

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.