

Jens-Uwe Appelt  
Dr. sc. hum.

## **Entwicklung und Anwendung von Hochdurchsatzanwendungen zur Charakterisierung und Analyse von genomischen Vektor-Integrationsorten im Kontext der retroviralen Gentherapie**

Promotionsfach: Immunologie  
Doktorvater: Prof. Dr. med. G. Opelz

Die somatische Gentherapie konnte erfolgreich zur Heilung monogenetischer Erbkrankheiten eingesetzt werden. Retroviren stellen dabei einerseits ein effizientes Werkzeug für den Gentransfer dar, bringen andererseits schwere, Insertionsmutagenese-bedingte Nebenwirkungen mit sich. Die Mechanismen der Insertionsmutagenese und die einhergehenden Konsequenzen sind bis heute nur unzureichend verstanden. Bioinformatische Analysen und statistische Betrachtungen leisten hierbei einen unverzichtbaren, komplexen Beitrag, jedoch führt die fehlende Homogenität der bioinformatischen und statistischen Methoden zu reduzierter Vergleichbarkeit der individuellen Studienergebnisse.

QuickMap versteht sich als Sammelbegriff für die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten, bioinformatischen Methoden, die sich zum Zweck der konsequent uniformen Vektorintegrationsanalyse vollständig automatisieren lassen. QuickMap analysiert Integrationssequenzen, um die chromosomalen Integrationsorte zu bestimmen und aus deren Charakterisierungen bezüglich benachbarter genomischer Elemente sogenannte Vektorintegrationsprofile abzuleiten. Für den Vergleich QuickMap-basierter Integrationsprofile wurden unterschiedlich große Sets simulierter Integrationsstellen statistisch untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Erwartungstreue der aus Simulationen abgeleiteten Integrationsfrequenzschätzer mit steigender Größe der Zufallssets stark verbessert wird. Basierend auf der Integrationssequenzanalyse weist die QuickMap-basierte Integrationsstellenanalyse im Vergleich zu bisherigen Entwicklungen eine sehr breite Vielfalt bezüglich der eingehenden genomischen Elemente und einen sehr hohen Detailgrad bezüglich der Auflösung der analysierten Integrationsumgebungen auf, während die für Hochdurchsatzanalysen konzipierten Implementierungen mit beachtlicher Verarbeitungsgeschwindigkeit arbeiten.

Zusätzlich wurde im Rahmen dieser Arbeit eine hochauflösende Integrationsanalyse von 46 114 HIV-Integrationsorten durchgeführt. Hier konnte gezeigt werden, dass HIV-basierte Vektoren die Integration in die Transkriptionsstart-nahen Bereiche aktiv-transkribierter Gene scheuen. Weiterhin wurden in einer Integrationsstudien-übergreifenden, QuickMap-basierten Metaanalyse mehr als 76 000 verschiedene Lenti-,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - und Spumaretrovirus-basierte Integrationsstellen in zahlreichen Zellentitäten untersucht. Die hierbei ermittelten Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass der spezifische Zelltyp keinen Einfluss auf das Integrationsprofil des jeweiligen Vektors hat und die Wahl des Integrationsorts vermutlich durch zwei wesentliche Komponenten bestimmt wird: Die erste Komponente lenkt die Integration in eine grobe Richtung, die stark von zellulären Faktoren und dem Expressionsprofil der transduzierten Zelle abhängt. Die zweite Komponente wirkt sich auf die exakte Positionierung aus und beruht auf zell-unspezifischen, also vektorspezifischen Eigenschaften.

Die hier vorliegende Arbeit bildet einen wichtigen Grundstein für die Einschätzung der vektorabhängigen Integrationspräferenzen und der potentiell einhergehenden Insertionsmutagenese-bedingten Nebenwirkungen retroviralen Gentransfers. QuickMap stellt zum ersten Mal eine vollständige Automatisierung der Integrationsanalyse öffentlich

zur Verfügung. Die weltweite Wissenschaftsgemeinde hat QuickMap als unterstützendes Werkzeug erkannt und seit der Veröffentlichung über 1 200 QuickMap-Analysen durchgeführt. QuickMap wird auch zukünftig weiterentwickelt werden, um der Entwicklung „sicherer“ Vektoren für zukünftige Gentherapiestudien das notwendige bioinformatische Fundament zur Verfügung zu stellen.