

Aus der Abteilung für Zellbiologie und Virologie des Heinrich-Pette-Instituts für
Experimentelle Virologie und Immunologie an der Universität Hamburg
Direktor: Prof. Dr. med. Hans-Georg Kräusslich

**Optimierung der Transgenexpression retroviraler
Gentherapie-Vektoren durch Einsatz posttranskriptionell
regulatorischer Elemente**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

dem Fachbereich der Medizin der Universität Hamburg
vorgelegt von

Axel Schambach
aus Hamburg

Hamburg 2003

Angenommen von dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg am: 24.10.2003

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität Hamburg

Dekan: Prof. Dr. R. Stahl

Referent: Prof. Dr. H.-G. Kräusslich

Korreferent: Prof. Dr. Dr. A. R. Zander

Gutachter: Prof. Dr. G. W. Mayr, Prof. Dr. A. H. Guse

Datum des Rigorosums: 24.10.2003

INHALTSVERZEICHNIS

A. EINLEITUNG	Seite
1. Gentherapie als modernes Therapiekonzept genetisch bedingter Erkrankungen	1
2. Retroviren und ihre Replikation	3
3. Virale Vektoren für die Gentherapie	5
a. Ein Virus in einen Vektor konvertieren	5
b. Retrovirale Vektoren	6
4. Die Verwendung von Verpackungszelllinien	7
5. Die zelluläre Genexpression	10
a. Regulation der zellulären Genexpression	13
6. Virale RNA-Elemente nutzen Komponenten der posttranskriptionellen Genexpression	15
a. Das konstitutive Transportelement (CTE)	16
b. Elemente aus der 3' pol-Region verschiedener Viren	16
c. Das WPRE des Woodchuck Hepatitis Virus	17
7. Ziel und Aufgabenstellung der Arbeit	18
B. MATERIAL UND METHODEN	
1. Allgemeine Materialien	19
2. Arbeiten mit rekombinanter DNA	19
3. Arbeiten mit Säugetierzellen	25
4. Arbeiten mit RNA	31
5. Biochemische Analyse von viralen Genprodukten	33
6. Computergestützte Sequenzanalyse	36
7. Klonierungen	37
8. Primer und Oligonukleotide	48
C. RESULTATE	
1. Konstruktion und Herstellung der retroviralen Vektoren	49
a. Verbessertes Design eines retroviralen Basisvektors	49
b. Experimentelle Durchführung	51
2. Promotoraktivität und Wirtszelltropismus in Zellen verschiedener Spezies und Titeranalysen	52
3. Einfluss von RNA-Elementen auf die HIV-1 gag-Expression	56
a. Hintergrund	56
b. Einfluss posttranskriptionell aktiver Elemente auf die HIV-1 gag-Expression in der Verpackungszelllinie	57
c. Einfluss posttranskriptionell aktiver Elemente auf die HIV-1 gag-Expression in der Zielzelle	59
d. Auf CTE basierende lentivirale Vektoren können das Rev/RRE-System partiell ersetzen	61
4. Posttranskriptionelle Modulation im Kontext der β -Globin cDNA	65
a. Verstärkte Globinexpression durch ein Intron und RNA-Elemente	65
b. Die Häminzugabe kann die Globinexpression auch in nicht-erythroiden Zellen rekonstituieren	73
c. Lentivirale Globinvektoren	75

	Seite
5. Das grün fluoreszierende Protein zur systematischen Analyse von verschiedenen RNA- und Spleißelementen	78
a. Hintergrund.....	78
b. Der EGFP-Expressionslevel eines retroviralen Vektors kann durch posttranskriptionelle Regulatorelemente modifiziert werden	78
6. Verwendung von RNA- und Spleißelementen zur Steigerung der MDR1-Genexpression...	86
a. Hintergrund.....	86
b. Die Kombination von Spleißelementen und WPRE verstärkt die Expression von humanem MDR1	87
 D. DISKUSSION	
1. Einfluss von RNA- und Spleißelementen auf die HIV-1 gag-Expression	93
a. RNA-Elemente bei der Konstruktion von lentiviralen Vektoren.....	95
b. Die Speziesbarriere von HIV-1	97
2. Einfluss von RNA- und Spleißelementen auf die Expression eines spleißabhängigen Transgens am Beispiel von β -Globin.....	97
a. Bisherige Gentherapieansätze für β -Globin.....	97
b. Globinexpression durch ein 5' Intron und RNA-Elemente	98
3. Einfluss posttranskriptioneller Kontrollelemente auf Gene, die ohne RNA-Elemente und Introns exprimierbar sind	104
4. Schlussfolgerungen und Leitlinien für die Konstruktion von verbesserten Expressionsvektoren.....	107
5. Möglichkeiten dieser Vektoren in der klinischen Therapie.....	109
a. Therapie der Sichelzellanämie und β -Thalassämie	109
b. Gentherapie mit MDR1-Vektoren	110
c. Technische Durchführung dieser Gentherapie-Ansätze und mögliche Probleme ..	111
 E. ZUSAMMENFASSUNG	 113
 F. LITERATURVERZEICHNIS	 114
 G. ANHANG	
1. Danksagung.....	123
2. Lebenslauf	124
3. Erklärung.....	126

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Titel	Seite
1	Die retrovirale Replikation am Beispiel des komplexen Retrovirus HIV-1	5
2	Produktion von viralen Partikeln und Transduktion von Zielzellen	9
3	Schema und Regulation der Genexpression am Beispiel von β -Globin	11
4	Signal-mediierter Transport durch die nukleären Porenkomplexe	12
5	Klonierung der retroviralen Basiskonstrukte	38
6	Klonierung der DNA für RNA-Elemente	39
7	Klonierung der Transgene	43
8	Schematisches Design der oncoretroviralen Vektoren in dieser Arbeit	50
9	Bestimmung von Wirtszelltropismus und Titer der verwendeten oncoretroviralen Vektoren	53
10	Posttranskriptionelle Kontrollelemente modulieren die HIV-1 gag-Expression	58
11	Analyse der CTE-vermittelten Gag-Expression in Zelllinien verschiedener Spezies	60
12	Steigerung der HIV-1 gag RNA-Expression durch CTEs	61
13	Darstellung des lentiviralen Vektorsystems	62
14	CTE-haltige lentivirale Vektoren können das Rev/RRE-System beim Gentransfer partiell ersetzen	63
15	Verbesserung der β -Globin RNA-Expression durch Spleißsignale plus WPRE oder CTE	66
16	Abhängigkeit der Globinexpression von der Ausdifferenzierung der erythroiden Reihe	72
17	Rekonstitution der Globinexpression in nicht-erythroiden Zellen durch Zugabe von Hämin	74
18	Lentivirale Globinvektoren	76
19	Modifizierung der Expressionslevel von retroviralen EGFP-Vektoren durch posttranskriptionelle Kontrollelemente	79
20	Einfluss der Transduktionsrate auf die EGFP-Expression	82
21	Deutliche Beeinflussung der EGFP-Expression durch verschieden lange WPRE-Elemente	84
22	Kombinationen von verschiedenen RNA-Elementen in einem Vektor	85
23	Posttranskriptionelle Kontrollelemente vergrößern die Expression des MDR1-Gens	88
24	Wirkung der MDR-Vektoren in Vorläuferzellen der Hämatopoese (K-562)	91
25	Schema der Inhibition der Translationsinitiation bei der Globinexpression	101
26	Schematischer Aufbau der in die <i>ex vivo</i> Gentherapie involvierten Prozeduren	112
Tab.		
1	Übersicht über die verwendeten Verpackungszelllinien, ihre Konstruktion und die zugehörige Literaturangabe	8
2	Verbesserung der RNA-Expression von Globin durch posttranskriptionell aktive Elemente	68
3	Notwendigkeit von Rev in verschiedenen Vektorsystemen	96
4	Charakteristika der Globinexpression bei unterschiedlicher Anwendung in retroviralen Vektoren von Sadelain und Schambach	100

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ALA	Aminolävulinsäure
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome, erworbene Immunschwäche
Amp.	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
CD4	Cluster Determinante 4 (Oberflächenrezeptor, Rezeptor für HIV)
CXCR4 / CCR5	Chemokinrezeptoren (Co-Rezeptoren für HIV)
CMV	Cytomegalievirus
CA	Capsid Protein
CFU	„Colony Forming Units“, kolonie-bildende Einheiten
cDNA	Komplementäre DNA
CTE	„constitutive transport element“, konstitutives Transportelement
cpm	„counts per minute“
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTAF	Dichlortriazinylaminofluorescein
ECL	„enhanced Chemoluminescence“
E. coli	Escherichia coli
EGFP	„enhanced green fluorescence protein“, kodonoptimiertes GFP
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	„enzyme linked immuno-sorbent assay“
EMCV	„Encephalomyocarditis Virus“
Env	„envelope“ (Glykoproteine)
FACS	„fluorescence activated cell sorter“: Analysegerät zur Durchflusszytometrie
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Fo	Foamy-Element
Gag	„group specific antigen“ (innere Strukturproteine)
GALV	„Gibbon Ape Leukemia Virus“
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
G-CSF	Granulozyten-Koloniestimulierender Faktor
HA	Hämagglutinin
HBV	Hepatitis B Virus
HIV	Human Immunodeficiency Virus, Humanes Immundefizienz-Virus
hPGK	Humane Phosphoglyceratkinase
HPI	Heinrich-Pette-Institut
HSRV	„Human Spuma Retrovirus“, Foamyvirus
IAP	Intracisternaler A-Typ Partikel
IF	Immunfluoreszenz
IL	Interleukin
IN	Integrase
IRES	Interne ribosomale „Entry Site“
kDa	Kilodalton
kb	Kilobasen
LCR	„Locus Control Region“, erythroider Enhancer bei Globinexpression
LTR	„Long Terminal Repeat“
mAk	monoklonaler Antikörper
MCS	Multiple cloning site, multiple Klonierungsstelle
MDR	Multidrugresistenz-Gen
MESV	„Murine Embryonic Stem Cell Virus“
MIA	Muriner intracisternaler A-Typ Partikel

m.o.i.	„multiplicity of infection“
Mo-MLV	„Moloney Murine Leukemia Virus“
MPMV	„Mason-Pfizer Monkey Virus“
MPSV	„Myeloproliferative Sarcoma Virus“
mRNA	„messenger“ RNA
MuLV	Murines Leukämievirus
NB	Northern Blot
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
NPC	„nuclear pore complex“, nukleärer Porenkomplex
nt.	Nukleotide
OD	Optische Dichte
p24	HIV-1 Capsid (24 kDa)
PBS	1.) „Phosphate Buffer Saline“ 2.) Primerbindungsstelle
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase Ketten Reaktion
PE	Phycoerythrin
Pol	Polymerase, Replikationsproteine
Pr55	Gag-Vorläuferprotein (55 kDa)
Prot	Proteinase
RNA	Ribonukleinsäure
Rev	virales Regulator-Gen des HIV
RNP	Ribonukleoprotein
RRE	Rev responsives Element
Rpm	„rounds per minute“ (Umdrehungen pro Minute)
RT	1.) <u>R</u> everse <u>T</u> ranskriptase 2.) <u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
SCF	„stem cell factor“
SD	Spleißdonor
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SA	Spleißakzeptor
SFFV	„Spleen Focus-Forming Virus“
SIV	„Simian Immunodeficiency Virus“
snRNA	„small nuclear RNA“
snRNP	„small nuclear ribonucleoprotein particles“
TAP	„tip-associated protein“
Tat	Virales Transaktivator-Gen des HIV
U	Units, Enzymeinheiten
Vpr	„viral protein R“ (HIV-1 Protein)
VSV-G	Glykoprotein des <u>v</u> esikulären <u>S</u> tomatitis <u>v</u> irus
WB	Western Blot
WHV	„Woodchuck Hepatitis Virus“ (Hepatitisvirus des Waldmurmeltieres)
wt	Wildtyp
WPRE	„Woodchuck Posttranscriptional Regulatory Element“

AMINOSÄUREN

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

A. Einleitung

1. *Gentherapie als modernes Therapiekonzept genetisch bedingter Erkrankungen*

Der erste Meilenstein in der Entwicklung der Genetik gelang 1865, als Gregor Mendel Regeln zur Vererbung von Erbanlagen aufstellte. Nachdem Avery in den vierziger Jahren des 20. Jahrhunderts die DNA (Desoxyribonukleinsäure) als Informationsträger identifiziert hatte, konnten Watson und Crick in den fünfziger Jahren die Struktur der DNA entschlüsseln. In den siebziger Jahren waren Forscher in der Lage, spezifische Gene als biologische Einheiten der Vererbung zu isolieren, womit die Entwicklung der Molekularbiologie und Biotechnologie begann. Während der achtziger Jahre wurden erste theoretische Ansätze der Gentherapie entwickelt. Mit Beginn des 21. Jahrhunderts sind die $3 \cdot 10^9$ Basenpaare des menschlichen Genoms im Rahmen des humanen Genomprojekts komplett entschlüsselt (Venter et al. 2001). Die Fortschritte der Gendiagnostik und Manipulation von Genen haben es Wissenschaftlern ermöglicht, genetisches Material zu modifizieren, um Krankheiten zu bekämpfen oder zu verhindern.

Ungefähr 2800 spezifische Krankheiten sind bekannt, die auf Defekte (Mutationen) eines Gens zurückzuführen sind. Beispiele sind die cystische Fibrose, die Hämophilie (Bluterkrankheit) und die β -Globinopathien (Sichelzellanämie, Thalassämie):

- Die cystische Fibrose (Mukoviszidose) wird in etwa einem von 2500 Neugeborenen der westlichen Welt beobachtet. Diese Erkrankung führt über einen defekten Chloridkanal zu einem veränderten Ionenverhältnis und somit zu eingedickten Sekreten in Lunge und Pankreas.
- Hämophiliepatienten können einen Faktor der Gerinnungskaskade (insbesondere Faktor VIII oder IX) nicht synthetisieren und sind somit schon bei kleineren Unfällen einem erhöhten Blutungsrisiko ausgesetzt.
- Die Sichelzellanämie und die β -Thalassämie sind Beispiele für Krankheiten, deren Ursachen in Mutationen der β -Globins (auf Chromosom 11p15.5) liegen:
 - a) Die Sichelzellanämie stellt eine kodominant vererbte, qualitative Hämoglobinveränderung dar und resultiert aus einer Mutation im Codon 6 (GAG \rightarrow GTG) der β -Globinkette. Durch die Mutation wird an der Oberfläche ein hydrophiler Glutamyrest durch einen hydrophoben

Valylrest substituiert, in dessen Folge es zu hydrophoben Wechselwirkungen benachbarter HbS-Moleküle und zu deren Aggregation mit typischer Sichelform des Erythrozyten kommt. Dies führt zu einer chronischen Anämie durch Hämolyse des Erythrozyten. Durch Verstopfung kleiner Blutgefäße kommt es zu schubweisen Infarktkrisen. Homozygot Erkrankte versterben oft im Kindesalter.

- b) Demgegenüber stellen die Thalassämien eine heterogene Gruppe autosomal vererbter Störungen der Globinsynthese dar. Es sind fast 100 verschiedene Mutationen beschrieben. Da β -Ketten in vermindertem Maße gebildet werden, resultiert eine Störung der Stöchiometrie des Hämoglobintetramers. Klinische Folge ist eine hypochrome, mikrozytäre Anämie und eine hochgradige Steigerung der Erythrozytenbildung, die aufgrund des molekularen Defekts jedoch ineffektiv ist. Es kann zu Wachstumsstörungen, Ikterus, Hepatosplenomegalie und zur Knochenmarkhyperplasie mit erweiterten Markräumen (Bürstenschädel im Röntgenbild) kommen.

Neben den zuvor beschriebenen monogenetischen Erkrankungen gibt es multifaktoriell (polygen) bedingte Erbkrankheiten. Ein Beispiel hierfür stellt der Diabetes mellitus dar, der in der Regel einer multifaktoriellen Vererbung folgt.

Die Gentherapie ist als eine medizinische Intervention definiert, die die Veränderung des genetischen Materials lebender Zellen bewerkstelligt und im wesentlichen zwei Ziele verfolgt:

- a) Substitution des fehlenden oder defekten Faktors (z.B. Faktor VIII Gabe). Das geht jedoch in vielen Fällen nicht, ist aufwendig und teuer. Besser wäre es, eine gesunde Kopie des fehlenden oder defekten Gens einzuschleusen oder idealerweise dieses auszutauschen (Mulligan 1993). Das ist das Grundprinzip der Gentherapie. Hierbei wird direkt die molekulare Ursache auf DNA-Ebene durch Veränderung des krankheitsverursachenden Genotyps angegangen.
- b) Einbringen eines Gens, um die Art, wie eine Zelle funktioniert, zu modifizieren. Beispielsweise kann das therapeutische Gen bei der Behandlung von Krebserkrankungen für ein giftiges Genprodukt oder für ein Gen kodieren, das eine Sensitivität gegenüber Vorläufersubstanzen (Suizidgen) vermittelt.

Im allgemeinen kann ein Gen nicht direkt in die Zelle eingeführt werden. Die einfache Gabe von Plasmid-DNA ist nicht ausreichend. Das Gen muß durch eine „Genfähre“ transportiert werden, den sogenannten „Vektor“. Ein natürlich vorkommender Vektor-Typus sind Viren. Für den Einsatz in der Gentherapie werden diese genetisch dahingehend modifiziert, dass sie nicht in der Lage sind, sich selbst zu reproduzieren. Ca. 40% der Gentherapieversuche basieren auf Retroviren (Übersicht in www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical). Es können aber auch andere Viren (z.B. Adenoviren, Herpesviren, Adenoassoziierte Viren) als Vektoren genutzt werden. Darüber hinaus bestehen zahlreiche physikalische Gentransfermethoden, die wegen eventueller Sicherheitsbedenken bei der Verwendung von modifizierten Viren als Genübertragungsvehikel interessant sind (Günzburg et al. 1997). Beispiele für physikalische Methoden des Gentransfers sind die Mikroinjektion von DNA und die Komplexierung von DNA mit membrangängigen Agenzien (z.B. Liposomen oder kationische Lipide). Diese Verfahren sind jedoch relativ ineffizient, da ein Großteil der so applizierten DNA in der Zelle in lysosomale Vesikel aufgenommen und degradiert wird. Darüber hinaus gewährleistet die mittels physikalischer Gentransfermethoden eingeführte DNA nur eine temporäre, episomale Genexpression. Retrovirale Vektoren hingegen besitzen die Fähigkeit zur stabilen Integration ins Wirtszellgenom, können also stabil exprimiert werden und sind demnach auch in den folgenden Generationen der therapierten Zelle präsent. Retroviren und deren Vektorderivate zeigen ferner einen breiten Zelltropismus bezüglich Infektion und Expression (Coffin et al. 2000). Demzufolge stellen sie besonders interessante Vektoren zum Gentransfer dar und werden daher im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

2. Retroviren und ihre Replikation

Retroviren stellen eine Familie umhüllter RNA-Viren dar. Sie enthalten zahlreiche Viren, von denen sich folgende für die Gentherapie eignen:

- a) die Säugetier und Vögel Typ C - Retroviren (Oncoretroviren)
- b) Lentiviren (wie HIV und andere Immundefizienzviren)
- c) Spumaviren.

Manche Retroviren scheinen im natürlichen Wirt apathogen zu sein (z.B. Spumaviren), wohingegen das humane Immundefizienzvirus (HIV) AIDS (acquired immunodeficiency

syndrome) verursacht. Die meisten Retroviren zeigen in ihrer Virionstruktur, Genomorganisation und Replikationsmethode große Übereinstimmungen (Coffin et al. 2000).

Für die Entwicklung der retroviralen Gentherapie waren Untersuchungen zum Verständnis der retroviralen Replikation (Abb. 1) eine wesentliche Voraussetzung. Retroviren sind lipidumhüllte Viren, die zwei Kopien eines linearen, Plusstrang-orientierten, einzelsträngigen RNA-Genoms von 7-11 Kilobasen beinhalten. Im infektiösen Virion sind diese RNA-Moleküle in einem Ribonukleoprotein-Komplex (RNP) kondensiert, umgeben vom Capsid und umhüllt von einer Lipidmembran mit den viralen Glykoproteinen. Nach Fusion der viralen und zellulären Membranen wird der RNP-Komplex ins Zytoplasma injiziert, das RNA-Genom durch das Enzym Reverse Transkriptase in eine lineare Doppelstrang-DNA umgeschrieben. Das Produkt der reversen Transkription verbleibt zunächst mit den viralen Proteinen assoziiert und wird als Präintegrationskomplex bezeichnet. Wenn der Präintegrationskomplex den Zellkern erreicht, wird die virale DNA ins Wirtszellgenom durch die virale Integrase eingebaut. Das integrierte Provirus dient als funktionelle Expressionseinheit. Die transkriptionellen Kontrollelemente liegen in Form einer Duplikation der terminalen Sequenzen (LTR, long terminal repeat) vor. Der 5'LTR dient als Promotor für den Polymerase II-Komplex. Der 3'LTR enthält das Polyadenylierungssignal.

Alle replikationskompetenten Retroviren haben Leserahmen, die die Strukturproteine (Gag), die Replikationsenzyme (Pol) und die Glykoproteine (Env) beinhalten. Komplexe Retroviren, wie z.B. HIV-1, haben darüber hinaus weitere offene Leserahmen. Diese kodieren für regulatorische Proteine, welche von mehrfach gespleißten RNAs translatiert werden. In den meisten Fällen gibt es nur ein Primärtranskript, welches als genomische RNA und mRNA für die viralen Gag- und Pol-Proteine dient. Die viralen Glykoproteine werden dagegen von einer gespleißten mRNA synthetisiert und das Intron, welches herausgespleißt wird, entspricht den für Gag/Pol-kodierenden Sequenzen. Gag und Pol werden als Polyproteine an zytosolischen Ribosomen synthetisiert und zum Ort des Capsid-Assembly transportiert. Dabei werden nur solche viralen RNAs verpackt, die das Verpackungssignal ψ tragen. Die viralen Glykoproteine werden am rauen endoplasmatischen Retikulum translatiert und auf dem Weg des vesikulären Transportpfades transportiert und prozessiert. Die Virusfreisetzung geschieht im sogenannten Budding-Prozess (bud: die Knospe) an der Zellmembran. Anschließend erfolgt die extrazelluläre Konversion zum reifen infektiösen Virion. Dieser Prozess benötigt die Spaltung des strukturellen Polyproteins durch die virale Protease (Übersicht über die retrovirale Replikation in Coffin et al. 2000).

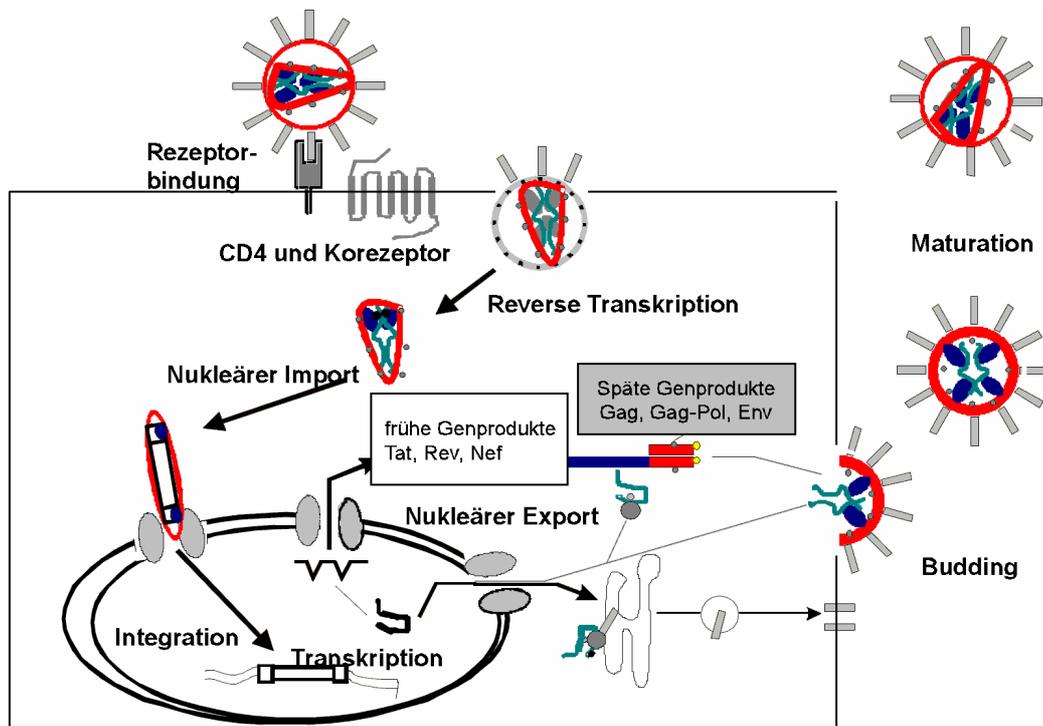


Abb. 1: Die retrovirale Replikation am Beispiel des komplexen Retrovirus HIV-1

Nach erfolgter Bindung der Rezeptoren (CD4- und Chemokinrezeptor) fusioniert das Virus mit der Zielzelle und der RNP-Komplex wird in das Zytoplasma entlassen. Die Reverse Transkriptase katalysiert die Synthese der doppelsträngigen DNA und der entstehende Präintegrationskomplex wird in den Zellkern importiert. Durch die virale Integrase erfolgt die Integration in das zelluläre Genom. Die integrierte DNA wird als Provirus bezeichnet. Die ungespleißte genomische prä-mRNA wird komplett gespleißt und exportiert. Komplett gespleißte RNAs kodieren für die regulatorischen Proteine Tat, Rev und Nef. Das Rev-Protein wandert in den Zellkern und bindet über die RRE-Sequenz an ungespleißte und einfach gespleißte RNAs und vermitteln deren Export. Die Rev-abhängig exportierten RNAs kodieren für die Strukturproteine Gag, Pol und Env sowie für die regulatorischen Proteine Vif, Vpr und Vpu. An der Plasmamembran lagern sich die Strukturproteine zusammen und es kommt zur Virusfreisetzung (Budding). Durch proteolytische Umlagerungen entstehen neue infektiöse Viren. [Abb. erhalten von M. Dittmar, HPI, und modifiziert.]

3. Virale Vektoren für die Gentherapie

a. Ein Virus in einen Vektor konvertieren

Viren haben die Eigenschaft, ihre genetische Information effizient in Zellen einzuschleusen. Bei der Vektorentwicklung will man sich dies zunutze machen, zugleich aber ein Fremdgen übertragen und die virale Replikation unterbinden. Dazu sind aus dem viralen Genom alle Gene zu entfernen, die für Struktur- und Replikationsproteine kodieren, und durch das Transgen zu ersetzen. Das Resultat ist der sogenannte Vektor (Abb. 2 u. 8). Enthält der Vektor noch Verpackungssequenz sowie Replikations- und Expressionssignale, kann er durch heterolog bereitgestellte virale Struktur- und Replikationsproteine komplementiert werden. Da diese komplementierenden Nukleinsäuren kein Verpackungssignal tragen, werden sie nicht in Vektorpartikel aufgenommen. Nach Eintritt der Partikel in die Zielzelle (Transduktion) wird nur die Vektor-Nukleinsäure eingeschleust. Eine detaillierte Übersicht zu diesem Thema liefert Kay et al. (2001).

b. Retrovirale Vektoren

Es gibt Vektoren auf der Basis unterschiedlicher Retroviren, die aus Human- (HIV-1), Nager- (z.B. MuLV) oder Geflügelzellen isoliert wurden. In der Gentherapie finden vor allem retrovirale Vektoren Verwendung, die von Gammaretroviren (Miller et al. 1989) und Lentiviren (Naldini et al. 1996b) abgeleitet sind. Unter den gammaretroviralen Vektoren sind wiederum diejenigen verbreitet, die aus Friend- und Moloney-Mausleukämieviren konstruiert wurden.

Retroviren eignen sich für die Gentherapie, weil sie effizient transduzieren und integrieren können. Die Integration der genetischen Information ins Genom der Wirtszelle sichert deren Weitergabe an Tochterzellen. Bis zu 8 Kilobasen exogener DNA können in retrovirale Vektoren inseriert und an Stelle der viralen Gene exprimiert werden. Der Zusammenbruch der Kernmembran ist bei Oncoretroviren nötig, um dem Präintegrationskomplex den Zugriff auf das Chromatin zu ermöglichen (Roe et al. 1993). Daher ist die produktive Transduktion eines oncoretroviralen Vektors abhängig von der bis zu 6 Stunden nach Infektion stattfindenden Mitose der Zielzelle (Miller et al. 1990), also von sich aktiv replizierenden Zellen. Da jedoch nur ein Teil der Zellen zu gegebener Zeit eine Mitose durchläuft, limitiert dies die gentherapeutischen Applikationen entsprechender oncoretroviraler Vektoren auf eine selektive Zielzellpopulation *ex vivo*, wie z.B. Lymphozyten und hämatopoetische Vorläuferzellen (Halene et al. 2000).

Analog zum MuLV-basierten System wurden lentivirale Vektoren konstruiert (Abb. 13, Vigna et al. 2000). Im Gegensatz zu Oncoretroviren gelangen diese wahrscheinlich durch aktiven Transport des Präintegrationskomplexes mittels Kopplung an die nukleäre Importmaschinerie durch die Kernpore der Zielzelle (Fouchier et al. 1999, Sherman et al. 2002). Diese lentivirale Strategie zum nukleären Import ermöglicht die Infektion sich nicht teilender Zellen bzw. von Zielzellen mit geringer Proliferation (Park et al. 2000).

Limitierungen retroviraler Vektoren sind in einer möglicherweise fehlerhaften reversen Transkription, einer eventuellen Insertionsmutagenese bei der Integration und im Vektordesign zu sehen. So sollte die Expressionskassette des Transgens nur von limitierter Größe, ohne intronische Sequenzen und interne Polyadenylierungssignale sein. Weiterhin können lokale Differenzen in Struktur und Aktivität des Chromatins bei der zufälligen DNA-Integration eine Rolle spielen.

Historische Entwicklung retroviraler Vektoren

Die erste Generation retroviraler Vektoren wurde durch Insertion intakter Transgene in das deletierte, retrovirale Genom hergestellt. Diese defekten Viren waren jedoch auf replikationskompetente Helferviren angewiesen (Shimotohno et al. 1981). Die Entdeckung des Verpackungssignals ψ (Mann et al. 1983, Shank et al. 1980) führte zur Entwicklung retroviraler Vektoren, ohne auf Helferviren zurückgreifen zu müssen. In ersten Vektoren platzierte man das Reportergen noch unmittelbar nach dem Verpackungssignal, nicht wissend, dass andere Areale der Leaderregion und Extrasequenzen des gag-Gens Einfluss auf Titer und Expression haben können (Armentano et al. 1987). Die Verbesserungen in aktuellen retroviralen Vektoren zielen darauf, die Genexpression zu erhöhen und die Möglichkeit der Entstehung replikationskompetenter Viren zu minimieren.

4. Die Verwendung von Verpackungszelllinien

Das Gegenstück zum retroviralen Vektor ist die Verpackungszelllinie. Diese enthält die genetische Information für die gag-, pol- und env-Genprodukte durch stabil (seltener transient) transfizierte Helferplasmide, jedoch kein Verpackungssignal, so dass keine infektiösen Virionen gebildet werden. Erst durch Transfektion eines retroviralen Vektors entstehen – nur für eine Infektionsrunde – infektiöse virale Partikel, welche das Transgen in die Zielzelle einschleusen (Abb. 2).

Fortschritte in Verpackungszelllinien und retroviralen Vektoren verliefen in parallelen Entwicklungen. Verpackungszelllinien wurden für Vögel-, Mäuse- und Primaten-Retroviren hergestellt. Besonders Mäuseretroviren wurden häufig verwendet, da die Biologie dieser Viren weitgehend verstanden war, ihre Genome frühzeitig kloniert waren und von ihnen Zellen in Kultur effizient infiziert wurden.

In den natürlich vorkommenden murinen Retroviren existiert eine Vielzahl von env-Genen. Das env-Gen ist die hauptsächliche Determinante des viralen Tropismus. In Mäusen existieren mindestens 5 verschiedene Klassen von Hüllproteinen (env): ecotrop, amphotrop, xenotrop, polytrop und 10A1 (Ott et al. 1990). Am häufigsten benutzt werden die ecotropen, welche Mäuse- und die verwandten Rattenzellen infizieren, und die amphotropen Viren, die eine Vielzahl von Zelltypen inklusive humane Zellen infizieren können.

Die erste Generation einer ecotropen Verpackungszelllinie (ψ -2) wurde 1983 von Mann konstruiert. Im Laufe der Jahre wurden Modifikationen vorgenommen, um die Biosicherheit

von Verpackungszelllinien und Vektoren zu verbessern. Verzichtbare virale Gensequenzen (z.B. 3'LTR) wurden eliminiert und die für virale Hilfsproteine kodierenden Bereiche auf mehrere Plasmide verteilt. So steigt statistisch die Anzahl der notwendigen Rekombinationsereignisse, um ein vollständiges replikationskompetentes virales Genom zu rekonstituieren (Chong et al. 1998, Otto et al. 1994).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Verpackungszelllinien gibt die folgende Tabelle wieder:

Env	Verpackungszelllinie	Design	Literatur
Ecotrop	Bosc23	Hilfsproteine auf mehreren Plasmiden kodiert	Pear et al. 1993
Amphotrop	PA317	$\Delta\psi$ /Modifikationen	Miller et al. 1986
	Phoenix ampho	Hilfsproteine auf mehreren Plasmiden kodiert	Kinsella et al. 1986
Primat (GALV)	PG13	Hilfsproteine auf mehreren Plasmiden kodiert	Miller et al. 1991

Tab. 1: Übersicht über die verwendeten Verpackungszelllinien, ihre Konstruktion und die zugehörige Literaturangabe

Im Falle eines amphotropen (z.B. Phoenix) oder GALV-env (Gibbon Ape Leukemia Virus) docken diese viralen Partikel an sogenannte pit-2-Rezeptoren der Zielzelle (Kavanaugh et al. 1994). Durch Verwendung heterotoper env-Proteine entstehen Pseudotypviren (phänotypisch neue Virusgeneration). Ein häufig verwendetes heterologes Hüllprotein ist das Glykoprotein des vesikulären Stomatitisvirus (**VSV-G**), welches für einen sehr guten Titer und ein breites Wirtsspektrum (vom Insekt bis zum Menschen) sorgt (Burns et al. 1993, Yee et al. 1994).

Abb. 2 zeigt die Produktion von viralen Partikeln durch eine Verpackungszelllinie. Durch CaPO_4 -vermittelte Transfektion wird ein für den retroviralen Vektor kodierendes Plasmid in die Verpackungszelllinie eingebracht. Dieses Plasmid kann transient (für wenige Tage nach Transfektion) transkribiert werden. Das virale Transkript wird im 5'LTR initiiert und im 3'LTR (polyA) terminiert. Es enthält das Verpackungssignal ψ , welches von den Capsidproteinen (Nucleocapsid) erkannt wird und so eine effiziente Verpackung in virusähnliche Partikel ermöglicht. Die Verpackungszelllinie liefert die notwendigen viralen Strukturproteine (*Gag*, *Pol*, *Env*) durch stabil (oder seltener transient) transfizierte Helferplasmide, so dass vollständig infektiöse Partikel entstehen, die das verpackte Vektorgenom enthalten und von der Verpackungszelllinie ins Medium sezerniert werden.

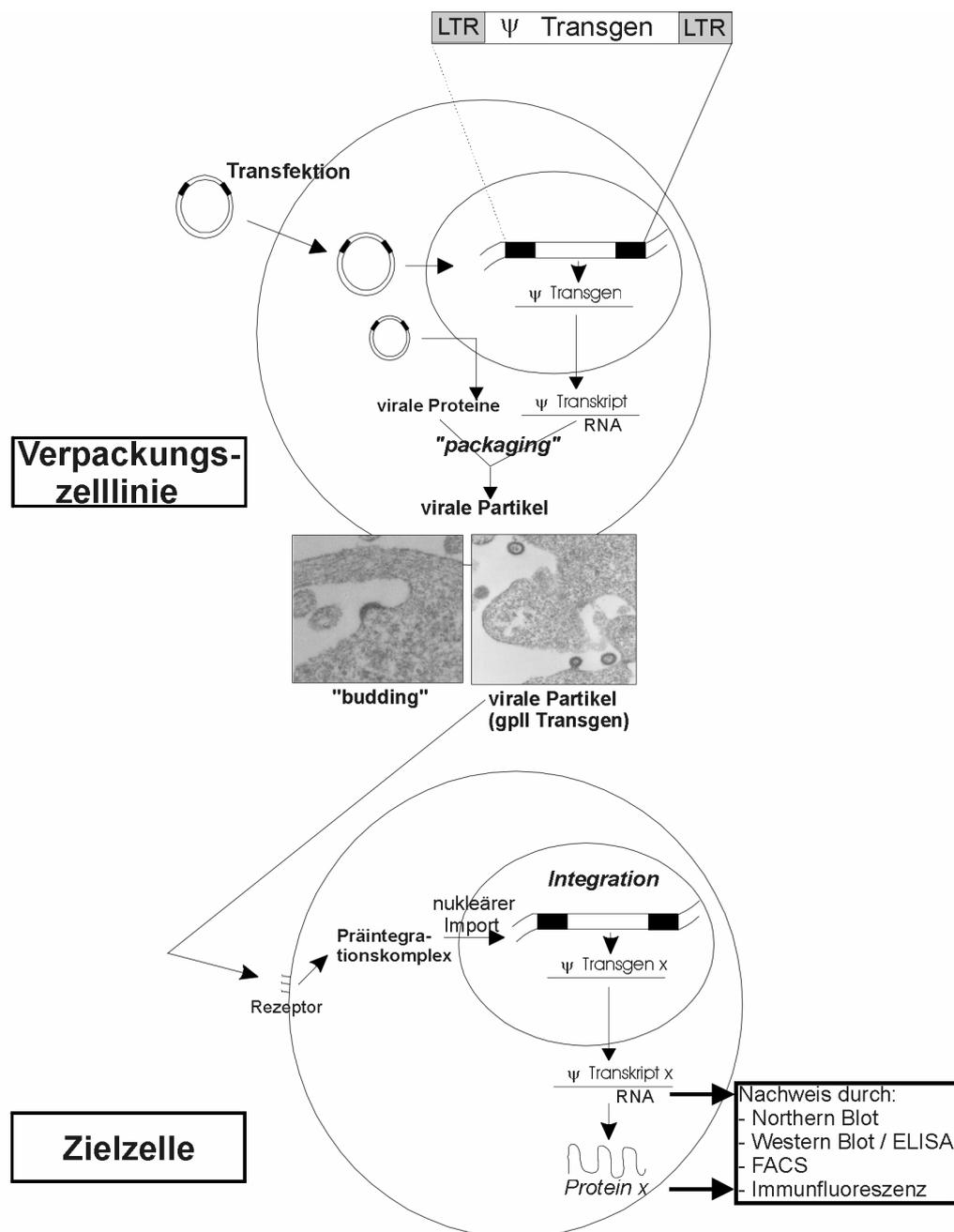


Abb. 2: Produktion von viralen Partikeln und Transduktion von Zielzellen

Die Produktion eines infektiösen retroviralen Partikels von einem Plasmid, das für den retroviralen Vektor kodiert, erfordert das Einführen des Plasmides in die Verpackungszelllinie durch Calciumphosphattransfektion oder Lipofektion. Die Verpackungszelllinie liefert die viralen Proteine, die für die Produktion der viralen Partikel notwendig sind. Das Verpackungssignal ψ wird durch die Capsidproteine erkannt und erlaubt die Verpackung der spezifischen retroviralen RNA (inkl. des exprimierten Transgens). Voll infektiöse Partikel werden dann an der Zellmembran freigesetzt ("budding", siehe Aufnahme links; vollständige Partikel des MP110gpII 4xCTE-Vektors in Aufnahme rechts). Der Zellkulturüberstand wird entfernt und dient als Virusquelle für zukünftige Experimente. Die Infektion einer Zielzelle findet durch replikationsinkompetente Partikel mittels Interaktion mit ihrem spezifischen Zielzellrezeptor statt. Das virale Genom wird dann revers transkribiert und ins Genom der Wirtszelle integriert. In der Zielzelle können aufgrund des Fehlens weiterer viraler Strukturproteine keine neuen viralen Partikel entstehen. Die Expression des Transgens kann im Northern Blot, Western Blot, ELISA, FACS und in der Immunfluoreszenz nachgewiesen werden.

Abb. 2 zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen von retroviralen Vektorpartikeln, die nach Transfektion des Vektors MP110gpII 4xCTE in Phoenix-Verpackungszellen (Korrelat zum Experiment in Abb. 10A, Spur 5) gewonnen wurden (elektronenmikroskopische Aufnahmen von G. Rutter, Abtl. für Elektronenmikroskopie, HPI). Die Partikel des Zellüberstandes wurden geerntet und für Transduktionsexperimente verwendet. Unter Zugabe oberflächenaktiver Stoffe erfolgte die Infektion von Zelllinien unterschiedlicher Spezies.

5. Die zelluläre Genexpression

Ein durch retroviralen Gentransfer in die Zelle eingebrachtes therapeutisches Gen unterliegt den Gesetzmäßigkeiten der zellulären Genexpression. Ebenso ist die Transduktionseffizienz retroviraler Vektoren von der Genexpression in Verpackungs- und Zielzelle abhängig.

Die zelluläre Genexpression ist ein hochgeordneter, schrittweise ablaufender Prozess (Abb. 3). Der Fluss der genetischen Information in normalen Zellen erfolgt gemäß dem zentralen Dogma der Molekularbiologie von der DNA über die RNA zum Protein. Die RNA-Synthese nach einer DNA-Matrize wird Transkription, die Proteinsynthese nach einer RNA-Matrize Translation genannt.

Während und nach der Transkription erfolgen umfangreiche Modifikationen des Primärtranskriptes (hnRNA=prä-mRNA). Schon während der Transkription wird das 5'Ende der RNA modifiziert (Capping), nachfolgend das 3'Ende durch Spaltung und Polyadenylierung (Hirose et al. 2000), um die RNA vor dem Angriff von Exonukleasen zu schützen (Furuichi et al. 1977) und die Translationseffizienz zu stimulieren (Shatkin 1976). Da die meisten Gene höherer Organismen (Eukaryonten) diskontinuierlich angeordnet sind, müssen die intervenierenden Sequenzen (Introns) in einer sog. Spleißreaktion entfernt werden. Hierbei werden die kodierenden Segmente des Gens (Exons) kovalent miteinander verbunden. Das Verbinden der Exonbereiche erfolgt in makromolekularen Ribonukleoproteinkomplexen, den Spleißosomen. Diese großen Komplexe bestehen aus fünf snRNAs (U1, 2, 4-6) und ca. 50 verschiedenen Proteinen. Das Spleißosom erkennt spezifische Signale am 5' (Spleißdonor) und 3'Ende (Spleißakzeptor) sowie innerhalb des Introns (,branch site'). Das Intron wird in einem irreversiblen Netzwerk von Interaktionen mit der prä-mRNA durch zwei Umesterungsreaktionen entfernt (Übersicht in Kramer 1996).

Ein wichtiges Kennzeichen der zellulären Genexpression ist die nukleäre Retention des Transkriptes während des gesamten Prozesses der Modifikation (Izaurrealde et al. 1995/98, Stutz et al. 1998). Nur die komplett prozessierte, reife RNA wird ins Zytoplasma transportiert, wo die Translation stattfindet (Jackson et al. 2000).

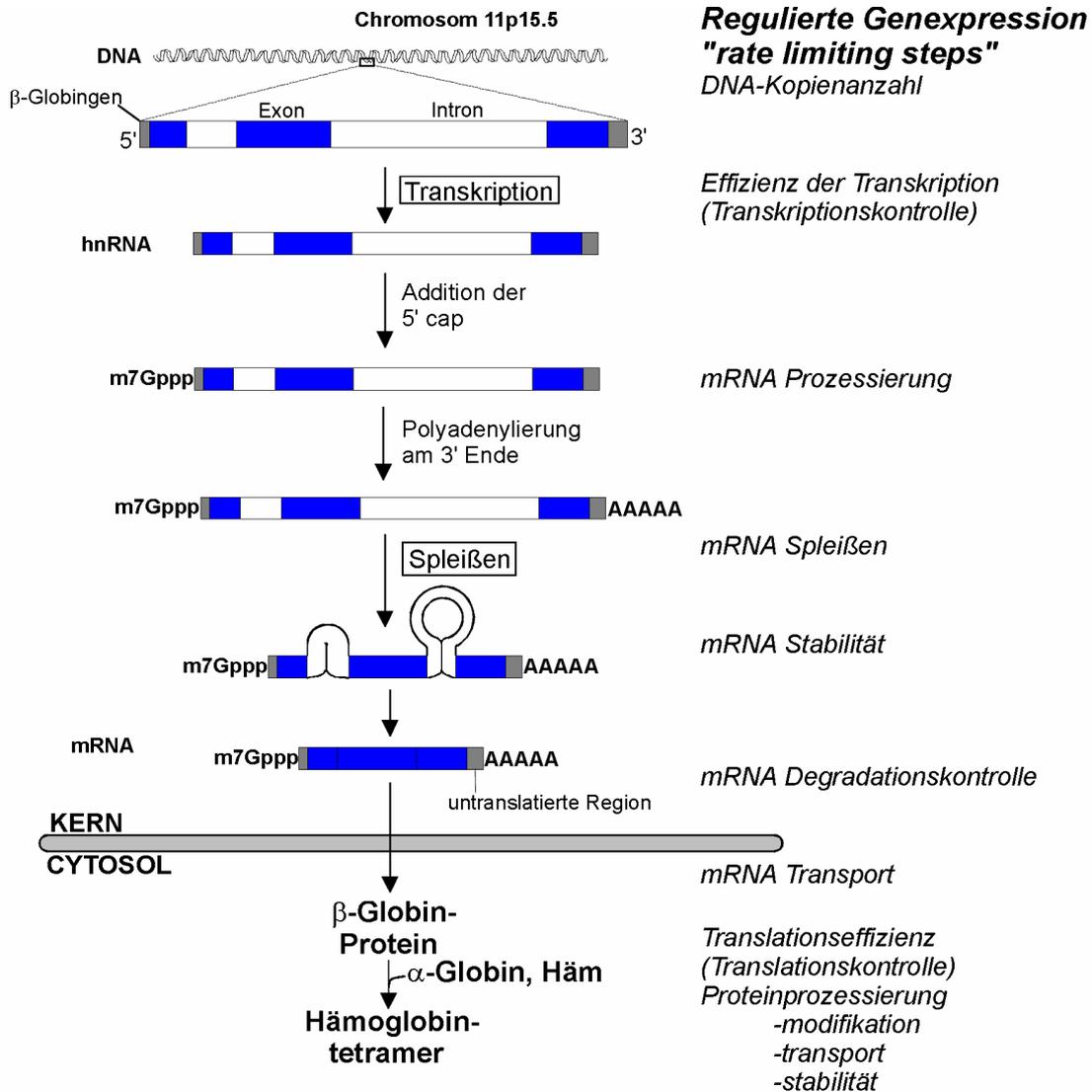


Abb. 3: Schema und Regulation der Genexpression am Beispiel von β -Globin

Die genetische Information auf Chromosom 11p15.5 wird mittels des RNA-Polymerase II Holoenzym in eine hnRNA (oder prä-mRNA) transkribiert. Sequentiell erfolgen 5' Capping (Anhängen einer Methylguanosingruppe), Spaltung und Polyadenylierung am 3' Ende und das Herausspleißen der intronischen Sequenzen. Die mRNA muß ins Zytoplasma transportiert werden und dabei die nukleäre Kernpore überwinden. Die Translation der mRNA erfolgt im Zytoplasma an den Ribosomen. Nachfolgend findet das Assembly von β -Globin mit α -Globin und Häm zum Hämoglobintetramer statt. Rechts sind mögliche limitierende Schritte ("rate limiting steps") der Genexpression angegeben (Details im Text).

Auf dem Weg ins Zytoplasma muß die modifizierte mRNA die Kernmembran überwinden, die das nukleäre und zytoplasmatische Kompartiment trennt. Diese ist eine Doppelmembran, deren äußerer Anteil kontinuierlich mit dem endoplasmatischen Retikulum verbunden ist. Die nukleäre Hülle wird durch Kernporenkomplexe (NPC) penetriert. Die NPCs höherer Eukaryonten sind aus 50-100 verschiedenen Proteinen aufgebaut, die als Nukleoporine

bezeichnet werden. NPCs formen wässrige Kanäle, durch die der gesamte nukleozytoplasmatische Transport abläuft. Sie erlauben die passive Diffusion von kleinen Molekülen (z.B. Metaboliten, Diffusionsausschlusslimit ca. 50 kDa). Über NPCs können aber auch sehr große Partikel, wie z.B. ribosomale Untereinheiten, mRNAs und der retrovirale Präintegrationskomplex transportiert werden.

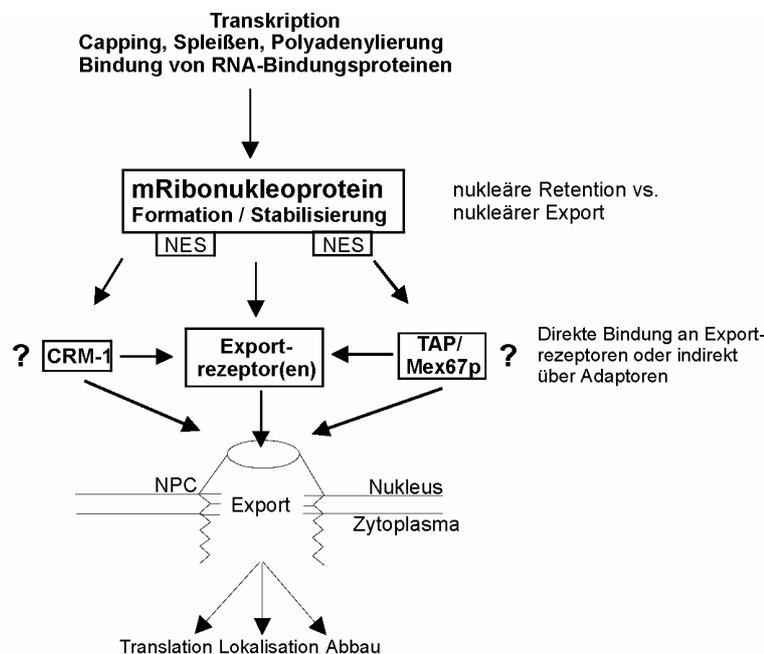


Abb. 4: Signal-medierter Transport durch die nukleären Porenkomplexe

Nach der Transkription wird die prä-mRNA prozessiert und nach Assoziation mit mRNA-bindenden Proteinen in ein mRNP (matures RNP) überführt. Dabei bestimmt die Art des mRNP durch vorhandene nukleäre Export- oder Retentionssignale, ob der Komplex exportiert oder nukleär retiniert wird. Durch nukleäre Exportsignale (NES) oder andere Signalsequenzen (z.B. Haarnadelschleifen des CTE) erfolgt die Bindung direkt an nukleäre Exportrezeptoren (z.B. CRM-1 oder Mex67p/TAP) oder indirekt über Adaptoren (z.B. Aly/REF), die eine Interaktion von mRNP und nukleärem Porenkomplex (NPC) bzw. von mRNP und nukleärem Exportrezeptor vermitteln.

Nukleärer Import und Export von Transportsubstraten (wie mRNA) erfolgen in der Regel durch Bindung zellulärer Transportrezeptoren an Peptidsignale (z.B. Kernlokalisierungssignale NLS, Kernexportsignale NES) auf dem zu transportierenden Substrat (Übersicht in Görlich et al. 1999, Stutz et al. 1998). Dabei können Adaptoren (RNA-bindende Proteine), welche das Transportsubstrat spezifisch binden, vermittelnd wirken.

Die nukleäre mRNA stellt hierbei ein Transportsubstrat dar, welches nicht als nackte RNA, sondern als Ribonukleoprotein-Komplex (RNP) exportiert wird (Abb. 4). Das ‚Assembling‘ in RNPs involviert die Rekrutierung einer großen Anzahl von (prä-)mRNA-bindenden Proteinen an die RNA, die schon während der Transkription beginnt und durch das 5' Capping, Spleißen, die 3' Polyadenylierung und Spaltung initiiert wird. Diese reifen, export-kompetenten mRNP-Komplexe enthalten spezifische Kernexportsignale, die in Interaktion

mit Exportrezeptoren oder bestimmten Adaptoren den nukleären Export durch die Kernpore einleiten.

Im Zytoplasma erfolgt die Translation der mRNA an den Ribosomen. Nach der Biosynthese erhalten die Proteine ihre native Konformation, teilweise unter Mitwirkung von Chaperonen („molekulare Anstandsdamen“ zur Unterstützung der Proteinfaltung). Weitere posttranslationale Modifikationen können proteolytische Modifikationen, Anheftung von Kohlenhydrat- oder Lipidseitenketten und die Translokation in entsprechende zelluläre Kompartimente beinhalten.

a. Regulation der zellulären Genexpression

Für die Expression eines zell- oder gewebetypischen Phänotyps sowie für die Anpassung sämtlicher Leistungen von Zellen an veränderliche Umweltbedingungen ist es unerlässlich, die Expression spezifischer Gene zu regulieren. Demzufolge besitzt eine eukaryotische Zelle eine Vielzahl von Mechanismen, die Menge des zu produzierenden Proteins auf ein gewünschtes Niveau einzustellen. Abb. 3 zeigt mögliche Regulationsmechanismen der Genexpression auf. Hier kommen folgende Schaltstellen in Frage:

1. Nukleäre:	Aktivierung der Genstruktur, DNA-Kopienanzahl, Transkriptionseffizienz, mRNA-Prozessierung, mRNA-Stabilität (Halbwertszeit), mRNA-Degradation.
2. Nukleozytoplasmatische:	Regulierter mRNA-Transport über die Kernpore.
3. Zytoplasmatische:	Translationseffizienz, Proteinprozessierung inkl. deren Modifikation, Transport und Stabilität (Halbwertszeit).

Die Regulationsphänomene werden – historisch bedingt – danach eingeteilt, ob sie zum Zeitpunkt der Transkription (transkriptionell) oder nach der Transkription (posttranskriptionell) stattfinden. Obwohl viele Prozessierungsschritte schon während der Transkription stattfinden, wird diese Einteilung zum besseren Verständnis im folgenden verwendet.

Frühester Zeitpunkt für die Regulation auf transkriptioneller Ebene ist die Inaktivierung von Genen durch Methylierung an CG-Paaren (z.B. bei vielen differenzierungsabhängigen Genen). Nachfolgend kann die Initiation der Transkription durch Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren gesteuert werden (z.B. bei Steroidhormonrezeptoren). Zusätzlich kann die Transkription durch eine Hemmung des Importes von Transkriptionsfaktoren in den Kern

bzw. durch die Hemmung der Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA (z.B. durch Histone) gesteuert werden.

Posttranskriptionell binden RNA-bindende Proteine an die mRNA zur Bildung von mRibonukleoprotein-Komplexen und vermitteln so deren Export (Abb. 4) (Izaurrealde et al. 1998, Stutz et al. 1998 u. Referenzen darin). Diese mRibonukleoproteine interagieren entweder direkt oder über mögliche zwischengeschaltete Adaptoren mit der Exportmaschinerie der Zielzelle bzw. bestimmten Nukleoporinen des NPC. Als Beispiel für die Komplexität des nukleären Exports sei hier die Kopplung des Spleißprozesses einer mRNA mit deren Export erwähnt (Luo et al. 1999, Matsumoto et al. 1998). Der Spleißprozess hinterläßt eine Proteinmarkierung, welche u.a. Aly/REF enthält. Aly/REF ermöglicht die Rekrutierung von TAP zu diesen Transkripten und verbessert so den mRNA-Export dieser Transkripte (s. D.3.). Dabei vermittelt TAP die Translokation des mRNP durch die Kernpore durch sequentielle Interaktion mit bestimmten Nukleoporinen (Zenklusen et al. 2001). Dementsprechend können einzelne Introns die Genexpression um das bis zu 500fache via posttranskriptionelle Mechanismen stimulieren (Buchman et al. 1988).

