

Regulation der foamy viralen Proteaseaktivität

Regulation of the foamy viral Protease Activity



Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der
Graduate School of Life Science,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse: Infektion und Immunität

Vorgelegt von

Ralf Spannaus

aus Halle a.d.S.

Würzburg, 2015

Eingereicht am: 25.02.2015

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Hünig

1. Betreuer: PD Dr. Jochen Bodem

2. Betreuer: Prof. Dr. Georg Krohne

3. Betreuerin: Prof. Dr. Birgitta Wöhr

Tag des Promotionskolloquiums: _____

Doktorurkunden ausgehändigt am: _____

Meiner Familie

Zusammenfassung

Alle Retroviren prozessieren ihre Pol- und Strukturproteine mit Hilfe der viralen Protease. In dieser Arbeit wurden zentrale Mechanismen der Regulation der foamyviralen Protease untersucht und charakterisiert. Dazu wurde eine chromatographische Virusreinigungsmethode entwickelt und die relative Pol- und Env-Enkapsidierung bestimmt. Foamyviren enthalten weniger Pol als andere Retroviren aber deutlich mehr Env als humane Immunodefizienzviren. Die Pol-Inkorporation könnte durch die limitierte Prozessierung mit nur einer einzigen Schnittstelle in Gag und Pol kompensiert werden. Deshalb wurde untersucht, ob die foamyvirale Protease ein beschränktes Schnittstellenrepertoire aufweist. In Zellkulturen sind die Schnittstellenpositionen P2' und P2 auf die Aminosäurereste Valin und Valin/Asparagin beschränkt. Demnach hat die foamyvirale Protease ein eingeschränkteres Schnittstellenrepertoire als die Protease des humanen Immunodefizienzvirus. Weiterhin wurde hier gezeigt, dass die vollständige reverse Transkription die Prozessierung von Gag voraussetzt und Proteaseaktivitäts-defiziente oder Gag-Schnittstellen-defiziente Viren keine vollständige cDNA bilden können. Demnach kompensieren Foamyviren die niedrige Proteasekonzentration, indem sie sicherstellen, dass die reverse Transkription erst nach der Gag-Maturation vollendet werden kann.

Weiterhin wird bei humanen Immunodefizienzviren durch die Gag-Maturation die essenzielle Mobilität der wenigen Env-Trimere auf der Hüllmembran getriggert. Die erstmals in dieser Arbeit bei Foamyviren quantifizierte Env-Menge ergab, dass Foamyviren 28 mal mehr Env- pro Gag-Molekül als humane Immunodefizienzviren besitzen. Wahrscheinlich dient dieser hohe Env-Gehalt der Kompensation der eingeschränkten Env-Mobilität, die durch die limitierte Gag-Prozessierung an nur einer carboxyterminalen Schnittstelle verursacht wird.

Da für die Aktivierung der foamyviralen Protease virale Ribonukleinsäure benötigt wird, wurde untersucht, welche Pol-Domänen für die Aktivierung der Protease benötigt werden. Im Gegensatz zur Integrase, deren Deletion in reduzierter Proteaseaktivität resultierte, war die funktionelle RNaseH-Domäne essenziell für die Gag-Prozessierung. Die Substitution der foamyviralen RNaseH durch RNaseH-Domänen von anderen Retroviren resultierte in genomunabhängiger Proteaseaktivität in Zellen und genomabhängiger Proteaseaktivität in den rekombinanten Viren. Demnach scheint die dimerstabilisierende Funktion der RNaseH durch direkte Protein-Protein-Interaktion oder durch unspezifische RNA-Bindung verursacht zu werden.

Summary

Retroviral Pol and structural proteins are processed by the viral protease. Here, central mechanisms of the foamy viral protease regulation were investigated and characterized. For determination of the relative Pol and Env encapsidation a novel chromatographic purification method was developed. In comparison with human immunodeficiency viruses, foamy viruses encapsidate less Pol but significantly more Env. Foamy viruses might compensate these low Pol amount by limiting Gag and Pol processing to a single cleavage site. I sought to investigate, whether a limited cleavage site repertoire of foamy viral protease might be a consequence of this restriction. In cell culture positions P2' and P2 within the cleavage sites are invariant and restricted to valine and valine/asparagine, supporting the conclusion that foamy viral protease cleavage at more specific sites than its human immunodeficiency viral counterpart. Secondly, I could show that complete foamy viral reverse transcription is dependent on Gag maturation, since viruses deficient in protease activity or with an inactive Gag cleavage site were incapable of producing cDNA beyond the first strong stop. Thus, low protease encapsidation is compensated by a delay of the reverse transcription until sufficient Gag maturation occurred.

The human immunodeficiency viral Gag processing triggers the mobility of the few Env trimmers on the viral membrane. This Env clustering was shown to be essential for infectivity. Here, foamy viral Env was quantified and found that foamy viruses incorporate 28 times more Env per Gag molecule than the human immunodeficiency viruses. It seems to be likely that these higher Env amounts are required to compensate for the lack of Env mobility due to the restricted Gag processing at a single site at the carboxyl terminus.

The dimerization and activation of the foamy viral protease depends on the binding of viral RNA and protein-protein interactions. Since the protease is active in the Pol and in the PRRT context the Pol domains essential for protease activity were mapped. While deletion of the integrase in context of recombinant viruses resulted in reduced protease activity further deletion of the RNase H domains abolished protease function. Substituting the RNase H domain with the RNase H of other retroviruses could restore protease activity even in the absence of viral RNA in cells, but not in viruses. Thus, the RNase H domains serve as protein-protein interaction domain or might dimerize the PRRT domains by binding to unspecific RNA.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	4
Summary.....	5
Inhaltsverzeichnis.....	6
1. Einleitung.....	9
1.1 Foamyviren.....	9
1.2 Aufbau foamyviraler Viruspartikel und des Provirus.....	9
1.3 Das Gag-Protein.....	10
1.4 Das Pol-Protein.....	11
1.4.1 Die Protease.....	12
1.4.2 Die reverse Transkriptase.....	15
1.5 Das Env-Protein.....	17
2. Material.....	18
2.1 Chemikalien.....	18
2.2 Enzyme.....	18
2.3 Bakterienstämme.....	18
2.4 Eukaryotische Zelllinien.....	18
2.5 Verwendete Kits.....	18
2.6 Größen- und Längenstandards.....	18
2.7 Antiseren und Antikörper.....	18
2.8 Plasmide.....	19
2.9 Chromatographiesäulen.....	19
2.10 Oligonuklotide.....	19
3. Methoden.....	22
3.1 Zellbiologische Methoden.....	22
3.1.1 Transfektion mit Turbofect.....	22
3.1.2 Kalziumphosphattransfektion.....	22
3.1.3 Polyethylenimin (PEI)-Transfektion.....	22
3.1.4 Infektiositätsbestimmung rekombinanter Viruspartikel.....	22
3.1.5 Herstellung der Zelllysate.....	23
3.1.6 Foamyviruskokultur.....	23
3.2 Virusreinigung.....	23
3.2.1 Reinigung rekombinanter Viren durch Größenausschlusschromatographie.....	23
3.2.2 Reinigung der Viruspartikel durch Dichtegradientenzentrifugation.....	24
3.2.3 Reinigung von Foamyviren durch Chromatographie.....	24

3.2.4 Reinigung von Foamyviren durch Anionenaustauschchromatographie	24
3.3 Westernblotanalysen und Proteinbestimmung.....	25
3.3.1 Westernblotanalyse	25
3.3.2 Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen	25
3.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration durch ein Bradfordreagenz	26
4. Ergebnisse.....	27
4.1 Charakterisierung der foamyviralen Viruskomposition	27
4.1.1 Die Säulenchromatographie resultierte in hochreinen foamyviralen Viruspartikeln.....	28
4.1.2 Reinigung foamyviraler Partikel durch Anionenaustauschchromatographie ...	31
4.1.3 Foamyviren enthalten weniger Pol-Proteine als Orthoretroviren.....	32
4.1.4 Foamyviren enthalten deutlich mehr Env-Proteine als Orthoretroviren	34
4.2 Analyse des Schnittstellenrepertoires der foamyviralen Protease	35
4.2.1 Die Gag p68/p3-Schnittstelle ist essenziell für die Bildung infektiöser Viren ...	36
4.2.2 Die Gag p68/p3- und die Pol RH/IN-Schnittstellen werden mit vergleichbarer Effizienz prozessiert	39
4.3 Infektiöse foamyvirale Viruspartikel enthalten unprozessierte Gag-Proteine	45
4.4 Die foamyvirale reverse Transkription wird durch die Gag-Maturation reguliert ...	48
4.5 Die Integrase ist nicht notwendig für die Proteaseaktivität	50
4.5.1 Das Fusionsprotein aus Protease und reverser Transkriptase in Kombination mit der genomischen RNA ist ausreichend für Proteaseaktivität <i>in vivo</i>	51
4.5.2 Die Integrase-deletion im proviralen Kontext resultierte in Gag-Prozessierung in den Viruspartikeln	52
4.5.3 Die Infektiosität von rekombinanten Viren mit GagPol-Fusion oder separat exprimierten Proteinen resultierte in annähernd gleichen Virustitern.....	53
4.5.4 Die GagPol-Fusion ermöglicht genomunabhängige Pol-Inkorporation	55
4.5.5 Vergleich der Proteaseaktivitäten von Pol- und PRRT-Proteinen in viralen Partikeln	56
4.5.6 Die <i>trans</i> -Komplementation der Proteaseaktivität resultierte in infektiösen rekombinanten Viren.....	57
4.6 Bedeutung der reversen Transkriptasedomäne für die Proteaseaktivität	59
4.6.1 Die funktionelle RNaseH-Domäne ist essenziell für die Proteaseaktivierung. ...	59
4.6.2 Die Substitution der funktionellen RNaseH-Domäne durch orthoretrovirale RNaseH-Domänen resultierte in Proteaseaktivität.....	63
5. Diskussion	67
5.1 Viruskomposition und chromatographische Reinigung von Foamyviren	67
5.2 Das Schnittstellenrepertoire der foamyviralen Protease	69

5.3 Die reverse Transkription wird durch die Gag-Prozessierung reguliert	74
5.4 Unprozessiertes Gag ist für optimale Infektiosität essenziell	76
5.5 Die Rolle der Pol-Domänen für die Proteaseaktivität	76
Literaturverzeichnis.....	79
Ursprung der Abbildungen	89
Eigene Publikationen	90
Abkürzungsverzeichnis.....	91
Curriculum Vitae.....	92
Eidesstattliche Erklärung/Affidavit.....	93
Danksagung	94

1. Einleitung

1.1 Foamyviren

Retroviridae sind eine in Mensch und Tier omnipräsente Virusfamilie, deren erste Vertreter Anfang des 20. Jahrhunderts in Filtraten aus Geflügelsarkomen nachgewiesen wurden (Ellermann and Bang, 1908; Rous, 1911). Der namensgebende Schritt im Replikationszyklus ist die reverse Transkription des RNA-Genoms in die provirale DNA (Baltimore, 1970; Temin and Mizutani, 1970). Durch die Integrase (IN) wird diese stabil in das Wirtsgenom integriert (Brown et al., 1987; Kulkosky and Skalka, 1994).

Foamyviren wurden erstmals Mitte des 20. Jahrhunderts beschrieben (Enders and Peebles, 1954). In Affennierenzellkulturen wurde ein „virusähnliches Agens“ identifiziert, welches einen zytopathischen Effekt auslöste (Rustigian et al., 1955). Das für die Synzytienbildung typische schaumige Erscheinungsbild wurde namensgebend für die Foamy- („foam“ = Schaum) oder auch Spumaviren (Achong et al., 1971). Die Gattung der Foamyviren ist der einzige Vertreter in der Unterfamilie der Spumaretroviren, die zusammen mit den Orthoretroviren die Familie der *Retroviridae* bildet. Wirtsspezifische Arten wurden in nahezu allen Primaten mit einer Prävalenz von bis zu 100% nachgewiesen (Hooks et al., 1972; Hooks and Gibbs, 1975; Johnston, 1961; Johnston, 1971; Rogers et al., 1967; Rustigian et al., 1955; Stiles, 1968). Auch in Nichtprimaten wie Pferden (EFV – Prävalenz ca. 15% (Materniak and Kuzmak, 2012; Tobaly-Tapiero et al., 2000)), Rindern (BFV – Prävalenz 40-85% (Hechler et al., 2012; Jacobs et al., 1995; Johnson et al., 1988; Malmquist et al., 1969; Pamba et al., 1999)) und Katzen (FFV – Prävalenz 33-76% (Bandeccchi et al., 1992; Hackett et al., 1970; Nakamura et al., 2000; Winkler et al., 1999)) wurden Foamyviren beschrieben. Das ursprünglich als humanes Foamyvirus bezeichnete prototypische Foamyvirus (PFV) wurde 1971 aus Nasopharynxkarzinomzellen eines kenianischen Patienten isoliert (Achong et al., 1971).

1.2 Aufbau foamyviraler Viruspartikel und des Provirus

Foamyvirale Partikel haben einen Durchmesser von etwa 100nm (Wilk et al., 2001), in deren Hüllmembran zahlreiche Env-Trimere verankert sind (Wilk et al., 2000). Das Kapsid wird von Gag-Proteinen gebildet und umschließt die Pol-Proteine und das virale Genom. Im Gegensatz zu Orthoretroviren enthalten foamyvirale Partikel neben RNA auch doppelsträngige DNA, da die reverse Transkription bereits spät im Replikationszyklus direkt nach der Kapsidassemblierung beginnt (Moebes et al., 1997; Yu et al., 1999). Im proviralen Genom sind die kanonisch angeordneten offenen Leseraster (ORF - „open reading frame“) der Gene *gag*, *pol* und *env* flankiert von den langen terminalen Repetitionen (LTR - „long terminal repeats“)(Abbildung 1.1). Am LTR-Promotor wird die Transkription der genomischen RNA initiiert, wobei die

spezifischen mRNAs für die Expression der Pol- und Env-Proteine durch Spleißen der genomischen RNA generiert werden (Bodem et al., 1997; Bodem et al., 1996; Holzschu et al., 1998; Jordan et al., 1996; Löchelt and Flügel, 1996; Muranyi and Flügel, 1991; Yu et al., 1996a).

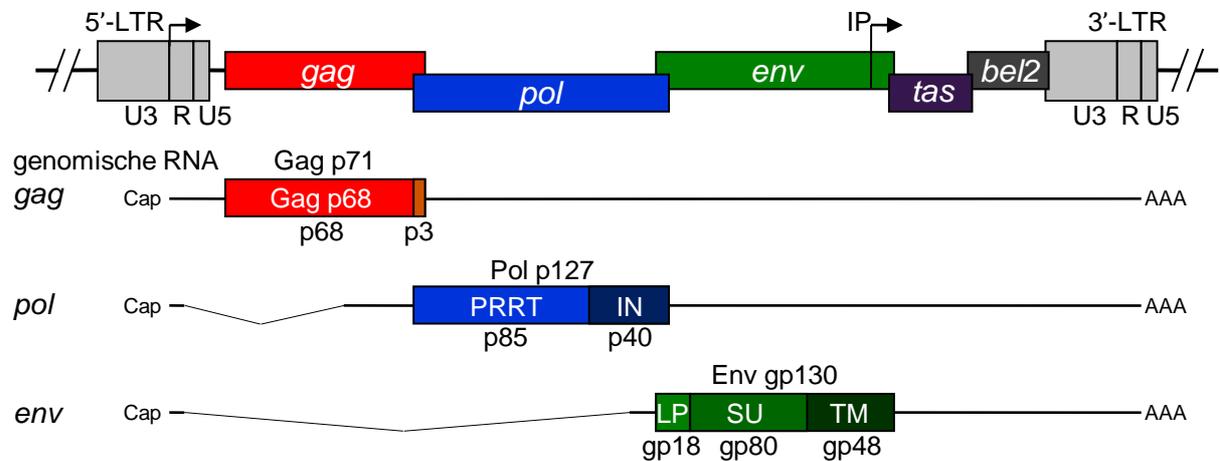


Abbildung 1.1: Die foamyvirale DNA und die Transkriptionsprodukte des LTR-Promotors. Schematische Darstellung eines integrierten Provirus, der von der genomischen DNA durch die flankierenden LTRs abgegrenzt ist. Die Gene *gag*, *pol*, *env*, *tas* und *bel2* sind durch farbige Balken dargestellt. Die Transkripte des LTR-Promotors sind unter dem proviralen Genom dargestellt. Die Molekulargewichte (in kDa) der Proteine und deren Spaltprodukte sind angegeben. PRRT: Fusionsprotein aus Protease (PR) und reverser Transkriptase (RT); IN: Integrase; LP: „Leaderpeptid“; SU: Oberflächenuntereinheit; TM: Transmembranuntereinheit

1.3 Das Gag-Protein

Der N-Terminus des Gag-Proteins (AS 4-19) ist für die Env-Interaktion und die Virusfreisetzung essenziell (Cartellieri et al., 2005b). Die Struktur der dimeren N-terminalen Domäne besteht aus dicht gepackten α -Helices und β -Faltblättern und einer großen zentralen Doppelwendelstruktur mit drei Leucin-Zipper Domänen und dem Interaktionsmotiv (AS 130-150), welches für die Gag-Dimerisierung unverzichtbar ist (Goldstone et al., 2013; Tobaly-Tapiero et al., 2001). In der zentralen Region des Gag-Proteins wurde ein konserviertes YXXLGL-Motiv identifiziert, welches für die weitere Polymerisierung des Kapsids benötigt wird (Mannigel et al., 2007).

Die cystein- und histidinreichen Motive, die in Orthoretroviren für die Genominkorporation benötigt werden, wurden im foamyviralen Gag-Protein nicht gefunden. Stattdessen wurden im C-Terminus des PFV-Gag-Proteins drei glycin- und argininreiche Motive (GR-Box I-III) identifiziert, die sowohl DNA und RNA binden als auch für die Pol-Interaktion verantwortlich sind (Hamann et al., 2014; Lee and Linial, 2008; Schliephake and Rethwilm, 1994; Yu et al., 1996b). Die GR-Box II ist für die Kernlokalisierung der Gag-Proteine verantwortlich, die jedoch nicht essenziell für die Bildung infektiöser Viren ist (Müllers et al., 2011a; Yu et al., 1996b). Hingegen werden wie beim Mason-Pfizer Affenvirus (MPMV) die Gag-Proteine im Zytoplasma durch ein zytoplasmatisches Targeting-Retentionssignal (CTRS - „cytoplasmic targeting-

retention signal“) in die Nähe des Zentrosoms geleitet, wo die Assemblierung des Kapsids erfolgt (Cartellieri et al., 2005a; Choi et al., 1999; Rhee and Hunter, 1990; Sakalian and Hunter, 1999; Yu et al., 2006). Die Deletion des CTRS verhindert die Kapsidassemblierung vollständig (Eastman and Linial, 2001). MPMV besitzt hingegen eine Myristoylierungsstelle im Gag-Protein, wodurch nach Deletion des CTRS die Kapside an der Zytoplasmamembran assemblieren (Choi et al., 1999; Rhee and Hunter, 1990; Sakalian and Hunter, 1999).

Im Gegensatz zu Orthoretroviren wird das 71 kDa große PFV Gag-Protein nicht in Matrix, Kapsid und Nukleokapsid prozessiert, sondern durch die virale Protease (PR) in das Gag p68-Protein und ein 3kDa großes Peptid (p3) geschnitten (Konvalinka et al., 1995a). Diese Prozessierung ist essenziell für die Bildung infektiöser Viren (Baldwin and Linial, 1999; Enssle et al., 1997; Hütter et al., 2013; Lehmann-Che et al., 2005; Zemba et al., 1998), obwohl das p3-Peptid selbst nicht essenziell für die Infektiosität ist (Enssle et al., 1997; Hütter et al., 2013; Stenbak and Linial, 2004; Zemba et al., 1998). Neben der p68/p3 Schnittstelle wurden drei weitere PR-Schnittstellen im Gag-Protein in *in vitro*-Experimenten beschrieben (Tabelle 1.1)(Pfrepper et al., 1999), von denen jedoch nur für die Prozessierung nach Aminosäure 311 (p33/p5-Schnittstelle nach Pfrepper et al., 1999) im Gag-Protein eine Funktion *in vivo* gezeigt wurde. Im Vergleich zur Gag p68/p3-Schnittstelle wird diese mit bedeutend geringerer Effizienz prozessiert und ist für die Disassemblierung des foamyviralen Kapsids von Bedeutung (Lehmann-Che et al., 2005; Pfrepper et al., 1999). Bei HIV wird das Gag-Protein an fünf verschiedenen Schnittstellen durch die virale PR prozessiert, was in fundamentalen Veränderungen der Virusstruktur resultiert (Coffin et al., 1997; Sundquist and Kräusslich, 2012). Aufgrund des einzelnen Prozessierungsschrittes der foamyviralen Gag-Proteine ist die strukturelle Umordnung während der Virusreifung weniger ausgeprägt (Konvalinka et al., 1995a). Im Gegensatz zu HIV-1 enthalten infektiöse und maturaire Foamyviren nicht nur vollständig prozessierte Gag-Proteine sondern Gag p71 und Gag p68 im Verhältnis von 1:4,2 (Cartellieri et al., 2005a).

1.4 Das Pol-Protein

Im Gegensatz zu Orthoretroviren wird Pol nicht als GagPol-Fusionsprotein exprimiert sondern separat von einem *pol*-spezifischen Transkript translatiert, welches durch Spleißen vom Hauptspleißdonor auf einen Spleißakzeptor am 3'-Ende des *gag*-Leserasters generiert wird (Bodem et al., 1996; Yu et al., 1996a). Das 127kDa große PFV-Pol-Protein besteht aus der PR-, der reversen Transkriptase- (RT) und der IN-Domäne. Es wurde vermutet, dass ähnlich wie bei Orthoretroviren das foamyvirale Pol-Protein in die funktionellen Domänen prozessiert wird (Netzer et al., 1993). Durch Analysen der autokatalytischen Prozessierungsprodukte von bakteriell exprimierten Pol-Proteinen wurden drei potenzielle PR-Schnittstellen identifiziert (Pfrepper et al., 1998), jedoch scheint die Prozessierung *in vivo* einzig auf die RT/IN-

Schnittstelle beschränkt zu sein (Tabelle 1.1)(Löchelt and Flügel, 1996). Die einzigen Spaltprodukte, die in Zell- und Viruslysaten nachgewiesen werden können, sind das 85kDa große PRRT-Protein und die 40kDa große Integrase (Löchelt and Flügel, 1996; Pahl and Flügel, 1993). Trotz Deletion der Pol RH/IN-Schnittstelle bleiben PR und RT aktiv, während die Infektiosität der Viruspartikel reduziert ist (Roy and Linial, 2007), so dass im Gegensatz zur Gag-Maturation die Pol-Prozessierung nicht essenziell zu sein scheint. Auch im Kontext des foamyviralen Vektorsystems wurde gezeigt, dass die Pol-Prozessierung nicht zwingend für die PR- und RT-Aktivität benötigt wird (Hütter et al., 2013). Jedoch war die Infektiosität der Wildtypfoamyviren mit Deletion der RH/IN-Schnittstelle nach mehreren Infektionsrunden nicht mehr nachweisbar (Roy and Linial, 2007), was suggeriert, dass die Pol-Prozessierung für eine effiziente Integration benötigt wird.

Die Pol-Proteine werden ungespalten in die Viruspartikel inkorporiert (Heinkelein et al., 2002a; Peters et al., 2005). Wie bei Foamyviren wird auch in Hepadnaviren das P-Protein unabhängig vom Strukturprotein exprimiert (Chang et al., 1989; Schlicht and Schaller, 1989), wobei durch die Bindung der Proteine an das virale RNA-Element Epsilon die Kapsidassemblierung von Hepatitis-B-Viren initiiert wird (Bartenschlager and Schaller, 1992). Bei Foamyviren binden die Pol-Proteine an die genomische RNA, die wiederum durch Gag-Proteine inkorporiert wird (Heinkelein et al., 2002b; Peters et al., 2005). Jedoch wurde gezeigt, dass durch Mutationen in der GR-Box I des Gag-Proteins die Pol-Protein- aber nicht die Genominkorporation verhindert wird, was eine zusätzliche Gag-Pol-Proteininteraktion für die Pol-Inkorporation nahelegt (Lee and Linial, 2008).

1.4.1 Die Protease

Retrovirale PRs gehören zur Familie der Aspartatproteasen, deren aktive Form symmetrische Homodimere sind (Katoh et al., 1989; Katoh et al., 1987; Miller et al., 1989; Navia et al., 1989; Pearl and Taylor, 1987). Wie bei den Orthoretroviren ist auch bei Foamyviren die aktive PR für die Infektiosität essenziell (Konvalinka et al., 1995a). Die Sekundärstrukturen aller retroviraler PRs passen auf das Strukturmodell, welches zuerst zur Beschreibung nichtviraler Aspartatproteasen diente (Andreeva, 1991). Diesem Modell entsprechend sind die Strukturen retroviraler PR-Monomere trotz unterschiedlicher Aminosäuresequenzen sehr ähnlich (Jaskolski et al., 1990; Wlodawer and Gustchina, 2000; Wlodawer et al., 1989). Sie sind durch vier Strukturelemente charakterisiert, und zwar eine Haarnadelkurve (beinhaltet die A1 Kurve), eine weite Schleife (B1), eine α -Helix und eine zweite weite Schleife (D1). Die flexible β -Schleife D1 wird auch als Klappe (engl.: flap) bezeichnet und ist funktionell essenziell für die Substratbindung (Gustchina and Weber, 1990). Das aktive Zentrum retroviraler PRs wird durch zwei Aspartat-Threonin/Serin-Glycin/Glutamin (D-T/S-G/Q)-Motive gebildet, je eins in den B1-

Schleifen der PR-Hälften (Coffin et al., 1997; Winkler et al., 1997; Wlodawer et al., 1989). Bei HIV-1 sind die Threoninreste an der Interaktion der beiden PR-Hälften beteiligt (sogenannter „fireman’s grip“), die für die Dimerisierung und die Positionierung der Aspartatreste im aktiven Zentrum benötigt werden (Ingr et al., 2003). Wie auch beim Rous Sarkomvirus ist das aktive Zentrum der PFV-PR ein Aspartat-Serin-Glycin-Motiv, bei dem wahrscheinlich der Serinrest funktionell den Threoninrest ersetzt (Konvalinka et al., 1995a). Die Substitution des Threonins zu Serin im aktiven Zentrum der HIV-PR resultierte jedoch in reduzierter PR-Aktivität durch Destabilisierung des PR-Dimers (Ingr et al., 2003; Konvalinka et al., 1995b).

Der offensichtliche strukturelle Unterschied zwischen der foamyviralen PR-Domäne und der HIV-1-PR sind die unstrukturierten N- und C-Termini (Abbildung 1.2)(Hartl et al., 2008), ähnlich zur monomeren HIV-1-PR mit Substitution des Arginin in Position 87 durch Lysin (Ishima et al., 2001). Bei orthoretroviralen PRs wird die Dimerisierung neben den Kontakten durch die Klappenregionen und im aktiven Zentrum besonders durch die viersträngige β -Faltblattstruktur (=„dimer interface“) der N- und C-Termini ermöglicht (Abbildung 1.2).

