

Tuna Toptan

Dr. med

Rhadinoviral vector-mediated transgene expression and regulation

Geboren am 11.11.1978 in Ankara, Türkei

Diplom (Approbation) am 01.11.2002 an der Universität Gazi, Ankara, Türkei

Promotionsfach: Infektiologie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Helmut Fickenscher

Herpesvirus saimiri (HVS) ist der Prototyp der Rhadinoviren. Subgruppe-C-Stämme können ein breites Spektrum von Zellen transduzieren, darunter primäre humane T-Zellen, die es zu stabilem Wachstum transformiert. HVS ist als viraler Gentherapie-Vektor wegen der großen Verpackungskapazität, des breiten Zelltropismus und der langfristigen Persistenz als nicht-integrierende Episome vorteilhaft. Für die Anwendung von HVS als Gentherapie-Vehikel sind aber ein funktioneller Abschalt-Mechanismus und Deletionsmutanten der viralen Onkogene nützlich. Durch Red-Rekombinations-Techniken wurden in dieser Doktorarbeit HVS-Vektoren auf Basis bakterieller artifizieller Chromosomen für ihren Einsatz optimiert.

Die T-Zell-vermittelte adoptive Immuntherapie hat sich als Alternative zur konventionellen Krebstherapie durchgesetzt. Hier wurde die spezifische Antigen-Erkennung durch einen rekombinanten T-Zellrezeptor ermöglicht. In diesem Projekt wurde rekombinantes HVS zu T-Zell-Vektoren für die Expression eines chimären T-Zellrezeptors so modifiziert, dass die gezielte Tötung von Tumorzellen *in vitro* erzielt wurde. Jedoch konnte weder die Oberflächen-Expression des Rezeptors noch die gezielte Abtötung länger als für einige Monate erhalten werden.

Die ektopische Expression der humanen Telomerase-Reverse Transkriptase (hTERT) verlängert die Lebensdauer vieler somatischer Zelltypen. Die Substitution oder Koexpression der HVS-Onkogene mit *hTERT* konnte hier die Marker der HVS-transformierten T-Zellen weder aufrecht erhalten noch verstärken, obwohl *hTERT* funktionell durch den Rhadinovirus-Vektor exprimiert wurde. Außerdem erschien die Telomeraseaktivität posttranslational in den transduzierten T-Zellen unabhängig von der hTERT-Expression reguliert zu werden.

Die Tetrazyklin-abhängige Transgen-Expression war ein weiterer Aspekt der Doktorarbeit. Hier wurde mit HVS-Vektoren eine effiziente und regulierbare Transgenexpression in unter-

schiedlichen Zellsystemen erfolgreich erreicht. Manche Zelltypen zeigten unter spezifischen Bedingungen eine niedrige Basalexpression, die vermutlich durch unterschiedliche Promotoraktivität oder durch geringgradige Virusreplikation bedingt war. Andererseits wurde erstmalig eine strikt regulierbare Transgenexpression in murinen sensorischen Neuronen nachgewiesen. Jedoch war die induzierbare Transgenexpression in primären T-Zellen auf eine kurze Zeitdauer beschränkt. Deshalb benötigt das duale Kontrollsystem weitere Entwicklung.

Die wesentliche Limitation in jedem Projektteil schien die kurzfristige Transgen-Expression in latent infizierten T-Zellen, aber nicht die Funktionalität der Transgene zu sein. Deshalb wurden neue Insertionsstellen für Transgene und Promotoren für eine langfristige Expression untersucht, so dass ein neuartiges rhadinovirales Vektordesign aufgebaut werden kann. Dadurch sollten die wesentlichen Hindernisse auf dem Weg zu effizienter T-Zell vermittelter adoptiver Immuntherapie und zu regulierbarer Transgenexpression überwunden werden.