Die Zusammensetzung des mRNP-Komplexes ist dabei nicht fixiert, sondern verändert sich abhängig von der nukleären Historie der mRNA und ihrer Prozessierung (Übersicht in Zenklusen et al. 2001). Es ist hierbei von Bedeutung, ob RNA-bindende Proteine, die RNA retinieren oder Exportsubstrate darstellen, vorhanden sind (Nakielny et al. 1997). Die RNA-Sequenz und das individuelle Prozessierungsmuster determinieren, welche RNA-Bindungsproteine binden und welcher Exportpfad somit eingeschlagen wird. Interessanterweise begleitet ein Teil dieser Ribonukleoproteine die prä-mRNA durch die nukleäre Kernpore ins Zytoplasma (Pinol-Roma et al. 1992). Dort können Ribonukleoproteine mit der mRNA während der Translation an den Polysomen assoziiert bleiben (Visa et al. 1996) und folglich auch die Translationsaktivität (Matsumoto et al. 1998) beeinflussen.

Zu den Mechanismen der posttranskriptionellen Regulation zählen auch Veränderungen auf translationaler Ebene (siehe z.B. Translationskontrolle bei Globin durch eIF2). Zur Übersicht sei hier auf einen Übersichtsartikel von Day et Tuite (1998) verwiesen.

6. Virale RNA-Elemente nutzen Komponenten der posttranskriptionellen Genexpression

Für eine erfolgreiche retrovirale Replikation ist es wichtig, eine hohe Expression der viralen Proteine zu gewährleisten. Dabei unterliegt die virale Genexpression der zellulären Genexpressionsmaschinerie und ihren Regulationsmechanismen. Aus diesem Grund haben eine Reihe von Viren Mechanismen entwickelt, sich die zelluläre Genexpression zu ihrem Vorteil zu erschließen (Boris-Lawrie et al. 2001).

Die meisten zellulären intronhaltigen mRNAs besitzen keine spezifischen Exportsequenzelemente. Die Präsenz von intronischen Sequenzen hält ungespleißte prä-mRNAs im Nukleus aufgrund einer Assoziation mit Komponenten des Spleißosoms zurück (Chang et al. 1989, Hamm et al. 1990, Legrain et al. 1989). Diese selektive Retention soll die Akkumulation potentiell schädlicher ungespleißter prä-mRNAs im Zytoplasma verhindern. Eine Ausnahme bilden RNA-Viren, die eine Strategie entwickelt haben, diesen Exportblock zu überwinden. Bei Retroviren werden intronhaltige RNAs im retroviralen Lebenszyklus exportiert. Bei komplexen Retroviren, wie z.B. HIV-1, bindet das virale Protein Rev an ein spezifisches Sequenzelement (RRE, rev responsive element) und vermittelt den Export intronhaltiger RNAs via CRM-1, einem zellulären Exportrezeptor (Pollard et al. 1998). Vergleichbare Systeme wurden bei anderen komplexen Retroviren gefunden (zusammengefasst in Coffin et al. 2000). Diese Elemente eignen sich jedoch nicht zum einfachen Einbau in retrovirale Vektoren, da sie ein in *trans* vorhandenes virales Protein (Rev oder Analog) erfordern.

Neben den *trans*-Systemen vom Typ Rev/RRE haben Viren und vereinzelt zelluläre Gene aber auch Strategien für die Optimierung ihrer Genexpression entwickelt, die allein auf *cis*-agierenden Sequenzen und deren Zusammenspiel mit zellulären Faktoren basieren (Huang et al. 1995/97, Liu et al. 1995, Schambach et al. 2000).

In einfachen Retroviren wie dem Typ D ‚Simian Virus‘ und dem ‚Mason-Pfizer Monkey Virus‘ bindet der zelluläre RNA-Exportrezeptor TAP an ein spezifisches *cis*-agierendes RNA-Element (CTE). Ein onkogenes Hühner-Retrovirus, das ‚Rous Sarcoma Virus‘ (RSV), besitzt ebenfalls derartige *cis*-aktive Sequenzen (Ogert et al. 1996). Neben dem Effekt des gesteigerten RNA-Exports wurden auch RNA-Stabilität und Spleißregulation als Auswirkung *cis*-aktiver Elemente berichtet. Aufgrund ihrer kleinen Größe und ihrer biologischen Funktion bilden diese Art von Elementen eine bessere Grundlage für den Einsatz in retroviralen Vektoren.

a. Das konstitutive Transportelement (CTE)

Die D-Typ Retroviren ‚Mason-Pfizer Monkey Virus‘ (MPMV) und ‚Simian Retrovirus‘ 1 und 2 (SRV-1/2) beinhalten ein *cis*-agierendes RNA-Exportelement (~173 bp) in der 3‘ Region ihrer Genome. Dieses zwischen der *env*-Region und dem 3‘LTR lokalisierte Element wurde als konstitutives Transportelement (CTE, Bray et al. 1994, Zolotukhin et al. 1994) bezeichnet. Die Präsenz des CTE inmitten des ungespleißten genomischen Transkripts von MPMV ist für die zytoplasmatische Akkumulation und Expression dieser RNA unerlässlich (Ernst et al. 1997b). Die Sekundärstruktur der CTE-RNA bildet eine inkomplette, invertierte, repetitive Sequenz, in welcher zwei innere und eine terminale Haarnadelschleife entstehen. Das Tip-assoziierte Protein TAP bindet an diese Haarnadelschleifen (Ernst et al. 1997a/b, Pasquinelli et al. 1997, Taberero et al. 1996). Das CTE interagiert dabei direkt mit TAP, welches im Gegenzug das CTE-haltige Transkript zum nukleären Porenkomplex (NPC) befördert und den Export einleitet (Bear et al. 1999, Braun et al. 1999, Gruter et al. 1998). Es wurde gezeigt, dass das CTE den nukleären Export von intronhaltigen RNAs vermitteln kann, die normalerweise vom Rev/RRE-System abhängig sind (Gasmi et al. 1999, Rizvi et al. 1996, Tang et al. 1997). Obwohl das CTE das Rev/RRE-System funktionell ersetzen kann, benutzen beide unterschiedliche nukleozytoplasmatische Transportpfade. Während der Rev-vermittelte Export mit dem Export von 5S-rRNA und U-reicher snRNA konkurriert, nutzt das CTE via TAP als mRNA-Exportrezeptor die gemeinsame Endstrecke des mRNA-Exportpfades und konkurriert mit dem mRNA-Export (Pasquinelli et al. 1997, Saavedra et al. 1997). Eine Übersicht zum Thema findet sich in Wodrich et al. (2000/01b).

b. Elemente aus der 3‘ *pol*-Region verschiedener Viren

Das IAP-Expressionselement (360 bp) ist ein *cis*-agierendes, orientierungsabhängiges RNA-Element in der kodierenden Region (3‘ Teil des *pol*-Leserahmens) des murinen intracisternalen A-Typ-Partikels (IAP) MIA14. Dieses Element ist für die Expression der IAP-Strukturproteine wichtig. Zusätzlich kann es das Rev/RRE-System von HIV-1 bei der Expression der HIV-1 Gag-Proteine in transienten Expressionskonstrukten substituieren (Wodrich et al. 2001a) und funktioniert dabei CRM-1 unabhängig. Die Sequenz der einzelsträngigen Bereiche des IAP-Elements weist Homologien zum MPMV-CTE auf, so dass gemeinsame Bindungsfaktoren und ein Einfluss auf den nukleozytoplasmatischen Export postuliert werden. Darüber hinaus wird eine RNA-Stabilität steigernde Wirkung diskutiert (Wodrich et al. 2001a).

In der korrespondierenden Region von MPMV (MPMVpol. Element, 1,6 kb groß) und von HSRV-1 (Human Spuma Retrovirus, Foamy) wurden analog stabile RNA-Elemente gefunden, welche die HIV-1 Gag-Expression zu steigern vermochten. Eine Übersicht über diese Elemente bietet Wodrich et al. (1998 u. 2001a).

c. Das WPRE des Woodchuck Hepatitis Virus

Das **posttranskriptionell regulatorische Element (PRE)** des **Woodchuck Hepatitis Virus (WHV)**, ein naher Verwandter des Hepatitis B Virus) ist auf allen vier Transkripten des WHV vorhanden und für deren effiziente Expression verantwortlich. Ursprünglich wurde zunächst das PRE von HBV (Hepatitis B Virus) gefunden, welches wichtig für die Expression des Oberflächenproteins HBs ist (Huang et al. 1994). In weiteren Experimenten konnte das **HPRE** (PRE von **HBV**) das Rev/RRE-System von HIV-1 in transienten Transfektionsreporterassays ersetzen (Donello et al. 1996, Huang et al. 1994) und die Expression der β -Globin cDNA nach transienter Transfektion steigern (Huang et al. 1995). Zufferey et al. (1999) zeigten, dass ein **WPRE** in retroviralen und lentiviralen Vektoren effizient die Expression des grün fluoreszierenden Proteins (EGFP) und von Luciferase steigern kann. Wenig später wurde der Nachweis der Expressionssteigerung durch das WPRE auch in AAV-Vektoren (Adeno-assoziiertes Virus) geführt (Loeb et al. 1999). Das WPRE scheint unabhängig von Transkription und Spleißing zu wirken, verbessert jedoch die Genexpression durch eine mögliche Modifikation von Polyadenylierung, RNA-Stabilität und/oder Translation (Donello et al. 1998, Huang et al. 1999 und unpublizierte Daten, zitiert in Loeb et al. 1999). Das WPRE stellt damit ein Paradebeispiel für die Optimierung der Genexpression von Transgenen dar.

7. Ziel und Aufgabenstellung der Arbeit

Die Genexpression eukaryotischer Zellen wird zu einem hohen Grade durch transkriptionelle und posttranskriptionelle Mechanismen reguliert. Die Steigerung der Expression kann dabei auf verschiedenen Ebenen bewirkt werden. Retrovirale Vektoren sind erheblich weiterentwickelt worden, jedoch sind die meisten Entwicklungen im Bereich der Transkriptionskontrolle erfolgt (z.B. durch Promotorwahl). Bisher weitgehend unerforscht ist die Verwendung posttranskriptioneller Regulatorelemente beim Einsatz retroviraler Vektoren. Dabei haben gerade die Retroviren und – als nahe Verwandte – die Pararetroviren innerhalb ihres Genoms RNA-Elemente (CTE, WPRE u.a.) entwickelt, welche einen definierten Einfluss auf die nukleäre und zytoplasmatische Prozessierung einer gegebenen RNA nehmen, sie in bestimmte RNA-Exportpfade einmünden lassen und so für eine regulierte, hohe Genexpression sorgen. Darüber hinaus kann auch der zelluläre Spleißprozess *per se* die RNA in einen definierten Exportpfad einmünden lassen. Demzufolge liegt die Schlussfolgerung nahe, diese wenig beachteten und durch Viren optimierten Tricks der Natur auszunutzen und in therapeutische Vektoren umzusetzen.

Daher werden in der vorliegenden Arbeit verschiedene dieser posttranskriptionell aktiven Elemente in retroviralen Gentherapievektoren mit einem modularen Aufbau eingesetzt. Dabei wird ein definierter Spleißkontext gewählt, der mit und ohne Spleißelemente Aussagen ermöglichen soll, ob und in welchem Umfang die Existenz von Spleiß- und RNA-Elementen die Genexpression retroviraler Vektoren steigern kann oder ob diese beiden posttranskriptionellen Regulationsmechanismen eventuell auch synergistisch wirken. Neben den posttranskriptionell aktiven Regulationselementen soll auch der Einfluss des Transgens selbst untersucht werden. Für einige Genkontexte ist schon der expressionsfördernde Effekt einiger weniger posttranskriptionell aktiver Elemente in episomalen Expressionskonstrukten beschrieben worden. Dabei handelt es sich um Gene (z.B. HIV-1 gag/prot, β -Globin), die in Abwesenheit von posttranskriptionell aktiven Elementen nur gering exprimiert werden. Dementsprechend sollten retrovirale Vektoren vom Einbau geeigneter Elemente (z.B. CTE, WPRE) profitieren. Andere klinisch relevante Transgene (z.B. MDR1) und anerkannte Gentherapie-Marker (z.B. EGFP) werden schon in Abwesenheit von posttranskriptionell aktiven Elementen hinreichend exprimiert. Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, ob geeignete Elemente in diesen Fällen einen zumindest relativen Expressionsvorteil schaffen können.

B. MATERIAL UND METHODEN

1. Allgemeine Materialien

Die meisten der verwendeten Chemikalien hatten den Reinheitsgrad „zur Analyse“ und wurden hauptsächlich von folgenden Lieferanten beschafft: Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg), Pharmacia (Freiburg i. B.), Roth (Karlsruhe), Riedel de-Haan (Seelze) und Roche (Mannheim). Radiochemikalien wurden von der Firma Amersham-Buchler (Braunschweig) bezogen. Plastikwaren kamen von den Firmen Greiner (Nürtingen), Becton-Dickinson (Heidelberg), Renner (Darmstadt) und Eppendorf (Hamburg). Photo- und Filmmaterialien (Röntgenfilme, Filme für die Mikrophotographie, Photopapier, etc.) wurden über den lokalen Fachhandel gekauft.

Die verwendeten Lichtmikroskope stammten von Leitz, Zeiss, Olympus und Hundt. Laborgeräte, wie Zentrifugen, Inkubatoren für Bakterien und Säugetierzellen, Schüttel- und Rührgeräte, Netzgeräte, Elektrophoresekammern, Pipetten und Pipettierhilfen etc. stammten von verschiedenen Firmen.

2. Arbeiten mit rekombinanter DNA

Alle Arbeiten mit DNA wurden nach den allgemein üblichen Verfahren (Ausubel et al. 1995, Sambrook et al. 1989) in einem entsprechend zugelassenen Labor der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt. Zur besseren Standardisierung einzelner Arbeiten wurden kommerziell erhältliche Fertigungskits verwendet.

a. Reagenzien

Wichtige Chemikalien, Lösungen und Puffer

Substanz / Lösung	Anmerkungen	Aufbewahrung
10fach TBE-Puffer	Tris-Base 0.89 M, Borsäure 0.89 M, EDTA 0.02 M	RT
5fach DNA-Ladepuffer für Agarosegele	50 % Glycerin, 20 mM Tris-HCl (pH=8.0), 20 mM EDTA, 0.01 % Bromphenolblau	4°C
50fach TAE-Puffer	Tris-Base 2 M, Essigsäure 0.25 M, EDTA 0.05 M	RT
Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung	Wassergesättigte Mischung im Volumenverhältnis 24:1	RT, lichtgeschützt
EDTA 0.5 M, pH=8.0		RT
Ethanol 100 % (nicht vergällt)		-20°C, RT
Ethanol 70 %		
Isopropanol (2-Propanol)		RT
Lösung I	50 mM Tris-HCl (pH=8.0), 5 mM EDTA	RT
Lösung II	1 % SDS, 0.2 M NaOH	RT
Lösung III	Kaliumacetat 3 M (pH=5.0)	RT
Natriumchlorid 5 M		RT
Natriumacetat 3 M, pH=5.2		RT
Phenollösung	TE-gesättigte Lösung mit 0,2 % 8-Hydroxychinolin, äquilibriert mit Tris-Puffer auf pH=8.0	4°C, lichtgeschützt
Phenol-/Chloroform-/Isoamylalkohol-Lösung	TE-gesättigte Mischung im Volumen-Verhältnis 25:24:1	4°C, lichtgeschützt

SDS 10 %		RT
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH=8.0) und 0.5 mM EDTA (pH=8.0)	RT
TE/RNase	TE mit 50 µg/ml RNase A	4°C
Tris-HCl Puffer, 1 M, pH=8.0		RT

Kits

Bezeichnung	Bezugsquelle	Aufbewahrung
Jet-Sorb Gel Extraktion Kit	Genomed, Bad Oeynhausen	4°C, RT
QIAquick Gel Extraktion Kit	QIAGEN GmbH, Hilden	4°C, RT
AmpliTAq-dC-Rhodamin Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt	-20°C
Big Dye Sequenzier-Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt	-20°C
SUPERSCRIPT™II-Kit	Gibco BRL, Eggenstein	-20°C

Enzyme

Bezeichnung	Bezugsquelle / Anmerkung	Aufbewahrung
Restriktionsenzyme, T4-Ligase, T4-DNA-Polymerase, Klenow-Enzym, thermostabile DNA-Polymerasen, Alkalische Phosphatase	New England Biolabs/Schwalbach i. Taunus, Roche/Mannheim, Pharmacia/Freiburg i. B., Stratagene/Heidelberg, MBI-Fermentas/St. Leon-Rot, Sigma/Deisenhofen	-20°C
RNase A	Sigma, Deisenhofen 10 mg/ml Lösung in 25 mM Tris-HCl (pH 7.5) und 2 mM EDTA. Erhitzen zur Inaktivierung der DNase-Aktivität	-20°C

Kulturmedien und Reagenzien für die Arbeit mit Bakterien

Bezeichnung	Zusammensetzung / Anmerkung	Aufbewahrung
Ampicillin	100 mg/ml in Wasser. Sterilisierung durch Filtration.	-20°C
Einfriermedium für Bakterien	50 % Glycerin, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5). Autoklavieren.	4°C
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid)	1 M Lösung in Wasser. Sterilisierung durch Filtration.	-20°C
LB-Medium (<u>L</u> uria <u>B</u> ertani)	Trypton 10 g/l, Hefe-Extrakt 5 g/l und NaCl 5 g/l. Sterilisierung durch Autoklavieren.	4°C
LB-Platten	LB-Medium mit 1,5 % Agar wurde nach dem Abkühlen in sterile 10-cm-Petrischalen aus Plastik gegossen.	4°C
LB-Amp Platten	LB-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin, nach dem Abkühlen zugesetzt.	4°C
SOB-Medium	Trypton 20 g/l, Hefe-Extrakt 5 g/l, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM. Sterilisierung durch Autoklavieren. Zugabe von MgCl ₂ und MgSO ₄ auf je 10 mM.	4°C
TB-Puffer	Pipes 10 mM, MnCl ₂ 55 mM, CaCl ₂ 15 mM, KCl 250 mM, pH=6.7. Sterilfiltriert.	4°C
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid)	1 % in Dimethylformamid (DMF).	-20°C, lichtgeschützt

b. Methoden zur Behandlung von rekombinanter DNA

Schnellaufarbeitung von DNA („Mini-Preps“) nach dem Prinzip der alkalischen Lyse

Die Mini-Preps wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Für die Gewinnung kleiner Mengen von Plasmid-DNA wurden ca. 2 ml einer Übernachtskultur von Bakterien in 2 ml Eppendorf-Röhrchen für 5 min bei 6000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 0,2 ml Lösung I (+RNase A) resuspendiert und zusammen mit 0,2 ml Lösung II invertiert. Anschließend wurden 0,2 ml Lösung III hinzugegeben und abermals invertiert. Der Niederschlag wurde für 10 bis 15 min in einer Mikrozentrifuge bei voller Drehzahl pelletiert, der Überstand in ein neues 2 ml Röhrchen transferiert, die DNA mit 1 ml Ethanol (100 %) präzipitiert und anschließend für 15 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Die DNA wurde in 75 µl RNase-haltigem TE-Puffer aufgelöst und konnte dann direkt für Restriktionsverdau (analytisch 5-10 µl, präparativ 10-40 µl) oder zum Sequenzieren (16 µl) eingesetzt werden.

Großaufarbeitung von Plasmid-DNA

Zur Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA für die Transfektion von Säugetierzellen wurden 230 ml einer dichten Übernachtskultur von *E. coli* nach dem Prinzip der alkalischen Lyse aufgearbeitet. Anschließend wurde die DNA über Anionenaustauscher-Säulen der Firma QIAGEN (Hilden) aufgearbeitet. Abweichend vom Herstellerprotokoll wurde nach der Elution der DNA von der Säule 12 ml Isopropanol über die Säule in das Eluat gegeben, um das Restsäulenvolumen zusätzlich zu nutzen. Alternativ wurden auch Nucleobond AX-Säulen der Firma Macherey-Nagel (Düren) verwendet. Diese Vorgehensweise ergab 500-1200 µg Plasmid-DNA bei ‚high copy‘-Plasmiden.

Konzentrationsbestimmung von DNA

Nukleinsäuren haben eine maximale Extinktion (optische Dichte, OD) bei 260 nm. Bei einer Konzentration von 50 µg/ml hat doppelsträngige DNA eine OD_{260} von 1,0. Damit läßt sich die DNA-Konzentration berechnen. Proteine haben eine höhere Extinktion bei 280 nm und der Quotient von OD_{260}/OD_{280} gibt eine gewisse Auskunft über den Reinheitsgrad der DNA. Bei einer sauberen DNA-Präparation sollte der Quotient einen Wert zwischen 1,8 und 2,0 ergeben. 5 µl der zu bestimmenden DNA wurden in 495 µl TE-Puffer gelöst und die Extinktion in einem Beckmann DU640 Spektrophotometer bestimmt. Der Extinktionswert multipliziert mit dem Faktor 5 ergibt die Konzentration in µg/µl.

Alkoholpräzipitation von DNA

Zur Konzentrierung oder zum Pufferwechsel kann DNA mit Alkohol quantitativ präzipitiert und in einem neuen Puffer wieder aufgenommen werden.

- Ethanol-fällung: ein gegebenes Volumen einer DNA-Lösung wurde mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat und mit 2 Volumina 100 % Ethanol versetzt und mindestens 10 min auf Eis inkubiert. Der Niederschlag wurde durch Zentrifugation in einer Mikrozentrifuge für 10 bis 15 min bei voller Drehzahl pelletiert, mit 70 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in einem geeigneten Volumen Wasser oder TE aufgelöst.
- Isopropanol-fällung: ein gegebenes Volumen einer DNA-Lösung wurde je nach Salzgehalt mit 0,8 bis 1,2 Volumina Isopropanol vermischt, kurz bei Raumtemperatur inkubiert, abzentrifugiert und – wie für die Ethanolpräzipitation beschrieben – weiterbehandelt.

Phenolextraktion

Unerwünschte Proteine können aus Lösungen mit DNA sehr effizient durch Extraktion mit Phenol entfernt werden. Dazu wurde die DNA auf ein Volumen von 200 bis 500 µl verdünnt und mit dem gleichen Volumen einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung ausgeschüttelt. Dabei gehen die Proteine in die phenolische Phase, die durch anschließende Zentrifugation für 10 min in einer Mikrozentrifuge von der wässrigen Phase abgetrennt wurde. Nach Überführung der DNA in ein neues Röhrchen wurden Phenolreste durch zweifaches Ausschütteln mit einer Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung entfernt und die DNA mit Alkohol gefällt.

Schneiden von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen

Die Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen wurde in der Regel nach Angaben der Hersteller unter Verwendung der mitgelieferten Puffer durchgeführt. Ein analytischer Verdau wurde in der Regel mit 1-2 µg DNA (oder 6 µl Miniprep-DNA) in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Für präparative Zwecke wurden zwischen 2 und 20 µg DNA (oder 10-40 µl Miniprep DNA) in einem Volumen von 50 µl verdaut. Bei mehreren Schnittstellen einer Restriktionsendonuklease bestand die Möglichkeit eines partiellen Verdau. Hierzu wurden suboptimale Bedingungen genutzt, wie der Einsatz von nur 5 U Enzym, Reaktionstemperatur 35°C und -dauer 30 Sekunden, um relativ große DNA-Mengen (5 µg) nur partiell zu verdauen. Das gewünschte Fragment wurde nachfolgend in einem Agarosegel aufgetrennt und dessen DNA isoliert.

Mit Hilfe der Klenow-Reaktion konnten überhängende Enden durch Auffüllen der Schnittstelle mit Klenow-Polymerase in glatte Enden überführt werden. Dies erfolgte unter Einsatz von 1-2 µg DNA-Fragment in DNA-Klenow-Pol. I-Puffer unter Zugabe von 40 µM dNTPs und 5 U Klenow-Polymerase. Anschließend wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und nachfolgend das Enzym 10 min bei 75°C inaktiviert.

Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen

Eine nicht-denaturierende elektrophoretische Größenauftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte über 0,6-2,0 %ige Agarose-Horizontal-Gele mit 2 µg/ml Ethidiumbromid in TAE-Puffer bei einer Spannung von 6 bis 8 Volt pro cm. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben mit 1/5 Volumen 5x Ladepuffer vermischt. Als Größenmarker wurde in der Regel mit Hind3 verdaute Lambda-Phagen-DNA oder eine 1 kb-Leiter verwendet. Die DNA-Fragmente wurden durch Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids auf einem UV-Transilluminator (254 nm) sichtbar gemacht und das Ergebnis über eine Videokamera mit angeschlossenem Drucker (Intas, Göttingen) dokumentiert.

Isolierung von DNA-Fragmenten

Die Gel-Stückchen mit den benötigten DNA-Fragmenten wurden nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel unter langwelligem UV-Licht (366 nm) ausgeschnitten. Zur anschließenden Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das Jet-Sorb-Kit der Firma Genomed oder das Qiaquick-Gel-Extraction-Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers benutzt.

Prinzip: Die Agarose wird in Gegenwart hoher Konzentrationen von chaotropen Salzen bei 50°C leicht geschmolzen. Unter diesen Bedingungen bindet die DNA an eine Silikatmatrix und die Agarose kann gewaschen werden. Anschließend wird die DNA in einem Puffer mit niedrigem Salzgehalt von der Matrix eluiert.

Polymerase Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR wurde in einem 20-50 µl Ansatz unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 250 nM dNTPs, 25-50 ng Template-DNA, 1 pmol/µl Primer, 1 U Polymerase-Mix (Taq Polymerase und Pfu Polymerase 50:1), Puffer (20 mM Tris/HCl, pH=8, 25 mM KCl, 4 mM MgCl₂).

Zur Klonierung vorgesehene PCR-Produkte wurden nur mit Pfu-Polymerase (mit Exonucleaseaktivität) amplifiziert, um die Wahrscheinlichkeit PCR-bedingter Mutationen zu minimieren. Für die Klonierung und die gezielte Einführung von Basenveränderungen in DNA-Fragmente wurden die Primer entsprechend mit Restriktionsschnittstellen bzw. mit gezielten Nukleotidsubstitutionen versehen. Dabei wurde beachtet, dass der an Template-DNA hybridisierende Teil groß genug war (je nach GC-Gehalt > 18 nt.). Die Reaktion wurde je nach Primerkombination und Fragmentlänge in einem MJ-Research PTC200 Thermocycler mit Deckelheizung (Biozym, Oldenhausen) über 30-35 Zyklen durchgeführt. Für die Amplifikation von Fragmenten mit zu ändernden Restriktionsschnittstellen im Primerbereich wurde die Hybridisierungstemperatur zur Erhöhung der Spezifität ab dem 11. Zyklus deutlich heraufgesetzt. Anschließend wurde das jeweils amplifizierte Fragment über ein Agarosegel aufgereinigt, nach Schneiden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen in einen Vektor kloniert und durch Sequenzieren überprüft.

Die RT-PCR wurde zur Amplifikation einer β-Globin cDNA unter Verwendung des SUPERSCRIPT™II-Kits (Gibco BRL, Eggenstein) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt und ist ausführlich im Abschnitt B.7. erklärt.

Desoxyoligonukleotide

Die Desoxyoligonukleotide wurden zunächst aus der Arbeitsgruppe von Dr. Michael Schreiber am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin (Hamburg) bezogen, später von der Fa. Metabion (Martinsried). Eine vollständige Auflistung der verwendeten Primer befindet sich im Abschnitt B.8.

Abspaltung von 5'-Phosphaten durch alkalische Phosphatase

Die Abspaltung der 5'-Phosphorsäuremonoester ist notwendig, um bei Ligasereaktionen eine intramolekulare Verknüpfung des Vektors zu verhindern. Dies geschieht besonders häufig, wenn der Vektor nur mit einem Enzym geschnitten wurde. Die Vektor-DNA wurde in 200 µl Reaktionspuffer mit alkalischer Phosphatase (5 U/µg DNA) für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 5 min bei 50°C inkubiert, um verborgene 5'-Enden dem Enzym zugänglich zu machen. Danach wurde er mit frischem Enzym versetzt und für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde durch Phenolextraktion entfernt und die DNA durch Alkoholpräzipitation konzentriert.

Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren

Vor jeder Ligrationsreaktion wurden die isolierten DNA-Fragmente zur groben Quantifizierung nebeneinander im Agarosegel aufgetrennt. 5 bis 50 ng Vektor-DNA wurden mit einem drei- bis zehnfachen molaren Überschuss des DNA-Inserts in einem Gesamtansatz von 10 µl mit 3 U T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) versetzt und für mindestens 4 Std. bei 16°C inkubiert (alternativ 2 Std. bei Raumtemperatur). Als Kontrolle diente immer ein Ansatz mit dem Vektor allein. Zur Transformation von kompetenten Bakterien wurden in der Regel 3-5 µl des Ligrationsansatzes verwendet.

Sequenzierung

Zum Sequenzieren wurde doppelsträngige Plasmid-DNA verwendet. Die Sequenzierung wurde nach der Didesoxymethode (Sanger et al. 1977) durchgeführt. Hierbei werden Didesoxynukleotide eingesetzt, die bei der Sequenzierreaktion nach Einbau in die wachsende DNA-Kette zu einem Kettenabbruch führen. Da diese Didesoxynukleotide fluoreszenzmarkiert sind, können sie in einem Sequenator analysiert werden. 0,5-1 µg doppelsträngige Plasmid-DNA (100-200 ng PCR-Produkt) wurden unter Zusatz von 15 pM Primer, 4 µl Rhodamin- bzw. BigDye-Puffer und 4 µl Half Term-Puffer (GenPAK) in einem Gesamtvolumen von 20 µl in die Sequenzierreaktion mittels PCR eingesetzt. Nachfolgend wurde die DNA mit Ethanol unter Salzzusatz gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen und in einem Sequenator des Institutes für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie des Universitätskrankenhauses Eppendorf analysiert.

Bakterien

Für alle Klonierungsarbeiten wurde der *E. coli* Stamm XL-1 Blue von der Firma Stratagene (Heidelberg) verwendet. Dieser zeichnet sich durch eine besonders niedrige Rekombinationsfrequenz sowie eine hohe Transformierbarkeit aus und hat folgende Genotyp-Merkmale:

recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)].

Herstellung transformationskompetenter Bakterien

In einem 2 Liter Erlenmeyer-Kolben wurden 250 ml SOB-Medium mit 2 ml Übernachtskultur *E. coli* XL-1 blue inokuliert und für ungefähr 4 - 5 Std. bei 37°C kultiviert, bis eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht wurde. Danach wurden die Bakterien auf Eis gekühlt, abzentrifugiert und in 25 ml TB-Puffer resuspendiert. Die Bakterien wurden 10 min auf Eis inkubiert und Dimethylsulfoxid auf eine Endkonzentration von 7 % zugesetzt. Nach Aliquotieren in Portionen von 100-500 µl wurden die Bakterien in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert (Protokoll nach Inoue et al. 1990). Mit dieser Methode wurde eine Transformationskompetenz von bis zu 10⁹ Kolonien /µg Plasmid-DNA erzielt.

Transformation von Bakterien

Nach dem Auftauen transformationskompetenter *E. coli* auf Eis wurden 40 µl Bakteriensuspension mit 3 µl DNA (zumeist aus einem Ligationsansatz) vermischt und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien 60 Sekunden lang einem Hitzeschock von 42°C im Wasserbad ausgesetzt und für weitere 4 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 200 µl LB-Medium und die 30minütige Inkubation bei 37°C. Zur Selektion auf transformierte Bakterien wurde der gesamte Ansatz auf vorgetrockneten LB-Platten mit Ampicillin oder Kanamycin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Flüssigkulturen von Bakterien

Die Kultivierung von transformierten Bakterien erfolgte in Gegenwart eines Antibiotikums (Ampicillin oder Kanamycin). Für kleine DNA-Präparationen wurden Röhren mit 4 ml LB-Amp./LB-Kana. aus einer Glycerinkultur oder von einer Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Zur Großaufarbeitung von DNA wurden 230 ml LB-Amp./-Kana. in einem Erlenmeyerkolben inokuliert und über Nacht geschüttelt. Zum Einfrieren wurden 800 µl Bakterienkultur mit 500 µl 50 % Glycerol versetzt und bei -80°C tiefgefroren.

3. Arbeiten mit Säugetierzellen

a. Reagenzien für die Zellkultur

Pulvermedien, Trypsin, Glutamin und Antibiotika wurden von Life Technologies GmbH (Eggenstein) bezogen. Fetales Kälberserum stammte von PAA (Linz, Österreich), Dimethylsulfoxid (DMSO) von Serva (Heidelberg).

Zur Kultivierung der Zellen wurden folgende Medien und Zusätze verwendet

Zellkulturmedien	Anmerkungen
DMEM	Dulbecco's Modification of Eagle's Minimum Essential Medium
Ham's F10	Nutrient Mixture F-10 Ham
IMEM	Iscove's Modified Eagle's Medium
MEM	Minimum Essential Medium
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute Nr. 1640 Medium

Zusätze	Anmerkungen
10 % FKS	Fetales Kälberserum, wärmebehandelt 30 min bei 56°C
Antibiotika	100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
Glutamin	2 mM Glutamin

Verwendete Lösungen für die Zellkultur

Lösung	Zusammensetzungen und Anmerkungen	Aufbewahrung
2x BBS-Lösung	50 mM BES, 280 mM NaCl, 1.5 mM Na ₂ HPO ₄ (pH=6.95) (Ausubel et al. 1995, Abschnitt A1-6).	-20°C
2x HeBS-Lösung	0.283 M NaCl, 0.023 M HEPES, 1.5 mM Na ₂ HPO ₄ (pH=7.00).	-20°C
CaCl ₂ -Lösung	250 mM CaCl ₂ . Sterilisiert durch Filtration.	-20°C
Chloroquin-Stamm-lösung	25 mM Chloroquindiphosphat (ICN Biomedicals, Aurora, Ohio) in PBS.	4°C
Einfriermedium für Zellen	FKS 50%, DMSO 10% und DMEM- oder RPMI-Medium 40%.	-20°C
Häminstammlösung	1 mM bovines Hämin (Sigma) wurde in 10 mM NaOH-Lösung gelöst. Hämin ist das Chlorid des Hämatins (oxidiertes Häm mit dreiwertigem Eisen)	4°C
<i>In situ</i> Betagalaktosidase-Reagenz	0,1 % X-Gal in PBS mit 2 mM MgCl ₂ , 5 mM Kaliumferri-cyanid und 5 mM Kaliumferrocyanid.	RT
ONPG-Lösung	1 mg/ml ONPG (2-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid) in 0.1 M Natriumphosphat (pH=7.5), 10 mM KCl, 1 mM MgSO ₄ , 50 mM 2-Mercaptoethanol.	-20°C
PBS-Puffer	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O, 1.4 mM KH ₂ PO ₄ , pH=7.3. Sterilisiert durch Autoklavieren.	RT
Polybren-Lösung	8 mg/ml Polybren (Sigma, Deisenhofen) in PBS. Sterilfiltriert.	-20°C
Protaminsulfat-Lösung	4 mg/ml. Sterilfiltriert.	-20°C
Rh123-Lösung	Rhodamin 123 (Sigma), Konzentration 5 mg/ml.	4°C
Trypsin/EDTA-Lösung	Trypsin 0.5 g/l, EDTA 0.2 g/l in PBS.	-20°C

b. Zellen und deren Kultivierung

Verpackungszelllinien

Name	Beschreibung	Literatur
Bosc23	Ecotrope Verpackungszelllinie aus 293T-Zellen, leicht transfizierbar.	Pear et al. 1993
PA317	Amphotrope Verpackungszelllinie, abstammend von NIH3T3-Zellen. Relativ schwach transfizierbar mittels Calciumphosphatmethode.	Miller et al. 1986 ATCC CRL-9078
PG13	Amphotrope Verpackungszelllinie, abstammend von NIH3T3-Zellen. Relativ schwach transfizierbar, enthält GALV-Hüllprotein (Primaten-env). Dadurch weit größere Infektionswahrscheinlichkeit für humane und Affen-Zellen.	Miller et al. 1991 ATCC CRL-10686
Phoenix ampho	Amphotrope Verpackungszelllinie, die vom Nolan Labor an der Stanford University entwickelt wurde. Diese hat als 293T-Abkömmling den Vorteil, sehr gut transfizierbar zu sein und produziert einen sehr guten Titer. Zusätzliche Pseudotypisierung durch VSV-G eröffnet ein sehr breites Spektrum infizierbarer Zielzellen.	Kinsella et al. 1996

Zielzellen

Adhärenz wachsende Zelllinien

Name	Beschreibung	Literatur
293T	Humane, embryonale Nierenepithelzelllinie, mit Adenovirus E1a transformiert und ein temperatursensitives T-Antigen tragend. Hervorragend transfizierbar.	DuBridge et al. 1987 ATCC CRL-1573
Cf2Th	Hunde-Thymuszelllinie. Sehr gut infizierbar durch Retroviren.	ATCC CRL-1430.
Cos7	Affen-Nierenepithel-Zelllinie. Transformiert mit SV40 T-Antigen, zeichnet sich durch gute Transfizierbarkeit aus.	ATCC CRL-1651
HeLa Magic/ P4-CCR5	Cervix-Adenocarcinom-Zelllinien. HeLa P4-CCR5 exprimiert den CD4-Rezeptor sowie die CCR5- und CXCR4-Chemokinrezeptoren und das Gen für Betagalaktosidase unter der transkriptionellen Kontrolle des HIV-1 LTR. Diese Zelllinie ist mit HIV-1 infizierbar und exprimiert nachweisbare Mengen von Betagalaktosidase erst nach Stimulation der Transkription vom LTR durch das virale Tat-Protein, so dass infizierte Zellen durch <i>in situ</i> Färbung mit X-Gal nachgewiesen werden können (Kimpton et al. 1992).	Clavel et al. 1994
Huh7	Humane Hepatomzelllinie, gut transduzierbar.	Nakabayashi et al. 1984
NIH3T3	Zelllinie aus Mäusefibroblasten. Nützlich für DNA-Transfektion and Transduktionsstudien (Virustiter), leicht transduzierbar.	ATCC CRL-1658
Q8	Wachtelzelllinie (zur Verfügung gestellt von M. Döbelstein, Marburg)	Abrams et al. 1982
SC-1	Zelllinie aus Mäusefibroblasten, leicht transduzierbar durch MuLV.	Hartley et al. 1975
SW480	Humane Colonadenom-Zelllinie. Exprimiert das carcinoembryonale Antigen (CEA), Keratin und TGF- β . Relativ gut infizierbar durch Mäuseretroviren.	ATCC CCL-228

Suspensionszelllinien

Name	Beschreibung	Literatur
K-562	Humane CML (chronisch myeloische Leukämie) – Zelllinie aus dem Pleuraexsudat einer 53-jährigen Frau mit CML in terminaler Blastenkrise. Die Zellpopulation enthält Vorläufer der Hämatopoese und wurde zunächst als sehr undifferenziert und der granulozytären Linie angehörig eingestuft (Lozzio et al. 1979). Weiterführende Studien von Andersson et al. (1979) bezüglich Oberflächenmarkereigenschaften führten zu der Annahme, dass K-562 eine humane erythroleukämische Zelllinie darstellte. K-562-Blasten sind multipotente, hämatopoetische, maligne Zellen, die spontan in nachweisbare Vorläufer der erythrozytären, granulozytären und monozytären Reihe differenzieren können (Lozzio et al. 1981). Sie stellen deshalb ein gutes Modell zur Gentherapie hämatopoetischer Zellen dar. Agenzien, die sich zur Induktion der Differenzierung von K-562 eignen, sind Natriumbutyrat, DMSO und Erythropoetin (Hoffman et al. 1979). Der hier verwendete Klon ließ sich allerdings nicht durch DMSO in Richtung der erythroiden Reihe differenzieren (kein Anstieg der Benzidin-positiven, d.h. Hämoglobin-positiven Zellen).	Lozzio et al. 1975 ATCC CCL-243
F4/6 MEL	SFFV (Spleen Focus Forming Virus) - transformierte, murine erythro-leukämische Zellen (MEL), die durch Infektion von Mäusen mit Friend-Virus gewonnen wurden und weiterhin aktives Friend-Virus sezernieren. Mögliche Induktoren sind HMBA (Hexamethylenbisacetamid) und DMSO (Dimethylsulfoxid) (Campbell et al. 1990). Nach Austesten der optimalen Bedingungen besonders gut mit 1,2 % DMSO-Lösung zur Differenzierung und Hämoglobinproduktion induzierbar. Nach 4-8 Tagen sind bis zu 80 % der Zellen Benzidin-positiv, d.h. in hohem Maße Hämoglobinproduzierend. Zur Induktion wurden in 6-well-Schalen $5 \cdot 10^5$ Zellen mit 1,2 % DMSO-haltigem MEM versetzt und dieses Medium täglich erneuert. Nach 4 Tagen beginnende Hämoglobinproduktion (30 % Benzidin-positiv). Am 8. Tag nach Induktionsbeginn waren bis zu 80 % Benzidin-positive Zellen nachweisbar. Zur Benzidinfärbung wurden 100 µl einer Benzidin-Stammlösung (3 % Benzidin in 90 % Essigsäure) mit 100 µl einer 30 %igen H ₂ O ₂ -Lösung und 500 µl H ₂ O versetzt und wenige Tropfen dieser Gebrauchslösung auf etwa 300 µl Zellsuspension gegeben. Benzidin-positive Zellen erschienen deutlich dunkelblau.	Dube et al. 1975

Zellkultur

Wenn nicht anders erwähnt, wurden sämtliche Zellen in DMEM, versetzt mit 10 % FKS, 2 mM Glutamin und Antibiotika (100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) bei 37°C in einer Atmosphäre mit gesättigtem Wasserdampf und 5 % CO₂ kultiviert. Abweichend davon wurden SC-1 und F4/6 in MEM mit 10 % FKS, 2 bzw. 4 mM (für SC-1) Glutamin und Penicillin/Streptomycin kultiviert. K-562 wurden in RPMI 1640-Medium mit 4 mM Glutamin und Penicillin/Streptomycin gehalten. Q8 wurde in einem speziell hergestellten Medium aus Ham's F10 mit üblichen Glutamin- und Penicillin/Streptomycin-Konzentrationen, 5 % FKS, 2 % Hühnerserum und 0,5 % DMSO kultiviert. Zur Passagierung wurden die adhärennten Zellen nach Waschen mit PBS vom Boden des Gefäßes abtrypsiniert und je nach Bedarf auf neue Kulturgefäße verteilt sowie in frischem Medium verdünnt. Suspensionzellen wurden alle 2-3 Tage mit frischem Medium versetzt.

Um in nicht-erythroiden Zellen eine Globinexpression nachweisen zu können, wurden die jeweiligen 293T- und SW480-Zellen mit Hämin-haltigen Medien in Konzentrationen von 5-200 μM versetzt und 2-6 Tage im Brutschrank unter Standardbedingungen kultiviert. Bovines Hämin wurde von der Firma Sigma bezogen. Hämin ist das Chlorid des Hämatins, in welchem das Eisen im Gegensatz zum Häm (Fe^{2+}) in der +III -Oxidationsstufe vorliegt.

c. Transfektion und Aufarbeitung von Säugetierzellen

Sämtliche Transfektionen wurden nach der Calciumphosphat-Coprazipitationsmethode nach Chen et al. (1987) durchgeführt. Da jedoch die Transfektionseffizienz von Verpackungszelllinien entscheidend für den späteren Virustiter ist, wurden für die 293T- (Bosc23, Phoenix) und die NIH3T3-Derivate (PA317, PG13) folgende Transfektionsprotokolle entwickelt:

Transfektion von Phoenix- bzw. Bosc-Zellen

$1,7 - 2,0 \cdot 10^6$ Zellen wurden so auf 6-cm-Schalen ausgesät, dass die Zellen möglichst vereinzelt vorlagen. Am folgenden Tag wurde unmittelbar vor Transfektion das Medium abgenommen und durch 4 ml frisches 25 μM Chloroquin-haltiges Medium ersetzt. Chloroquin inaktiviert lysosomale DNasen und sorgt so für eine 2-3fach bessere Transfektionsrate (Pear et al. 1993). 8 μg Vektor-DNA wurden in 0,25 M CaCl_2 -Lösung aufgenommen und danach tropfenweise 500 μl 2x HeBS hinzugegeben. In einem weiter optimierten Protokoll wird 4 μg eines gag/pol- (M13) und 2 μg eines VSV-G-Expressionsplasmids kotransfiziert, um Virustiter und Infektionsspektrum zu erhöhen (Protokoll M. v. Laer, HPI). Anschließend wurde diese Lösung durch Einleiten von Luftblasen homogen durchmischt. Nach einer genau 20minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde dieses Gemisch unter Schwenken der Zellkulturschale ins Medium getropft. Die Zellen wurden über Nacht nicht länger als 14 Std. (Chloroquin ist zytotoxisch) bei 35°C in einem Brutschrank von 3 % CO_2 und gesättigtem Wasserdampf inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel und die Weiterkultivierung im 37°C-Brutschrank bei 5 % CO_2 . Ab 36 Std. nach Transfektion bestand die Möglichkeit, alle 8-12 Std. (bis zu 96 Std. nach Transfektion) Virusüberstand zu „ernten“. Zellen und Überstände wurden je nach Experiment weiter verwendet und konnten ggf. bei -80°C zwischengelagert werden.

Transfektion von PA317- und PG13-Zellen

$5 \cdot 10^5$ Zellen wurden auf einer 10-cm-Schale ausgesät [veränderte Mengenangabe bei Verwendung einer 6-cm-Schale: $2 \cdot 10^5$ Zellen]. Am folgenden Tag wurde das Medium abgenommen und durch 9 ml [4 ml] frisches Medium ersetzt. Anschließend wurden die Zellen für 2 bis 4 Std. wieder in den Inkubator gestellt. 15 μg [8 μg] Vektor-DNA wurden mit 500 μl [200 μl] 0,25 M CaCl_2 und 500 μl [200 μl] 2x BBS transfiziert. 16-24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mindestens einen weiteren Tag bei 37°C in einer Atmosphäre mit gesättigtem Wasserdampf und 5 % CO_2 inkubiert. Zellen und Überstände wurden je nach Experiment weiter verwendet. Es konnten mittels Lipofektion an Stelle der Calciumphosphattransfektion bessere Transfektionseffizienzen erzielt werden.

Transfektion von 293T-Zellen zur Produktion lentiviraler Partikel

$5 \cdot 10^6$ Zellen wurden in einer 10-cm-Schale ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Medium 5 min vor Transfektion durch 25 μM Chloroquin-haltiges Medium ersetzt. 15 μg pMDLg/RRE oder pcDNA3g/p4xCTE

(HIV-1 gag/pol-Expressionsplasmide), 5 µg pRSVrev (Rev-Expressionsplasmid), 3 µg eines VSV-G-Expressionsplasmids (M3) sowie 5 µg eines EGFP-Transfervektors [10-15 µg eines Globin-Transfervektors] wurden unter Zugabe von 500 µl 0,25 M CaCl₂ und 500 µl 2x HeBS transfiziert. Das weitere Vorgehen entsprach dem Protokoll zur Transfektion von Phoenix-Zellen. Ein Großteil der lentiviralen Vektoren wurde freundlicherweise von L. Naldini (Universität Turin, Italien) zur Verfügung gestellt (Dull et al. 1998).

Bestimmung der Transfektions- und Transduktionseffizienz

Die Zahl der transfizierten und transduzierten Zellen in einem Ansatz ist kritisch für die nachfolgenden biochemischen Analysen. Deshalb wurde bei jedem Experiment die prozentuale Zahl der transfizierten und transduzierten Zellen bestimmt. Hierzu wurden die Zellen mit einem EGFP-Expressionsplasmid (grün fluoreszierendes Protein) in den Fällen kotransfiziert, in denen es nicht schon im retroviralen Vektor vorhanden war, um eine Kontrolle der gleichen Transfektionseffizienz zu gewährleisten. Die Transduktionseffizienz wurde bei nicht EGFP-haltigen Konstrukten mit einem EGFP-haltigen viralen Vektor in einem separaten Kontrollansatz durch Durchflusszytometrie oder Fluoreszenzmikroskopie beurteilt. Ferner wurde, wenn möglich, vor dem eigentlichen Experiment ein kleiner Teil des Virusüberstandes in einem Transduktionsexperiment analysiert, um mit möglichst gleicher und einheitlicher m.o.i. (<0,3) im Folgeexperiment zu transduzieren.

Die Beurteilung der Transfektions- und Transduktionseffizienz im Fluoreszenzmikroskop wurde entweder durch Inspektion der Zellkulturschale im inversen Mikroskop oder nach Fixierung eines zuvor zugegebenen Deckgläschens mit 4 % Paraformaldehyd im lichtstärkeren aufrechten Fluoreszenzmikroskop durch Auszählen der GFP-positiven Zellen durchgeführt.

Eine zweite Möglichkeit bestand in der Kotransfektion eines Beta-Galaktosidase-exprimierenden Plasmids durch *in situ* Färbung der Zellen oder durch Bestimmung der Betagalaktosidaseaktivität im Zellysate. Für die *in situ* Betagalaktosidase-Färbung wurden die Zellen auf einem Deckgläschen mit PBS gewaschen, 5 min lang mit 4 % Paraformaldehyd in PBS bei Raumtemperatur fixiert und nach kurzem Waschen mit 0,1 % Triton-X 100 permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen mit Betagalaktosidase-Reagens überschichtet und bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer so lange inkubiert, bis eine deutliche Blaufärbung der Zellen erkennbar war. Die Anzahl der transfizierten Zellen wurde durch Auszählen unter dem Mikroskop bestimmt.

d. Transduktion von Zielzellen

Phoenix-Überstand

Ab 36 Std. (vorzugsweise jedoch ab 48) nach Transfektion wurde der Überstand der Verpackungszelllinie abgenommen und – um Zellbestandteile und etwaige Kontaminationen zu vermeiden - nach Filtration durch ein 0,45-µm-Filter auf die Zielzelllinie überführt, bei welcher zuvor auch das Medium entfernt wurde. Durch die gut transfizierbaren Phoenixzellen (Transfektionsrate mind. 60 %) ergibt sich auch bei einmaliger Gabe von Überstand auf die Zielzellen ein zumeist ausreichender Titer (>1*10⁶ infektiöse Einheiten / ml, s. Abschnitt C.2.). Gegebenenfalls wurde der Virusüberstand sogar verdünnt (m.o.i. <0,3), da ab einer Infektionsrate von 40 % positiven Zellen statistisch die Wahrscheinlichkeit für Mehrfachintegrationen steigt (s. Abb. 20; vgl. Wahlers et al. 2001) und die genaue Messung der Genexpression erschwert wird. 8 µg Polybren pro ml Medium wurden verwendet, um die Transduktionseffizienz durch Herabsetzung der Oberflächenspannung der Zielzellen

zu erhöhen. In der Regel wurde 0,5-1,0 ml Virusüberstand auf $1 \cdot 10^5$ Zielzellen in 6-well-Schalen gegeben. Nach einem Tag wurde der Polybren-haltige Virusüberstand durch frisches Medium ersetzt und die Zellen bis zur weiteren biochemischen Analyse etwa 5-6 Tage im 37°C Brutschrank kultiviert. Die expansive Wachstumstendenz der Zellen in diesem Zeitraum erforderte etwa 2-3 Tage nach Transduktion eine Überführung auf 10-cm-Schalen.

PA317-/PG13-Überstand

Ab 48 Std. nach Transfektion konnten Überstände von PA317-/PG13-Zellen etwa alle 8-12 Std. abgenommen werden. Da diese Zellen als NIH3T3-Derivate sehr viel schlechter transfizierbar sind als 293T-Zellen, produzieren sie auch einen deutlich schlechteren Titer. Demzufolge wurden mindestens 3x 3 ml Überstand von den Verpackungszelllinien abgenommen und auf $4 \cdot 10^4$ Zielzellen in 6-well-Schalen überführt (m.o.i. $<0,3$).

Retrovirale Transduktion von Suspensionszellen

VSV-G-pseudotypisierte virale Partikel wurden als Überstand von Phoenixzellen abgenommen. Etwa $1 \cdot 10^6$ Suspensionszellen (z.B. K-562) wurden in 6-well-Schalen ausgesät und in 3 ml filtriertem retroviralem Überstand der Verpackungszelllinie aufgenommen (m.o.i. 0,1-0,3). Um die Transduktionseffizienz durch Reduktion der Oberflächenspannung zu verbessern, wurden 4 µg/ml Protaminsulfat zugegeben. Nachfolgend wurden die 6-well-Schalen 60 min bei 2000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert, was den Titer etwa verdoppelt. Anschließend wurden die Zellen wieder resuspendiert und am nächsten Tag in frischem Medium aufgenommen.

Extraktion genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen

Zur Extraktion genomischer DNA wurden $1 \cdot 10^7$ Zellen in 1 ml DNAzol (Gibco BRL, Eggenstein) lysiert und nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Die Qualität der gewonnenen DNA wurde im Agarosegel überprüft. DNA-Präparationen wurden für die PCR 1:100 verdünnt eingesetzt.

e. Bestimmung des Virustiters

$2 \cdot 10^4$ NIH3T3-Zellen wurden in 24-well-Schalen in 1 ml Medium ausgesät. Am folgenden Tag wurde jeweils 1 ml Virus (MP110/11/71neo^R oder hygro^RTK) in Verdünnungen von pur bis 1:1.000.000 in Zehnerstufen zugegeben. Zusätzlich wurde eine Kontrolle angesetzt, die kein Virus enthielt, welche aber anzeigte, wann nicht infizierte Zellen abstarben. Einen Tag nach Viruszugabe wurde G418- (Geneticin) bzw. Hygromycin-haltiges Medium (Roche, Mannheim) in Konzentrationen von 400 µg/ml bzw. 300 µg/ml zugegeben. Nach 10-12 Tagen wurde anhand der Kolonienanzahl („colony forming units“) unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnungsstufe pro well der Titer bestimmt.

Eine zweite Möglichkeit bestand in der Transduktion durch EGFP-haltige virale Partikel. Hierbei wurden 10 bzw. 100 µl Mediumüberstand von Phoenixzellen (transfiziert mit MP110/11/71EGFP) auf 1 ml Medium aufgefüllt und nachfolgend auf $1 \cdot 10^5$ NIH3T3-Zellen in 6-well-Schalen gegeben (s. Transduktionsprotokoll Phoenix-Überstand B.3.d.). Nach 6 Tagen erfolgte die Auswertung im FACS, wodurch der Virustiter berechnet werden konnte.