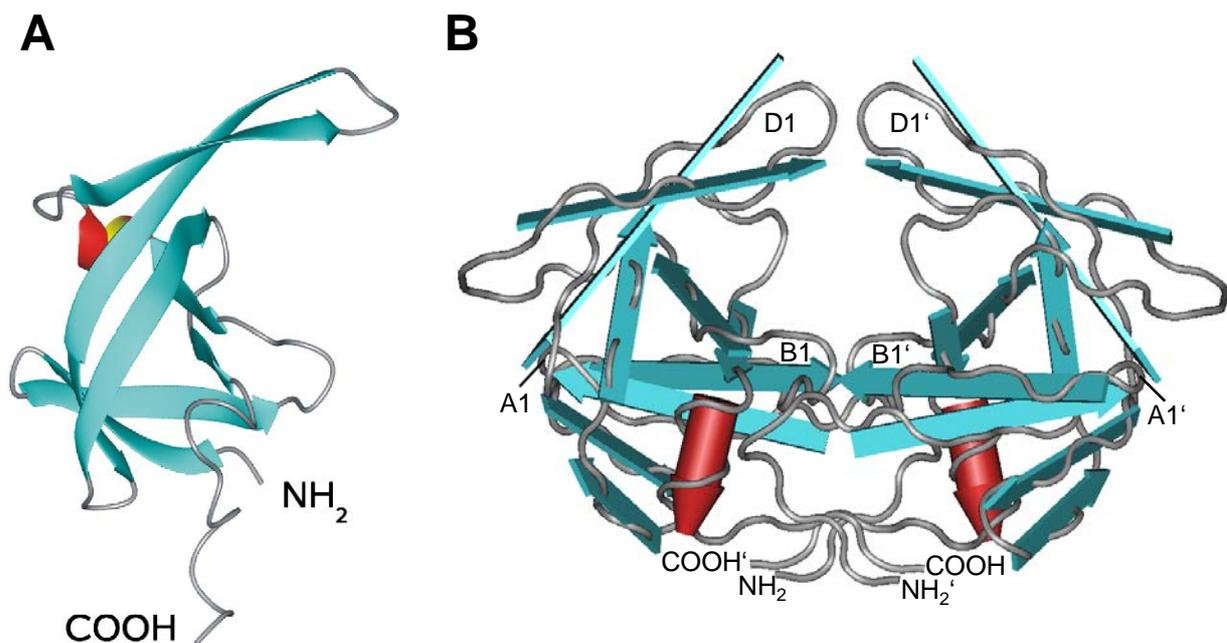


Abbildung 1.2 Strukturen retroviraler Proteasen. (A) Foamyvirales PR-Monomer am Beispiel von SFV_{mac} (Hartl et al., 2008 - mit Genehmigung von Elsevier) (B) HIV-1 PR-Dimer in offener Konformation mit Kennzeichnungen der A1-Kurven (A1), der B1-Schleifen (B1), der D1-Schleifen (D1) und der C-(COOH) und N-Termini (NH₂). rot: α -Helix; blau: β -Faltblätter (Martin et al., 2005; PDB ID: 1TW7; MMDB ID: 34066).

Essenziell für die Positionierung des C-terminalen β -Faltblattes und somit für die Formation des HIV-1 „dimer interface“ ist die Interaktion des Arginins 87 mit dem Aspartat in Position 29 (Ishima et al., 2001; Louis et al., 2003). In der foamyviralen PR wurde solch eine intramolekulare Interaktion nicht nachgewiesen (Hartl et al., 2008). Auch die Mason-Pfizer Affenvirus (MPMV)

PR liegt in wässriger Lösung als Monomer vor (Veverka et al., 2001; Veverka et al., 2003). Hier wird vermutet, dass die Aktivierung durch eine intramolekulare Disulfid-Brückenbindung zwischen einem N-terminalen und einem C-terminalen Cystein ermöglicht wird (Zabranska et al., 2007). In der foamyviralen PR-Domäne sind jedoch keine Cysteine im C- oder N-Terminus lokalisiert. Die foamyvirale PR ist nur unter unphysiologisch hoher Salzkonzentration *in vitro* aktiv (Fenyőfalvi et al., 1999; Hartl et al., 2008; Pfrepper et al., 1997). Erst in Gegenwart der viralen RNA mit dem spezifischen PR-aktivierenden RNA-Motiv (PARM - „protease-activating RNA motif“), welches am Ende des *pol*-Gens lokalisiert ist, wird die PR im Kontext des PPRT-Fusionsproteins aktiv (Hartl et al., 2010b). Kürzlich wurde publiziert, dass die IN-Domäne *in vivo* für die Pol-Dimerisierung und die Aktivierung der foamyviralen PR benötigt wird (Lee et al., 2011). Da die IN Dimere bildet und sogar als Tetramer im Integrationskomplex vorliegt (Gupta et al., 2012a; Hare et al., 2010), ist eine PR-Multimerisierung auf diesem Weg denkbar.

Tabelle 1.1: Aminosäuresequenzen der viralen PR-Schnittstellen in den Gag- und Pol- bzw. GagPol-Proteinen von HIV-1 Subtyp B (A) und PFV (B).

A		B	
HIV-1 (Subtyp B) ^a		PFV ^b	
MA/CA	VSQNY/PIVQN	p33/p5	QHIR/SVTG
CA/p2	KARVL/AEAMS	p68/p3	RAVN/TVTQ
p2/NC	PATIM/IQKGN	RH/IN	YVVN/CNTK
NC/p1	ERQAN/FLGKI		
p1/p6	RPGNF/LQSRP		
p6Pol/PR	VSFSF/PQITL		
PR/RTp51	CTLNF/PISPI		
RT/RTp66	GAETF/YVDGA		
RT/IN	IRKVL/FLDGI		

a: HIV-1 Subtype B PR-Schnittstellen
(modifiziert nach Kozisek et al., 2012)

b: *In vivo* verifizierte Schnittstellen der foamyviralen PR (Konvalinka et al., 1995a; Löchelt and Flügel, 1996; Pfrepper et al., 1998; Pfrepper et al., 1999). **fett:** die identischen Positionen der Gag p68/p3- und der Pol RH/IN-Schnittstellen

Die HIV-1 Maturation ist ein geordneter, mehrstufiger Prozess, der durch die sehr unterschiedlichen Prozessierungseffizienzen der PR-Schnittstellen reguliert wird (Pettit et al., 2005a; Pettit et al., 2004; Pettit et al., 2005b; Pettit et al., 1994; Wiegers et al., 1998). Die fünf Gag-Schnittstellen können in drei verschiedene Kategorien eingeordnet werden, und zwar hohe (p2/NC), mittlere (p1/p6 und MA/CA) und niedrige (NC/p1 und CA/p2) Prozessierungseffizienz (Pettit et al., 1994). Im Gegensatz zu HIV-1 scheint die foamyvirale Gag- und Pol-Prozessierung auf zwei Gag- und eine Pol-Schnittstelle limitiert zu sein. Beim Vergleich der Sequenzen der Gag p68/p3- und der Pol-RH/IN-Schnittstellen fällt eine Sequenzübereinstimmung in drei Positionen auf (Tabelle 1.1). Bei HIV-1 sind maximal zwei gleiche Positionen beim Vergleich

zweier Schnittstellen zu finden (Tabelle 1.1, p6Pol/PR und PR/RTp51). Diese größere Sequenzhomologie der foamyviralen PR-Schnittstellen suggeriert eine höhere Substratspezifität der foamyviralen PR. Des Weiteren ist unklar, ob - wie in den *in vitro*-Experimenten gezeigt - die Kombination von PRRT-Fusionsproteinen und viraler RNA für PR-Aktivität ausreicht oder ob die PR nur im Kontext des Pol-Proteins aktiv ist (Hartl et al., 2010b; Lee et al., 2011). Möglicherweise sind auch Teile der RH- oder sogar der restlichen RT-Domäne ohne Verlust der PR-Aktivität deletierbar.

1.4.2 Die reverse Transkriptase

Die N-terminale Domäne retroviraler RTs hat die enzymatischen Aktivitäten einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase für die Erststrangsynthese und einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase für die Zweitstrangsynthese. Die RH-Domäne im C-Terminus der RT-Domäne ist eine RNA-Endonuklease, die den RNA-Anteil des RNA-DNA-Hybrids hydrolysiert. Für den ersten Schritt der Erststrangsynthese fungiert bei Retroviren eine zelluläre t-RNA als Primer, die an die Primerbindestelle bindet (Harada et al., 1975; Peters et al., 1977; Rhim et al., 1991; Sawyer and Dahlberg, 1973). Bei PFV dienen die Lys1,2-t-RNAs als Primer für die RT-Reaktion (Abbildung 1.3)(Maurer et al., 1988).

Das PRRT-Fusionsprotein ist wahrscheinlich die aktive Form der foamyviralen RT, da die Substitution von Aminosäuren in der RH/IN-Schnittstelle zur Reduktion der RT-Aktivität führt (Roy and Linial, 2007). Jedoch wurde im Kontext des foamyviralen Vektorsystems RT-Aktivität auch in einem GagPol-Fusionsprotein nachgewiesen (Swiersy et al., 2011). Wie beim Moloney-Mausleukämievirus (MoMLV) und beim Friend-Mausleukämievirus ist die aktive Form der foamyviralen RT wahrscheinlich ein Monomer (Hartl et al., 2010a; Moelling, 1974; Verma, 1975), während andere retrovirale RTs meistens als Heterodimere katalytisch aktiv sind (di Marzo Veronese et al., 1986; Golomb and Grandgenett, 1979). Trotz des verschiedenen Aufbaus retroviraler RTs ist die Funktion bei allen Retroviren sehr ähnlich. In Analysen der Polymeraseaktivität in *in vitro*-Experimenten wurde gezeigt, dass im Vergleich zu anderen retroviralen RT Proteinen die foamyvirale RT eine höhere Prozessivität aufweist und eine niedrigere Affinität zu dNTPs besitzt (Hartl et al., 2010a; Rinke et al., 2002).

Im ersten Schritt der Erststrangsynthese wird das 5'-Ende der viralen RNA in die sogenannte „strong stop“-DNA negativer Orientierung revers transkribiert (Abbildung 1.3). Während der Polymerisation wird der RNA-Anteil des RNA-DNA-Hybrids von der RH-Domäne hydrolysiert, wobei die t-RNA am 5'-Ende der neusynthetisierten einzelsträngigen DNA erhalten bleibt. Diese DNA entspricht der späteren RU5-Region der proviralen 3'-LTR und dient anschließend als Primer für den zweiten Schritt der Erststrangsynthese, indem die R-Region komplementär an das 3'-Ende der genomischen RNA bindet, was als erster Matrizenwechsel bezeichnet wird

(Abbildung 1.3). Ausgehend von diesem DNA-Primer wird die RNA-Matrize bis zum 5'-Ende revers transkribiert. Mit Ausnahme des Polypurintrakts (PPT, engl.: poly purin tract) wird der RNA-Strang von der RH-Domäne abgebaut (Abbildung 1.3). Der PPT dient im folgenden Schritt als Primer für die Polymerisation der „strong-stop“-DNA in positiver Orientierung (Abbildung 1.3).

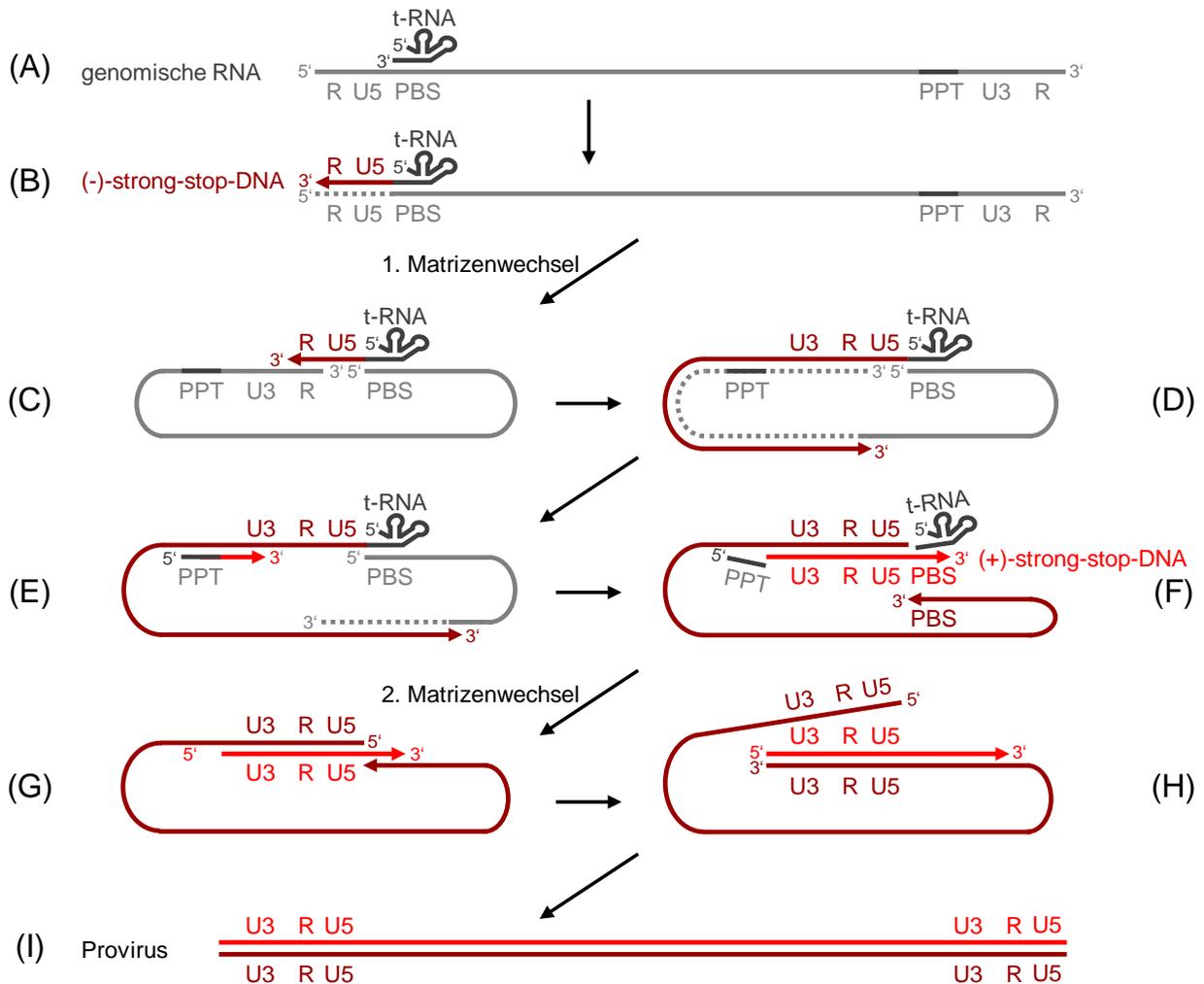


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der reversen Transkription eines retroviralen RNA-Genoms. hellgrau: genomische RNA; dunkelgrau: t-RNA und Polypurintrakt (PPT - polypurine tract); dunkelrot: komplementäre DNA in negativer Orientierung; hellrot: komplementäre DNA in positiver Orientierung **(A)** Bindung des Lys1,2-t-RNA-Primers an der Primerbindestelle **(B)** Reverse Transkription der „strong-stop“-DNA in negativer Orientierung und Abbau der RNA-Matrize durch die RH-Domäne. **(C)** Erster Matrizenwechsel durch die komplementäre Bindung der „strong-stop“ DNA an das 3'-Ende der genomischen RNA. **(D)** Während der RT-Reaktion bis zum 5'-Ende der RNA-Matrize wird die RNA bis auf den PPT durch die RH-Domäne abgebaut. **(E)** Der PPT dient als Primer für die Synthese der „strong-stop“-DNA in positiver Orientierung. **(F)** Die Synthese endet nach der reversen Transkription des t-RNA-Primers. Während dieses Schrittes werden PPT-RNA und t-RNA durch die Endonukleasfunktion der RH-Domäne abgespalten. **(G)** Das 3' Ende der „strong-stop“-DNA in positiver Orientierung bindet komplementär an das 3'-Ende des negativ orientierten Erststrangs. **(H)** Ausgehend vom DNA-DNA-Hybrid im Bereich der Primerbindestelle werden beide Stränge bis zum Ende polymerisiert. **(I)** Das Produkt: die provirale doppelsträngige DNA; (Abbildung modifiziert nach Flint et al., 2009)

Nachdem die Primerbindestellensequenz der t-RNA am 5'-Ende der DNA in negativer Orientierung revers transkribiert worden ist, endet die Synthese und der t-RNA- und der PPT-RNA-Primer werden durch die Endonukleasefunktion der RH-Domäne abgespalten (Abbildung 1.3). Die komplementäre Hybridisierung des 3'-Endes der „strong-stop“-DNA in positiver Orientierung mit dem 3'-Ende des negativ orientierten Erststrangs wird als zweiter Matrizenwechsel bezeichnet (Abbildung 1.3). Ausgehend von diesem DNA-DNA-Hybrid im Bereich der Primerbindestelle werden anschließend beide DNA-Stränge bis zum Ende polymerisiert, was in der proviralen doppelsträngigen DNA mit zwei kompletten LTRs resultiert (Abbildung 1.3).

1.5 Das Env-Protein

Durch die Bindung viraler Env-Glykoproteine an Oberflächenrezeptoren wird die Aufnahme von umhüllten Viren in die Wirtszelle initiiert. Die dadurch ausgelösten Konformationsänderungen der Env-Proteine resultieren in der Fusion von Zell- und Virusmembran und der Aufnahme des kapsidumhüllten viralen Genoms (Dimitrov, 2004). Heparin wurde als Adhäsionsmolekül für PFV identifiziert (Nasimuzzaman and Persons, 2012; Plochmann et al., 2012). Nach dem Viruseintritt in die Zielzelle wird durch pH-abhängige Fusion von Virus- und Zellmembran das Kapsid in das Zytoplasma freigesetzt (Picard-Maureau et al., 2003). Im Gegensatz zu Env-Proteinen von anderen Retroviren wird bei Foamyviren nach der Translation in das raue endoplasmatische Retikulum der N-Terminus von Env nicht durch den zellulären Signalpeptidase-Komplex abgespalten (Duda et al., 2004). Da die N- und C-Termini auf der zytoplasmatischen Seite lokalisiert sind, haben die Env-Proteine in diesem Stadium die Type-III Membrantopologie (Geiselhart et al., 2003; Lindemann et al., 2001; Wilk et al., 2001). Die Env-Proteine werden glykosyliert und durch furinähnliche PRs prozessiert (Duda et al., 2004; Geiselhart et al., 2004; Lindemann et al., 2001). Die Prozessierung resultiert in den drei Untereinheiten des Env-Proteins, dem N-terminalen Polypeptid gp18 mit Typ-II Membrantopologie, der C-terminalen Transmembranuntereinheit mit Typ-II Membrantopologie und der zentralen Oberflächenuntereinheit die auf der luminalen Seite mit den beiden anderen Untereinheiten assoziiert ist (Lindemann et al., 2001). Die Interaktion des Polypeptids gp18 mit den Gag-Proteinen ist für die Knospung und Freisetzung der Viruspartikel essenziell (Lindemann et al., 2001; Wilk et al., 2001). Ohne Env-Proteine verbleiben foamyvirale Kapside im Zytoplasma und werden nicht als virusähnliche Partikel freigesetzt (Fischer et al., 1998). Die große Anzahl von Env-Trimeren in der foamyviralen Membran steht im direkten Kontrast zu den Lentiviren, die nur sehr wenige Env-Moleküle (ca. 7-8 Trimere bei HIV-1) in der Membran aufweisen (Chertova et al., 2002; Chojnacki et al., 2012; Wilk et al., 2001; Wilk et al., 2000; Zhu et al., 2003).

2. Material

2.1 Chemikalien

Sofern nicht angegeben wurden die verwendeten Chemikalien von Sigma-Aldrich, Carl Roth, Roche, Gibco oder Appllichem bezogen.

2.2 Enzyme

Alle Enzyme wurden von den Firmen Sigma Aldrich, Thermo Scientific, Promega oder New England Biolabs bezogen.

2.3 Bakterienstämme

Escherichia coli TOP10 (Invitrogen)

2.4 Eukaryotische Zelllinien

HEK 293T-Zellen Humane embryonale Nierenzellen, transduziert mit SV40, exprimieren stabil das große SV40 T-Antigen (ATCC: CRL-11268; DuBridge et al., 1987).

BHK-LL-LacZ-Zellen Baby Hamster Nierenzelllinie, Indikatorzelllinie, exprimiert das Enzym β -Galaktosidase durch den foamyviralen LTR Promotor (Yu and Linial, 1993)

HT1080-Zellen humane Fibrosarkomazelllinie (ATCC:CVCL-121; Rasheed et al., 1974)

2.5 Verwendete Kits

BigDyeR Terminator v.1.1 Sequenzing Kit (Applied Biosystems); GenElute™ HP Plasmid Midiprep Kit (Sigma Aldrich); NucleoBond® Xtra Midi (Meacherey-Nagel); PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega); GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich); GenElute™ Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich); Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific), WesternBright Quantum HRP Substrat (Advansta); ECL Western Blotting Substrate (Promega); Turbofect® *in vitro* Transfection Reagent (Fermentas)

2.6 Größen- und Längenstandards

GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific); GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Thermo Scientific); PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific); Prestained Molecular Weight Marker (Sigma Aldrich)

2.7 Antiseren und Antikörper

Maus anti-PFV-Gag-Antikörper (SGG1)(Heinkelein et al., 2002b); Maus anti-PFV-PRRT-Antikörper (15E10)(Imrich et al., 2000); Maus anti-PFV-SU-Antikörper (P3E10)(Duda et al.,

2004; Yu et al., 2006); Kaninchen anti-PFV-IN-Antiserum (Pahl and Flügel, 1995); Kaninchen anti-GAPDH-Antiserum (Sigma Aldrich); Kaninchen anti-GFP-Antiserum (Sigma Aldrich); HRP-konjugierte Ziege anti-Maus-Antikörper (Jackson); HRP-konjugierte Esel anti-Kaninchen-Antikörper (Jackson)

2.8 Plasmide

pHSRV13 (Löchelt et al., 1991); pMD9 (Heinkelein et al., 2002b); pcoPG4 (Stirnnagel et al., 2010); pcoPP (Hartl et al., 2011); pcoPE (Müllers et al., 2011b); pNL4-3 (Adachi et al., 1986); pcAMS (Miller and Buttimore, 1986); peGFP-C1 (Clontech); pUC19 (Life Technologies); pcDNA3.1+ (Life Technologies)

2.9 Chromatographiesäulen

HiScreen Capto Core 700 (GE Healthcare); HiTrap Capto Core 700 (GE-Healthcare); HiTrap Heparin Sepharose High Performance (GE Healthcare); UNOsphere Q (Bio-Rad)

2.10 Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'→3')
A619Ga	GTCACGGTGTTCACCTCTGCTGTCGCCGGCTCC
A619Gs	GCGACAGCAGAGGAGTGAACACCGTGACCCAGAGCG
AflIIs	ATGGAAGACTTAAGGCAGCGGC
C752Ga	TTCTTGGTGTTCGCCGTTACCCACGTAGGAGCCCTGGG
C752Gs	TACGTGGTGAACGGCAACACCAAGAAGCCCAACCTGGAC
GagΔCSa	AGCACCCAATGCTCCCAAAGCACCGCTGTCGCCGGCTCCGCTGC
GagΔCSs	GGTGTCTTGGGAGCATTTGGGTGCTAGCGCCACCTCCAGCACCG
Gag129Pola	AGCTGCAGGGGGTTCATGGGCCGGTAGCTGCTGCTGTAGG
Gag129Pols	AGCAGCAGCTACCGGCCATGAACCCCTGCAGCTGCTGC
Gag129SUa	TCCGCAGGGAGGGCCGGTAGCTGCTGCTGTAG
Gag129SUs	CTACCGGCCCTCCCTGCGGATGCAGCACCC
GagBstEIIIs	ACAGGCCGTGGTGACCGCCC
GagHw/oStopa	AACGGCTCTGTCCCCTGGTTCGCCGCCAGAGGC
GagHpals	AACGGTGGAGGGCAGTGTAGTCTGAGC
GagINa	CTGGGTCACGGTGTTCACGGCTCTGCTGTCGCCGGCTCCGCTGC
GagINs	AGAGCCGTGAACACCGTGACCCAGAAGCCCAACCTGGACGCCGAAC
Gagp68/Ina	CTTGGTGTTCAGTTCACCCACGTAGCTGTCGCCGGCTCCGCTGC
Gagp68/Ins	AGAGCCGTGAACTGCAACACCAAGAGCGCCACCTCCAGCACCG
GagRH/Ina	CTTGGTGTTCAGTTCACGGCTCTGCTGTCGCCGGCTCCGCTGC
GagRH/Ins	TACGTGGTGAACCTGCAACACCAAGAGCGCCACCTCCAGCACCG
HIVRHXhoIa	TATCTCGAGTTACGCGATCGCCAGGATCTTCCTGATGCCGGCG
HSRVAsiSIa	TATTCCGGAATATGCGATCGCTTTTTTGGTATTACAATTAACCTACATAACT- TCCTTGGG
HSRVAsiSIs	ATAGCGATCGCATGTAATACCAAAAAACCAACCTGGATGC
HSRVBspEla	TTCACCACTATGGGTTCGGGATG
HSRVPaIcIs	TGTTAGAAAACTATTAACCTACAATGCACAAAGCC

