

Anne Arens  
Dr. sc. hum.

## **Bioinformatische Analyse der Zusammensetzung genmodifizierter Zellen und Gewebe in der präklinischen und klinischen Gentherapie**

Promotionsfach: DKFZ  
Doktorvater: Prof. Dr. Christof von Kalle

Retrovirale Vektoren dienen als Genfähren, deren stabile Integration in das Zielgenom eine dauerhafte Transgenexpression gewährleisten kann. Die Integrationsereignisse verlaufen „halbzufällig“ und stellen einen eindeutigen klonalen Marker der transduzierten Zellen und deren Tochterzellen dar. In klinischen Gentherapiestudien zur Behandlung von Immunschwächekrankheiten konnten Langzeiterfolge der Gentherapie nachgewiesen und vorherrschende lebensbedrohliche Infektionen, die auf herkömmliche Therapieansätze nicht ansprechen, erfolgreich behandelt werden. Dennoch stellt die Integration des Therapievektors in das Zielgenom per se eine Insertionsmutagenese dar, die schwere Nebenwirkungen auslösen kann. Diese zeigten sich bei der malignen Transformation genkorrigierter Zellen, die bei einzelnen Patienten zur Entstehung von Leukämie oder eines myelodysplastischen Syndroms führten. Aus diesem Grund ist es unumgänglich das klonale Repertoire genkorrigierter Zellen von Patienten in klinischen Gentherapiestudien zu überwachen und die Integrationscharakteristiken neuer Vektorsysteme in der präklinischen Phase genauestens zu evaluieren. Diese im Hochdurchsatz durchgeführten Analysen erfordern einerseits molekularbiologische Protokolle zur Amplifikation der Therapievektor-Zielgenom-Übergänge und andererseits deren effiziente und automatisierte bioinformatische Auswertung.

Mit der in der Programmiersprache *Perl* implementierten Hochdurchsatz-Integrationsstellen-Analyse-Pipeline (*HISAP*) wurde im Rahmen dieser Dissertation ein automatisiertes Programm für die Integrationsstellenanalyse implementiert, welches den komplexen Anforderungen des *in vivo* Monitoring genveränderter Zellen in klinischen Gentherapiestudien gerecht wird. *HISAP* ermöglicht die effiziente Auswertung von präklinischen und klinischen Projekten mit großen Probenzahlen und ist für die Hochdurchsatzsequenzierung ausgelegt. Neben der Lokalisation der Integrationsstellen im Zielgenom und deren Annotation mit funktionellen Elementen aus der genomischen Umgebung gleicht *HISAP* Integrationsstellen zwischen verschiedenen Proben eines Projekts oder verschiedener Projekte ab. Somit ermöglicht *HISAP* ein effizientes *in vivo* Monitoring von viral markierten Zellklonen über zeitliche Verläufe und deren Repopulation in verschiedenen Geweben. Des Weiteren identifiziert *HISAP* potentielle dominante Klone, Regionen bevorzugter Vektorintegration und erstellt ein genomisches Integrationsprofil des analysierten Vektortyps.

Obwohl *HISAP* ursprünglich für die Auswertung von linearen amplifikationsmedierten (LAM-)PCR-Produkten nach Sanger- oder Pyrosequenzierung (454/Roche) entwickelt wurde, ist die in *HISAP* implementierte Analysestrategie

äußerst flexibel und skalierbar. *HISAP* kann daher auf verschiedene Protokolle für die Amplifikation und Sequenzierung von viralen und nicht-viralen Vektor-Zielgenom-Fusionssequenzen, als auch für vielfältige Analyseansätze, die nicht aus dem direkten Umfeld der Gentherapie stammen, adaptiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Integrationsstellenanalyse einer  $\gamma$ -retroviralen, klinischen Phase I/II Gentransferstudie zur Therapie von *septischer Granulomatose* beschrieben. Unter Verwendung der oben genannten Analyseaspekte konnte gezeigt werden, dass bei beiden behandelten Patienten keine durch Insertionsmutagenese verursachten Nebenwirkungen ausgelöst wurden. In einer präklinischen Studie trug *HISAP* zur Evaluierung des Integrationsprofils lentiviraler Vektoren in postmitotischen Nagetierzellen bei. Es konnten signifikante Unterschiede zu den analog evaluierten lentiviralen Integrationsprofilen proliferierender Zellen herausgestellt werden. Des Weiteren wurden bei der Analyse des Sicherheitsprofils von Integrase-defizienten lentiviralen Vektoren in Hepatozyten durch *HISAP* seltene Integrationsereignisse lokalisiert. Das Nachverfolgen viral markierter Tumorzellen in seriellen Xenotransplantationen führte zur Detektierung von Zellen, die zu Tumorwachstum und Metastasenbildung beitrugen. Auch an der Bestimmung der Spezifität von Zinkfingernukleasen (ZFN) war *HISAP* maßgeblich beteiligt. Lentivirale Vektoren wurden dabei als Donoren verwendet, die über „non homologous end joining“ in ZFN-induzierte Doppelstrangbrüchen (DSB) eingebaut wurden. Diese dienten nach ihrer Inkorporation der Lokalisation der DSB im humanen Genom. Regionen mit erhöhter DSB-Frequenz und somit einer Häufung von Integrationsereignissen wurden mit *in silico* identifizierten ZFN-Off-Target-Bindestellen annotiert. So konnte ein Ansatz etabliert werden, um genomweit Off-Target-Schnittstellen für ZFN zu detektieren. Somit hat sich gezeigt, dass *HISAP* optimale Voraussetzungen für die Überwachung klinischer Gentrapiestudien, die Weiterentwicklung verbesserter und neuartiger Vektorsysteme für den Gentransfer und sich anschließende funktionale Analysen bereitstellt.