4. Arbeiten mit RNA

Die Geräte wurden vor Benutzung mit 0.2 M NaOH-Lösung und 1 % SDS gesäubert. Alle verwendeten Lösungen wurden mit Diethylenpyrocarbonat (DEPC) behandeltem Wasser angesetzt. Andere Lösungen wurden bei Anbruch aus Originalflaschen des Herstellers abgefüllt und nur für die RNA-Aufarbeitung eingesetzt.

a. Reagenzien, Lösungen und Kits für die Arbeit mit RNA

Name	Beschreibung
20fach MOPS	400 mM 3-N-Morpholino-Propansulfonsäure, 200 mM Natriumacetat, 20 mM EDTA
20fach SSC	3 M NaCl, 0.3 M Trinatriumcitrat
³² P -dαATP	Radioaktive Phosphor-markierte Nukleosidtriphosphate
³² P -dαCTP	
Denaturierungsmix	Deionisiertes Formamid, Formaldehyd (37 %), 20fach MOPS im Verhältnis 10:3:1
DEPC-H ₂ O	Deionisiertes Wasser mit 0.1 % Diethylenpyrocarbonat wurde für 12 Std. gerührt und anschließend autoklaviert.
Färbelösung	0.5 M Natriumacetat (pH=5.2) mit 0.04 % Methylenblau
Fixierer	5 % Essigsäure
Heringssperma-DNA	10 mg/ml gescherte Heringssperma-DNA
Hybridisierlösung	6x SSC, 5x Denhardt, 0.5 % SDS, 100 µg/ml Heringssperma DNA, 50 % deionisiertes Formamid
Laufpuffer	1fach MOPS, 75 ml Formaldehyd 37 % ad 1L DEPC-H ₂ O
MoBiTec 300 Säulen	Säulenprozedur zur Trennung von radioaktiv markierten Nukleinsäuren und nicht inkorporierten dNTPs (MoBiTec GmbH, Göttingen).
Prime It II-Kit	Random Primer labeling Kit (Stratagene)
RNAzol	Tel-Test, Friendswood/USA

b. Gesamt-RNA-Extraktion aus eukaryotischen Zellen

Für die Gewinnung der gesamten RNA aus transfizierten eukaryotischen Zellen wurden die Zellen einer 10-cm-Schale (ca. 10⁷ Zellen) mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen und die Zellen abgeschabt, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und für 5 min bei 2000 rpm pelletiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml RNAzol lysiert, nach Zugabe von 200 µl Chloroform invertiert und 5 min auf Eis inkubiert. Das Homogenat wurde zur Phasentrennung 15 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und mit 1 Volumen Isopropanol gefällt. Das resultierende Pellet wurde mit 800 µl 75 % EtOH gewaschen und in DEPC-Wasser resuspendiert. Zur Vermeidung von Restkontamination mit Plasmid-DNA wurde die RNA 30 min lang bei 37°C mit RQ-1 DNase (Promega, RNase frei) verdaut und die RNA-Extraktion wie oben beschrieben wiederholt. Die resultierende RNA-Präparation wurde bei -20°C eingefroren. 1/10 der Präparation wurde auf einem normalen Agarosegel zur Quantifizierung aufgetragen und auf Qualität überprüft.

c. Northern Blot

10 µg der präparierten RNA und ein RNA-Marker (New England Biolabs) wurden in einem 1 %igen denaturierenden Formaldehydgel aufgetrennt. Hierzu wurde die RNA mit 28 µl Denaturierungsmix gemischt, für 5 min bei 60°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt, mit 5 µl Orange 5-Auftragspuffer versetzt und bei 60 Volt für ca. 3-5 Std. im Kühlraum (4°C) aufgetrennt. Das Gel wurde nach der Trennung 3x 10 min mit DEPC-H₂O gespült, um das Formaldehyd zu entfernen. Anschließend erfolgte eine 20minütige Denaturierung der RNA in 0.05 M NaOH, erneutes Spülen mit DEPC-H₂O und mindestens 45 min Equilibrieren in 20fach SSC. Die RNA wurde durch Kapillarblot über Nacht bei 4°C auf eine Nylon Membran (Pall) mit 20fach SSC als Transferpuffer übertragen und durch UV-Vernetzung (Stratalinker 0.12 Joule/cm²), sowie thermisch (2 Std. 80°C) fixiert. Für die Hybridisierung wurde die Membran mindestens 1 Std. in Hybridisierungspuffer bei 42°C blockiert und nach Zugabe der radioaktiv markierten Sonde (spezifische Aktivität > 1*10⁷ cpm) über Nacht inkubiert. Die Membran wurde nach der Hybridisierung sukzessiv mit 2x SSC (RT), 2x SSC/0.1 % SDS (60°C), 1x SSC/0.1 % SDS (60°C) und 0.1x SSC/0.1 % SDS (60°C) jeweils 15 min gewaschen. Anschließend wurde die Membran getrocknet und auf einem Röntgenfilm oder auf Bio-Imager Platten (Fuji) exponiert.

Radioaktive Markierung einer Sonde für den Northern Blot

25 ng der zu markierenden Sonde (Restriktionsfragment) wurden in 23 µl DEPC-H₂O resuspendiert und zusammen mit 10 µl Random-Primer (Prime It II, Stratagene) für 5 min denaturiert und anschließend auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 10 µl ³²P-dαATP (dCTP) wurde die Markierungsreaktion entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Nichteingebaute Nukleotide wurden durch Gelfiltration (Mobitec 300 Säule) entfernt und die spezifische Aktivität (³²P Cherenkov) bestimmt.

5. Biochemische Analyse von viralen Genprodukten

a. Reagenzien

Für die Proteingel-Elektrophorese

Name	Beschreibung
2x Ladepuffer für Proteingele	2 % SDS, 2 % Beta-Mercaptoethanol, 0.118 M Sammelgelpuffer, 20 % Glycerol
10x Sammelgelpuffer	0.47 M Tris, pH=6.7
Acrylamid-Stammllösung für Proteingele	Acrylamid 40 % (w/v), Bisacrylamid 1 % (w/v)
Bio-Rad Protein Assay Kit	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Entfärbelösung für Proteingele	Methanol 30 %, Essigsäure 1 %
Fixier- und Färbelösung für Proteingele	Methanol 50 %, Essigsäure 30 %, Coomassie -R 0.1 %
Laufpuffer für Proteingele	Glycin 0.384 M, Tris-Base 0.05 M, SDS 0.1 %

Für Western Blot-Analysen

Name	Beschreibung
ECL-Kit	Reagenzien für die Proteindetektion mittels ‚enhanced chemiluminescence‘ (ECL, Amersham, Braunschweig).
Ponceau-S Rot	0.1 % Lösung in 5 % Essigsäure
Röntgenfilme	Kodak X-AR, Hypermax-beta (Amersham)
TBS-Puffer	20 mM Tris-HCl (pH=7.5), 150 mM NaCl
Western Blot-Blockingpuffer	10 % / 5 % Magermilchpulver in PBS-Puffer
Western Blot-Transferpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin (pH=8.3), 20 % Ethanol, 0.05 % SDS
Western Blot-Waschpuffer I	PBS-Puffer mit 0.5 % Triton-X 100
Western Blot-Waschpuffer II	TBS-Puffer mit 3 % Tween 20

Für die indirekte Immunfluoreszenz

Name	Beschreibung
Elvanol	1 g Polyvinylalkohol (Mr 6000, Serva) wurde unter Erwärmen in 8 ml PBS gelöst, mit 4 ml Glycerin (87 %) gemischt und autoklaviert.
FCS 10 %-Lösung	10 % FCS in PBS
Methanol/Aceton-Fixans	Verhältnis 1:1. Aufbewahrung bei -20°C.
Paraformaldehyd-Fixans	4 % in H ₂ O. Frisch angesetzt.

b. Verwendete Antikörper nach Eigenschaft und Bezugsquelle

Nachstehend sind – soweit vorhanden – die verwendeten Verdünnungen der einzelnen Antikörper für ECL-Western Blot (ECL-WB), indirekte Immunfluoreszenz (IF) und ‚enzyme linked immunosorbent assay‘ (ELISA) angegeben.

Spezifische Erstantikörper

Spezifität	Spezies	Bezugsquelle	ECL-WB	IF	ELISA
α -GFP	Kaninchen	Prof. Kräusslich	1:2500	-	-
α -HIV-CA	Kaninchen	Prof. Kräusslich	1:2000	1:100	-
α -HIV-CA mAK 183	Maus	mAK 183, AIDS Repository des NIH, USA	-	pur	1:1000
α -HIV-Nef	Kaninchen	Prof. Kräusslich	1:2500	1:100	-
HIV Patientenserum	Mensch	Dr. Pawlita, Heidelberg	-	1:100	-
α - β 6-9, β -Kette von Hämoglobin	Maus	Immuno-Rx, Augusta/USA	1:1000	-	-
α -HA-Epitop (Hämagglutinin)	Maus	Roche	1:80	-	-
α -HA-Epitop, 'high affinity'	Ratte	Roche	1:1000-2000	-	-

Spezifische Zweitantikörper

Spezifität	Spezies	Marker	ECL-WB	IF	ELISA
α -Maus	Ziege	Meerrettich-Peroxidase	1:5000	-	-
α -Kaninchen	Esel	Meerrettich-Peroxidase	1:10000	-	1:10000
α -Ratte	Ziege	Meerrettich-Peroxidase	1:1000	-	-
α -Maus	Ziege	FITC, DTAF oder Texas Red	-	1:100	-
α -Kaninchen	Ziege	FITC oder Texas Red	-	1:100	-
α -Mensch	Ziege	DTAF	-	-	1:100

Polyklonale Sekundärantikörper mit Detektionsmarkern wurden von Dianova (Hamburg) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen.

c. Methoden**Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysaten**

Für Zelllysate wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford das Reagens der Firma BioRad nach Angaben des Herstellers verwendet. Eichkurven wurden mit Rinderserumalbumin als Standard erstellt. Vor jedem Western Blot wurde die Proteinkonzentration bestimmt, um die verschiedenen Zelllysate miteinander vergleichen zu können.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Proteinanalyse wurde eine diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) durchgeführt. Dabei wurden 17,5 %ige Trenngele (Verhältnis des verwendeten Acrylamid zu Bisacrylamid 200:1) und 6,3 %ige Sammelgele verwendet (Verhältnis des verwendeten Acrylamid zu Bisacrylamid 40:1). Vor dem Auftragen wurden die Proben 10 min in Protein-Ladepuffer gekocht. Es wurden Mini-Gele (Größe 9x7x0.15 cm, System 201, Hoefer, San Francisco/USA) verwendet und die Elektrophorese wurde bei konstanter Stromstärke durchgeführt (20 mA im Sammelgel und 40 mA im Trenngel).

Immuno-Blot / Western Blot

Nach elektrophoretischer Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel wurden die Proteine mit einer ‚Semi-dry‘ Trans-Blot Apparatur (cti GmbH) bei 80 mA 2 Std. bei RT auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schüll) übertragen (Towbin et al. 1979). Die Übertragungseffizienz wurde durch Färbung mit Ponceau-Rot (Sigma) überprüft. Nach Entfärbung mit PBS-Puffer wurde die Nitrozellulose zur Absättigung der unspezifischen Proteinbindungsstellen eine Std. lang in 10 % Magermilchpulver in PBS-Puffer inkubiert. Die spezifischen Antikörper wurden in PBS-Puffer mit 5 % Magermilchpulver und 0,5 % Triton X-100 verdünnt und mindestens zwei Std. bei Raumtemperatur auf einem Überkopfschüttler mit der Nitrozellulose inkubiert. Nach viermaligem Waschen der Nitrozellulose mit PBS / 0,5 % Triton X-100 wurde die Membran erneut 60 min lang mit 5 % Magermilchpulver / PBS blockiert. Die Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper erfolgte in 2,5 % Magermilchpulver / TBS und 0,5 % Triton X-100 für zwei Std. Nach Inkubation der Nitrozellulose mit dem Zweitantikörper wurde intensiv mit 0,5 % Triton X-100 / TBS und 3 % Tween / TBS gewaschen. Für eine hohe Sensitivität beim Nachweis der Proteine wurde eine enzymvermittelte Chemolumineszenz-Reaktion (ECL) verwendet. Die Lumineszenzreaktionen wurden durch Inkubation des Blots mit dem ECL-Kit von Amersham (Braunschweig) gestartet, die Proteine durch Exposition von Röntgenfilmen nachgewiesen.

Quantifizierung von Capsidprotein mittels „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA)

Die Bestimmung des HIV-1 Capsidproteins im Medium (Zellüberstand) erfolgte immunologisch mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen das Capsidprotein (B.5.b.) und beinhaltet die Umsetzung eines chromogenen Substrates, welches photometrisch quantifiziert werden kann (Harlow et al. 1998, Konvalinka et al. 1995). Die Sensitivität des in unserem Labor etablierten Tests beträgt 15 pg CA pro ml.

Indirekte Immunfluoreszenz

Auf mikroskopischen Deckgläschen wachsende adhärenente Zellen wurden nach Waschen mit PBS-Puffer in Methanol/Aceton-Lösung 5 min fixiert und anschließend luftgetrocknet. Zur Immunfärbung wurden die Zellen mit unverdünntem Zellkulturüberstand monoklonaler Antikörper oder mit 10 % FCS / PBS verdünntem Erstantikörper überschichtet und 30-60 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach Waschen mit PBS-Puffer wurde der Zweitantikörper analog inkubiert und gewaschen. Die Präparate wurden in deionisiertem Wasser entsalzt, in 100 % Ethanol entwässert, getrocknet, mit Elvanol eingebettet und mit einem Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss, Axiophot) analysiert. Digitale Aufnahme und Bildarchivierung erfolgten mit einer Photometrics-Kamera bzw. mit IPLab Spectrum Software. Für die konventionelle Photographie wurden Kodak T-Max 400 Filme verwendet.

FACS-Analyse

In einem Becton Dickinson Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS Calibur) wurden jeweils ca. 10^6 Zellen untersucht. In Experimenten mit EGFP war keine Anfärbung der Zellen notwendig. Diese Zellen wurden 6 Tage nach Transduktion mit PBS-Puffer gewaschen, mit Trypsin behandelt, in PBS-Puffer aufgenommen und durchflusszytometrisch untersucht. MDR-exprimierende und δ LNGFR- exprimierende Zellen wurden einem gesonderten Färbeprotokoll unterzogen. Diese Zellen wurden mit PBS-Puffer gewaschen, abtrypsinisiert und in Zellkulturmedium aufgenommen. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 1000 rpm wurde das überstehende Medium verworfen, der Primärantikörper zugegeben und 30 min in Dunkelheit bei 4°C inkubiert. Nachfolgend

wurde zweimal mit 5 ml PBS-Puffer gewaschen und zwischendurch zwecks Entfernung der Waschlösung erneut zentrifugiert. Nach Zugabe des Sekundärantikörpers wurde wieder 30 min in Dunkelheit bei 4°C inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschrritten mit je 5 ml PBS-Puffer wurden die Zellen in 1 ml PBS aufgenommen und am FACS mittels der CellQuest Version 3.1f (Becton Dickinson) analysiert.

Verwendete Primärantikörper

Bezeichnung	Spezies	Bezugsquelle	Eingesetzte Menge
α - δ LNGFR (<u>L</u> ow <u>A</u> ffinity <u>N</u> erve <u>G</u> rowth <u>F</u> actor <u>R</u> eceptor)	Maus, mAK	Roche	0,25 μ g
α - δ LNGFR (Biotin-markiert)	Maus, mAK	Roche	0,25 μ g
α -MDR (UIC2) bzw. UIC2-PE	Maus, mAK	Coulter Immunotech (Mechetner et al. 1992)	0,5 μ g

Verwendete Sekundärantikörper

Bezeichnung	Spezies	Bezugsquelle	Eingesetzte Menge
Ziege- α -Maus –PE oder FITC	Ziege	Immunotech	3 μ g
Ratte - α -Maus –FITC	Ratte	Pharmingen (02064D)	1,5 - 2,0 μ g
Streptavidin-FITC	Ziege	Roche	

Rhodamin-Ausfluss-Assay (Funktionalitätsassay für MDR)

20 μ l einer Rhodamin-Stammlösung (100 ng/ μ l) wurden in 10 ml Medium aufgenommen, 1 ml dieses Färbemediums auf $1 \cdot 10^6$ Zellen gegeben und diese 20 min lichtgeschützt bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Während dieser Zeit wurde das Fluorochrom Rh123 von den Zellen aufgenommen. Nach zweimaligem Waschen mit eisgekühltem PBS-Puffer wurde 30-60 min lichtgeschützt bei 37°C inkubiert (Ausflusszeit). Nach erneutem zweimaligen Waschen mit eiskaltem PBS-Puffer wurden die Zellen in 1 ml eiskaltem PBS-Puffer auf Eis bis zur Messung am FACS aufbewahrt und tote Zellen optional durch 1 μ g/ml Propidiumjodid markiert. Diejenigen mit der geringsten Fluoreszenzintensität stellen hierbei die MDR-tragenden Zellen dar, da diese das Fluorochrom während der Ausflusszeit aus den Zellen pumpen können.

6. Computergestützte Sequenzanalyse

Berechnung der Sekundärstruktur einer RNA-Sequenz

Die Berechnung der Sekundärstrukturen verschiedener RNA-Sequenzen erfolgte mit Hilfe des Programms Mulfold 2.3 auf dem Mulfold Server von M. Zuker (Universität Wisconsin/USA \rightarrow <http://mfold2.wustl.edu/~mfold/rna/form1.cgi>).

Analyse einer Sequenz auf potentielle Spleißsignale

Die Analyse der Sequenzen auf Spleißsignale erfolgte auf der ‚splice site prediction input form‘ der Fruchtfliegen-Homepage (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html). Die Sequenzen wurden im ASCII-Code gespeichert und mit dem Programm NNSSP (human splice site prediction by neural network) von V.V. Solovyev (Solovyev et al. 1994) und dem Programm HSPLVersion 2 (prediction of splice sites in human DNA sequences) von M.G. Reese (Kulp et al. 1996) auf potentielle Spleißsignale untersucht.

7. Klonierungen

a. Klonierung der Basisvektoren MP110/11/71 (Spleißvarianten)

Klonierung pSHX

Plasmid pUC19 (New England Biolabs) wurde mit EcoR1 und Hind3 geschnitten und aufgereinigt. Parallel dazu wurden je 500 pmol einzelsträngiges Oligonukleotid SHXMCS+ und SHXMCS- (s. B.8.) in einer TE- (pH=8.0) und 100 mM NaCl-haltigen Lösung aufgenommen und 10 min bei 95°C inkubiert. Um die „Annealing“-Reaktion abzuschließen, wurde das Wasserbad danach ausgeschaltet, was einen langsamen Abkühlungsvorgang gewährleistete. Der so entstandene SHXMCS-Doppelstrang diente dazu, die Schnittstellen Sca1, Xba1, Hind3 und Xho1 in die „Multiple Cloning Site“ von pUC19 einzufügen. Nachfolgende Ligation von EcoR1/Hind3-geschnittenem pUC19 mit SHXMCSds ließ das Plasmid pSHX (s. Abb. 5) entstehen. Die endogenen Schnittstellen der MCS von pUC19 wurden dabei zerstört. Nach LB-Kultivierung mit IPTG und X-Gal (Ausubel et al. 1995) konnten in einer Blau-Weiß-Selektionierung die Oligonukleotid-haltigen Plasmide (weiße Kolonien) identifiziert werden. Die Multiple Cloning Site von pSHX wurde mit den Primern M13/pUC revers und direkt sequenziert.

Allgemeines zur Nomenklatur der klonierten retroviralen Vektoren

Der Präfix p bezeichnet ein Plasmid. Die Buchstaben MP und SF beschreiben die jeweilige Verwendung des MPSV (Myeloproliferative Sarcoma Virus) oder SFFV (Friend Spleen Focus Forming Virus) für den 3'LTR (long terminal repeat). Die anschließende Zahlenabfolge bezeichnet die verschiedenen Leaderderivate von MESV (Murine Embryonic Stem cell Virus). 11 bezeichnet einen Leader, der einen aktiven Spleißdonor besitzt. Demgegenüber besitzt Leader 110 im Gegensatz zu 11 einen durch ‚site directed mutagenesis‘ deletierten Spleißdonor. Der Leader 71 beinhaltet im Gegensatz zum Leader 11 einen zusätzlichen Spleißakzeptor, so dass in Kombination mit dem 5' gelegenen Spleißdonor ein funktionelles Intron entsteht. In die Multiple Cloning Site Not1, EcoR1, BamH1 und Hind3 sind verschiedene Transgene und posttranskriptionell aktive Elemente (s. Abb. 5 u. 8) eingebracht.

Klonierung pMP110Δ3'LTR

pSHX wurde mit Xba1/Hind3 geöffnet, mit alkalischer Phosphatase behandelt und gelgereinigt. Der MPSV LTR (long terminal repeat des Myeloproliferative Sarcoma Virus) wurde als Nhe1/Kpn1 Fragment (445bp) aus pMP1K exzidiert (zur Verfügung gestellt von C. Baum, HPI). Der MP1-Vektor enthält den 5'LTR und Leader (inkl. 400 bp gag-Anteile) von MESV sowie den 3'LTR von MPSV (Baum et al. 1995/96). Das K aus MP1K steht für ein Kozak-optimiertes Leo-Resistenzgen (Leo^R), das eine Fusion der cDNAs von LacZ und dem Neomycin-Resistenzgen (Neo^R) darstellt (Hildinger et al. 1998). Parallel wurde der MESV ‚gag-frame leader‘ Kpn1/Hind3 (620bp) aus pSF110 ausgeschnitten. pSF110 wurde mittels ‚site-directed mutagenesis‘ aus pSF11 erstellt und enthält einen defekten Spleißdonor in der Leaderregion. SF110 und SF11 enthalten den 3'LTR von SFFV und den 5'LTR sowie den ‚gag-frame‘ Leader von MESV (Hildinger et al. 1999). In einer Drei-Fragment-Ligation wurden obige Fragmente (MPSV 5'LTR, MESV 110 gag-frame Leader und pSHX-Backbone) zu pMP110Δ3'LTR vereinigt (s. Abb. 5).

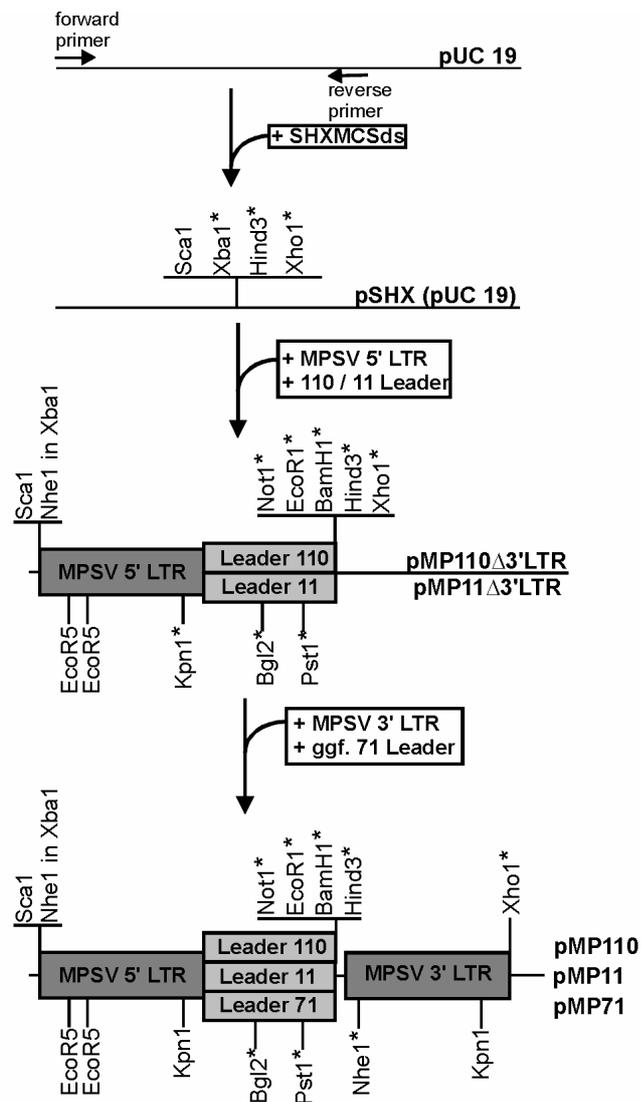


Abb. 5: Klonierung der retroviralen Basiskonstrukte

In das Plasmid pUC19 wurden durch SHXMCSds die Schnittstellen Sca1, Xba1, Hind3 u. Xho1 eingebracht und die endogene MCS von pUC19 deletiert. In diese wurden sukzessive der 5' LTR (long terminal repeat) von MPSV (Myeloproliferative Sarcoma Virus) und der gag-frame Leader 110 oder 11 des MESV (Murine Embryonic Stem cell Virus) eingesetzt. Der Leader 11 enthält einen intakten Spleißdonor, welcher im Leader 110 durch 'site directed mutagenesis' deletiert wurde. Im nächsten Klonierungsschritt wurde der 3' MPSV LTR eingefügt. Nachfolgend ließ sich in den Leader 11 durch eine Bgl2/Not1 Klonierung ein zusätzlicher Spleißakzeptor einfügen, wodurch der Leader 71 mit einem funktionellen Intron entstand. **'Single cut' Schnittstellen sind mit einem Stern (*) markiert.**

Klonierung pMP110

Der MPSV 3'LTR wurde mittels PCR unter Benutzung von Pfu-Polymerase (Exonukleaseaktivität) und der Primer U3RU5+ und LTRxhoTail (s. B.8.) aus pMP1K (s. voriger Abschnitt) herausamplifiziert. Das PCR-Fragment wurde mit Hind3 und Xho1 geschnitten und in pMP110Δ3'LTR kloniert, welches ebenfalls mit Hind3/Xho1 geschnitten wurde. Die nachfolgende Zwei-Fragment-Ligation ergab pMP110 (Abb. 5).

Klonierung pMP11

Abweichend von obiger Klonierungsstrategie wurde pMP11Δ3'LTR nicht mittels pSF110, sondern aus pSF11 hergestellt, das einen intakten Spleißdonor in der Leaderregion trägt. pSF110 und pSF11 differieren jeweils nur in der Leaderregion (pSF110 mit deletiertem Spleißdonor) und sind in Hildinger et al. (1999) publiziert. Die Klonierungsstrategie ist ansonsten gleich wie bei pMP110.

Klonierung pMP71

Aus pMP11 und pSF91 wurde pMP71 hergestellt, indem beide Vektoren mit Bgl2/Not1 geschnitten wurden und das 4000 bp Fragment von pMP11 mit dem 400 bp Fragment von pSF91 ligiert wurde. Es wurde ein zusätzliches minimales Spleißakzeptoroligonukleotid so eingebracht, dass im Vektor pMP71 in der Leaderregion ein funktionelles Intron entsteht. pSF91 enthält den 3'LTR von SFFV und den 5'LTR sowie den Leader von MESV (Hildinger et al. 1999). Dieser Leader enthält im Vergleich zu pSF11 einen zusätzlichen Spleißakzeptor. Darüber hinaus ist ein in den ‚gag frame‘-Leaderkonstrukten 110, 11 und 71 vorhandenes mögliches prä-AUG Kodon im Leader 91 aus Sicherheitsgründen mutiert. Die Leader 71 und 91 sind mit Ausnahme dieser Mutation aber ansonsten identisch.

b. Einfügen der DNA für verschiedene RNA-Elemente

Alle drei Basisvektoren pMP110/11/71 haben die gleiche Multiple Cloning Site mit den Schnittstellen Not1, EcoR1, BamH1 und Hind3, welche jeweils ‚single cut‘ Schnittstellen darstellen. Für die einzelnen Vektoren sind ‚single cut‘ Schnittstellen jeweils mit einem Stern in den Abbildungen markiert. Über die Schnittstellen der MCS wurden die später erwähnten Transgene und die für die posttranskriptionell aktiven RNA-Elemente kodierenden DNA-Fragmente eingesetzt (Abb. 6).

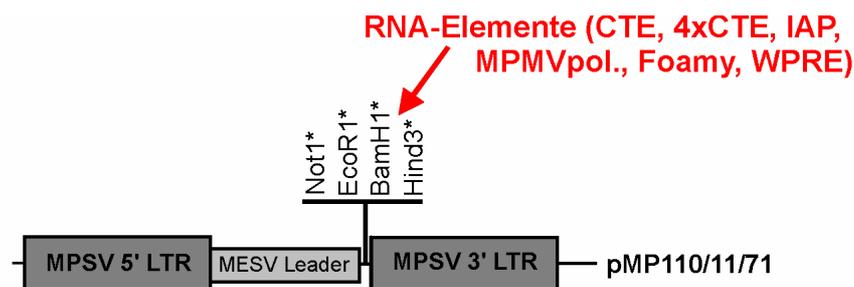
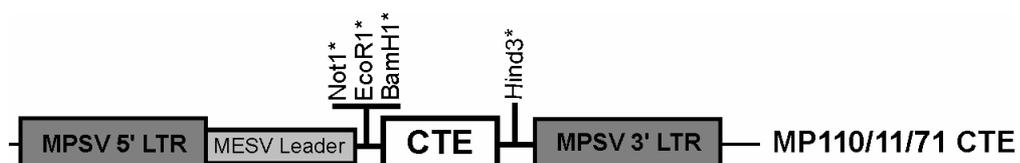


Abb. 6: Klonierung der DNA für RNA-Elemente

Einfügen der für RNA-Elemente kodierenden DNA-Fragmente (CTE, 4xCTE, IAP, MPMVpol., Foamy, WPRE) in die 3' Region der 'Multiple Cloning Site'.

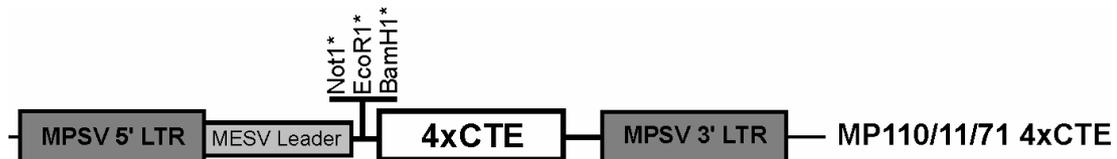
Klonierung MP110/11/71 CTE (+MPMV CTE)

Das konstitutive Transportelement (CTE) des Mason-Pfizer Monkey Virus (MPMV) wurde mittels einer Pfu/Taq-PCR (Gemisch 1:5) vom proviralen Klon pSIVMPCG (Nukleotide 8006-8175, GenBank Nr. M12349) unter Verwendung der Primer MPMV 5' und 3'CTE (s. B.8.) amplifiziert (pSIVMPCG zur Verfügung gestellt von E. Hunter, Birmingham/Alabama). Nach Gelreinigung wurde das entstandene Fragment mit Xba1/Hind3 (Schnittstellen durch Primer erstellt) verdaut und in pUC19 (New England Biolabs) kloniert, welches zuvor Xba1/Hind3 geschnitten war. Das resultierende Plasmid wurde als pUC19-MPMVCTE bezeichnet und das CTE sequenziert. Aus diesem Plasmid konnte das MPMV CTE als BamH1/Hind3-Verdau (BamH1 aus der MCS von pUC19) entnommen und direkt in die MCS von pMP110/11/71 überführt werden.



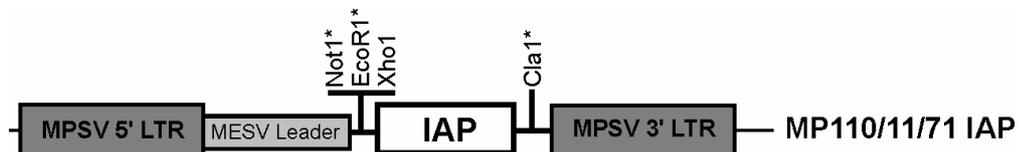
Klonierung MP110/11/71 4xCTE (+ 4fach multimerisiertes MPMV CTE)

Das 4xCTE (4fach MPMV CTE, CCCC) wurde aus 3-CCCC (Wodrich 1998) herauskloniert. Dieses Plasmid ist ein Derivat von pcDNA3 (Invitrogen) und enthält eine Expressionskassette aus gpII (HIV gag/prot, in Abschnitt 7.c.) und einem multimerisierten CTE (4xCTE). Das 4xCTE ist hier als EcoR1/Not1-Fragment vorhanden. 3-CCCC wurde mit Not1 geschnitten, die Schnittstelle mit Klenow Polymerase aufgefüllt und mit EcoR1 nachgeschnitten. Ebenso wurde MP110 erst mit Hind3 geschnitten, mit Klenow Polymerase aufgefüllt und mit EcoR1 nachgeschnitten. Nach Ligation dieser beiden Fragmente entstand MP110 4xCTE. EGFP und gpII wurden anschließend als Not1/EcoR1- bzw. EcoR1-Fragment eingefügt (s. B.7.3.).



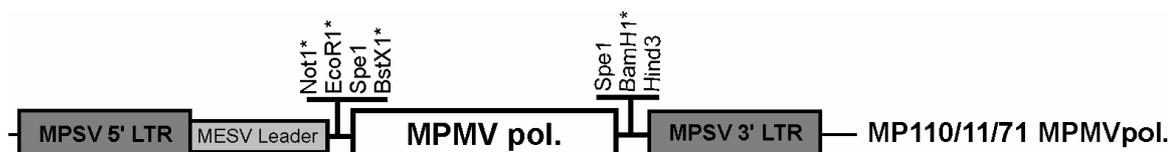
Klonierung MP110/11/71 IAP (+IAP-Element)

Das IAP-Element wurde mittels PCR aus pMIA14 (Nukleotide 5442 - 5809, Genbank Nr. M17551) unter Verwendung der Primer 5'MIAminforXho und 3'MIAminrevClaNhe (s. B.8.) amplifiziert. Sodann wurde das IAP-Fragment in pCRII (Invitrogen) subkloniert, aus dem entstandenen pCRII-MIAmin Plasmid mit NheI geschnitten und nachfolgend mit Klenow Polymerase aufgefüllt. Danach wurde mit EcoR1 nachgeschnitten (Schnittstelle aus pCRII Vektor), woraus sich ein EcoR1-IAPmin-blunt Fragment von 400 bp Größe ergab. Dieses wurde in pMP110, das mit Hind3 geschnitten und dann mit Klenow Polymerase behandelt worden war, als EcoR1-blunt Fragment eingesetzt. EGFP und gpII wurden anschließend als Not1/EcoR1- bzw. EcoR1-Fragment eingefügt (s. B.7.3.).



Klonierung MP110 MPMV pol.

Aus der pol- und env-Region von pSIVMPCG wurde das 1,6kb große MPMVpol.-Element (Nukleotide 5075-6680, Genbank Nr. M12349) als SpeI-Fragment in pCRII-Foamy umgesetzt. pCRII-Foamy enthält das Foamy-Element in pCRII (Invitrogen) (s. Foamy-haltige Vektoren unten). Aus pCRII-Foamy wurde das MPMVpol.-Element als EcoR1/BamH1-Fragment (Schnittstellen durch pCRII eingeführt) in den pMP110-Vektor überführt. In den so entstandenen MP110 MPMVpol.-Vektor wurde darauffolgend EGFP und gpII als Not1/EcoR1- bzw. EcoR1-Fragment eingesetzt (s. B.7.3.).

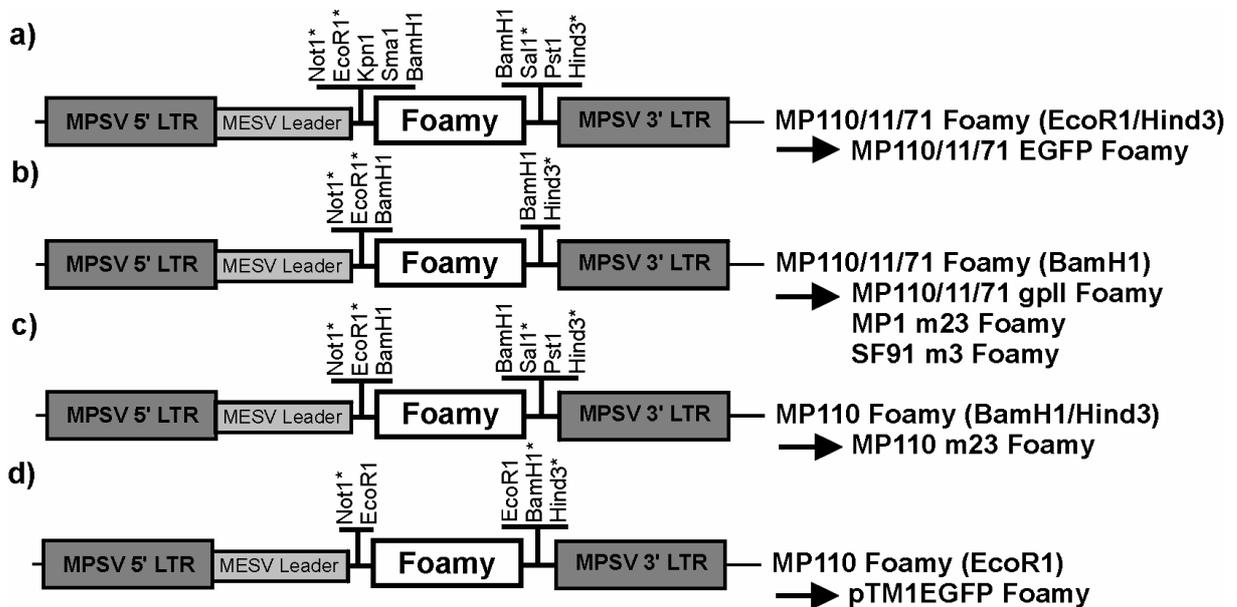


Foamy-haltige Vektoren

Das etwa 560 bp große Foamy-Element (Fo) wurde aus der humanen Foamyvirussequenz pHSRV1 (nt. 6128-6683, Genbank Nr. U21247) mittels der Primer Foamy5'CTEi und Foamy3'CTEi (s. B.8.) amplifiziert und in

pCRII (Invitrogen) und TA-PCR subkloniert. TA-PCR ist ein synthetischer von pUC19 (New England Biolabs) abstammender TA-Klonierungsvektor, der in der BamH1-Schnittstelle ein 1,6 kb Neomycin-Resistenzgen als Spacer enthält. Durch Bcm1-Verdau wird der Spacer entfernt und es entsteht der TA-Vektor (pTA-PCR).

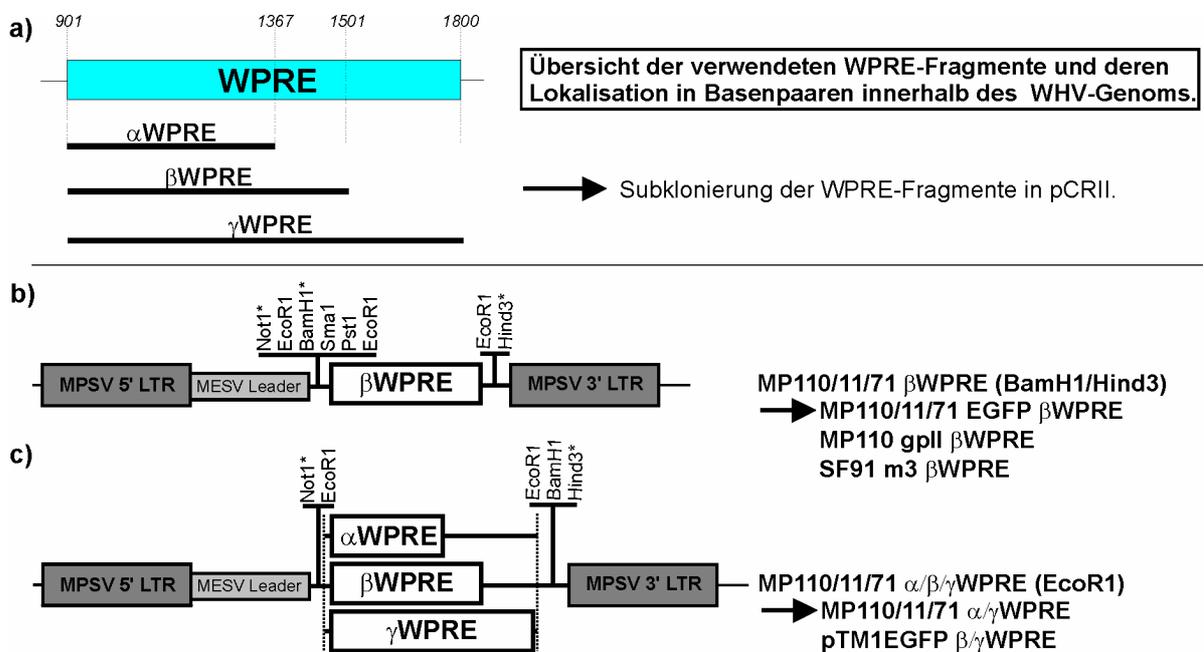
- Im Kontext von EGFP wurde das Foamy-Element als EcoR1/Hind3-Fragment aus pTA-PCR-Foamy verwendet und in pMP110/11/71 kloniert.
- Im Falle von gpII wurde das Foamy-Element als BamH1-Fragment aus pTA-PCR-Foamy in den retroviralen Vektor MP110gpII überführt. Zur Konstruktion von MP1m23Fo und SF91m3Fo (Basisplasmide s. B.7.c.) wurde das Foamy-Element ebenfalls als BamH1-Fragment aus TA-PCR-Foamy ausgeschnitten und verwendet.
- MP110m23Fo wurde mit einem Foamy-Fragment aus TA-PCR-Foamy erstellt, welches zunächst mit BamH1 partiell verdaut und anschließend mit Hind3 nachgeschnitten wurde, so dass ein BamH1/Hind3-Foamy-Fragment entstand und für den Vektor MP110m23Fo verwendet wurde.
- Für die Subklonierung in den Vektor pTM1EGFP (s. SF91m3IRESEGFP, B.7.c.) wurde das Foamy-Element als EcoR1-Fragment aus pCRII-Foamy ausgeschnitten und in die EcoR1-Schnittstelle von pTM1EGFP überführt.



WPRE-haltige Vektoren

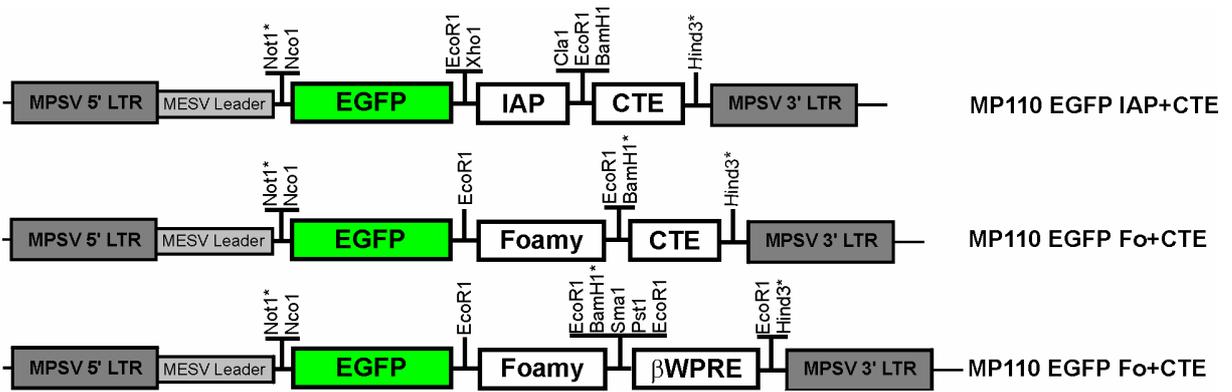
- Das Woodchuck ‚posttranscriptional regulatory element‘ (WPRE) wurde nach einem Algorithmus von Zuker (Jaeger et al. 1989/90) auf sein Sekundärfaltungspotential untersucht (Daten nicht gezeigt). Dabei zeigten sich drei Regionen, die unabhängig voneinander stabile RNA-Sekundärstrukturen ausbildeten. Basierend auf dieser Strukturvorhersage wurden drei unterschiedlich große WPRE-Fragmente kloniert, welche jeweils vom 5'Ende her entweder die erste (α WPRE), die ersten beiden (β WPRE) oder alle drei Substrukturen der RNA-Faltungsanalyse (γ WPRE) umfassten. Hierzu erfolgte die Amplifikation von PCR-Fragmenten aus pWHV8 (Woodchuck Hepatitis B Virus, Genbank Nr. J04514) mit Namen α WPRE (467 bp, nt. 901-1367), β WPRE (601 bp, nt. 901-1501) und γ WPRE (901 bp, nt. 901-1801) mit den entsprechenden Primerpaaren (s. B.8.) und die TA-Subklonierung der entsprechenden Fragmente in pCRII (Invitrogen).

- b) β WPRE wurde aus pCRII als EcoR1-Fragment zunächst in pSK- (Bluescript, Genbank Nr. X52329) subkloniert und von dort als BamH1/Hind3-Fragment in MP110 eingesetzt. Durch nachträglichen Einsatz von EGFP als Not1/EcoR1-Fragment bzw. gpII (aus MP110gpII) als Not1/BamH1-Fragment gelangten diese Transgene in den so entstandenen MP110 β WPRE Vektor oder dessen Derivate mit Spleißvarianten. SF91m3 β WPRE wurde durch Drei-Fragment-Ligation aus dem SF91 Not1/Hind3-, m3 Not1/BamH1- (aus SF91m3, Hildinger et al. 1999) und β WPRE BamH1/Hind3-Fragment (aus pSK- β WPRE, s.o.) kloniert.
- c) α WPRE und γ WPRE wurden als EcoR1-Fragmente aus pCRII- α WPRE oder γ WPRE in MP110EGFP umgesetzt, so dass MP110EGFP α - oder γ WPRE entstand. Die Subklonierungen von β WPRE und γ WPRE in pTM1EGFP erfolgten als EcoR1-Fragmente aus den korrespondierenden pCRII-Vektoren. Der Cla1/BamH1-Verdau von pTM1EGFP γ WPRE ergab, dass sich in den letzten 200 bp von γ PRE eine zusätzliche BamH1-Schnittstelle befand. Daher besaß der sukzessiv klonierte SF91m3IRESEGF β WPRE+ Vektor nur eine trunkierte Version von γ WPRE, welche nur etwa 30 Basenpaaren länger als β WPRE ist und folglich SF91m3IRESEGF β WPRE+ genannt wurde.



Klonierung von Vektoren mit mehreren viralen RNA-Elementen

In die Vektoren MP110EGFP IAP+CTE sowie MP110EGFP Fo+CTE und MP110EGFP Fo+WPRES wurden die jeweils 3' insertierten CTE- (aus pUC19MPMVCTE) und β WPRES-Fragmente (aus MP110 β WPRES) als BamH1/Hind3-Fragmente eingebracht. Die in Relation zum anderen RNA-Element 5' eingebrachten Foamy- (aus pCRII-Foamy) und IAP-DNA-Fragmente (aus pCRII-MIAmin.) wurden als EcoR1-Insert kloniert.



c. Klonierung der verschiedenen Transgene

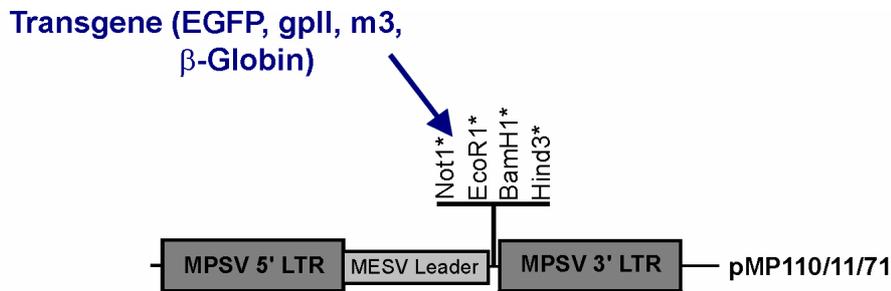
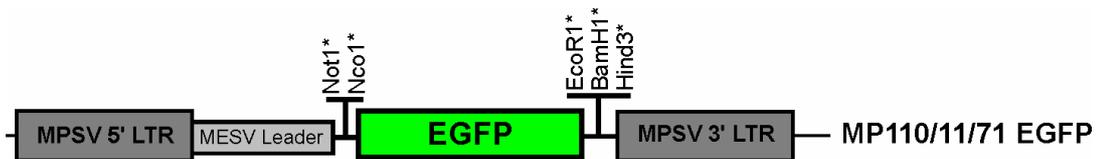


Abb. 7: Klonierung der Transgene

Einfügen der Transgene (EGFP, gpII, m3, β -Globin) in die 5' Region der 'Multiple Cloning Site'.

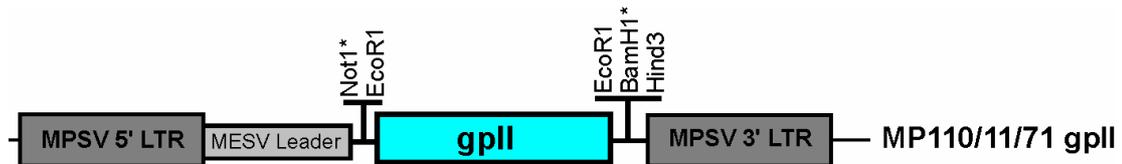
MP110/11/71 EGFP

pKS-EGFP-I enthält in einem Bluescript-Plasmid das von Clontech kommerziell zu erwerbende EGFP (enhanced), welches zusätzlich in der 3' Region noch ein Polio-Epitop und einen His-Tag enthält (erstellt von R.Welker, HPI). Aus diesem Plasmid wurde EGFP als NotI/EcoR1-Fragment exzidiert und in MP110 eingesetzt.



MP110 gpII (+ HIV-1 gag/prot)

Das Plasmid pKex-gpII lag am HPI bereits vor (Wodrich 1998). Es enthält als EcoR1-Fragment einen Teil der HIV-1 5'untranslatierten Region, den vollständigen offenen Leserahmen der Gag-Strukturproteine sowie den für die Protease (Prot) kodierenden Teil des pol-Leserahmens (nt. 681-2551 von HIV-1 Klon BH 10), gefolgt von zwei Stopcodons (Mergener et al. 1992). Diese Kassette wurde mit der Abkürzung **gpII** bezeichnet und in die EcoR1-Schnittstelle des MP110-Vektors überführt, der zuvor geschnitten und mit alkalischer Phosphatase behandelt worden war. Durch Restriktionsverdaus ließ sich die richtige Orientierung der gpII-Kassette herausfinden.

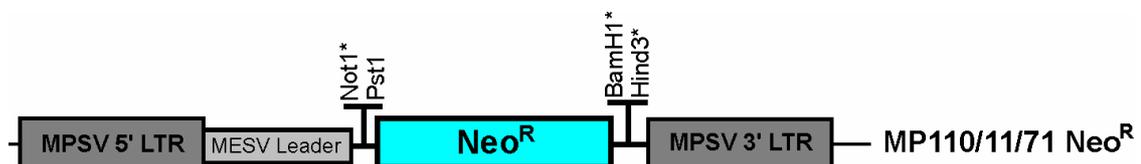


MP110 gpII *SD*- (HIV-1 gag/prot mit deletierten *SD*)

Wie oben wurde die Transgenkassette gpII *SD*- aus dem korrespondierenden pKex-gpII *SD*- Vektor als EcoRI-Fragment herausgeschnitten und in den mit EcoRI-geöffneten Vektor MP110 kloniert. Die Kassette gpII *SD*- enthält im Gegensatz zur gpII-Kassette eine Deletion des 'Major Splice Donor' von HIV in der 5' untranslatierten Region (Wodrich 1998). Das resultierende Plasmid MP110 enthält weder Spleißsignale in der retroviralen Leaderregion noch den 'Major Splice Donor' von HIV-1 (*SD*-).

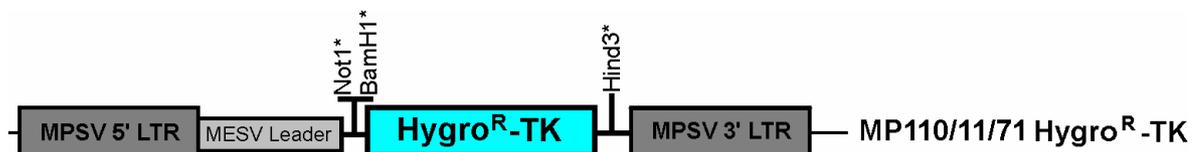
MP110/11/71 Neo^R

pR338 Nef ist ein retroviraler Vektor, der von D. Paulsen (HPI) erstellt wurde und in der MCS das HIV-1 Nef-Gen enthält (Paulsen 1999). Das Basiskonstrukt pR338 (p5O-M-X-neo) ist ein von C. Stocking (HPI) klonierter retroviraler Vektor, der auf MESV basiert und einen 3' MPSV LTR trägt (Laker et al. 1998). pR338 Nef und pR338 (-) beinhalten 3' der MCS ein Neomycin-Gen, welches über SmaI und BamHI herauskloniert werden kann. pR338 Nef wurde mit SmaI/BamHI verdaut, so dass ein Fragment mit dem Neomycin-Resistenzgen Neo^R herausfiel. MP110 wurde zunächst mit EcoRI geschnitten, dann mit Klenow Polymerase aufgefüllt und mit BamHI nachgeschnitten. Nachfolgende Ligation der blunt/BamHI-Fragmente von pMP110 und Neo^R ergab den Vektor MP110 Neo^R. Die gleiche Klonierungsstrategie wurde für die Spleißvarianten pMP11 und pMP71 angewandt.



MP110 Hygro^R-Thymidinkinase

pHT (Plasmid Dr. Hans-Jörg Hauser, GBF Braunschweig) enthält das Hygromycin-Resistenzgen und Herpes-Thymidinkinase-Gen als Fusionsprodukt. Diese Hygro^R-Thymidinkinase-Kassette wurde aus der MCS dieses Vektors als NotI/Hind3-Fragment in den MP110-Kontext überführt.



MP110/MP1 m23

Die MDR-cDNA m23 (Sorrentino et al. 1992) wurde aus MP1m23 als NotI/BamHI-Fragment in MP110 NotI/BamHI umgesetzt. Der retrovirale Vektor MP1 ist in Hildinger et al. (1998) erläutert. Die MDR-cDNA m23 enthält einen mutierten Spleißdonor und einen partiell mutierten Spleißakzeptor innerhalb des MDR-Gens.

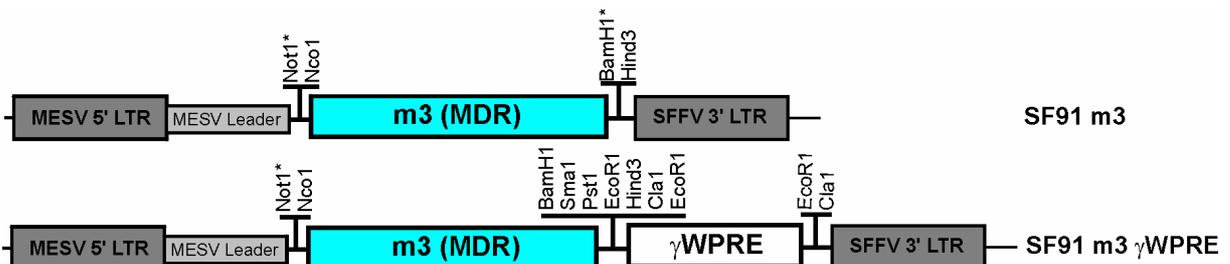
Das m23-Konstrukt hat durch die Deletion des Spleißdonors in der kodierenden Region ein vermehrtes Spleißen vom viralen Spleißdonor in der 5'UTR auf den nur teildeletierten in der cDNA gelegenen Spleißakzeptor zur Folge, was für einen Expressionsverlust sorgt (persönliche Mitteilung von M. Hildinger, HPI).



SF91 m3

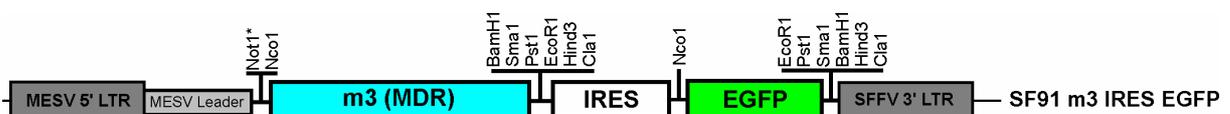
SF91 m3 (Knipper et al. 2001) wurde von M. Hildinger und C. Baum (HPI) zur Verfügung gestellt. Die 3,9 kb MDR-cDNA m3 weist einen partiell mutierten Spleißakzeptor (nt. 2319) in der cDNA auf und wurde als Not1/BamH1-Fragment in die MCS von SF91 (Hildinger et al. 1999) kloniert. SF91 weist ebenso wie MP71 ein virales Intron in der 5'UTR auf, besitzt jedoch den 5'LTR von MESV und den 3'LTR von SFFV. Aus Sicherheitsgründen wurde im 91-Kontext noch eine potentielle AUG-Stelle, die jedoch keine vorangehende Kozak-Konsensus-Sequenz hat, innerhalb der Leader-Region mutiert.

Zur Konstruktion des Vektors SF91m3 γ WPRE wurde das Plasmid SF91m3IRESEGFP (s.u.) mit ClaI geöffnet und mit alkalischer Phosphatase behandelt. Die Ligation dieses Fragmentes mit einem ClaI-geschnittenen γ WPRE-Fragment aus pCRII- γ WPRE ergab den Vektor SF91m3 γ WPRE.