Name	Sequenz (5'→3')
INAsiSIs	ATATAGCGATCGCGTACGTGGTGAAGTCAACACCAAGAAGC
K755Ga	AGGTTGGGCTTCCCGGTGTTGCAGTTCACCACGTAGGAGC
K755Gs	AACTGCAACACCGGGAAGCCCAACCTGGACGCCG
MLVRHXhoIa	GAGAACTCCAGGAACCTCCACACTTCTGGCGATCGCGTAACTCGAGATA
N621Ga	CTGGGTCACGGTGCCACGGCTCTGCTGTCGCCGG
N621Gs	AGCAGAGCCGTGGGCACCGTGACCCAGAGCGCCAC
N751Ga	TTGGTGTTCAGGGCACCACGTAGGAGCCCTGGGTG
N751Gs	TCCTACGTGGTGGGCTGCAACACCAAGAAGCCCAACCTG
N753Ga	GGCTTCTTGGTGCCGAGTTCACCACGTAGGAGCCCTG
N753Gs	GTGGTGAAGTGGCCACCAAGAAGCCCAACCTGGACG
p68XhoIa	TATTCTAGACTCGAGTTAGTTCACGGCTCTGCTGTCCG
PolΔCSa	GGGCTTAGCACCCAATGCTCCCAAAGCACCGGAGCCCTGGGTGGCCAGC
PolΔCSs	GGCTCCGGTGCTTTGGGAGCATTGGGTGCTAAGCCCAACCTGGACGCCG
PolΔINNNotIa	AATTGCGGCCGCTTAGTTCACCACGTAGGAGCCCTGGGTGG
Pol337a	TATCTCGAGTTACAGGATCTGGAACACCTTTTCCAG
PolBamHIs	ATGACCTACCTGGAAGATCCCCGG
PolHpals	AACACCGTGACCCAGATGAACCCCTGCAGCTGCTGCAGCC
PolHla	TCTTGTCGTAGTGGAAGTGGATCCGGGG
PolNarIa	ATGGTGGCGCCGCTGGCCCAGTGGG
Polp68/Ina	GTTCACGGCTCTGGAGCCCTGGGTGGCCAGC
Polp68/Ins	ACCCAGGGCTCCAGAGCCGTGAACTGCAACACCAAGAAGCCCAACC
Polp68/p3a	CTGGGTCACGGTGTTACGGCTCTGGAGCCCTGGGTGGCCAGC
Polp68/p3s	AGAGCCGTGAACACCGTGACCCAGAAGCCCAACCTGGACGCCGAAC
PRRHa	GCCCTCGTACTGGGTGAGCTGCAGAGGCTGCTGG
PRRHs	CTGCAGCTGACCCAGTACGAGGGCGTGTCTACACCG
PRRTStoppa	TATCTCGAGTTAGTTCACCACGTAGGAGCCCTGGG
Q625Ga	GGAGGTGGCGCTCCCGGTCACGGTGTTACGGCTCTG
Q625Gs	GAACACCGTGACCGGGAGCGCCACCTCCAGCACC
R618Ga	GGTGTTCACGGCTCCGCTGTCGCCGGCTCCGC
R618Gs	AGCCGGCGACAGCGGAGCCGTGAACACCGTGACCC
RHΔ161CXhoIa	TATCTCGAGTTAGTTCACCACGTAGGAGCCCTGGG
RTΔ78CXhoIa	ATATCTCGAGTTACACGTAGAAGCTGTCGGTAATCACCAGC
RTHIVRHa	GCCGTCCACGTAGAACACGCCCTCGTACTGGCTGG
RTHIVRHs	GAGGGCGTGTCTACGTGGACGGCGCCGCAAC
RTMLVRHa	CCCATCCGTGTAGAACACGCCCTCGTACTGGCTGG
RTMLVRHs	GAGGGCGTGTCTACACGGATGGGAGCAGCTTCCTG
RTXhoIa	ATATCTCGAGTTAGCTGGGGTGTTCACGGGGC
Stopp+100a	TATTAGGAAAGGACAGTGGGAGTGG
SUa	ATATCTCGAGTTACCGCCGCTTCCGGTTGTTGC
T622Ga	GCTCTGGGTCACGCCGTTACGGCTCTGTTACGGCTC
T622Gs	CAGAGCCGTGAACGGCGTGACCCAGAGCGCCACC
T624Ga	GCTCTGGCCCACGGTGTTACGGCTCTGCTGTCCG
T624Gs	AGAGCCGTGAACACCGTGGGCCAGAGCGCCACCTCCAGCACC
T754Ga	TTGGGCTTCTTGCCGTTGCAGTTCACCACGTAGGAGCC
T754Gs	GTGAACTGCAACCCCAAGAAGCCCAACCTGGACGCC

Name	Sequenz (5'→3')
V620Ga	CTGGGTCACGGTGTACCGGCTCTGCTGTCGCCGGCTC
V620Gs	AGCAGAGCCGGTAACACCGTGACCCAGAGCGCC
V623Ga	GGTGGCGCTCTGGGTCCCGGTGTTACGGCTCTGCTG
V623Gs	GAGCCGTGAACACCGGGACCCAGAGCGCCACCTCC
V749Aa	TTGCAGTTCACGGCGTAGGAGCCCTGGGTGGCCAGC
V749As	CAGGGCTCCTACGCCGTGAACTGCAACACCAAGAAGCCC
V749Ga	TTGCAGTTCACCCCGTAGGAGCCCTGGGTGGCCAGC
V749Gs	CAGGGCTCCTACGGGGTGAAGTCAACACCAAGAAGCCC
V750Ga	GTGTTGCAGTTCCCCACGTAGGAGCCCTGGGTGGC
V750Gs	GGCTCCTACGTGGGGAAGTCAACACCAAGAAGCCCAACC
Y748Ga	GCAGTTCACCACGCCGGAGCCCTGGGTGGCCAGC
Y748Gs	ACCCAGGGCTCCGGCGTGGTGAAGTCAACACCAAGAAGC
Y748Ra	AGTTCACCACTCTGGAGCCCTGGGTGGCC
Y748Rs	ACCCAGGGCTCCAGAGTGGTGAAGTCAACACCAAGAAGC

3. Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Transfektion mit Turbofect

Am Vortag in 6-Napf-Platten ausgesäte HEK 293T-Zellen (6×10^5) oder BHK-LL-LacZ (3×10^5) wurden nach Angaben des Herstellers mit dem TurboFect® *in vitro* Transfection Reagent Kit (Thermo Scientific) transfiziert. Die Zellen wurden anschließend 48 bis 72 Stunden bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ inkubiert.

3.1.2 Kalziumphosphattransfektion

2xHBS (HEPES Buffered Saline) 274mM NaCl; 10mM KCl; 1,4mM Na₂HPO₄; 15mM D-Glukose; 42mM HEPES pH 7,3

4µg Plasmid DNA wurde in 180µl 0,25M CaCl₂ gegeben. Die verdünnte DNA wurde in 180µl 2xHBS getropft. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Transfektionsgemisch auf am Vortag in 6-Napf-Platten ausgesäte HEK 293T-Zellen (6×10^5) gegeben. Die Zellen wurden anschließend 48 bis 72 Stunden inkubiert.

3.1.3 Polyethylenimin (PEI)-Transfektion

Die Plasmid-DNA wurde in einem vorgelegten Volumen DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) verdünnt. In einem separaten Reaktionsgefäß wurde das PEI (25kDa linear) in das gleiche Volumen DMEM gegeben. Die verdünnte DNA wurde in das DMEM-PEI-Gemisch getropft und anschließend bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 20 Minuten wurde der Transfektionsansatz auf am Vortag ausgesäte Zellen gegeben und anschließend 48 bis 72 Stunden inkubiert. Die je nach Maßstab und Zelllinie variierenden Mengen sind in Tabelle 3.1 angegeben.

Tabelle 3.1: Polyethylenimintransfektion

Zelllinie	Maßstab	ausgesäte Zellen	eingesetztes DMEM	DNA-Menge	PEI-Menge
HEK 293T	6-Napf-Platte	6×10^5	2x100µl	4µg	4µg
HEK 293T	10cm-Schale	6×10^6	2x600µl	19µg	25µg
BHK-LL-LacZ	10cm-Schale	$1,5 \times 10^6$	2x600µl	16µg	32µg

3.1.4 Infektiositätsbestimmung rekombinanter Viruspartikel

Jeweils 10µl Virusüberstand wurden 48-72 Stunden nach der Transfektion auf am Vortag in 96-Napf-Platten ausgesäte BHK-LL-LacZ-Zellen (1×10^4) in Triplikaten titriert. Nach weiteren 48-72 Stunden wurde die Anzahl der GFP-positiven Zellen gezählt, die Infektiosität und die

Standardabweichung berechnet. Um eine höhere Signifikanz der Ergebnisse zu erreichen, wurden ausgewählte Experimente dreifach durchgeführt.

3.1.5 Herstellung der Zellysate

RIPA-Puffer (Radioimmuno-precipitationsassay Puffer)	150mM NaCl; 1% NP40; 12mM Natrium-Desoxycholat; 3,5mM SDS; 50mM Tris pH 8
SDS-Probenpuffer (6x)	30% Glycerin; 0,35M SDS; 0,5µM Bromphenolblau; 37,5% β-Mercaptoethanol; 25% SDS-Sammelgelpuffer (siehe 3.3.1)

48-72 Stunden nach der Transfektion wurde der Überstand abgenommen und die Zellen mit RIPA-Puffer fünf Minuten auf Eis lysiert. Anschließend wurden die Zellen abgelöst, mit SDS-Probenpuffer versetzt und vorsichtig sonifiziert. Die Proteine wurden durch Erhitzen (5 Minuten; 95°C) denaturiert.

3.1.6 Foamyviruskokultur

MEM (Minimum essential Medium)	9,6g/l MEM, #41500-083 (life technologies); 26,2mM NaHCO ₃ ; 10% fötales Rinderserum; 2mM Glutamin, 30pM Penicillin G; 17,2pM Streptomycin
--------------------------------	---

BHK-LL-LacZ oder HT1080 Zellen wurden mit PFV infiziert. Alle zwei Tage wurde der Virusüberstand abgenommen und 75% der infizierten Zellen entfernt. Die verbleibenden infizierten Zellen wurden mit frischen MEM, 10% des Virusüberstandes und nichtinfizierten Zellen aufgefüllt.

3.2 Virusreinigung

3.2.1 Reinigung rekombinanter Viren durch Größenausschlusschromatographie

PBS (Phosphat Buffered Saline)	137mM NaCl; 2,68mM KCl; 6,46mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,15mM K ₂ HPO ₄ ; 0,9mM CaCl ₂ ; 0,5mM MgCl ₂
--------------------------------	--

Für die Bestimmung der Prozessierungseffizienzen wurden rekombinante Foamyviren durch Größenausschlusschromatographie mittels HiTrap Capto Core 700-Säulen gereinigt. Dazu wurde 48-72 Stunden nach der Transfektion der Virusüberstand mit den rekombinanten Viren aus jeweils drei Näpfen einer 6-Napf-Platte abgenommen und durch Filter mit 0,45µm Porengröße von zellulären Fragmenten befreit. Nachdem 50µl des Überstandes für Infektiositätsbestimmungen abgenommen worden war, folgte die partielle Reinigung der Viruspartikel durch die Trennung in HiTrap Capto Core 700-Säulen. Das Säulenmaterial bindet Proteine und Komplexe, die kleiner als 700kDa sind, wodurch alle nicht virusassoziierten Proteine entfernt werden sollten. Als Laufpuffer wurde 20mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7) verwendet. Die resultierenden 10ml der virushaltigen Fraktion wurden über 600µl 20% Saccharose in PBS geschichtet und durch Zentrifugation (201149 x g; 4°C; 2h) pelletiert. Die

Viruspellets wurden mit 50µl RIPA-Puffer (siehe 3.1.5) lysiert und anschließend mit SDS-Probenpuffer (siehe 3.1.5) versetzt. Durch Erhitzen des Lysats (fünf Minuten; 95°C) wurden die Proteine denaturiert.

3.2.2 Reinigung der Viruspartikel durch Dichtegradientenzentrifugation

Für die Bestimmung des Gag p71/p68-Verhältnisses wurden die Foamyviren aus der Foamyviruskokultur durch Dichtegradientenzentrifugation, wie bereits für HIV-1 beschrieben, gereinigt (Dettenhofer and Yu, 1999). Zuerst wurden die Viruspartikel aus 200ml Überstand durch Zentrifugation (201149 x g; 4°C; 2h) pelletiert und anschließend in 300µl PBS (siehe 3.2.1) aufgenommen. Ein Dichtegradient aus 9,6-35% Iodixanol (OptiPrep™, Axis-Shield) in PBS wurde mit den konzentrierten Viruspartikeln beladen und zentrifugiert (172647 x g; 4°C; 1,5h). Die virushaltigen Fraktionen (19-25% Iodixanol) wurden 1:5 mit PBS verdünnt und die Viruspartikel durch Zentrifugation pelletiert (198835 x g; 4°C; 1h). Die Pellets wurden in PBS gelöst, mit SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95°C denaturiert.

3.2.3 Reinigung von Foamyviren durch Chromatographie

Bei dieser Reinigungsmethode wurden entweder 60ml Virusüberstand von transfizierten HEK 293T-Zellen (Vektorsystem) oder 60ml Kokulturüberstand als Ausgangsmaterial benutzt. Nach dem Filtern (0,45µm Porengröße) wurden die Viruspartikel durch schnelle Proteinflüssigkeitschromatographie (FPLC - „fast protein liquid chromatography) gereinigt. Im ersten Schritt wurde der gefilterte Überstand durch HiScreen Capto Core 700-Säulen und 20mM Natriumphosphatpuffer (pH 7) als Laufpuffer mit einer Flussrate von 1ml/min getrennt, wobei die komplette proteinhaltige Fraktion gesammelt wurde. Im zweiten Schritt wurde der Capto Core 700-Durchfluss mit einer Flussrate von 1ml/min auf HiTrap Heparin Sepharose High Performance (HP)-Säulen geladen. Als Laufpuffer diente 20mM Natriumphosphat (pH 7). Die gebundenen Foamyviren wurden bei 0,45M NaCl eluiert. Diese virushaltige Fraktion wurde gesammelt, zentrifugiert (373200 x g; 4°C; 1h) und in 50µl RIPA-Puffer resuspendiert. Von den einzelnen Reinigungsschritten (gefilterter Überstand, Capto Core 700-Durchfluss und virushaltige Heparin Sepharose HP-Fraktion) wurden nicht zentrifugierte Proben für die Infektiositäts- und die Proteinbestimmung abgenommen (Miller, 2012).

3.2.4 Reinigung von Foamyviren durch Anionenaustauschchromatographie

Zuerst wurden die rekombinanten Foamyviren durch die Säulenchromatographie gereinigt. Die Heparin-Sepharose-Fraktion (80%) wurde anschließend mit 20mM Natriumphosphatpuffer (pH 7) auf 45mM NaCl verdünnt und mit einer Flussrate von 1ml/min in einer UNOsphere Q-Säule getrennt. Als Laufpuffer und Elutionspuffer wurden die gleichen Puffer wie bei der HiTrap Heparin Sepharose HP-Säule benutzt. Die Viren wurden durch einen Stufengradienten von

0,15M, 0,175M, 0,2M, 0,25M, 0,3M und 0,5M NaCl eluiert. Nachdem jeweils 100µl für die Infektiositäts- und die Proteinbestimmungen abgenommen worden waren, folgte die Zentrifugation (373200 x g; 4°C; 1h) der vier mittleren Fraktionen (0,175M, 0,2M, 0,25M und 0,3M NaCl) und der Heparin-Sepharose-Fraktion (verbliebene 20%). Die Pellets wurden in je 50µl RIPA-Puffer resuspendiert und mit SDS-Probenpuffer 5min bei 95°C denaturiert.

3.3 Westernblotanalysen und Proteinbestimmung

3.3.1 Westernblotanalyse

SDS-Laufpuffer	0,025M Tris; 0,2M Glycin; 0,1%SDS
SDS-Sammelgelpuffer (4x)	0,5M Tris-HCL pH 6,8; 0,4% SDS
SDS-Trenngelpuffer (4x)	1,5M Tris-HCL pH 8,8; 0,4% SDS
Westernblot-Puffer	0,025M Tris; 0,2M Glycin; 10% Methanol
Nassblotpuffer	0,025M Tris; 0,2M Glycin

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen nach Molekulargewicht. Die Gele, bestehend aus einer Sammelgel- und einer Trenngelschicht (10-12,5% Acrylamid), wurden in SDS-Laufpuffer mit den Proben beladen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 140V. Anschließend wurden die Proteine entweder durch die Halbtrocken- (4mA/cm²; 25V; 30min) oder die Nassblotmethode (150mA; 4°C; 16h) auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membran wurde 30 Minuten in 5% Magermilch in PBS geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach Inkubation mit dem antigenspezifischen ersten Antikörper oder Antiserum und mehrfachem Waschen mit PBS wurde die Membran mit den peroxydasekonjugierten zweiten Antikörpern (1:10000 in PBS) inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde die Membran mit dem ECL-Substrat (ECL Western Blotting Substrate (Pierce), ECL Western Blotting Substrate (Promega) oder WesternBright Quantum HRP Substrat (Advansta)) nach Herstellerangaben angewendet und die Signale durch einen Röntgenfilm oder durch eine CCD-Kamera (LAS-3000 von Fujifilm) detektiert. Die relativen Gag- und Pol-Mengen wurden mit der AIDA-Software (GE Healthcare) bestimmt. Durch dieses Programm wird angezeigt, ob die Intensität der Signale im linearen Bereich lag, was für alle quantifizierten Banden zutrif.

3.3.2 Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Fixierlösung	50% Methanol, 12% Essigsäure, 0,05% Formaldehyd
Lösung A	0,43g Na ₂ S ₂ O ₃ in 5ml ddH ₂ O
Silbernitratlösung	0,6g AgNO ₃ , 225µl Formaldehyd in 300ml ddH ₂ O
Entwicklerlösung	30g Na ₂ CO ₃ , 250µl Formaldehyd, 25µl Lsg. A in 500ml ddH ₂ O
Oxidationslösung	450µl Lösung A in 330ml dH ₂ O

Das SDS-Polyacrylamidgel wurde eine Stunde lang bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit Fixierlösung inkubiert und anschließend mit 50% Ethanol 3x 30 Minuten gewaschen. Nach einminütiger Inkubation in Oxidationslösung wurde das Gel 30 Minuten in Silbernitratlösung geschwenkt, mit dH₂O gewaschen und anschließend mit Entwicklerlösung gefärbt. Das gefärbte Gel wurde anschließend eine Stunde in Fixierlösung geschwenkt.

3.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration durch ein Bradfordreagenz

Die Proteinkonzentrationen wurden in Triplikaten nach Herstellerangaben mit dem Bradfordreagenz Roti-Nanoquant (Carl Roth) bestimmt.

4. Ergebnisse:

4.1 Charakterisierung der foamyviralen Viruskomposition

Im Gegensatz zu den Orthoretroviren wird *pol* bei Foamyviren Gag-unabhängig exprimiert und genomabhängig inkorporiert (Bodem et al., 1996; Heinkelein et al., 2002a; Jordan et al., 1996; Löchelt and Flügel, 1996; Muranyi and Flügel, 1991; Peters et al., 2005; Yu et al., 1996a). Auf Grund dieser unter Retroviren einzigartigen Mechanismen ist eine abweichende Komposition der foamyviralen Proteine im Viruspartikel möglich. Darüber hinaus ist bei Foamyviren nur sehr wenig über die Viruskomposition bekannt. Deshalb sollte im folgenden Experiment das Gag/Pol-Verhältnis in Foamyviren neu analysiert werden, welches bisher mit 15,8:1 (Gag/PRRT) und 9,8:1 (Gag/IN) erst einmal bestimmt worden war (Cartellieri et al., 2005a). Da auch nichtvirusassoziierte foamyvirale Pol-Proteine sezerniert werden, wurden für diese Analyse hochreine Viren benötigt (Swiersy et al., 2011). Durch den starken zytotoxischen Effekt von Foamyviren ist es selbst durch einen Iodixanolgradienten nicht möglich, die erforderliche Reinheit zu erreichen (eigene Vorversuche). Aus diesem Grund wurde ein alternatives chromatographiebasierendes Reinigungsprotokoll für Foamyviren entwickelt (Abbildung 4.1).

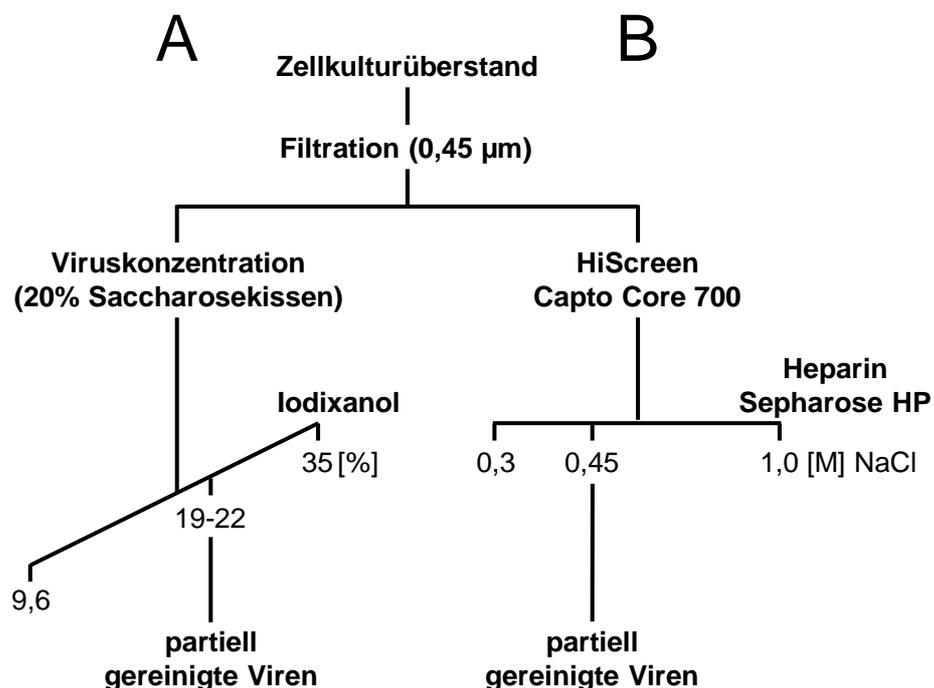


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Virusreinigung. (A) Nachdem der gefilterte Überstand durch ein 20%iges Saccharosekissen pelletiert worden ist, erfolgt die weitere Virusreinigung durch eine Iodixanolgradientenzentrifugation. (B) Virusreinigungsschema durch Säulenchromatographie: Capto Core 700-Säule und Heparin Sepharose HP-Säule. Die NaCl-Konzentrationen der Elutionsschritte sind angegeben.

4.1.1 Die Säulenchromatographie resultierte in hochreinen foamyviralen Viruspartikeln.

Kürzlich wurde gezeigt, dass Foamyviren an Heparin binden und es als Adhäsionsmolekül nutzen (Nasimuzzaman and Persons, 2012; Plochmann et al., 2012). Aus diesem Grund wurden zwei chromatographische Reinigungsschritte durchgeführt, eine Größenausschlusschromatographie durch eine Capto Core 700-Säule und eine Affinitätschromatographie durch eine Heparin Sepharose HP-Säule (Abbildung 4.1). Zur Etablierung der Reinigung wurde das foamyvirale Vektorsystem verwendet. Am Vortag ausgesäte HEK 293T-Zellen (3×10^7) wurden mit $50 \mu\text{g}$ pMD9, $25 \mu\text{g}$ pcoPG4, $10 \mu\text{g}$ pcoPE und $10 \mu\text{g}$ pcoPol transfiziert. Drei Tage nach der Transfektion wurde der Überstand (50ml) abgenommen und filtriert ($0,45 \mu\text{m}$), wovon 20% für weitere Analysen aufbewahrt wurden. Die restlichen 80% des Überstandes wurden bei einer Flussrate von 1 ml/min durch HiScreen Capto Core 700-Säulen getrennt, wobei als Laufpuffer 20 mM Natriumphosphat ($\text{pH } 7$) verwendet wurde. Durch Capto Core 700-Säulen werden alle Proteine und Komplexe gebunden, die kleiner als 700 kDa sind. Vom virushaltigen Durchfluss wurden 25% für weitere Analysen auf Eis aufbewahrt (entspricht 20% des initialen Virusproteins). Die restlichen 75% des Capto Core 700-Durchflusses (entspricht 60% des initialen Virusproteins) wurden anschließend mit einer Flussrate von 1 ml/min und 20 mM Natriumphosphat ($\text{pH } 7$) durch eine HiTrap Heparin Sepharose HP-Säule getrennt. Die Elution erfolgte durch einen Stufengradienten mit $0,3 \text{ M}$, $0,45 \text{ M}$ und 1 M NaCl in 20 mM Natriumphosphat ($\text{pH } 7$) (Abbildung 4.2).

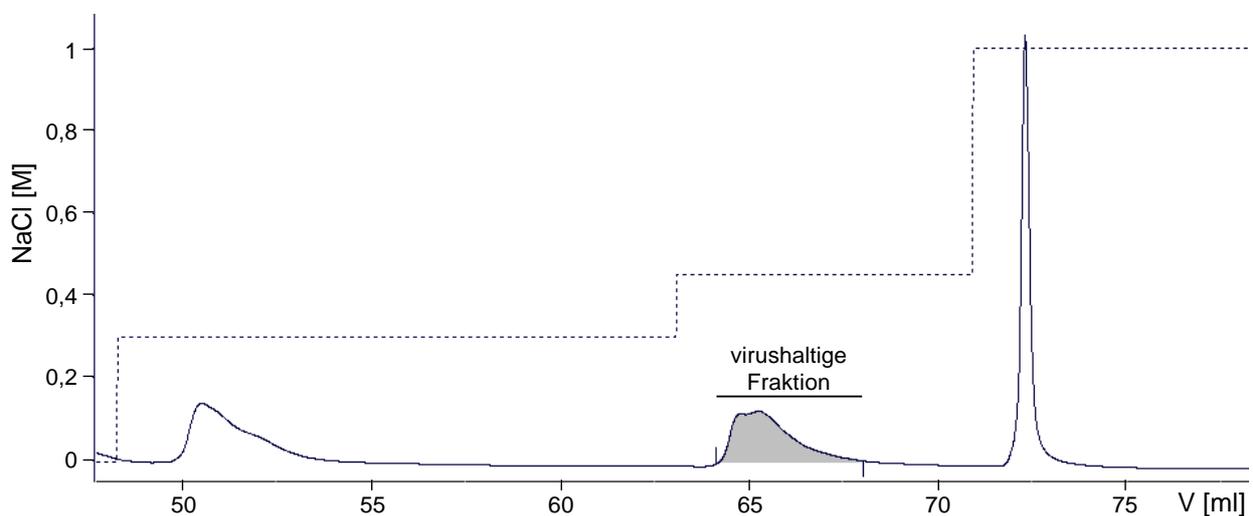


Abbildung 4.2: Chromatogramm einer Affinitätschromatographie mit einer HiTrap Heparin Sepharose HP-Säule. Durchgezogene Kurve: relative Proteinmenge (Absorption bei 280 nm); gestrichelte Kurve: NaCl-Konzentration; graue Fläche: virushaltige $0,45 \text{ M}$ -NaCl-Fraktion

Die virushaltige Fraktion ($0,45 \text{ M}$ NaCl) wurde gesammelt und analysiert. Jeweils $3 \times 10 \mu\text{l}$ des gefilterten Überstandes, des Capto Core 700-Durchflusses und der virushaltigen Heparin Sepharose HP-Fraktion (450 mM NaCl) wurden in Triplikaten auf BHK-LL-Zellen titriert. Nach

zwei Tagen wurden die GFP-positiven Zellen gezählt und die Infektiosität berechnet (Abbildung 4.3; Tabelle 4.1). Von den virushaltigen Fraktionen der Reinigungsschritte wurde die Proteinmenge nach Bradford bestimmt (Tabelle 4.1). Während für die Heparin Sepharose HP-Fraktion bei 0,45M NaCl die Proteinkonzentration unter der Nachweisgrenze lag, wurden für den Capto Core 700-Durchfluss 26µg/ml und den gefilterten Überstand 2,9mg/ml bestimmt (Tabelle 4.1). Unter Berücksichtigung des Fraktionsvolumens entspricht das einer Reinigung von fast 98,7% bei einer Reduktion der Infektiosität von unter 50% (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Reinigung von rekombinanten foamyviralen Viruspartikeln

Säulen	Volumen [ml]	Protein-konzentration [µg/ml]	Reinigung* [%]	Infektiosität [1/ml]	Absolute Infektiosität ^a
Überstand	50	2897	-	3,6x10 ⁶ ±8x10 ⁵	1,8x10 ⁸ ±4x10 ⁷
Capto Core 700	60	26	98,654	1,2x10 ⁶ ±1x10 ⁵	9,5x10 ⁷ ±9x10 ⁶
Heparin Seph. HP	5	0,48	99,795	2,5x10 ⁶ ±2x10 ⁵	2,1x10 ⁷ ±2x10 ⁶
Total	-	-	99,997	-	-

a, Absolute Infektiosität der Fraktion unter Berücksichtigung der für Zentrifugationen entnommenen Volumina.

