

**Kontrolle der RNA-Prozessierung  
in Retroviren und abgeleiteten Gentransfervektoren  
über regulatorische Motive des  
untranslatierten ersten Exons**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereichs Biologie der  
Universität Hamburg

vorgelegt von

**Janine Kraunus**

aus Bad Segeberg

**Hamburg 2004**

---

# Inhaltsverzeichnis

|          |                                                                                                      |           |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung.....</b>                                                                               | <b>1</b>  |
| 1.1      | Gentherapie.....                                                                                     | 1         |
| 1.1.1    | Hämatopoetisches System.....                                                                         | 3         |
| 1.1.2    | Sicherheit in der Gentherapie.....                                                                   | 5         |
| 1.2      | Retrovirale Vektoren.....                                                                            | 7         |
| 1.2.1    | Genomarchitektur und funktionelle Organisation der Mausleukämieviren.....                            | 7         |
| 1.2.2    | Lebenszyklus.....                                                                                    | 9         |
| 1.2.3    | Retrovirale Vektoren für die Transduktion von Knochenmarkzellen.....                                 | 11        |
| 1.2.4    | Mechanismen der posttranskriptionellen Genexpression.....                                            | 13        |
| 1.2.5    | Feinabstimmung der retroviralen Genexpression.....                                                   | 16        |
| 1.2.6    | Selbstinaktivierende retrovirale Vektoren (SIN).....                                                 | 19        |
| 1.2.7    | RNA-Prozessierung in SIN-Vektoren.....                                                               | 20        |
| 1.3      | Fragestellung.....                                                                                   | 22        |
| <b>2</b> | <b>Material und Methoden.....</b>                                                                    | <b>23</b> |
| 2.1      | Material.....                                                                                        | 23        |
| 2.1.1    | Mikrobiologie.....                                                                                   | 23        |
| 2.1.2    | Molekularbiologie.....                                                                               | 23        |
| 2.1.3    | Zellkultur.....                                                                                      | 26        |
| 2.1.4    | Mausstämme.....                                                                                      | 27        |
| 2.2      | Methoden.....                                                                                        | 27        |
| 2.2.1    | Mikrobiologische Methoden.....                                                                       | 27        |
| 2.2.2    | Molekularbiologische Methoden.....                                                                   | 28        |
| 2.2.2.1  | Arbeiten mit DNA.....                                                                                | 28        |
| 2.2.2.2  | Arbeiten mit RNA.....                                                                                | 34        |
| 2.2.2.3  | Nachweis von RNA und DNA im Blotverfahren.....                                                       | 35        |
| 2.2.3    | Zellbiologische Methoden.....                                                                        | 38        |
| 2.2.3.1  | Zelllinien.....                                                                                      | 38        |
| 2.2.3.2  | Primäre Zellen.....                                                                                  | 40        |
| 2.2.3.3  | Durchflusszytometrie und Sortierung von Zellen.....                                                  | 42        |
| 2.2.4    | Computerunterstützte Analysen und Statistik.....                                                     | 44        |
| 2.3      | Vektoren.....                                                                                        | 44        |
| 2.3.1    | Retrovirale Vektoren unter LTR-Kontrolle.....                                                        | 45        |
| 2.3.2    | Selbstinaktivierende retrovirale Vektoren (SIN-Vektoren).....                                        | 46        |
| <b>3</b> | <b>Ergebnisse.....</b>                                                                               | <b>51</b> |
| 3.1      | Ein Intron steigert den Virustiter in LTR- und SIN-Vektoren.....                                     | 51        |
| 3.2      | Transduktion von Zielzellen.....                                                                     | 53        |
| 3.3      | Expression des Transgens eGFP in kultivierten Zelllinien.....                                        | 54        |
| 3.3.1    | Expressionshemmender Einfluss des Verpackungssignals.....                                            | 55        |
| 3.3.2    | Expressionssteigerung durch die Gegenwart eines Introns.....                                         | 55        |
| 3.3.3    | Ein interner Promotor schwächt die Transgenexpression.....                                           | 57        |
| 3.3.4    | Effizientere RNA-Prozessierung von SIN-Vektoren mit Intron?.....                                     | 58        |
| 3.4      | Das posttranskriptionelle regulatorische Element (PRE) steigert den Titer und die Genexpression..... | 60        |
| 3.4.1    | Das PRE ermöglicht eine 20-fache Titersteigerung in SIN-Vektoren.....                                | 61        |
| 3.4.2    | Das PRE verstärkt die Genexpression in SIN- und LTR-Vektoren.....                                    | 62        |
| 3.5      | Optimierte SIN-Vektoren sind geeignet für die Transduktion muriner Knochenmarkzellen.....            | 63        |
| 3.5.1    | Korrekte Provirusintegration.....                                                                    | 65        |

---

|          |                                                                                                                         |            |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.6      | Optimierte SIN-Vektoren zeigen eine effiziente RNA-Prozessierung .....                                                  | 66         |
| 3.6.1    | Introntragende SIN-Vektoren mit hoher Spleißeffizienz .....                                                             | 67         |
| 3.6.2    | Gesteigerte Translation in SIN-Vektoren .....                                                                           | 69         |
| 3.7      | Sequenzabschnitte des untranslatierten ersten Exons regulieren das<br>balancierte Spleißen .....                        | 70         |
| 3.7.1    | Deletionen funktioneller Abschnitte in der 5'UTR von SF91 .....                                                         | 72         |
| 3.7.2    | Etablierung eines Versuchssystems .....                                                                                 | 73         |
| 3.7.2.1  | Hochgradige Transfektionseffizienz in 293T-Zellen .....                                                                 | 74         |
| 3.7.2.2  | Hohe Reinheit der RNA in der Kern- und Zytoplasmafraktion .....                                                         | 75         |
| 3.7.2.3  | Überprüfung der RNA-Transkripte durch reverse Transkription zeigte ein<br>artifizielles PCR-Produkt .....               | 76         |
| 3.7.2.4  | Separation von nukleärer und zytoplasmatischer RNA .....                                                                | 77         |
| 3.7.3    | Die PBS nimmt eine Sonderstellung in der Spleißregulation ein .....                                                     | 79         |
| 3.7.4    | Deletionen PBS-flankierender Regionen steigern das Spleißen .....                                                       | 82         |
| 3.8      | Die Rolle der Primerbindungsstelle (PBS) in der Spleißregulation ist von ihrer<br>Sequenz unabhängig .....              | 85         |
| 3.8.1    | Die MLV-PBS zeigt den gleichen Phänotyp wie die MESV-PBS .....                                                          | 85         |
| 3.8.2    | Die Spleißeffizienz ist unabhängig von der tRNA-Bindung .....                                                           | 88         |
| 3.8.3    | Die PBS übt ihre Funktion in der Spleißregulation als Abstandhalter aus .....                                           | 90         |
| 3.9      | Die Sequenz der Region 3' der PBS (+164 - +182) ist entscheidend für die<br>Spleißregulation .....                      | 93         |
| 3.10     | Humane und murine Fibroblasten zeigen übereinstimmende Befunde .....                                                    | 94         |
| 3.11     | Die PBS vermindert Proteinexpression .....                                                                              | 96         |
| 3.12     | Die Bedeutung des untranslatierten ersten Exons für den retroviralen<br>Lebenszyklus .....                              | 99         |
| <b>4</b> | <b>Diskussion .....</b>                                                                                                 | <b>102</b> |
| 4.1      | <i>Cis</i> -Elemente beeinflussen den Titer und die Genexpression retroviraler<br>Vektoren .....                        | 103        |
| 4.1.1    | Die SIN-Konfiguration mindert den Virustiter .....                                                                      | 103        |
| 4.1.2    | Das Verpackungssignal hemmt die Translation .....                                                                       | 105        |
| 4.1.3    | Ein Intron fördert die Genexpression .....                                                                              | 106        |
| 4.1.4    | Das PRE wirkt auf RNA-Prozessierung und Translation .....                                                               | 107        |
| 4.1.5    | Verbesserte RNA-Prozessierung in der SIN-Konstruktion .....                                                             | 108        |
| 4.2      | Die hochkonservierte 5' untranslatierte Region beeinflusst den Lebenszyklus<br>der Mausleukämieviren .....              | 109        |
| 4.2.1    | Translationsregulation durch Sequenzen des untranslatierten ersten Exons ..                                             | 110        |
| 4.2.2    | Rolle der 5'UTR im Infektionszyklus .....                                                                               | 112        |
| 4.2.3    | Ein neuartiger Spleißmechanismus bei MLV: Sequenzen des<br>untranslatierten ersten Exons wirken spleißregulierend ..... | 113        |
| 4.3      | SIN-Konfiguration – sicher und effizient? .....                                                                         | 118        |
| 4.4      | Ausblick .....                                                                                                          | 120        |
| <b>5</b> | <b>Zusammenfassung .....</b>                                                                                            | <b>121</b> |
|          | <b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>                                                                                      | <b>123</b> |
|          | <b>Literatur .....</b>                                                                                                  | <b>125</b> |
|          | <b>Anhang .....</b>                                                                                                     | <b>I</b>   |

# 1 Einleitung

Retroviren sind in der zell- und molekularbiologischen Grundlagenforschung ein wichtiges Werkzeug, um Regulationsmechanismen der Genexpression und die Onkogenese zu studieren. Außerdem finden sie weit verbreitet Einsatz als Vektoren für eine dosiskontrollierte stabile Transgeninsertion in embryonale und adulte Zellen. Ein Großteil der experimentellen und medizinischen Ansätze des retroviralen Gentransfers bezieht sich auf das hämatopoetische System, bei dem die hämatopoetischen Stammzellen und Lymphozyten die wichtigsten Zielzellen darstellen. Bei der medizinischen Anwendung des retroviralen Gentransfers ist unter anderem aufgrund der Langlebigkeit der genetisch veränderten Zellen großer Wert auf die biologische Sicherheit zu legen. Aber auch für die Grundlagenforschung ist es notwendig, Vektoren mit erhöhter Effizienz und Präzision zu entwickeln.

Die zentrale Hypothese der vorliegenden Arbeit war, dass über eine Optimierung der Vektorarchitektur und der RNA-Prozessierung sowohl die Effizienz als auch die Sicherheit retroviraler Gentransfervektoren verbessert werden kann. Dies setzt mechanistische Analysen in geeigneten biologischen und gentherapeutischen Zellsystemen voraus.

## 1.1 Gentherapie

Bei der Gentherapie wird genetisches Material in Zellen gebracht, um Erkrankungen des Menschen zu diagnostizieren, zu lindern oder zu heilen (Bundesärztekammer, 1995; Mulligan, 1993). Man unterscheidet zwischen der Keimbahntherapie und somatischer Gentherapie. Die Keimbahntherapie führt zu einem homogen transgenen Organismus mit der Konsequenz, dass die genetische Veränderung vererbt werden kann (Wivel und Walters, 1993). Dagegen werden bei der somatischen Gentherapie nur somatische Körperzellen des Menschen genetisch verändert. Die Auswirkungen dieser Veränderung beschränken sich zumeist auf eine Zellart bzw. ein Organ. So entsteht ein Chimärismus, der nicht an Nachkommen vererbt wird. Der somatische Gentransfer bietet eine Vielzahl neuer therapeutischer Möglichkeiten, beispielsweise bei der Korrektur von Erbkrankheiten (Cavazzana-Calvo et al., 2000; Drumm et al., 1990; Pawliuk et al., 1998), bei Infektionskrankheiten (Ramsay et al., 1997) und in der Tumorthherapie (Baum et al., 1996; Dachs et al., 1997; Davis et al., 1996; Thomas et al., 2003).

Grundlegend kann man die Vektorsysteme in virale und nicht-virale unterteilen und einen transienten und einen stabilen Gentransfer unterscheiden. Bei dem transienten Gentransfer

wird genetisches Material nur vorübergehend in die Zelle gebracht und dort exprimiert. Die stabile Integration in das Wirtsgenom ist hierbei nur ein zufälliges, sehr seltenes Ereignis. Bei den dafür benutzten nicht-viralen Vektorsystemen erfolgt der Gentransfer mittels physikochemischer Methoden wie der Elektroporation, der Kalziumphosphattransfektion oder der Lipofektion. Die Effizienz des Transfers in die meisten Zellen ist gering. Zudem kann die Kopienzahl in den Zielzellen schlecht kontrolliert werden. Ein Vorteil ist, dass keine Kontamination mit anderen biologischen Sequenzen wie Virusbestandteilen vorliegt. Für den Gentransfer werden häufig virale Vektorsysteme herangezogen. Vektoren auf der Grundlage Adeno-assoziiierter Viren (AAV) können nur beschränkt stabil in das Wirtsgenom integrieren und sind außerdem limitiert in ihrer Größe. Ein Vorteil dieser Vektoren ist allerdings, dass sie hohe Titer erzeugen. Außerdem zeigen sie eine erhöhte Frequenz zur homologen Rekombination mit zellulären Sequenzen (Russell und Hirata, 1998). Eine potentielle Durchseuchung mit replikationskompetenten Helferviren (Adenoviren) ist ein Risikofaktor bei der Anwendung dieser Vektoren in der Gentherapie. Adenovirale Vektoren können Transgensequenzen mit bis zu 28 kb tragen. Da es wie bei den AAV für ihren Lebenszyklus nicht essentiell ist, können auch diese Vektoren nur schlecht stabil in das Wirtsgenom integrieren und gehen deshalb vor allem in sich schnell teilenden Zellen während der Replikation verloren. Ein anderer Nachteil ist ihre hohe Immunogenität (Lee et al., 1995; Yang et al., 1994). Aufgrund der im Vektor vorhandenen viralen Gensequenzen und der Komplementation mit dem Verpackungssystem werden transduzierte Zellen häufig von dem Immunsystem als fremd erkannt. Das bedeutet für die Anwendung in der Gentherapie, dass das therapeutische Fenster von Nutzen und Toxizität des therapeutischen Gens in Kombination mit Virusbestandteilen sehr klein ist (Lozier et al., 1999).

Retrovirale Vektoren ermöglichen einen stabilen Gentransfer und finden derzeit die häufigste Anwendung in der Gentherapie (Thomas et al., 2003). Für den Lebenszyklus der Viren ist eine stabile Integration in das Wirtsgenom essentiell. Die Limitation einfacher Retroviren ist die Notwendigkeit der Proliferation der Zielzellen, da für eine stabile Insertion die Auflösung der Kernmembran notwendig ist. Terminal differenzierte Gewebe wie z.B. Gehirn, Muskeln und Leber oder auch ruhende Zellen wie die Stammzellen des hämatopoetischen Systems sind deshalb durch einfache retrovirale Vektoren nur schwer zu transduzieren. Im Gegensatz dazu sind die von den komplexeren Lentiviren, einer Untergruppe der Retroviren, abgeleiteten Vektoren eher in der Lage, ruhende Zellen zu transduzieren, da sie einen Mechanismus entwickelt haben, ihr Genom durch aktiven Transport in den Zellkern der Wirtszelle zu bringen (Verma und Somia, 1997).

### 1.1.1 Hämatopoetisches System

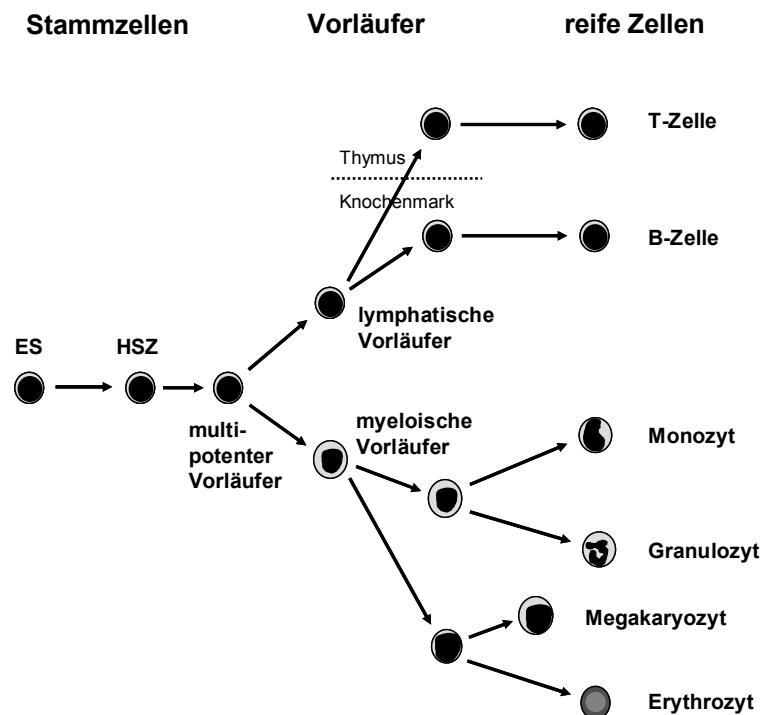
In der Gentherapie des Menschen kann man eine *in-vivo*- von einer *ex-vivo*-Anwendung unterscheiden. Bei der *in-vivo*-Anwendung wird der das Transgen tragende Vektor direkt in den Organismus appliziert. Bei der *ex-vivo*-Anwendung werden das entsprechende Organ bzw. Zellen dem Organismus entnommen und außerhalb des Körpers genetisch verändert. Darauf erfolgt die Transplantation. Die *ex-vivo*-Anwendung erfüllt einen höheren Sicherheitsanspruch, da zum einen die veränderten Zellen aufgereinigt und gezielt transduziert werden können, ohne die benachbarten Gewebe oder den ganzen Organismus zu verändern. Zum anderen kann die Dosis, mit der der Gentransfer ausgeübt wird, besser bestimmt und kontrolliert werden. Überschüssiger Vektor kann entfernt werden.

Ein Organ, das sich hervorragend für die *ex-vivo*-Anwendung eignet, ist das hämatopoetische System (Abb. 1). Das Knochenmark enthält das blutbildende System des menschlichen Körpers. Die reifen Blutzellen nehmen unterschiedlichste Funktionen wie Sauerstofftransport, Immunantwort und Wundverschluss wahr. Das Blut ist eine Bilanzgröße, die von Bildung und Abbau bestimmt wird. Die Blutbildung vollzieht sich in einer hierarchischen Differenzierungsstruktur. Undifferenzierte hämatopoetische Stammzellen (HSZ) verfügen über ein hohes Selbsterneuerungspotential. Diese Zellen sind selten, können aber das gesamte hämatopoetische System nach Transplantation rekonstituieren. Aus den HSZ leiten sich die Vorläufer (Progenitoren) der Myelo-, Erythro-, Thrombo- und Lymphopoese ab. Die nur begrenzt selbsterneuerungsfähigen Progenitoren stellen das Proliferations- und Reifungsreservoir dar. Dieses wird immer dann aktiviert, wenn ein Bedarf signalisiert wird. Unter normalen Bedingungen werden erst die ausgereiften Zellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut abgegeben. Die Thymozyten vollziehen ihre vollständige Reifung im Thymus.

Die Lebensdauer terminal differenzierter Zellen ist je nach Zelltyp sehr unterschiedlich von Tagen (Granulozyten) über Wochen (Erythrozyten) bis zu Jahren (reife Lymphozyten). Um das Gleichgewicht dieses komplexen Systems zu gewährleisten, werden jeden Tag mehr als  $10^{11}$  Zellen neugebildet (Dexter und Spooner, 1987). Diese stammen von den HSZ.

Die Mechanismen der Homöostase der Hämatopoese sind noch wenig verstanden; ein Zusammenspiel zellulärer (Stroma) und systemischer Faktoren (z.B. Zytokine) ist wahrscheinlich. Zytokine sind Glykoproteine mit regulierender Wirkung, die das Wachstum und die Differenzierung hämatopoetischer Zellen im Konzert mit unlöslichen Komponenten des Knochenmarkstromas kontrollieren. Zytokine wie der Stammzellfaktor (SCF), Interleukin-3 (Il-3), Il-6 oder der Granulozyten-Makrophagen-Kolonien

stimulierende Faktor (GM-CSF) spielen eine bedeutende Rolle für das Überleben, die Selbsterneuerung und Differenzierung der HSZ und Progenitorzellen. Um murine und humane hämatopoetische Stammzellen unter *in-vitro*-Bedingungen in ihrem undifferenzierten Zustand erhalten und zu Selbsterneuerungsteilungen anregen zu können, wurden unterschiedliche Kombinationen von Zytokinen beschrieben (Hogge et al., 1996; Li et al., 2003; Ramsfjell et al., 1999; Sutherland et al., 1991). Gewöhnlich überwiegt jedoch die Differenzierung gegenüber der Stammzellreplikation. Da der retrovirale Gentransfer durch Zellteilung gefördert wird (siehe Kap. 1.1), ist die Optimierung der Zellkulturverfahren eine wichtige Voraussetzung für die klinische Entwicklung der Gentherapie.



**Abb. 1: Das hämatopoetische System**

Die Abbildung gibt nur in groben Zügen die Organisation des hämatopoetischen Systems wider. Die Pfeile stehen für Expansion und Differenzierung. Die pluripotente embryonale Stammzelle (ES) hat uneingeschränktes Selbsterneuerungspotential. Die undifferenzierten hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) besitzen ein hohes Selbsterneuerungspotential und ermöglichen die Entwicklung in differenziertere Vorläuferzellen und reife Zellen des peripheren Bluts. Die reifen Zellen haben eine beschränkte Lebenszeit. Die Lymphozyten können ihre Funktion allerdings über Jahre ausüben.

Wenn sich eine Stammzelle teilt, entstehen entweder zwei identische Tochterzellen, die wiederum beide Selbsterneuerungspotential haben, oder es kommt zur Induktion der Differenzierung in einer bzw. beiden Tochterzellen. Eine entscheidende Rolle beim Differenzierungsprozess von Stamm- über Vorläuferzellen bis zu terminal ausgereiften

Blutzellen spielen die Transkriptionsfaktoren, deren Aktivierung wahrscheinlich in einer Kombination deterministischer und stochastischer Prozesse erfolgt (Enver et al., 1998; Just et al., 1993). Die unterschiedliche Expression von Transkriptionsfaktoren reguliert die Expression weiterer zellulärer Gene. Je nach Stadium der Hämatopoese und der Zelllinie wird ein unterschiedliches Set an Transkriptionsfaktoren exprimiert (Enver et al., 1998).

Im Zusammenspiel mit den Transkriptionsfaktoren spielt die epigenetische Organisation des Chromatins eine entscheidende Rolle für die Genaktivierung (Brandeis et al., 1994; Macleod et al., 1994). Nachdem die Transkriptionsrate eines Gens differenzierungsabhängig eingerichtet worden ist, hängt das weitere Schicksal der transkribierten Sequenzen entscheidend von den vielfältigen Mechanismen der RNA-Prozessierung ab, die ebenfalls differenzierungsabhängig reguliert sein können. Folglich sollte ein Transgen regulatorische Sequenzen tragen, die dem Transkriptionsprofil und der RNA-Prozessierung der Zielzelle möglichst gut entsprechen.

Zur gezielten Transduktion von HSZ der Maus ist von Li et al. (2003) ein optimiertes Protokoll entwickelt worden, das eine Aufreinigung undifferenzierter bzw. geringgradig differenzierter „liniennegativer“ Zellen beinhaltet.

### 1.1.2 Sicherheit in der Gentherapie

So effizient sich die Gentherapie von hämatopoetischen Stammzellen durch retrovirale Vektoren inzwischen zeigt, so beunruhigend sind die Komplikationen, die im Jahre 2002 beobachtet wurden (Hacein-Bey-Abina et al., 2003; Kohn et al., 2003b; Li et al., 2002). Eine Gentherapiestudie, die von Cavazzana-Calvo et al. (Cavazzana-Calvo et al., 2000) durchgeführt wurde, beinhaltete die retrovirale Modifikation hämatopoetischer Zellen von zehn Kindern, die seit Geburt unter XSCID (X-linked severe combined immunodeficiency) leiden. Aufgrund der fehlenden  $\gamma$ -Kette des Interleukin-2-Rezeptors, der an der Signaltransduktion von fünf verschiedenen Wachstumsfaktoren für die Lymphozytenentwicklung beteiligt ist, waren die Patienten nicht zur Immunreaktion fähig. Die gentherapeutische Substitution der fehlenden Rezeptorkomponente konnte die Immunfunktion bei neun von zehn Patienten wieder herstellen. Die Sicherheit der retroviralen Anwendungen in Frage stellend, entwickelten mittlerweile zwei der Patienten eine T-Zellleukämie. Molekulare Analysen zeigten, dass bei beiden leukämischen Klonen eine retrovirale Integration im *LMO2*-Gen stattgefunden hatte. *LMO2* ist ein Protoonkogen. Das Genprodukt wird in hämatopoetischen Vorläuferzellen und Zellen der myeloiden Linie exprimiert und bindet Transkriptionsfaktoren. Die Aktivierung von *LMO2* durch retrovirale Insertion war vermutlich nicht die alleinige Ursache der Leukämie. Es

spielten wahrscheinlich weitere, potentiell krankheitsspezifische Faktoren eine Rolle (Baum et al., 2004; Hacein-Bey-Abina et al., 2003). Dies stimmt mit dem Modell der Tumorentstehung durch eine initiale Mutation und akkumulierende Zweitmutationen überein (Wu und Pandolfi, 2001). Die Onkogenaktivierung durch Vektorinsertion ist auch bei der Entwicklung von Leukämien nach Infektion mit replizierenden Retroviren das entscheidende pathogenetische Ereignis; hingegen scheint die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen bei der Entstehung onkogener Mutationen durch retrovirale Insertionen weniger bedeutsam zu sein (Akagi et al., 2004).

Andere Studien des retroviralen Gentransfers beim Menschen und in Großtiermodellen zeigten bisher keine Leukämieentwicklung (Kohn et al., 2003a). Allerdings berichteten zuvor Li et al. (2002) in einer Studie in der Maus mit retroviral transduzierten HSZ von einer Tumorentstehung durch Onkogenaktivierung. Durch insertionelle Aktivierung des für ein Zinkfingerprotein kodierenden Gens *Evi1* (ecotropic viral integration site 1) wurde eine akute myeloische Leukämie (AML) verursacht. Auch in diesem Fall wird ein pathogenetischer Beitrag des vom Vektor kodierten Transgens diskutiert (Li et al., 2002).

In die Sicherheitsdiskussion der Gentherapie müssen weitere Fakten einbezogen werden. Es handelt sich bei den HSZ um langlebige Zellen, in denen protoonkogene Veränderungen akkumulieren können. Infolge der *in-vitro*-Kultur und genetischer Veränderung der Zellen gelangt nur ein kleiner Teil der Zellen mit noch repopulierenden Eigenschaften zurück in den Organismus. Diese Fraktion muss expandieren, um die therapeutische Funktion zu erfüllen. Neben den Risiken der Zellmanipulation durch *in-vitro*-Kultur und genetische Veränderung bei der klonalen Expansion treten weitere bei der Vektorproduktion sowie der Transgeninsertion und -expression auf. Ein wichtiger Faktor des Langzeiterfolgs ist zudem die Toleranz des Immunsystems gegenüber den genetisch veränderten Zellen (Baum et al., 2003).

Für eine gezielte und kontrollierbare Anwendung dürfen retrovirale Vektoren nur einen viralen Zyklus durchleben, das heißt sie müssen replikationsinkompetent sein. Die Infektion von Zielzellen darf nur zur Integration der proviralen DNA in das Wirtsgenom und zur Expression des Transgens führen, ohne eine neue Verpackung viraler RNA zu ermöglichen. Die Transgendosis in der Zielzelle ist möglichst gering zu halten (Kustikova et al., 2003). Verpackungssysteme, in die kodierende Regionen für Hüllproteine und Strukturproteine ebenso wie das Plasmid für den retroviralen Vektor eingebracht werden, vermindern das Risiko der Entstehung replikationskompetenter Retroviren. Entsprechend sollten die Vektoren selbst möglichst wenige retrovirale Sequenzen besitzen, um die Entstehung replikationskompetenter Retroviren durch Rekombination zu vermeiden

(Hildinger et al., 1999). Eine weitere Gefahr ist die Mobilisierung der Vektor-RNA durch natürlich vorkommende Retroviren, die in der Lage sind, diese zu verpacken.

Nach Insertion der proviralen DNA in das Wirtsgenom muss die Wechselwirkung mit benachbarten Genen minimiert werden. Die Transgenexpression soll abhängig von Vektorsequenzen sein und nicht maßgeblich von der Umgebung reguliert oder eventuell abgeschwächt werden. Da die Manipulation des Insertionsortes retroviraler Vektoren gegenwärtig technologisch noch nicht absehbar ist (Bushman, 2003), sollte die retrovirale Genkassette so gestaltet sein, dass benachbarte Gene durch die Insertion des Provirus möglichst nicht aktiviert werden. Die Optimierung der Vektorarchitektur und RNA-Prozessierung könnte hierbei einen wichtigen Beitrag leisten.

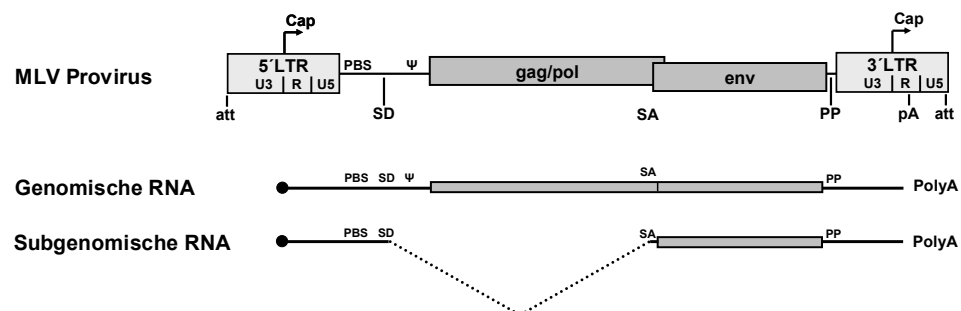
## 1.2 Retrovirale Vektoren

Retrovirale Vektoren sind die häufigsten und am besten charakterisierten Vektorsysteme, die derzeit bei einem Gentransfer von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen angewandt werden (Thomas et al., 2003). Die meisten dieser Vektoren sind abgeleitet von den Mausleukämieviren (MLV) oder dem humanen Immundefizienzvirus (HIV). Der Lebenszyklus von Retroviren bringt es mit sich, dass sie ihr Genom mit hoher Effizienz stabil in das Wirtsgenom integrieren, um RNA und Proteine exprimieren zu können. Das gleiche gilt für ein Transgen, das in einen Vektor integriert wird. Retroviren werden nach ihrer Genomorganisation, Morphologie und ihrem Replikationszyklus in verschiedene Gattungen eingeteilt (Coffin et al., 1997). Die Mausleukämieviren zählen zu den einfachen C-Typ-Retroviren oder Gammaretroviren.

### 1.2.1 Genomarchitektur und funktionelle Organisation der Mausleukämieviren

Das Genom von Retroviren besteht aus zwei RNA-Strängen positiver Polarität (Coffin, 1996). Wie zelluläre mRNAs (messenger RNA, Boten-RNA) tragen sie am 5'-Ende ein Cap und am 3'-Ende ein Polyadenylierungssignal (PolyA) (Abb. 2). Einfache Retroviren wie MLV kodieren drei virale Gene *gag* (für Strukturproteine: Kapsid), *pol* (für enzymatische Proteine) und *env* (für Hüllproteine: Env). Am 5'- und am 3'-Ende besteht die RNA terminal aus der R-Region („redundant“), die in identischer Sequenz das Transkript abschließt. Die R-Region trägt den Transkriptionsstartpunkt und ein Signal für die Termination. Auf den 5'-R-Bereich folgt die U5-Region, die invertierte Sequenzen für die Integration des Provirus in die Wirts-DNA trägt. 3' der U5-Region schließt sich direkt die Primerbindungsstelle (PBS) an, die mit einem Molekül zellulärer tRNA (transfer RNA)

hybridisiert vorliegt, deren freies Hydroxylende (3'OH) den Startpunkt der reversen Transkription darstellt. Stromabwärts der PBS befindet sich ein Spleißdonor (SD). Zwischen dem SD und der kodierenden Region für Gag liegt das Verpackungssignal ( $\Psi$ ), das eine sehr konservierte, stark gefaltete Sekundärstruktur ausbildet und für die Dimerisierung mit einer weiteren genomischen RNA und die Kapsidbindung verantwortlich ist. Am Ende der kodierenden Region für Pol befindet sich die Spleißakzeptorstelle (SA). Alle Retroviren exprimieren zumindest ein gespleißtes Transkript für die Expression von Env.



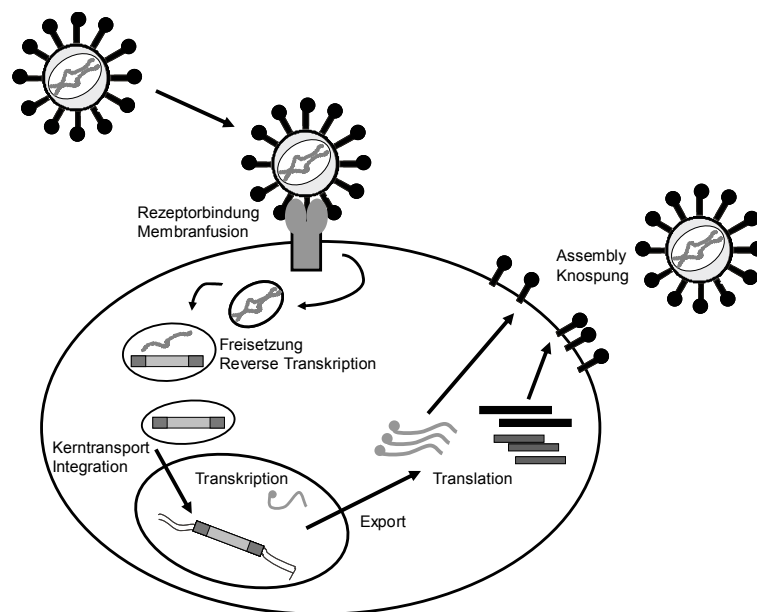
**Abb. 2: Genomische Organisation einfacher Retroviren**

Am Beispiel von MLV ist die genomische Organisation einfacher Retroviren in der proviralen Form und als genomische RNA dargestellt. (LTR, long terminal repeat; PBS, Primerbindungsstelle; SD und SA, Spleißdonor und -akzeptor;  $\Psi$ , Verpackungssignal; PP, Polypurintrakt; pA, Polyadenylierungssignal; att, Integrationsignal; Cap, Transkriptionsstart; gag/pol, env, kodierende Regionen für Kapsidproteine, Enzyme und Hüllproteine)

Stromabwärts der kodierenden Region für Env befindet sich der Polypurintrakt (PP), der beim Umschreiben der retroviralen RNA in DNA als Primer der Synthese des zweiten DNA-(+)-Strangs dient. Der U3-Bereich trägt mit Enhancer- (Verstärker) und Promotorbereichen wichtige Kontrollmotive für die Regulation der viralen Transkription. U5- und U3-Sequenzen stellen auf RNA-Ebene einfach („unique“) auftretende Sequenzen dar. In der proviralen DNA sind sie durch den besonderen Mechanismus der reversen Transkription an beiden Enden verdoppelt und bilden zusammen mit den R-Regionen die identischen langen terminalen Wiederholungssequenzen, die LTRs (long terminal repeat). Die 5' untranslatierte Region (5'UTR) vom Transkriptionsstartpunkt der R-Region bis zum Translationsstartkodon des Gag/Pol-Fusionsproteins wird auch als Leader bezeichnet.

### 1.2.2 Lebenszyklus

In dem Viruspartikel der Retroviren befinden sich zwei gepaarte RNA-Genome positiver Polarität, die mit Proteinen und tRNA zu einem Ribonukleoproteinkomplex (RNP) verpackt sind (Coffin, 1996). Der Komplex ist umgeben von einer proteinhaltigen Kapsidhülle (Kapsid) und einer Lipiddoppelmembran, die aus Bestandteilen der Wirtszelle und den virusspezifischen Hüllglykoproteinen (Env) besteht. Die Env-Proteine determinieren, an welche Rezeptoren das Virus andocken, d.h. welche Zielzellen es transduzieren kann.



**Abb. 3: Retroviraler Lebenszyklus**

Nach Rezeptorbindung und Fusion der viralen und zellulären Membran wird das Viruskapsid in das Zytoplasma entlassen. Die virale RNA wird revers transkribiert und die provirale DNA integriert in das Wirtsgenom. Die provirale DNA funktioniert als eine Transkriptionseinheit und erzeugt eine RNA, von der genomische RNA und alle viralen Proteine generiert werden müssen. Das Assembly (Zusammenlagerung) von zwei genomischen RNAs und die Anlagerung von viralen Proteinen (Gag/Pol, Env) zur Generierung neuer viraler Partikel geschehen im Zytoplasma und an der zytoplasmatischen Membran.

Nach Rezeptorbindung fusioniert die Virusmembran mit der Zellmembran, und das Kapsid mit dem RNP wird in das Zytoplasma entlassen (Abb. 3). Alternativ wird das Virus endozytotisch aufgenommen. Die im Partikel enthaltene virale reverse Transkriptase (RT) schreibt mit Hilfe des tRNA-Primers die RNA in eine doppelsträngige DNA mit einem DNA/RNA-Hybrid als Zwischenstufe um. Bei der Replikation linearer DNA-Stränge geht normalerweise ein Teil der 5'-Enden verloren. Retroviren umgehen diesen Verlust, indem sie über zwei identische R-Sequenzen am 5'- und 3'-Ende während der reversen Transkription zwei Sprünge in der Basenpaarung vollziehen. Durch die Übertragung der

5'-U5-Region an das 3'-Ende und der 3'-U3- Region an das 5'-Ende entsteht ein doppelsträngiges DNA-Produkt, das Provirus, mit LTRs. Das Provirus gelangt als Präintegrationskomplex in den Zellkern. MLV sind offenbar darauf angewiesen, dass sich während der Zellteilung die Kernmembran auflöst. Lentiviren, wie HIV, bilden eine Ausnahme, denn der Präintegrationskomplex kann aktiv in den Zellkern transportiert werden. Das ermöglicht die Transduktion von teilungsinaktiven jedoch metabolisch aktiven Zellen.

Die Integration erfolgt durch die virale Integrase (IN). Ursprünglich ging man davon aus, dass die Integrationsstellen von Retroviren statistisch über das Genom verteilt wären. Deshalb sollte das Risiko, zufällig ein Gen zu unterbrechen oder zu stimulieren relativ klein sein (Varmus, 1982). Heute wird ein rein zufälliges Ereignis angezweifelt, obwohl keine Konsensussequenzen in der flankierenden Region der Integrationsereignisse festgestellt werden konnten. Man geht davon aus, dass bei der Insertion sowohl nukleosomale Strukturen als auch DNA-Bindungsproteine eine Rolle spielen (Pruss et al., 1994; Pryciak und Varmus, 1992). Vergleiche von Insertionsstellen von MLV und HIV bzw. abgeleiteten Vektoren zeigten eine Bevorzugung von Bereichen um Transkriptionsstartstellen von aktiv transkribierten Genen für MLV. Integrationen durch HIV zeigten ebenfalls eine Präferenz für transkribierte Regionen, ohne jedoch den 5' Bereich zu bevorzugen (Wu et al., 2003).

Nach Integration des Provirus kann virale RNA mit Hilfe der zellulären Transkriptionsmaschinerie hergestellt werden. Die regulatorischen Sequenzen befinden sich in der U3-Region des LTR, die Transkriptionsfaktoren und der Enzymkomplex werden von der Zelle zur Verfügung gestellt. Deshalb ist die Höhe der Genexpression in hohem Maße von dem Zellhintergrund abhängig. Bei der proviralen DNA handelt es sich um eine Transkriptionseinheit. Es entsteht nur eine polycistronische RNA, von der alle Bestandteile des Virus generiert werden müssen. Zum Teil wird die RNA als Volltranskript für genomische RNA oder die Expression der viralen Proteine Gag und Pol ungespleißt in das Zytoplasma transportiert. Da die Expression von Env nur von gespleißter RNA geschieht, ist die Balance zwischen der gleichzeitigen Produktion von ungespleißter und gespleißter RNA („balanciertes Spleißen“) mit anschließendem Export beider RNAs in das Zytoplasma ein essentieller Mechanismus der retroviralen Genexpression. Genomische RNA kann im Zytoplasma als Dimer zum RNP gepackt mit Kapsid umgeben werden und an der Lipidhülle der Zelle in Regionen, in denen sich die viralen Hüllproteine gesammelt haben, knospen, um den Infektionszyklus erneut zu beginnen.

### 1.2.3 Retrovirale Vektoren für die Transduktion von Knochenmarkszellen

Retrovirale Vektoren müssen die für einen Lebenszyklus notwendigen viralen Sequenzen in ihrem Genom tragen. Um dennoch die Menge viraler Sequenzen zu begrenzen, ist es möglich, einige Faktoren in *trans* zur Verfügung zu stellen (wie z.B. Hüllproteine, Kapsidproteine). Dem Zielzellenspektrum entsprechend müssen *cis*-wirkende Sequenzen (wie z.B. Promotor/Enhancersequenzen der U3-Region) retroviraler Vektoren in geeigneter Weise kombiniert werden.

Die in der vorliegenden Arbeit konstruierten und untersuchten retroviralen Vektoren leiten sich von MLV ab. Um diese Viren als Vektoren für die Gentherapie von frühen Knochenmarkstammzellen nutzen zu können, sind die einzelnen regulierenden Sequenzen hinsichtlich ihrer Langzeitexpression, dem Zielzellenspektrum und ihrer Sicherheit optimiert worden. In frühen embryonalen Stammzellen ist die produktive Infektion durch MLV blockiert, und frühe hämatopoetische Zellen zeigen eine nur geringe Expression viraler Gene. Durch *in-vivo*- und *in-vitro*-Passage und durch Selektion in verschiedenen embryonalen Karzinom- und Stammzelllinien sind Mutanten entwickelt worden, die diese Einschränkungen umgehen können (Stocking et al., 1993). Eine entscheidende Veränderung des Wildtypvirus ist dabei eine Punktmutation bei Base -345 ausgehend von der Cap-Stelle. Diese Mutation verhindert die Bindung des Repressors ECF-1 (EC cell factor I) bzw. ELP (embryonic LTR-binding protein) (Akgün et al., 1991; Gorman et al., 1985; Tsukiyama et al., 1989). Eine weitere Punktmutation bei -166 führt zu der Konsensussequenz für die Bindungsstelle für SP1, einem gut charakterisierten Transkriptionsfaktor (Kadonaga et al., 1988; Stocking et al., 1985; Stocking et al., 1986). Beide erwähnten Mutationen sind im myeloproliferativen Sarkomvirus (Myeloproliferative Sarkoma Virus, MPSV) enthalten und erlauben eine Expression in embryonalen Karzinomzellen, nicht aber in embryonalen Stammzellen (Grez et al., 1991; Prince und Rigby, 1991).

Weitere Modifikationen in der Enhancerregion sowie die Mutation der PBS für Prolin, die gleichzeitig eine Bindungsstelle für einen negativ regulierenden Faktor (NRE, negativ regulatory element) darstellt (Loh et al., 1988; Petersen et al., 1991), in die Sequenz für die Bindung der tRNA Glutamin (Colicelli und Goff, 1987), ermöglichte die Isolierung des murinen embryonalen Stammzellvirus MESV (Franz et al., 1986; Hilberg et al., 1987). MESV wird in undifferenzierten embryonalen und hämatopoetischen Zellen exprimiert (Baum et al., 1995; Grez et al., 1990).

Um die verschiedenen Eigenschaften der entwickelten Vektoren positiv zu nutzen, wurde ein neuer Vektor konstruiert, der den 5'LTR des MPSV, den Leaderbereich des MESV und den 3'LTR des SFFV (spleen focus-forming virus), einem Friend-MCF-Virus, enthält. Dieser Friend-MCF-MESV (FMEV) Vektor zeigt eine relativ linienunabhängige starke Expression in hämatopoetischen Zellen (Hildinger et al., 1998). Der U3-Bereich des SFFV besitzt gute Enhanceraktivitäten in hämatopoetischen Zellen (Baum et al., 1995; Baum et al., 1997; Tumas et al., 1996). Die wichtigsten Enhancermotive sind Erkennungsstellen für die in diesen Zellen stark exprimierten Transaktivatoren SP1, ETS und AML1/PEBP (Baum et al., 1997; Shivdasani und Orkin, 1996; Wahlers et al., 2002b). Die Kombination dieser Elemente sorgte auch bei einer Einzelkopie in der Zielzelle für eine hohe Transgenexpression.

Trotz Optimierung dieser Vektoren wurde dennoch weiterhin das Auftreten transkriptioneller Repressionen festgestellt (Laker et al., 1998; Osborne et al., 1999). Die Repressormotive konnten nicht vollständig eliminiert werden, so dass eine Stilllegung der Expression mit der Möglichkeit der *de novo* Methylierung (Asche et al., 1984; Seliger et al., 1986) in differenzierungsabhängiger Form erfolgen kann.

Auf der Basis des FMEV wurden die Vektoren hinsichtlich ihrer Sicherheit soweit optimiert, dass alle weiteren kodierenden viralen Sequenzen deletiert wurden. Das Transgen (z.B. das „enhanced green fluorescent protein“ eGFP) wird von dem Startkodon für das Kapsidprotein Gag exprimiert. Alle weiteren AUGs des Leader wurden ebenfalls entfernt (Hildinger et al., 1999), um die Initiation der Expression von Polypeptiden mit unbekannter Funktion, die toxisch oder immunogen wirken könnten, zu unterbinden. Der so entstandene Vektor SF110 wird ausführlich in Material und Methoden vorgestellt (Kap. 2.3.1, Abb. 7).

Eine Variante des eben vorgestellten Vektors besitzt zusätzlich ein Intron in der 5'UTR (SF91). Viele zelluläre Gene und alle retroviralen Genome besitzen zumindest ein Intron in der 5' untranslatierten Region (5'UTR). Introns als RNA-Prozessierungselemente können die Genexpression durch eine effizientere Transkription, eine erhöhte Stabilität der RNA und einen beschleunigten Export in das Zytoplasma steigern (Fong und Zhou, 2001; Reed und Hurt, 2002) (siehe folgendes Kapitel 1.2.4). Außerdem sorgen die Proteine des Exon-Grenzkomplexes für eine Effizienzsteigerung der Translation (Nott et al., 2004). Ein Intron in der 5'UTR LTR-kontrollierter retroviraler Vektoren wirkt sich ebenfalls expressionssteigernd aus (Hildinger et al., 1999), wobei der Effekt stark von der Art der zu exprimierenden cDNA abhängt (Schambach et al., 2000). Der Vektor SF91 wird ebenfalls in Material und Methoden ausführlicher besprochen (Kap. 2.3.1, Abb. 8).

### 1.2.4 Mechanismen der posttranskriptionellen Genexpression

Die Genexpression einfacher Retroviren ähnelt der zellulärer Gene. In retroviralen Vektoren ist die Transgenexpression dementsprechend nicht nur von den Regulatorsequenzen der U3-Region für die Transkriptionsinitiation abhängig, sondern ebenfalls von posttranskriptionellen Ereignissen.

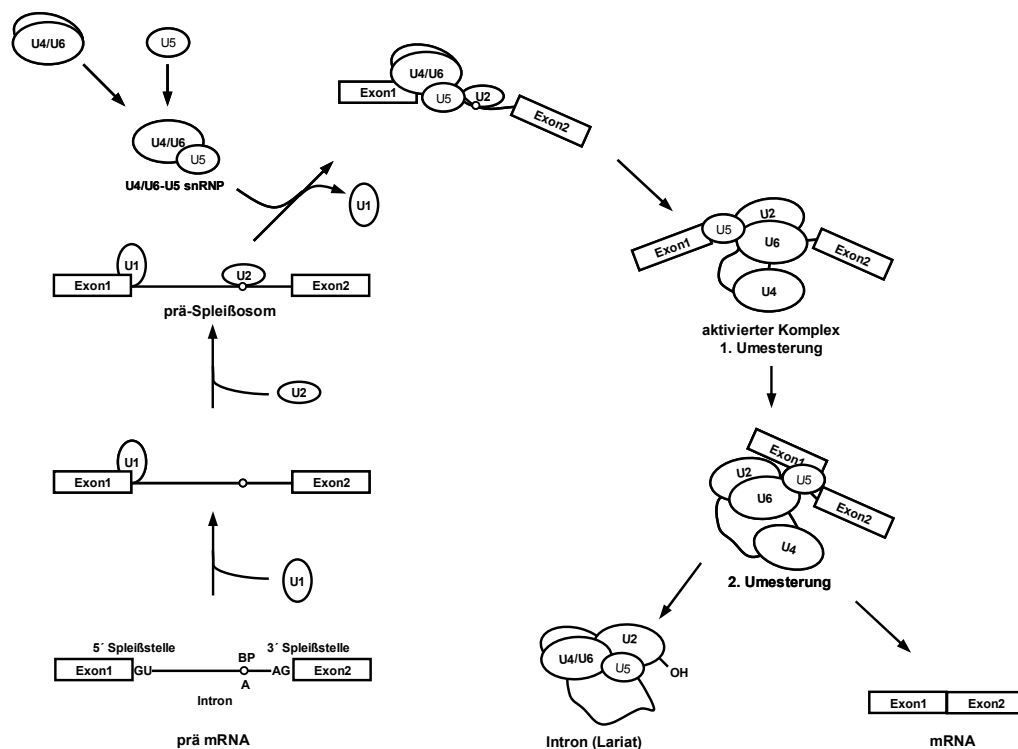
Die Regulation erfolgt auf sequentiellen Ebenen, beinhaltet Transkription, Spleißen und Translation und ist in Eukaryonten zudem noch mit einer Kompartimentierung von Kern und Zytoplasma zeitlich und räumlich durch den Kernexport getrennt. Inzwischen weiß man, dass sich die Prozesse bei zellulären Genen im Wesentlichen gegenseitig beeinflussen und aufeinander abgestimmt sind (Maniatis und Reed, 2002). Die Kontrolle der Genexpression beginnt mit der Chromatinstruktur bzw. der Aktivierung einer Genstruktur (Kornberg, 1993). Die Zugänglichkeit und die Sequenz des Promotors bestimmen, wie gut die RNA-Polymerase II binden und die Transkription initiieren kann, denn für beide Schritte sind allgemeine Transkriptionsfaktoren notwendig. Die Bindung erfolgt über ein TATA-bindendes Protein (TBP) durch den Transkriptionsfaktor TFIID (Hernandez, 1993). Weitere Transkriptionsfaktoren und die Polymerase selbst werden nach der Bindung rasch zugefügt. Die Geschwindigkeit der Komplexbildung wird von Regulatormolekülen bestimmt, die an Enhancerbereiche, teils in einer Distanz von über 10 kb, binden (Drapkin et al., 1993). Die Anzahl und die Art der Bindungsstellen für Aktivator- oder Repressormoleküle in Enhancerbereichen bestimmen die Effektivität der Transkription.

Die posttranskriptionelle Kontrolle der Genexpression beginnt mit dem Capping der frisch synthetisierten prä-mRNA bereits nach der Synthese der ersten 20 bis 40 Nukleotide. Dies geschieht durch Proteinkomplexe, die zuvor an die C-terminale Domäne (CTD) der großen Untereinheit der Polymerase II gebunden haben, und schützt die prä-mRNA vor Exonukleasen. Die CTD spielt zudem durch die Anlagerung des Cap-bindenden Komplexes (CBC), der seinerseits das Cap der prä-mRNA bindet, eine wichtige Rolle beim Spleißen des ersten Introns (Lewis et al., 1996), beim Export bestimmter RNAs (Gorlich et al., 1996; Lewis und Izaurralde, 1997) und bei der Initiation der Proteinsynthese (Fortes et al., 2000; Ishigaki et al., 2001). Die Polyadenylierung nach Erreichen der Terminationssequenz hat Einfluss auf die Stabilität und den Export der RNA und sorgt für eine effiziente Translation.

Ein weiterer wichtiger Regulationsprozess ist das Spleißen der primären mRNA (Abb. 4). Die meisten prä-mRNAs enthalten alternierende Sequenzen von kodierenden (Exons) und nichtkodierenden Bereichen (Introns). Während des Spleißprozesses werden die Introns an

5'- (Spleißdonor, SD) und 3'-Enden (Spleißakzeptor, SA), den sogenannten Spleißstellen, herausgespleißt und die Exons kovalent miteinander verbunden.

Zelluläre RNAs werden zu einem großen Teil (bis zu 60 %) alternativ gespleißt (Consortium, 2001; Kan et al., 2001). Die Regulation erfolgt sowohl über *cis*-aktive Sequenzen, Enhancer und Silencer, auf der RNA als auch über Proteine mit RNA-Erkennungsmotiven und serin- und argininreichen Domänen (Akker et al., 2001; Graveley, 2000; Liu et al., 1998; Schaal und Maniatis, 1999). Außerdem scheint alternatives Spleißen auch von kinetischen Aspekten wie der Elongationsrate der Polymerase II und damit von Transkriptionsaktivatoren abhängig zu sein (Kadener et al., 2001; Kikumori et al., 2002; Neugebauer, 2002).



**Abb. 4: Spleißen von mRNA**

Die Entfernung von Introns aus einer prä-mRNA erfordert die Anlagerung zahlreicher Spleißkomponenten (U1-U6: U1-U6snRNP). *Cis*-aktive Konsensussequenzen auf der RNA sind die 5' Spleißstelle (SD) und die 3' Spleißstelle, die neben dem Spleißakzeptor (SA) aus dem Verzweigungspunkt (BP) und dem Polypyrimidintrakt (PPT) besteht. Das Spleißen ist ein streng regulierter Prozess, an dem RNA-RNA- und RNA-Proteinwechselwirkungen beteiligt sind. Das Intron wird als Lariat entfernt. Die Exons werden kovalent miteinander verbunden.

Die Spleißstellen sind anhand von spezifischen Konsensussequenzen auf der RNA markiert. In unmittelbarer Nähe des SA befinden sich im Intron der Verzweigungspunkt (branch point, BP) und ein Polypyrimidintrakt (PPT). Die Sequenzelemente müssen vom Spleißosom, einem Multieinheitenkomplex aus Proteinen und RNA (Staley und Guthrie,

1998), erkannt werden. Bei den RNA-Komponenten handelt es sich um Kern-RNAs, U1, U2, U4, U5 und U6, die mit Proteinen zu kleinen Kernribonukleoproteinen (small nuclear RNP, snRNP) gepackt sind. Initiiert wird der Spleißprozess über Watson-Crick-Basenpaarung des SD mit der U1snRNP.

Schrittweise werden weitere Spleißkomponenten angelagert. Der PPT der 3'-Spleißstelle wird von der U2snRNP gebunden, und nach der Verdrängung der U1snRNP lagern sich die U4/U6snRNP und U5snRNP an. In Hefe gibt es auch Hinweise darauf, dass sich das Spleißosom aus größeren Komplexen, penta-snRNPs, die bereits die fünf UsnRNAs tragen, zusammensetzt; die einzelnen Komponenten treffen damit nicht erst auf der RNA zusammen (Stevens et al., 2002). Durch Konformationsänderungen wird der Komplex aktiviert; in zwei anschließenden Transesterifizierungsreaktionen werden das Intron als Lariat entfernt und die Exons ligiert (Kramer, 1996). Normalerweise kann jede 5'-Spleißstelle nur mit der nächstgelegenen 3'-Spleißstelle die Reaktion durchführen. Reguliert wird dieser Prozess meist über die Erkennung nahegelegener 3' und 5' Spleißstellen entlang eines Exons (Exondefinition). Allerdings sind in Exons und Introns viele Sequenzen zu finden, die dem SD-Konsensus entsprechen und von der U1snRNP gebunden, aber dennoch nicht benutzt werden (Eperon et al., 1993; Sun und Chasin, 2000). Dies spricht für die Existenz bislang unbekannter zusätzlicher Signale, die entweder über die Primärsequenz oder die Sekundärstruktur der RNA reguliert sein könnten.