SF91m3IRESEGFP

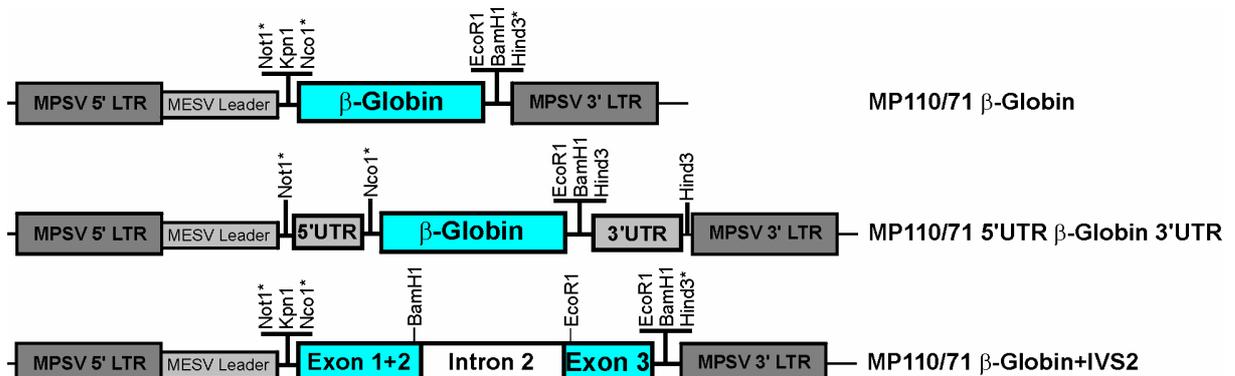
Dieser bicistronische retrovirale Vektor exprimiert erstens MDR1 (m3) und zweitens EGFP über eine ‚intraribosomal entry site‘ (IRES) von EMCV. Die für RNA-Elemente kodierenden DNA-Fragmente des CTE, Foamy, β - und γ WPRE wurden als EcoR1-Fragmente in pTM1EGFP (zur Verfügung gestellt von F. Fehrmann, HPI) subkloniert. pTM1 ist ein EMCV-IRES tragender Vektor, der von Bernie Moss publiziert wurde (Moss et al. 1990). Das EGFP wurde über einen Nco1/BamH1-Verdau von pHHR-EGFP (Wodrich 1998) in pTM1 transferiert. Die Drei-Fragment-Ligation aus dem Not1/BamH1-Fragment von pSF91m3 (Vektorbackbone), dem Not1/Cla1-Fragment aus pKSm3 (m3 als Not1/Cla1 Fragment in Bluescript pKS, Plasmid M. Hildinger) und dem Cla1/BamH1-Fragment (IRES-EGFP) von pTM1EGFP (+/- Element) ergab SF91m3IRESEGFP. Das Cla1/BamH1-Fragment enthielt aus klonierungstechnischen Gründen noch einen kleinen Rest (etwa 20bp) vom T7-Promotor aus dem Plasmid TM1EGFP.



β-Globin Vektoren

Aus humanen Leukozyten und Erythrozytenvorläufern eines gesunden Spenders wurde mittels des RNAzol-Kits RNA isoliert. Mit einem SUPERSRIPT™II Kit (Fa. Gibco) wurde unter Verwendung eines polyT-Primers (16mer) und des Enzyms Reverse Transkriptase zunächst unspezifisch cDNA amplifiziert. Aus diesem cDNA-Pool wurde in einer zweiten PCR mit den β-Globin spezifischen Primern 5'betacdsNot1 (Primer erstellt Not1-Schnittstelle) und 3'betacdsHAtagEcoR1 (Primer mit EcoR1-Schnittstelle, s. B.8.) die spezifische β-Globin-kodierende Sequenz synthetisiert und zusätzlich ein Hämagglutinin-Epitop (Nonapeptid-Sequenz YPYDVPDYA des Influenza Hämagglutininproteins) eingebaut, um einen möglichen Proteinnachweis auch in humanen hämatopoetischen Zellen führen zu können. Die hierdurch gewonnenen 3 Klone wurden sequenziert. Schließlich wurde ein Klon (L4) verwendet, der zwei stille Punktmutationen (AS10 Ala (WT: GCG→GCC), AS53 Ala (WT:GCA→GCT), verglichen mit Genbank Acc. No. V00497) aufwies, also keinen Aminosäureaustausch gegenüber der Wildtypsequenz darstellte. Das entstandene PCR-Fragment wurde in pCRII (von Fa. Invitrogen bezogen) subkloniert und als Not1/EcoR1-Fragment in die MCS von MP110/71 umgesetzt. Da die β-Globin-Sequenz auch eine EcoR1-Schnittstelle beinhaltetete, musste dies über einen partiellen Verdau unter suboptimalen Enzymbedingungen erfolgen.

Die 5'untranslatierte Region von der ‚Cap site‘ bis zum ATG wurde als synthetisches Oligonukleotid mit Hilfe der einzelsträngigen Oligonukleotide 5'5'UTRbetaglobin und 3'5'UTRbetaglobin (s. B.8.) und nachfolgendem Annealing (10 min 95°C, 10 min 70°C, 10 min 60°C, 10 min 50°C) als Not1/Nco1-Fragment eingebaut. Die 3' UTR wurde als Hind3-geschnittenes PCR-Fragment (Subklonierung in pCRII) in die Hind3-Schnittstelle der MCS gesetzt. Der verwendete Bereich der 3'UTR erstreckte sich entweder bis direkt vor das β-Globin polyA- (Primer 5'3'UTRbgl. und 3'3'UTRbgl.min.) oder bis ungefähr 400 bp hinter das polyA-Signal (5'Primer gleich; 3'Primer 3'3'UTRbgl.max.). Das Intron 2 von β-Globin (IVS2, intervening sequence 2) wurde als BamH1/EcoR1-Fragment aus pGSE1758 (zur Verfügung gestellt von F. Grosveld, Rotterdam; Pruzina et al. 1994) als partieller Verdau in die cDNA-Sequenz eingebaut (resultierend β-Globin + IVS2). Der Einbau der für RNA-Elemente kodierenden DNA-Fragmente erfolgte in gleicher Weise, wie dies für andere Transgene beschrieben wurde.



Klonierung der lentiviralen Vektoren

Die lentiviralen Basiskonstrukte wurden von L. Naldini (Universität Turin) zur Verfügung gestellt (Aufbau dieser Vektoren s. Abb. 13; Dull et al. 1998, Naldini et al. 1996a/b). Die Globinkassette der oncoretroviralen Vektoren, die aus der β -Globin cDNA, WPRE, flankierenden Globin-UTRs und z.T. Intron 2-haltigen Sequenzen besteht (Abb. 18), wurde durch PCR mit Hilfe der Primer 5'globinforHIV und 3'globinforHIV (s. B.8.) amplifiziert, mittels der eingebauten Bgl2/Kpn1-Schnittstellen geschnitten und in den mit BamH1/Kpn1-geöffneten Vektor pRRLsin.PPT.hPGK.EGFPpre oder pRRLsin.CMV.EGFPpre (Dull et al. 1998) eingefügt. So entstanden die Vektoren pRRLsin.PPT.hPGK. β GK (**β GK** für β -Globinkassette) mit und ohne Globin-IVS2 (intervening sequence 2, Intron 2 in natürlich angestammter Position) und pRRLsin.CMV. β GK+IVS2. Ein weiterer Vektor pRRLsin.PPT.hPGK. β GK+IVS2del. enthält ein teildeletiertes Intron 2 von β -Globin, welches sich weniger negativ auf den Titer der retroviralen Vektoren auswirkt als ein Vollängenintron (Sadelain et al. 1995). Dieses teildeletierte Intron wurde dem Vektor pMD.G (Naldini et al. 1996b) als BamH1/EcoR1-Fragment entnommen und durch partiellen Verdau in den lentiviralen Vektor überführt. Das Vollängenintron wurde ebenso über einen partiellen BamH1/EcoR1-Verdau eingesetzt.

Der Vektor pRRLsin.PPT.hPGK.EGFPcte entstand durch Ersetzen des Age1/Kpn1 EGFPpre-Fragmentes aus pRRLsin.PPT.hPGK.EGFPpre mit dem Age1/Kpn1-Fragment (EGFPcte) aus pCG8-3C (zur Verfügung gestellt von R. Morgan, NIH/USA; Mautino et al. 2000).

Zur Klonierung des Helferplasmid pcDNA3g/p4xCTE (als gag/pol-Expressionsplasmid) wurden das teildeletierte β -Globin Intron 2 und gag/pol (g/p) durch partiellen BamH1/EcoR1-Verdau aus pMDLg/pRRE (Dull et al. 1998) exzidiert und in den pcDNA3-Vektor überführt. Das Produkt wurde nachfolgend mit EcoR1/Not1 geschnitten und das 4xCTE-Fragment eingebracht.

8. Primer und Oligonukleotide

LTR Xhotail-:	CTC GAG AAT GAA AGA CCC CCG AGG TGG GCA GTC AAT C
SHXMCS+:	AAT TAG TAC TC T AGA GGG ACC AAG CTT CCG CAC TCG AGC
SHXMCS-:	AGC TGC TCG AGT GCG GAA GCT TGG TCC CTC TAG AGT ACT
U3RU5+:	TCC AAG CTT CCT AAC ACG AGC CAT AGA TAG
MPMV 5':	GCT CTA GAC CAC CTC CCC TGT GAG C
3'CTE:	AAA GCT TGC TAG CTG ATC AAC ACA TCC CTC GGA GGC
M13/pUC reverse:	CAG GAA ACA GCT ATG AC
M13/pUC direct:	ACT GGC CGT CGT TTT AC
Foamy5'CTEi:	GGT CTA GAA ACA ACA CCT ATA GCC C
Foamy3'CTEi:	GGG CTA GCA CAA CAA GTA TAA AGC
5'WPRES:	GGA GGC CTA TCG ATG AAT TCG AGC ATC TTA CCG CCA TTT ATT CCC
3'WPRES alpha:	GGA GGC CTA TCG ATG AAT TCG AAA GGA GCT GAC AGG TGG TGG
3'WPRES beta:	GGA GGC CTA TCG ATG AAT TCG AAA GGA CGT CAG CTT CCC CG
3'WPRES gamma:	GGA GGC CTA TCG ATG AAT TCT TGG CAT GCC AAG TTG ACG ATT TGC
5'MIAminforXho:	TCT CGA GTC AGA GCC AGA TAG GCC CAA TG
3'MIAminrevClaNhe:	TGG GCT AGC ATC GAT AGA GCC AAG GCT GTC TG
5' Δ 61TAP NotI:	TTG CGG CCG CGG TAC CAT GAG TGA TGC CCA GGA TGG
3'TAP EcoRI:	TGG AAT TCT CAC TTC ATG AAT GCC ACT TC
5'betacdsNotI:	GGG CGG CCG CGG TAC CAT GGT GCA CCT GAC TCC TGA GG
3'betacdsHAtagEcoRI:	CCG AAT TCA GGC GTA GTC GGG CAC GTC GTA GGG GTA GTG ATA CTT GTG GGC CAG GGC
5'5'UTRbetaglobin:	GGC CGC ACA TTT GCT TCT GAC ACA ACT GTG TTC ACT AGC AAC CTC AAA CAG ACA C
3'5'UTRbetaglobin:	CAT GGT GTC TGT TTG AGG TTG CTA GTG AAC ACA GTT GTG TCA GAA GCA AAT GTG C
5'3'UTRbgl.:	GGA AGC TTA GGC CTG CTC GCT TTC TTG CTG TCC
3'3'UTRbgl.min.:	TAA AAG CTT AGC GCT AGG CAG AAT CCA GAT GCT C
3'3'UTRbgl.max.:	CCA AGC TTA GCG CTA GGA GAA ACC ATC TCG CCG
5'globinforHIV:	GAA GAT CTA CAT TTG CTT CTG ACA CAA CT
3'globinforHIV:	GGG GTA CCG GCA GAA TCC AGA TGC TCA AG

C. RESULTATE

1. Konstruktion und Herstellung der retroviralen Vektoren

a. Verbessertes Design eines retroviralen Basisvektors

Die Genexpression eines retroviralen Vektors folgt den Gesetzmäßigkeiten der zellulären Genexpression, weist aber einige Besonderheiten auf. Das virale Transkript wird im 5'LTR initiiert. Die U3-Region des LTRs übernimmt Promotor- und Enhancerfunktionen und beinhaltet zahlreiche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Der im folgenden verwendete Basisvektor MP110 (Design C. Baum, HPI, Abb. 8) enthält LTR-Regionen von MPSV (myeloproliferatives Sarkomvirus). Der MPSV LTR ermöglicht die Transduktion eines großen Wirtszellspektrums, weil der Promotor/Enhancer in relativ undifferenzierten Zellen (z.B. embryonalen Karzinomzellen) und vielen Zellen der Hämatopoese aktiv ist (Bowtell et al. 1988, Franz et al. 1986). Andere verwendete Vektoren (z.B. SF91) enthalten einen SFFV LTR. Dieser beinhaltet einen polyzythämischen Stamm von SFFV (Spleen Focus-Forming Virus), der dem FMCF (Friend Mink Cell Focus forming Virus) verwandt ist. Dieser LTR stellt den stärksten bekannten, retroviralen Promotor/Enhancer in hämatopoetischen Zellen dar. Verglichen mit dem SFFV-Enhancer hat derjenige von MPSV eine etwa 5fach reduzierte Aktivität in myelo-erythroiden Zellen, wohingegen der Mo-MLV-Enhancer um den Faktor 10 schwächer in diesen Zellen einzustufen ist (Baum et al. 1995).

Der retrovirale Leader (5' untranslatierter Bereich) besteht aus der R-Region, der U5-Region, der Primerbindungsstelle (PBS), dem Verpackungssignal (ψ) und enthält gegebenenfalls Spleißsignale. Für die Leaderregion wurde ein sog. ‚gag-frame leader‘ von MESV (Murine Embryonic Stem cell Virus) verwendet. MESV entstand durch Kombination der PCMV-U3 (PCC4-zellpassagiertes MPSV) mit einer mutierten Primerbindungsstelle (tRNA^{Pro} nach tRNA^{Gln}) eines endogenen murinen Retrovirus. Der MESV-Leader verhindert die transkriptionelle Repression einer U3-vermittelten Transaktivierung, die durch einen an die Primerbindungsstelle bindenden Repressor, der an die PBS für tRNA^{Gln} nicht binden kann, vermittelt wird und bei konventionellen Leaderregionen retroviraler Vektoren beobachtet wurde (PBS: tRNA^{Pro}) (Kempler et al. 1993). Die Bezeichnung ‚gag-frame leader‘ deutet an, dass die Leaderregion ‚in frame‘ direkt vor dem Startcodon für gag endet (Position -1 relativ zum gag-ATG) und somit keine gag-Sequenzen enthält. Das schließt eine mögliche Interferenz zwischen viral-kodierenden Sequenzen und Transgenprodukten aus.

Um den einzelnen Effekt verschiedener Klassen von posttranskriptionellen Regulatorelementen (z.B. Spleißelemente u. RNA-Elemente) und deren mögliche Interaktion im Kontext von verschiedenen cDNAs untersuchen zu können, ist vor allem der genaue Leaderaufbau wichtig (Hildinger et al. 1999), da im Leaderbereich endogene Spleißsignale vorkommen können. Die im folgenden am meisten verwendete Vektorserie MP110/11/71 bietet einen modularen Aufbau, der einen präzisen Austausch von Spleißelementen in der 5'UTR und *cis*-aktiven Elementen in der 3'UTR erlaubt (Abb. 8).

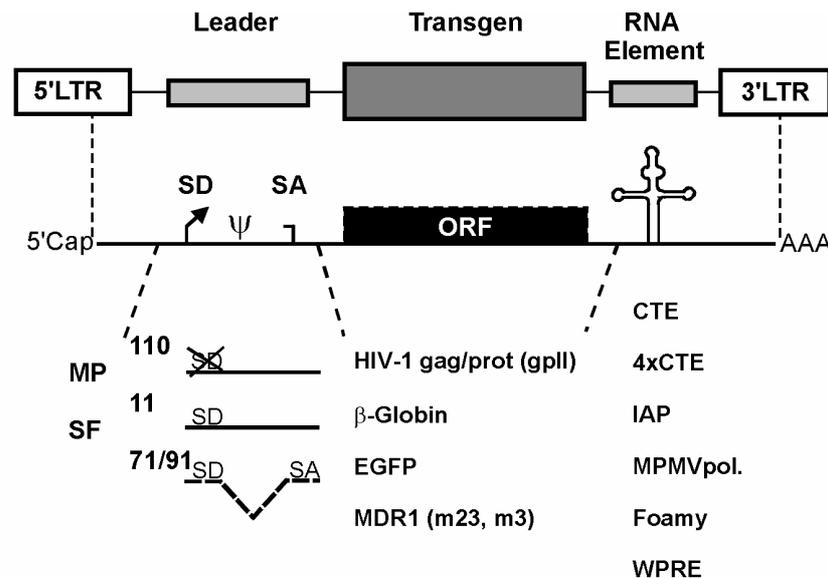


Abb. 8: Schematisches Design der oncoretroviralen Vektoren in dieser Arbeit

Das Schema zeigt den modularen Aufbau der retroviralen Vektoren mit den Long Terminal Repeats (LTR), dem Spleißkontext in der 5' untranslatierten Leaderregion, dem Transgen und posttranskriptionellen Kontrollelementen (RNA-Elemente), welche in die 3' untranslatierte Region inseriert wurden. Die LTRs der MP-Vektoren sind Derivate des MPSV (Myeloproliferative Sarcoma Virus). Der 3' LTR der SF-Vektoren ist vom SFV (Friend Spleen Focus-forming Virus) abstammend, der 5'LTR vom MESV (Murine Embryonic Stem cell Virus). Die gag-deletierte Leaderregion ist vom MESV abgeleitet. Sie beinhaltet entweder keine Spleißsites (Leader 110), einen Spleißdonor (SD) (Leader 11) oder einen Spleißdonor (SD) in Kombination mit einem Spleißakzeptor (SA) (Leader 71 oder Leader 91), was ein das Verpackungssignal ψ umfassendes Intron kreiert. Die benutzten cDNAs waren entweder HIV-1 gag/prot (gpII), humane β -Globin cDNA, das grün fluoreszierende Protein (EGFP) oder das humane Multidrug-Resistenzgen 1 (MDR1). Posttranskriptionelle Kontrollelemente waren entweder das konstitutive Transport Element (CTE) des Mason-Pfizer Monkey Virus oder ein vierfaches Multimer desselben (4xCTE), Elemente aus der pol-Region (Polymerase) des IAP (murines intrazisternales A-Typ Partikel, MIA), Foamyvirus oder MPMV oder das PRE (posttranscriptional regulatory element) des Woodchuck Hepatitis Virus (WPRE).

Es wurden drei Serien von retroviralen Vektoren mit unterschiedlichen Spleißkontexten entwickelt: MP11 besitzt einen aktiven viralen Spleißdonor (SD) in der Leaderregion. MP110 besitzt demgegenüber einen deletierten Spleißdonor, welcher durch ‚site-directed mutagenesis‘ aus MP11 deletiert worden ist. Die Vektorserie MP71/91 enthält neben dem aktiven Spleißdonor einen minimalen Spleißakzeptor (SA), so dass ein Intron entsteht, welches effizient herausgespleißt werden kann. Zwischen SD und SA befindet sich das Verpackungssignal ψ , so dass in den Vektorpartikeln auf die ψ -tragenden, d.h. die nicht gespleißten RNA-Transkripte selektiert wird, da bei Herausspleißen von ψ keine effiziente

Verpackung des gespleißten Transkripts stattfinden kann. In der Zielzelle jedoch kann und soll das Spleißen stattfinden, um so die Genexpression zu steigern. Einen Überblick über die verwendeten Basisvektoren liefert Baum et al. (1995), Eckert et al. (1996) und Hildinger et al (1999).

In den offenen Leserahmen (ORF) wurden verschiedene cDNAs eingesetzt, so die cDNAs von HIV-1 gag/prot (gpII), des humanen β -Globins, des grün fluoreszierenden Proteins (EGFP) oder des humanen Multidrug-Resistenzgens (MDR1). Die für die RNA-Elemente (WPRE, Foamy, CTE u.a.) kodierende DNA wurde jeweils unmittelbar 3' der cDNA eingesetzt, also in die 3'UTR vor dem retroviralen 3'LTR, der das Polyadenylierungssignal enthält.

b. Experimentelle Durchführung

Wie Abb. 2 zeigt, wurde eine Verpackungszelllinie (meist Phoenix amphi) mittels Calciumphosphatmethode oder Lipofektion mit einem retroviralen Vektor transfiziert. Die Transfektionseffizienz in der Verpackungszelllinie wurde durch Kotransfektion von EGFP-Plasmiden (bei Benutzung von retroviralen gpII- oder β -Globin-Vektoren) und nachfolgende Analyse im inversen Fluoreszenzmikroskop oder mittels Durchflusszytometrie bestimmt und lag in der Regel bei 65-80 % transfizierter Zellen. Durch die Transfektion eines retroviralen Vektors und die endogene Produktion von viralen Strukturproteinen in der Verpackungszelllinie wurden Vektor-Partikel (Virus-ähnliche Partikel) hergestellt, die aus dem Überstand der Verpackungszelllinie gewonnen werden konnten. Der Zellüberstand mit den Vektorpartikeln wurde gesammelt, für Folgeexperimente bei -80°C gelagert und konnte ggf. wiederverwendet werden. Allerdings wurden häufig die jeweiligen Überstände direkt verwendet und auf die entsprechenden Zielzellen gegeben, weil dadurch ein geringerer Titerverlust entstand.

Die Anzahl der infektiösen viralen Partikel wird als CFU/ml oder TU/ml angegeben (Colony Forming Units bzw. Transducing Units). Bei der Infektion wurde versucht, möglichst mit der gleichen Anzahl infektiöser Partikel pro Zelle zu arbeiten und die m.o.i. nach Möglichkeit $<0,35$ zu wählen, so dass statistisch nur ein Integrationsereignis wahrscheinlich war. Nach Infektion einer Zielzelle unter Zusatz einer oberflächenaktiven Substanz (Polybren) erfolgte die stabile Integration des retroviral eingebrachten Transgens ins Wirtszellgenom der Zielzelle. In Verpackungszelllinie und Zielzelle erfolgte der Nachweis der spezifischen Transgenexpression auf RNA-Ebene im Northern Blot und Protein-Ebene im Western Blot, in

der Immunfluoreszenz oder im FACS 2 Tage nach Transfektion der Verpackungszelllinie bzw. 6 Tage nach Transduktion der Zielzellen.

Für die identischen Plasmide waren die Titer der zellfreien Vektorüberstände, die in jeweils unabhängig voneinander und mehrfach durchgeführten Transfektionsexperimenten von Phoenix-Zellen erzielt wurden, sehr reproduzierbar (Variation <20 %). Der Titer der retroviralen EGFP-Vektoren lag, wie durch Durchflusszytometrie transduzierter NIH3T3-Zellen ermittelt, im Bereich von $1-5 \cdot 10^6$ infektiösen Einheiten pro ml, jeweils abhängig von den verwendeten Spleiß- und RNA-Elementen sowie zusätzlichen Plasmiden (gag/pol oder VSV-G) (s. Abb. 9).

2. Promotoraktivität und Wirtszelltropismus in Zellen verschiedener Spezies und Titeranalysen

Dieser Abschnitt beschreibt, welches Spektrum an Zielzellen verschiedener Spezies durch die hier verwendeten, oncoretroviralen Vektoren erreicht werden kann (Wirtszelltropismus), wie der Titer in definierten Zielzellkontexten ist und wie gut das EGFP-Transgen von den oncoretroviralen Vektoren in den infizierten Zellen exprimiert wird.

Hierzu wurde zunächst der Vektor MP110EGFP benutzt. Dieser enthält keine Spleiß- oder RNA-Elemente. Er exprimiert das grün fluoreszierende Protein (GFP), welches die Möglichkeit der detaillierten Analyse im FACS bietet. Es wurden Zellen verschiedener Spezies, die mit dem Vektor MP110EGFP transduziert worden waren, einander gegenübergestellt und auf EGFP-Expression analysiert.

Die Anzahl EGFP-positiver, d.h. transduzierter und exprimierender Zellen, gibt bei konstanter Anzahl viraler Partikel ein Maß für den Titer an. Der Titer hängt u.a. vom Zielzellrezeptorbesatz und der Effizienz von ‚Entry‘, reverser Transkription, Integration und Genexpression ab. Die Anzahl der transduzierten Zellen ist in Abb. 9A jeweils auf der linken Seite der y-Achse angegeben.

Die individuelle Expressionsaktivität des MPSV-Promotors (MPSV LTR) wird in einer transduzierten Zelle durch die Expressionsstärke des GFP im FACS symbolisiert. Je stärker der Promotor in einer bestimmten Zelle ist, desto mehr GFP wird produziert und desto stärker leuchtet diese Zelle. Diese Expressionsstärke ist in Abb. 9A auf der rechten Seite der y-Achse dargestellt.

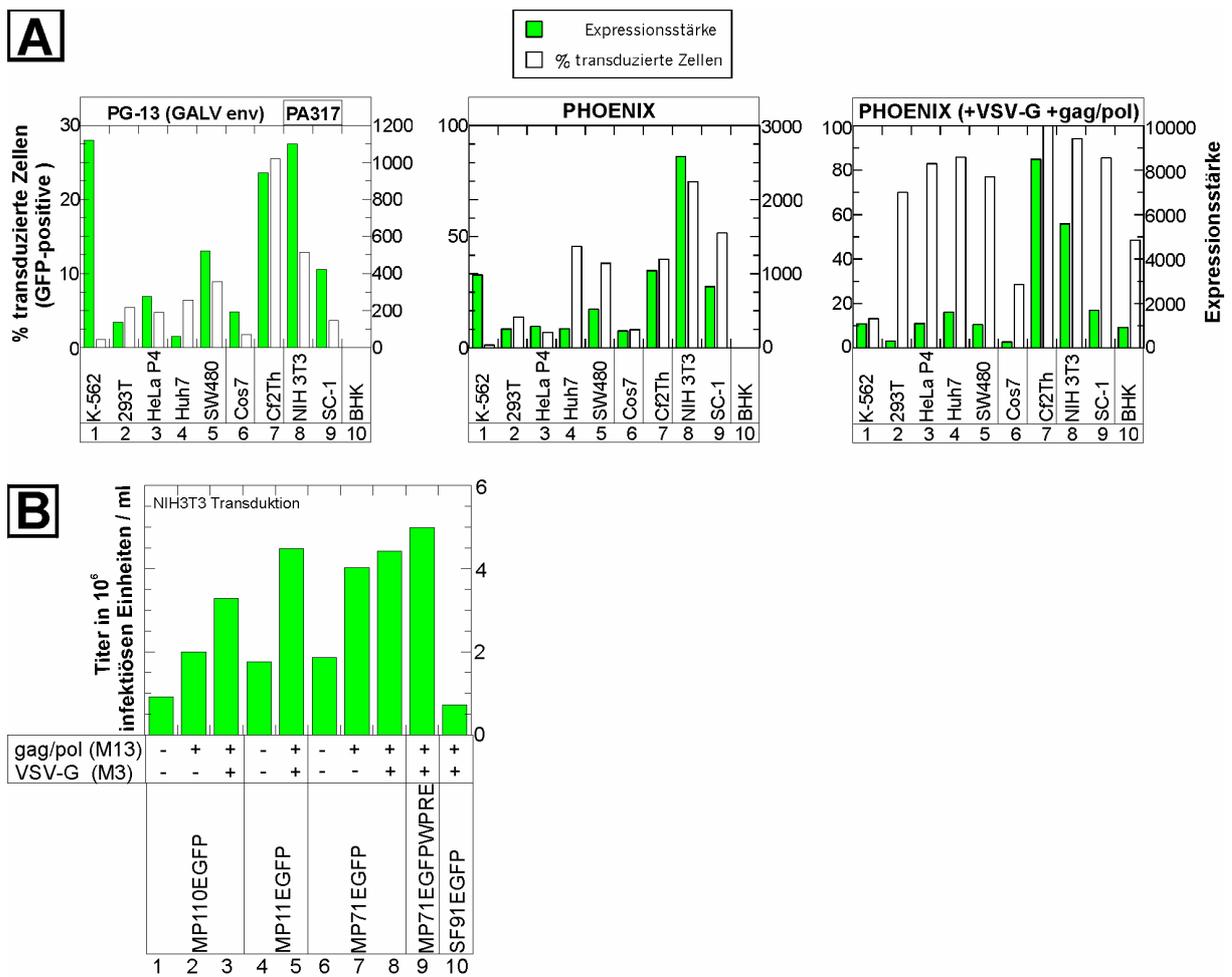


Abb. 9: Bestimmung von Wirtszelltropismus und Titer der verwendeten, oncoretroviralen Vektoren

(A) Die Verpackungszelllinien PG13, PA317 (links) und Phoenix (Mitte, rechts) wurden ohne (links, Mitte) und mit additiven Plasmiden (M13 MuLV-gag/pol, M3 VSV-Glykoprotein) (rechts) mit dem Vektor MP110EGFP transfiziert. Nachfolgend wurden mit dem jeweils gleichen Überstand dieser Ansätze Zellen verschiedener Säugetierspezies transduziert: K-562, 293T, HeLa P4, Huh7, SW480 (humane Zelllinien), Cos7 (Affe), Cf2Th (Hund), NIH3T3, SC-1 (Maus) und BHK (Hamster). Mittels FACS-Analyse wurden die prozentuale Anzahl der (GFP-positiven) transduzierten Zellen (weiß, rechte Säulen) und deren mittlere Fluoreszenzintensität, dargestellt als Expressionsstärke (Maß für die Promotoraktivität in der Zielzelle, grün, linke Säule), ermittelt. Die jeweiligen Skalierungen wechseln innerhalb der Abbildungen (s. individuelle Beschriftung).

(B) NIH3T3-Zellen wurden mit viralem Phoenix-Überstand der Vektoren MP110EGFP (Spur 1-3), MP11EGFP (Spur 4 u. 5), MP71EGFP (Spur 6-8), MP71EGFP βWPRE (9) und SF91EGFP (10) transduziert, z.T. unter Verwendung von MuLV-gag/pol (M13) und VSV-G(lykoprotein)-exprimierenden Plasmiden (M3) (s. Beschriftung links). Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie 5 Tage nach Transduktion (Rechenalgorithmus s. Text). Die ermittelten Titer bewegen sich bei Verwendung von NIH3T3-Zellen jeweils abhängig von den verwendeten Plasmiden zwischen $1-5 \cdot 10^6$ infektiösen Einheiten pro ml verwendetem Überstand.

Für die Analyse von posttranskriptionell aktiven Elementen war es wichtig, ein System zu etablieren, das sich der besten Verpackungszelllinie und der richtigen Zielzelllinien bedient.

Dementsprechend wurden verschiedene Verpackungszelllinien getestet:

- die amphotropen Verpackungszelllinien PA317 (Miller et al. 1986) und PHOENIX ampho (Kinsella et al. 1996)
- die ein Primaten-Hüllprotein exprimierende Verpackungszelllinie PG13 (Miller et al. 1991).

Diese differieren in der individuellen Transfizierbarkeit, im produzierten Titer und im verwendeten Hüllprotein. Um die optimalen Zielzellen und das Wirtszellspektrum der durch die verschiedenen Verpackungszelllinien produzierten viralen Partikel zu bestimmen, wurden Zelllinien verschiedener Spezies transduziert. Die produzierten viralen Partikel wurden hierbei auf ihre Fähigkeit überprüft, Zellen eines weiten Spektrums der Säugetierspezies zu infizieren (Abb. 9A). So wurden 5 Zelllinien des Menschen (K-562, 293T, HeLa P4, Huh7, SW480), zwei Zelllinien von Mäusen (NIH3T3, SC-1) und je eine Zelllinie vom Affen (Cos7), Hund (Cf2Th) und Hamster (Baby Hamster Kidney) verwendet.

Im Experiment der Abb. 9A wurden PG13- und PA317-Zellen sowie Phoenix amphi-Zellen mit dem Vektor MP110EGFP transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurde von dem gleichen, frischen Überstand eines Experiments je 1 ml auf $1 \cdot 10^4$ Zielzellen transferiert, um diese in Gegenwart von Polybren zu transduzieren. In Abb. 9A wurden links PG13- und PA317-Überstände verwendet, mittig und rechts Phoenix-Überstände. Die verschiedenen transduzierten Zielzellen wurden später gleich behandelt, 6 Tage weiterkultiviert und schließlich im FACS analysiert. In der Abb. 9A (links und Mitte) ist die FACS-Auswertung der Transduktion der jeweils unten angegebenen Zielzellen angegeben. Jeweils links auf der Ordinate ist die prozentuale Anzahl der transduzierten Zellen angegeben (s. weiße Säulen, Maß für den Titer), rechts deren Expressionsstärke (s. grüne Säulen, Maß für die Promotoraktivität).

PG13-Zellen sind als NIH3T3-Derivate relativ schlecht mittels Calciumphosphatmethode transfizierbar (Transfektionseffizienz $<4\%$) und produzieren folglich einen niedrigen Titer. Daher war der Phoenixüberstand (Transfektionseffizienz von Phoenixzellen $>60\%$) in der Lage, prozentual mehr Zellen zu transduzieren (z.B. Huh7 610 % mehr, SW480 330 % mehr, Spur 4 u. 5) als der vergleichbare PG13-Überstand (vgl. mittleres u. linkes Säulendiagramm). Insgesamt erreichte das GALV-Hüllprotein (env von PG13) alle dargestellten Zellen bis auf Mäuse- (NIH3T3, SC-1) (nicht gezeigt) und Hamsterzellen (BHK). Zur Infektion der Mäusezellen wurde anstelle der PG13- die PA317-Zelllinie (NIH3T3-Derivat, amphotropes Hüllprotein) verwendet. Hamsterzellen (BHK, Spur 10) waren weder von PG13- noch von amphotropen Phoenix-Überständen transduzierbar.

Unter den humanen Zelllinien ließen sich besonders gut SW480-Zellen durch Phoenix- und PG13-Überstände transduzieren (Spur 5). Auch Cf2Th- (Hund, Spur 7) sowie NIH3T3- und SC-1-Zellen (Maus, Spur 8 u. 9) waren sehr gut transduzierbar. Die Expressionsstärke als

Maß der Promotoraktivität war vor allem in K-562-, SW480-, Cf2Th-, NIH3T3- und SC-1-Zellen stark ausgeprägt.

Festzuhalten bleibt, dass SW480 und Cf2Th als geeignete Zielzellen für nachfolgende Analysen identifiziert wurden, da sie gut infizierbar waren und in ihnen die verwendeten, oncoretroviralen Vektoren gut exprimiert wurden. Dementsprechend wurden diese Zelllinien für die meisten Versuche in dieser Arbeit verwendet. Als beste Verpackungszelllinie wurde die Phoenixzelllinie für die meisten Experimente verwendet.

Der gute Titer der Phoenix-Zellen kann durch Pseudotypisierung der viralen Partikel mit dem Glykoprotein des vesikulären Stomatitisvirus (Kotransfektion von VSV-G) noch deutlich gesteigert werden. Darüber hinaus kann die Kotransfektion eines zusätzlichen MuLV gag/pol-exprimierenden Plasmides den Titer ebenfalls weiter steigern. Das rechte Säulendiagramm der Abb. 9A zeigt, dass 293T, HeLa P4, Huh7, SW480, Cf2Th, NIH3T3 und die zuvor noch nicht transduzierbaren BHK (Spur 10) bei Kotransfektion von VSV-G und MuLV gag/pol zwischen 48 % und 100 % transduzierte Zellen aufweisen. Die höheren Expressionsstärken unter Verwendung der zusätzlichen VSV-G- und MuLV gag/pol-Plasmide sind durch eventuell vorhandene Mehrfachintegrate bedingt, weil ab 40 % Transduktionseffizienz die Wahrscheinlichkeit für Mehrfachintegrate steigt (Abb. 19C). Dies erklärt, warum die Spuren 2-5 und 7-9 in Abb. 9A rechts bei einem hohen Prozentsatz transduzierter Zellen eine stärkere Expressionsstärke aufweisen.

Abb. 9B quantifiziert den Titer von Phoenixüberständen genauer. Titeranalysen werden in der Regel auf eine bestimmte Zelllinie, zumeist NIH3T3, bezogen. In welcher Weise die Vektoren durch Zusatz von Spleiß- oder RNA-Elementen sowie durch Addition eines gag/pol- bzw. VSV-G-Plasmides Veränderungen im Titer erfahren, ist in Abb. 9B dargestellt. 10 oder 100 µl des viralen Phoenix-Überstandes wurden - aufgefüllt auf 1 ml - zur Transduktion von $1 \cdot 10^5$ NIH3T3-Zellen genutzt. Die Analyse der transduzierten Zellen erfolgte 5 Tage nach Transduktion in der Durchflusszytometrie (FACS). Über den Prozentsatz der transduzierten Zellen wurde der Titer in Kenntnis der eingesetzten Zellzahl von NIH3T3 und des Volumens des viralen Überstandes berechnet (Titer = infektiöse Einheiten / ml Überstand). Bei der Bestimmung in NIH3T3-Zellen bewegte sich der ermittelte Titer zwischen $1 \cdot 5 \cdot 10^6$ infektiösen Einheiten pro ml viralen Überstandes (Abb. 9B). In Spur 1 wurde in der Verpackungszelllinie nur der Vektor MP110EGFP (ohne Spleißelemente) transfiziert, was in einem Titer von $1 \cdot 10^6$ /ml Überstand resultierte. Kotransfektion von gag/pol (Expressionsplasmid M13, Spur 2, 3, 5, 7, 8) sowie von gag/pol und VSV-G (M3

Expressionsplasmid, Spur 3, 5, 8) erhöhte den Titer sowohl im Kontext der Vektoren MP110EGFP (ohne Spleißelemente) als auch MP11EGFP (mit Spleißdonor) und MP71EGFP (mit funktionellem Intron). Einen geringen positiven Effekt auf den Titer hatte die Verwendung eines WPRE im Vektor MP71EGFP β WPRE (vgl. Spur 9 mit 8) sowie die Verwendung eines Spleißdonor und eines kompletten Introns in den EGFP-Konstrukten (vgl. Spur 4 u. 6 mit 1). Der in Spur 10 gezeigte Vektor SF91EGFP unterscheidet sich im wesentlichen von MP71EGFP (Spur 6) durch Verwendung eines 5'MESV- und 3'SFFV-LTR und produziert einen etwa zweifach niedrigeren Titer.

Die Titeranalyse lässt sich alternativ mittels eines Resistenzgens und Endpunktverdünnung (*limited dilution*) des viralen Überstands bei Zugabe einer definierten Zielzellanzahl durchführen (Abschnitt 9.11. in Ausubel et al. 1995). Es wurde eine Neomycin- oder Hygromycinresistenzgenkassette (Hygromycin-Thymidinkinase-Fusionsprodukt) verwendet, um den Titer zu bestimmen. Dabei wurde für die Vektoren MP110, MP11 und MP71 unter Verwendung von NIH3T3-Zellen ein Titer in der Größenordnung von $5-7 \cdot 10^5$ infektiösen Einheiten pro ml viralen Überstandes ermittelt (Daten nicht gezeigt). Der etwas niedrigere Titer hat seine Ursache in dem im Vergleich zu EGFP größeren Transgen und schwierigeren Nachweis über ‚*limited dilution*‘ sowie der Kultivierung mit dem entsprechenden Antibiotikum (G418 bzw. Hygromycin). Schwach Resistenzgen-exprimierende Zellen werden durch diese Methode nämlich nicht erfasst, während eine schwächere EGFP-Expression im FACS dargestellt werden kann.

3. Einfluss von RNA-Elementen auf die HIV-1 gag-Expression

a. Hintergrund

HIV-1 gag/prot (gpII) kodiert für die Strukturproteine (gag) und die virale Protease (prot). Der nukleäre Export der korrespondierenden mRNA wird bei HIV-1 durch das virale Rev-Protein bewerkstelligt, welches an das auf entsprechenden HIV-RNAs befindliche RRE (Rev Responsive Element) bindet. Ursache der Notwendigkeit eines nukleären Exportsystems ist die nukleäre Retention der kodierenden RNA entweder durch *cis*-aktive Signale oder durch vorhandene Spleißsignale in den flankierenden Sequenzen (s. Abschnitt D.1.). Das konstitutive Transportelement (CTE) von MPMV kann das Rev/RRE-System beim nukleären Export substituieren, indem es durch Bindung an zelluläre Faktoren (z.B. TAP) den RNA-Transport der intronhaltigen HIV-RNAs besorgt.

Um den Einfluss posttranskriptionell aktiver RNA-Elemente auf die Expression eines Element-abhängigen Transgens zu untersuchen, wurden die HIV-1 gag/prot-Kassette (gpII) plus jeweiligem RNA-Element in einen Mo-MLV- basierten retroviralen Vektor umgesetzt.

b. Einfluss posttranskriptionell aktiver Elemente auf die HIV-1 gag-Expression in der Verpackungszelllinie

In der Verpackungszelllinie werden diejenigen Konstrukte benachteiligt, die keine oder nur schwach wirksame Elemente beinhalten. Die Transduktion der Zielzellen (Cf2Th, SW480 u.a.) wurde ohne Abgleich der Titer durchgeführt. Damit wird die Expression in der Zielzelle von HIV-1 gag/prot durch nachfolgende Variablen bestimmt:

- a) Differenzen in der Transgendosis, weil veränderte Prozessierung und nukleärer Export von Vektor-RNA in der transfizierten Verpackungszelllinie den Vektortiter maßgeblich beeinflussen.
- b) Differenzen in der posttranskriptionellen RNA-Prozessierung und im Export in der retroviral transduzierten Zielzelle.

Aus diesem Grund werden zunächst die Vorgänge für wichtige RNA-Elemente (IAP, CTE) und Spleißfaktoren in der Verpackungszelllinie Phoenix betrachtet.

Die Konstrukte MP110gpII (-)/IAP/CTE/4xCTE (kein Spleißdonor im gag-frame Leader) wurden einschließlich ihrer Derivate mit deletiertem HIV-Spleißdonor (gpII~~SD~~) in die amphotrope Phoenixzelllinie transfiziert (Abb. 10A) und die Überstände zur Transduktion von Cf2Th-Zellen (Abb. 10B) verwendet. Ebenso wurde die gpII-Kassette in verschiedenen Spleißkontexten (MP11/71) getestet. Die hier benutzte HIV-1 gag/prot-Kassette (**gpII**) besteht aus HIV-1 **gag** (gruppenspezifisches Antigen) sowie der viralen **Protease** und enthält einen kleinen Abschnitt der 5'UTR mit dem funktionellen Hauptspleißdonor von HIV-1 (Major Splice Donor) (Mergener et al. 1992).

In Abb. 10A sind im Western Blot die Zelllysate von transfizierten Phoenix-Zellen mit Capsid-spezifischen Antikörpern gefärbt. Der Blot zeigt die 55 kDa Bande des Pr55-Vorläuferproteins. Die übrigen, kleineren Banden korrespondieren mit Spaltungsprodukten des Gag-Polyproteins (z.B. Capsid bei 24 kDa). Die in Spur 2 gezeigte Basalexpression des Vektors MP110gpII konnte durch Addition des IAP- und CTE-Elementes deutlich und durch das 4xCTE besonders stark erhöht werden. Zusätzliche Spleißelemente verminderten im Kontext von MP11gpII (mit Spleißdonor, Spur 9-11) und MP71gpII (mit Intron, Spur 12-14)

die gag-Expression, was hier auch durch Addition eines IAP- oder CTE-Elementes nicht kompensiert wurde. Die Deletion des HIV *Major Splice Donor* in den gpII-Konstrukten (benannt **SD-**, Spur 6-8) führte zu einer zusätzlichen Verringerung der gag-Expression, wobei die Präsenz des IAP-Elementes die Expression gegenüber der Basalexpression nur geringfügig steigern konnte (vgl. Spur 7 u. 6).

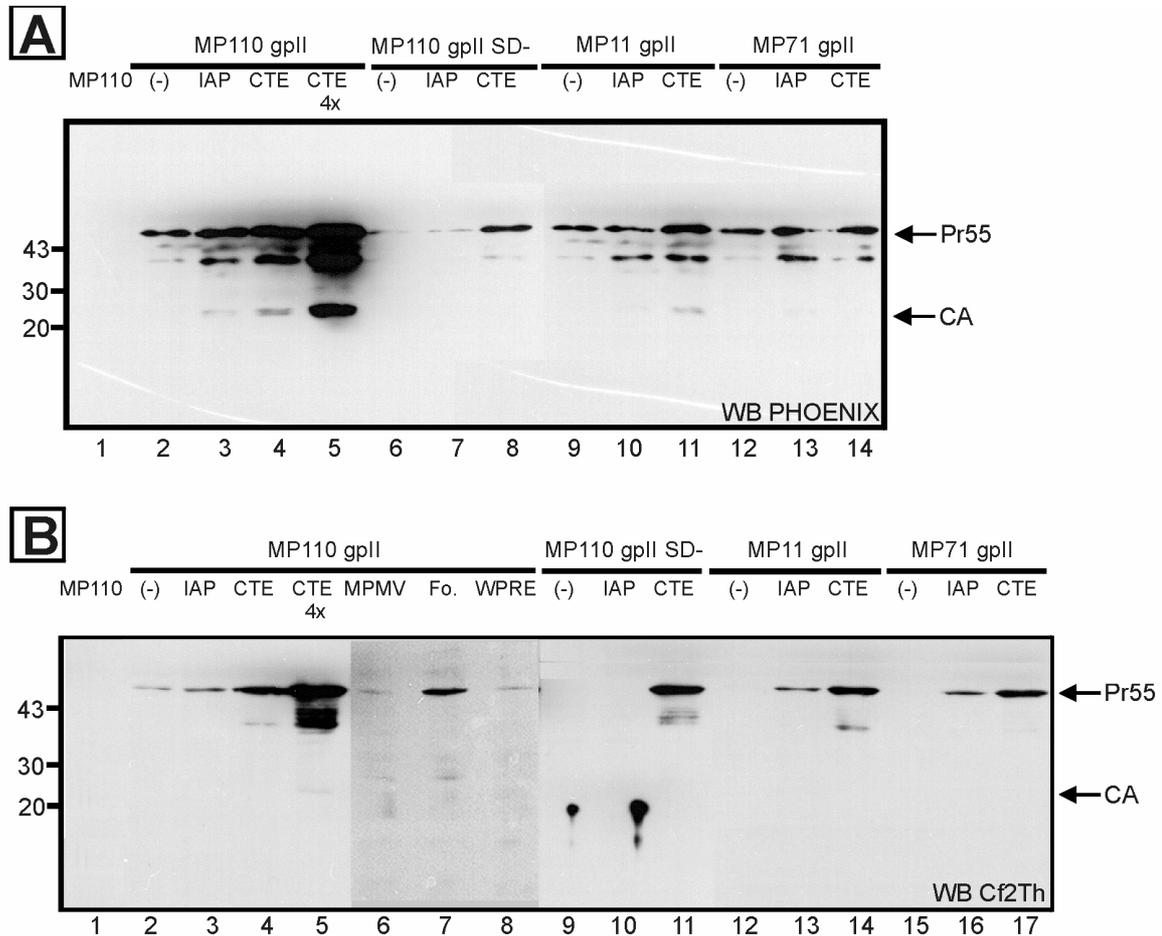


Abb. 10: Posttranskriptionelle Kontrollelemente modulieren die HIV-1 gag-Expression

(A) Western Blot von transfizierten Phoenix-Zellen: Die Spuren 1-14 zeigen Zelllysate von Phoenix-Zellen, die mit Vektorderivaten von MP110, MP11 und MP71 transfiziert wurden. Der Leervektor MP110 (Spur 1), MP110gpII ohne RNA-Element (Spur 2) und MP110gpII mit den posttranskriptionellen Kontrollelementen IAP (3), CTE (4), 4xCTE (5) sind dargestellt. Die folgenden Spuren markieren den jeweiligen gpII-Vektor im MP110 **SD-** (deletierter HIV Major Splice Donor, Spur 6-8), MP11 (9-11) und MP71 Kontext (12-14). Die Pfeile geben die Laufhöhe des Gag-Polyproteins (Pr55) und des Capsid-Spaltungsproduktes (CA-Protein) an. Die übrigen Banden stellen die HIV-1 Gag-Spaltungsintermediate dar. Molekulare Massenstandards sind in kDa auf der linken Seite aufgelistet.

(B) Western Blot von transduzierten Cf2Th-Zellen: Die Spuren 1-17 markieren Zelllysate von mit MP-Vektorüberständen transduzierten Cf2Th-Zellen. Beschriftung von Vektoren, Massenstandards und Pfeilmarkierungen analog der in A verwendeten Nomenklatur. Die Spuren 6, 7 und 8 kennzeichnen transduzierte Cf2Th-Zellen, welche mit den Vektoren MP110gpII MPMVpol. bzw. Foamy oder β WPRE transduziert wurden und keine Korrelate in A aufweisen.

Die mit HIV-1 gag/prot-Vektoren transfizierten Zelllinien produzieren HIV-1 ähnliche virale Partikel, die in den Überstand des Mediums freigesetzt werden. Der Überstand der mit den Vektoren der Spuren 2-5 transfizierten Verpackungszelllinie Phoenix wurde im ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) analysiert (Daten nicht gezeigt). Dieser Assay

quantifizierte die HIV-1 Strukturproteine im Überstand mittels eines entsprechenden Capsid-Antikörpers. Konkordant mit dem Ergebnis des Western Blots (Abb. 10A) lieferte der Vektor MP110gpII 4xCTE den höchsten Wert.

Festzuhalten bleibt, dass besonders die Vektorserie MP110gpII und insbesondere die Addition des 4xCTEs eine hohe Expression in der Verpackungszelllinie gewährleistet.

c. Einfluss posttranskriptionell aktiver Elemente auf die HIV-1 gag-Expression in der Zielzelle

Die Überstände der in Abb. 10A analysierten Phoenixzellen wurden unter Einsatz der oberflächenaktiven Substanz Polybren zur Transduktion von $1 \cdot 10^5$ Zielzellen (u.a. Cf2Th, SW480) genutzt. Nach Zugabe frischen Mediums wurden die Zellen 6 Tage weiterkultiviert. Dann erfolgte ein neuer Nachweis im Western und Northern Blot sowie in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie.

Abb. 10B zeigt einen Western Blot von Zelllysaten aus Cf2Th-Hundezellen, die mit den Überständen aus Abb. 10A transduziert worden sind. Analog zu den Vorgängen in der Verpackungszelllinie liefert der Vektor mit dem 4xCTE (Spur 5) das beste Signal, wohingegen die weiteren Elemente quantitativ in der Reihenfolge CTE > Foamy > IAP (Spur 4, 7 u. 3) die gag-Expression zu stimulieren vermochten. Die Spuren 6-8 zeigen die gag-Expression von MP110gpII-Vektoren mit MPMVpol., Foamy- oder β WPRE-Element. (cave: für diese Vektoren sind die korrespondierenden Spuren in Abb. 10A nicht dargestellt). Die Addition eines β WPRE- oder eines 1,6 kb MPMVpol.-Elementes (Spur 8 u. 6) lieferte keine Stimulation.

Zellen unterschiedlicher Spezies wurden mit Vektorpartikeln des besten gpII-Vektors (MP110gpII 4xCTE) infiziert, um zu zeigen, dass HIV-Strukturproteine in diesen Zellen exprimiert werden. Derselbe virale Überstand wurde zur Transduktion der verschiedenen Zielzellen verwendet und jeweils 1 ml von diesem auf jeweils $1 \cdot 10^5$ Zielzellen transferiert. 7 Tage nach Transduktion wurden die Zellen mit Methanol/Aceton-Lösung fixiert und die Expression der HIV-1 Gag Strukturproteine in der indirekten Immunfluoreszenz unter Verwendung eines monoklonalen anti-p24-Antikörpers (mAK 183) und eines anti-Maus-FITC Antikörpers nachgewiesen. Abb. 11 zeigt Gag-Expression in SW480- (human), NIH3T3- (Maus), CHO- (Hamster), Cf2Th- (Hund), Cos7- (Affe) und Q8-Zellen (Wachtel) (Abb. 11D-I). Demgegenüber wies der Kontrollansatz mit SW480-Zellen, die mit den

Vektoren MP110 (Leervektor, A) bzw. MP110gpII (B) transduziert worden sind, keine Gag-Expression auf. Unter Verwendung des Vektors MP110gpII CTE (C) stellte sich eine schwächere Expression als mit dem Referenzvektor MP110gpII 4xCTE (D-I) dar.

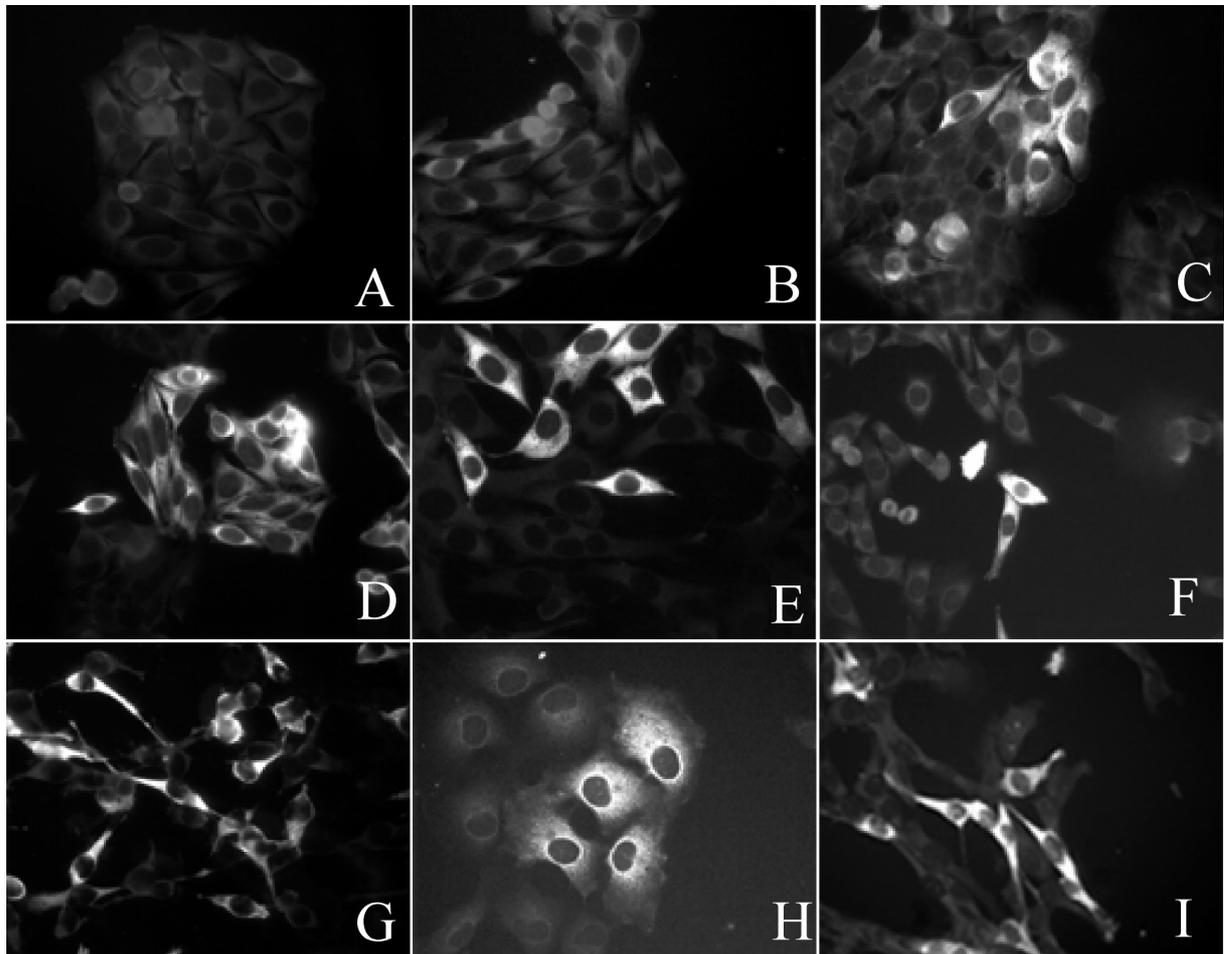


Abb. 11: Analyse der CTE-vermittelten Gag-Expression in Zelllinien verschiedener Spezies

Immunfluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen von transduzierten Zelllinien verschiedener Spezies. Die Bilder D-I zeigen Transduktionen von SW480- (D, humane Zelllinie), NIH3T3- (E, Maus), CHO- (F, Hamster), Cf2Th- (G, Hund), Cos7- (H, Affe) und Q8-Zellen (I, Wachtel) mit dem Vektor MP110gpII 4xCTE. Die Bilder A-C stellen Transduktionen mit den Vektoren MP110 (A, Leervektor), MP110gpII (B) und MP110gpII CTE (C) dar. Die Zellen wurden jeweils 7 Tage nach Transduktion fixiert und die HIV-1 spezifischen Produkte durch indirekte Immunfluoreszenz mittels eines Antiserums gegen Capsid bestimmt.

