

Leopold Sellner  
Dr. med.

## **Entwicklung und präklinische Validierung neuer rekombinanter Adeno-assoziiierter viraler Vektoren für die Gentherapie mit CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen**

Geboren am 22.02.1984 in Salzburg

Staatsexamen am 12. Juni 2009 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)

Doktorvater: Prof. Dr. med. W. Jens Zeller

Durch ihre Pluripotenz und Plastizität sind in der Gentherapie hämatopoetische Stammzellen (HSZ) von besonderem Interesse. Dies gilt sowohl für angeborene wie auch erworbene Defekte des hämatopoetischen Systems. Besonders G-CSF-mobilisierte CD34<sup>+</sup> periphere Blutstammzellen können leicht bei geringer Invasivität gesammelt werden, wodurch sie sich hervorragend für gentherapeutische Studien eignen. Bedauernswerterweise fehlt den meisten gegenwärtig eingesetzten Vektorsystemen entweder eine ausreichende Transduktionseffizienz oder ein akzeptables Sicherheitsprofil. Auf Adeno-assoziierten Viren (AAV) basierende Vektoren besitzen ein akzeptables Sicherheitsprofil verglichen mit anderen Vektorsystemen. Unglücklicherweise erreichen konventionelle rekombinante AAV (rAAV) -basierte Vektoren derzeit weder für präklinische noch für klinische Applikationen ausreichende Gentransfereffizienzen bei CD34<sup>+</sup> peripheren Blutstammzellen (PBSZ).

In dieser empirischen Studie konnte durch Kapsidmodifikation an auf rAAV Serotyp 2 (rAAV2) basierten Vektoren mithilfe einer AAV-„random peptide library“, bei der sieben randomisierte Aminosäuren in die Heparinbindungsregion des AAV-Kapsids eingefügt werden, die Gentransfereffizienz sowohl an Leukämiezelllinien als auch an primären humanen CD34<sup>+</sup> peripheren Blutstammzellen im Vergleich zu konventionellen rAAV2-Vektoren signifikant gesteigert werden. Diese modifizierten Vektoren zeigten zusätzlich eine höhere Spezifität für Blutvorläuferzellen, da sie Zelllinien solider Tumoren weniger effizient transduzierten als konventionelle rAAV2-Vektoren.

Zusätzlich wurde das Potential pseudotypisierter rAAV2-Vektoren, welche ein AAV2-Genom in Kapside anderer AAV-Serotypen integrieren können, für die Transduktion sowohl von Leukämiezelllinien als auch von primären humanen CD34<sup>+</sup> peripheren Blutstammzellen evaluiert. Dafür wurden die rAAV2-Vektoren mit den Kapsiden der Serotypen eins bis sechs

getestet. Mit dem Kapsid des Serotypen sechs wurde ein sehr potenter rAAV2-Vektor (rAAV2/6) für diese Zielzellen entdeckt.

Um die Limitierung der Genexpression in primären humanen CD34<sup>+</sup> PBSZ durch die Notwendigkeit einer Doppelstrangsynthese des einsträngigen AAV-Genoms zu umgehen wurde die Effizienz pseudotypisierter rAAV-Vektoren mit einem selbst-komplementären (sc), doppelsträngigen Transgen getestet, wodurch signifikant höhere Transgenexpressionsraten verglichen mit ihrem konventionellen, einsträngigen Gegenpart erreicht werden konnten.

Mit diesen neu entwickelten rAAV-Vektoren wird eine Grundlage für die erfolgreiche Gentherapie bei primären Blutvorläuferzellen geliefert. Die Gentransfer- und Genexpressioneffizienz bei primären humanen CD34<sup>+</sup> PBSZ ist dabei hoch genug, um ein breites Spektrum an Anwendungsmöglichkeiten in präklinischen Studien an HSZ sowohl *in vitro* als auch im Mausmodell testen zu können. Sollten diese Versuche erfolgreich sein, können diese Vektoren anschließend den Einsatz von rAAV-Vektoren in klinischen Gentherapiestudien mit HSZ ermöglichen.