

5 Zusammenfassung

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

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

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

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

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