

Sibylle Carolin Hodecker

Dr. med.

## **Etablierung des lentiviralen Gentransfers in humane mesenchymale Stammzellen für eine zellbasierte gegen TGF-beta gerichtete Gentherapie von Glioblastomen**

Promotionsfach: DKFZ

Doktorvater: Prof. Dr. med. Wolfgang Wick

Die schlechte Prognose von Patienten mit malignen Gliomen ist zum Teil auf die unzureichende Administration von therapeutischen Agenzien zu den hochinvasiven Tumorzellen zurückzuführen. Humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs) sind aufgrund ihres ausgeprägten Migrationspotentials zu Tumorzellen, der unproblematischen Gewinnung und Expansion in vitro und nicht zuletzt wegen ihrer ethischen Unbedenklichkeit ein vielversprechendes Vehikel für eine zellbasierte Gentherapie. Lentivirale Vektoren sind für den Gentransfer in Stammzellen besonders geeignet. TGF-beta (TGF- $\beta$ ) spielt eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des Glioblastoms. Über eine Inhibition dieses Zytokins mittels löslicher TGF-beta-Rezeptoren (TGF- $\beta$ R) könnte der Tumor in seiner malignen Progression gehemmt werden. In dieser Arbeit soll ein hocheffizientes Transduktionssystem für den Gentransfer von löslichen TGF-beta-Rezeptoren in humane mesenchymale Stammzellen entwickelt werden.

Lentivirale Vektoren mit Expressionskassetten für eGFP und lösliche Formen der humanen TGF- $\beta$ R<sub>II</sub> und TGF- $\beta$ R<sub>III</sub> wurden kloniert und für die Generierung lentiviraler Partikel mittels transienter Transfektion von 293T-Zellen verwendet. Die konzentrierten Überstände wurden für die lentivirale Transduktion von humanen MSCs verwendet. Die Transduktionseffizienz wurde durchflusszytometrisch über Quantifizierung der eGFP-positiven Zellen bestimmt. Die Expression und Sekretion der löslichen Rezeptoren wurde mittels Western Blot-Analyse von Lysaten und Überständen transduzierter Zellen untersucht. Die Funktionalität der löslichen Rezeptoren wurde in einem Bioassay mit TGF- $\beta$ -sensitiven Mv1Lu-Zellen und einem Phospho-Smad2-Immunoblot von Gliomzellen nach Inkubation in TGF- $\beta$ R-enthaltenden Überständen untersucht. Um zu demonstrieren, dass die transduzierten hMSCs ihren Stammzellcharakter behalten, wurden die Zellen mittels FACS-Analyse phänotypisch charakterisiert. Die Migrationsfähigkeit der transduzierten hMSCs wurde in einer modifizierten Boyden Chamber mit glioblastomkonditioniertem Medium untersucht.

Mit den in dieser Arbeit klonierten selbstinaktivierenden Vektoren lassen sich mit MOIs von <10 hohe Transduktionseffizienzen in humanen mesenchymalen Stammzellen bei geringer Zytotoxizität erreichen. Durch Zugabe von Polybren konnte die Transduktionseffizienz und Transgenexpression signifikant gesteigert werden. Die Migrationsfähigkeit der Stammzellen wird durch die Transduktion nicht beeinträchtigt. Der Stammzell-charakteristische Phänotyp bleibt auch nach Transduktion erhalten. Die transduzierten hMSCs exprimieren und sezernieren lösliche Formen des humanen TGF- $\beta$ RII und TGF- $\beta$ RIII. Es wurde gezeigt, dass der lösliche TGF- $\beta$ RIII TGF- $\beta$ 2 effektiv binden kann und die TGF- $\beta$ -vermittelte Signaltransduktion in Gliomzellen inhibiert.

Das in dieser Arbeit entwickelte Transduktionssystem ist für den effektiven lentiviralen Gentransfer in humane mesenchymale Stammzellen geeignet und bildet eine aussichtsreiche Grundlage für die Entwicklung einer zellbasierten gegen TGF- $\beta$  gerichteten Gentherapie von Glioblastomen.