

Marius Christian Stiefelhagen  
Dr. med.

## **Optimierung und Anwendung rekombinanter auf Adeno-assoziierten Viren des Serotyps 2 (rAAV2) basierender Vektoren für eine effizientere Transduktion von Zellen der chronischen myeloischen Leukämie**

Geboren am 12.03.1981 in Engelskirchen  
Staatsexamen am 19. November 2008 an der Universität Heidelberg.

Promotionsfach: Innere Medizin  
Doktorvater: Prof. Dr. med. Stefan Frühauf

Obwohl es in den letzten Jahren Fortschritte bei der Entwicklung viraler Vektoren gegeben hat, besteht für viele hämatopoetische Zellen bislang keine Möglichkeit, einen effizienten Gentransfer mit Hilfe rekombinanter adeno-assoziiierter Virus-2 (rAAV2)-Vektoren zu erzielen.

Die auf rekombinantem AAV des Serotyps 2 basierende Peptidbank nach Müller (Muller et al. 2003) ermöglicht nun die Entwicklung zielgerichteter rAAV2-Vektoren. Hierbei wird gezielt eine Stelle des AAV2-Kapsidgenoms manipuliert. An Position Arg588 werden sieben zufällig angeordnete Aminosäuresequenzen eingefügt. Die Gesamtheit der so erzeugten Kapsidmutanten kann anschließend auf dem gewünschten Zelltyp in einem vierstufigen Selektionsprozess angewendet werden, um einen rAAV2-Vektor mit optimalen Bindungseigenschaften für die jeweilige Zelllinie zu erhalten. Die Kenntnis des Bindungsrezeptors der Zielzellen ist bei dieser Methode nicht notwendig, was einen entscheidenden Vorteil darstellt.

Um die Eignung dieser Methode für leukämische Zellen zu untersuchen, wendeten wir diese Peptidbank auf einer Zelllinie der chronisch myeloischen Leukämie (CML), K562, an. Der auf diese Weise erstellte rAAV2-Vektor wurde anschließend auf einer Reihe anderer leukämischer Zelllinien sowie Zelllinien solider Tumoren getestet. Abschließend erfolgte die Anwendung auf CML-Patientenmaterial sowie CD34-positiven (CD34+) Blutstammzellen. Ein Standard-rAAV2-Vektor sowie ein per Computer generierter rAAV2-Zufallsklon dienten als Kontrolle.

Bei der Transduktion der leukämischen Zelllinien wurde eine im Vergleich zu den Kontrollen bis zu 36-fach erhöhte Effizienz des Gentransfers festgestellt. Bei den primären CML-Patientenzellen wurde im Vergleich zu den Kontrollen eine moderate Steigerung des Gentransfers erreicht. Gleiches galt für die CD34+ - Zellen.

Mit Hilfe der auf rAAV2-basierenden Peptidbank waren wir in der Lage, eine rAAV2-Kapsidmutante herzustellen, mit der sich CML-Zelllinien mit höherer Effizienz infizieren lassen als mit einem Standard-rAAV2-Vektor. Hinsichtlich der klinischen Anwendung ergibt sich ein Anwendungspotential unter Verwendung des Selektionsvorganges auf primärem Patientenmaterial.

Diese Arbeit zeigt, dass die auf rAAV2 basierende Peptidbank einen vielversprechenden Ansatz für die Herstellung zielgerichteter Vektoren zur genterapeutischen Anwendung bei CML und anderen leukämischen Erkrankungen darstellt.