Die Polymerase kann erst von der RNA entlassen werden, wenn ein funktionales Polyadenylierungssignal gelesen wurde (Proudfoot et al., 2002; Shatkin und Manley, 2000). Die Prozessierung einer prä-mRNA inklusive Spleißen und Polyadenylierung muss normalerweise vollständig abgeschlossen sein, bevor die reife mRNA in das Zytoplasma transportiert werden kann (Green, 1989). Es handelt sich um einen eng gekoppelten Prozess. Der Spleißkomplex hinterlässt auf der RNA verschiedene Proteine, den Exon-Grenzkomplex (exon-junction complex), der den nukleozytoplasmatischen Transport der mRNA fördert (Reed und Hurt, 2002). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass der Exon-Grenzkomplex die Translation fördert (Nott et al., 2004). Intronfreie RNA muss folglich ohne spleißvermittelte Exportfaktoren aus dem Kern transportiert werden. Dies geschieht, indem auch bei dieser RNA Faktoren auf der RNA hinterlassen werden, die den Export ermöglichen (Lei et al., 2001; Strasser et al., 2002). Handelt es sich im Gegensatz um intronhaltige RNA und ist das Spleißen oder die Polyadenylierung defekt, dann verbleiben die mRNAs im Kern (Custodio et al., 1999; Horowitz et al., 2002).

Zur Expression muss die prozessierte mRNA in einem aktiven Transport in das Zytoplasma transportiert werden. Der Transport erfolgt durch den Kernporenkomplex

(nuclear pore complex, NPC), einen in die Kernmembran eingelagerten Multiproteinkomplex, bestehend aus 50 bis 100 verschiedenen Proteinen mit einem Gewicht von 125 MDa (Reichelt et al., 1990). Der aktive Export ist ein selektiver Prozess, der von spezifischen Exportsignalen vermittelt wird. Für Proteine mit nukleärem Exportsignal (NES) sind Exportfaktoren gut charakterisiert. An kurze leucinreiche NES bindet als primärer Adapter CRM-1. Der Export wird durch kooperative Bindung von RanGTP möglich, das nach Hydrolyse zu RanGDP wieder in den Kern rücktransportiert wird (Ohno et al., 1998). mRNAs werden nicht als nackte Nukleinsäuren, sondern als RNP-Komplexe transportiert. Die Beladung der RNA durch hnRNPs (heteronukleäre Ribonukleoproteine) erfolgt während der Transkription und Prozessierung, und die Proteinzusammensetzung der hnRNPs ist sehr variabel (Matunis et al., 1993; Wurtz et al., 1996). Einige Ribonukleoproteine verbleiben auf der RNA, andere müssen vor RNA-Export abgespalten werden (Pinol-Roma und Dreyfuss, 1992). Der genaue Mechanismus des mRNA-Exports ist noch nicht bekannt. Als essentieller Exportfaktor wurde Mex67 in Hefe und TAP als das menschliche Homolog entdeckt (Grüter et al., 1998; Segref et al., 1997). TAP kann direkt oder im Komplex mit p15 mit den Nukleoporinen des NPC interagieren. Der Kontakt des TAP/p15 mit der mRNA wird über das Adapterprotein Aly, welches durch Transkription und Spleißen auf die RNA geladen wurde, hergestellt (Zhou et al., 2000). Auch für die Regulation des RNA-Exports könnten neben Sequenzmotiven der RNA spezifische Sekundärstrukturen eine wichtige Rolle spielen.

### 1.2.5 Feinabstimmung der retroviralen Genexpression

Retroviren nutzen die zelluläre Transkriptions- und Expressionsmaschinerie und bringen dabei als regulatorische Sequenzen ihre LTRs mit Promotor- und Enhancersequenzen ein. Bei einfachen Retroviren wie MLV sind die LTR-Promotoren konstitutiv aktiv. Um das für ihren Lebenszyklus essentielle balancierte Spleißen zu erreichen, müssen Retroviren dafür sorgen, dass ihre Spleißstellen zu einem gewissen Teil überlesen werden können. Zusätzlich muss diese ungespleißte RNA, obwohl sie Erkennungsmerkmale für die Spleißmaschinerie enthält und nicht vollständig prozessiert ist, also die zellulären Bedingungen nicht erfüllt, durch den NPC in das Zytoplasma transportiert werden. Es ist nur zum Teil bekannt, wie Retroviren die posttranskriptionelle Kontrolle der Wirtszelle umgehen bzw. alternativ nutzen.

Bei den komplexeren Retroviren sind zusätzliche kodierende Regionen auf der RNA vorhanden, von denen regulatorische Proteine exprimiert werden. HIV exprimiert Rev, das nach Bindung an das RRE (Rev responsive Element) in der 3'UTR die neu synthetisierte

RNA Crm1-abhängig in das Zytoplasma transportiert. Einfache Retroviren besitzen keine Regulatorproteine, um ein balanciertes Spleißen zu steuern. Sie müssen dies über *cis*-wirkende Sequenzen ihrer RNA erreichen. Man geht davon aus, dass die einfachen Retroviren ein ausgewogenes Verhältnis an genomischer und einmal gespleißter RNA durch ineffiziente Spleißstellen oder regulatorisch verstärkende oder schwächende Elemente in der prä-mRNA erreichen (Hammariskjöld et al., 1994; Katz et al., 1988; Katz und Skalka, 1990; Paca et al., 2001). Dabei werden ineffiziente Spleißsignale meist dem SA zugeordnet. Für einige Retroviren sind Exportsignale identifiziert worden, mit Hilfe derer ungespleißte RNA exportiert wird. Das Rous Sarcoma Virus (RSV) trägt ein solches Element, das aus Sequenzwiederholungen besteht, in der 3'UTR (Ogert et al., 1996; Simpson et al., 1997). Im Mason-Pfizer Monkey Virus (MPMV) und im Simian Retrovirus 1 und 2 (SRV1/2) ist in derselben Region ein konstitutives RNA-Transportelement (CTE) lokalisiert. Wie bei den zellulären mRNAs erfolgt ein TAP/p15-abhängiger RNA-Export, allerdings kann das CTE TAP/p15 direkt ohne den Adapter Aly rekrutieren (Yoon et al., 1997).

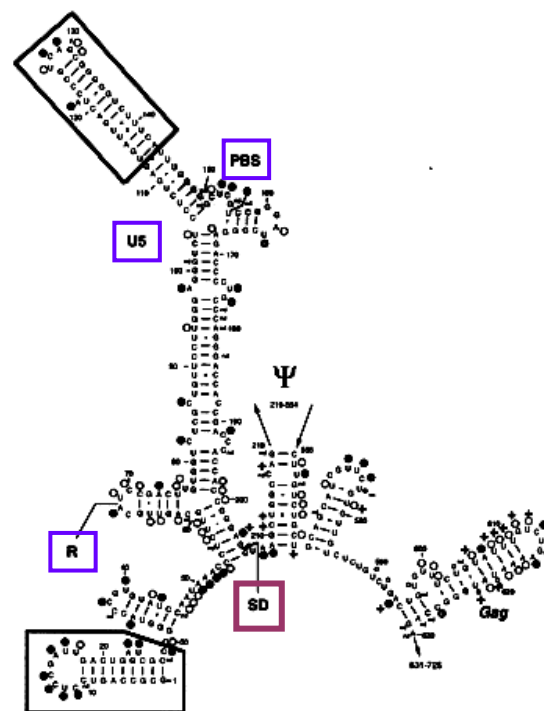
Bei den Mausleukämieviren (MLV) ist bis jetzt nur wenig über den Mechanismus bekannt, wie genomische RNA synthetisiert und in das Zytoplasma transportiert wird. In der für Gag kodierenden Region sind Sequenzen entdeckt worden, von denen eine spleißverstärkend und die andere spleißunterdrückend wirkt (Hoshi et al., 2002). Eine weitere Sequenz in der für Gag kodierenden Region im verlängerten Verpackungssignal scheint als konstitutives Exportelement zu fungieren (King et al., 1998).

Die ersten 28 Basen der R-Region von MLV bilden eine Stammschleifenstruktur (R-region stem loop, RSL). Der RSL scheint wichtig für die Akkumulation ungespleißter RNA im Zytoplasma zu sein (Trubetskoy et al., 1999). Ob dies einer Rolle in der Spleißregulation oder vielmehr in der Exportfunktion zuzuordnen ist, ist noch unbekannt.

Interessant und für die vorliegende Arbeit besonders relevant ist die Beobachtung, dass MLV stromaufwärts des SD, also im untranslatierten ersten Exon, eine ausgeprägte Sekundärstruktur auszubilden vermag. Diese umfasst neben dem vergleichsweise kleinen RSL einen großen Sequenzabschnitt, der die PBS beidseitig flankiert.

Für die hochkonservierte 5'UTR von Moloney MLV (MoMLV) als typischem Vertreter der MLV sind mit Hilfe von experimentellen Daten Konformationen für den monomeren und den dimeren Zustand beschrieben worden (Mougel et al., 1993) (Abb. 5). Die ersten 28 Basen der R-Region (RSL) bilden eine Stammschleife aus. Eine weitere Stammschleife ist am 3'-Ende der U5-Region direkt stromaufwärts der PBS zu finden (Mougel et al., 1993).

Bestimmte Bereiche der U5-Region sind an der Regulation der reversen Transkription und an der Verpackung beteiligt (Lobel und Goff, 1985; Murphy und Goff, 1989). Die konservierte Haarnadelstruktur im 3'U5 ist strukturell und womöglich auch funktionell analog zum von Cobrinik et al. (1991) beschriebenen U5-IR-Stamm des Rous Sarkoma Virus, der ebenfalls wie bei MLV wichtig für die Initiation der reversen Transkription sein soll. Auch in HIV-1 und HIV-2 sind solche Stammschleifenmotive direkt stromaufwärts der PBS beschrieben worden (Baudin et al., 1993; Berkhout und Schoneveld, 1993). Die PBS bildet zusammen mit flankierenden Sequenzen in MLV eine verzweigte Stammschleife aus, bei der 10 von 18 Nukleotiden an der Schleife beteiligt sind (Mougel et al., 1993). Die stromabwärts der PBS gelegene Region liegt gepaart mit Nukleotiden der U5-Region vor. Auch dieser Stamm ist bereits von Cobrinik et al. (1991) im U5-Leader vom RSV beschrieben worden (1991). Er soll an der Initiation der reversen Transkription beteiligt sein.



**Abb. 5: 5'UTR von MoMLV (Mougel et al., 1993)**

Die Region 5' des SD bildet eine konservierte Stammschleifenstruktur aus. Der Stamm wird gebildet von PBS flankierenden Regionen wie der U5-Region und der Region zwischen der PBS und dem SD. Die Schleife wird von der PBS gebildet. Hochkonservierte Sequenzen sind außerdem der RSL sowie die Stammschleife der 3'-U5-Region. Dargestellt ist die dimere Form des 5'UTR von MoMLV, die der monomeren B-Form entspricht.

Experimentelle Daten haben zwei unterschiedliche Varianten der monomeren Form ergeben. Ein Monomer ist in seiner B-Form identisch der Konformation des dimeren Zustands, das andere Monomer hat eine energetisch günstigere E-Form, in der 17 von 18 Basen der PBS gepaart mit der U5-Region vorliegen. Es ist noch nicht geklärt, ob die E-Form tatsächlich biologisch relevant oder ein Artefakt ist.

Für RSV und HIV-1 wurde eine effizientere Translation des Monomers gegenüber dem Dimer festgestellt (Baudin et al., 1993; Bieth et al., 1990; Darlix, 1986). Auch für MoMLV wurde dieser Mechanismus vorgeschlagen und von Mougél et al. (1993) die Hypothese aufgestellt, dass ein Konformationswechsel generell unterschiedliche virale Funktionen beeinflussen kann. Es fällt auf, dass sich der retrovirale SD an der Basis der komplexen Sekundärstruktur befindet und nicht direkt in die benachbarten Stammschleifenstrukturen involviert ist. Eine Beteiligung der Sekundärstruktur am Spleißprozess wurde jedoch noch nicht erwogen.

### 1.2.6 Selbstinaktivierende retrovirale Vektoren (SIN)

Der wesentliche Vorteil retroviraler Vektoren ist eine effiziente, selektive und stabile Transduktion von Zielzellen mit vorhersagbarer Kopienzahl. Bei der Vektorkonstruktion muss darüber hinaus bedacht werden, dass das Transgen in ausreichender Höhe exprimiert werden muss. Ein Faktor, der in der letzten Zeit immer mehr Aufmerksamkeit gefordert hat, ist die Sicherheit des Systems, um Nebeneffekte zu minimieren oder zu vermeiden. Vektoren müssen so konstruiert sein, dass sie replikationsinkompetent sind. Um den Lebenszyklus zumindest für eine Runde zu gewährleisten, müssen bestimmte *cis*-Elemente auf der viralen RNA vorhanden sein. Dazu zählen die terminalen Integrationsstellen der U3- und U5-Region, die R-Region, die PBS, der PP, Promotor- und Enhancersequenzen. Da die kodierenden Regionen für Gag/Pol und Env separat von diesen *cis*-Elementen der RNA angeordnet sind, können sie in MLV-abgeleiteten Vektoren leicht von dem Vektor ausgeschlossen werden und von kotransfizierten Plasmiden in Verpackungszellen exprimiert werden. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit der homologen Rekombination mit verwandten viralen Sequenzen von endogenen Viren in der Verpackungs- oder Zielzelle und damit die Entstehung von möglicherweise neuen replikationskompetenten Viren, die unter Umständen pathogen sind, herabgesetzt (Anderson et al., 1993; Munk et al., 1997) und die Sicherheit des Vektorsystems gesteigert.

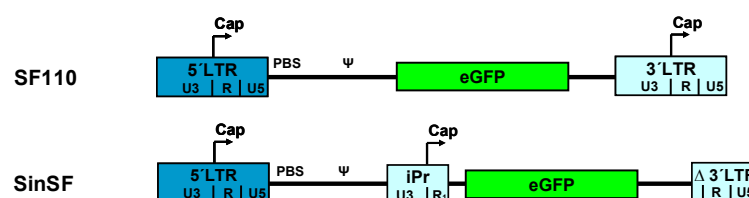
Bei vollständigen LTR-Sequenzen besteht jedoch prinzipiell weiterhin die Gefahr der Mobilisierung durch natürlich vorkommende endogene Viren, die fehlende virale Proteine komplementieren. Die Konstruktion von selbstinaktivierenden (SIN-) Vektoren macht eine

Mobilisierung unmöglich (Abb. 6). In dem Plasmid für den SIN-Vektor werden Promotor- und Enhancersequenzen im U3-Bereich des 3'LTR deletiert, so dass in einem Verpackungssystem die Transkription der genomischen RNA von dem Promotor im 5'LTR möglich ist. Bei der reversen Transkription in der Zielzelle wird ein defekter U3-Bereich in den 5'LTR kopiert, und eine Transkription genomischer RNA ist nicht mehr möglich. Ein interner Promotor sorgt für die Transkription des Transgens (Yu et al., 1986). Die SIN-Konfiguration reduziert somit die Anzahl aktiver Enhancer/Promotorbereiche von zwei in LTR-gesteuerten Vektoren (LTR-Vektor) auf eins in SIN-Vektoren durch den internen Enhancer/Promotor. Stromabwärts gelegene Transkriptionseinheiten können aufgrund der Promotordeletion nicht mehr direkt vom 3'LTR aktiviert werden.

### 1.2.7 RNA-Prozessierung in SIN-Vektoren

Konventionelle SIN-Vektoren auf der Basis von MLV haben sich wegen niedriger infektiöser Titer und oftmals relativ schwacher Genexpression für therapeutische Anwendungen bislang nicht durchsetzen können (Baum et al., 2003).

In Vorarbeiten wurde eine neue Generation von SIN-Vektoren entwickelt. Die vom SFFV stammenden Promotor- und Enhancersequenzen sind im 3'LTR deletiert und stromaufwärts des Transgens als interner Promotor integriert worden (Abb. 6, Abb. 9). Um die Transkriptionsinitiation möglich zu machen, sind zusätzlich die ersten Basen der R-Region im internen Promotor einschließlich des RSL enthalten (Schaumann, Diplomarbeit 2000). Identische Transkriptionskontrollregionen in LTR- und SIN-Vektoren sind eine wichtige Voraussetzung für einen fairen Vergleich der Vektoren hinsichtlich der Regulation und Effizienz ihrer Transgenexpression.



**Abb. 6: LTR- und SIN-Vektor im Vergleich**

Die retroviralen Vektoren mit LTR-Konfiguration (SF110) tragen in der Plasmid-DNA den 5'LTR des MPSV und den 3'LTR des SFFV. Kodierende Sequenzen sind durch jene für das Markergen eGFP ersetzt. Wichtige *cis*-aktive Sequenzen wie die PBS und  $\Psi$  von MLV sind erhalten. Der SIN-Vektor SinSF trägt den internen Promotor von SFFV in konventioneller Position direkt vor dem Markergen. Promotor- und Enhancerbereiche der 3'LTR sind zerstört.

Effiziente Spleißsignale sollten auch bei SIN-Vektoren die Transgenexpression erhöhen. In der Diplomarbeit von Daniel Schaumann (2000) ergaben sich erste Hinweise, dass ein Intron in MLV-SIN-Vektoren eingefügt werden kann, wenn der interne Promotor zwischen die PBS und den SD gesetzt wird. Sofern der retrovirale SA stromaufwärts des Transgens vorhanden war, konnte ein Spleißen der Transgen-RNA nachgewiesen werden. Die so konstruierten Vektoren zeigten einen etwa dreifachen Anstieg der eGFP-Expression, was auf das Spleißen in der 5'UTR zurückgeführt wurde. Allerdings waren die Effizienz und die Präzision des Spleißens in diesen SIN-Vektoren nicht untersucht worden. Zudem wiesen die spleißkompetenten Vektoren suboptimale Titer auf, die einen Gentransfer in primäre Knochenmarkzellen nicht zuließen. Die in Vorarbeiten konstruierten SIN-Vektorkonfigurationen werden im Detail in Material und Methoden besprochen (Kap. 2.3.2, Abb. 9 und Abb. 10).

Neben einem Intron in der 5'UTR ist das posttranskriptionelle regulatorische Element (PRE) des Woodchuck Hepatitisvirus ein weiteres RNA-Prozessierungselement, das die Genexpression von LTR-gesteuerten MLV-Vektoren steigern kann (Schambach et al., 2000; Zufferey et al., 1999). Dieses *cis*-aktive Element entstammt der 3'UTR verschiedener Hepatitisviren. Das PRE des Hepatitis B Virus (HBV) ist wichtig für die Expression des Oberflächenproteins (Huang und Yen, 1994). Der Funktionsmechanismus des PRE ist noch nicht genau bekannt. Es wird vermutet, dass es durch Veränderung der Polyadenylierung, Stabilitätssteigerung der RNA und einen besseren Transport der RNA in das Zytoplasma für eine erhöhte RNA-Konzentration im Zytoplasma sorgt (Donello et al., 1998; Huang et al., 1999; Loeb et al., 1999; Popa et al., 2002).

Das PRE und seine Kombination mit einem Intron sind im Kontext von MLV SIN-Vektoren noch nicht systematisch untersucht worden.

### 1.3 Fragestellung

Die Anwendung gentherapeutischer Behandlungen beim Menschen setzt eine sorgfältige Analyse des Nutzens und des Risikos voraus. Erhöhte Sicherheit ohne Verlust der Effizienz kann nur dann gewährleistet werden, wenn die Mechanismen der Vektor-Wirt-Interaktion sorgfältig analysiert und auf dieser Grundlage optimierte Gentransfersysteme entwickelt werden.

Das erste Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer neuen Generation retroviraler Vektoren, die einen höheren Sicherheitsanspruch haben als die bisher verwendeten, und zugleich eine stabile und hohe Genexpression in den transduzierten Zellen ermöglichen. Um die grundlegende Vektorarchitektur zu verbessern, sollten SIN-Vektoren entwickelt werden, die maßgebliche RNA-Prozessierungselemente wie Intron und PRE in idealer Weise kombinieren. Im direkten Vergleich mit LTR-Vektoren sollten die Expressionseigenschaften in relevanten Zellsystemen, insbesondere zunächst Fibroblasten und murine Knochenmarkzellen untersucht werden.

Traditionelle SIN-Vektoren auf MLV-Basis leiden unter sehr niedrigen Titern. Von großer praktischer Bedeutung war es daher, den Titer dieser Vektoren zu steigern, um damit eine effiziente Transduktion primärer Zellen zu ermöglichen.

Der Schwerpunkt der Arbeit bestand in einer mechanistischen Analyse retroviraler RNA-Prozessierungsmodule. Dabei sollte das untranslatierte erste Exon, das eine stark gefaltete Sekundärstruktur einnimmt, eingehender untersucht werden. Es sollten Sequenzelemente charakterisiert werden, die an der Regulation des Spleißens und an einer effizienten Translation der RNA beteiligt sind. Bislang lag die Hauptaufmerksamkeit bei der Vektorentwicklung auf der Optimierung der Enhancer- und Promotorsequenzen. Die Transkription von Transgenen ist allerdings in hohem Maße differenzierungsabhängig. Vermutlich können die Expressionseigenschaften retroviraler Vektoren unabhängig von der Wahl der Enhancer- und Promotorsequenzen verbessert werden, wenn die Mechanismen der RNA-Prozessierung und insbesondere der Spleißregulation besser verstanden werden. Zugleich sollte eine solche Analyse wichtige Einsichten in die Evolution von Retroviren und die Regulation des retroviralen Lebenszyklus zulassen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Biochrom (Berlin), Biomol (Hamburg), Roche (Mannheim), Difco-Laboratories (Hamburg), Gibco BRL Life Technologies (Eggenstein), Merck (Darmstadt), neoLab (Heidelberg), Pharmacia (Freiburg), Roche (Grenzach-Wyhlen), Serva (Heidelberg) und Sigma (München) bezogen. Es wurden die handelsüblichen Standardqualitäten eingesetzt.

$\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dCTP-markierte Radionukleotide wurden von der Firma Hartmann Analytic (Braunschweig) geliefert.

#### 2.1.1 Mikrobiologie

Zur Transformation und Amplifikation der verwendeten Plasmide wurden die *Escherichia coli* Bakterienstämme XL1 Blue (Stratagene) und XL10-Gold (Stratagene) verwendet. Die Herstellung, Lagerung, Anzucht und Expansion der chemisch kompetenten Bakterienstämme zur Transformation von Plasmiden erfolgte nach den allgemein üblichen Protokollen (Ausubel et al., 2001; Sambrook et al., 1989).

##### Bakterienkulturmedien

Zur Anzucht der Bakterien wurde Luria-Bertani (LB)-Medium verwendet. Das LB-Medium setzt sich zusammen aus 1 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefeextrakt und 0,5 % NaCl, pH 7,4. Bei festen Nährmedien wurde zusätzlich 1,5 % Bacto-Agar zugegeben. Die Medien wurden bei 121°C 20 min autoklaviert und im Falle der festen Nährmedien anschließend ausplattiert.

Zur Selektion transformierter Bakterien wurde Ampicillin aufgrund der Hitzelabilität erst nach Abkühlung auf 50°C in einer Endkonzentration von 100 ng/ml zugesetzt.

#### 2.1.2 Molekularbiologie

##### Enzyme, Puffer und Zusätze

Restriktionsendonukleasen sowie weitere DNA- und RNA-modifizierende Enzyme wurden von den Firmen Boehringer-Mannheim (Mannheim), MBI-Fermentas (St.Leon-Rot), Gibco/Invitrogen (Karlsruhe), Roche Diagnostics (Mannheim), New England

Biolabs (Schwalbach), Stratagene (Heidelberg), Geneo BioProducts GmbH (Hamburg) und Qiagen (Hilden) bezogen. Sie wurden nach Herstellerangaben eingesetzt.

### Plasmide und retrovirale Vektoren

#### **Plasmide**

|       |                                                                                        |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| pUC19 | Klonierungsvektor mit multipler Klonierungsstelle (MCS)                                |
| M57   | Expressionsplasmid für Gag/Pol aus MLV überlassen von Dr. M.-D. von Laer, HPI, Hamburg |
| K73   | Expressionsplasmid für Eco Hüllprotein (Morita et al., 2000)                           |

#### **Retrovirale Vektoren**

|          |                                                                                           |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| SF110    | Retroviraler Vektor unter LTR-Kontrolle (Hildinger et al., 1999)                          |
| SF91     | Retroviraler Vektor unter LTR-Kontrolle mit Intron (Hildinger et al., 1999)               |
| SF91P    | Retroviraler Vektor unter LTR-Kontrolle mit Intron und PRE (Schaumann, Diplomarbeit 2000) |
| SinSF110 | SIN-Vektor (Schaumann, Diplomarbeit 2000)                                                 |
| SinSF91  | SIN-Vektor mit Intron (Schaumann, Diplomarbeit 2000)                                      |

#### **tRNA-Plasmide**

|             |                                                                                                                    |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| tRNA-x2-pro | tRNA-Expressionsplasmid für tRNA <sup>Pro</sup> (Lund et al., 1997) zur Verfügung gestellt von Prof. F.S. Pedersen |
| tRNA-x2-lys | tRNA-Expressionsplasmid für tRNA <sup>Lys</sup> (Lund et al., 1997) zur Verfügung gestellt von Prof. F.S. Pedersen |

### Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von Gibco/Invitrogen Karlsruhe bezogen.

| Name                          | Sequenz (5' nach 3')                       | Reaktion / Vektorkonstrukt                |
|-------------------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------------|
| <u>SF91-Deletionsmutanten</u> |                                            |                                           |
| del3-32 SE                    | ACT CGG GGC GGG TAC CCG TAT TCC CAA TAA AG | überlappende PCR<br>SF91delR <sub>1</sub> |
| del32-3 AN                    | TAC GGG TAC CCG CCC CGA GTG AGG GGT TG     |                                           |
| del32-183 SE                  | AGT CGC CCG GGA CCA CCG ACC CCC CCG CCG    | überlappende PCR<br>SF91del33-182         |
| del183-32 AN                  | GTC GGT GGT CCC GGG CGA CTC AGT CAA TCG    |                                           |
| del32-70 SE                   | AGT CGC CCG GTC CGA ATC GTG GAC TCG CTG    | überlappende PCR<br>SF91delR <sub>2</sub> |
| del70-32 AN                   | ACG ATT CGG ACC GGG CGA CTC AGT CAA TCG    |                                           |
| del163-183 SE                 | CCA CCG AGA TGA CCA CCG ACC CCC CCG CCG    | überlappende PCR<br>SF91del164-182        |
| del183-163 AN                 | GTC GGT GGT CAT CTC GGT GGA ACC TCC        |                                           |

| Name                           | Sequenz (5' nach 3')                                           | Reaktion / Vektorkonstrukt               |
|--------------------------------|----------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| del145-183 SE                  | GTC TTT CAT TGA CCA CCG ACC CCC CCG CCG                        | überlappende PCR<br>SF91delPBS-182       |
| del183-145 AN                  | GTC GGT GGT CAA TGA AAG ACC CCC GAG GTG                        |                                          |
| del182-202 SE                  | CCT GCC CAG GGG GAG GTA AGC TGG CCA G                          | überlappende PCR<br>SF91del183-201       |
| del202-182 AN                  | CTT ACC TCC CCC TGG GCA GGG GTC TCC                            |                                          |
| del69-146 SE                   | TGG AGG TTC CAC CGA G                                          | PCR<br>SF91delU5                         |
| del146-69 AN                   | TGC AAA CAG CAA GAG GC                                         |                                          |
| del145-164 SE                  | TTG GAG ACC CCT GCC CAG                                        | PCR<br>SF91delPBS                        |
| del164-145 AN                  | AAT GAA AGA CCC CCG AGG                                        |                                          |
| <u>SF91 antisense-Mutanten</u> |                                                                |                                          |
| as146-163 SE                   | ATC TCG GTG GAA CCT CCA TTG GAG ACC CCT GCC                    | überlappende PCR<br>SF91asPBS            |
| as163-146 AN                   | TGG AGG TTC CAC CGA GAT AAT GAA AGA CCC CCG                    |                                          |
| as164-182 SE                   | CCT GGG CAG GGG TCT CCA AGA CCA CCG ACC CCC                    | überlappende PCR<br>SF91as164-182        |
| as182-164 AN                   | TTG GAG ACC CCT GCC CAG GAT CTC GGT CCA ACC                    |                                          |
| <u>SF91 PBS-Mutanten</u>       |                                                                |                                          |
| mlvPBS SE                      | CAT TTG GGG GCT CGT CCG GGA TTT GGA GAC CCC TG                 | überlappende PCR<br>SF91mlvPBS           |
| mlvPBS AN                      | CCA AAT CCC GGA CGA GCC CCC AAA TGA AAG ACC CC                 |                                          |
| mlvPBSdel163-183 SE            | GGG GGC TCG TCC GGG ATG ACC ACC GAC CCC CCC G                  | überlappende PCR<br>SF91mlvPBSdel164-182 |
| mlvPBSdel183-163 AN            | CAT CCC GGA CGA GCC CCC AAA TGA AAG ACC C                      |                                          |
| artPBS SE                      | TGG TCA GCT GCA GGG GAT TTG GAG ACC CCT GCC CAG GGA C          | überlappende PCR<br>SF91artPBS           |
| artPBS AN                      | ATC CCC TGC AGC TGA CCA AAT GAA AGA CCC CCG AGG TGG            |                                          |
| <u>weitere Primer</u>          |                                                                |                                          |
| -188 SE                        | CAG ATG GTC CCC AGA TGC                                        | PCR,<br>Sequenzierung                    |
| 180 AN                         | AGG GAC CAC CGA CCC CC                                         | PCR,<br>Sequenzierung                    |
| eGFPprev                       | ACG CTG AAC TTG TGG CCG                                        | PCR,<br>Sequenzierung                    |
| SD1-5'                         | CCG TAT TCC CAA TAA AGC CT                                     | RT-PCR,<br>Sequenzierung                 |
| SA-ANTI                        | CAT GGC CTG TAA GTG AGC TTG GAG AGA GGG ACT ATT AGT TAA CTA TG | RT-PCR,<br>Sequenzierung                 |

Tab. 1: Oligonukleotide

### 2.1.3 Zellkultur

#### Zelllinien

Es handelt sich bei allen Zelllinien um adhärent wachsende Zellen.

| Zelllinie | Medium | Herkunft                                                                                                                                                            |
|-----------|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SC1       | MEM    | murine Fibroblastenzelllinie (ATCC Nr. CRL-1404)                                                                                                                    |
| 293T      | DMEM   | 293 ist eine humane Epithelialzelllinie aus der Niere (ATCC Nr. CRL-1573), 293T ist transformiert durch Adenovirus E1a und trägt ein temperatursensitives T-Antigen |
| Phönix-gp | DMEM   | retrovirale Verpackungszelllinie, Derivat der humanen embryonalen Nierenzelllinie 293T; Phönix-gp trägt stabil den Vektor für die Expression von gag/pol            |

**Tab. 2: Zelllinien, benutzte Medien und Herkunft**

#### Zellkulturmedien

Die Zellkulturmedien wurden mit fötalem Kälberserum (FCS; Sigma, München) versetzt. Zur Inaktivierung der enthaltenen Komponenten des Komplementsystems, wurde das FCS 30 min bei 56°C erwärmt.

#### *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)*

DMEM (Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein) wurde für die Kultivierung von Phönix gp verwendet und vor Gebrauch mit 10 % FCS, 2 mM Glutamin und 1 mM Natriumpyruvat versetzt. Der pH wurde zuvor mit NaHCO<sub>3</sub> auf pH 7,7 eingestellt.

#### *Minimal Essential Medium (MEM)*

MEM (Sigma Cell Culture<sup>TM</sup>, München) wurde für die Kultivierung von SC1 eingesetzt und vor Gebrauch mit 10 % FCS, 2 mM Glutamin und 1 mM Natriumpyruvat supplementiert.

#### *Einfriermedium*

Die Zelllinien wurden mit 90 % FCS und 10 % DMSO langsam über Nacht auf -70°C abgekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff verwahrt.

#### *Iscoe's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)*

IMDM (Flow Laboratories, Meckenheim) wurde mit 10 % FCS für die Verwahrung von Knochenmarkzellen während der Aufreinigung und mit 2 % FCS als Waschlösung für die

Säule bei der „Liniendepletion“ verwendet. Die Knochenmarkzellen wurden generell in Gegenwart von Antibiotika (1 % Penicillin/Streptomycin, Pen/Strep) kultiviert.

Für die *in-vitro*-Kultur von aufgereinigten Knochenmarkzellen wurde IMDM mit 20 % FCS mit den Zytokinen mSCF (50 ng/ml), hFLT-3 (100 ng/ml), hIL-11 (100 ng/ml) und mIL3 (20 ng/ml) (PeproTech, NJ und CellSystems, St.Katherinen) eingesetzt.

#### Weitere Materialien der Zellkultur

Bei der Aufreinigung von Knochenmarkzellen wurde das Liniendepletionskit (lineage depletion kit, BD Pharmingen, Heidelberg; Komposition siehe Kap. 2.2.3.2) und zur Infektion dieser Zellen Retronektin (rekombinantes Fibronectinfragment CH-296, TAKARA, Cambrex BioScience, Verviers, Belgien) verwendet. Die in der FACS-Analyse eingesetzten Antikörper wurden von BD Pharmingen, Heidelberg bezogen.

#### **2.1.4 Mäusstämme**

Für die Gewinnung von primären Zellen wurde das Knochenmark von C57BL/6J-Lyt5.2 Mäusen präpariert (Jackson Laboratory, Bar Harbor; ME, USA).

## **2.2 Methoden**

Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden wurden wie beschrieben durchgeführt (Ausubel et al., 2001; Sambrook et al., 1989). Abweichende Methoden werden im Folgenden aufgeführt.

### **2.2.1 Mikrobiologische Methoden**

#### Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Zur Aufnahme von Plasmid-DNA (Transformation) müssen Bakterienstämme zuvor kompetent gemacht werden. In dieser Arbeit wurden ausschließlich chemisch kompetente *E. coli* Bakterienstämme verwendet. Am Vortag in 10 ml LB-Medium angeimpfte Bakterienkulturen wurden am Morgen in 200 ml LB-Medium überführt. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,4 bis 0,5 wurden die Bakterien geerntet und abzentrifugiert (4°C, 1600 g, 10 min). Das Pellet wurde zweimal vorsichtig in 50 ml eiskalter CaCl<sub>2</sub>-Lösung (60mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM PIPES pH7) resuspendiert und nach dem letzten Zentrifugationsschritt in 7,5 ml CaCl<sub>2</sub>-Glycerin-Lösung (60mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM PIPES pH7, 15 % Glycerin) aufgenommen. 100 µl-

Aliquots wurden in vorgekühlte Eppendorfgefäße gegeben und auf flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Zellen wurden bei -70°C aufbewahrt.

### Transformation

Zur Transformation von chemisch kompetenten Bakterien wurden diese auf Eis langsam aufgetaut, 8 bis 10 µl Ligationsansatz zugegeben und weitere 20 min bei 4°C inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock im Wasserbad bei 42°C für 90 sec. Nach weiterer Inkubation für 2 min auf Eis wurden die Bakterien in 300 µl LB-Medium aufgenommen und 1 h bei 37°C geschüttelt (200 rpm). Anschließend wurde die Suspension auf LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C stehen gelassen. Wurden die Bakterien mit einem Plasmid transformiert, das für eine Ampicillin-Resistenz kodierte, wurden LB-Platten mit Ampicillin benutzt. Am nächsten Tag konnten Bakterienkolonien gepickt und einer Analyse unterzogen werden.

## **2.2.2 Molekularbiologische Methoden**

### 2.2.2.1 Arbeiten mit DNA

#### Präparation von Plasmid-DNA

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979; Ish-Horowicz und Burke, 1981) verfahren. Je nach benötigter Plasmidmenge wurde im „Mini-“, „Midi-“ oder „Maximaßstab“ gearbeitet.

Für die Minipräparation wurden 3 ml LB-Kulturmedium mit Ampicillin mit einer plasmidtragenden Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Die DNA-Präparation erfolgte nach Standardprotokoll. Nach Zentrifugation wurde das Bakterienpellet in 150 µl Resuspensionspuffer (50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM TrisHCl pH 8) suspendiert, mit 300 µl Lysispuffer (0,2 N NaOH, 1 % SDS) versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Fällung genomischer DNA und Proteinen mit 225 µl Ausfällungspuffer (5 M Essigsäure, 3 M Kaliumacetat) für 10 min bei 4°C und anschließender Zentrifugation wurde der Plasmid-DNA enthaltende Überstand mit 300 µl Isopropanol gefällt. Die DNA wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und das Pellet in 30 µl 1x TE-Puffer mit 20 µg/ml DNase-freier RNase A gelöst. Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des Restriktionsverdaus mit anschließender Gelelektrophorese charakterisiert. Alternativ wurden 8 µl gelöste Plasmid-DNA direkt in die Sequenzierungsreaktion eingesetzt.

Für die Midi- bzw. Maxipräparation wurden ca. 100 µl positiver Bakterienkoloniekulturen in 100 ml bzw. 200 ml LB-Kulturmedium angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Midi- und Maxipräparation erfolgte mit dem „Midi/Maxi Plasmid Purification Kit“ (Qiagen, Hilden). Die Konzentration der in 100 – 250 µl TE-Puffer resuspendierten DNA wurde photometrisch bestimmt. Die isolierte und aufgereinigte Plasmid-DNA wurde durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung überprüft.

### Alkoholpräzipitation von DNA

DNA-Lösungen wurden zur Aufreinigung und zur Konzentrierung gefällt. Dazu wurde die DNA-Lösung mit dem 0,4-fachen Volumen 3 M NaAcetat-Lösung und dem 2,5-fachen Volumen 100 % EtOH versetzt. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurde die DNA mit Hilfe der Zentrifugation pelletiert und das Pellet in 70 % EtOH gewaschen. Die Resuspension erfolgte mit H<sub>2</sub>O oder TE-Puffer.

### Isolierung von DNA-Fragmenten

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten nach PCR oder Restriktionsverdau von Plasmiden wurde die präparative Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Abhängig von der erwarteten Fragmentgröße wurde mit 0,8 bis 2 % -igen TAE-Agarosegelen gearbeitet. Durch Ethidiumbromidfärbung wurden die DNA-Banden auf einem UV-Transilluminator (Ti2, Biometra, Göttingen) sichtbar gemacht und das gewünschte DNA-Fragment durch Vergleich mit einem DNA-Standard (Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder, MBI Fermentas, St. Leon-Rot) mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Aufreinigung des DNA-Fragments aus dem Agarosestück erfolgte mit „Qiaquick“-Säulchen (Qiagen, Hilden).

Die DNA-Fragmente wurden in Ligationsreaktionen oder als Sonden im Northern- und Southernblot eingesetzt.

### Restriktionsverdau

Je nach Verwendung wurden 0,5 – 3 µg Plasmid-DNA oder PCR-Produkte in einem Endvolumen von 20 µl mit 1 µl des ausgewählten Restriktionsenzym und dem von der Firma empfohlenen Puffer (1 h, 37°C) gespalten. Die DNA-Fragmente wurden nach Gelaufreinigung direkt verwendet oder zuvor weiteren enzymatischen Reaktionen unterzogen. Vektor-DNA, die bei zukünftigen Klonierungen das Vektorrückgrat darstellte, wurde an den Enden dephosphoryliert. DNA-Fragmente, die als Inserts in Klonierungen dienten, wurden zum Teil phosphoryliert.

### Partieller Verdau

Bei einem partiellen Verdau soll bei mehreren möglichen Schnittstellen die DNA nicht vollständig geschnitten werden. Erreicht wird dies durch zeitliche oder enzymatische Limitierung der Reaktion. Zur Generierung der retroviralen Vektoren SinSF91P1 und SinSF91P2 musste in dieser Arbeit das Plasmid SinSF91 partiell mit dem Restriktionsenzym EcoR1 verdaut werden. Es wurde mit Enzymmengen von 10 U, 3 U und 1 U bei einer Inkubationszeit von 10 min gearbeitet. Der Verdau wurde sofort bei 70°C für 10 min hitzeinaktiviert oder direkt in einem Agarosegel aufgetrennt.

Nach Restriktionsverdau von SF91P mit EcoRI und Aufreinigung des PRE-Fragments wurde das PRE als Insert in den partiell verdauten Vektor SinSF91 an zwei verschiedene Positionen in einer Ligationsreaktion eingebracht. Die Orientierung des Inserts wurde in einem Kontrollrestriktionsverdau und in einer Sequenzierungsreaktion überprüft.

Es entstanden folgende Plasmide für spätere retrovirale Vektoren:

|           |                                                                                                |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SinSF91P1 | von SinSF91 abgeleiteter Vektor mit PRE zwischen der kodierenden Region für eGFP und dem 3'LTR |
| SinSF91P2 | von SinSF91 abgeleiteter Vektor mit PRE stromabwärts der kodierenden Region für eGFP im 3'LTR  |

### Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde von Kleppe (Kleppe et al., 1971) beschrieben, von Mullis und Mitarbeitern (Saiki et al., 1986) weiterentwickelt und dient als Methode zur Amplifikation eines bestimmten DNA-Abschnittes, der zwischen zwei gewählten Oligonukleotidprimern liegt, die gegenläufig komplementäre DNA-Bereiche binden. Die PCR-Methode erfolgte in dieser Arbeit zur Amplifizierung von DNA-Abschnitten für die Klonierung neuer retroviraler Vektorabschnitte, zur Mutagenese bzw. Deletion von bestimmten DNA-Abschnitten, indem gezielt Basen in der Primerregion ausgetauscht wurden, zum Screening von Bakterienkolonien und zum Nachweis von mRNA nach Umschreibung der zellulären mRNA in cDNA (RT-PCR).

Es wurden zwischen 0,1 und 0,3 µg DNA mit 30 pmol der erforderlichen Primer, 1 x PCR-Puffer, 0,3 mM dNTPs und 5 U Polymerase versetzt. Aufgrund seiner „Proofreading“-Aktivität wurde der Taq-Polymerase ein Zehntel Enzymvolumen der ebenfalls hitzestabilen DNA-Polymerase Pfx zugesetzt. Grundsätzlich wurden die PCR-Reaktionen in 25 bis 35 Zyklen mit je 30 sec DNA-Doppelstrangtrennung bei 95°C, 15 sec Hybridisierung der

Primer (Annealing) bei 56°C und Amplifikation je nach Fragmentgröße für 45 bis 90 sec bei 68°C durchgeführt.

Für die meisten Anwendungen wurde direkt der „T3 Thermocycler“ (Biometra, Göttingen) benutzt. Bei Problemen mit der Anreicherung eines spezifischen PCR-Produktes wurde zuvor mit dem „Mastercycler gradient“ (Firma Eppendorf, Hamburg) die optimale Hybridisierungstemperatur bestimmt.

### Überlappende PCR

Die Technik der überlappenden PCR besteht aus insgesamt drei PCR-Reaktionen. Die ersten beiden Reaktionen laufen getrennt ab. Dabei beinhaltet das erste PCR-Fragment am 3'-Ende die zu verändernde oder zu deletierende Region in ihrem 3'-Primer, das zweite PCR-Fragment umgekehrt am 5'-Ende die zu verändernde oder zu deletierende Region in ihrem 5'-Primer. Außerdem sind diese beiden Primer gegeneinander komplementär. Nach der getrennten Synthese dieser ersten beiden PCR-Produkte werden beide über die Gelelektrophorese aufgereinigt und in einer dritten PCR-Reaktion gegenseitig als Template und, da sie in der Mitte überlappen, als Primer eingesetzt. Die ersten beiden Zyklen der PCR dienen zur Auffüllung des Templates, danach werden die beiden äußeren Primer, der 5'-Primer des ersten PCR-Produktes und der 3'-Primer des zweiten PCR-Produktes, zugegeben und die PCR-Reaktion vollständig durchgeführt. Als äußerer 5'-Primer diene in allen Reaktionen der Primer -188 SE, als äußerer 3'-Primer der Primer eGFP<sub>Prev</sub> (Tab. 1).

Die überlappende PCR wurde in dieser Arbeit zur Klonierung der meisten Deletions- und Antisensemутanten des SF91 retroviralen Vektors, außerdem der Herstellung des SF91-Vektors mit MLV- bzw. artifizieller PBS genutzt. Die Produkte konnten über einen Verdau mit den Restriktionsenzymen ApaI und XbaI in den ebenso verdauten Vektor SF91 einkloniert werden.

Auf diese Weise entstanden folgende Plasmide (angegebene Basen beziehen sich immer auf den Transkriptionsstartpunkt):

|                       |                                                           |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------|
| SF91delR <sub>1</sub> | Deletion des RSL (der ersten Hälfte der R-Region) in SF91 |
| SF91del33-182         | Deletion der Basen 33-182 in Anlehnung an den SIN-Vektor  |
| SF91R <sub>2</sub>    | Deletion der zweiten Hälfte der R-Region in SF91          |
| SF91asPBS             | Antisense-Orientierung der PBS                            |
| SF91del164-182        | Deletion der Basen 164-182 in SF91                        |
| SF91as164-182         | Antisense-Orientierung der Basen 164-182 in SF91          |
| SF91delPBS-182        | Deletion der Basen 146-182 in SF91                        |

|                      |                                                                                           |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| SF91del183-201       | Deletion der Basen 183-201 in SF91                                                        |
| SF91artPBS           | Austausch der MESV-PBS in eine künstliche PBS                                             |
| SF91mlvPBS           | Austausch der MESV-PBS in die MLV-PBS                                                     |
| SF91mlvPBSdel164-182 | Austausch der MESV-PBS in die MLV-PBS mit zusätzlicher Deletion der Basen 164-182 in SF91 |

#### Dephosphorylierung des Vektorrückgrats

Um bei Ligationsreaktionen die Selbstligation des Vektorrückgrats zu unterbinden, wurden die 5' Phosphate entfernt. Dazu wurde der zuvor durchgeführte Restriktionsverdau direkt mit 2 µl Alkalischer Phosphatase und 2 µl entsprechendem Puffer versetzt und das Reaktionsgemisch für 1 h bei 37°C inkubiert. Es folgte eine DNA-Präzipitation zur Aufreinigung.

#### Polynukleotidkinase-Reaktion

Um die Ligation von PCR-Produkten in ein Vektorrückgrat zu ermöglichen, wurden die 5'-Enden der DNA-Fragmente mit Hilfe der Polynukleotidkinase (PNK) des Bakteriophagen T4 (MBI, Fermentas) phosphoryliert. In einem Gesamtvolumen von 50 µl wurde das PCR-Fragment mit dem zugehörigen Puffer (5 µl), ATP (10 mM) und der PNK (10 U) für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Aufreinigung fand mit Hilfe der Gelelektrophorese oder durch Alkoholpräzipitation statt.

#### Ligation

Bei Standardligationsreaktionen wird meist ein kleineres Insert in ein Vektorrückgrat gebracht. Das molare Verhältnis von Insert zu Vektor sollte etwa 3:1 betragen. Bei den Ligationsreaktionen wurden etwa 100 ng geschnittene dephosphorylierte Vektor-DNA mit dem 3-fachen molaren Überschuss an Insert-DNA in einem Endvolumen von 20 µl zusammen mit Ligationspuffer und T4-DNA-Ligase (2 U) über Nacht bei 16°C inkubiert. Als Kontrolle erfolgte ein Ansatz ohne Insert-DNA.

#### 3-Fragment-Ligation

Einige Deletionsmutanten wurden über eine 3-Fragment-Ligation kloniert, indem zwei Inserts gleichzeitig in ein Vektorrückgrat kloniert wurden. Die beiden Insertfragmente lagen 3' bzw. 5' der geplanten Deletion und waren zuvor in einer PCR-Reaktion erzeugt worden. Die Ligation der Inserts miteinander erfolgte „blunt“ (ohne Basenüberhang), die

jeweils anderen Enden der Fragmente wurden nach einem Verdau mit den Restriktionsenzymen ApaI bzw. XbaI in den ebenso verdauten Vektor SF91 gleichzeitig inkloniert. Es wurde mit einem molaren Verhältnis von Insert I zu Insert II zu Vektorrückgrat von 6:6:1 gearbeitet. Die Ligationenreaktion erfolgte im Übrigen entsprechend der einfachen Ligation.

Mit dieser Methode wurden folgende Plasmide für spätere retrovirale Vektoren hergestellt:

SF91delU5                      Deletion der U5-Region in SF91

SF91delPBS                    Deletion der PBS in SF91

### Sequenzierung

Bei Ligationen und PCR-Produkten wurden die korrekten Basenfolgen der veränderten oder amplifizierten DNA-Abschnitte mit Hilfe der DNA-Sequenzierung nach einem modifizierten Verfahren der Methode nach Sanger (Sanger et al., 1977) durchgeführt. Es handelt sich hier um die Dideoxy-Kettenabbruch-Methode, bei der fluoreszenzmarkierte Nukleotide in einer Cycle-Sequencing-Reaktion eingesetzt werden. Der bei 4°C hergestellte Reaktionsansatz enthält ca. 400 – 800 ng DNA, 4 µl BigDye (Applied Biosystems, Weiterstadt), 1,5 µl Primer (15 pmol/µl) ad 20 µl mit aqua dest. Die Reaktion erfolgte im Thermoblock (Biometra, Göttingen):

|    |      |        |                                                                                     |     |
|----|------|--------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1. | 96°C | 1 min  |  | 25x |
| 2. | 96°C | 30 sec |                                                                                     |     |
| 3. | 50°C | 15 sec |                                                                                     |     |
| 4. | 60°C | 4 min  |                                                                                     |     |
| 5. | 4°C  | Pause  |                                                                                     |     |

Die DNA wurde gefällt und zur gelelektrophoretischen Analyse in das Sequenzierungsservicelabor des „Instituts für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie“, UKE, Hamburg gegeben.

### Isolierung von genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen

Um die Unversehrtheit der proviralen Sequenzen nach Integration in das Wirtsgenom überprüfen zu können, wurde die genomische DNA aus transduzierten Knochenmarkzellen isoliert. Es wurde mit Zellzahlen von  $3 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen gearbeitet. Die DNA wurde mit Hilfe des „DNAzol® Genomic DNA Isolation Reagent“ (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, USA) mit 1 ml DNAzol pro  $1 \times 10^7$  Knochenmarkzellen nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die DNA wurde in 200 µl 1 x TE über Nacht gelöst und im Photometer die Konzentration bestimmt.

#### 2.2.2.2 Arbeiten mit RNA

Bei Umgang mit RNA wurde generell soweit möglich bei 4°C gearbeitet. Arbeitsflächen, und Geräte wurden mit SDS gereinigt, es wurden nur RNase-freie Pipettenspitzen benutzt. Sämtliche Arbeiten wurden mit Handschuhen durchgeführt. Lösungen wurden mit Diethylenpyrocarbonat (DEPC) vorbehandelt. Dazu wurden Lösungen mit 0,1 % DEPC versetzt, über Nacht gerührt und am nächsten Tag autoklaviert.

##### Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen

Zur Präparation von Gesamt-RNA wurden eukaryontische Zellen aus der Zellkultur herangezogen. Adhärenente SC1-Zellen wurden kurz durch Trypsin/EDTA gelöst, sofort mit eiskaltem PBS gewaschen, gezählt und  $8 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen für die RNA-Präparation mit dem Reagenz RNA-Instapure (Eurogentec, Seraing, Belgien) eingesetzt. Das RNA-Pellet wurde in 50 µl 1 mM DEPC-TE-Puffer resuspendiert.

Die Konzentration wurde im Photometer bei 260 nm bestimmt. Dabei sollte der Quotient der Werte bei 260 nm/280 nm bei 1,9 – 2,1 liegen. Zusätzlich wurden 2 µl der RNA-Präparation gelelektrophoretisch in einem 1,2 % -igen TBE-Agarosegel auf die Qualität überprüft. Die RNA wurde aliquotiert bei -70°C verwahrt und im Northernblot und in der RT-PCR eingesetzt.

##### Alkoholpräzipitation von RNA

RNA wurde durch die Zugabe des 0,5-fachen Volumens von 7,5 M  $\text{NH}_4\text{Ac}$  und des 2,5-fachen Volumens von EtOH gefällt. Nach Inkubation von 15 min auf Trockeneis und anschließender Zentrifugation (15 min, 4°C, 13000rpm) wurde das Pellet mit 70 % EtOH gewaschen, getrocknet und in 1 mM EDTA aufgenommen. Um das Pellet zu lösen, konnte es 10 min bei 70°C erhitzt werden.

##### Fraktionierung von nukleärer und zytoplasmatischer RNA

SC1- und 293T-Zellen wurden wie im vorigen Absatz beschrieben vorbereitet. Vor der Zugabe von RNA-Instapure zu  $8 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen wurde die Trennung zwischen Kern und Zytoplasma vorgenommen. Dazu wurden die Zellpellets auf Eis in 500 µl Lysispuffer (0,5 % NP-40, 0,14 M NaCl, 10 mM Tris (pH 8,4), 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM EDTA (pH 8,0)) sanft resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation (470 g, 5 min, 4°C), der Überstand als Zytoplasmafraktion I wurde in ein frisches 2 ml Gefäß überführt und das Pellet noch zweimal mit 300 µl Lysispuffer

gewaschen und zentrifugiert. Die Überstände wurden als Zytoplasmafraktion II und III in einem frischen 2 ml Gefäß vereinigt. Das Pellet entsprach der Kernfraktion. Alle Fraktionen wurden mit 1 ml RNA-Inspure aufgearbeitet. RNA der Zytoplasma I Fraktion wurde in 40 µl, die beiden anderen Fraktionen in 30 µl resuspendiert. Die Qualitätskontrolle erfolgte im Photometer und gelelektrophoretisch.

### RT-PCR

Zur Erststrangsynthese der cDNA aus RNA-Inspure aufgereinigter RNA wurde 1 µg RNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 1 µl 10 mM DTT, 1 µl 10 mM dNTP, 1 µg OligodT und 1 µl Reverser Transkriptase (Geneo BioProducts GmbH, Hamburg) für eine Stunde bei 39°C inkubiert. Die Reaktion wurde 10 min bei 70°C hitzeinaktiviert. Im Falle, dass eine Verunreinigung der RNA mit DNA die PCR beeinflusst, wurde die RNA mit Hilfe von RNeasy Säulen und einer DNase-Behandlung (Qiagen, Hilden) nach Herstellerprotokoll zuvor gereinigt.

Der cDNA-Strang diente als Template für eine PCR. Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die einzelnen Banden sequenziert.

#### 2.2.2.3 Nachweis von RNA und DNA im Blotverfahren

### Northernblot

Im Northernblot wurden variierend zwischen 2 µg und 15 µg RNA je Bahn eingesetzt. Als Größenstandard diente ein radioaktiv markierter λ/HindIII DNA-Marker. Die RNA wurde vorbereitet indem zu 10 µl RNA-Volumen 16,2 µl DMSO, 1,6 µl 20 x MOPS und 4,6 µl deionisiertes Glyoxal zugegeben wurden und die Proben 60 min bei 50°C denaturiert wurden. Mit dem radioaktiv markierten DNA-Marker wurde in entsprechender Weise verfahren. Nach kurzem Abkühlen der Proben auf Eis wurden 3,2 µl 10 x RNA-Beladungspuffer (50 % Glycerol, 1 mM EDTA, 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylene Cyanol FF) zugegeben. Ein vorbereitetes 1,2 % -iges Agarosegel mit 1 % MOPS konnte mit den Proben beladen werden. Bei der Vorbereitung des Gels war darauf zu achten, dass MOPS erst nach Abkühlung der in DEPC-H<sub>2</sub>O aufgekochten Agarose unter 50°C zugegeben werden darf. Das Gel sollte mindestens 30 min abkühlen.

