Annette Deichmann
Dr. sc. hum.

Vergleichende Analysen retroviraler Vektorintegrationen in repopulationsfähigen Progenitorzellen

Geboren am 4.11.1961 in Kirchen/Sieg
Diplom der Fachrichtung Biologie am 23.7.1987 an der Universität Würzburg

Promotionsfach: Internistische Onkologie
Doktorvater: Prof. Dr. med. C. von Kalle

Mit Gentherapien steht ein vielversprechender Therapieansatz bei onkologischen und angeborenen Erkrankungen mit genetischem Hintergrund zur Verfügung. Insbesondere für Defekte des hämatopoetischen Systems, die sich alternativen therapeutischen Bemühungen weitgehend entziehen, bietet sich eine somatische Gentherapie als Behandlungsoption an. Die Zellen der Hämatopoese sind leicht zu gewinnen, ex vivo zu transduzieren und zu reimplantieren. Seit 1989 wird eine Vielzahl gentherapeutischer Studien durchgeführt.

Virale Vektoren haben sich in 70% der Studien als verlässliche genetische Transportvehikel etabliert, in 33% der Studien wurden onkoretrovirale Vektoren eingesetzt. Anfänglich ging man davon aus, onkoretrovirale Vektoren würden randomisiert in das Wirtsgenom integrieren. Das Risiko einer Insertionsmutagenese und insbesondere einer Onkogenese schien bei Verwendung von replikationsdefekten Vektoren eher hypothetisch und sehr unwahrscheinlich. In der jüngsten Vergangenheit häuften sich jedoch Hinweise darauf, dass die Integration keineswegs randomisiert sondern vielmehr in sensiblen genreichen und exprimierten genomischen Regionen erfolgt. Da die Möglichkeit einer Tumorinduktion prinzipiell gegen die Vorteile der Gentherapie abzuwägen ist, musste das Augenmerk der gentherapeutischen Forschung verstärkt auf den Bereich der Insertion und Insertionsmutagenese gelegt werden.

Ziel dieser Arbeit war es, in einer großen Zahl transduzierter Zellen präklinischer und klinischer Studien das Integrationsprofil der Vektoren zu charakterisieren, möglicherweise bevorzugt betroffene Gene und Genregionen zu identifizieren und denkbare selektive Effekte vor und nach Transplantation darzustellen. Neben einer rein deskriptiven Generfassung wurde gezielt auf die Funktion der kodierten Proteine eingegangen.

Für die Analysen stand Material aus 5 humanen und 2 nicht-humanen (murin und nicht-humanoide Primaten) Studien zur Verfügung. 3795 Insertionsstellen konnten lokalisiert und in die Auswertung eingebracht werden. Besonders wichtig war, dass sowohl Posttransplationsdaten als auch Prätransplantationsdaten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transduktion zur Verfügung standen und selektive Effekte der gentherapeutisch veränderten Klone in vitro und in vivo untersucht werden konnten.

Die Auswertung der Integrationsstellenprofile zeigte, dass virale Vektoren in den präklinischen und klinischen Studien fast ausschließlich in genreiche Abschnitte des Wirtsgenoms integrieren. Sie bevorzugen dabei primär die Transkriptionsstartpunkte der Gene, die zum Zeitpunkt der Transduktion aktiv transkribiert werden. Betrachtet man bevorzugte Integrationsorte in Zellen vor der Transplantation vom genontologischen Standpunkt aus, so findet sich in diesen Haushalts-Gengruppen eine auffallende Häufung von Integrationsstellen (CIS). Im weiteren Verlauf verschieben sich die CIS im Rahmen selektiver Prozesse zugunsten der Genbereiche, die Zellwachstum und Zelltod definieren. So erwiesen sich vielfach Protoonkogene als bevorzugte Integrationsorte. Die hier beschriebenen

Auffälligkeiten gelten dabei sowohl für den klonalen Verlauf in vitro wie in vivo. Die zugrunde liegenden Mechanismen der Selektion scheinen dieselben zu sein.

Im Verlauf der Arbeit erkrankten mehrere Studienpatienten an Leukämien. Die Untersuchung der bei ihnen prädominierenden Zellklone der Hämatopoese legen die Vermutung nahe, dass die Onkogenese eine schwerwiegende Nebenwirkung der Therapie darstellt. Die hier vorgelegten Daten zeigen deutlich, dass nach der Transplantation eine LTR-getriebene Aktivierung von wachstumsfördernden Genen im Bereich der retroviralen Integrationen auftritt. Die so aktivierten Klone werden in vivo selektioniert, was offensichtlich einen wichtigen Teil des therapeutischen Erfolgs sichert. Damit steht die Gentherapie vor einem schwer lösbaren Paradoxon: Selektive Prozesse scheinen einerseits unabdingbar für eine konstante Expression der integrierten Gene und damit den dauerhaften Therapieerfolg, andererseits bergen dieselben Prozesse aber auch das Risiko einer malignen Entartung.

Die Forschungsbemühungen müssen deshalb darauf abzielen, Vektoren zu entwickeln, die gezielt in vorgegebene Regionen des Genoms integrieren und geringstmögliche Einflüsse auf zelluläre Gene ausüben. Gleichzeitig müssen die klinischen Studienbedingungen besser erfasst werden, die eine maligne Entartung begünstigen.

Um die Effizienz dieser Entwicklung zu überwachen, werden regelmäßige Integrationsstellen-Analysen fester und unabdingbarer Bestandteil jeder Therapie sein. Hochdurchsatz-Sequenziertechnologien und die Entwicklung bioinformatischer Auswertungsprogramme, die eine rasche Analyse und sichere Interpretation erlauben, sind dafür bereits in Entwicklung.