

Stephanie Bleier
Dr. med.

Klonale Analysen nach retroviralem Zytostatikaresistenzgentransfer in hämatopoetische Stammzellen unter Verwendung von *multiple displacement amplification*

Promotionsfach: DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum)
Doktormutter: Frau Priv.-Doz. Dr. sc. nat. Stephanie Maier-Laufs

Der retrovirale Gentransfer in hämatopoetische Stammzellen (HSZ) birgt ein enormes Potential für die Behandlung vieler vererbter Gendefekte sowie maligner Erkrankungen. In den letzten Jahren gab es jedoch erhebliche Bedenken bezüglich der Sicherheit dieser Genterapie, vor allem nach dem Auftreten von Leukämien nach retroviraler Korrektur des schweren Immundefizienz Syndroms SCID-X1. Diese Neoplasien wurden wahrscheinlich durch die Integration des Vektors in (Proto-)Onkogene mit nachfolgender Fehlregulation verursacht. Dieser Vorgang wird als Insertionsmutagenese bezeichnet und stellt die wichtigste Nebenwirkung im Rahmen von Genterapieprotokollen dar. Um die Anwendung retroviraler Vektoren für den klinischen Alltag möglich zu machen, sind Untersuchungen bezüglich der retroviralen Integrationsprofile und deren Auswirkungen auf die Hämatopoese von Nöten. Dabei wurde der Einfluss chemotherapeutischer Behandlung, welche in vielen Genterapiestudien angewandt wird, bisher noch wenig analysiert. Einer der wichtigsten limitierenden Faktoren im Zusammenhang dieser Sicherheitsuntersuchungen sind die begrenzten DNA-Mengen aus Tierversuchen und klinischen Studien.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode zur Genomamplifizierung, *multiple displacement amplification* (MDA), auf retroviral transduzierter DNA etabliert. Dabei konnte gezeigt werden, dass nach der Anwendung von MDA retrovirale Integrationen zuverlässig mit LM-PCR detektiert werden können und die Sensitivität der Integrationsanalyse durch die Kombination beider Methoden erhöht wird. MDA ist weiterhin geeignet, um nach dessen Anwendung selbst kleinste Anteile transduzierter DNA in einem Hintergrund untransduzierter DNA zuverlässig zu quantifizieren.

Es wurden die Auswirkungen chemotherapeutischer Selektion auf das Integrationsprofil des MLV-basierten Vektors SF91m3 mit dem Transgen MDR1 in einem NOD/SCID-Mausmodell untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass in Mäusen nach zytostatischer Behandlung mehr Integrationen in der Nähe von Transkriptionsstarts von Genen vorhanden waren als in unbehandelten Mäusen. Die Anteile individueller Klone, welche mit real-time PCR

quantifiziert wurden, unterschieden sich jedoch nicht signifikant in behandelten und unbehandelten Mäusen. Dies ist die erste Arbeit, in der die Auswirkungen von Chemotherapie auf retroviral transduzierte hämatopoetische Zellen direkt durch absolute Quantifizierung individueller Zellklone untersucht wurden.

Weiterhin wurden in dieser Arbeit murine HSZ aus einem seriellen Transplantationsmodell mittels LM-PCR und quantitativer real-time PCR analysiert. Diese waren mit einem MSCV-Vektor, der das Transgen MGMT(P140K) enthielt, transduziert und seriell in drei Generationen von Mäusen transplantiert und chemotherapeutisch behandelt worden. Dabei wurden Fluktuationen individueller klonaler Anteile an der transduzierten Hämatopoese zwischen den drei Kohorten beobachtet. Es gab jedoch keine Hinweise auf abnormes Zellverhalten.

Die vorliegende Arbeit leistet einen Beitrag zur verbesserten Integrationsanalyse in Gentherapiestudien durch Anwendung der MDA und trägt zu einem tiefergehenden Verständnis der Auswirkungen von Chemo Selektion auf die retroviral transduzierte Hämatopoese bei.