilungsrate von 100%[8].

1.2.2 Hämatopoetische Gentherapie bei primären Immundefekten

Primäre Immundefekte sind schwerwiegende, meist monogenetische, Erkrankungen, welche sowohl das angeborene oder das adaptive Immunsystem als auch beide Systeme betreffen können. Aufgrund ihrer Pathogenese stellt die Gentherapie einen vielversprechenden Therapieansatz für primäre Immundefekte dar(46).

Das Wiskott-Aldrich Syndrom (WAS) ist ein X-chromosomal vererbter Defekt des WAS-Gens und ist durch Dysfunktion myeloider und lymphoider Zellen sowie eine schwere Mikrothrombozytopenie geprägt. Im Rahmen einer Studie zum WAS wurden sieben Probanden mittels einer Myeloablation und anschließender, drei Tage später folgenden, Infusion von autologen HSZ, welche durch lentivirale Konstrukte genetisch korrigiert wurden, therapiert. Der klinische Status von sechs Probanden verbesserte sich merklich. Die regelmäßige Infusion von Blutprodukten oder rekombinierten Thrombozytenproduktionsstimulatoren konnte bei allen sechs Patienten eingestellt werden und der Median hospitalisierter Tage wurde von 25 Tagen im Zeitraum von zwei Jahren vor der Therapie auf 0 Tage in den 2 Jahren nach der Therapie reduziert. Der siebte Teilnehmer verstarb sieben Monate nach der Behandlung an einer bereits vor der Therapie erworbenen Herpes Simplex Virus (HSV) Infektion. Da alle Patienten trotz Therapie weiterhin an Thrombozytopenie litten, ist eine vollständige Korrektur des Phänotyps zurzeit nur mit einer erfolgreichen allogenen Stammzelltransplantation möglich. Die Autoren vermuten daher, dass der Erfolg der Therapie mit steigender Zahl dauerhaft einwachsender HSZ zunimmt(48).

Eine andere Form der schweren kombinierten Immunschwäche (SCID) ist die X-chromosomal vererbte SCID (X-SCID). Die Unterteilung der X-SCID basiert auf dem Vorkommen oder Fehlen der verschiedenen Lymphozyten ($NK^{+/-}$; $B^{+/-}$; $T^{+/-}$). In den meisten Patienten kommt es früh zu schweren Infektionen und eine HSZ-Transplantation ist die einzige kurative Therapie(49). Im experimentellen Ansatz wurden neun Patienten mit X-SCID gentherapeutisch behandelt. Autologe $CD34^{+}$-Zellen wurden mittels retroviraler Konstrukte genetisch korrigiert und ohne Vorbehandlung per Infusion in den Patienten zurückgeführt. Vier der neun Kinder entwickelten eine T-Zellen akute lymphoblastische Leukämie, da es zur Integration der retroviralen Konstrukte in regulierende Bereiche des Genoms, z.B. Protoonkogene,

[8] http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=/pages/medicines/human/medicines/003854/human_med_001985.jsp&mid=WC0b01ac058001d124, 22.06.2017, 17:43

kam. In drei Fällen konnte die T-Zellen akute lymphoblastische Leukämie erfolgreich behandelt werden. Nach Studienangaben wuchsen alle behandelten Kinder in normaler Umgebung auf und es kam im weiteren Verlauf zu keinen schwerwiegenden Infektionen. Der X-SCID Phänotyp konnte durch die Gentherapie nicht vollständig korrigiert werden, da über den zehnjährigen Beobachtungszeitraum ein Defizit an NK-Zellen bestand. Dieses Defizit lässt sich auch bei der Therapie mittels einer HSZ Transplantation ohne vorrangegangene Myeloablation beobachten(50).

In den oben erwähnten und weiteren Studien(46,51) zur gentherapeutischen Behandlung von primären Immundefekten wird gezeigt, dass die Gentherapie eine vielversprechende Alternative für Patienten mit einem genetischen Defekt darstellt. Allerdings ist die Behandlung momentan noch mit vielen Risiken verbunden (z.B. die Entstehung hämatopoetischer maligner Erkrankungen durch die insertionelle Mutagenese), sodass die stetige Suche nach Verbesserungen zur sicheren Therapie von großer Bedeutung ist.

1.2.3 Optimierung der Gentherapie

Zwei Aspekte sind für die Optimierung der Gentherapie besonders wichtig. Erstens sollte die Transduktion der Zellen effizient sein und zweitens muss die Therapie so sicher wie möglich sein, um klinische Relevanz zu erlangen. In den ersten Studien der angewandten Gentherapie, vor ca. 20 Jahren, wurden größtenteils murine Leukämie Virus (MLV)-basierte retrovirale Vektoren für den Gentransfer genutzt(52). Die Transduktion mittels MLV-Virus ist aufgrund seiner Eigenschaft, die genetische Information nur in mitotisch aktive Zellen einbringen zu können, eingeschränkt, da besonders HSZ eine geringe Teilungsrate aufweisen(53). Daher wurde neben den Retroviren ebenso Adeno-, Herpes Simplex- und Adeno-assoziierte Viren in klinischen Studien evaluiert(52,53). Überblickt man alle bisher durchgeführten klinischen gentherapeutischen Studien, zeigt sich die Nutzung von Adenoviren in über 21% der Studien und damit an oberster Stelle[5]. Nichtsdestotrotz besitzen Retroviren verschiedene Eigenschaften, welche im Zuge der Gentherapie wünschenswert sind. Dazu gehört die stabile Integration des Transgens als eine wichtige Voraussetzung für die langzeitige Expression dessen. Konträr dazu werden keine Gene des Virus selber eingebaut, dies würde eine Erkennung und Elimination der transduzierten Zelle durch körpereigene T-Zellen nach sich ziehen. Spezifisch für die Gattung der Lentiviren (gehörend zur Familie der Retroviren) findet sich außerdem die Fähigkeit der Transduktion teilungsinaktiver Zellen(54). Mit diesem Hintergrund stellen lentivirale Vektoren einen erfolgsversprechenden Ansatz für den Gentransfer dar. Durch die Etablierung der 3. Generation selbst-inaktivierender (SIN) lentiviraler Vektoren wurde die Sicherheit der Applikation weiterhin erhöht. Selbst-inaktivierend bezeichnet eine Deletion in der 3’long terminal repeat (LTR)-Region der viralen RNA mit folgender eingeschränkter Fähigkeit zur transkriptionellen Aktivität der umgeschriebenen und eingebauten DNA. Bei der Produktion von Lentiviren der dritten Generation sind die viralen Gene und das Transgen auf vier

verschiedene Plasmide aufgeteilt und die Wahrscheinlichkeit, dass ein Vektor reproduktionsfähig ist, wird so sehr gering gehalten. Mit der Anwendung dieser Mechanismen wird die Reproduktion von intakter viraler RNA unterbunden(54,55).

Sowohl die Effizienz, als auch die Sicherheit der Gentherapie können weiterhin über den genutzten Promotor, welcher die Transkription des Transgens steuert, beeinflusst werden. Bei der Verwendung von konstitutiven Promotoren, wie z.B. dem spleen-focus-forming virus (SFFV), ist die Transkription des Transgens meist über das physiologische Level gesteigert(56). Ebenso kommt es unabhängig vom Differenzierungsgrad der Zelle zur stetigen Expression des Transgens.

Neben den konstitutiven Promotoren existieren auch induzierbare oder spezifische Promotoren. Induzierbare Promotoren werden z.B. durch spezielle Antibiotika oder bei bestimmten Temperaturen aktiviert(57,58). Die Nutzung induzierbarerer Promotoren stellt einen weiteren Fortschritt hinsichtlich Effizienz und Sicherheit in der Gentherapie dar, da für die Behandlung zahlreicher Erkrankungen eine zeitweilige Expression des therapeutischen Gens ausreichend ist, aber ggf. eine erneute Expression nötig wird, wenn es zum Rezidiv kommt(59).

Zur Gruppe der spezifischen Promotoren gehören die myeloid-spezifischen Promotoren, wie z.B. der miR223 Promotor oder Myeloid Specific Promoter (MSP)(60–63). Wird ein Transgen über einen solchen myeloid-spezifischen Promotor reguliert, nimmt die Expressionsaktivität dessen, im Laufe der Differenzierung einer Zelle hin zur myeloiden Reihe, stetig zu(64). Das bedeutet auch, dass es nach der Transduktion der HSZ, nicht oder zu einer nur geringen Expression des Transgens in dieser kommt, ebenso wie in nicht-myeloid differenzierten Zellen(65). Die Nutzung myeloid-spezifischer Promotoren erwies sich bereits als weiterer Fortschritt hin zur sicheren Applikation der Gentherapie(66).

1.3 Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Diseases – MSMD

Die Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Diseases (MSMD) ist ein seltener primärer Immundefekt des hämatopoetischen Systems und prädisponiert Patienten für schwere Infektionen durch schwachvirulente Mykobakterien(67). Nach der Phagozytose verschiedener Pathogene sind Makrophagen, verursacht durch einen Defekt im IFNγ-Signalweg, nicht in der Lage die Pathogene zu eliminieren. Somit kommt es zur intramakrophagozytären Ausbreitung und damit zur Infektion durch die Pathogene(68). Bei Patienten, die von den schwersten Formen der Erkrankung betroffen sind, beträgt die Lebenserwartung nicht über 20 Jahre(69). Insgesamt gibt es weltweit bereits über 550 registrierte MSMD-Fälle unter denen 19 komplette oder partiell primäre Immundefizite des IFNγ-Signalweges zusammengefasst sind(70).

1.3.1 Ätiologie

Zurzeit sind neun(68) bzw. zehn(71) Gene beschrieben, bei denen es durch eine Mutation zur Ausprägung des MSMD-Phänotyps kommt. IL12B, IL12RB1, IFNGR1, IFNGR2, STAT1, TYK2, IRF8 und ISG15 sind acht autosomale Gene und CYBB und IKBKG (teilweise als NEMO[9] bezeichnet) sind zwei x-chromosomal vererbte Gene, welche, wenn defekt, als Auslöser der MSMD beschrieben wurden(71). Die Produkte von vier dieser Gene (IL12B, IL12RB1, ISG15, NEMO) stehen im Zusammenhang mit der Produktion von IFNγ(72). Fünf weitere Gene (IFNGR1, IFNGR2, STAT1, CYBB, TYK2) und deren Produkte sind für die physiologische Antwort der Zelle auf IFNγ-Stimulierung verantwortlich(72). Das Produkt des zehnten Gens (IRF8) ist sowohl für die Produktion von, wie auch für die zelluläre Antwort auf IFNγ verantwortlich(72). Mutationen, die dazu führen, dass die physiologische Antwort (siehe **Abb. 3**) auf IFNγ nicht korrekt stattfindet, sind für einen Großteil aller MSMD-Fälle verantwortlich. 40% sind auf Defekte des IL-12-Rezeptor zurückzuführen, und weitere 39% kommen durch einen Defekt in der Untereinheit 1 des IFNγ-Rezeptor zustande(73).

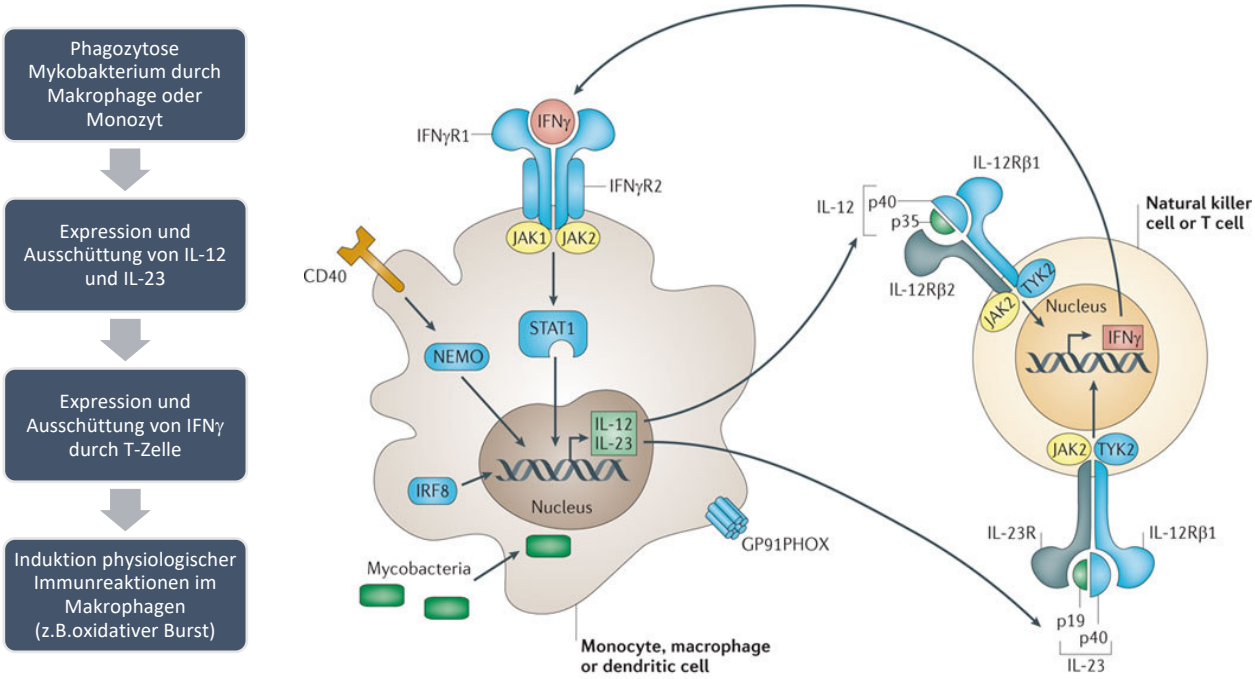


Abb. 3 **Physiologische Antwort auf Mykobakterien in Makrophagen**
Die Abbildung zeigt die gegenseitige Stimulation von Makrophage und T-Zelle nach der Phagozytose eines mykobakteriellen Erregers durch den Makrophagen. Die Zytokinstimulation der T-Zelle bewirkt die Ausschüttung von IFNγ, welches unentbehrlich für die physiologische Aktivierung und Stimulation des Makrophagen ist. Mit Ausnahme von ISG15 sind die (Protein-)Produkte aller Gene dargestellt, welche bei Mutation zur Ausprägung der MSMD führen. [GP91PHOX wird durch das CYBB-Gen kodiert]. *Modifiziert von* (74) (**Copyright** vorhanden)

[9] https://ghr.nlm.nih.gov/gene/IKBKG#synonyms, 28.06.2017 11:25 Uhr

1.3.2 Krankheitsbild

Das klinische Bild der Patienten variiert je nach dem zugrundeliegenden Genotyp. Allen gemeinsam ist aber die Anfälligkeit gegenüber normalerweise gering-virulenten Mykobakterien (freilebende Mykobakterien oder dem zur Impfung verwendeten Bacillus Calmette-Guérin(BCG)), Salmonellen, oder anderen intrazellulären Bakterien oder Viren(75).

Ein autosomal partiell dominant vererbter Defekt des IFNγ-Rezeptor 1 Gens (IFNGR1 [humanes Gen]) ist meist schon früh nach der Geburt bemerkbar(76). Varun K. Sharma et al beschreiben die Patientengeschichte eines betroffenen Kindes im *Journal of Clinical Immunology* (Juli 2015, Band 35, Ausgabe 5, S. 459-462). In einem 1-monatigen Neugeborenen entwickelte sich zusätzlich zu einem Abszess, welcher sich im Injektionsbereich der BCG-Impfung entwickelt hatte, eine linksseitige axilläre Lymphadenitis. Nachdem die Diagnose granulomatöse Lymphadenitis durch eine Biopsie bestätigt wurde, erfolgte eine erfolgreiche, zielgerichtete Behandlung. Im Alter von 1 1/2 Jahren entwickelten sich multiple verhärtete Schwellungen entlang des Schädelknochens, die bei der körperlichen Untersuchung im Alter von 2 Jahren bereits auf eine Größe von ca. 2 x 2 cm angewachsen waren. Zusätzlich bestand bereits 4-monatige Heiserkeit und 2-monatiges, vor allem abends erhöhtes Fieber. In den folgenden Untersuchungen (Computertomographie (CT) und Röntgen) zeigte sich eine mediastinale Vergrößerung mit kollabiertem linken oberen Lungenlappen und Hepatosplenomegalie und in der Knochenszintigraphie zeigten sich multiple Herde in beiden Os Parietale, dem linken Os Frontale und mehreren Costae verae mit Verdacht auf (V.a.) eine multifokale Osteomyelitis. Verschiedene Tests konnten eine disseminierte *Mykobakterium avium intracellulare* (MAC) Infektion bestätigen. Nach 6-monatiger antimykobakterieller Therapie war der klinische Zustand des Kindes weitestgehend normalisiert und die Sequenzierung des IFNGR1 bestätigte eine autosomal partiell dominante Form des IFNγR1-Defizits. Im weiteren klinischen Verlauf erlitt der Patient erneut mykobakterielle Infektionen, welche mit antimykobakteriellen Medikamenten und IFNγ-Gabe, erfolgreich behandelt werden konnten. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung war der 6-jährige Patient asymptomatisch, und wurde lediglich prophylaktisch mit Azithromycin behandelt(76).

Peter Olbrich et al berichten in *Pediatric Blood&Cancer* (November 2015, Band 62, Ausgabe 11, S. 2036-2039) über einen 4-jährigen Jungen, der mit generalisierter Lymphadenopathie, maculopapulösem Ausschlag und Nachtschweiß vorgestellt wird. Im Gegensatz zum vorrangegangenen Fall wurde dieses Kind nicht mit dem BCG Impfstoff geimpft und in der klinischen Vorgeschichte findet sich eine intravenös-antibiotisch behandelte Salmonellen-Gastroenteritis. Trotz intravenöser Antibiotikatherapie verschlechterte sich der klinische Zustand des Jungen, er fieberte und es kam zur Dyspnoe. Die ausführliche Ursachensuche (unter anderem: großes Blutbild, wiederholte Blutkulturen, Knochenmarksaspiration, Lymphknoten- und Lungenbiopsie, Funktionstest der Leukozyten und Screening auf

verschiedene Infektionskrankheiten) lieferte keine Diagnose, allerdings konnte der Zustand des Patienten mit intensiver Breitspektrum-Antibiose dahingehend stabilisiert werden, dass er teilweise ambulant behandelt werden konnte.

3 Monate später wurde der Junge mit wiedergekehrtem Fieber, generalisierten Lymphadenopathien, Hepatosplenomegalie, disseminiertem Ausschlag und ausgeprägtem Ekzem der unteren rechten Extremität vorgestellt. Die durchgeführten Blutuntersuchungen zeigten einen starken Anstieg von Entzündungsmarkern. In der wiederholten Lymphknoten-Biopsie ließ sich *Mykobakterium fortuitum* nachweisen. Die Sequenzierung des IFNGR1 sicherte die Diagnose des autosomal rezessiven kompletten IFNγR1-Defizits. Nach erfolgreicher Behandlung der aktiven Infektion wurde eine Knochenmarkstransplantation mit HLA-identischen HSZ eines Geschwisterkindes durchgeführt. 13 Monate nach der Transplantation befand sich der Patient in gutem klinischen Zustand. Die 12-monatige post-HSZ-Transplantation fortgeführte Therapie gegen *M. fortuitum* konnte danach erfolgreich eingestellt werden(69).

1.3.3 Aktuelle Therapie

Die aktuelle Therapie von MSMD lässt sich in zwei Behandlungsansätze unterteilen. Auf der einen Seite findet eine symptomatische Therapie akuter Infektionen und deren Komplikationen statt und auf der anderen Seite steht der Versuch der kurativen Therapie.

Die symptomatische Therapie der Infektionen zieht sich meist über lange, mehr-monatige Zeiträume und ist mitunter multimedikamentös(77). Trotz intensiver Therapie mit Antibiotika und Chemotherapeutika, wie Rifampicin, Isoniazid, Ethambutol, Streptomycin und Clofazimin, bis hin zur Gabe von IFNγ, können betroffene Kinder noch vor ihrem zweiten Lebensjahr versterben(78).

Daher wird bei schweren Formen der MSMD eine frühe allogene HSZ-Transplantation als kurative Therapie angestrebt. Wie bereits beschrieben wird für eine allogene HSZ-Transplantation ein passender Spender benötigt. Ein bestmöglich passender Spender trägt die gleichen humanen Leukozyten Antigene (HLA) wie der Empfänger(79). Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Geschwisterkind exakt die gleichen HLA trägt liegt bei 25%[10] (ausgenommen sind eineiige Zwillinge). Vorausgesetzt es liegt ein HLA-identisches Knochenmarkstransplantat vor, ist die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Therapie mit dem Knochenmark eines nicht verwandten Spenders identisch mit derjenigen einer erfolgreichen Therapie mit dem Knochenmark eines verwandten Spenders (keine Daten im MSMD-Kontext, da Patientenzahl sehr gering) (80–82).

[10] https://www.kinderkrebsinfo.de/patienten/behandlung/behandlungsmethoden/pohkinderkrebsinfostammzelltransplantation/vorbereitung_der_szt/spendersuche/index_ger.html , 30.06.2017 13:29 Uhr

1.3.3.1 Komplikationen der aktuellen Therapie

Wie bereits erwähnt, können Patienten durch eine passende Knochenmarkspende geheilt werden. Ein HLA-identischer Spender ist allerdings nicht immer auffindbar. Situationsbedingt kann es zur Transplantation einer nicht HLA-identischen Spende kommen. In diesen Fällen steigt, unabhängig von der Grunderkrankung, die Therapie-bedingte Mortalität(79,83,84). Weiterhin kann es durch die hohe Erregerlast und die erhöhten IFNγ Plasma-Spiegel der MSMD-Patienten zu schwerwiegenden Komplikationen nach der Transplantation kommen, wie z.B. schweren Infektionen und der Abstoßung des Transplantats (85).

Es ist aktuell nicht möglich, alle erkrankten Patienten effektiv zu therapieren oder sogar von ihrer Erkrankung zu heilen. Daher wird eine neue, effiziente und kausal behandelnde Therapie benötigt.

2 Ziel der Arbeit

Die Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Diseases (MSMD) ist ein seltener primärer Immundefekt im hämatopoetischen System, bei dem Patienten an rezidivierenden und schweren Infektionen leiden, die durch schwach-virulente Mykobakterien verursacht werden. Ein Defekt im IFNγ-Signalweg stört die Stimulierung der antimikrobiellen Aktivität von Makrophagen nach der Phagozytose der Pathogene. Mutationen des IFNGR1- oder IFNGR2-Gens tragen zu der vollständigen Unterbrechung des IFNγ-Signalweges bei. Sie führen zu schwersten Krankheitsverläufen der MSMD.
Aufgrund der eingeschränkten Therapiemöglichkeiten der MSMD ist das Ziel dieser Arbeit einen Beitrag zur Entwicklung der autologen Gentherapie mittels HSZ und daraus abgeleiteten Makrophagen zu leisten. Die Korrektur von Makrophagen mit autosomal rezessiven Mutationen des IFNGR1-Gens stehen im Fokus der angestrebten Gentherapie.

Die bereits konstruierten lentiviralen Vektoren der dritten Generation wurden bislang nicht hinreichend auf ihre potentielle Zelltoxizität untersucht. Des Weiteren ist die effiziente Wiederherstellung der antimikrobiellen Funktion von Makrophagen durch die myeloidspezifischen Vektoren bisher nicht ausreichend überprüft worden. In dieser Arbeit werden die oben erwähnten Aspekte der Vektoren gezielt im murinen System untersucht. Zu Beginn wird ein möglicher pathologischer Einfluss der Vektoren auf die Zellviabilität und -proliferation überprüft. Im weiteren Verlauf der Arbeit werden weitere Fragestellungen bezüglich der Vektor-vermittelten Toxizität untersucht werden. Dazu zählt die Überprüfung des Differenzierungspotentials der Zellen auf Einschränkungen und die Überprüfung von Folgen einer möglichen Überexpression des Rezeptors. Darüber hinaus setzt eine erfolgreiche Gentherapie die stabile Expression des Vektors voraus. Daher wird die Transgenexpression nach Transduktion über einen längeren Zeitraum untersucht. Es ist ebenfalls Ziel dieser Arbeit zu überprüfen, ob die effiziente Wiederherstellung physiologischer Zellmechanismen durch die Vektoren in vitro möglich ist.
Für die Versuche steht unter anderem eine murine Makrophagen-Zelllinie zur Verfügung. Hinsichtlich der angestrebten Vektoren-Anwendung in menschlichen HSZ und daraus abgeleiteten Makrophagen sind weitere Experimente in murinen HSZ, sowohl von Wildtyp- als auch IFNγR1-defizitären Mäusen, und daraus abgeleiteten Makrophagen von besonderer Bedeutung.
Die drei zu untersuchenden Vektoren tragen das murine Ifnγr1-Gen als Transgen und exprimieren dieses über einen konstitutiven (SFFV) oder myeloidspezifischen (miR223, MSP) Promotor. Da der angestrebte therapeutische Effekt der Vektoren vor allem in Makrophagen zur Anwendung kommen soll, liegt der Fokus dieser Arbeit auf den myeloidspezifischen Vektoren.

Die Ziele in dieser Arbeit tragen dazu bei, SIN-lentivirale Vektoren der 3. Generation hinsichtlich ihrer Sicherheit und Funktion besser einschätzen zu können. Dies ist ein weiterer Schritt auf dem Weg zur erfolgreichen Etablierung der Gentherapie für die MSMD.

3 Material und Versuchsdurchführung

3.1 Zellkultur – Zelllinien

Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Sobald Konfluenz herrschte, wurden die Zellen passagiert.

Tab. 1. **Kulturmedien mit Zusätzen für Zelllinien**

Zell-Linie	Medium	Zusätze
RAW264.7	DMEM 4,5 g/dl Glucose (GIBCO)	10% FBS superior (Millipore) Penicillin/Streptomycin (100 U/ml) (Thermo Fisher Scientific)
HEK293T	DMEM 4,5 g/dl Glucose (GIBCO)	10% FBS superior (Millipore) Penicillin/Streptomycin (100 U/ml) (Thermo Fisher Scientific)
HL-60	RPMI 1640 (1X) (GIBCO)	10% FBS superior (Millipore) Penicillin/Streptomycin (100 U/ml) (Thermo Fisher Scientific)

3.2 Isolation muriner hämatopoetischer Stammzellen aus dem Knochenmark

Im Rahmen dieser Arbeit wurden keine Versuche am lebenden Tier durchgeführt. Für die Isolation der HSZ aus dem Knochenmark wurden Femur und Tibia von WT C57Bl/6 und B6.129S7-*Ifngr1*^{tm1Agt}/J verwendet. Die Mäuse wurden von Herrn PD Dr. Lachmann durch zervikale Dislokation getötet (§4 AZ 2017/157 sowie AZ 2016/127) und die Knochen am toten Tier frei präpariert. Die Knochenmarkszellen wurden mit einer Spritze und einer 27 G Kanüle mit 1 ml MACS-Puffer (bestehend aus Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) mit 10% FBS superior und 2 mM EDTA) aus dem Knochen gespült. Die so gewonnenen Zellen wurden zehn Minuten bei 4°C mit 300xg zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Red-Cell-Lysis (RCL) Lösung (4,15g NH_4Cl, 2,3g $KHCO_3$, 0,5 ml 0,5 M EDTA ad 500ml H_2O) resuspendiert und für zwei Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Dann wurden 20 ml MACS-Puffer hinzugegeben und erneut zehn Minuten bei 4°C mit 300xg zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 10 ml MACS-Puffer resuspendiert und die Zellen durch ein 100µm Sieb gefiltert. Die Zellzahl wurde bestimmt. Danach wurden die Zellen mit Lineage-spezifischen Antikörpern und magnetischen Micro-Beads markiert, beides aus dem „Lineage Cell Depletion Kit, mouse“ von Miltenyi Biotec. Die Markierung ist laut Protokoll des Herstellers erfolgt. Die Zellen wurden dann in die LS-Säule von Miltenyi Biotec gegeben, welche am QuadroMACS^{TM}, ebenfalls Miltenyi Biotec, befestigt ist, und laut Protokoll gespült. Anschließend erfolgte die Kultivierung der so gewonnenen Lineage-negativen Zellen in 1,5 ml Medium.

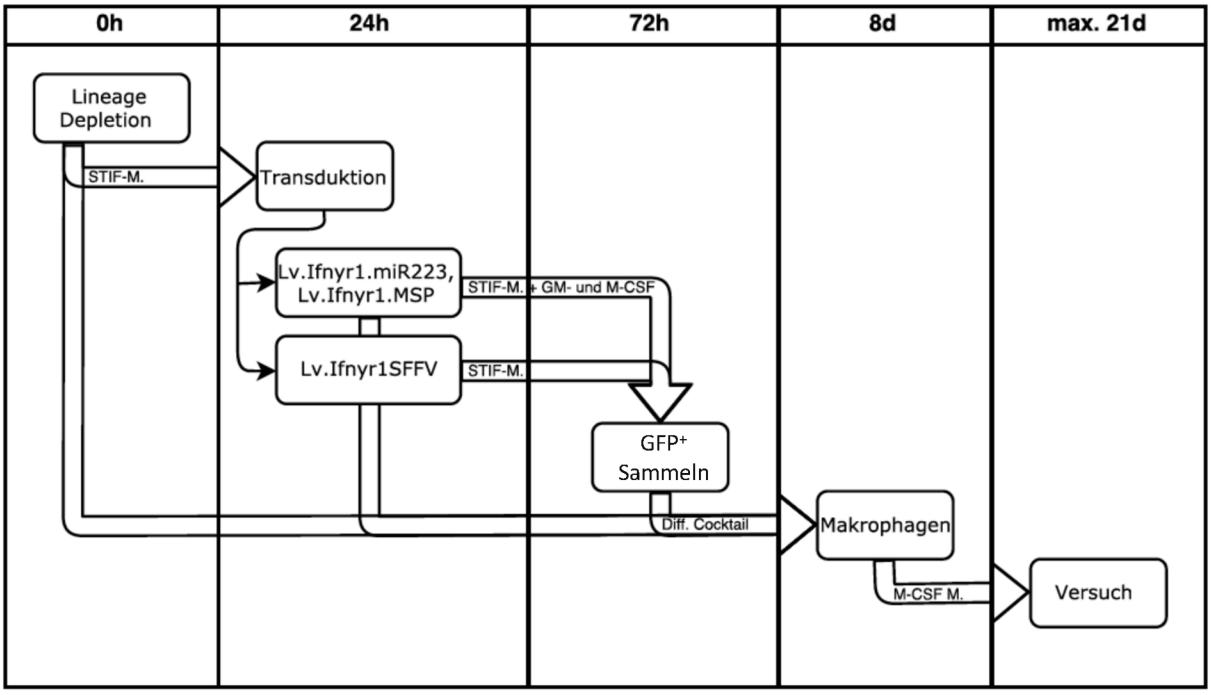
3.3 Zellkultur – murine hämatopoetische Stammzellen (mHSZ)

Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO_2 in einem separaten Behälter mit erhöhter Humidität inkubiert. Mit Beginn der Differenzierungsphase wurden die Zellen unter bereits erwähnten Standardbedingungen aufbewahrt. Wenn nicht anders erwähnt, wurde mit den Zellen wie folgt verfahren:
Die lentivirale Transduktion erfolgte 24h nach der Lineage Depletion. Die Zellen befanden sich für 48h auf dem Transduktionswell. 72h nach Beginn der Transduktion wurden die grün-fluoreszierendes Protein(GFP)-exprimierenden (GFP^+) Zellen mittels Durchflusszytometrie gesammelt. Dann befanden sich die Zellen für 5 Tage im Differenzierungscocktail. Bis zum jeweiligen Versuch wurden die MΦ im M-CSF Medium kultiviert.
Das Schema in Diagramm 1 verdeutlicht den Ablauf der Transduktion und Differenzierung. Es zeigt mögliche Abweichungen des oben erwähnten Protokolls.