Der Einfluss verschiedener RNA-Elemente auf die HIV-1 gag-Expression in transduzierten Zellen wurde außerdem auf RNA-Ebene im Northern Blot analysiert (Abb. 12). SW480-Zellen wurden mit Überständen von Phoenixzellen, die mit MP110gpII (-) / CTE / 4xCTE transfiziert worden waren, transduziert. 6 Tage danach wurde die Gesamt-RNA aus den transduzierten SW480-Zellen gewonnen und im Northern Blot analysiert. Abb. 12 zeigt den Northern Blot nach Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde, die aus der kodierenden gpII-Sequenz generiert wurde. In den Spuren 1 und 2 sind mit den Vektoren MP110 (Leervektor, Spur 1) und MP110gpII (2) transduzierte SW480-Zellen als Kontrolle zu sehen. Die Spur 1 zeigt kein Signal, da die MP110-RNA durch die aus der gpII-Region generierte Sonde nicht nachgewiesen wird. Während Spur 2 ein schwaches Signal liefert,

weisen die Spuren 3 und 4 mit den Vektoren MP110gpII CTE bzw. 4xCTE deutliche stärkere Signale auf. Darüber hinaus legt das höhere Molekulargewicht des 4xCTE-Transkriptes (Spur 4) im Vergleich zu den Spuren 2 (kein RNA-Element) und 3 (einfaches CTE) nahe, dass die Oligomerisierung einer komplexen RNA-Sequenz (CTE) kompatibel mit dem Vorgang der reversen Transkription ist.

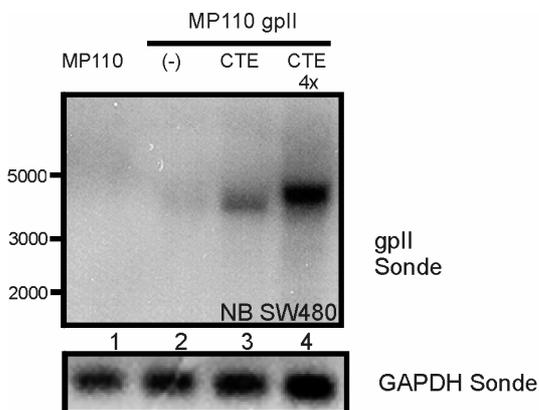


Abb. 12: Steigerung der HIV-1 gag RNA-Expression durch CTEs

Northern Blot von transduzierten SW480-Zellen: Die Transduktion wurde durchgeführt mit den Vektoren MP110, MP110gpII oder mit Derivaten von MP110gpII mit einem einfachen oder vierfachen (4x) CTE (Spur 1-4). Die gag-spezifische RNA wurde mit einer radioaktiv markierten Sonde detektiert, die aus der kompletten gag/prot-kodierenden Region generiert wurde und somit in allen MP110gpII-Derivaten präsent war. Molekulare Größenstandards sind zur linken in Basenpaaren angegeben. Der Blot wurde mit einer radioaktiv markierten GAPDH-detektierenden Sonde rehybridisiert.

d. Auf CTE basierende lentivirale Vektoren können das Rev/RRE-System partiell ersetzen

In b. und c. wurde gezeigt, dass die Expression der HIV-1 Gag-Strukturproteine durch multimere Kopien des MPMV-CTE gesteigert werden kann, wenn gag in einem retroviralen Vektor transduziert wird. Bei der Verwendung lentiviraler Systeme bilden die HIV-1 Strukturproteine einen Teil des Partikel-produzierenden Systems der Verpackungszelllinie. Auch in diesem Fall kann deren Expression durch Einsatz multimerer Kopien des CTEs gesteigert werden.

Um dieses experimentell zu zeigen, wurde das lentivirale Vektorsystem von L. Naldini (Kay et al. 2001, Naldini et al. 1996b) modifiziert. Das in Dull et al. (1998) verwendete gag/pol-exprimierende Helferplasmid pMDLg/pRRE dieses Systems (Abb. 13) wurde hierzu teilweise durch ein eigenes gag/pol-Plasmid (pcDNA3g/p4xCTE) ersetzt. In den pcDNA3-Vektor wurde die gag/pol-Kassette mit vorangehendem Globintron aus dem pMDLg/pRRE-Plasmid kloniert und mit einem 4xCTE verknüpft (pcDNA3g/p4x-CTE, Abb. 13).

Das von Naldini entwickelte System basiert auf transienter Transfektion von 293T-Zellen. Hierbei werden lentivirale Partikel produziert, die eine EGFP-kodierende Reporter-RNA transduzieren. Zur Partikelproduktion wurden jeweils der EGFP-tragende Transfervektor pRRLsin18.PPT.hPGK.eGFPpre, ein VSV-G Plasmid (pMD.G) und pRSV-Rev transfiziert.

Rev/RRE führt zur zytoplasmatischen Akkumulation ungespleißter RNA. Die Zugabe von Rev war aus zwei Gründen für den Transfektor erforderlich. Erstens verhindert Rev/RRE, dass das 5' Intron, welches ein RRE enthält, effizient gespleißt wird und so das ebenfalls im Intron lokalisierte Verpackungssignal verloren geht. Zweitens ist Rev/RRE zum effizienten Export gag-haltiger Sequenzen im Leaderbereich ebenfalls notwendig. Abb. 13 liefert eine Übersicht über das verwendete lentivirale Vektorsystem.

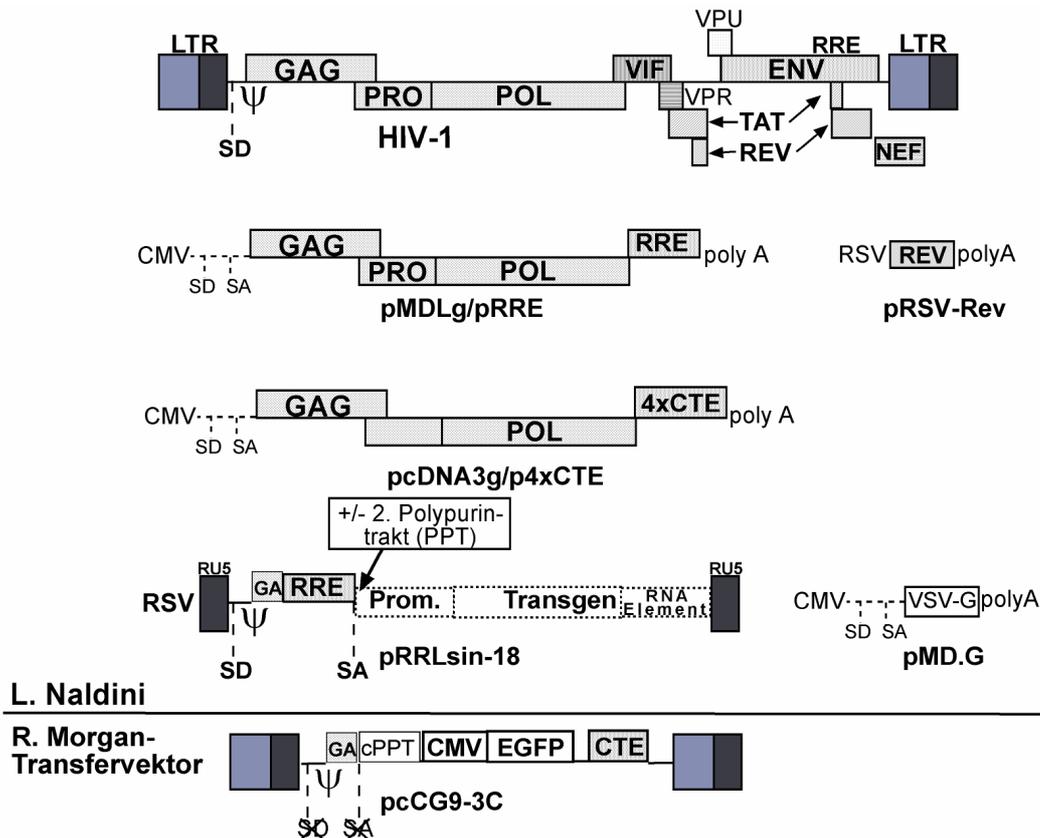


Abb. 13: Darstellung des lentiviralen Vektorsystems

Schematische Zeichnung des HIV-Provirus (oben) und der benötigten Konstrukte, um einen Lentivirus-Vektor der dritten Generation zu erstellen. Die viralen HIV-LTRs, die Leserähmen der viralen Gene, der Hauptspleißdonor (SD), das Verpackungssignal (ψ) und das RRE bzw. das 4xCTE sind in fettgedruckter Schrift angegeben. Das Helferplasmid, pMDLg/pRRE bzw. 4xCTE, exprimiert die gag- und pol-Gene durch einen CMV-Promotor und enthält das Intron 2 und das polyA-Signal des humanen β -Globins. Da die Transkripte der gag- und pol-Gene *cis*-repressive Elemente enthalten, werden sie nur exprimiert, wenn ein System zum nukleären Export (Rev/RRE oder 4xCTE) an das Konstrukt gekoppelt ist. Ein nicht-überlappendes Konstrukt, pRSV-Rev, exprimiert die Rev cDNA. Der Transfektor pRRLsin-18 enthält HIV-1 *cis*-agierende Sequenzen und eine Expressionskassette für das Transgen (inkl. RNA-Element). Dieses Transkript ist der einzige Teil, der in die Zielzelle transferiert wird. Der Transfektor enthält keine Wildtyp-Kopien des HIV-LTR. Der 5'LTR ist ein chimäres Konstrukt, in dem der Enhancer/Promotor von RSV die U3-Region ersetzt, um die transkriptionelle Abhängigkeit von Tat auszuschalten. Der 3'LTR beinhaltet eine fast komplette Deletion der U3-Region, welche auch die TATA-Box (Nukleotid -418 bis -18 relativ zu der U3/R Grenze) umfasst. Da der 3'LTR im Zuge der reversen Transkription die Matrize für beide LTRs darstellt, resultiert die Transduktion dieses Vektors in transkriptioneller Inaktivierung des 5'LTR. Daher ist dieser LTR **selbstinaktivierend** (sin). Das Konstrukt pMD.G kodiert für das heterologe Hüllprotein VSV-G (das Glykoprotein des vesikulären Stomatitisvirus), um den Vektor zu pseudotypisieren. Nur die relevanten Teile der Konstrukte sind angegeben. Unten ist ein Transfektor von R. Morgan (NIH) schematisch gezeigt, der im Abschnitt Diskussion noch angesprochen wird.

In Vorexperimenten produzierte das neu erstellte Plasmid pcDNA3g/p4xCTE im Western Blot eine stärkere Gag-Expression (40% mehr) als der Referenzvektor pMDLg/pRRE (Daten nicht gezeigt). Analog dazu konnte im ELISA aus dem Überstand der transfizierten Zellen virales Capsid in den angegebenen Relationen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Die 293T-Zelllinie wurde mit folgenden Plasmiden transfiziert (Abb. 14): 5 µg eines Transfervektors (pRRL.sin.PPT.hPGK.EGFPpre oder SRV-1 cte), 15 µg eines gag/pol-Helferplasmids (pMDLg/pRRE oder pcDNA3g/p4xCTE), 3 µg eines VSV-G-Plasmids (pMD.G) und in einigen Ansätzen 5 µg eines Rev-Expressionsplasmids (pRSV-Rev). 48 Stunden nach Transfektion erfolgte die Analyse der Zellen im FACS (Abb. 14A). Je 0,2 ml des Partikel-tragenden Überstands wurde verwendet, um $1 \cdot 10^5$ SW480-Zellen zu transduzieren. 6 Tage nach Transduktion erfolgte die Auswertung der EGFP-Expression der transduzierten SW480-Zellen im FACS (Abb. 14B).

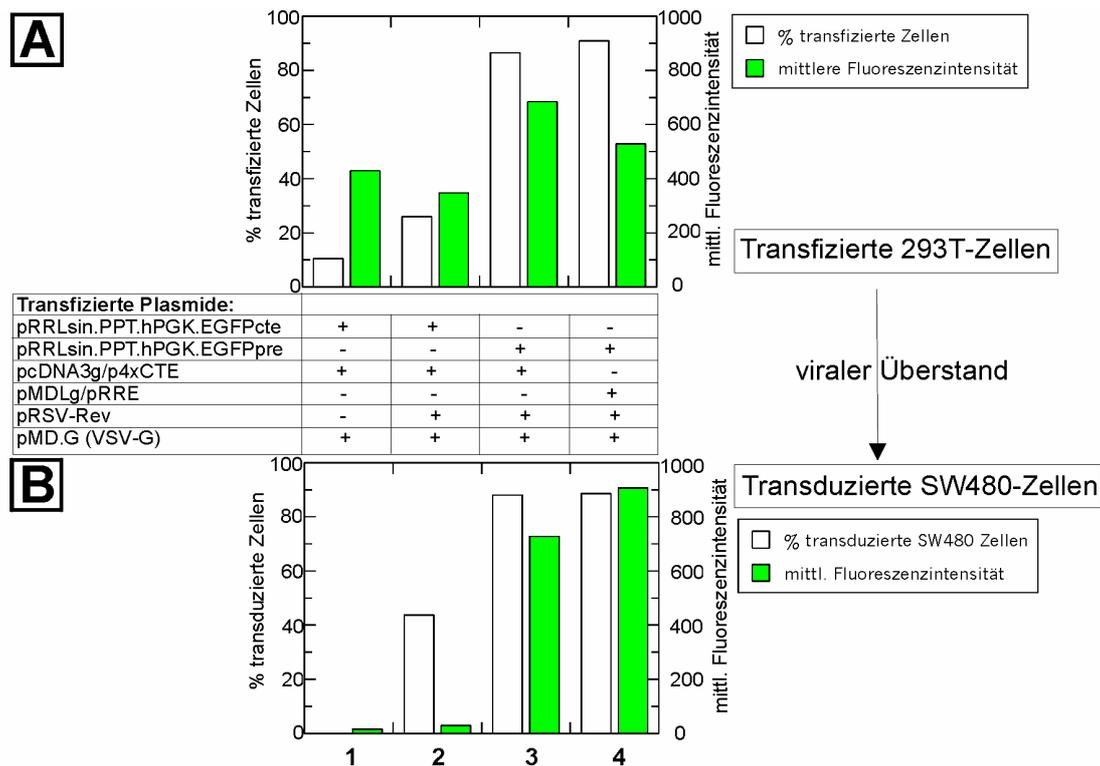


Abb. 14: CTE-haltige lentivirale Vektoren können das Rev/RRE-System beim Gentransfer partiell ersetzen

- (A) 293T-Zellen wurden mit den lentiviralen Vektoren (pRRLsin.PPT.hPGK.EGFP Derivate) inkl. SRV1-CTE oder WPRE, gag/pol-exprimierenden Helferplasmiden pcDNA3g/p4xCTE (MPMV-CTE) bzw. pMDLg/pRRE (RRE-haltig), pMD.G (VSV-G-Plasmid) und zum Teil mit einem Rev-Plasmid (RSV-Rev) transfiziert (Angabe der verwendeten Plasmide links). Die Zellen wurden nach 2 Tagen auf Anzahl der EGFP-positiven Zellen (weiße Säulen, Beschriftung links) und deren mittlere Fluoreszenzintensität (grüne Säulen, rechts) mittels Durchflusszytometrie untersucht.
- (B) Mit dem viralen Überstand der transfizierten 293T-Zellen wurden SW480-Zellen transduziert. 6 Tage nach Transduktion wurden die Prozentzahl der EGFP-positiven Zellen (% transduzierte Zellen, weiße Säulen, Beschriftung links) und deren mittlere Fluoreszenzintensität (grüne Säulen, rechts) mittels FACS ermittelt.

Auf der x-Achse sind jeweils die verwendeten Plasmide und auf der y-Achse der prozentuale Anteil der EGFP-positiven Zellen links (% transfizierte bzw. transduzierte Zellen) sowie die ermittelte mittlere Fluoreszenzaktivität dieser positiven Zellen rechts angegeben.

In Spur 1 wurden der SRV-1 CTE-haltige Transfervektor pRRLsin.PPT.hPGK.EGFPcte sowie die Plasmide pcDNA3g/p4xCTE und pMD.G transfiziert. Dieser Ansatz enthält kein

Rev. Der Export des Transfervektors wird durch das SRV-1 CTE vermittelt, der des gag/pol-Helferplasmides durch das MPMV 4xCTE. Bei nur 10,5 % positiven Zellen (Abb. 14A, Spur 1) funktioniert der Export des Transfervektors durch das CTE signifikant schlechter als in den benachbarten Spuren 2-4. Nach Transduktion von SW480 durch diesen Zellüberstand erkennt man <0,1 % EGFP-positive Zellen (14B, Spur 1). Wahrscheinlich wird das RRE-haltige Intron ohne Anwesenheit von Rev in der 293T-Linie schon so effizient gespleißt, dass das Verpackungssignal verloren geht und somit keine Transgen-tragenden viralen Partikel transferiert werden. Spur 2 enthält die gleichen Plasmide wie Spur 1, jedoch zusätzlich das Rev-exprimierende pRSV-Rev. Dadurch kann man in 293T-Zellen 26 % EGFP-positive Zellen nachweisen (Abb. 14A). Nach Transduktion sind etwa 44 % EGFP-positive SW480-Zellen zu erkennen (14B). Dies weist darauf hin, dass die Zugabe von Rev in Spur 2 im Vergleich zu Spur 1 wahrscheinlich über die Rev-vermittelte zytoplasmatische Akkumulation Verpackungssignal-tragender Vektortranskripte den Gentransfer des Transfervektors ermöglicht hat. Die geringe Fluoreszenzintensität in den transduzierten SW480-Zellen im Vergleich zu den Spuren 3 und 4 (Abb. 14B) ist auf die schwächere EGFP-Expression in CTE-haltigen im Vergleich zu WPRE-haltigen Vektoren zurückzuführen (s. auch C.5.b.). In den Spuren 3 und 4 wurde der Transfervektor mit WPRE, entweder das gag/pol-exprimierende Helferplasmid pcDNA3g/p4xCTE oder alternativ das pMDLg/pRRE, zusätzlich ein Rev- und VSV-G-Plasmid verwendet. Nach Transfektion von 293T-Zellen sieht man eine deutlich höhere Anzahl positiver EGFP-Zellen als in den Spuren 1 und 2 (Abb.14A). Nach Transduktion von SW480 sind in den Spuren 3 und 4 mehr als 88% EGFP-positive Zellen vorhanden (Abb. 14B). Es ist also von einem sehr guten Titer auszugehen.

Festzuhalten bleibt, dass die hier verwendeten lentiviralen Vektoren noch die Rev-Anwesenheit benötigen. Der Diskussionsteil liefert eine Strategie, wie man – basierend auf diesen Ergebnissen – ganz auf Rev verzichten kann.

4. Posttranskriptionelle Modulation im Kontext der β -Globin cDNA

a. Verstärkte Globinexpression durch ein Intron und RNA-Elemente

Zahlreiche Forschungsberichte (Buchman et al. 1988, Huang et al. 1997/99, Yu et al. 1991) haben gezeigt, dass das β -Globintranskript für die effiziente zytoplasmatische Expression den Spleißvorgang benötigt. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob ein retrovirales Intron in der 5'UTR, generiert durch Spleißsignale einer retroviralen Leaderregion (s. Abb. 8), in einem retroviralen Vektor anstelle eines genomischen Globinintrons verwendet werden kann. Daneben sollte der Einfluss *cis*-agierender RNA-Elemente auf die β -Globinexpression untersucht werden.

Hierzu wurde mittels einer zweistufigen RT-PCR (Reverse Transkriptase) die β -Globin cDNA aus RNA humaner Erythrozyten und Leukozyten gewonnen. Mit Hilfe entsprechender Primer konnten 5' eine optimierte Kozak-Konsensus-Sequenz (Kozak 1984 u. 1991) und 3' die kodierende Sequenz eines Hämagglutinin-Epitops (Nonapeptid-Sequenz des Influenza Hämagglutininproteins zum vereinfachten Proteinnachweis) sowie entsprechende Restriktionsschnittstellen eingebracht werden. Von den entstandenen cDNA-Klonen wurden drei sequenziert. Der im folgenden verwendete Globin-Klon enthielt zwei (stille) Polymorphismen, die nicht in einem Aminosäureaustausch resultierten (s. B.7.c.).

Um den Effekt der RNA-Elemente ohne Interferenz mit möglichen Spleißphänomenen zu testen, wurde die β -Globin cDNA zunächst in den spleißdefizienten Vektor MP110 eingesetzt. Danach erfolgte der Einbau in den Vektor MP71, der ein funktionelles virales Intron in der 5' untranslatierten Region enthält. Ebenso wie bei gag/prot wurden die verwendeten RNA-Elemente in die 3'UTR der Vektoren eingesetzt (s. Abb. 8). Da die Wirkung der Vektoren ohne Selektion und ohne Einstellung der m.o.i. getestet wurde, wurden die Vorgänge zunächst in der Verpackungszelllinie Phoenix amphi und nachfolgend nach Transduktion verschiedener Zielzellsysteme analysiert.

Analyse der Globinexpression auf RNA-Ebene

Der Northern Blot von Gesamt-RNA-Präparationen der mit den verschiedenen Vektoren transfizierten Phoenix-Zellen ist in Abb. 15A dargestellt. Diese Analyse erfolgte 2 Tage nach Transfektion. Die RNA-Detektion erfolgte mittels einer gegen die 3'UTR gerichteten Sonde. Diese weist gespleißte wie ungespleißte Vektortranskripte nach.

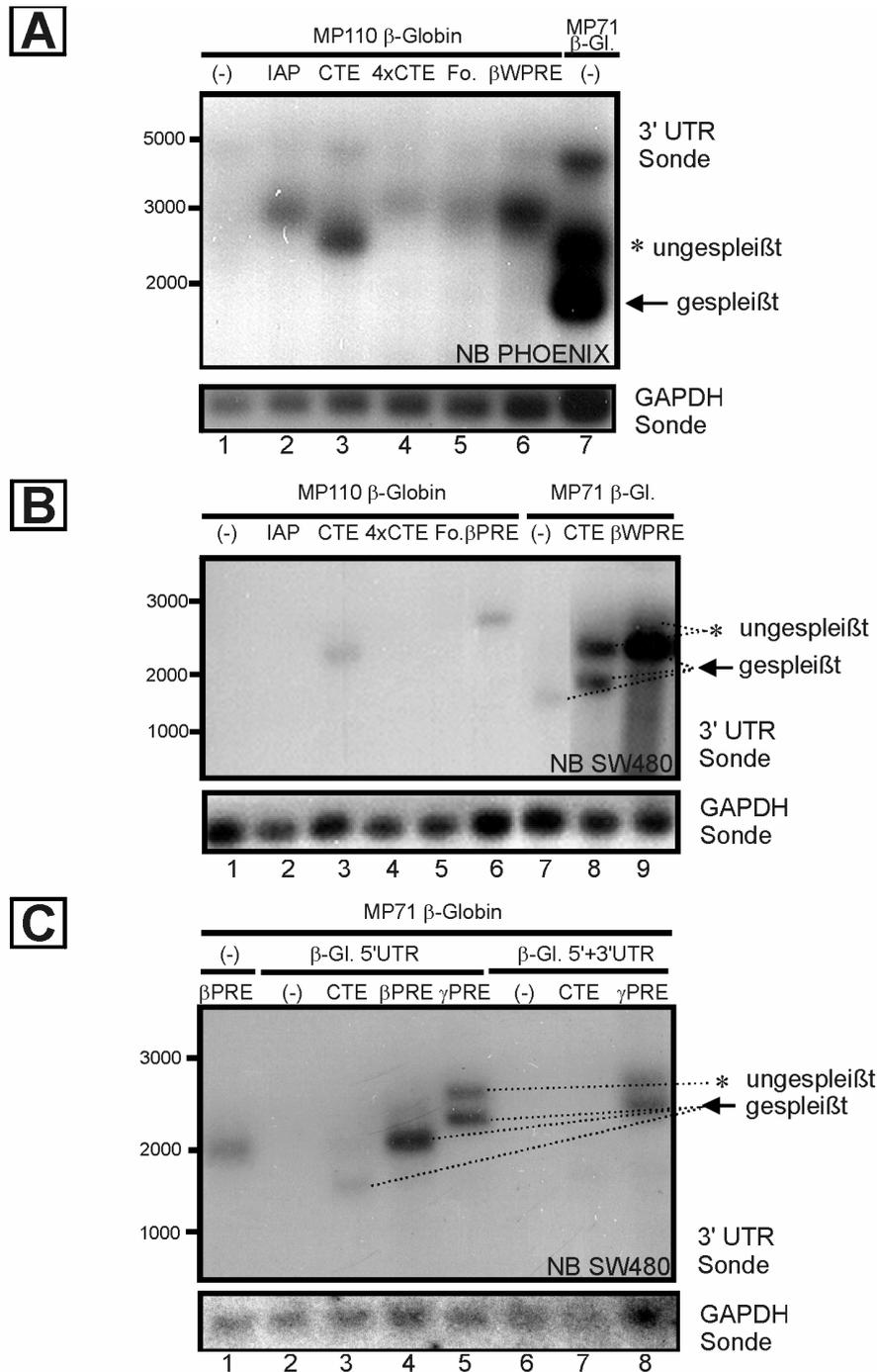


Abb. 15: Verbesserung der β -Globin RNA-Expression durch Spleißsignale plus WPRE oder CTE

- (A) Northern Blot von RNA-Präparationen von Phoenix-Zellen, die mit den entsprechenden Vektoren transfiziert wurden (s. Beschriftungen Spur 1-7). Die radioaktiv markierte 3'UTR-Sonde wurde aus der Region des 3' MPSV-LTR, der auf allen Transkripten präsent ist, generiert. Ungespleißte und gespleißte RNAs sind entsprechend den jeweiligen Globintranskripten mit Sternen bzw. Pfeilen markiert. GAPDH-Niveaus sind unten angegeben.
- (B) Northern Blot von RNA-Präparationen aus unselektierten, polyklonalen SW480-Zellpopulationen, die mit den jeweiligen MP110 β -Globin- (Spur 1-6) bzw. MP71 β -Globin-Vektorüberständen (7-9) transduziert wurden. Übrige Beschriftung analog zu A.
- (C) Northern Blot von RNA-Präparationen aus unselektierten, polyklonalen SW480-Zellpopulationen, die entweder keine oder nur die 5' oder die 5' und 3' Globin-UTR des β -Globin-Sequenz aufwiesen. Im Unterschied zu B wurde in den Spuren 5 und 8 ein größeres WPRE-Fragment (901 bp, γ PRE) verwendet. Übrige Beschriftung analog zu A.

Die Spuren 1-6 markieren das jeweilige MP110 β -Globin Vektorderivat mit und ohne RNA-Element in der 3'UTR. Es ist zu erkennen, dass die MP110 β -Globin-Vektoren mit CTE (Spur 3) oder β WPRE-Element (Spur 6) gegenüber dem Vektor ohne Element (Spur 1) deutlich stärkere Signale liefern. Auch die Vektoren mit IAP-, Foamy-Element und 4xCTE liefern detektierbare Signale, jedoch in der erwähnten Reihenfolge in absteigender Intensität (Spur 2, 5, 4). Das stärkste Signal zeigt der MP71 β -Globin-Vektor, der ein retrovirales Intron in der 5'UTR und kein RNA-Element in der 3'UTR enthält (Spur 7). Die Verwendung intronhaltiger Sequenzen oder von RNA-Elementen liefert also ein stark unterschiedliches Expressionsniveau in der Verpackungszelllinie. Jeweils 2,5 ml dieser Überstände (kein Titerabgleich) wurden nach dem in B.3. erläuterten Transduktionsprotokoll auf die jeweiligen Zielzellen (MEL, K-562, SW480, 293T) transferiert. Die Analyse der Zielzellen erfolgte wiederum 6 Tage nach Transduktion aus Gesamt-RNA-Präparationen.

Der in Abb. 15B dargestellte Northern Blot enthält aus transduzierten SW480-Zellen erstellte Gesamt-RNA-Präparationen, die mit einer Sonde gegen die 3'UTR detektiert und nachfolgend mit einer Sonde gegen GAPDH nachhybridisiert wurden. Die Spuren 1-6 kennzeichnen die Verwendung der MP110 β -Globin-Vektoren ohne (1) und mit jeweiligem RNA-Element (2-6). Besonders die Vektoren mit CTE (Spur 3) und β WPRE (6) zeigen nach Gentransfer auf RNA-Ebene eine nachweisbare β -Globinexpression in transduzierten SW480-Zielzellen. Obwohl nach Transfektion für die Vektoren mit IAP-, 4xCTE- und Foamy-Element (Abb. 15A, Spur 2, 4, 5) β -Globinexpression auf RNA-Ebene nachgewiesen wurde, konnte nach Transduktion von SW480-Zellen kaum noch Expression nachgewiesen werden (Abb. 15B, Spur 2, 4, 5).

SW480-Zellen, die mit Überständen der spleißkompetenten MP71 β -Globin-Vektoren generiert wurden, zeigten im Vergleich zu den spleißdefizienten MP110 β -Globin-Derivaten eine deutlich höhere β -Globin-Expression (vgl. Spur 7-9 mit 1-6). Die durch Verwendung eines Introns nachweisbare RNA-Menge (Spur 7) lässt sich durch Nutzung eines CTE und besonders eines β WPRE deutlich steigern (Spur 8 u. 9). Die jeweils untere Bande entspricht der gespleißten RNA (s. Pfeil), wohingegen die ungespleißte RNA mit einem Stern markiert ist. Interessanterweise scheint die Verwendung eines Introns allein (Spur 7) bzw. mit Einsatz eines CTE oder WPRE unterschiedliche Verhältnisse von gespleißter zu ungespleißter Form zu liefern. Spur 7 (Intron) zeigt wie Spur 9 (β WPRE) vorwiegend gespleißte RNA, Spur 8 (CTE) jedoch ein nahezu gleiches Verhältnis von gespleißter zu ungespleißter Form.

Im Phosphoimager gemessene Daten ergaben für den in Abb. 15B gezeigten Northern Blot die in nachfolgender Tab. 2 dargestellten, GAPDH-bereinigten Stimulationsfaktoren für die einzelnen Elemente:

Vektorkontext	Spleißkontext*	RNA-Element*	x-fache Stimulation RNA
MP110 β -Globin	n.a.	n.a.	1
MP110 β -Globin	n.a.	CTE	568
MP110 β -Globin	n.a.	4xCTE	112
MP110 β -Globin	n.a.	Foamy	100
MP110 β -Globin	n.a.	β WPRE	706
MP71 β -Globin	SD/SA	n.a.	642
MP71 β -Globin	SD/SA	CTE	4666
MP71 β -Globin	SD/SA	β WPRE	8913

*n.a.: nicht anwendbar

Tab. 2: Verbesserung der RNA-Expression von Globin durch posttranskriptionell aktive Elemente

Die Tabelle zeigt errechnete Stimulationsfaktoren eines Phosphoimager-Experimentes unter Berücksichtigung verschiedener Spleißelement- und RNA-Element-Kontexte. Erklärung siehe Text. SD/SA: Spleißdonor/ Spleißakzeptor.

Aus den Phosphoimagerdaten wurde das Verhältnis der Signalintensitäten aller Vektoren in Relation zum Standardvektor ohne Element kalkuliert. Die Stimulationsfaktoren wurden dementsprechend auf den MP110 β -Globin-Vektor (Spur 1) bezogen (gleich 1 gesetzt) und repräsentieren die kumulativen Effekte der Vorgänge aus Verpackungs- und Zielzelllinie.

Zahlreiche Veröffentlichungen beschreiben den hohen Einfluss der untranslatierten RNA-Regionen (sog. UTRs) auf mRNA-Stabilität und Translatierbarkeit einer Globin-mRNA (Cooper 1993, Day et al. 1998, Kozak 1994, Kugler et al. 1995, Russell et al. 1996). Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund des Kernverlustes während der Reifung der Erythrozytenvorläufer über Retikulozyten zum Erythrozyten wichtig, weil die sehr stabilen Globin-RNAs nach dem Kernverlust die Menge des gebildeten Globin-Proteins steuern. Störungen dieses sensiblen Systems können durch ein Missverhältnis von α - zu β -Globin Symptome einer Thalassämie verursachen.

Um die Rolle und Notwendigkeit der 5' und 3' β -Globin-UTRs in den retroviralen Vektoren zu testen, wurden die 5'UTR als synthetisches Oligonukleotid eingefügt und die 3'UTR durch PCR generiert (B.7.c.) und in die aus den Vorexperimenten besten Vektoren eingefügt. Abb. 15C zeigte einen entsprechenden Northern Blot aus Gesamt-RNA, der wiederum aus RNA-Präparationen transduzierter SW480-Zellen erstellt wurde. Die Detektion erfolgte wieder mit einer gegen die 3'UTR gerichteten Sonde. Nachfolgend wurde eine Hybridisierung auf

GAPDH durchgeführt. Spur 1 markiert den MP71 β -Globin Vektor mit β WPRE ohne UTRs. Die Spuren 2-5 zeigen Derivate des MP71 β -Globin-Vektors mit Globin 5' UTR und verschiedenen RNA-Elementen (CTE, β WPRE und γ WPRE). In den Spuren 6-8 werden Vektoren ohne und mit RNA-Elemente (CTE, γ WPRE) dargestellt, die sowohl die 5' als auch die 3' Globin-UTR enthalten.

In dieser Arbeit wurden verschieden lange Fragmente des WPRE genutzt. Eine Analyse des Sekundärstrukturaltungspotential des WPRE zeigte drei Regionen, die unabhängig voneinander stabile RNA-Sekundärstrukturen ausbilden konnten (Daten nicht gezeigt, Methodik s. B.6.). Basierend auf dieser Strukturvorhersage wurden drei unterschiedlich lange WPRE-Fragmente kloniert, welche jeweils vom 5'-Ende her entweder die erste (α WPRE, 467 bp), die ersten beiden (β WPRE, 601bp) oder alle drei Substrukturen (γ WPRE, 901bp) der RNA-Faltungsanalyse umfaßten (s. B.7.b). In β -Globin-Vektoren wurden nur das β - und γ WPRE genutzt.

Wie schon in Abb. 15B ergaben die Vektoren mit WPRE jeweils das höchste Expressionsniveau (Abb. 15C, Spur 1, 4, 5, 8). Interessanterweise resultierte die Verwendung des längeren Fragments γ WPRE im Vergleich zum kürzeren β WPRE in einem leicht veränderten Spleißmuster. So ist in der γ WPRE-Spur prozentual mehr ungespleißte RNA vorhanden als in der korrespondierenden β WPRE-Spur (vgl. Spur 5 u. 4, ca. 40 % zu 7 % ungespleißter RNA).

Der Einsatz der 5' Globin-UTR bewirkt eine geringe Erhöhung der RNA-Menge (vgl. Spur 1 mit 4). Eine Insertion der 3'UTR in einen Globinvektor mit γ WPRE und 5'UTR (Spur 8) liefert nach GAPDH-Abgleich im Verhältnis zum korrespondierenden Vektor ohne 3'UTR (Spur 5) ein deutlich geringeres RNA-Signal.

Festzuhalten bleibt, dass die Verwendung der Globin-UTRs im Northern Blot geringe Unterschiede der RNA-Mengen bedingt. Die Insertion der 5'UTR sorgt für eine Erhöhung der RNA-Mengen, die zusätzliche Insertion der 3'UTR jedoch für eine Verringerung. Der Haupteffekt auf die Globinexpression bleibt aber in den verschiedenen RNA-Elementen und in dem Einbau intronhaltiger Sequenzen begründet.

Analyse der Globinexpression auf Protein-Ebene

Hintergrund

Dzierzak et al. (1988) hatten bereits gezeigt, dass das durch retroviralen Gentransfer in Mäusestammzellen eingebrachte β -Globin nur in erythroiden Linien auf signifikantem Niveau exprimiert wurde, nicht aber in B-, T-Zellen oder Makrophagen. Wichtig ist, dass es bei der Globinexpression neben der Transkriptionskontrolle durch ‚locus control region‘ und β -Globinpromotor (s. D.2.) mindestens eine weitere Blockade auf posttranskriptioneller bzw. translationaler Ebene gibt.

Die Translationskontrolle bei der Globinexpression ist ein sehr komplexes System zur Koordination der Synthese von Häm und Globin. Sie wird über die Phosphorylierung des eukaryotischen Initiationsfaktors 2 (eIF2) kontrolliert (s. D.2.). Wenn der Häm Spiegel niedrig ist, hört die Globinsynthese auf. Dies verhindert die Bildung von Apohämoglobin, welches leicht denaturiert wird. Die Hämsynthese selbst wird ebenfalls reguliert (Übersicht in Ponka 1999), hauptsächlich durch das Schlüsselenzym der Häm-Synthese, die ALA- (Aminolävulin-säure) Synthetase. Diese existiert in 2 verschiedenen Genen, von denen die ALA-Synthetase 2 exklusiv in der erythroiden Reihe exprimiert wird und ebenfalls einer Translationskontrolle in Form eines sog. ‚iron responsive element‘ (durch Eisen reguliert, lokalisiert in der 5‘UTR) unterliegt. Die Hämoglobinsynthese läuft also in einer Art Kaskade ab, in welcher zunächst das Eisenangebot die Hämsynthese steuert (Häm ist Protoporphyrin IX + Fe^{2+}), woraufhin das Häm über die Regulation von eIF2 die Globinsynthese steuert.

Erythroid-spezifische β -Globin-Proteinexpression durch Regulation der Translation

Die konstruierten Globinvektoren unterlagen wegen des Fehlens des β -Globinpromotors und der ‚locus control region‘ (s. D.2.) nicht der konventionellen Transkriptionsregulation für Globin. Der hier verwendete Promotor (MPSV LTR) war in einem breiten Spektrum an Zielzellen aktiv (s. C.2.). Das kam auch in der Globin-RNA-Expression in nicht-erythroiden Zellen (z.B. Phoenix-, SW480-Zellen) zum Ausdruck.

Trotz detektierter RNA-Expression (Abb. 15) konnte nach Transfektion von Phoenix-Zellen und nach Transduktion von SW480- und 293T-Zellen keine Globinexpression im Western Blot bestimmt werden (Daten nicht gezeigt). Wahrscheinlich ist der geschilderte translationale Regulationsmechanismus durch Häm ausreichend, um eine zell- und differenzierungs-spezifische – auf die ausdifferenzierte erythroide Zelle beschränkte – Expression zu gewährleisten.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde ein Zellsystem mit der Möglichkeit zur Ausdifferenzierung einer erythroiden Linie etabliert. Die im folgenden verwendeten MEL-Zellen (**m**urine **e**rythro**l**eukämische Zellen, Klon F4/6, zur Verfügung gestellt von W. Ostertag, HPI) und K-562-Zellen (humane Erythroleukämiezellen) sind immortalisierte Zelllinien, die etwa auf Stufe der Proerythroblasten in der erythroiden Differenzierung arretiert sind (s. B.3.). Diese Zelllinien lassen sich durch geeignete Induktoren zur Ausdifferenzierung anregen. Eine ganze Reihe von Agenzien, die diesen Induktionsprozess für MEL- und K-562-Zellen einleiten können, ist bekannt (Campbell et al. 1990, Hoffman et al. 1979). Um die Induzierbarkeit zu testen, wurden K-562- und MEL-Zellen über einen Zeitraum von 2-8 Tagen täglich mit DMSO-versetzten Medien in Konzentrationen von 1,1 sowie 1,2 und 1,5 % DMSO zur Differenzierung angeregt. Um die Zellen nicht zu dicht wachsen zu lassen, wurden sie jeden Tag im Verhältnis 1 : 1 gesplittet. Nach etwa 4 Tagen nahmen die Zellen als Kennzeichen der hochregulierten Hämoglobinsynthese eine schmutziggelbe Farbe an. Die besten Bedingungen stellten sich nach Tag 6 unter Zugabe von 1,2%igem DMSO-Medium ein. Hier waren über 80 % der MEL-Zellen in der Benzidinfärbung positiv (Daten nicht gezeigt). Die Benzidinprobe beruht auf der oxidierenden Wirkung des Hämoglobins und der Oxidation von Benzidin zu Benzidinblau. Benzidinpositive Zellen stellen folglich Zellen mit Hämoglobinsynthese dar.

Der verwendete K-562-Zellklon war mit dieser Methode nicht ausdifferenzierbar. Um zu testen, wieviel Prozent der jeweiligen K-562- und MEL-Zellpopulationen sich ohne Induktoren spontan weiterdifferenziert haben, wurde ebenfalls die Benzidinfärbung zum Hämoglobinnachweis genutzt. Diese ergab, dass im Falle der MEL-Zelllinie (F4/6) weniger als 0,5 % der Zellen und unter den K-562-Zellen etwa 1 % der Zellen ohne Zugabe von Induktoren Benzidin-positiv, somit hämoglobinhaltig und nahezu ausdifferenziert sind.

Im folgenden Experiment der Abb. 16 wurden MEL- und K-562-Zellen jeweils mit den gleichen Überständen von mit MP71 β -Globin-Vektorderivaten transfizierten Phoenixzellen transduziert. Hierzu wurden jeweils 2 ml vom gleichen Phoenix-Überstand der jeweiligen Globin-Vektoren zur Transduktion von jeweils $2 \cdot 10^5$ Zielzellen verwendet. Die transduzierten MEL- und K-562-Zellen in Abb. 16A/B wurden nicht mit DMSO induziert. Im Gegensatz dazu wurden die in Abb. 16C dargestellten transduzierten MEL-Zellen – wie zuvor geschildert – mit 1,2%igem DMSO-haltigen Medium zur Ausdifferenzierung induziert. Die Analyse erfolgte jeweils 6 Tage nach Transduktion im Western Blot aus gewonnenen

Zelllysaten mittels eines gegen das HA-Epitop gerichteten Antikörpers. Die Globinbande mit HA-Epitop ist bei etwa 17 kDa (148 AS für Globin, 9 für HA-Epitop) nachzuweisen.

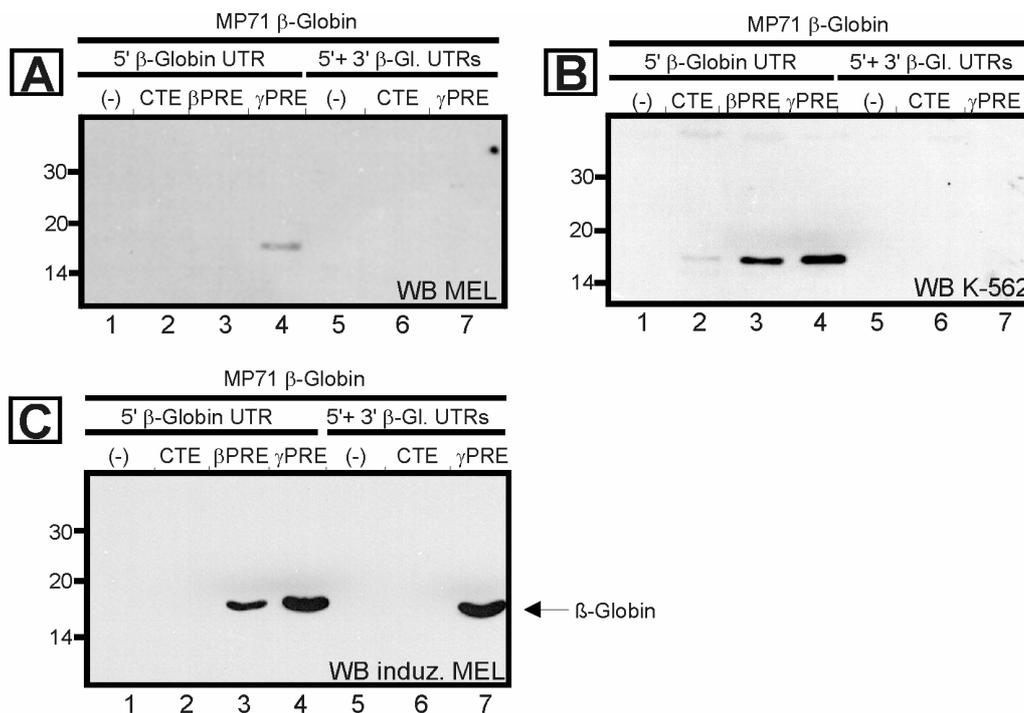


Abb. 16: Abhängigkeit der Globinexpression von der Ausdifferenzierung der erythroiden Reihe

- (A) Western Blot von transduzierten MEL-Zellen (murine Erythroleukämie) 6 Tage nach Transduktion: Die Spuren 1-4 markieren Zelllysate von transduzierten MEL-Zellen, die mit MP71 5'UTR β -Globin-Vektorüberständen jeweils ohne (Spur 1), mit CTE- (2), β WPRE- (3) oder γ WPRE-Element (4) transduziert wurden. Die Spuren 5-7 beinhalten Zelllysate von MEL-Zellen, die vom MP71 β -Globin-Vektor mit 5' und 3'UTR transduziert wurden, jeweils ohne (Spur 5), mit CTE (Spur 6) oder γ WPRE (Spur 7). Molekulare Massenstandards sind links in kDa angegeben. Die Globin-HA-Bande läuft etwa bei 17 kDa. Zur Detektion von β -Globin wurde ein hochaffiner Antikörper verwendet, der gegen ein C-terminal gelegenes Hämagglutininepitop gerichtet ist. Wegen eines nur schwachen Signals wurden dieser Blot und der nachfolgende K-562-Blot etwa 5 Minuten in ECL-Technik exponiert.
- (B) Western Blot von transduzierten K-562-Zellen (humane Erythroleukämie) 6 Tage nach Transduktion: Beschriftungen und Versuchsbedingungen wie unter A.
- (C) Western Blot von transduzierten und nachfolgend 6 Tage mit DMSO zur Ausdifferenzierung induzierten MEL-Zellen: Im Gegensatz zu A und B wurde dieser Blot bei einem starken Signal nur 2 Sekunden in ECL-Technik exponiert. Sonstige Beschriftungen und Versuchsbedingungen sind analog zu A und B. Die Globinbande ist rechts mit einem Pfeil markiert.

Im ECL-Western Blot aus nicht-induzierten MEL-Zellen (Abb. 16A) erkennt man nur für den Vektor MP71 5'UTR β -Globin mit γ WPRE (Spur 4) ein schwaches Globinsignal. Der in B dargestellte ECL-Western Blot aus nicht-induzierten K-562-Zellen zeigt für die Vektor-derivate von MP71 5'UTR β -Globin mit CTE (Spur 2), β WPRE (Spur 3) und γ WPRE (Spur 4) schwach detektierbare Signale, welche in der erwähnten Reihenfolge an Intensität zunehmen.

Die Signalintensitäten der Abb. 16A u. B (nicht-induzierte MEL- u. K-562-Zellen) kann man nicht unmittelbar mit den Signalintensitäten der Abb. 16C (induzierte MEL-Zellen) vergleichen. Wegen der sehr schwachen Globinexpression in nicht-induzierten MEL- bzw. K-

562-Zellen wurde der Röntgenfilm **etwa 5 Minuten in ECL-Technik** für die gezeigten Globinsignale exponiert (Abb. 16A u. B). Die gute Globinexpression in induzierten MEL-Zellen ließ sich demgegenüber schon **nach 2 Sekunden Expositionszeit in ECL-Technik** nachweisen (Abb. 16C). Die Unterschiede in der Globinexpression zwischen Abb. 16A/B und 16C zeigen sich also nicht nur in den verschiedenen Signalintensitäten, sondern vor allem in der deutlichen Divergenz der nötigen Expositionszeiten (5 min vs. 2 sec) für ein gutes Globinsignal.

In Abb. 16C lässt sich in induzierten MEL-Zellen schon nach kurzer Expositionsdauer von 2 Sekunden für die Vektoren MP71 5'UTR β -Globin β WPRE (Spur 3) und γ PRE (Spur 4) eine deutliche Globinexpression nachweisen. Im Gegensatz zu den nicht-induzierten Zellen MEL- und K-562-Zellen liefert diesmal der Vektor mit zusätzlicher 3'UTR (Spur 7) ein starkes Globinsignal. Die MP71 β -Globin-Vektorderivate mit CTE-Element (Abb. 16C, Spur 2 u. 6) zeigen keine Globinexpression, obwohl in Abb. 15B (Spur 8) und Abb. 15C (Spur 3 u. 7) noch ein deutliches RNA-Signal für die CTE-Vektoren zu erkennen war.

Da in Abb. 16A, B und C jeweils gleiche Virusüberstände bei Verwendung von gleichen Zielzellen und gleichem Versuchsaufbau benutzt und als Kontrolle jeweils EGFP-Vektoren transduziert wurden, ist eine niedrige Transduktionseffizienz als Ursache der schwachen Globinexpression in A und B zu vernachlässigen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass es für eine effiziente Globinexpression nach Gentransfer in Zellkultursystemen notwendig ist, die Zellen in Richtung zum Erythrozyten ausdifferenzieren zu lassen. Als der beste Vektor hat sich in diesem Kontext der MP71 5'UTR β -Globin γ WPRE mit und ohne 3'UTR herauskristallisiert, wobei der Vektor inklusive 3'UTR weder in nicht-erythroiden (Daten nicht gezeigt) noch erythroiden, nicht-induzierten Zellen exprimiert wird (Abb. 16A/B, Spur 7). Daher ist bei diesem Vektor im Vergleich zum Vektorkorrelat ohne 3'UTR von einer größeren Zell- und Differenzierungsspezifität auszugehen.

b. Die Häminzugabe kann die Globinexpression auch in nicht-erythroiden Zellen rekonstituieren

Im vorigen Abschnitt wurde gezeigt, dass die hier verwendeten Globinvektoren nur in ausdifferenzierten erythroiden Zellen effizient Globin exprimieren und dass dies über einen möglicherweise durch Häm bedingten posttranskriptionellen / translationalen Regulations-

mechanismus gesteuert wird. Im folgenden wird untersucht, ob durch externe Häm- bzw. Häminsupplementierung im Medium die Globinexpression auch in nicht-erythroiden Zellen rekonstituiert werden kann.

Hierzu wurden 293T-Zellen (nicht-erythroide, humane Nierenepithelzelllinie) mit Globinvektoren transfiziert.

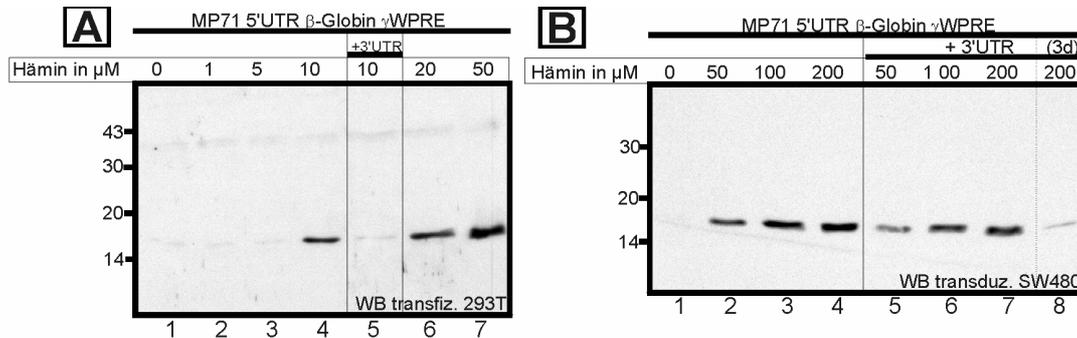


Abb. 17: Rekonstitution der Globinexpression in nicht-erythroiden Zellen durch Zugabe von Häm

- (A) Western Blot aus Zellysaten von transfizierten 293T-Zellen (humane Nierenepithelzelllinie): Die Spuren 1-4 und 6-7 kennzeichnen die Transfektion mit dem Vektor MP71 5'UTR β -Globin γ WPRE. In Spur 5 wurde ein Vektor verwendet, der - ansonsten gleich - zusätzlich die β -Globin 3'UTR enthielt. Eine Häminlösung wurde dem Zellkulturansatz in Endkonzentrationen von 1 μ M (Spur 2), 5 μ M (3), 10 μ M (4, 5), 20 μ M (6) und 50 μ M (Spur 7) beigefügt. Die Spur 1 diente als Kontrolle und enthielt kein Häm. Die Detektion des β -Globin-HA-Fusionsproteins (~17kDa, Hämagglutinin-Epitop C-terminal vorhanden) erfolgte mittels eines hochaffinen HA-Antikörpers. Links sind molekulare Massenstandards in kDa angegeben.
- (B) Western Blot aus Zellysaten von transduzierten SW480-Zellen (humane Kolonadenomzelllinie): Die Spuren 1-8 markieren die Transduktion mittels viralem Überstand des Vektors MP71 5'UTR β -Globin γ WPRE ohne (Spur 1-4) und mit Globin 3'UTR (Spur 5-8). Generell erfolgte die Analyse 6 Tage nach Transduktion bzw. 5 Tage nach Häminzugabe. Nur der Ansatz in Spur 8 wurde 3 Tage nach Häminzugabe untersucht. Häm wurde in Endkonzentrationen von 50 μ M (Spur 2 u. 5), 100 μ M (Spur 3 u. 6) oder 200 μ M (Spur 4, 7 u. 8) zugegeben. Die Spur 1 stellt eine Kontrolle ohne Häm dar.

Die Abb. 17A zeigt in den Spuren 1-4 und 6-7 den jeweils verwendeten Vektor MP71 5'UTR β -Globin γ WPRE sowie in Spur 5 dessen Derivat mit 3'UTR. Zur Transfektionskontrolle wurde mit einem GFP-Expressionsplasmid kotransfiziert. 8 Stunden nach Transfektion wurde das Medium gewechselt und durch Medien mit 0, 1, 5, 10, 20 oder 50 μ M Häm (chloridhaltiges Hämderivat mit dreiwertigem Eisen) ersetzt. Zwei Tage nach Häminzugabe wurden die entsprechenden Zellysate „geerntet“. Die Detektion von Globin erfolgte im ECL-Western Blot (Abb. 17A) mittels Anti-HA- und Anti-Ratte-Peroxidase-Antikörpern. Der Nachweis einer Globin/HA-Proteinbande gelang erst ab einer Häminkonzentration von 10 μ M (Spur 4). Eine Steigerung der Globinexpression ließ sich durch Erhöhung der Häminkonzentration auf 20 bzw. 50 μ M (Spuren 6 u. 7) erzielen. Der Vektor MP71 5'UTR β -Globin γ WPRE mit 3'UTR (Spur 5) produzierte im Vergleich zum Vektor ohne UTR (Spur 4) bei gleicher Häminkonzentration signifikant weniger Globin nach einer Expressionszeit von 2 Tagen.

Nachfolgend wurden SW480-Zellen (nicht-erythroide, humane Colonadenomzelllinie) mit Überständen von Phoenixzellen, die mit den Plasmiden MP71 5'UTR β -Globin γ WPRE mit (Spur 1-4) und ohne 3'UTR (Spur 5-8) transfiziert worden waren, transduziert. 24 Std. nach Transduktion erfolgte die Zugabe von Medien mit Häminkonzentrationen von 0, 50, 100 und 200 μ M. Die Zellen wurden 5 Tage weiterkultiviert und die Zelllysate im Western Blot mittels Anti-HA- und Anti-Ratte-Peroxidase-Antikörpern analysiert. Abb. 17B zeigt den korrespondierenden Western Blot. Ohne Häminzugabe war kein Globinsignal nachweisbar (Spur 1). Ab einer Zugabe von 50 μ M Hämin ließ sich bei Verwendung der Vektoren MP71 5'UTR β -Globin γ WPRE mit und ohne 3'Globin-UTR (Spur 2 bzw. 5) Globinexpression nachweisen. Eine Erhöhung der Häminkonzentration auf 100 bzw. 200 μ M führte zu einer weiteren Steigerung der Globinexpression in SW480-Zellen (Abb. 17B, Spur 3-4 bzw. 6-7). In Spur 8 wurde der gleiche Versuchsansatz (gleicher Vektor, gleiche Häminkonzentration) wie in Spur 7 gewählt, jedoch erfolgte die Ernte des Zelllysates schon nach 3 anstelle von 5 Tagen nach Häminzugabe. Hier zeigte sich wie im Experiment in transfizierten 293T-Zellen (s. 17A, vgl. Spur 5 mit 4) eine geringe Globinexpression bei Verwendung des Globinvektors mit 3'UTR nach kurzen Expressionszeiten von 2-3 Tagen.

Zusammenfassend konnte Globinexpression durch externe Häminzugabe in zwei verschiedenen nicht-erythroiden Zelllinien (293T, SW480) nachgewiesen werden. Globinexpression wurde diesbezüglich sowohl nach Transfektion als auch nach Transduktion detektiert. Der Vektor inklusive 3'UTR weist alsbald nach Differenzierungsinduktion geringere Globinexpressionswerte als der Vektor ohne 3'UTR auf, jedoch wird dieses Expressionsdefizit nach insgesamt 6 Tagen Expressionszeit nahezu aufgeholt (Spur 5-7 in Abb. 17B).

c. Lentivirale Globinvektoren

Lentivirale EGFP-Vektoren haben in Vorexperimenten bei der Transduktion von MEL-Zellen einen 5-10fach höheren Titer als oncoretrovirale Vektoren produziert, was lentivirale Globinvektoren potentiell attraktiv für Gentherapieapplikationen macht. Die in oncoretroviralen Vektoren beste Globinexpressionskassette (β GK), bestehend aus Globin-cDNA, flankierenden Globin-UTRs und γ WPRE, wurde mittels PCR amplifiziert und in den lentiviralen Vektorkontext überführt. Abb. 18A gibt in Verbindung mit Abb. 13 einen Überblick über Nomenklatur und Konstruktion der lentiviralen Globin-Vektoren.