*, Unter Berücksichtigung der für Zentrifugationen entnommenen Volumina.

Durch die Integration der Proteinkurve des Heparin Sepharose HP-Chromatogramms (Abbildung 4.2) wurde die Proteinmenge bestimmt und die Reinigung von fast 99,8% berechnet. Das entspricht einer Proteinkonzentration von 0,48µg/ml in der virushaltigen Heparin Sepharose HP-Fraktion bei einer Reduktion der Infektiosität um Faktor 4,5 (Tabelle 4.1). Daraus ergibt sich für die Säulenchromatographie eine Gesamtreinigung von 99,997% und ein Verlust von infektiösen Viruspartikeln von Faktor 8,6 (Tabelle 4.1). Für die weiteren Analysen der Produkte der einzelnen Reinigungsschritte wurden die Viruspartikel der restlichen Volumina durch Zentrifugation (373200 x g; 1h; 4°C) konzentriert und in jeweils 50µl RIPA-Puffer und SDS-Probenpuffer resuspendiert. Für die Westernblotanalysen wurden die geladenen Mengen auf die Infektiosität ($\approx 1 \times 10^6$) normalisiert und die viralen Proteine mit den monoklonalen anti-Gag- und anti-SU-Antikörpern sowie dem polyklonalen anti-IN-Antiserum detektiert (Abbildung 4.3). Lysate aus transfizierten und untransfizierten Zellen dienten als Kontrollen. Die vorher bestimmte Reinheit der Fraktionen wurde durch ein silbergefärbtes Polyacrylamid-SDS-Gel verifiziert (Abbildung 4.3). Um das Gel nicht zu überladen, wurde vom gefilterten Virusüberstand eine 1:100 verdünnte Probe geladen ($\approx 1 \times 10^4$ Viruspartikel). Durch Vergleich der Westernblotanalysen und des Silbergels wurden die virusspezifischen Proteinbanden in der Heparin Sepharose HP-Fraktion im Silbergel identifiziert (Abbildung 4.3). Die Proteinmengen im 1:100 verdünnten Überstand und der Capto Core 700-Probe waren vergleichbar, wodurch die Ergebnisse der Proteinquantifizierung bestätigt wurden (Abbildung 4.3, Tabelle 4.1). Obwohl

die geladenen Mengen in den Westernblotanalysen auf die Infektiositäten normalisiert wurden, stieg die Menge der detektierten Gag-Proteine mit den Reinigungsschritten an (Abbildung 4.3). Demnach konnte die Reduktion des Virustiters nicht oder nur teilweise auf den Verlust von Viruspartikeln während der Reinigung zurückgeführt werden, sondern wurde von verringerter Infektiosität verursacht.

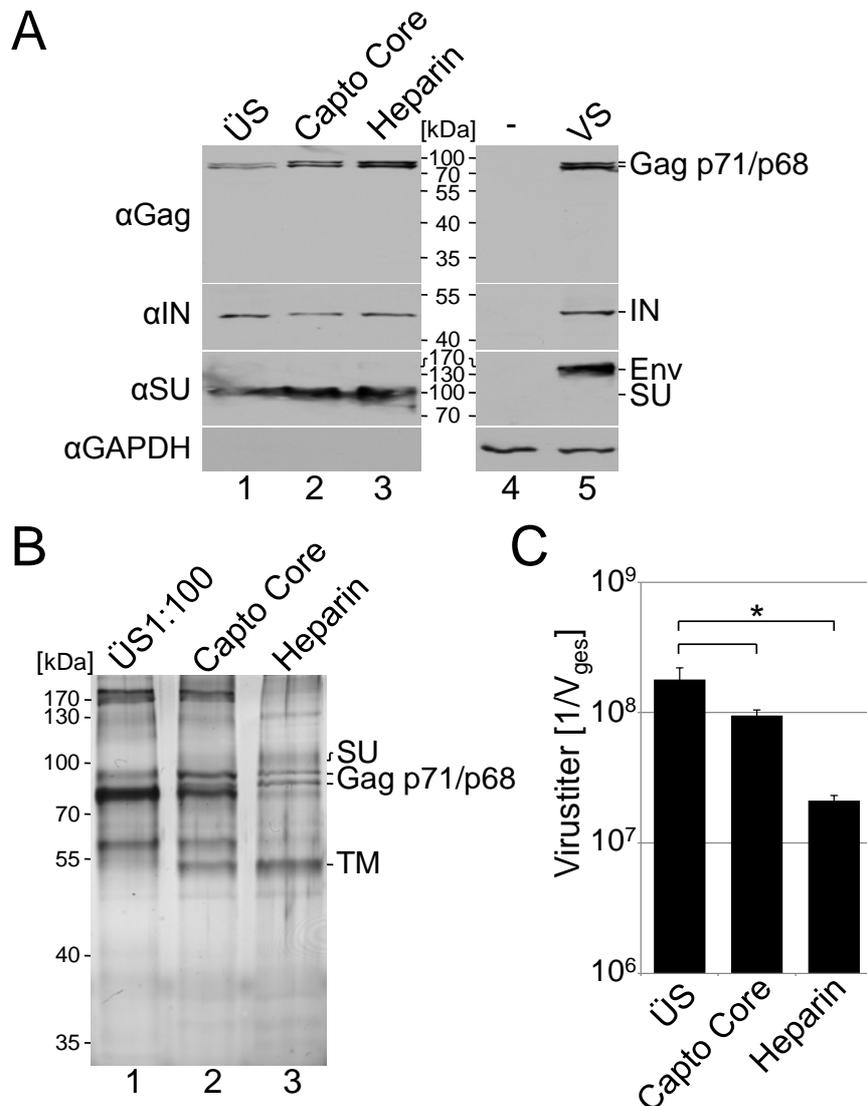


Abbildung 4.3: Reinigung von Foamyviren durch Säulenchromatographie. Gefilterte rekombinante Viruspartikel wurden durch eine HiScreen Capto Core 700-Säule (Capto Core) gefolgt von einer HiTrap Heparin Sepharose HP-Säule (Heparin) gereinigt. ÜS: gefilterter Überstand; -: Lysate untransfizierter Zellen; +: Lysate mit Vektorsystem transfizierter Zellen (A) Westernblotanalysen der konzentrierten Virusfraktionen (je $\approx 1 \times 10^6$ infektiöse Viruspartikel) mit anti-Gag- und anti-SU-Antikörpern sowie dem anti-IN-Antiserum. Ladekontrolle: Detektion von GAPDH; links: Positionen der Größenmarkerproteine (B) Analyse der konzentrierten Virusfraktionen durch Silberfärbung. Bis auf Spur 1 (1:100 Verdünnung der Probe auf Grund hohen Proteingehalts) wurden $\approx 1 \times 10^6$ infektiöse Viruspartikel geladen. Die Positionen der SU-, der Gag p71/p68- und der TM- sowie der Größenmarkerproteine sind angegeben. (C) Auf das initiale Volumen des Überstandes normalisierte Virustiter der Reinigungsschritte unter Berücksichtigung der für Westernblotanalysen und Silberfärbung entnommenen Volumina. Fehlerbalken: Standardabweichung; *: T-Tests (p-Wert < 0,05)

4.1.2 Reinigung foamyviraler Partikel durch Anionenaustauschchromatographie

Anschließend wurde untersucht, ob durch einen weiteren chromatographischen Reinigungsschritt die verbliebenen nichtviralen Proteine entfernt werden können. Zu diesem Zweck wurde nach der Säulenchromatographie, bei der in diesem Versuch immer die kompletten Volumina in den jeweils nächsten Reinigungsschritt eingesetzt wurden, eine zusätzliche Ionenaustauschchromatographie durchgeführt.

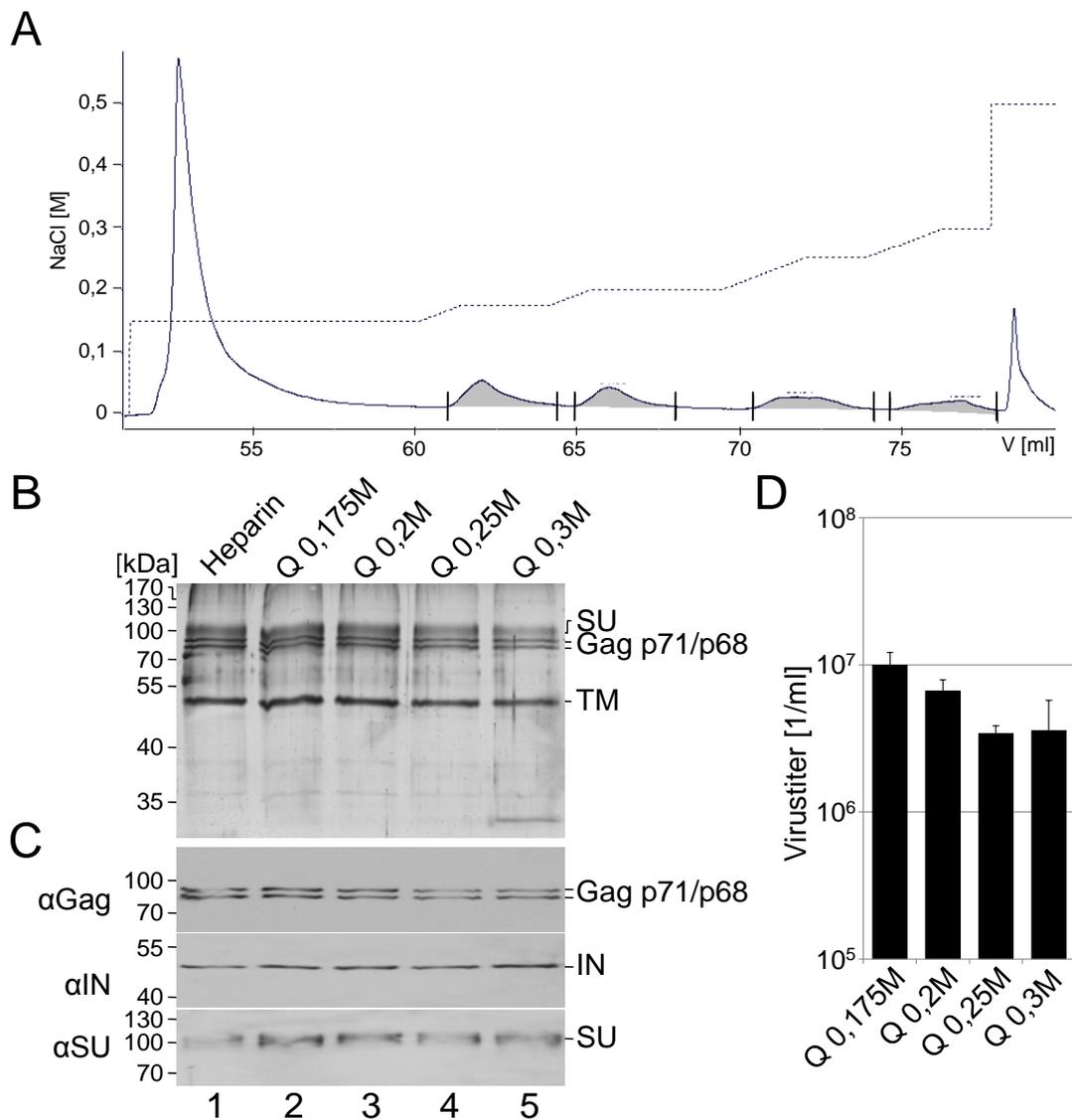


Abbildung 4.4: Reinigung rekombinanter Viren durch eine UNOsphere Q-Säule. (A) Chromatogramm der Ionenaustauschchromatographie; durchgezogene Kurve: relative Proteinmenge (Absorption 280nm); gestrichelte Kurve: NaCl-Konzentration; graue Flächen mit senkrechten Markierungen: virushaltige UNOsphere Q-Eluate (0,175M, 0,2M, 0,25M und 0,3M NaCl) (B) Silbergefärbtes Polyacrylamid-SDS-Gel der 0,45M Heparin Sepharose HP- und der virushaltigen UNOsphere Q-Fractionen (auf vergleichbare Virusmengen normalisiert). Die Positionen der SU-, der Gag p71/p68- und der TM- sowie der Größenmarkerproteine sind angegeben. (C) Westernblotanalysen der in (B) gezeigten Fraktionen mit den anti-Gag- und anti-SU-Antikörpern sowie dem anti-IN-Antiserum. links: Positionen der Größenmarkerproteine (D) Infektiosität der analysierten UNOsphere Q-Fractionen. Fehlerbalken: Standardabweichung

Ein Teil (20%) der virushaltigen Heparin Sepharose HP-Fraktion wurde für die weiteren Analysen aufbewahrt. Um die Salzkonzentration zu reduzieren, wurden die restlichen 80% mit 20mM Natriumphosphat (pH 7) auf 45mM NaCl verdünnt und anschließend an eine UNOsphere Q-Säule mit einer Flussrate von 1ml/min und 20mM Natriumphosphat (pH 7) als Laufpuffer gebunden. Die Elution erfolgte durch einen Stufengradienten von 0,15M, 0,175M, 0,2M, 0,25M, 0,3M und 0,5M NaCl in 20mM Natriumphosphat (pH 7)(Abbildung 4.4). Die Viruspartikel der vier mittleren Fraktionen (0,175M, 0,2M, 0,25M und 0,3M NaCl) und die Heparin Sepharose HP-Fraktion wurden durch Zentrifugation konzentriert (373200 x g; 1h; 4°C), in jeweils 50µl RIPA-Puffer gelöst und die Proteine mit SDS-Probenpuffer fünf Minuten bei 95°C denaturiert. Vor der Zentrifugation wurden jeweils 50µl der Fraktionen für die Infektiositätsbestimmungen abgenommen, die in vergleichbaren Virustitern der vier analysierten UNOsphere Q-Fraktionen resultierten (Abbildung 4.4). Auch durch die Westernblotanalysen mit den monoklonalen anti-Gag- und anti-SU-Antikörpern sowie dem polyklonalen anti-IN-Antiserum wurde gezeigt, dass alle Fraktionen gleiche Virusmengen enthielten (Abbildung 4.4). Um die Reinheit der Fraktionen zu überprüfen, wurde ein mit gleichen Mengen beladenes Polyacrylamid-SDS-Gel mit Silbernitrat gefärbt. In allen analysierten UNOsphere Q-Eluaten wurden die gleichen Banden mit ähnlicher Intensität wie in der Heparin Sepharose HP-Fraktion identifiziert, während jedoch auch die gleichen nichtviralen Proteine im Silbergel nachweisbar waren (Abbildung 4.4). In der Fraktion mit 0,3M NaCl wurde eine zusätzliche Bande mit ca. 33kDa angereichert (Abbildung 4.4). Durch die UNOsphere Q-Säule wurden vier Virusfraktionen gewonnen, die sich jedoch kaum in ihrer Zusammensetzung unterscheiden. Deshalb wurde auf diese weitere Reinigung verzichtet.

4.1.3 Foamyviren enthalten weniger Pol-Proteine als Orthoretroviren.

Für die Bestimmung der relativen Pol-Mengen in Foamyviren durch quantitative Westernblotanalysen wurde zunächst ein Standard für die monoklonalen anti-Gag- und anti-PRRT-Antikörper benötigt. Da deren Epitope im N-Terminus des Gag- bzw. des Pol-Proteins lokalisiert sind, wurde ein Expressionsplasmid konstruiert, das ein Fusionsprotein aus den 129 N-terminalen Aminosäuren des Gag-Proteins und den 337 N-terminalen Aminosäuren des Pol-Proteins kodiert (Abbildung 4.5). Durch dieses Gag129Pol337-Fusionsprotein, das beide Epitope im Verhältnis 1:1 enthält, konnten die Sensitivitäten der monoklonalen anti-Gag- und anti-PRRT-Antikörper verglichen und normalisiert werden. Mit den Oligonukleotiden AflII_s und Gag129Pol337a wurde das 129 Aminosäuren kodierende *gag*-Fragment und mit Gag129Pol337s und Pol337a das 337 Aminosäuren kodierende *pol*-Fragment amplifiziert. Beide Produkte wurden mit den Oligonukleotiden AflII_s und Pol337a in einer dritten Polymerasekettenreaktion (PCR – „polymerase chain reaction“) fusioniert, anschließend mit *EcoRI* und *XhoI* verdaut und in

den mit *EcoRI* und *XhoI*-geschnittenen pco-Vektor ligiert. Das resultierende Expressionsplasmid pGag129Pol337 kodiert das Fusionsprotein Gag129Pol337, welches beide Epitope der monoklonalen Antikörper enthält (Abbildung 4.5).

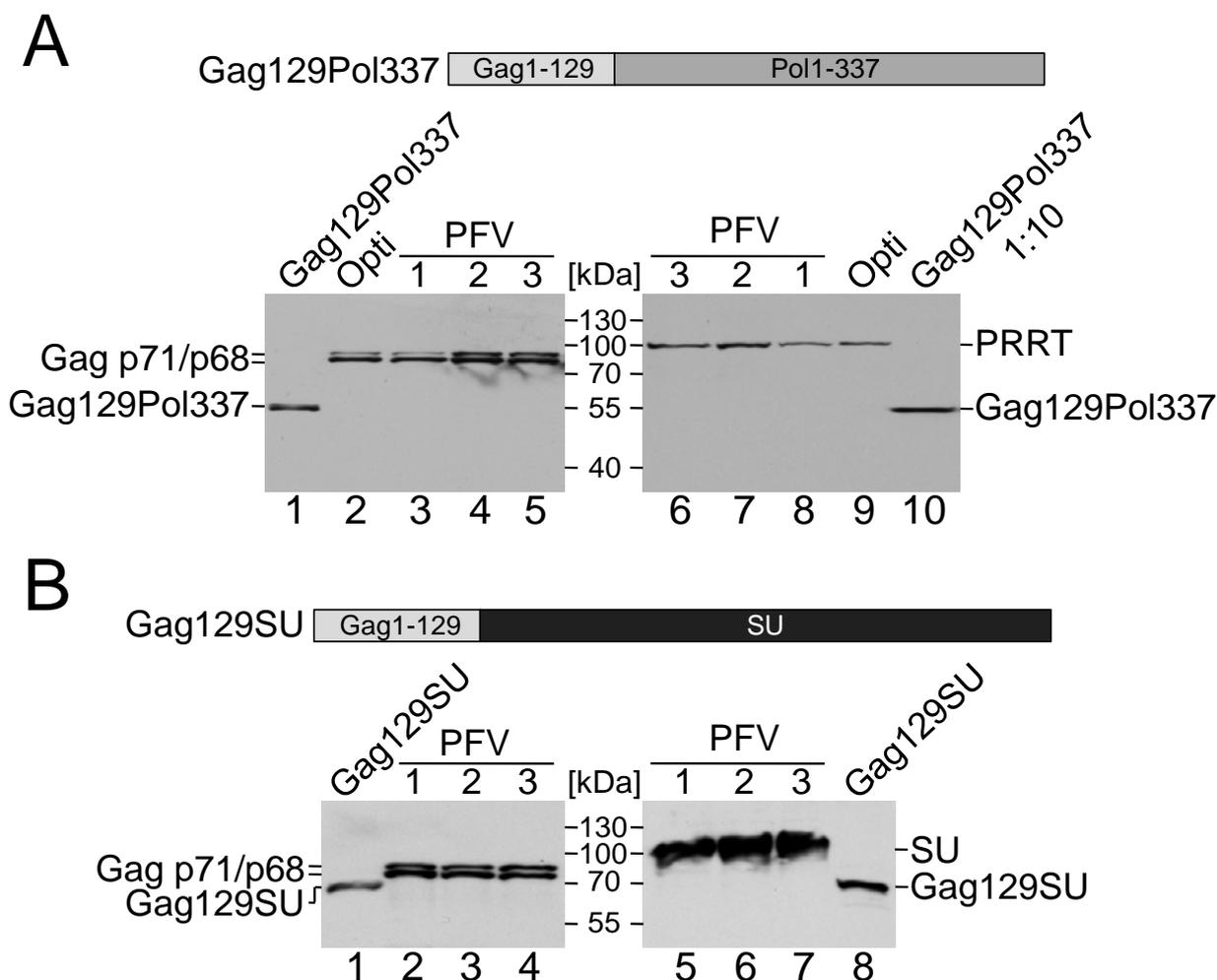


Abbildung 4.5: Charakterisierung der foamyviralen Viruskomposition. (A) Oberer Teil: schematische Darstellung des Gag129Pol337-Proteins; unterer Teil: Westernblotanalysen von biologisch unabhängigen PFV-Proben. Die viralen Proteine wurden durch anti-Gag- und anti-PRRT-spezifische Antikörper detektiert. Die Positionen der Gag p71/p68-, der PRRT- und der Gag129Pol337- sowie der Größenmarkerproteine sind angegeben. Opti: durch Iodixanolgradienten gereinigt; PFV 1-3: durch Säulenchromatographie gereinigt; Gag129Pol337-Zelllysate: Standard für die Antikörper-normalisierung (B) Oberer Teil: schematische Darstellung des Gag129SU-Proteins. unterer Teil: Westernblotanalysen von unabhängigen säulenchromatographisch gereinigten PFV-Proben (PFV 1-3). Die viralen Proteine wurden durch anti-Gag- und anti-SU-spezifische Antikörper detektiert. Die Positionen der Gag p71/p68-, der SU- und der Gag129SU- sowie der Größenmarkerproteine sind angegeben. Gag129SU-Zelllysate: Standard für die Antikörpernormalisierung

Am Vortag ausgesäte HEK 293T-Zellen (6×10^5) wurden mit $3,5 \mu\text{g}$ pGag129Pol337 und $0,5 \mu\text{g}$ peGFP-C1 als Transfektionskontrolle transfiziert und nach zwei Tagen mit RIPA-Puffer lysiert während die Proteine mit SDS-Probenpuffer fünf Minuten bei 95°C denaturiert wurden. Der Überstand ($3 \times 60 \text{ml}$) aus Foamyvirus-HT1080-Kokulturen wurde durch die Säulenchromatographie, wie oben beschrieben, gereinigt, wobei jeweils die kompletten

Volumina in die nächsten Reinigungsschritte eingesetzt wurden, um möglichst hohe Viruskonzentrationen für die Analyse der Viruskomposition zu erreichen. Zusätzlich zum Gag129Pol337-Zellysate und den drei unabhängigen Lysaten aus säulenchromatographisch gereinigten Foamyviren wurde eine vierte über einen Iodixanolgradienten gereinigte Virusprobe analysiert. Alle Proben wurden jeweils in zwei Taschen der SDS-Polyacrylamidgele aufgetragen, um die Virusproteine einmal mit den monoklonalen anti-Gag- und einmal mit den monoklonalen anti-PRRT-spezifischen Antikörpern nachzuweisen (Abbildung 4.5). Die Westernblotanalysen wurden in vier technischen Replikaten durchgeführt und anschließend quantifiziert. Die Gag129Pol337-Proteine wurden durch die beiden Antikörper nachgewiesen, wobei die anti-PRRT-Antikörper 2,35x sensitiver als die anti-Gag-Antikörper waren (Abbildung 4.5). Die relativen Gag- und PRRT-Mengen der drei unabhängigen chromatographisch gereinigten Proben wurden aus den Werten der vier technischen Replikate berechnet, woraus sich ein Gag/PRRT-Verhältnis von $37,34 \pm 10,64:1$ ergab (Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2: Proteinkomposition von Foamyviren

	Gag/PRRT*	Gag/Env*
relative Mengen	$37,3 \pm 10,6:1$	$4,0 \pm 1,9:1$

* Die Werte wurden von drei unabhängigen Proben in vier Experimenten ermittelt.
 ± Standardabweichung

Die Quantifizierung der einzelnen über Iodixanolgradienten gereinigten Probe resultierte in einem etwas niedrigeren Gag/PRRT-Verhältnis als in den chromatographisch gereinigten Viren ($29,91 \pm 20,75:1$). Wie zu Beginn vermutet wurde, enthalten Foamyviren tatsächlich noch weniger Pol-Proteine als bisher angenommen (Cartellieri et al., 2005a). Die Abweichung der über den Iodixanolgradienten gereinigten Foamyviren ist auf die Quantifizierung einer einzelnen Probe zurückzuführen, was die große Standardabweichung bestätigt.

4.1.4 Foamyviren enthalten deutlich mehr Env-Proteine als Orthoretroviren.

In elektronenmikroskopischen Bildern von Foamyviren sind wesentlich mehr Env-Trimere auf der Oberfläche als bei anderen Retroviren (Wilk et al., 2001; Wilk et al., 2000). Um diesen Sachverhalt zu untersuchen, wurde die oben beschriebene Methode modifiziert, um auch das Verhältnis von Gag- und Env-Proteinen in Foamyviren zu bestimmen. Dafür wurde ein Expressionsplasmid konstruiert, das ein Fusionsprotein aus den N-terminalen 129 Aminosäuren des Gag-Proteins und der SU (Aminosäuren 127-571 des Env-Proteins) kodiert (Abbildung 4.5). Da dieses Gag129SU-Fusionsprotein beide Epitope im Verhältnis 1:1 enthält, wurde es als Standard für die Normalisierung der monoklonalen anti-Gag- und anti-SU-Antikörper verwendet. Mit den Oligonukleotiden AfIIIs und Gag129SUa wurde das 129 Aminosäuren kodierende *gag*-Fragment und mit den Oligonukleotiden Gag129SUs und SUa das SU-kodierende

Fragment amplifiziert. Die beiden überlappenden Produkte wurden in einer PCR mit den Oligonukleotiden AflII_s und SU_a fusioniert, anschließend mit *EcoRI* und *XhoI* verdaut und in einen *EcoRI* und *XhoI* verdauten pco-Vektor ligiert. Das resultierende Plasmid pGag129SU kodiert das Gag129SU-Fusionsprotein aus den 129 N-terminalen Aminosäuren des Gag-Proteins und der SU-Untereinheit von Env, das beide Epitope der monoklonalen Antikörper enthält (Abbildung 4.5). Wie schon für pGag129Pol337 beschrieben, wurden HEK 293T-Zellen mit pGag129SU und peGFP-C1 transfiziert und die Zelllysate hergestellt. Vier Polyacrylamid-SDS-Gele wurden jeweils doppelt mit diesem Zelllysat und drei unabhängigen durch Säulenchromatographie gereinigten Foamyviruslysaten beladen. Nach dem Blotting wurde eine Hälfte der Membran mit dem monoklonalen anti-Gag-Antikörper und die andere Hälfte mit monoklonalen anti-SU-Antikörpern inkubiert. Die Chemilumineszenzsignale von vier Westernblotanalysen wurden durch die CCD-Kamera detektiert und die spezifischen Banden quantifiziert. Nach Berechnung der relativen Mengen und der Standardabweichung ergab sich ein Verhältnis von Gag- zu Env-Proteinen von $4,04 \pm 1,89:1$ (Tabelle 4.2).

