

Kai Christoph Wermann  
Diplom Biologe Dr. med.

## **Etablierung eines In-vivo-Modells für den *Multidrug-Resistance-1 (MDR-1)*-Gentransfer in hämatopoetische Stammzellen**

Geboren am 02.04.1968 in Bensheim

Reifeprüfung am 21.05.1987

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 93/94 bis WS 99/00

Physikum am 07.09.1994

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Heidelberg

Staatsexamen am 11.05.1999 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Hämatologie

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

Ziel unserer Untersuchungen war es, ein Tiermodell für präklinische Versuche zur Transplantation von Stammzellen zu etablieren, die mit dem *MDR-1*-Gen retroviral transduziert wurden. In dieser Arbeit wird ein In-vivo-Modell für die menschliche Hämatopoese in immundefizienten Mäusen vorgestellt. Von drei getesteten Mausstämmen zeigten NOD/SCID-Mäuse das beste Anwachsen der menschlichen Zellen im Knochenmark 5-10 Wochen nach der Transplantation. Für ein erfolgreiches Anwachsen der menschlichen Zellen war es notwendig, die Mäuse vor der Transplantation subletal zu bestrahlen und über den gesamten Zeitraum nach der Transplantation mit den menschlichen Wachstumsfaktoren IL-3 und G-CSF zu behandeln. Bei einem Vergleich von intraperitonealer mit intravenöser Gabe der Zellen zeigten intravenös transplantierte menschliche Zellen ein deutlich besseres Anwachsen in den Mäusen. Als Transplantat wurden frische Knochenmarkszellen oder PBPC verwendet, die aufgetaut, frisch oder frisch und zusätzlich CD34<sup>+</sup>-selektiert waren. Frische PBPC wuchsen am besten in den Mäusen, allerdings bestanden die menschlichen Zellen in den Mäusen fast ausschließlich aus CD2<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>-T-Zellen. Der überwiegende Anteil von T-Zellen und die Tatsache, daß 2/7 der Mäuse nach 4 bzw. 5 Wochen verstarben, wies auf eine T-Zell-vermittelte Graft-versus-host-Reaktion hin. Bei der Transplantation von aufgetauten

oder frischen CD34<sup>+</sup>-selektierten PBPC zeigte sich ein Wachstum von verschiedenen Leukozytensubtypen in den Mäusen mit dem Schwerpunkt auf der B-Zell-Entwicklung. CD34<sup>+</sup>-Stammzellen konnten sowohl bei aufgetauten, als auch bei frischen CD34<sup>+</sup>-selektierten PBPC 6-10 Wochen nach der Transplantation nachgewiesen werden.

In vitro wurden CD34<sup>+</sup>-selektierte PBPC mit *MDR-1*-retroviralen Überständen oder durch eine Kokultivierung mit Virus-produzierenden Zellen transduziert. Es wurden drei verschiedene *MDR-1*-Vektoren getestet, mit dem Ergebnis, daß der retrovirale Vektor GASF verglichen mit GAMP besser für die Transduktion von PBPC geeignet ist. Igvp010 zeigte ebenfalls eine gute Transduktion von PBPC, allerdings war die Resistenz gegen Zytostatika nicht vielversprechend, so daß dieser Vektor nicht weiter verwendet wurde. Es hat sich gezeigt, daß nach einer 96-stündigen Transduktion in  $\alpha$ MEM-Medium in Anwesenheit von Polybrene ein Transfer des *MDR-1*-Gens in hämatopoetische Stammzellen möglich ist. Die besten Resultate wurden erzielt, wenn die Zellkulturplatten vor der Transduktion mit der Fibronectinkomponente CH-296 beschichtet wurden und IL-3 plus Stroma-konditioniertes Medium im Transduktionsansatz vorhanden waren. Der positive Effekt des Stroma-konditionierten Mediums auf die Transduktion wurde besonders beim funktionellen Nachweis des *MDR-1*-Gens in vitro beobachtet. In vivo konnte der positive Effekt auf die Transduktionseffizienz sowohl funktionell (im Rhodamin-123-Ausschleustest) als auch auf genetischer Basis (durch eine *MDR-1*-Provirus-PCR) nachgewiesen werden.

Nach einer Transplantation von *MDR-1*-retroviral-transduzierten Zellen in NOD/SCID-Mäuse wurde ein geringes Wachstum von menschlichen Stammzellen festgestellt, wenn die Zellen mit retroviralen Überständen transduziert wurden. Die Anzahl der transplantierten Zellen mußte auf das Vierfache gesteigert werden, damit menschliche Zellen in den Mäusen nachgewiesen werden konnten. Bei *MDR-1*-kokultivierten menschlichen Stammzellen wurde dieser Wachstumsnachteil nicht beobachtet.

Zusammenfassend können NOD/SCID-Mäuse für die Transplantation von *MDR-1*-transduzierten menschlichen Blutstammzellen empfohlen werden. Die besten Resultate wurden erzielt, wenn frische CD34<sup>+</sup>-selektierte PBPC in Gegenwart von IL-3 und Stroma-konditioniertem Medium mit Virus-produzierenden Zellen kokultiviert wurden.

Dieses Ergebnis ist ein Beitrag für die Weiterentwicklung des *MDR-1*-Gentherapiemodells und für die mögliche Integration dieses Ansatzes in bestehende Therapiekonzepte von Tumorerkrankungen des Blutes.