Tab. 2. **Kulturmedien mit Zusätzen für KM-abgeleitete MΦ**

	Medium	**Zusätze**
mHSZ bis Transduktion und Transduktion (falls keine Transduktion, direkt Differenzierung)	StemSpan (Stem Cell Technologies) „STIF-Medium“	1% L-Glutamine (Thermo Fisher Scientific) Penicillin/Streptomycin (100 U/ml) (Thermo Fisher Scientific) 10 ng/ml muriner Stammzell Faktor (mSCF) (Peprotec) 20 ng/ml murines Thrombopoietin (mTPO) (Peprotec) 20 ng/ml humaner insulin-like growth factor-2 (hIGF-2) (Peprotec) 10 ng/ml humaner Fibroblasten Wachstumsfaktor-1 (hFGF-1) (Peprotec)
mHSZ nach Transduktion bis Sortierung (falls keine Sortierung, direkt Differenzierung)	StemSpan (Stem Cell Technologies)	1% L-Glutamine (Thermo Fisher Scientific) Penicillin/Streptomycin (100 U/ml) (Thermo Fisher Scientific) 10 ng/ml muriner Stammzell Faktor (mSCF) (Peprotec) 20 ng/ml murines Thrombopoietin (mTPO) (Peprotec) 20 ng/ml humaner insulin-like growth factor-2 (hIGF-2) (Peprotec) 10 ng/ml humaner Fibroblasten Wachstumsfaktor-1 (hFGF-1) (Peprotec) Für Vektorvarianten mit myeloidspezifischen Promotor zusätzlich: 20 ng/ml muriner Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor (mM-CSF) 20 ng/ml Granulozyten-Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor (GM-CSF) (Peprotec)
Differenzierung zu Makrophagen (MΦ)	70% RPMI 1640 (1X) (GIBCO) 30% M-CSF Überstand (L929 Zellen) „Differenzierungs-Cocktail“	10% FBS superior (Millipore) Penicillin/Streptomycin (100 U/ml) (Thermo Fisher Scientific) 10 ng/ml muriner Granulozyten-Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor (GM-CSF) (Peprotec) 10 ng/ml murines IL-3 (Peprotec)
Makrophagen (MΦ)	70% RPMI 1640 (1X) (GIBCO) 30% M-CSF Überstand (L929 Zellen) „M-CSF Medium“	10% FBS superior (Millipore) Penicillin/Streptomycin (100 U/ml) (Thermo Fisher Scientific)

Diagramm 1 **Differenzierungsschema Lin⁻-Zellen zu MΦ**



3.4 Vektoren

Die folgenden Vektoren wurden von Adele Mucci (Research Group Reprogramming and Gene Therapy, Institut für Experimentelle Hämatologie, MHH) synthetisiert. Sie standen dem Labor daher bereits zur Verfügung. Der 3. Gen. selbst-inaktivierender lentiviraler Vektor, welcher als Grundgerüst für alle Konstrukte diente, wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Axel Schambach (Leiter des Instituts für Experimentelle Hämatologie, MHH) zur Verfügung gestellt.

pRRL.PPT.SFFV.Ifnγr1.IRES.eGFPpre# (Lv.SFFV.Ifnγr1) In diesem Vektor wird das Transgen Ifnγr1.IRES.eGFP über den Spleen Focus-Forming Virus (SFFV) Promoter konstitutiv exprimiert.

pRRL.PPT.MSP.Ifnγr1.IRES.eGFPpre# (Lv.MSP.Ifnγr1) In diesem Vektor wird die Expression des Transgens Ifnγr1.IRES.eGFP über den SP146/gp91phox Myeloid Spezifischen Promoter (MSP) reguliert. Der MSP Promotor basiert auf dem synthetischen SP146 myeloidspezifischen Enhancer-Element, welches von Barde et al. (2011)(63) mit dem minimalen $gp91^{phox}$ Promoter vom endogenen Locus fusioniert wurde. Das SP146 Element, synthetisiert von He et al. (2006)(61), setzt sich aus verschiedenen cis-Elementen natürlicher myeloidspezifischer Promotoren zusammen. Der MSP Promotor wurde freundlicherweise von Dr. Bernhard Gentner (San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy, Mailand, Italien) zur Verfügung gestellt. Er zeigt eine Hochregulierung der Expression des Transgens mit zunehmender myeloider Differenzierung der Zellen (62,63).

pRRL.PPT.miR223.Ifnγr1.IRES.eGFPpre# (Lv.miR223.Ifnγr1) In diesem Vektor wird die Expression des Transgens Ifnγr1.IRES.eGFP über den miR223 Promotor reguliert. Der miR223 Promotor basiert auf dem humanen miR223 Promotor. Er zeichnet sich durch eine hohe und selektive Aktivität in myeloiden Zellen aus(86). Er wurde freundlicherweise von Christian Brendel, PhD (Boston Children´s Hospital, Boston, USA) zur Verfügung gestellt.

3.5 Restriktionsverdau

Für den Restriktionsverdau wurden 2µl des Plasmids, jeweils 1µl des Restriktionsenzyms AgeI (AgeI-HF®, New England BioLabs) und SalI (SalI-HF®,New England BioLabs), 2µl Restriktionspuffer (CutSmart® Buffer, New England BioLabs) und 14µl H_2O über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Agarosegel gegossen (1% Agarose in TAE-Puffer) und aufgekocht bis alles Pulver gelöst war. Dann wurden 0,01% Ethidiumbromid hinzugegeben, und das Gel wurde für mindestens 20 Minuten bei Raumtemperatur ausgehärtet. Im Folgenden wurden die verdauten Proben, eine unverdaute Kontrolle des Plasmids und der Marker (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, ready-to-use, Thermo Fisher Scientific) auf das Gel gegeben. Die Gelelektrophorese fand mit 90 Volt bei 400 mAm für 15 Minuten statt. Die Auswertung erfolgte mit dem Gel Doc™ XR+ (Bio-Rad) und der Software Image Lab (Bio-Rad).

3.6 Durchflusszytometrie

3.6.1 Zellsortierung – Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

Zum Sammeln der transduzierten Zellen wurde das FACSAria IIu, Becton Dickinson genutzt, welches in der *Research Facility Cell Sorting* (MHH) der MHH vorhanden ist. Zur Datenanalyse wurde das BD FACSCalibur genutzt. Die Zellen wurden in 100µl MACS-Puffer resuspendiert und dann entweder direkt oder nach Antikörper-Färbung untersucht.

3.6.2 Antikörper-Färbung

Die Antikörper-Färbung erfolgte in 200µl MACS-Puffer mit 1µl Antikörper bei 4°C an einem dunklen Ort. Die Anfärbezeit betrug je nach genutztem Antikörper 15, 30 oder 45 Minuten.

Tab. 3. **Antikörper Durchflusszytometrie**

Antigen	**Fluorchrom**	**Hersteller**
CD 119 (IFNγR1)	APC	eBioScience
CD 119 (IFNγR1)	Biotin-Bindungsstelle	eBioScience
Streptavidin	PE-Cy7	eBioScience
CD 45.1 (Protein tyrosine phosphatase, receptor type, c)	APC-eFLuor760	eBioScience
F4/80	APC	eBioScience
CD11b	PE	eBioScience

3.7 Lentivirale Partikel

3.7.1 Produktion lentiviraler Partikel

Zur Herstellung der Plasmide wurden bakterielle Glycerol-Vorräte verwendet. Eine kleine Menge des Glycerol-Vorrats wurde in 4ml LB-Medium (mit 100µg/ml Ampicillin (Carl Roth GmbH)) gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 300µl der Bakteriensuspension in 250ml LB-Medium (mit 100µg/ml Ampicillin) überführt und über Nacht erneut bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Plasmide aus den Bakterien isoliert. Dafür wurde das Plasmid DNA Purification Protokoll mit NucleoBond® Xtra Midi/Maxi von Macherey-Nagel GmbH&Co.KG verwendet.

Für die Virusproduktion wurden humane embryonale Nieren-Zellen (HEK 293T) verwendet. Am Vortag wurden dafür 20 Zellkultur-Schalen à 15 cm mit jeweils HEK 293T Zellen besät (eine konfluente 15 cm Schale wurde auf 4 Schalen gesplittet). Das Medium wurde durch 12ml Transfektionsmedium ersetzt (DMEM 4,5 g/dl Glucose (GIBCO) mit folgenden Zusätzen versetzt: 10% FBS superior (Millipore), Penicillin/Streptomycin (100 U/ml) (Thermo Fisher Scientific), 25µM Chloroquine (Sigma-Aldrich), 20mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure (HEPES)). Die Plasmide (jeweils pro Schale: 12,5µg lentiviraler Vektor, welcher das Transgen trägt, 20µg pcDNA3.Gp.4xCTE (kodierend für HIV-1 Gag/Pol), 12,5µg pRSV/Rev, 5µg pMD.G (kodierend für das Vesikuläre Stomatitis Virus Glykoprotein VSV-G)) für die Transfektion wurden in 1,6ml H_2O mit 400µl 1,25M $CaCl_2$ pro Schale gegeben. Die Plasmid-$CaCl_2$- Mischung wurde dann unter stetiger Sauerstoffzufuhr langsam tropfend in eine 2xHBS-Lö-

sung (8,18g NaCl; 5,95g HEPES; 0,103g Na_2HPO_4; 500ml H_2O; pH zwischen 7,1-7,2 eingestellt) hineingegeben. Pro Schale wurden 2ml 2xHBS-Lösung vorgelegt. Die Größe der Präzipitate wurde in kurzen Zeitabständen unter dem Mikroskop beurteilt, sobald kleine Präzipitate zu erkennen waren, wurden jeweils 4ml Mischung auf die Schalen verteilt. Nach einer Inkubation über 6-8h bei 37°C wurde das Transfektionsmedium durch 12ml Medium (DMEM 4,5 g/dl Glucose (GIBCO) mit folgenden Zusätzen: 10% FBS superior (Millipore), Penicillin/Streptomycin (100 U/ml) (Thermo Fisher Scientific), 20mM HEPES) ersetzt.

Nach 24h wurde der Überstand abgenommen, sterifiltriert (0,22μm) und bei 4°C mit 14000g über Nacht zentrifugiert. Die Zellen wurden erneut mit 12 ml Medium aufbewahrt und nach weiteren 24h wurde wie bereits beschrieben mit dem Überstand verfahren. Die Viruspellets wurden in 300μl Stem-Span resuspendiert und bei -80°C aufbewahrt. 11μl wurden für die Virustiter-Bestimmung genutzt.

3.7.2 Virustiterbestimmung

Pro produziertem, viralen Überstand wurden 4 Wells einer 12-Well Zellkultur-Platte mit 100.000 Zellen (HL-60) in 500μl Medium (Zusatz: 0,5μg Protaminsulfat (Sigma-Aldrich)) vorbereitet. Der hergestellte Virusüberstand wurde in den Potenzen 10^{-2} bis 10^{-5} in 500μl Medium (Zusatz: 4 μg/ml Protaminsulfat) verdünnt. Dann wurde je eine Verdünnungsstufe des Virusüberstands zu den Zellen gegeben. Diese wurden dann über 3 Tage bei 37°C inkubiert. Da alle benutzten Vektoren das GFP-Gen beinhalten, war die Titer-Bestimmung per FACS-Analyse möglich. Der Titer berechnete sich nach folgender Formel:

$$Titer = \frac{100.000\ Zellen\ \times\ \%\ GFP^{+}Zellen}{100\ \times\ Verdünnung}$$

3.8 Transduktion

3.8.1 Zelllinie

Je 150.000 Zellen (RAW 264.7) wurden in 300μl Standardmedium mit 4 μg/ml Protaminsulfat in einer 12-Well Zellkultur-Platte über 24h oder 48h mit unterschiedlichen MOIs (Multiplizität der Infektion) transduziert. Die Transduktionseffizienz wurde über die GFP-Expression, welche per Durchflusszytometrie ermittelt wurde, bestimmt.

3.8.2 Murine Hämatopoetische Stammzellen

Die Lin$^-$-Zellen wurden, wie bereits beschrieben, 24h vor ihrer Transduktion in STIF-Medium stimuliert. Auf einer 24-Well nicht-adhärenten Zellkultur-Platte wurde der Well-Boden mit 50µg/ml Retronectin® (Takara Bio Inc.) über Nacht bei 4°C bedeckt. Am Morgen wurde der Überstand an Retronectin® abgenommen und mit 2% Rinder Serum Albumin (BSA) in PBS gegenüber unspezifischer Rezeptorbindung für 30 Minuten bei RT geblockt. Die Wells wurden dann mit Hank´s Balanced Salt Solution (HBSS) zweifach, für mindestens 20 Minuten gewaschen. Der Virus und 500µl STIF-Medium wurden in die präparierten Wells gegeben und 2h bei 32°C und 2000xg zentrifugiert. Die vorbereiteten Zellen, 1 ml STIF-Medium und 1µl/ml Protaminsulfat wurden auf die Wells gegeben und 30 min bei 32°C und 300xg zentrifugiert. Die Virus- und Zellzahl wurden so angepasst, dass sich eine MOI von 20 ergab. Die Transduktion fand für 48h unter Standard-Kultivierungsbedingungen statt. Danach wurden die Zellen gewaschen und zur Differenzierung auf eine neue Zellkultur-Platte übertragen. Die Transduktionseffizienz wurde über die GFP-Expression, welche per Durchflusszytometrie ermittelt wurde, bestimmt.

3.9 Evaluation der Teilungsrate

Hierzu wurde das Cell Proliferation Dye eFluor® 670 von eBioscience genutzt. Zu Beginn wurden die Zellen, wie im Protokoll des Herstellers beschrieben, mit 0,5µl eFluor® 670 pro 500.000 Zellen gefärbt. Im Anschluss wurden 200.000 Zellen in 2ml Standardmedium für 24h, 48h und 72h unter Standardbedingungen kultiviert und dann der Anteil an eFluor® 670 in den Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Weitere 200.000 Zellen wurden sofort per Durchflusszytometrie zum Startzeitpunkt 0h analysiert.

3.10 Evaluation der Zellviabilität

Zu Beginn wurden 200.000 RAW 264.7 Zellen in 2 ml Standardmedium unter Standardbedingungen kultiviert. Zum selben Zeitpunkt wurden weitere 200.000 Zellen mit 1µl Propidiumiodid (PI) in 200µl PBS gefärbt und per Durchflusszytometrie der Anteil PI-positiver, dementsprechend abgestorbener, Zellen analysiert. Nach 48h wurden die zu Beginn kultivierten Zellen nach dem gleichen Verfahren per Durchflusszytometrie analysiert.

3.11 Evaluation der STAT5 Phosphorylierung nach Stimulation

Die Zellzahl betrug mindestens 500.000 Stück. Die Zellen befanden sich auf einer 6-Well-Platte. 24h vor Beginn des Versuches wurde das Standardmedium durch 1ml X-Vivo™ 15 (Lonza) Medium ersetzt. Mit dem Beginn des Versuches wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in frischem 1ml X-Vivo™ kultiviert. Dann wurden die Zellen für 15 Minuten mit 50ng/ml mGM-CSF (Peprotec) stimuliert. Die

Kontrolle blieb unstimuliert. Alle Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen und in ein FACS-Tube überführt. Nach der fünfminütigen Zentrifugation bei 1500 rpm, wurde das Pellet für 10-60 Minuten in 100µl 4% Paraformaldehyd (PFA) resuspendiert. Im nächsten Schritt wurde 1 ml gekühltes 100% Methanol hinzugegeben und die Proben wurden für 30-120 Minuten bei 4°C und Dunkelheit aufbewahrt. Dann wurden 3 ml MACS-Puffer hinzugegeben und 5 Minuten bei 600xg gefugt. Im letzten Schritt wurden die Proben in 100µl MACS-Puffer mit 2µl anti-humanem/murinen phosphoryliertem STAT5 (Y694) APC Antikörper (eBioscience) für 30-60 Minuten bei RT und lichtgeschützt gefärbt und per Durchflusszytometrie untersucht.

3.12 Evaluation BCG-Elimination nach *in vitro* Infektion

Zu Beginn wurden je 200.000 MΦ pro Kondition ausgesät. Transduzierte, GFP^+ MΦ wurden vor Beginn ihrer Differenzierung mittels Durchflusszytometrie gesammelt. 24h vor der Infektion wurden die MΦ in RPMI 1640 (1X) (GIBCO), Zusatz 10% FBS superior (Millipore), mit 50 ng/ml murinem IFNγ stimuliert. Die *in vitro* Infektion mit BCG wurde von Kollaborationspartnern in dafür ausgestatteten Laboren wie im Folgenden beschrieben durchgeführt.

Mykobakterium bovis (BCG) wurde in seiner exponentiellen Wachstumsphase geerntet, zweifach mit PBS gewaschen und im oben beschriebenen Medium resuspendiert bis eine $Extinktion_{600}$ von 0,1 erreicht war. Eventuell vorhandene Bakterienhaufen wurden durch 5 Minuten im Ultraschall-Wasserbad mit anschließender Zentrifugation (120xg, 2 Minuten) entfernt. Die Infektion erfolgte mit einer MOI von 100:1 für 1h. Dann wurden 10 µg/ml Gentamycin zur Elimination aller extrazellulären Keime hinzugegeben. Zu den Zeitpunkten 1h *post infectionem* (*p.i.*) und 24 h *p.i.* wurden die Zellen zweifach mit PBS gewaschen und mittels 10facher Suspension durch eine 24-gauge Kanüle die Zellmembran rupturiert. Das entstandene Lysat wurde mittels PBS seriell 10fach verdünnt und 100 ml jeder Verdünnung wurden auf einer Middlebrook 7H10 Agar Platte ausgesät. Nach zweiwöchiger Inkubationszeit bei 37°C wurden die Kolonie-formenden Einheiten (CFU) gezählt.

3.13 Western Blot

Zuerst wurden die Zellen in 150µl RIPA-Puffer (Sigma-Aldrich) versetzt mit 1% Proteaseinhibitor (cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich) für 5 Minuten auf Eis lysiert. Dann wurde das Lysat für 10 Minuten bei 8000xg und 4°C zentrifugiert. Die Proteine, welche sich im Überstand befanden, wurden in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, bei 95°C für 5 Minuten denaturiert und abschließend bei -20°C aufbewahrt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben wurde das Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) laut Herstellerprotokoll genutzt und mit dem Model 680 Microplate Reader (Bio-Rad) bei 560nm ausgewertet.

Alle Proben wurden mit dem Protein Loading Puffer (350 mM Tris-HCl pH 7,5, 10% SDS, 36% Glycerin, 0,03% Bromophenol blau, 5% β-Mercaptoethanol) auf dasselbe Volumen angeglichen. Dann erfolgte die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Die Bandengröße wurde mit der PageRuler™ prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Das Sammelgel lief mit 80 Volt für 20 Minuten und das Trenngel mit 120 Volt für 40 Minuten, bis die Proben auf dem gesamten Gel aufgetrennt waren. Das Blotten der Gele auf Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membranen, welche zuvor für 20 Sekunden in Methanol aktiviert wurden, wurde mit dem Wet/Tank Blotting System Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad) durchgeführt. Dies geschah mit 300 mAm bei 4°C für 70 Minuten. Die Membran wurde in 1x TBST mit 5% Milchpulver für 1 h gegenüber unspezifischer Antikörperbindung geblockt. Dann wurde die Membran in 5 ml 1x TBST mit 5% Milchpulver mit den primären Antikörpern (Konzentration 1/1000) über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran drei Mal für 5 Minuten in 1x TBST gewaschen und dann mit dem passenden Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelten sekundären Antikörper (Konzentration 1/10.000) in 15 ml 1x TBST mit 5% Milchpulver für 1 h bei RT inkubiert. Die Membran wurde erneut drei Mal für 5 Minuten in 1x TBST gewaschen. Die Banden wurden mit dem SuperSIgnal™ West Pico oder Femto Chemiluminescent Substrate (beide von Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben visualisiert und mit der ChemiDoc XRS + Station (Bio-Rad) aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit der Software Quantity One1-D Analysis Software (Bio-Rad). Tubulin (Molekulargewicht: 55 kDA) wurde als Ladekontrolle genutzt, an welcher die Proben normalisiert wurden.

Zum Strippen (Entfernung der Antikörper um eine erneute Antikörper-Färbung der Membran durchführen zu können) des Western Blots wurde die Membran mit Stripping-Lösung (75% H_2O, 17% 10% SDS, 7% 1M Tris, pH 6,8, 1% β-Mercaptoethanol) bedeckt und für 30 Minuten bei 70°C inkubiert. Dann wurde die Membran mindestens fünf Mal mit 1x TBST gewaschen. Danach wurde sie erneut in 1x TBST mit 5% Milchpulver für 1 h gegenüber unspezifischer Antikörperbindung geblockt. Die Anfärbung mit weiteren Antikörper erfolgte nach dem oben genannten Verfahren.

Tab. 4. **Western Blot Puffer**

Puffer	Zusammensetzung
10x TBS	24,2 g Tris, 203,3 g $MgCl_2$, 0,3 g $CaCl_2$, 0,1 g NaCl, ad 1 L H_2O, pH 7,6
1x TBST	10% 10x TBS, 0,1% Tween20, ad 1 L H_2O
10x Running Puffer	30,3 g Tris, 144 g Glycine, 10 g SDS, ad 1 L H_2O
1x Running Puffer	10% 10x Running Puffer, ad 1 L H_2O
10x Transfer Puffer	30,3 g Tris, 144 g Glycine, ad 1 L H_2O
1x Transfer Puffer	10% 10x Transfer Puffer, 20% Methanol, 70% H_2O
Sammelgel (6 ml)	4,1 ml H_20, 1 ml 30% Acrylamide Mix (Rotiphorese® Gel 30, Carl Roth), 0,75 ml 1 M Tris (pH 6,8), 60 µl 10% SDS, 60 µl 10% Ammonium Persulfat, 5 µl TEMED
Trenngel (20 ml)	9,3 ml H_20, 5,3 ml 30% Acrylamide Mix (Rotiphorese® Gel 30, Carl Roth), 5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8), 200 µl 10% SDS, 200 µl 10% Ammonium Persulfat, 12 µl TEMED

Tab. 5. **Western Blot Antikörper**

Antigen	Spezies	Hersteller
STAT1	Hase mAk	CellSignaling
pSTAT1 (Y701)	Hase mAk	CellSignaling
α-Tubulin	Maus	Sigma-Aldrich
Anti-Maus HRP-gekoppelt	Esel	Jackson ImmunoResearch
Anti-Hase HRP-gekoppelt	Ziege	Jackson ImmunoResearch

3.14 Mikroskopische Aufnahmen

Mikroskopische Aufnahmen wurden mit dem Olympus IX71 Mikroskop aufgenommen und mit der CellProfiler-Software analysiert.

3.15 Cytospins

Cytospins wurden zur Beurteilung der Zellmorphologie angefertigt. Dafür wurden die Zellen vom Well gelöst, gezählt und im Anschluss ca. 50.000 Zellen mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen in 200µl PBS für 7 Minuten bei 600xg mit der medite Cytofuge® (MEDITE® GmbH) auf eine Glasplatte gefugt. Im Folgenden wurden die Proben mit der Pappenheim-Färbung gefärbt und unter dem Mikroskop analysiert.

3.16 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse wurde mit dem Programm Prism 6 von GraphPad durchgeführt.

Für die statistische Auswertung in „**Abb.10** Evaluation der Teilungsrate transduzierter RAW264.7 Zellen, **Teil B**“ und „**Abb.11** Evaluation der Zellviabilität transduzierter RAW264.7 Zellen, **Teil B**“ wurde ein ungepaarter t-test mit zweiseitigem parametrischem Test (Konfidenzintervall (KI) 95%, $p<0,05$) genutzt (unpaired t-test with parametric test, two-tailed).

Für die statistische Auswertung in „**Abb.10** Evaluation der Teilungsrate transduzierter RAW264.7 Zellen, **Teil C**“ und „**Abb.11** Evaluation der Zellviabilität transduzierter RAW264.7 Zellen, **Teil C**“ wurde eine einfache Varianzanalyse mit Dunnett’s multiplen Vergleichstest (KI 95%, $p<0,05$) genutzt (Ordinary One-way ANOVA with Dunnett’s multiple comparisons test).

Für die Auswertung von „**Abb.17** Evaluation der Teilungsrate transduzierter WT-MΦ” wurde eine zweifache Varianzanalyse mit Dunnett’s multiplen Vergleichstest (KI 95%, $p<0,05$) genutzt (Two-way ANOVA with Dunnett’s multiple comparisons test).

Für die Auswertung von „**Abb.20** Evaluation der Elimination von intrazellulären BCG nach IFNγ-Stimulation“ wurde eine zweifache Varianzanalyse mit Tukey’s multiplen Vergleichstest (KI 95%, $p<0,05$) genutzt (Two-way ANOVA with Tukey’s multiple comparisons test).

4 Ergebnisse

4.1 Virale Vektoren

Zu Beginn der Arbeit wurde der Bestand des Labors an Plasmiden für die Virusproduktion aufgenommen. Besonderes Augenmerk lag auf den Ifnγr1.IRES.eGFP Transgen-kodierenden Plasmiden, pRRL.PPT.SFFV.Ifnγr1.IRES.eGFPpre# (Lv.SFFV.Ifnγr1), pRRL.PPT.MSP.Ifnγr1.IRES.eGFPpre# (Lv.MSP.Ifnγr1) und pRRL.PPT.miR223.Ifnγr1.IRES.eGFPpre# (Lv.miR223.Ifnγr1), dargestellt in **Abb. 4**. Das Grundgerüst jedes Konstrukts, ein 3. Gen. selbstinaktivierender lentiviraler Vektor, wurde freundlicherweise von Axel Schambach (Leiter des Instituts für Experimentelle Hämatologie, MHH) zur Verfügung gestellt. Die myeloidspezifischen Promotoren MSP und miR223 wurden freundlicherweise von Bernhard Gentner (San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy, Mailand, Italien) und Christian Brendel (Boston Children´s Hospital, Boston, USA) zur Verfügung gestellt. Die Klonierung der Vektoren wurde von Adele Mucci (Research Group Reprogramming and Gene Therapy, Institut für Experimentelle Hämatologie, MHH) durchgeführt. Aufgrund der selektiven Expression des Transgens in myeloiden Zellen standen mit dem Lv.MSP.Ifnγr1 und Lv.miR223.Ifnγr1 vielversprechende Vektoren für die optimierte hämatopoetische Gentherapie der MSMD und anderer Erkrankungen basierend auf Defekten in Zellen der myeloiden Reihe zur Verfügung.

Die Transgene der Plasmide wurden mittels eines Restriktionsverdaus zu Beginn der Arbeit überprüft. Hierfür wurden alle drei Plasmide mit den Restriktionsenzymen AgeI und SalI geschnitten. Die Bandengrößen der verdauten Plasmide waren übereinstimmend mit den zuvor errechneten Bandengrößen im Programm Clone Manager© (Sci-Ed Software) (vgl. **Abb.5**). Das Lv.SFFV.Ifnγr1 Plasmid wurde in einen 1344 Basenpaare (Bp) großen Abschnitt, einen 1446 Bp großen Abschnitt und einen 6561 Bp großen Abschnitt zerschnitten. Das Lv.MSP.Ifnγr1 Plasmid in einen 1344 Bp, einen 1446 Bp und einen 7991 Bp großen Abschnitt und das Lv.miR223.Ifnγr1 in einen 1344 Bp, einen 1446 Bp und einen 6942 Bp großen Abschnitt zerschnitten. Hiermit konnte die Korrektheit der Plasmide, welche für die Virusproduktion genutzt wurden, gezeigt werden. Die Aufnahmen der Gele und die dazugehörigen Plasmidkarten sind in **Abb.5** dargestellt.

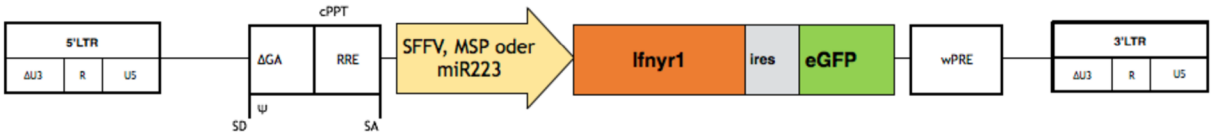
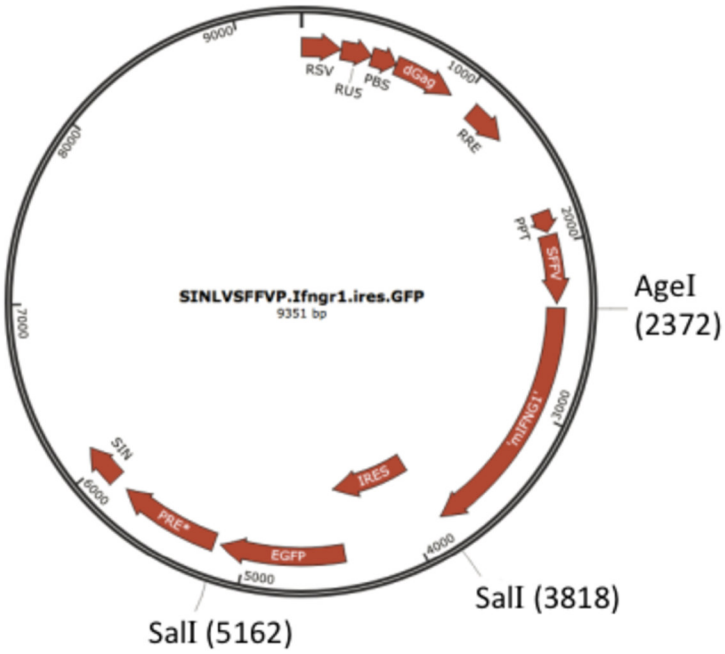
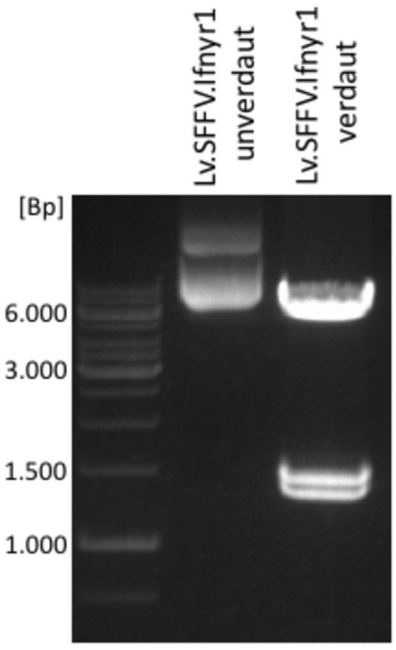


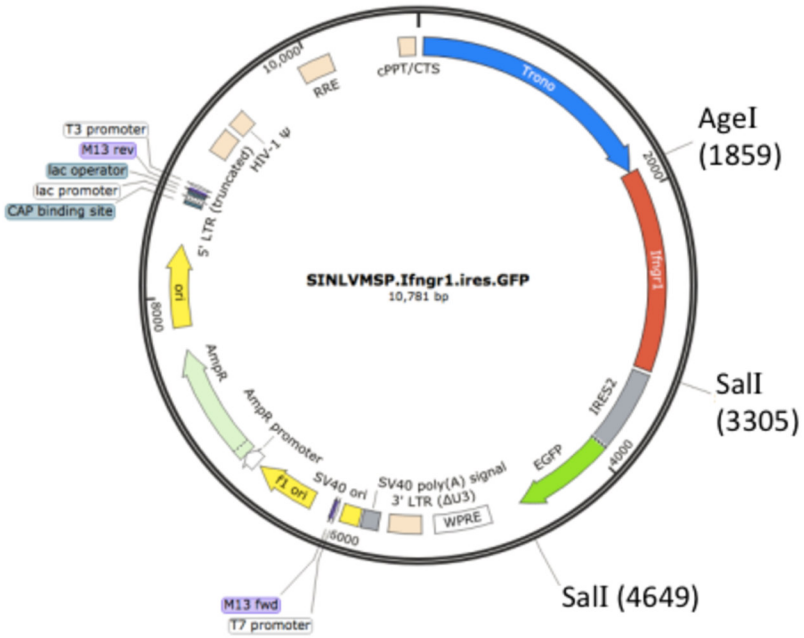
Abb. 4 Viraler Vektor
Schematische Darstellung eines 3. Gen. SIN lentiviralen Vektors mit Ifnγr1.IRES.eGFP als Transgen, reguliert über den SFFV, MSP oder miR223 Promoter.