4.2 Analyse des Schnittstellenrepertoires der foamyviralen Protease

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen der Gag-p68/p3- und der Pol-RH/IN-Schnittstellen zeigte zwei ähnliche und drei identische Positionen innerhalb der acht Aminosäuren umfassenden Sequenzen (Abbildung 4.6).

	P								
	4'	3'	2'	1'	1	2	3	4	
Gag p68/p3	R	A	V	N	/	T	V	T	Q
Pol RH/IN	Y	V	V	N	/	C	N	T	K
p68/IN	R	A	V	N	/	C	N	T	K
Δ CS	G	A	L	G	/	A	L	G	A

Abbildung 4.6: Die foamyviralen Gag p68/p3- und Pol RH/IN-PR-Schnittstellen sind sehr ähnlich. Aminosäuren der Gag p68/p3-, der Pol RH/IN-, der Hybrid-p68/IN-Schnittstelle und der Δ CS-Sequenz; ■: basische Aminosäuren oder Histidin; ■: kleine oder hydrophobe Aminosäure oder Tyrosin; ■: Hydroxyle, Sulphydrole, Amine oder Glycin

Die starke Homologie der beiden PR-Schnittstellen wies auf ein beschränktes Schnittstellen-Repertoire der foamyviralen PR hin, was möglicherweise die niedrige PR-Konzentration in Foamyviren kompensiert. Um diese Hypothese weiter zu untersuchen, wurden in den folgenden Experimenten die Prozessierungseffizienzen der Gag p68/p3- und der Pol RH/IN-Schnittstellen im Kontext der Gag- und der Pol-Proteine verglichen und die Bedeutung der einzelnen Aminosäurereste in den acht Positionen der PR-Schnittstellen für eine effiziente Maturation der Proteine untersucht. Die Gag p33/p5-Schnittstelle wurde bei den weiteren Experimenten außen vorgelassen, da selbst in gereinigten Viren das Prozessierungsprodukt (ca. 35kDa) nicht

nachweisbar war (Abbildung 4.3). Dieses Produkt war bisher erst einmal in Foamyviren detektiert worden (Pfrepper et al., 1999), während es in einem anderen Experiment ausschließlich in der Zielzelle nach der Infektion nachgewiesen worden war (Lehmann-Che et al., 2005).

4.2.1 Die Gag p68/p3-Schnittstelle ist essenziell für die Bildung infektiöser Viren.

Um die Prozessierungseffizienzen der Schnittstellen vergleichen und den Einfluss des umgebenden Proteins untersuchen zu können, wurde die Gag p68/p3- durch die Pol RH/IN-Schnittstelle ausgetauscht (pGagRH/IN). Dafür wurden Fragmente des pcoPG4-Plasmids mit den Oligonukleotidpaaren GagBstEII_s – GagRH/IN_a oder GagRH/IN_s - Stopp+100a amplifiziert. Die überlappenden Produkte wurden mit GagBstEII_s und Stopp+100a fusioniert, mit *BstEII* und *XhoI* verdaut und in den *BstEII* und *XhoI* geschnittenen pcoPG4-Vektor ligiert. Zusätzlich wurde ein Expressionsplasmid konstruiert, das ein Gag-Protein mit einer Hybrid-p68/IN-Schnittstelle kodiert (pGagp68/IN). In dieser Schnittstelle waren die vier C-terminal der Schnittstelle gelegenen Aminosäuren in den Positionen P1-P4 durch die der Pol RH/IN-Schnittstelle substituiert (Abbildung 4.7). Die Klonierung wurde analog zur Konstruktion des pGagRH/IN-Plasmids mit den Oligonukleotiden GagBstEII_s, Gagp68/IN_a, Gagp68/IN_s und Stopp+100a durchgeführt. Am Vortag ausgesäte HEK 293T-Zellen ($1,8 \times 10^6$) wurden mit 1,5 µg pcoPG4, pGagRH/IN oder pGagp68/IN zusammen mit den Vektorsystemkomponenten pcoPP (0,12 µg), pcoPE (1,2 µg) und pMD9 (6 µg) transfiziert. Nach drei Tagen wurden die Infektiositäten der rekombinanten Viren bestimmt, die Viruspartikel gereinigt und konzentriert und die viralen Proteine in Virus- und Zelllysaten in Westernblotanalysen durch das polyklonale anti-IN-Antiserum und die monoklonalen anti-Gag-Antikörper detektiert (Abbildung 4.7). Die Gag-spezifischen Signale wurden in drei unabhängigen Westernblotanalysen quantifiziert, die Prozessierungseffizienzen berechnet ($p68/(p68+p71)$) und auf die Prozessierung der Gag-Proteine (p68/p3) normalisiert. Durch den gepaarten T-Test wurde die Signifikanz der Unterschiede im Vergleich zur Maturation der Gag-Proteine bestimmt (Abbildung 4.8). Nur etwa 50% der zellulären und 42% der virusassoziierten Gag-Proteine waren prozessiert, was möglicherweise auf die um Faktor zehn reduzierten pcoPP-Mengen zurückzuführen ist. Die RH/IN-Schnittstelle im Gag-Protein wurde in Zell- und Viruslysaten mit der Effizienz der Gag p68/p3-Schnittstelle prozessiert (Abbildungen 4.7-4.8), was ebenfalls in gleicher Infektiosität resultierte (Abbildung 4.8). Die Maturation der virusassoziierten Gagp68/IN-Proteine war mit der Prozessierung der Gag-Proteine vergleichbar, während die Gagp68/IN-Maturation in der Zelle und die Infektiosität der rekombinanten Viren leicht reduziert waren (Abbildungen 4.7-4.8). Im Kontext des Gag-Proteins wurden die Gag p68/p3- und die Pol RH/IN-Schnittstelle mit gleicher Effizienz prozessiert.

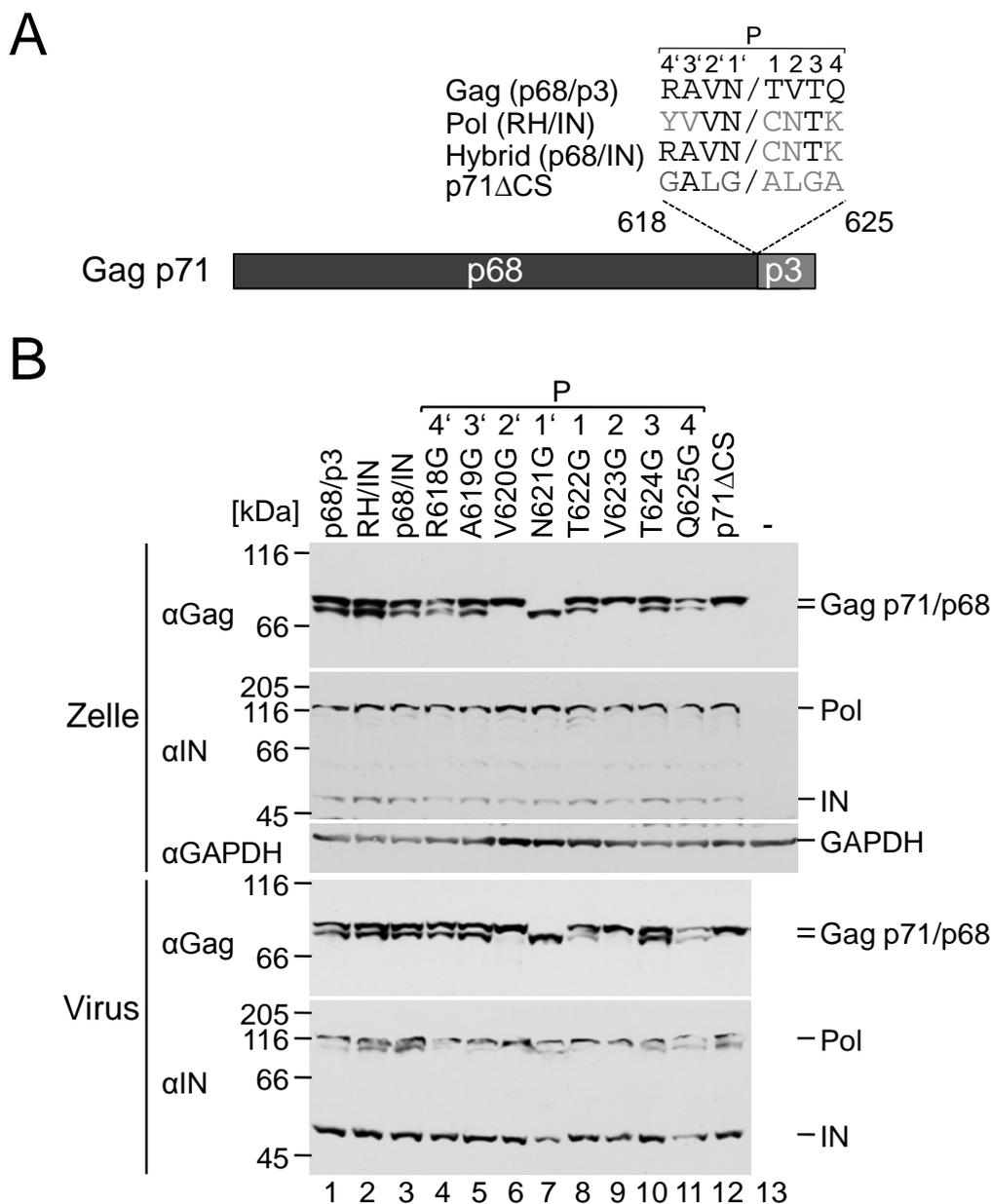


Abbildung 4.7: Die Valinreste in den Positionen P2 und P2' sind essenziell für die Gag-Prozessierung (A) Schematische Darstellung der analysierten Gag-Proteine (B) HEK 293T-Zellen wurden mit pMD9, pcoPE, pcoPP und je einem pcoPG4-Derivat transfiziert. Die Gag- und Pol-Proteine wurden in Westernblotanalysen der Virus- und Zelllysate mit anti-Gag-Antikörpern oder dem anti-IN-Antiserum nachgewiesen. Ladekontrolle: Detektion von GAPDH; links: Positionen des molekularen Größenmarkers (aus Spannaus et al., 2014 - mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

Als nächstes sollten die invarianten Aminosäurereste innerhalb der Gag-p68/p3-Schnittstelle durch einen Glycin-„walk“ identifiziert werden. Dafür wurden Expressionsklone konstruiert, die für Gag-Proteine mit jeweils einer durch Glycin substituierten Aminosäure innerhalb der PR-Schnittstelle (P4'-P4) kodieren (Abbildung 4.7). Glycin wurde gewählt, da lediglich zwei der acht Aminosäuren der Gag p68/p3-Schnittstelle ähnlich zu Glycin sind. Diese Expressionsklone wurden analog zu den GagRH/IN- und Gagp68/IN-Plasmiden kloniert. Die Oligonukleotidpaare für die ersten beiden PCR-Reaktionen waren GagBstEIIIs – R618Ga und R618Gs – Stopp+100a

(für pGagR618G), GagBstEIIIs – A619Ga und A619Gs – Stopp+100a (für pGaga619G), GagBstEIIIs – V620Ga und V620Gs – Stopp+100a (für pGagV620G), GagBstEIIIs – N621Ga und N621Gs – Stopp+100a (für pGagN621G), GagBstEIIIs – T622Ga und T622Gs – Stopp+100a (für pGagT622G), GagBstEIIIs – V623Ga und V623Gs – Stopp+100a (für pGagV623G), GagBstEIIIs – T624Ga und T624Gs – Stopp+100a (für pGagT624G) und GagBstEIIIs – Q625Ga und Q625Gs – Stopp+100a (für pGagQ625G).

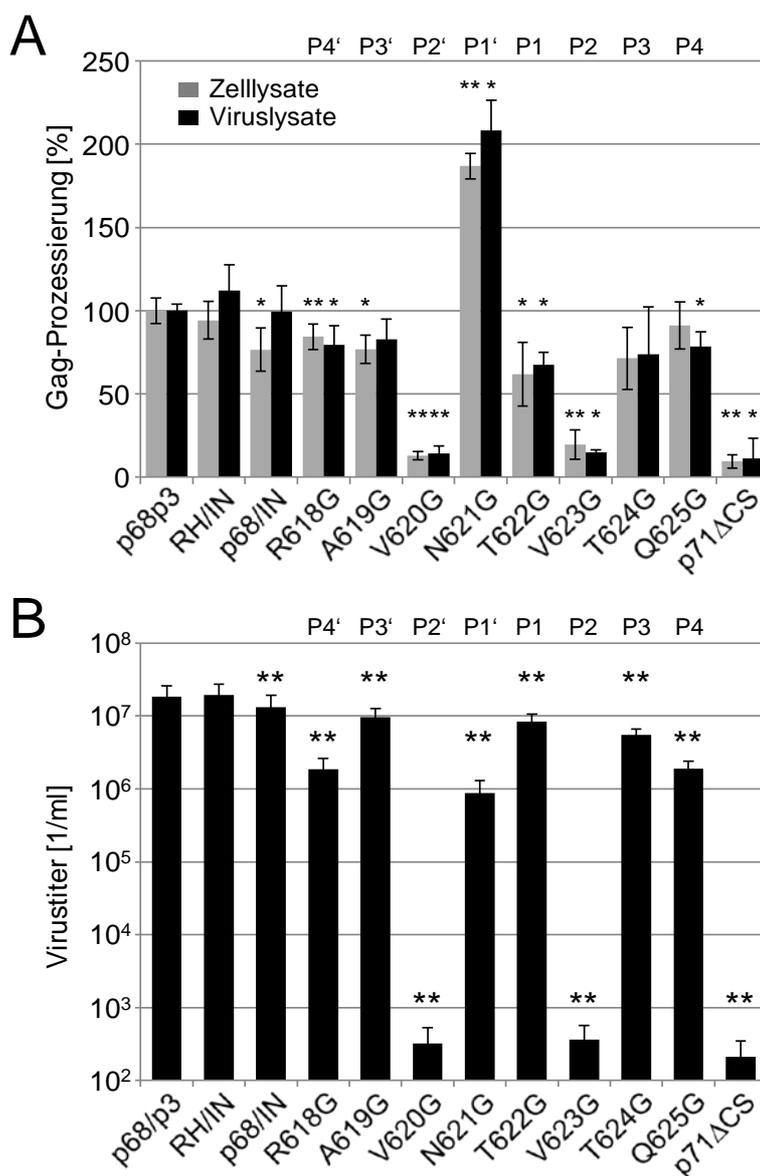


Abbildung 4.8: Die Infektiosität korrelierte mit der Gag-Prozessierung (A) Der Anteil der prozessierten Gag-Proteine in Zell- (graue Balken) und Viruslysaten (schwarze Balken) wurde in drei unabhängigen Experimenten quantifiziert und auf die Prozessierung der Gag-Proteine (Zelllysate: 50%; Viruslysate: 42%) normalisiert. Die Signifikanz der Unterschiede im Vergleich zur Maturation der Gag-Proteine wurde durch gepaarte T-Tests berechnet (ein Stern: p-Wert<0,05; zwei Sterne: p-Wert<0,01). Fehlerbalken: Standardabweichung **(B)** Die Virustiter von drei unabhängigen Experimenten wurden jeweils in Triplikaten bestimmt. Die Signifikanz der Unterschiede im Vergleich zu rekombinanten Viren mit Gag p68/p3-Schnittstellen wurde gekennzeichnet (zwei Sterne: p-Wert<0,01). Fehlerbalken: Standardabweichung (aus Spannaus et al., 2014 - mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

Als Kontrolle wurde ein Gag-Expressionsplasmid mit dem Namen p71 Δ CS konstruiert, das eine nicht funktionelle Schnittstelle (GALG/ALGA) statt der p68/p3-Schnittstelle kodiert. Dieses wurde mit Hilfe der Oligonukleotidpaare GagBstEII - Gag Δ CSa und Gag Δ CSa - Stopp+100a kloniert. Da das Gag p71 Δ CS-Protein im Vergleich zum Gag-Protein in sieben Positionen innerhalb der PR-Schnittstelle verändert wurde, sollte Gag p71 Δ CS kein spaltbares Substrat für die PR sein (Abbildungen 4.6-4.8) und es zeigte sich, dass weder im Zell- noch im Viruslysat Gag p71 Δ CS prozessiert wurde (Abbildungen 4.7-4.8). Da die Gag-Prozessierung essenziell für die Infektiosität foamyviraler Partikel ist (Baldwin and Linial, 1999; Enssle et al., 1997; Lehmann-Che et al., 2005), war die Infektiosität um fünf Größenordnungen im Vergleich zu rekombinanten Viren mit nicht modifizierten Gag-Proteinen reduziert (Abbildung 4.7). Als nächstes wurden die Einzelsubstitutionen zu Glycin innerhalb der Gag p68/p3-Schnittstelle analysiert (Abbildungen 4.7-4.8). Die Versuche ergaben, dass die Pol-Proteine unabhängig von der Gag-Maturation mit der gleichen Effizienz prozessiert wurden (Abbildung 4.7). Die beiden Substitutionen in den Positionen P2' (V620G) und P2 (V623G) resultierten wie p71 Δ CS in nicht nachweisbarer Gag-Maturation (Abbildungen 4.7-4.8). Der Austausch der Aminosäure in Position P1' (N621G) bewirkte eine verstärkte Gag-Prozessierung, sodass keine Gag p71-spezifische Bande durch die Westernblotanalysen detektiert wurde (Abbildungen 4.7-4.8). Diese effizientere Maturation resultierte in der Reduktion der Infektiosität um mehr als eine Größenordnung (Abbildung 4.8). Des Weiteren wurde festgestellt, dass die Gag-Maturation direkt mit der Infektiosität der rekombinanten Viruspartikel korrelierte und dass die Gag-Prozessierung in Zell- und Viruslysaten immer ähnlich effizient war (Abbildungen 4.7-4.8). Innerhalb der Gag p68/p3-Schnittstelle waren die beiden Valinreste in den Positionen P2' und P2 eindeutig die kritischen Determinanten für die Maturation der Proteine.

4.2.2 Die Gag p68/p3- und die Pol RH/IN-Schnittstellen werden mit vergleichbarer Effizienz prozessiert.

Im folgenden Experiment wurden die Prozessierungseffizienzen der Pol RH/IN- und der Gag p68/p3-Schnittstellen im Kontext des Pol-Proteins untersucht. Durch Sequenzvergleich der Pol-RH/IN-Schnittstelle und der Hybrid p68/IN-Schnittstelle wurde gezeigt, dass diese in sechs Positionen identisch sind, während die Pol RH/IN-Schnittstelle und die Δ CS-Sequenz vier ähnliche Positionen aufweisen (Abbildung 4.6).

Analog zu den Untersuchungen der Gag-p68/p3-Schnittstelle wurde diesmal die Nukleotidsequenz der Pol RH/IN-Schnittstelle im pcoPP-Plasmid durch Sequenzen kodierend für die Gag p68/p3-, die Hybrid p68/IN-Schnittstelle und die Δ CS-Sequenz (GALG/ALGA) ausgetauscht. Dafür wurden Fragmente des pcoPP-Plasmids mit den Oligonukleotidpaaren PolBamHI_s - Polp68/p3a oder Polp68/p3s - Stopp+100a, PolBamHI_s - Polp68/INa oder Polp68/INs -

Stopp+100a und PolBamHIs – Pol Δ CSa oder Pol Δ CSs - Stopp+100a amplifiziert. Die jeweils überlappenden Produkte wurden in PCRs mit PolBamHIs und Stopp+100a fusioniert, anschließend mit *Bam*HI und *Xho*I verdaut und in den *Bam*HI und *Xho*I geschnittenen pcoPP-Vektor ligiert, wobei die daraus resultierenden Pol-Expressionsplasmide pPolp68/p3, pPolp68/IN und pPol Δ CS genannt wurden (Abbildung 4.9).

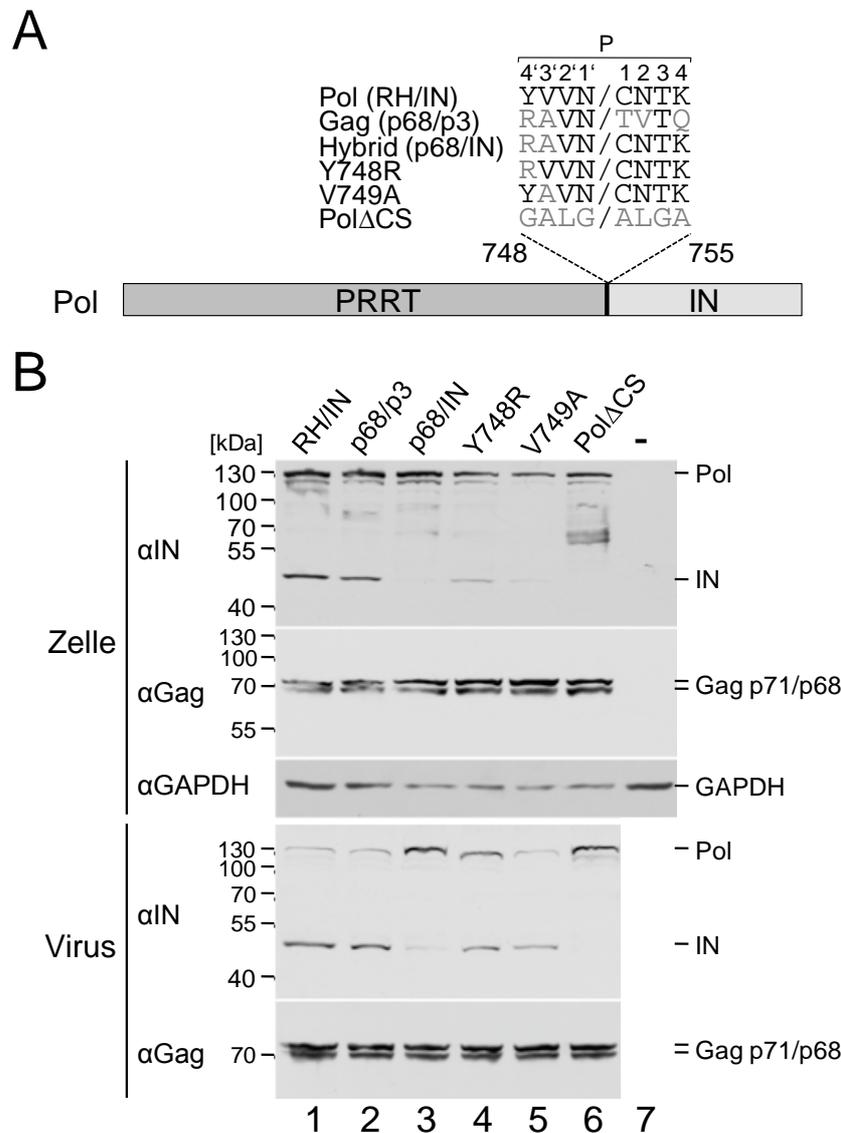


Abbildung 4.9: Im Kontext des Pol-Proteins wird die Hybrid p68/IN-Schnittstelle nicht prozessiert (A) Schematische Darstellung der analysierten PR-Schnittstellen im Pol-Protein **(B)** HEK 293T-Zellen wurden mit pMD9, pcoPE, pcoPG4 und je einem der unter A dargestellten pcoPP-Derivaten transfiziert. Die Gag- und Pol-Proteine wurden in Westernblotanalysen der Virus- und Zellysate mit anti-Gag-Antikörpern und dem anti-IN-Antiserum nachgewiesen. Ladekontrolle: Detektion von GAPDH; links: Positionen des molekularen Größenmarkers (aus Spannaus et al., 2014 - mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

Am Vortag ausgesäte HEK 293T-Zellen ($1,8 \times 10^7$) wurden mit $0,12 \mu\text{g}$ dieser Konstrukte oder pcoPP und den Vektorsystemplasmiden pMD9 ($6 \mu\text{g}$), pcoPG4 ($3 \mu\text{g}$) und pcoPE ($1,2 \mu\text{g}$) transfiziert. Nach drei Tagen wurden die Infektiositäten bestimmt und die Viruspartikel, wie

bereits beschrieben, aufbereitet. Die viralen Proteine wurden in den Zell- und Viruslysaten in Westernblotanalysen mit den monoklonalen anti-Gag-Antikörpern und dem polyklonalen anti-IN-Antiserum detektiert (Abbildung 4.9). Die Pol-Prozessierung wurde in drei unabhängigen Versuchen durch Quantifizierung der Pol- und IN-spezifischen Banden bestimmt (IN/(Pol+IN)) und auf die Maturation der Pol-Proteine (RH/IN) normalisiert (Abbildung 4.10).

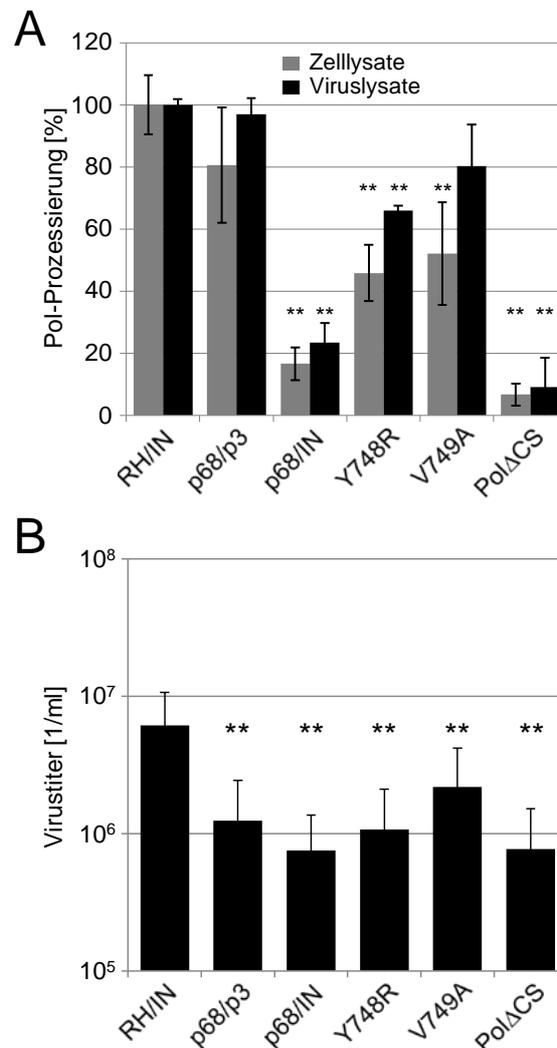


Abbildung 4.10: Die Infektiosität korreliert mit der Pol-Prozessierung. (A) Der Anteil der prozessierten Pol-Proteine in Zell- (graue Balken) und Viruslysaten (schwarze Balken) wurde in drei unabhängigen Experimenten quantifiziert und die Werte auf die Prozessierung der Pol-Proteine (Zelllysate: 45%; Viruslysate: 76%) normalisiert. Die Signifikanz der Unterschiede zur Pol-Maturation wurde durch den gepaarten T-Test berechnet (zwei Sterne: p-Wert<0,01). Fehlerbalken: Standardabweichung (B) Die Virustiter wurden in drei unabhängigen Experimenten jeweils in Triplikaten bestimmt und die Signifikanz der Unterschiede im Vergleich zu rekombinanten Viren gekennzeichnet (zwei Sterne: p-Wert<0,01). Fehlerbalken: Standardabweichung (aus Spannaus et al., 2014 - mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

Durch den gepaarten T-Test wurde die Signifikanz der Unterschiede der Prozessierungseffizienzen im Vergleich zur Pol-Maturation bestimmt (Abbildung 4.10). In den Lysaten aus transfizierten Zellen (Vektorsystem) wurden 45% und in den korrespondierenden Viruslysaten

76% prozessierte IN-Proteine nachgewiesen. Obwohl die Polp68/p3-Proteine mit gleicher Effizienz prozessiert wurden, war die Infektiosität signifikant reduziert (Abbildungen 4.9-4.10), wohingegen die Maturation und die Infektiosität der Polp68/IN-Proteine auf das Niveau der PolΔCS-Kontrolle reduziert waren (Abbildungen 4.9-4.10). In den Westernblotanalysen war gut zu erkennen, dass die zellulären Pol-Proteine mit viel niedrigerer Effizienz prozessiert wurden als partikelassoziierte Pol-Proteine (Abbildung 4.9). Dieser starke Unterschied beruhte möglicherweise auf der höheren Pol-Konzentration in den Viren. Wie schon im Kontext des Gag-Proteins wurden einerseits die Gag p68/p3- und die Pol RH/IN-Schnittstelle mit vergleichbarer Effizienz prozessiert (Abbildungen 4.7-4.10), andererseits war auch die Gag-Maturation unabhängig von der Pol-Prozessierung (Abbildung 4.9). Diese Ergebnisse zeigten, dass im Gegensatz zu HIV-1 der Zeitpunkt der foamyviralen Gag- und Pol-Maturation nicht durch unterschiedliche Prozessierungseffizienzen der Schnittstellen reguliert wurde. Die Hybrid p68/IN-Schnittstelle wurde im Gag-Kontext mit nahezu gleicher Effizienz wie die Gag-Proteine prozessiert, während die Maturation der Polp68/IN-Proteine im Vergleich zur Prozessierung der Pol-Proteine stark reduziert war (Abbildungen 4.7-4.10).

