

Bernhard Rudolf Gentner
Dr. med.

Entwicklung und Validierung der Methodik für die Integrationsanalyse retroviraler Vektoren in humanen mobilisierten Blutvorläuferzellen in vitro und im experimentellen Maus-Transplantationsmodell

Geboren am 09. 11. 1975 in Donauwörth
Reifeprüfung am 30. 06. 1995 in Donauwörth
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1996/96 bis WS 2002/03
Physikum am 16. 09. 1998 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Houston/TX, USA und Heidelberg
Staatsexamen am 12. 05. 2003 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin und DKFZ
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. S. Frühauf und Prof. Dr. med. W.J. Zeller

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Entwicklung von Methoden zur Identifizierung retroviraler Integrationsorte in humanen hämatopoetischen Zellen. Ein von Mäuse-Onkoretroviren abgeleiteter Vektor (*SF1m*) wurde zur Transduktion von Blutvorläuferzellen verwendet.

Als Erstes wurde ein auf arbiträren Primern basierendes PCR-Protokoll entwickelt. Dieses schnelle Protokoll ermöglichte die Sequenzierung des Vektor-Integrationsortes in 25 koloniebildenden Blutvorläuferzellen mit hoher Sensitivität. Diese Methode ist der inversen PCR, der einzigen bisher für diese Anwendung etablierten Methode, hinsichtlich Nachweisquote ebenbürtig und hinsichtlich Aufwand und Sensitivität überlegen.

Darüber hinaus wurde ein zweites PCR-Protokoll entwickelt, das den simultanen Nachweis von multiplen Integrationsorten in komplexen Zellgemischen erlaubte. Eine ligationsmedierte PCR (LM-PCR) mit speziellen, die Sensitivität und Spezifität erhöhenden Schritten wurde an Zelllinien etabliert und umfangreich auf Zuverlässigkeit und Aussagekraft getestet. Im chimären Knochenmark von neun NOD/SCID-Mäusen, das neben murinen Zellen genmarkierte hämatopoetische Zellen des Menschen enthielt, wurde mit Hilfe dieser neu entwickelten Methode die Anzahl unterschiedlicher Integrationsorte des retroviralen Gentransfervektors in der humanen Zellfraktion ermittelt, was Aufschluss über die Zahl repopulierender menschlicher Stammzellklone gibt.

Es konnte, entgegen etablierter Meinung, gezeigt werden, dass multiple Klone (Donor 1: 3-7 Klone/Knochenmark, Mittelwert 5; Donor 2: 8-16 Klone/Knochenmark, Mittelwert 12; bei viermaliger LM-PCR: 30 Klone/Knochenmark) an der Rekonstitution der Hämatopoese im NOD/SCID-Modell beteiligt sind.

Die Sequenzierung und Zuordnung von 98 Integrationsorten des *SF1m*-Vektors in hämatopoetischen Stammzellen ermöglichte eine Analyse der Verteilung der Integrationsorte im menschlichen Genom. Diese Arbeit zeigt erstmals für einen Gentherapievektor in hämatopoetischen Vorläuferzellen, dass die Integrationsortwahl nicht rein auf zufälliger Ebene abläuft, sondern dass starke Häufigkeitsschwankungen für bestimmte Chromosomenregionen existieren. Der *SF1m*-Vektor integrierte auf chromosomaler Ebene bevorzugt in die Chromosomen 6, 16, 17 und 19 und auf subchromosomaler Ebene bevorzugt in die Regionen *16p11-13* und *19q12-13*. Die LM-PCR bildet die Basis für die Untersuchung der Stammzelldynamik sowie für studienbegleitende Sicherheitsuntersuchungen im Rahmen von Gentherapieprotokollen.