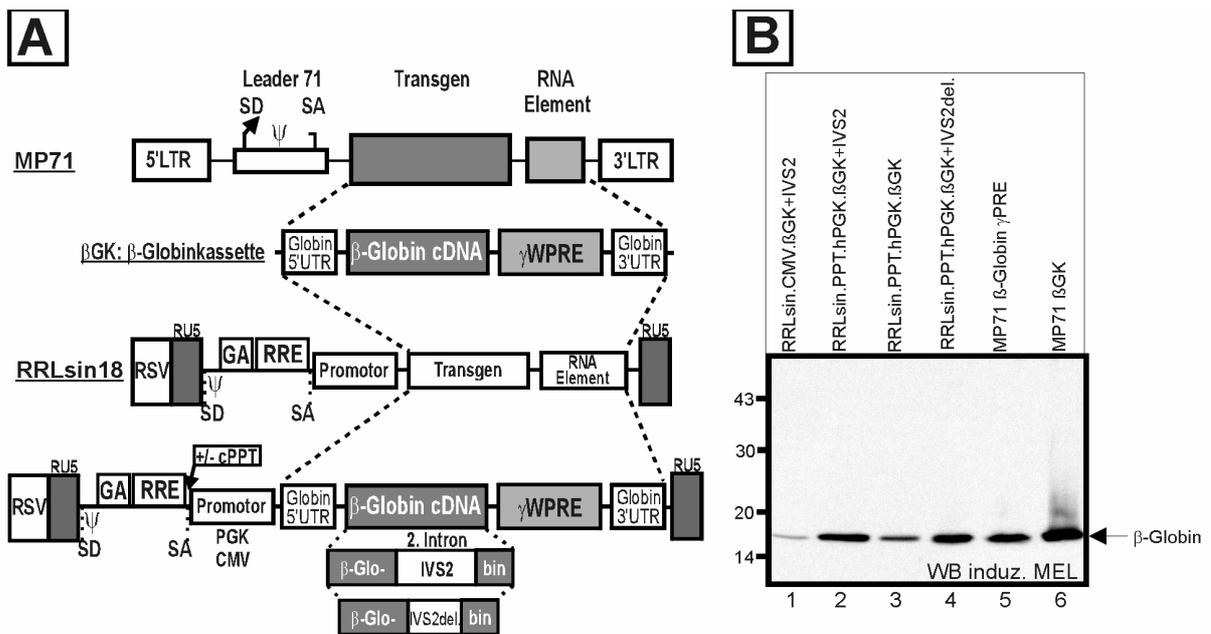


Abb. 18: Lentivirale Globinvektoren

(A) Schematische Darstellung von Globinvektoren im oncoretroviralen (oben) und lentiviralen Kontext (unten).

Oben ist der Vektor MP71 5'UTR β-Globin γWPRE 3'UTR (MP71βGK) nach der schon erläuterten Nomenklatur (Abb. 8) dargestellt. Das Transgen β-Globin (cDNA) und das γWPRE (RNA-Element) werden von den Globin-UTRs (untranslatierte Regionen) flankiert. Diese β-Globin-Kassette (βGK) wurde in die 'Multiple Cloning Site' des lentiviralen Vektors pRRLsin-18 eingeführt (unten). Nomenklatur und Abkürzungen sind der schematischen Zeichnung der lentiviralen Vektoren zu entnehmen (Abb. 13).

(B) Western Blot von transduzierten MEL-Zellen, welche nach Transduktion 6 Tage mit DMSO zur Differenzierung induziert wurden. In den Spuren 1-4 wurden lentivirale Globinvektoren verwendet, deren Nomenklatur in Abb. 18A und 13 ausführlich erläutert wurde. Dabei bezeichnet pRRLsin den lentiviralen Vektorkontext (Abb. 13), nachfolgend werden ein evtl. zentraler Polypurintrakt (PPT), der Promotor, das Transgen und ein evtl. RNA-Element genannt. Spur 1 beinhaltet einen lentiviralen Vektor mit CMV-Promotor, der β-Globin-Kassette (aus cDNA, flankierenden UTRs und γWPRE) und dem β-Globin-Intron 2 (Intervening Sequence 2) in seiner natürlich angestammten Position (s. A unten). Die Spuren 2-4 zeigen lentivirale Vektoren mit zentralem Polypurintrakt (PPT), dem PGK-Promotor, der β-Globin-Kassette und unterschiedlichen Intronkonstellationen. In Spur 2 wurde das vollständige β-Globin-Intron 2 (IVS2), in Spur 4 ein Intron 2 mit Teildeletion (IVS2del., s. Text) und in Spur 3 kein Globulintron verwendet. In den Spuren 5 und 6 wurden oncoretrovirale Globinkonstrukte benutzt. Die Spur 5 markiert den MP71 β-Globin-Vektor mit γWPRE, der sich vom Vektor mit kompletter β-Globin-Kassette (Spur 6, s. A oben) nur durch das Fehlen der flankierenden Globin-UTRs unterscheidet.

Das Design des lentiviralen Naldini-Transfervektors (RRLsin18, Abb. 13) hat jedoch einen entscheidenden Nachteil für die Konstruktion von Globinvektoren, da der 3'LTR selbstinaktivierend ist. Nach reverser Transkription wird der U3-deletierte 3'LTR zum 5'LTR. Demzufolge wird der lentivirale Vektor in der Zielzelllinie durch den weiter 3' gelegenen internen PGK- oder CMV-Promotor angetrieben. Daraus folgt, dass das virale Intron, welches für eine gute Globinexpression unerlässlich und zwischen 5'LTR und internem Promotor lokalisiert ist, in der Zielzelle nicht genutzt wird. Aus diesem Grund wurde ein zweites Intron, das β-Globin-Intron 2 (Intervening Sequence 2), in seiner natürlich angestammten Position zwischen Exon 2 und 3 eingesetzt. Es wurde das Vollängenintron (IVS2) und ein von Sadelain beschriebenes teildeletiertes Intron (IVS2del.) verwendet (Sadelain et al. 1995). Nach dortiger Angabe wirkt sich das teildeletierte Intron unter

Beibehaltung der Spleißeffizienz weniger negativierend auf den Titer retroviraler Globinvektoren aus.

293T-Zellen wurden mit 10 µg Transfervektor (RRLsin-Derivate), 15 µg gag/pol-Helferplasmid (pMDLg/pRRE), 5 µg pRSV-Rev, 3 µg pMD.G (VSV-G exprimierend) und 1 µg EGFP-Expressionsplasmid (Transfektionskontrolle) transfiziert. In einem Parallelansatz wurden Phoenixzellen sowohl mit MP71β-Globin-Vektorderivaten als auch mit MuLV gag/pol- und VSV-G-Plasmiden transfiziert (s. Abschnitt C.4.a.). So konnten lentivirale und oncoretrovirale Globinvektoren direkt miteinander verglichen werden. Gleiche Mengen (je 2 ml) der Überstände von Verpackungszelllinien wurden auf MEL-Zellen (F4/6-Zelllinie) zur Transduktion transferiert. 24 Std. nach Transduktion wurden die MEL-Zellen mit 1,2 % DMSO-haltigem Medium 5 Tage zur Ausdifferenzierung induziert. Nach Induktion erfolgte die Analyse aus Zelllysaten der MEL-Zellen im Western Blot.

Abb. 18B zeigt den entsprechenden ECL-Western Blot. Die Spuren 1-4 markieren die Verwendung der lentiviralen Vektoren, in den Spuren 5 und 6 sind die oncoretroviralen Vektoren dargestellt. In Spur 1 wurde ein lentivirales Konstrukt mit CMV-Promotor, β-Globin-Kassette (**βGK**, bestehend aus β-Globin cDNA, γWPRE und flankierenden Globin-UTRs) sowie zusätzlichem Globin-Intron 2 (Intervening Sequence 2) genutzt. Die in den Spuren 2-4 verwendeten Vektoren tragen abweichend davon einen hPGK-Promotor und beinhalten den zentralen HIV-1 Polypurintrakt (cPPT) vor dem PGK-Promotor. In der Literatur wird vermutet, dass der zentrale PPT als zusätzliche Ansatzstelle der reversen Transkription innerhalb der retroviralen Replikation dient und den Import des Präintegrationskomplexes steigert (Sirven et al. 2000, Zennou et al. 2000). In den Spuren 2 und 4 wurden lentivirale Globinvektoren mit Globin-Intron 2 (IVS2 bzw. IVS2del., s.o.) verwendet. Diese zeigen mehr Globinexpression als der korrespondierende Vektor ohne Globin-Intron (Spur 3). Das unterstreicht wiederum die Notwendigkeit einer Spleißaktion zur Steigerung der Globinexpression in der Zielzelle.

Der in Spur 6 dargestellte oncoretrovirale Globin-Vektor MP71βGK (mit Globin cDNA, γWPRE und flankierenden Globin-UTRs) liefert deutlich mehr Globinexpression als die gezeigten lentiviralen Konstrukte der Spuren 1-4. Der Vektor MP71β-Globin γWPRE (Spur 5) besitzt im Gegensatz zu MP71βGK (Spur 6) keine Globin-UTRs und liefert eine schwächere Expression als der Vektor inkl. beider Globin-UTRs (Spur 6). Zusammenfassend bringen die lentiviralen Globinkonstrukte in diesem Kontext keinen Expressionsvorteil.

5. Das grün fluoreszierende Protein zur systematischen Analyse von verschiedenen RNA- und Spleißelementen

a. Hintergrund

Während die Transgenkontexte gpII und β -Globin Paradigmen für CTE-abhängige bzw. spleißabhängige Transkripte darstellen, können viele andere cDNAs in Abwesenheit von Spleißelementen oder CTEs exprimiert werden. Für solche Sequenzen könnten RNA-Elemente jedoch eine relative Expressionsverbesserung schaffen. Deshalb wurde der Einfluss von Spleißelementen, RNA-Elementen und deren Kombinationen auf die Expression des grün fluoreszierenden Proteins (EGFP) untersucht. Dieses ursprünglich aus einer Qualle (*Aequorea victoria*) isolierte Protein emittiert bei Anregung mit blauem Licht grünes Licht, welches im Fluoreszenzmikroskop oder im FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorter) detektiert werden kann. Die Expression von GFP konnte Spezies-unabhängig in zahlreichen prokaryotischen (*E. coli*) und eukaryotischen Zellsystemen (Säugetierzellen, *Drosophila melanogaster*, *C. elegans*) nachgewiesen und die Proteinlokalisierung in Echtzeit dargestellt werden (Chalfie et al. 1994, Prasher 1995). Sukzessiv konnte ein EGFP (enhanced) durch Optimierung der ‚Codon Usage‘ (Kodonnutzung) erstellt werden (Cormack et al. 1996), welches eine etwa 100fach gesteigerte Fluoreszenzleistung aufwies. Dieses EGFP wurde in dieser Arbeit verwendet.

b. Der EGFP-Expressionslevel eines retroviralen Vektors kann durch post-transkriptionelle Regulatorelemente modifiziert werden

Im Gegensatz zu den gpII- und β -Globin-Versuchen konnten die EGFP-Versuche bei gleichen m.o.i.-Werten durchgeführt werden. Dies folgt aus der Nachweisbarkeit der EGFP-Expression direkt in der Durchflusszytometrie in Verpackungszelllinie und transduzierten Zellen und der vereinfachten Titerbestimmung (Arai et al. 1999, Wahlers et al. 2001).

Die Vektoren MP110EGFP (deletierter Spleißdonor), MP11EGFP (aktiver Spleißdonor), MP71EGFP (volles Intron) und ihre Derivate mit RNA-Elementen wurden zur Transfektion von Phoenix-Zellen genutzt. Nachfolgend wurden SW480-Zellen mit den jeweiligen Überständen transduziert. Die Zellen wurden 6 Tage nach Transduktion weiterkultiviert. Es folgte die Analyse im Northern Blot und in der Durchflusszytometrie zur Beurteilung von RNA- bzw. Proteinexpression.

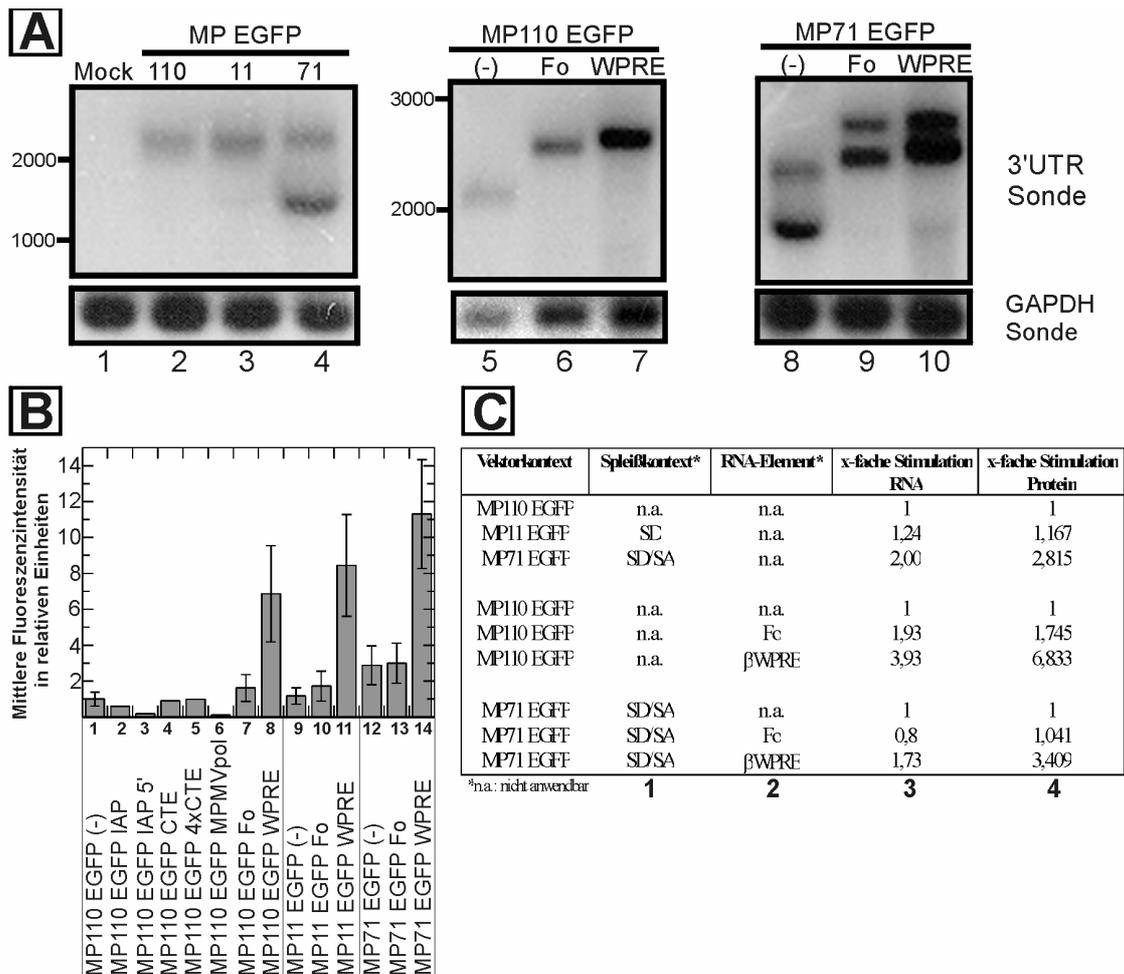


Abb. 19: Modifizierung der Expressionslevel von retroviralen EGFP-Vektoren durch posttranskriptionelle Kontrollelemente

- (A) Diese Northern Blot-Analyse zeigt EGFP-Transkripte in SW480-Zellen, die bei äquivalenter m.o.i. mit den beschrifteten Vektoren transduziert wurden. Der relative Anstieg der retroviralen RNA-Expression ist abhängig von der Präsenz von Spleißsignalen oder von RNA-Elementen und wurde durch Phosphoimager-Analyse (C) quantifiziert. Die Blots wurden durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten, gegen die MPSV 3'UTR gerichteten Sonde erstellt. Danach erfolgte eine Rehybridisierung mittels einer GAPDH-spezifischen Sonde. Molekulare Größenstandards sind in bp angegeben.
- (B) Verbesserung der EGFP-Proteinexpression retroviraler Vektoren durch Spleiß- und RNA-Elemente: Die mittlere Fluoreszenzintensität der EGFP-positiven Zellen unselektierter SW480-Zellpopulationen wurde durch Durchflusszytometrie ermittelt und die Standardabweichung (Fehlerbalken) bestimmt. Grundlage sind drei, unabhängig voneinander durchgeführte, nachfolgend gemittelte Transduktionen mit den bezeichneten Vektoren. Für die Berechnung der relativen Einheiten wurde der Vektor ohne Spleiß- und RNA-Elemente (MP110EGFP) gleich 1 gesetzt.
- (C) Tabellarische Gegenüberstellung der relativen Stimulation von RNA- und Proteinexpression in EGFP-transduzierten SW480-Zellen: Aus dem gleichen Versuchansatz des in A gezeigten Northern Blots wurden Zellen mittels Durchflusszytometrie (FACS) auf Proteinebene untersucht. So konnten die einzelnen Stimulationseffekte von Spleißkontext (Spalte 1) und RNA-Elementen (Spalte 2) auf RNA- und Proteinebene unmittelbar gegenübergestellt werden. Die RNA-Stimulationsfaktoren (Spalte 3) wurden aus Phosphoimager-Daten kalkuliert, wobei die Signalintensität des Referenzvektors MP110EGFP gleich 1 gesetzt wurde und alle anderen Vektorkontexte zu diesem in Bezug gesetzt wurden. Bei der Berechnung der RNA-Stimulationsfaktoren wurden die unterschiedlichen GAPDH-Signalintensitäten der einzelnen Spuren rechnerisch berücksichtigt. Ferner wurde an die aus FACS-Daten bekannten unterschiedlichen Transduktionsraten angeglichen. Letztere variierten nur um wenige Prozent. Die Proteinexpression wurde aufgrund der mittleren Fluoreszenzintensität von EGFP-positiven Zellen am FACS ermittelt. Auch hier wurde der Vektor MP110 EGFP, der keine Spleiß- und RNA-Elemente enthält, gleich 1 gesetzt, um die relativen Stimulationseffekte der übrigen Vektoren zu berechnen.

Die Northern Blot-Analyse von Gesamt-RNA-Präparationen einer polyklonalen, unselektierten Population transduzierter SW480-Zellen zeigte mittels einer gegen die 3'UTR gerichteten Sonde die in Abb. 19A dargestellten Transkripte. Darunter ist die Rehybridisierung mit einer GAPDH-Sonde gezeigt.

Die Spur 2 (Abb. 19A) zeigt das ungespleißte Transkript ohne Präsenz von Spleißelementen. Verglichen mit dem korrespondierenden Spleißdonor-deletierten Vektor (MP110EGFP) führt die Präsenz eines aktiven Spleißdonors (MP11EGFP) zu einem geringen Anstieg des ‚steady-state‘ RNA-Levels (vgl. Spur 2 mit 3). Das Vorhandensein eines funktionellen Introns (MP71EGFP) resultierte in effizientem Spleißen (Abb. 19A, Spur 4). Die Verwendung des Foamy- und besonders des β WPRE-Elementes führte zu einer deutlichen Steigerung der RNA-Expression im spleißdefizienten Vektor MP110EGFP (vgl. Spur 6 u. 7 mit 5). Im spleißkompetenten Vektor MP71EGFP zeigte der Einsatz eines β WPRE eine weitere Steigerung der RNA-Expression (vgl. Spur 10 mit 8), wohingegen ein Foamy-Element kaum Expressionsgewinn in diesem Kontext brachte (vgl. Spur 9 mit 8). Das Foamy- und das β WPRE-Element wirkten sowohl auf die gespleißte als auch ungespleißte RNA, ohne einen signifikanten Effekt auf das Spleißverhältnis auszuüben (19A, Spur 8-10).

Die Abb. 19B zeigt die Effekte von Spleißkontext und RNA-Elementen auf die EGFP-Expression auf Proteinebene. Drei unabhängig voneinander durchgeführte Transduktionen wurden mit Überständen der in Abb. 19B unten angegebenen Vektoren durchgeführt. Die mittlere Fluoreszenzintensität der EGFP-positiven Zellen wurde durchflusszytometrisch ermittelt (FACS) und die Standardabweichung (Fehlerbalken) berechnet (Abb. 19B). In Analogie zu den erhobenen RNA-Daten (Abb. 19A links) führt die Anwesenheit eines Spleißdonors (MP11EGFP, Säule 9) und besonders eines funktionellen Introns (MP71EGFP, Säule 12) zu einer geringen Erhöhung der EGFP-Expression auf Proteinebene. Bei der Verwendung von RNA-Elementen waren das Foamy-Element (Abb. 19B, Säule 7, 10, 13) und noch signifikanter das β WPRE (Säule 8, 11, 14) in der Lage, die EGFP-Expression z.T. deutlich zu verbessern. Im Kontext des spleißdefizienten Vektors MP110EGFP wurden weitere posttranskriptionelle Kontrollelemente (IAP, CTE, 4xCTE, MPMVpol.-Element) getestet. Im Vergleich zu den Beobachtungen bei gpII (Abb. 10) und β -Globin (Abb. 15 u. 16) war kein Anstieg der EGFP-Expression bei Verwendung des IAP-Elementes nachweisbar (Abb. 19B, Säule 2). Das Einfügen der kodierenden DNA eines RNA-Elementes (in diesem Falle des IAP) in die 5'UTR (IAP5', Säule 3) anstelle der 3'UTR sorgte für einen deutlichen Expressionsverlust (vgl. Säule 2 u. 3). Die Einsetzung eines 1,6 kb großen MPMVpol.-

Elementes (aus der pol/env-Region des MPMV, Säule 6) in die 3'UTR führte zu einer schlechteren EGFP-Expression. Auch der Einbau des CTE (Säule 4) oder 4xCTE (5) in die 3'UTR des MP110EGFP-Vektors brachte keinen Expressionsgewinn gegenüber dem Referenzvektor ohne RNA-Element (Säule 1).

Aus dem gleichen Versuchsansatz gewonnene RNA- und Proteindaten lassen einen unmittelbaren Vergleich der RNA- und Proteinexpression zu. Die im Northern Blot von Abb. 19A transduzierte SW480-Zellpopulation wurde daher auch im FACS analysiert (generelle Methodik s. 19B), um die EGFP-Expression auf Proteinebene zu dokumentieren. In der tabellarischen Darstellung der Abb. 19C sind die schon in 19A gezeigten Vektorkontexte nach verwendeten Spleißkontexten und RNA-Elementen aufgeschlüsselt. Die RNA-Stimulationsfaktoren wurden aus Phosphoimager-Daten berechnet, die unter Verwendung des in 19A gezeigten Northern Blots gewonnen wurden. Für die Berechnung der Stimulationsfaktoren wurden sowohl die Signalintensitäten der jeweiligen GAPDH-Expression als auch die unterschiedliche Prozentzahl der transduzierten Zellen, die durch Bestimmung der EGFP-positiven Zellen im FACS ermittelt wurde, berücksichtigt.

Der Referenzvektor MP110EGFP, der keine Spleiß- und RNA-Elemente enthält, wurde gleich 1 gesetzt und ein dementsprechender x-facher Stimulationsfaktor auf RNA-Ebene für die übrigen Vektorkonstrukte angegeben. Auf Protein-Ebene wurden die im FACS ermittelten mittleren Fluoreszenzintensitäten der EGFP-positiven Zellen ebenfalls auf den gleich 1 gesetzten Referenzvektor MP110EGFP bezogen und der x-fache Stimulationsfaktor für die einzelnen Konstrukte berechnet. In Abb. 19C können für den jeweiligen Vektor-, Spleiß- und RNA-Element-Kontext die x-fachen Stimulationsfaktoren auf RNA- und Protein-Ebene direkt nebeneinander abgelesen werden.

Das Vorhandensein eines aktiven Spleißdonors (MP11EGFP) hat neben einer geringen RNA-Stimulation (1,2fach) eine vergleichbare Stimulation der Proteinexpression (1,2fach) zur Folge. Ein vollständiges Intron führt im Vektorkontext MP71EGFP zu einem zweifachen Anstieg der RNA-Expression und einer fast dreifachen Stimulation der Proteinexpression (Abb. 19C). Das weist auf einen zweifachen Effekt des Spleißvorgangs in der 5'UTR hin: erstens auf der Ebene des RNA-Exports und der Stabilität sowie zweitens auf der Ebene der Translation.

Im spleißdefizienten Kontext MP110EGFP brachte der Einbau eines Foamy-Elements auf RNA-Ebene eine 1,9fache Stimulation, auf Proteinebene eine 1,7fache Stimulation in

Relation zum Referenzvektor ohne Element. Das Foamy-Element wirkt also eher auf RNA-Ebene und bringt auf Protein-Ebene keinen weiteren Expressionsgewinn. Das β WPRE sorgt im spleißdefizienten EGFP-Kontext auf RNA-Ebene für eine 3,9fache Expressionssteigerung. Dem steht ein 6,8facher Stimulationsfaktor auf Protein-Ebene gegenüber, so dass das WPRE auch auf Translationsebene wirksam sein muss. Insgesamt war das Foamy-Element signifikant schwächer als das β WPRE. Darüber hinaus sorgte das β WPRE für eine Expressionsverbesserung sowohl in spleißdefizienten (MP110) als auch spleißkompetenten Vektoren (MP71) (vgl. Abb. 19A Spur 10 u. 8, 19B Säule 14 u. 12, Abb. 19C), während das Foamy-Element sowie das CTE und andere verwandte Elemente (für letztere Daten nicht gezeigt) keinen oder nur wenig Effekt auf spleißkompetente Vektoren hatten (vgl. Abb. 19A Spur 9 u. 8, 19B Säule 13 u. 12, Abb. 19C). Wie bei β -Globin wurde der größte Anstieg der Expression (mehr als 10fach verglichen mit dem Basiskonstrukt MP110EGFP) durch die Kombination von β WPRE und Spleißelementen (Intron) erzielt (Abb. 19A Spur 10, B Säule 14, Abb. 19C). Interessanterweise war der Effekt des β WPRE im Kontext des spleißkompetenten Vektors MP71 schwächer als im Kontext des spleißdefizienten Vektors, was in einer 50 %igen Reduktion der Expressionsstimulation sowohl auf RNA- als auch Protein-Ebene resultierte (Abb. 19C). Insgesamt wurde aber im spleißkompetenten Vektorkontext noch eine 3,4fache Stimulation auf Proteinebene durch das β WPRE beobachtet (Abb. 19C).

Einfluss der Transduktionsrate auf die EGFP-Expression

Um eine relative Verstärkung der Expressionslevel als Konsequenz von Unterschieden in der Transgenkopienanzahl auszuschließen, wurden Cf2Th-Zellen mit seriellen Verdünnungen von Phoenix-Überständen der Vektoren MP110EGFP, MP110EGFP Fo(amy) und MP110EGFP β WPRE transduziert (Abb. 20). Die mittleren Fluoreszenzintensitäten (y-Achse) wurden zur Prozentzahl der EGFP-transduzierten Zellen (x-Achse) in Beziehung gesetzt.

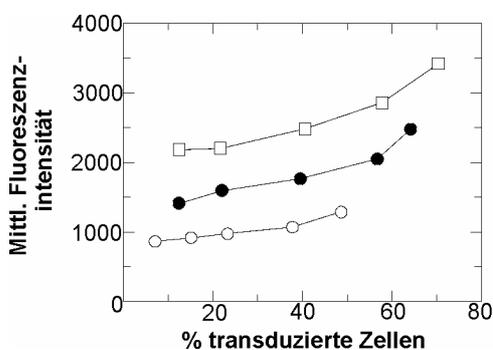


Abb. 20: Einfluss der Transduktionsrate auf die EGFP-Expression

Cf2Th-Zielzellen wurden mit 5 seriellen Verdünnungen (1:1, 1:2, 1:4, 1:8 und 1:16) der Überstände von Phoenixzellen transduziert, welche mit den Vektoren MP110 EGFP (\circ), MP110 EGFP Fo (\bullet) und MP110 EGFP β WPRE (\square) transfiziert worden waren. Die mittlere Fluoreszenzintensität transduzierter Zellen (y-Achse) und die Prozentzahl der transduzierten Zellen (x-Achse) wurden 5 Tage nach Transduktion durchflusszytometrisch analysiert.

Die resultierenden Kurven zeigen, dass auch in Cf2Th-Zellen das Foamy- (●) und besonders das β WPRE-Element (□) zu einer deutlichen Expressionsverbesserung in Relation zum Referenzvektor ohne Element (○) führen. Bis etwa 30-35 % transduzierter Zellen zeigt sich in den drei Kurven nur wenig Beeinflussung der mittleren Fluoreszenzintensität durch die Prozentzahl der transduzierten Zellen. Bei über 40 % transduzierten Zellen verändert sich die Steigung der Kurve (Abb. 20), die zunächst linear verläuft und ab 40 % transduzierter Zellen eher exponentiell steigt. Wahrscheinlich sorgen nun vermehrt vorhandene Mehrfachintegrate von Vektorkopien für eine höhere EGFP-Expression. Da Transduktionslevel von mehr als 35 % die Wahrscheinlichkeit von multiplen Integrationsereignissen erhöhen (Arai et al. 1999, Wahlers et al. 2001), wurde ein Anstieg der mittleren Fluoreszenzintensität bei allen Vektortypen und bei höheren m.o.i.-Werten beobachtet (Abb. 19C). Im Ergebnis ist die durch ein RNA- oder Spleiß-Element vermittelte Verstärkung der EGFP-Expression solange nicht vom infektiösen Titer beeinflusst, wie die Transduktionseffizienz unter 30-35 % liegt.

Beeinflussung der EGFP-Expression durch verschieden lange WPRE-Elemente

Im Globinabschnitt dieser Arbeit (C.4.a.) wurden zum ersten Mal verschieden lange WPRE-Fragmente (β - bzw. γ WPRE, Abb. 15 u. 16) genutzt. Im folgenden werden drei verschiedene WPRE-Elemente (α WPRE 467 bp, β WPRE 601 bp, γ WPRE 901 bp, ausführlich erläutert in B.7.b.) im Kontext des MP110EGFP-Vektors auf ihren Einfluss auf die EGFP-Expression untersucht. Northern Blot-Daten wurden aus Gesamt-RNA-Präparationen transduzierter SW480-Zellen (Methodik wie im Experiment Abb. 19A) gewonnen.

Vektoren mit jedem der drei unterschiedlich langen WPRE-Elemente zeigten im Northern Blot im Vergleich zum Kontrollvektor MP110EGFP eine deutlich höhere EGFP RNA-Expression (Abb. 21A). Je länger das verwendete WPRE-Fragment war, desto stärker stieg die Expression. Abb. 21B zeigt die Steigerung der verschiedenen WPRE-Elemente auf Proteinebene in einer FACS-Analyse. Es wurden sowohl SW480- (Säule 5-8) als auch Cf2Th-Zellen (Säule 1-4) transduziert und analysiert. Um individuelle Titerunterschiede der Elemente aufzeigen zu können, erfolgte hier kein Titerabgleich in der Verpackungszelllinie.

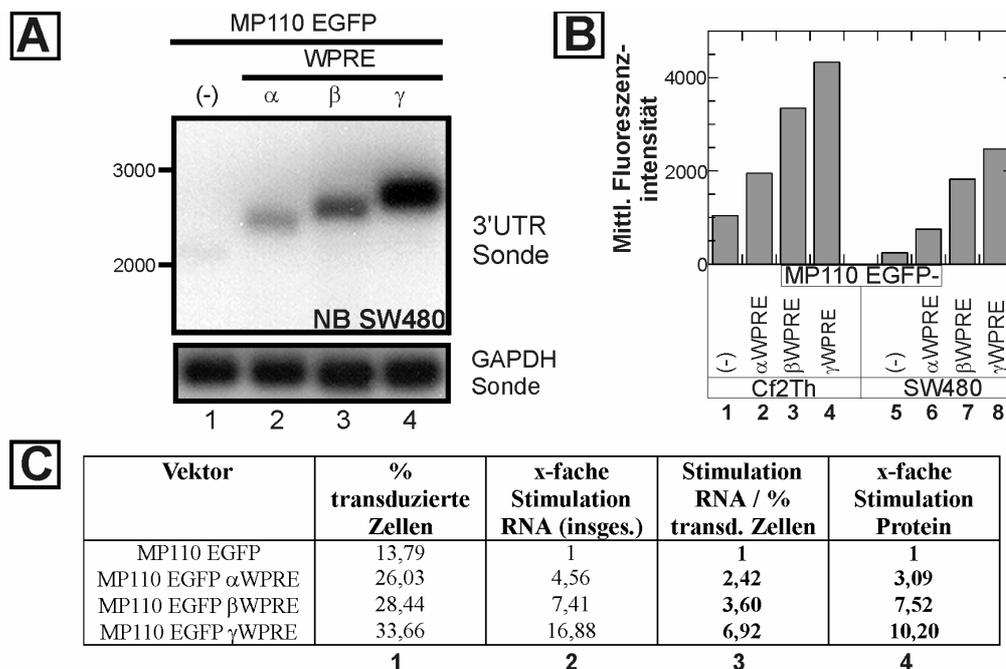


Abb. 21: Deutliche Beeinflussung der EGFP-Expression durch verschieden lange WPRE-Elemente
 (A) Northern Blot Analyse von RNA-Präparationen aus SW480-Zellen, die mit MP110 EGFP-Vektordrivaten unter Verwendung von drei verschiedenen WPRE-Fragmenten (Spur 2-4: α , β , γ WPRE, s. B.7.b) transduziert wurden. Die verwendeten Sonden und die übrigen Beschriftungen sind analog zu Abb. 19A.
 (B) FACS-Analyse von transduzierten Cf2Th- (Säule 1-4) und SW480-Zellen (Säule 5-8). Die mittlere Fluoreszenzintensität der EGFP-positiven Zellpopulationen wurde bestimmt und in Säulenform dargestellt.
 (C) Gegenüberstellung der Stimulationfaktoren verschiedener WPRE-Elemente auf RNA- und Protein-Ebene. Der in A dargestellte Northern Blot wurde im Phosphoimager analysiert. Es wurden aus diesen Daten RNA-Stimulationsfaktoren (insgesamt) in Relation zum Vektor MP110 berechnet (Spalte 2). Auf Proteinebene wurde dieselbe transduzierte SW480-Zellpopulation (s. B, Säule 5-8) im FACS analysiert und so die prozentuale Anzahl der EGFP-positiven Zellen (Spalte 1) und deren mittlere Fluoreszenzintensität bestimmt. Zur Bestimmung des Stimulationfaktors auf Proteinebene (Spalte 4) wurden die verschiedenen Fluoreszenzintensitäten in Relation zum MP110 EGFP-Vektor ohne Element (gleich 1) gesetzt. Aus der prozentualen Anzahl der EGFP-positiven Zellen (% transduzierte Zellen, Spalte 1) konnte in Relation zum MP110 EGFP-Vektor ohne Element (gleich 1 gesetzt) ein Stimulationfaktor auf RNA-Ebene (Stimulation RNA / % transduzierte Zellen, Spalte 3) berechnet werden, der die höhere Anzahl der transduzierten Zellen der WPRE-Vektoren berücksichtigt.

Wie Abb. 19C enthält auch Abb. 21C eine tabellarische Übersicht von RNA- und Protein-Stimulationen verschiedener Kontexte. Die Daten wurden aus der gleichen SW480-Zellpopulation gewonnen, die in Abb. 21A (Spur 1-4) und Abb. 21B (Säule 5-8) gezeigt wurde. So konnten RNA- und Proteinexpression der gleichen Zellpopulation unmittelbar miteinander verglichen werden. Aus dem Northern Blot der Abb. 21A wurden Phosphoimager-Daten generiert und hieraus RNA-Stimulationsfaktoren der verschiedenen WPRE-Kontexte in Relation zum MP110EGFP-Vektor (gleich 1 gesetzt) kalkuliert (Spalte 2). Bei der Berechnung wurden wie in Abb. 19C die GAPDH-Niveaus berücksichtigt. Die transduzierten SW480-Zellen wurden im FACS analysiert, um die Prozentzahl der EGFP-positiven Zellen (Spalte 1) und die mittlere Fluoreszenzintensität der EGFP-positiven Zellen zu bestimmen. Aus der mittleren Fluoreszenzintensität EGFP-positiver Zellen wurden in Relation zum MP110EGFP-Vektor Stimulationfaktoren auf Protein-Ebene kalkuliert (Spalte 4).

WPRE-haltige Vektoren verbessern den Titer (Abb. 21C, vgl. Abb. 9B), was in der größeren Anzahl transduzierter Zellen bei Verwendung der WPRE-Fragmente zum Ausdruck kommt (Spalte 1). Um die unterschiedlichen Titer bei der Kalkulation der RNA-Stimulationsfaktoren zu berücksichtigen, wurde die unterschiedliche Prozentzahl der EGFP-positiven Zellen eingerechnet. Daraus entstanden die in Spalte 3 angegebenen Stimulationsfaktoren (Stimulation RNA / % transduzierte Zellen).

In Abb. 21C zeigt sich eine WPRE-bedingte Steigerung der EGFP-Proteinexpression auf das 3,1fache bei α WPRE, das 7,5fache bei β WPRE und das 10,2fache bei γ WPRE, bezogen auf den gleich 1 gesetzten Basalvektor MP110EGFP. Analog zu Abb. 19C fällt für die verschiedenen WPRE-Elemente die Steigerung auf RNA-Ebene geringer aus als die Steigerung auf Proteinebene, und zwar – abhängig vom Element – 1,3fach bei α WPRE, 2,1fach bei β WPRE und 1,5fach bei γ WPRE.

Kombinationen verschiedener RNA-Elemente in einem Vektor

In den vorigen Abschnitten wurden Spleißelemente mit RNA-Elementen kombiniert oder multimere RNA-Elemente (4xCTE) getestet. Der nachfolgende Abschnitt prüft die Kombinationen verschiedener RNA-Elemente miteinander (IAP+CTE, Foamy+CTE, Foamy+ β WPRE).

Hierzu wurden in die 3'UTR des MP110EGFP-Vektors die kodierenden Sequenzen von zwei verschiedenen RNA-Elementen kloniert (B.7.b). Nach Transduktion von SW480-Zellen durch die entsprechenden Vektoren wurde die mittlere Fluoreszenzintensität EGFP-positiver Zellen bestimmt (Abb. 22, gleiche Versuchsdurchführung wie in Abb. 19).

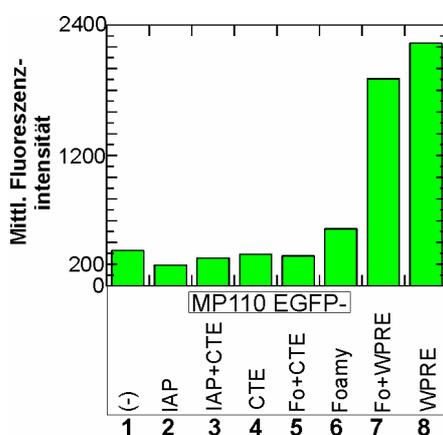


Abb. 22: Kombinationen von verschiedenen RNA-Elementen in einem Vektor

Derivate des MP110EGFP-Vektors wurden zur Transduktion von SW480-Zellen genutzt. Es wurden der Basisvektor (Spur 1) und dessen Derivate mit einem (Spur 2, 4, 6, 8) oder zwei verschiedenen RNA-Elementen (Spur 3, 5, 7) in der 3'UTR verwendet. Die Verwendung zweier RNA-Elemente in der 3'UTR ist zwischen den Ausgangsvektoren mit dem jeweiligen Element dargestellt. Bei der Kombination zweier Elemente innerhalb der 3'UTR befindet sich das erstgenannte 5' vom letztgenannten. Die Analyse erfolgte im FACS 6 Tage nach Transduktion. Die mittlere Fluoreszenzintensität der EGFP-positiven Zellpopulation ist links dargestellt.

In Säule 1 ist der Basalvektor MP110EGFP angegeben. Die Säulen 2, 4, 6 und 8 markieren die mittlere Fluoreszenzintensität EGFP-positiver Zellen unter Verwendung jeweils nur des

IAP-, CTE-, Foamy- oder β WPRE-Elementes. Die Säulen 3, 5 und 7 zeigen die Kombination von IAP- und CTE- (Säule 3), Foamy- und CTE- (Säule 5) sowie Foamy- und β WPRE-Elementen (Säule 7). Die Verknüpfungen verschiedener Elemente resultierten zumeist (Ausnahme Foamy+CTE, Abb. 22, Säule 5) in einem intermediären Expressionslevel zwischen den Expressionsniveaus der jeweiligen Elemente allein. Hier sind die Foamy- und/oder WPRE-tragenden Vektoren (Säule 6-8) die am besten exprimierenden Vektoren. Die Kombination von Foamy und WPRE (Säule 7) bringt jedoch in Relation zum einfachen WPRE-Vektor (Säule 8) keine Expressionsverbesserung. Dies spricht gegen eine synergistische Kooperation dieser Kombinationen von Elementen und damit gegen einen sinnvollen kombinatorischen Einsatz in therapeutischen Vektoren.

Zusammenfassend zeigen die erhaltenen Resultate der EGFP-Vektoren, dass die höchste Expression solcher Transgene durch Spleißelemente (Intron) in der 5'UTR in Kombination mit dem WPRE (v.a. γ WPRE) erzielt wurde, während das CTE die Expression nicht verbesserte. Das Foamy-Element wirkte 1,7fach stärker als der Referenzvektor ohne RNA-Element in Abwesenheit von Spleißelementen, hatte jedoch kaum Einfluss in Präsenz von Spleißelementen.

6. Verwendung von RNA- und Spleißelementen zur Steigerung der MDR1-Genexpression

a. Hintergrund

Das ursprünglich in Tumorzellen gefundene MDR1-Gen (Multiple Drug-Resistenzgen 1) vermittelt Resistenz gegenüber zahlreichen Zytostatika, wie z.B. Anthrazyklinen, Vinca-Alkaloiden, Epipodophyllotoxinen, Taxanen und Colchizin. Ursache ist die Überexpression des MDR1-Genprodukts, eines 170 kDa großen, membranständigen Transportproteins (Membraneffluxpumpe), welches auch als Permeabilitäts-Glykoprotein (P-gp) bekannt ist (Borst et al. 1997, Gottesman et al. 1995). Der gezielte gentherapeutische Einbau dieses Gens in hämatopoetische Stammzellen birgt in einer *ex vivo* Gentherapie das Potential, bei Leukämie- und anderen Tumorpatienten wesentlich höhere Dosen an Zytostatika geben und Tumoren aggressiver behandeln zu können, weil gentherapierte, hämatopoetische Zellen durch die Anwesenheit dieser Membraneffluxpumpe toxische Chemotherapeutika in verstärktem Maße aus der Zelle pumpen können (Eckert et al. 1996, Sorrentino et al. 1992).

Die Überexpression des MDR1-Gens in hämatopoetischen Stammzellen soll dabei die mit der höher dosierten Chemotherapie verbundenen Nebenwirkungen minimieren. Eine umfassende Übersicht über MDR und seine klinische Bedeutung sowie mögliche therapeutische Ansätze finden sich in Hegewisch-Becker et al. (1996).

b. Die Kombination von Spleißelementen und WPRE verstärkt die Expression von humanem MDR1

Um die mögliche Expressionssteigerung von MDR-Vektoren (beschrieben in Hildinger 1999, Knipper et al. 2001) durch den Einsatz posttranskriptionell aktiver RNA-Elemente zu testen, wurde ein CTE-, Foamy- oder WPRE-Element in den spleißkompetenten retroviralen MDR1-Vektor SF91m3 kloniert. Dieser Vektor enthält die MDR1-cDNA m3 und als 3'LTR den SFFV LTR (s. B.7.c). Aus Vorexperimenten von Eckert et al. (1996) war bekannt, dass die Promotoraktivität des SFFV LTR in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen stärker als die des MPSV LTR einzustufen ist. Mit Vektorderivaten des SF91m3 wurden Phoenixzellen nach der Calciumphosphatmethode transfiziert. Mit den korrespondierenden Überständen wurden $1 \cdot 10^5$ SW480-Zellen unter Polybrenzusatz transduziert.

Abb. 23A zeigt Immunfluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen von transduzierten SW480-Zellen, die mit Überständen der Vektoren SF91m3, SF91m3 Fo(amy) und SF91m3 β WPRE transduziert wurden. Die Anfärbung erfolgte über einen monoklonalen, Phycoerythrin konjugierten MDR-Antikörper. Die Transgenexpression bei Verwendung des Vektor inkl. WPRE (SF91m3 β WPRE, s. A III) ist im Vergleich zu den Zellen, die mit dem Standardvektor (SF91m3, A I) oder dem Vektor inkl. Foamy-Element (SF91m3 Fo, A II) transduziert wurden, deutlich vermehrt. Eine parallel durchgeführte FACS-Analyse lieferte die in Abb. 23A unter den Immunfluoreszenzen vermerkten mittleren Fluoreszenzintensitäten. Das Experiment wurde mehrfach durchgeführt und die MDR-Expression durchflusszytometrisch dokumentiert. Die Abb. 23B stellt beispielhaft die FACS-Auswertung eines anderen Transduktionsexperiments dar. Auf der Abzisse ist die Fluoreszenzintensität (MDR-Primärantikörper, Sekundärantikörper Anti-Maus-FITC) der transduzierten Zellen in logarithmischer Form aufgetragen, auf der Ordinate die Zellanzahl. Die MDR-positiven Zellen sind durch den Marker M1 umschlossen und deren mittlere Fluoreszenzintensität sowie die Anzahl der positiven MDR-exprimierenden Zellen in C auch für andere RNA-Elemente tabellarisch dargestellt. Anhand der FACS-Analyse konnte ein etwa dreifacher Anstieg der mittleren Fluoreszenzintensität durch die Verwendung eines WPRE-haltigen Vektors ermittelt werden.

Die Vektoren mit CTE- oder Foamy-Element hatten nur geringen Einfluss auf die Expression, konnten aber den Titer (s. C, Prozentzahl der transduzierten Zellen) etwas steigern. Die dreifache Expressionssteigerung durch das WPRE wurde auch in Experimenten mit deutlich weniger transduzierten Zellen (<30 %, s. A) nachvollzogen. Eventuell vorhandene Mehrfach-integrate sind folglich nicht die Ursache für die Expressionssteigerung.

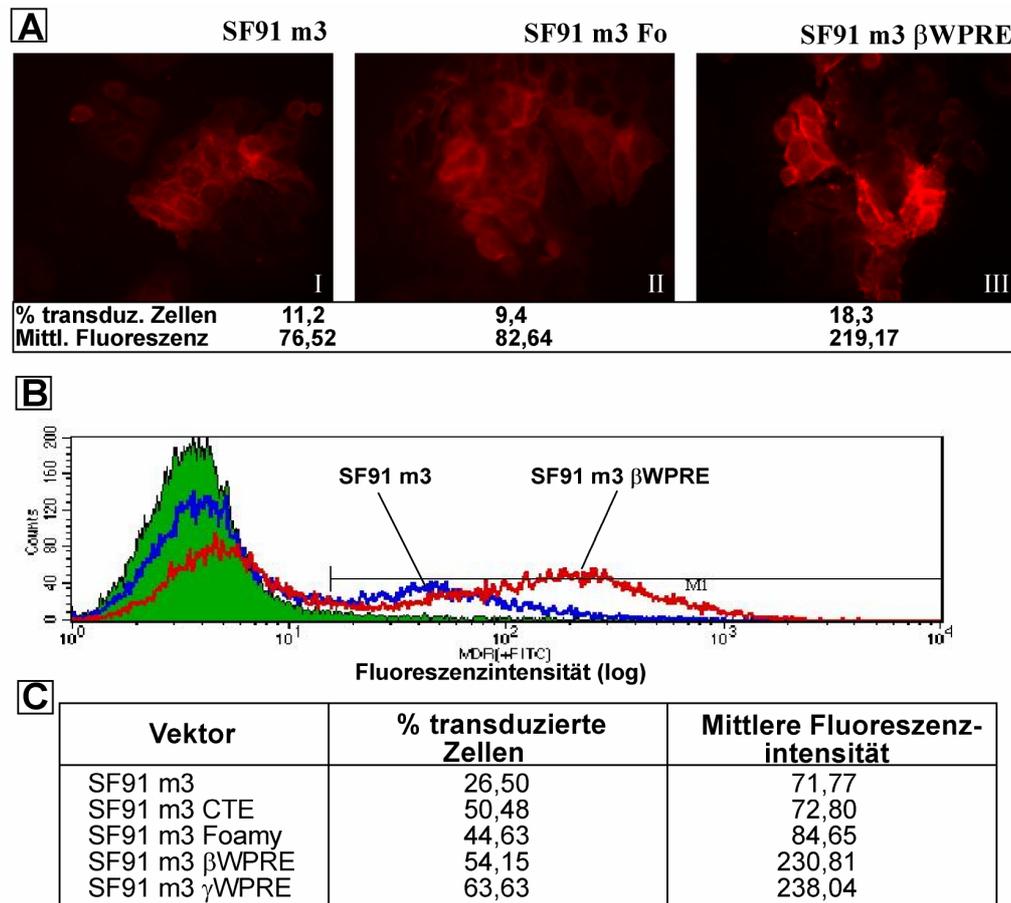


Abb. 23: Posttranskriptionelle Kontrollelemente vergrößern die Expression des MDR1-Gens

- (A) Die Immunfluoreszenz-mikroskopisch dargestellten SW480-Zellen wurden mit den retroviralen Vektoren SF91 m3, SF91 m3 Foamy oder SF91 m3 β WPRE transduziert: Die Zellen wurden 6 Tage nach Transduktion mit Paraformaldehyd fixiert und die Detektion wurde mit einem Phycoerythrin (PE) - konjugierten monoklonalen MDR-Antikörper durchgeführt. Die Transduktionsraten waren vergleichbar und <20 %. Die zugehörigen Ergebnisse der Durchflusszytometrie (% transduzierte Zellen, mittlere Fluoreszenzintensität) sind unter den Aufnahmen angegeben.
- (B) In einem 2. Experiment wurden SW480-Zellen, die mit den retroviralen Vektoren SF91 m3 oder SF91 m3 β WPRE transduziert wurden, im FACS analysiert. Der Marker M1 wurde auf MDR-positive Zellen eingestellt und die mittlere Fluoreszenzintensität dieser Population bestimmt (C). Die Zellfärbung erfolgte mit einem monoklonalen MDR-Antikörper (UIC2), gefolgt von einem FITC-konjugierten Anti-Maus-Antikörper. Die mit dem Vektor MP110 transduzierten Zellen (grün) wurden als Kontrolle verwendet.
- (C) Neben den in B dargestellten Vektoren wurden im selben Versuchsansatz die SF91m3-Derivate mit CTE-, Foamy und γ WPRE-Element verwendet. Die Ergebnisse der Transduktion von SW480-Zellen mit diesen Vektoren sind tabellarisch dargestellt. Die Methodik entspricht der FACS-Analyse unter B. Die mittlere Fluoreszenzintensität der MDR-positiven, polyklonalen Zellpopulation ist rechts dargestellt, in der Mitte der prozentuale Anteil MDR-exprimierender Zellen.

Um die Vektoren in einem Modellsystem zu testen, welches dem blutbildenden System möglichst nahe kommt, wurden humane K-562-Zellen (erythroide Vorläuferzellen) mit diesen Vektoren transduziert. Neben der SF91m3-Vektorserie wurden weitere Vektoren getestet. Der Vektor MP110m23 (s. Abb. 24A, Spur 1 u. 2) enthält MPSV LTRs, keine Spleißsignale und

eine von Sorrentino et al. (1992) publizierte MDR cDNA (m23), welche einen deletierten Spleißdonor und einen teildeletierten Spleißakzeptor aufweist. Diese cDNA liefert eine schlechtere Basalexpression als die von C. Baum verwendete m3 cDNA. Diese m23 cDNA wurde in den spleißdefizienten Vektor MP110 kloniert, um zu testen, ob das Foamy-Element analog zum EGFP-Kontext (Abb. 19B) in schwach exprimierenden Konstrukten einen verbessernden Einfluss ausüben kann. Daneben wurden SFFV-basierte bicistronische Vektoren (SF91m3IRESEGF) erstellt, die hinter der MDR-cDNA ein zweites Markergen (EGFP) aufwiesen. Für die Expression des zweiten Gens wurde eine IRES-Sequenz (Intraribosomal Entry Site) von EMCV verwendet.

Es wurden Phoenixzellen mit MP110m23- und SF91m3-Vektorderivaten transfiziert und 2 ml Überstand auf $2 \cdot 10^4$ K-562-Zellen transferiert, um diese zu transduzieren. 6 Tage nach Transduktion erfolgte die Auswertung im FACS. Die Detektion des MDR-Proteins erfolgte durch einen monoklonalen, Phycoerythrin-konjugierten MDR-Antikörper (s. Abb. 24A, rote Säulen). Die Fluoreszenzintensität des EGFP wurde bei bicistronischen Vektoren parallel bestimmt. Abb. 24A zeigt die FACS-Analyse dieser transduzierten K-562-Zellen. Auf der Ordinate ist die mittlere Fluoreszenzintensität MDR- und MDR IRES EGFP-transduzierter Zellen angegeben. Die Säulen links (rot) markieren die MDR-Expression, die Säulen rechts (grün) die EGFP-Expression.

In den Spuren 1 und 2 sind die mit den Vektoren MP110m23 (schwaches MDR, keine Spleißelemente in der 5'UTR) und MP110m23 Foamy transduzierten Zellen gezeigt. Der Basalvektor MP110m23 (Spur 1) weist eine geringe MDR-Expression auf, welche sich durch Einsatz eines Foamy-Elementes (Spur 2) auf das 1,6fache steigern lässt. Die Spuren 3-6 markieren die Verwendung der bicistronischen SF91m3IRESEGF-Vektoren, d.h. MDR- und EGFP-transduzierter K-562-Zellen. Diese Vektoren produzieren eine intermediäre MDR-Expression, die zwischen den Expressionsniveaus der Vektoren aus den Spuren 1-2 und 7-9 liegt. Obwohl die MDR-Expression der bicistronischen Vektoren bei Verwendung eines RNA-Elements nahezu konstant bleibt, kann die EGFP-Expression durch ein β WPRE oder ein β WPRE+ um 23 bzw. 36 % gesteigert werden. Das RNA-Element β WPRE+ ist 3' um 30 bp länger als β WPRE und entstand aufgrund einer zuvor unbekanntes Schnittstelle. In der SF91m3-Serie (Spur 7-9) besitzen die Vektoren durch SFFV-Promotor und vorhandene Spleißelemente eine gute MDR-Expression in K-562-Zellen, jedoch lässt sich diese durch ein β WPRE kaum steigern. Das Foamy-Element führt in diesem spleißkompetenten Vektor sogar zu einem Expressionsverlust.

Um den relativ geringen Effekt der RNA-Elemente auf die MDR-Expression weiter zu untersuchen, wurde eine Northern Blot-Analyse aus Gesamt-RNA-Präparationen der MDR-transduzierten Zellen durchgeführt (Abb. 24B). Hierzu wurde die gleiche MDR-transduzierte K-562-Zellpopulation der Spuren 7-9 aus Abb. 24A benutzt. Der Nachweis der MDR-Transkripte erfolgte über eine radioaktiv markierte, gegen die SFFV 3'UTR gerichtete Sonde. Die möglichen Spleißprodukte sind in dem darunterliegenden Schema veranschaulicht. Unten ist die Nachhybridisierung mit einer GAPDH-Sonde aufgezeigt.

In Abb. 24B ist eine mehrfache Steigerung der MDR-RNA-Transkripte durch Verwendung eines Vektor mit β WPRES (Spur 3) festzustellen, während das Foamy-Element (Spur 2) in diesen Vektoren keinen signifikanten Vorteil bietet. Warum trotz deutlich gesteigerter Mengen an RNA (nach Phosphoimager Daten etwa Faktor 2,1) im Vergleich zum Referenzvektor SF91m3 nur wenig mehr MDR-Protein detektiert wird, konnte nicht geklärt werden. Eine mögliche Erklärung wäre z.B. ein limitierter Transport des synthetisierten Proteins zur Zelloberfläche als Ort der Detektion.