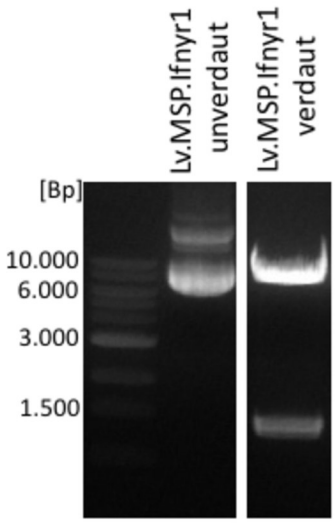
A


SINLVSFFVP.Ifngr1.ires.GFP
9351 bp
RSV
RU5
PBS
dGag
RRE
PPT
SFFV
mIFNG1'
IRES
EGFP
PRE*
SIN
AgeI
(2372)
SalI (3818)
SalI (5162)


Lv.SFFV.Ifnyr1
unverdaut
Lv.SFFV.Ifnyr1
verdaut
[Bp]
6.000
3.000
1.500
1.000

B


SINLVMSP.Ifngr1.ires.GFP
10,781 bp
cPPT/CTS
Trono
RRE
HIV-1 Ψ
5' LTR (truncated)
T3 promoter
M13 rev
lac operator
lac promoter
CAP binding site
ori
AmpR
AmpR promoter
f1 ori
SV40 ori
SV40 poly(A) signal
3' LTR (ΔU3)
WPRE
EGFP
IRES2
mIfngr1
M13 fwd
T7 promoter
AgeI
(1859)
SalI
(3305)
SalI (4649)


Lv.MSP.Ifnyr1
unverdaut
Lv.MSP.Ifnyr1
verdaut
[Bp]
10.000
6.000
3.000
1.500

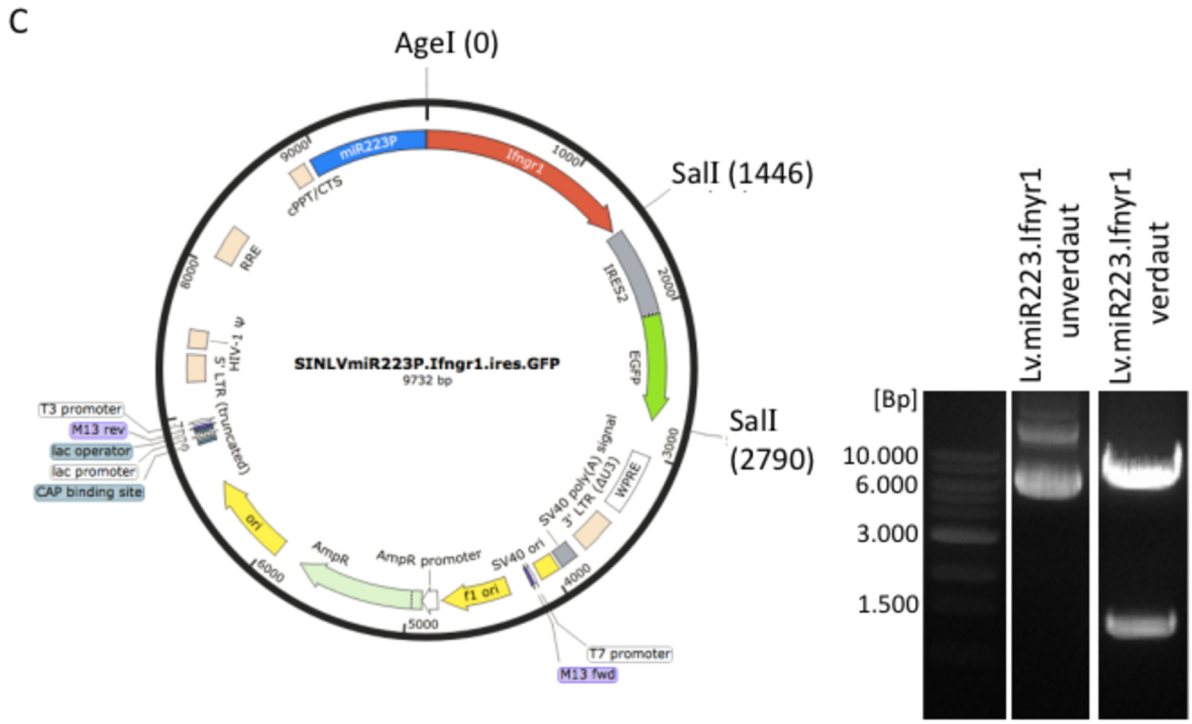


Abb. 5 Plasmidkarten und Restriktionsverdau

Schematische Darstellung der Plasmide mit den eingezeichneten Schnittstellen der Restriktionsenzyme AgeI und SalI. Daneben der jeweilige Restriktionsverdau der Plasmide mit den Restriktionsenzymen AgeI und SalI. **A** Lv.SFFV.Ifnγr1.IRES.eGFP; von oben nach unten sind bei der verdauten Probe eine 6561 Bp, eine 1446 Bp und eine 1344 Bp Bande zu erkennen. Das unverdaute Plasmid trennte sich in zwei Banden auf, die zweite, schneller laufende Bande ist sehr wahrscheinlich das gecoilte Plasmid. **B** Lv.MSP.Ifnγr1.IRES.eGFP; von oben nach unten sind bei der verdauten Probe eine 7991 Bp, eine 1446 Bp und eine 1344 Bp Bande zu erkennen. Das unverdaute Plasmid trennte sich in zwei Banden auf, die zweite, schneller laufende Bande ist die gecoilte Form des Plasmids. [In der ringförmigen schematischen Darstellung des Plasmids wird der MSP-Promoter als „Trono" bezeichnet] **C** Lv.miR223.Ifnγr1.IRES.eGFP; von oben nach unten sind bei der verdauten Probe eine 6942 Bp, eine 1446 Bp und eine 1344 Bp Bande zu erkennen. Das unverdaute Plasmid trennte sich in zwei Banden auf, die zweite, schneller laufende Bande ist die gecoilte Form des Plasmids. [Lv.SFFV.Ifnγr1.IRES.eGFP n=1; Lv.MSP.Ifnγr1.IRES.eGFP und Lv.miR223.Ifnγr1.IRES.eGFP n=2, repräsentative Abbildung; vollständige Abbildungen der Gele im Appendix]

4.2 Virusproduktion

Die Virusproduktion erfolgte nach der Beschreibung in „**3.7.1** Produktion lentiviraler Partikel“ mit anschließender Titerbestimmung (**3.7.2** Virustiterbestimmung). Die Virusproduktion von Lv.SFFV.Ifnγr1 lieferte 1,4*10^7-4,15*10^8 Partikel/ml. Bei der Produktion von Lv.Trono.Ifnγr1 bestanden mit 7,02*10^6-1,06*10^8 Partikel/ml ähnliche Schwankungen in der Anzahl produzierter Partikel. Die Produktion von Lv.miR223.Ifnγr1 lieferte mit 1,99*10^6-1,05*10^7 Partikel/ml die geringste produzierte Partikelmenge. Die Daten der Durchflusszytometrie, die zur Titerberechnung genutzt wurden, sind beispielhaft in **Abb.6** dargestellt. Die dargestellten Zellpopulationen zeigen nur die lebendigen Zellen der Proben, da eine Vorauswahl der Zellgröße und Granularität angewandt wurde (Lebend-Gating). Eine exemplarische Abbildung des Lebend-Gating und eine Tabelle mit den Titern aller produzierter Viren ist in dem Appendix zu finden.

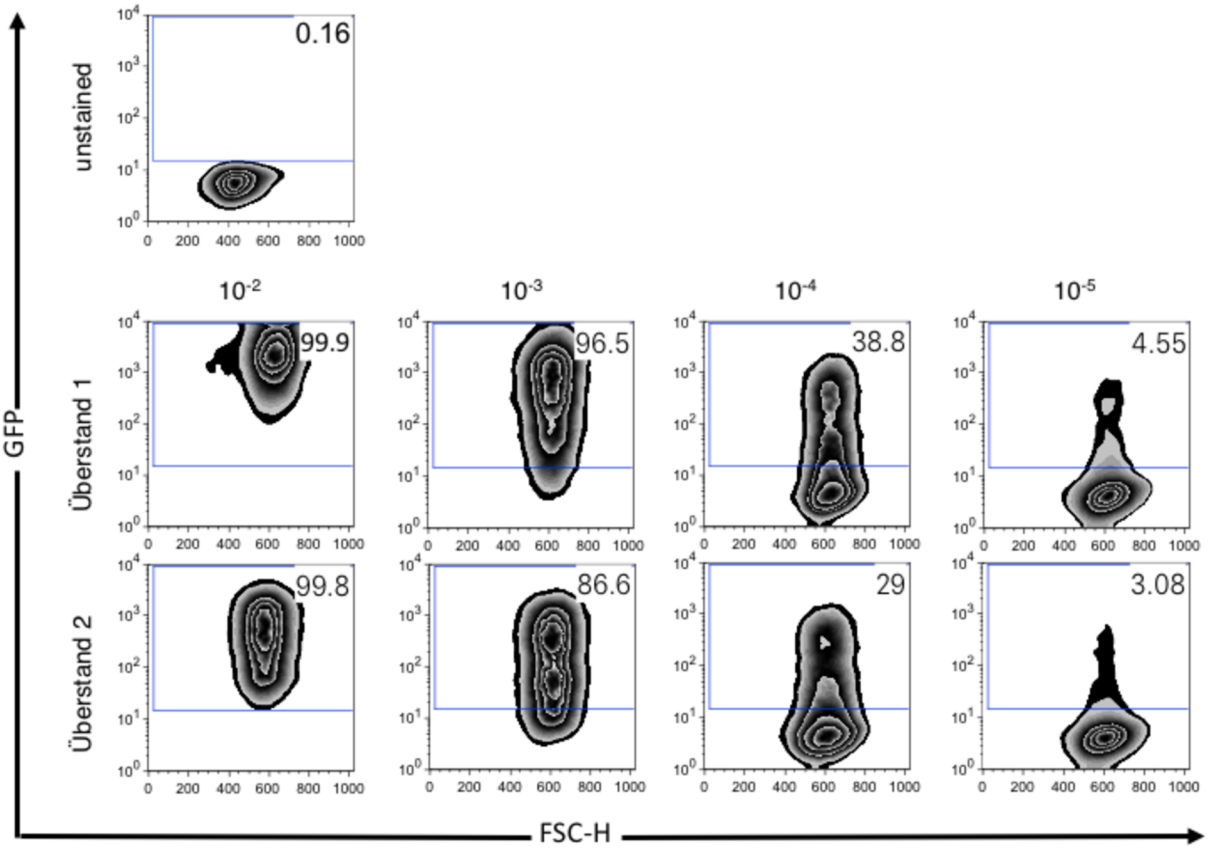


Abb. 6 Virustiterbestimmung
Die GFP⁺ Zellen [angegeben in %] dienten zur Berechnung des Virustiters (Formel in **3.7.2** Virustiterbestimmung). HL-60 Zellen wurden mit dem hergestellten Virusüberstand in den Verdünnungen 10^{-2}-10^{-5} transduziert. Die nachfolgende Bestimmung der GFP⁺ Zellen per Durchflusszytometrie wurden zur Titerbestimmung der jeweiligen Überstände genutzt. [repräsentative Abbildung, Lebend-Gating]

4.3 Evaluation der Vektoren

Die drei lentiviralen Vektoren Lv.SFFV.Ifnγr1, Lv.MSP.Ifnγr1 und Lv.miR223.Ifnγr1 wurden zu Beginn der Arbeit *in vitro* evaluiert. Für die Evaluation wurden eine murine Zelllinie und KM-abgeleitete Makrophagen mit den Vektoren transduziert und anschließend analysiert. Da sich das Transgen aller Vektoren aus dem Ifnγr1 Gen und dem GFP-Gen zusammensetzt, ergaben sich für die Evaluation der Vektoren mehrere Möglichkeiten. Einerseits konnte die erfolgreiche Transduktion über das Vorhandensein des grün-fluoreszierenden Proteins nachgewiesen werden und andererseits diente der Nachweis der (gesteigerten) IFNγR1-Expression auf der Zelloberfläche ebenfalls als Beweis der erfolgreichen Transduktion. Die Bezeichnung „Mock" wurde im Folgenden für Zellen genutzt, deren Prozedur identisch mit derjenigen Vektor-transduzierter Zellen war, ohne dass die Zellen genetisch verändert wurden. Somit beschreibt Mock in Abhängigkeit des betrachteten Experimentes untransduzierte RAW264.7 Zellen, WT-MΦ oder Ifnγr1$^{-/-}$-MΦ.

4.3.1 Evaluation der Vektoren in der RAW264.7-Zelllinie

Hierfür wurde die murine Makrophagen Zelllinie RAW264.7 mit den drei lentiviralen Vektoren Lv.SFFV.Ifnγr1, Lv.MSP.Ifnγr1 und Lv.miR223.Ifnγr1 transduziert. Die MOI betrug jeweils 10, 20 und 50 um die bestmögliche Transduktionseffizienz zu evaluieren. Zur Ermittlung der Transduktionseffizienz wurde die GFP-Expression von RAW264.7$^{Lv.SFFV.Ifn\gamma r1}$, RAW264.7$^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und RAW264.7$^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die maximale, über alle Versuchsansätze betrachtete, erzielte Transduktionseffizienz betrug 70,7% bei einer MOI von 20, wie in den Daten der Durchflusszytometrie in **Abb. 7 A** zu erkennen ist. Daher wurde entschieden die GFP$^+$ Zellen mittels Durchflusszytometrie zu sammeln. Daraufhin betrug die GFP-Expression in RAW264.7$^{Lv.SFFV.Ifn\gamma r1}$, RAW264.7$^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und RAW264.7$^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ über 90% (**Abb. 7 B**). Im Folgenden wurde die IFNγR1-Expression mittels Antikörperfärbung überprüft, um die vollständige Transgenexpression der Vektoren nachzuweisen. Die CD 119 (IFNγR1) Färbung zeigte eine erhöhte Expression des IFNγR1 in GFP$^+$ Zellen im Vergleich zur IFNγR1-Expression in untransduzierten WT Zellen (**Abb.7 C** und **D**).

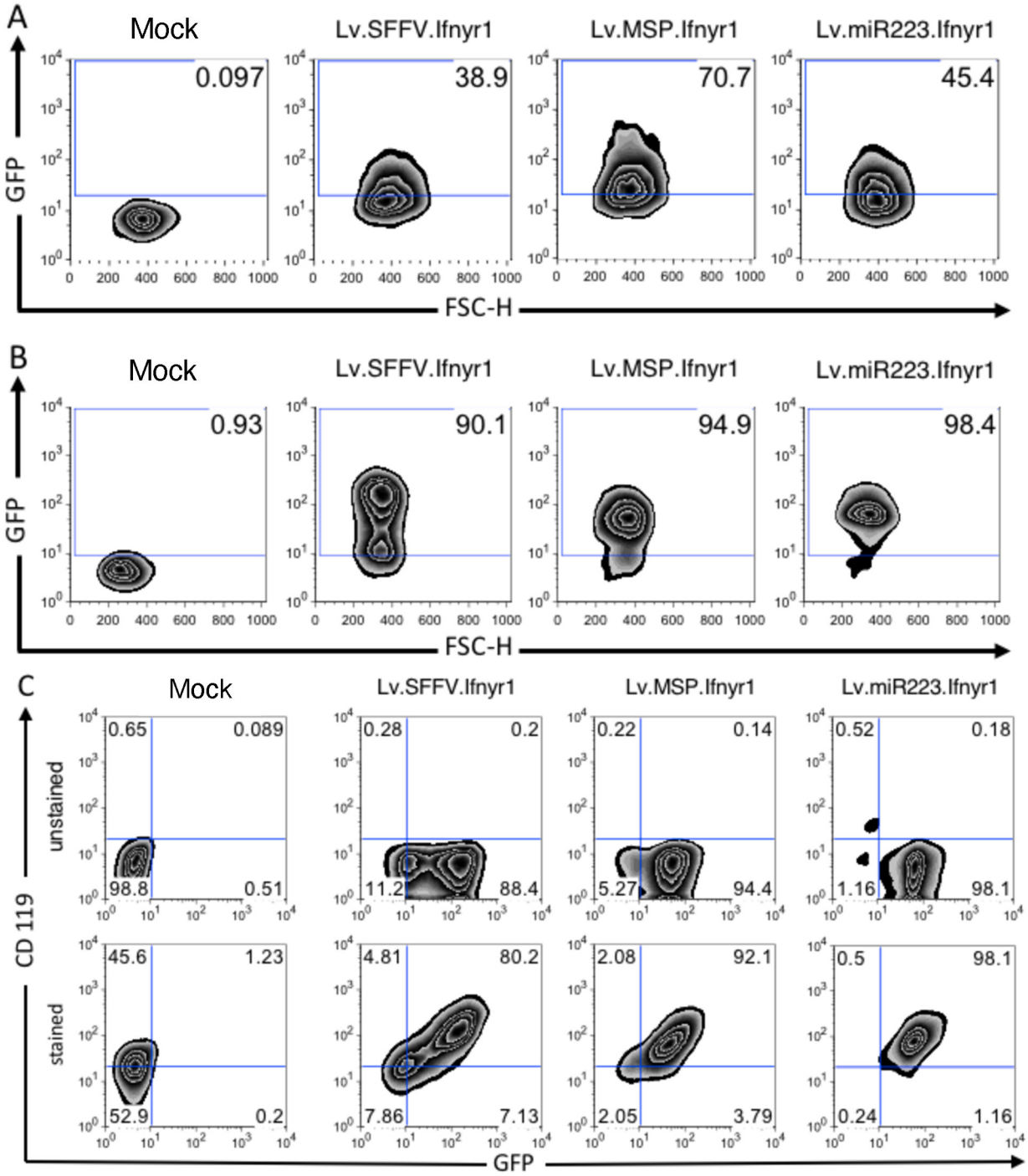
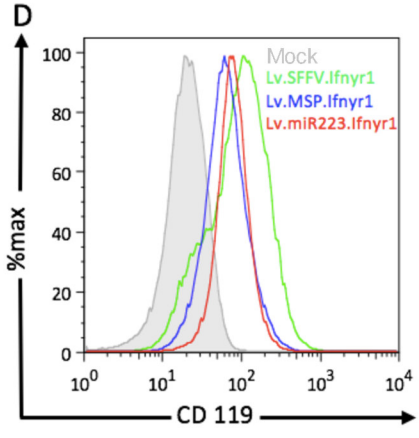


Abb. 7 Vektorevaluation RAW264.7 Zelllinie

A GFP Expression [angegeben in %] muriner RAW264.7 Zellen nach der Transduktion mit Lv.SFFV.Ifnγr1 (MOI 20), Lv.MSP.Ifnγr1 (MOI 20) und Lv.miR223.Ifnγr1 (MOI 50). **B** GFP Expression [angegeben in %] von RAW264.7$^{Lv.SFFV.Ifn\gamma r1}$, RAW264.7$^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und RAW264.7$^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ nach dem Sammeln GFP$^+$ Zellen per Durchflusszytometrie. **C** IFNγR1 Expression aufgetragen gegen die GFP Expression. Die GFP$^+$ RAW264.7$^{Lv.SFFV.Ifn\gamma r1}$, RAW264.7$^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und RAW264.7$^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ zeigen eine klare Expression des IFNγR1 wohingegen eine geringe Färbung mit dem CD119 Ak bei den untransduzierten WT Zellen vorliegt. **D** Overlay der CD119 Expression von RAW264.7$^{Lv.SFFV.Ifn\gamma r1}$, RAW264.7$^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$, RAW264.7$^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ und WT. Die eindeutig erhöhte Expression des Transgens in transduzierten Zellen ist ersichtlich. [**A-D** Lebend-Gate, n=1]



4.3.2 Evaluation der Vektoren in Knochenmark-abgeleiteten Makrophagen

4.3.2.1 Evaluation der Vektoren in Wildtyp-Knochenmark-abgeleiteten Makrophagen

Nach der Präparation des Knochenmarks einer Maus mit unverändertem Genotyp (WT) wurde eine Lineage Depletion mit den isolierten Zellen durchgeführt (beschrieben in: **3.2** Isolation muriner hämatopoetischer Stammzellen aus dem Knochenmark). Die Lin^--Zellen wurden mit den lentiviralen Vektoren Lv.SFFV.Ifnγr1, Lv.MSP.Ifnγr1 und Lv.miR223.Ifnγr1 transduziert. Da die Transduktionseffizienz in den Lin^--Zellen noch geringer war (**Abb.8 A**) als in der murinen Zelllinie RAW264.7 (vgl. **4.3.1** Evaluation der Vektoren in der RAW264.7-Zelllinie), wurde entschieden, die GFP^+ Zellen mittels Durchflusszytometrie für einige der nachfolgenden Versuche zu sammeln. Bei den in **Abb. 8** gezeigten Daten kam es nur bei $M\Phi^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ zur Sammlung GFP^+ Zellen. Im Folgenden wurden die Zellen zu Makrophagen (MΦ) differenziert (Nachweis der Differenzierung in: **4.4.2.1** Evaluation des Differenzierungspotentials transduzierter Wildtyp-Makrophagen) und die Vektoren evaluiert. Hierfür wurde einerseits die GFP-Expression mittels Fluoreszenz-Aufnahmen der Zellen überprüft und die IFNγR1-Expression mittels Antikörperfärbung untersucht. Die Fluoreszenz-Aufnahmen von $M\Phi^{Lv.SFFV.Ifn\gamma r1}$, $M\Phi^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und $M\Phi^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ zeigten spezifische Fluoreszenz für GFP (vgl. **Abb.8 B-E**). In der IFNγR1-Antikörperfärbung konnten keine Unterschiede in der Expression des IFNγR1 zwischen transduzierten und WT MΦ gezeigt werden (vgl. **Abb. 8 F**). Da die GFP Expression klar nachzuweisen war und der Nachweis der IFNγR1-Expression mittels Antikörperfärbung in der Arbeitsgruppe bereits zu früheren Zeitpunkten Probleme bereitete, wurde vermutet, dass der CD 119 Antikörper (eBioScience) teilweise nicht korrekt bindet.

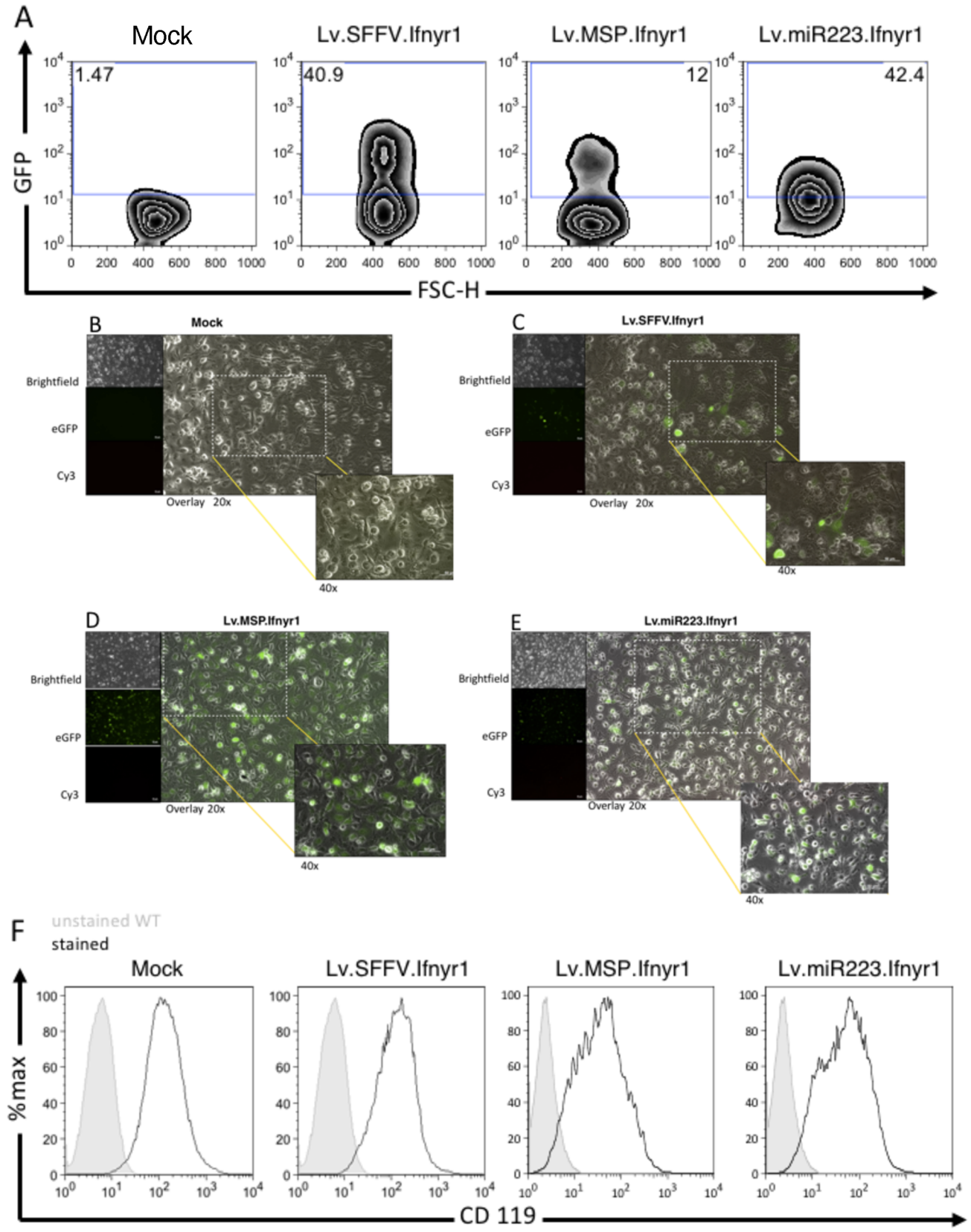


Abb. 8 Vektorevaluation in WT-KM abgeleiteten MΦ

A GFP Expression [angegeben in %] von WT MΦ, WT $M\Phi^{Lv.SFFV.Ifn\gamma r1}$, WT $M\Phi^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und WT $M\Phi^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$. **B-E** Mikroskopische Aufnahmen von WT-KM abgeleiteten MΦ. Vergrößerung 20x für Brightfield, eGFP-Filter, Cy3-Filter und Overlay und eine 40x Ausschnittvergrößerung. **B** Untransduzierte MΦ, keine Fluoreszenz sichtbar. **C** $M\Phi^{Lv.SFFV.Ifn\gamma r1}$, Fluoreszenz spezifisch im eGFP Filter. **D** $M\Phi^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$, Fluoreszenz spezifisch im eGFP Filter. **E** $M\Phi^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ Fluoreszenz spezifisch im eGFP Filter. **F** CD 119 Ak Färbung von WT MΦ, WT $M\Phi^{Lv.SFFV.Ifn\gamma r1}$, WT $M\Phi^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und WT $M\Phi^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$. [**A** Lebend-Gate, n=1; **F** Lebend-Gate, transduzierte MΦ: GFP^+-Gate, n=2]

4.3.2.2 Evaluation der myeloidspezifischen Vektoren in Ifnγr1$^{-/-}$-Knochenmark-abgeleiteten Makrophagen

Nach der Präparation des Knochenmarks einer Maus, in welcher das Ifnγr1 Gen deaktiviert wurde (Ifnγr1$^{-/-}$), wurde eine Lineage Depletion mit den isolierten Zellen durchgeführt (beschrieben in: **3.2** Isolation muriner hämatopoetischer Stammzellen aus dem Knochenmark). Die Lin^{-}-Zellen wurden mit den myeloidspezifischen lentiviralen Vektoren Lv.MSP.Ifnγr1 und Lv.miR223.Ifnγr1 transduziert und die GFP^{+} Zellen wurden, ebenfalls aufgrund der geringen Transduktionseffizienz, mittels Durchflusszytometrie gesammelt. Im Folgenden wurden die Zellen zu Makrophagen (MΦ) differenziert (Nachweis der Differenzierung in: **4.4.2.2** Evaluation des Differenzierungspotentials transduzierter Ifnγr1$^{-/-}$-Makrophagen) und die Vektoren evaluiert. Hierfür wurde einerseits die GFP-Expression mittels Fluoreszenz-Aufnahmen der Zellen überprüft und die IFNγR1-Expression mittels Antikörperfärbung untersucht. Die Fluoreszenz-Aufnahmen von MΦ$^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und MΦ$^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ zeigten spezifische Fluoreszenz für GFP im Vergleich zu den untransduzierten Ifnγr1$^{-/-}$-MΦ (**Abb.9 A-C**). Die CD 119 Färbung zeigte eine klar erhöhte Expression des IFNγR1 in korrigierten Zellen, ungefähr 4-fach erhöhte MFI in MΦ$^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und 3-fach erhöhte MFI in MΦ$^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$, gegenüber untransduzierten Ifnγr1$^{-/-}$-MΦ (**Abb.9 D&E**). Die dargestellten Graphen von MΦ$^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und MΦ$^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ in **Abb.9 D&E** zeigen nur die GFP^{+} Zellen der Proben, da eine Vorauswahl der GFP-Expression angewandt wurde. Eine exemplarische Abbildung des GFP^{+}-Gating ist in dem Appendix zu finden.

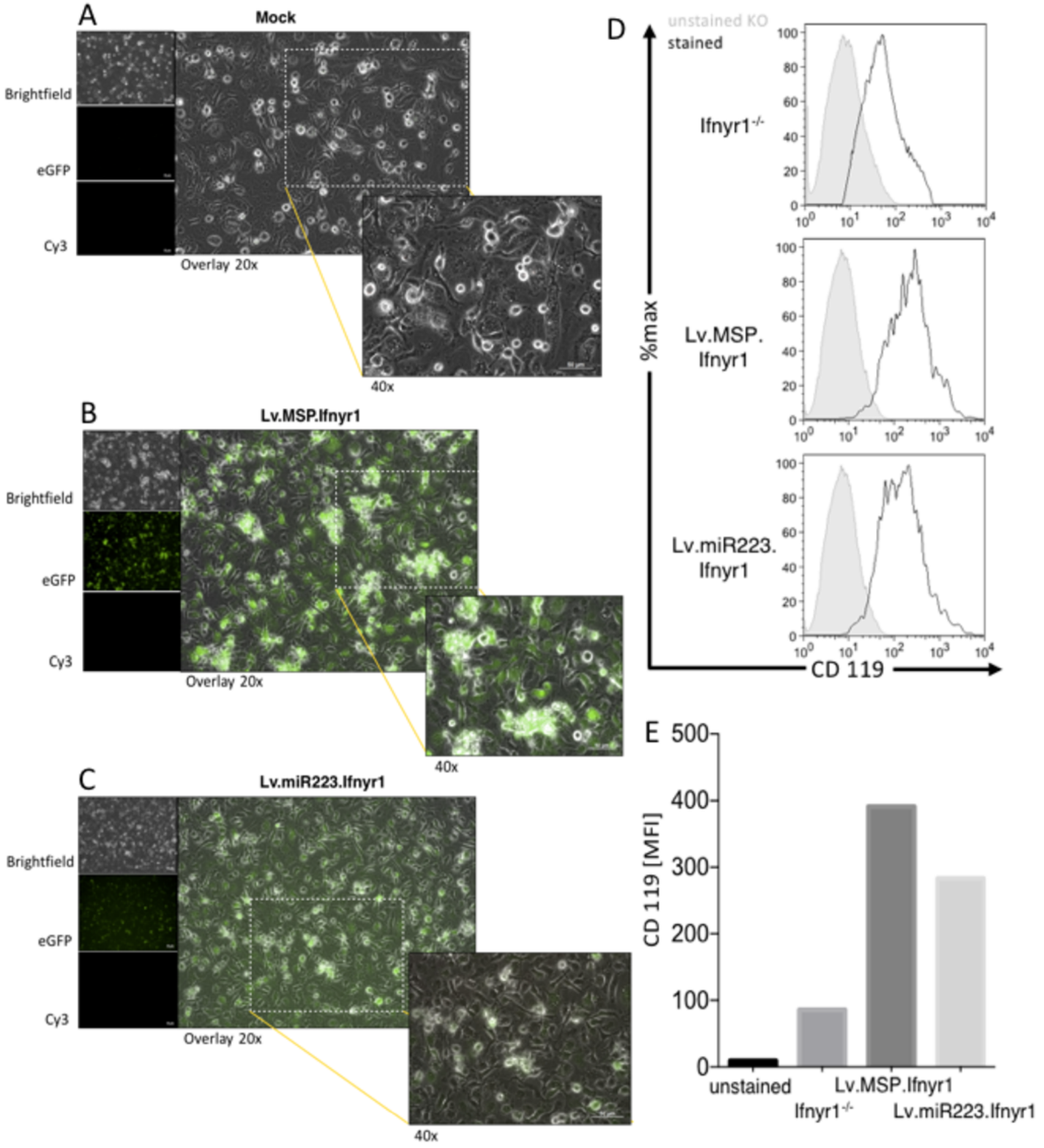


Abb. 9 Vektorevaluation in Ifnγr1$^{-/-}$-KM abgeleiteten MΦ

A-C Mikroskopische Aufnahmen von Ifnγr1$^{-/-}$-KM abgeleiteten MΦ. Vergrößerung 20x für Brightfield, eGFP-Filter, Cy3-Filter und Overlay und eine 40x Ausschnittvergrößerung. **A** Untransduzierte MΦ, keine Fluoreszenz sichtbar. **B** MΦ$^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$, Fluoreszenz spezifisch im eGFP Filter. **C** MΦ$^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ Fluoreszenz spezifisch im eGFP Filter. **D** CD 119 Ak Färbung von Ifnγr1$^{-/-}$MΦ, MΦ$^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und MΦ$^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$, deutlich erkennbar erhöhte Ak-Bindung in korrigierten MΦ. **E** Hier ist die mittlere fluoreszierende Intensität der Proben, welche in **D** abgebildet sind, dargestellt. Eine deutlich erkennbare erhöhte Ak-Bindung in korrigierten MΦ ist sichtbar.
[**D&E** Lebend-Gate, MΦ$^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und MΦ$^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ GFP^{+}-Gate, n=2, repräsentative Abbildung]

4.4 Evaluation der Vektorensicherheit

4.4.1 Evaluation der Vektorensicherheit in der RAW264.7-Zelllinie

Es wurde untersucht ob die Vektoren einen pathologischen Einfluss auf die transduzierten Zellen haben. Das Augenmerk lag dabei auf der Teilungsrate, Zellviabilität und der stabilen Transgenexpression. Für die Versuche in der RAW264.7-Zelllinie wurden die Zellen mit den drei lentiviralen Konstrukten Lv.SFFV.Ifnγr1, Lv.MSP.Ifnγr1 und Lv.miR223.Ifnγr1 transduziert und die GFP^+ Zellen mittels Durchflusszytometrie gesammelt. In den Versuchen betrug die GFP-Expression von $RAW264.7^{Lv.SFFV.Ifn\gamma r1}$, $RAW264.7^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und $RAW264.7^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ daher über 90% (**Abb.10 A und Abb.11 A**). Da in dem Transgen Ifnγr1.IRES.eGFP das Ifnγr1 Gen und das eGFP-Gen gekoppelt sind, ist davon auszugehen, dass es bei einer GFP-Expression zur simultanen IFNγR1-Expression kommt.