Da sich die Pol RH/IN- nur in zwei Positionen von der Hybrid-p68/p3-Schnittstelle unterscheidet (Abbildung 4.6), wurden zusätzlich die Einzelsubstitutionen PolY748R (Position P4') und PolV749A (Position P3') analysiert (Abbildung 4.9). Die Konstruktion dieser Expressionsplasmide erfolgte analog zur Klonierung der anderen pcoPP-Derivate. Für die ersten beiden PCR-Reaktionen wurden die Oligonukleotidpaare PolBamHIs - Y748Ra und Y748Rs - Stopp+100a (für pPoly748R) und PolBamHIs - V749Aa und V749As - Stopp+100a (für pV749A) benutzt. Beide Proteine wurden in den Zell- und Viruslysaten mit höherer Effizienz als die Polp68/IN- aber mit niedrigerer Effizienz als die Pol-Proteine prozessiert (Abbildung 4.9-4.10). Die Infektiosität der rekombinanten Viruspartikel mit PolY748R- war nur etwas höher als die mit Polp68/IN-Proteinen, während Viren mit PolV749A-Proteinen signifikant höhere Infektiosität aufwiesen (Abbildung 4.10). Die Reduktion der Pol-Maturation und der Infektiosität der rekombinanten Viren mit der Pol-Hybrid-Schnittstelle war wahrscheinlich ein kumulativer Effekt der beiden Einzelsubstitutionen. Die vergleichsweise effizientere Prozessierung der Hybrid-p68/IN-Schnittstelle im Gag-Protein resultierte vermutlich aus der leichteren Erreichbarkeit durch die Protease auf Grund der C-terminalen Position im Gag-Protein (Abbildungen 4.7-4.10). Innerhalb der Gag p68/p3-Schnittstelle wurden die Valine in den Positionen P2' und P2 strikt für die Gag-Prozessierung benötigt. Um auch die für die Pol-Maturation essenziellen Aminosäurereste zu identifizieren, wurden die Expressionskonstrukte für die Einzelsubstitutionen durch Glycin innerhalb der Pol RH/IN-Schnittstelle kloniert (Abbildung 4.11).

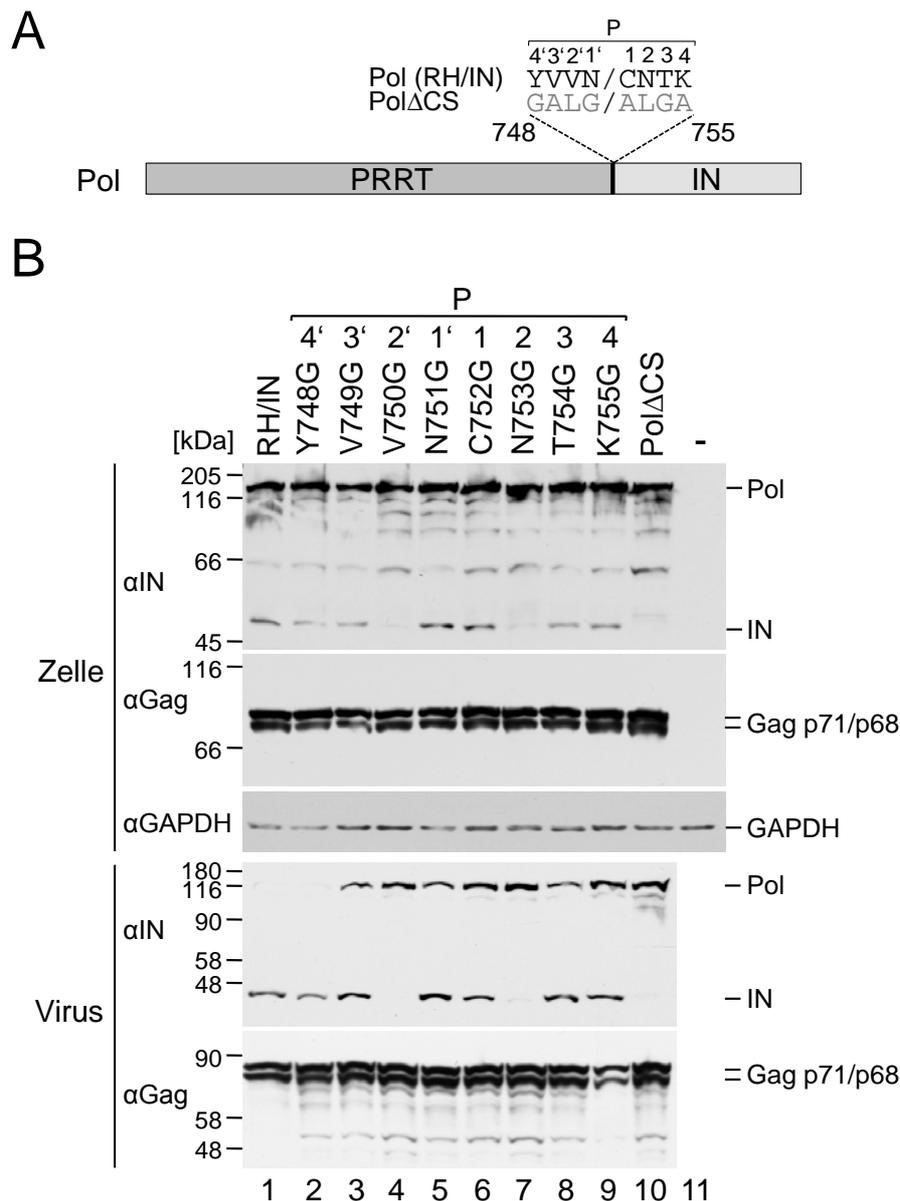


Abbildung 4.11: Der Asparaginrest in Position P2 und besonders der Valinrest in Position P2' sind essenziell für die Pol-Prozessierung. (A) Schematische Darstellung der analysierten Pol-Proteine (B) HEK 293T-Zellen wurden mit pMD9, pcoPE, pcoPG4 und je einem der pcoPP-Derivate transfiziert. Die Gag- und Pol-Proteine wurden in Westernblotanalysen der Virus- und Zellysate mit anti-Gag-Antikörpern und dem anti-IN-Antiserum nachgewiesen. Ladekontrolle: Detektion von GAPDH, links: Positionen des molekularen Größenmarkers (aus Spannaus et al., 2014 - mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

In der Pol-RH/IN-Schnittstelle sind nur zwei Aminosäuren ähnlich zu Glycin. Die Klonierung erfolgte analog zur Konstruktion der anderen pcoPP-Derivate, nur dass für die ersten beiden PCR-Reaktionen die Oligonukleotidpaare PolBamHIs - Y748Ga und Y748Gs - Stopp+100a (für pPolY748G), PolBamHIs - V749Ga und V749Gs - Stopp+100a (für pPolV749G), PolBamHIs - V750Ga und V750Gs - Stopp+100a (für pPolV750G), PolBamHIs - N751Ga und N751Gs - Stopp+100a (für pPolN751G), PolBamHIs - C752Ga und C752Gs - Stopp+100a (für pPolC752G), PolBamHIs - N753Ga und N753Gs - Stopp+100a (für pPolN753G), PolBamHIs - T754Ga und T754Gs - Stopp+100a (für pPolT754G) und PolBamHIs - K755Ga und K755Gs - Stopp+100a (für

pPolK755G) verwendet wurden. Am Vortag ausgesäte HEK 293T-Zellen ($1,8 \times 10^7$) wurden wie zuvor mit $0,12 \mu\text{g}$ dieser Plasmide oder pcoPP und den Vektorsystemkomponenten pMD9 ($6 \mu\text{g}$), pcoPG4 ($3 \mu\text{g}$) und pcoPE ($1,2 \mu\text{g}$) transfiziert. Nach drei Tagen wurden die Infektiositäten bestimmt, die Viruspartikel aufbereitet und zusammen mit den Zelllysaten in Westernblotanalysen untersucht (Abbildung 4.11). Durch die niedrige Effizienz der Pol-Maturation in den Zelllysaten waren nur die Banden der virusassoziierten Pol-Proteine zuverlässig zu quantifizieren (Abbildung 4.11-4.12).

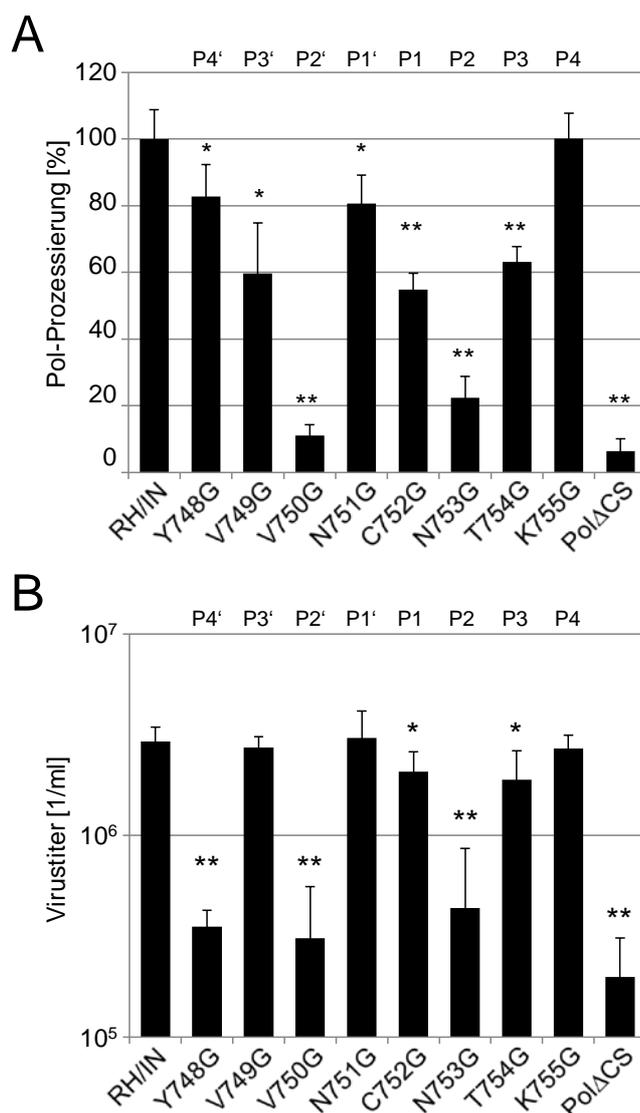


Abbildung 4.12: Die nichtprozessierbare Pol RH/IN-Schnittstelle resultierte in verminderter Infektiosität um eine Größenordnung. (A) Der Anteil der prozessierten Pol-Proteine in den Viruslysaten (schwarze Balken) wurde in drei unabhängigen Experimenten quantifiziert und die Werte auf die Prozessierung der Pol-Proteine (Viruslysate: 75%) normalisiert. Die Signifikanz der Unterschiede im Vergleich zur Pol-Maturation wurde durch den gepaarten T-Test berechnet (ein Stern: p -Wert $< 0,05$; zwei Sterne: p -Wert $< 0,01$). Fehlerbalken: Standardabweichung. (B) Die Virustiter wurden in drei unabhängigen Experimenten jeweils in Triplikaten bestimmt und die Signifikanz der Unterschiede im Vergleich zur Infektiosität rekombinanter Viren gekennzeichnet (ein Stern: p -Wert $< 0,05$; zwei Sterne: p -Wert $< 0,01$). Fehlerbalken: Standardabweichung (aus Spannaus et al., 2014 - mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

Die Substitution in Position P2' (PolV750G) resultierte, ähnlich wie im Gag-Protein, in Prozessierung und Infektiosität vergleichbar mit den Δ CS-Proteine (Abbildungen 4.11-4.12). Den zweitstärksten Einfluss auf Pol-Maturation und Infektiosität hatte der Aminosäureaustausch in Position P2 (PolN753G), jedoch war die Reduktion nicht so prominent wie bei den PolN751G- oder Pol Δ CS-Proteinen (Abbildungen 4.11-4.12). Für die anderen Substitutionen konnte zusammenfassend festgestellt werden, dass die Infektiosität sich proportional zur Pol-Maturation verhielt (Abbildungen 4.11-4.12), wobei nur der Austausch in Position P4' trotz effizienter Prozessierung in reduzierter Infektiosität resultierte (Abbildungen 4.11-4.12). Ein ähnlicher Effekt wurde bereits für die Polp68/p3-Proteine festgestellt, bei denen ebenfalls unter anderem der Aminosäurerest in Position P4 substituiert wurde (Abbildungen 4.9-4.10). Diese Reduktion der Infektiosität beruht also nicht auf fehlerhafter Pol-Prozessierung, vielmehr wurde, da das Tyrosin in Position P4' Bestandteil der C-terminalen α -Helix der RH-Domäne ist, durch dessen Substitution wahrscheinlich die RH- und/oder die RT-Funktion beeinträchtigt (Leo et al., 2012a; Leo et al., 2012b). Wie schon im Kontext des Gag-Proteins konnte auch für das Pol-Protein gezeigt werden, dass die Aminosäurereste in den Positionen P2 (Asparagin) und ganz besonders in P2' (Valin) entscheidend für die Pol-Maturation waren (Abbildungen 4.7-4.8, 4.11-4.12). Bei den Gag p68/p3- und Pol RH/IN- Schnittstellen resultierten die Substitutionen in den Positionen P4', P1' und P4 in fast unveränderter Prozessierung. Im Kontext des Pol-Proteins führte der Austausch der Aminosäurereste in den Positionen P3', P1 und P3 zu reduzierter Pol-Maturation (Abbildungen 4.11-4.12), während die Substitutionen in den gleichen Positionen innerhalb der Gag p68/p3-Schnittstelle viel schwächeren Einfluss auf die Gag-Prozessierung hatten (Abbildungen 4.7-4.8).

4.3 Infektiöse foamyvirale Viruspartikel enthalten unprozessierte Gag-Proteine.

Während foamyvirale Pol-Proteine in den Viruspartikeln nahezu vollständig prozessiert werden, ist die Gag-Maturation weniger effizient (Cartellieri et al., 2005a; Abbildungen 4.7-4.12). Um den Zusammenhang von Gag-Prozessierung und Infektiosität zu untersuchen, wurden HEK 293T-Zellen ($1,8 \times 10^7$) mit verschiedenen Verhältnissen von p71 Δ CS und dem Gag p68-kodierenden Expressionsplasmid p68 an Stelle von pcoPG4 zusammen mit den restlichen Vektorsystemplasmiden pMD9 (6 μ g), pcoPG4 (3 μ g) und pcoPE (1,2 μ g) transfiziert (Abbildung 4.13). Für die Klonierung des Gag p68-Expressionskonstruktes wurde ein Fragment des pcoPG4-Plasmids mit den Oligonukleotiden GagBstEII_s und p68XhoI_a in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Das Produkt wurde mit *BstEII* und *XhoI* verdaut und anschließend in den *BstEII* und *XhoI* geschnittenen pcoPG4-Vektor ligiert. Die Gag p71- und Gag p68-spezifischen Banden wurden in drei unabhängigen Experimenten in Westernblotanalysen quantifiziert, die Prozessierungseffizienz berechnet (Gag p68/(p68+p71)) und auf die Gag-Maturation virusproduzierender

Zellen einer FV-Kokultur (83% prozessierte Gag-Proteine) bzw. der gereinigten Foamyviren (85% prozessierte Gag-Proteine) standardisiert (Abbildungen 4.13-4.14). Die Signifikanz der Unterschiede der Prozessierungseffizienzen im Vergleich zum Wildtyp wurde durch gepaarte T-Tests bestimmt (Abbildung 4.14). Die Gag-Prozessierung in den Zelllysaten war der in den Viruslysaten sehr ähnlich (Abbildungen 4.13-4.14). Im Vergleich zu den Wildtypviren wurde eine leicht reduzierte Gag-Maturation in den rekombinanten Viren nachgewiesen (Abbildungen 4.13-4.14).

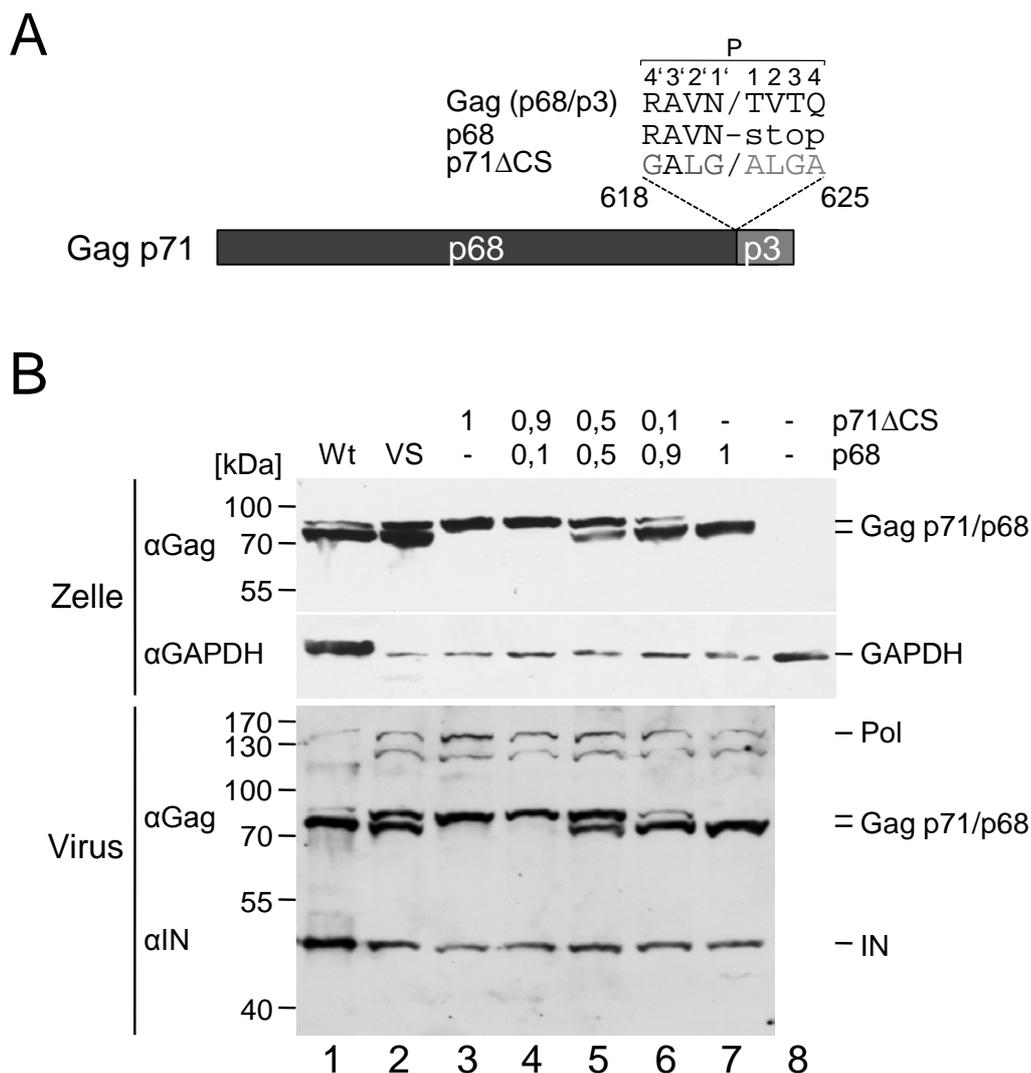


Abbildung 4.13: Die Gag-Prozessierung in Foamyviren ist effizienter als in rekombinanten Viren mit Gag (A) Schematische Darstellung der analysierten Gag-Proteine **(B)** HEK 293T-Zellen wurden mit pMD9, pcoPE, pcoPP und pcoPG4 oder verschiedenen Verhältnissen von p68 und p71ΔCS (in µg angegeben) transfiziert. Die Gag- und Pol-Proteine wurden mit anti-Gag-Antikörpern und dem anti-IN-Antiserum in Westernblotanalysen detektiert. Ladekontrolle: Nachweis von GAPDH; links: Positionen des molekularen Größenmarkers; Wt: Foamyviren aus Kokultur; VS: rekombinante Viren mit Gag (aus Spannaus et al., 2014 - mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

Rekombinante Viruspartikel mit ausschließlich p71 Δ CS Gag waren nicht infektiös, während die Deletion des p3-Peptids (Gag p68) in einer Reduktion der Infektiosität um Faktor zehn im Vergleich zu rekombinanten Viren mit Gag-Proteinen resultierte (Abbildungen 4.13-4.14). Dieses Phänomen wurde bereits für die GagN621G-Substitution in der Position P1' beschrieben (Abbildungen 4.7-4.8). Die höchste Infektiosität wurde für rekombinante Viren mit dem Wildtyp-Gag p71/p68-Verhältnis von 1:6 detektiert (Abbildungen 4.13-4.14). Jedoch konnte selbst mit diesem Gag p71/p68-Verhältnis die Infektiosität rekombinanter Viren mit Gag-Proteinen nicht erreicht werden (Abbildungen 4.13-4.14).

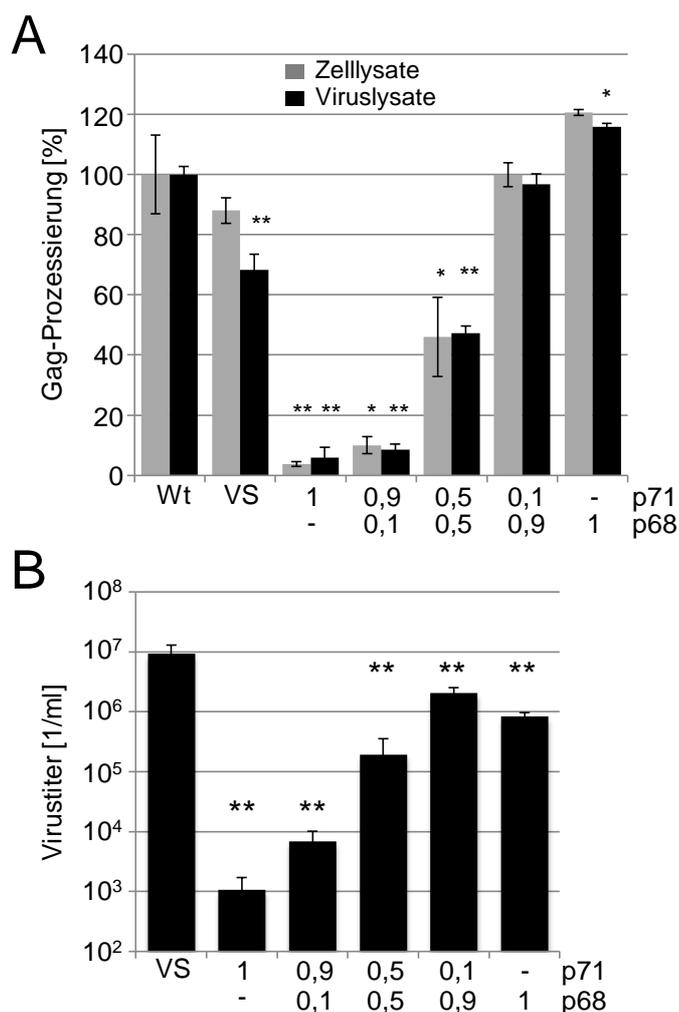


Abbildung 4.14: Kleine Mengen unprozessierter Gag-Proteine werden für die höchste Infektiosität benötigt. (A) Die relativen Gag-Mengen (p68/(p71+p68)) in den Zell- (graue Balken) und Viruslysaten (schwarze Balken) wurden in drei unabhängigen Experimenten quantifiziert und die Werte auf die Gag-Prozessierung der Foamyviren (Zelllysate: 85%; Viruslysate: 83%) normalisiert. Die Signifikanz der Unterschiede im Vergleich zur Wildtypprozessierung wurde durch den gepaarten T-Test berechnet (ein Stern: p-Wert<0,05; zwei Sterne: p-Wert<0,01). Fehlerbalken: Standardabweichung (B) Die Infektiositäten der rekombinanten Viren wurden in drei unabhängigen Experimenten in Triplikaten bestimmt und die Signifikanz der Unterschiede zu rekombinanten Viren gekennzeichnet (zwei Sterne: p-Wert<0,01). Wt = Foamyviren aus der Kokultur; VS = rekombinante Foamyviren; Fehlerbalken: Standardabweichung (aus Spannaus et al., 2014 - mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

4.4 Die foamyvirale reverse Transkription wird durch die Gag-Maturation reguliert.

Die Gag-Prozessierung ist essenziell für die Infektiosität (Baldwin and Linial, 1999; Enssle et al., 1997), während durch die Deletion des p3-Peptids die Infektiosität um lediglich eine Größenordnung reduziert wurde (Abbildungen 4.13-4.14). Deshalb wurde vermutet, dass das p3-Peptid möglicherweise eine regulatorische Funktion während der RT-Reaktion erfüllt. Jedoch hatten Experimente ergeben, dass p3-Peptide die RT-Reaktion nicht beeinflussen (pers. Mitteilung Frau Prof. Birgitta Wöhr). Deshalb wurde im folgenden Experiment analysiert, ob die RT-Reaktion von der Gag-Prozessierung abhängt.