Die mit MDR-Vektoren transduzierten Zellen wurden einem Rhodamin-Ausflussassay unterzogen, um die Funktion der eingebauten MDR-Proteine zu testen. Rhodamin 123 ist ein Farbstoff, der Substrat der MDR-Pumpe ist, über diese transportiert wird und im FACS bestimmt werden kann (Baum et al. 1995). MDR-positive Zellen mit intakten MDR-Pumpen sind nach Aufnahme von Rhodamin 123 in der Lage, diesen Farbstoff wieder aus den Zellen herauszupumpen. Sie stellen sich im FACS Fluoreszenz-negativ dar.

6 Tage nach Transduktion wurde die mit dem Vektor SF91m3 β WPRES transduzierte K-562-Zellpopulation (gleiche Population wie in Abb. 24A, Spur 9 und B, Spur 3) einem Rhodamin-Ausflussassay unterzogen (Abb. 24C). In Abb. 24C ist auf der Ordinate die Zellzahl, auf der Abzisse die Rhodamin123-Fluoreszenzintensität in logarithmischer Form angegeben. Die mit dem Marker M1 umschlossene MDR-positive Zellpopulation (15% der Gesamtpopulation) stellt sich nach 30 min Ausflusszeit Fluoreszenz-negativ dar und konnte das zunächst aufgenommene Rhodamin wieder herauspumpen (vgl. fluoreszierende, nicht-transduzierte K-562-Zellen in dunkel). Eine Parallelfärbung derselben MDR-transduzierten Zellen mit einem Phycoerythrin-konjugierten MDR-Antikörper (UIC2-PE) zeigte 15% MDR-positive Zellen (Daten nicht gezeigt). Somit war davon auszugehen, dass nahezu 100% der MDR-transduzierten Zellen eine funktionelle MDR-Pumpe beinhalten. Der Rhodamin-Ausflussassay wurde auch für SF91m3- (kein RNA-Element) und SF91m3 Foamy-

transduzierte K-562-Zellen durchgeführt und zeigte auch in diesen Kontexten funktionelle MDR-Pumpen (Daten nicht gezeigt).

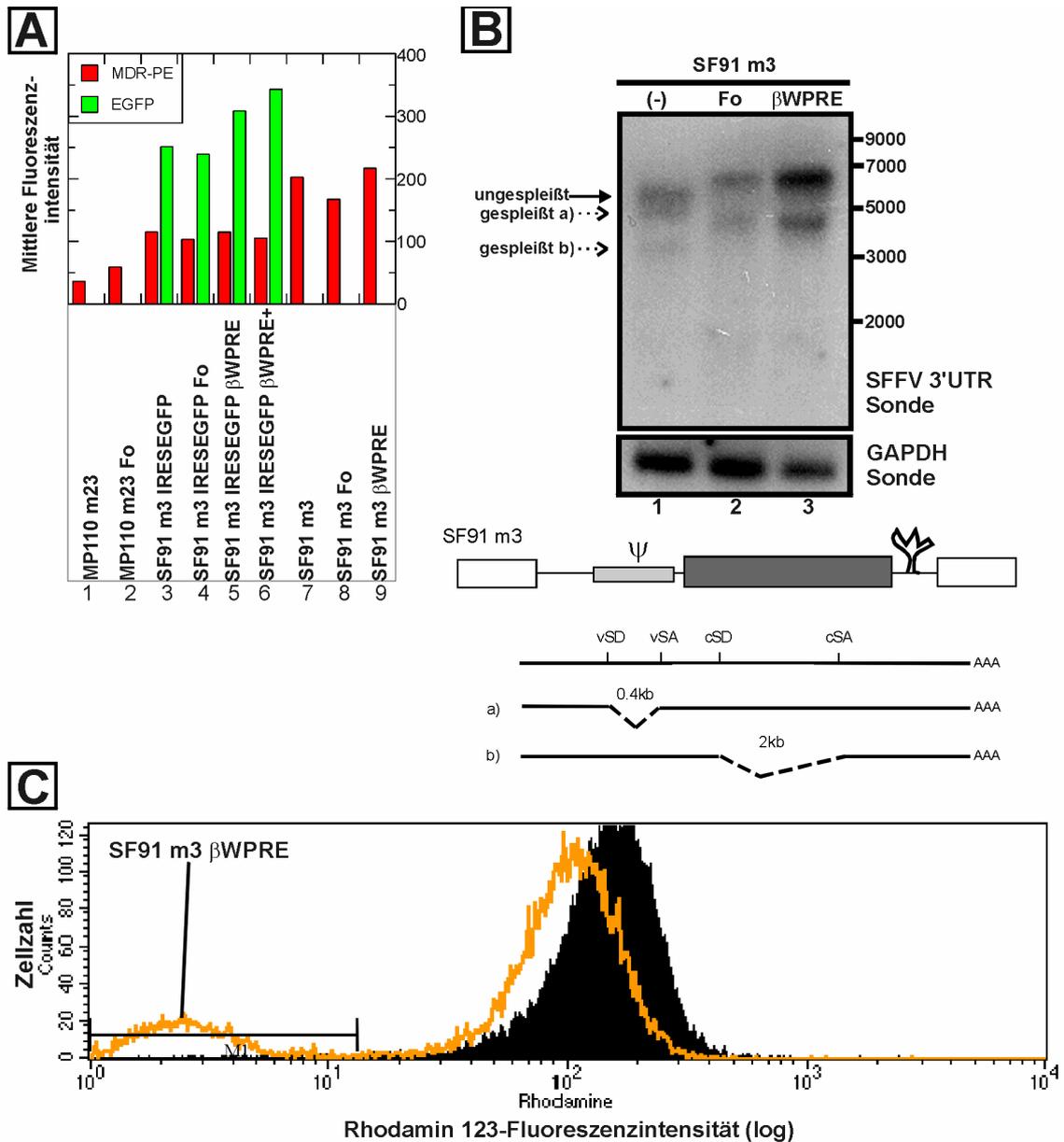


Abb. 24: Wirkung der MDR-Vektoren in Vorläuferzellen der Hämatopoese (K-562)

- (A) FACS-Analyse von K-562 Zellen, die mit Vektorderivaten von MP110 m23, SF91 m3 IRESEGFP (+EMCV IRES-EGFP) und SF91 m3 transduziert wurden. Zur Färbung der MDR-positiven Zellen wurde ein (monoklonaler) PE-konjugierter MDR-Antikörper genutzt (UIC2-PE, rote Säulen). Die EGFP-Expression ist in grün aufgetragen. Zur Analyse wurden die MDR- und EGFP-positiven Zellen erfasst und deren mittlere Fluoreszenzintensität auf der Ordinate dargestellt.
- (B) Northern Blot-Analyse von transduzierten K-562-Zellen: Die Transduktionen wurden mit den Vektoren SF91 m3 und deren Derivaten mit Foamy- (Fo) oder βWPRE-Element durchgeführt. Die MDR-spezifische RNA wurden mittels einer gegen die SFFV 3'UTR gerichteten, radioaktiv markierten Sonde detektiert (Größenangaben rechts in bp). Der Blot wurde mit einer GAPDH-Sonde rehybridisiert. Unter dem Northern Blot befindet sich ein Schema des MDR-Vektors, das die oben markierten Spleißprodukte illustrieren soll: vSD/vSA (viraler Spleißdonor/-akzeptor), cSD/vSA (Spleißelemente in der MDR cDNA).
- (C) Funktionalitätstest des verwendeten SF91 m3 βWPRE Vektors im Rhodamin-Ausflussassay. Die K-562-Zellen wurden mit Rhodamin123-Farbstoff inkubiert, welcher Substrat der MDR-Pumpe ist. Die mit dem Marker 1 (M1) versehenen Zellen waren in der Lage, den Farbstoff wieder aus den Zellen herauszupumpen, d.h. MDR-positiv.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass vor allem die Kombination von Spleißelementen und WPRE im MDR-Kontext einen signifikanten Expressionsvorteil bewirkt. Es bleibt allerdings noch zu klären, warum in K-562-Zellen die deutlich gesteigerten RNA-Mengen zu einer nur geringfügig gesteigerten (detektierbaren) Proteinexpression führen.

D. Diskussion

Dies ist die erste vergleichende Studie, die eine systematische Wirkungsanalyse mehrerer verschiedener Typen posttranskriptionell aktiver Elemente (Spleißsignale, CTE-, Foamy-, WPRE- u.a. RNA-Elemente) auf die Verstärkung der Expression von retroviral transduzierten und somit chromosomal integrierten Transgenen präsentiert. Die Wirkung dieser Elemente wurde entweder allein oder in Kombination sowie im Kontext verschiedener Typen von Transgenen getestet:

- das gag/prot-Gen als ein Beispiel für ein Exportfaktor-abhängiges Transkript
- humanes β -Globin als ein typisches Intron-abhängiges Transkript
- cDNAs wie EGFP und MDR1, die in Abwesenheit von *cis*-agierenden RNA-Elementen und intronhaltigen Sequenzen exprimiert werden können.

Anknüpfend an den derzeitigen Wissensstand auf dem Gebiet der RNA-Prozessierung liefert die vorliegende Arbeit Leitlinien für die Konstruktion von posttranskriptionell verbesserten Expressionsvektoren für experimentelle oder medizinische Zwecke. Die Regulation der posttranskriptionellen Genexpression einer eukaryotischen Zelle findet auf multiplen Ebenen statt. Dabei stellen insbesondere nukleärer Export, RNA-Stabilität vs. RNA-Degradation und die Effizienz der Translation limitierende Schritte dar. Diesbezüglich können Spleißelemente und posttranskriptionell aktive RNA-Elemente kontextabhängig z.T. zu einer deutlichen Erhöhung der Genexpression führen.

1. Einfluss von RNA- und Spleißelementen auf die HIV-1 gag-Expression

Offensichtlich benötigt eine Transkriptionseinheit, die aktive nukleäre Retentionssignale beinhaltet (Schneider et al. 1997, Schwartz et al. 1992), die Präsenz eines Exportsystems wie Rev/RRE oder das CTE (zusammengefasst in Pollard et al. 1998, Wodrich et al. 2000). Die Rev-Abhängigkeit kann dabei durch Mutagenese dieser in der kodierenden Region prävalenten Retentionssignale (Schneider et al. 1997) oder durch Mutation der Spleißsignale (Wodrich 1998 u. Referenzen darin) aufgehoben werden. Dadurch kann die nukleäre Retention überwunden werden. Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten (Abb. 10B, vgl. Spur 8 mit 4) zeigen, dass die Präsenz vom WPRE in der 3'UTR nicht ausreicht, um die Abwesenheit eines CTE zu kompensieren. Andere Autoren hingegen beobachteten, dass das WPRE das Rev/RRE-System in transienten Transfektionsassays substituieren konnte

(Donello et al. 1998, Huang et al. 1994). Diese Autoren benutzten einen Rev-abhängigen Reporter, der in vielen episomalen Plasmidkopien pro transfizierter Zelle vorhanden war. Im Gegensatz dazu beinhaltet das in dieser Arbeit verwendete experimentelle System die Herstellung retroviraler Vektoren und die nachfolgende Expression in retroviral transduzierten Zielzellen, womit eine chromosomale Integration einer einzelnen Genkopie einhergeht. Die HIV-1 gag-Expression geht vom integrierten Vektorgenom aus, so dass das hier verwendete System eine natürlichere Umgebung darstellt. Ferner ist das WPRE nicht in der Lage, das Rev/RRE-System in einem proviralen Rev-minus HIV-1 Klon zu ersetzen (Wodrich et Kräusslich, unpublizierte Daten). Dies legt nahe, dass die Resultate des hier gezeigten experimentellen Systems für komplexere virale Systeme richtungsweisend sind.

Auch die Insertion eines kompletten Introns in die Leaderregion (5'UTR) war für eine gute gag-Expression nicht ausreichend (Abb. 10B, Spur 15). Möglicherweise genügt ein Intron als Exportstimulus nicht, um die durch gag-Sequenzen vermittelte nukleäre Retention zu überwinden. Bei retroviralen ASLV-RNAs (Avian Sarcoma Leukosis Virus) ist bekannt, dass ein gag-Segment einen negativen Spleißregulator (negative regulator of splicing) beinhaltet (Arrigo et al. 1988), der über ‚splice site‘-ähnliche Sequenzen eine Interaktion mit den inhibitorischen snRNPs U11 und U12 vermittelt. Eine Übertragbarkeit auf HIV erscheint allerdings fraglich.

Die Mutation des Hauptspleißdonors (Major Splice Donor) von HIV-1 sorgte in den Derivaten von MP110gpIISD- (deletierter MSD) für einen niedrigeren Titer als in den korrespondierenden gpII-Konstrukten mit intaktem Spleißdonor (vgl. Spur 6-8 mit 2-4 in Abb. 10A). Jedoch zeigt der Vektor MP110gpIISD- mit CTE – bei weniger transduzierten Zellen – nach Transduktion in der Immunfluoreszenzmikroskopie eine stärkere Expression pro Zelle (Daten nicht gezeigt) und weist im Western Blot trotz niedrigerem Ausgangstiter ein stärkeres Signal als der korrespondierende MP110gpII CTE-Vektor auf (vgl. Spur 11 u. 4 in 10B). Unter Berücksichtigung des niedrigen Ausgangstiters ergibt sich folglich in der Zielzelle eine stärkere Expressionsleistung mit mutiertem Hauptspleißdonor von HIV-1.

Festzuhalten bleibt, dass vor allem das CTE und das Rev/RRE-System die durch nukleäre Retentionssignale vermittelte aktive Kernretention überwinden können, nicht aber zusätzlich eingebrachte Spleißsignale in der 5'UTR oder das WPRE. Mit CTE oder Rev/RRE wird die aktive Kernretention durch den aktiven Export der mRNA mittels Kopplung an nukleozytoplasmatische Exportpfade überwunden.

a. RNA-Elemente bei der Konstruktion von lentiviralen Vektoren

Die Erkenntnis, dass HIV-1 gag auf einem hohen Level von einem Mo-MLV-basierten, retroviralen Vektor mit einem oligomeren CTE exprimiert wird (Abb. 10), kann zur Produktion von verbesserten lentiviralen Verpackungszelllinien beitragen. Hohe Expression und einfacher Aufbau von HIV-1 gag/pol-Helferplasmid und Transfervektor bleiben ein wichtiges Ziel zur Verbesserung lentiviraler Vektorsysteme. Dabei ist es vorteilhaft, auf zusätzliche Plasmide (z.B. Rev-Plasmid) zu verzichten.

Im lentiviralen Vektorsystem von L. Naldini (Abb.13) beinhalten sowohl Transfervektor als auch Helferplasmid nukleäre Retentionssignale durch vorhandene gag-Sequenzen. Daher sind diese Plasmide zur effizienten Expression auf die Existenz eines Exportsystems wie Rev/RRE oder CTE angewiesen. In diesem Fall enthält das gag/pol-Helferplasmid das komplette gag-Gen, während der Transfervektor geringe gag-Sequenzen in der 5'UTR beinhaltet (s. Abb. 13). Neben der Exportfunktion ist das Rev/RRE-System im Naldini-System noch aus einem zweiten Grund erforderlich: Ein RRE ist im Transfervektor im 5'UTR lokalisiert. Das Rev/RRE-System vermittelt eine zytoplasmatische Akkumulation ungespleißter RNA (Pollard et al. 1998, Powell et al. 1997) und konserviert somit das ebenfalls im Intron lokalisierte, für die Verpackung unerlässliche Signal ψ .

R. Morgan (NIH/USA) hat einen lentiviralen Transfervektor (pcCG9-3C, Mautino et al. 2000, Abb. 13) konstruiert, der nicht auf die Existenz des Rev/RRE-Systems angewiesen ist, sondern auf dem CTE-Exportsystem beruht. Dieser Transfervektor besitzt im 5'Intron kein RRE, dafür aber in der 3'UTR ein (SRV-1) CTE. Morgan hat folgerichtig die Spleißsignale (Donor und Akzeptor) des 5'Introns deletiert, um den Verlust des Verpackungssignals in der Verpackungszelle zu vermeiden. Nach Mautino et al. (2000) produziert dieser Transfervektor in Kombination mit einem gag/pol-Helferplasmid einen Titer mit vergleichbarem oder sogar besserem Niveau als die Naldini-Transfervektoren, was mit der Nutzung verschiedener Exportpfade zu erklären ist.

Während Morgan mit seinem System die Möglichkeit beschreibt, den Transfervektor Rev-unabhängig zu gestalten, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Rev-unabhängiges gag/pol-Helferplasmid konstruiert (pcDNA3g/p4xCTE, Abb.13), das auf einem multimeren MPMV-CTE als Exportsystem basiert. Wegen der beabsichtigten Kompatibilität zu den übrigen Naldini-Vektoren trägt dieses Plasmid die gag/pol-Sequenzen des Naldiniplasmids pMDLg/pRRE. Eine Kombination dieses Vektors mit einem Rev-unabhängigen Transfervektor würde ein vollständig Rev-unabhängiges lentivirales System kreieren

(s. theoretisches Optimum in nachfolgender Tab. 3). Dieses birgt das Potential, replikationsdefekte interferierende Partikel mit transdominant-negativen Rev-Mutanten zu entwerfen, die zur Anti-HIV-Gentherapie von Blutzellen dienen könnten (Ragheb et al. 1995, Vandendriessche et al. 1995). Transdominantes Rev inhibiert hierbei spezifisch den CRM-1 vermittelten nukleären Export durch die Formation von inaktiven Multimeren mit *wt* Rev der infizierten Zelle (Hope et al. 1992).

Leider war der CTE-abhängige Morgan-Transfervektor nicht mit dem vorhandenen gag/pol-Helferplasmid des Naldinisystems (Abb.13) kompatibel (Daten nicht gezeigt). Möglicher Grund ist die vorhandene tat-Abhängigkeit (tat: virales Transaktivatorgen) des HIV-LTR im Morgan-Transfervektor. Im Naldini-Transfervektor existiert ein tat-unabhängiger LTR, so dass das korrespondierende gag/pol-Helferplasmid (pMDLg/pRRE, Abb.13) auf die essentiellen Bestandteile minimiert ist und kein tat enthält. Daher wurde in einem Transfervektor des Naldini-Systems (pRRL.sin.PPT.hPGK.EGFPpre, Abb. 13) das WPRE durch ein SRV-1 CTE aus dem Morgan-Transfervektor ersetzt, um den Transfervektor pRRLsin.PPT.hPGK.EGFPcte zu entwerfen. Durch ein CTE sollte bei Abwesenheit von Rev der Export des gag-haltigen Vektortranskriptes gewährleistet werden. Wie aus Abb. 14 (Spur 1 und 2) hervorgeht, besteht bei Abwesenheit von Rev eine deutlich geringere prozentuale Anzahl EGFP-transduzierter SW480-Zellen (vgl. <1 % mit 42 %). Dieses Ergebnis könnte aus dem Verlust des im gespleißten Intron lokalisierten Verpackungssignals ψ resultieren. Bei Anwesenheit von Rev (Abb. 14, Spur 2) bleibt das Verpackungssignal wahrscheinlich infolge Rev/RRE-vermittelter zytoplasmatischer Akkumulation ungespleißter RNA erhalten.

	Naldini (Dull et al. 1998)	Morgan (Mautino et al. 2000a/b, 2001)	Naldini/Schambach	Theoretisches Optimum
Transfervektor	Rev-abhängig	Rev-unabhängig (RRE eliminiert)	Rev-abhängig (Naldini-Vektor)	Rev-unabhängig (z.B. Morgan)
gag-Helferplasmid	Rev-abhängig	Rev-abhängig	Rev-unabhängig (durch 4xCTE)	Rev-unabhängig (z.B. 4xCTE)
Rev-Abhängigkeit	Ja	Ja	Ja	Nein

Tab. 3: Notwendigkeit von Rev in verschiedenen Vektorsystemen.

Um ein vollständig Rev-unabhängiges lentivirales System zu entwerfen, müssten analog zum Morgan-Transfervektor Veränderungen des 5'Introns der pRRLsin-Transfektoren vorgenommen werden. Dies würde eine Modifikation der Spleißelemente (z.B. Deletion von Donor

und Akzeptor) und ggf. eine Deletion des RRE-Elementes erfordern, was aber im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurde.

b. Die Speziesbarriere von HIV-1

Die Replikation des Volllängen-Genoms von HIV-1 ist auf humane Zellen beschränkt. Die Restriktion des HIV-1 Wirtszellspektrums resultiert aus der Notwendigkeit der Interaktion von viralen Proteinen mit spezifischen zellulären Kofaktoren, die aufgrund von Art-spezifischen Alterationen unterschiedlich sein können. Das restringierte Wirtszellspektrum von HIV-1 hat die Entwicklung von Kleintiermodellen limitiert (Cohen et al. 2001). In Mäusezellen z.B. ist die HIV-1 Replikation durch einen Block auf ‚Entry‘-Ebene (Chesebro et al. 1990) und proviraler Expressionsebene vermindert. Diese Blöcke können durch Kotransfektion von humanem CD4 und CCR5 sowie humanem Cyclin T1 (Kofaktor von HIV-1 tat) umgangen werden (Mariani et al. 2000). Weiterhin gibt es einen Block auf ‚Assembly‘-Ebene (Mariani et al. 2000/2001), der zu einem nicht korrekten Zusammenschluss (Assembly) der Virionproteine und zu deren Akkumulation in zytoplasmatischen vesikulären Strukturen führt (Mariani et al. 2000). Zur Konstruktion eines Mausmodells für HIV-1 ist es wichtig festzuhalten, dass Abb. 11 die CTE-vermittelte Gag-Expression in vielen transduzierten nicht-humanen Zelllinien zeigt. Hier weisen Hunde-, Affen-, Wachtel- und insbesondere Nagerzellen eine deutliche Gag-Expression auf. Möglicherweise können diese Ergebnisse helfen, HI-Virus in Kleintiermodellen zu produzieren. Dieses wird z. Z. im Labor von Herrn Prof. Kräusslich in Heidelberg untersucht.

2. Einfluss von RNA- und Spleißelementen auf die Expression eines spleißabhängigen Transgens am Beispiel von β -Globin

a. Bisherige Gentherapieansätze für β -Globin

Als monogenetische Erkrankungen gehören die Sichelzellanämie und die Thalassämie zu den ersten für gentherapeutische Anwendungen beforschten Krankheiten. Der kurative Ansatz würde das Einbringen eines funktionellen Globingens in hämatopoetische Stammzellen mit hoher Expression in reifen erythroiden Zellen beinhalten. Die ersten Resultate eines erfolgreichen β -Globin-Gentransfers in das hämatopoetische System der Maus wurden 1988 veröffentlicht (Dzierzak et al. 1988, Miller et al. 1988). Dort wurde ein oncoretroviraler Vektor verwendet. Zwar wurde eine für erythroide Zellen spezifische Expression beobachtet,

jedoch waren die Expressionsniveaus (<1 % des endogenen Mäuseglobins) für einen therapeutischen Nutzen zu niedrig. Auch in den folgenden 12 Jahren wurde trotz Einsatz der sog. ‚locus control region‘ (LCR) und von Chromatininsulatoren (zur Vermeidung von Vektorsilencing und positionsspezifischen Integrationsphänomenen) kein Durchbruch in den therapeutischen Nutzbereich erzielt (Kalberer et al. 2000, Rivella et al. 1998). Funktionelle Analysen in transgenen Mäusen haben gezeigt, dass die 21 kb upstream vom β -Globin Locus gelegene ‚locus control region‘ über starke erythroid-spezifische Enhanceraktivitäten verfügt und somit die Globinexpression steigert (Grosveld et al. 1987 u. 1998). Der Einbau einer Mini-LCR in einen oncoretroviralen Vektor durch Sadelain et al. (1995) führte bei maximal 6 kb Insertgröße zunächst zu einem instabilen Konstrukt. Erst die Verwendung eines lentiviralen Vektors ermöglichte den erwünschten therapeutischen Bereich im murinen Knochenmarktransplantationsmodell (May et al. 2000). Mögliche Nachteile dieses Vektors bestehen in seiner umfangreichen Größe (bis zu 6 kb Insert) sowie in seiner umständlichen Architektur. Die Transgenkassette muss *in antisense* eingebracht werden, um eine verfrühte Nutzung von Spleißsignalen und Polyadenylierungssignal schon in der Verpackungszelllinie zu vermeiden.

b. Globinexpression durch ein 5' Intron und RNA-Elemente

In Abschnitt C.4.a. wurde gezeigt, wie Globinexpression nur unter Verwendung einer *in sense* cDNA und einiger Modifikatoren der posttranskriptionellen Regulation (Intron, RNA-Elemente), also sehr viel kleinerer Insertionssequenzen (vgl. max. 1,4 kb hier u. 6 kb Insert oben), möglich ist.

Das β -Globintranskript benötigt den Spleißvorgang eines Introns für die effiziente zytoplasmatische Expression (Buchman et al. 1988, Huang et al. 1997/99, Yu et al. 1991) sowohl *in vivo* als auch im transienten Transfektionsexperiment. Die intronischen Sequenzen sind auch in gentherapeutischen Vektoren unerlässlich. Die hier verwendeten Globin-Vektoren enthalten virale Spleißsignale in der 5'UTR anstelle der beiden angestammten Globinintrons und gewährleisten den für eine gute Expression notwendigen Spleißvorgang. Funktionelles Spleißen *per se* dirigiert die RNA in einen effizienten RNA-Exportpfad (Luo et al. 1999), stimuliert somit den RNA-Export und steigert den Titer (s. auch D.3.).

Zusätzlich wurden DNA-Sequenzen eingesetzt, die für virale RNA-Elemente (WPRE, CTE, 4xCTE, Foamy-, IAP-Element) kodieren und für eine effizientere posttranskriptionelle Prozessierung sorgen sollen. Für das WPRE wurden in transienten Transfektionssystemen

schon erste Hinweise auf eine mögliche Expressionssteigerung bei Globin gefunden (Donello et al. 1998, Huang et al. 1995/99). Alle oben genannten Elemente steigern nach transienter Transfektion in Phoenix-Zellen die Globin-RNA-Expression deutlich (Abb. 15A, Tab. 2). Die Steigerung verringert sich in der Reihenfolge Intron, β WPRE, CTE, IAP, 4xCTE, Foamy. Nach Transduktion von SW480-Zellen (Abb. 15B) ist auf RNA-Ebene jedoch nur noch der Intron-, WPRE- und CTE-Effekt nachweisbar. Durch den relativ schwachen Effekt der anderen Elemente bereits in der Verpackungszelllinie liegt es nahe, dass die Produktion „verpackbarer“ Globin-RNA bei diesen Elementen nicht für einen ausreichenden Virustiter hinreichend ist. Auch das CTE und das WPRE erhöhen die Globin-RNA-Expression in transduzierten Zellen deutlich. Am besten jedoch wirkt die Kombination von Spleißelementen mit CTE oder besser mit WPRE (Abb. 15B, Spur 8 u. 9). Die Kombination von Intron und WPRE erhöht dabei die RNA-Menge nach Phosphoimager-Daten auf das etwa 9000fache, bezogen auf den Referenzvektor ohne Spleiß- und RNA-Elemente.

Dabei steigern CTE und WPRE den sog. ‚steady state‘ (Fließgleichgewicht) an RNA, bewerkstelligen dies jedoch auf unterschiedliche Weise. WPRE und CTE haben kaum funktionelle Homologie und rekrutieren möglicherweise unterschiedliche nukleäre Partner. Für das CTE sind diese Partner teilweise schon bekannt (Gruter et al. 1998, Kang et al. 1999), für das WPRE jedoch noch nicht (Huang et al. 1999, Loeb et al. 1999, Smith et al. 1998). Das CTE erhöht vor allem die Menge an ungespleißter RNA (Abb. 15B, Spur 8). Es wirkt als Exportfaktor (via Tap) und greift entsprechend den hier gezeigten Daten möglicherweise früh in die mRNA-Prozessierungsabfolge ein. So wird mehr ungespleißte RNA exportiert, die folglich der Spleißmaschinerie entgeht. Interessanterweise zeigen die MP71 β -Globin CTE-Vektoren trotz ausreichender Menge an Globin-RNA (Abb. 15B Spur 8, Abb. 15C Spur 3 u. 7) auch nach Induktion zu erythroiden Zellen keine Proteinexpression (Abb. 16C, Spuren 2 u. 6). Da der Spleißvorgang für die Globinexpression unerlässlich ist, stellt sich die Frage, ob möglicherweise die geringe Spleißaktivität des CTE-tragenden Globintranskriptes eine Rolle bei der Translatierbarkeit spielt bzw. ob die Translatierbarkeit der Globin-RNA eventuell an den Spleißprozess gekoppelt ist. Mit β WPRE (Abb. 15B, Spur 9) sind bei gleichbleibender Spleißrate gespleißte und ungespleißte RNA gleichermaßen erhöht. Dementsprechend agiert das WPRE an einer Stelle der RNA-Prozessierung, die entweder nach der Spleißreaktion oder unabhängig von der Spleißreaktion anzusiedeln ist und zur Stabilisierung der ungespleißten wie der gespleißten RNA führt.

Trotz detektierter RNA-Expression von Globin im Northern Blot konnte auf Proteinebene im Western Blot zunächst kein Globin nachgewiesen werden, was auf eine Translationsrepression hindeutet. Diese Translationsregulation ermöglicht – der Abb. 16 zufolge – eine auf Zellen der Erythropoese beschränkte Globinexpression, die erst ab einer gewissen Ausdifferenzierung der Zellen mit dem Beginn der Hämsynthese eintritt. Innerhalb der ebenfalls streng kontrollierten Hämsynthese scheint hier die Menge an produziertem Häm für die effiziente Initiation der Globintranslation entscheidend zu sein. Dies belegen Experimente unter Zugabe von externem Hämin in Zellkultur, was eine Expression sogar in nicht-erythroiden Zellen (293T, SW480) ermöglicht (Abb. 17A u. B). Hier konnte durch Hämzugabe die Globinexpression auf andere, nicht-erythroide Zelllinien transferiert werden.

cDNA	Physiolog. β-Globinexpression	Sadelain et al. (1995, 2000)	Schambach et al.
↓	1.) Transkriptionsregulation durch LCR	1.) "Mini"-LCR	1.) LCR-unabhängiger Promotor (z.B. MPSV LTR)
↓	2.) Globinintrons für gute Expression notwendig	2.) genomische DNA mit Globinintrons --> <i>antisense</i> Konstrukt mit genomischer DNA	2.) virales Intron --> <i>in sense</i> Konstrukt mit cDNA
mRNA	Translationskontrolle:		
↓	3.) Proteinkinase inaktiviert einen Initiationsfaktor bei Häm-Abwesenheit --> Translation bei Hämpräsenz in erythroiden Zellen	3.) Translation in ausdifferenzierten erythroiden Zellen	3.) Translation in ausdifferenz. erythroiden Zellen
↓			4.) Translation in nicht-erythr. Zellen durch Hämingabe
Protein			

Tab. 4: Charakteristika der Globinexpression bei unterschiedlicher Anwendung in retroviralen Vektoren von Sadelain und Schambach

Normalerweise ist die Initiation der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Proteinbiosynthese, was sie zu einem attraktiven Angriffspunkt für Regulationsvorgänge macht. Retikulozytenextrakte synthetisieren Hämoglobinuntereinheiten mit großer Geschwindigkeit, bis die Versorgung mit Häm zum Erliegen kommt. Ohne Häm hört die Proteinsynthese auf, weil plötzlich ein Inhibitor der Proteinsynthese gebildet wird, den man als hämkontrollierten Inhibitor (HCI) bezeichnet. Dieser ist eine Kinase, die die α -Untereinheit des Initiationsfaktors eIF2, welcher die Met-tRNA zur ribosomalen 40S-Untereinheit bringt, phosphoryliert. Die Phosphorylierung des eIF2 hemmt die Wiederherstellung des eIF2, indem ein unwirksamer Komplex aus eIF2, GEF (Guanylnukleotidaustauschfaktor) und Phosphat entsteht (Abb. 25).

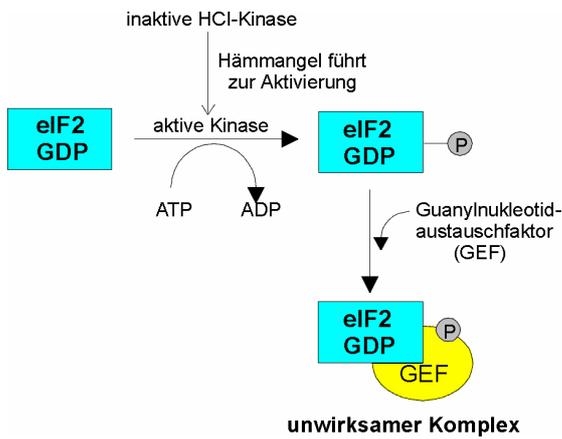


Abb. 25: Schema der Inhibition der Translationsinitiation bei der Globinexpression

Die Initiation der Translation wird durch Phosphorylierung der α -Untereinheit des eIF2 (eukaryotischer Initiationsfaktor 2) gehemmt. Die hämkontrollierte Kinase (HCl-Kinase), die diese Reaktion in Retikulozyten katalysiert, ist bei Häm-mangel aktiv. Dementsprechend verhindert die ausreichende Häm-anwesenheit die Bildung eines unwirksamen eIF2-Komplexes, so daß eIF2 zur Translationsinitiation zur Verfügung steht.

Phosphorylierte eIF2-Moleküle sind nicht in der Lage, die Proteinsynthese auszulösen. Die Häm-regulierte eIF2 α -Kinase (HCl) wird vorwiegend in Erythrozyten exprimiert. Sie reguliert die Synthese sowohl von α - als auch von β -Globinen in erythroiden Vorläufern. Sie soll die Überschuss-Synthese von Globinketten in Relation zum Häm vermeiden. In Eisen-defizienten homozygoten HCl-Knock-Out-Mäusen aggregierten die überschüssigen Globine ohne Häm in den Erythrozyten und resultierten in einer hyperchromen, normozytären Anämie mit kompensatorischer erythroider Hyperplasie und akzelerierter Apoptose in Knochenmark und Milz (Han et al. 2001). Daher ist der HCl ein physiologischer Regulator der Globinexpression und Überlebensdauer von Erythrozyten.

Die Entdeckung einer durch Interferon induzierten Kinase, die ähnlich in virusinfizierten Zellen wirkt, legt die Vermutung nahe, dass dieser Mechanismus ein gängiges Prinzip zur Translationskontrolle in Eukaryonten darstellt (Chen et al. 1995).

Möglicherweise können die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse zur Globinexpression auch auf eine zusätzliche spezifische translationale Häm-Regulation hindeuten, die unabhängig von eIF2 funktioniert. Die Existenz einer vorwiegend in Erythrozyten exprimierten eIF2 α -Kinase erklärt die Regulation (An- und Abschaltung) der Globinexpression in Erythrozyten, nicht aber die Häm-abhängige Regulation der Globinexpression in 293T- (Nierenepithel-) und SW480- (Colonadenom-) Zellen (Abb. 17), wo diese Kinase nicht in hinreichender Menge exprimiert wird. In SW480- und 293T-Zellen sollte ausreichend viel funktioneller eIF2 (eukaryotischer Initiationsfaktor 2) vorhanden sein, weil dieser auch für die Proteinsynthese von anderen RNA-Matrizen benötigt wird. Dies deutet auf einen zusätzlichen Regulationsmechanismus durch Häm bzw. durch Eisen (Bestandteil des Hämmoleküls) hin. Denkbar wäre z.B. eine Stabilisierung des entstehenden Globinproteins durch ein kotranslationales Zusammenfallen des Hämmoleküls bei angebotenen Hämmolekülen (Krashennikov et al. 1991).

Die Kontrolle der Genexpression auf Ebene der Translationsinitiation stellt ein in eukaryotischen Zellen vielfach zu beobachtendes Phänomen dar. Hierbei kann die Translationsinitiation auch durch Elemente in der 5' oder 3'UTR gesteuert werden (Übersicht in Day et al. 1998). So befindet sich im Falle des IRE (Iron Responsive Element) ein RNA-Strukturelement in der 5'UTR der erythroiden 5-Aminolävulinsäure-Synthetase (eALA, Schlüsselenzym der Hämsynthese) und Ferritin-mRNA. An dieses IRE bindet ein Protein, was bei geringen Eisenkonzentrationen das Scannen der 40S ribosomalen Untereinheit behindert und so die effiziente Translation verhindert. Bei ausreichenden Eisenkonzentrationen wird die Translation von Ferritin verstärkt, wodurch entsprechend mehr Ferritin als Speicherform des Eisens zur Verfügung steht. Auch in der 3'UTR sind Elemente identifiziert worden, die die mRNA-Stabilität und Translation entscheidend beeinflussen (z.B. 3'UTR Tabak Mosaik Virus, Gallie et al. 1990; 3' UTR 15-Lipoxygenase, Ostareck-Lederer et al. 1994). Neben der Kontrolle der Translationsinitiation befinden sich in den untranslatierten Regionen mit Cap-Struktur, Kozak-Konsensussequenz, weiteren *upstream* AUGs, PolyA-Signal und stabilen Sekundärstrukturen weitere Determinanten, die die Expression und Stabilität einer gegebenen mRNA wesentlich beeinflussen können.

Für Globin weisen zahlreiche Veröffentlichungen auf eine mögliche Rolle der Globin-UTRs für Stabilität und Translatierbarkeit der Globin-RNA hin (Cooper 1993, Day et Tuite 1998, Kozak 1994, Kugler et al. 1995, Russell et al. 1996). Aus diesem Grunde wurden die Globin 5' und 3'UTR in das Design der retroviralen Vektoren miteinbezogen. Abb. 15C und 18B zeigen auf RNA- bzw. Proteinebene jedoch nur eine maximal dreifache Steigerung der Globinexpression durch Verwendung von Globin-UTRs. Prinzipiell ist Globinexpression in den hier verwendeten Vektoren auch ohne Insertion von UTRs, insbesondere der Globin 5'UTR, nachweisbar (Abb. 18B, Spur 5). Dieses widerspricht aber teilweise einer Publikation von Kugler et al. (1995), die eine essentielle Rolle der 5'UTR für die Translatierbarkeit von Globin postuliert. Die Analyse von Kugler et al. erfolgte allerdings in einem transienten Transfektionsassay in nicht-erythroiden Zellen (HeLa-Zellen), also einem experimentellen System, welches der zellulären Globinexpression bezüglich chromosomaler, kontinuierlicher Expression in erythroiden Zellen weniger nahe kommt als das hier verwendete.

Die Inklusion von Globin-UTRs hat allerdings Auswirkungen auf den Zeitpunkt der Expression. So scheinen die Globinvektoren mit 5'UTR in den Experimenten mit Hämoglobin generell früher (d.h. 3 Tage nach Transfektion, Abb. 17A, Spur 4, 6, 7) mit hoher Expression zu beginnen, wohingegen die Vektoren mit 5' und 3'UTR erst nach 6 Tagen (Abb. 17B, Spur

5, 6, 7) eine vergleichbare Expressionsstärke erreichen. Dies weist auf eine höhere Zell- und Differenzierungsspezifität des Globin-Vektors mit 5' und 3'UTR hin, da dieser zu einem späteren Zeitpunkt innerhalb der erythroiden Differenzierung sein Expressionsmaximum erreicht. Dies würde auch erklären, warum in nicht-induzierten K-562- und MEL-Zellpopulationen dieser Vektor kein Globin exprimiert, während bei der Vektorserie nur mit 5'UTR zumindestens eine geringe Globinexpression nachweisbar ist (Abb. 16A Spur 4, 16B Spur 2-4).

Einsatz der Globin-Expressionskassette in lentiviralen Vektoren

Der β -Globin Vektor mit γ WPRE sowie 5' und 3'UTR wurde als β -Globinkassette (β GK) auf den lentiviralen Vektorkontext übertragen (Abb. 18). Nach Experimenten von May et al. (2000) sind β -Globinsequenzen in lentiviralen Vektoren etwas stabiler als in oncoretroviralen. Darüber hinaus produzieren lentivirale Vektoren generell einen größeren Titer als oncoretrovirale Vektoren in erythroiden Zellen (Daten nicht gezeigt). In Abschnitt C.4.c. wurde gezeigt, dass die lentiviralen Vektoren von Naldini ungünstig für die Konstruktion eines Globinvektors sind, da sie einen selbstinaktivierenden LTR enthalten und das 5'Intron in der Verpackungszelllinie nicht genutzt wird. Daher wurde ein zweites Intron (Globinintron) in diese lentiviralen Vektoren eingesetzt, was die Globinexpression steigern konnte. Die Expressionsstärke der oncoretroviralen Vektoren wurde trotz der oben angesprochenen Vorteile lentiviraler Vektoren nicht erreicht (Abb. 18B). Neuere lentivirale Vektoren von D. Trono (Universität Genf) besitzen LTRs, in denen die Funktionalität des 5'Introns bis in die Zielzelle erhalten bleibt (Klages et al. 2000). Diese würden sich aus den angesprochenen Gründen besser für die Globin-Gentherapie eignen.

Vermutlich bedingt die im Vergleich zum MPSV LTR schlechtere Promotoraktivität des CMV- und hPGK-Promotors in den lentiviralen Vektoren eine schlechtere Globinexpression. Kurpad et al. (1999) berichten von einer unter erythroider Ausdifferenzierung zunehmend schlechter werdenden Aktivität des CMV-Promotors. Folglich würde sich zur lentiviralen Vektorverbesserung der Einsatz von Promotoren lohnen, die zur Expression in hämatopoetischen Zellen optimiert sind (MPSV/SFFV LTR; Ankyrin-Promotor, Sabatino et al. 2001).

3. Einfluss posttranskriptioneller Kontrollelemente auf Gene, die ohne RNA-Elemente und Introns exprimierbar sind

EGFP stellt neben MDR-1 ein Beispiel für ein Gen dar, welches in Abwesenheit von *cis*-agierenden RNA-Elementen und intronhaltigen Sequenzen exprimiert werden kann. Als fluoreszierendes Protein lässt sich EGFP in der inversen Fluoreszenzmikroskopie und durchflusszytometrisch leicht darstellen. In der Verpackungszelllinie ist ein Titerabgleich möglich, so dass in der Zielzelle verlässliche Aussagen zur Expression gemacht werden können. Daher ist dieses System ideal, um die Einflüsse einzelner RNA- und Spleißelemente sowie deren Kombination in der Zielzelle quantitativ zu bestimmen. Bei der Analyse wurden sowohl Protein- als auch RNA-Expression bestimmt und miteinander verglichen.

Im MP110-Kontext können ohne Spleißsignale gezielte Aussagen zu den einzelnen oder kombinatorischen Wirkungen der einzelnen RNA-Elemente auf die EGFP-Expression gemacht werden. In Abb. 19B wurde gezeigt, dass insbesondere das WPRE-Element, aber auch das Foamy-Element, eine signifikante Steigerung der EGFP-Proteinexpression bewirken. Im spleißdefizienten MP110EGFP-Kontext erbrachte das Foamy-Element eine 1,9fache RNA-Stimulation, jedoch nur eine 1,7fache Proteinstimulation im Vergleich zum Basalvektor (Abb. 19C). Wie das Foamy-Element in die mRNA-Prozessierung eingreift, ist noch weitgehend ungeklärt. Von einigen Arbeitsgruppen wurden retrovirale, auf dem Foamy-Virus basierende Gentherapie-Vektoren konstruiert. Die Transduktion dieser Vektoren ist dabei abhängig von Sequenzen, die in der 3' Region des pol-Gens zu finden sind (Heinkelein et al. 1998, Wu et al. 1998) und mit der verwendeten Region des Foamy-Elementes überlappen. Die hier vorgestellten EGFP-Transduktionsdaten zum Foamy-Element legen nahe, dass das Foamy-Element mehr dem Phänotyp des WPRE entspricht, weil es die EGFP-Expression verbessert. Es vermittelt also Funktionen, die nicht vom CTE im gleichen Kontext bewirkt werden. Dies würde der Annahme entsprechen, dass es sich bei Foamyviren (klassifiziert als Retroviren) um eine evolutionäre Verbindung zwischen Retro- und Pararetroviren (z.B. HBV) handelt (Linial 1999). Die Sequenz des Foamy-Elementes überlappt mit zentralen Polypurintraktsequenzen (cPPT) des Foamyvirus (Heinkelein et al. 1998). Solch ein cPPT wird auch in Lentiviren gefunden und ist in die Initiation der Plus-Strang-Synthese der reversen Transkription involviert (Charneau et al. 1992/94). Nach Heinkelein et al. (1998) hat der cPPT jedoch wenig Einfluss auf die Vektortransfereffizienz eines Foamy-Vektorsystems, wie er durch Deletionskonstrukte zeigt.

Das CTE vermittelt im EGFP-Kontext keinen expressionsverbessernden Effekt. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die durch ein CTE zu übernehmende Exportfunktion schon in der kodonoptimierten EGFP-Sequenz steckt. Diese Kodonoptimierung hin zu favorisierten Kodons für hochexprimierte humane Gene bewirkt sowohl im EGFP- als auch im HIV-1 gag-Kontext (Haas et al. 1996) einen deutlichen Anstieg der Expressionseffizienz. Diese Expressionssteigerung ist durch einen effizienten, nukleären Export zu erklären, der durch den Wegfall der *cis*-negativen Elemente auch bei HIV-1 gag keine Exportelemente wie CTE oder Rev/RRE mehr benötigt (Graf et al. 2000).

Das β WPRE steigerte die RNA-Expression 3,9fach, die Proteinexpression jedoch 6,8fach (Abb. 19C), bezogen auf den Basalvektor MP110EGFP. Durch Einsatz eines γ WPRE war noch eine weitere Expressionssteigerung möglich (Abb. 21C). Während das Foamy-Element seine Proteinexpressionssteigerung aus der erhöhten RNA-Menge schöpft, sorgt das WPRE sowohl auf RNA- als auch Translationsebene für einen starken Expressionsgewinn. Die bisherige Literatur zum WPRE begründet diesen Effekt durch verbesserte RNA-Stabilität, Polyadenylierung und Translation (s. A.6.c.). Interessanterweise wurden parallel zur Entdeckung des WPRE bei WHV auch bei anderen viralen (Herpes simplex Thymidinkinase) und auch zellulären Genen (Maus Histon 2a) posttranskriptionell aktive RNA-Elemente mit Auswirkung auf die Effizienz der Polyadenylierung identifiziert (Huang et al. 1999). Auch für Rev/RRE und die RU5-Region von SNV (Spleen Necrosis Virus) wurde eine Verbesserung der Translationseffizienz festgestellt (Boris-Lawrie et al. 2001).

Weiterhin diente das EGFP-System dazu, die Kombination von verschiedenen in dieser Arbeit getesteten RNA-Elementen in Hinblick auf einen potentiellen Synergismus zu testen. Dazu wurden jeweils zwei verschiedene Elemente in der 3'Region des retroviralen Vektors platziert. Die resultierende EGFP-Expression lag fast immer in einem intermediären Bereich zwischen den Basalexpressionen der jeweiligen Ausgangsvektoren mit nur einem Element (Abb. 22). Die Kombination mehrerer verschiedener RNA-Elemente brachte also keinen weiteren Expressionsgewinn.

Der Literatur zufolge haben posttranskriptionelle Prozessierungsschritte (Effizienz von Spleißen, Capping, 3'Polyadenylierung) deutlichen Einfluss auf die Genexpression (s. A.5.). In Abb. 19C verbessert die Anwesenheit eines Spleißdonors (MP11EGFP) die Expression um das 1,2fache. Dies ist durch eine mögliche Stabilisierung des Transkriptes durch Bindung des U1-snRNA-Komplexes (Kramer 1996) und anderer Komponenten des Spleißosoms zu erklären (Hammarskjold et al. 1994). Ein komplettes Intron (MP71EGFP) bewirkt eine

stärkere Expressionssteigerung (Abb. 19C, 2,0fache RNA-Stimulation, 2,8fache Protein-stimulation). Durch die Spleißsignale bzw. die Spleißreaktion wird die Bindung eines bestimmten RNP-Komplexes initiiert, der in einen bestimmten Exportpfad dirigiert (Luo et al. 1999). Dabei stellt Aly, das Metazoen-Homolog des Hefe-Exportfaktors Yralp, das mögliche Verbindungsprotein zwischen Spleißprozess und mRNA-Export dar (Rodrigues et al. 2001, Zhou et al. 2000). Als Resultat des Spleißens wird Aly in einem Komplex mit vier anderen Proteinen 24 bp *upstream* von der Exon-Exon-Grenze stabil an die mRNA gebunden (Huang et al. 2001, Kataoka et al. 2000, Le Hir et al. 2000). Die Proteinmarkierung, die als Resultat des Spleißprozesses dort entsteht, ist nicht nur im mRNA-Export, sondern auch in der Entstehung des ‚Nonsense-Mediated Decay‘ (RNA-Degradationsmechanismus) involviert (Kim et al. 2001, Lykke-Andersen et al. 2001).

Eine andere mögliche Erklärung für den Intron-Effekt wäre, dass ribosomales Scannen der ungespleißten Leadersequenz in retroviralen Vektoren ein recht fehleranfälliger Prozess ist (Berlitz et al. 1995, Hildinger et al. 1999) und Spleißen in der 5‘UTR zusätzliche Faktoren liefern könnte, die die Translationsinitiation dirigieren (Matsumoto et al. 1998). Dabei ist bedeutsam, dass bestimmte Ribonukleoproteine die prä-mRNA durch die Kernpore ins Zytoplasma begleiten können (Pinol-Roma et al. 1992) und dort mit der mRNA während der Translation an den Polysomen assoziiert bleiben (Visa et al. 1996). So wurde gezeigt, dass effizientes 5‘ Capping (Hamm et al. 1990, Jarmolowski et al. 1994) und verbesserte 3‘ Polyadenylierung (Eckner et al. 1991, Jarmolowski et al. 1994, Sun et al. 1992) die Translationseffizienz stimulieren können. Der postulierte Mechanismus beinhaltet hier ebenfalls eine Steigerung des mRNA-Exports und potentielle Interferenz von Ribonukleoproteinkomplexen mit der Translationsmaschinerie.

In einem spleißdefizienten Transkript (MP110EGFP) wirkte das β WPRE zweifach stärker auf RNA- und Proteinexpression als im analogen Vektor mit funktionellen Spleißelementen in der 5‘UTR (MP71EGFP, Abb. 19C). Es besteht also eine partielle funktionelle Redundanz der Funktion von Spleißelementen und WPRE. Deren Kombination resultierte in einer hochsignifikanten Verbesserung der Expression im Falle von EGFP, aber auch bei MDR1 und besonders bei β -Globin.

4. Schlussfolgerungen und Leitlinien für die Konstruktion von verbesserten Expressionsvektoren

In dieser Arbeit wurden gezielt zelluläre und virale Prozessierungs- und Exportstrategien genutzt, um retrovirale Vektoren effizienter zu gestalten. Retrovirale Vektoren stellen im Prinzip suboptimale Konstrukte dar, weil im Gegensatz zur zellulären Genexpression nur begrenzter Raum (bis zu 8 kb) für die Insertion von relativ viel Information (Transgen, ggf. Promotor, regulatorische Sequenzen etc.) vorhanden ist. Den gleichen Beschränkungen unterliegen (Para-) Retroviren, welche daher für die Expressionsoptimierung ihres Genoms umfangreichen Gebrauch von posttranskriptionell aktiven RNA-Elementen machen. Diese Elemente stellen dabei evolutionär optimierte Strukturen dar und sind bei begrenztem Raum des viralen Genoms nur von kurzer Sequenz. Darüber hinaus sind retrovirale und pararetrovirale Elemente mit dem retroviralen Replikationszyklus kompatibel, während zelluläre Genabschnitte (z.B. β -Globin-Intron 2, Sadelain et al. 1995) mit diesem interferieren können.

Zur Zeit gibt es mindestens drei verschiedene Mechanismen für Retro- und Pararetroviren, um RNA-Export und die Genexpression zu bewirken:

- 1) Das Rev/RRE-System der Primaten-Lentiviren und das homologe System der HERV-K-Familie der humanen, endogenen Retroviren.
- 2) Das CTE der Typ-D Viren, welches an den zellulären Exportfaktor Tap bindet, und das funktionell homologe System der DR-Elemente des Rous Sarcoma Virus.
- 3) Das PRE von HBV und WHV, welche sich eines unterschiedlichen, aber zur Zeit unzureichend charakterisierten, zellulären Pfades bedient (Zang et al. 1999).

Es ist wahrscheinlich, dass jedes der geschilderten Systeme an die besonderen Notwendigkeiten der Genexpression der individuellen Viren und Virusgruppen angepasst ist, was ihren funktionellen Differenzen entspräche. Folglich führt die Insertion der verschiedenen Elemente in heterologe retrovirale Vektorsysteme zu unterschiedlichen Expressionseffekten. Die Verbesserung der Expression ist abhängig von dem verwendeten Transgen, dem Vektor-kontext und den verwendeten Zellsystemen. Hierbei beinhaltet der Vektorkontext den Besitz an funktionellen Spleißelementen, die Funktionalität von untranslatierten Regionen (z.B. Translationskontrolle bei der ALA-Synthetase), die Stärke des Polyadenylierungssignals und die Promotoraktivität. In verschiedenen Zellsystemen und Spezies laufen die oben genannten

Regulationsschritte in unterschiedlicher Intensität ab, z.B. durch gewebeabhängige Promotoraktivitäten. Darüber hinaus scheint auch der zelluläre Tropismus und die Speziesidentität der verwendeten Elemente eine Rolle zu spielen. So funktionierten zum Beispiel RNA-Elemente aus Mäuse- und Affenviren besonders gut in Mäuse- und Affenzellen (Daten nicht gezeigt).

Die gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass die richtige Wahl eines posttranskriptionellen Verstärkermoduls von der zu exprimierenden cDNA abhängig ist. Die Insertion eines CTE oder Rev/RRE ist zu empfehlen, wenn die Transkriptionseinheit Sequenzen enthält, die den nukleären Export aktiv behindern (wie z.B. nukleäre Retentionssignale), oder wenn Spleißsignale komplett fehlen. In allen anderen Kontexten (inklusive der klinisch relevanten Gene β -Globin und MDR1) vermittelte die Kombination von Spleißelementen in der 5'UTR und eines WPRE in der 3'UTR die beste Steigerung der Expression. Weitere Verstärkung dürfte durch Oligomerisierung der WPRE-Sequenzen zu erwarten sein (in transienten Transfektionssystemen schon in Donello et al. 1996 bestätigt). Festzuhalten bleibt, dass die Oligomerisierung eines anderen RNA-Elements, nämlich des CTE von MPMV, mit der viralen, reversen Transkription kompatibel ist (C.3.c).

Die Lokalisation der RNA- und Spleißelemente in den untranslatierten Regionen ist dabei genau definiert. Das Intron sollte in der 5'UTR platziert werden, da die Insertion in der 3'UTR im ‚Nonsense Mediated Decay‘ (Hentze et al. 1999, Nagy et al. 1998, Thermann et al. 1998) resultieren kann. Die RNA-Elemente sollten jedoch in der 3'UTR platziert werden, da eine Lokalisation in der 5'UTR (s. IAP-Element, Abb. 19B, Spur 3) zu einer deutlichen Expressionsverschlechterung führen kann. Darüber hinaus ist der natürliche Platz dieser RNA-Elemente (z.B. CTE, IAP, Foamy und WPRE) in der 3' Region ihrer Genome.

Das in den letzten Jahren gewonnene Verständnis der Wirkungsweise der RNA- und Spleißelemente macht deutlich, dass RNA-Synthese, Prozessierung, nukleärer Export und zytoplasmatische Translation funktionell zusammenhängende und die Genexpression limitierende Schritte sind. Die Unterschiede zwischen diesen Elementen und ihren Proteinpartnern zu verstehen, bedeutet die posttranskriptionelle Genexpression in gentherapeutischen Vektoren dirigieren zu können.