4.4.1.1 Beurteilung der Teilungsrate transduzierter Zellen

Die Teilungsrate untransduzierter muriner RAW264.7 Zellen wurde mit der Teilungsrate von $RAW264.7^{Lv.SFFV.Ifn\gamma r1}$, $RAW264.7^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und $RAW264.7^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ verglichen. Hierfür wurden jeweils 200.000 Zellen mit dem Proliferationsmarker Dye eFluor® 670 angefärbt und zum Zeitpunkt 0h und 48h mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Veränderung der mittleren fluoreszierenden Intensität (Δ MFI) des eFluor® 670-Markers wurde zur Bestimmung der Teilungsrate genutzt. Die Δ MFI wurde durch die Subtraktion des 48h MFI-Wert vom 0h MFI-Wert errechnet. Die $RAW264.7^{Lv.SFFV.Ifn\gamma r1}$ wiesen im Vergleich zu den (untransduzierten) WT-Zellen keinen signifikanten Unterschied in ihrer Proliferationsrate auf (**Abb.10 B**). Die myeloidspezifischen Vektorvarianten $RAW264.7^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und $RAW264.7^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ wiesen im Vergleich zu den WT-Zellen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in ihren Proliferationsraten auf (**Abb.10 C**). Somit konnte gezeigt werden, dass die Transduktion von RAW264.7 Zellen mit den lentiviralen Vektoren Lv.SFFV.Ifnγr1, Lv.MSP.Ifnγr1 und Lv.miR223.Ifnγr1 keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferationsrate hat.

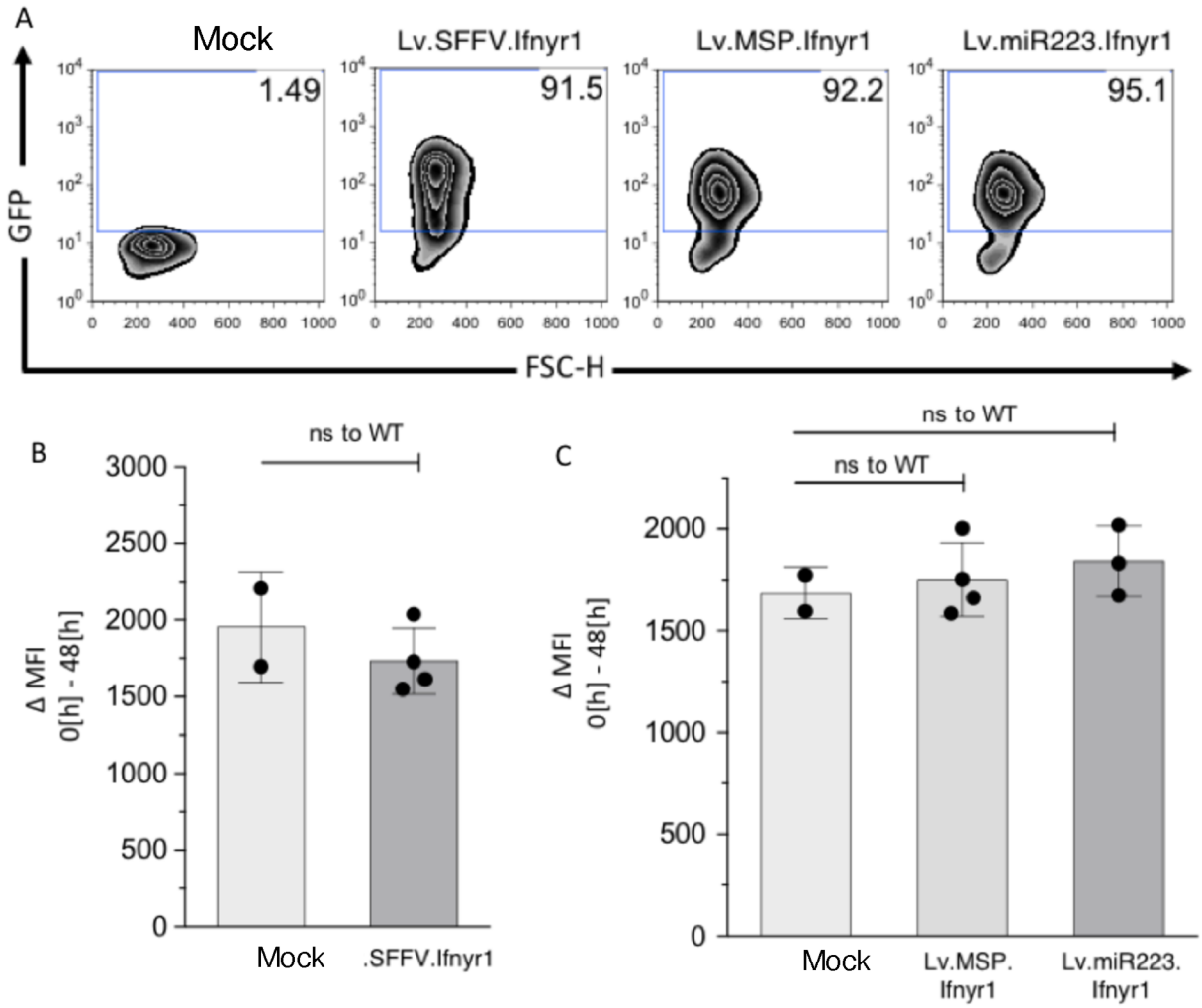


Abb. 10 Evaluation der Teilungsrate transduzierter RAW264.7 Zellen
A Über 90% der RAW264.7$^{Lv.SFFV.Ifn\gamma r1}$, RAW264.7$^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und RAW264.7$^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ exprimierten GFP. **B&C** Differenz der mittleren fluoreszierenden Intensität zwischen 0h und 48h nach Färbung mit dem Proliferationsmarker eFluor® 670 **B** Untransduzierte RAW264.7 Zellen im Vergleich zu RAW264.7$^{Lv.SFFV.Ifn\gamma r1}$, keine signifikanten Unterschiede. **C** Untransduzierte RAW264.7 Zellen im Vergleich zu RAW264.7$^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und RAW264.7$^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$, keine signifikanten Unterschiede. [**A-C** Lebend-Gate **B** n=2-4, ungepaarter t-test mit Standardabweichung (SA) **C** n=3-4 einfache Varianzanalyse; Rohdaten beispielhaft im Appendix dargestellt]

4.4.1.2 Beurteilung der Zellviabilität transduzierter Zellen

Die Überlebensfähigkeit untransduzierter muriner RAW264.7 Zellen wurde mit der Überlebensfähigkeit von RAW264.7$^{Lv.SFFV.Ifn\gamma r1}$, RAW264.7$^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und RAW264.7$^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ verglichen. Hierfür wurden 200.000 Zellen zu den beiden Zeitpunkten 0h und 48h mit 1µl Propidiumiodid (PI) angefärbt und der Anteil PI$^+$ Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. PI ist ein Farbstoff, welcher die Zellmembranen abgestorbener Zellen durchwandert und im Folgenden mit den Nukleinsäuren der DNA interkaliert. In diesem Versuch wurde daher auf die Vorauswahl auf lebendige Zellen verzichtet. Die RAW264.7$^{Lv.SFFV.Ifn\gamma r1}$ zeigten im Vergleich zu den (untransduzierten) WT-Zellen keine signifikante Differenz im Anteil PI$^+$ Zellen (**Abb.11 B**). Die myeloidspezifischen Vektorvarianten RAW264.7$^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und

RAW264.7$^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ zeigten im Vergleich zu den WT-Zellen ebenfalls keine signifikante Differenz im Anteil PI^{+} Zellen (**Abb.11 C**). Somit konnte gezeigt werden, dass die Transduktion von RAW264.7 Zellen mit den lentiviralen Vektoren Lv.SFFV.Ifnγr1, Lv.MSP.Ifnγr1 und Lv.miR223.Ifnγr1 keinen signifikanten Einfluss auf die Überlebensfähigkeit hat.

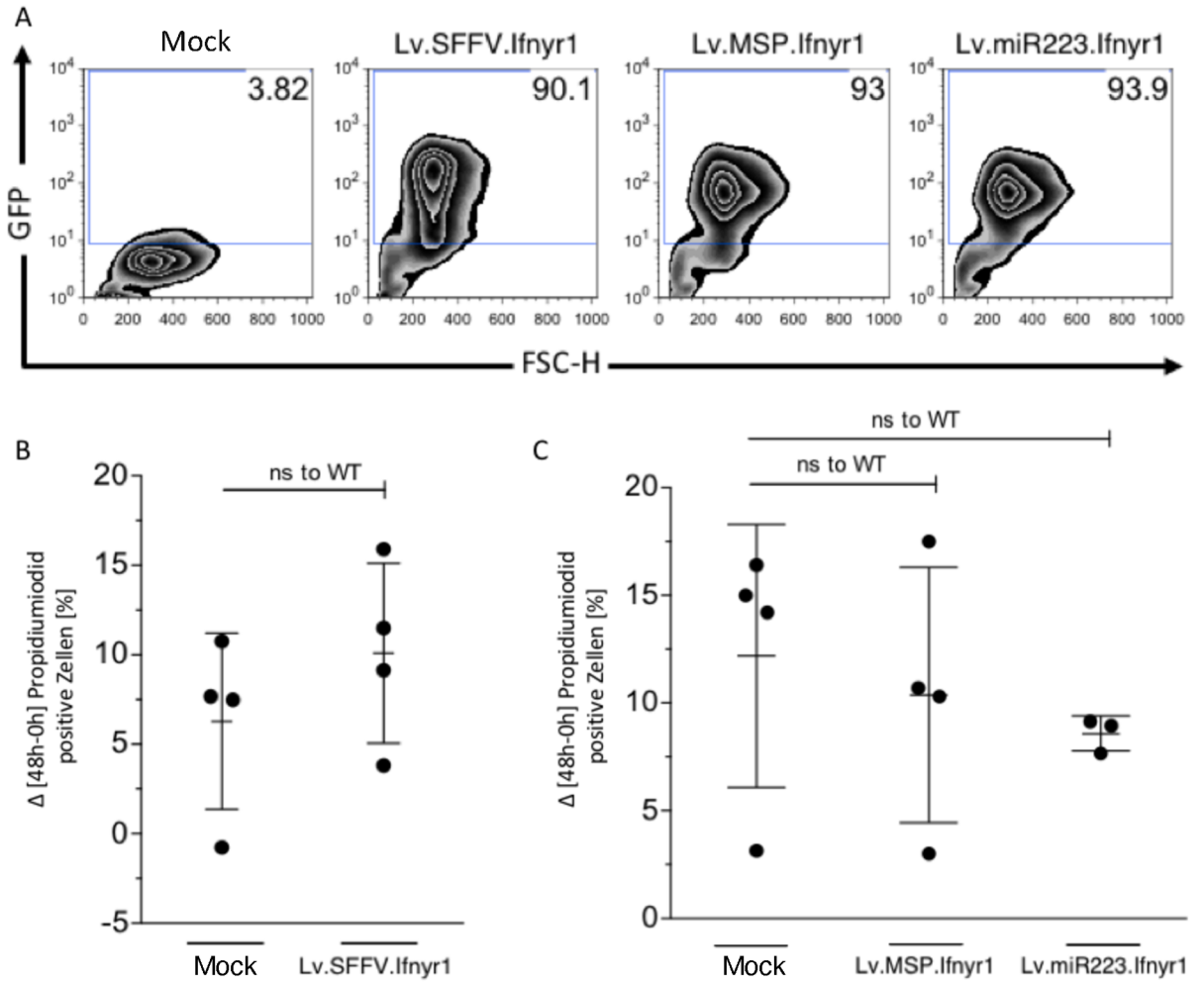


Abb. 11 Evaluation der Zellviabilität transduzierter RAW264.7 Zellen
A Über 90% der RAW264.7$^{Lv.SFFV.Ifn\gamma r1}$, RAW264.7$^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und RAW264.7$^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ exprimierten GFP. **B&C** Prozentuale Differenz der Propidiumiodid positiven Zellen zwischen 0h und 48h. **B** Untransduzierte RAW264.7 Zellen im Vergleich zu RAW264.7$^{Lv.SFFV.Ifn\gamma r1}$, keine signifikanten Unterschiede. **C** Untransduzierte RAW264.7 Zellen im Vergleich zu RAW264.7$^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und RAW264.7$^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$, keine signifikanten Unterschiede. [**B** n=4, ungepaarter t-test mit SA **C** n=3-4, einfache Varianzanalyse]

4.4.1.3 Untersuchung der stabilen Transgenexpression

Da die stabile Transgenexpression für die angestrebte Gentherapie von entscheidender Bedeutung ist, wurde diese über einen 4-wöchigen Zeitraum wöchentlich per Durchflusszytometrie untersucht. Hierfür wurde die GFP-Expression von RAW264.7$^{Lv.SFFV.Ifn\gamma r1}$, RAW264.7$^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und RAW264.7$^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ zu den Zeitpunkten Woche 1 bis Woche 4 ermittelt. Sowohl die Vektorvariante mit dem konstitutiven Promotor (SFFV) wie auch die beiden Vektorvarianten mit den myeloidspezifischen Promotoren (MSP und miR223) zeigten keine Veränderungen in der Transgenexpression im zeitlichen Verlauf. Der Anteil

an GFP$^+$ Zellen aus den Gruppen RAW264.7$^{Lv.SFFV.Ifn\gamma r1}$, RAW264.7$^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und RAW264.7$^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ betrug zu jedem Zeitpunkt über 90%. Der Anteil an GFP$^+$ Zellen der WT-Zellen betrug zu jedem Zeitpunkt unter 0,5%. Die GFP$^+$ WT-Zellen sind am ehesten durch die Autofluoreszenz abgestorbener Zellen zu erklären, welche fälschlicherweise im Lebend-Gate erfasst wurden.

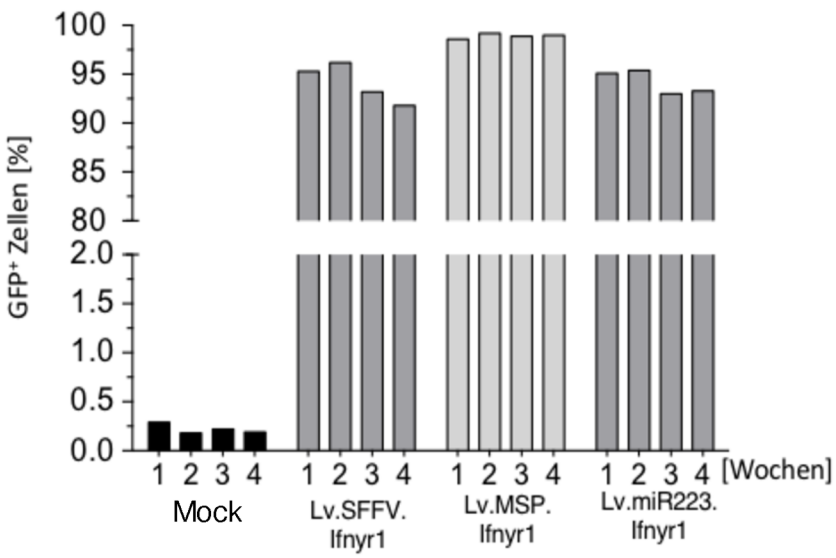


Abb. 12 Evaluation der Transgenexpression in RAW264.7 Zellen
Die GFP-Expression in (untransduzierten) WT Zellen betrug zu jedem Zeitpunkt, Woche 1-4, unter 0,5%. In RAW264.7$^{Lv.SFFV.Ifn\gamma r1}$, RAW264.7$^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und RAW264.7$^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ kam es zur stabilen Expression des Transgens über den gesamten Versuchszeitraum. In keinem der Versuchsansätze zeigten sich ausgeprägte Expressionsdifferenzen zwischen den einzelnen Zeitpunkten. [Lebend-Gate, n=1]

4.4.2 Evaluation der Vektorensicherheit in Knochenmark-abgeleiteten Makrophagen

In diesem Abschnitt wurde untersucht ob die Vektoren einen pathologischen Einfluss auf KM-abgeleiteten MΦ haben. Hierfür wurde das Differenzierungspotential muriner transduzierter Lin$^-$-Zellen zu MΦ und die Teilungsrate transduzierter MΦ untersucht. Außerdem wurde eine mögliche Auswirkung der Überexpression des IFNγR1 in Folge der Transduktion in Bezug auf andere Rezeptor-vermittelte Signalwege in der Zelle überprüft. Für die Versuche wurden Lin$^-$-Zellen mit den Vektoren Lv.SFFV.Ifnγr1, Lv.MSP.Ifnγr1 und Lv.miR223.Ifnγr1 transduziert und zu MΦ differenziert. In einem Teil der folgenden Versuche wurden die GFP$^+$ HSZ vor ihrer Differenzierung mittels Durchflusszytometrie gesammelt. Die Bezeichnung „Mock“ wurde im folgenden Text und in den folgenden Abbildungen für MΦ genutzt, deren Prozedur identisch mit derjenigen Vektor-transduzierter MΦ war, mit der Ausnahme, dass kein Virus in das Transduktionswell hinzugegeben wurde. In der nachfolgenden **Abb. 13** ist der Umgang mit den Zellen bis hin zum Versuch schematisch dargestellt.

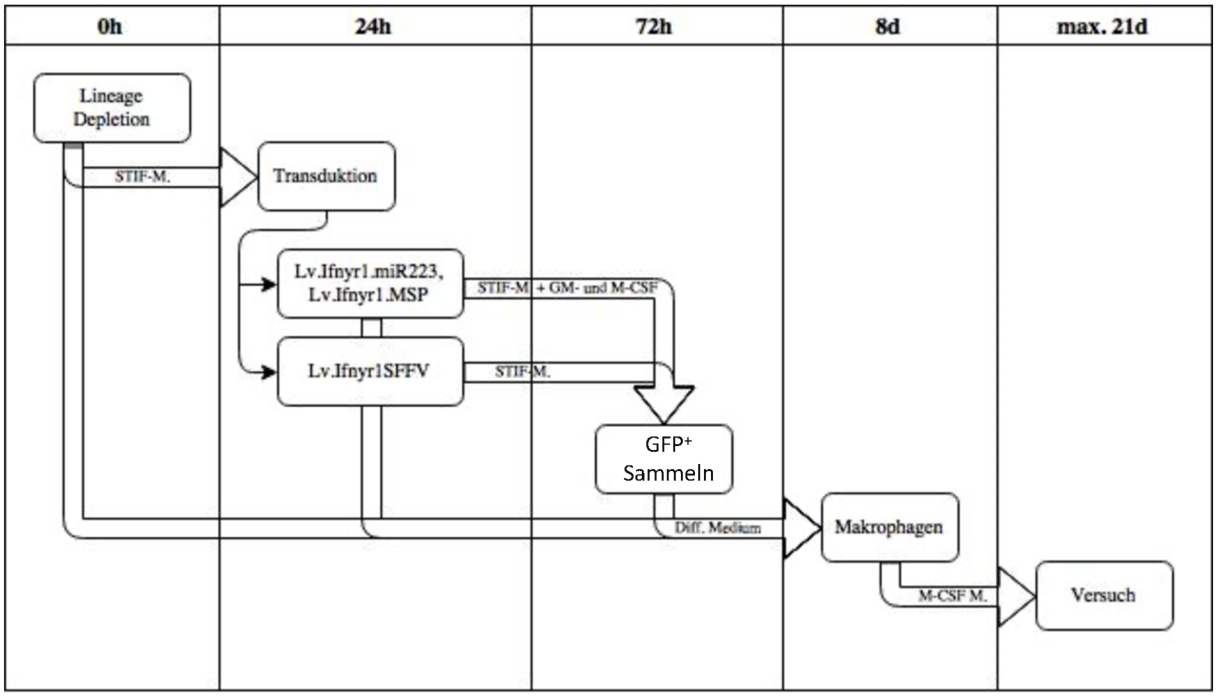


Abb. 13 Schema der Prozedur muriner Lin$^-$-Zellen
Diese Abbildung ist ebenfalls im Diagramm 1, unter **3.3 Zellkultur - murine hämatopoetische Stammzellen (mHSZ)**, zu finden. Dargestellt ist der Umgang Lin$^-$-Zellen vom Zeitpunkt der Lineage Depletion bis hin zum Versuch der im Differenzierungsprozess entstandenen MΦ. Im Schema sind mögliche Abweichungen zum Protokoll, welches in **3.3 Zellkultur - murine hämatopoetische Stammzellen (mHSZ)** beschrieben ist, dargestellt. Die Lin$^-$-Zellen wurden 24h im STIF-Medium (10 ng/ml SCF, 20 ng/ml TPO, 20 ng/ml IGF, 10 ng/ml FGF) prästimuliert. Die Transduktion erfolgte mit einer MOI von 20. In den folgenden 48h bis zum Sammeln der GFP$^+$ Zellen mittels Durchflusszytometrie wurden die Lv.SFFV.Ifnγr1-transduzierten Zellen weiterhin in STIF-Medium kultiviert, wohingegen Lv.MSP.Ifnγr1- und Lv.miR223.Ifnγr1-transduzierte Zellen zusätzlich mit 20 ng/ml GM-CSF und 20 ng/ml M-CSF prädifferenziert wurden. Die Prädifferenzierung diente der frühen Expression von GFP in den myeloidspezifischen Vektoren. Die anschließende 5-tägige endgültige Differenzierung zu MΦ geschah in einem zu 30% aus dem Überstand M-CSF-produzierender Zellen bestehenden Medium (M-CSF-Medium) mit dem Zusatz von 10 ng/ml IL-3 und 20 ng/ml GM-CSF (Diff.-Medium). Bis zum Versuch wurden die MΦ in dem bereits erwähnten M-CSF-Medium kultiviert. In den nachfolgenden Versuchen wird im Vorhinein darauf hingewiesen, falls es zu Abweichungen des Protokolls kam.

4.4.2.1 Evaluation des Differenzierungspotentials transduzierter Wildtyp-Makrophagen

Um das Differenzierungspotential von transduzierten murinen Lin$^-$-Zellen zu Makrophagen zu zeigen, wurden die Zellen mit Lv.SFFV.Ifnγr1, Lv.MSP.Ifnγr1 und Lv.miR223.Ifnγr1 transduziert und für 5 Tage mit 10 ng/ml mGM-CSF und 10 ng/ml mIL-3 in einem Medium (M-CSF Medium), welches zu 30% aus dem Überstand einer M-CSF produzierenden Zelllinie (L 929) bestand, stimuliert. Nach weiteren 7 Tagen Kultivierung im M-CSF-Medium wurde die Expression verschiedener Antigene auf der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Lin$^-$-Zellen stammen aus einer WT-Maus.

Die Rezeptor-Typ Tyrosin-Proteinphosphatase C (CD 45) findet sich als Oberflächenprotein auf allen kerntragenden hämatopoetischen Zellen(87).

Integrin alpha M (CD 11b) ist die Untereinheit eines heterodimeren Integrin-Moleküls und wird in Monozyten, Granulozyten, NK-Zellen und Makrophagen exprimiert(88).

Das EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1 Protein (F4/80) wird im murinen System fast ausschließlich auf Makrophagen exprimiert(89) und stellt somit den spezifischsten der genutzten Marker dar.

In den Versuchen konnte die eindeutige Expression aller oben erwähnten Antigene sowohl auf untransduzierten $M\Phi^{Mock}$ wie auch auf $M\Phi^{Lv.SFFV.Ifn\gamma r1}$, $M\Phi^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und $M\Phi^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ gezeigt werden (vgl. **Abb. 14**). Ebenso konnte eine mit der untransduzierten Kontrolle, $M\Phi^{Mock}$, annähernd identische Expression von CD 45.1 in allen transduzierten MΦ nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigte sich ein annähernd gleiches Expressionsmuster von CD 11b und F4/80 in den $M\Phi^{Lv.SFFV.Ifn\gamma r1}$ verglichen mit $M\Phi^{Mock}$. Die Expressionskurven von CD 11b und F4/80 der $M\Phi^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und $M\Phi^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ wiesen im Vergleich mit den $M\Phi^{Mock}$ eine geringe Linksverschiebung auf der X-Achse auf. Diese Linksverschiebung ist auch in der, in allen Histogrammen dargestellten (grau hinterlegt), ungefärbten, zeitgleich durchgeführten $M\Phi^{Mock}$-Probe desselben Experimentes zu erkennen gewesen. Die Daten der Durchflusszytometrie sind in **Abb. 14** dargestellt.

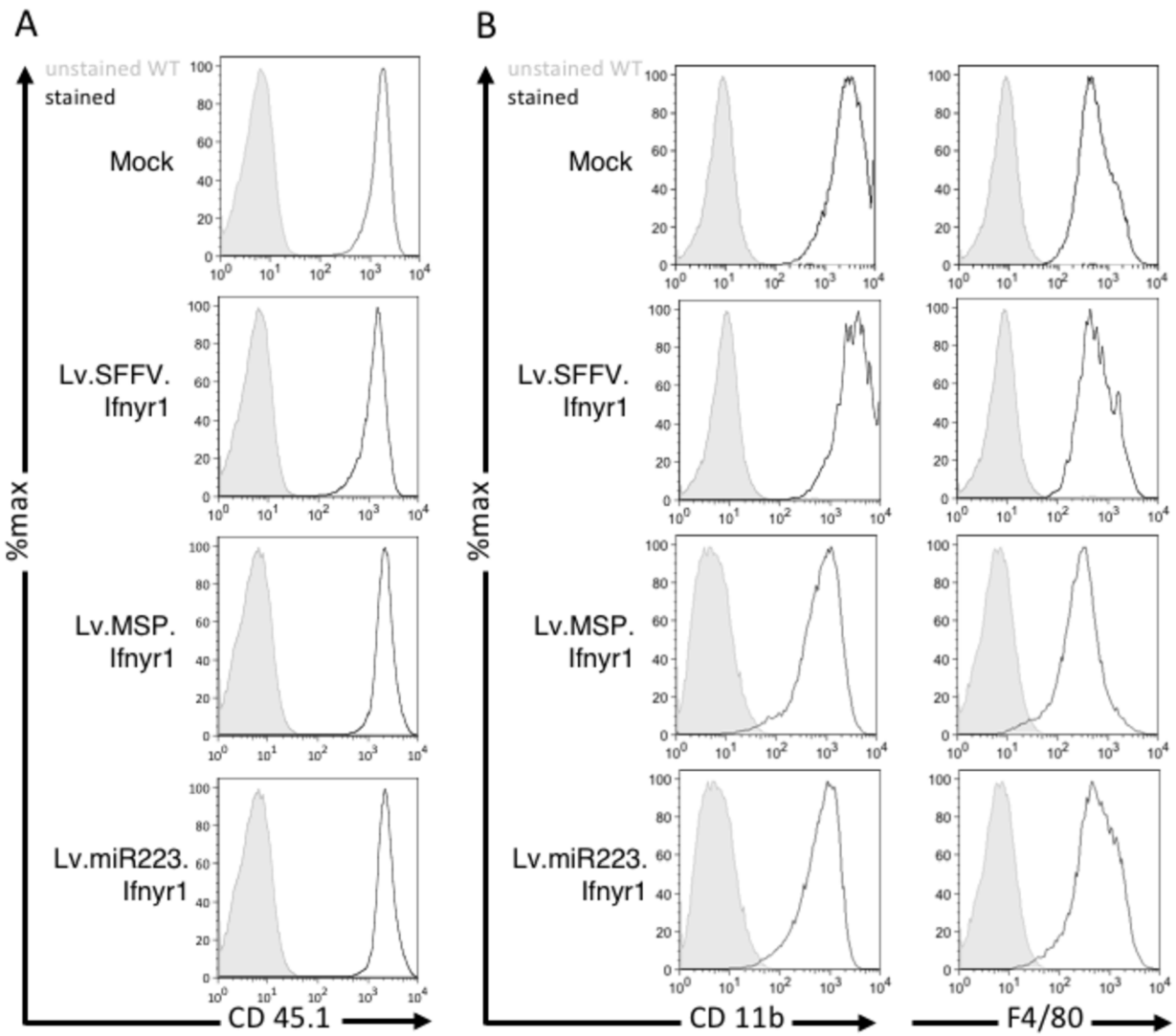


Abb. 14 Differenzierungsmarker WT-KM abgeleiteter Makrophagen
Dargestellt sind die mit dem jeweiligen Antikörper gefärbten Zellen als Histogramm. Außerdem ist die ungefärbte $M\Phi^{Mock}$ Kontrolle des jeweiligen Experimentes abgebildet. **A** Die Expression von CD 45.1 in $M\Phi^{Lv.SFFV.Ifn\gamma r1}$, $M\Phi^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und $M\Phi^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ war annähernd gleich der Expression von CD 45.1 in der untransduzierten Kontrolle $M\Phi^{Mock}$. **B** Die Expression von CD 11b und F4/80 in $M\Phi^{Lv.SFFV.Ifn\gamma r1}$ war annähernd gleich der Expression von CD 11b und F4/80 in der untransduzierten Kontrolle $M\Phi^{Mock}$. Die Expressionskurve von CD 11b und F4/80 der $M\Phi^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und $M\Phi^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ zeigte eine geringe Linksverschiebung auf der X-Achse im Vergleich zu der Expressionskurve von CD 11b und F4/80 der untransduzierten Kontrolle $M\Phi^{Mock}$. [**A&B** Lebend-Gate, $M\Phi^{Lv.SFFV.Ifn\gamma r1}$ GFP^+-Gate, n=1]

4.4.2.2 Evaluation des Differenzierungspotentials transduzierter Ifnγr1$^{-/-}$-Makrophagen

Um das Differenzierungspotential von transduzierten murinen Lin^--Zellen zu Makrophagen zu zeigen, wurden die Zellen mit den myeloidspezifischen Vektoren Lv.MSP.Ifnγr1 und Lv.miR223.Ifnγr1 transduziert. Die Lin^--Zellen stammen aus einer Ifnγr1$^{-/-}$-Maus und die Differenzierung erfolgte auf demselben Weg, welcher in „**4.4.2.1** Evaluation des Differenzierungspotentials transduzierter Wildtyp-Makrophagen“ bereits beschrieben wurde.

Die Expression von CD 45.2, CD 11b und F4/80 auf $M\Phi^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und $M\Phi^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt und mit der jeweiligen Expression auf der untransduzierten Kontrolle

$M\Phi^{Mock}$ verglichen. Die klare Expression aller erwähnter Antigene konnte in $M\Phi^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und $M\Phi^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ gezeigt werden (vgl. **Abb. 15**). Sowohl $M\Phi^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$, wie auch $M\Phi^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$, zeigten eine, den $M\Phi^{Mock}$ annähernd gleiche, Oberflächenexpression von CD 45.2 und CD 11b. Die F4/80 Expression in $M\Phi^{Mock}$ und $M\Phi^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ war annähernd gleich. Die Expression von F4/80 in $M\Phi^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ war im Vergleich zu $M\Phi^{Mock}$ um annähernd eine Zehnerpotenz gesteigert.

Zusätzlich wurde die Morphologie der transduzierten MΦ, $M\Phi^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und $M\Phi^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$, mit derjenigen der Kontrolle, $M\Phi^{Mock}$, verglichen. Dafür wurden Cytospins der jeweiligen Zellen angefertigt. In den Aufnahmen aller Cytospins war die typische MΦ-Morphologie gut zu erkennen (vgl. **Abb. 16**). Die runden Zellen variierten in ihrer Größe und das blaugefärbte Cytoplasma war mit wenigen bis vielen weißlich erscheinenden Vakuolen gefüllt. Der ovaloide Kern zeigte feine Chromatinstrukturen(90). Sowohl die Morphologie von $M\Phi^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ wie auch die Morphologie von $M\Phi^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ zeigte keine Unterschiede zu der Morphologie von $M\Phi^{Mock}$.