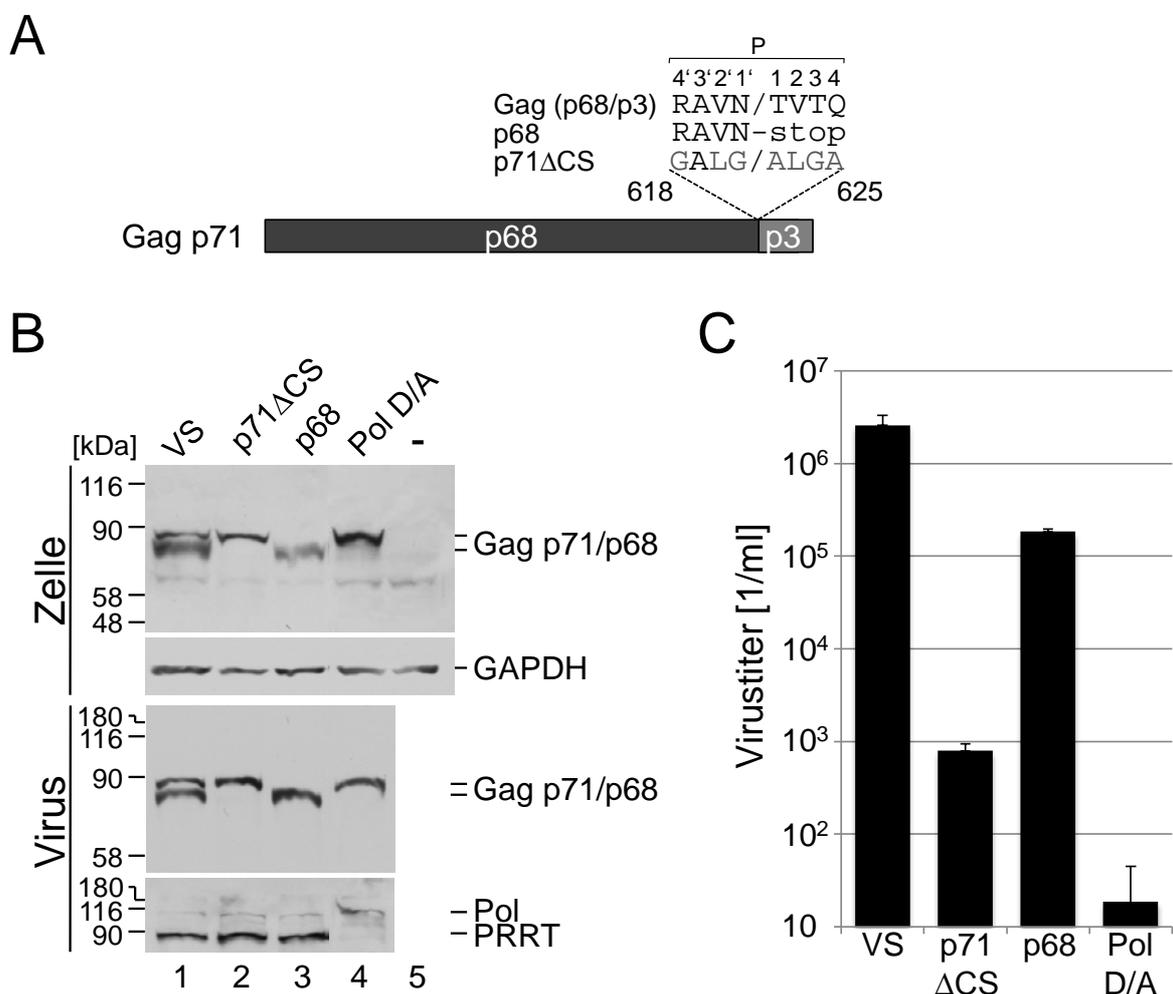


Abbildung 4.15: Die PolD/A-Substitution resultiert in unprozessierten Gag- und Pol-Proteinen sowie stark reduzierter Infektiosität. (A) Schematische Darstellung der analysierten Proteine (B) HEK 293T-Zellen wurden mit pMD9, pcoPE, pcoPP oder pPolD/A und pcoPG4, p68 oder p71ΔCS transfiziert. Gag- und Pol-Proteine wurden in Westernblotanalysen der Virus- und Zellysate mit anti-Gag- und anti-PRRT-Antikörpern nachgewiesen. Ladekontrolle: Detektion von GAPDH; links: Positionen des molekularen Größenmarkers (C) Die Virustiter wurden in Triplikaten ermittelt. Fehlerbalken: Standardabweichung (aus Spannaus et al., 2013 - mit freundlicher Genehmigung von ASM)

Als Negativkontrolle wurde das pPolD/A-Plasmid konstruiert, das ein Pol-Protein mit inaktiver PR kodiert. Dafür wurde ein Fragment aus dem pcoPP-Plasmid mit den Oligonukleotiden AflIIs und PolNarIa in einer PCR-Reaktion amplifiziert, mit *AflII* und *NarI* verdaut und in den *AflII* und *NarI*-geschnittenen pcoPP-Plasmid ligiert. Das resultierende pPolD/A-Plasmid kodiert ein Pol-Protein mit einer D24A-Substitution im aktiven Zentrum der PR-Domäne, was zur Inaktivierung der foamyviralen PR führt (Konvalinka et al., 1995a). Am Vortag ausgesäte HEK 293T-Zellen wurden ($1,8 \times 10^6$) mit dem foamyviralen Vektorsystem transfiziert. Neben den Vektorsystemplasmiden wurde im zweiten Ansatz pcoPG4 durch p71 Δ CS, im dritten Ansatz pcoPG4 durch p68 und im vierten Ansatz pcoPP durch pPolD/A ersetzt (Abbildung 4.15). Nach drei Tagen wurde die Infektiosität bestimmt und die Zellysate wurden hergestellt. Die rekombinanten Viruspartikel wurden durch die Capto Core700-Säulen partiell gereinigt, durch Zentrifugation pelletiert und in PBS aufgenommen. Anschließend erfolgte ein DNaseI-Verdau der verbliebenen zellulären DNA und der Plasmid-DNA. Jeweils 10% der Viruspartikel wurden lysiert und danach zusammen mit den entsprechenden Zellysaten in Westernblotanalysen durch die monoklonalen anti-Gag- und anti-PRRT-Antikörper auf Prozessierung der viralen Proteine untersucht (Abbildung 4.15).

Die Deletion der Gag p71/p68-Schnittstelle zeigte unprozessierte Gag-Proteine und stark reduzierte Infektiosität, während die Deletion des C-terminalen p3-Peptids die Infektiosität nur leicht beeinflusste (Abbildungen 4.15). Die Substitution im aktiven Zentrum der foamyviralen PR-Domäne resultierte in unprozessierten Gag- und Pol-Proteinen und reduzierter Infektiosität um fünf Größenordnungen (Abbildung 4.15). Die Gag-spezifischen Banden wurden quantifiziert und die Virusfraktionen auf die Gag-Menge normalisiert. Anschließend wurden jeweils gleiche Virusmengen in verschiedene PCR-Reaktionen eingesetzt. In den ersten Amplifikationen wurden die RU5-spezifischen Oligonukleotide (RU5s und RU5a) benutzt, um das Produkt der ersten Teilreaktion der RT-Reaktion zu detektieren (Abbildung 4.16). In allen rekombinanten Viren konnte eine RU5-spezifische Bande nachgewiesen werden (Abbildung 4.16). Das bedeutete, dass die Initiation und die Elongation der „strong-stop“-DNA in negativer Orientierung unabhängig von der Gag- oder Pol-Prozessierung waren. In den nächsten PCR-Reaktionen wurden die U3-spezifischen Oligonukleotide U3s und U3a eingesetzt (Abbildung 4.16). Die U3-Region wird nach dem ersten Templatwechsel revers transkribiert (Abbildung 4.16). Neben den rekombinanten Viruspartikeln wurde lediglich in Viren mit Gag p68-Proteinen eine U3-spezifische Bande nachgewiesen (Abbildung 4.16). Weder in Partikeln mit Gag p71 Δ CS-Proteinen noch in Viren mit PolD/A-Proteinen wurde die RT-Reaktion nach dem ersten Templatwechsel fortgesetzt. Die PCR Reaktionen wurden von Theresa Brunner durchgeführt.

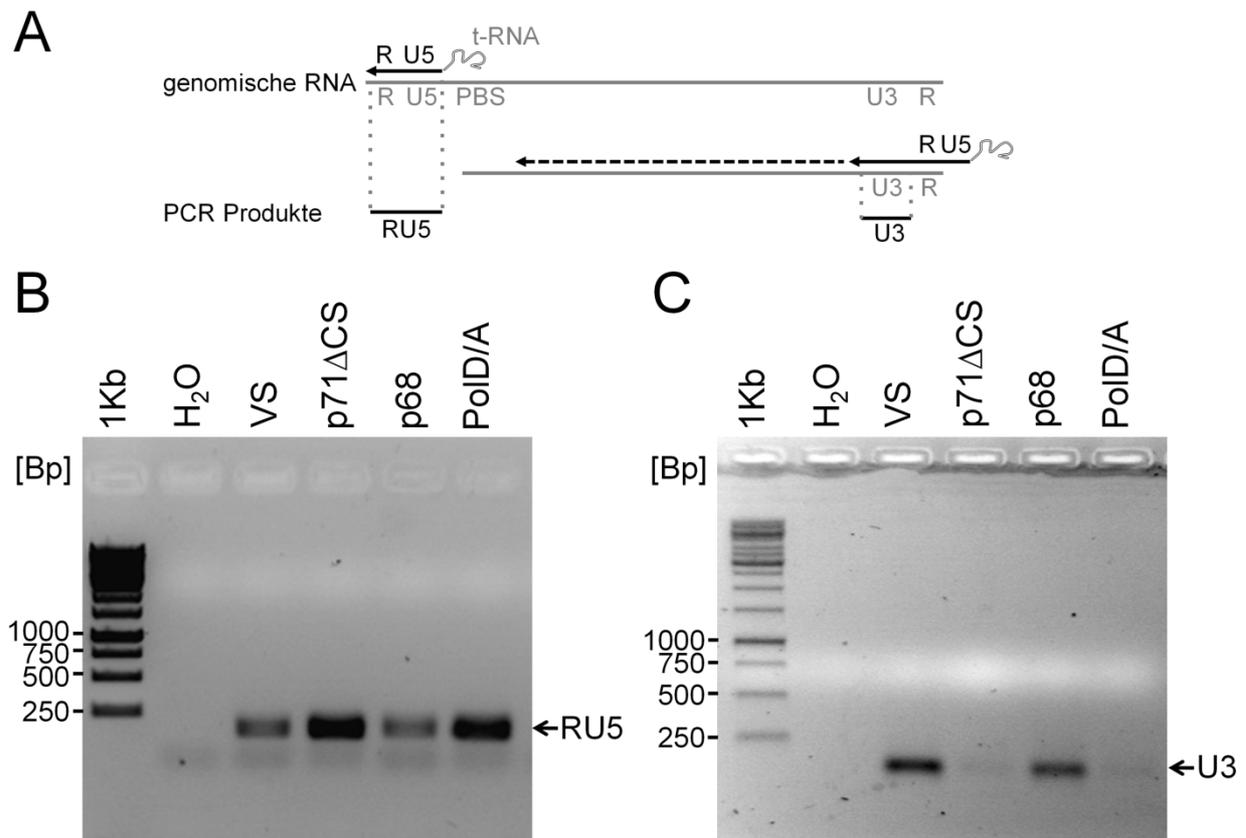


Abbildung 4.16: Die reverse Transkription ist abhängig von der Gag-Prozessierung. (A) Schema des ersten Schrittes der RT-Reaktion und der Position der nachgewiesenen DNA-Fragmente (B) Die Gag-spezifischen Signale (Abbildung 4.15) wurden quantifiziert, um anschließend jeweils die gleichen Virusmengen mit RU5-spezifischen Oligonukleotiden in PCR-Reaktionen zu analysieren. (C) Die gleichen Virusmengen wie in B wurden mit U3-spezifischen Oligonukleotiden in PCR-Reaktionen analysiert. VS: rekombinante Foamyviren (Vektorsystem) (aus Spannaus et al., 2013 - mit freundlicher Genehmigung von ASM; Durchführung: Theresa Brunner)

4.5 Die Integrase ist nicht notwendig für die Proteaseaktivität.

Nach der Analyse der PR-Schnittstellen und der Funktion der foamyviralen Gag- und Pol-Prozessierung sollte in den folgenden Experimenten untersucht werden, welche Pol-Domänen für eine aktive PR benötigt werden. Bei Orthoretroviren ist die aktive Form der viralen PR ein symmetrisches Homodimer aus zwei PR-Untereinheiten (Katoh et al., 1989; Katoh et al., 1987; Miller et al., 1989; Navia et al., 1989; Pearl and Taylor, 1987). Für die foamyvirale PR wurde in *in vitro*-Experimenten gezeigt, dass für ihre Aktivierung die spezifische Interaktion von PRRT-Fusionsproteinen mit PARM benötigt wird (Hartl et al., 2011). Möglicherweise wird durch diesen Mechanismus verhindert, dass die virale PR vor der Virusassemblierung aktiv ist. Auf der anderen Seite wurde publiziert, dass die IN-Domäne für die Dimerisierung der Pol-Proteine und somit für die PR-Aktivierung benötigt wird (Lee et al., 2011). Da beide Modelle sich widersprechen, wurde auf verschiedenen Wegen analysiert, welche Pol-Domänen *in vivo* für die Aktivierung der foamyviralen PR essentiell sind.

4.5.1 Das Fusionsprotein aus Protease und reverser Transkriptase in Kombination mit der genomischen RNA ist ausreichend für Proteaseaktivität *in vivo*.

Um die IN-kodierende Sequenz im Pol-Expressionsplasmid zu deletieren, wurde ein pcoPP-Fragment mit den Oligonukleotiden PolBamHIs und PRRTStoppa amplifiziert, mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Xho*I verdaut und anschließend in den *Bam*HI und *Xho*I geschnittenen pcoPP-Vektor ligiert. Das resultierende Plasmid pPRRT kodiert das PRRT-Fusionsprotein aus PR- und RT-Domäne (Abbildung 4.17). HEK 293T-Zellen (6×10^5) wurden in 6-Napf-Platten ausgesät und am folgenden Tag in verschiedenen Ansätzen mit pcoPP (0,05 μ g) oder pPRRT (0,1/0,2 μ g) und dem Gag-Expressionsplasmid pcoPG4 (0,5 μ g) transfiziert. Um den Einfluss des viralen Genoms auf die PR-Aktivität zu zeigen, wurde zusätzlich in je einen Ansatz pMD9 (1 μ g) kotransfiziert (Abbildung 4.17).

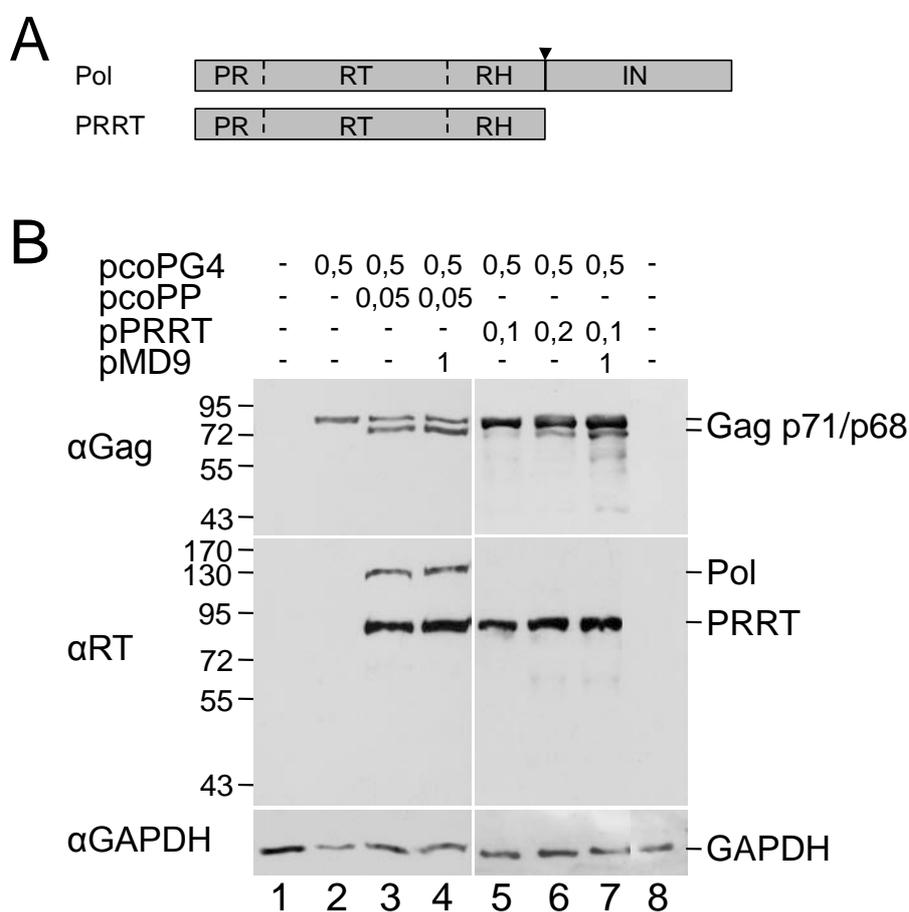


Abbildung 4.17: Das PRRT-Fusionsprotein ist ausreichend für die PR-Aktivierung. (A) Schema des Pol- und des PRRT-Proteins (B) HEK 293T-Zellen wurden mit pcoPG4, pMD9 und pcoPP oder pPRRT transfiziert (DNA-Mengen in μ g). Die Gag- und Pol-Proteine wurden mit monoklonalen anti-Gag- und anti-PRRT-Antikörpern in Westernblotanalysen nachgewiesen. Ladekontrolle: Detektion von GAPDH; links: Positionen des molekularen Größenmarkers in kDa (aus Spannaus et al., 2012 - mit freundlicher Genehmigung von ASM)

Nach zwei Tagen wurden die Gag- und Pol-Proteine in den Zelllysaten und deren Prozessierung mit den monoklonalen anti-Gag- und anti-PRRT-Antikörpern in Westernblotanalysen nachgewiesen. Nicht nur die Pol- sondern auch die PRRT-Proteine waren ausreichend um Gag-Proteine zu prozessieren (Abbildung 4.17), wobei durch das Vektorgenom die schwachen PR-Aktivitäten der PRRT-Proteine verstärkt wurden (Abbildung 4.17). Demnach ist die IN-Domäne *in vivo* nicht essenziell für die PR-Aktivität. Die niedrige PR-Aktivität ohne Genom wurde bereits beschrieben und beruht wahrscheinlich auf der starken zellulären Überexpression der Pol-Proteine durch das kodonoptimierte pcoPP-Plasmid (Hartl et al., 2011). Im direkten Vergleich war die Gag-Prozessierung durch die Pol-Proteine effizienter als durch die PRRT-Fusionsproteine.

4.5.2 Die Integrase-deletion im proviralen Kontext resultierte in Gag-Prozessierung in den Viruspartikeln.

Um die Ergebnisse zu bestätigen, wurde im folgenden Experiment die Gag-Prozessierung einer IN-Deletion im proviralen Kontext untersucht. Außerdem sollte analysiert werden, ob PRRT-Proteine auch in foamyvirale Viruspartikel inkorporiert werden und dort die Prozessierung der Gag-Proteine katalysieren. Durch ortsspezifische Mutagenese wurde in das *pol*-Leseraster des proviralen pHSRV13-Plasmids ein Stoppkodon direkt 3' der Nukleotidsequenz der RH/IN-Schnittstelle inseriert, wozu eine ortsspezifische Mutagenese-PCR mit den Oligonukleotiden HSRVPacIs, HSRVAsiSIa, HSRVAsiSIs und HSRVBspEIa durchgeführt wurde. Das Fusionsprodukt wurde mit *PacI* und *BspEI* verdaut und in den *PacI* und *BspEI* geschnittenen pHSRV13-Vektor ligiert. Dieses pHSRV13AsiSI-Plasmid (mit einer *AsiSI*-Schnittstelle vor der IN-kodierenden Sequenz) wurde mit *AsiSI* verdaut und mit dem hybridisierten selbstkomplementären Oligonukleotid pStop ligiert. Das resultierende Plasmid pHSRV13 Δ IN kodiert das PRRT-Fusionsprotein im proviralen Kontext. Am Vortag ausgesäte BHK-Zellen (je $1,5 \times 10^7$) wurden mit je 45 μ g der proviralen Plasmide pHSRV13 oder pHSRV13 Δ IN transfiziert. Nach drei Tagen wurden die Virusüberstände abgenommen und die Viren durch Zentrifugation ($201149 \times g$, 4°C , 2h) pelletiert. Die Viruspellets und die virusproduzierenden Zellen wurden mit RIPA-Puffer lysiert. Die Expression, Prozessierung und Inkorporation der Gag- und Pol-Proteine wurden in Westernblotanalysen mit monoklonalen anti-PRRT- und anti-Gag-Antikörpern nachgewiesen (Abbildung 4.18). Die Deletion der IN-Domäne führte zu reduzierten zellulären PRRT-Mengen, während die Pol-Inkorporation nur schwach beeinträchtigt wurde (Abbildung 4.18). Die Gag-Prozessierung durch das PRRT-Fusionsprotein war in den Zelllysaten kaum nachweisbar, während in den Viruslysaten eine deutliche p68-spezifische Bande detektiert wurde (Abbildung 4.18). Demnach ist auch in foamyviralen Partikeln die IN nicht essenziell für PR-Aktivität.

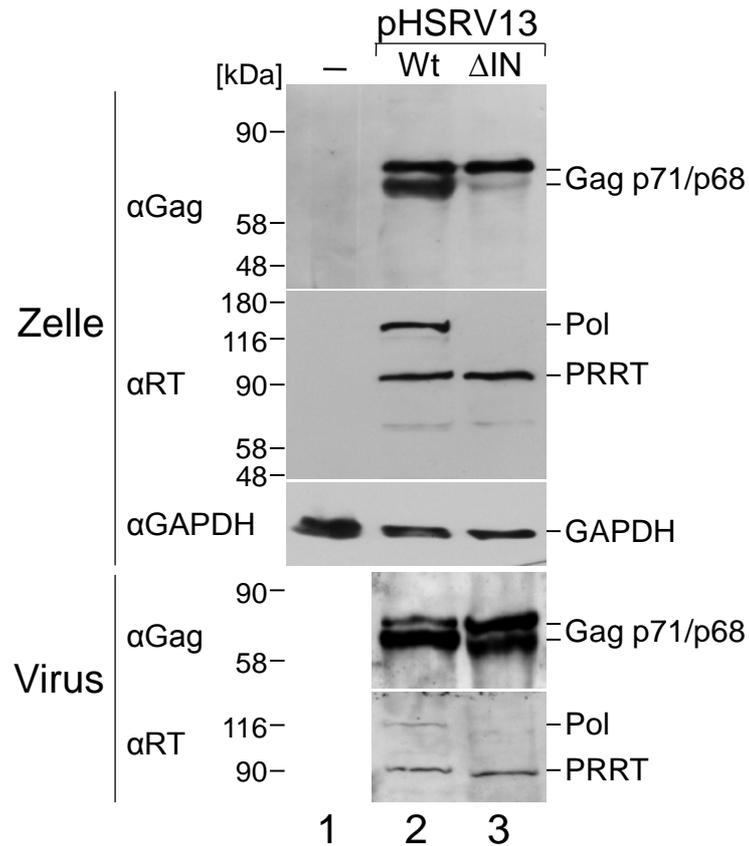


Abbildung 4.18: Die Inkorporation von PRRT-Proteinen resultiert in PR-Aktivität in foamyviralen Partikeln. BHK-Zellen wurden mit dem pHSRV13 oder dem Expressionsklon für die IN-defiziente Mutante pHSRV13ΔIN transfiziert. Durch Westernblotanalysen mit monoklonalen anti-Gag- und anti-PRRT-Antikörpern wurden die Gag- und Pol-Proteine in den Virus- und Zellysaten nachgewiesen. Ladekontrolle: Detektion von GAPDH; links: Positionen des molekularen Größenmarkers (aus Spannaus et al., 2012 - mit freundlicher Genehmigung von ASM)

4.5.3 Die Infektiosität von rekombinanten Viren mit GagPol-Fusion oder separat exprimierten Proteinen resultierte in annähernd gleichen Virustitern.

Die Pol-Inkorporation ist von der IN und dem Genom abhängig (Baldwin and Linial, 1998; Peters et al., 2005; Roy and Linial, 2007). Um die PR-Aktivität in rekombinanten Viren unabhängig von unterschiedlich effizienter Pol- und PRRT-Inkorporation untersuchen zu können, wurden die *gag*- und *pol*-Leseraster fusioniert. Damit Gag und Pol im Virus prozessiert werden können, wurde an Pol eine N-terminale Gag p68/p3-Schnittstelle kloniert. Dazu wurde ein Fragment des pcoPP-Plasmids mit den Oligonukleotiden PolHpaI und PolHIIa amplifiziert, mit *Bam*HI geschnitten und in das *Bam*HI- und *Hpa*I-verdaute pcoPP-Plasmid ligiert. In das *Hpa*I verdaute Produkt (pCSPol) wurde anschließend ein *Hpa*I-geschnittenes Fragment aus pcoPG4 ligiert, das mit den Oligonukleotiden GagHpaI und GagHw/oStoPa amplifiziert wurde. Das resultierende pGagPol-Plasmid kodiert das Fusionsprotein aus Gag und Pol, verbunden durch eine Gag p68/p3- Schnittstelle (Abbildung 4.19). Mit diesem Konstrukt wurde untersucht, ob die Expression als GagPol-Fusionsprotein in effizienter Pol-Inkorporation und in der Bildung

infektiöser rekombinanter Viruspartikel resultiert. Zu diesem Zweck wurden am Vortag ausgesäte HEK 293T-Zellen in 6-Napf-Platten (je 6×10^5) mit pMD9 (1 μ g), pGagPol (2 μ g) und pcoPE (0,2 μ g) transfiziert. Da wie bei HIV-1 für die korrekte Assemblierung der Viruspartikel möglicherweise auch Gag-Proteine benötigt werden (Müller et al., 2009), wurden zusätzlich verschiedene Mengen pcoPG4 (0; 0,25; 0,5 μ g) kotransfiziert. Als Positivkontrolle diente das foamyvirale Vektorsystem. Die Infektiosität der Viruspartikel wurde in Triplikaten bestimmt (Abbildung 4.19).