Die Elektrophorese wurde 10 min bei 70 V, anschließend über Nacht (10 bis 14 Stunden) bei 30 V durchgeführt (Laufpuffer: 1 x MOPS). Um ein pH-Gefälle zu vermeiden wurde zum Pufferaustausch eine Umwälzpumpe angeschlossen.

Nach beendetem Gellauf wurde die RNA wiederum über Nacht durch einen Kapillarblot mit 20 x SSC auf eine Nylonmembran (Biodyne B Transfer Membran, PALL Europe Limiten, Portsmouth, UK) transferiert und anschließend zweimal mit je 120 mJ im UV-Stratalinker<sup>TM</sup> 1800 (Stratagene) vernetzt.

#### Radioaktive Markierung eines DNA-Markers

Sowohl für den Northern- als auch für den Southernblot wurde als Größenstandard ein radioaktiv markierter DNA-Marker hergestellt. Dazu wurden 1,2 µg mit dem Restriktionsenzym HindIII verdaute λ-DNA mit 30 µCi (~1,1 MBq) α-[<sup>32</sup>P]-dCTP (spezifische Radioaktivität: 3000 Ci/mmol bzw. 110 TBq/mmol) versetzt und mit Hilfe der 3' exonukleasedefizienten Mutante des Klenowfragments der DNA-Polymerase I und 2 µl 2 mM ATP/GTP/TTP-Mix im entsprechenden Puffer für 20 min bei Raumtemperatur radioaktiv markiert. Nicht eingebaute Aktivität wurde über Affinitätschromatographie-Säulchen (MobiSpin, MobiTaq, Göttingen) entfernt. Die Aktivität der markierten DNA wurde im Szintillationsmessgerät (Beckman) bestimmt. Im Northernblot wurden zwei verschiedene Aktivitäten von 5 x 10<sup>4</sup> und 1 x 10<sup>5</sup> cpm, im Southernblot von 1 x 10<sup>4</sup> und 2 x 10<sup>4</sup> cpm verwendet.

#### Radioaktive Markierung einer DNA-Sonde

Zum Nachweis spezifischer Banden in einem Northern- oder Southernblot wurden DNA-Sonden mit dem DecaLabel<sup>TM</sup> DNA Labeling Kit (Stratagene) radioaktiv markiert. Dazu wurden in der Markierungsreaktion 25 bis 40 ng DNA eingesetzt und nach Herstellerangaben weiter verfahren. Nicht eingebaute Aktivität wurde über Affinitätschromatographie-Säulchen entfernt und die Aktivität im Szintillator bestimmt. Es wurde mit einer Aktivität von 0,5 x 10<sup>5</sup> bis 2 x 10<sup>6</sup> cpm/ml hybridisiert.

Die DNA für die Sonden gegen die RNA von eGFP, beta-Aktin, GAPDH und Cytochrom C wurden aus Plasmiden in einem Restriktionsverdau gewonnen (eGFP: SF91P mit EcoRI; pAktin: als cDNA erhalten von Dr. J. Friel; GAPDH: pGAP ,zur Verfügung gestellt von Prof. K. Harbers, mit EcoRI; Cytochrom C: pT7CytCO<sub>II</sub>, Cytochrom C Oxidase II, zur Verfügung gestellt von Dr. J. Bohne, mit EcoRI/XhoI).

Im Gegensatz zu den DNA-Sonden handelt es sich bei der Sonde gegen ein Intron der Glycerinphosphat-Dehydrogenase (GAPDH) um eine RNA-Sonde, die freundlicherweise von Dr. T. Heise zur Verfügung gestellt wurde. Diese wurde nach der Insertion der Intronsequenz in einen Transkriptionsvektor in einer *in-vitro*-Transkription radioaktiv markiert.

### Hybridisierung der Northernblot-Membranen

Die Membran wurde in ein Inkubationsröhrchen überführt, es wurden 10 ml auf 50°C erwärmter Prähybridisierungspuffer (47 % deion. Formamid, 5,7 x SSC, 0,48 % SDS, 2,35 x Denhardt-Lösung, 7,5 % Dextransulfat, 0,5 – 1 mg denaturierte mit Ultraschall behandelte Lachssperma-DNA) zugegeben, so dass die Membran luftblasenfrei an der Röhrchenwand anlag, und das Röhrchen mindestens eine Stunde in einem 42°C warmen rotierenden Ofen inkubiert.

Anschließend wurde die 5 min auf 95°C denaturierte DNA Sonde zugegeben und die Membran über Nacht hybridisiert. Zunächst wurde bei allen Blots mit einer radioaktiv markierten Sonde gegen eGFP gearbeitet.

Um überschüssige und nicht spezifisch gebundene Sonden zu entfernen, wurde die Membran zweimal für 5 min bei Raumtemperatur in 2 x SSC, eine Stunde in 1 x SSC/0,1 % SDS und zweimal eine Stunde in 0,1 x SSC/0,1 % SDS in einer Schale bei 65°C gewaschen. Die gewaschene Membran wurde kurz getrocknet, in eine Folie eingeschweißt und zur Exposition auf einen Röntgenfilm (Kodak X-omat-AR) in einer Filmkassette mit Verstärkerfolie (Firma Kostix) in einer Truhe bei -70°C bis zur Entwicklung verwahrt. Außerdem wurden die Banden im Phosphoimager (Fuji, Düsseldorf) quantifiziert.

Als Kontrollen wurden die Blots mit weiteren Sonden hybridisiert. Die Sonden waren gegen die RNA unterschiedlicher Größe gerichtet. Deshalb wurden bei den schon hybridisierten Blots ein bis zwei Halbwertszeiten abgewartet und anschließend mit der nächsten Sonde in gleicher Weise verfahren.

### Southernblot

Bei der Southernblot-Methode (Southern, 1975) wird genomische DNA zunächst durch ein Restriktionsenzym gespalten, gelelektrophoretisch aufgetrennt, um anschließend auf eine Membran transferiert und dort fixiert zu werden.

In dieser Arbeit wurden je Probe 10 µg DNA in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit dem Restriktionsenzym KpnI und dem entsprechenden Puffer für 10 Stunden bei 37°C verdaut. Die DNA-Fragmente wurden über Nacht gelelektrophoretisch in einem 0,8 % -igen TAE-Agarosegel bei einer Spannung von 1,3 V/cm aufgetrennt. Das Gel wurde 30 min in Denaturierungspuffer (0,4 N NaOH; 0,6 M NaCl) und anschließend 30 min in Neutralisierungspuffer (1,5 M NaCl; 0,5 M TrisHCl; pH 7,5) gespült, bevor die DNA über einen Kapillarblot mit 10 x SSC auf eine Nylonmembran über Nacht transferiert wurde. Nach kurzem Waschen der Membran in 6 x SSC wurde die DNA im UV-Stratalinker<sup>TM</sup> 1800 (Stratagene) zweimal mit 120 mJ fixiert und war damit bereit für die Hybridisierung.

### Hybridisierung der Southernblot-Membran

Die Prähybridisierung und Hybridisierung der Southernblot-Membran erfolgte mit demselben Puffer wie beim Northernblot, allerdings lagen die Hybridisierungstemperaturen aufgrund der stabileren DNA-DNA-Wechselwirkungen bei 55°C. Es wurde eine radioaktiv markierte Sonde gegen eGFP verwendet.

Anschließend wurde die Membran zweimal in 2 x SSC (5 min, Raumtemperatur) und zweimal mit 0,1 x SSC/0,1 % SDS (1 h, 65°C) gewaschen. Die kurz getrocknete und eingeschweißte Membran wurde auf einem Film exponiert.

### **2.2.3 Zellbiologische Methoden**

Die sterile Kultivierung der verschiedenen Zellen erfolgte mit dem jeweiligen beschriebenen Medium bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> (v/v), 95 % Luftfeuchtigkeit.

#### 2.2.3.1 Zelllinien

Es wurde ausschließlich mit adhärent wachsenden Zelllinien gearbeitet. Jeden zweiten bis dritten Tag konnten der Zellrasen durch Trypsin-EDTA-Behandlung vom Kulturschalenboden gelöst und in die Zellen in Einzelsuspension gebracht werden, bevor sie verdünnt erneut mit frischem Medium ausgesät wurden.

Auf die Kultivierung von primären Zellen wird später eingegangen.

### Produktion von Viruspartikeln durch Verpackungszelllinien

Für die Infektion von murinen Zellen (SC1, Knochenmarkzellen) mussten Virusüberstände hergestellt werden. Dafür wurden Phoenix-gp als Verpackungszelllinien benutzt und transient mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert. Für die Infektion von murinen Zellen wurde die Verpackung mit Eco-Env vorgenommen. Die Transfektion erfolgte nach der Kalziumphosphat-Methode mit 2 µg Eco-Plasmid (K73), 10 µg gag-pol-Plasmid (M57) und 6 µg des jeweiligen retroviralen Vektorplasmids. Die Plasmide wurden mit 50 µl 2,5 M CaCl<sub>2</sub> versetzt, mit aqua dest auf ein Volumen von 500 µl gebracht und zum Präzipitieren tropfenweise in 500 µl blubbernden 2 x Präzipitationspuffer (0,28 M NaCl; 50 mM Hepes; 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,05) gegeben. Bei 5 x 10<sup>6</sup> am Tage zuvor in einer 9 cm -Schale ausplattierten Phoenix gp Zellen wurde das Medium mit Zusatz von 50 mM Hepes und 25 µM Chloroquin (Sigma) erneuert. Anschließend wurde die kopräzipitierte DNA vorsichtig auf die Zellen gegeben. Nach 6 bis 10 Stunden wurde wiederum das Medium gegen frisches DMEM inklusive 50 mM Hepes ausgetauscht und ab dem folgenden Tag

alle 12 Stunden der Überstand abgenommen, steril filtriert (Milexfilter GP, 22 µm) und bei -70°C verwahrt. Die Zellen wurden nach jeder Überstandabnahme mit frischem Medium versehen. Die Virusernte wurde 2-3 Tagen vorgenommen.

#### Transiente Transfektion von Zielzellen zur Analyse der Genexpression

Wie bei der transienten Transfektion zur Partikelproduktion wurde nach der Kalzium-Phosphatmethode vorgegangen. Hier wurden keine Plasmide für Gag/Pol und Env kotransfiziert. Einen Tag vor der Transfektion wurden  $7 \times 10^5$  293T-Zellen pro Vertiefung in einer 6-Loch-Zellkulturplatte ausgesät. Am Tag der Transfektion wurde ein „halber Präzipitationsansatz“ mit 2 µg Vektor-DNA und 25 µl 2,5 M  $\text{CaCl}_2$  in einem Endvolumen von 250 µl hergestellt und mit 250 µl 2 x HBS-Lösung präzipitiert. Von diesem Reaktionsansatz wurden auf die ausgesäten Zellen nach Mediumwechsel 150 µl Suspension gegeben. Die Zellen wurden nach 48 h geerntet, ein Aliquot wurde in der Durchflusszytometrie auf die eGFP-Expression untersucht. Die übrigen Zellen wurden nach Kern-Zytoplasmatrengung der RNA-Analyse unterzogen.

Auch SC1-Zellen sollten nach transienter Transfektion auf RNA- und Proteinexpression untersucht werden. Diese Zellen ließen sich nicht mit der Kalzium-Phosphatmethode transfizieren. Es wurde ein Transfektionskit (Effectene-Transfektionskit, Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben verwendet. Dabei wurden pro Ansatz 0,4 µg DNA mit 3,2 µl Enhancer und 80 µl EC-Puffer versetzt, gemischt und 5 min bei Raumtemperatur verwahrt. Anschließend wurden 10 µl Effectene zugegeben, die Suspension für 10 s gemischt und mit 600 µl Medium vermischt. Der Ansatz wurde tropfenweise auf die ausgesäten SC1 pipettiert.

Die Aufarbeitung der Zellen erfolgte wie bei den 293T nach 48 h.

#### Bestimmung der Virustiter der Überstände

Um die Konzentration der Virusüberstände zu bestimmen wurden  $1 \times 10^5$  SC1 pro Vertiefung in 24-Loch-Zellkulturplatten ausgesät. Vier Stunden nach Aussaat wurden unterschiedliche Volumina der Eco-Virusüberstände auf die Zellen gegeben und das Volumen mit MEM-Medium auf 500 µl aufgefüllt. Dem Ansatz wurde Protaminsulfat (Sigma) zugegeben (4 µg/ml Endkonzentration). Protaminsulfat setzt die Abstoßung zwischen Zell- und Virusoberfläche aufgrund der Ladung von Oberflächenmolekülen herab (Cornetta und Anderson, 1989). Die Transduktionseffizienz wurde durch Zentrifugation (CL-GPKR Zentrifuge, Beckman) der Kulturplatten bei 200 g für eine Stunde bei 30 bis 35°C gesteigert. 6 bis 12 Stunden nach der Zentrifugation wurde das

Medium gegen frisches gewechselt. Die Zellen wurden kultiviert und an Tag 2 bzw. 3 nach Transduktion analysiert.

Da alle untersuchten retroviralen Vektorkonstrukte dieser Arbeit das Markergen eGFP trugen, konnte die Bestimmung transduzierter Zellen mit Hilfe der durchflusszytometrischen Analyse im FACSCalibur (Becton-Dickinson, Heidelberg) durchgeführt werden. Der Titer der Überstände berechnete sich aus der Anzahl der ausgesäten Zellen, dem Prozentsatz der eGFP-positiven Zellen, dem Volumen des eingesetzten Überstandes und einem Faktor 2, der sich aus der notwendigen Bedingung ergibt, dass die Zellen sich zur Transduktion einmal teilen mussten:

$$\text{Titer [Partikel/ml]} = \frac{2 \times 1 \times 10^5 \text{ ausgesäte Zellen} \times \% \text{ eGFP-positiv}}{\text{ml eingesetzter Virusüberstand}}$$

Um statistisch auszuschließen, dass Zellkulturen vorlagen, die Zellen mit zwei oder mehr Vektorintegrationen enthielten und damit einen Berechnungsfehler verursachten, wurden nur Transduktionen mit einer eGFP-Prozentrage  $\leq 30\%$  für die Analyse zugelassen (Kustikova et al., 2003; Wahlers et al., 2001).

#### Transduktion von Zelllinien

Die Transduktion von Zielzellen erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie die Titerbestimmung. Es wurde mit einer Viruspartikelzahl pro Zellzahl, der Multiplizität der Infektion (Multiplicity of Infektion, MOI), von 0,5 bis 3,0 gearbeitet. Die Zellen wurden nach Transduktion im Durchflusszytometer auf die Prozentrage der eGFP-positiven Zellen und die Fluoreszenzintensität dieser Population untersucht.

#### 2.2.3.2 Primäre Zellen

##### Gewinnung von murinem Knochenmark

Murine Knochenmarkzellen mussten in präparativem Maßstab gewonnen werden, um die Transduktion und Expression der zu untersuchenden retroviralen Vektoren in primären Zellen im Gegensatz zu stabilen Zelllinien beurteilen zu können. Die Maus wurde durch Genickbruch getötet und mit Ethanol auf einer OP-Unterlage semisterilisiert. Zur Gewinnung von Knochenmark wurden die Ober- und Unterschenkelknochen der Hinterbeine freipräpariert. Die Organe wurden zur Weiterverarbeitung in IMDM mit 10 % FCS und 2 % Pen/Strep aufbewahrt. Ab diesem Schritt wurde steril weitergearbeitet, um die Zellen weiter *in vitro* kultivieren zu können. Muskeln und Sehnen wurden mit Gaze entfernt. Die Knochen wurden an einem Ende angeschnitten und an dem anderen Ende

mit einer Kanüle (0,6 x 30 mm) durchbohrt, so dass das Mark mit dem in der aufgesetzten Spritze befindlichen IMDM durchgespült werden konnte. Um eine Einzelzellsuspension zu erhalten, wurde zum Schluss das gesamte in IMDM befindliche präparierte Mark 15 mal durch eine Kanüle (1 mm Durchmesser) gezogen. Zur Anreicherung von Vorläuferzellen wurden die gewonnenen Zellen der Liniendepletion unterzogen.

#### Liniendepletion der Knochenmarkzellen

Da nur wenig Stammzellen in einer Kultur im Vergleich zu vielen differenzierenden und ausdifferenzierten Zellen zu finden sind, ist es schwierig, diese Zellen mit limitiertem Virusüberstand zu transduzieren. Daher wird zunächst versucht, die Stammzellen anzureichern, indem Zellen aus verschiedenen Linien der Blutzelldifferenzierung anhand spezifischer Differenzierungsmarker depletiert werden („lineagedepletion“, Liniendepletion). Um das bei den meisten Knochenmarktransplantationsmodellen der Maus verwendete toxische 5-Fluorouracil (5-FU) zu vermeiden, wurde nach einem optimierten Protokoll zur Liniendepletion vorgegangen (Li et al., 2003). Dabei wurden reifere Knochenmarkzellen mit biotinkoppelten Antikörpern gegen die linienspezifischen Oberflächenmoleküle (CD3e, CD11b, CD45R/B220, Gr-1, Ter119) (lineage depletion kit, BD Pharmingen, Heidelberg) markiert.

Nach einem Waschschrift wurden die Zellen mit anti-Biotin-gekoppelten Mikrokügelchen (MicroBeads, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) magnetisch markiert. Zur Aufreinigung wurden die Zellen auf eine Säule gegeben (LD Säulen, Miltenyi Biotec), die an einem starken Magnetfeld lokalisiert war, so dass die an Mikrokügelchen gebundene Zellen angereichert wurden. Die Säule wurde mit IMDM 2 % FCS gespült. Im Durchfluss befanden sich die liniennegativen (Lin -) Vorläuferzellen. Die gebundenen linienpositiven (Lin +) Zellen konnten nach Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld ebenfalls ausgewaschen werden. Die Zellen wurden in zytokinhaltigem IMDM mit 20 % FCS, 1 % Pen/Strep und 1 % Glutamin kultiviert. Die Qualität der Aufreinigung der verschiedenen Fraktionen wurde im Durchflusszytometer überprüft. Die liniennegative Zellpopulation wurde drei Tage kultiviert ehe sie zur Transduktion mit retroviralen Vektoren herangezogen wurde.

#### Transduktion von liniennegativen Knochenmarkzellen

Die Transduktionseffizienz der liniennegativen Knochenmarkzellen wurde durch den Einsatz von Retronektin gesteigert. Retronektin besitzt Bindungsstellen für Oberflächenproteine hämatopoetischer Zellen und für Viruspartikel, was zu einer

Kolokalisation von Zelle und Virus führt (Fehse et al., 1998; Kiem et al., 1998). Für humane HSZ ist zudem gezeigt worden, dass Retronektin das regenerative Potential dieser Zellen erhalten kann sowie die terminale Differenzierung und die Apoptose blockiert (Dao et al., 1998; Donahue et al., 2001).

Dazu wurden 2 ml einer 48 µg/ml Retronektinlösung (PBS mit rekombinantem Fibronektinfragment CH-296, TAKARA, Cambrex BioScience, Verviers, Belgien) in eine Vertiefung einer 6-Loch-Schale gegeben. Nach einer Inkubation von mindestens 2 h bei Raumtemperatur wurde die Lösung entfernt und der Boden der Schale mit 2 ml PBS/2 % BSA für 30 min blockiert. Es erfolgte ein Waschschriff mit 3 ml HBSS/2,5 % (v/v) 1 M Hepes, anschließend musste der Virusüberstand nach Entfernung des HBSS sofort aufzentrifugiert werden. Es wurde 1 ml Virusüberstand für 30 min bei 4°C und 2000 rpm zentrifugiert und dieser Schritt mit 1 ml frischen Überstand wiederholt. Nach Überstandabnahme wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in einem Volumen von 3 ml zytokinhaltigem IMDM in die Vertiefung gegeben.

### 2.2.3.3 Durchflusszytometrie und Sortierung von Zellen

#### Durchflusszytometrische Analysen (FACS-Analysen)

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, das die Auftrennung von Zellen aufgrund ihrer Lichtstreuung durch Größe und Granularität sowie über ihre Fluoreszenz ermöglicht. In Suspension befindliche Zellen werden durch Überdruck in einem Flüssigkeitsstrom hintereinander angeordnet und so einzeln physikalisch auf die eben erwähnten Parameter vermessen. Das hier verwendete Durchflusszytometer FACSCalibur (Becton-Dickinson, Heidelberg) kann neben der Art der Fluoreszenz auch ihre Intensität quantifizieren.

Zelllinien wurden neben Größe (forward-scatter, FSC) und Granularität (sideward-scatter, SSC) nur auf die eGFP-Expression untersucht. Dazu wurden die adhärenenten Zellen mit Trypsin behandelt und anschließend zweimal in 1 x PBS gewaschen und ebenfalls in 1 x PBS der FACS-Analyse unterzogen.

Murine Knochenmarkzellen wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern vor der FACS-Analyse gefärbt (Tab. 3). Die eGFP-Fluoreszenz gab auch in diesen Zellen Auskunft über die Transduktions- und Expressionseffizienz der eingesetzten Vektoren. Die zusätzlichen Antikörper wurden genutzt, um zwischen verschiedenen Zellpopulationen wie unreifen und reifen Zellen unterscheiden zu können. Dazu wurden  $5 \times 10^5$  Zellen in 1 x PBS gewaschen und zunächst zur Blockade unspezifischer Bindungen mit 1 µl F<sub>C</sub>-Block in einem Volumen von 100 µl für 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. 1 µg

fluoreszenzmarkierter oder biotinkoppelter Antikörper wurde zugegeben und für weitere mindestens 30 min bei 4°C inkubiert. Bei dem biotinkoppelten Antikörper folgte nach einem Waschschrift in 1 x PBS die Inkubation mit 1 µg fluoreszenzmarkiertem Streptavidin, welches an das Biotin bindet. Die Zellen wurden in 1 x PBS gewaschen und der FACS-Analyse unterzogen. Direkt vor der Analyse wurde Propidiumiodid (Endkonzentration 10 µg/ml) zugegeben, um tote Zellen in der Analyse ausschließen zu können.

| Nr. | Zellmaterial | 1. Fluoreszenz<br>eGFP/ FITC | 2. Fluoreszenz<br>PE                     | 3. Fluoreszenz<br>APC | Nachweis                               |
|-----|--------------|------------------------------|------------------------------------------|-----------------------|----------------------------------------|
| 1   | Knochenmark  | Sca-1                        | Linien + (CD3, B220, CD11b, Gr1, Ter119) | c-Kit                 | Effizienz der Liniendepletion          |
| 2   | Knochenmark  | Vektortransduktion           | Linien + (CD3, B220, CD11b, Gr1, Ter119) | c-Kit                 | linienpositiv<br>liniennegativ         |
| 3   | Knochenmark  | Vektortransduktion           | Sca-1                                    | c-Kit                 | frühe Stamm-<br>und<br>Vorläuferzellen |
| 4   | Knochenmark  | Vektortransduktion           | Gr1                                      | CD11b                 | Granulozyten/<br>Makrophagen           |

**Tab. 3: Fluoreszenzmarkierte Antikörper für die Durchflusszytometrie**

#### Anreicherung eGFP-exprimierender Zellen durch Sortierung

Massenkulturen von eGFP-exprimierenden SC1-Zellen wurden in einem MoFlo-Zellsorter (Cytomation, Freiburg) auf die positive Population eingegrenzt und sortiert. Dazu wurde eine Massenkultur mit weniger als 30 % eGFP-positiven Zellen (um die Einfachintegration des Provirus zu gewährleisten) in 1 x PBS gewaschen und in einem sterilen Sortierungsröhrchen in 1 x PBS/4 % FCS in einem Endvolumen von 1,5 – 2 ml aufgenommen. Die Zellen wurden in sterilen Sortierungsröhrchen mit vorgelegten 2 ml MEM-Medium mit 1 % Penicillin/Streptomycin abgelegt. Die Sortierung wurde freundlicherweise von Herrn A. Rimek übernommen.

Nach der Sortierung wurden die Zellen einmal in 1 x PBS gewaschen und anschließend in unterschiedlichen Dichten in 96- und 24-Loch-Zellkulturplatten eingesät. Die erste Woche fand die Kultivierung in Gegenwart von Antibiotika (1 % Pen/Strep) statt, die dann ausgeschlichen wurden. SC1-Zellen wurden für einen Northernblot hochgezogen.

### 2.2.4 Computerunterstützte Analysen und Statistik

Die Daten der Durchflusszytometrie wurden mit CellQuest-Software analysiert. Nach Abgrenzung der negativen Population wurde die mittlere Fluoreszenz der positiven Population als arithmetisches Mittel einer bestimmten Anzahl (n) unabhängiger Experimente dargestellt. Dabei ist darauf hinzuweisen, dass es sich bei den mit der CellQuest-Software erstellten Histogrammen nicht um lineare Skalen handelt. Bei den ermittelten Werten handelt es sich nicht um Absolutwerte. Die Fehlerbalken geben die Stichprobenstandardabweichung an. Bei Vergleich verschiedener Vektoren und Vektormutanten wurde die Signifikanz unterschiedlicher Ergebnisse mithilfe des Student T-Tests ermittelt. Signifikante Unterschiede mit  $P < 0,05$  wurden mit einem Sternchen (\*) versehen.

Quantifizierungen von radioaktiven Signalen wurden mit Hilfe des Phosphoimagers (Biorad) durchgeführt.

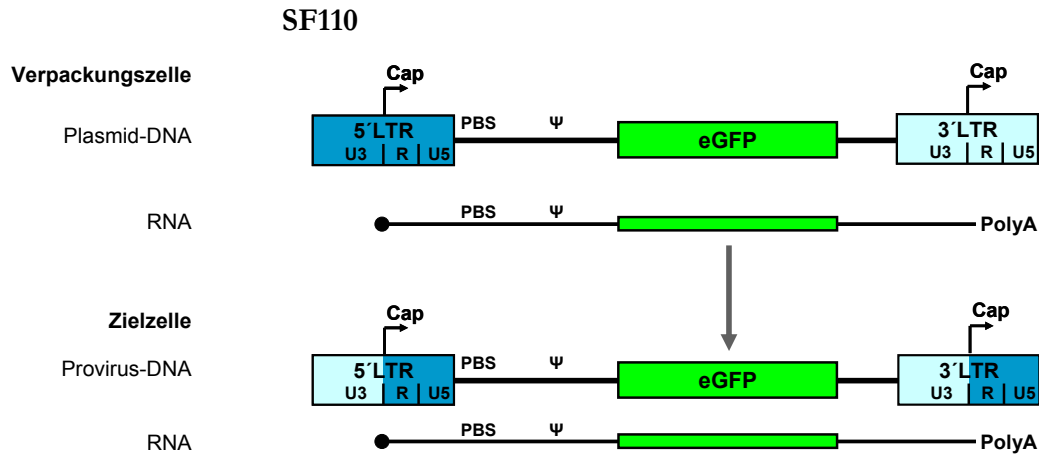
## 2.3 Vektoren

Die bereits in Vorarbeiten klonierten retroviralen LTR- und SIN-Vektoren tragen alle das „enhanced green fluorescent protein“ eGFP (Persons et al., 1998) als Markergen. Durch eine eingeführte Punktmutation und eine veränderte Kodonnutzung wurde die Expression des ursprünglich von der Qualle *Aequora victoria* stammenden Proteins in Säugerzellen verstärkt (Haas et al., 1996). Eine lange Proteinhalbwertszeit von über 24 Stunden trägt außerdem wesentlich zur Sensitivität dieses Markers bei. Aufgrund seiner leichten Quantifizierbarkeit in der durchflusszytometrischen Analyse bot sich eGFP für den Vergleich der Proteinexpression retroviraler Vektoren an. Die Korrelation mit transkribierter mRNA wurde in Vorarbeiten bestätigt (Wahlers et al., 2002a).

In einem Vektorverpackungssystem, in dem neben der Vektorplasmid-DNA ein Expressionsplasmid für Gag/Pol und eines für das Hüllprotein kotransfiziert werden, eröffnet sich die Möglichkeit, je nach Zielzelle die Vektoren mit einem entsprechenden nicht von dem Ursprungsvirus stammenden Hüllprotein zu pseudotypisieren. Für Studien dieser Arbeit mit murinen Zellen ist die Verpackung mit ökotropen (ecotrop, Eco) Hüllproteinen aufgrund hoher Titer und einer hohen Rezeptordichte optimal.

### 2.3.1 Retrovirale Vektoren unter LTR-Kontrolle

Der retrovirale Basisvektor SF110 besitzt den 5'LTR des MPSV, den Leaderbereich des MESV und den 3'LTR des SFFV (Hildinger et al., 1999). Das Transgen, in diesem Fall das enhanced green fluorescent protein (eGFP), wird von dem Startkodons für das Kapsidprotein Gag exprimiert. Der Vektor SF110 diente als Grundlage für alle in dieser Arbeit klonierten und untersuchten Vektoren (Abb. 7).



**Abb. 7: LTR-Vektor SF110**

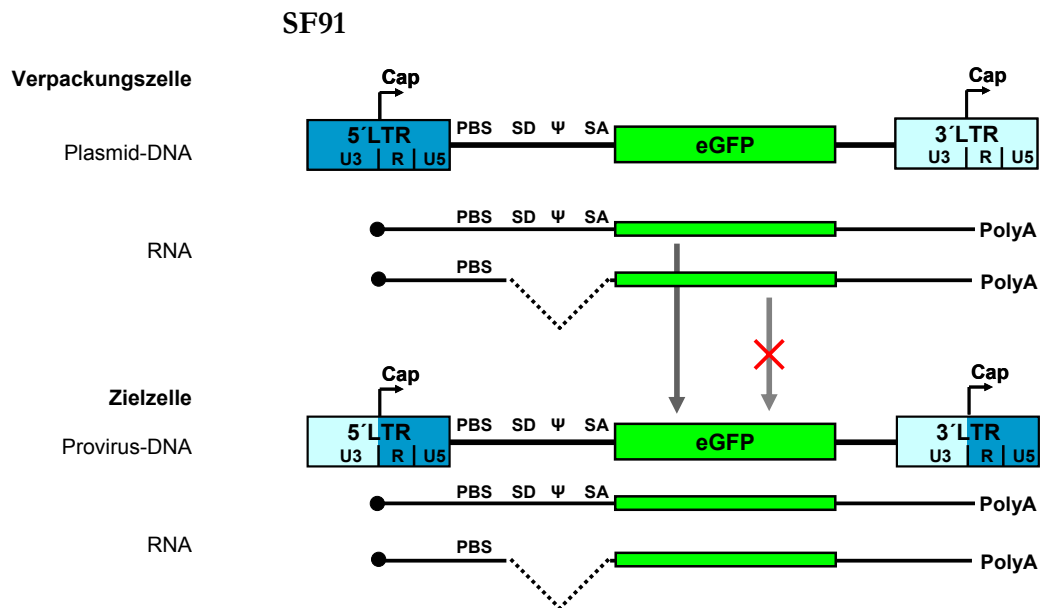
Die Darstellung spiegelt die DNA- und RNA-Situation des Vektors SF110 nach transienter Transfektion in der Verpackungszelle und nach Transduktion der Zielzelle wider.

—————→ verpackungsfähige und revers transkribierbare RNA

Die Promotor/Enhancersequenzen des MPSV regulieren die Transkription nach transienter Transfektion in der Verpackungszelle. Nach reverser Transkription gelangen die U3-Sequenzen des SFFV in den 5'LTR und übernehmen die Regulation in der Zielzelle.

Die 5'UTR enthält die R-Region, die das Startsignal für die RNA-Transkription mit Cap-Bereich trägt, gefolgt von der U5 Region, in der Signalsequenzen für die Polyadenylierung sitzen, die am 5'LTR normalerweise nicht genutzt werden. Außerhalb des LTR-Bereichs befindet sich die Primerbindungsstelle (PBS) und das Verpackungssignal ( $\Psi$ ). Im Vektor SF110 ist die Spleißdonor-(SD-) Stelle des MESV durch Mutation zerstört.

Eine Variante dieses Vektors (SF91) beinhaltet den SD des MESV und trägt stromabwärts direkt 5' des Startkodons ATG für die Translation des Transgens einen Spleißakzeptor (SA) (Abb. 8, siehe auch Anhang). Es handelt sich um den identischen SA, der im Wildtyp Moloney MLV (MoMLV) zur Expression von Env benutzt wird.



**Abb. 8: LTR-Vektor SF91**

Die Darstellung spiegelt die DNA- und RNA-Situation des Vektors SF110 nach transienter Transfektion in der Verpackungszelle und nach Transduktion der Zielzelle wider.

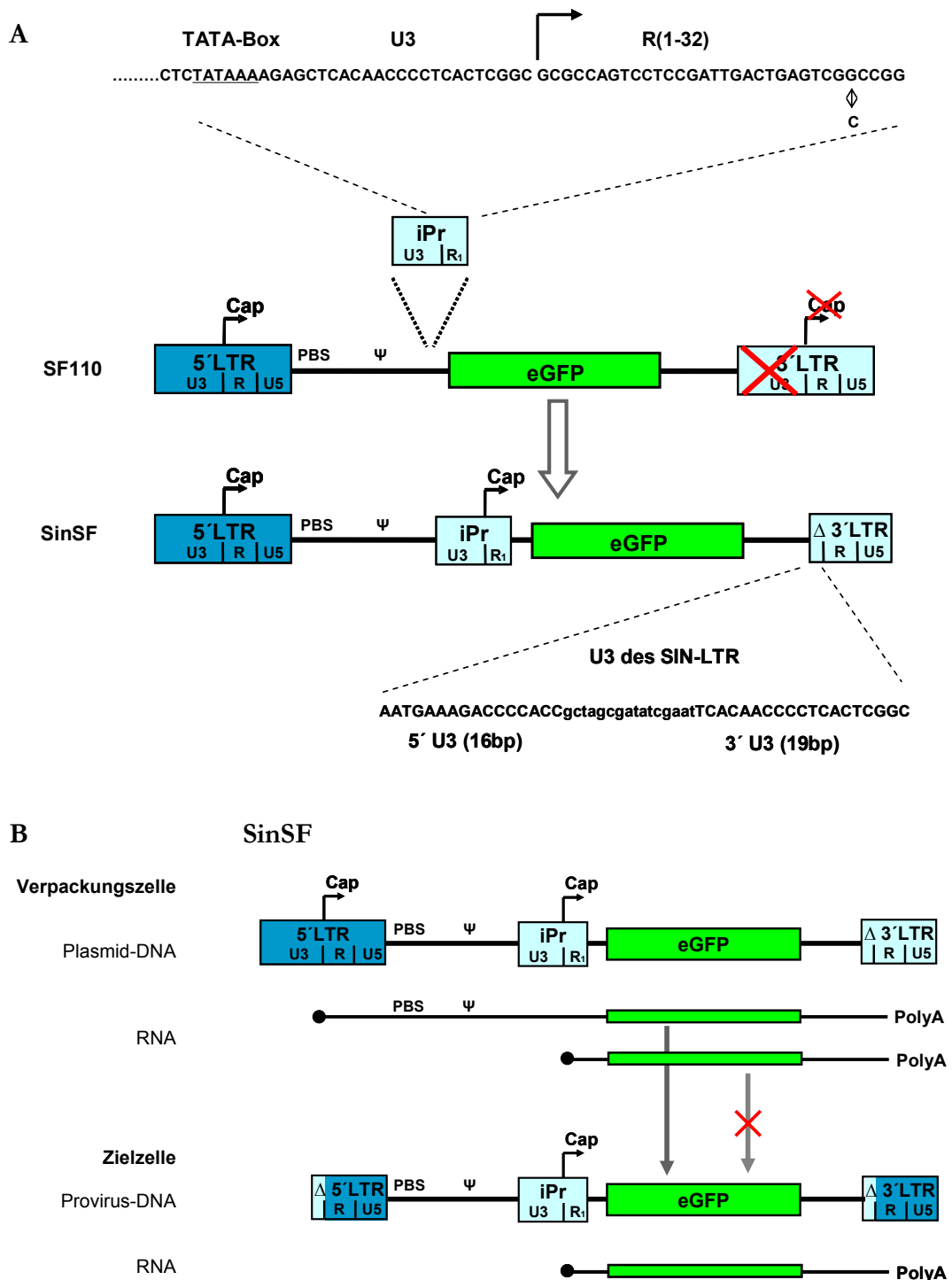
Nur die das Intron enthaltende genomische RNA kann in der Verpackungszelle in retrovirale Partikel verpackt und in der Zielzelle revers transkribiert werden.

—————> verpackungsfähige und revers transkribierbare RNA  
 ————X——> nicht verpackbare RNA

SF110 besitzt im Gegensatz zu SF91 kein funktionales Intron. Im transienten System zur Vektorverpackung sowie in der Zielzelle kann nur genomische, d.h. ungespleißte mRNA entstehen. Diese muss in das Zytoplasma transportiert werden und dient zur Expression des Transgens. Der Vektor SF91 ist wie Wildtyp MLV in der Lage, sowohl ungespleißte als auch gespleißte mRNA zu produzieren. Da sich das Verpackungssignal im Intron befindet, kann in der Verpackungszelle nur ungespleißte RNA in Viruspartikel verpackt werden. Der Transfer des Introns in die Zielzelle ist damit garantiert. Die Expression des Transgens kann in der Zielzelle von ungespleißter und gespleißter RNA erfolgen.

### 2.3.2 Selbstinaktivierende retrovirale Vektoren (SIN-Vektoren)

Die beiden LTR-Vektoren SF110 und SF91 wurden zur Konstruktion einer neuen Generation von selbstinaktivierenden (SIN-) Vektoren verwendet. SIN-Vektoren besitzen nach Integration des Provirus in die Zielzelle keine funktionalen LTRs mehr, d.h. sie können keine genomische RNA exprimieren und sind auch bei Supplementierung mit Kapsid- und Hüllproteinen nicht mehr mobilisierbar. Erreicht wird dies, indem Enhancer- und Promotorsequenzen des U3-Bereichs des 3'LTR deletiert werden.



**Abb. 9: Entwicklung der SIN-Vektoren**

A: Entwicklung von SinSF aus SF110. Die U3-Region des 3' LTR wurde im Vektorplasmid fast vollständig zerstört. Ein interner Promotor (iPr) wurde 5' des Transgens eingebaut. Der interne Promotor trägt die U3-Region und die ersten 32 Basen der R-Region (R<sub>1</sub>) des SFV aus dem ursprünglichen 3' LTR. An Base 28 zeigen die SIN-Vektoren im Vergleich mit den LTR-Vektoren eine Punktmutation.

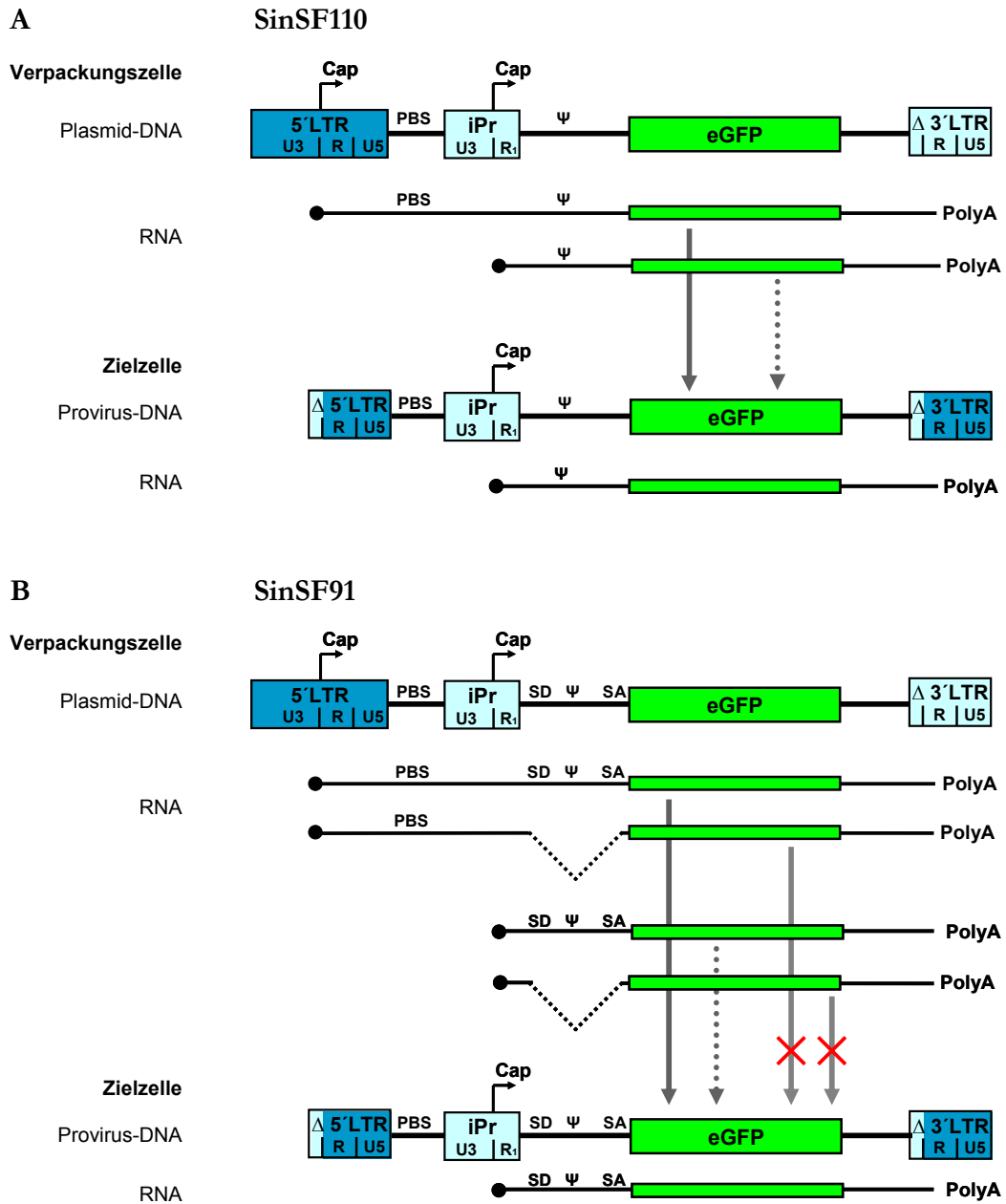
B: SIN-Vektor SinSF. Das vom internen Promotor initiierte Transkript in der Verpackungszelle kann ohne Ψ nicht verpackt werden.

→ verpackungsfähige und revers transkribierbare RNA  
 → × nicht verpackbare RNA

In den in dieser Arbeit untersuchten Vektoren wurde fast der gesamte U3-Bereich außer den ersten 16 und den letzten 19 Basen der SFFV U3-Region deletiert (Schaumann, Diplomarbeit 2000) (Abb. 9A). Nach transienter Transfektion ist der 5'LTR mit den Enhancer- und Promotorsequenzen des MPSV in der Verpackungszelle noch intakt und ermöglicht die Transkription der viralen genomischen RNA zur Partikelproduktion. Nach reverser Transkription der viralen RNA in DNA und Integration des Provirus in das Wirtsgenom der infizierten Zielzelle wird der Aufbau des U3/R-Bereichs des 3'LTR an den 5'LTR übernommen. Damit besitzt das Provirus keinen funktionsfähigen 5'LTR.

Die Expression des Transgens kommt zum Erliegen, wenn nicht ein interner Promotor in das Virus eingebaut wird. Um die Vergleichbarkeit der Expression und Partikelproduktion mit den LTR-Vektoren zu gewährleisten, wurde als interner Promotor die U3-Region des SFFV inklusive der ersten 32 Basen der R-Region integriert. Diese Basen der R-Region sind wichtig für die Initiation der Transkription und die Akkumulation ungespleißter viraler RNA im Zytoplasma (Trubetskoy et al., 1999). Aufgrund der Restriktionsschnittstelle, die zum Einbau des internen Promotors genutzt wurde, befindet sich an Base 28 der R-Region eine Punktmutation. Der interne Promotor wurde - wie es in konventionellen SIN-Vektoren der Fall ist - zunächst direkt stromaufwärts des Transgens integriert. Von dem entsprechenden LTR-Vektor SF110 abgeleitet entstand so der SIN-Vektor SinSF (Abb. 9A und B).

Diese konventionelle Position des internen Promotors in einem SIN-Vektor erlaubt keine Integration eines funktionalen Introns wie es im LTR-Vektor SF91 möglich ist. Es wurde getestet, ob der interne Promotor auch von anderen Positionen aus in der Lage ist, die Transkription zu initiieren. Dies würde die Konstruktion weiterer SIN-Varianten ermöglichen mit z.B. zusätzlichen regulatorischen Elementen oder Spleißstellen auf ihrer RNA. Zwei weitere SIN-Konstrukte wurden in die Analysen einbezogen. Der interne Promotor wurde so in den Vektor integriert, dass er seine Funktion 30 Basenpaare stromabwärts der PBS und folglich stromaufwärts des Verpackungssignals ausübte. Je nachdem, ob der LTR-Vektor SF110 oder SF91 als Grundlage gedient hatte, entstanden die Vektoren SinSF110 und SinSF91 (Abb. 10A und B).



**Abb. 10: SIN-Vektoren mit internem Promotor stromaufwärts von  $\Psi$**

A: SinSF110 trägt den internen Promotor stromabwärts der PBS und stromaufwärts von  $\Psi$ . Beide Transkripte der Verpackungszelle können verpackt werden. Allerdings kann die vom internen Promotor initiierte RNA aufgrund der fehlenden PBS nicht revers transkribiert werden.

B: SinSF91 trägt  $\Psi$  in einem Intron. Die Verpackungszelle kann zusätzlich zwei gespleißte Transkripte herstellen, die aufgrund des Verlustes von  $\Psi$  nicht verpackbar sind.

- > verpackungsfähige und revers transkribierbare RNA
- .....> verpackungsfähige nicht revers transkribierbare RNA
- X——> nicht verpackbare RNA

Beide Vektoren tragen zwischen dem Promotor und dem Transgen das Verpackungssignal  $\Psi$ . SinSF91 besitzt zudem Spleißsignale, die das Verpackungssignal einschließen. Wie in den LTR-Vektoren garantiert  $\Psi$  den Transfer des Introns in die Zielzelle in SinSF91. Bei diesem Vektor ist in der Zielzelle die Expression des Transgens von ungespleißter und gespleißter RNA möglich. Beide Vektoren können in der Verpackungszelle RNA vom internen Promotor initiiert synthetisieren. Diese RNA ist zwar verpackbar, da sie  $\Psi$  enthält, allerdings kann die reverse Transkription in der Zielzelle nicht vollzogen werden, da die PBS nicht vorhanden ist.

Durch das neue Design dieser Vektoren war es möglich, den Einfluss von Spleißstellen auf die Genexpression in Kombination mit einem internen Promotor zu überprüfen, indem zwei nahezu identische Konstrukte mit und ohne funktionale Spleißsignale (SinSF91/SinSF110) verglichen wurden. Außerdem ermöglichte die Konstruktion von SinSF110 den Einfluss des Verpackungssignals auf die Transgenexpression zu untersuchen. Aufgrund der im höchsten Maße identischen Regulationselemente erlauben die SIN-Vektoren SinSF110 und SinSF91 zudem einen direkten Vergleich mit den ihnen entsprechenden LTR-Vektoren SF110 und SF91. Dieser Vergleich betrifft die Produktion von Virusüberständen und die Transgenexpression in retroviral transduzierten Zellen.

### 3 Ergebnisse

Im Vergleich zu konventionellen retroviralen Vektoren sollten selbstinaktivierende (SIN) Vektoren einen höheren Sicherheitsanspruch beim Einsatz als Gentransfervektoren in der Gentherapie erfüllen. Zunächst wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Konfigurationen von SIN- und analogen LTR-Vektoren auf ihre Effizienz bei der Herstellung infektiöser Partikel und ihr Transgenexpressionsniveau untersucht. Einige dieser Ergebnisse sind bereits veröffentlicht (Kraunus et al., 2004). Hier werden nur die für diese Arbeit wichtigen Erkenntnisse kurz vorgestellt.

Als Schwerpunkt dieser Arbeit wurde aufgrund einer scheinbar verbesserten RNA-Prozessierung der SIN-Vektoren eine mechanistische Analyse der Auswirkungen der Sequenz und Struktur des untranslatierten ersten Exons des retroviralen Vektors SF91 auf die RNA- und Proteinexpression unternommen.

Die retroviralen Vektoren, die in dieser Arbeit konstruiert und experimentell untersucht worden sind, leiten sich von MLV ab. In Vorarbeiten in unserer Abteilung hergestellte LTR- und SIN-Vektoren werden detailliert in Material und Methoden vorgestellt (Kap. 2.3). Alle Vektoren sind des Weiteren in einem Überblick im Anhang dargestellt. Außerdem sind im Anhang die Sequenzen des Vektorplasmids SF91 und SinSF91 zu finden.

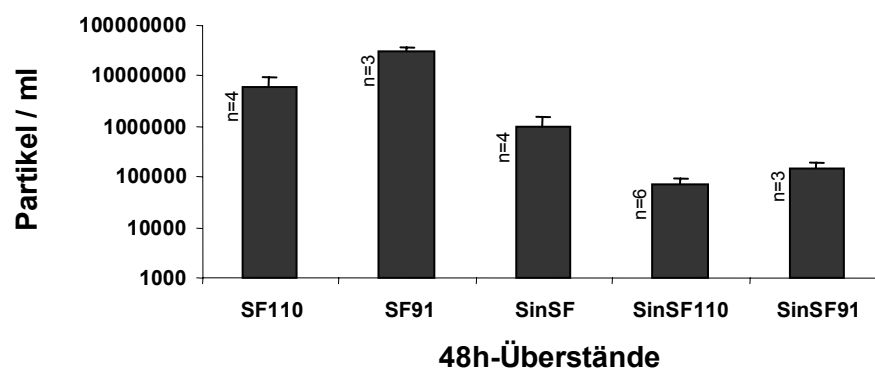
#### 3.1 Ein Intron steigert den Virustiter in LTR- und SIN-Vektoren

Um retrovirale Vektoren in der Gentherapie einsetzen zu können, ist unabhängig von der Transgenexpression ein essentieller Schritt die Herstellung von Virusüberständen mit ausreichend hohen Titern. Neben der niedrigen Genexpression ist dies das Hauptproblem der konventionellen SIN-Vektoren. Für die Virustransduktion von Knochenmarkzellen sollte mindestens ein Titer von  $1 \times 10^6$  Viruspartikeln/ml eingesetzt werden. Die Titer, die üblicherweise mit SIN-Vektoren erreicht wurden, liegen mit  $2 \times 10^4$  bis  $1 \times 10^5$  Viruspartikeln/ml weit unterhalb dieses Ziels (Hwang et al., 1997; Yu et al., 1986).

Die Transduktion von Zielzellen hängt einerseits vom Titer der Virusüberstände ab, andererseits von der Dichte der Rezeptoren auf der Zielzelle, die vom Hüllprotein des Virus benutzt werden können. In dieser Arbeit wurden die verschiedenen retroviralen Vektoren, LTR- sowie SIN-Vektoren, auf die Produktion von Virusüberständen mit ökotropem Hüllprotein (Eco) überprüft.

Bei der Eco-Verpackung konnten Überstände bis zu 84 Stunden nach Transduktion geerntet werden mit einem Maximum des Titters bei 48 Stunden und einem anschließend langsamen Abfall der Partikelkonzentration.

Die erreichten Titer eines speziellen Vektors waren in verschiedenen Experimenten auf das Höchste reproduzierbar. Die folgende Abbildung zeigt die Titer der 48h-Überständen mit Eco-Hüllproteinen der verschiedenen Vektoren von drei bis sechs unabhängigen Experimenten im Vergleich (Abb. 11).



**Abb. 11: Ein Intron erhöht den Virustiter in LTR- und SIN-Vektoren**

Dargestellt sind die Virusüberstände, die 48 Stunden nach transienter Transfektion geerntet wurden. Sowohl bei SIN- als auch bei LTR-Vektoren konnte ein integriertes Intron den Virustiter steigern. Es handelt sich um die Mittelwerte von drei bis sechs unabhängigen Experimenten je Vektor.

Betrachtete man die Titer der LTR-Vektoren SF110 ( $6,2 \times 10^6$ /ml) und SF91 ( $3,0 \times 10^7$ /ml) fiel auf, dass allein die Gegenwart eines Introns in SF91 den Titer um einen Faktor von fünf steigerte. Dies wurde schon bei Hildinger et al. (1999) beschrieben. Da sowohl ungespleißte als auch gespleißte RNAs synthetisiert werden, allerdings nur die ungespleißte RNA verpackbar ist, scheinen die Spleißstellen auch ohne Spleißereignis Einfluss auf die Stabilität bzw. den Export der genomischen RNA aus dem Kern auszuüben oder die Struktur von  $\Psi$  zu beeinflussen.

Trotz eines Titters von  $1,0 \times 10^6$ /ml für den SIN-Vektor mit konventioneller Position des internen Promotors, SinSF, lag dieser um einen Faktor von sechs (SF110) bzw. 30 (SF91) unter dem für die LTR-Vektoren erreichten. Die neue Konstruktion in SinSF110 und SinSF91 mit dem Promotor stromabwärts der PBS schwächte die Partikelproduktion zunehmend. Diese SIN-Vektoren zeigten gegenüber ihren korrespondierenden LTR-Vektoren einen starken Titerverlust, der bei SinSF110 ( $6,9 \times 10^4$ /ml) gegenüber SF110 zwei Zehnerpotenzen betrug, bei SinSF91 ( $1,4 \times 10^5$ /ml) gegenüber SF91 lag der Verlust sogar

über  $2 \times 10^2$ . Die Promotorinsertion zwischen die PBS und den SD wirkt sich demzufolge negativ auf die Partikelproduktion aus.

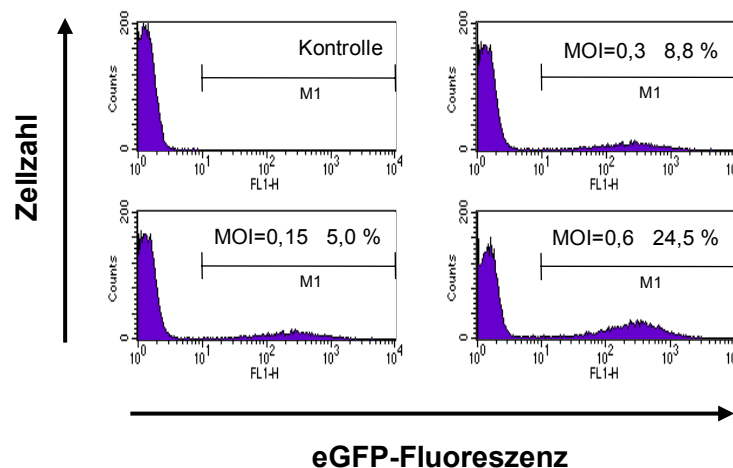
Gegenüber dem konventionellen SIN-Vektor SinSF erniedrigte die Distanz des internen Promotors zum Reportergen, die das Verpackungssignal zwischen beide Elemente bringt, die Virusproduktion um das 20-fache (Vergleich SinSF mit SinSF110).