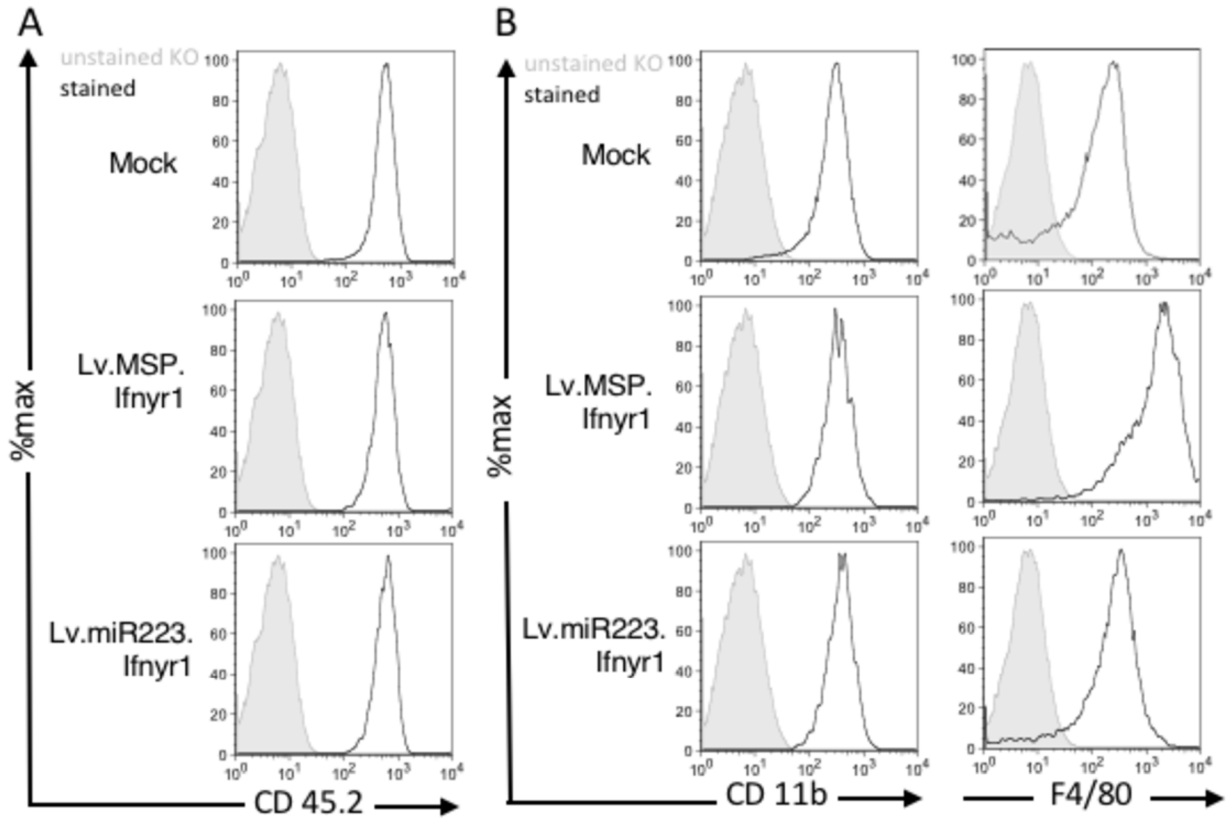


Abb. 15 Differenzierungsmarker Ifnγr1$^{-/-}$ KM abgeleiteter Makrophagen
A&B Dargestellt sind die mit dem CD 45.2, CD 11b oder F4/80 Antikörper gefärbten Zellen als Histogramm. Außerdem ist jeweils die ungefärbte $M\Phi^{Mock}$ Kontrolle abgebildet. **A** Die Expression von CD 45.2 in $M\Phi^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und $M\Phi^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ war annähernd gleich der Expression von CD 45.2 in der untransduzierten Kontrolle $M\Phi^{Mock}$. **B** Die Expression von CD 11b in $M\Phi^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und $M\Phi^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ war ebenfalls vergleichbar mit der Expression in $M\Phi^{Mock}$. Die F4/80-Expression in $M\Phi^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ war vergleichbar mit der Expression von F4/80 in den $M\Phi^{Mock}$. Die Expressionskurve von F4/80 der $M\Phi^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ zeigte eine Rechtsverschiebung auf der X-Achse im Vergleich zu der Expressionskurve von F4/80 in $M\Phi^{Mock}$. [**A&B** Lebend-Gate, $M\Phi^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und $M\Phi^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ GFP^+-Gate, n=1]

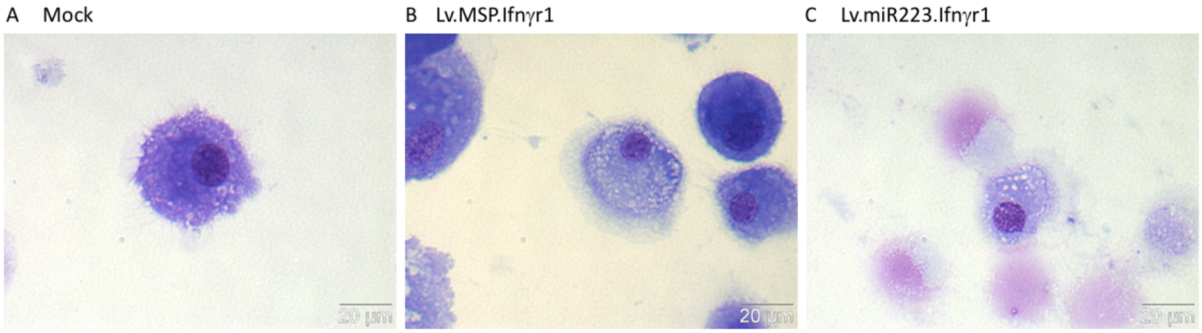


Abb. 16 Morphologie Ifnγr1$^{-/-}$ KM abgeleiteter Makrophagen
A-C Cytospin-Aufnahmen ausdifferenzierter MΦ. **A** Die Aufnahme von MΦ^{Mock} zeigte die typische MΦ-Morphologie. Weißlich-erscheinende Vakuolen sind im violett-bläulichen Cytoplasma zu erkennen gewesen.
B Die Aufnahme von MΦ$^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ zeigte ebenfalls die typische MΦ-Morphologie. Weißlich-erscheinende Vakuolen waren im violett-bläulichen Cytoplasma zu erkennen. **C** Die Aufnahme von MΦ$^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ zeigte ebenfalls die typische MΦ-Morphologie. Weißlich-erscheinende Vakuolen waren im violett-bläulichen Cytoplasma zu erkennen. [n=1]

4.4.2.3 Beurteilung der Teilungsrate transduzierter Wildtyp-Makrophagen

Die Teilungsrate untransduzierter muriner WT-Makrophagen (MΦ^{Mock}) wurde mit der Teilungsrate von MΦ$^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und MΦ$^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ verglichen. Hierfür wurden jeweils 300.000 Zellen mit dem Proliferationsmarker Dye eFluor® 670 angefärbt und zum Zeitpunkt 0h, 24h und 72h mittels Durchflusszytometrie untersucht. In **Abb. 17** sind die Ergebnisse des Versuches in zwei Gruppen unterteilt. In der ersten Gruppe, **Abb. 17 A**, wurden ausschließlich die GFP$^+$ Anteile der MΦ$^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und MΦ$^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ für die Datenanalyse genutzt. Gegensätzlich dazu wurden in der zweiten Gruppe, **Abb. 17 B**, ausschließlich die GFP$^-$ Anteile der MΦ$^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und MΦ$^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ zur Datenanalyse genutzt. In der GFP$^+$ Gruppe zeigte sich nach 24h eine signifikante Differenz in der Teilungsrate zwischen MΦ^{Mock} und MΦ$^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$. Diese signifikante Differenz war nach 72h nicht mehr nachzuweisen. Allerdings wurde zu diesem Zeitpunkt eine signifikante Differenz in der Teilungsrate zwischen MΦ^{Mock} und MΦ$^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ nachgewiesen, welche zum früheren Zeitpunkt 24h nicht bestand. In der GFP$^-$ Gruppe zeigten sich nach 24h keine signifikanten Differenzen in der Teilungsrate zwischen den transduzierten MΦ und MΦ^{Mock}. Zum 72h Zeitpunkt wurde eine signifikante Differenz zwischen MΦ^{Mock} und MΦ$^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ nachgewiesen, welche ebenfalls in der GFP$^+$ Gruppe gezeigt wurde.

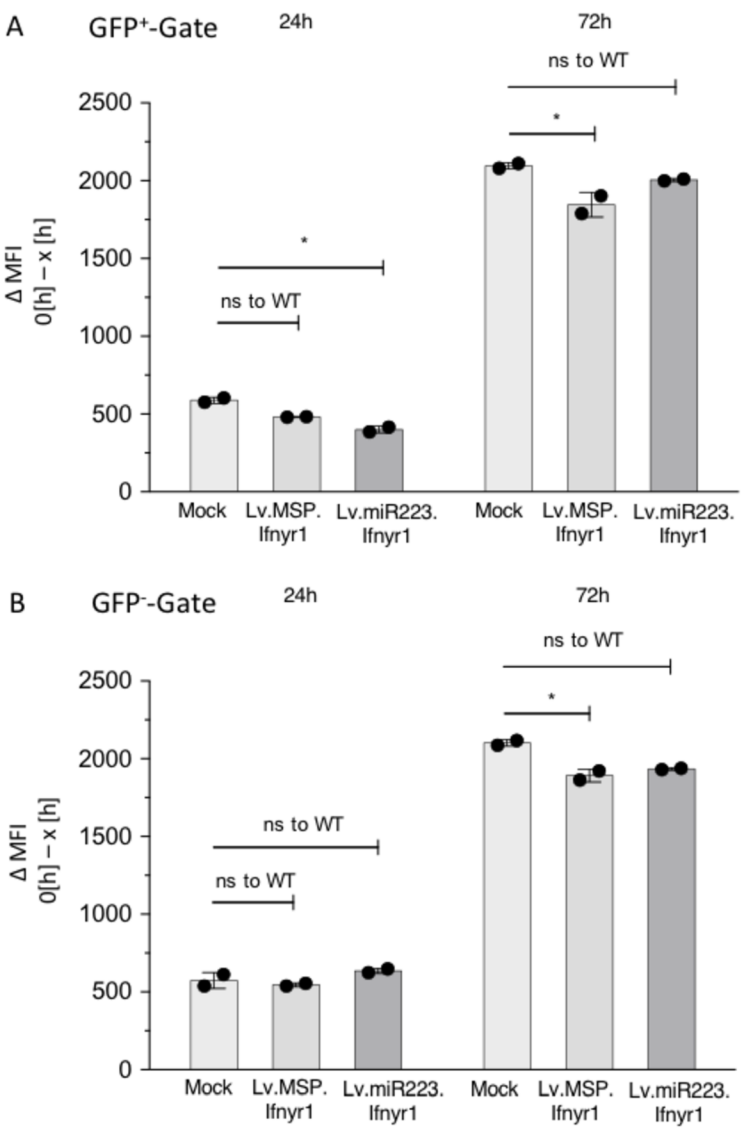


Abb. 17 Evaluation der Teilungsrate transduzierter WT-MΦ
A&B Differenz der mittleren fluoreszierenden Intensität zwischen 0h und 24h bzw. 72h nach Färbung mit dem Proliferationsmarker eFluor® 670 **A** Analyse ausschließlich GFP$^+$ Anteile der $M\Phi^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und $M\Phi^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$. Zum 24h Zeitpunkt zeigte sich eine signifikante Differenz zwischen $M\Phi^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ und $M\Phi^{Mock}$, zum 72h Zeitpunkt eine signifikante Differenz zwischen $M\Phi^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und $M\Phi^{Mock}$.
B Analyse ausschließlich GFP$^-$ Anteile der $M\Phi^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und $M\Phi^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$. Zum 24h Zeitpunkt zeigten sich keine signifikanten Differenzen zwischen $M\Phi^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und $M\Phi^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ und $M\Phi^{Mock}$. Zum 72h Zeitpunkt zeigte sich erneut eine signifikante Differenz zwischen $M\Phi^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und $M\Phi^{Mock}$.
[Lebend-Gate; n=2, zweifache Varianzanalyse]

4.4.2.4 Evaluation der rezeptorvermittelten STAT5 Phosphorylierung in transduzierten Wildtyp-Makrophagen

Es wurde untersucht, ob ein pathologischer Einfluss auf rezeptorvermittelte Signalwege in der Zelle durch die Transduktion und daraus folgende stetige Überexpression des IFNγR1 besteht. Hierzu wurden die WT-MΦ für 15 Minuten mit 50 ng/ml mGM-CSF stimuliert und die physiologisch folgende Phosphorylierung des Signal Transducer and Activator of Transcription 5 (STAT5) wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Im jeweiligen Experiment wurde einerseits untersucht ob es nach der GM-CSF Stimulation zur physiologischen Phosphorylierung von STAT5 kommt und im Folgenden der Anteil von phosphoryliertem STAT5 (pSTAT5) in $M\Phi^{Mock}$ mit $M\Phi^{Lv.SFFV.Ifn\gamma r1}$, $M\Phi^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ oder $M\Phi^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ verglichen.

Die STAT5-Phosphorylierung konnte sowohl in $M\Phi^{Mock}$ wie auch in allen transduzierten MΦ klar gezeigt werden (vgl. **Abb. 18**). Ebenso war die Quantität von pSTAT5 in $M\Phi^{Lv.SFFV.Ifn\gamma r1}$, $M\Phi^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und

$M\Phi^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ vergleichbar mit der Quantität von pSTAT5 in $M\Phi^{Mock}$. Im Vergleich von $M\Phi^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ mit $M\Phi^{Mock}$ zeigte sich eine leichte Linksverschiebung des Kurvenmaximums. Da eine eindeutige Phosphorylierung von STAT5 zu erkennen ist, hat die Linksverschiebung, welche versuchsbedingten Schwankungen unterliegt, keine Relevanz auf die Ergebnisaussage.

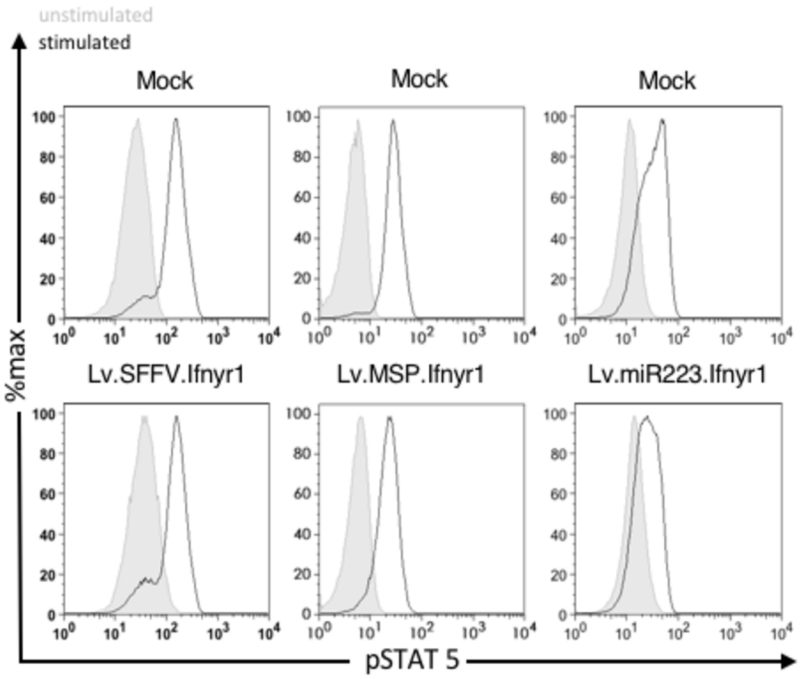


Abb. 18 Evaluation von phosphoryliertem STAT5 nach GM-CSF Stimulation
Im Histogramm sind die Daten der Durchflusszytometrie GM-CSF-stimulierter und unstimulierter Zellen (grau hinterlegt) nach pSTAT5-Ak Färbung dargestellt. Eine klare Rechtsverschiebung des Kurvenmaximums ist in $M\Phi^{Lv.SFFV.Ifn\gamma r1}$, $M\Phi^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und $M\Phi^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ zu erkennen. Die Verschiebung ist mit der Rechtsverschiebung des Kurvenmaximums in den untransduzierten Kontrollen, $M\Phi^{Mock}$, des jeweiligen Experiments vergleichbar. [Lebend-Gate, n=1]

4.4.2.5 Evaluation der rezeptorvermittelten STAT1 Phosphorylierung in transduzierten Wildtyp- und Ifnγr1$^{-/-}$-Makrophagen

Erneut wurde untersucht, ob ein pathologischer Einfluss auf rezeptorvermittelte Signalwege in der Zelle durch die Transduktion und daraus folgende stetige Überexpression des IFNγR1 besteht. Für diesen Versuch wurden sowohl WT-Lin$^-$- wie auch Ifnγr1$^{-/-}$-Lin$^-$-Zellen mit den myeloidspezifischen Vektoren Lv.MSP.Ifnγr1 und Lv.miR223.Ifnγr1 transduziert. In diesem Versuchsansatz wurden die GFP$^+$ Zellen nicht mittels Durchflusszytometrie gesammelt, dementsprechend war der Anteil GFP$^+$-Zellen in $M\Phi^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ oder $M\Phi^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ geringer als in den vorangegangenen Versuchen. Da IFNγ zur Familie der Typ-II Interferone gehört, wurde im Folgenden die Stimulation der transduzierten MΦ mit IFNα, einem Typ-I Interferon, untersucht.

Hierzu wurden die MΦ für 60 Minuten mit 20 ng/ml IFNα stimuliert und die physiologisch folgende Phosphorylierung des *Signal Transducer and Activator of Transcription 1* (STAT1) wurde mittels eines Western Blots bestimmt. In diesem Experiment wurde erstens überprüft, ob STAT1 in den unstimulierten und stimulierten MΦ vorliegt und zweitens, ob es nach der IFNα Stimulation zur Phosphorylierung von STAT1 kommt.

Sowohl in WT-KM-abgeleiteten MΦ wie auch in Ifnγr1$^{-/-}$-KM-abgeleiteten MΦ konnte in der untransduzierten Kontrolle MΦ^{Mock} und in den transduzierten MΦ$^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und MΦ$^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ STAT1 nachgewiesen werden (vgl. **Abb. 19 A & B**). Des Weiteren konnte pSTAT1 in den IFNα-stimulierten MΦ, sowohl in der Kontrolle wie auch in den transduzierten Zellen, nachgewiesen werden. Dies galt in WT-KM-abgeleiteten MΦ und Ifnγr1$^{-/-}$-KM-abgeleiteten MΦ gleichermaßen. Im dargestellten Western Blot in **Abb. 19** sind die beiden STAT1 Isomere (α und β), welche endogen in der Zelle vorliegen, gut an den zwei klar abgrenzbaren Banden zu erkennen. Die Isoformen sind ebenfalls in ihren phosphorylierten Formen gut an zwei voneinander getrennten Banden zu erkennen.

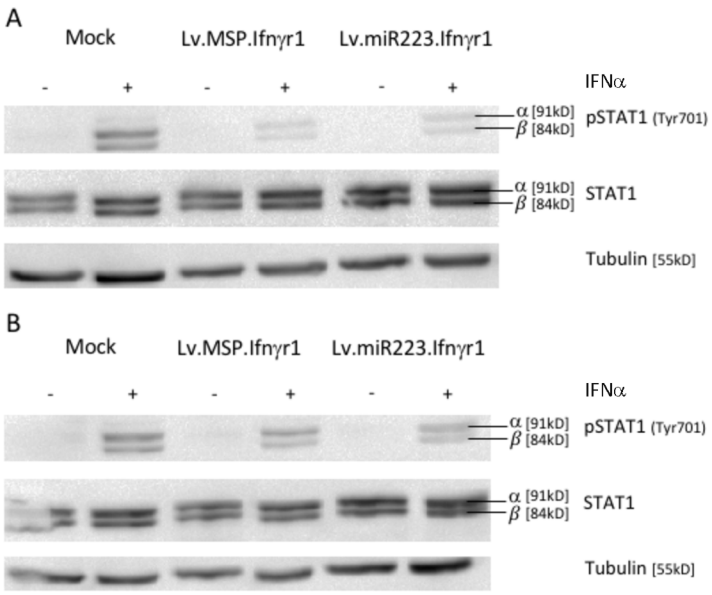


Abb. 19 Evaluation von phosphoryliertem STAT1 nach IFNα Stimulation
Die Abbildung zeigt zwei Western Blots. Sie wurden einmalig gestrippt daher konnte die Ak-Färbung mit STAT1 und pSTAT1 auf derselben Membran erfolgen.
A WT-KM-abgeleiteten MΦ Die Tubulin- und STAT1-Banden stellten sich in MΦ^{Mock}, MΦ$^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und MΦ$^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ klar dar. In der pSTAT1-Ak-Färbung sind nur in den IFNα-stimulierten MΦ Banden zu erkennen gewesen, somit wurde pSTAT1 nur in diesen MΦ nachgewiesen.
B Ifnγr1$^{-/-}$-KM-abgeleiteten MΦ Hier stellten sich die Tubulin- und STAT1-Banden ebenfalls klar in MΦ^{Mock}, MΦ$^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und MΦ$^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ dar. pSTAT1 wurde nur in den IFNα-stimulierten MΦ nachgewiesen.
[n=1, vollständiger Blot im Appendix]

4.5 Evaluation der zellulären Immunantwort nach IFNγ-Stimulation transduzierter Knochenmark-abgeleiteten Makrophagen

4.5.1 Evaluation des intrazellulären Abbaus von Bacillus Calmette-Guérin in transduzierten Knochenmark-abgeleiteten Makrophagen

Für diesen Versuch wurden Ifnγr1$^{-/-}$ Lin^{-}-Zellen mit den myeloidspezifischen Vektoren Lv.MSP.Ifnγr1 und Lv.miR223.Ifnγr1 transduziert. Mittels Durchflusszytometrie wurden die GFP^{+}-Zellen 72h nach der Transduktion gesammelt. Die darauffolgende Differenzierung zu MΦ erfolgte auf dem bereits in „**4.4.2.1** Evaluation des Differenzierungspotentials transduzierter Wildtyp-Makrophagen“ beschriebenen Weg. Die *in vitro* Infektion erfolgte mit dem *Mykobakterium Bacillus Calmette-Guérin* (BCG). BCG ist bei Patienten mit MSMD häufig der Erreger schwerwiegender Infektionen, wenn er als Vakzin gegen Tuberkulose verabreicht wird(91).

Im Versuch wurde der intrazelluläre Abbau von BCG in transduzierten Ifnγr1$^{-/-}$-MΦ, MΦ$^{Lv.MSP.Ifnγr1}$ und MΦ$^{Lv.miR223.Ifnγr1}$, evaluiert. Hierfür wurden Ifnγr1$^{-/-}$-MΦ, MΦ$^{Lv.MSP.Ifnγr1}$ und MΦ$^{Lv.miR223.Ifnγr1}$ für 24h mit 50 ng/ml IFNγ stimuliert und im Anschluss für 1h mit BCG inkubiert (MOI 100:1). Die MΦ wurden zu den Zeitpunkten 1h und 24h *post infectionem* (*p.i.*) lysiert und die intrazelluläre Elimination der phagozytierten Mykobakterien wurde mittels der kolonieformenden Einheiten (CFU) 1h *p.i.* und 24h *p.i.* eruiert.

In den Ifnγr1$^{-/-}$-MΦ konnte keine Differenz der vitalen intrazellulären Pathogene zwischen den beiden Zeitpunkten beobachtet werden. Die lentiviral korrigierten Ifnγr1$^{-/-}$-MΦ, MΦ$^{Lv.MSP.Ifnγr1}$ und MΦ$^{Lv.miR223.Ifnγr1}$, zeigten in allen Experimenten eine annähernd vollständige Elimination von BCG 24h *p.i.* (Reduktion der 24h-*p.i.*-CFU pro Zelle auf unter drei). Die Elimination von BCG in MΦ$^{Lv.MSP.Ifnγr1}$ und MΦ$^{Lv.miR223.Ifnγr1}$ war im Vergleich zu der Elimination von BCG in den Ifnγr1$^{-/-}$-MΦ signifikant erhöht (vgl. **Abb. 20**).

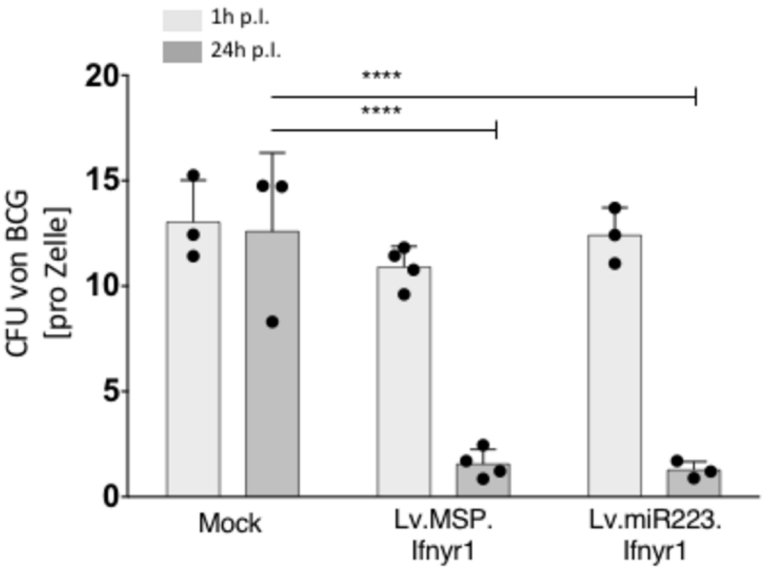


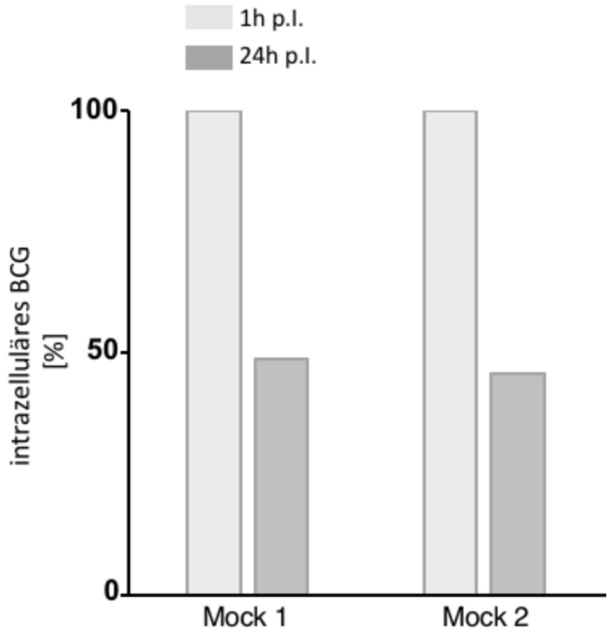
Abb. 20 Evaluation der intrazellulären Elimination von BCG nach IFNγ-Stimulation
Im Diagramm sind die CFU von BCG pro Zelle 1h *p.i.* (hellgrau) und 24h *p.i.* (dunkelgrau) für Ifnγr1$^{-/-}$-MΦ, MΦ$^{Lv.MSP.Ifnγr1}$ und MΦ$^{Lv.miR223.Ifnγr1}$ aufgetragen. Die Ergebnisse jedes Experimentes sind als Punkt dargestellt. Bei MΦ$^{Lv.MSP.Ifnγr1}$ und MΦ$^{Lv.miR223.Ifnγr1}$ zeigte sich eine deutliche Reduktion von BCG nach 24h, welche bei den Ifnγr1$^{-/-}$-MΦ nicht beobachtet werden konnte. Die beobachtete Differenz 24h *p.i.* zwischen Ifnγr1$^{-/-}$-MΦ und MΦ$^{Lv.MSP.Ifnγr1}$ bzw. MΦ$^{Lv.miR223.Ifnγr1}$ war signifikant. [n=3-4, zweifache Varianzanalyse]

In dem oben erwähnten Versuch kam es während der Versuchsdurchführung mit WT-MΦ zur Verunreinigungen der Versuchsansätze mit anderen Erregern. Daher bestand Unsicherheit über die Aussagekraft der beobachteten Ergebnisse der WT-MΦ. Es wurde entschieden diesen Teil des Versuchs zu wiederholen. Aufgrund privater Umstände musste der Kollaborationspartner, welcher die Infektion der Zellen und die Zählung der Bakterien durchführte, gewechselt werden. Die Generierung, der Umgang und die Infektion der MΦ wurde nach dem bereits verwendeten Protokoll von einem anderen Kollaborationspartner durchgeführt.

Da der Versuchsansatz der WT-MΦ nur zweimalig wiederholt wurde, ist in diesem Teil des Experimentes auf eine statistische Auswertung verzichtet worden. 24h *p.i.* kam es in den WT-MΦ zu einer Reduktion der intrazellulären BCG-Keime um 51,5% und 54,5% (vgl. **Abb. 21**). Im ersten, oben beschriebenen,

Teil des Versuches wurde eine durchschnittliche Reduktion um 4,2% in Ifnγr1$^{-/-}$-MΦ, eine durchschnittliche Reduktion um 85,7% in MΦ$^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und eine durchschnittliche Reduktion um 90,4% in MΦ$^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ beobachtet. Somit konnte in IFNγ-stimulierten WT-MΦ eine gegenüber Ifnγr1$^{-/-}$-MΦ gesteigerte Elimination von BCG beobachtet und eine gegenüber den IFNγR1-überexprimierenden MΦ$^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und MΦ$^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ geringere Elimination von BCG beobachtet werden.

Abb. 21 Evaluation der intrazellulären Elimination von BCG nach IFNγ-Stimulation in WT-MΦ
Im Diagramm ist der relative, intrazelluläre Abbau von BCG 1h *p.i.* (hellgrau) und 24h *p.i.* (dunkelgrau) für IFNγ-stimulierte WT-MΦ aufgetragen. In beiden Experimenten ist 24h *p.i.* eine Reduktion der Keime um ca. 50% zu sehen. [n=2]



5 Diskussion

Optimierung der lentiviralen Gentherapie für die MSMD

Das Feld der hämatopoetischen Gentherapie wurde in den letzten Jahren von großen Fortschritte geprägt. Die Aussicht auf eine zeitnahe und erfolgreiche klinische Anwendung ist vielversprechend. Insbesondere im Feld der primären Immundefizienzen konnten erste Patienten bereits mittels gentherapeutischer Behandlungsansätze geheilt werden(92). Allerdings zeigten verschiedene Studien auch Probleme und Komplikationen, welche im nachfolgenden Text näher erläutert werden, der bisher wenig angewandten hämatopoetischen Gentherapie auf(93). Daher war es das Ziel dieser Arbeit, eine angestrebte hämatopoetische Gentherapie für die Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Diseases (MSMD), verursacht durch autosomal rezessive Mutationen des Interferon-γ-Rezeptor-1 Gens, zu optimieren. Dazu wurden myeloidspezifische lentivirale Vektoren hinsichtlich ihrer Sicherheit und Funktion in murinen Zellen evaluiert. Da bisher keine Gentherapie zur Behandlung von MSMD zur Verfügung steht sind diese Untersuchungen Voraussetzungen für die Anwendung der Vektoren im humanen System.

Zu Beginn dieser Arbeit wurde die Transduktionsfähigkeit der Vektoren in einer murinen Makrophagen Zelllinie (RAW264.7) und murinen Knochenmark-abgeleiteten (KM-abgeleiteten) Makrophagen (MΦ) bestätigt. Im Folgenden konnte eine Überexpression des Interferon-γ-Rezeptor-1 (IFNγR1), ebenso wie die Expression des grün-fluoreszierenden Proteins nach Vektortransduktion gezeigt werden. Des Weiteren wurde eine stabile Expression des jeweiligen Transgens über einen vierwöchigen Zeitraum beobachtet. Eine dauerhafte Expression von IFNγR1 nach der Behandlung mit der angestrebten Gentherapie ist für die anhaltende Korrektur der Rezeptor-defizitären Zellen notwendig.
Im nächsten Schritt wurde die Sicherheit der Vektoren überprüft. Hier konnte gezeigt werden, dass die Teilungsrate und Zellviabilität Vektor-transduzierter RAW264.7-Zellen sich nicht signifikant von untransduzierten RAW264.7-Zellen unterscheidet. Ein teilungsfördernder, tumorbildender Effekt der Vektoren wurde somit nicht beobachtet. Ebenso schienen die Vektoren keinen toxischen, Apoptose- oder Nekrose-fördernden Einfluss auf die transduzierten Zellen zu haben. Die Teilungsrate von Wildtyp (WT)-KM-abgeleiteten MΦ wurde ebenfalls untersucht. Eine abschließende Beurteilung dieses Versuchsteils ist aufgrund der nur zweifachen Durchführung nicht möglich. Die Interpretation der vorhandenen Daten erweckt allerdings den Eindruck, dass die Vektoren auch in diesen Zellen keine Auswirkung auf die Teilungsrate haben. Im weiteren Verlauf der Arbeit konnte bei der Evaluation der Differenzierungskapazität von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen zu MΦ keine Einschränkung durch die Vektortransduktion gezeigt werden. Nachfolgend wurde ein pathologischer Einfluss der Vektoren auf den Signalweg und die Rezeptorexpression des GM-CSF-Rezeptors in WT-KM-abgeleiteten MΦ ausgeschlossen. Im letzten Versuch zur Evaluation der Vektoren-Sicherheit wurde ein möglicher

pathologischer Einfluss der Vektoren auf den Signalweg und die Rezeptorexpression des IFNα-Rezeptors untersucht. Sowohl in WT-KM-abgeleiteten MΦ, wie auch in Ifnγr1$^{-/-}$-KM-abgeleiteten MΦ konnten keine Transduktions-bedingten Veränderungen nach IFNα-Stimulation festgestellt werden. Eine Beeinträchtigung Rezeptor-vermittelter Signalwege ausgehend von den Vektoren wurde somit nicht beobachtet.

