

Zusammenfassung

In der somatischen Gentherapie sind Moloney-Mausleukämieviren (Mo-MuLV) abgeleitete Vektorkonstrukte das meistverwendete und bezüglich der Sicherheit und Effizienz am besten charakterisierte System für somatischen Gentransfer. Im Vergleich zu anderen Methoden des Gentransfers bieten Retroviren den Vorteil einer stabilen Expression des Transgens. Allerdings wurden auch bei retroviral eingebrachten Transgenen Verluste der Vektorexpression nachgewiesen.

Suizidgenvektoren werden zur Zeit in der Klinik zur Entfernung solider Tumoren und bei allogener Knochenmarktransplantation im Rahmen der adoptiven Immuntherapie in Immunzellen eingesetzt, um beim Auftreten einer potentiell lebensbedrohlichen Transplantat-gegen-Wirt Krankheit (GvHD) eine gezielte Entfernung alloreaktiver Spenderzellen zu ermöglichen. Im Fall der Inaktivierung der Suizidgenfunktion können die genetisch-modifizierten Zellen jedoch nicht zerstört und die Tumorigenese kontrolliert bzw. die GvHD ursächlich bekämpft werden. Zur weiteren Optimierung der Sicherheit retroviraler Konstrukte wurde in der vorliegenden Arbeit ein klinisch relevanter Suizidgenvektor in T-Zellen auf Verluste der Expression *in vivo* überprüft. Für die Untersuchung hierfür zugrundeliegender Ursachen wurde ein Modell (Maus) entwickelt. Hierbei wurde die Suizidgenfunktion des Vektors zur *in vivo* Entfernung tumorigener T-Zellen und damit Aufhebung der Tumorausbildung benutzt. Im Fall einer nur unvollständigen Entfernung der Vektor-transduzierten Tumorzellen konnten Tumorrezidive innerhalb eines bestimmten Zeitraums nach Selektion nachgewiesen werden. Durch die Verwendung von Zellklonen innerhalb des hier präsentierten Tumorzell-Transplantationsmodells war es möglich, unterschiedliche Ursachen der Inaktivierung retroviraler Sequenzen zu identifizieren: a) chromosomaler Verlust, b) Exzision des proviralen Vektors durch LTR-Rekombination und c) Löschung der Suizidgenexpression. In dieser Arbeit wird zum ersten Mal ein *in vivo*-Modell für die Quantifizierung der Frequenzen unterschiedlicher Abschaltungsursachen retroviraler Vektoren vorgestellt. Vorteil des hier etablierten Modells ist, daß aufgrund seiner Sensitivität auch seltene Abschaltungsereignisse nachweisbar sind. Hierdurch konnten die jeweiligen Abschaltungshäufigkeiten zur Bewertung der Sicherheit retroviraler Suizidgenvektoren quantifiziert werden. Das Modell erlaubt eine Abschätzung der Risiken des Verlusts der Vektorexpression in den beiden derzeitigen klinischen Anwendungsmöglichkeiten. In der Onkologie könnten chromosomale Verluste trotz geringer Mutationsraten aufgrund der häufig

festgestellten, genetischen Instabilität von Tumorzellen zu Rezidiven führen. Diese Ursache des Verlusts der Suizidgenexpression sollte bei diploiden T-Zellen, die bei Auftreten einer GvHD entfernt werden sollen, nicht von großer Bedeutung sein. LTR-Rekombination und Löschung wurden in der vorliegenden Arbeit als weitere Ursachen für die Inaktivierung der Vektorfunktion nachgewiesen. Sie traten ebenfalls jeweils mit einer geringen Inzidenz auf. Da bei einer Knochenmarktransplantation häufig nur geringe Mengen von T-Zellen (etwa 1×10^5) kotransplantiert werden, sollte eine selektive *in vivo* T-Zelldepletion ausreichen, um die Anzahl immunogener T-Zellen unter den für die GvHD kritischen Schwellenwert zu reduzieren. Insofern ist die Sicherheit retroviraler Suizidgenvektoren hierbei als hoch einzuschätzen.

Ziel weiterer Untersuchungen war die Charakterisierung von *cis*-aktiven Elementen, die eine dauerhafte Expression retroviraler Vektoren in humanen T-Zellen ermöglichen. Zu diesem Zweck wurde die Expression von zwei Vektoren mit unterschiedlichen, intern im Vektorgenom gelegenen, Promotoren (CMV *versus* PGK) *in vitro* miteinander verglichen. Hierbei wies das Vektorkonstrukt mit dem CMV-Promotor eine deutlich stabilere Transgenexpression gegenüber dem Konstrukt mit dem PGK-Promotor auf.