Bei den SIN-Vektoren wurde bei gleicher Position des Promotors in SinSF110 und SinSF91 durch die Anwesenheit von Spleißstellen in SinSF91 die Virusproduktion um einen Faktor von 2,5 verbessert. Das entspricht dem beobachteten positiven Einfluss der Spleißstellen auf den Titer in den LTR-Vektoren, allerdings schwächer ausgeprägt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Virusüberstände der untersuchten SIN-Vektoren weit unter den für LTR-Vektoren erreichten liegen. Ein Intron in der genomischen RNA wirkt positiv auf die Herstellung von Virusüberständen. Dies gilt für die LTR- und die SIN-Konfiguration. Trotz Steigerung der Partikelkonzentration in SinSF91 lag diese allerdings immer noch um einen Faktor von sieben unter der des konventionellen SIN-Vektors SinSF. Zur Verbesserung des Titers der SIN-Vektoren waren daher weitere Modifikationen dringend notwendig (Kap. 3.4).

### 3.2 Transduktion von Zielzellen

Um bei der Infektion von Zielzellen mit unterschiedlichen Vektoren die Vergleichbarkeit der Transgenexpression zu gewährleisten, muss die Grundbedingung der gleichen Gendosis erfüllt sein. Integriert mehr als eine Vektorkopie in das Wirtsgenom einer Zielzelle, erhöht sich damit auch die Expressionshöhe des Transgens, d.h. in den Experimenten dieser Arbeit der Mittelwert der Fluoreszenz von eGFP, wodurch Vektorvergleiche beeinträchtigt werden (Wahlers et al., 2001). Um eine einfache Provirusintegration zu erreichen, wurden die Zielzellen mit einer definierten Menge an Virus infiziert, damit nach der Transduktion höchstens 30 % der Zellen eGFP positiv waren. Die Notwendigkeit dieses Prozederes wurde von Kustikova et al. (2003) bestätigt. Die bei der Infektion einzusetzende Multiplizität der Infektion (multiplicity of infection, MOI), um eine höchstens 30 % -positive transduzierte Zellpopulation zu erhalten, hängt wie erwähnt vom Hüllprotein der Viruspartikel und der entsprechenden Rezeptordichte der Zielzelle ab und muss für jede Kombination aus Virus und Zelle neu ermittelt werden. Um die optimale MOI für die Transduktion der murinen Fibroblastenzelllinie (SC1) mit Eco-Überständen zu ermitteln, wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an SF91-Überständen versetzt.



**Abb. 12: Die MOI von 0,5 ist ausreichend für die Transduktion von SC1**

Gezeigt ist die Austitrierung der für die Transduktion von SC1 notwendigen MOI mit SF91-Virusüberständen. Eine MOI von 0,6 war ausreichend, um 25 % der Zellen zu transduzieren. In den folgenden Experimenten wurde daraufhin mit einer MOI von 0,5 gearbeitet.

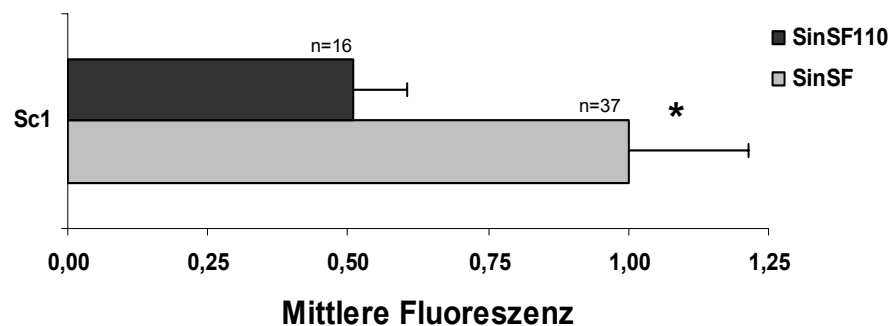
Bei einer MOI von 0,6 konnten mit SF91-Virusüberständen etwa 25 % SC1-Zellen transduziert werden (Abb. 12). Bei allen folgenden Experimenten mit SC1-Zellen wurde für jeden retroviralen Vektor mit einer MOI von 0,5 gearbeitet. Diese war ausreichend, um die Zellen effizient zu infizieren und gleichzeitig die 30 % -Grenze nicht zu überschreiten.

### 3.3 Expression des Transgens eGFP in kultivierten Zelllinien

Alle Vektorkonstrukte enthalten im Wesentlichen identische Elemente wie Promotor-, Enhancer- und Spleißsequenzen. Dadurch wird die Vergleichbarkeit der Vektoren gesichert. Sie unterscheiden sich im Hinblick auf Position und Kombination dieser Sequenzen. Im Folgenden wurde der Einfluss der Elemente auf die Transgenexpression systematisch in den verschiedenen Zelllinien untersucht. Es ist darauf hinzuweisen, dass alle Untersuchungen mit der gleichen MOI durchgeführt wurden. Es wurden nur Experimente in die Analyse einbezogen, bei denen die Infektionsrate unter 30 % eGFP positiver Zellen lag und mindestens 300 positive Ereignisse im Durchflusszytometer gemessen wurden. Die Analysen wurden mit SC1 durchgeführt.

### 3.3.1 Expressionshemmender Einfluss des Verpackungssignals

Im Abschnitt 3.1 wurde gezeigt, dass sich die Position des internen Promotors direkt stromabwärts der PBS negativ auf die Viruspartikelproduktion auswirkt. Nach stabiler Integration des Provirus in das Wirtsgenom ist der U3-Bereich mit Promotor- und Enhancersequenzen im 5'LTR nicht mehr vorhanden und eine Promotorinterferenz kann ausgeschlossen werden (siehe Kap. 2.3.2). Der interne Promotor initiiert die Transkription. Durch Vergleich der SIN-Vektoren SinSF und SinSF110 kann der Einfluss des Verpackungssignals auf die Transgenexpression untersucht werden (Abb. 13).



**Abb. 13: Hemmender Einfluss von  $\Psi$  auf die Expression**

Der Vergleich der Vektoren SinSF und SinSF110 zeigt, dass sich das Verpackungssignal negativ auf die eGFP-Expression auswirkt. Die mittlere Fluoreszenz von SinSF ist gleich 1 gesetzt.

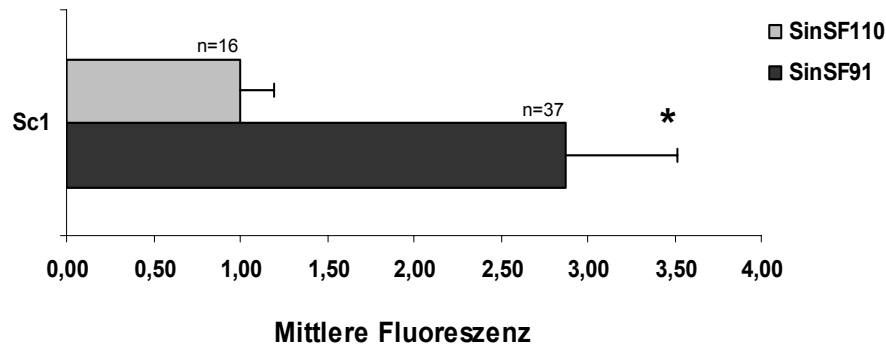
(n = Anzahl unabhängiger Experimente; \* bei  $P < 0,05$ )

Es konnte eine um etwa 50 % verminderte Transgenexpression bei Anwesenheit des Verpackungssignals in der mRNA in SinSF110 festgestellt werden. Das Verpackungssignal, von dem bekannt ist, dass es eine sehr stabile konservierte Sekundärstruktur ausbildet (Coffin, 1996), scheint die Expression oder die Translation der mRNA durch Behinderung der Anlagerung oder Wanderung des Translationskomplexes auf der RNA negativ zu beeinflussen.

### 3.3.2 Expressionssteigerung durch die Gegenwart eines Introns

Da das Verpackungssignal in den untersuchten SIN-Vektoren die Expression des Transgens zu behindern scheint, auf der anderen Seite allerdings in den LTR-Vektoren ebenfalls vorhanden ist, wurde die Auswirkung eines Introns, das das Verpackungssignal enthält, untersucht. Die Expression des Transgens kann hierbei sowohl von gespleißter als

auch von nicht gespleißter RNA erfolgen. Im Folgenden wurden der SIN-Vektor SinSF110 ohne Intron und der SIN-Vektor SinSF91, der ein funktionales Intron enthält, verglichen (Abb. 14).



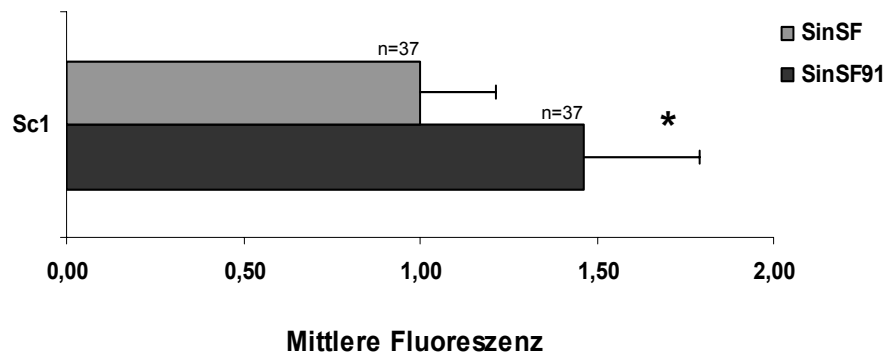
**Abb. 14: Ein Intron steigert die Expression**

Der Vergleich von SinSF91 mit SinSF110 zeigte, dass die Gegenwart eines Introns die Transgenexpression um einen Faktor von drei steigerte. Die mittlere Fluoreszenz von SinSF110 ist gleich 1 gesetzt.

(n = Anzahl unabhängiger Experimente; \* bei  $P < 0,05$ )

Die Experimente zeigten, dass die Gegenwart eines Introns die Expression des Transgens stark förderte. Der Mittelwert der Fluoreszenz war in Gegenwart eines Introns nahezu verdreifacht im Vergleich zu SinSF110. Dies könnte zum einen daran liegen, dass die Expression beeinträchtigende Verpackungssignal nach dem Spleißprozess nicht mehr auf der RNA vorhanden ist. Außerdem ist bekannt, dass gespleißte RNA effizienter in das Zytoplasma transportiert wird, vor Degradation geschützt und besser von der Translationsmaschinerie erkannt wird (Maniatis und Reed, 2002; Nott et al., 2004; Reed und Magni, 2001). Auch allein die Existenz von Spleißstellen ohne Spleißereignis, wie es bei der Virusverpackung erneut bestätigt wurde (Kap. 3.1), fördert die Konzentration der mRNA im Zytoplasma. Da die Ergebnisse dieses Experiments alleine auf der eGFP-Fluoreszenz basieren, können über die RNA-Menge, -Stabilität und die Spleiß- und Exporteffizienz keine Aussagen getroffen werden.

Der Vektor SinSF91 übertrifft in seinem Expressionsniveau auch den konventionell aufgebauten SIN-Vektor SinSF um etwa 50 % (Abb. 15).

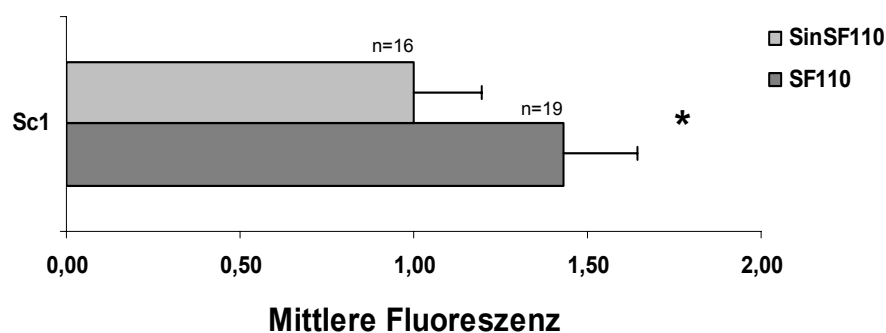


**Abb. 15: Das neue Vektordesign ist auch gegenüber der konventionellen SIN-Vektorkonfiguration die Transgenexpression betreffend von Vorteil**

Auch gegen den konventionellen SinSF zeigte die neue Konstruktion in SinSF91 eine verbesserte Transgenexpression. Die mittlere Fluoreszenz ist in SinSF91 um 50 % erhöht. Die mittlere Fluoreszenz von SinSF ist gleich 1 gesetzt.  
(n = Anzahl unabhängiger Experimente; \* bei  $P < 0,05$ )

### 3.3.3 Ein interner Promotor schwächt die Transgenexpression

Hinsichtlich der weiteren Optimierung der SIN-Vektoren liefert der direkte Vergleich mit den LTR-Vektoren zusätzliche Rückschlüsse. Der Einfluss der internen Promotorposition auf die Transgenexpression kann am besten im direkten Vergleich des LTR-Vektors SF110 mit dem SIN-Vektor SinSF110 beurteilt werden (Abb. 16).



**Abb. 16: Der interne Promotor in SinSF110 schwächt die Transgenexpression**

Der LTR-Vektor SF110 exprimierte das Transgen in den murinen Fibroblasten um fast 50 % stärker. Die mittlere Fluoreszenz von SinSF110 ist gleich 1 gesetzt.  
(n = Anzahl unabhängiger Experimente; \* bei  $P < 0,05$ )

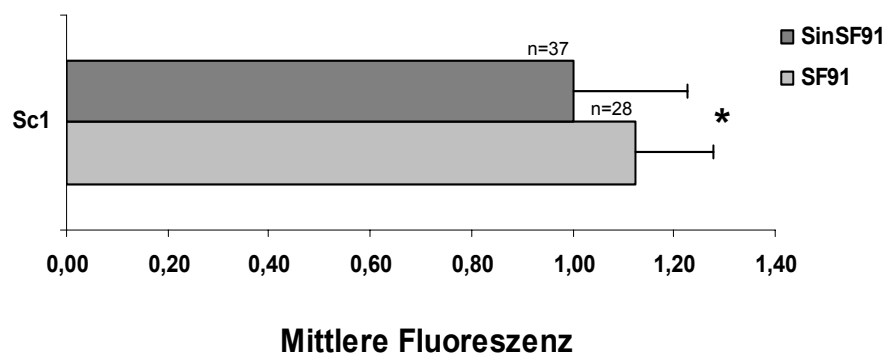
Beide Vektoren besitzen eine weitestgehend identische 5'UTR. Der interne Promotor des SinSF110 befindet sich außerhalb des 5'LTR stromabwärts der PBS (Abb. 10A). Die 5'UTR unterscheidet sich daher in 150 Basen (Base 33 – 182 bezogen auf Cap), die dem Transkript des SIN-Vektors fehlen. Dieser Bereich umfasst die zweite Hälfte der R-Region,

die U5-Region, die PBS und die 19 Basen bis zur Integrationsstelle des internen Promotors (vergl. Abb. 7 und Abb. 10A; Abb. 27).

Die transduzierten murinen Fibroblasten SC1 zeigten eine um den Faktor 1,4 bessere Expression des Transgens unter LTR-Kontrolle. Neben der beschriebenen Differenz in der 5'UTR kann die bessere Expression bei den LTR-Vektoren auch auf die Verdoppelung des Enhancerbereichs zurückzuführen sein. Bei der Transgenexpression in der Zielzelle besitzen die SIN-Vektoren durch die nahezu vollständige Deletion des U3-Bereichs im LTR im Gegensatz zu dem doppelten Satz bei den LTR-Vektoren nur einen einfachen Satz der Enhancersequenzen im internen Promotor.

### 3.3.4 Effizientere RNA-Prozessierung von SIN-Vektoren mit Intron?

Um die Hypothese zu überprüfen, dass die niedrigere Transgenexpression von SinSF110 im Vergleich zu SF110 auf die einfache Version der Enhancersequenzen zurückzuführen ist, wurde der Vektorvergleich auf die korrespondierenden Vektoren mit funktionalem Intron übertragen. Der entsprechende Vektorvergleich von SF91 zu SinSF91 ergab eine ähnliche Transgenexpression durch beide Vektoren (Abb. 17).



**Abb. 17: LTR versus SIN im Kontext eines Introns**

Wie in der vorigen Abbildung (Abb. 16) wurde die LTR-gesteuerte Transgenexpression mit der intern initiierten verglichen. Diesmal wurden die Vektoren SF91 und SinSF91, die ein Intron tragen, verglichen. Die mittlere Fluoreszenz von SinSF91 ist gleich 1 gesetzt. (n = Anzahl unabhängiger Experimente; \* bei  $P < 0,05$ )

Trotz des statistisch ermittelten signifikanten Unterschieds beider untersuchten Vektoren lag die Differenz der Genexpression bei nur 10 %. Die Spleißsignale dieser Vektoren scheinen die Transgenexpression des SIN-Vektors im Verhältnis stärker zu fördern als die des LTR-Vektors (siehe Vergleich SF110/SinSF110, Abb. 16).

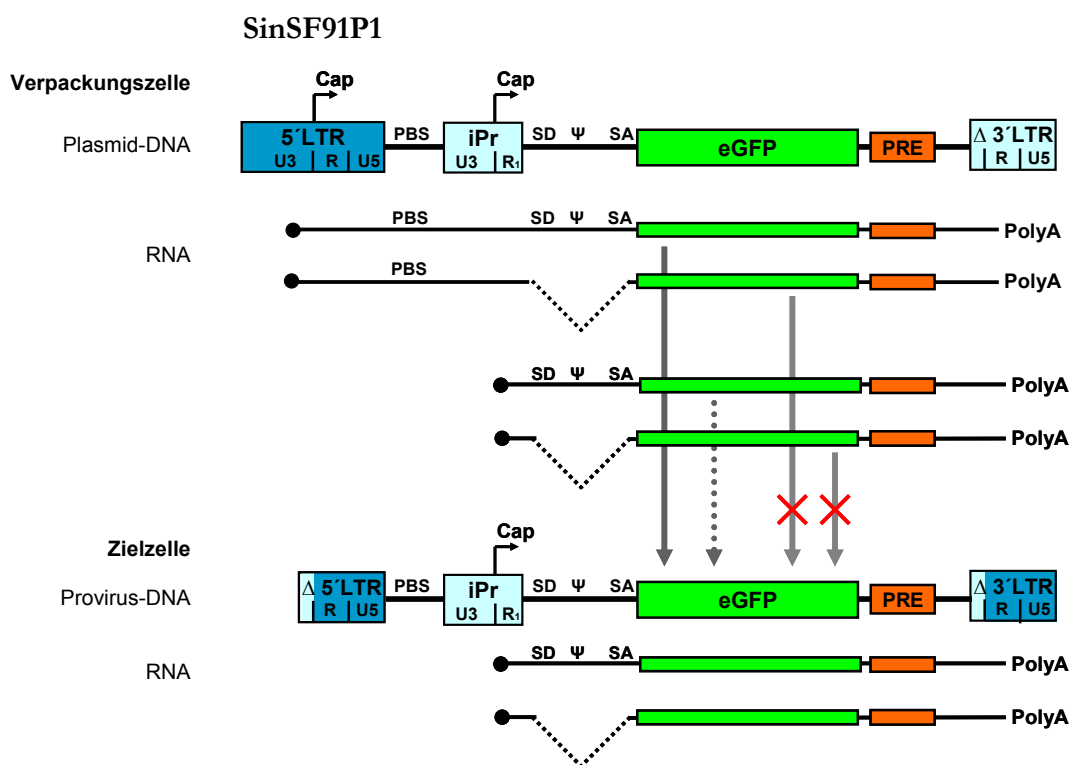
Mit Hilfe des Vektorvergleichs konnte in den vorangegangenen Experimenten gezeigt werden, dass das Verpackungssignal auf der RNA einen hemmenden Einfluss auf die Transgenexpression hat. Wird jedoch das Verpackungssignal in ein Intron integriert kann die Expression um das dreifache gesteigert werden. Die interne Promotorposition in Kombination mit einer einfachen Version an Enhancersequenzen in SIN-Vektoren reduziert die Genexpression um 30 %. Ein zusätzlich integriertes Intron wirkte sich stärker auf SIN-Vektoren aus und konnte den Expressionsverlust trotz einer einfachen Version an Enhancersequenzen kompensieren. Auf eine möglicherweise unterschiedliche RNA-Prozessierung in SIN- und LTR-Vektoren, die diese Kompensation gestattete, wird ab dem Kapitel 3.6 eingegangen.

Die in den murinen Fibroblasten gewonnenen Ergebnisse konnten in der humanen Fibroblastenzelllinie HT1080 reproduziert werden (Kraunus et al., 2004).

### 3.4 Das posttranskriptionelle regulatorische Element (PRE) steigert den Titer und die Genexpression

Das posttranskriptionelle regulatorische Element (PRE) des Woodchuck Hepatitisvirus kann die Genexpression in retro- und auch lentiviralen Vektoren steigern (Zufferey et al., 1999). Die Expressionssteigerung ist vermutlich auf eine veränderte RNA-Prozessierung im Hinblick auf Polyadenylierung, Export und Stabilität der RNA zurückzuführen (Donello et al., 1998; Huang et al., 1999; Loeb et al., 1999; Popa et al., 2002).

Um den Einfluss des PRE auf die RNA-Prozessierung im Kontext von SIN-Vektoren beurteilen zu können, wurde das 900 bp gamma-PRE (Schambach et al., 2000) in die 3'UTR stromaufwärts des 3'LTR integriert und resultierte damit in SinSF91P1 (Abb. 18).

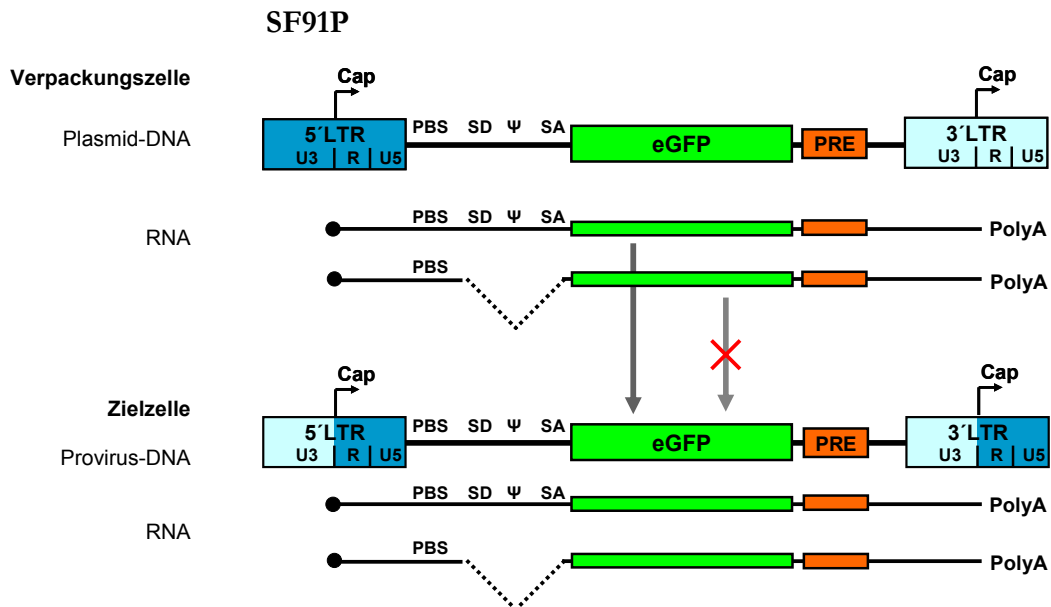


**Abb. 18: SinSF91P1 trägt das PRE in der 3'UTR**

Auf der Grundlage von SinSF91 wurde ein weiterer SIN-Vektor konstruiert, der das PRE des Woodchuck Hepatitisvirus stromabwärts der kodierenden Region in der 3'UTR stromaufwärts des 3'LTR trägt (SinSF91P1).

- > verpackungsfähige und revers transkribierbare RNA
- .....> verpackungsfähige nicht revers transkribierbare RNA
- X——> nicht verpackbare RNA

Um zudem einen Vergleich mit den LTR-Vektoren zu ermöglichen, wurde ein dem SinSF91P1 entsprechender LTR-Vektor SF91P von A. Schambach (Schambach et al., 2000) zur Verfügung gestellt (Abb. 19).



**Abb. 19: LTR-Vektor SF91P trägt das PRE in der 3'UTR**

Der LTR-Vektor SF91P trägt das PRE des Woodchuck Hepatitisvirus stromabwärts von eGFP außerhalb des 3'LTR entsprechend der Konstruktion von SinSF91P1. Damit stellt er eine Kontrolle für diese SIN-Vektoren dar.

—————→ verpackungsfähige und revers transkribierbare RNA  
 ————X——→ nicht verpackbare RNA

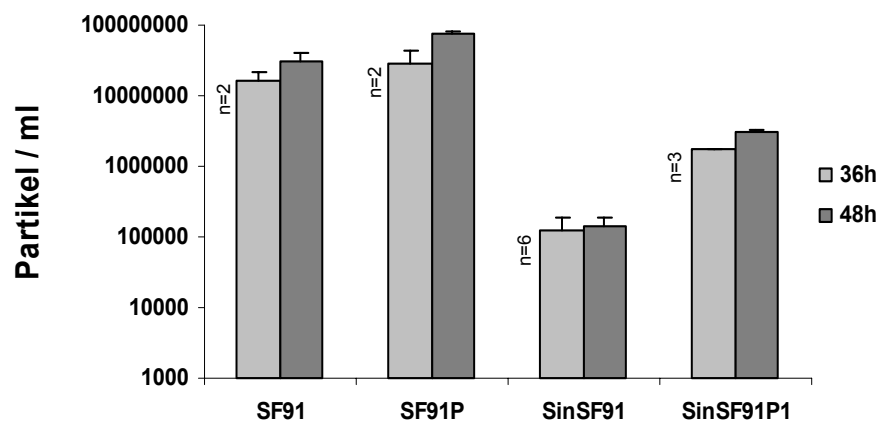
Innerhalb jeder Vektorgruppe (SIN bzw. LTR) sollte der Einfluss des PRE auf den Virustiter und auf die Transgenexpression überprüft werden. Außerdem sollte untersucht werden, ob das PRE abhängig von der Vektorkonfiguration (SIN oder LTR) unterschiedliche Auswirkungen hat.

### 3.4.1 Das PRE ermöglicht eine 20-fache Titersteigerung in SIN-Vektoren

Zunächst wurden die PRE-tragenden Vektoren SF91P und SinSF91P1 im Vergleich zu korrespondierenden Vektoren SF91 und SinSF91 auf ihre Virustiter untersucht. Die Ergebnisse dieser Klonierungen waren vielversprechend. Die Eco-Verpackung in Phönix-gp mit anschließender Titerbestimmung in SC1 zeigte für beide PRE-Varianten eine deutliche Steigerung der Partikelkonzentration (Abb. 20).

Betrachtet man die 48h-Überstände so konnte in den LTR-Vektoren der Virustiter durch Integration des PRE von  $3 \times 10^7$  Partikel/ml auf  $6 \times 10^7$  Partikel/ml verdoppelt werden. Der Vergleich mit den entsprechenden SIN-Vektoren SinSF91 und SinSF91P1 zeigte, dass

die Produktion von Viruspartikeln in den SIN-Vektoren noch deutlich eingeschränkt ist. Konnte der Titer im LTR-Kontext jedoch nur verdoppelt werden, hat das PRE im SIN-Kontext den Titer um einen Faktor von 20 bei den 48h-Überständen gesteigert. Der Titer erreichte  $3 \times 10^6$  Partikel/ml für SinSF91P1 (vergleiche  $1,4 \times 10^5$  Partikel/ml in SinSF91). Damit lag dieser erstmals in einem Bereich, der für die Transduktion primärer hämatopoetischer Zellen geeignet ist.



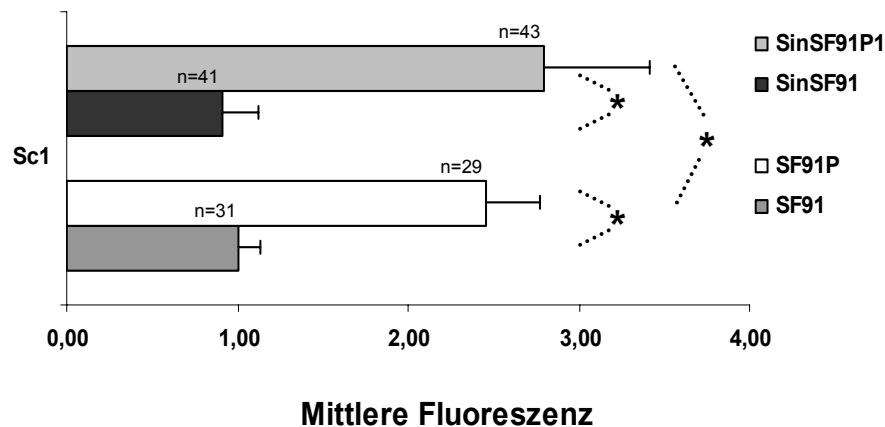
**Abb. 20: Das PRE beeinflusst den Titer positiv**

Im Vergleich sind die Titer der 36h- und 48h-Überstände der LTR- und SIN-Vektoren mit Intron basierend auf SF91 und SinSF91 mit und ohne PRE aus zwei bis sechs unabhängigen Experimenten dargestellt. Wesentlich stärker als auf den LTR-Vektor SF91 wirkte sich die Integration des PRE auf die Titerproduktion bei dem SIN-Vektor SinSF91 aus. Die Integration des PRE in die 3'UTR ermöglichte hier eine 20-fache Titersteigerung auf bis zu  $3 \times 10^6$  Partikel/ml (48h-Überstand).

### 3.4.2 Das PRE verstärkt die Genexpression in SIN- und LTR-Vektoren

Neben der deutlichen Verbesserung der Virustiter besonders die SIN-Vektoren betreffend sollten die Vektoren nun auf die Transgenexpression in SC1 untersucht werden.

Die Integration der PRE-Sequenz bewirkte bei dem LTR-Vektor eine Steigerung der Expression um das 2,5-fache, bei dem SIN-Vektor um das 3-fache (Abb. 21). Damit erreichte bzw. übertraf die eGFP-Expression von SinSF91P1 sogar die Transgenexpression von SF91P.



**Abb. 21: Das PRE hebt die Transgenexpression um das 2- bis 3-fache**

Sowohl in dem LTR- als auch in dem SIN-Vektor konnte eine Erhöhung der Transgenexpression durch Integration des PRE in die 3'UTR beobachtet werden. Die PRE-Integration in SinSF91 sorgte für eine Expressionssteigerung um den Faktor 3. Damit hebt das PRE die Genexpression der SIN-Vektoren auf LTR-Niveau. Die mittlere Fluoreszenz von SinSF91 ist gleich 1 gesetzt.

(n = Anzahl unabhängiger Experimente; \* bei  $P < 0,05$ )

Neben der Integration des PRE in die 3'UTR stromaufwärts des 3'LTR wurde ein weiterer SIN-Vektor konstruiert, der im Unterschied zu SinSF91P1 das PRE in der 3'UTR im 3'LTR trägt. Bei dieser Version (SinSF91P2) wird bei der Synthese des Provirus das PRE verdoppelt und in den 5'LTR übertragen. Dieser Vektor zeigte bezüglich des Titers als auch der Transgenexpression geringgradig niedrigere Werte (Daten nicht gezeigt). Folglich hat eine Verdoppelung des PRE in den 5'UTR keinen weiteren fördernden Einfluss auf Virustiter oder Genexpression.

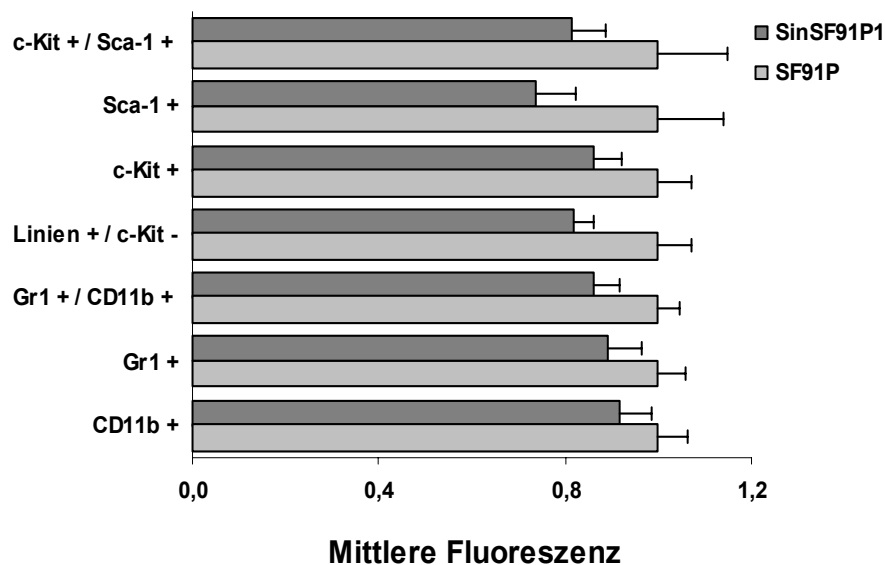
Mit der Analyse PRE-tragender Vektoren konnte demonstriert werden, dass das PRE sich positiv auf die Virustiter auswirkte mit einem wesentlich größeren Einfluss auf die SIN-Vektoren. Zum ersten Mal eignen sich die Virusüberstände von SIN-Vektoren für die Transduktion primärer hämatopoetischer Zellen. Die Genexpression wurde durch das PRE in der 3'UTR in SIN- und LTR-Vektoren in ähnlichem Maße angehoben.

### 3.5 Optimierte SIN-Vektoren sind geeignet für die Transduktion muriner Knochenmarkzellen

Ein Ziel dieser Arbeit bestand in der erfolgreichen Entwicklung von retroviralen Vektoren mit gesteigertem Sicherheitsanspruch, die bei Anwendungen mit hämatopoetischen Zellen eingesetzt werden können. Um die Effizienz der SIN-Vektoren in diesen Zellen zu überprüfen, wurden murine Knochenmarkzellen mit ausgewählten Vektoren transduziert.

Es wurde der SIN-Vektor SinSF91P1 eingesetzt, der den höchsten erreichbaren Titer und die beste Transgenexpression in den bislang untersuchten Zelltypen zeigte. Verglichen wurde dieser mit dem korrespondierenden LTR-Vektor SF91P, der ebenfalls spleißkompetent ist und ein PRE in der 3'UTR trägt.

Um zu prüfen, ob sich der SIN-Vektor SinSF91P1 für die Transduktion von Knochenmarkzellen eignet, mussten zunächst Differenzierungsmarker-negative („liniennegative“) Vorläuferzellen angereichert werden (siehe Kap. 2.2.3.2) (Li et al., 2003). Die Liniendepletion erlaubte eine Anreicherung von liniennegativen und c-Kit-positiven Zellen von 1,37 % vor der Aufreinigung auf 57,89 % nach der Aufreinigung. Die seltene Fraktion der sowohl c-Kit- als auch Sca-1-positiven Zellen konnte von 1,17 % auf 4,4 % angereichert werden. Die Transduktionseffizienz der gewonnenen Zellen wurde zudem durch den Einsatz von Retronektin gesteigert (siehe Kap. 2.2.3.2). Die aufgereinigte liniennegative Fraktion wurde für jeden Vektor mit einer relativen MOI von 2,8 und von 0,9 jeweils in Doppelbestimmungen auf Retronektin-beschichteten Platten transduziert.



**Abb. 22: Vergleichbar hohe Transgenexpression von SIN- und LTR-Vektoren acht Tage nach Transduktion muriner Knochenmarkzellen**

Die eGFP-Expression durch die Vektoren SF91P und SinSF91P1 in murinen Knochenmarkzellen ist acht Tage nach Transduktion dargestellt. Die Populationen wurden mit verschiedenen Linienmarkern im Durchflusszytometer vermessen. Beide Vektoren exprimierten das Transgen mit ähnlich hohem Niveau. Damit scheint sich der retrovirale SIN-Vektor SinSF91P1 für die Transduktion muriner Knochenmarkzellen zu eignen. Die mittlere Fluoreszenz durch den Vektor SF91P wurde gleich 1 gesetzt. Die Ergebnisse jedes Vektors resultieren aus vier unabhängigen Experimenten (n=4). Mit Ausnahme der Gr1- und der CD11b-positiven Populationen ist  $P < 0,05$ .

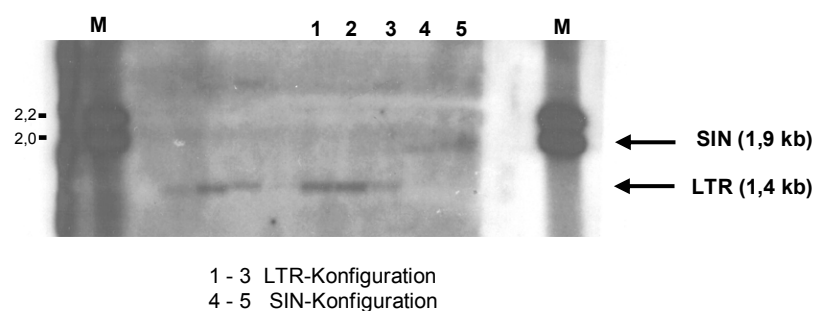
Die Transduktionseffizienz für den LTR-Vektor SF91P betrug bei einer MOI von 2,8 ca. 8 % und bei einer MOI von 0,9 ca. 3,5 % eGFP-positive Zellen, bei dem SIN-Vektor SinSF91P1 trotz gleicher Bedingungen nur ca. 5 % (MOI 2,8) und 2 % (MOI 0,9).

Die transduzierten Knochenmarkzellen wurden 8 Tage in zytokinhaltigem Medium kultiviert. An Tag 8 nach Transduktion wurden die Zellen im Durchflusszytometer nach den Linienmarkern getrennt auf ihre eGFP-Expression untersucht. Die Transgenexpression zeigte in allen untersuchten Zellpopulationen für beide Vektoren ein vergleichbar hohes Expressionsniveau (10 bis 20 % Differenz von SF91P und SinSF91P1). Eine Ausnahme bildete die frühe Sca1-positive Population, die für den SIN-Vektor eine um 30 % reduzierte Transgenexpression vorwies (Abb. 22).

Zusammenfassend untermauern die Daten die prinzipielle Eignung des Vektors SinSF91P1 für den Gentransfer in unreife Knochenmarkzellen. Acht Tage nach Transduktion erreichte die Expression des SIN-Vektors mit Ausnahme der Sca-1-positiven Population nahezu das Niveau der LTR-Vektoren.

### 3.5.1 Korrekte Provirusintegration

Die korrekte Größe der in das Wirtsgenom integrierten Proviren wurde nach DNA-Präparation in einem Southernblot überprüft. Das verwendete Restriktionsenzym KpnI schneidet provirale DNA in der R-Region und direkt 3' des Transgens eGFP. Da die Transduktionseffizienz insbesondere im Fall des SIN-Vektors gering war, sind nur sehr schwache Banden zu erkennen, die aber die erwartete Größe beschreiben.



#### Abb. 23: Nachweis der Vektorintegration

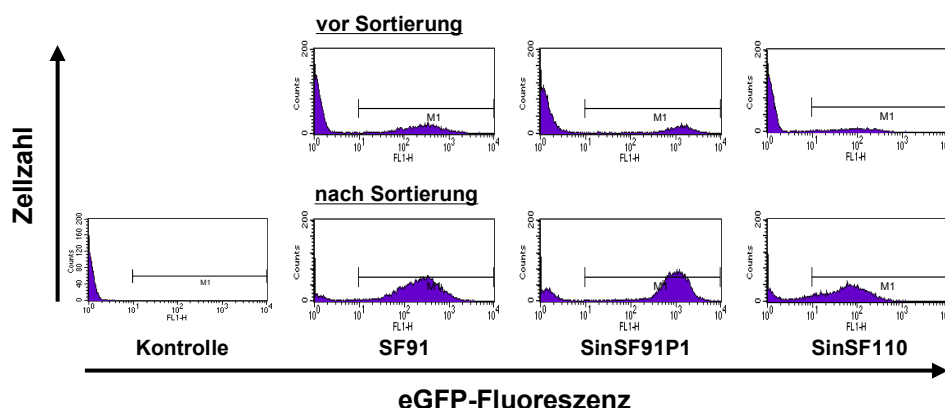
Zum Nachweis der korrekten Vektorintegration wurde die genomische DNA der transduzierten Knochenmarkzellen aufgereinigt und die DNA im Southernblot untersucht. Das Restriktionsenzym KpnI erzeugt DNA-Fragmente von 1,4 kb bei genomischer DNA, die den Provirus des LTR-Vektors SF91P trägt. Der integrierte SIN-Vektor SinSF91P1 verursacht 1,9 kb große Banden. Aufgrund der geringen Transduktionsrate vor allem des SIN-Vektors sind die Banden nur schwach, aber in der korrekten Größe nachweisbar. (Größenstandard in kb)

### 3.6 Optimierte SIN-Vektoren zeigen eine effiziente RNA-Prozessierung

In den bisher beschriebenen Experimenten wurde das Expressionsniveau von konstruierten LTR- und SIN-Vektoren allein auf Proteinebene mit Hilfe der Fluoreszenz von eGFP im Durchflusszytometer untersucht. Neben den zuvor erwähnten Zellsystemen, zeigte der SIN-Vektor mit Intron und PRE auch in murinen und humanen Lymphozyten sowie in embryonalen Stammzellen eine ähnlich hohe oder sogar erhöhte eGFP-Expression im Vergleich zu korrespondierenden LTR-Vektoren (in Zusammenarbeit mit: Dr. B. Fehse, Universitätskrankenhaus Eppendorf, Hamburg; Dr. G. Brandenburg, Georg Speyer Haus, Frankfurt; Dr. W. Zheng, Medizinische Hochschule Hannover, Hannover) (Kraunus et al., 2004).

Die hohe Expression der SIN-Vektoren ist insofern überraschend, da diese gegenüber der doppelten Version in LTR-Vektoren nur einen Enhancerbereich für die Expressionsverstärkung zur Verfügung haben. Da Enhancerbereiche mit Bindungsstellen für Aktivatoren und Repressoren nur einen von mehreren beeinflussenden Faktoren für die Regulation der Genexpression darstellen, könnte auch eine veränderte RNA-Prozessierung oder Translationseffizienz die positiven Eigenschaften der SIN-Vektoren erklären.

Im Folgenden wurde eine detaillierte Analyse der Regulation der RNA- und Proteinexpression unternommen. Zunächst wurde die Gesamtzell-RNA vektortransduzierter SC1-Zellen in einem Northernblot auf ihre Spleißeffizienz untersucht. Außerdem sollte die Translationseffizienz der Vektoren beurteilt werden.



**Abb. 24: Anreicherung eGFP-exprimierender SC1 durch Sortierung**

Um die transduzierten Zellen auf ihre Vektor-RNA-Expression untersuchen zu können, wurden die Zellen durch Sortierung auf eGFP-positive Zellen angereichert. Es konnten Massenkulturen mit 60 bis 90 % eGFP-positiven SC1 hergestellt werden. Die Ergebnisse sind beispielhaft an drei ausgewählten Zellpopulationen dargestellt. Für die prozentualen Anteile eGFP-positiver Zellen vor und nach Zellsortierung siehe Tab. 4.

| Vektoren   |           | % eGFP-positive Zellen |       |
|------------|-----------|------------------------|-------|
|            |           | vor                    | nach  |
|            |           | Sortierung             |       |
| <b>LTR</b> | SF91      | 25,07                  | 92,85 |
|            | SF91P     | 9,87                   | 85,62 |
|            | SF110     | 26,88                  | 87,4  |
| <b>SIN</b> | SINSF     | 15,53                  | 87,03 |
|            | SINSF91   | 16,64                  | 62,15 |
|            | SINSF91P1 | 16,11                  | 83,25 |
|            | SINSF110  | 11,07                  | 75,22 |

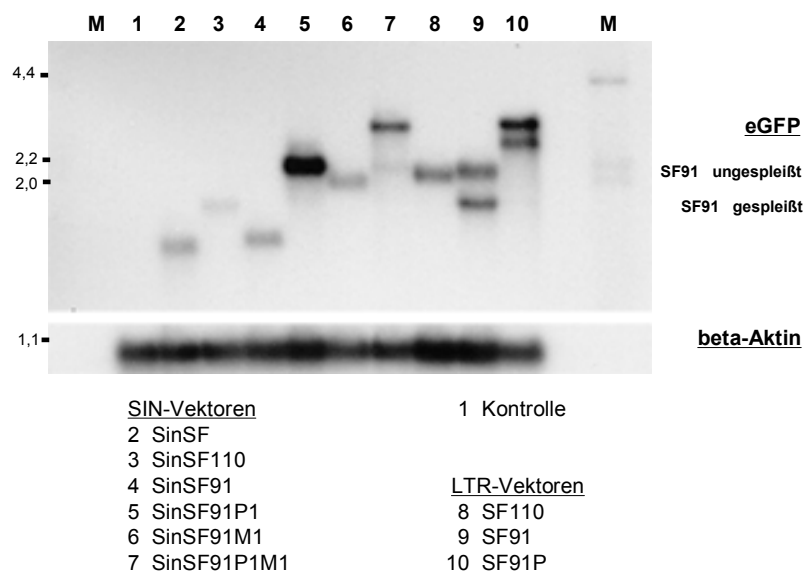
**Tab. 4: SC1-Massenkulturen mit 60 bis 90 % eGFP-positiven Zellen nach Sortierung**  
 Durch Sortierung der mit den verschiedenen Vektorkonstrukten transduzierten SC1 konnten Massenkulturen mit 60 bis 90 % eGFP-positiven Zellen hergestellt werden.

Um das Transgen eGFP nachweisen zu können, wurden die mit den unterschiedlichen Konstrukten transduzierten Fibroblasten zur Anreicherung eGFP-exprimierender Zellen sortiert. Dabei wurden Massenkulturen mit einem Anteil von 60 bis 90 % eGFP-positiven Zellen generiert (Abb. 24, Tab. 4). Wegen der moderaten Transduktionsrate vor Sortierung lag in den meisten Zellen mit hoher Wahrscheinlichkeit nur eine Genkopie vor.

### 3.6.1 Introntragende SIN-Vektoren mit hoher Spleißeffizienz

Zur Spleißanalyse von SIN- und LTR-Vektoren wurde von den eben beschriebenen sortierten Massenkulturen die RNA gewonnen und in einem Northernblot mit einer radioaktiv markierten Sonde auf die Transkription des Transgens eGFP untersucht. Die in Abb. 25 dargestellten Ergebnisse spiegeln die Gesamtzell-RNA wider. In Bahn 2 bis Bahn 7 sind verschiedene SIN-Vektorvarianten zu finden, wobei in Bahn 4 bis Bahn 7 intronhaltige SIN-Vektoren dargestellt sind. In Bahn 8 bis Bahn 10 befinden sich die LTR-Vektoren mit introntragenden Vektoren in Bahn 9 und 10.

Der Northernblot zeigte, dass der LTR-gesteuerte Vektor SF91 (Abb. 25, Bahn 9) das balancierte Spleißen widerspiegelt, wie es für das Wildtypvirus beschrieben ist. Mit diesem Vektor transduzierte Zellen zeigten das gespleißte eGFP-Transkript von 1700 b und das ungespleißte Transkript von 2150 b. Auch für den LTR-Vektor SF91P konnte das balancierte Spleißen mit Transkripten von 2600 b und 3050 b bestätigt werden (Abb. 25, Bahn 10). Der Vektor SF110 konnte aufgrund des nicht vorhandenen Introns nur ungespleißte RNA produzieren. Für diesen Vektor war die ungespleißte RNA von 2090 b zu detektieren (Abb. 25, Bahn 8).



**Abb. 25: Hohe Spleißeffizienz introntragender SIN-Vektoren**

Die aus transduzierten SC1 isolierte RNA wurde mit einer Sonde gegen die eGFP-RNA zur Identifizierung retroviraler RNA analysiert. Die RNA-Menge wurde abgeglichen gegen die Menge an beta-Aktin-RNA. Trotz identischer Spleißdonor- und -akzeptorstellen ihrer RNA konnte bei den SIN-Vektoren SinSF91 (Bahn 4) und SinSF91P (Bahn 5) kein balanciertes Spleißen wie es für die analogen LTR-Vektoren SF91 (Bahn 9) und SF91P (Bahn 10) typisch ist, festgestellt werden. Die Vektoren SinSF91M1 und SinSF91M1P1 sind zwei weitere retrovirale Konstrukte, auf die im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter eingegangen wurde (Bahnen 6 und 7).

(K: Kontrolle; M: Größenmarker; Größenangaben am linken Rand in kb)

Alle SIN-Vektoren zeigten nur ein eGFP-Transkript im Northernblot. Hierbei handelte es sich bei den spleißinkompetenten Vektoren SinSF (1100 b) und SinSF110 (1600 b) um das genomische RNA-Transkript, bei den spleißkompetenten Vektoren SinSF91 (1200 b und 1600 b) und SinSF91P1 (2100 b und 2550 b) um die jeweils kürzere gespleißte RNA (Abb. 25, Bahnen 2-5). Das Gesamt-RNA-Transkript konnte bei letzteren nicht bzw. nur in Spuren detektiert werden.

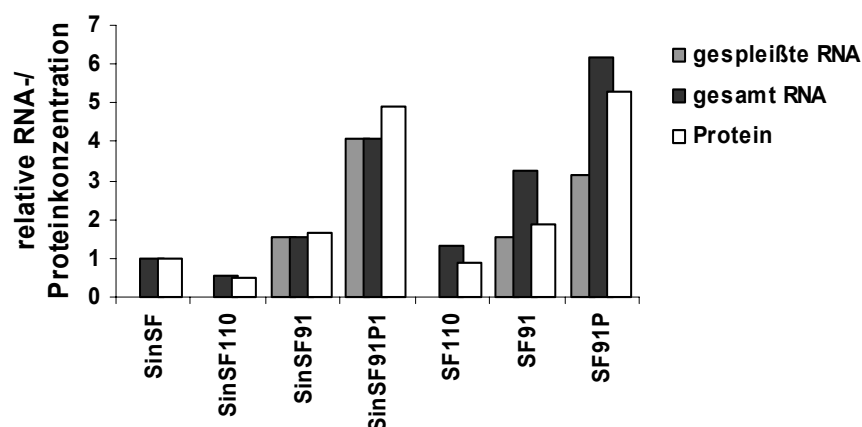
Die Regulation des balancierten Spleißens einfacher Retroviren wurde bisher auf schwache 3'-Spleißsequenzen zurückgeführt, die entweder dem Spleißakzeptor oder dem Verzweigungspunkt (branch point) zugeordnet wurden (Katz und Skalka, 1990; Pollard und Malim, 1998). Der hier festgestellte Effekt, dass die SIN-Vektoren mit Intron nur gespleißte RNA im Northernblot zeigen, ist überraschend, da korrespondierende LTR- und SIN-Vektoren über identische Spleiß- und Intronsequenzen verfügen. Da hier Gesamtzellextrakt untersucht wurde, konnte zu diesem Zeitpunkt keine Aussage darüber gemacht werden, ob es sich um ein verändertes Spleißmuster handelt oder ob der RNA-Export so betroffen ist, dass SIN-Vektoren eventuell ungespleißte RNA nicht exportieren können und diese im Zellkern schneller degradiert wird.

Für die introntragenden LTR-Vektoren konnte das balancierte Spleißen, wie es für den Lebenszyklus von Retroviren notwendig ist, nachgewiesen werden. Obwohl die LTR- und die SIN-Vektorkonfigurationen über identische SD- und SA-Sequenzen verfügen, produzierten die spleißkompetenten SIN-Vektoren zumindest in Bezug auf die Gesamtzell-RNA fast ausschließlich gespleißte RNA.

### 3.6.2 Gesteigerte Translation in SIN-Vektoren

Trotz der einfachen Promotor/Enhancersequenzen in der SIN-Vektorkonfiguration konnten mit diesen Vektoren vergleichbar hohe Transgenexpressionen in verschiedenen Zellsystemen erreicht werden wie mit analogen LTR-Vektoren (Kraunus et al., 2004). Neben der im vorigen Abschnitt beschriebenen erhöhten Spleißeffizienz introntragender SIN-Vektoren sollte der Einfluss der Vektorkonfiguration auf die Translation ermittelt werden.

Gleichzeitig mit der Ernte der Zellen für die RNA-Präparation wurden diese im Durchflusszytometer auf ihre Proteinexpression, gemessen an der eGFP-Fluoreszenz, analysiert. Die folgende Abbildung (Abb. 26) zeigt das Ergebnis der Proteindaten im Abgleich mit im RNA-Blot ermittelten RNA-Mengen. Das Diagramm stellt für jeden Vektor im Vergleich die RNA-Gesamtmenge als schwarze Säule und den darin enthaltenen Anteil an gespleißter RNA als graue Säule dar. Die im Durchflusszytometer detektierte Proteinmenge ist rechts daneben als weiße Säule zu erkennen. Dabei wurden die Werte des SIN-Vektors SinSF gleich 1 gesetzt.



**Abb. 26: RNA-Prozessierung ist effizienter in SIN-Vektoren**

Der Abgleich der RNA- und Proteinmengen bezieht auch den Anteil an gespleißter RNA von der Gesamt-RNA mit ein. Die RNA-Mengen wurden im Phosphoimager quantifiziert und gegen die beta-Aktin-RNA abgeglichen. Die eGFP-Menge wurde mit Hilfe der Fluoreszenz in der Durchflusszytometrie ermittelt. Die RNA- und Proteinmenge von SinSF wurde jeweils gleich 1 gesetzt.

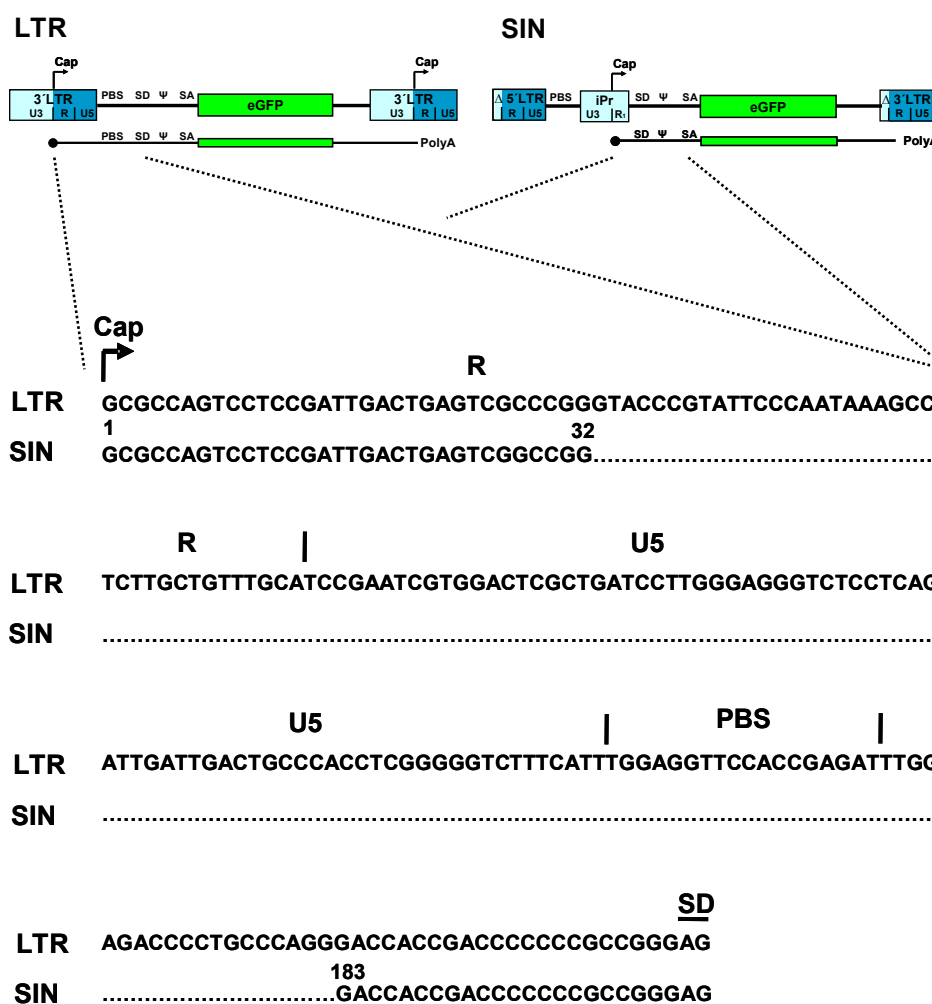
Betrachtete man die Vektoren, die aufgrund nicht vorhandener Spleißstellen nur genomische RNA exprimieren können und  $\Psi$  in der 5'UTR enthalten (SinSF110, SF110), so fiel eine relativ zu der RNA-Menge herabgesetzte Proteinmenge auf. Dies galt verstärkt für SF110 gegenüber SinSF110. Beide Vektoren enthalten in ihrer RNA-Sequenz das Verpackungssignal, das die Proteinexpressionsmaschinerie passieren muss. Eine Ausnahme bildet SinSF. Dieser Vektor besitzt ebenfalls kein Intron, allerdings befindet sich der Promotor direkt vor dem Transgen, weshalb keine Verpackungssequenz überlesen werden muss.