Die Funktion der myeloidspezifischen Vektoren wurde in Ifnγr1$^{-/-}$-KM-abgeleiteten MΦ evaluiert. Es konnte gezeigt werden, dass eine genetische Korrektur der MΦ ihre physiologische Immunfunktion wiederherstellt und die intrazelluläre Elimination von BCG nach IFNγ-Stimulation erfolgt. Mit dem Augenmerk auf die angestrebte Gentherapie ist die Vektor-vermittelte Wiederherstellung antimikrobiellen Funktion von entscheidender Bedeutung.

In den meisten Fällen betrug die Transduktionseffizienz der myeloidspezifischen lenitviralen Vektoren unter 20% bei Lv.MSP.Ifnγr1 und unter 10% bei Lv.miR223.Ifnγr1. Daher wurden die transduzierten, GFP^{+} Zellen für einige Experimente mittels Durchflusszytometrie gesammelt. Ein möglicher Grund für die geringe Transduktionseffizienz lässt sich auf die Größe (> 6 kBp) der viralen Vektoren zurückzuführen(94). Kirsten Canté-Barrett zeigte, dass bereits eine Verringerung der viralen Sequenz um 600 Bp zu einer signifikanten Erhöhung der Transduktionseffizienz führt. Daher sollte in Betracht gezogen werden, die virale Sequenz für eine effektivere Anwendung der Vektoren zu verkürzen. Einerseits wäre die Verkleinerung des Vektor-Grundgerüstes und andererseits die Entfernung des Reportergens (GFP) aus dem Vektor denkbar. Erreicht man im Folgenden eine ausreichend hohe Transduktionseffizienz, kann auf das Sammeln der transduzierten Zellen mittels Durchflusszytometrie vor den Versuchen verzichtet werden.

Mehrere Versuche und Experimente in dieser Arbeit wurden nur einfach, bzw. zweifach durchgeführt (n=1, n=2). Daher können die erzielten Ergebnisse interpretiert und gedeutet werden, eine abschließende Aussage ist allerdings nicht zu treffen. Eine erneute Durchführung der Versuche wird benötigt um die erzielten Ergebnisse zu bestätigen. Des Weiteren ist eine Wiederholung zweifach durchgeführter Versuche nötig, um die Aussagekraft der Ergebnisse zu erhöhen. Dies trifft unter anderem auf den zweiten, WT- MΦ bezogenen Versuchsteil des in „**4.5.1** Evaluation des intrazellulären Abbaus von Bacillus Calmette-Guérin in transduzierten Knochenmark-abgeleiteten Makrophagen“ beschriebenen Versuches zu.

Der in **4.5.1** beschriebene Versuch konnte die erfolgreiche Wiederherstellung des IFNγR1-vermittelten intrazellulären Abbaus von BCG in lentiviral-korrigierten Ifnγr1$^{-/-}$-KM-abgeleiteten MΦ zeigen. Dies beweist die Funktionalität der myeloidspezifischen Vektoren Lv.MSP.Ifnγr1 und Lv.miR223.Ifnγr1 gegenüber dem häufig mit der MSMD-assoziiertem Pathogen BCG(78,95). Allerdings leiden die betroffenen Patienten, neben den BCG-Infektionen, an schwerwiegenden Infektionen anderer Keime und Patho-

gene. Dazu zählen beispielsweise atypische, nichttuberkulöse Mykobakterien, *Mykobakterium tuberculosis* oder *Salmonella spp.* und in seltenen Fällen auch nicht-bakterielle Erreger wie z.B. *Histoplasma capsulatum*, *Pneumocystis jirovecii* oder auch *Toxoplasma gondii*(68). Auf dem Weg zur Gentherapie für die MSMD sollte daher in Betracht gezogen werden, das durchgeführte *in vitro* Infektionsexperiment mit verschiedenen krankheitsrelevanten Keimen zu wiederholen. Ein erster Infektionsversuch mit *Salmonella typhimurium* wurde bereits von Ariane Nguyen (JRG Translational Hematology of congenital Diseases, Institut für Experimentelle Hämatologie, MHH) durchgeführt und in ihrer Arbeit „Myelospecific transgene expression of IfngR1 in the hematopoietic system“ beschrieben.

Alle Experimente in dieser Arbeit wurden im murinen System durchgeführt, daher ist eine *in vivo* Studie im Menschen erst nach ebenfalls erfolgreichen *in vitro* Experimenten im humanen System vorstellbar. In vielen wissenschaftlichen Veröffentlichungen zeigt sich eine eingeschränkte Übertragbarkeit tierexperimenteller Ergebnisse auf spätere humane Experimente(96,97). Unter Berücksichtigung der Exklusivität jedes einzelnen Experimentes ist eine individuelle Beurteilung der Übertragbarkeit der Ergebnisse aus dem murinen in das humane System in diesem Kontext nicht möglich. Es gibt allerdings Unterschiede, welche zwischen den Immunsystemen beider Spezies bestehen, die mit Hinblick auf die IFNγR1-defizitäre MSMD besondere Beachtung finden sollten. So deutet beispielsweise Vieles daraufhin, dass die Expression induzierbarer Stickstoff Synthasen (iNOS) in der Maus durch IFNγ und Lipopolysaccharide (LPS) induziert wird, wohingegen dieselbe Expression im Menschen über IFN-$\alpha\beta$, IL-4 mit CD23 oder verschiedene Chemokine vermittelt wird(98). Ein sinnvoller nächster Schritt wäre somit die Etablierung der lentiviralen Vektoren in humanen Zellen.

Es wurde bereits erwähnt, dass die MSMD, ausgelöst durch autosomal rezessive IFNGR1-Defekte mit vollständiger IFNγR1-Defizienz ein sehr seltenes Krankheitsbild ist. Die Verfügbarkeit von Patientenmaterial für *in vitro* Versuche ist daher stark eingeschränkt. Hier ist die Etablierung und Nutzung der neuen Technologie zur Herstellung von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSZ) denkbar(99–102). Die Erzeugung von iPSZ aus nahezu jeder beliebigen kernhaltigen somatischen Zelle geht aus der Forschung von Dr. Yamanaka (Direktor des Center for iPS Cell Research, Universität Kyoto, Japan) hervor und ermöglicht heutzutage die Generierung patienten- und damit krankheitsspezifischer Stammzellen. Auf diesem Wege generierte Stammzellen und aus ihnen differenzierte Zellen, zum Beispiel Makrophagen(103), dienen bereits heutzutage als Modell für die Anwendung der hämatopoetischen Gentherapie bei primären Immundefizienzen(104).

Im Juli 2017 veröffentlichte Yuan Zhao (Medicines and Health Products Regulatory Agency, South Mimms, Vereinigtes Königreich) die Entwicklung des ersten weltweiten lentiviralen Vektoren Standards nach den Regularien der Weltgesundheitsorganisation (WHO)(105). Die Notwendigkeit für einen Standard verdeutlicht die rapide ansteigende Nutzung der Lentiviren im Feld der Gentherapie, ebenso

wie die schnelle, in weniger als drei Jahrzehnten stattgefundene Entwicklung der dritten Generation selbst-inaktivierender Lentiviren(106). Der schnelle Einzug der Lentiviren in die Gentherapie lässt sich unter anderem durch die bisher beobachtete, sichere Anwendbarkeit jener erklären.

Die Entstehung insertioneller Mutagenese konnte gehäuft bei Patienten primärer Immundefizienzen (WAS, X-SCID), welche mittels gamma-retroviraler gentherapeutischer Ansätze behandelt wurden, beobachtet werden(50,107). In lentiviral-gentherapeutischen Studien konnte eine Vektorintegrations-vermittelte Entstehung insertioneller Mutagenese bislang nicht beobachtet werden(108,109). Die, zur Etablierung einer Gentherapie für MSMD, genutzten Lentiviren zeigen allerdings eine Affinität zur Integration in transkriptions-aktive Bereiche innerhalb der DNA(110). Aufgrund dieser mehr oder weniger zufällig stattfindenden Integration genetischen Materials in das Genom einer Zelle ist die Entstehung einer insertionellen Mutagenese daher trotzdem nicht vollständig ausgeschlossen. Des Weiteren ist die Genotoxizität und das tumorfördende Potential, welches mit der lentiviralen Transduktion einhergeht, abhängig von der absoluten Zahl der Vektorkopien, welche in das Genom integrieren(105). Das Komplikationsrisiko steigt mit zunehmender Zahl vorhandener Vektorkopien und zurzeit gibt es kein experimentelles Verfahren mit dem die Integration einer einzelnen Vektorkopie sichergestellt werden kann.

Designernukleasen als Alternative zur lentiviral-vermittelten Gentherapie

Die erwähnten, möglichen Komplikationen der lentiviralen Gentherapie auf zellulärer Ebene können mit Methoden der Genom-Editierung umgangen werden. Zu diesen zählen unter anderem die Designer-Nukleasen Zinkfingernukleasen, Transcription Activator-like Effector Nucleases (TALEN´s) und Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR) RNA-gelenkte Nukleasen.

Das gleiche Grundprinzip aller oben erwähnter Genom-Editierungs Methoden basiert auf der Generierung eines doppelsträngigen DNA Bruchs an einem spezifischen, individuell selektierbaren Genlokus. Infolge dessen werden die zelleigenen DNA-Reparaturmechanismen an der Strangbruchstelle aktiv, und es kommt zum Non-Homologous End-Joining (NHEJ) oder zur homologen Reparatur (HR)(111). Welche Art der DNA-Reparatur gewünscht, bzw. benötigt wird, ist von dem jeweiligen Anwendungsgebiet abhängig. Das NHEJ kann zu dem Knock-Out eines Genes oder, mittels simultan-induzierten DNA-Strangbrüchen an mehreren Orten innerhalb eines DNA-Stranges, zur vollständigen Entfernung größerer Basenpaarsequenzen führen. Auf diesem Wege können heutzutage Krankheitsmodelle, sowohl auf zellulärer Ebene wie auch in komplexen Organismen wie den Säugetieren, generiert werden(112,113). Eine mögliche Anwendung bei der MSMD ist in **Abb. 22** „Therapeutisches Nutzen des Non-Homologous End-Joining bei der MSMD“ dargestellt. Die HR erfolgt physiologisch über die intakte, genetische Information des zweiten, im Zellkern vorhandenen homologen Chromosoms(114).

Um eine spezifische DNA-Sequenz in den Ort des selektiv induzierten DNA-Doppelstrangbruchs zu integrieren, muss simultan zum Bruch eine, den Bruchrändern, homologe DNA-Sequenz (Donor-DNA) im Nukleus vorhanden sein(115). Mit dem zeitgleichen Einbringen von Donor-DNA und einer Designer-Nuklease in die Zelle, ist so das zielgerichtete Knock-In genetischer Information möglich. Erneut ist eine mögliche Anwendung bei der MSMD in **Abb. 23** „Therapeutisches Nutzen der homologen Reparatur bei der MSMD“ dargestellt.

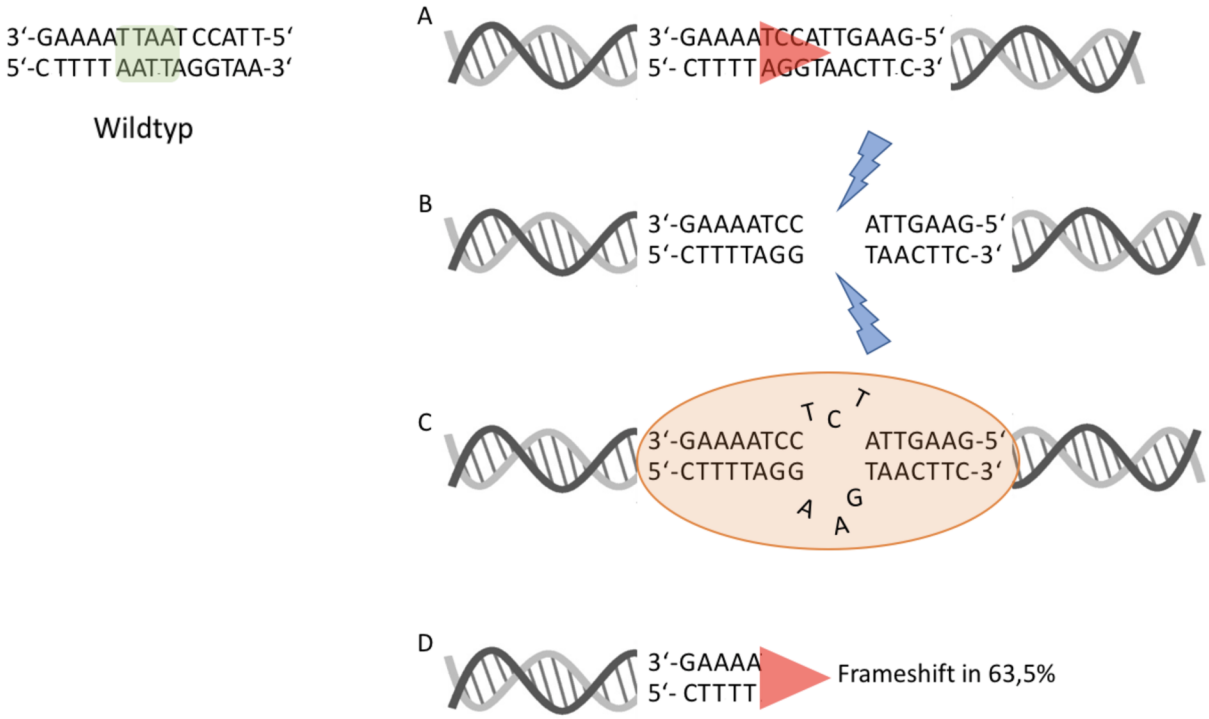


Abb. 22 Therapeutisches Nutzen des Non-Homologous End-Joining bei der MSMD
In der Abbildung wird die gentherapeutische Korrektur einer heterozygot autosomal dominanten IFNγR1-defizitären MSMD mittels Designernukleasen dargestellt. Links im Bild ist die WT DNA-Sequenz dargestellt. **A** Hier ist die 4-Basenpaar große Deletion (TTAA, auf der WT-Sequenz grün markiert) eines MSMD Patienten dargestellt. **B** Die DNA wird mittels einer Designernuklease am Ort der Deletion aufgebrochen. **C** Es kommt zum Non-Homologous End-Joining durch die zelleigenen Reparaturmechanismen. Hierbei wird der Bruch mit zufällig ausgewählten Nukleotiden aufgefüllt. **D** In 63,5 % der Fälle kommt es zum Frameshift des Leserasters. Dann ist die Synthese des defekten IFNγR1, ursächlich für die Entstehung der MSMD, ist nicht mehr möglich. Das dominante, mutierte Gen wurde abgeschaltet und die Rezeptorsynthese kann nun mittels der gesunden genetischen Information des homologen Chromosoms geschehen.
Die gezeigte Deletion (Chromosom 6q, IFNGR1, Nukleotid 818, TTAA) wurde bei der Sequenzierung des IFNGR1 eines IFNγR1-defizitären MSMD Patienten nachgewiesen, beschrieben in (116). Die Deletion liegt, in dem hier beschriebenen Fall einer autosomal dominanten MSMD, heterozygot vor. Die schematische DNA-Helix wurde von (117) modifiziert (**Copyright** vorhanden).

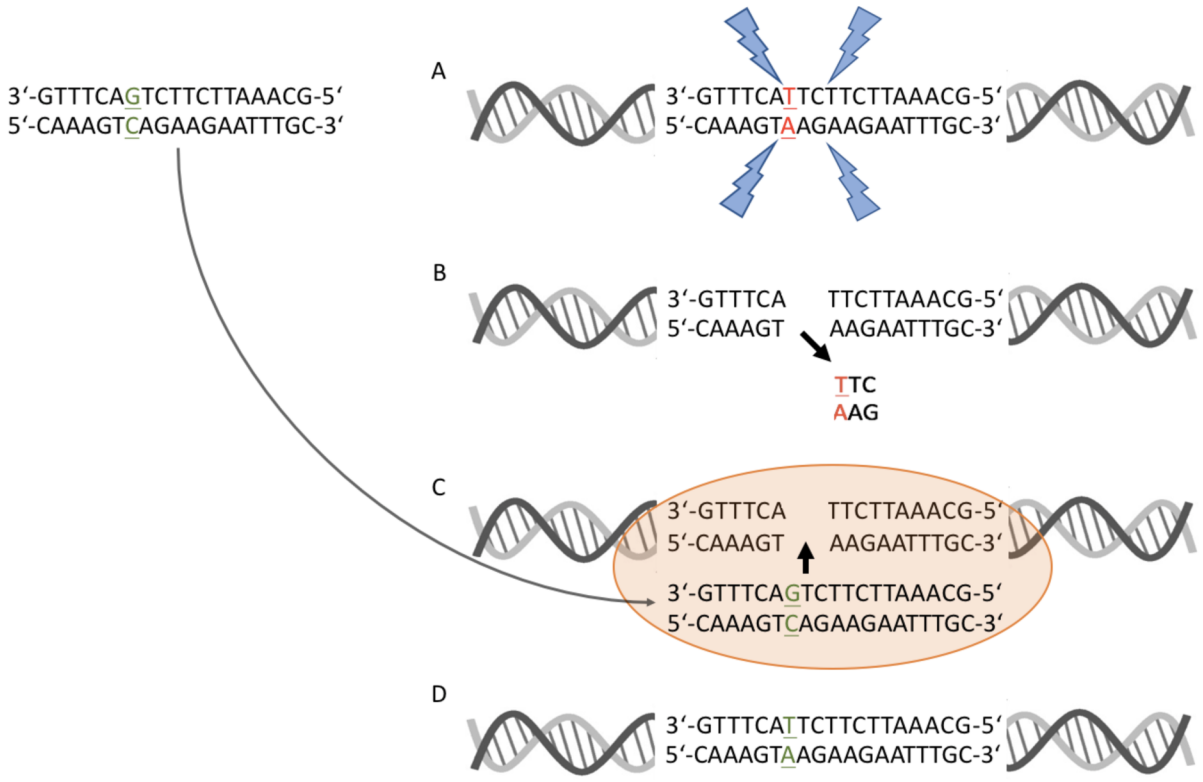


Abb. 23 Therapeutisches Nutzen der homologen Reparatur bei der MSMD
In der Abbildung wird die gentherapeutische Korrektur einer homozygot rezessiven IFNγR1-defizitären MSMD mittels Designernukleasen dargestellt. Links im Bild ist die, simultan in die Zelle eingebrachte, korrekte DNA-Sequenz (Donor-DNA) dargestellt. **A** Hier ist der selektiv induzierte Doppelstrangbruch am Ort der Punktmutation (G zu T) durch eine Designernuklease dargestellt. **B** Die Mutation wurde aus der DNA „herausgeschnitten“. **C** Die zelleigenen Reparaturmechanismen nutzen die eingebrachte Donor-DNA für die homologe Reparatur. **D** Die Punktmutation, ursächlich für das klinische Bild des Patienten, wurde korrigiert. Das IFNGR1 liegt nun wieder intakt im Nukleus vor.
Die gezeigte Punktmutation (G zu T) wurde bei der Sequenzierung des IFNGR1 (Chromosom 6q) eines IFNγR1-defizitären MSMD Patienten mit autosomal rezessiven Genotyp nachgewiesen, beschrieben in (118). Die schematische DNA-Helix wurde von (117) modifiziert (**Copyright** vorhanden).

Die erste zur Gen-Editierung genutzten Designer-Nukleasen waren die Zinkfingernukleasen(119). Ein „Zinkfinger“ ist ein ein Zinkatom enthaltendes Protein, welches spezifisch drei, teilweise vier, benachbarte Nukleotide in der DNA erkennt und bindet. Die erkannte Nukleotid-Sequenz ist von den jeweiligen, im Protein, vorhandenen Aminosäuren abhängig. Zur Generierung einer Nukleotid-Sequenz spezifischen Zinkfingernuklease koppelt man mehrere, individuell ausgewählte, und vorher miteinander verbundene Zinkfinger mit einer unspezifisch-schneidenden Endonuklease. Im Genom erfüllen die Zinkfinger dann eine Guide-Funktion in dem sie die spezifische Nukleotid-Sequenz binden und es im Folgenden zum Schnitt der DNA durch die hergeleitete Endonuklease kommt. Um einen DNA-Doppelstrangbruch herbeizuführen werden zwei, sowohl den codierenden wie auch den codogenen Strang bindende, Zinkfingernukleasen genutzt(112). Es gibt nur wenige Studien in denen die Zinkfingernukleasen vermittelte Geneditierung mit dem Ziel der Therapie einer angeborenen Erkrankung des

blutbildenden Systems genutzt wurde. Dazu zählt die Beta Thalassämie(120), die SCID(121) oder die X-linked Chronic Granulomatous Disease (X-CGD)(122). Mit der erfolgreichen gentherapeutischen Korrektur von SCID und X-CGD *in vitro* wurde die Effektivität der Zinkfingernukleasen im Bereich der primären Immundefizienzen, zu denen auch die MSMD gehört, gezeigt.

Die generell geringe Anwendung der Zinkfingernukleasen im gentherapeutischen Feld lässt sich durch ihre zeitaufwendige und teure Generierung, sowie die Entwicklung neuerer und effizientere Alternativen begründen(123). Die ebenfalls Protein-basierte Designernuklease TALEN ist sowohl kostengünstiger und schneller herzustellen und weist zusätzlich ein breiteres Spektrum erkennbarer Nukleotidsequenzen auf(124).

Die Generierung von Knock-Out Ratten mit TALENs im Jahr 2011 war die Etablierung einer neuen Methode zur Geneditierung(125). Ebenso wie die Zinkfinger sind die Transcription Activator-like Effectors (TALEs) Nukleotid-bindende Proteine, welche ihre Basen-Spezifität durch geringe Unterschiede in der jeweiligen Aminosäuresequenz erhalten. Auch hier dient die TALE-Sequenz als Guide für eine gebundene Endonuklease. Allerdings erkennt ein TALE nur ein einzelnes Nukleotid und kein Triplett. Dadurch können TALENs theoretisch beliebig programmiert werden und jeden Ort der DNA erkennen. Um einen Doppelstrangbruch zu generieren, werden auch bei dieser Methode zwei gepaarte Nukleasen genutzt. In den vergangenen Jahren kam die junge Technik bereits in vielen Gebieten zum Einsatz, Beispiele sind die Generierung von Knock-Out Modellen verschiedener Säugetiere(125,126), Krankheitsmodellierung in nicht-humanen Primaten(127) und die erfolgreiche Generierung von chimären Antigenrezeptoren (CAR) bildenden T-Zellen mit Anwendung in humanen *in vivo* Studien(128). *In vitro* konnten TALENs bereits zur genetischen Korrektur verschiedener primärer Immundefekte, ähnlich der MSMD, beitragen. Hierzu zählen verschieden Formen der X-CGD(122,129) oder X-SCID(130). Im direkten Vergleich mit den Zinkfingernukleasen besitzen TALENs eine höhere Spezifität gegenüber ihrer Ziel-DNA mit einer daraus folgenden Reduktion der Off-Target Ereignisse und einer geringeren Zytotoxizität(122,131). Diese Beobachtungen können ein Grund für den derzeitigen Trend sein, welcher sich weg von den Zinkfingernukleasen, hin zur Gen-Editierung mittels TALENs und den CRISPR gelenkten Nukleasen bewegt.

Die CRISPR RNA-gelenkten Nukleasen werden, der genutzten Cas-Nuklease nach, auch als CRISPR/Cas System bezeichnet. In den meisten Studien wird die in *Streptococcus pyogenes* entdeckte Cas9 Nuklease verwendet(132). Im Gegensatz zu den bereits erwähnten Designer-Nukleasen wird die Ziel-DNA im CRISPR/Cas9 System nicht über Proteine, sondern über eine single guide RNA (sgRNA) erkannt. Die schnelle, simple und kostengünstige Modifikation der sgRNA ist der große Vorteil des CRISPR/Cas9 Systems gegenüber anderen Techniken der Gen-Editierung(133). Dies führt zur bevorzugten Nutzung von CRISPR/Cas9 in vielen Studien trotz einer eingeschränkten Auswahl der Ziel-DNA. Zwar ist die aus 20 Nukleotiden bestehende sgRNA frei bestimmbar, es kommt aber nur zum DNA-Doppelstrangbruch

durch Cas9, wenn eine 3 Nukleotid große Protospacer adjacent motif (PAM) Sequenz (eine beliebige Nukleinbase gefolgt von zwei Guanin Nukleinbasen) direkt auf die Ziel-DNA folgt(134). Da viele Forscher das CRISPR/Cas9 System als zukünftiges Mittel der Wahl der Gen-Editierung in der Medizin sehen, gibt es zurzeit viele Studien mit dem Ziel das System zu optimieren. Dazu zählt einerseits die Erweiterung der bisher unbeeinflussbaren PAM-Sequenz und andererseits die Reduktion, der im Vergleich relativ hohen, Off-Target induzierten Doppelstrangbrüche(132,135,136). Bezogen auf die erst seit wenigen Jahren bestehende Verfügbarkeit des CRISPR/Cas Systems kam es bereits in vielen Bereichen der Zellforschung zum Einsatz und der Einzug in das Feld der primären Immundefekte steht kurz bevor(109). Eine denkbare Anwendung in Hinsicht auf die MSMD ist in **Abb. 22** und **Abb. 23** schematisch dargestellt.

Zusammenfassend ist es mit den verschiedenen Techniken der Genom-Editierung möglich, die Komplikationen der lentiviralen Vektorintegration in das Genom zu umgehen. Das, mit der insertionellen Mutagenese einhergehende, Tumorpotential wird durch den spezifischen, individuell bestimmbaren Integrationsort der Donor-DNA verringert. Ebenfalls wird die Toxizität, welche mit einer erhöhten Anzahl an Vektorkopien im Genom einhergeht, durch den Lokus-spezifischen Knock-In der Donor-DNA an einem einmalig im Genom vorkommenden Ort, so gering wie möglich gehalten.

Zelltherapie als ergänzende Behandlungsmöglichkeit zur Gentherapie

Es gibt eine weitere MSMD-spezifische Therapieproblematik, welche sowohl bei der aktuell durchgeführten, allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation auftritt wie auch bei der angestrebten gentherapeutischen autologen hämatopoetischen Stammzelltransplantation mit hoher Wahrscheinlichkeit auftreten wird. Einerseits kommt es zur gehäuften Transplantatabstoßung und andererseits können bereits bestehende mykobakterielle Infektionen nach der Transplantation disseminieren und zum Tod des Patienten führen(85). Die extrem hohen IFNγ-Plasmaspiegel in IFNγR1-defizitären MSMD Patienten (68,137) sind, der aktuellen Datenlage nach, bei einer Knochenmarkstransplantation für den Selektionsvorteil der patienteneigenen HSZ (IFNGR1$^{-/-}$-Genotyp) gegenüber den HSZ des Spenders verantwortlich. Die inhibierte Proliferation humaner HSZ im Beisein erhöhter IFNγ-Level wurde bereits *in vitro* erwiesen(138,139). Diese Beobachtungen lassen somit die Annahme zu, dass die hohen IFNγ-Plasmaspiegel der MSMD-Patienten, zusätzlich zu den generellen Risiken, für die gehäufte Transplantatabstoßung verantwortlich sind(85,140,141). Häufige Infektionen mit nicht virulenten mykobakteriellen und anderen seltenen Erregern sind die Namensgeber der MSMD. Die infektiöse Prädisposition und die komplexe und langwierige antimikrobielle Therapie erschweren es, einen infektionsfreien Zustand des Patienten vor der Transplantation zu erreichen. Nach der Transplantation liegt daher ein erhöhtes Risiko für den unkontrollierbaren Ausbruch einer Infektion vor, mit, wie zuvor erwähnt, tödlichen Folgen für den Patienten(85,142).

Die angestrebte Gentherapie hat keinen Einfluss auf den prätransplantären Zustand des Patienten und führt somit nicht zur Reduktion der momentan bestehenden Komplikationsrisiken. Fontolizumab (Handelsname „HuZAF“) ist ein humanisierter anti-IFNγ Antikörper zur Reduktion der IFNγ-Plasmaspiegel. Neben der hauptsächlichen Anwendung zur Behandlung des Morbus Crohn, ist eine Off-Label Therapie in MSMD-Patienten vorstellbar(143). Die erfolgreiche Behandlung der langwierigen Infektionen der Patienten gelingt, trotz intensiver antibiotischer Therapie, teils nicht(76,78). Ein Ansatz, welcher möglicherweise zur effektiven Reduktion der transplantären Komplikationsrisiken führt, ist die vorausgehende Applikation einer Zelltherapie.

Die Zelltherapie wird von der Food and Drug Administration der USA als Transplantation „autologer, allogener oder xenogener Zellen, die *ex vivo* manipuliert oder anderweitig verändert wurden“[11] zur Heilung oder Verbesserung des Zustands eines Patienten definiert. Es gibt verschiedene, bereits seit längerem zugelassene Zelltherapien. Hierzu zählen unter anderem die Transplantation von *ex vivo* gezüchteten autologen Chondrozyten zur Behandlung von Knorpelschäden(144) oder die Transplantation polycarboner Membranen, welche mit *ex vivo* generierten allogenen Keratinozyten und Fibroblasten überzogen sind um die Wundheilung zu unterstützen(145). Im Hinblick auf das Krankheitsbild der MSMD sollte der bereits angewandten Makrophagen-Zelltherapie im murinen hereditären Pulmonary Alveolar Proteinosis (PAP)-Modell besondere Beachtung geschenkt werden(146,147). Die hereditäre PAP ist eine seltene Differenzierungsstörung der Alveolarmakrophagen, ausgelöst durch Mutationen in den Genen der GM-CSF-Rezeptoren. Im Krankheitsverlauf kommt es über verschiedene Pathologien zu einer schweren respiratorischen Insuffizienz. Happle et al untersuchten den klinischen Nutzen der intrapulmonalen Transplantation humaner HSZ abgeleiteter Makrophagen in das humanisierte hereditäre PAP-Mausmodell. Eine Verbesserung der wichtigsten klinischen PAP-Parameter konnte gezeigt werden(147). Dazu zählten unter anderem die Verminderung der Proteinkonzentration in der Bronchoalveolären-Lavage Flüssigkeit und die Reduzierung der pathologisch erhöhten GM-CSF-Plasmaspiegel.

