

## 6. Zusammenfassung

Gentransfer in hämatopoetische Stammzellen ist aufgrund der potentiell möglichen therapeutischen Anwendung und für die Erforschung der Biologie dieser Zellen ein attraktives Verfahren. Retrovirale Vektoren bieten für die Infektion hämatopoetischer Stammzellen gegenüber anderen Vektoren Vorteile wie u.a. die stabile Integration des Vektorgenoms in das Wirtszellgenom. Daraus kann eine lang anhaltende Expression des Transgenes resultieren. Voraussetzung für diese Anwendungen ist eine hohe Gentransfereffizienz in Stammzellen. Konventionelle retrovirale Vektoren weisen eine geringe Gentransfereffizienz in hämatopoetische Stammzellen auf. Als Ursachen dafür sind Blockaden auf verschiedenen Ebenen der retroviralen Infektion und Expression beschrieben: Die Bindung von amphiotrophen Retroviren an Stammzellen ist aufgrund der geringen Expression funktioneller Rezeptormoleküle ineffizient. Die Expression der integrierten Mo-MuLV basierten Vektoren wird durch verschiedene Mechanismen behindert: Unzureichende Aktivierung der Transkription durch den LTR und die Bindung

eines negativ regulatorischen Elementes (NRE) an die Leadersequenz. Die Blockade der Expression kann durch MPSV und MESV überwunden werden. MPSV und MESV sind rekombinante Retroviren, die verglichen Mo-MuLV eine höhere Expression in Stammzellen erlauben. Der MPSV LTR ist in diesen Zellen aktiver als der Mo-MuLV LTR und die MESV Leadersequenz bindet nicht das NRE. Vektoren, die andere Hüllproteine als das amphiotrophe env benutzen, könnten potentiell die Infektionsblockade auf der Ebene der Virus - Rezeptor Interaktion umgehen.

Für die experimentelle Insertionsmutagenese in hämatopoetischen Stammzellen könnte ein replikationskompetenter Retrovirus selbst dann einsetzbar sein, wenn er diese nur ineffizient infiziert: Durch Replikation und Infektion könnte sich dieser Virus in der Zielzellpopulation verbreiten und zu einer Vielzahl an Insertionsereignissen führen.

In dieser Arbeit wurde ein neuartiger, replikationskompetenter Hybridvektor (MES-MCFV-MP) konstruiert, der den MPSV LTR, die MESV Leadersequenz und ein polytrophen env Glykoprotein besitzt. Durch vergleichende Infektionsexperimente wurde untersucht, ob MES-MCFV-MP verschiedene humane und murine hämatopoetische Zelllinien aufgrund des polytrophen env-Glykoproteins effizienter infiziert als ein vergleichbarer amphiotropher Vektor.

Die korrekte Konstruktion des neuen Hybridvektors wurde durch Restriktionsanalysen bestätigt. Die Aktivität der reversen Transkriptase wurde durch den Nachweis der Enzymaktivität und durch Transduktionsexperimente nachgewiesen. Durch

Infektionsversuche konnte gezeigt werden, daß MES-MCFV-MP einen polytrophen Wirtsbereich hat und replikationskompetent ist.

Die vergleichenden Infektionsexperimente ergaben, daß MES-MCFV-MP die murine Stammzelllinie FDC-Pmix nicht effizienter infiziert als der amphotrophe Kontrollvektor. Die humane myeloide Vorläuferzelllinie K-562 war durch MES-MCFV-MP im Gegensatz zum amphotrophen Kontrollvektor nicht infizierbar. Die Gentransfereffizienz in diese Zelllinien wird also durch das polytrope Hüllprotein im Vergleich zum amphotrophen Hüllprotein nicht gesteigert.

Die murine pluripotente Stammzelllinie Myl-D-7 ist bereits durch amphotrophe und ökotrophe Retroviren infiziert. Insertionsmutagenese ist daher in Myl-D-7 Zellen mit diesen Retroviren unmöglich. Die Transduzierbarkeit der Myl-D-7 Zellen durch MES-MCFV-MP wurde untersucht. Während die Myl-D-7 Zellen durch virushaltige Kulturüberstände nicht infiziert werden konnte, gelang dies mit geringer Effizienz durch eine Kokultur mit den virusproduzierenden Zellen. Wegen dieser geringen Transduktionseffizienz wäre die Insertionsmutagenese in Myl-D-7 Zellen nur durch eine Verbreitung des replikationskompetenten MES-MCFV-MP Vektors in der Zellpopulation möglich.

Die Entwicklung neuer retroviraler Vektoren durch Pseudotypisierung mit anderen Hüllproteinen und die weitere Optimierung der transkriptionsregulierenden Sequenzen sollte die Gentransfereffizienz in hämatopoetische Stammzellen weiter verbessern.