Bei etwa gleichen Proteindaten von korrespondierenden Vektoren wie SF91 und SinSF91 bzw. SF91P und SinSF91P1 war der Unterschied der RNA-Menge auffällig. Bezogen auf die Gesamt-RNA-Menge konnten die SIN-Vektoren ihre RNA scheinbar besser prozessieren. Die beiden SIN-Vektoren SinSF91 und SinSF91P1 produzierten zu über 90 % gespleißte RNA, die effektiv in Protein übersetzt wurde. Die beiden LTR-Vektoren SF91 und SF91P zeigten zwar eine ähnliche Proteinmenge wie die entsprechenden SIN-Vektoren, allerdings war eine höhere RNA-Menge notwendig, um dieses Expressionsniveau zu erreichen. Die RNA-Menge setzte sich höchstens zur Hälfte aus gut translatierbarer gespleißter RNA zusammen. Die andere Hälfte, bei dem PRE-Vektor ein größerer Anteil, bestand aus ungespleißter RNA, die inklusive Verpackungssignal zur Translation herangezogen werden musste.

Die Daten weisen darauf hin, dass die Proteinexpression der SIN-Vektoren effizienter abläuft als die der LTR-Vektoren. Zum Teil scheint ein verändertes Spleißverhältnis mit einem höheren Anteil gespleißter RNA dafür verantwortlich zu sein. Ein verändertes Spleißverhältnis wie es hier für die SIN-Vektoren beschrieben werden konnte, könnte außerdem den geringen Titer dieser Vektoren erklären (Kap. 4.3).

### **3.7 Sequenzabschnitte des untranslatierten ersten Exons regulieren das balancierte Spleißen**

In den vorangegangenen Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass die RNA der untersuchten SIN-Vektoren effizienter als die der LTR-Vektoren prozessiert wurde. Die RNA-Expression und -Prozessierung geschieht nach der Integration des Provirus in die Wirts-DNA. Die Sequenzen des SD, SA und des Verzweigungspunktes sind in LTR- und SIN-Vektoren identisch. Ein Sequenzvergleich beider Vektorkonfigurationen auf RNA-Ebene erlaubt, unterschiedliche *cis*-Elemente dieser ausfindig zu machen, die den abweichenden Spleißprozess der Vektoren regulatorisch beeinflussen könnten (Abb. 27).



**Abb. 27: Basen 33-182 fehlen in der 5'UTR von SIN-Vektoren**

Regionen der 5'UTR in der Wirtszelle, die in LTR- und SIN-Vektoren identisch sind, umfassen die ersten 32 Basen der R-Region und Sequenzen stromabwärts der Base 182 von Cap aus. Auf der RNA von SIN-Vektoren nicht mehr vorhandene Sequenzen bestehen aus der zweiten Hälfte der R-Region, der U5-Region der PBS und 19 Basen stromabwärts der PBS.

Identische Bereiche der beiden Vektorkonfigurationen auf RNA-Ebene sind die Cap-Region inklusive der ersten 32 Basen der R-Region (eine Punktmutation an Base 28). Außerdem entsprechen sich die Regionen der 5'UTR beginnend 20 Basen stromabwärts der PBS (Base 183 bezogen auf Cap), die den SD, das Verpackungssignal, den Verzweigungspunkt und den SA beinhalten. Identisch ist auch die für das Transgen kodierende Region und die 3'UTR, was die Basen stromabwärts des Transgens bis zum 3'LTR und die R-Region im 3'LTR mit dem Polyadenylierungssignal betrifft.

Unterschiede der beiden Vektorkonstruktionen auf der RNA-Ebene befinden sich in der 5'UTR sowie im 3'LTR-U3-Bereich. In beiden Regionen bestehen bei den SIN-Vektoren Deletionen. Beim SIN-Vektor fehlen in der 5'UTR die zweite Hälfte der R-Region (Basen

+33 - +69 bezogen auf Cap), die U5-Region (Basen +70 - +145), die PBS (Basen +146 - +163) und die 19 Basen stromabwärts der PBS.

Anhand der Unterschiede in der RNA-Sequenz von LTR- und SIN-Vektoren wurden auf der Basis des LTR-Vektors SF91 unterschiedliche Mutanten des untranslatierten ersten Exons (5'UTR stromaufwärts des SD) konstruiert und auf ihre Auswirkungen bezüglich der RNA-Prozessierung und Proteinexpression untersucht. Da einige Mutationen nicht mit einem vollständigen Lebenszyklus des Retrovirus kompatibel sind, wurde für die folgenden Experimente ein transientes Expressionssystem gewählt. Hierbei wurden die Auswirkungen von Deletionen ausgewählter Regionen der 5'UTR auf den Spleißprozess 48 Stunden nach Transfektion analysiert. Um auf der Transkriptionsebene zwischen Spleißprozess und RNA-Transport vom Kern in das Zytoplasma unterscheiden zu können, muss die Situation im Kern getrennt von der im Zytoplasma untersucht werden. Dazu wurde vor der RNA-Aufreinigung eine Kern-Zytoplasmatrennung vorgenommen.

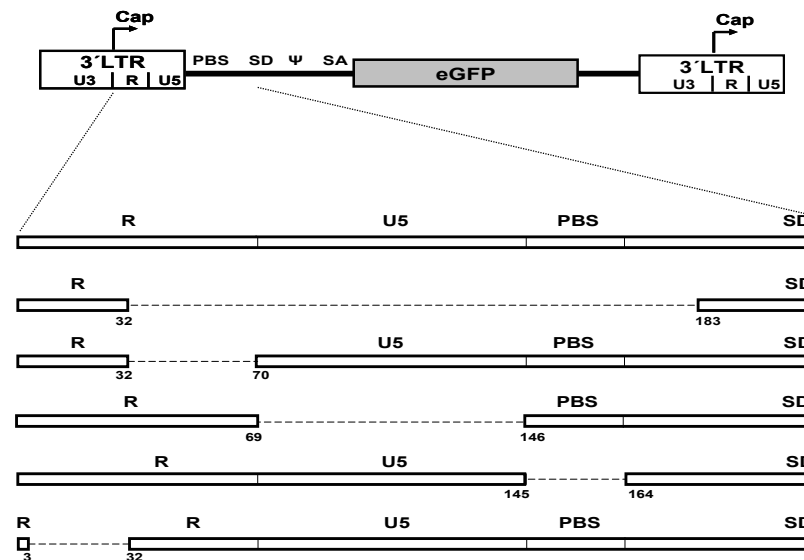
Im untranslatierten ersten Exon konnten abgrenzbare Regionen identifiziert werden, die sich positiv oder negativ auf das Spleißen der prä-mRNA und auf die Translationseffizienz der mRNA auswirken. Die in diesem Abschnitt entwickelten Vektoren sind in einem Überblick im Anhang dargestellt.

### **3.7.1 Deletionen funktioneller Abschnitte in der 5'UTR von SF91**

Das untranslatierte erste Exon scheint den Spleißprozess in den untersuchten retroviralen Vektoren zu beeinflussen. Als Ausgangsprodukt für die Entwicklung verschiedener Deletionsmutanten wurde der LTR-Vektor SF91 gewählt, der wie das Wildtypvirus ein balanciertes Spleißen zeigt. Zunächst sollte der Versuchsaufbau geprüft werden. Um festzustellen, ob die in einer stabilen Situation beobachteten Effekte auf ein transientes System übertragbar sind, wurde in Analogie zum Aufbau des Vektors SinSF91, der im stabilen System fast nur gespleißtes Produkt zeigte (Abb. 25, Bahn 9), die gesamte Region der Basen 33-182 deletiert (SF91del33-182) (Abb. 27, Abb. 28). Außerdem wurde dieser Bereich, um mögliche regulierende Sequenzen einengen zu können, in Untereinheiten unterteilt und diese einzeln deletiert. So entstanden Deletionsmutanten, denen die zweite Hälfte der R-Region (SF91delR<sub>2</sub>, Basen 33-69 bezogen auf Cap), die U5-Region (SF91delU5; Basen 70-145 bezogen auf Cap) oder die Primerbindungsstelle (SF91delPBS; Basen 146-163 bezogen auf Cap) fehlten (Abb. 28).

In einem weiteren Kontrollvektor wurde der RSL deletiert; dies sind die ersten 28 Basen der R-Region, die eine Stammschleifenstruktur (stem loop) ausbilden können (SF91delR<sub>1</sub>; Basen 4-31 bezogen auf Cap) (Trubetskoy et al., 1999). Bei dieser Mutante wurden die

ersten drei Basen nicht entfernt, um die Transkriptionsinitiation aufrecht zu erhalten. In der Mutante SF91del33-182 wurde die RSL-Region nicht entfernt, da sie essentiell für die zytoplasmatische Anreicherung ungespleißter RNA ist (Trubetskoy et al., 1999).



**Abb. 28: Deletionsmutanten der 5'UTR von SF91**

Unterschiedliche Regionen wurden in der 5'UTR von SF91 stromaufwärts des SD, d. h. im untranslatierten ersten Exon, zur Untersuchung des Spleißmechanismus in MLV deletiert. In Anlehnung an die SIN-Vektoren wurde die Region +33 bis +182 entfernt. Außerdem wurden Teilmutanten konstruiert, bei denen die zweite Hälfte der R-Region (SF91delR<sub>2</sub>), die U5-Region (SF91delU5) oder die PBS (SF91delPBS) deletiert wurden. Eine weitere Mutante stellt der Vektor SF91delR<sub>1</sub> dar, dem die RSL deletiert wurde.

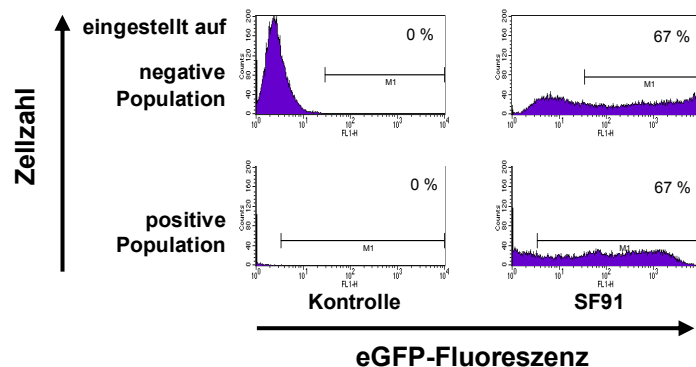
### 3.7.2 Etablierung eines Versuchssystems

Ähnlich wie bei der Verpackung von viraler RNA wurden die verschiedenen Plasmide der Deletionsmutanten im Vergleich mit dem Basisvektor SF91 mit Hilfe der Calcium-Chlorid-Methode in die Zielzellen transfiziert, allerdings wurde kein Plasmid für Gag/Pol und Hüllproteine kotransfiziert. Außerdem wurden 293T-Zellen benutzt, die im Gegensatz zu Phoenix-gp-Zellen das Plasmid für Gag/Pol nicht stabil tragen, aber im Übrigen dieselbe Ursprungslinie darstellen. Damit wurde eine Verpackung von Viren ausgeschlossen und die Expression von eGFP ohne einen etwaigen Einfluss retroviraler Proteine untersucht.

48 Stunden nach Transfektion wurde ein kleiner Teil der Zellen auf ihre Transfektionseffizienz im Durchflusszytometer untersucht. Der größere Anteil wurde zur Kern-Zytoplasmentrennung herangezogen und die extrahierte RNA zunächst in einem Probegels auf ihre Reinheit und anschließend im Northernblot auf die Transkripte des Transgens und unterschiedlicher Kontrollen untersucht.

### 3.7.2.1 Hochgradige Transfektionseffizienz in 293T-Zellen

Zwei Tage nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und zunächst auf ihre Transfektionseffizienz und die eGFP-Expression im Durchflusszytometer untersucht. Da die eGFP-Expression nicht wie bei der stabilen einfachen Integration nach Virusinfektion einen isolierten positiven Gipfel anzeigte, sondern vielmehr einen breiten Bereich an eGFP-positiven Ereignissen, der über das vier logarithmische Einheiten umfassende Messspektrum des Zytometers hinausging, musste die eGFP-Expression jeder Probe in zwei unterschiedlichen Einstellungen vermessen und anschließend gegeneinander abgeglichen werden (Abb. 29).



**Abb. 29: Abgleich der eGFP-Expression im transienten System**

Um die transient eGFP-exprimierenden Zellen erfassen zu können, musste im Durchflusszytometer mit zwei unterschiedlichen Einstellungen gearbeitet werden. In der ersten Einstellung wurde die negative Zellpopulation vollständig erfasst und durch den Vergleich mit der Kontrolle eine Eingrenzung der eGFP-positiven Zellpopulation festgesetzt. In diesem Messfenster befindet sich ein großer Teil der hochpositiven Zellen im letzten Kanal des Messgeräts (1024 Kanäle) und würde bei der Analyse das Ergebnis verfälschen. In der zweiten Einstellung wurde mit denselben Proben die Fluoreszenz so aufgenommen, dass die positive Population vollständig im Messspektrum sichtbar gemacht wurde. Durch die Eingrenzung einer Population, die den gleichen Anteil an eGFP-positiven Zellen beinhaltete, wurde von dieser Population die mittlere Fluoreszenz bestimmt.

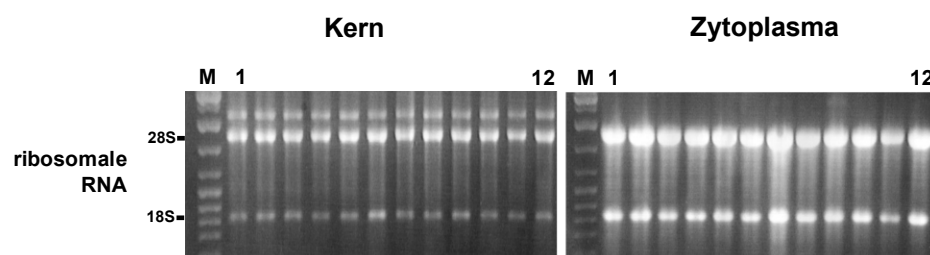
Die erste Einstellung wurde linksbündig auf die eGFP-negative Population eingestellt, die sehr gut abzugrenzen war. In dieser Einstellung konnte die breite eGFP-positive Population nicht vollständig erfasst werden, aber eine Auskunft über den Prozentanteil positiver Zellen wurde erhalten. In der zweiten Einstellung wurde versucht, möglichst die gesamte Breite eGFP-positiver Zellen in das Messspektrum einzubeziehen. Über die Eingrenzung einer Zellpopulation, die den identischen Anteil eGFP-positiver Zellen anzeigte, konnte anschließend die mittlere Fluoreszenz der eGFP-positiven Fraktion für die verschiedenen Vektoren am besten ermittelt werden. Die Transfektionseffizienz in 293T-

Zellen betrug zwischen 60 und 80 % und war für alle Vektoren vergleichbar. Auf die mittlere Fluoreszenz der eGFP-Expression wird in Kapitel 3.11 eingegangen.

### 3.7.2.2 Hohe Reinheit der RNA in der Kern- und Zytoplasmafraktion

Um auf RNA-Ebene zwischen dem Spleißprozess und dem RNA-Transport vom Kern in das Zytoplasma differenzieren zu können, wurde eine Fraktionierung der beiden Kompartimente vorgenommen. Eine zeitlich begrenzte milde Lyse bei 4°C sorgte für die Auflösung der Zellmembran, während die Kernmembran intakt blieb. Die Kerne konnten über Zentrifugations- und Waschschriffe von der Zytoplasmafraktion abgetrennt werden. Die RNA wurde von beiden Fraktionen separat aufgearbeitet, im Photometer vermessen und in einem Probegel auf ihre Qualität überprüft (Abb. 30).

Das Fraktionierungsverfahren zeigte im Vergleich zur Gesamt-RNA-Präparation eine geringere RNA-Ausbeute. Von ca.  $8 \times 10^6$  eingesetzten 293T Zellen wurden etwa 150 µg Gesamt-RNA erhalten. Nach Fraktionierung in die einzelnen Kompartimente konnten noch 10 - 20 µg Kern-RNA und 50 - 80 µg zytoplasmatische RNA aufgereinigt werden. Die zwei durchgeführten Waschschriffe (Zytoplasmafraktion II und III, 2.2.2.2) enthielten nur noch ca. 6 - 10 µg RNA und zeigten damit an, dass die Aufreinigung quantitativ nach dem ersten Lyseschriff erfolgt war. Bei einem Vergleich mit der Gesamt-RNA, die aus  $8 \times 10^6$  Zellen gewonnen worden war, war folglich ein Verlust von etwa 50 % zu verzeichnen. Die wesentlich höhere Menge an zytoplasmatischer RNA beruht zum großen Teil auf der in diesem Zellkompartiment befindlichen ribosomalen RNA.



**Abb. 30: Probegel RNA-Präparation**

Die RNA-Probegele der Kern- und Zytoplasmafraktion zeigten die Banden der RNA der großen (28S) und kleinen (18S) ribosomalen Untereinheit mit einer Akkumulation in der Zytoplasmafraktion. Die Bande oberhalb der 28S-RNA ist wahrscheinlich ein nur im Kern vorkommender Vorläufer ribosomaler RNA. Alle Proben, die später in einem Northernblot analysiert werden sollten, wurden auf die Qualität der RNA in einem Probegel überprüft.

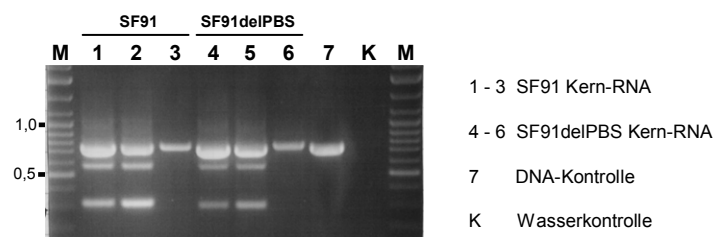
Die RNA der großen 28S (ca. 5000 b) und der kleinen 18S (ca. 2000 b) ribosomalen Untereinheit waren auf dem Probegel zu erkennen und gaben ebenfalls Aufschluss über die Qualität der RNA. Bei der zusätzlichen Bande oberhalb der 28S RNA in der Kernfraktion

handelte es sich wahrscheinlich um einen Vorläufer der ribosomalen RNA, der deshalb nur in diesem Kompartiment zu finden war und ebenfalls einen Hinweis auf die Qualität der Fraktionierung gibt.

Nach der Qualitätsprüfung der aufgereinigten RNA in einem Probegel wurde diese in einem analytischen Gel zum Nachweis der Transgengtranskripte aufgetrennt.

### 3.7.2.3 Überprüfung der RNA-Transkripte durch reverse Transkription zeigte ein artifizielles PCR-Produkt

Die reverse Transkription der aus den Kernlysaten präparierten RNA mit anschließender PCR-Amplifikation anhand zweier Proben, SF91 und SF91delPBS (Abb. 28), zeigte bei der Gelelektrophorese zur Auftrennung verschiedener DNA-Produkte nicht nur die beiden erwarteten Banden der ungespleißten und gespleißten RNA (700 b bzw. 300 b), sondern noch eine dritte Bande, die in ihrer Größe zwischen den beiden eben erwähnten lag (ca. 550 b) (Abb. 31).



#### Abb. 31: RT-PCR zur Überprüfung der Spleißprodukte

Die RNA, die in der Kernfraktion gewonnen worden war, wurde mit Hilfe der reversen Transkription auf genomische und gespleißte Produkte überprüft. Dies ist beispielhaft für die transiente Transfektion mit SF91 und SF91delPBS gezeigt. Für beide Kernextrakte (SF91, SF91delPBS) wurde der Nachweis sowohl für die genomische (700 b) als auch für die gespleißte (300 b) RNA erbracht. Trotz zusätzlicher DNase-Behandlung (Bahn 2, 3, 5, 6) nach RNA-Aufreinigung war eine DNA-Kontamination vorhanden (Bahn 3 und 6 ohne reverse Transkriptase). Auffällig ist die unerwartete Bande bei etwa 550 b. (M: DNA-Marker; Zahlenwerte entsprechen DNA-Größen in kb; Bahn 7: DNA-Kontrolle aus SF91-Plasmid-DNA; K: Wasserkontrolle)

Die Kern-RNA jeder Probe wurde einerseits direkt in die reverse Transkription eingesetzt, zum anderen zuvor zusätzlich mit DNase behandelt und anschließend über eine Säule aufgereinigt. Bei beiden Proben konnte eine residuale DNA-Kontamination trotz DNase-Behandlung gefunden werden (Bahn 3, 6). Diese Bande zeigte die gleiche Größe wie ungespleißtes Transkript (Bahn 1, 2 und 4, 5; obere Bande) und die DNA-Kontrolle (Bahn 7).

Bei der direkten Sequenzanalyse nach Gelaufreinigung der PCR-Produkte wurde die Identität der ungespleißten und gespleißten RNA-Produkte bestätigt. Bei der mittleren ca.

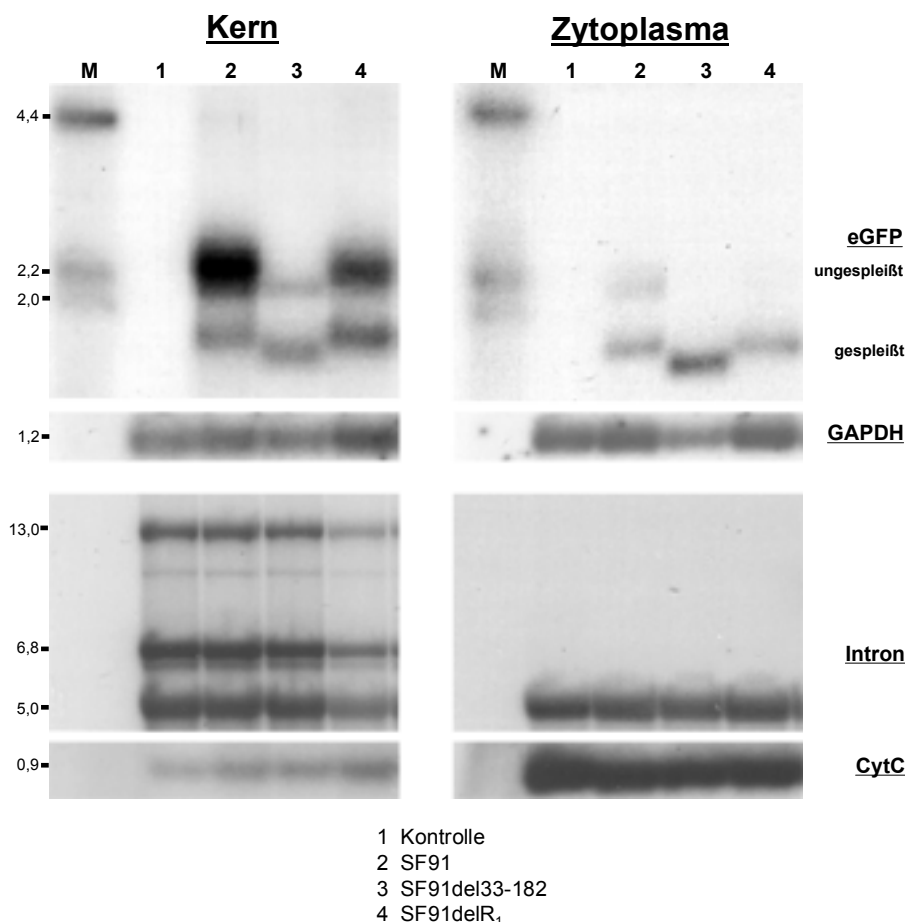
550 Basen großen Bande stellte sich heraus, dass es sich um ein Gemisch von PCR-Produkten handelte, die in ihrer Größe sowohl der gespleißten als auch der ungespleißten RNA entsprachen. Vermutlich handelte es sich hier um einen Artefakt, der durch Hybridisierung eines intronlosen Strangs mit einem intronhaltigen Gegenstrang entsteht, unterstützt durch eine sehr stabile Schleifenbildung des intronhaltigen Strangs und die langen Flanken sequenzidenter Bereiche. Diese chimäre Hybridisierung konkurriert offenbar nach Unterschreiten der Schmelztemperatur mit der homologen Hybridisierung identischer Stränge.

Der in der RT-PCR beobachtete Effekt dürfte bei der Northernblot-Analyse keine Rolle gespielt haben, da in einem denaturierenden Gel gearbeitet wurde. Außerdem sind keine gegenläufigen Basensequenzen bei den eingesetzten RNA-Produkten vorhanden, die sich aneinander anlagern könnten.

#### 3.7.2.4 Separation von nukleärer und zytoplasmatischer RNA

Für das analytische RNA-Gel wurden zwischen 2 und 10 µg RNA eingesetzt. Der begrenzende Faktor war die Menge der aus der Kernfraktion gewonnenen RNA. Neben dem Nachweis der Transkripte des Transgens eGFP für die Spleißanalyse wurde als interner Abgleich mit einer Sonde gegen das ubiquitär vorkommende Transkript der Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH) gearbeitet.

Um den Nachweis der Fraktionierung zu erbringen, wurde das geblottete Gel ferner mit Sonden gegen Transkripte, die hauptsächlich im Kern oder im Zytoplasma vorhanden sein sollten, hybridisiert (Abb. 32). Als Nachweis für die Lokalisation im Kern wurde ein Intron von GAPDH (zur Verfügung gestellt von T. Heise, HPI, Hamburg) als Sonde („Intron“) verwendet. Da intronhaltige RNAs normalerweise nur im Kern vorkommen, wurde eine Bande in der Kernfraktion, nicht aber in der Zytoplasmafraktion erwartet. Für den Nachweis der Zytoplasmafraktion wurde mit einer Sonde gegen Cytochrom C („CytC“) gearbeitet. Cytochrom C ist ein mitochondriales Protein. Die kodierende Region für Cytochrom C ist im Genom der Mitochondrien-DNA kodiert und wird ebenfalls dort exprimiert. Die mit der Sonde nachzuweisende RNA sollte nur in der Zytoplasmafraktion zu finden sein.



**Abb. 32: Northernblot nach Kern-Zytoplasmafraktionierung**

Die RNA wurde nach Fraktionierung mit verschiedenen Sonden hybridisiert. Bahn 2 gibt als Beispiel für den Vektor SF91 die gespleißte und ungespleißte eGFP-RNA wider. GAPDH ist die Beladungskontrolle. Intron GAPDH („Intron“) diente als Kontrolle für die Lokalisation im Kern, Cytochrom C („CytC“) ist der Zytoplasmanachweis. Die Zahlenwerte am linken Rand geben die Bandengrößen in Kilobasen (kb) an, die mit Hilfe eines markierten DNA-Markers zum Teil erst nach Überexpression des Blots ermittelt werden konnten.

Die Abbildung (Abb. 32) zeigt einen Ausschnitt eines RNA-Blots nach Hybridisierungen mit verschiedenen Sonden. Die Sonde gegen eGFP zeigte Banden in zwei verschiedenen Höhen an, die gespleißte und nicht gespleißte RNA widerspiegeln. Für den Vektor SF91 (Bahn 2) lagen diese Banden bei 1,7 und 2,1 kb. Die Sonde gegen GAPDH diente als Beladungskontrolle.

Wie im Blot zu sehen, konnten durch die Hybridisierung mit der Sonde gegen das Intron von GAPDH („Intron“) in der Kernfraktion drei Banden verschiedener Höhen von ca. 5 kb, 7 kb und über 12 kb nachgewiesen werden. Hingegen war in der Zytoplasmafraktion eine Bande auf der Höhe von 5 kb zu sehen. Die erwartete Bande des ungespleißten Transkripts von GAPDH sollte bei 6,8 kb liegen. Eine Bande dieser Größenordnung war in der Kernfraktion, nicht aber in der Zytoplasmafraktion zu finden. In HeLa-Zellen sind sogar Transkripte der GAPDH bis zu 8 kb nachgewiesen und eine funktionelle

Transkriptionseinheit von 13 kb festgestellt worden (Dani et al., 1984). Dies könnte die Bande bei über 12 kb erklären, die aufgrund der Existenz von Introns auf den Kern beschränkt ist. Auffällig bei der Bande von etwa 5 kb, die sowohl in der Kern- stärker aber noch in der Zytoplasmafraktion auftrat, ist, dass diese Bande auch mit Hybridisierungen durch die Sonde gegen eGFP nachgewiesen wurde. Zudem handelt es sich bei der Größe von 5 kb um die Höhe, auf der die große 28S ribosomale Untereinheit läuft. Wir gehen davon aus, dass es sich um eine unspezifische Hybridisierung mit der ribosomalen RNA handelt, die sich hauptsächlich im Zytoplasma befindet. Die Zytoplasmafraktion scheint sehr rein von Kern-RNA zu sein. Es sind keine Spuren des GAPDH-Intron-Transkripts der Länge von 6,8 kb in dieser Fraktion zu detektieren.

Die Hybridisierung mit der Sonde gegen Cytochrom C zeigte eine Bande bei etwa 0,9 kb. Diese Bande war stärker in der Zytoplasmafraktion, aber auch schwach in der Kernfraktion zu sehen. Dies deutet darauf hin, dass die Kernfraktion nicht ganz rein von zytoplasmatischen Anteilen ist. Allerdings kann es sich auch nur um eine Verunreinigung mit mitochondrialen Bestandteilen handeln. Da auch Mitochondrien eine doppelte Membran besitzen, wird diese bei der sanften Lyse wie die Kernmembran zunächst intakt bleiben, und die Zellorganellen würden bei den Waschschritten zusammen mit den Kernen pelletiert werden.

Zum Vergleich der Kern- und Zytoplasmamarker in diesen beiden Fraktionen wurden die Blots mit der identischen Radioaktivität hybridisiert und die gezeigten Röntgenfilme lagen jeweils für den gleichen Zeitraum auf.

Insgesamt deuten die genannten Kontrollen eine für den Zweck dieser Arbeit zufrieden stellende Anreicherung und Qualität der Kern- und Zytoplasmafraktionen an.

### **3.7.3 Die PBS nimmt eine Sonderstellung in der Spleißregulation ein**

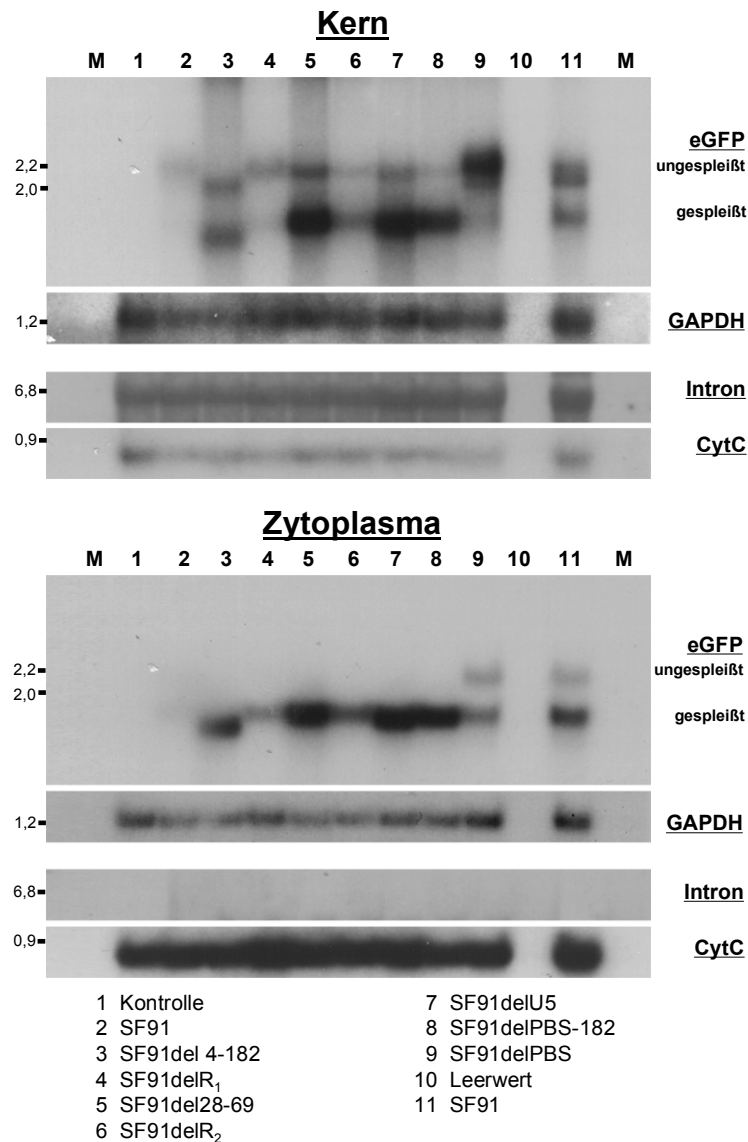
Die SIN-Vektoren zeigten eine von den LTR-Vektoren abweichende bedeutend höhere Spleißeffizienz nach Transduktion von Zielzellen. Aufgrund von Sequenzunterschieden ihrer RNA sind vermutlich Elemente in der 5'UTR für die unterschiedliche RNA-Prozessierung verantwortlich. Mit Hilfe des eben vorgestellten transienten Expressionssystems werden die Auswirkungen von Deletionen der 5'UTR von SF91 (Abb. 28) auf die RNA-Expression nun demonstriert.

Alle Deletionsmutanten wurden wie beschrieben untersucht und die geblottete RNA mit den verschiedenen Sonden hybridisiert. Zunächst wird auf die Ergebnisse in Abb. 32 eingegangen.

Der Kontrollvektor SF91, gegen den alle Vektormutanten verglichen wurden, zeigte in der Kernfraktion ein balanciertes Spleißen (Abb. 32, Bahn 2). Der größte Teil der eGFP-RNA lag in der Kernfraktion ungespleißt vor (gespleißt zu ungespleißt = 1 : 3-4). Das Zytoplasma dagegen zeigte ein umgekehrtes Verhältnis (gespleißt zu ungespleißt = 2-3 : 1) an. Die Kernfraktion spiegelte damit das Verhältnis alternativen Spleißens in einfachen Retroviren wider. Im Gegensatz zu der Betrachtung der Gesamt-RNA (Abb. 25) zeigte sich hier deutlich, dass ein beträchtlicher Teil der LTR-initiierten retroviralen RNA (~ 80 %) ungespleißt bleibt und ineffektiv prozessiert wird. Die gegensätzlichen Spleißverhältnisse der RNA-Transkripte im Zytoplasma deuten einen effizienteren Kernexport oder eine höhere zytoplasmatische Stabilität gespleißter RNA an. Die Deletionsmutante SF91del33-182 zeigte schon im Kern einen wesentlich größeren Anteil an gespleißter RNA (Abb. 32, Bahn 3). Das Verhältnis gespleißter zu ungespleißter RNA betrug hier 4-5 : 1. Im Zytoplasma befand sich fast ausschließlich gespleißtes Produkt. Damit konnten die Ergebnisse der Virustransduktion in einem transienten System reproduziert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass alleine Veränderungen im 5'UTR-Bereich 5' des SD den Spleißprozess beeinflussen und damit unabhängig von Veränderungen im 3'U3-Bereich (Kap. 3.7) in die RNA-Prozessierung eingreifen. Dieser Befund schließt ebenfalls aus, dass die in den SIN-Vektoren an Base 28 vorhandene Punktmutation (Abb. 9A) die veränderte Spleißregulation erklärt.

Die Analyse der Deletion der ersten Hälfte der R-Region (SF91delR<sub>1</sub>), die den RSL bildet, zeigte ebenfalls ein balanciertes Spleißen wie der Vektor SF91 im Kernextrakt (Abb. 32, Bahn 4). Im Zytoplasma war nahezu ausschließlich gespleißte RNA zu erkennen. Die Aussage von Trubetskoy et al. (1999), dass die Stammschleife (R1-28) essentiell für die zytoplasmatische Expression von ungespleißter RNA ist, konnte mit diesen Ergebnissen untermauert werden. Die Deletion der Stammschleifenregion führte zum Verlust ungespleißter RNA im Zytoplasma. Trubetskoy et al. (1999) hatten nicht beschrieben, ob die Stammschleife einen effizienteren Export ungespleißter RNA ermöglicht oder spleißinhibitorisch wirkt. Mit Hilfe der Kern-Zytoplasmafraktionierung konnte hier gezeigt werden, dass die Stammschleifenregion weniger Einfluss auf den Spleißprozess als vielmehr auf den RNA-Export ungespleißter RNA hat. Die Kernfraktion zeigte balanciertes Spleißen, jedoch erreichte die im Kern angereicherte ungespleißte RNA nicht das Zytoplasma. Der RSL der R-Region scheint ein wichtiger Transportfaktor für den Export genomischer RNA zu sein.

Die im Folgenden besprochenen Ergebnisse sind in Abb. 33 präsentiert. Es wird auf die Bahnen 6, 7, 9 und 11 eingegangen. In der Abbildung erscheinende unerwähnte Mutanten sind nicht Gegenstand dieser Arbeit. Andere liefern schon erwähnte reproduzierte Ergebnisse bereits vorgestellter Mutanten.



**Abb. 33: Sonderstellung der PBS in der Spleißregulation**

Dargestellt sind die Kern- und Zytoplasmafraktion der verschiedenen Deletionsmutanten von SF91. Bei Betrachtung der Kernfraktion ist die starke Bande ungespleißter RNA bei der PBS-Deletionsmutante auffällig (Bahn 9). Alle anderen Mutanten von SF91 zeigten bereits in dieser Fraktion eine Anreicherung von gespleißter RNA. SF91 zeigt das balancierte Spleißen (Bahn 11). (Sonden: eGFP – Spleißeffizienz; GAPDH – interne Beladungskontrolle; Intron – Kernmarker Intron GAPDH; CytC – Zytoplasmamarker Cytochrom C; M: DNA-Größenstandard, Größenangaben in kb)

Die Deletion der zweiten Hälfte der R-Region in SF91delR<sub>2</sub> sowie die Deletion des U5-Bereichs in SF91delU5 zeigten ein ähnliches Bild wie SF91del33-182. Schon in der

Kernfraktion lag fast nur gespleißte RNA vor, die zudem noch besser in das Zytoplasma exportiert wurde (Abb. 33, Bahn 6 und 7; vergl. SF91 Bahn 11).

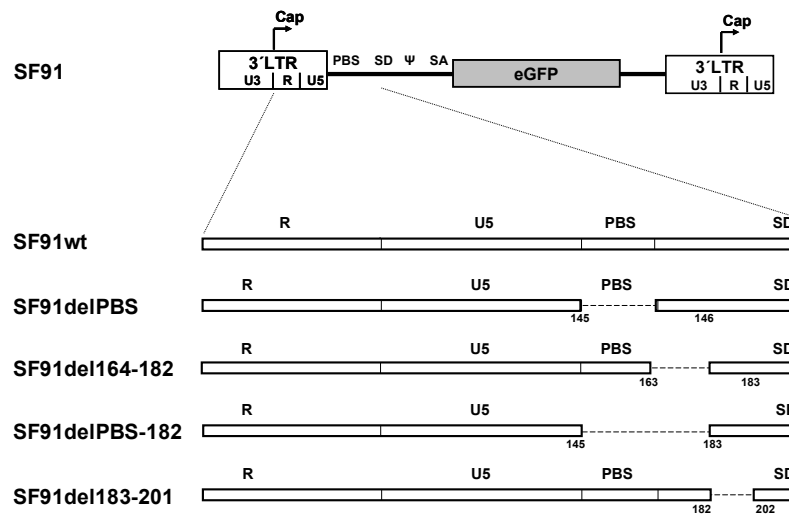
Überraschenderweise hatte die Deletion der PBS eine gegensätzliche Wirkung (Abb. 33, Bahn 9). Wesentlich stärker als bei dem „Wildtypvektor“ SF91 wurde der Spleißprozess im Kern behindert, und es lag zum überwiegenden Teil ungespleißte eGFP-RNA vor (gespleißt zu ungespleißt = 1 : 10). Im Zytoplasma wurde sowohl gespleißte als auch ungespleißte RNA in einem Verhältnis gespleißt zu ungespleißt von 1 : 2 detektiert. Konsistent zeigte die gespleißte RNA im Vergleich zur ungespleißten RNA damit eine etwa fünfmal stärkere zytoplasmatische Anreicherung.

Diese Daten zeigen, dass der retrovirale SA trotz der nicht perfekten Konsensussequenz in der Lage ist, ein effizientes Spleißen zu ermöglichen. Außerdem konnte festgestellt werden, dass distinkte Regionen 5' des SD spleißfördernde (PBS) oder spleißinhibitorische ( $R_2$ , U5) Wirkungen ausüben. Die Sonderrolle der PBS erinnert an die Sekundärstruktur der 5'UTR von MoMLV, in der dieser Bereich eine Schleife bildet und die flankierenden Regionen einen verzweigten Stamm formen (Abb. 5).

### 3.7.4 Deletionen PBS-flankierender Regionen steigern das Spleißen

Mutanten mit Deletionen der Regionen stromaufwärts der PBS zeigten bereits in der Kernfraktion fast ausschließlich gespleißte RNA. Dagegen war die Spleißreaktion der Mutante mit deletierter PBS nahezu blockiert. In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob die PBS tatsächlich eine isolierte Stellung in der 5'UTR bezüglich der Spleißregulation einnimmt und wie sich stromabwärts die PBS begrenzende Bereiche in der RNA-Prozessierung verhalten.

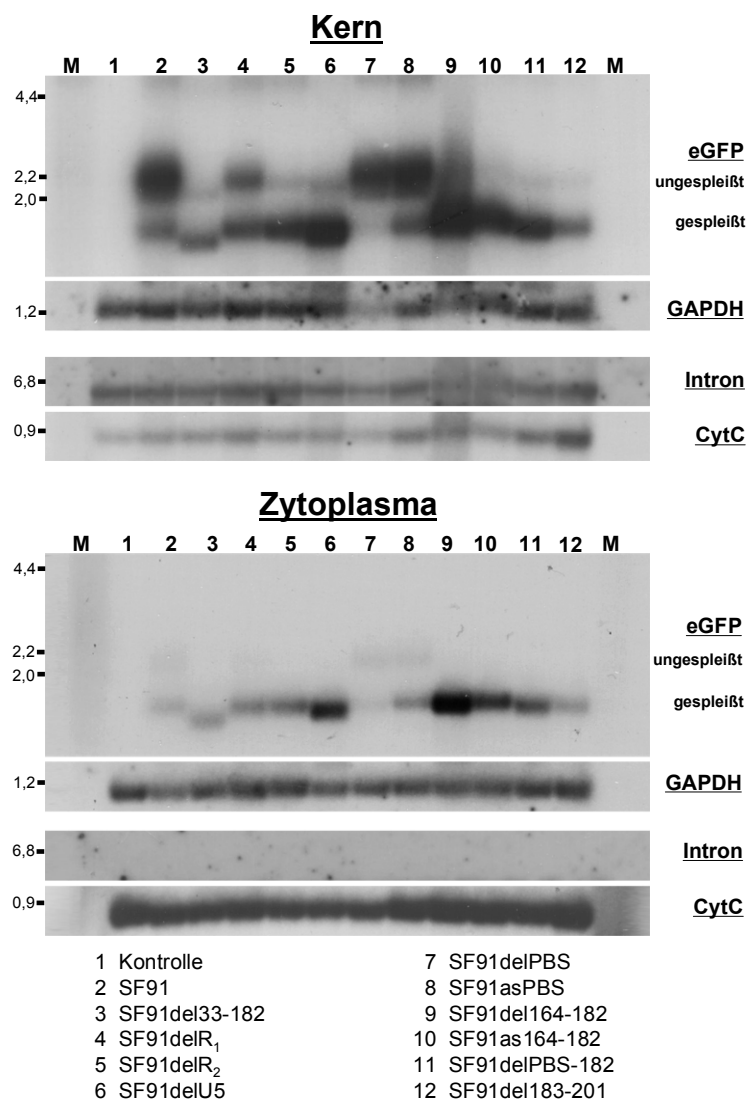
Bei der Konstruktion der Mutante SF91del33-182 wurden die 30 Basen 5' des SD nicht deletiert, da zunächst nur die 5'UTR von SinSF91 repräsentiert werden sollte (Abb. 27). Da zwar die Deletion der PBS nicht aber der gesamten Region +33 bis +182 den Spleißprozess herabsetzte, wurden die Regionen 3' der PBS nun detaillierter untersucht. Für ein weiteres Konstrukt wurden die 19 Basen stromabwärts der PBS bis zum Integrationsort des internen Promotors im SIN-Vektor (SF91del164-182; Basen 164-182 deletiert) entfernt. Diese Region wurde außerdem in der Kombination mit der PBS deletiert (SF91delPBS-182; Basen 146-182 deletiert). Eine weitere Region stromabwärts des Integrationsortes für den internen Promotor im SIN-Vektor bis nahe an den Spleißdonor wurde dem Vektor SF91 entnommen (SF91del183-201; Basen 183-201 deletiert). Die zwölf Basen 5' des SD wurden nicht einbezogen, um seine Funktion nicht zu behindern (Abb. 34).



**Abb. 34: PBS und 3'-proximale Deletionsmutanten**

Darstellung der Deletionsmutanten zwischen der PBS und dem SD. Die Deletion der PBS ist bereits bekannt. Um den Einfluss stromabwärts der PBS gelegener Sequenzen auf die RNA-Prozessierung zu studieren, wurden diese Regionen abschnittsweise entfernt.

Wie die bereits besprochenen Mutanten von SF91 wurden diese Vektoren transient in 293T-Zellen transfiziert, nach einer Kern-Zytoplasmafraktionierung die RNA präpariert und in einem Northernblot untersucht (Abb. 35). Die Deletionsmutanten, die in den Bahnen 3 bis 7 vorgestellt werden, sind bereits bekannt; die Auswirkungen der Veränderungen der Vektorstruktur konnten hier reproduziert werden (Kap. 3.7.3). Die Bahnen 8 und 10 werden in einem späteren Kapitel besprochen (Kap. 3.8.3, Kap. 3.9). Im Folgenden werden die Mutanten besprochen, in denen Sequenzen der PBS und stromabwärts der PBS deletiert wurden (Abb. 35, Bahnen 7, 9, 11 und 12).



**Abb. 35: Deletion der PBS als einzige Region in der 5'UTR wirkt spleißinhibitorisch während Deletionen flankierender Regionen den Spleißprozess fördern**

Dargestellt sind die Kern- und Zytoplasmafraktion der verschiedenen Deletionsmutanten von SF91. (Sonden: eGFP – Spleißeffizienz; GAPDH – interne Beladungskontrolle; Intron – Kernmarker Intron GAPDH; CytC – Zytoplasmamarker Cytochrom C; M: DNA-Größenstandard, Größenangaben in kb)

Die Deletion SF91del164-182 (Abb. 35, Bahn 9) sowie die Deletion SF91del183-201 (Abb. 35, Bahn 12) zeigten das gleiche Transkriptverhältnis, das auch bei den Deletionen der zweiten Hälfte der R-Region und der U5-Region beobachtet wurde (Abb. 33, Bahn 6 und 7). Entfernungen dieser Regionen führten im Kern zu einer gesteigerten Spleißreaktion. Wenn im Kern noch schwache Banden ungespleißter RNA zu erkennen waren, so waren diese im Zytoplasma auch nach Überexpression aufgrund des erschwerten Transports ungespleißter RNA aus dem Kern kaum noch bzw. gar nicht zu detektieren. Alle untersuchten Mutanten mit Deletionen der flankierenden Sequenzen der PBS zeigten

ein verstärktes Spleißen im klaren Gegensatz zur Deletion der PBS selbst, die das Spleißen nahezu blockierte. Die Deletionen der PBS (SF91delPBS: Abb. 35, Bahn 7) und der 3'-Region der PBS (SF91del164-182: Abb. 35, Bahn 9) zeigten entgegengesetzte Phänomene, wobei darauf hinzuweisen ist, dass es sich hier um Regionen mit einer Größe von nur 18 und 19 Basen handelt. Die Kombination dieser beiden Varianten in SF91delPBS-182 (Abb. 35, Bahn 11) ergab den Phänotyp der Deletion SF91del164-182. Damit verhielt sich die Deletion der Region 164-182 dominant gegenüber der alleinigen Deletion der PBS.

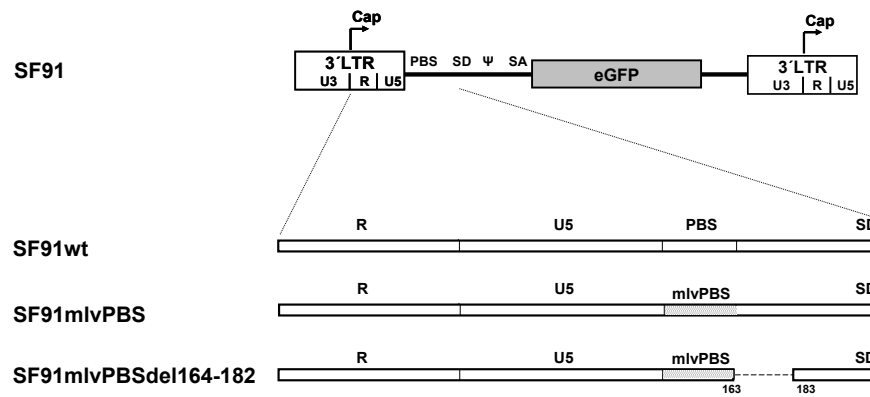
Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Deletionen aller untersuchten Elemente mit Ausnahme der Deletion der PBS den Spleißprozess zu fördern scheinen, während die Deletion der PBS dagegen den Spleißprozess behindert. Die PBS hat im Virus vermutlich eine spleißfördernde Funktion und bildet somit eine „Insel“ innerhalb eines größeren Netzwerkes umgebender spleißinhibitorischer Sequenzen.

### **3.8 Die Rolle der Primerbindungsstelle (PBS) in der Spleißregulation ist von ihrer Sequenz unabhängig**

Die Mutante mit der Deletion der PBS führte zu einer auffälligen Abweichung gegenüber allen anderen Deletionsmutanten den Spleißphänotyp betreffend. Verschiedenste Funktionen wie die Bindung einer tRNA zur Initiation der reversen Transkription und die Bindung von Repressoren der transkriptionellen Initiation in embryonalen Stammzellen sind für die PBS bekannt (Baum et al., 1995; Grez et al., 1990; Kohn et al., 2003a). Im Folgenden wurde der Einfluss der Sequenz der PBS und die Bindung einer tRNA auf die Spleißregulation untersucht.

#### **3.8.1 Die MLV-PBS zeigt den gleichen Phänotyp wie die MESV-PBS**

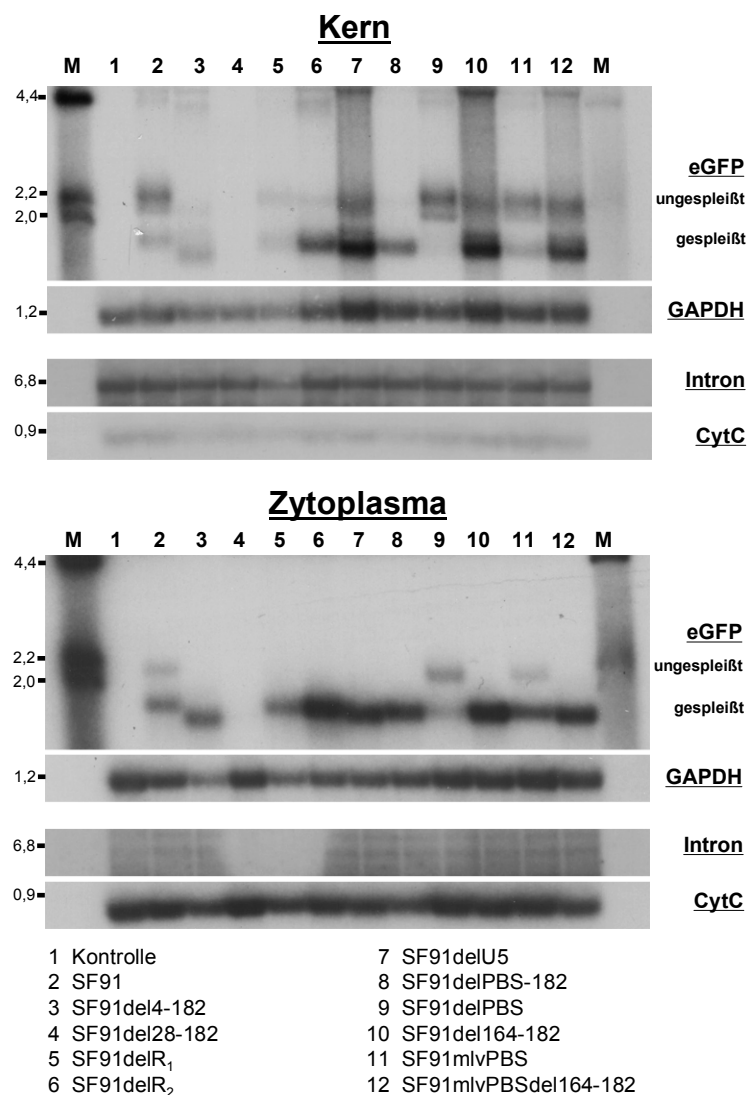
Da die in natürlichen MLV vorkommende PBS für tRNA<sup>Pro</sup> in einigen Zelltypen die Transkriptionsinitiation inhibiert, verwendet der Vektor SF91 eine alternative PBS für tRNA<sup>Glu</sup>. Um eine dem Wildtyp-MLV analoge Situation zu untersuchen, wurde die PBS des SF91 zurückgeführt in die MLV-PBS für tRNA<sup>Pro</sup>. Dies resultierte in SF91mlvPBS (Abb. 36). Außerdem wurde als weitere Kontrolle eine Variante kloniert, in der neben der MLV-PBS die 19 Basen stromabwärts der PBS entfernt wurden. Diese Variante wurde SF91mlvPBSdel164-182 benannt (Abb. 36). Die Vektoren wurden wie oben beschrieben auf ihre RNA-Expression im transienten System untersucht.