Suzuki et al untersuchten den klinischen Nutzen der intrapulmonalen Transplantation muriner, lentiviral korrigierter KO-HSZ abgeleiteter Makrophagen in das murine hereditäre PAP-Mausmodell. Die gentherapeutische Korrektur der $CSF2RB^{-/-}$ HSZ (Csf2rb-Knock-Out modelliert hereditären PAP-Phänotyp) hatte keinen Einfluss auf deren Differenzierung zu Makrophagen(146). Der therapeutische Effekt nach der intrapulmonalen Transplantation der korrigierten Zellen unterschied sich ebenfalls nicht von demjenigen, welcher bei der Transplantation von WT-Zellen beobachtet wurde. In dieser

[11] https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/CellularandGeneTherapy/ucm072987.htm, 01.11.2017, 11:25 Uhr

Studie konnte eine, in gleicher Weise wie bereits bei Happle et al beschriebene, Verbesserung der klinischen PAP-Parameter durch die Makrophagen-Transplantation nachgewiesen werden.
Die IFNγR1-defizitäre MSMD und die hereditäre PAP weisen mehrere Ähnlichkeiten auf, welche für eine ebenfalls erfolgreiche Anwendung der Makrophagen-Zelltherapie bei der MSMD sprechen. Beide primären Immundefizienzen entstehen durch einen Rezeptordefekt auf der Zelloberfläche von Makrophagen, welche dadurch nicht in der Lage sind ihrer Schutz- und Abwehrfunktion nachzukommen. Des Weiteren kommt es zu einem starken Anstieg des jeweiligen Rezeptor-komplementären Signalmoleküls (GM-CSF und IFNγ) im Plasma der Patienten. Der Selektionsvorteil transplantierter Makrophagen, welcher bei der hereditären PAP beobachtet wurde(146), ist bei der MSMD nicht zu erwarten, da IFNγ im Gegensatz zu GM-CSF keine proliferationssteigernde Wirkung auf die Zellen besitzt(146,148). Im Hinblick auf die gewünschte vorübergehende Applikation der Zelltherapie bei MSMD-Patienten, um optimale Bedingungen für eine Knochenmarkstransplantation zu schaffen, ist das Nichtvorhandensein eines Selektionsvorteils allerdings zu vernachlässigen.
Die therapeutische Gabe der Makrophagen kann, ähnlich einer Bluttransfusion, intravenös geschehen(149) und die Zellen bereits *in vitro* spezifisch, gegenüber einem vorhandenen infektionsauslösenden Erreger im Patienten (beispielsweise BCG), stimuliert werden(150). Zurzeit bestehen zwei Möglichkeiten um die Patienten-spezifischen Makrophagen zu generieren. Einerseits können HSZ ($CD34^+$) aus dem peripheren Blut des Patienten extrahiert, *in vitro* kultiviert, genetisch korrigiert und zu Makrophagen differenziert werden(147). Andererseits können, ebenfalls *in vitro*, iPSZ aus Patientenmaterial generiert, genetisch korrigiert und im Anschluss zu Makrophagen differenziert werden(104,151).
Mit Bezug auf die Beobachtungen der Makrophagen-Zelltherapie bei der hereditären PAP, ist bei der Anwendung einer Makrophagen-Zelltherapie für MSMD-Patienten ebenfalls ein deutlicher therapeutischer Effekt zu erwarten. Dazu zählen einerseits die Reduktion der erhöhten IFNγ-Plasmaspiegel durch die Rezeptor-vermittelte Aufnahme, und andererseits die Bekämpfung bestehender Infektionen durch die Makrophagen. In der Theorie kann der prätransplantäre Zustand eines MSMD-Patienten mit der Makrophagen-Zelltherapie verbessert und stabilisiert sowie das Komplikationsrisikos einer Knochenmarkstransplantation verringert werden. Um den therapeutischen Nutzen und somit auch die Theorie zu bestätigen, wird jedoch der experimentelle Nachweis benötigt.

Zusammengefasst wurden die Schwierigkeiten, welche mit der lentiviralen Gentherapie für die IFNγR1-defizitäre MSMD einhergehen, erläutert und mögliche Lösungsansätze dieser diskutiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind ein weiterer Schritt auf dem Weg zu der klinischen Anwendung der Gentherapie für MSMD Patienten. Bevor es zu der Applikation am Patienten kommt, sollte die Funktionalität und Sicherheit der Therapie in humanen Zellen und weiteren murinen Modellen bestätigt werden.

6 Zusammenfassung

Die hereditäre Interferon-γ-Rezeptor 1 (IFNγR1) -defizitäre Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Diseases (MSMD) ist eine seltene und schwerwiegende primäre Immundefizienz ausgehend vom Verlust des IFNγR1 auf Makrophagen. Die betroffenen Patienten leiden meist schon im ersten Lebensjahr an schwer kontrollierbaren Infektionen atypischer und für gesunde Individuen nicht-virulenter Keime wie dem Bacillus Calmette-Guérin oder Keimen aus der Klasse der nichttuberkulösen, apathogenen Mykobakterien. Trotz der mehrmonatigen Therapie der Infektionen mit einer Kombination verschiedener Antibiotika, ist die erfolgreiche Behandlung nicht sichergestellt. Eine Heilung der Erkrankung kann bisher nur mit der Transplantation hämatopoetischer Stammzellen eines HLA-identischen Spenders erreicht werden. Die geringe Zahl an Therapiemöglichkeiten und die niedrige Wahrscheinlichkeit einen passenden Spender für die Knochenmarkstransplantation zu finden, sowie die mit ihr einhergehenden Risiken, zusammen mit der Schwere der Erkrankung, sind für die Letalität von 58% der Patienten im Kindesalter verantwortlich(68).

Die, in dieser Arbeit beschriebenen Versuche sind ein weiterer Schritt hin zur erfolgreichen Etablierung einer hämatopoetischen Gentherapie für die IFNγR1-defizitäre MSMD. Die angestrebte Therapie ermöglicht die Heilung der Patienten mittels der Transplantation von *in vitro* genetisch korrigierten patienteneigenen Zellen. Die Korrektur der Zellen soll unter der Verwendung von bereits in klinischen Studien genutzten SIN-Lentiviren der 3. Generation, in welchen das Transgen über einen myeloidspezifischen Promoter gesteuert wird, geschehen. In diesem Projekt wurde die Sicherheit der Anwendung zweier möglicher, myeloidspezifischer Vektoren der Gentherapie für die MSMD im murinen System nachgewiesen. Die stabile Expression des Transgens in Zellen einer Makrophagen-Zelllinie konnte gezeigt werden und ein Vektor-vermittelter Einfluss auf die Teilungsrate oder Zellviabilität wurde ausgeschlossen. Im weiteren Verlauf wurde nachgewiesen, dass die Vektoren die Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen zu Makrophagen nicht beeinflussen und zu keiner Beeinträchtigung anderer Rezeptor-vermittelte Signalwege in differenzierten Makrophagen führen. Zu guter Letzt wurde die Wiederherstellung der antimikrobiellen Fähigkeiten IFNγR1-defizitärer Makrophagen mittels der Vektoren, und damit die Vektorfunktion, nachgewiesen.

In dieser Arbeit wurde die sichere Anwendung und Funktion der myeloidspezifischen Vektoren im murinen System gezeigt. Mit Hinblick auf die erzielten Ergebnisse können nun humane *in vitro* Versuche gestartet werden, womit die klinische Etablierung einer hämatopoetischen Gentherapie für die MSMD ein Stück näher rückt.

Referenzen

1. Zech NH, Shkumatov A, Koestenbauer S. The magic behind stem cells. J Assist Reprod Genet. 2007 Jun;24(6):208–14

2. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. Cell. 2000 Jan;100(1):157–68

3. Moore MA, Metcalf D. Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. Br J Haematol. 1970;18(3):279–96

4. Cumano A, Godin I. Ontogeny of the hematopoietic system. Annu Rev Immunol. 2007;25:745–85

5. Tavian M, Coulombel L, Luton D, Clemente HS, Dieterlen-Lievre F, Peault B. Aorta-associated CD34+ hematopoietic cells in the early human embryo. Blood. 1996 Jan;87(1):67–72

6. Godin I, Garcia-Porrero JA, Dieterlen-Lievre F, Cumano A. Stem cell emergence and hemopoietic activity are incompatible in mouse intraembryonic sites. J Exp Med. 1999 Jul;190(1):43–52

7. Douarin NM Le, Houssaint E, Jotereau F V, Belo M. Origin of hemopoietic stem cells in embryonic bursa of Fabricius and bone marrow studied through interspecific chimeras. Proc Natl Acad Sci U S A. 1975 Jul;72(7):2701–5

8. Houssaint E. Differentiation of the mouse hepatic primordium. II. Extrinsic origin of the haemopoietic cell line. Cell Differ. 1981 Nov;10(5):243–52

9. Fontaine-Perus JC, Calman FM, Kaplan C, Douarin NM Le. Seeding of the 10-day mouse embryo thymic rudiment by lymphocyte precursors in vitro. J Immunol (Baltimore, Md 1950). 1981 Jun;126(6):2310–6

10. Nishikawa SI, Nishikawa S, Hirashima M, Matsuyoshi N, Kodama H. Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. Development. 1998;125(9):1747–57

11. Yokota T, Huang J, Tavian M, Nagai Y, Hirose J, Zuniga-Pflucker JC, et al. Tracing the first waves of lymphopoiesis in mice. Development. 2006;133(10):2041–51

12. Dommergues M, Aubeny E, Dumez Y, Durandy A, Coulombel L. Hematopoiesis in the human yolk sac: quantitation of erythroid and granulopoietic progenitors between 3.5 and 8 weeks of development. Bone Marrow Transplant. 1992;9 Suppl 1:23–7

13. Huyhn A, Dommergues M, Izac B, Croisille L, Katz A, Vainchenker W, et al. Characterization of hematopoietic progenitors from human yolk sacs and embryos. Blood. 1995;86(12):4474–85

14. Tavian M, Robin C, Coulombel L, Peault B. The human embryo, but not its yolk sac, generates lympho-myeloid stem cells: mapping multipotent hematopoietic cell fate in intraembryonic mesoderm. Immunity. 2001 Sep;15(3):487–95

15. Ivanovs A, Rybtsov S, Welch L, Anderson RA, Turner ML, Medvinsky A. Highly potent human hematopoietic stem cells first emerge in the intraembryonic aorta-gonad-mesonephros region. J Exp Med. 2011 Nov;208(12):2417–27

16. Kieusseian A, de la Grange PB, Burlen-Defranoux O, Godin I, Cumano A. Immature hematopoietic stem cells undergo maturation in the fetal liver. Development. 2012;139(19):3521–30

17. Mikkola HK, Orkin SH. The journey of developing hematopoietic stem cells. Development. 2006;133(19):3733–44

18. Kim CH. Homeostatic and pathogenic extramedullary hematopoiesis. J Blood Med. 2010;1:13–9

19. Randall TD, Lund FE, Howard MC, Weissman IL. Expression of murine CD38 defines a population of long-term reconstituting hematopoietic stem cells. Blood. 1996;87(10):4057–67

20. Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. Science. 1996 Jul;273(5272):242–5

21. Gorgens A, Ludwig AK, Mollmann M, Krawczyk A, Durig J, Hanenberg H, et al. Multipotent hematopoietic progenitors divide asymmetrically to create progenitors of the lymphomyeloid and erythromyeloid lineages. Stem cell reports. 2014;3(6):1058–72

22. Ackermann M, Liebhaber S, Klusmann J, Lachmann N. Lost in translation : pluripotent stem cell-derived hematopoiesis. EMBO Mol Med. 2015

23. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. Nature. 2013

24. Chang MY, Chan CK, Braun KR, Green PS, O'Brien KD, Chait A, et al. Monocyte-to-Macrophage Differentiation. J Biol Chem. 2012

25. Takahashi K. Development and Differentiation of Macrophages and Related Cells, Historical Review and Current Concepts. J. Clin. Exp. Hematop. 41, Journal of Cinical an Experimental Hematophathology. 2001

26. Pilling D, Galvis-Carvajal E, Karhadkar TR, Cox N, Gomer RH. Monocyte differentiation and macrophage priming are regulated differentially by pentraxins and their ligands. BMC Immunol. 2017;18(1):30

27. Wynn TA, Barron L. Macrophages: Master regulators of inflammation and fibrosis. Seminars in Liver Disease. 2010

28. Janusz M. Immunoregulatory function of macrophages. Postepy Hig Med Dosw. 1991

29. Keklikoglou I, De Palma M. Vascular modulatory functions of macrophages. In: Macrophages: Biology and Role in the Pathology of Diseases. 2014

30. Jantsch J, Binger KJ, Müller DN, Titze J. Macrophages in homeostatic immune function. Frontiers in Physiology. 2014

31. Mosser DM, Stewart CA. Regulatory macrophages and the maintenance of homeostasis. In: Macrophages: Biology and Role in the Pathology of Diseases. 2014

32. Fehder WP, Tuluc F, Ho W-Z, Douglas SD. Macrophages. Encyclopedia of Stress. 2010

33. Gordon S, Martinez-Pomares L. Physiological roles of macrophages. Pflugers Archiv European Journal of Physiology. 2017

34. Khan TA, Mazhar H, Saleha S, Tipu HN, Muhammad N, Abbas MN. Interferon-Gamma Improves Macrophages Function against *M. tuberculosis* in Multidrug-Resistant Tuberculosis Patients. Chemother Res Pract. 2016

35. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. Annu Rev Immunol. 2009

36. Rhee SJ, Walker WA, Cherayil BJ. Developmentally Regulated Intestinal Expression of IFN- and Its Target Genes and the Age-Specific Response to Enteric Salmonella Infection. J Immunol. 2005

37. de Oliveira CC, de Oliveira SM, Godoy LMF, Gabardo J, Buchi D de F. Canova, a Brazilian medical formulation, alters oxidative metabolism of mice macrophages. J Infect. 2006

38. Kay MA, Woo SL. Gene therapy for metabolic disorders. Trends Genet. 1994 Jul;10(7):253–7

39. Bunnell BA, Morgan RA. Gene therapy for infectious diseases. Clin Microbiol Rev. 1998 Jan;11(1):42–56

40. Baekelandt V, Strooper B De, Nuttin B, Debyser Z. Gene therapeutic strategies for neurodegenerative diseases. Curr Opin Mol Ther. 2000;2(5):540–54

41. Lowenstein PR. Why are we doing so much cancer gene therapy? Disentangling the scientific basis from the origins of gene therapy. Gene Ther. 1997 Aug;4(8):755–6

42. Pahle J, Walther W. Vectors and strategies for nonviral cancer gene therapy. Expert Opin Biol Ther. 2016;16(4):443–61

43. Pagano L, Lyon S. Celebrating 40 years of progress in bone marrow transplantation: a report from the 40th Annual Meeting of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. Future Microbiol. 2014;9(10):1117–21

44. Rebeiro P, Moore J. The role of autologous haemopoietic stem cell transplantation in the treatment of autoimmune disorders. Internal Medicine Journal. 2016

45. Collins M, Thrasher A. Gene therapy: progress and predictions. ProceedingsBiological Sci. 2015;282(1821):20143003

46. Fischer A, Abina SH-B, Touzot F, Cavazzana M. Gene therapy for primary immunodeficiencies. Clin Genet. 2015;88(6):507–15

47. Kwan A, Abraham RS, Currier R, Brower A, Andruszewski K, Abbott JK, et al. Newborn screening for severe combined immunodeficiency in 11 screening programs in the United States. J Am Med Assoc. 2014

48. Hacein-Bey Abina S, Gaspar HB, Blondeau J, Caccavelli L, Charrier S, Buckland K, et al. Outcomes Following Gene Therapy in Patients With Severe Wiskott-Aldrich Syndrome. JAMA. 2015

49. Pasic S, Vujic D, Veljković D, Slavkovic B, Mostarica-Stojkovic M, Minic P, et al. Severe combined immunodeficiency in Serbia and Montenegro between years 1986 and 2010: A single-center experience. J Clin Immunol. 2014

50. Hacein-Bey-Abina S, Hauer J, Lim A, Picard C, Wang GP, Berry CC, et al. Efficacy of Gene Therapy for X-Linked Severe Combined Immunodeficiency. N Engl J Med. 2010

51. Cicalese MP, Aiuti A. Clinical applications of gene therapy for primary immunodeficiencies. Hum Gene Ther. 2015 Apr;26(4):210–9

52. Robbins PD GS. Viral vectors for gene therapy. Pharmacol Ther. 1998

53. Medin JA, Karlsson S. Viral vectors for gene therapy of hematopoietic cells. Immunotechnology. 1997;3(1):3–19

54. Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L, et al. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. J Virol. 1998;72(12):9873–80

55. Singh S, Khan I, Khim S, Seymour B, Sommer K, Wielgosz M, et al. Safe and Effective Gene Therapy for Murine Wiskott-Aldrich Syndrome Using an Insulated Lentiviral Vector. Mol Ther - Methods Clin Dev. 2017

56. Hoffmann, D., Schott, J.W., Geis, F.K., Lange, L., Müller, F.-J., Lenz, D., Zychlinski, D., Steinemann, D., Morgan, M., Moritz, T., Schambach A. Detailed comparison of retroviral vectors and promoter configurations for stable and high transgene expression in human induced pluripotent stem cells. Gene Ther. 2017

57. Chtarto A, Bender HU, Hanemann CO, Kemp T, Lehtonen E, Levivier M, et al. Tetracycline-inducible transgene expression mediated by a single AAV vector. Gene Ther. 2003 Jan;10(1):84–94

58. Yamaguchi M, Ito A, Okamoto N, Kawabe Y, Kamihira M. Heat-inducible transgene expression system incorporating a positive feedback loop of transcriptional amplification for hyperthermia-induced gene therapy. J Biosci Bioeng. 2012 Oct;114(4):460–5

59. Jazwa A, Florczyk U, Jozkowicz A, Dulak J. Gene therapy on demand: Site specific regulation of gene therapy. Gene. 2013 Aug 10;525(2):229–38

60. Zhou H, Xiao J, Wu N, Liu C, Xu J, Liu F, et al. MicroRNA-223 Regulates the Differentiation and Function of Intestinal Dendritic Cells and Macrophages by Targeting C/EBPβ. Cell Rep. 2015 Nov 10;13(6):1149–60

61. He W, Qiang M, Ma W, Valente AJ, Quinones MP, Wang W, et al. Development of a synthetic promoter for macrophage gene therapy. Hum Gene Ther. 2006 Sep;17(9):949–59

62. Chiriaco M, Farinelli G, Capo V, Zonari E, Scaramuzza S, Matteo G Di, et al. Dual-regulated lentiviral vector for gene therapy of X-linked chronic granulomatosis. Mol Ther. 2014 Aug;22(8):1472–83

63. Barde I, Laurenti E, Verp S, Wiznerowicz M. Lineage-and stage-restricted lentiviral vectors for the gene therapy of chronic granulomatous disease. Gene Ther. 2011

64. Fukao T, Fukuda Y, Kiga K, Sharif J, Hino K, Enomoto Y, et al. An evolutionarily conserved mechanism for microRNA-223 expression revealed by microRNA gene profiling. Cell. 2007;129(3):617–31

65. Johnnidis JB, Harris MH, Wheeler RT, Stehling-Sun S, Lam MH, Kirak O, et al. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. Nature. 2008 Feb;451(7182):1125–9

66. Shibuya H, Nakasa T, Adachi N, Nagata Y, Ishikawa M, Deie M, et al. Overexpression of microRNA-223 in rheumatoid arthritis synovium controls osteoclast differentiation. Mod Rheumatol. 2013 Jul 19;23(4):674–85

67. Darleguy A, Bost-Bru C, Pagnier A, Plantaz D, Piolat C, Nugues F, et al. Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: a case report of disseminated infection due to Mycobacterium avium. Arch Pediatr. 2013 Jul;20(7):758–61

68. Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Abel L, Casanova JL. Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: genetic, immunological, and clinical features of inborn errors of IFN-gamma immunity. Semin Immunol. 2014;26(6):454–70

69. Olbrich P, Martinez-Saavedra MT, Perez-Hurtado JM, Sanchez C, Sanchez B, Deswarte C, et al. Diagnostic and therapeutic challenges in a child with complete interferon-gamma receptor 1 deficiency. Pediatr Blood Cancer. 2015 Nov;62(11):2036–9

70. Louvain de Souza T, de Souza Campos Fernandes RC, Azevedo da Silva J, Gomes Alves Júnior V, Gomes Coelho A, Souza Faria AC, et al. Microbial Disease Spectrum Linked to a Novel IL-12Rβ1 N-Terminal Signal Peptide Stop-Gain Homozygous Mutation with Paradoxical Receptor Cell-Surface Expression. Front Microbiol. 2017;8:616

71. Haverkamp MH, van de Vosse E, van Dissel JT. Nontuberculous mycobacterial infections in children with inborn errors of the immune system. J Infect. 2014 Jan;68:S134–50

72. Moncada-Vélez M, Martinez-Barricarte R, Bogunovic D, Kong X-F, Blancas-Galicia L, Tirpan C, et al. Partial IFN-γR2 deficiency is due to protein misfolding and can be rescued by inhibitors of glycosylation. Blood. 2013 Oct 3;122(14):2390–401

73. Filipe-Santos O, Bustamante J, Chapgier A, Vogt G, de Beaucoudrey L, Feinberg J, et al. Inborn errors of IL-12/23- and IFN-gamma-mediated immunity: molecular, cellular, and clinical features. Semin Immunol. 2006 Dec;18(6):347–61

74. Chapman SJ, Hill A V. Human genetic susceptibility to infectious disease. Nat Rev. 2012 Feb;13(3):175–88

75. van de Vosse E, van Dissel JT, Ottenhoff TH. Genetic deficiencies of innate immune signalling in human infectious disease. Lancet Infect Dis. 2009 Nov;9(11):688–98

76. Sharma VK, Pai G, Deswarte C, Lodha R, Singh S, Kang LW, et al. Disseminated Mycobacterium avium Complex Infection in a Child with Partial Dominant Interferon Gamma Receptor 1 Deficiency in India. J Clin Immunol. 2015 Jul 9;35(5):459–62

77. Roesler J, Kofink B, Wendisch J, Heyden S, Paul D, Friedrich W, et al. Listeria monocytogenes and recurrent mycobacterial infections in a child with complete interferon-γ-receptor (IFNγR1) deficiency: Mutational analysis and evaluation of therapeutic options. Exp Hematol. 1999

78. Jouanguy E, Altare F, Lamhamedi S, Revy P, Emile J-F, Newport M, et al. Interferon-γ –Receptor Deficiency in an Infant with Fatal Bacille Calmette–Guérin Infection. N Engl J Med. 1996

79. Kekre N, Mak KS, Stopsack KH, Binder M, Ishii K, Brånvall E, et al. Impact of HLA-Mismatch in Unrelated Donor Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Meta-Analysis. Am J Hematol. 2016

80. Brissot E, Labopin M, Stelljes M, Ehninger G, Schwerdtfeger R, et al. Comparison of matched sibling donors versus unrelated donors in allogeneic stem cell transplantation for primary refractory acute myeloid leukemia: a study on behalf of the Acute Leukemia Working Party of the EBMT. J Hematol Oncol. 2017 Jun 24;10(1):130

81. Di Stasi A, Milton DR, Poon LM, Hamdi A, Rondon G, Chen J, et al. Similar transplantation outcomes for acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome patients with haploidentical versus 10/10 human leukocyte antigen-matched unrelated and related donors. Biol Blood Marrow Transplant. 2014;20(12)

82. Yakoub-Agha I, Mesnil F, Kuentz M, Boiron JM, Ifrah N, Milpied N, et al. Allogeneic marrow stem-cell transplantation from human leukocyte antigen-identical siblings versus human leukocyte antigen-allelic-matched unrelated donors (10/10) in patients with standard-risk hematologic malignancy: a prospective study from the French . J Clin Oncol. 2006

83. Ciurea SO, Saliba RM, Rondon G, Patah PA, Aung F, Cano P, et al. Outcomes of Patients with Myeloid Malignancies Treated with Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation from Matched Unrelated Donors Compared with One Human Leukocyte Antigen Mismatched Related Donors Using HLA Typing at 10 Loci. Biol Blood Marrow Transplant. 2011;17(6)

84. Park M, Koh KN, Kim BE, Im HJ, Park KD, Kang HJ, et al. The impact of HLA matching on unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation in Korean children. Korean J Hematol. 2011

85. Roesler J, Horwitz ME, Picard C, Bordigoni P, Davies G, Koscielniak E, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for complete IFN-gamma receptor 1 deficiency: a multi-institutional survey. J Pediatr. 2004;145(6):806–12

86. Brendel C, Hänseler W, Wohlgensinger V, Bianchi M, Tokmak S, Chen-Wichmann L, et al. Human miR223 promoter as a novel myelo-specific promoter for chronic granulomatous disease gene therapy. Hum Gene Ther Methods. 2013

87. Kishihara K, Penninger J, Wallace VA, Kundig TM, Kawai K, Wakeham A, et al. Normal B-lymphocyte development but impaired T-cell maturation in CD45-exon6 protein tyrosine phosphatase deficient mice. Cell. 1993

88. Solovjov DA, Pluskota E, Plow EF. Distinct roles for the alpha and beta subunits in the functions of integrin alphaMbeta2. J Biol Chem. 2005

89. Leenen PJM, de Bruijn MFTR, Voerman JSA, Campbell PA, van Ewijk W. Markers of mouse macrophage development detected by monoclonal antibodies. J Immunol Methods. 1994

90. Bozinovski S, Seow HJ, Chan SPJ, Anthony D, McQualter J, Hansen M, et al. Innate cellular sources of interleukin-17A regulate macrophage accumulation in cigarette- smoke-induced lung inflammation in mice. Clin Sci. 2015

91. Strickler A, Pérez A, Risco M, Gallo S. [Bacillus Calmette-Guérin (BCG) disease and interleukin 12 receptor β1 deficiency: clinical experience of two familial and one sporadic case]. Rev Chil infectología órgano Of la Soc Chil Infectología. 2014

92. Kuo CY, Kohn DB. Gene Therapy for the Treatment of Primary Immune Deficiencies. Curr Allergy Asthma Rep. 2016 May 7;16(5):39

93. Xu X, Tailor CS, Grunebaum E. Gene therapy for primary immune deficiencies: a Canadian perspective. Allergy Asthma Clin Immunol. 2017 Dec 27;13(1):14

94. Canté-Barrett K, Mendes RD, Smits WK, van Helsdingen-van Wijk YM, Pieters R, Meijerink JPP. Lentiviral gene transfer into human and murine hematopoietic stem cells: size matters. BMC Res Notes. 2016 Jun 16;9(1):312

95. Boudjemaa S, Dainese L, Héritier S, Masserot C, Hachemane S, Casanova J-L, et al. Disseminated BCG osteomyelitis related to STAT 1 gene deficiency mimicking a metastatic neuroblastoma. Pediatr Dev Pathol. 2016 Mar 28;16–02–1778–CR.1

96. Knight A. Animal experiments scrutinised: systematic reviews demonstrate poor human clinical and toxicological utility. ALTEX. 2007;24(4):320–5

97. Shanks N, Greek R, Greek J. Are animal models predictive for humans? Philos Ethics Humanit Med. 2009 Jan 15;4:2

98. Mestas J, Hughes CCW. Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. J Immunol. 2004;172(5)

99. Walmsley GG, Hyun J, McArdle A, Senarath-Yapa K, Hu MS, Chung MT, et al. Induced pluripotent stem cells in regenerative medicine and disease modeling. Curr Stem Cell Res Ther. 2014 Mar;9(2):73–81

100. Valdimarsdóttir G, Richter A. [Breakthrough in research on pluripotent stem cells and their application in medicine]. Laeknabladid. 2015 Dec;101(12):581–6

101. Kim C. iPSC technology--Powerful hand for disease modeling and therapeutic screen. BMB Rep. 2015 May;48(5):256–65

102. Zhang Z, Huang B, Gao F, Zhang R. Impact of immune response on the use of iPSCs in disease modeling. Curr Stem Cell Res Ther. 2015;10(3):236–44

103. Zhang H, Xue C, Shah R, Bermingham K, Hinkle CC, Li W, et al. Functional Analysis and Transcriptomic Profiling of iPSC-Derived Macrophages and Their Application in Modeling Mendelian Disease. Circ Res. 2015 Jun 19;117(1):17–28

104. Lachmann N, Happle C, Ackermann M, Lüttge D, Wetzke M, Merkert S, et al. Gene Correction of Human Induced Pluripotent Stem Cells Repairs the Cellular Phenotype in Pulmonary Alveolar Proteinosis. Am J Respir Crit Care Med. 2013 Nov 26;189(2):131126070906004

105. Zhao Y, Stepto H, Schneider CK. Development of the First World Health Organization Lentiviral Vector Standard: Toward the Production Control and Standardization of Lentivirus-Based Gene Therapy Products. Hum Gene Ther Methods. 2017 Aug;28(4):205–14

106. Kohn DB. Historical Perspective on the Current Renaissance for Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy. Hematol Oncol Clin North Am. 2017 Oct;31(5):721–35

107. Braun CJ, Witzel M, Paruzynski A, Boztug K, Kalle C von, Schmidt M, et al. Gene therapy for Wiskott-Aldrich Syndrome—Long-term reconstitution and clinical benefits, but increased risk for leukemogenesis. Rare Dis. 2014 Jan 30;2(1):e947749

108. Olbrich H, Slabik C, Stripecke R. Reconstructing the immune system with lentiviral vectors. Virus Genes. 2017 Oct 25;53(5):723–32

109. Kohn DB, Kuo CY. New frontiers in the therapy of primary immunodeficiency: From gene addition to gene editing. J Allergy Clin Immunol. 2017 Mar;139(3):726–32

110. Ciuffi A. Mechanisms governing lentivirus integration site selection. Curr Gene Ther. 2008 Dec;8(6):419–29

111. Vartak S V., Raghavan SC. Inhibition of nonhomologous end joining to increase the specificity of CRISPR/Cas9 genome editing. FEBS J. 2015 Nov;282(22):4289–94

112. Merkert S, Martin U. Targeted genome engineering using designer nucleases: State of the art and practical guidance for application in human pluripotent stem cells. Stem Cell Res. 2016 Mar;16(2):377–86

113. Mahata B, Biswas K. Generation of Stable Knockout Mammalian Cells by TALEN-Mediated Locus-Specific Gene Editing. In: Methods in molecular biology (Clifton, NJ). 2017. p. 107–20

114. Chapman JR, Taylor MRG, Boulton SJ. Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice. Mol Cell. 2012 Aug 24;47(4):497–510

115. Kawahara A, Hisano Y, Ota S, Taimatsu K. Site-Specific Integration of Exogenous Genes Using Genome Editing Technologies in Zebrafish. Int J Mol Sci. 2016 May 13;17(5):727

116. Casanova J-L, Jouanguy E, Lamhamedi-Cherradi S, Lammas D, Dorman SE, Fondanèche M-C, et al. A human IFNGR1 small deletion hotspot associated with dominant susceptibility to mycobacterial infection. Nat Genet. 1999 Apr 1;21(4):370–8

117. Nugent NR, Goldberg A, Uddin M. Topical Review: The Emerging Field of Epigenetics: Informing Models of Pediatric Trauma and Physical Health. J Pediatr Psychol. 2016 Jan;41(1):55–64

118. Newport MJ, Huxley CM, Huston S, Hawrylowicz CM, Oostra BA, Williamson R, et al. A Mutation in the Interferon-γ –Receptor Gene and Susceptibility to Mycobacterial Infection. N Engl J Med. 1996 Dec 26;335(26):1941–9

119. Chandrasegaran S, Carroll D. Origins of Programmable Nucleases for Genome Engineering. J Mol Biol. 2016 Feb 27;428(5):963–89

120. Modares M, Shariati L, Hejazi Z, Shahbazi M, Tabatabaiefar MA, Khanahmad H. Inducing indel mutation in the *SOX6* Gene by Zinc Finger Nuclease for gamma reactivation: An Approach towards Gene Therapy of Beta Thalassemia. J Cell Biochem. 2017 Sep 23

121. Urnov FD, Miller JC, Lee Y-L, Beausejour CM, Rock JM, Augustus S, et al. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. Nature. 2005 Jun 2;435(7042):646–51

122. Dreyer A-K, Hoffmann D, Lachmann N, Ackermann M, Steinemann D, Timm B, et al. TALEN-mediated functional correction of X-linked chronic granulomatous disease in patient-derived induced pluripotent stem cells. Biomaterials. 2015 Nov;69:191–200

123. Barman HK, Rasal KD, Chakrapani V, Ninawe AS, Vengayil DT, Asrafuzzaman S, et al. Gene editing tools: state-of-the-art and the road ahead for the model and non-model fishes. Transgenic Res. 2017 Oct 5;26(5):577–89

124. Sanjana NE, Cong L, Zhou Y, Cunniff MM, Feng G, Zhang F. A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering. Nat Protoc. 2012 Jan 5;7(1):171–92

125. Tesson L, Usal C, Ménoret S, Leung E, Niles BJ, Remy S, et al. Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. Nat Biotechnol. 2011 Aug 5;29(8):695–6

126. Wang H, Hu Y-C, Markoulaki S, Welstead GG, Cheng AW, Shivalila CS, et al. TALEN-mediated editing of the mouse Y chromosome. Nat Biotechnol. 2013 May 12;31(6):530–2

127. Liu H, Chen Y, Niu Y, Zhang K, Kang Y, Ge W, et al. TALEN-Mediated Gene Mutagenesis in Rhesus and Cynomolgus Monkeys. Cell Stem Cell. 2014 Mar 6;14(3):323–8

128. Qasim W, Zhan H, Samarasinghe S, Adams S, Amrolia P, Stafford S, et al. Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells. Sci Transl Med. 2017 Jan 25;9(374):eaaj2013

129. Sweeney CL, Zou J, Choi U, Merling RK, Liu A, Bodansky A, et al. Targeted Repair of CYBB in X-CGD iPSCs Requires Retention of Intronic Sequences for Expression and Functional Correction. Mol Ther. 2017 Feb 1;25(2):321–30