5. Möglichkeiten dieser Vektoren in der klinischen Therapie

Alle Gentherapiestrategien haben zwei wichtige Anforderungen:

- 1) Das effiziente Einbringen des relevanten, genetischen Materials in die Zielzelle.
- 2) Die Expression des Transgens auf therapeutischem Niveau.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, wie durch Modifikatoren der posttranskriptionellen Prozessierung die Genexpression retro- und lentiviraler Vektoren wirksam gesteigert werden kann. Die retroviralen Vektoren bewerkstelligen den unter 1) genannten Punkt. Sie sind in der Lage, relevante Zielzellen des hämatopoetischen Systems effizient zu transduzieren und sorgen durch Integration in das Genom der Wirtszelle für eine dauerhafte Expression. Dabei soll die Expression des Transgens ein therapeutisches Niveau erreichen (Punkt 2) und im Idealfall regulierbar sein (z.B. durch Hämin). Die hier vorliegenden Vektoren stellen eine weitgehende Umsetzung der derzeitigen Erkenntnisse im Bereich der posttranskriptionellen Regulation dar, insbesondere durch virale Elemente. Durch gezielte Eingriffe in den RNA-Metabolismus wurden RNA-Stabilität, -Transport, -Prozessierung und -Translatierbarkeit optimiert, um die Genexpression zu steigern. Zum vollen Verständnis der nukleozytoplasmatischen Verbindungen, die die Genexpression in eukaryotischen Zellen steuern, ist jedoch die weitere Charakterisierung der zellulären Partner und ihre Regulation eine wichtige Voraussetzung. Die Optimierung der posttranskriptionellen Prozessierung durch geeignete Modifikatoren stellt einen großen Fortschritt gegenüber herkömmlichen Vektorkonstruktionen dar, die oft nur transkriptionell aktive Elemente (z.B. durch die Promotorwahl) berücksichtigen.

Für die klinisch relevanten Transgene β -Globin und MDR wurden Vektoren entwickelt, die durch Einsatz von viralen RNA-Elementen und Spleißsignalen eine deutlich verbesserte Expressionsleistung ermöglichen und berechtigte Hoffnungen auf eine erfolgreiche Gentherapie zulassen. Beispielhaft für diese beiden Gene soll skizziert werden, wie die gentherapeutischen Anwendungen in der Hämatologie und Onkologie in der Klinik aussehen.

a. Therapie der Sichelzellanämie und β -Thalassämie

Für die erbliche Sichelzellanämie und Thalassämie (Klinik s. A.1.) existiert bis auf die Knochenmarkstransplantation keine kausale Therapie. Bei der Sichelzellanämie wird mit Hydroxyharnstoff (erhöht den HbF-Anteil) und Austauschtransfusionen therapiert. Bei der

Thalassämie werden neben Austauschtransfusionen Chelatbildner (Desferoxamin) zur Verhinderung einer Eisenüberladung eingesetzt.

Der gentherapeutische Ansatz würde diese beiden Krankheitsformen kausal angehen. Im Falle der Sichelzellanämie sind nach Blouin et al. (2000) bei einer Gentherapie etwa 10-20 % des Expressionsniveaus der endogenen Globinexpression zur Korrektur des Phänotyps ausreichend. Der hier etablierte Vektor (MP71 β GK) besitzt die Fähigkeit zur stabilen Integration ins Wirtszellgenom, was im Idealfall nur eine einmalige Applikation erforderlich macht. Die erstellte Globinkassette ermöglicht eine zell- und differenzierungsspezifische Globinexpression in der erythroiden Reihe. Für den hier optimierten Vektor MP71 β GK laufen z.Z. weitere Untersuchungen, ob die hier gezeigten detektierbaren Proteinniveaus in erythroiden Zellen ausreichen, um therapeutische Globinlevel zu erzielen.

b. Gentherapie mit MDR1-Vektoren

Für MDR1 ergeben sich Anwendungsmöglichkeiten im Bereich der Tumorthherapie und der Korrektur von Erbkrankheiten. Für zahlreiche maligne Erkrankungen (Sarkome, Mamma- und Ovarialkarzinome, maligne Lymphome, multiple Myelome) wurde in den letzten Jahren gezeigt, dass eine Intensivierung der Chemotherapie die Ansprechbarkeit verbessern kann. Die dosislimitierende Nebenwirkung zahlreicher Zytostatika beruht auf deren Knochenmarktoxizität. Um diese Nebenwirkungen abzuschwächen, könnten autologe Stammzellen vor ihrer Retransfusion (Abb. 26) mit einem MDR1-exprimierendem Vektor transduziert werden. Dadurch kann eine erhöhte Zytostatikaresistenz in den hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen etabliert werden, um mit einer hochdosierten Chemotherapie den Tumor erfolgreich zu bekämpfen.

Neben dem Einsatz in der Tumorthherapie kann MDR1 als Selektionsmarker zur Anreicherung transduzierter Zellen mittels *in vivo*-Selektion bei der Korrektur von Erbkrankheiten verwendet werden. Hierbei erfolgt eine Koexpression von MDR1 zusammen mit dem therapeutischen Gen. Derartige Ansätze wurden für Vektoren gezeigt, die MDR1 zusammen mit der Glucocerebrosidase (M. Gaucher, Aran et al. 1994), der α -Galactosidase (M. Fabry, Sugimoto et al. 1995) oder gp91phox (septische Granulomatose, Sokolic et al. 1996) exprimierten.

Durch Verwendung von Spleißelementen und WPRE lässt sich die Transgenexpression eines MDR1-exprimierenden Vektors in humanen Colonadenomzellen (SW480) und in hämato-

poetischen Vorläuferzellen (K-562) (zumindestens auf RNA-Niveau) signifikant steigern (Abb. 23 u. 24). Die höhere MDR1-Expression bei Verwendung des optimierten SF91m3 γ WPRE-Vektor lässt dementsprechend eine Applikation größerer Zytostatikadosen zu mit der Möglichkeit, vorhandene Tumoren effizienter behandeln zu können. Folgeexperimente von H. Wodrich und A. Niethammer (Scripps Research Institute, San Diego) konnten zeigen, dass LLC-Zellen (Luis Lung Cells), die mit dem Vektor MP91m3 β WPRE transduziert worden sind, bis zu 500 ng/ml Colchizin im Medium tolerieren konnten.

Bei MDR1 handelt es sich als Resistenzgen um ein *in vivo* selektierbares Markergen. Die Zytostatikagabe führt zu einer Selektion der MDR-positiven Zellen. Dies bedeutet, dass bei der Knochenmarkstransplantation ein geringer Anteil transduzierter, angewachsener Stammzellen ausreichen würde, weil durch Applikation von Chemotherapeutika auf die MDR-positive Zellpopulation *in vivo* selektioniert werden könnte.

c. Technische Durchführung dieser Gentherapie-Ansätze und mögliche Probleme

Auf Grund der mangelnden Spezifität retroviraler Vektoren für bestimmte Zielzellen bietet sich für diese Globin- und MDR-Vektoren eine *ex vivo* Gentransferstrategie an. Sowohl für den MDR1- als auch β -Globinvektor wäre deren Zielzelle die pluripotente hämatopoetische Stammzelle im Knochenmark. Diese Stammzellen zeichnen sich durch ihre lange Lebensdauer und das Potential zur Repopulation sowie zur Differenzierung in jede der hämatopoetischen Linien aus. Man nimmt an, dass die humanen hämatopoetischen Stammzellen zur CD34⁺- und CD38⁻-Zellpopulation (Bhatia et al. 1997), die murinen Stammzellen des Mäusemodells hingegen zur lin⁻/ckit⁺/sca1⁺-Population gehören. Technisch sind hämatopoetische Stammzellen aus Knochenmark, Nabelschnurblut oder nach G-CSF-Gabe aus dem peripheren Blut immunomagnetisch (z.B. durch MACS) zu isolieren. Nachfolgend können sie in Zellkultur unter Zytokinzugabe (u.a. flt-3 Ligand, SCF, IL-3 und IL-6) gehalten und zur Teilung angeregt werden. Während dieses Stadiums können sie mit aufgereinigten retroviralen Vektoren transduziert und dem Empfänger im Rahmen einer autologen Stammzelltransplantation intravenös reinfundiert werden. Um ein Anwachsen (Engraftment) des genetisch veränderten Knochenmarks zu gewährleisten, muss der Empfänger eine (vorige) Depletion seines eigenen Knochenmarks durch Bestrahlung oder Zytostatikagabe durchgemacht haben.

Die Zellen mit dem transferierten Gen führen zu einer Langzeitexpression des gewünschten Transgens, welches chromosomal integriert vorliegt.

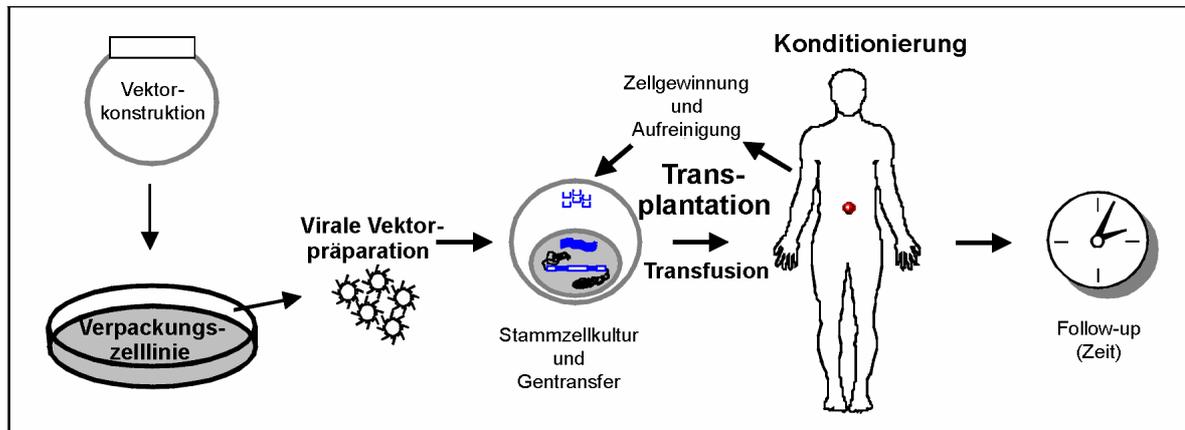


Abb. 26: Schematischer Aufbau der in die ex vivo Gentherapie involvierten Prozeduren

Nach Transfektion einer Verpackungszelllinie werden die aufgereinigten viralen Vektoren, welche mit dem zu therapierenden Transgen (z.B. β -Globin, MDR1) bestückt sind, zur Infektion einer Stammzellkultur genutzt. Die Stammzellen wurden zuvor immunomagnetisch direkt aus gewonnenem Knochenmark oder nach G-CSF-Gabe aus dem peripheren Blut isoliert. Mittels eines geeigneten Cytokincocktails werden die hämatopoetischen Stammzellen in Zellkultur kultiviert, expandiert und nachfolgend mit der viralen Vektorpräparation transduziert. Nach Reinfusion der Stammzellen kommt es bei entsprechend konditionierten Patienten (Radio- und Chemotherapie) zum Anwachsen der Zellpopulation. Der Erfolg der Gentherapie wird in langfristigen Follow Up-Untersuchungen kontrolliert. [Die Abbildung wurde von C. Baum zur Verfügung gestellt.]

Als Grenzen dieser Therapieform gibt es z. Z. noch einige methodische Probleme. So ist die Anzahl der mit retroviralen Vektoren transduzierten Zellen häufig gering. Lentivirale Vektoren haben demgegenüber den Vorteil, auch ruhende, hämatopoetische Zellen infizieren zu können (Haas et al. 2000). Die Zusammenstellung des individuellen Zytokincocktails bei Transduktion und Expansion ermöglicht durch die induzierte Zellteilung auch eine Transduktion mit retroviralen Vektoren (Kiem et al. 1998). Weiterhin ist das Anwachsen ein weiterer kritischer Punkt, der z. Z. intensiv beforscht wird (Glimm et al. 2000, Habibian et al. 1998). Mögliche Risiken des retroviralen Gentransfers sind die Insertionsmutagenese und Leukämiebildung durch die verwendeten Vektoren (Li et al. 2002) sowie die Schädigung durch Bestrahlung oder Chemotherapie, wie sie bei Knochenmarkstransplantation notwendig sind.

Derzeit werden die hier vorgestellten Vektoren in präklinischen *ex vivo* Gentherapie-Experimenten am Mausmodell getestet.

E. Zusammenfassung

Die Expression von Transgenen in retroviralen Gentherapie-Vektoren ist häufig dadurch limitiert, dass die Mehrzahl der transkribierten RNAs nicht effizient prozessiert und für den nukleären Export lizenziert wird. Die nachfolgende Akkumulation zytoplasmatischer mRNA und somit deren Translatierbarkeit kann von der Präsenz geeigneter Introns, Exportsignale oder effizienter Polyadenylierung abhängen. In dieser Arbeit wurden optimierte retrovirale Vektoren durch Insertion posttranskriptionell regulatorischer Elemente konstruiert. Es wurden Spleißsignale in der 5' untranslatierten Region (UTR) von retroviralen Vektoren modifiziert und DNA-Sequenzen, die u.a. für RNA-Elemente des Mason-Pfizer Monkey Virus (CTE), murinen intracisternalen A-Typ Partikels (IAP), Foamyvirus und Woodchuck Hepatitis Virus (WPRE) kodieren, in die 3'UTR insertiert. Einige dieser Elemente (z.B. CTE) verbessern den nukleozytoplasmatischen Transport einer mRNA, während für andere (z.B. WPRE) eine Rolle in der Verbesserung von RNA-Stabilität oder Polyadenylierung postuliert wird.

Unter Benutzung verschiedener Verpackungszelllinien wurden Vektorpartikel produziert und mit diesen bis zu 10 verschiedene Zelllinien unterschiedlicher Spezies (u.a. Mensch, Affe, Hund, Maus) transduziert. Für drei Klassen funktionell verschiedenartiger Gene wurden unterschiedliche Effekte der verwendeten RNA- und Spleißelemente beobachtet:

- 1) In einem CTE-abhängigen Transkript, dem gag/prot-Genfragment von HIV-1, war die größte Expressionsverbesserung durch ein oligomeres CTE zu erzielen, während das WPRE oder ein Intron nur einen marginalen Effekt ausübte.
- 2) In humanem β -Globin, einem intron-abhängigen Transkript, kompensierte die Präsenz eines CTEs oder WPREs das Fehlen eines Introns, obgleich die größte Expressionssteigerung durch die Kombination eines Introns mit einem WPRE zu erreichen war.
- 3) In cDNAs des grün fluoreszierenden Proteins (EGFP) und des humanen Multidrug-resistenzgens (MDR1), die in Abwesenheit eines CTEs oder eines Introns exprimiert werden können, führte die Verwendung funktioneller Spleißsignale oder des WPREs zu einer relativen Expressionsverbesserung. Die Kombination eines Introns mit einem WPRE resultierte in der größten Verbesserung der Genexpression (bis zu 10fach), was für eine partielle Synergie dieser Elemente spricht.

Diese Resultate legen nahe, dass die verwendeten Module (v.a. Spleißelemente, CTE und WPRE) auf verschiedene Pfade der RNA-Prozessierung Einfluss nehmen und die richtige Wahl eines posttranskriptionell regulatorischen Elementes von dem Typus der zu exprimierenden cDNA abhängt. Zusammengenommen können posttranskriptionelle Kontrollelemente kontextabhängig zu einer deutlichen Verbesserung der Genexpression retroviral transduzierter Transgene führen.

F. Literaturverzeichnis

1. **Abrams H. D., L. R. Rohrschneider, et al.** (1982). "Nuclear location of the putative transforming protein of avian myelocytomatosis virus." *Cell* **29**(2): 427-39.
2. **Andersson L. C., K. Nilsson, et al.** (1979). "K562 - a human erythroleukemic cell line." *Int J Cancer* **23**(2): 143-47.
3. **Arai T., M. Takada, et al.** (1999). "Dose-dependent transduction of vesicular stomatitis virus G protein-pseudotyped retrovirus into human solid tumor cell lines and murine fibroblasts." *Virology* **260**: 109-115.
4. **Aran J. M., M. M. Gottesman, et al.** (1994). "Drug-selected coexpression of human glucocerebrosidase and P-glycoprotein using a bicistronic vector." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(8): 3176-80.
5. **Armentano D., S. F. Yu, et al.** (1987). "Effect of internal viral sequences on the utility of retroviral vectors." *J Virol* **61**(5): 1647-50.
6. **Arrigo S., K. Beemon** (1988). "Regulation of Rous sarcoma virus RNA splicing and stability." *Mol Cell Biol* **8**(11): 4858-67.
7. **Ausubel F. M., R. Brent, et al.** (1995). "Short Protocols in Molecular Biology." 3rd ed., John Wiley & Sons, Inc.
8. **Baum C., H. G. Eckert, et al.** (1996). "Improved retroviral vectors for hematopoietic stem cell protection and in vivo selection." *J Hematother* **5**(4): 323-29.
9. **Baum C., S. Hegewisch-Becker, et al.** (1995). "Novel retroviral vectors for efficient expression of the multidrug resistance (mdr-1) gene in early hematopoietic cells." *J Virol* **69**(12): 7541-47.
10. **Bear J., W. Tan, et al.** (1999). "Identification of novel import and export signals of human TAP, the protein that binds to the constitutive transport element of the type D retrovirus mRNAs." *Mol Cell Biol* **19**(9): 6306-17.
11. **Bender M. A., A. D. Miller, et al.** (1988). "Expression of the human beta-globin gene after retroviral transfer into murine erythroleukemia cells and human BFU-E cells." *Mol Cell Biol* **8**(4): 1725-35.
12. **Berlios C., J. L. Darlix** (1995). "An internal ribosomal entry mechanism promotes translation of murine leukemia virus gag polyprotein precursors." *J Virol* **69**(4): 2214-22.
13. **Bhatia M., J. C. Wang, et al.** (1997). "Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(10): 5320-25.
14. **Blouin M. J., H. Beauchemin, et al.** (2000). "Genetic correction of sickle cell disease: insights using transgenic mouse models." *Nat Med* **6**(2): 177-82.
15. **Boris-Lawrie K., T. M. Roberts, et al.** (2001). "Retroviral RNA elements integrate components of post-transcriptional gene expression." *Life Sci* **69**(23): 2697-709.
16. **Borst P., A. H. Schinkel** (1997). "Genetic dissection of the function of mammalian P-glycoproteins." *Trends Genet* **13**(6): 217-22.
17. **Bowtell D. D., S. Cory, et al.** (1988). "Comparison of expression in hemopoietic cells by retroviral vectors carrying two genes." *J Virol* **62**(7): 2464-73.
18. **Braun I. C., E. Rohrbach, et al.** (1999). "TAP binds to the constitutive transport element (CTE) through a novel RNA-binding motif that is sufficient to promote CTE-dependent RNA export from the nucleus." *Embo J* **18**(7): 1953-65.
19. **Bray M., S. Prasad, et al.** (1994). "A small element from the Mason-Pfizer monkey virus genome makes human immunodeficiency virus type 1 expression and replication Rev-independent." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(4): 1256-60.
20. **Buchman A. R., P. Berg** (1988). "Comparison of intron-dependent and intron-independent gene expression." *Mol Cell Biol* **8**(10): 4395-405.
21. **Burns J. C., T. Friedmann, et al.** (1993). "Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(17): 8033-37.
22. **Campbell P. L., A. E. Kulozik, et al.** (1990). "Induction by HMBA and DMSO of genes introduced into mouse erythroleukemia and other cell lines by transient transfection." *Genes Dev* **4**(7): 1252-66.

23. **Chalfie M., Y. Tu, et al.** (1994). "Green fluorescent protein as a marker for gene expression." *Science* **263**(5148): 802-05.
24. **Chang D. D., P. A. Sharp** (1989). "Regulation by HIV Rev depends upon recognition of splice sites." *Cell* **59**(5): 789-95.
25. **Charneau P., M. Alizon, et al.** (1992). "A second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication." *J Virol* **66**(5): 2814-20.
26. **Charneau P., G. Mirambeau, et al.** (1994). "HIV-1 reverse transcription. A termination step at the center of the genome." *J Mol Biol* **241**(5): 651-62.
27. **Chen C., H. Okayama** (1987). "High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA." *Mol Cell Biol* **7**(8): 2745-52.
28. **Chen J. J., I. M. London** (1995). "Regulation of protein synthesis by heme-regulated eIF-2 alpha kinase." *Trends Biochem Sci* **20**(3): 105-08.
29. **Chesebro B., K. Wehrly, et al.** (1990). "Differential expression in human and mouse cells of human immunodeficiency virus pseudotyped by murine retroviruses." *J Virol* **64**(9): 4553-57.
30. **Chong H., W. Starkey, et al.** (1998). "A replication-competent retrovirus arising from a split-function packaging cell line was generated by recombination events between the vector, one of the packaging constructs, and endogenous retroviral sequences." *J Virol* **72**(4): 2663-70.
31. **Clavel F., P. Charneau** (1994). "Fusion from without directed by human immunodeficiency virus particles." *J Virol* **68**(2): 1179-85.
32. **Coffin J. H. S. H., Varmus H.E. & Miller A.D. (eds.)** (2000). "Retroviruses." Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview.
33. **Cohen J.** (2001). "Building a small-animal model for AIDS, block by block." *Science* **232** (5532): 1034-36.
34. **Cooper D. N.** (1993). "Human gene mutations affecting RNA processing and translation." *Ann Med* **25**(1): 11-17.
35. **Cormack B. P., R. H. Valdivia, et al.** (1996). "FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP)." *Gene* **173**(1): 33-38.
36. **Day D. A., M. F. Tuite** (1998). "Post-transcriptional gene regulatory mechanisms in eukaryotes: an overview." *J Endocrinol* **157**(3): 361-71.
37. **Donello J. E., A. A. Beeche, et al.** (1996). "The hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element is composed of two subelements." *J Virol* **70**(7): 4345-51.
38. **Donello J. E., J. E. Loeb, et al.** (1998). "Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element." *J Virol* **72**(6): 5085-92.
39. **Dube S. K., I. B. Pragnell, et al.** (1975). "Induction of endogenous and of spleen focus-forming viruses during dimethylsulfoxide-induced differentiation of mouse erythroleukemia cells transformed by spleen focus-forming virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**(5): 1863-67.
40. **DuBridg R. B., P. Tang, et al.** (1987). "Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system." *Mol Cell Biol* **7**(1): 379-87.
41. **Dull T., R. Zufferey, et al.** (1998). "A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system." *J Virol* **72**(11): 8463-71.
42. **Dzierzak E. A., T. Papayannopoulou, et al.** (1988). "Lineage-specific expression of a human beta-globin gene in murine bone marrow transplant recipients reconstituted with retrovirus-transduced stem cells." *Nature* **331**(6151): 35-41.
43. **Eckert H. G., M. Stockschlader, et al.** (1996). "High-dose multidrug resistance in primary human hematopoietic progenitor cells transduced with optimized retroviral vectors." *Blood* **88**(9): 3407-15.
44. **Eckner R., W. Ellmeier, et al.** (1991). "Mature mRNA 3' end formation stimulates RNA export from the nucleus." *Embo J* **10**(11): 3513-22.
45. **Ernst R. K., M. Bray, et al.** (1997a). "Secondary structure and mutational analysis of the Mason-Pfizer monkey virus RNA constitutive transport element." *RNA* **3**(2): 210-22.
46. **Ernst R. K., M. Bray, et al.** (1997b). "A structured retroviral RNA element that mediates nucleocytoplasmic export of intron-containing RNA." *Mol Cell Biol* **17**(1): 135-44.
47. **Fouchier R. A., M. H. Malim** (1999). "Nuclear import of human immunodeficiency virus type-1 preintegration complexes." *Adv Virus Res* **52**: 275-99.
48. **Franz T., F. Hilberg, et al.** (1986). "Retroviral mutants efficiently expressed in embryonal carcinoma cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(10): 3292-96.

49. **Furuichi Y., A. LaFiandra, et al.** (1977). "5'-Terminal structure and mRNA stability." *Nature* **266**(5599): 235-39.
50. **Gallie D. R., V. Walbot** (1990). "RNA pseudoknot domain of tobacco mosaic virus can functionally substitute for a poly(A) tail in plant and animal cells." *Genes Dev* **4**(7): 1149-57.
51. **Gasmi M., J. Glynn, et al.** (1999). "Requirements for efficient production and transduction of human immunodeficiency virus type 1-based vectors." *J Virol* **73**(3): 1828-34.
52. **Glimm H., I. H. Oh, et al.** (2000). "Human hematopoietic stem cells stimulated to proliferate in vitro lose engraftment potential during their S/G(2)/M transit and do not reenter G(0)." *Blood* **96**(13): 4185-93.
53. **Görlich D., U. Kutay** (1999). "Transport between the cell nucleus and the cytoplasm." *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**: 607-60.
54. **Gottesman M. M., C. A. Hrycyna, et al.** (1995). "Genetic analysis of the multidrug transporter." *Annu Rev Genet* **29**: 607-49.
55. **Graf M., A. Bojak, et al.** (2000). "Concerted action of multiple cis-acting sequences is required for Rev dependence of late human immunodeficiency virus type 1 gene expression." *J Virol* **74**(22): 10822-26.
56. **Grosveld F., E. De Boer, et al.** (1998). "The dynamics of globin gene expression and gene therapy vectors." *Ann N Y Acad Sci* **850**: 18-27.
57. **Grosveld F., G. B. van Assendelft, et al.** (1987). "Position-independent, high-level expression of the human beta-globin gene in transgenic mice." *Cell* **51**(6): 975-85.
58. **Gruter P., C. Taberner, et al.** (1998). "TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus." *Mol Cell* **1**(5): 649-59.
59. **Günzburg W.H., B. Salmons** (1997). "Physikalische Gentransfermethoden." in *Gentransfer in Säugetierzellen*. Spektrum Verlag, Heidelberg, Berlin. S. 19-32.
60. **Haas D. L., S. S. Case, et al.** (2000). "Critical factors influencing stable transduction of human CD34(+) cells with HIV-1-derived lentiviral vectors." *Mol Ther* **2**(1): 71-80.
61. **Haas J., E. C. Park, et al.** (1996). "Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein." *Curr Biol* **6**(3): 315-24.
62. **Habibian H. K., S. O. Peters, et al.** (1998). "The fluctuating phenotype of the lymphohematopoietic stem cell with cell cycle transit." *J Exp Med* **188**(2): 393-98.
63. **Halene S., D. B. Kohn** (2000). "Gene therapy using hematopoietic stem cells: Sisyphus approaches the crest." *Hum Gene Ther* **11**(9): 1259-67.
64. **Hamm J., I. W. Mattaj** (1990). "Monomethylated cap structures facilitate RNA export from the nucleus." *Cell* **63**(1): 109-18.
65. **Hammarskjöld M. L., H. Li, et al.** (1994). "Human immunodeficiency virus env expression becomes Rev-independent if the env region is not defined as an intron." *J Virol* **68**(2): 951-58.
66. **Han A. P., C. Yu, et al.** (2001). "Heme-regulated eIF2alpha kinase (HRI) is required for translational regulation and survival of erythroid precursors in iron deficiency." *Embo J* **20**(23): 6909-18.
67. **Harlow E., D. Lane** (1998). "Using antibodies: a laboratory manual." Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
68. **Hartley J. W., W. P. Rowe** (1975). "Clonal cell lines from a feral mouse embryo which lack host-range restrictions for murine leukemia viruses." *Virology* **65**(1): 128-34.
69. **Hegewisch-Becker S. H., D. K. Hossfeld** (1996). "Multidrug-Resistenz: Klinische Bedeutung und therapeutische Ansätze." in *Onkologie*. Zeller W.J., Zur Hausen H. (Eds.). Kap. IV-10.2.
70. **Heinkelein M., M. Schmidt, et al.** (1998). "Characterization of a cis-acting sequence in the Pol region required to transfer human foamy virus vectors." *J Virol* **72**(8): 6307-14.
71. **Hentze M. W., A. E. Kulozik** (1999). "A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay." *Cell* **96**(3): 307-10.
72. **Hildinger M.** (1999). "Entwicklung retroviraler Vektoren für den Einsatz in der Gentherapie." Dissertation. FB Chemie, Universität Hamburg.
73. **Hildinger M., K. L. Abel, et al.** (1999). "Design of 5' untranslated sequences in retroviral vectors developed for medical use." *J Virol* **73**(5): 4083-89.
74. **Hildinger M., H. G. Eckert, et al.** (1998). "FMEV vectors: both retroviral long terminal repeat and leader are important for high expression in transduced hematopoietic cells." *Gene Ther* **5**(11): 1575-79.

75. **Hirose Y., J. L. Manley** (2000). "RNA polymerase II and the integration of nuclear events." *Genes Dev* **14**(12): 1415-29.
76. **Hoffman R., M. J. Murnane, et al.** (1979). "Induction of erythropoietic colonies in a human chronic myelogenous leukemia cell line." *Blood* **54**(5): 1182-87.
77. **Hope T. J., N. P. Klein, et al.** (1992). "Trans-dominant inhibition of human immunodeficiency virus type 1 Rev occurs through formation of inactive protein complexes." *J Virol* **66**(4): 1849-55.
78. **Huang Y., G. G. Carmichael** (1997). "The mouse histone H2a gene contains a small element that facilitates cytoplasmic accumulation of intronless gene transcripts and of unspliced HIV-1-related mRNAs." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(19): 10104-09.
79. **Huang Y., J. A. Steitz** (2001). "Splicing factors SRp20 and 9G8 promote the nucleocytoplasmic export of mRNA." *Mol Cell* **7**(4): 899-905.
80. **Huang Y., K. M. Wimler, et al.** (1999). "Intronless mRNA transport elements may affect multiple steps of pre-mRNA processing." *Embo J* **18**(6): 1642-52.
81. **Huang Z. M., T. S. Yen** (1994). "Hepatitis B virus RNA element that facilitates accumulation of surface gene transcripts in the cytoplasm." *J Virol* **68**(5): 3193-99.
82. **Huang Z. M., T. S. Yen** (1995). "Role of the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element in export of intronless transcripts." *Mol Cell Biol* **15**(7): 3864-69.
83. **Inoue H., H. Nojima, et al.** (1990). "High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids." *Gene* **96**(1): 23-28.
84. **Izaurralde E., S. Adam** (1998). "Transport of macromolecules between the nucleus and the cytoplasm." *RNA* **4**(4): 351-64.
85. **Izaurralde E., I. W. Mattaj** (1995). "RNA export." *Cell* **81**(2): 153-59.
86. **Jackson D. A., A. Pombo, et al.** (2000). "The balance sheet for transcription: an analysis of nuclear RNA metabolism in mammalian cells." *Faseb J* **14**(2): 242-54.
87. **Jarmolowski A., W. C. Boelens, et al.** (1994). "Nuclear export of different classes of RNA is mediated by specific factors." *J Cell Biol* **124**(5): 627-35.
88. **Jaeger J. A., D. H. Turner, et al.** (1989). "Improved predictions of secondary structures for RNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(20): 7706-10.
89. **Jaeger J. A., D. H. Turner, et al.** (1990). "Predicting optimal and suboptimal secondary structure for RNA." *Methods Enzymol* **183**: 281-306.
90. **Kalberer C. P., R. Pawliuk, et al.** (2000). "Preselection of retrovirally transduced bone marrow avoids subsequent stem cell gene silencing and age-dependent extinction of expression of human beta-globin in engrafted mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(10): 5411-15.
91. **Kang Y., B. R. Cullen** (1999). "The human Tap protein is a nuclear mRNA export factor that contains novel RNA-binding and nucleocytoplasmic transport sequences." *Genes Dev* **13**(9): 1126-39.
92. **Kataoka N., J. Yong, et al.** (2000). "Pre-mRNA splicing imprints mRNA in the nucleus with a novel RNA-binding protein that persists in the cytoplasm." *Mol Cell* **6**(3): 673-82.
93. **Kavanaugh M. P., D. G. Miller, et al.** (1994). "Cell-surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(15): 7071-75.
94. **Kay M. A., J. C. Glorioso, et al.** (2001). "Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics." *Nat Med* **7**(1): 33-40.
95. **Kempler G., B. Freitag, et al.** (1993). "Characterization of the Moloney murine leukemia virus stem cell-specific repressor binding site." *Virology* **193**(2): 690-99.
96. **Kiem H. P., R. G. Andrews, et al.** (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**(6): 1878-86.
97. **Kim V. N., N. Kataoka, et al.** (2001). "Role of the nonsense-mediated decay factor hUpf3 in the splicing-dependent exon-exon junction complex." *Science* **293**(5536): 1832-36.
98. **Kimpton J., M. Emerman** (1992). "Detection of replication-competent and pseudotyped human immunodeficiency virus with a sensitive cell line on the basis of activation of an integrated beta-galactosidase gene." *J Virol* **66**(4): 2232-39.
99. **Kinsella T. M., G. P. Nolan** (1996). "Episomal vectors rapidly and stably produce high-titer recombinant retrovirus." *Hum Gene Ther* **7**(12): 1405-13.

100. Klages N., R. Zufferey, et al. (2000). "A stable system for the high-titer production of multiply attenuated lentiviral vectors." *Mol Ther* **2**(2): 170-76.
101. Knipper R., K. Kuehlcke, et al. (2001). "Improved post-transcriptional processing of an MDR1 retrovirus elevates expression of multidrug resistance in primary human hematopoietic cells." *Gene Ther* **8**(3): 239-46.
102. Konvalinka J., M. A. Litterst, et al. (1995). "An active-site mutation in the human immunodeficiency virus type 1 proteinase (PR) causes reduced PR activity and loss of PR-mediated cytotoxicity without apparent effect on virus maturation and infectivity." *J Virol* **69**(11): 7180-86.
103. Kozak M. (1984). "Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs." *Nucleic Acids Res* **12**(2): 857-72.
104. Kozak M. (1991). "Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation." *J Biol Chem* **266**(30): 19867-70.
105. Kozak M. (1994). "Features in the 5' non-coding sequences of rabbit alpha and beta-globin mRNAs that affect translational efficiency." *J Mol Biol* **235**(1): 95-110.
106. Kramer A. (1996). "The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing." *Annu Rev Biochem* **65**: 367-409.
107. Krasheninnikov I. A., A. A. Komar, et al. (1991). "Nonuniform size distribution of nascent globin peptides, evidence for pause localization sites, and a contranlational protein-folding model." *J Protein Chem* **10**(5): 445-53.
108. Kugler W., J. Enssle, et al. (1995). "Nuclear degradation of nonsense mutated beta-globin mRNA: a post-transcriptional mechanism to protect heterozygotes from severe clinical manifestations of beta-thalassemia?" *Nucleic Acids Res* **23**(3): 413-18.
109. Kulp D., D. Haussler, et al. (1996). "A generalized hidden Markov model for the recognition of human genes in DNA." *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* **4**: 134-42.
110. Kurpad C., P. Mukherjee, et al. (1999). "Adeno-associated virus 2-mediated transduction and erythroid lineage-restricted expression from parvovirus B19p6 promoter in primary human hematopoietic progenitor cells." *J Hematother Stem Cell Res* **8**(6): 585-92.
111. Laemmli U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(259): 680-85.
112. Laker C., J. Meyer, et al. (1998). "Host cis-mediated extinction of a retrovirus permissive for expression in embryonal stem cells during differentiation." *J Virol* **72**(1): 339-48.
113. Le Hir H., E. Izaurralde, et al. (2000). "The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions." *Embo J* **19**(24): 6860-69.
114. Legrain P., M. Rosbash (1989). "Some cis- and trans-acting mutants for splicing target pre-mRNA to the cytoplasm." *Cell* **57**(4): 573-83.
115. Li Z., J. Dullmann, et al. (2002). "Murine leukemia induced by retroviral gene marking." *Science* **296** (5567): 497.
116. Linial M. L. (1999). "Foamy viruses are unconventional retroviruses." *J Virol* **73**(3): 1747-55.
117. Liu X., J. E. Mertz (1995). "HnRNP L binds a cis-acting RNA sequence element that enables intron-dependent gene expression." *Genes Dev* **9**(14): 1766-80.
118. Loeb J. E., W. S. Cordier, et al. (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**(14): 2295-305.
119. Lozzio B. B., C. B. Lozzio (1979). "Properties and usefulness of the original K-562 human myelogenous leukemia cell line." *Leuk Res* **3**(6): 363-70.
120. Lozzio B. B., C. B. Lozzio, et al. (1981). "A multipotential leukemia cell line (K-562) of human origin." *Proc Soc Exp Biol Med* **166**(4): 546-50.
121. Lozzio C. B., B. B. Lozzio (1975). "Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome." *Blood* **45**(3): 321-34.
122. Luo M. J., R. Reed (1999). "Splicing is required for rapid and efficient mRNA export in metazoans." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(26): 14937-42.
123. Lykke-Andersen J., M. D. Shu, et al. (2001). "Communication of the position of exon-exon junctions to the mRNA surveillance machinery by the protein RNPS1." *Science* **293**(5536): 1836-39.
124. Mann R., R. C. Mulligan, et al. (1983). "Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus." *Cell* **33**(1): 153-59.

125. **Mariani R., G. Rutter, et al.** (2000). "A block to human immunodeficiency virus type 1 assembly in murine cells." *J Virol* **74**(8): 3859-70.
126. **Mariani R., B. A. Rasala, et al.** (2001). "Mouse-human heterokaryons support efficient human immunodeficiency virus type 1 assembly". *J Virol* **75**(7): 3141-51.
127. **Matsumoto K., K. M. Wassarman, et al.** (1998). "Nuclear history of a pre-mRNA determines the translational activity of cytoplasmic mRNA." *Embo J* **17**(7): 2107-21.
128. **Mautino M. R., N. Keiser, et al.** (2000). "Improved titers of HIV-based lentiviral vectors using the SRV-1 constitutive transport element." *Gene Ther* **7**(16): 1421-24.
129. **May C., S. Rivella, et al.** (2000). "Therapeutic haemoglobin synthesis in beta-thalassaemic mice expressing lentivirus-encoded human beta-globin." *Nature* **406**(6791): 82-86.
130. **Mechetner E. B., I. B. Roninson** (1992). "Efficient inhibition of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance with a monoclonal antibody." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(13): 5824-28.
131. **Mergener K., M. Facke, et al.** (1992). "Analysis of HIV particle formation using transient expression of subviral constructs in mammalian cells." *Virology* **186**(1): 25-39.
132. **Miller A. D., M. A. Bender, et al.** (1988). "Design of retrovirus vectors for transfer and expression of the human beta-globin gene." *J Virol* **62**(11): 4337-45.
133. **Miller A. D., C. Buttimore** (1986). "Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production." *Mol Cell Biol* **6**(8): 2895-902.
134. **Miller A. D., J. V. Garcia, et al.** (1991). "Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus." *J Virol* **65**(5): 2220-24.
135. **Miller A. D., G. J. Rosman** (1989). "Improved retroviral vectors for gene transfer and expression." *Biotechniques* **7**(9): 980-2, 984-6, 989-90.
136. **Miller D. G., M. A. Adam, et al.** (1990). "Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection." *Mol Cell Biol* **10**(8): 4239-42.
137. **Moss B., O. Elroy-Stein, et al.** (1990). "Product review. New mammalian expression vectors." *Nature* **348**(6296): 91-92.
138. **Mulligan R. C.** (1993). "The basic science of gene therapy." *Science* **260**(5110): 926-32.
139. **Nagy E., L. E. Maquat** (1998). "A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance." *Trends Biochem Sci* **23**(6): 198-99.
140. **Nakabayashi H., K. Taketa, et al.** (1984). "Phenotypical stability of a human hepatoma cell line, HuH-7, in long-term culture with chemically defined medium." *Gann, Jap. J. Cancer Res.* **75**(2): 151-58.
141. **Nakielnny S., U. Fischer, et al.** (1997). "RNA transport." *Annu Rev Neurosci* **20**: 269-301.
142. **Naldini L., U. Blomer, et al.** (1996a). "Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(21): 11382-88.
143. **Naldini L., U. Blomer, et al.** (1996b). "In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector." *Science* **272**(5259): 263-67.
144. **Ogert R. A., L. H. Lee, et al.** (1996). "Avian retroviral RNA element promotes unspliced RNA accumulation in the cytoplasm." *J Virol* **70**(6): 3834-43.
145. **Ostareck-Lederer A., D. H. Ostareck, et al.** (1994). "Translation of 15-lipoxygenase mRNA is inhibited by a protein that binds to a repeated sequence in the 3' untranslated region." *Embo J* **13**(6): 1476-81.
146. **Otto E., A. Jones-Trower, et al.** (1994). "Characterization of a replication-competent retrovirus resulting from recombination of packaging and vector sequences." *Hum Gene Ther* **5**(5): 567-75.
147. **Park F., K. Ohashi, et al.** (2000). "Efficient lentiviral transduction of liver requires cell cycling in vivo." *Nat Genet* **24**(1): 49-52.
148. **Pasquinelli A. E., R. K. Ernst, et al.** (1997). "The constitutive transport element (CTE) of Mason-Pfizer monkey virus (MPMV) accesses a cellular mRNA export pathway." *Embo J* **16**(24): 7500-10.
149. **Paulsen D.** (1999). "Murine Leukämieviren mit dem gfp-Gen oder dem HIV nef-Gen: Untersuchung zur genetischen Stabilität und zum Infektionsverlauf in vivo." Dissertation. FB Biologie, Universität Hamburg.
150. **Pear W. S., G. P. Nolan, et al.** (1993). "Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(18): 8392-96.

151. **Pinol-Roma S.G. Dreyfuss** (1992). "Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm." *Nature* **355**(6362): 730-32.
152. **Pollard V. W., M. H. Malim** (1998). "The HIV-1 Rev protein." *Annu Rev Microbiol* **52**: 491-532.
153. **Ponka P.** (1999). "Cell biology of heme." *Am J Med Sci* **318**(4): 241-56.
154. **Powell D. M., M. C. Amaral, et al.** (1997). "HIV Rev-dependent binding of SF2/ASF to the Rev response element: possible role in Rev-mediated inhibition of HIV RNA splicing." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(3): 973-78.
155. **Prasher D. C.** (1995). "Using GFP to see the light." *Trends Genet* **11**(8): 320-23.
156. **Pruzina S., M. Antoniou, et al.** (1994). "Transcriptional activation by hypersensitive site three of the human beta-globin locus control region in murine erythroleukemia cells." *Biochim Biophys Acta* **1219**(2): 351-60.
157. **Ragheb J. A., P. Bressler, et al.** (1995). "Analysis of trans-dominant mutants of the HIV type 1 Rev protein for their ability to inhibit Rev function, HIV type 1 replication, and their use as anti-HIV gene therapeutics." *AIDS Res Hum Retroviruses* **11**(11): 1343-53.
158. **Rivella S., M. Sadelain** (1998). "Genetic treatment of severe hemoglobinopathies: the combat against transgene variegation and transgene silencing." *Semin Hematol* **35**(2): 112-25.
159. **Rizvi T. A., R. D. Schmidt, et al.** (1996). "Rev/RRE-independent Mason-Pfizer monkey virus constitutive transport element-dependent propagation of SIVmac239 vectors using a single round of replication assay." *Virology* **222**(2): 457-63.
160. **Rodrigues J. P., M. Rode, et al.** (2001). "REF proteins mediate the export of spliced and unspliced mRNAs from the nucleus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(3): 1030-35.
161. **Roe T., T. C. Reynolds, et al.** (1993). "Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis." *Embo J* **12**(5): 2099-108.
162. **Russell J. E., S. A. Liebhaber** (1996). "The stability of human beta-globin mRNA is dependent on structural determinants positioned within its 3' untranslated region." *Blood* **87**(12): 5314-23.
163. **Saavedra C., B. Felber, et al.** (1997). "The simian retrovirus-1 constitutive transport element, unlike the HIV-1 RRE, uses factors required for cellular mRNA export." *Curr Biol* **7**(9): 619-28.
164. **Sabatino D. E., N. E. Seidel, et al.** (2001). "Development of a stable retrovirus vector capable of long-term expression of gamma-globin mRNA in mouse erythrocytes." *Ann N Y Acad Sci* **938**: 246-61.
165. **Sadelain M., C. H. Wang, et al.** (1995). "Generation of a high-titer retroviral vector capable of expressing high levels of the human beta-globin gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(15): 6728-32.
166. **Sambrook J., E. F. Fritsch, et al.** (1989). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual." CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
167. **Sanger F., S. Nicklen, et al.** (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-67.
168. **Schambach A., H. Wodrich, et al.** (2000). "Context dependence of different modules for posttranscriptional enhancement of gene expression from retroviral vectors." *Mol Ther* **2**(5): 435-45.
169. **Schneider R., M. Campbell, et al.** (1997). "Inactivation of the human immunodeficiency virus type 1 inhibitory elements allows Rev-independent expression of Gag and Gag/protease and particle formation." *J Virol* **71**(7): 4892-903.
170. **Schwartz S., M. Campbell, et al.** (1992). "Mutational inactivation of an inhibitory sequence in human immunodeficiency virus type 1 results in Rev-independent gag expression." *J Virol* **66**(12): 7176-82.
171. **Shank P. R., M. Linial** (1980). "Avian oncovirus mutant (SE21Q1b) deficient in genomic RNA: characterization of a deletion in the provirus." *J Virol* **36**(2): 450-56.
172. **Shatkin A. J.** (1976). "Capping of eucaryotic mRNAs." *Cell* **9**(4 Pt 2): 645-53.
173. **Sherman M. P., W. C. Greene** (2002). "Slipping through the door: HIV entry into the nucleus." *Microbes Infect* **4**(1): 67-73.
174. **Shimotohno K., H. M. Temin** (1981). "Formation of infectious progeny virus after insertion of herpes simplex thymidine kinase gene into DNA of an avian retrovirus." *Cell* **26**(1 Pt 1): 67-77.

175. **Sirven A., F. Pflumio, et al.** (2000). "The human immunodeficiency virus type-1 central DNA flap is a crucial determinant for lentiviral vector nuclear import and gene transduction of human hematopoietic stem cells." *Blood* **96**(13): 4103-10.
176. **Smith G. J., 3rd, J. E. Donello, et al.** (1998). "The hepatitis B virus post-transcriptional regulatory element contains two conserved RNA stem-loops which are required for function." *Nucleic Acids Res* **26**(21): 4818-27.
177. **Sokolic R. A., S. Sekhsaria, et al.** (1996). "A bicistronic retrovirus vector containing a picornavirus internal ribosome entry site allows for correction of X-linked CGD by selection for MDR1 expression." *Blood* **87**(1): 42-50.
178. **Solovyev V. V., A. A. Salamov, et al.** (1994). "Predicting internal exons by oligonucleotide composition and discriminant analysis of spliceable open reading frames." *Nucleic Acids Res* **22**(24): 5156-63.
179. **Sorrentino B. P., S. J. Brandt, et al.** (1992). "Selection of drug-resistant bone marrow cells in vivo after retroviral transfer of human MDR1." *Science* **257**(5066): 99-103.
180. **Stutz F., M. Rosbash** (1998). "Nuclear RNA export." *Genes Dev* **12**(21): 3303-19.
181. **Sugimoto Y., I. Aksentijevich, et al.** (1995). "Retroviral coexpression of a multidrug resistance gene (MDR1) and human alpha-galactosidase A for gene therapy of Fabry disease." *Hum Gene Ther* **6**(7): 905-15.
182. **Sun J., D. R. Pilch, et al.** (1992). "The histone mRNA 3' end is required for localization of histone mRNA to polyribosomes." *Nucleic Acids Res* **20**(22): 6057-66.
183. **Tabernero C., A. S. Zolotukhin, et al.** (1996). "The posttranscriptional control element of the simian retrovirus type 1 forms an extensive RNA secondary structure necessary for its function." *J Virol* **70**(9): 5998-6011.
184. **Tang H., Y. Xu, et al.** (1997). "Identification and purification of cellular proteins that specifically interact with the RNA constitutive transport elements from retrovirus D." *Virology* **228**(2): 333-39.
185. **Thermann R., G. Neu-Yilik, et al.** (1998). "Binary specification of nonsense codons by splicing and cytoplasmic translation." *Embo J* **17**(12): 3484-94.
186. **Towbin H., T. Staehelin, et al.** (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(9): 4350-54.
187. **Vandendriessche T., M. K. Chuah, et al.** (1995). "Inhibition of clinical human immunodeficiency virus (HIV) type 1 isolates in primary CD4+ T lymphocytes by retroviral vectors expressing anti-HIV genes." *J Virol* **69**(7): 4045-52.
188. **Venter J. C., M. D. Adams, et al.** (2001). "The sequence of the human genome." *Science* **291**(5507): 1304-51.
189. **Vigna E., L. Naldini** (2000). "Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy." *J Gene Med* **2**(5): 308-16.
190. **Visa N., A. T. Alzhanova-Ericsson, et al.** (1996). "A pre-mRNA-binding protein accompanies the RNA from the gene through the nuclear pores and into polysomes." *Cell* **84**(2): 253-64.
191. **Wahlers A., M. Schwieger, et al.** (2001). "Influence of multiplicity of infection and protein stability on retroviral vector-mediated gene expression in hematopoietic cells." *Gene Therapy* **8**(6): 477-86.
192. **Wodrich H.** (1998). "Untersuchungen zur posttranskriptionellen Regulation der Retroviren." Dissertation. FB Biologie, Universität Hamburg.
193. **Wodrich H., J. Bohne, et al.** (2001a). "A new RNA element located in the coding region of a murine endogenous retrovirus can functionally replace the Rev/Rev-responsive element system in human immunodeficiency virus type 1 Gag expression." *J Virol* **75**(22): 10670-82.
194. **Wodrich H., H. G. Krausslich** (2001b). "Nucleocytoplasmic RNA transport in retroviral replication." *Res Probl Cell Differ* **34**: 197-217.
195. **Wodrich H., A. Schambach, et al.** (2000). "Multiple copies of the Mason-Pfizer monkey virus constitutive RNA transport element lead to enhanced HIV-1 Gag expression in a context-dependent manner." *Nucleic Acids Res* **28**(4): 901-10.
196. **Wu M., S. Chari, et al.** (1998). "Cis-Acting sequences required for simian foamy virus type 1 vectors." *J Virol* **72**(4): 3451-54.

197. **Yee J. K., A. Miyanohara, et al.** (1994). "A general method for the generation of high-titer, pantropic retroviral vectors: highly efficient infection of primary hepatocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(20): 9564-68.
198. **Yu X. M., G. W. Gelembiuk, et al.** (1991). "Expression from herpesvirus promoters does not relieve the intron requirement for cytoplasmic accumulation of human beta-globin mRNA." Nucleic Acids Res **19**(25): 7231-34.
199. **Zang W. Q., T. S. Benedict Yen** (1999). "Distinct export pathway utilized by the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element." Virology **259**(2): 299-304.
200. **Zenklusen D., F. Stutz** (2001). "Nuclear export of mRNA." FEBS Letters **498**: 150-156.
201. **Zennou V., C. Petit, et al.** (2000). "HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap." Cell **101**(2): 173-85.
202. **Zhou Z., M. J. Luo, et al.** (2000). "The protein Aly links pre-messenger-RNA splicing to nuclear export in metazoans." Nature **407**(6802): 401-05.
203. **Zolotukhin A. S., A. Valentin, et al.** (1994). "Continuous propagation of RRE(-) and Rev (-)RRE(-) human immunodeficiency virus type 1 molecular clones containing a cis-acting element of simian retrovirus type 1 in human peripheral blood lymphocytes." J Virol **68**(12): 7944-52.
204. **Zufferey R., J. E. Donello, et al.** (1999). "Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors." J Virol **73**(4): 2886-92.

G. Anhang

1. Danksagung

Diese Arbeit wurde von 1997-2001 am Hamburger Heinrich-Pette-Institut für experimentelle Virologie und Immunologie in der Abteilung für Zellbiologie und Virologie erstellt.

Herrn Prof. Hans-Georg Kräusslich möchte ich für die Themenstellung und die hervorragende Unterstützung als Doktorvater während dieser Zeit danken. Er war meinen experimentellen Ideen gegenüber immer aufgeschlossen, was sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Herrn Dr. Harald Wodrich danke ich für die thematische Begleitung der Doktorarbeit. Er hat mir nicht nur Einblicke in die biologische Sichtweise verschafft, sondern auch meine Begeisterung für virologische und zellbiologische Zusammenhänge geweckt und gefördert.

Herrn Prof. Christopher Baum habe ich für die große Hilfe beim vektorologischen Part dieser Arbeit zu danken.

Herrn Dr. Klaus Wiegers verdanke ich, dass ich nach Weggang meines Doktorvaters nach Heidelberg meine Experimente am Heinrich-Pette-Institut abschließen konnte.

Frau Dr. Daniela Paulsen und den Herren Dr. Matthias Dittmar, Dr. Ottmar Herchenroeder, Dr. Markus Hildinger, Dr. Jens Bohne und Uwe Tessmer danke ich für die Einarbeitung in zellbiologische und biochemische Techniken.

Besonderer Dank gebührt auch den Herren Prof. L. Naldini (Turin), Prof. R. Morgan (National Institute of Health, USA), Prof. F. Grosveld (Rotterdam), Dr. M. Dobbstein (Marburg), Dr. E. Hunter (Birmingham/USA), Dr. H. J. Hauser (Braunschweig), Prof. W. Ostertag und Prof. C. Baum (HPI) für die Überlassung von Plasmiden und Zelllinien.

Herr Dr. G. Rutter (Abteilung für Elektronenmikroskopie, HPI) war mir sehr hilfreich bei der Erstellung von elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

In dankbarer Erinnerung bleiben mir auch meine Kollegen Denis, Doreen, Jens, Jessica, Hormozd, Karen, Lars, Uwe und Christiane für die freundliche Unterstützung und viele nette Stunden innerhalb und außerhalb des Labors.

Besonderer Dank gilt auch meinen Eltern, die mich immer uneingeschränkt unterstützt haben.

2. Lebenslauf

Anschrift: Axel Schambach Tel.: 04185-2981
 Auf dem Brenneck 1 Fax: 04185-2851
 D-21220 Seevetal e-mail: axschamb@hotmail.com

Geboren: 27. August 1974 in Hamburg

Mutter: Dr. med. Ursula Schambach, Allgemeinmedizinerin in Seevetal

Vater: Kurt Schambach, Diplom-Volkswirt i. R.

Ausbildung

Jahr	Abschnitt	Ort	Abschluss
1981-85	Grundschule Ramelsloh	Seevetal	
1985-94	Alexander von Humboldt-Gymnasium	Hamburg	Abitur mit Durchschnittsnote 1,0 und den Hauptfächern Chemie und Physik
1992-95	Schulbegleitende Ausbildung zum CTA am Gymnasium Altona	Hamburg	Chem.-Techn. Assistent mit Note 1,2
1995-2001	Medizinstudium an der Universität	Hamburg	
Mrz 97	Ärztliche Vorprüfung		Note 2
Mrz 98	1. Staatsexamen		Note 2
Okt 98	USMLE Step I (1. USA Examen)		Bestanden
Sep 00	2. Staatsexamen		Note 2,0
Dez 01	3. Staatsexamen		Note 1
2002-03	Arzt im Praktikum, Kinderklinik (MHH)	Hannover	

Wissenschaftliche Tätigkeit

Zeitabschnitt	Institution	Ort	Abteilung
1994-97	UK Eppendorf	Hamburg	Fettstoffwechselforschung (Labor PD Ameis)
Mrz-Apr 1996	University of California	San Diego	Gentherapie, Immunologie (Labor Prof. Carson, Dr. Raz)
1997-2002	Heinrich-Pette-Institut für Virologie und Immunologie	Hamburg	Virologie und Zellbiologie
Mrz-Apr 2001	Scripps Research Institute (TSRI)	San Diego	Zellbiologie, Adenoviren (Labor Prof. Gerace)

Forschungsthemen

1994-97	Genetische Charakterisierung der lysosomalen sauren Lipase unter Herrn PD Dr. Detlev Ameis (UK Eppendorf, Hamburg)
1997-2003	Verbesserung von retroviralen Vektoren in der Gentherapie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Kräusslich und Herrn Prof. Dr. Christopher Baum (Heinrich-Pette-Institut Hamburg, ab Mrz 2002 Medizin. Hochschule Hannover)

Publikationen

1. „Different missense mutations in histidine-108 of lysosomal acid lipase cause cholesteryl ester storage disease in unrelated compound heterozygous and hemizygous individuals“ in Human Mutation **12**: 44-51 (1998) (Koautor).
2. „Multiple copies of the Mason-Pfizer monkey virus constitutive RNA transport element lead to enhanced HIV-1 Gag expression in a context dependent manner“, in Nucleic acids research **28**(4): 901-10 (2000) (Koautor).
3. „Context Dependence of different modules for Posttranscriptional Enhancement of Gene Expression from Retroviral Vectors“, in Molecular Therapy **2**(5): 435-45 (2000) (Erstautor).

Hamburg, den 20. Februar 2003

(Axel Schambach)

3. Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

(Axel Schambach)