**Abb. 36: Vektormutanten mit der PBS von MLV für tRNA<sup>Pro</sup>**

Die PBS für die tRNA<sup>Glu</sup> wurde gegen die Wildtyp-PBS von MLV für tRNA<sup>Pro</sup> ausgetauscht (SF91mlvPBS). Der Einfluss der Sequenz der PBS auf die Spleißregulation sollte untersucht werden. Zusätzlich wurde ein dem Vektor SF91del164-182 entsprechendes Konstrukt kloniert, das die MLV-PBS und die Deletion von Sequenzen 3' der PBS gleichzeitig trägt (SF91mlvPBSdel164-182).

Die Ergebnisse der RNA-Analyse sind in Abb. 37 dargestellt. Es wird im Besonderen auf die Bahnen 2 und 10 bis 12 eingegangen. Die RNA-Expression mit dem spezifischen Spleißmuster war bei den korrespondierenden Vektoren SF91 (Bahn 2) und SF91mlvPBS (Bahn 11) sowie SF91del164-182 (Bahn 10) und SF91mlvPBSdel164-182 (Bahn 12) vergleichbar (Abb. 37). Die Punktmutationen der PBS im SF91 gegenüber der Wildtyp-MLV-PBS haben keinen Einfluss auf das Spleißmuster in diesen Vektoren.



**Abb. 37: Wildtyp-MLV-PBS mit dem gleichen Spleißmuster wie SF91-PBS**

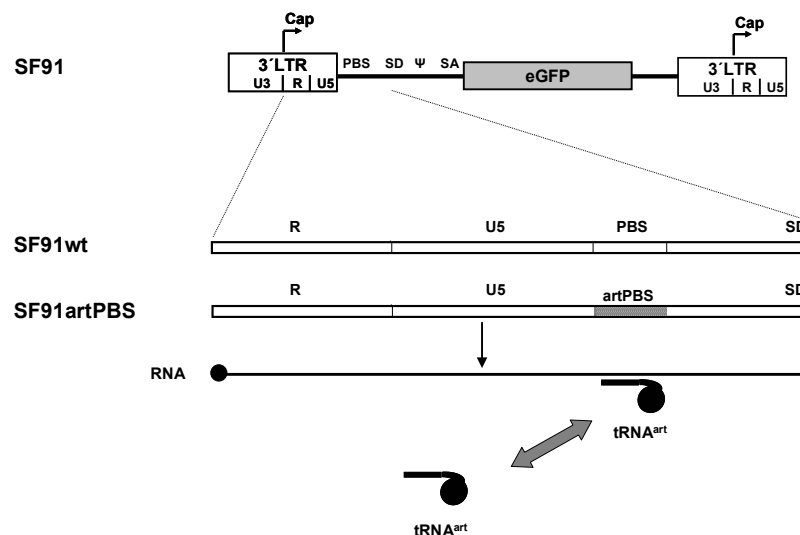
Dargestellt sind die bereits bekannten Deletionsmutanten von SF91. Zusätzlich sind in den Bahnen 11 und 12 die Konstrukte mit einem Austausch der PBS gegen die Wildtyp-PBS von MLV zu finden. (Sonden: eGFP – Spleißeffizienz; GAPDH – interne Beladungskontrolle; Intron – Kernmarker Intron GAPDH; CytC – Zytoplasmamarker Cytochrom C; M: DNA-Größenstandard, Zahlenwerte geben den Größenstandard in kb an)

Bestätigt wurden in diesem Experiment in der Kernfraktion sehr schön die unterschiedlichen Auswirkungen der verschiedenen deletierten Sequenzen auf die Spleißregulation (Bahnen 6 bis 10). PBS-flankierende Sequenzen führten zu einer Spleißverstärkung (Abb. 37: SF91delR<sub>2</sub>, Bahn 6; SF91delU5, Bahn 7; SF91del164-182, Bahn 10) und die PBS selbst zur Spleißinhibition (SF91delPBS, Bahn 9). Außerdem kann auch hier die Dominanz der kombinierten Deletion der PBS und stromabwärts liegenden Sequenzen (SF91delPBS-182, Bahn 8) gegenüber der alleinigen Deletion der PBS gefunden werden.

### 3.8.2 Die Spleißeffizienz ist unabhängig von der tRNA-Bindung

Die Rolle der PBS in der Spleißregulation könnte auch auf der Bindung einer zellulären tRNA beruhen. In der Zielzelle wird durch eine bereits bei der Verpackung an die PBS gebundene tRNA die reverse Transkription in provirale DNA initiiert. Intranukleär könnte theoretisch bereits bei der de-novo-Transkription die tRNA „in statu nascendi“ an die PBS binden und somit direkt oder indirekt den 3' gelegenen SD beeinflussen.

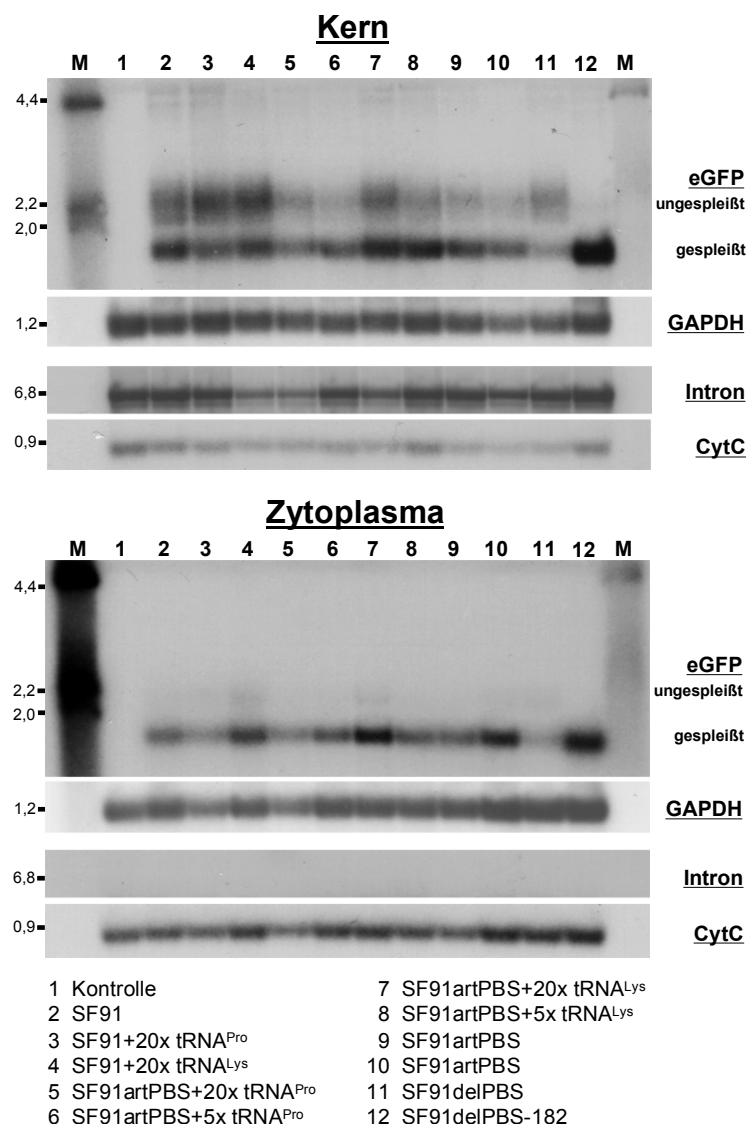
Die Bindung einer tRNA ist im Fall der SF91delPBS-Mutante nicht mehr möglich. Eine weitere Vektorvariante SF91artPBS sollte mit Hilfe einer künstlichen PBS einen Hinweis darauf geben, ob der Effekt, der bei der Deletion der PBS festgestellt wurde, möglicherweise auf der fehlenden tRNA-Bindung beruhen könnte (Abb. 38). Diese künstliche PBS kann weder zelleigene tRNAs binden noch die reverse Transkription initiieren (Lund et al., 1997). Um das System wieder zu komplementieren, muss ein Plasmid, das eine ebenfalls künstliche tRNA kodiert, die an die künstliche PBS binden kann, kotransfiziert werden. Diese tRNA kann die Synthese des Provirus und die stabile Integration in das Wirtsgenom ermöglichen. Die Sequenz einer solchen PBS und zwei Plasmide, die für künstliche tRNAs kodieren, wurden von Prof. F.S. Pedersen (Arhus, Dänemark) zur Verfügung gestellt. Beide tRNAs sind in ihrer Bindungssequenz für die PBS identisch, werden aber durch unterschiedliche Aminosäuren (Prolin und Lysin) komplementiert.



**Abb. 38: SF91-Mutante mit einer künstlichen PBS (artPBS)**

Die Vektor-RNA, die eine künstliche PBS trägt, kann keine zellulären tRNAs binden (Vektor SF91artPBS). Bei Kotransfektion eines Plasmids, das eine künstliche tRNA kodiert (tRNA<sup>art</sup>), kann der Infektionszyklus wieder komplementiert werden (Kap. 3.12).

Dass die Komplementierung der künstlichen PBS mit der künstlichen tRNA funktioniert, wurde überprüft, indem die Vektoren mit und ohne Plasmide für tRNAs in das Verpackungssystem eingesetzt wurden. SC1-Zellen wurden mit Virusüberständen transduziert und analysiert (Kap. 3.12).



**Abb. 39: Die tRNA-Bindung hat keinen Einfluss auf die Spleißeffizienz**

Im Kontext einer artifiziellen PBS sollte die Abhängigkeit der Spleißregulation von der tRNA-Bindung untersucht werden. SF91 und SF91artPBS sind mit Plasmiden, die für die tRNA<sup>Pro</sup> (Bahn 3, 5, 6) oder tRNA<sup>Lys</sup> (Bahn 4, 7, 8) kodieren, kotransfiziert worden (20x bzw. 5x: 20- bzw. 5-facher molarer Plasmidüberschuss gegenüber den retroviralen Vektoren). Als Vergleich wiederum sind die Transkripte von SF91delPBS (Bahn 11) und SF91delPBS-182 (Bahn 12) zu erkennen. Die Kernfraktion war in diesem Experiment stärker mit zytoplasmatischer RNA kontaminiert. (Sonden: eGFP – Spleißeffizienz; GAPDH – interne Beladungskontrolle; Intron – Kernmarker Intron GAPDH; CytC – Zytoplasmamarker Cytochrom C; M: DNA-Größenstandard, Zahlenwerte geben den Größenstandard in kb an)

Für die RNA-Analyse wurde die transiente Transfektion von 293T-Zellen unter den gleichen Bedingungen wie bei den anderen SF91-Mutanten durchgeführt. Zusätzlich wurde die artifizielle tRNA, die eine der beiden Aminosäuren trägt, mit einem 5- bzw. 20-fachen molaren Überschuss kotransfiziert. Die RNA wurde nach Kern-Zytoplasmafraktionierung im Northernblot analysiert (Abb. 39).

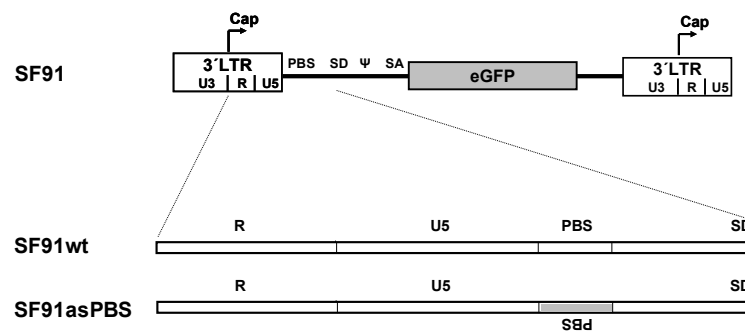
In diesem Experiment war die Kernfraktion stärker mit zytoplasmatischer RNA kontaminiert. Deshalb sind die Bandenverhältnisse in dieser Fraktion tendenziell in Richtung der zytoplasmatischen Verhältnisse verschoben. Der Blot zeigt jedoch, dass der Spleißprozess offenbar nicht von der Möglichkeit der tRNA-Primerbindung an die PBS abhängt (Abb. 39). Der Vektor SF91artPBS wurde ohne und mit den künstlichen tRNAs verschiedener Konzentrationen transfiziert. Die An- bzw. Abwesenheit von tRNAs führte zu keiner wesentlichen Veränderung der Spleißeffizienz (Abb. 39, Bahn 5-8 im Vergleich zu Bahn 9 und 10). Das Spleißverhältnis veränderte sich im Kern nur im Rahmen einer normalen Varianz. Als Kontrolle wurde der Vektor SF91 ebenfalls mit den künstlichen tRNAs kotransfiziert (Abb. 39, Bahn 2-4). Dieser Vektor sollte die kotransfizierten tRNAs nicht binden.

An dieser Stelle konnte erneut der starke Einfluss der Deletionen der PBS und der 3' Sequenzen der PBS bestätigt werden (Abb. 39, Bahn 11 und 12).

### **3.8.3 Die PBS übt ihre Funktion in der Spleißregulation als Abstandshalter aus**

In den vorangegangenen Experimenten wurde deutlich, dass die spleißregulatorische Funktion der PBS nicht an die in SF91 veränderte PBS für die tRNA<sup>Glu</sup> und ebenfalls nicht an die Primerbindung geknüpft sein kann. Nun sollte ermittelt werden, ob es sich bei dem Einfluss der PBS um einen sequenzspezifischen Effekt handelt oder ob dieser auf einer Funktion als Abstandshalter (Spacer) beruht.

Deshalb wurde in einer weiteren Variante die Sequenz der PBS in antisense-Orientierung als SF91asPBS eingeführt (Abb. 40). Der Vektor wurde zunächst transient auf die eGFP-Expression und nach Kern-Zytoplasmatrengung auf die Spleißverhältnisse untersucht (Abb. 41).



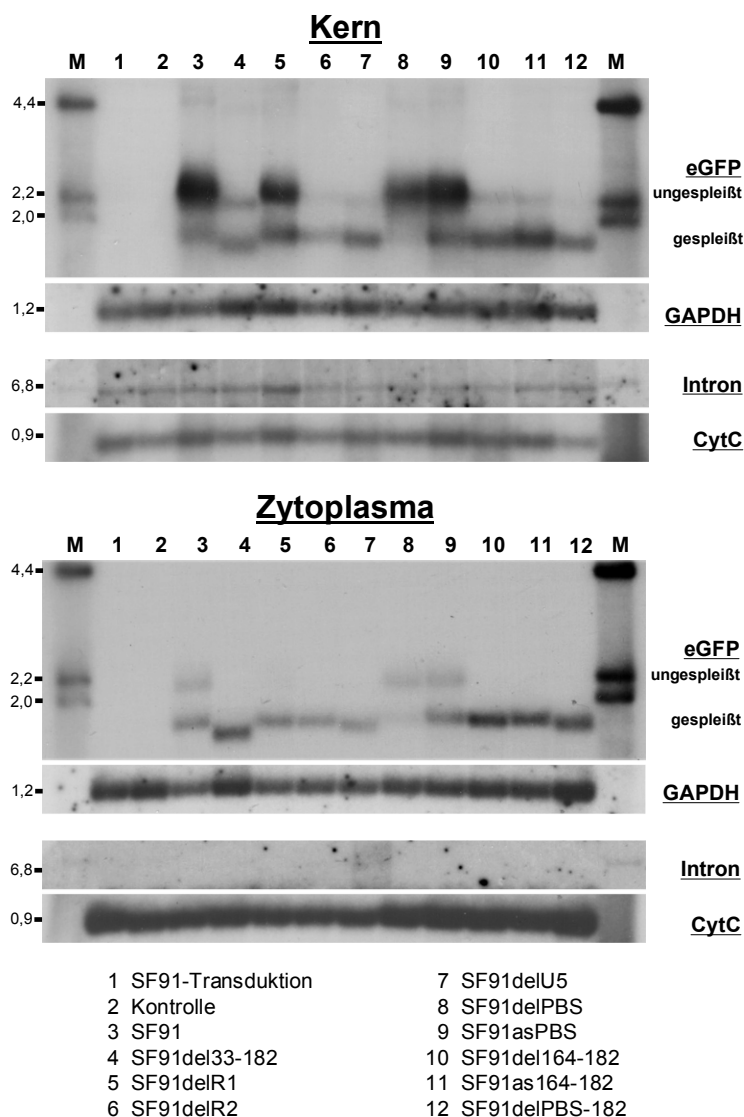
**Abb. 40: Vektorkonstruktion mit PBS in antisense-Orientierung**

Zur Überprüfung der Sequenzabhängigkeit der PBS in der Spleißregulation wurden die Basen der PBS in antisense-Orientierung in den Vektor SF91 integriert (SF91asPBS).

Der Northernblot (Abb. 41) stellt neben den bereits bekannten Deletionsmutanten von SF91 (Bahnen 4 bis 7, 10, 12) die Deletion der PBS (Bahn 8) der antisense-Orientierung der PBS (Bahn 9) gegenüber. Betrachtet man im Vergleich den Ursprungsvektor SF91 (Bahn 3) mit der deletierten PBS (Bahn 8) und der antisense-Variante der PBS (Bahn 9), so fällt auf, dass die antisense-Orientierung der PBS sowohl in der Kern- als auch in der Zytoplasmafraktion den Phänotyp des SF91 zeigte (Abb. 41). Im Kern lag mehr ungespleißte als gespleißte RNA vor. Die Zytoplasmafraktion wies wie bei dem Vektor SF91 eine Akkumulation an gespleißter RNA vor. Diese Beobachtung legt nahe, dass die Auswirkungen der PBS auf das Spleißverhältnis der RNA auf einem sequenzunabhängigen “Spacer“-Effekt beruhen.

Die PBS ist an der Spleißregulation der untersuchten retroviralen Vektoren entscheidend beteiligt. Die Deletion der PBS führte zu einer Blockade der Spleißreaktion. Dabei ist die Funktion der PBS im Vektor SF91 nicht von der Sequenz abhängig. Eine Rückintegration mit anderer Sequenz, wie im Kapitel 3.8.1 die Integration der MLV-PBS (fünf Punktmutationen) oder in letzterem Fall die antisense-Version, vermag den Phänotyp des SF91 wieder herzustellen. Die PBS scheint bei der Regulation der RNA-Prozessierung ihre Rolle als Abstandshalter zu erfüllen.

Mittlerweile zeigten weiterführende Experimente, dass die PBS und auch die Deletion der PBS in gleicher Form das Spleißmuster im Kontext eines infektiösen MLV beeinflusst (persönliche Mitteilung J. Bohne).



**Abb. 41: „Spacer“-Funktion der PBS**

Bahn 2 bis 5 sind bereits aus der Vorstellung der Kern-Zytoplasmafraktionierung bekannt (Abb. 32). Reproduziert konnten die Auswirkungen der Deletionen der PBS und flankierenden Sequenzen dargestellt werden. Neben der Deletion der PBS (Bahn 8) wird hier die Auswirkung der antisense-Version der PBS (SF91asPBS, Bahn 9) vorgestellt. SF91asPBS spiegelt in der Kern- und Zytoplasmafraktion den „Wildtyp“ SF91 wider (Bahn 3).

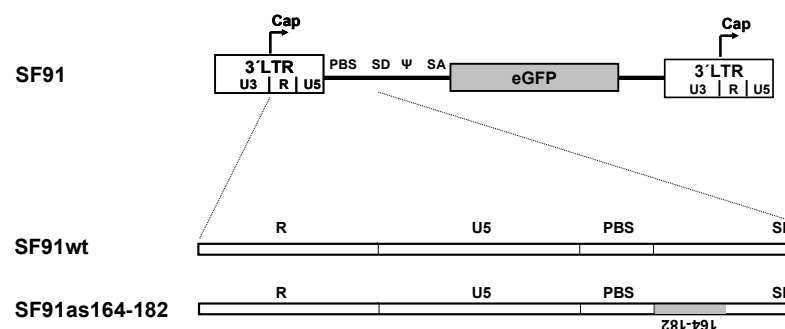
Bahn 10 und 11 werden in Kap. 3.9 besprochen. Bahn 11 zeigt die antisense-Version der Sequenz 3' der PBS (SF91as164-182).

Bahn 1 sollte die RNA-Expression von retroviral transduzierten Zellen zeigen. Aufgrund der im Verhältnis zur Transfektion wesentlich geringeren Transferrate von Fremd-DNA konnten Banden in dieser Bahn erst nach Überexpression detektiert werden. Sie spiegelten das gleiche Spleißverhältnis in Kern- und Zytoplasmafraktion wider wie transfizierte Zellen (nicht gezeigt). (Sonden: eGFP – Spleißeffizienz; GAPDH – interne Beladungskontrolle; Intron – Kernmarker Intron GAPDH; CytC – Zytoplasmamarker Cytochrom C; M: DNA-Größenstandard, Zahlenwerte geben den Größenstandard in kb an)

### 3.9 Die Sequenz der Region 3' der PBS (+164 - +182) ist entscheidend für die Spleißregulation

Für die PBS konnte eine Aufgabe in der Spleißregulation nachgewiesen werden, die nicht von ihrer Sequenz, sondern vielmehr von ihrer Funktion als Abstandshalter abhängt. Im Gegensatz zur Blockade des Spleißens bei Deletion der PBS konnte für die Deletion der 19 Basen stromabwärts der PBS eine Spleißförderung aufgezeigt werden (Abb. 41).

Die Deletionsmutante SF91del164-182 zeigte eine Verschiebung des Spleißverhältnisses zu fast vollständig gespleißter RNA in der Kernfraktion (Abb. 41, Bahn 10). Auch bei dieser Region sollte überprüft werden, ob ihr Einfluss sequenzabhängig ist oder vielmehr auf einem Spacereffekt beruht. Ebenso wie die PBS wurde diese Sequenz neben der Deletion in der antisense-Orientierung wieder in den Vektor integriert (SF91as164-182) (Abb. 42).



**Abb. 42: Antisense-Orientierung der Region 3' der PBS**

Analog zu der antisense-Version der PBS (SF91asPBS) wurde auch die stromabwärts liegende Region +164 - +182 in der antisense-Orientierung in den Vektor integriert (SF91as164-182).

Die RNA-Analyse ergab für die antisense-Mutante SF91as164-182 den gleichen Phänotyp wie für die Deletionsmutante derselben Sequenz (SF91del164-182) (Abb. 41, Bahnen 10 und 11). Das Spleißmuster des Wildtyps SF91 ließ sich durch die antisense-Orientierung der Region 3' der PBS nicht wieder herstellen. Die Ergebnisse des untersuchten Sequenzabschnitts zeigten eine Sequenzabhängigkeit dieser Region. Der Effekt der Deletion war nicht durch ein beliebiges Stück an Nukleinsäure gleicher Größe, in diesem Fall der antisense-Sequenz, rückgängig zu machen. Es handelte sich somit nicht um einen „Spacer“-Effekt, sondern um einen orientierungs- und sequenzspezifischen Effekt der stromabwärts der PBS liegenden Region.

Während die PBS eine Abstandshalterfunktion in der Spleißregulation einnimmt, konnte für die 19 Basen stromabwärts der PBS eine sequenzspezifische Funktion nachgewiesen

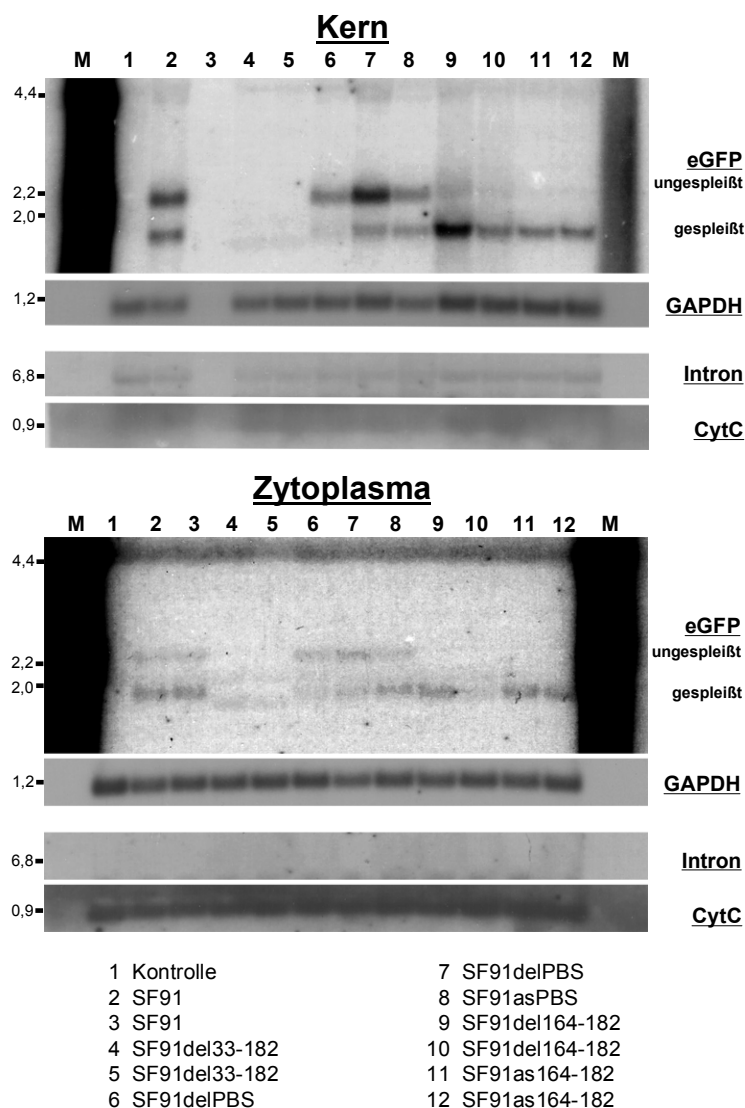
werden. Die Ergebnisse sind sehr gut vereinbar mit der Sekundärstruktur der RNA, die von Mougél et al. (1993) für diese Region beschrieben wurde (Kap. 4.2).

### 3.10 Humane und murine Fibroblasten zeigen übereinstimmende Befunde

Anhand von Analysen in humanen 293T-Zellen sind in dieser Arbeit Sequenzbereiche in der retroviralen 5'UTR entdeckt worden, die spleißfördernde (PBS) und spleißvermindernde (PBS flankierende Bereiche) Auswirkungen haben. Um auszuschließen, dass diese ermittelten Sequenzen ein Zufallsbefund einer speziellen Zelllinie sind, sollten die Ergebnisse in der murinen Fibroblastenzelllinie SC1 überprüft werden.

Dazu wurden diese Zellen ebenfalls transient mit den verschiedenen ausgewählten Vektoren transfiziert. Es stellte sich heraus, dass diese Zellen weit schwieriger transient zu transfizieren waren. Mit der „Effectene-Methode“ (Kap. 2.2.3.1), mit der Plasmid-DNA über Lipidvesikel in die Zellen geschleust wird, konnten Transfektionsraten von nur 1 – 5 % eGFP-positiver Zellen erreicht werden. Aufgrund dieser niedrigen Transfektionsrate wurden im Northernblot 10 bis 15 µg RNA eingesetzt. Der Film zur Detektion der radioaktiv markierten Sonde gegen eGFP musste vier Wochen aufliegen, um das Signal sichtbar zu machen.

Bei den Vektoren, die für dieses Experiment eingesetzt wurden, handelte es sich neben dem Wildtypvektor SF91 um den Vektor SF91del33-182, außerdem um die Vektoren, die die Deletion und die antisense-Variante der PBS und der Region 3' der PBS tragen. Die Banden waren nur schwach zu erkennen, gaben aber für jeden analysierten Vektor das gleiche Spleißverhältnis wie in 293T wider (Abb. 43). Damit konnten die in den humanen Fibroblasten gewonnenen Daten reproduziert werden. Der „Wildtyp“-SF91 zeigte balanciertes Spleißen im Kern mit effizientem Transport gespleißter RNA in das Zytoplasma (Bahnen 2 und 3). Der Vektor SF91del33-182 zeigte schon im Kern ein verstärktes Spleißen (Bahnen 4 und 5). In SF91delPBS ist das Spleißen inhibiert (Bahnen 6 und 7), durch die antisense-Variante SF91asPBS konnte das Spleißverhalten des Wildtyps SF91 wieder hergestellt werden (Bahn 8). Sowohl in der Deletion als auch in der antisense-Orientierung der Region stromabwärts der PBS SF91del164-182 und SF91as164-182 lag verstärkt gespleißtes Produkt im Kern vor (Bahnen 9 bis 12).



**Abb. 43: Übereinstimmende Befunde in murinen Fibroblasten**

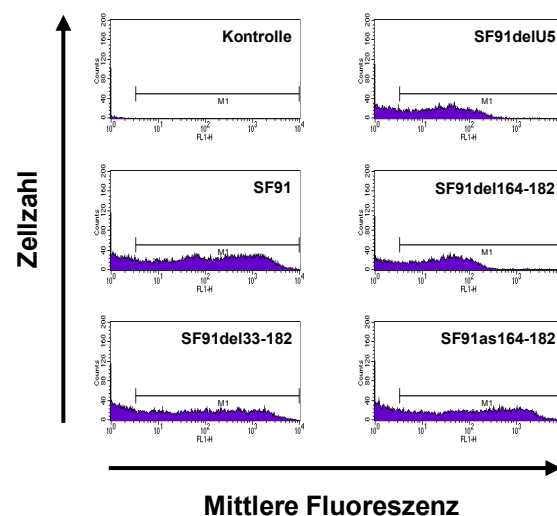
Die konstruierten Mutanten wurden ebenfalls in murinen Fibroblasten (SC1) analysiert, um eine zelltypabhängige RNA-Prozessierung auszuschließen. Die Ergebnisse entsprechen denen in den humanen 293T-Zellen. Die Transfektionseffizienz war wesentlich geringer als in 293T-Zellen. (Sonden: eGFP – Spleißeffizienz; GAPDH – interne Beladungskontrolle; Intron – Kernmarker Intron GAPDH; CytC – Zytoplasmamarker Cytochrom C; M: DNA-Größenstandard, Zahlenwerte geben den Größenstandard in kb an)

Diese Befunde stehen im Einklang mit den initialen Beobachtungen zur Spleißregulation der SIN-Vektoren (Abb. 25) und der oben gezeigten mechanistischen Analyse. Innerhalb der Fibroblastenzelllinie sind die gewonnenen Daten nicht zellabhängig.

### 3.11 Die PBS vermindert Proteinexpression

In diesem Abschnitt sollte untersucht werden, ob die 5'UTR nicht nur die RNA- sondern auch die Proteinexpression beeinflusst. Die oben beschriebenen Vektormutanten wurden darauf folgend auf ihre Proteinexpression untersucht. Bereits in Kapitel 3.6.2 wurde die eGFP-Expression als Indikator verwendet. Es wurde wiederum in transienten Transfektionsansätzen gearbeitet, da einige der Deletionen in SF91 nicht mit dem retroviralen Lebenszyklus vereinbar sind.

Die transiente Proteinexpression (eGFP) wurde 48 Stunden nach Transfektion im Durchflusszytometer vermessen. Bei Verwendung von 293T-Zellen zeigten etwa 60 bis 80 % der Zellen eine eGFP-Expression (Kap. 3.7.2.1). Die Varianz der Expression innerhalb einer Massenkultur war bei der transienten Transfektion verglichen mit der Virustransduktion wesentlich höher. Dies lag wahrscheinlich vor allem daran, dass einzelne Zellen transient mit unterschiedlichen Mengen an Plasmid-DNA getroffen wurden, bei der Infektion hingegen die meisten Zellen nur eine Transgenkopie enthielten.



**Abb. 44: Transiente Proteinexpression der SF91-Mutanten**

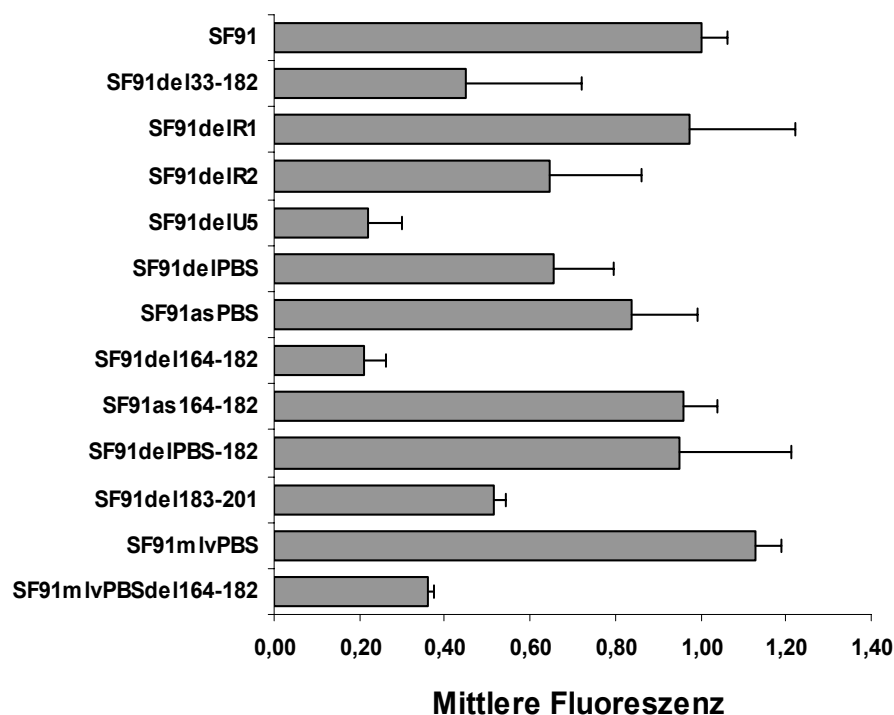
Die Proteinexpression wurde in der Durchflusszytometrie 48 h nach transienter Transfektion aufgenommen. Einige der SF91-Mutanten wichen in der eGFP-Expression stark von der im Wildtypvektor gemessenen ab. Gezeigt ist ein charakteristischer Versuch.

Die Ergebnisse der Proteinexpression in 293T-Zellen konnten mit SC1-Zellen trotz der geringen Zellzahlen an eGFP-positiven Ereignissen aufgrund der niedrigen Transfektionseffizienz in diesen Zellen reproduziert werden.

Einige Vektoren unterschieden sich deutlich in der Höhe der Fluoreszenz vom Wildtypvektor SF91 (Abb. 44). Die bedeutendsten Unterschiede waren wie folgt (Abb. 45):

Verglichen mit dem SF91 zeigte der Vektor mit der Deletion der Basen +33 bis +182 (SF91del33-182) eine um 50 % reduzierte eGFP-Expression. Die Deletionen der U5-Region sowie die Deletion der 19 stromabwärts der PBS gelegenen Basen führten zu einer sehr starken Reduktion der eGFP-Expression (auf etwa 20 % reduziert). Dagegen führte die Deletion der PBS zu einem geringeren Verlust der Transgenexpression (Reduktion auf 65 %).

Mit Bezug auf die Transgenexpression bei der Virustransduktion der SIN-Vektoren (vergleiche auch Kap. 3.6.2) hätte man erwarten können, dass die Deletion der Basen +33 bis +182 zu einer guten eGFP-Expression führt, da die RNA zum größten Teil im Kern gespleißt wird und in dieser Form gut in das Zytoplasma transportiert wird. Auch die Mutanten mit der Deletion der U5-Region und der Region stromabwärts der PBS (SF91del164-182) zeigten ein verstärktes Spleißen mit einer Anreicherung gespleißter RNA im Zytoplasma, zu erkennen anhand der intensiven Bandenintensitäten im RNA-Blot. Auch hier hätte man ein hohes Transgenexpressionsniveau erwartet.



**Abb. 45: eGFP-Expression bei transienter Transfektion**

48 h nach transienter Transfektion wurden die 293T-Zellen auf die Transgenexpression untersucht. Einige der eingesetzten Vektoren zeigten zum Teil starke Abweichungen vom Vektor SF91. Die durchflusszytometrischen Analysen wurden wie unter 3.7.2.1 beschrieben aufgenommen. Die Ergebnisse eines Vektors setzen sich aus drei bis neun unabhängigen Experimenten zusammen. Die hier dargestellten Ergebnisse konnten auch nach Abgleich der im Phosphorimager quantifizierten RNA bestätigt werden.

Die eGFP-Expression unterscheidet sich auch stark von der Deletions- und der antisense-Mutante 164-182. Während die mittlere Fluoreszenz bei der Deletion (SF91del164-182) drastisch auf etwa 20 % reduziert wurde, konnte die antisense-Variante die Expression des Wildtyps wieder herstellen, obwohl beide Vektoren ähnlich viel gespleißte RNA erzeugten und in das Zytoplasma exportierten.

Die Deletion der PBS ging mit einer reduzierten eGFP-Expression einher (65 %). Da in dieser Vektorkonfiguration kaum noch gespleißte RNA gebildet wurde, erscheint dieser Verlust der eGFP-Expression gering. Auffällig sind diesbezüglich im Vergleich die Deletionen der Region 3' der PBS sowie die kombinierte Deletion beider Regionen. Wie erwähnt lag das Expressionsniveau von SF91del164-182 bei 20 % des Wildtyps. Wurde zusätzlich die PBS deletiert lag die mittlere Fluoreszenz bei fast 100 % (SF91delPBS-182). Während beide Mutanten fast nur gespleißtes Transkript bildeten, das in hoher Konzentration im Zytoplasma zu finden war, schien die PBS sich hier inhibitorisch auf die Translation auszuwirken.

Die Umkehrung der PBS-Sequenz bzw. der Austausch der PBS von SF91 gegen andere PBS-Sequenzen von MLV oder auch die künstliche PBS führte zu keiner deutlichen Änderung der Proteinexpression. Das galt ebenfalls bei gleichzeitiger Kotransfektion mit dem 5-fachen molaren Überschuss an künstlicher tRNA. Diese Daten legen nahe, dass die PBS-Sequenz keine eigenständigen Auswirkungen auf die Translationskontrolle hat.

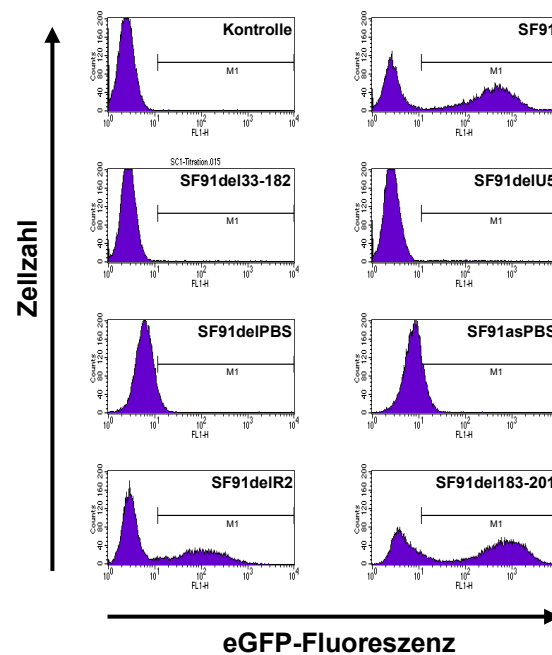
Die Ergebnisse zeigen, dass die verschiedenen Elemente nicht nur einen Einfluss auf den Spleiß- und RNA-Exportprozess ausüben, sondern unabhängig davon wahrscheinlich auch an der Regulation der Proteinexpression beteiligt sind. Eine zentrale Rolle scheint dabei wiederum die PBS zu spielen, die einen inhibitorischen Einfluss auf die Translation ausübt. Die Deletionen der U5-Region und der 19 Basen stromabwärts der PBS hemmen die Proteinexpression; diese Regionen scheinen von daher wichtig für eine hohe Translationseffizienz zu sein.

### 3.12 Die Bedeutung des untranslatierten ersten Exons für den retroviralen Lebenszyklus

Die unterschiedlichen Mutationen der „Wildtyp“-Variante SF91 enthalten Deletionen verschiedener Module, die die Fähigkeit zur Virusproduktion betreffen können. Daher wurde untersucht, ob diese Mutanten in der Lage sind, in einer Verpackungszelllinie kompetente Viruspartikel herzustellen. Die Plasmide der verschiedenen Mutanten wurden mit Plasmiden für das Hüllprotein Eco und für das Kapsidprotein Gag/Pol kotransfiziert. Es wurde der Virusüberstand geerntet und dieser auf SC1-Zellen austitriert.

Wie zu erwarten, zeigten einige der Deletionsmutanten keine produktive Infektion der Zielzelle (Abb. 46, Abb. 47). Dies ist mit der Funktion des jeweilig entfernten Elements leicht zu erklären. Die Deletion der PBS-Region verhindert die für die reverse Transkription notwendige Primerbindung, die Deletion der U5-Region unterbindet durch das Fehlen der invertierten Wiederholungen (IR, inverted repeats) die Integration des Provirus in das Wirtsgenom. Das gleiche gilt für die kombinierten Deletionen in SF91del33-182 bzw. SF91delPBS-182, die beide die PBS betreffen. Ebenso konnten keine Virustiter für die Vektormutante mit künstlicher PBS (SF91artPBS) gemessen werden, wenn keine geeigneten tRNAs intrazellulär vorhanden waren. Bei Kotransfektion von SF91artPBS mit komplementärer plasmidkodierter künstlicher tRNA wurden wildtypanaloge Titer von  $1 - 2 \times 10^6$  Partikeln/ ml erreicht. Ein 5-facher molarer Plasmidüberschuss für tRNA gegenüber Vektor-DNA war vollkommen ausreichend (siehe Kap. 3.8.2). Dies galt für beide eingesetzten künstlichen tRNAs.

Hingegen war eine geringe produktive Infektion nach partieller Deletion der R-Region (SF91delR<sub>1</sub>, SF91delR<sub>2</sub>), der Deletion SF91del164-182 sowie der Deletion SF91del183-201 festzustellen (Abb. 46, Abb. 47). Die erste Hälfte der R-Region trägt den RSL, der wichtig für die Akkumulation ungespleißter RNA im Zytoplasma ist (Trubetskoy et al., 1999). Obgleich der RSL in der Mutante SF91delR<sub>1</sub> entfernt wurde, konnten moderate Virusüberstände generiert werden (Titer bei  $1 \times 10^5$  Partikel/ml). Die zweite Hälfte der R-Region enthält das retrovirale Polyadenylierungssignal AATAAA. Vermutlich wird nach Transgeninsertion ein Polyadenylierungssignal gelesen, das sich weiter stromabwärts in zellulärer DNA befindet.



**Abb. 46: Produktive Infektion durch SF91-Mutanten**

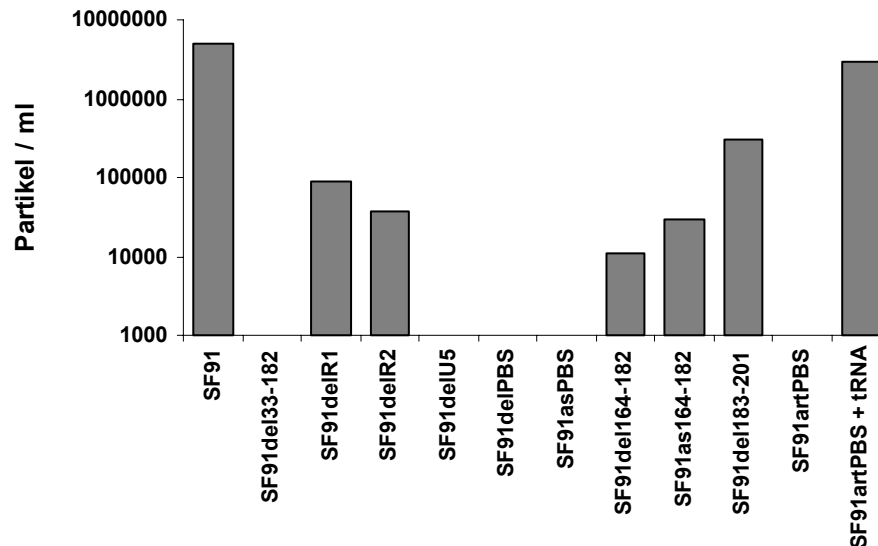
Dargestellt sind die 48h-Überstände einer Auswahl der SF91-Deletionsmutanten. Während die Vektoren SF91del133-182, SF91delU5, SF91delPBS und SF91asPBS keine infektiösen Partikel mehr bilden können, ist eine niedrige Partikelproduktion mit den Mutanten SF91delR<sub>2</sub> und SF91del183-201 möglich. Zur Infektion mit SF91 wurden 5 µl, zur Infektion aller Mutanten wurden 450 µl Überstand eingesetzt. Für die Mutanten SF91delPBS und SF91asPBS ist eine Rechtsverschiebung der „negativen Population“ zu erkennen.

Alle weiteren erwähnten Deletionen enthalten keine für die Virusproduktion essentiellen bekannten Elemente. Die Titer lagen allerdings alle weit unter dem des SF91. Die Titer der Mutanten SF91del164-182 sowie SF91as164-182 sind mit ca.  $1 \times 10^4$  Partikeln/ml sehr gering und für beide Mutanten im gleichen Bereich. Mit der Deletionsmutante SF91del183-201 wurden Titer um  $2 \times 10^5$  Partikel/ml erreicht.

Damit üben diese Sequenzen keine zwingend notwendigen aber stimulierende Funktionen für die Virusproduktion oder Integration aus.

Bei den Vektoren, die nach Verpackung keine stabile Transduktion von Zielzellen zeigten, war eine Rechtsverschiebung der „negativen Population“ der Zielzellen festzustellen (Abb. 46, SF91delPBS und SF91asPBS). Sehr ausgeprägt waren diese Verschiebungen bei der Mutante mit deletierter PBS (SF91delPBS) und auch bei der Mutante mit der künstlichen PBS (SF91artPBS), sofern keine komplementäre tRNA per Kotransfektion bereitgestellt wurde. Die Rechtsverschiebung der „negativen Population“ ohne stabile Transduktion der Zielzellen legt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um eine Pseudotransduktion der Zielzellen handelt. Im Rahmen der Arbeit wurde auf diesen transienten Gentransfer nicht weiter eingegangen. Mögliche Erklärungen und ein Nutzen des Pseudotransfers werden in

der Diskussion (Kap. 4.2.2) besprochen. Weiterführende Untersuchungen der Pseudotransduktion mit den Deletionsmutanten delPBS und delU5 werden derzeit im Labor von Prof. Dr. Baum untersucht.



**Abb. 47: Titer ausgewählter SF91-Mutanten**

Für die Mutanten mit Deletionen beider Abschnitte der R-Region sowie bei Veränderungen der Sequenzen 3' der PBS waren geringe Titer festzustellen. Dagegen konnten für einige Vektoren keine infektiösen Viruspartikel nachgewiesen werden (SF91del33-182, SF91delU5, SF91delPBS, SF91asPBS). Die Einführung einer artifiziellen PBS führte zu einem absoluten Titerverlust, der durch Komplementierung mit einer künstlichen tRNA vollständig behoben werden konnte.

Die Überprüfung der Virusproduktion von SF91-Mutanten bestätigte die Bedeutsamkeit einzelner Regionen der 5'UTR für den viralen Lebenszyklus. Regionen 3' der PBS konnten stimulierende Funktionen in der Partikelproduktion bzw. der Zielzellentransduktion zugeschrieben werden. Die vorliegenden Ergebnisse liefern darüber hinaus neue Erkenntnisse, die zur Konstruktion von Vektoren für einen transienten Gentransfer genutzt werden können.

## 4 Diskussion

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war, eine neue Generation retroviraler Vektoren für die Gentherapie zu entwickeln, die durch ein vermindertes Risiko von Nebenwirkungen einen erhöhten Sicherheitsanspruch erfüllen. Es wurde eine Gruppe selbstinaktivierender (SIN-) Vektoren vorgestellt, in die unterschiedliche Regulations- und Prozessierungselemente integriert worden sind. Die Vektoren wurden auf ihr Potential bei der Generierung von Viruspartikeln, auf ihre Transduktionseffizienz und die Höhe der Transgenexpression in einer murinen Fibroblastenzelllinien und in primären hämatopoetischen Zellen untersucht. Die gewonnenen Daten lieferten wichtige Erkenntnisse sowohl für technische Aspekte der Vektorkonstruktion als auch für biologische Prozesse der retroviralen Genregulation.

Die Virustiter der SIN-Vektoren waren wesentlich niedriger als die der LTR-Vektoren. Durch den Einbau des PRE in die SIN-Vektoren konnten allerdings erstmals Titer erreicht werden, die sich für die Transduktion primärer Zellen eignen.

Der Vergleich der Transgenexpression innerhalb der SIN-Vektoren zeigte, dass gegenüber einem konventionellen SIN-Vektor (SinSF) ein zwischen Promotor und Transgen gelegenes Verpackungssignal (SinSF110) die Expression hemmt, ein Intron in dieser Region (SinSF91) die Expression steigert. Die zusätzliche Integration eines PRE, bevorzugt in die 3'UTR stromaufwärts des 3'LTR (SinSF91P1), führte zu einer starken Expressionssteigerung, so dass das Expressionsniveau korrespondierender LTR-Vektoren (SF91P) erreicht wurde.

Auf posttranskriptioneller Ebene zeigten die SIN-Vektoren trotz gleicher Sequenzen des Spleißdonors, Spleißakzeptors und Introns einen wesentlich effizienteren Spleißprozess als LTR-Vektoren, was zu eingehenden Analysen des Spleißmechanismus einfacher Retroviren Anlass gab. Hierbei wurden neue Prozessierungselemente in der stark konservierten 5'UTR stromaufwärts des retroviralen Spleißdonors entdeckt, die die Spleißreaktion regulieren. Diese Region scheint dabei abhängig von bestimmten Sequenzelementen eine spleißinhibitorische Rolle inne zu haben. Eine Sonderstellung neben den anderen analysierten Sequenzelementen dieses Bereichs nimmt die PBS ein, die als einziges Element spleißfördernd zu wirken scheint. Diese Funktion ist unabhängig von der Fähigkeit der Primerbindung. Vermutlich spielt die Sekundärstruktur des untranslatierten ersten Exons eine wichtige Rolle in der Spleißregulation.

Diese Daten erlauben grundsätzlich neue Einblicke in die Spleißregulation von Retroviren und ermöglichen zudem die Konstruktion verbesserter retroviraler Vektoren mit erhöhter Genexpression und potentiell erhöhter Sicherheit.

## 4.1 *Cis*-Elemente beeinflussen den Titer und die Genexpression retroviraler Vektoren

Einfache Retroviren exprimieren keine regulatorisch wirkenden akzessorischen Proteine. Die virale Genexpression wird von der Wirtszelle und *cis*-regulatorischen Sequenzen der viralen RNA bestimmt. Ein Sicherheitsaspekt retroviraler Vektoren ist die Entfernung nicht benötigter viraler Elemente. Allerdings müssen die Sequenzen, die für den Lebenszyklus essentiell sind und nicht durch z.B. ein Vektorverpackungssystem zur Verfügung gestellt werden können, im Vektorgenom erhalten bleiben. Im Kontext von SIN-Vektoren wurden in dieser Arbeit die Auswirkungen weiterer *cis*-aktiver Elemente wie ein Intron und das PRE des Woodchuck Hepatitisvirus systematisch getestet. Der Einfluss dieser Elemente auf den Virustiter und die Transgenexpression werden im Folgenden diskutiert.

### 4.1.1 Die SIN-Konfiguration mindert den Virustiter

Die Virustiter, die mit den SIN-Vektoren erreicht wurden, lagen weit unterhalb der Titer korrespondierender LTR-Vektoren. Die Aspekte, die hier diskutiert werden sollen, behandeln den Einfluss der Positionen der Promotoren und des PRE auf den Virustiter. Die Auswirkungen, die das untranslatierte erste Exon bzw. seine Sekundärstruktur auf die Expression genomischer RNA und damit auf den Virustiter haben, werden in einem späteren Kapitel angesprochen (Kap. 4.3).

Die Versetzung des internen Promotors von seiner konventionellen Position direkt vor dem Transgen vor das Verpackungssignal stromabwärts der PBS führte zu einem starken Partikelkonzentrationsverlust von über einer logarithmischen Einheit. Die Integration eines das Verpackungssignal einschließenden Introns kann die Partikelproduktion wieder leicht erhöhen. Dies ist vermutlich damit zu erklären, dass alleine die Anwesenheit von Spleißstellen auf der RNA zur Beladung mit regulatorischen Proteinen und damit zur Stabilisierung der RNA führt. Unabhängig von dem eintretenden Spleißereignis könnte die RNA besser an den Exportmechanismus gekoppelt (Reed und Hurt, 2002) oder die Faltung des Verpackungssignals verbessert sein. Dies würde den Titeranstieg in Vektoren mit Spleißstellen erklären, der nur mit der Menge an ungespleißter RNA korrelieren kann. Dieser Effekt wurde auch in LTR-Vektoren beobachtet (Hildinger et al., 1999). Alternativ könnten gebundene Spleißfaktoren die Interaktion mit dem Nukleokapsid von Gag fördern. In jedem Fall ist eine Vervollendung des Spleißprozesses mit der Verpackung der RNA nicht vereinbar, da das Verpackungssignal im Intron liegt.

Dass die Virusproduktion durch den Transfer des internen Promotors zwischen die PBS und den SD stark abnimmt, kann auf verschiedene Interferenzen zurückzuführen sein. Es besteht eine Konkurrenz zwischen den Promotoren im 5'LTR und in interner Position, die sich gegenseitig supprimieren können (Emerman und Temin, 1984). Beide Sequenzbereiche binden die gleichen Regulatormoleküle und können die Transkription initiieren. Zudem können beide Transkripte aufgrund der Gegenwart des Verpackungssignals verpackt werden. Allerdings führt nur die Initiation vom 5'LTR zu genomischer RNA, die eine produktive Infektion von Zielzellen leisten kann. Da die Titerbestimmung in den durchgeführten Experimenten allein aufgrund der eGFP-positiven Zellen vorgenommen wurde, kann zwischen Partikelformation, Infektion, Provirusintegration und Transgenexpression nicht differenziert werden.

Als weitere Interferenz des internen U3-Bereichs könnte dieser die Funktionen der benachbarten Bereiche, des Verpackungssignals und der PBS, beeinträchtigen. Die Funktionen dieser Regionen sind sehr abhängig von der richtigen Sekundärstruktur, die durch die Integration von Sequenzelementen zerstört werden kann. Der interne Promotor/Enhancerbereich kann auch die Prozessierung nach vollzogener reverser Transkription beeinflussen. Für retrovirale Vektoren ist außerdem beschrieben worden, dass Deletionen im U3-Bereich, wie sie zur Konstruktion von SIN-Vektoren im LTR vorgenommen wurden, einen negativen Effekt auf die Titerproduktion haben (Yu et al., 1986).

Bei den SIN-Vektoren, die das Verpackungssignal stromabwärts des internen Promotors tragen (SinSF110 und SinSF91), ist theoretisch auch eine heterodimere RNA-Verpackung einer genomischen mit einer subgenomischen vom internen Promotor initiierten RNA denkbar, die die Chance auf eine produktive Transduktion von Zielzellen herabsetzt. *In vivo* konnten Heterodimere bei der Verpackung viraler RNA bislang nicht nachgewiesen werden (Dube et al., 1976; Rasmussen et al., 2002).