130. Menon T, Firth AL, Scripture-Adams DD, Galic Z, Qualls SJ, Gilmore WB, et al. Lymphoid Regeneration from Gene-Corrected SCID-X1 Subject-Derived iPSCs. Cell Stem Cell. 2015 Apr 2;16(4):367–72

131. Mussolino C, Alzubi J, Fine EJ, Morbitzer R, Cradick TJ, Lahaye T, et al. TALENs facilitate targeted genome editing in human cells with high specificity and low cytotoxicity. Nucleic Acids Res. 2014 Jun 2;42(10):6762–73

132. Chira S, Gulei D, Hajitou A, Zimta A-A, Cordelier P, Berindan-Neagoe I. CRISPR/Cas9: Transcending the Reality of Genome Editing. Mol Ther - Nucleic Acids. 2017 Jun 16;7:211–22

133. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. Cell. 2014 Jun 5;157(6):1262–78

134. Liu X, Homma A, Sayadi J, Yang S, Ohashi J, Takumi T. Sequence features associated with the cleavage efficiency of CRISPR/Cas9 system. Sci Rep. 2016 Jan 27;6:19675

135. Zhang J-H, Adikaram P, Pandey M, Genis A, Simonds WF. Optimization of genome editing through CRISPR-Cas9 engineering. Bioengineered. 2016 Apr 8;7(3):166–74

136. Kleinstiver BP, Prew MS, Tsai SQ, Topkar V V, Nguyen NT, Zheng Z, et al. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. Nature. 2015 Jul 23;523(7561):481–5

137. Fieschi C, Dupuis S, Picard C, Smith CI, Holland SM, Casanova JL. High levels of interferon gamma in the plasma of children with complete interferon gamma receptor deficiency. Pediatrics. 2001 Apr;107(4):E48

138. Selleri C, Maciejewski J, Sato T, Young N. Interferon-gamma constitutively expressed in the stromal microenvironment of human marrow cultures mediates potent hematopoietic inhibition. Blood. 1996;87(10)

139. de Bruin AM, Voermans C, Nolte MA. Impact of interferon-γ on hematopoiesis. Blood. 2014 Oct 16;124(16):2479–86

140. Delisle J-S, Gaboury L, Belanger M-P, Tasse E, Yagita H, Perreault C. Graft-versus-host disease causes failure of donor hematopoiesis and lymphopoiesis in interferon- receptor-deficient hosts. Blood. 2008 Sep 1;112(5):2111–9

141. Rottman M, Soudais C, Vogt G, Renia L, Emile J-F, Decaluwe H, et al. IFN-γ Mediates the Rejection of Haematopoietic Stem Cells in IFN-γR1-Deficient Hosts. Thrasher AJ, editor. PLoS Med. 2008 Jan 29;5(1):e26

142. Horwitz ME, Uzel G, Linton GF, Miller JA, Brown MR, Malech HL, et al. Persistent Mycobacterium avium infection following nonmyeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation for interferon-gamma receptor-1 deficiency. Blood. 2003;102(7):2692–4

143. Reinisch W, de Villiers W, Bene L, Simon L, Rácz I, Katz S, et al. Fontolizumab in moderate to severe Crohn's disease: A phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled, multiple-dose study. Inflamm Bowel Dis. 2010 Feb;16(2):233–42

144. Roberts S, McCall IW, Darby AJ, Menage J, Evans H, Harrison PE, et al. Autologous chondrocyte implantation for cartilage repair: monitoring its success by magnetic resonance imaging and histology. Arthritis Res Ther. 2003;5(1):R60-73

145. Helary C, Zarka M, Giraud-Guille MM. Fibroblasts within concentrated collagen hydrogels favour chronic skin wound healing. J Tissue Eng Regen Med. 2012 Mar;6(3):225–37

146. Suzuki T, Arumugam P, Sakagami T, Lachmann N, Chalk C, Sallese A, et al. Pulmonary macrophage transplantation therapy. Nature. 2014 Oct 1;514(7523):450–4

147. Happle C, Lachmann N, kuljec J, Wetzke M, Ackermann M, Brennig S, et al. Pulmonary transplantation of macrophage progenitors as effective and long-lasting therapy for hereditary pulmonary alveolar proteinosis. Sci Transl Med. 2014 Aug 20;6(250):250ra113-250ra113

148. Arai K, Lee F, Miyajima A, Miyatake S, Arai N, Yokota T. Cytokines: Coordinators of Immune and Inflammatory Responses. Annu Rev Biochem. 1990 Jun;59(1):783–836

149. Charron D. Autologous white blood cell transfusion: Toward a younger immunity. Hum Immunol. 2007 Oct;68(10):805–12

150. Brestrich G, Zwinger S, Fischer A, Schmück M, Röhmhild A, Hammer MH, et al. Adoptive T-Cell Therapy of a Lung Transplanted Patient with Severe CMV Disease and Resistance to Antiviral Therapy. Am J Transplant. 2009 Jul;9(7):1679–84

151. Suzuki T, Mayhew C, Sallese A, Chalk C, Carey BC, Malik P, et al. Use of Induced Pluripotent Stem Cells To Recapitulate Pulmonary Alveolar Proteinosis Pathogenesis. Am J Respir Crit Care Med. 2013 Nov 26;189(2):131126070944001

Appendix

Virusproduktion

In der nachfolgenden Tabelle sind alle produzierten lentiviralen Vektoren aufgelistet.

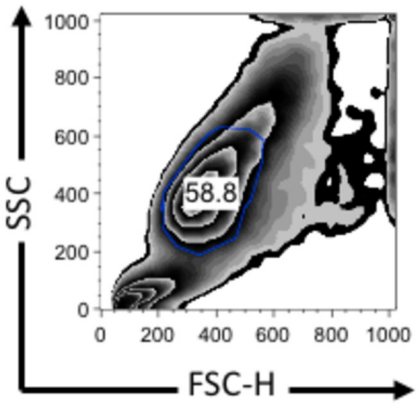
Tab. 6. Produzierter Virus

Vektor	Überstand	Titer [Viruspartikel/ml]
Lv.SFFV.Ifnγr1	1	$4{,}15*10^8$
	2	$2{,}85*10^8$
Lv.SFFV.Ifnγr1	1	$3{,}08*10^8$
	2	$1{,}92*10^8$
Lv.SFFV.Ifnγr1	1	$1{,}4*10^7$
	2	$6{,}75*10^7$
Lv.MSP.Ifnγr1	1	$7{,}02*10^6$
	2	$7{,}27*10^6$
Lv.MSP.Ifnγr1	1	$1{,}06*10^8$
	2	$9{,}79*10^7$
Lv.miR223.Ifnγr1	1	$1{,}05*10^7$
	2	$1{,}99*10^6$

Lebend-Gate

Das Lebend-Gate wurde anhand der Größe (FSC-H) und der Granularität (SSC) der Zellen, bestimmt mittels Durchflusszytometrie, gelegt. In der untenstehenden Abbildung befindet sich die Lebend-Gate Population im blau-umrandeten Bereich. In diesem Beispiel fielen 58.8% aller analysierten Zellen in das Gate.

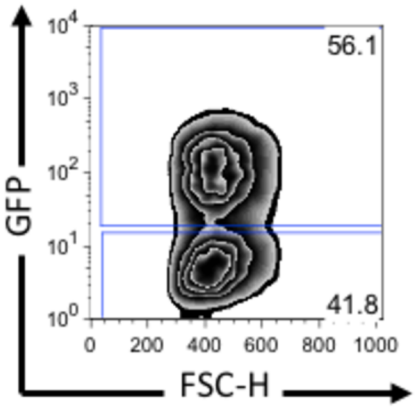
Abb. 24 Beispiel Lebend-Gate



GFP-Gate

Das GFP-Gate wurde anhand der zellulären GFP-Expression, bestimmt mittels Durchflusszytometrie, gelegt. In der untenstehenden Abbildung befindet sich die GFP^+-gegatete Population im oberen blau-umrandeten Bereich. Die GFP^--gegatete Population befindet sich in dieser Abbildung im unteren blau-umrandeten Bereich. In diesem Beispiel sind somit 56.1% aller analysierten Zellen GFP^+ und 41,8% aller Zellen GFP^-.

Abb. 25 Beispiel GFP-Gate



Rohdaten der Evaluation der Teilungsrate transduzierter Zellen

In der untenstehenden Abbildung sind die Daten der Durchflusszytometrie, die zur Evaluation der Teilungsrate der RAW264.7 Zellen genutzt wurden, repräsentativ dargestellt. Die mittlere fluoreszierende Intensität (MFI) des e670Fluor® Dye wurde zu den Zeitpunkten 0 h und 48 h in dem Programm FlowJo (LCC) ermittelt. Die Differenz der MFI von 0 h und 48 h ergab die ΔMFI, welche zur Auswertung des Versuches diente.

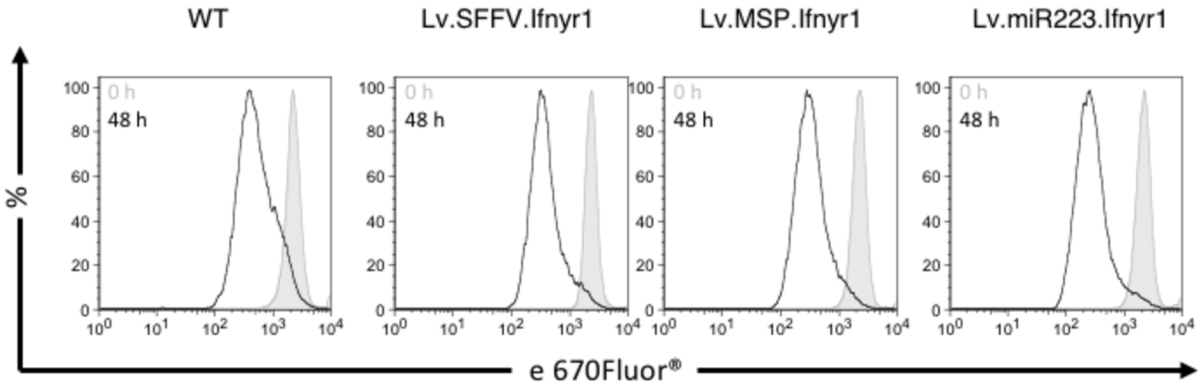


Abb. 26 Repräsentative Abbildung der Rohdaten für die Evaluation der Teilungsrate
[n=4, Lebend-Gate]

Rohdaten der Evaluation der Zellviabilität transduzierter Zellen

In der untenstehenden Abbildung sind die Daten der Durchflusszytometrie, die zur Evaluation der Zellviabilität der RAW264.7 Zellen genutzt wurden, repräsentativ dargestellt. Die Propidiumiodid$^+$ (PI) Zellen (in %) wurden zu den Zeitpunkten 0 h und 48 h ermittelt. Die Differenz der PI$^+$ Zellen von 48 h und 0 h diente zur Berechnung des „Δ [48h-0h] Propidiumiodid positive Zellen [%]“ Wertes. Dieser wurde dann zur Auswertung des Versuches genutzt.

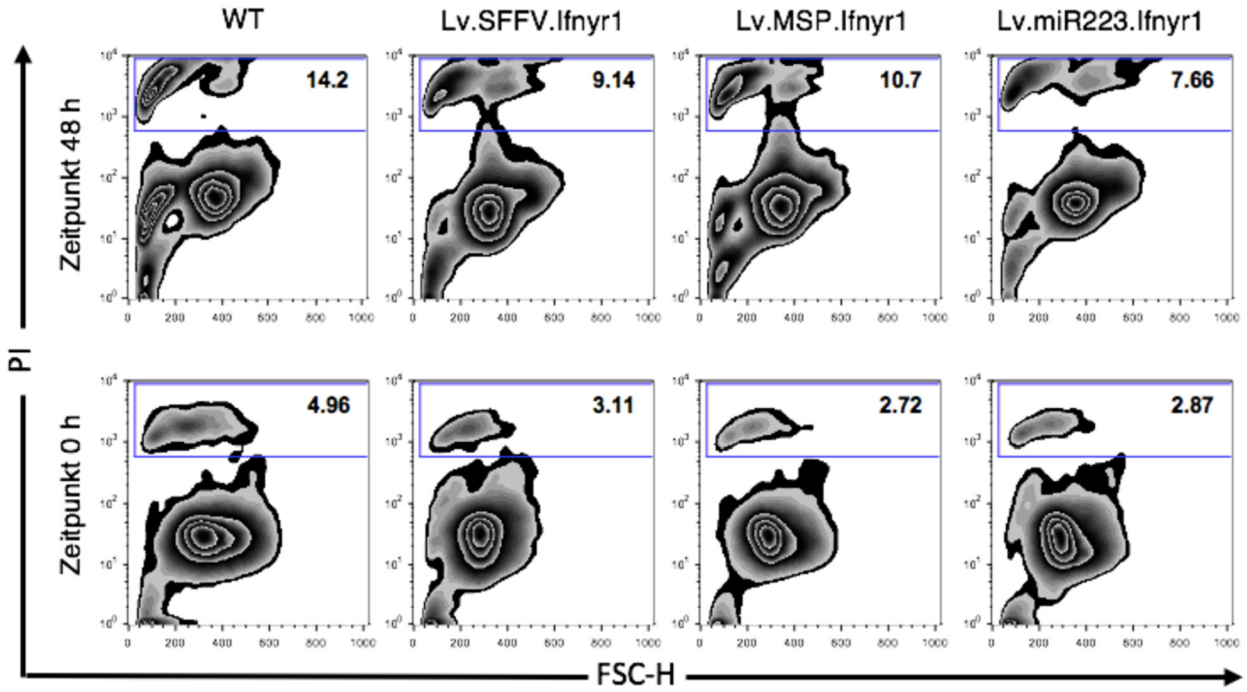


Abb. 27 Repräsentative Abbildung der Rohdaten für die Evaluation der Zellviabilität
[n=4]

Vollständige Gele der Restriktionsverdaue

In den folgenden Abbildungen sind die Gele der Restriktionsverdaue als vollständige Aufnahme dargestellt. Die Basenpaargröße [Bp] wurde für eine bessere Übersicht in die Bilder eingefügt.

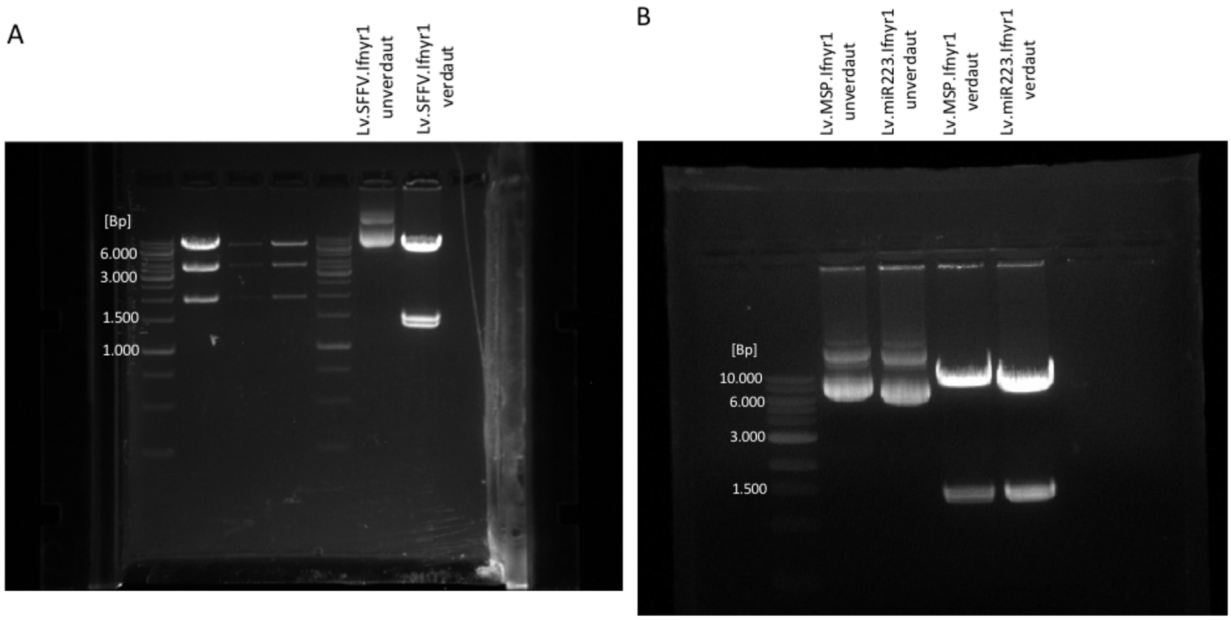


Abb. 28 Vollständiges Gel des Restriktionsverdaus
A Gel des Restriktionsverdaus von Lv.SFFV.Ifnγr1.IRES.eGFP [n=1] **B** Gel des Restriktionsverdaus von Lv.MSP.Ifnγr1.IRES.eGFP und Lv.miR223.Ifnγr1.IRES.eGFP [n=2; repräsentative Abbildung]

Vollständige Aufnahmen der Western Blots

In den folgenden Abbildungen sind die vollständigen Aufnahmen der Western Blots dargestellt. Da die STAT1-Antikörper Färbung auf demselben, gestrippten, Blot geschah wie die pSTAT1-Antikörper Färbung wurde auf eine erneute Tubulin-Antikörper Färbung verzichtet. Die Größe der Banden [kD] wurde zur besseren Übersicht in die Abbildung eingefügt.

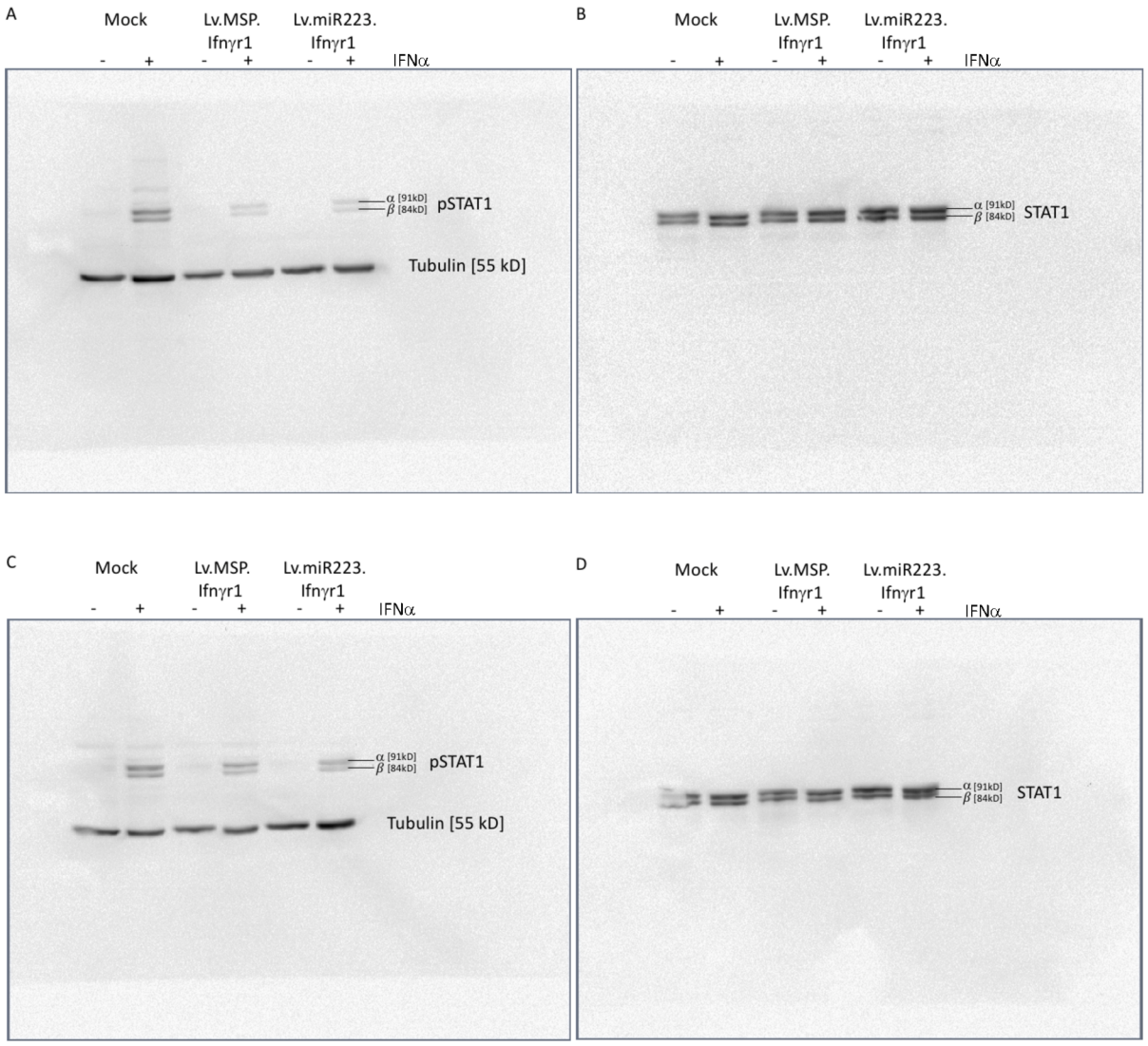


Abb. 29 Vollständige Aufnahme Western Blot
A-D Vollständige Aufnahmen der Western Blots **A&B** WT-KM-abgeleitete $M\Phi^{Mock}$, $M\Phi^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und $M\Phi^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ **A** Tubulin- und pSTAT1-Antikörper Färbung **B** STAT1-Antikörper Färbung
C&D $Ifn\gamma r1^{-/-}$-KM-abgeleitete $M\Phi^{Mock}$, $M\Phi^{Lv.MSP.Ifn\gamma r1}$ und $M\Phi^{Lv.miR223.Ifn\gamma r1}$ **C** Tubulin- und pSTAT1-Antikörper Färbung **D** STAT1-Antikörper Färbung
[n=1]

Vollständige Sequenz der cDNA des verwendeten Interferon-γ-Rezeptor-1 Gens

Im Folgenden ist die cDNA Sequenz des verwendeten Ifnγr1 abgebildet. Die Basen der Nukleotide wurden folgendermaßen abgekürzt:

A *Adenin*; **T** *Thymin*; **G** *Guanin*; **C** *Cytosin*

ATGGGCCCGCAGGCGGCAGCTGGCAGGATGATTCTGCTGGTGGTCCTGATGCTGTCTGCGAAGGTCGGGA
GTGGAGCTTTGACGAGCACTGAGGATCCTGAGCCTCCCTCGGTGCCTGTACCGACGAATGTTCTAATTAA
GTCTTATAACTTGAACCCTGTCGTATGCTGGGAATACCAGAACATGTCACAGACTCCTATTTTTACTGTA
CAGGTAAAGGTGTATTCGGGTTCCTGGACTGATTCCTGCACCAACATTTCTGATCATTGTTGTAATATCT
ATGAACAAATTATGTATCCTGATGTATCTGCCTGGGCCAGAGTTAAAGCTAAGGTTGGACAAAAAGAATC
TGACTATGCACGGTCAAAAGAGTTCCTTATGTGCCTAAAGGGAAAGGTCGGGCCCCCTGGCCTGGAGATC
AGGAGGAAGAAGGAAGAACAGCTCTCCGTCCTCGTATTTCACCCTGAAGTCGTTGTGAATGGAGAGAGCC
AGGGAACCATGTTTGGTGACGGGAGCACCTGTTACACATTCGACTATACTGTGTATGTGGAGCATAACCG
GAGTGGGGAGATCCTACATACGAAACATACGGTCGAAAAAGAAGAGTGTAATGAGACTCTGTGTGAGTTA
AACATCTCAGTATCCACACTGGATTCCAGATATTGTATTTCAGTAGACGGAATCTCATCTTTCTGGCAAG
TTAGAACAGAAAAATCGAAAGACGTCTGTATCCCTCCTTTCCATGATGACAGAAAGGATTCAATTTGGAT
TCTGGTGGTTGCTCCTCTTACCGTCTTTACAGTAGTTATCCTGGTATTTGCGTATTGGTATACTAAGAAG
AATTCATTCAAGAGAAAAAGCATAATGTTACCTAAGTCCTTGCTCTCTGTGGTAAAAAGTGCCACGTTAG
AGACAAAACCTGAATCGAAGTATTCACTTGTCACACCGCACCAGCCAGCTGTCCTAGAGAGTGAGACGGT
GATCTGTGAAGAGCCCCTGTCCACAGTGACAGCTCCAGACAGCCCCGAAGCAGCAGAACAGGAAGAACTT
TCAAAAGAAACAAAGGCTCTGGAGGCTGGAGGAAGCACGTCTGCCATGACCCCAGACAGCCCTCCAACTC
CGACACAAAGACGCAGCTTTTCCCTGTTAAGTAGTAACCAGTCAGGCCCTTGTAGCCTCACCGCCTATCA
CTCCCGAAACGGCTCTGACAGTGGCCTCGTGGGATCGGGCAGCTCCATATCGGACTTGGAATCTCTCCCA
AACAACAACTCAGAAACAAAGATGGCAGAGCACGACCCTCCACCCGTGAGAAAGGCCCCCATGGCCTCCG
GTTATGACAAACCGCACATGTTGGTGGACGTGCTTGTGGATGTTGGGGGGAAGGAGTCTCTCATGGGGTA
TAGACTCACAGGAGAGGCCCAGGAGCTGTCCTAA

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Hämatopoetische Organe in der Embryonalentwicklung 2

Abb. 2 Adulte Hämatopoese 3

Abb. 3 Physiologische Antwort auf Mykobakterien in Makrophagen 9

Abb. 4 Viraler Vektor 25

Abb. 5 Plasmidkarten und Restriktionsverdau 27

Abb. 6 Virustiterbestimmung 28

Abb. 7 Vektorevaluation RAW264.7 Zelllinie 30

Abb. 8 Vektorevaluation in WT-KM abgeleiteten MΦ 32

Abb. 9 Vektorevaluation in Ifnγr1$^{-/-}$-KM abgeleiteten MΦ 34

Abb. 10 Evaluation der Teilungsrate transduzierter RAW264.7 Zellen 36

Abb. 11 Evaluation der Zellviabilität transduzierter RAW264.7 Zellen 37

Abb. 12 Evaluation der Trans-genexpression in RAW264.7 Zellen 38

Abb. 13 Schema der Prozedur muriner Lin^{-}-Zellen 39

Abb. 14 Differenzierungsmarker WT-KM abgeleiteter Makrophagen 41

Abb. 15 Differenzierungsmarker Ifnγr1$^{-/-}$ KM abgeleiteter Makrophagen 42

Abb. 16 Morphologie Ifnγr1$^{-/-}$ KM abgeleiteter Makrophagen 43

Abb. 17 Evaluation der Teilungsrate transduzierter WT-MΦ 44

Abb. 18 Evaluation von phos-phoryliertem STAT5 nach GM-CSF Stimulation 45

Abb. 19 Evaluation von phosphoryliertem STAT1 nach IFNα Stimulation 46

Abb. 20 Evaluation der intrazellu-lären Elimination von BCG nach IFNγ-Stimulation 47

Abb. 21 Evaluation der intrazellulären Elimination von BCG nach IFNγ-Stimulation in WT-MΦ 48

Abb. 22 Therapeutisches Nutzen des Non-Homologous End-Joining bei der MSMD 53

Abb. 23 Therapeutisches Nutzen der homologen Reparatur bei der MSMD 54

Abb. 24 Beispiel Lebend-Gate 69

Abb. 25 Beispiel GFP-Gate 70

Abb. 26 Repräsentative Abbildung der Rohdaten für die Evaluation der Teilungsrate 70

Abb. 27 Repräsentative Abbildung der Rohdaten für die Evaluation der Zellviabilität 71

Abb. 28 Vollständiges Gel des Restriktionsverdaus 72

Abb. 29 Vollständige Aufnahme Western Blot 73

Tabellenverzeichnis

Tab. 1. Kulturmedien mit Zusätzen für Zelllinien 14

Tab. 2. Kulturmedien mit Zusätzen für KM-abgeleitete MΦ 15

Tab. 3. Antikörper Durchflusszytometrie 18

Tab. 4. Western Blot Puffer 23

Tab. 5. Western Blot Antikörper 23

Tab. 6. Produzierter Virus 69

Publikationsbeiträge

Ein Teil der Ergebnisse dieses Projektes wurde in diesem Manuskript veröffentlicht:

Hematopoietic stem cell gene therapy for IFNγR1 deficiency protects mice from mycobacterial infections
Hetzel M, Mucci A, Blank P, Nguyen AHH, **Schiller J**, Halle O, Kühnel MP, Billig S, Meineke R, Brand D, Herder V, Baumgärtner W, Bange FC, Goethe R, Jonigk D, Förster R, Gentner B, Casanove JL, Bustamante J, Schambach A, Kalinke U, Lachmann N; *Blood* 12. Dezember 2017; blood-2017-10-812859

Erklärung

Ich, Jan Schiller, erkläre, dass ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel „**Optimierte Hämatopoetische Gentherapie für die Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Diseases“** im Institut der experimentellen Hämatologie unter Betreuung von Prof. Dr. rer. nat. Nico Lachmann durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.
Die Gelegenheit zum vorliegenden Promotionsverfahren ist mir nicht kommerziell vermittelt worden. Insbesondere habe ich keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.
Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.
Ergebnisse der Dissertation wurden im Journal Blood veröffentlicht.

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Zu Beginn möchte ich mich bei meinem Doktorvater und Betreuer PD Dr. Nico Lachmann für die Möglichkeit mein Dr. med. Projekt in seiner Arbeitsgruppe verwirklichen zu können, bedanken. Ebenfalls möchte ich mich bei meinem Zweitbetreuer Prof. Dr. Ulrich Baumann für die Abrundung des Projekts durch das Einbringen seiner Ideen bedanken. Des Weiteren möchte ich Dr. Susanne Kruse, stellvertretend für die HBRS, für die Ermöglichung der Teilnahme an einer strukturierten Doktorandenausbildung (StrucMed) danken. Ich möchte auch allen Mitwirkenden und Mitarbeitern des REBIRTH Excellence Clusters an dieser Stelle meinen Dank für die Möglichkeit zur Arbeit in REBIRTH Laboren aussprechen. Besonders hervorheben und bedanken möchte ich mich bei dem Deutschen Zentrum für Infektionsforschung für die finanzielle Unterstützung meines Projektes.

Mein Dank gilt allen Kooperationspartnern, deren Arbeit maßgeblich zu Teilen dieses Projekt beigetragen haben, erwähnen möchte ich Mark Kühnel, Patrick Blank und Daniel Brand.

Während meiner Zeit im Labor habe ich einiges gelernt und mich auch persönlich weiterentwickelt. Das lag aber wohl nicht am Labor, sondern an meinen Kollegen, die ich nun lieber Freunde nennen mag. Mit euch war die Arbeit um einiges spaßiger und meiner Meinung nach auch produktiver ☺ Nicht zu vergessen, dass für lange Tage fast immer ein Kuchen parat war (Danke Fennja!). Da es den Rahmen sprengen würde alle Namen aufzuzählen, möchte ich mich vor allem bei den folgenden Personen ganz herzlich bedanken. Ariane, vielen Dank für die Einarbeitung in die wissenschaftliche Arbeit, vor allem in die Basics, welche du mir am Anfang beigebracht hast ☺. Nachdem Ariane das Labor verlassen hatte, brauchte ich natürlich neue Antwortgeber auf meine vielen Fragen, und die fand ich glücklicherweise mit euch, Miri und Theresa. Vielen lieben Dank euch beiden für die zahlreichen Stunden, in denen ihr meine Fragen beantwortet habt oder praktische Dinge im Labor erklärt habt. Auch dir, Marc, möchte ich für die Unterstützung bei einigen Versuchen, aber vor allem für die ganzen lustigen Momente, die wir im Labor hatten, danken. Formell, bereits im ersten Satz erwähnt, möchte ich dir hier, im Freundesteil, noch einmal ganz herzlich danken Nico. Für all die von dir gewährten Freiheiten während meiner Arbeit, die offenen und ehrlichen Gespräche, die fordernden und motivierenden Diskussionen und ein rundum sehr gutes Jahr, welches wir zusammen verbracht haben.

Ein großes Dankeschön an alle Korrekturleser und Impulsgeber und alle, die auf anderem Wege zu der Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben und hier nicht namentlich erwähnt sind.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, ohne die ich wohl gerade nicht in der Lage wäre diese Danksagung zu schreiben. Vielen lieben Dank, dass ihr mich bis hier her immer unterstützt

habt und dass ihr mir ein so freies und nach meinen Vorstellungen gestaltetes Leben ermöglicht. Außerdem möchte ich mich an diesem Punkt bei dir, Maike, bedanken, da wir es dann doch, zu zweit, besser mit unseren Eltern gemeistert haben, als es alleine möglich gewesen wäre ☺ Mein Dank gilt natürlich auch dem Rest meiner Familie, und vor allem dir Oma, möchte ich auch noch einmal danke für die Unterstützung und die schöne Zeit, welche wir im letzten Jahr zusammen verbracht haben sagen.