Durch die Integration des PRE des Woodchuck Hepatitisvirus konnte die Partikelproduktion um einen Faktor von zwei bei den LTR-Vektoren und um einen Faktor von bis zu 20 bei den SIN-Vektoren gesteigert werden. Dies könnte an dem bereits erwähnten Einfluss des PRE auf die Polyadenylierung, die Stabilität und den Export der RNA liegen (Donello et al., 1998; Huang et al., 1999; Loeb et al., 1999). Dem posttranskriptionellen regulatorischen Element von HBV wird außerdem eine Rolle bei der Spleißinhibition und der Förderung des Transports ungespleißter RNA aus dem Kern zugesprochen (Huang et al., 1999). Bei einem Vergleich der Relationen von ungespleißter zu gespleißter RNA der LTR-gesteuerten Vektoren SF91 und SF91P in dem Northernblot

gesamtzellulärer RNA konnte eine Verschiebung zu ungespleißter RNA bei SF91P festgestellt werden (Abb. 25). Das legt nahe, dass die spleißinhibitorische Wirkung zumindest in diesem Vektorkontext auch für das PRE des Woodchuck Hepatitisvirus gelten könnte. Diese Funktion des PRE würde den auffallenden Titeranstieg durch Integration des Elements in die SIN-Vektoren erklären. Aufgrund der hohen Spleißkompetenz dieser könnte ein spleißinhibierendes Element eine größere Auswirkung auf die SIN-Vektoren haben. Das PRE wirkte bei LTR-Vektoren vermutlich weniger deutlich titersteigernd, da diese bereits ohne PRE ausreichende Mengen ungespleißter RNA exprimierten.

Durch die Integration des PRE in die SIN-Vektoren war es erstmals möglich, einen Virustiter des Vektors SinSF91P1 herzustellen, der mit bis zu  $3 \times 10^6$  Partikeln/ml für die Infektion von primären Zellen geeignet war.

Einen wesentlichen Einfluss auf den Virustiter könnte auch die Sekundärstruktur des untranslatierten ersten Exons ausüben (Kap. 4.3).

#### 4.1.2 Das Verpackungssignal hemmt die Translation

Retrovirale Verpackungssignale auf der zu translatierenden RNA scheinen die Genexpression stark herabzusetzen. Das Verpackungssignal bildet eine etwa 350 Basen große, hoch konservierte und stark gefaltete Sekundärstruktur in der 5'UTR aus, die auch heterologe RNA in retrovirale Partikel zu inkorporieren vermag (Adam und Miller, 1988; Bender et al., 1987; De Tapia et al., 1998; Mougel und Barklis, 1997; Mougel et al., 1996). Die korrekte Faltung ist unabhängig von flankierenden Sequenzen. Es wurde gezeigt, dass die Integration des Verpackungssignals stromabwärts von *env* ebenfalls in der Lage ist, diese subgenomische RNA zu verpacken (Mann und Baltimore, 1985). Allerdings hat sich für die Vektorkonstruktion wegen der wesentlich besseren Effizienz die Cap-proximale Position durchgesetzt, welche der Wildtypsituation entspricht.

Die Ribosomen müssen von Cap aus beginnend das Verpackungssignal überwinden. Ausschalten lässt sich diese Hürde, indem eine interne ribosomale Eintrittsstelle (internal ribosomal entry site, IRES) oder ein interner Promotor stromabwärts des Verpackungssignals direkt 5' des Transgens eingeführt wird. Alternativ kann das Verpackungssignal entsprechend der Konfiguration des retroviralen Env-Transkripts von Spleißstellen eingefasst werden. Diese Strategie wurde hier erstmals für die Konstruktion retroviraler SIN-Vektoren eingehend evaluiert. Im SIN-Vektor SinSF91 garantierte die Position des Verpackungssignals innerhalb des Introns den Transfer des Introns in die Zielzelle. Der umfassende Vektorvergleich der vorliegenden Arbeit zeigte sowohl in der

LTR-Konfiguration als auch in SIN-Vektoren eine verbesserte Transgenexpression derjenigen Konstrukte, die das Verpackungssignal durch Spleißen entfernen konnten (SF91, SinSF91) bzw. kein Verpackungssignal in der 5'UTR aufwiesen (SinSF).

Diese hier erstmals für MLV erhobenen Daten sind mit der Literatur gut vereinbar. Sowohl von viralen als auch von zellulären mRNAs ist bekannt, dass hochstrukturierte 5'UTRs die Translationseffizienz herabsetzen (Geballe und Gray, 1992; Guan und Weiner, 1989; Hentze et al., 1987; Kozak, 1986; Miele et al., 1996; Niepel et al., 1999; Pelletier und Sonenberg, 1985). Vermutlich geschieht dies durch eine Behinderung des Lesens der mRNA durch die Ribosomen ausgehend von Cap. Für den RU5-Bereich des Spleen Necrosis Virus (SNV) wird postuliert, dass Interaktionen dieses Bereichs mit zellulären Translationsfaktoren die hochstrukturierte 5'UTR auflösen und eine bessere Translation möglich machen könnten (Roberts und Boris-Lawrie, 2000).

Auch die Überexpression einer Komponente des Translationsinitiationskomplexes eIF4E soll helfen, eine inhibierende 5'RNA-Struktur aufzulösen (Koromilas et al., 1992). Daher könnte die expressionssenkende Wirkung des Verpackungssignals differenzierungsabhängig sein.

#### **4.1.3 Ein Intron fördert die Genexpression**

Die Anwesenheit eines Introns erhöht die Transgenexpression bzw. die Stabilität der RNA und die Effizienz der Translation. Spleißen, RNA-Export aus dem Kern und Translation sind eng gekoppelte Prozesse, die sich gegenseitig beeinflussen und verstärken können (Fong und Zhou, 2001; Maniatis und Reed, 2002; Nott et al., 2004; Reed und Hurt, 2002). Im Gegensatz zu einigen zellulären mRNAs, wie z.B. der beta-Globin mRNA, kann die mRNA von eGFP auch ungespleißt in das Zytoplasma exportiert werden (Li und Garoff, 1998; Schambach et al., 2000). Komplexere Retroviren exprimieren akzessorische Proteine, um nicht vollständig gespleißte RNAs aus dem Kern auszuschleusen. So wird beispielsweise die genomische RNA von HIV über die RRE/Rev-Wechselwirkung aus dem Kern transportiert (Pollard und Malim, 1998). Einfache Retroviren wie MLV verfügen über keine akzessorischen Proteine. Daher muss hier die Spleißregulation ausschließlich über die Sequenz bzw. die Sekundärstruktur des Transkripts und über die Interaktion mit zellulären Faktoren gesteuert werden.

In der hier vorgestellten Fibroblastenzelllinie SC1 zeigte der spleißkompetente Vektor mit SIN-Konfiguration eine um den Faktor drei erhöhte Transgenexpression gegenüber dem Vektor ohne Intron (SinSF91/SinSF110). Im Vergleich zu einem Konstrukt ohne Verpackungssignal in der 5'UTR betrug die Expressionssteigerung spleißkompetenter

Vektoren ca. 50 % (SinSF91/SinSF). Diese Ergebnisse wurden mit der eGFP-cDNA erzielt. Es ist gut möglich, dass andere Sequenzen, wie z.B. die beta-Globin-cDNA, in noch viel stärkerem Ausmaß von einem Intron in der 5'UTR profitieren (Schambach et al., 2000). Zudem liegen auch präliminäre Daten vor, nach denen ein Intron in der 5'UTR den Enhancer besser auf den zugehörigen Promotor „fixiert“, möglicherweise infolge der bekannten positiven Rückkoppelung zwischen Spleißen und Transkriptionsinitiation (Anderson et al., 2003).

Die verbesserte Transgenexpression durch Spleißstellen eröffnet daher die Möglichkeit, Vektoren mit schwächeren Enhancern zu konstruieren. Dies ist ein wichtiger Faktor im Hinblick auf die Biosicherheit, da schwache Enhancer das Problem der Hochregulierung benachbarter zellulärer Gene reduzieren sollten (Baum et al., 2003; Ramezani et al., 2003). Vor diesem Hintergrund ist der hier erstmals erbrachte Beweis der korrekten Funktion eines Introns in einem SIN-MLV-Vektor ein wichtiger Fortschritt in der Vektorentwicklung.

#### **4.1.4 Das PRE wirkt auf RNA-Prozessierung und Translation**

In verschiedenen retro- und lentiviralen Vektorsystemen ist gezeigt worden, dass die Integration des posttranskriptionellen regulatorischen Elements des Woodchuck Hepatitisvirus (PRE) die Genexpression steigert (Schambach et al., 2000; Zufferey et al., 1999). Dies konnte ebenfalls bei der Integration des PRE in die untersuchten SIN-Vektoren bestätigt werden. Die Genexpression wurde um das drei- bis vierfache im Vergleich zu korrespondierenden Vektoren ohne PRE gesteigert. Dies galt für LTR- und SIN-Vektoren.

Das PRE beeinflusst die RNA-Prozessierung (Donello et al., 1998; Huang et al., 1999; Loeb et al., 1999). Dies führt zu einer erhöhten RNA-Konzentration und wohl auch indirekt zu einer besseren Translationseffizienz im Zytoplasma. Die Northernblot-Daten zeigten, dass der RNA-Gehalt durch Integration des PRE bei LTR-Vektoren um fast 50 % stieg, bei SIN-Vektoren dagegen sogar um einen Faktor von 2,5. Der Zugewinn an eGFP-Expression übertraf leicht die RNA-Expressionssteigerung sowohl in LTR- als auch in SIN-Vektoren.

Die SIN-Vektoren wurden entwickelt, um sie für eine möglichst sichere Gentherapie bei der Knochenmarktransplantation einsetzen zu können. Der optimierte SIN-Vektor SinSF91P1 war erstmals für die Transduktion primärer Knochenmarkzellen geeignet. Mit Ausnahme der frühen Sca-1-positiven Zellpopulation zeigte sich auch in diesen primären Zellen eine vergleichbar hohe Transgenexpression korrespondierender LTR- und SIN-

Vektoren, die ein Intron und ein PRE trugen. Wichtig ist zu überprüfen, wie sich die konstruierten retroviralen Vektoren *in vivo* nach Gentransfer in Knochenmarkstammzellen verhalten. Entscheidende Parameter sind dabei die Kinetik und die Differenzierungsabhängigkeit der Transgenexpression.

#### **4.1.5 Verbesserte RNA-Prozessierung in der SIN-Konstruktion**

Bei der Analyse der Gesamt-RNA vektortransduzierter Fibroblasten konnte für die LTR-Vektoren neben gespleißter RNA ein großer Teil ungespleißter RNA nachgewiesen werden (balanciertes Spleißen). Letztere, die genomische RNA, ist physiologisch für den Lebenszyklus von Retroviren notwendig, um neue Partikel verpacken zu können und das Gag/Pol-Polyprotein zu exprimieren. Im Vektorkontext konnte auch die ungespleißte RNA in Protein translatiert werden. Allerdings war die Translation weniger effizient als bei gespleißter RNA. Dies reflektiert die enge Verbindung zwischen Transkription, Spleißen, Export und Translation, was sowohl dem Energiehaushalt wie auch der Qualitätskontrolle des Zellstoffwechsels zugute kommt (Maniatis und Reed, 2002).

SIN-Vektoren besitzen im Gegensatz zu den LTR-Vektoren nur eine einfache Version von Enhancersequenzen, die die Genexpression stimulieren können. Die vergleichbar hohe Transgenexpression korrespondierender LTR- und SIN-Vektoren, die ein Intron besitzen (SF91 und SinSF91), konnte auf eine verbesserte RNA-Prozessierung in den selbstinaktivierenden Vektoren zurückgeführt werden. Das Gesamtzelllysat SIN-vektortransduzierter Zellen zeigte fast ausschließlich gespleißte RNA, die effektiv in Protein translatiert werden konnte. Die nachfolgenden Untersuchungen lieferten Hinweise für einen bislang unbekannten Mechanismus der Spleißregulation über eine inhibitorische Funktion des untranslatierten ersten Exons (siehe Kap. 4.2.3).

## 4.2 Die hochkonservierte 5' untranslatierte Region beeinflusst den Lebenszyklus der Mausleukämieviren

In dieser Arbeit konnte ein gegensätzliches Spleißverhalten von LTR- und SIN-Vektoren festgestellt werden. Da beide Vektorkonfigurationen über identische Spleißdonor- und -akzeptorstellen verfügen und diese retroviralen Vektoren wie auch das Wildtypvirus keine akzessorischen Proteine für die Spleißregulation exprimieren, müssen andere regulatorische Elemente auf der viralen RNA für die Regulation verantwortlich sein. In der 5'UTR der SIN-Vektoren befindet sich eine Deletion der Basen +33 - +182 bezogen auf Cap. Diese umfasst die PBS und flankierende Regionen.

Bei der 5'UTR von MLV handelt es sich um eine Sequenz, die starke Sekundärstrukturen ausbildet. Sie ist in murinen Retroviren hochgradig konserviert (Mougel et al., 1993). Die für die 5'UTR von MoMLV beschriebenen Konformationen für den monomeren und den dimeren Zustand beruhen auf experimentellen Daten (Mougel et al., 1993) (Kap. 1.2.5, Abb. 5). Die ersten 28 Basen der R-Region bilden eine Stammschleife aus. Dieser RSL ist bereits von Trubetskoy et al. (1999) beschrieben und charakterisiert worden. Die U5-Region zusammen mit der PBS und der Region stromabwärts der PBS bilden eine verzweigte Stammschleifenstruktur. Dabei formen 10 von 18 Nukleotiden der PBS die Schleife, die zur Bindung einer tRNA zur Verfügung stehen muss (Mougel et al., 1993).

Direkt stromaufwärts der PBS am 3'-Ende der U5-Region befindet sich eine weitere Stammschleife (Mougel et al., 1993). Die konservierten Haarnadelstrukturen im 3'U5 sind ebenfalls für das Rous Sarkoma Virus (Cobrinik et al., 1991) und für HIV-1 und HIV-2 (Baudin et al., 1993; Berkhout und Schoneveld, 1993) beschrieben worden. In MoMLV wie auch in RSV liegt die stromabwärts der PBS gelegene Region gepaart mit Nukleotiden der U5-Region vor (Cobrinik et al., 1991; Mougel et al., 1993). Bestimmte Bereiche der U5-Region sollen an der Initiation der reversen Transkription und an der Verpackung beteiligt sein (Lobel und Goff, 1985; Murphy und Goff, 1989). Konformationsänderungen der 5'UTR verändern die Translationseffizienz in RSV und HIV-1 (Baudin et al., 1993; Bieth et al., 1990; Darlix, 1986). Das könnte auch ein Hinweis darauf sein, dass virale Prozesse generell von alternativen Sekundärstrukturen durch Konformationswechsel beeinflusst werden (Mougel et al., 1993).

Der SD befindet sich am Ende des Stamms, der durch Sequenzabschnitte 3' der PBS zusammen mit der U5-Region ausgebildet wird. Die Integration des internen Promotors inklusive der ersten 32 Basen der R-Region erfolgte zwischen der PBS und dem SD. Damit

sind nicht nur Sequenzabschnitte 5' des SD entfernt worden; es wurde wahrscheinlich auch ein Teil der Sekundärstruktur des untranslatierten ersten Exons durch die Promotorintegration zerstört. Vermutlich haben Veränderungen der Sekundärstruktur zu der unterschiedlichen RNA-Prozessierung in LTR- und SIN-Vektoren geführt.

Um die RNA-Prozessierung und Expressionsregulation in MLV genauer zu analysieren und zugleich Rückschlüsse auf die veränderte RNA-Prozessierung und Transgenexpression in den SIN-Vektoren zu ziehen, wurden in der vorliegenden Arbeit, ausgehend von dem LTR-gesteuerten Vektor SF91, verschiedene Regionen der 5'UTR in Anlehnung an die deletierten Sequenzen der SIN-Konfiguration deletiert bzw. mutiert. Es wurden die Auswirkungen dieser Veränderungen auf die RNA-Produktion, die Transgenexpression sowie die Fähigkeit zur Herstellung infektiöser Viruspartikel studiert. Die Ergebnisse werden im Folgenden diskutiert, wobei die potentiellen Auswirkungen auf die Sekundärstruktur besonders beachtet werden.

#### 4.2.1 Translationsregulation durch Sequenzen des untranslatierten ersten Exons

Zunächst soll hier auf die Auswirkungen der Veränderungen der 5'UTR auf die Transgenexpression eingegangen werden (Tab. 5).

| Vektor            | RNA im<br>Zytoplasma<br>(Anteil gespleißter RNA) | Protein |
|-------------------|--------------------------------------------------|---------|
| SF91 Wildtyp      | 100 (65)                                         | 100     |
| Deletion U5       | 90 (95)                                          | 20      |
| Deletion PBS      | 80 (40)                                          | 65      |
| Deletion PBS-182  | 75 (95)                                          | 95      |
| Deletion 164-182  | 120 (95)                                         | 20      |
| Antisense 164-182 | 90 (95)                                          | 95      |

**Tab. 5: Abgleich der RNA- und Proteinexpression**

Die zytoplasmatische RNA-Menge und die transient exprimierte Proteinmenge von transduzierten Zellen sind im Vergleich dargestellt. Die Auflistung umfasst nur ausgewählte retrovirale Vektoren. Die Angaben sind in %, wobei Werte für SF91 gleich 100 % gesetzt wurden. Man beachte den Anteil gespleißter RNA von nur 40 % im Zytoplasma für die Mutante mit deletierter PBS. Alle anderen Mutanten zeigten nahezu ausschließlich gespleißt RNA in der zytoplasmatischen Fraktion.

Die Deletion der U5-Region und die Deletion der stromabwärts der PBS liegenden 19 Nukleotide resultierten in einem Rückgang der Transgenexpression auf ca. 20 %. Von beiden Regionen wurde gezeigt, dass sie wichtig für die Spleißinhibition sind (Kap. 3.7.4, Kap. 4.2.3). Diese beiden Deletionsmutanten zeigten daher hohe Mengen an gespleißtem Transkript im Zytoplasma (Tab. 5). Dass trotz effizienter RNA-Prozessierung eine nur geringe eGFP-Expression detektiert werden konnte, lässt auf eine von der RNA-

Verarbeitung unabhängige Rolle dieser Elemente in der Regulation der Transgenexpression schließen. Dabei scheinen die U5-Region und die 3' der PBS befindliche Region expressionsstimulierend zu wirken. Eine mögliche Erklärung wäre die direkte Bindung von Faktoren, die an der Translationsregulation beteiligt sind. Andererseits bilden die Sequenzen der U5-Region zusammen mit den Basen der Region stromabwärts der PBS den Stamm der konservierten Stammschleifenstruktur der 5'UTR. So ist es ebenso vorstellbar, dass die korrekte Sekundärstruktur die Voraussetzung für eine effiziente Translation ist.

Die Deletion der PBS führte zu einer auf ca. 65 % moderat erniedrigten Transgenexpression im Vergleich zum Kontrollvektor SF91. Dieser Wert ist höher als erwartet, da ohne die PBS das Spleißen nahezu blockiert war. Im Zytoplasma waren reduzierte Konzentrationen an RNA mit einem größeren Anteil ineffizient zu translatierender ungespleißter RNA (60 %) zu finden. Spleißdefekte Vektoren zeigen normalerweise eine mindestens zwei- bis dreifache Reduktion der Genexpression. Die in der Stammschleifenstruktur die Schleife ausbildende PBS scheint demzufolge expressionsmindernd zu wirken.

Der Vergleich der Mutanten SF91delPBS-182 und SF91del164-182 unterstreicht die expressionsmindernde Wirkung der PBS. Obwohl eine wesentlich höhere Konzentration an gespleißter RNA im Zytoplasma vorlag (120 % bei SF91del164-182 gegenüber 75 % bei SF91delPBS-182), zeigte die Mutante SF91del164-182 wie erwähnt eine auf 20 % des Vektors SF91 reduzierte Genexpression. Wurde aber zusätzlich die PBS entfernt (SF91delPBS-182), konnte bezüglich der Genexpression wieder das Wildtypniveau erreicht werden. Der PBS wurde bisher nur eine inhibitorische Rolle in der Transkriptionsregulation zugesprochen (Loh et al., 1988; Petersen et al., 1991). Die Daten dieser Arbeit geben erstmals Hinweise darauf, dass die PBS bzw. die von ihr abhängige Sekundärstruktur auch die Translation beeinflusst.

Bei dem Vergleich mit der Deletionsmutante SF91del164-182 konnte auch die antisense-Orientierung dieser 3' flankierenden Sequenz der PBS (SF91as164-182) die Transgenexpression des Wildtypvektors wieder herstellen (Tab. 5). Dies lässt die Vermutung zu, dass diese Region essentiell als Abstandhalter (Spacer) für eine effiziente Translation ist.

Interessant ist die in der Literatur beschriebene expressionsfördernde Funktion der PBS-flankierenden Sequenzen im Spleen Necrosis Virus (SNV). Der U5-Region wurde in SNV eine Rolle in der Förderung der Translation zugesprochen, indem sie die Assoziation von ribosomalen Proteinen stimuliert (Roberts und Boris-Lawrie, 2000). Es ist denkbar, dass

Sequenzelemente der U5-Region über ihre Funktionen in der Sekundärstruktur der 5'UTR eine wichtige Rolle bei der Translation spielen.

#### 4.2.2 Rolle der 5'UTR im Infektionszyklus

Trotz der Deletion verschiedener Bereiche im 5'UTR können einige der Wildtypmutanten infektiöse Partikel produzieren. Die Titer wurden anhand des Anteils eGFP-positiver Zellen ermittelt. Voraussetzung für die Transgenexpression ist ein vollständig durchlaufener Infektionszyklus. Eine Partikelproduktion von Mutanten, die nur einen Teil des Lebenszyklus durchlaufen können, wie bei der Deletion der PBS oder der U5-Region, konnte mit den Methoden dieser Arbeit nicht bestimmt werden. Während die PBS und die U5-Region essentiell für eine produktive Virustransduktion sind, konnten nach Deletionen in der R-Region (5' oder 3' Hälfte) und der Deletion der zwischen der PBS und dem SD gelegenen Regionen noch geringe Virustiter erreicht werden (Abb. 47).

Die PBS selbst wird für die Bindung des tRNA-Primers als Start der reversen Transkription benötigt. Ohne die PBS kann zwar die virale RNA transient in die Zielzelle gebracht, dort aber nicht in DNA umgeschrieben werden. Gleiches gilt für die antisense-Variante der PBS und für die artifizielle PBS ohne Kotransfektion einer artifiziellen tRNA. Die U5-Region hingegen wird zur Integration des Provirus in die Wirts-DNA mit Hilfe der invertierten Wiederholungssequenzen (inverted repeats, IR) benötigt. Außerdem scheinen Sequenzen der U5-Region von MLV auch an der Verpackung und reversen Transkription beteiligt zu sein (Murphy und Goff, 1989).

Alle anderen Mutanten vermittelten eine sehr geringe Transduktionseffizienz. Die Titer lagen alle weit unterhalb des Bereichs, der mit der Wildtypkonfiguration in SF91 erreicht wurde, und zeigten an, dass die Regionen zwar nicht essentiell sind, aber stimulierend in den Infektionszyklus von Retroviren eingreifen. Für die Deletion der zweiten Hälfte der R-Region, die das Terminationssignal trägt, gilt dabei, dass nach Übertragung der veränderten R-Region von der 5'LTR an die 3'LTR bei der reversen Transkription ein stromabwärts gelegenes Terminationssignal im Provirus oder in der zellulären DNA gelesen werden muss. Bei der Analyse der Deletionen im R-Bereich konnte festgestellt werden, dass nur ein Teilbereich der R-Region, wie die ersten 32 Basen bzw. die letzten 37 Basen, ausreicht, um einen Strangwechsel bei der reversen Transkription bei MLV zu ermöglichen. Bei der Deletion des gesamten R-Bereichs sollte keine produktive Transduktion von Zielzellen stattfinden können, da der Strangwechsel nicht mehr vollzogen werden kann.

Der RSL sorgt für die Akkumulation genomischer RNA im Zytoplasma (Trubetskoy et al., 1999). Mit den gewonnenen Daten kann diese Aussage bestätigt werden. Trotzdem

konnten aber infektiöse Virusüberstände bei Deletion dieser Region generiert werden. Der RSL ist insofern nicht der einzige Faktor für den Export genomischer RNA.

Interessant war die durchflusszytometrisch beobachtete Rechtsverschiebung der „negativen Population“ nach „Infektion“ mit unverdünnten Überständen der Produzentenzellen. Besonders auffällig war dies für die Deletionsmutante der U5-Region (SF91delU5) und der PBS (SF91delPBS) sowie für die antisense-Variante der PBS (SF91asPBS) und die Variante mit der künstlichen PBS (SF91artPBS), wenn nicht mit künstlicher tRNA komplementiert wurde. Wie bereits erwähnt kann die Mutante der U5-Region die revers transkribierte RNA nicht integrieren; Mutanten der PBS können die virale RNA nicht revers transkribieren.

Bei dem beobachteten Phänomen handelt es sich wahrscheinlich um die Übertragung von viraler RNA und/oder von Proteinen in Viruspartikeln (Pseudotransduktion). Dies ist lediglich ein transienter Prozess im Gegensatz zur klassischen retroviralen Transduktion, die obligatorisch zur stabilen Transgeninsertion führt. Dabei wird RNA bzw. Protein in Viruspartikel verpackt und nach Aufnahme der Partikel in das Zytoplasma der Zielzelle eingeschleust. Die retrovirale RNA kann aber aufgrund fehlender Sequenzen nicht revers transkribiert oder stabil integriert werden (Haas et al., 2000). Für die Pseudotransduktion von RNA ist demnach ein Verpackungssignal erforderlich, um diese in Viruspartikel zu verpacken. Signale für die reverse Transkription oder Integration sind allerdings nicht erforderlich. Die in die Zelle geschleuste RNA kann möglicherweise direkt translatiert werden. Die Deletionsmutanten dieser Arbeit tragen alle das Verpackungssignal und wären damit zu einer Pseudotransduktion fähig.

In weiteren Studien wird nun untersucht, ob sich diese Deletionsmutanten für die transiente Veränderung von Zellen nutzen lassen. In der Gentherapie ist diese Anwendung besonders interessant für Transgene, die bei langfristiger Expression toxisch sein könnten.

#### **4.2.3 Ein neuartiger Spleißmechanismus bei MLV: Sequenzen des untranslatierten ersten Exons wirken spleißregulierend**

Anhand von Deletionen und weiteren Mutationen in der konservierten Sequenz des untranslatierten ersten Exons der untersuchten retroviralen Vektoren wurde der mögliche Spleißmechanismus analysiert, über den Retroviren ein balanciertes Spleißen ihrer RNA verwirklichen könnten.

Retroviren sind in ihrem Lebenszyklus abhängig von der Expression genomischer RNA und der zeitgleichen Produktion von Kapsid- und Hüllproteinen zur Verpackung infektiöser viraler Partikel. Da einige Proteine wie das Hüllprotein nur von gespleißter

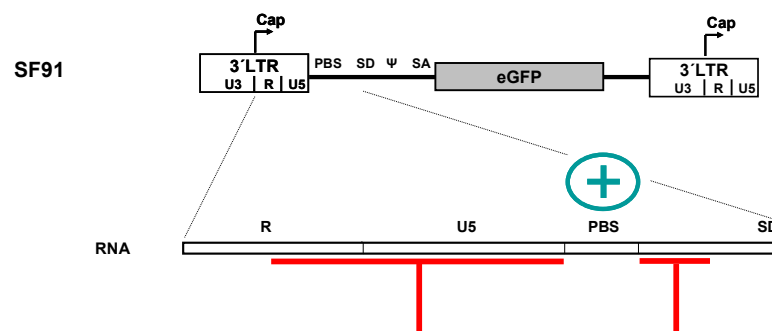
mRNA translatiert werden können, bedeutet dies, dass gleichzeitig gespleißte und ungespleißte RNA entstehen und diese in das Zytoplasma transferiert werden müssen. Komplexere Retroviren kodieren akzessorische Proteine, die auf *cis*-aktive Regionen wirken und Spleißen und Export der RNA steuern können (Pollard und Malim, 1998). Einfache Retroviren exprimieren keine akzessorischen Proteine, die *trans*-aktiv den Spleißprozess oder den Export von ungespleißter RNA aus dem Kern regulieren können, und müssen neben ihren eigenen *cis*-Elementen auf Faktoren der Wirtszelle zurückgreifen. Häufig wird balanciertes Spleißen ineffizienten Spleißsignalen zugeschrieben (Katz und Skalka, 1990; Pollard und Malim, 1998). Die *cis*-aktiven Elemente, die bisher in einfachen Retroviren entdeckt wurden und für balanciertes Spleißen und Transport ungespleißter RNA aus dem Kern zuständig sein sollen, befinden sich alle stromabwärts des SD, teilweise im Intron oder in der Pol-Region, zumeist aber in der 3'UTR (Amendt et al., 1995; Hoshi et al., 2002; Ogert et al., 1996; Zhang et al., 1997).

Wie das balancierte Spleißen und der Export ungespleißter RNA aus dem Kern bei MLV gesteuert werden, ist unbekannt. Ein Exportsignal wurde entdeckt, das für die Akkumulation ungespleißter RNA im Zytoplasma notwendig ist (Trubetskoy et al., 1999). Es handelt sich um die ersten 28 Basen des retroviralen Transkripts und damit der R-Region, die eine Stammschleifenstruktur bilden (RSL, R-region stem loop). Ob der RSL die Spleißreaktion blockiert und deshalb insgesamt mehr genomische RNA im Kern vorhanden ist oder die RSL gezielt den Transport ungespleißter RNA in das Zytoplasma fördert, war nicht bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass der RSL keine Auswirkungen auf die Spleißregulation hat, sondern vielmehr allein den Export genomischer RNA zu beeinflussen scheint. Auch hier spielt die Sekundärstruktur möglicherweise eine zentrale Rolle. Mutationen in der Stammschleifenstruktur, die die Sekundärstruktur erhalten, können den Phänotyp des Wildtyps wieder herstellen (Trubetskoy et al., 1999).

Die Regulation des balancierten Spleißens bei einfachen Retroviren wie MLV wird gewöhnlich auf einen mangelnden Konsensus der Spleißstellen zurückgeführt. Dies gilt besonders für die Spleißakzeptorstelle, von der man dachte, dass sie aufgrund der suboptimalen 3'-Konsensussequenz zum Teil überlesen wird. In MLV entspricht der Spleißdonor jedoch exakt der Konsensussequenz, der Spleißakzeptor hat einen guten Polypurintrakt. Von den Basen direkt an der Spleißstelle stimmen jedoch nur das Adenin und Guanin mit der Konsensussequenz überein. Auf der Basis der SIN-Vektoren konnte allerdings mit RNA-Analysen von Gesamtzellextrakt gezeigt werden, dass die

Spleißsequenzen vollkommen ausreichend sind, um einen effektiven Spleißprozess zu leisten.

Detaillierter wurde die 5'UTR stromaufwärts des SD auf ihren Einfluss auf die Spleißregulation untersucht (Abb. 48). Die isolierte Deletion der Region +33 bis +182 des untranslatierten ersten Exons, die bei den spleißkompetenten SIN-Vektoren entfernt worden war, zeigte auch im LTR-Kontext, dass fast ausschließlich gespleißte RNA produziert wurde. Da auch diese Deletion weder den Spleißdonor noch den Spleißakzeptor noch intronische Sequenzen berührte, wurde bestätigt, dass die Spleißregulation offenbar nicht ausschließlich über letztere Sequenzen gesteuert wird. Sowohl bei MLV wie bei den hier verwendeten Vektoren kann ein spleißregulierender Einfluss akzessorischer retroviraler Proteine ausgeschlossen werden.



**Abb. 48: Sequenzen 5' des SD beeinflussen die Spleißregulation**

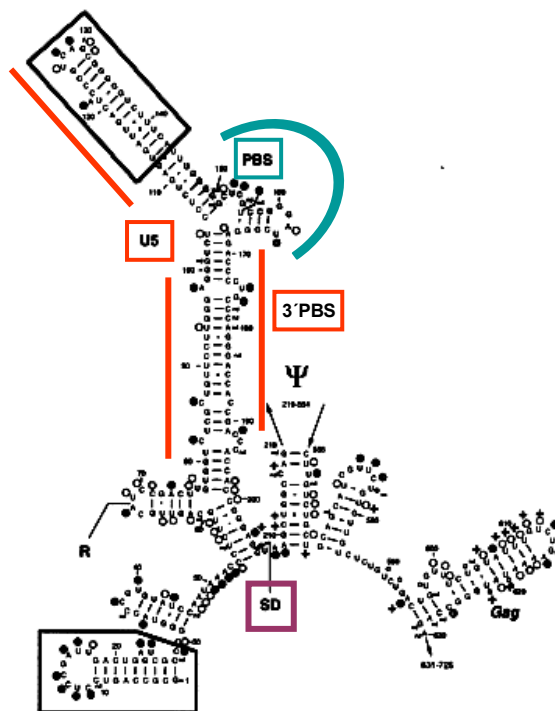
Während PBS-flankierende Sequenzen (U5, +164 - +182) in der Wildtypsituation das Spleißen zu behindern scheinen (rot), fördert die PBS das Spleißen (grün). Die Untersuchungen wurden mit Deletions- und antisense-Mutanten dieser Region durchgeführt.

Die folgenden Aussagen beruhen auf einer getrennten Analyse nukleärer und zytoplasmatischer RNA. Daher kann ein überlagernder Effekt eines veränderten RNA-Exports ausgeschlossen werden.

Die Deletionen der zweiten Hälfte der R-Region, der U5-Region und der Regionen 3' der PBS zeigten alle eine spleißfördernde Wirkung. Diese Elemente müssen daher den Spleißprozess im Virus inhibieren (Abb. 48). Es ließ sich außerdem feststellen, dass die Rolle der 19 Basen stromabwärts der PBS an ihre Sequenz gebunden ist. Eine Kontrolle in Form der antisense-Variante der 3' der PBS gelegenen Sequenz bewirkte, dass in diesem Fall wie bei der Deletion dieser Sequenz fast ausschließlich gespleißte RNA vorlag.

Umgeben von spleißinhibierenden Elementen bildete die PBS eine Ausnahme. Die Deletion der PBS blockierte den Spleißprozess. Damit scheint die PBS spleißfördernd im Virus zu wirken (Abb. 48). Eine genauere Untersuchung der Region der PBS ergab in

einem künstlichen System, in dem keine tRNA-Primerbindung möglich war, dass die Funktion der PBS bei der Spleißregulation nicht abhängig von der Anlagerung einer tRNA ist. Darüber hinaus ist die Rolle der PBS bei der RNA-Prozessierung auch nicht an ihre Sequenz gebunden. Die Integration der PBS-Sequenz in antisense-Orientierung kann den „Wildtypphänotyp“ mit balanciertem Spleißen wieder herstellen. Das gleiche gilt für die Integration der Wildtyp-PBS für tRNA<sup>Pro</sup>.



**Abb. 49: Auswirkungen der Sekundärstruktur auf die Spleißregulation**

Die rot markierten Bereiche beschreiben PBS-flankierende Bereiche, deren Deletionen das Spleißen fördern. In der Wildtypsituation haben diese Sequenzen, die die Struktur stabilisieren, demnach spleißinhibitorische Funktionen. Grün markiert ist die PBS, deren Deletion den Spleißprozess blockiert. Im Virus hat diese die Stammschleifenstruktur destabilisierende Region vermutlich eine spleißfördernde Funktion. Ausgeübt werden die gegensätzlichen Aufgaben eventuell über die Zugänglichkeit des SD am Fuß des Stamms. Der RSL ist in seiner Struktur von den markierten Deletionen nicht betroffen.

Diese Beobachtungen sind vereinbar mit dem bereits vorgestellten Modell von Mougél et al. (1993), das auf die Sekundärstruktur in der 5'UTR von MoMLV Bezug nimmt (Abb. 49). Wie oben beschrieben liegt die RU5-Region basengepaart mit der stromabwärts liegenden Sequenz der PBS vor. Die PBS bildet eine Schleife und einen Übergang zu einem verzweigten Stamm. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit postulieren, dass die Sekundärstruktur der 5'UTR wichtig für die Regulation des Spleißens ist. Eine ausschlaggebende Rolle könnte dabei die Stabilität der Struktur spielen.

Veränderungen der Region 5' des SD beeinflussen die Stammschleifenstruktur der Region. Dabei würden Veränderungen, wie z.B. Deletionen im Stamm, diese Struktur destabilisieren. Deletionen PBS-flankierender Stammbereiche (SF91delU5, SF91del164-182) zeigten ein nahezu vollständiges Spleißen genomischer RNA im Kern. Deletionen in der Schleife würden die Sekundärstruktur stabilisieren. Bei der Deletion der PBS, die die Schleife bildet, war das Spleißen nahezu blockiert. In der Wildtypsituation scheinen Sekundärstruktur-stabilisierende Sequenzen das Spleißen also zu verhindern, während destabilisierende Sequenzen das Spleißen fördern.

Die PBS könnte durch Schleifenbildung die Sekundärstruktur in einer Balance halten, die auch den Spleißprozess in einem Gleichgewicht von Überlesen und Erkennen der Spleißsignale hält, wie es für den Lebenszyklus von Retroviren essentiell ist. Der SD befindet sich am Fuß des Stamms. Das initiale Ereignis bei der Spleißreaktion ist die Bindung des SD durch den U1snRNP. Man könnte sich vorstellen, dass der SD bei einer stabilen fixierten Form der 5'UTR sterisch von dem Zugriff von Spleißfaktoren wie der U1snRNP abgeschirmt wird.

Die Spleißreaktion einfacher Retroviren am Beispiel von MLV wird durch die Sekundärstruktur des untranslatierten ersten Exons und deren Stabilität reguliert. Dieses Modell ist vereinbar mit der Beobachtung, dass die Spleißsequenzen selbst ausreichend der Konsensussequenz entsprechen, um einen effizienten Spleißprozess zu ermöglichen. Dies konnte sowohl im SIN-Vektorkontext als auch bei der Analyse der Deletionsmutanten des LTR-Vektors nachgewiesen werden. Inzwischen wurden die Auswirkungen unterschiedlicher Deletionen der 5'UTR auch im Kontext eines infektiösen MLV bestätigt (persönliche Mitteilung Jens Bohne). An der Regulation des balancierten Spleißens sind Regionen des untranslatierten ersten Exons beteiligt, die spleißfördernd (PBS) und spleißhemmend (PBS-flankierende Sequenzen) wirken. Ihre Funktionen üben diese Sequenzen über ihren Einfluss auf die Stabilität der Stammschleifenstruktur der Region aus. Möglicherweise sind auch Wechselwirkungen dieser Region mit stromabwärts liegenden Sequenzen an der Regulation des Spleißens beteiligt.

Ein derartiger Mechanismus der Spleißregulation wurde bislang weder bei viralen noch bei zellulären Genen beschrieben. Die Sequenz der 5'UTR ist in murinen Retroviren hochgradig konserviert. Die Stammschleifenstruktur der 5'UTR wird darüber hinaus auch in anderen entwicklungsgeschichtlich weiter entfernten Retroviren wie RSV und HIV

gefunden (Baudin et al., 1993; Berkhout und Schoneveld, 1993; Cobrinik et al., 1991). Interessant wäre zu untersuchen, ob auch in diesen Viren die Spleißeffizienz durch einen Konformationswechsel zu beeinflussen wäre.

Retroviren fungieren als „mobile“ zelluläre Elemente. Sie benötigen die zelluläre Expressionsmaschinerie für ihren Lebenszyklus. Auch die Regulation der Genexpression ist abhängig von der Wirtszelle. Aus diesem Grund kämen ähnliche Prozesse wie die hier beschriebenen auch für die Regulation zellulärer RNA-Prozessierung in Frage. Um dieser Hypothese nachzugehen, könnte zunächst die Wirkung der viralen 5'UTR auf einen zellulären SD getestet werden.

### 4.3 SIN-Konfiguration – sicher und effizient?

Inwiefern erfüllen die Vektoren dieser Arbeit einen erhöhten Sicherheitsanspruch in der Gentherapie? Durch das Fehlen von Promotorsequenzen im 3'LTR können stromabwärts gelegene Gene in SIN-Vektoren nicht direkt durch Transkriptionsinitiation exprimiert werden, wie es in LTR-Vektoren geschehen kann. Die Deletion der Enhancersequenz im 3'LTR des retroviralen Vektors, die durch den Strangwechsel bei der reversen Transkription auch auf den 5'LTR übertragen wird, entfernt zwar auch diese Sequenzen von der direkten Nähe von stromaufwärts bzw. -abwärts gelegenen Genen. Da allerdings Enhancer über eine Distanz von wenigstens hundert Kilobasen ihre Funktion erfüllen können (Adhya, 1989; Serfling et al., 1985), bleibt offen, ob die SIN-Konfiguration einen erheblichen Sicherheitsgewinn darstellt. Es ist durchaus denkbar, dass die einfache Version der Enhancerbereiche im SIN-Vektor im Gegensatz zu den beidseitig terminal vorhandenen Sequenzen in LTR-Vektoren auch nur das halbe Risiko der Transkriptionsförderung mit sich bringt.

Ein weiterer Sicherheitsaspekt ist das verminderte Risiko der Rekombination. Dies ist bei den SIN-Vektoren zwar auch gegeben, allerdings durch die zusätzliche Deletion der U3-Region weiter vermindert. Eine Mobilisierung von SIN-Vektoren durch Komplementierung mit Hüll- und Kapsidproteinen ist nicht möglich, da die RNA zwar verpackbar wäre, aber aufgrund der subgenomischen RNA keine 5' R-, U5-Region und PBS besitzt, die eine reverse Transkription und Provirusintegration möglich machen.

Letztlich führt auch die bessere RNA-Prozessierung, die sich anscheinend negativ auf den Virustiter der SIN-Vektoren auswirkt, zu einer erhöhten Sicherheit dieser Vektoren. Eine präzise RNA-Prozessierung vermindert das Risiko aberranter Transkripte, die vielfältige biologische Auswirkungen haben könnten. Ein genaues Spleißen setzt eine effiziente

Lesbarkeit der Spleißsignale voraus. Bei schwachen Spleißsignalen könnten diese nicht nur überlesen werden und damit nur genomisches Transkript entstehen, es könnten auch weiter 3' liegende Spleißakzeptoren benutzt werden, die zu „nonsense“- (sinnlosen) Transkripten führen. Werden diese nicht im Kern als solche erkannt und degradiert, besteht die Möglichkeit, dass sie zu Proteinen mit unbekannten, möglicherweise pathogenen Funktionen führen. Da die entwickelten SIN-Vektoren ein sehr effizientes Spleißen in der Wirtszelle zeigten, sollte auch dieses Sicherheitsrisiko weitestgehend unter Kontrolle sein.

Aber sind diese Vektoren auch effizient genug, um sie in der Gentherapie einsetzen zu können? Vor dem Hintergrund der Analyse der 5'UTR und ihrer Auswirkung auf die RNA-Prozessierung und die Translation muss die SIN-Vektorkonfiguration erneut diskutiert werden. Einige Aspekte der niedrigen Virustiter der SIN-Vektoren sind bereits besprochen worden (Kap. 4.1.1). Ein weiterer Grund für die geringe Partikelkonzentration ist vermutlich die hohe Spleißeffizienz dieser Vektoren. Durch die Integration des internen Promotors wird dieser in der Verpackungszelle die Sekundärstruktur der 5'UTR oder die Wirkung der Stammschleifenstruktur auf den SD zerstören. Dies mag ein Grund sein, warum die konventionelle Position des internen Promotors direkt vor dem Transgen bezüglich der Partikelproduktion von Vorteil ist. Eine veränderte Sekundärstruktur wirkt sich ebenso auf das Assembly neuer viraler Partikel aus (Rasmussen et al., 2002). Dabei kann die Dimerisierung viraler RNA oder die Anlagerung von Faktoren für die Verpackung erschwert sein. Man könnte sich ferner vorstellen, dass RNAs aufgrund ihrer Sekundärstrukturen einer Art intrazellulären „Sortierung“ unterliegen. Unterschiedliche Konformationen haben dabei bei einem intrazellulären Transport verschiedene Ziele.

Mit den optimierten SIN-Vektoren mit Intron und PRE konnte in verschiedenen Zellsystemen eine Transgenexpression erreicht werden, die den LTR-Vektoren gleichzusetzen ist (Kraunus et al., 2004). Die gewonnenen Erkenntnisse, dass Sequenzelemente des untranslatierten ersten Exons die Translationseffizienz steigern (PBS-flankierende Regionen) bzw. die Translation herabsetzen (PBS), sollten in ein neues Vektordesign ebenfalls integriert werden.

## 4.4 Ausblick

In Bezug auf das Vektordesign durch Verbesserung der RNA-Prozessierung ist mit dieser Arbeit ein entscheidendes Modul verwirklicht und mechanistisch verstanden. Die Verwendung eines Introns im 5'UTR eröffnet neue Perspektiven, um retrovirale und auch lentivirale Vektoren zu optimieren. Die postulierte balancierte Spleißinhibition über eine Sekundärstruktur exonischer Sequenzen könnte auch bei zellulären Genen zur differentiellen Spleißregulation beitragen. Es wäre sehr interessant, die zellulären Kofaktoren dieses Prozesses zu identifizieren und eine etwaige Differenzierungsabhängigkeit zu erfassen.

Es konnte gezeigt werden, dass fremde Sequenzen zwischen die PBS und den SD eingeführt werden können. Weitere Vektorverbesserungen sind durch Berücksichtigung der gefundenen Prozessierungselemente in der 5'UTR möglich. Als wichtiges Element in der RNA-Prozessierung sollten in Zukunft auch Analysen der Polyadenylierung mit einbezogen werden. Außerdem sind Untersuchungen zum RNA-Export und zur Translationskontrolle eine wichtige Voraussetzung für die Vektroptimierung. Weitere Arbeiten sind notwendig, um die entdeckte Spleißregulation für ein Vektordesign zu nutzen, das die Produktion von hohen Virusüberständen durch Spleißinhibition in Verpackungszellen möglich macht.

Letztlich müssen alle konstruierten Vektorvarianten in robusten *in-vivo*-Analysen daraufhin getestet werden, inwiefern sie die Effizienz- und Sicherheitskriterien für eine therapeutische Anwendung erfüllen.

## 5 Zusammenfassung

Retroviren sind die am häufigsten genutzten Vektorsysteme für den Gentransfer in hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen. Mit dem Ziel einer erhöhten Sicherheit in der Gentherapie wurde in der vorliegenden Arbeit eine neue Generation retroviraler selbstinaktivierender (SIN-) Vektoren entwickelt, die in den langen terminalen Repetitionen (LTRs) keine aktiven Enhancer/Promotorsequenzen tragen. In die SIN-Vektoren wurden unterschiedliche RNA-Prozessierungselemente wie Intron und posttranskriptionelles regulatorisches Element (PRE) an verschiedene Positionen integriert und die Vektoren im Vergleich zu korrespondierenden LTR-gesteuerten Vektoren auf ihre Fähigkeit zur Produktion infektiöser Partikel untersucht. In unterschiedlichen Zellsystemen wurden außerdem die Transduktionseffizienz und die Transgenexpression der Vektoren analysiert. Die SIN-Vektoren sind im Hinblick auf die Viruspartikelproduktion den LTR-Vektoren weit unterlegen. Dies liegt unter anderem an der nicht vermeidbaren Promotorinterferenz bei der Expression dieser Vektoren in den Verpackungszellen. Bei der neuen Generation von SIN-Vektoren besteht zusätzlich eine Konkurrenz von mehreren verpackbaren viralen RNAs. Zudem sorgt vermutlich eine veränderte Sekundärstruktur des untranslatierten ersten Exons für einen geringeren Anteil verpackbarer genomischer RNA. Trotzdem konnten mit den RNA-Prozessierungselementen Intron und PRE Titer erzeugt werden, die sich zur Transduktion von primären Zellen eignen.

Es konnte festgestellt werden, dass sich das Verpackungssignal zwischen internem Promotor und Transgen in SIN-Vektoren negativ und ein das Verpackungssignal einschließendes Intron positiv auf die Transgenexpression auswirkt. Ein optimierter SIN-Vektor SinSF91P1 verlieh primären hämatopoetischen Zellen ein gleiches Transgenexpressionsniveau wie ein vergleichbarer LTR-Vektor.

Auf transkriptioneller Ebene ist die Expression viraler Gene in hohem Maße von dem Zellhintergrund und damit von den Promotor- und Enhancersequenzen abhängig, die ein retroviraler Vektor trägt. Da grundlegende posttranskriptionelle Ereignisse wie Spleißen und RNA-Export in vielen Zelltypen vorteilhafte Auswirkungen haben sollten, wurde ein besonderer Wert auf die mechanistische Analyse dieser Prozesse gelegt. Die intronhaltigen SIN-Vektoren zeigten ein wesentlich effizienteres Spleißen der RNA als ihre korrespondierenden LTR-Vektoren. Eingehende Analysen führten zu der Entdeckung bislang unbekannter posttranskriptioneller Regulatorelemente, die sich in der 5' untranslatierten Region (5'UTR) stromaufwärts des Spleißdonors und damit im untranslatierten ersten Exon befinden. Diese Region bildet konservierte, starke gefaltete

Sekundärstrukturen aus. Mit Hilfe zahlreicher Mutanten konnten verschiedene Regionen mit gegensätzlichen Funktionen in der RNA-Prozessierung abgegrenzt werden. Die Primerbindungsstelle (PBS) scheint als einziges Element dieser Region spleißfördernd auf genomische virale RNA zu wirken, während flankierende Sequenzen spleißinhibierend wirken. Diese Funktion übt die PBS unabhängig von ihrer Primerbindungsfunktion aus. Eine zentrale Rolle bei der Spleißregulation scheint dabei die Sekundärstruktur der stromaufwärts des Spleißdonors gelegenen Sequenzen bzw. die Stabilität dieser Struktur einzunehmen. Zusätzlich zeigten diese Regionen eine Beteiligung an der Translationsregulation. Dabei konnte der PBS erstmals eine inhibitorische Wirkung auf die Translation zugesprochen werden, während flankierende Sequenzen im Gegensatz dazu die Translation fördern.

Diese Arbeit liefert grundlegende Einblicke in die RNA-Prozessierung einfacher Retroviren, die unmittelbare Bedeutung für das Verständnis des retroviralen Lebenszyklus und die Entwicklung sicherer und effektiver Gentransfervektoren haben.

## Abkürzungsverzeichnis

### Häufig verwendete Abkürzungen und Anglizismen

|                   |                                                                     |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------|
| µg                | Mikrogramm                                                          |
| µl                | Mikroliter                                                          |
| µmol              | Mikromol                                                            |
| AAV               | Adeno-assoziierte Vektoren                                          |
| Abb.              | Abbildung                                                           |
| AML               | Akute Myeloische Leukämie                                           |
| Assembly          | Zusammenlagerung                                                    |
| att               | Integrationssignal                                                  |
| b                 | Basen                                                               |
| bp                | Basenpaare                                                          |
| BP                | „branch point“, Verzweigungspunkt                                   |
| CaCl <sub>2</sub> | Calciumchlorid                                                      |
| CBC               | Cap-bindender Komplex                                               |
| cpm               | Anzahl pro Minute (counts per minute)                               |
| CTD               | C-terminale Domäne                                                  |
| CTE               | konstitutives Transportelement                                      |
| DEPC              | Diethylpyrocarbonat                                                 |
| DNA               | Desoxyribonukleinsäure                                              |
| DNase             | Desoxyribonuklease                                                  |
| Eco               | ökotrop (ecotrop)                                                   |
| eGFP              | „enhanced green fluorescent protein“, grün fluoreszierendes Protein |
| Enhancer          | Verstärker                                                          |
| Env               | Hüllprotein (envelope)                                              |
| FACS              | Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung                               |
| FCS               | Fötale Kälberserum                                                  |
| Gag               | “group specific antigen“, innere Strukturproteine                   |
| GALV              | Gibbon Ape Leukemia Virus                                           |
| GAPDH             | Glyzerinaldehydphosphat-Dehydrogenase                               |
| h                 | Stunden                                                             |
| HIV               | Humaner Immundefizienzvirus                                         |
| hnRNP             | heteronukleäre RNP                                                  |
| HSZ               | hämatopoetische Stammzellen                                         |
| IN                | virale Integrase                                                    |
| iPr               | interner Promotor                                                   |
| IR                | invertierte Wiederholungen (inverted repeat)                        |
| Kap.              | Kapitel                                                             |
| LTR               | Lange terminale Wiederholungssequenzen (long terminal repeat)       |
| MACS              | magnetisch aktivierte Zellsortierung                                |
| MCS               | multiple Klonierungsstelle                                          |
| MDa               | Mega Dalton                                                         |
| min               | Minuten                                                             |
| MLV               | Mausleukämievirus                                                   |
| mM                | Millimol                                                            |
| MoMLV             | Moloney Mausleukämievirus                                           |
| MPMV              | Mason-Pfizer Monkey Virus                                           |
| MPSV              | myeloproliferatives Sarkomvirus                                     |

|           |                                                     |
|-----------|-----------------------------------------------------|
| mRNA      | Boten-RNA (messenger RNA)                           |
| NPC       | Kernporenkomplex (nuclear pore complex)             |
| PBS       | Primerbindungsstelle                                |
| PCR       | Polymerasekettenreaktion                            |
| Pen/Strep | Penicillin/Streptomycin                             |
| Pol       | Polymerase                                          |
| PolyA     | Polyadenylierungssignal                             |
| PP        | Polypurintrakt                                      |
| PPT       | Polypyrimidintrakt                                  |
| PRE       | posttranskriptionelles regulatorisches Element      |
| Rev       | Virales Regulatorgen                                |
| RNA       | Ribonukleinsäure                                    |
| RNase     | Ribonuklease                                        |
| RNP       | Ribonukleoprotein                                   |
| rpm       | rounds per minute                                   |
| RRE       | Rev responsives Element                             |
| RSL       | Haarnadelschleife der R-Region (R-Region stem loop) |
| RSV       | Rous Sarkoma Virus                                  |
| RT        | Reverse Transkription                               |
| SA        | Spleißakzeptor                                      |
| SD        | Spleißdonor                                         |
| sec       | Sekunden                                            |
| SFFV      | Spleen Focus Forming Virus                          |
| Silencer  | schwächende Sequenzen                               |
| SIN       | selbstinaktivierend                                 |
| snRNP     | kleine Kern-RNP (small nuklear RNP)                 |
| Spacer    | Abstandshalter                                      |
| Tab.      | Tabelle                                             |
| TBP       | TATA-bindendes Protein                              |
| TF        | Transkriptionsfaktor                                |
| U3        | „unique“ 3 Region                                   |
| U5        | „unique“ 5 Region                                   |
| UTR       | untranslatierte Region                              |
| vergl.    | vergleiche                                          |
| VSV       | Vesikular Stomatitis Virus                          |
| XSCID     | X-linked severe combined immunodeficiency syndrome  |
| Ψ         | Verpackungssignal (Psi)                             |

## Literatur

- Adam, M. A., and Miller, A. D. (1988). Identification of a signal in a murine retrovirus that is sufficient for packaging of nonretroviral RNA into virions. *J Virol* *62*, 3802-3806.
- Adhya, S. (1989). Multipartite genetic control elements: communication by DNA loop. *Annu Rev Genet* *23*, 227-250.
- Akagi, K., Suzuki, T., Stephens, R. M., Jenkins, N. A., and Copeland, N. G. (2004). RTCGD: retroviral tagged cancer gene database. *Nucleic Acids Res* *32 Database issue*, D523-527.
- Akgün, E., Ziegler, M., and Grez, M. (1991). Determinants of retrovirus gene expression in embryonal carcinoma cells. *J Virol* *65*, 382-388.
- Akker, S. A., Smith, P. J., and Chew, S. L. (2001). Nuclear post-transcriptional control of gene expression. *J Mol Endocrinol* *27*, 123-131.
- Amendt, B. A., Simpson, S. B., and Stoltzfus, C. M. (1995). Inhibition of RNA splicing at the Rous sarcoma virus src 3' splice site is mediated by an interaction between a negative cis element and a chicken embryo fibroblast nuclear factor. *J Virol* *69*, 5068-5076.
- Anderson, K., Crable, S. C., Hammond, S. M., Hacein-Bey, S., Fischer, A., and Cavazzana-Calvo, M. (2003). Mechanism of activation of the LMO2 gene by retroviral insertions. *Blood* *102*.
- Anderson, W. F., McGarrity, G. J., and Moen, R. C. (1993). Report to the NIH Recombinant DNA Advisory Committee on murine replication-competent retrovirus (RCR) assays (February 17, 1993). *Hum Gene Ther* *4*, 311-321.
- Asche, W., Colletta, G., Warnecke, G., Nobis, P., Pennie, S., King, R. M., and Ostertag, W. (1984). Lack of retrovirus gene expression in somatic cell hybrids of friend cells and teratocarcinoma cells with a teratocarcinoma phenotype. *Mol Cell Biol* *4*, 923-930.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (2001). *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Wiley, New York.
- Baudin, F., Marquet, R., Isel, C., Darlix, J. L., Ehresmann, B., and Ehresmann, C. (1993). Functional sites in the 5' region of human immunodeficiency virus type 1 RNA form defined structural domains. *J Mol Biol* *229*, 382-397.
- Baum, C., Dullmann, J., Li, Z., Fehse, B., Meyer, J., Williams, D. A., and von Kalle, C. (2003). Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells. *Blood* *101*, 2099-2114.
- Baum, C., Hegewisch-Becker, S., Eckert, H. G., Stocking, C., and Ostertag, W. (1995). Novel retroviral vectors for efficient expression of the multidrug resistance (mdr-1) gene in early hematopoietic cells. *J Virol* *69*, 7541-7547.
- Baum, C., Itoh, K., Meyer, J., Laker, C., Ito, Y., and Ostertag, W. (1997). The potent enhancer activity of the polycythemic strain of spleen focus-forming virus in hematopoietic cells is governed by a binding site for Sp1 in the upstream control region and by a unique enhancer core motif, creating an exclusive target for PEBP/CBF. *J Virol* *71*, 6323-6331.

- Baum, C., Margison, G. P., Eckert, H. G., Fairbairn, L. J., Ostertag, W., and Rafferty, J. A. (1996). Gene transfer to augment the therapeutic index of anticancer chemotherapy. *Gene Ther* 3, 1-3.
- Baum, C., von Kalle, C., Staal, F. J., Li, Z., Fehse, B., Schmidt, M., Weerkamp, F., Karlsson, S., Wagemaker, G., and Williams, D. A. (2004). Chance or necessity? Insertional mutagenesis in gene therapy and its consequences. *Mol Ther* 9, 5-13.
- Bender, M. A., Palmer, T. D., Gelinis, R. E., and Miller, A. D. (1987). Evidence that the packaging signal of Moloney murine leukemia virus extends into the gag region. *J Virol* 61, 1639-1646.
- Berkhout, B., and Schoneveld, I. (1993). Secondary structure of the HIV-2 leader RNA comprising the tRNA-primer binding site. *Nucleic Acids Res* 21, 1171-1178.
- Bieth, E., Gabus, C., and Darlix, J. L. (1990). A study of the dimer formation of Rous sarcoma virus RNA and of its effect on viral protein synthesis in vitro. *Nucleic Acids Res* 18, 119-127.
- Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Brandeis, M., Frank, D., Keshet, I., Siegfried, Z., Mendelsohn, M., Nemes, A., Temper, V., Razin, A., and Cedar, H. (1994). Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation. *Nature* 371, 435-438.
- Bundesärztekammer (1995). Richtlinien zum Gentransfer in menschliche Körperzellen. Richtlinien des ständigen Arbeitskreises "Biomedizinische Ethik und Technologiefolgenabschätzung" beim Wissenschaftlichen Beirat. *Deutsches Ärzteblatt* 92, 789-794.
- Bushman, F. D. (2003). Targeting survival: integration site selection by retroviruses and LTR-retrotransposons. *Cell* 115, 135-138.
- Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J. L., *et al.* (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288, 669-672.
- Cobrinik, D., Aiyar, A., Ge, Z., Katzman, M., Huang, H., and Leis, J. (1991). Overlapping retrovirus U5 sequence elements are required for efficient integration and initiation of reverse transcription. *J Virol* 65, 3864-3872.
- Coffin, J. M. (1996). Retroviridae: The viruses and their replication. In *Fundamental Virology*, B. N. Fields, K. D.M., and P. M. Howley, eds. (Philadelphia, New York, Lippincott-Raven), pp. 763-844.
- Coffin, J. M., Hughes, S. H., and Varmus, H. E. (1997). *Retroviruses* (NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Colicelli, J., and Goff, S. P. (1987). Identification of endogenous retroviral sequences as potential donors for recombinational repair of mutant retroviruses: positions of crossover points. *Virology* 160, 518-522.
- Consortium, I. H. G. S. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.
- Cornetta, K., and Anderson, W. F. (1989). Protamine sulfate as an effective alternative to polybrene in retroviral-mediated gene-transfer: implications for human gene therapy. *J Virol Methods* 23, 187-194.

- Custodio, N., Carmo-Fonseca, M., Geraghty, F., Pereira, H. S., Grosveld, F., and Antoniou, M. (1999). Inefficient processing impairs release of RNA from the site of transcription. *Embo J* 18, 2855-2866.
- Dachs, G. U., Dougherty, G. J., Stratford, I. J., and Chaplin, D. J. (1997). Targeting gene therapy to cancer: a review. *Oncol Res* 9, 313-325.
- Dani, C., Piechaczyk, M., Audigier, Y., El Sabouty, S., Cathala, G., Marty, L., Fort, P., Blanchard, J. M., and Jeanteur, P. (1984). Characterization of the transcription products of glyceraldehyde 3-phosphate-dehydrogenase gene in HeLa cells. *Eur J Biochem* 145, 299-304.
- Dao, M. A., Hashino, K., Kato, I., and Nolta, J. A. (1998). Adhesion to fibronectin maintains regenerative capacity during ex vivo culture and transduction of human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 92, 4612-4621.
- Darlix, J. L. (1986). Circularization of retroviral genomic RNA and the control of RNA translation, packaging and reverse transcription. *Biochimie* 68, 941-949.
- Davis, B. M., Koc, O. N., Lee, K., and Gerson, S. L. (1996). Current progress in the gene therapy of cancer. *Curr Opin Oncol* 8, 499-508.
- De Tapia, M., Metzler, V., Mougél, M., Ehresmann, B., and Ehresmann, C. (1998). Dimerization of MoMuLV genomic RNA: redefinition of the role of the palindromic stem-loop H1 (278-303) and new roles for stem-loops H2 (310-352) and H3 (355-374). *Biochemistry* 37, 6077-6085.
- Dexter, T. M., and Spooncer, E. (1987). Growth and differentiation in the hemopoietic system. *Annu Rev Cell Biol* 3, 423-441.
- Donahue, R. E., Sorrentino, B. P., Hawley, R. G., An, D. S., Chen, I. S., and Wersto, R. P. (2001). Fibronectin fragment CH-296 inhibits apoptosis and enhances ex vivo gene transfer by murine retrovirus and human lentivirus vectors independent of viral tropism in nonhuman primate CD34+ cells. *Mol Ther* 3, 359-367.
- Donello, J. E., Loeb, J. E., and Hope, T. J. (1998). Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element. *J Virol* 72, 5085-5092.
- Drapkin, R., Merino, A., and Reinberg, D. (1993). Regulation of RNA polymerase II transcription. *Curr Opin Cell Biol* 5, 469-476.
- Drumm, M. L., Pope, H. A., Cliff, W. H., Rommens, J. M., Marvin, S. A., Tsui, L. C., Collins, F. S., Frizzell, R. A., and Wilson, J. M. (1990). Correction of the cystic fibrosis defect in vitro by retrovirus-mediated gene transfer. *Cell* 62, 1227-1233.
- Dube, S., Kung, H. J., Bender, W., Davidson, N., and Ostertag, W. (1976). Size, subunit composition, and secondary structure of the Friend virus genome. *J Virol* 20, 264-272.
- Emerman, M., and Temin, H. M. (1984). Genes with promoters in retrovirus vectors can be independently suppressed by an epigenetic mechanism. *Cell* 39, 449-467.
- Enver, T., Heyworth, C. M., and Dexter, T. M. (1998). Do stem cells play dice? *Blood* 92, 348-351; discussion 352.
- Eperon, I. C., Ireland, D. C., Smith, R. A., Mayeda, A., and Krainer, A. R. (1993). Pathways for selection of 5' splice sites by U1 snRNPs and SF2/ASF. *Embo J* 12, 3607-3617.
- Fehse, B., Schade, U. M., Li, Z., Uhde, A., Koch, S., Goller, B., Ruger, R., Fehse, N., Stockschrader, M., and Zander, A. R. (1998). Highly-efficient gene transfer with

- retroviral vectors into human T lymphocytes on fibronectin. *Br J Haematol* 102, 566-574.
- Fong, Y. W., and Zhou, Q. (2001). Stimulatory effect of splicing factors on transcriptional elongation. *Nature* 414, 929-933.
- Fortes, P., Inada, T., Preiss, T., Hentze, M. W., Mattaj, I. W., and Sachs, A. B. (2000). The yeast nuclear cap binding complex can interact with translation factor eIF4G and mediate translation initiation. *Mol Cell* 6, 191-196.
- Franz, T., Hilberg, F., Seliger, B., Stocking, C., and Ostertag, W. (1986). Retroviral mutants efficiently expressed in embryonal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 3292-3296.
- Geballe, A. P., and Gray, M. K. (1992). Variable inhibition of cell-free translation by HIV-1 transcript leader sequences. *Nucleic Acids Res* 20, 4291-4297.
- Gorlich, D., Kraft, R., Kostka, S., Vogel, F., Hartmann, E., Laskey, R. A., Mattaj, I. W., and Izaurraide, E. (1996). Importin provides a link between nuclear protein import and U snRNA export. *Cell* 87, 21-32.
- Gorman, C. M., Rigby, P. W., and Lane, D. P. (1985). Negative regulation of viral enhancers in undifferentiated embryonic stem cells. *Cell* 42, 519-526.
- Graveley, B. R. (2000). Sorting out the complexity of SR protein functions. *Rna* 6, 1197-1211.
- Green, M. R. (1989). Pre-mRNA processing and mRNA nuclear export. *Curr Opin Cell Biol* 1, 519-525.
- Grez, M., Akgun, E., Hilberg, F., and Ostertag, W. (1990). Embryonic stem cell virus, a recombinant murine retrovirus with expression in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 9202-9206.
- Grez, M., Zornig, M., Nowock, J., and Ziegler, M. (1991). A single point mutation activates the Moloney murine leukemia virus long terminal repeat in embryonal stem cells. *J Virol* 65, 4691-4698.
- Grüter, P., Tabernero, C., von Kobbe, C., Schmitt, C., Saavedra, C., Bachi, A., Wilm, M., Felber, B. K., and Izaurralde, E. (1998). TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus. *Mol Cell* 1, 649-659.
- Guan, K. L., and Weiner, H. (1989). Influence of the 5'-end region of aldehyde dehydrogenase mRNA on translational efficiency. Potential secondary structure inhibition of translation in vitro. *J Biol Chem* 264, 17764-17769.
- Haas, D. L., Case, S. S., Crooks, G. M., and Kohn, D. B. (2000). Critical factors influencing stable transduction of human CD34(+) cells with HIV-1-derived lentiviral vectors. *Mol Ther* 2, 71-80.
- Haas, J., Park, E. C., and Seed, B. (1996). Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. *Curr Biol* 6, 315-324.
- Hacein-Bey-Abina, S., von Kalle, C., Schmidt, M., Le Deist, F., Wulffraat, N., McIntyre, E., Radford, I., Villeval, J. L., Fraser, C. C., Cavazzana-Calvo, M., and Fischer, A. (2003). A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 348, 255-256.
- Hammariskjöld, M. L., Li, H., Rekosh, D., and Prasad, S. (1994). Human immunodeficiency virus env expression becomes Rev-independent if the env region is not defined as an intron. *J Virol* 68, 951-958.

- Hentze, M. W., Caughman, S. W., Rouault, T. A., Barriocanal, J. G., Dancis, A., Harford, J. B., and Klausner, R. D. (1987). Identification of the iron-responsive element for the translational regulation of human ferritin mRNA. *Science* *238*, 1570-1573.
- Hernandez, N. (1993). TBP, a universal eukaryotic transcription factor? *Genes Dev* *7*, 1291-1308.
- Hilberg, F., Stocking, C., Ostertag, W., and Grez, M. (1987). Functional analysis of a retroviral host-range mutant: altered long terminal repeat sequences allow expression in embryonal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *84*, 5232-5236.
- Hildinger, M., Abel, K. L., Ostertag, W., and Baum, C. (1999). Design of 5' untranslated sequences in retroviral vectors developed for medical use. *J Virol* *73*, 4083-4089.
- Hildinger, M., Eckert, H. G., Schilz, A. J., John, J., Ostertag, W., and Baum, C. (1998). FMEV vectors: both retroviral long terminal repeat and leader are important for high expression in transduced hematopoietic cells. *Gene Therapy* *5*, 1575-1579.
- Hogge, D. E., Lansdorp, P. M., Reid, D., Gerhard, B., and Eaves, C. J. (1996). Enhanced detection, maintenance, and differentiation of primitive human hematopoietic cells in cultures containing murine fibroblasts engineered to produce human steel factor, interleukin-3, and granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* *88*, 3765-3773.
- Horowitz, D. S., Lee, E. J., Mabon, S. A., and Misteli, T. (2002). A cyclophilin functions in pre-mRNA splicing. *Embo J* *21*, 470-480.
- Hoshi, S., Odawara, T., Oshima, M., Kitamura, Y., Takizawa, H., and Yoshikura, H. (2002). cis-Elements involved in expression of unspliced RNA in Moloney murine leukemia virus. *Biochem Biophys Res Commun* *290*, 1139-1144.
- Huang, Y., Wimler, K. M., and Carmichael, G. G. (1999). Intronless mRNA transport elements may affect multiple steps of pre-mRNA processing. *Embo J* *18*, 1642-1652.
- Huang, Z. M., and Yen, T. S. (1994). Hepatitis B virus RNA element that facilitates accumulation of surface gene transcripts in the cytoplasm. *J Virol* *68*, 3193-3199.
- Hwang, J. J., Li, L., and Anderson, W. F. (1997). A conditional self-inactivating retrovirus vector that uses a tetracycline-responsive expression system. *J Virol* *71*, 7128-7131.
- Ish-Horowicz, D., and Burke, J. F. (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res* *9*, 2989-2998.
- Ishigaki, Y., Li, X., Serin, G., and Maquat, L. E. (2001). Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20. *Cell* *106*, 607-617.
- Just, U., Friel, J., Heberlein, C., Tamura, T., Baccarini, M., Tessmer, U., Klingler, K., and Ostertag, W. (1993). Upregulation of lineage specific receptors and ligands in multipotential progenitor cells is part of an endogenous program of differentiation. *Growth Factors* *9*, 291-300.
- Kadener, S., Cramer, P., Nogues, G., Cazalla, D., de la Mata, M., Fededa, J. P., Werbach, S. E., Srebrow, A., and Kornblihtt, A. R. (2001). Antagonistic effects of T-Ag and VP16 reveal a role for RNA pol II elongation on alternative splicing. *Embo J* *20*, 5759-5768.
- Kadonaga, J. T., Courey, A. J., Ladika, J., and Tjian, R. (1988). Distinct regions of Sp1 modulate DNA binding and transcriptional activation. *Science* *242*, 1566-1570.

- Kan, Z., Rouchka, E. C., Gish, W. R., and States, D. J. (2001). Gene structure prediction and alternative splicing analysis using genomically aligned ESTs. *Genome Res* 11, 889-900.
- Katz, R. A., Kotler, M., and Skalka, A. M. (1988). cis-acting intron mutations that affect the efficiency of avian retroviral RNA splicing: implication for mechanisms of control. *J Virol* 62, 2686-2695.
- Katz, R. A., and Skalka, A. M. (1990). Control of retroviral RNA splicing through maintenance of suboptimal processing signals. *Mol Cell Biol* 10, 696-704.
- Kiem, H. P., Andrews, R. G., Morris, J., Peterson, L., Heyward, S., Allen, J. M., Rasko, J. E., Potter, J., and Miller, A. D. (1998). Improved gene transfer into baboon marrow repopulating cells using recombinant human fibronectin fragment CH-296 in combination with interleukin-6, stem cell factor, FLT-3 ligand, and megakaryocyte growth and development factor. *Blood* 92, 1878-1886.
- Kikumori, T., Cote, G. J., and Gagel, R. F. (2002). Naturally occurring heterologous trans-splicing of adenovirus RNA with host cellular transcripts during infection. *FEBS Lett* 522, 41-46.
- King, J. A., Bridger, J. M., Gounari, F., Lichter, P., Schulz, T. F., Schirmacher, V., and Khazaie, K. (1998). The extended packaging sequence of MoMLV contains a constitutive mRNA nuclear export function. *FEBS Lett* 434, 367-371.
- Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, I., and Khorana, H. G. (1971). Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol* 56, 341-361.
- Kohn, D., Sadelain, M., Dunbar, C., Bodine, D., Kiem, H., Candotti, F., Tisdale, J., Riviere, I., Blau, C., Richard, R., *et al.* (2003a). American society of gene therapy (ASGT) ad hoc subcommittee on retroviral-mediated gene transfer to hematopoietic stem cells. *Molecular Therapy* 8, 180-187.
- Kohn, D. B., Sadelain, M., and Glorioso, J. C. (2003b). Occurrence of leukaemia following gene therapy of X-linked SCID. *Nat Rev Cancer* 3, 477-488.
- Kornberg, T. B. (1993). Understanding the homeodomain. *J Biol Chem* 268, 26813-26816.
- Koromilas, A. E., Lazaris-Karatzas, A., and Sonenberg, N. (1992). mRNAs containing extensive secondary structure in their 5' non-coding region translate efficiently in cells overexpressing initiation factor eIF-4E. *Embo J* 11, 4153-4158.
- Kozak, M. (1986). Influences of mRNA secondary structure on initiation by eukaryotic ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 2850-2854.
- Kramer, A. (1996). The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. *Annu Rev Biochem* 65, 367-409.
- Kraunus, J., Schaumann, D. H. S., Meyer, J., Modlich, U., Fehse, B., Brandenburg, G., von Laer, D., Klump, H., Schambach, A., Böhne, J., and Baum, C. (2004). Self-inactivating retroviral vectors with improved RNA processing. *Gene Therapy in press*.
- Kustikova, O. S., Wahlers, A., Kuhlcke, K., Stahle, B., Zander, A. R., Baum, C., and Fehse, B. (2003). Dose finding with retroviral vectors: correlation of retroviral vector copy numbers in single cells with gene transfer efficiency in a cell population. *Blood* 102, 3934-3937.

- Laker, C., Meyer, J., Schopen, A., Friel, J., Heberlein, C., Ostertag, W., and Stocking, C. (1998). Host cis-mediated extinction of a retrovirus permissive for expression in embryonal stem cells during differentiation. *J Virol* 72, 339-348.
- Lee, M. G., Kremer, E. J., and Perricaudet, M. (1995). Adenoviral vectors. *Mol Cell Biol Hum Dis Ser* 5, 20-32.
- Lei, E. P., Krebber, H., and Silver, P. A. (2001). Messenger RNAs are recruited for nuclear export during transcription. *Genes Dev* 15, 1771-1782.
- Lewis, J. D., and Izaurralde, E. (1997). The role of the cap structure in RNA processing and nuclear export. *Eur J Biochem* 247, 461-469.
- Lewis, J. D., Izaurralde, E., Jarmolowski, A., McGuigan, C., and Mattaj, I. W. (1996). A nuclear cap-binding complex facilitates association of U1 snRNP with the cap-proximal 5' splice site. *Genes Dev* 10, 1683-1698.
- Li, K. J., and Garoff, H. (1998). Packaging of intron-containing genes into retrovirus vectors by alphavirus vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 3650-3654.
- Li, Z., Dullmann, J., Schiedlmeier, B., Schmidt, M., von\_Kalle, C., Meyer, J., Forster, M., Stocking, C., Wahlers, A., Frank, O., *et al.* (2002). Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science* 296, 497.
- Li, Z., Schwieger, M., Lange, C., Kraunus, J., Sun, H., van den Akker, E., Modlich, U., Serinsöz, E., Will, E., von Laer, D., *et al.* (2003). Predictable and efficient retroviral gene transfer into murine bone marrow repopulating cells using a defined vector dose. *Experimental Hematology* 31, 1206-1214.
- Liu, H. X., Zhang, M., and Krainer, A. R. (1998). Identification of functional exonic splicing enhancer motifs recognized by individual SR proteins. *Genes Dev* 12, 1998-2012.
- Lobel, L. I., and Goff, S. P. (1985). Reverse transcription of retroviral genomes: mutations in the terminal repeat sequences. *J Virol* 53, 447-455.
- Loeb, J. E., Cordier, W. S., Harris, M. E., Weitzman, M. D., and Hope, T. J. (1999). Enhanced expression of transgenes from adeno-associated virus vectors with the woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element: implications for gene therapy. *Hum Gene Ther* 10, 2295-2305.
- Loh, T. P., Sievert, L. L., and Scott, R. W. (1988). Negative regulation of retrovirus expression in embryonal carcinoma cells mediated by an intragenic domain. *J Virol* 62, 4086-4095.
- Lozier, J. N., Metzger, M. E., Donahue, R. E., and Morgan, R. A. (1999). Adenovirus-mediated expression of human coagulation factor IX in the rhesus macaque is associated with dose-limiting toxicity. *Blood* 94, 3968-3975.
- Lund, A. H., Duch, M., Lovmand, J., Jorgensen, P., and Pedersen, F. S. (1997). Complementation of a primer binding site-impaired murine leukemia virus-derived retroviral vector by a genetically engineered tRNA-like primer. *J Virol* 71, 1191-1195.
- Macleod, D., Charlton, J., Mullins, J., and Bird, A. P. (1994). Sp1 sites in the mouse *aprt* gene promoter are required to prevent methylation of the CpG island. *Genes Dev* 8, 2282-2292.
- Maniatis, T., and Reed, R. (2002). An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature* 416, 499-506.

- Mann, R., and Baltimore, D. (1985). Varying the position of a retrovirus packaging sequence results in the encapsidation of both unspliced and spliced RNAs. *J Virol* **54**, 401-407.
- Matunis, E. L., Matunis, M. J., and Dreyfuss, G. (1993). Association of individual hnRNP proteins and snRNPs with nascent transcripts. *J Cell Biol* **121**, 219-228.
- Miele, G., Mouland, A., Harrison, G. P., Cohen, E., and Lever, A. M. (1996). The human immunodeficiency virus type 1 5' packaging signal structure affects translation but does not function as an internal ribosome entry site structure. *J Virol* **70**, 944-951.
- Morita, S., Kojima, T., and Kitamura, T. (2000). Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther* **7**, 1063-1066.
- Mougel, M., and Barklis, E. (1997). A role for two hairpin structures as a core RNA encapsidation signal in murine leukemia virus virions. *J Virol* **71**, 8061-8065.
- Mougel, M., Tounekti, N., Darlix, J. L., Paoletti, J., Ehresmann, B., and Ehresmann, C. (1993). Conformational analysis of the 5' leader and the gag initiation site of Mo-MuLV RNA and allosteric transitions induced by dimerization. *Nucleic Acids Res* **21**, 4677-4684.
- Mougel, M., Zhang, Y., and Barklis, E. (1996). cis-active structural motifs involved in specific encapsidation of Moloney murine leukemia virus RNA. *J Virol* **70**, 5043-5050.
- Mulligan, R. C. (1993). The basic science of gene therapy. *Science* **260**, 926-932.
- Munk, C., Lohler, J., Prassolov, V., Just, U., Stockschrader, M., and Stocking, C. (1997). Amphotropic murine leukemia viruses induce spongiform encephalomyelopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5837-5842.
- Murphy, J. E., and Goff, S. P. (1989). Construction and analysis of deletion mutations in the U5 region of Moloney murine leukemia virus: effects on RNA packaging and reverse transcription. *J Virol* **63**, 319-327.
- Neugebauer, K. M. (2002). On the importance of being co-transcriptional. *J Cell Sci* **115**, 3865-3871.
- Niepel, M., Ling, J., and Gallie, D. R. (1999). Secondary structure in the 5'-leader or 3'-untranslated region reduces protein yield but does not affect the functional interaction between the 5'-cap and the poly(A) tail. *FEBS Lett* **462**, 79-84.
- Nott, A., Le Hir, H., and Moore, M. J. (2004). Splicing enhances translation in mammalian cells: an additional function of the exon junction complex. *Genes Dev* **18**, 210-222.
- Ogert, R. A., Lee, L. H., and Beemon, K. L. (1996). Avian retroviral RNA element promotes unspliced RNA accumulation in the cytoplasm. *J Virol* **70**, 3834-3843.
- Ohno, M., Fornerod, M., and Mattaj, I. W. (1998). Nucleocytoplasmic transport: the last 200 nanometers. *Cell* **92**, 327-336.
- Osborne, C. S., Pasceri, P., Singal, R., Sukonnik, T., Ginder, G. D., and Ellis, J. (1999). Amelioration of retroviral vector silencing in locus control region beta-globin-transgenic mice and transduced F9 embryonic cells. *J Virol* **73**, 5490-5496.
- Paca, R. E., Hibbert, C. S., O'Sullivan, C. T., and Beemon, K. L. (2001). Retroviral splicing suppressor requires three nonconsensus uridines in a 5' splice site-like sequence. *J Virol* **75**, 7763-7768.

- Pawliuk, R., Bachelot, T., Raftopoulos, H., Kalberer, C., Humphries, R. K., Bank, A., and Leboulch, P. (1998). Retroviral vectors aimed at the gene therapy of human beta-globin gene disorders. *Ann N Y Acad Sci* 850, 151-162.
- Pelletier, J., and Sonenberg, N. (1985). Insertion mutagenesis to increase secondary structure within the 5' noncoding region of a eukaryotic mRNA reduces translational efficiency. *Cell* 40, 515-526.
- Persons, D. A., Mehaffey, M. G., Kaleko, M., Nienhuis, A. W., and Vanin, E. F. (1998). An improved method for generating retroviral producer clones for vectors lacking a selectable marker gene. *Blood Cells Mol Dis* 24, 167-182.
- Petersen, R., Kempler, G., and Barklis, E. (1991). A stem cell-specific silencer in the primer-binding site of a retrovirus. *Mol Cell Biol* 11, 1214-1221.
- Pinol-Roma, S., and Dreyfuss, G. (1992). Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm. *Nature* 355, 730-732.
- Pollard, V. W., and Malim, M. H. (1998). The HIV-1 Rev protein. *Annu Rev Microbiol* 52, 491-532.
- Popa, I., Harris, M. E., Donello, J. E., and Hope, T. J. (2002). CRM1-dependent function of a cis-acting RNA export element. *Mol Cell Biol* 22, 2057-2067.
- Prince, V. E., and Rigby, P. W. (1991). Derivatives of Moloney murine sarcoma virus capable of being transcribed in embryonal carcinoma stem cells have gained a functional Sp1 binding site. *J Virol* 65, 1803-1811.
- Proudfoot, N. J., Furger, A., and Dye, M. J. (2002). Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* 108, 501-512.
- Pruss, D., Reeves, R., Bushman, F. D., and Wolffe, A. P. (1994). The influence of DNA and nucleosome structure on integration events directed by HIV integrase. *J Biol Chem* 269, 25031-25041.
- Pryciak, P. M., and Varmus, H. E. (1992). Nucleosomes, DNA-binding proteins, and DNA sequence modulate retroviral integration target site selection. *Cell* 69, 769-780.
- Ramezani, A., Hawley, T. S., and Hawley, R. G. (2003). Performance- and safety-enhanced lentiviral vectors containing the human interferon-beta scaffold attachment region and the chicken beta-globin insulator. *Blood*. 2003 Jun 15;101(12):4717-24. *Blood* 101, 4717-4724.
- Ramsay, A. J., Leong, K. H., and Ramshaw, I. A. (1997). DNA vaccination against virus infection and enhancement of antiviral immunity following consecutive immunization with DNA and viral vectors. *Immunol Cell Biol* 75, 382-388.
- Ramsfjell, V., Bryder, D., Bjorgvinsdottir, H., Kornfalt, S., Nilsson, L., Borge, O. J., and Jacobsen, S. E. (1999). Distinct requirements for optimal growth and In vitro expansion of human CD34(+)CD38(-) bone marrow long-term culture-initiating cells (LTC-IC), extended LTC-IC, and murine in vivo long-term reconstituting stem cells. *Blood* 94, 4093-4102.
- Rasmussen, S. V., Mikkelsen, J. G., and Pedersen, F. S. (2002). Modulation of homo- and heterodimerization of Harvey sarcoma virus RNA by GACG tetraloops and point mutations in palindromic sequences. *J Mol Biol* 323, 613-628.
- Reed, R., and Hurt, E. (2002). A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing. *Cell* 108, 523-531.

- Reed, R., and Magni, K. (2001). A new view of mRNA export: separating the wheat from the chaff. *Nat Cell Biol* 3, E201-204.
- Reichelt, R., Holzenburg, A., Buhle, E. L., Jr., Jarnik, M., Engel, A., and Aebi, U. (1990). Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore complex components. *J Cell Biol* 110, 883-894.
- Roberts, T. M., and Boris-Lawrie, K. (2000). The 5' RNA terminus of spleen necrosis virus stimulates translation of nonviral mRNA. *J Virol* 74, 8111-8118.
- Russell, D. W., and Hirata, R. K. (1998). Human gene targeting by viral vectors. *Nat Genet* 18, 325-330.
- Saiki, R. K., Bugawan, T. L., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1986). Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324, 163-166.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
- Schaal, T. D., and Maniatis, T. (1999). Selection and characterization of pre-mRNA splicing enhancers: identification of novel SR protein-specific enhancer sequences. *Mol Cell Biol* 19, 1705-1719.
- Schambach, A., Wodrich, H., Hildinger, M., Bohne, J., Krausslich, H. G., and Baum, C. (2000). Context dependence of different modules for posttranscriptional enhancement of gene expression from retroviral vectors. *Mol Ther* 2, 435-445.
- Schaumann, D. (Diplomarbeit 2000). Universität Hamburg.
- Segref, A., Sharma, K., Doye, V., Hellwig, A., Huber, J., Luhrmann, R., and Hurt, E. (1997). Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export, binds to both poly(A)+ RNA and nuclear pores. *Embo J* 16, 3256-3271.
- Seliger, B., Kollek, R., Stocking, C., Franz, T., and Ostertag, W. (1986). Viral transfer, transcription, and rescue of a selectable myeloproliferative sarcoma virus in embryonal cell lines: expression of the mos oncogene. *Mol Cell Biol* 6, 286-293.
- Serfling, E., Lubbe, A., Dorsch-Hasler, K., and Schaffner, W. (1985). Metal-dependent SV40 viruses containing inducible enhancers from the upstream region of metallothionein genes. *Embo J* 4, 3851-3859.
- Shatkin, A. J., and Manley, J. L. (2000). The ends of the affair: capping and polyadenylation. *Nat Struct Biol* 7, 838-842.
- Shivdasani, R. A., and Orkin, S. H. (1996). The transcriptional control of hematopoiesis. *Blood* 87, 4025-4039.
- Simpson, S. B., Zhang, L., Craven, R. C., and Stoltzfus, C. M. (1997). Rous sarcoma virus direct repeat cis elements exert effects at several points in the virus life cycle. *J Virol* 71, 9150-9156.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98, 503-517.
- Staley, J. P., and Guthrie, C. (1998). Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell* 92, 315-326.

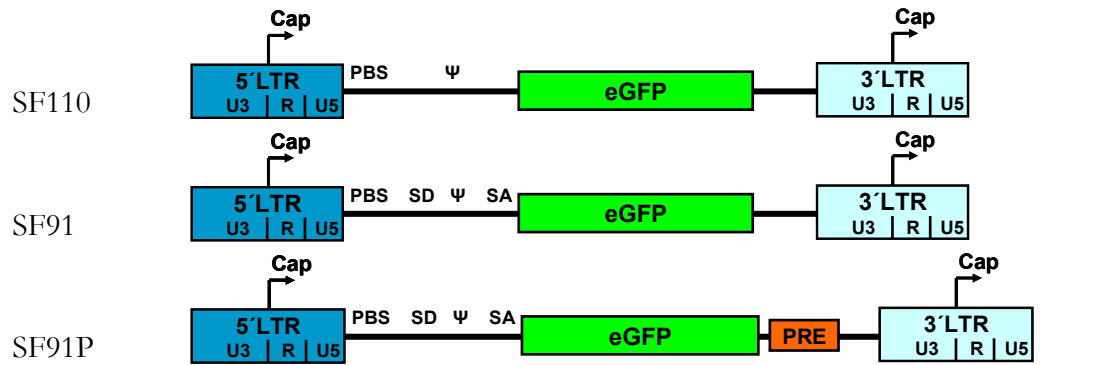
- Stevens, S. W., Ryan, D. E., Ge, H. Y., Moore, R. E., Young, M. K., Lee, T. D., and Abelson, J. (2002). Composition and functional characterization of the yeast spliceosomal penta-snRNP. *Mol Cell* 9, 31-44.
- Stocking, C., Grez, M., and Ostertag, W. (1993). Regulation of retrovirus infection and expression in embryonic and hematopoietic stem cells. *Virus Strategies Molecular Biology and Pathogenesis*.
- Stocking, C., Kollek, R., Bergholz, U., and Ostertag, W. (1985). Long terminal repeat sequences impart hematopoietic transformation properties to the myeloproliferative sarcoma virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 5746-5750.
- Stocking, C., Kollek, R., Bergholz, U., and Ostertag, W. (1986). Point mutations in the U3 region of the long terminal repeat of Moloney murine leukemia virus determine disease specificity of the myeloproliferative sarcoma virus. *Virology* 153, 145-149.
- Strasser, K., Masuda, S., Mason, P., Pfannstiel, J., Oppizzi, M., Rodriguez-Navarro, S., Rondon, A. G., Aguilera, A., Struhl, K., Reed, R., and Hurt, E. (2002). TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature* 417, 304-308.
- Sun, H., and Chasin, L. A. (2000). Multiple splicing defects in an intronic false exon. *Mol Cell Biol* 20, 6414-6425.
- Sutherland, H. J., Eaves, C. J., Lansdorp, P. M., Thacker, J. D., and Hogge, D. E. (1991). Differential regulation of primitive human hematopoietic cells in long-term cultures maintained on genetically engineered murine stromal cells. *Blood* 78, 666-672.
- Thomas, C. E., Ehrhardt, A., and Kay, M. A. (2003). Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature Rev Genet* 4, 346-358.
- Trubetskoy, A. M., Okenquist, S. A., and Lenz, J. (1999). R region sequences in the long terminal repeat of a murine retrovirus specifically increase expression of unspliced RNAs. *J Virol* 73, 3477-3483.
- Tsukiyama, T., Niwa, O., and Yokoro, K. (1989). Mechanism of suppression of the long terminal repeat of Moloney leukemia virus in mouse embryonal carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 9, 4670-4676.
- Tumas, D. B., Spangrude, G. J., Brooks, D. M., Williams, C. D., and Chesebro, B. (1996). High-frequency cell surface expression of a foreign protein in murine hematopoietic stem cells using a new retroviral vector. *Blood* 87, 509-517.
- Varmus, H. E. (1982). Form and function of retroviral proviruses. *Science* 216, 812-820.
- Verma, I. M., and Somia, N. (1997). Gene therapy -- promises, problems and prospects. *Nature* 389, 239-242.
- Wahlers, A., Kustikova, O., Zipfel, P. F., Itoh, K., Koester, M., Heberlein, C., Li, Z., Schiedlmeier, B., Skerka, C., Fehse, B., and Baum, C. (2002a). Upstream conserved sequences of mouse leukemia viruses are important for high transgene expression in lymphoid and hematopoietic cells. *Mol Ther* 6, 313-320.
- Wahlers, A., Schwieger, M., Li, Z., Meier-Tackmann, D., Lindemann, C., Eckert, H. G., von Laer, D., and Baum, C. (2001). Influence of multiplicity of infection and protein stability on retroviral vector-mediated gene expression in hematopoietic cells. *Gene Ther* 8, 477-486.
- Wahlers, A., Zipfel, P. F., Schwieger, M., Ostertag, W., and Baum, C. (2002b). In vivo analysis of retroviral enhancer mutations in hematopoietic cells: SP1/EGR1 and

- ETS/GATA motifs contribute to long terminal repeat specificity. *J Virol* 76, 303-312.
- Wivel, N. A., and Walters, L. (1993). Germ-line gene modification and disease prevention: some medical and ethical perspectives. *Science* 262, 533-538.
- Wu, X., Li, Y., Crise, B., and Burgess, S. M. (2003). Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science* 300, 1749-1751.
- Wu, X., and Pandolfi, P. P. (2001). Mouse models for multistep tumorigenesis. *Trends Cell Biol* 11, S2-9.
- Wurtz, T., Kiseleva, E., Nacheva, G., Alzhanova-Ericsson, A., Rosen, A., and Daneholt, B. (1996). Identification of two RNA-binding proteins in Balbiani ring premessenger ribonucleoprotein granules and presence of these proteins in specific subsets of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles. *Mol Cell Biol* 16, 1425-1435.
- Yang, Y., Nunes, F. A., Berencsi, K., Furth, E. E., Gonczol, E., and Wilson, J. M. (1994). Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4407-4411.
- Yoon, D. W., Lee, H., Seol, W., DeMaria, M., Rosenzweig, M., and Jung, J. U. (1997). Tap: a novel cellular protein that interacts with tip of herpesvirus saimiri and induces lymphocyte aggregation. *Immunity* 6, 571-582.
- Yu, S. F., von Ruden, T., Kantoff, P. W., Garber, C., Seiberg, M., Ruther, U., Anderson, W. F., Wagner, E. F., and Gilboa, E. (1986). Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 3194-3198.
- Zhang, S., Hara, H., Kaji, H., and Kaji, A. (1997). Inhibition of HIV type 1 RNA dimerization by antisense DNA corresponding to the 17-nucleotide sequence downstream from the splice donor site of HIV type 1 RNA. *AIDS Res Hum Retroviruses* 13, 865-873.
- Zhou, Z., Luo, M. J., Straesser, K., Katahira, J., Hurt, E., and Reed, R. (2000). The protein Aly links pre-messenger-RNA splicing to nuclear export in metazoans. *Nature* 407, 401-405.
- Zufferey, R., Donello, J. E., Trono, D., and Hope, Z. J. (1999). Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *Journal of Virology* 73, 2886-2892.

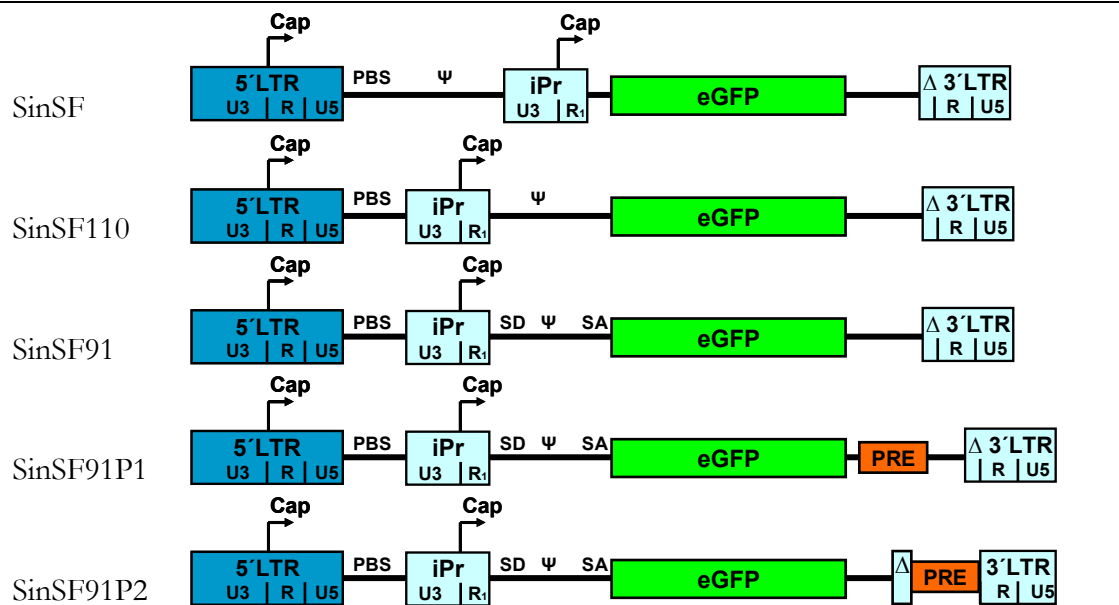
# Anhang

## Vektoren: Vektorentwicklung

### LTR-Vektoren

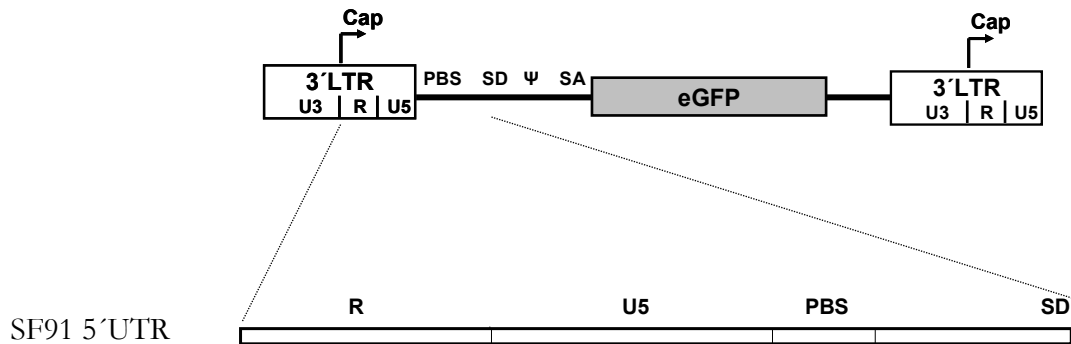


### SIN-Vektoren

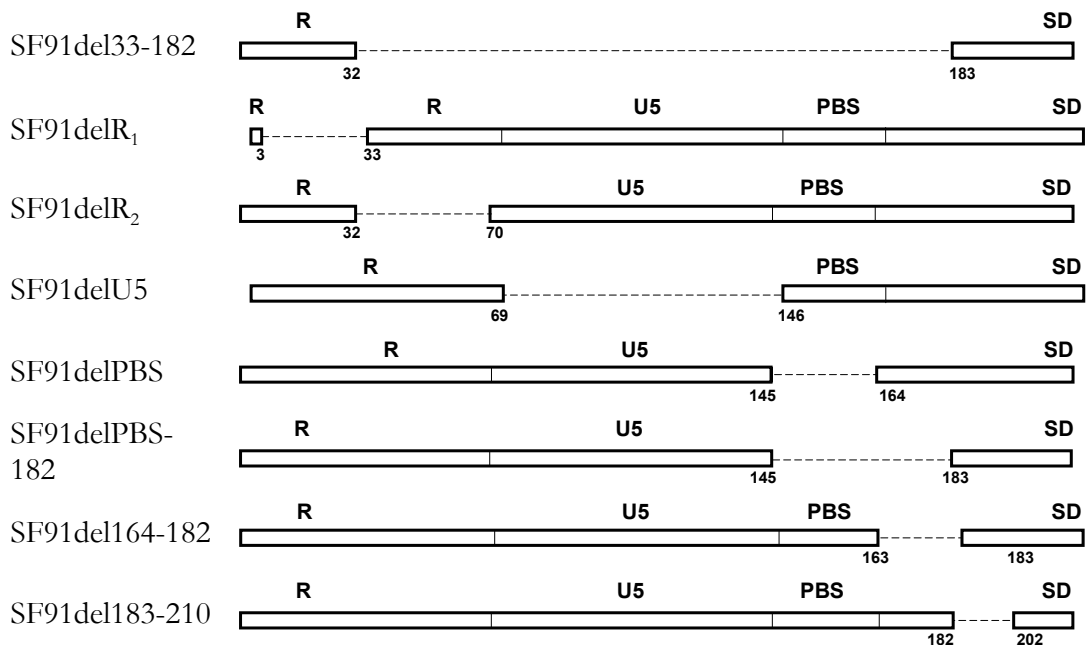


## Vektoren: SF91-Mutanten

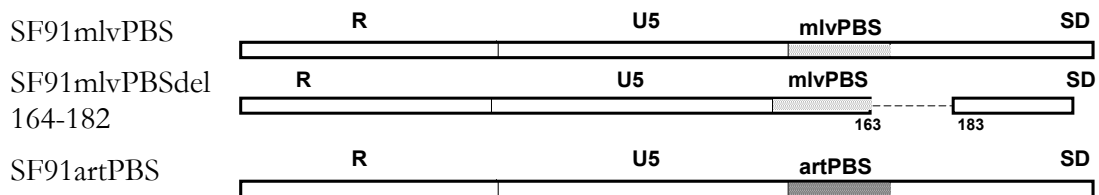
### SF91



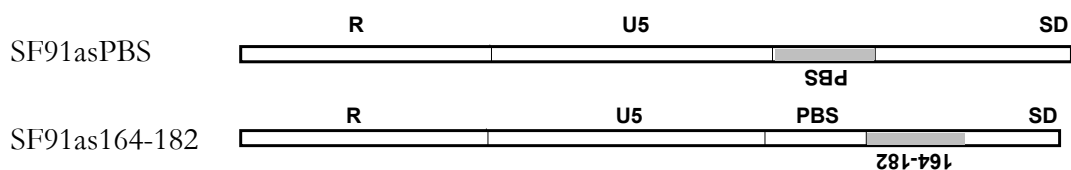
### Deletionsmutanten



### PBS-Mutanten



### antisense-Mutanten



## SF91-Vektor: Plasmid-Sequenz (5'LTR – 3'LTR)

aattagtac**5'LTR**CTAGCTTAAGTAAGCCATTTTGCAAGGCATGGAAAAATACATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTTAGGAACAGAGAG  
**U3**ACAGGAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGTTGGAACAGCAGAATATGG  
 GCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGT  
 TTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGC  
**U3**TTCTGTTCGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCACAACCCCTCACTCGGCGCGCCAGTCCTCCGATTGACTGCGTCGCC  
**R**CGGGTACCCGATTCCCAATAAAGCCTCTTGCTGTTTGCAATCCGAATCGTGGACTCGCTGATCCTTGGGAGGGTCTCCTCAGATTGATTGA  
**U5**CTGCCCACCTCGGGGGTCTTTTCATT**PBS**TGGAGGTTCCACCGAGATTGGAGACCCCTGCCAGGGACCACCGACCCCCCGCGGGG**SD**AGGTA  
 AGCTGGCCAGCGGTGTTTTCTGTCTGTCTGTCTTTGGGCGTGTGTCGCCGCATCTAGTGTGCGCCTGCGTCTGTACTAGTTGG  
 CTAAGTAGATCTGTATCTGGCGGTCCCGCGGAAGAACTGACGAGTTCGTATTCGCGCCGAGCCCTGGGAGACGTCCCAGCGGCTC  
 GGGGGCCCGTTTTGTGGCCATTCTGTATCAGTTAACCTACCCGAGTCGGACTTTTTTGAGCTCCGCCACTGTCCGAGGGGTACGTGGCT  
 TTGTTGGGGACGAGAGACAGACACTTCCGCCCCGTCTGAATTTTGTCTTCGGTTTTACGCCGAAACCGCGCGCGCTCTTGTC  
 TGCTGCAGCATCGTTCTGTGTTGTCTGTCTGACTGTGTTTCTGTATTTGTCTGAAAATTAGCTCGACAAAGTTAAGTAATAGTCCCTCTCT  
**SA** → **eGFP cDNA**  
 CCAAGCTCACTTACAGGCGGCCGCTCTAGCGCTACCGGTGCGCACCATgtgtgagcaaggcgaggagctgtcacccgggtggtgccatcctggcgagctggacgg  
 cgagctaaacggccacaagttcagctgttccggcgagggcgagggcgatgccacctcaggcaagctgacctgaagttcatctgcaccaccggcaagctcccggtgccctggccaccctcgtgacc  
 accctgacctacggctgagtgcttccgctaccccgaccacatgaagcagcagcttcttaagtcgccatgccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttctaaggacgacggcaa  
 ctacaagaccgcgcgaggtgaagttcagggcgacacctgtgaaccgcatcgagctgaaggcgatcgactcaaggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaaca  
 gccacaacgtctatcatgcccagacaagcagaagaacggcatcaaggtaactcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctgcgcaccatcaccagcagaacaccccatc  
 ggcgacggccccgtgctgctgcccgaaccactacgtgagcaccagtcgcccctgagcaagaccccaacgagaagcgcgatcacatggctgctggagttcgtgaccgcgcgggatcactc  
 tcggcatggacgagctgtacaagtcgggactcagatccagcgtgataaccacgctccaccacaaacaaggatgccggtaccggcgcccaccaccaccaccacacatgtgaATTTCGGATC  
 CAAGCTTCCTAACACGAGCCATAGATAGAATAAAGATTTTATTTAGTCTCCAGAAAAAGGGGG**3'LTR**AATGAAAGACCCACCTGTAGGTTTG  
**U3**GCAAGCTAGCTGCAGTAACGCCATTTTGCAAGGCATGGAAAAATACCAACCAAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGGCGGGTACATGAAA  
 ATAGCTAACGTTGGGCCAAACAGGATATCTGCGGTGAGCAGTTTCGGCCCCGGCCGGGGCCAAGAACAGATGGTCAACGCAGTTTCCGG  
 CCCCCGGCCGAGGCCAAGAACAGATGGTCCCAGATATGGCCCAACCCCTCAGCAGTTTCTTAAGACCCATCAGATGTTTCCAGGCTCCCC  
 CAAGGACCTGAAATGACCCTGCGCCTTATTTGAATTAACCAATCAGCCTGCTTCTCGCTTCTGTTGCGCGCTTCTGCTTCCGAGCTCTAT  
**U3**AAAAAGACTCACAAACCCCTCACTCGGCGCGCCAGTCCTCCGATTGACTGAGTCGCCCGGGTACCCGTGTTCTCAATAAAGCCCTCTTGCA  
**R**GTTGGCATCCGACTCGTGGTCTCGCTGTTCTTGGGAGGGTCTCCTCAGAGTGATTGACTGCCACCTCGGGGGTCTTTTCATTctcgag

## SinSF91-Vektor: Plasmid-Sequenz (5'LTR – 3'LTR)

**5'LTR** **U3**  
 AattagttactCTAGCTTAAGTAAGCCATTTTGCAAGGCATGGAAAAATACATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTTAGGAACAGAGAG  
 ACAGGAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGTTGGAACAGCAGAATATGG  
 GCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGT  
 TTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGC  
**U3** **R**  
 TTCTGTTGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCAACCCCTCACTCGGC GCGCCAGTCTCCGATTGACTGCGTCGCC  
 CGGGTACCCGATTCCCAATAAAGCCTCTTGCTGTTTGCATCCGAATCGTGGACTCGCTGATCCTTGGGAGGGTCTCCTCAGATTGATTGA  
**U5** **PBS** **iPr** **U3**  
 CTGCCCACCTCGGGGTCTTTCATTGGAGGTTCCACCGAGATTGGAGACCCCTGCCCGTCGAGCGGCGCTAGCTGCAGTAACGCCA  
 TTTTGAAGGCATGGAAAAATACCAACCAAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGGCGGGTACATGAAAAATAGCTAACGTTGGGCCAAACAG  
 GATATCTGCGGTGAGCAGTTTCGGCCCCGGCCGGGGCCAAGAACAGATGGTCACCGCAGTTTCGGCCCCGGCCGAGGCCAAGAACA  
 GATGGTCCCAGATATGGCCAACCCTCAGCAGTTTCTTAAGACCCATCAGATGTTTCCAGGCTCCCCAAGGACCTGAAATGACCTGCGC  
 CCTTATTGAAATTAACCAATCAGCCTGCTTCTCGCTTCTGTTGCGCGCTTCTGCTTCCCAGCTCTATAAAAGAGCTCACAACCCCTCACT  
**R** **SD**  
 CGGCGCGCCAGTCTCCGACAGACTGAGTCGCCCGGGACCAACCGACCCCCCGCGGGAGGTAAGCTGGCCAGCGGTGTTTTCGTGTCT  
 TGTCTGTCTTTGGGCGTGTGTTGTGCCGGCATCTAGTGTGCGCCTGCGTCTGTACTAGTTGGCTAACTAGATCTGTATCTGGCGGTCC  
 CGCGGAAGAACTGACGAGTTTCGTATTCCCGGCCGAGCCCTGGGAGACGTCCCAGCGGCCTCGGGGGCCCGTTTTGTGGCCATTCT  
 GTATCAGTTAACCTACCCGAGTCGGACTTTTTGGAGCTCCGCCACTGTCCGAGGGGTACGTGGCTTTGTTGGGGACGAGAGACAGAGA  
 CACTTCCCGCCCCGCTGAATTTTGTCTTTCGGTTTTACGCCGAAACCGCGCCGCGCTTGTCTGCTGCAGCATCGTTCTGTGTTGTC  
 TCTGTCTGACTGTGTTTCTGTATTGTCTGAAAATTAGCTCGACAAAGTTAAGTAATAGTCCCTCTCTCAAGCTCACTTACAGGCGGCCG  
**SA**  
 TCTAGCGCTACCGGTGCGCACCATgtgtgagcaagggcgaggagctgtaccgggtggtgccatcctgtcagctggacggcgacgtaaacggccacaagttcagcgtgtccggc  
**→ eGFP cDNA**  
 gagggcgagggcgatgccacctcaggaagctgacctgaagttcatctgcaccaccggaagctgcccgtgcctggcccaccctcgtgaccacctgacctacggcgtgagtgcttcagccgcta  
 ccccgaccacatgaagcagcagcactctcaagtcgccatgcccgaaggctacgtcaggagcgcaccatcttcaaggacgacggcaactacaagcccgccgaggtgaagttcaggggc  
 gacacctggtgaaccgcatcagctgaaggcatcgaactcaaggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatatcatgcccagacagaa  
 gaacggcatcaaggtgaactcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctgccgaccactaccagcagaacacccccatcggcgacggccccgtgctgctgccgacaaccact  
 acctgagcaccctgcctgagcaagaccaccaagcagcagcgcgatcacatggtcctgtgaggtcgtgaccgccgggatcactctcggcatggacgagctgtacaagtcggactcag  
 atccagcgtgataaccagcctccaccacaacaaggtgcccgtaccggcgccaccaccaccaccaccacatgtgaATTCGGATCCAAGCTTCTTAAACAGAGCCATAGA  
 TAGAATAAAAGATTTTATTTAGTCTCCAGAAAAAGGGGG **3'LTR** **delU3**  
 AATGAAAGACCCACCGCTAGCGATATCGAATTCACAACCCCTCACTCGGC

**SinSF91-Vektor: Plasmid-Sequenz (5′LTR – 3′LTR)**

(fortlaufend)

**R**  
GCGCCAGTCCTCCGATTGACTGAGTCGCCCCGGGTACCCGTGTTCTCAATAAAGCCCTCTTGCAAGTTGGCATCCGACTCGTGGTCTCGCTG

**U5**  
TTCCTTGGGAGGGTCTCCTCAGAGTGATTGACTGCCACCTCGGGGGTCTTTCATTctcgag