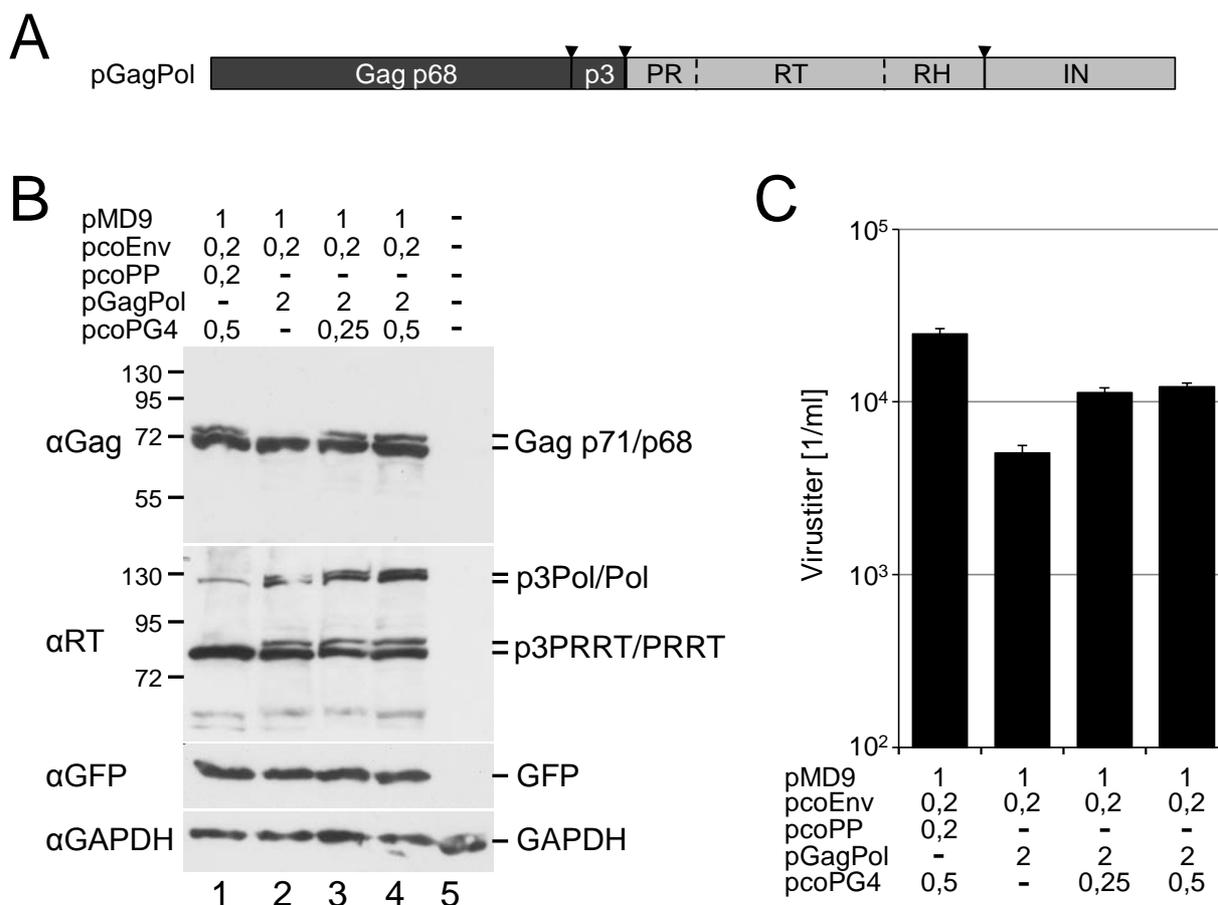


Abbildung 4.19: Die Expression von Pol als GagPol-Fusionsprotein resultierte in infektiösen Viruspartikeln. (A) Schema des GagPol-Fusionsproteins; Pfeile: Positionen der PR-Schnittstellen (B) HEK 293T-Zellen wurden neben dem Vektorsystem (Spur 1) mit pMD9, pcoPE, pGagPol und ansteigenden Mengen pcoPG4 transfiziert (DNA-Mengen in μ g). Durch Westernblotanalysen mit monoklonalen anti-Gag- und anti-PRRT-Antikörpern wurden die Gag-, Pol-, und GagPol-Proteine nachgewiesen. Ladekontrolle: Detektion von GAPDH; Transfektionskontrolle: Detektion von GFP; links: Positionen des molekularen Größenmarkers in kDa (C) Die Virustiter wurden in Triplikaten ermittelt. Fehlerbalken: Standardabweichung (aus Spannaus et al., 2012 - mit freundlicher Genehmigung von ASM)

Bereits das GagPol-Fusionsprotein allein resultierte in infektiösen Viren (Abbildung 4.19). Durch die zusätzliche Kotransfektion von pcoPG4 wurde die Infektiosität auf einen Wert gesteigert, der vergleichbar mit dem Virustiter des herkömmlichen Vektorsystems war (Abbildung 4.19). Das zeigte, dass im foamyviralen Vektorsystem mit pGagPol kein zusätzliches Pol benötigt wurde. Um zu überprüfen, ob Proteinmenge und Prozessierung ebenfalls mit den separat exprimierten

Proteine vergleichbar waren, wurden Westernblotanalysen mit Hilfe der monoklonalen anti-Gag- und anti-PRRT-Antikörper durchgeführt (Abbildung 4.19). Die Gag- und Pol-Proteinmengen waren vergleichbar mit den einzeln exprimierten Proteinen (Abbildung 4.19). Die jeweils etwas größeren Banden über den PRRT- und den Pol-Banden in den pGagPol-Zellysaten waren wahrscheinlich unvollständig prozessierte Pol- und PRRT-Proteine mit N-terminalen p3-Peptid (Abbildung 4.19). Hingegen wurde im GagPol-positiven Zellysate ohne zusätzliche Gag-Proteine keine Gag p71-Bande detektiert (Abbildung 4.19). Erst durch die Kotransfektion von zusätzlichen pcoPG4 wurden Gag p71- und Gag p68-spezifische Banden in ähnlichem Verhältnis wie bei den separat exprimierten Proteinen detektiert (Abbildung 4.19). Wahrscheinlich ist das Fehlen des p71 Gag der Grund für die reduzierte Infektiosität der rekombinanten Viren mit den GagPol-Fusionsproteinen ohne zusätzliches Gag-Protein (Abbildung 4.19). Wie zuvor gezeigt, resultierte ein Gagp71/p68-Verhältnis von 1:6 in foamyviralen Viruspartikeln mit maximierter Infektiosität (Abbildungen 4.13-4.14).

4.5.4 Die GagPol-Fusion ermöglicht genomunabhängige Pol-Inkorporation.

Im nächsten Experiment wurde analysiert, ob die Pol-Inkorporation vom GagPol-Fusionsprotein tatsächlich genomunabhängig ist und ob für die Freisetzung der rekombinanten Viruspartikel mit GagPol-Fusionsproteinen ebenfalls Env-Proteine benötigt werden (Baldwin and Linial, 1998; Fischer et al., 1998). Am Vortag ausgesäte HEK 293T-Zellen (je $1,8 \times 10^6$) wurden entweder mit dem Vektorsystem ($3 \mu\text{g}$ pMD9, $1,5 \mu\text{g}$ pcoPG4, $0,6 \mu\text{g}$ pcoPE, $0,6 \mu\text{g}$ pcoPol) oder mit pGagPol ($6 \mu\text{g}$), pMD9 ($3 \mu\text{g}$), pcoPG4 ($1,5 \mu\text{g}$) und pcoPE ($0,6 \mu\text{g}$) transfiziert. Für beide Kombinationen wurde der Einfluss der Env-Proteine und des Vektorgenoms untersucht (Abbildung 4.20). Nach drei Tagen wurden die Virusüberstände abgenommen und die Viruspartikel konzentriert. Die viralen Proteine in Virus- und Zellysaten wurden anschließend durch Westernblotanalysen mit monoklonalen anti-Gag- und anti-PRRT-Antikörpern detektiert (Abbildung 4.20). Die Prozessierung der Gag-, Pol-, und GagPol-Proteine war, vermutlich auf Grund der starken *pol*-Überexpression, unabhängig vom Vektorgenom. Wie zu erwarten war, wurden alle rekombinanten Viren nur in Anwesenheit von Env-Proteinen freigesetzt (Abbildung 4.20). Während für die Pol-Proteine ohne Vektorgenom lediglich eine sehr schwache, wahrscheinlich unspezifische Inkorporation detektiert wurde, erfolgte durch die GagPol-Fusionsproteine eine genomunabhängige Pol-Aufnahme in die rekombinanten Viruspartikel (Abbildung 4.20). Beim Vergleich der Pol-Mengen in den Viren ist eine effizientere Pol-Inkorporation durch die GagPol-Fusionsproteine erkennbar (Abbildung 4.20). Durch dieses Experiment wurde gezeigt, dass die GagPol-Fusionsproteine nicht vor der Pol-Inkorporation in Gag- und Pol-Proteine prozessiert wurden, sondern die Gag-abhängige Pol-Inkorporation ohne zusätzliche Pol-Expression ausreichend für die Bildung foamyviraler Partikel war.

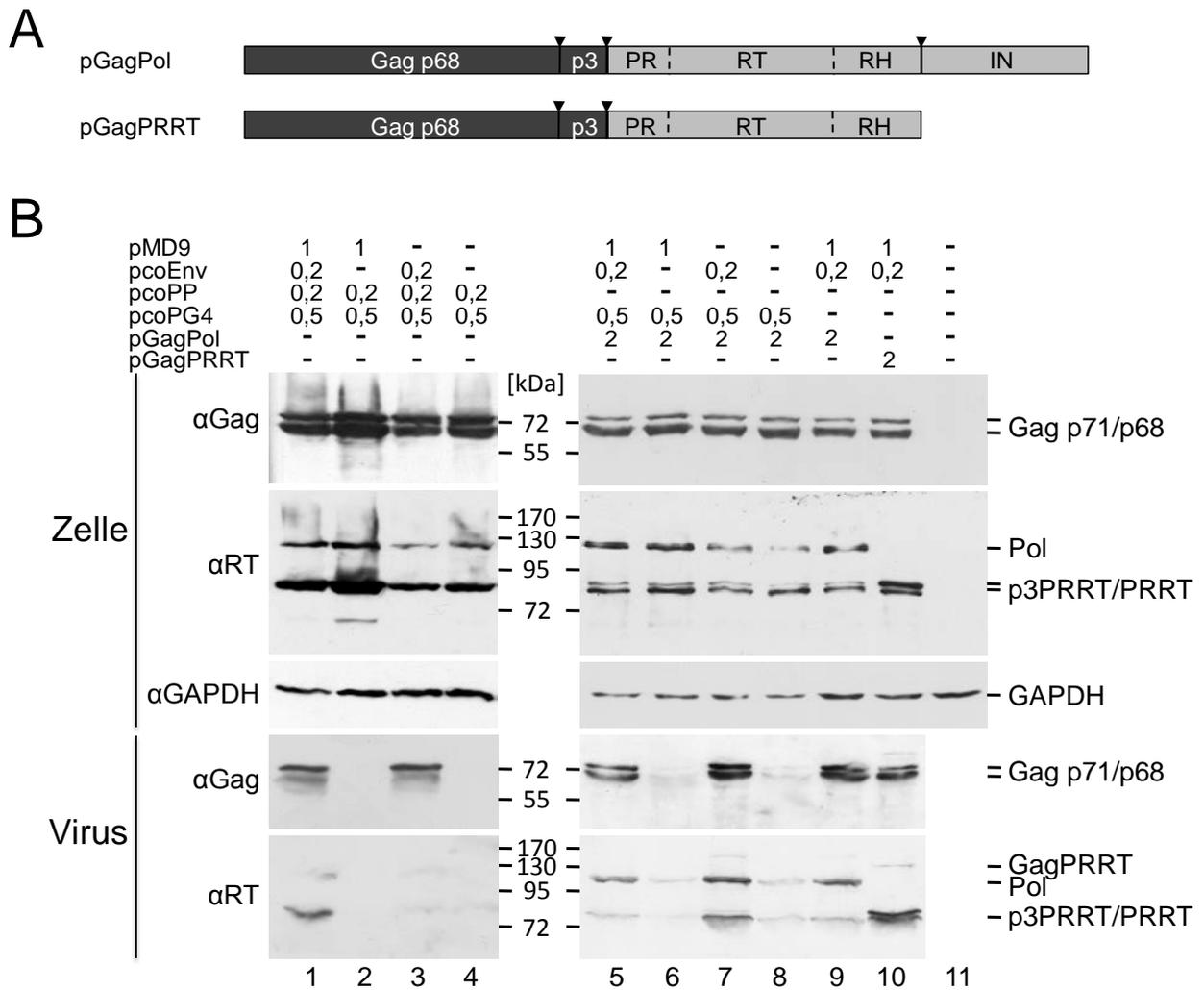


Abbildung 4.20: Die Pol-Inkorporation von GagPol- und GagPRRT-Fusionsproteinen ist genomunabhängig. (A) Schema des GagPol- und des GagPRRT-Fusionsproteins; Pfeile: Positionen der PR-Schnittstellen (B) HEK 293T-Zellen wurden entweder mit dem Vektorsystem oder mit pGagPol jeweils mit und ohne pcoPE und pMD9 oder mit GagPRRT, pcoPE und pMD9 transfiziert (DNA-Mengen in μg). Durch Westernblotanalysen mit monoklonalen anti-Gag- und anti-PRRT-Antikörpern wurden die Gag-, Pol- und GagPol-Proteine in den Virus- und Zellysaten nachgewiesen. Ladekontrolle: Detektion von GAPDH; Mitte: Positionen des molekularen Größenmarkers (aus Spannaus et al., 2012 - mit freundlicher Genehmigung von ASM)

4.5.5 Vergleich der Proteaseaktivitäten von Pol- und PRRT-Proteinen in viralen Partikeln

Um die PR-Aktivitäten im Kontext des Pol- oder des PRRT-Fusionsproteins unabhängig von der Inkorporationseffizienz zu vergleichen, wurde analog zum pGagPol- das pGagPRRT-Plasmid konstruiert. Damit Gag und PRRT im Virus prozessiert werden können, wurde an PRRT eine N-terminale Gag p68/p3-Schnittstelle kloniert. Dazu wurde ein Fragment des pcoPP-Plasmids mit den Oligonukleotiden PolHpals und Pol Δ INNotIa in einer PCR-Reaktion amplifiziert, mit *NotI* verdaut und in den *NotI* und *HpaI* geschnittenen pcoPP-Vektor ligiert. In das *HpaI*-geschnittene Produkt pCSPRRT wurde anschließend das *HpaI*-verdaute Fragment aus pcoPG4 ligiert, das mit den Oligonukleotiden GagHpals und Gagw/oStopa amplifiziert wurde. Das resultierende pGagPRRT-Plasmid kodiert das Fusionsprotein aus Gag, einer zusätzlichen Gag p68/p3-

Schnittstelle und PRRT (Abbildung 4.20). Wie im letzten Experiment wurden HEK 293T-Zellen (je $1,8 \times 10^6$) mit pGagPol oder pGagPRRT zusammen mit pMD9, pcoPG4 und pcoPE transfiziert. Die Virus- und Zellysate wurden anschließend in Westernblotanalysen auf Gag- und Pol-Mengen sowie Prozessierung untersucht (Abbildung 4.20). Beide Fusionsproteine wurden mit vergleichbarer Effizienz exprimiert, während die Gag-abhängige Inkorporation der Pol- bzw. PRRT-Proteine in vergleichbaren Pol-Mengen in den Viruslysaten resultierte (Abbildung 4.20). Die Gag-Prozessierung in den Virus- und Zellysaten war in beiden Proben identisch (Abbildung 4.20). Durch die GagPRRT-Fusion wurde unterschiedlich effiziente Pol-Inkorporation ausgeschlossen, was in vergleichbarer PR-Aktivität durch das PRRT- und das Pol-Protein resultierte. Demnach ist PRRT im Viruspartikel für die PR-Aktivität ausreichend.

4.5.6 Die Komplementation der Proteaseaktivität in *trans* resultierte in infektiösen rekombinanten Viren.

Durch die GagPRRT-Expression zusammen mit *env*, *gag* und dem Vektorgenom wurde zwar mit Pol vergleichbare Gag-Prozessierung nachgewiesen, doch waren diese rekombinanten Viruspartikel auf Grund der deletierten IN nicht infektiös. Deshalb wurde die IN durch ein Fusionsprotein aus Gag und IN in *trans* komplementiert. Dazu wurden Fragmente aus dem pcoPP-Plasmid mit den Oligonukleotiden Gag/INs und Stopp+100a und aus dem pcoPG4-Plasmid mit den Oligonukleotiden GagBstEII_s und Gag/Ina amplifiziert und in einer PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden GagBstEII_s und Stopp+100a fusioniert. Das BstEII und XbaI verdaute Produkt wurde in den BstEII und XbaI geschnittenen pcoPG4-Vektor ligiert. Das resultierende pGagIN-Plasmid kodiert ein Fusionsprotein, bestehend aus Gag, einer zusätzlichen Gag p68/p3-PR-Schnittstelle und der IN-Domäne (Abbildung 4.21). Am Vortag ausgesäte HEK 293T-Zellen ($1,8 \times 10^6$) wurden mit pMD9 (3 μ g), pcoPE (0,6 μ g) und pGagPol (6 μ g) oder statt pGagPol mit je 3 μ g von pGagPRRT und pGagIN transfiziert. Die viralen Proteine in Virus- und Zellysaten wurden durch Westernblotanalysen mit monoklonalen anti-Gag- und anti-PRRT-Antikörpern detektiert und die Infektiosität der rekombinanten Viren wurde bestimmt. Auch in diesem Experiment waren die PRRT-Proteine ausreichend, um die GagPRRT- und GagIN-Fusionsproteine zu prozessieren (Abbildung 4.21). Durch die Fusion von Gag-Protein und IN wurde die Inkorporation der IN erreicht (Abbildung 4.21). Im Vergleich zur Positivkontrolle mit dem Gag-Pol-Fusionsprotein war die Infektiosität der rekombinanten Viruspartikel jedoch um drei Größenordnungen reduziert (Abbildung 4.21), was möglicherweise auf reduzierter Inkorporation des Vektorgenoms beruhte. Es ist denkbar, dass die Pol-RNA-Bindung auf additiven Interaktionen des Pol-Proteins im Bereich der PRRT und der IN beruhen und somit alle RNA-bindenden Motive in einem Protein enthalten sein müssen. Deshalb wurde im nächsten Versuch die IN durch die Kotransfektion des PR-Aktivität-defizienten pGagPolD/A- statt des

pGagIN-Plasmids in *trans* komplementiert, womit in diesem Versuch komplette Pol-Proteine enthalten waren (Abbildung 4.21). Die Konstruktion des pGagPolD/A-Plasmids wurde analog zur Klonierung des pGagPol-Vektors durchgeführt, nur dass statt pcoPP das pPolD/A-Plasmid benutzt wurde. HEK 293T-Zellen wurden mit pcoPE (0,6 μ g), pMD9 (3 μ g), pGagPolD/A (3 μ g) und pGagPRRT (3 μ g) transfiziert. Durch die aktive PR-Domäne des Gag-PRRT-Fusionsproteins wurden sowohl die Gag-PRRT-Proteine als auch in *trans* die GagPolD/A-Proteine prozessiert (Abbildung 4.21). Die Kombination dieser beiden Fusionsproteine mit Env-Proteinen und Vektorgenom resultierte in infektiösen Viruspartikeln (Abbildung 4.21).

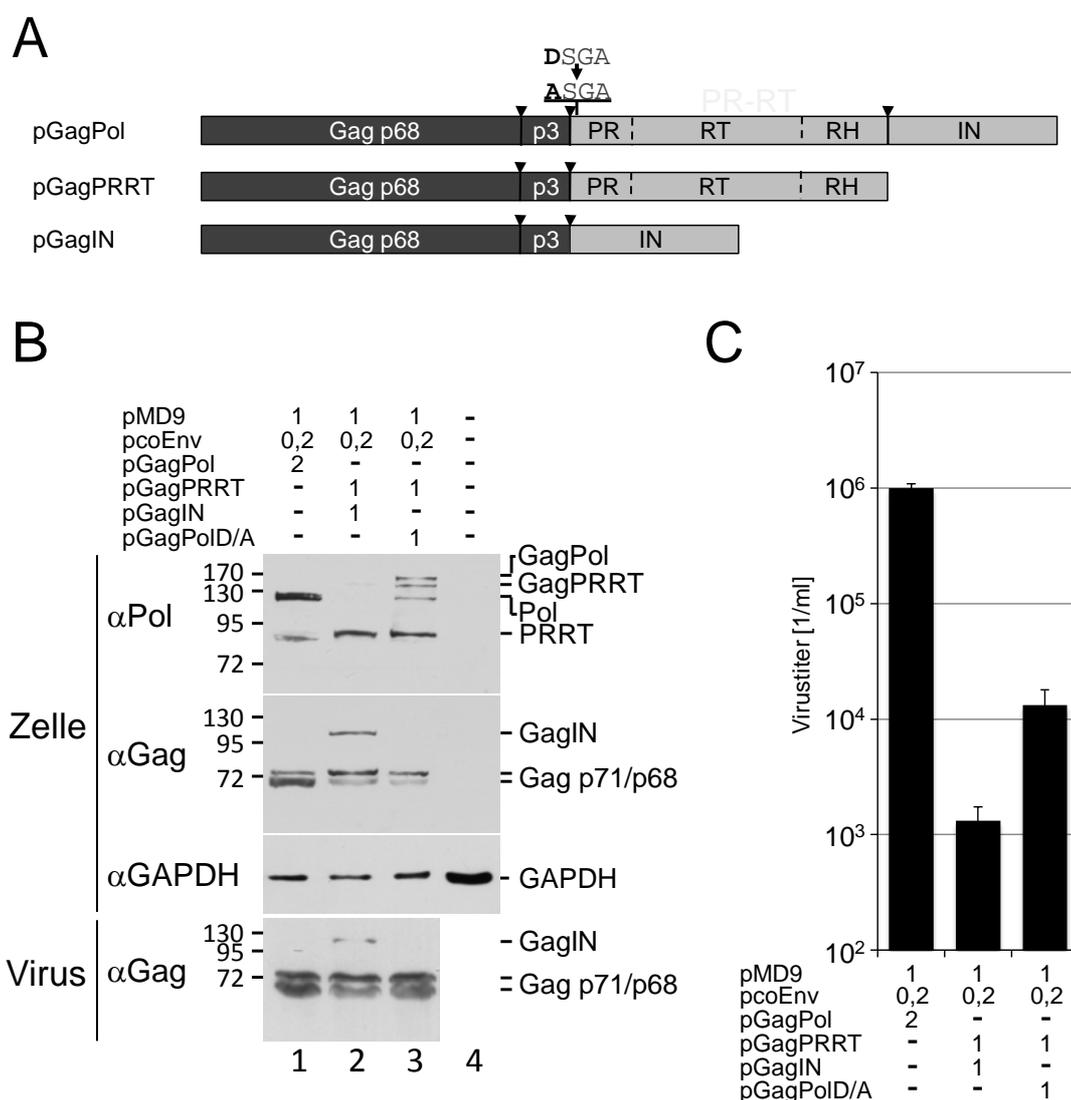


Abbildung 4.21: Die IN-Domäne in *cis* ist nicht essenziell für PR-Aktivität und Infektiosität. (A) Schema der analysierten Fusionsproteine; Pfeile: Positionen der PR-Schnittstellen (B) HEK 293T-Zellen wurden neben pMD9 und pcoPE mit pGagPol oder Kombinationen aus pGagPRRT und pGagIN oder pGagPolD/A transfiziert (DNA-Mengen in μ g). Die Expression, Prozessierung und Inkorporation der Fusionsproteine wurde in Westernblotanalysen anti-Gag- und anti-PRRT-Antikörpern nachgewiesen. Ladekontrolle: Detektion von GAPDH; links: Positionen molekularen Größenmarkers in kDa (C) Die Virustiter wurden in Triplikaten ermittelt. Fehlerbalken: Standardabweichung (aus Spannaus et al., 2012 - mit freundlicher Genehmigung von ASM)

Im Vergleich zu den rekombinanten Viren mit pGagPol-Fusionsproteinen war die Infektiosität um Faktor einhundert reduziert (Abbildung 4.21). Durch diese Experimente wurde bewiesen, dass die IN-Domäne in *cis* nicht für die PR-Aktivität benötigt wird. Das PR-Aktivität-defiziente GagPolD/A Fusionsprotein wurde in *trans* durch GagPRRT komplementiert, was in Virusreifung und infektiösen rekombinanten Viruspartikeln resultierte.

4.6 Bedeutung der reversen Transkriptasedomäne für die Proteaseaktivität.

Im letzten Teil wurde gezeigt, dass die IN-Domäne nicht für die PR-Aktivität essenziell ist. Da auf Grund ihrer Funktion sowohl die RT als auch die RH-Domäne der RT RNA binden kann, könnte die Dimerisierung der foamyviralen PRRT-Proteine RT-abhängig sein. Um diese Theorie zu untersuchen, wurden in den nächsten Experimenten verschiedene C- und N-terminale RT-Deletionen im Kontext der PRRT-Fusionsproteine analysiert.

4.6.1 Die funktionelle RNaseH-Domäne ist essenziell für die Proteaseaktivierung.

Dazu wurde die PRRT-kodierende Sequenz im pPRRT-Plasmid am 3'-Ende weiter verkürzt. Am C-Terminus des PRRT-Fusionsproteins ist die 161 Aminosäuren umfassende RH-Domäne lokalisiert (Leo et al., 2012a; Leo et al., 2012b). Durch PCR-basierende Klonierungsstrategien wurden die Expressionsplasmide pPRRT Δ 161C und pPRRT Δ 78C mit kompletter und teilweiser Deletion der RH-Domäne konstruiert (Abbildung 4.22), wozu Fragmente des Plasmides pcoPP mit den Oligonukleotidpaaren PolBamHIs – RT Δ 161CXhoIa oder PolBamHIs - RTRH Δ 78CXhoIa amplifiziert, mit *Bam*HI und *Xho*I verdaut und anschließend in den *Bam*HI und *Xho*I geschnittenen pcoPP-Vektor ligiert wurden. Das pPRRT Δ 161C-Plasmid kodiert das Fusionsprotein aus PR und RT mit einer C-terminalen Deletion der kompletten RH-Domäne, während das pPRRT Δ 78C-Plasmid ein PRRT-Fusionsprotein mit einer C-terminalen RH-Deletion von nur 78 Aminosäuren kodiert (Abbildung 4.22). Mit diesen Plasmiden wurde untersucht, ob die funktionelle RH-Domäne essenziell für die PR-Aktivität ist. Dafür wurden am Vortag ausgesäte HEK 293T-Zellen ($1,8 \times 10^6$) mit 1,2 μ g pcoPP, pPRRT, pPRRT Δ 78C oder pPRRT Δ 161C zusammen mit den foamyviralen Vektorsystemplasmiden, pcoPG4 (3 μ g), pcoPE (1,2 μ g) und mit pMD9 (6 μ g) oder pUC19 (6 μ g) transfiziert. Nach drei Tagen wurde der Virusüberstand durch Capto Core 700-Säulen von nichtvirusassoziierten Proteinen getrennt. Anschließend wurden die Viruspartikel durch Zentrifugation konzentriert und mit RIPA-Puffer lysiert. Die viralen Proteine in Virus- und Zellysaten wurden durch Westernblotanalysen mit den anti-Gag- und anti-PRRT-Antikörpern detektiert (Abbildung 4.22). In jeweils drei unabhängigen Experimenten wurde die Gag-Prozessierung in den Virus- und den Zellysaten quantifiziert (Gag p68/(Gag p71+Gag p68)) und auf die Gag-Maturation in korrespondierenden Lysaten mit dem Pol-Protein normalisiert (Abbildung 4.23).

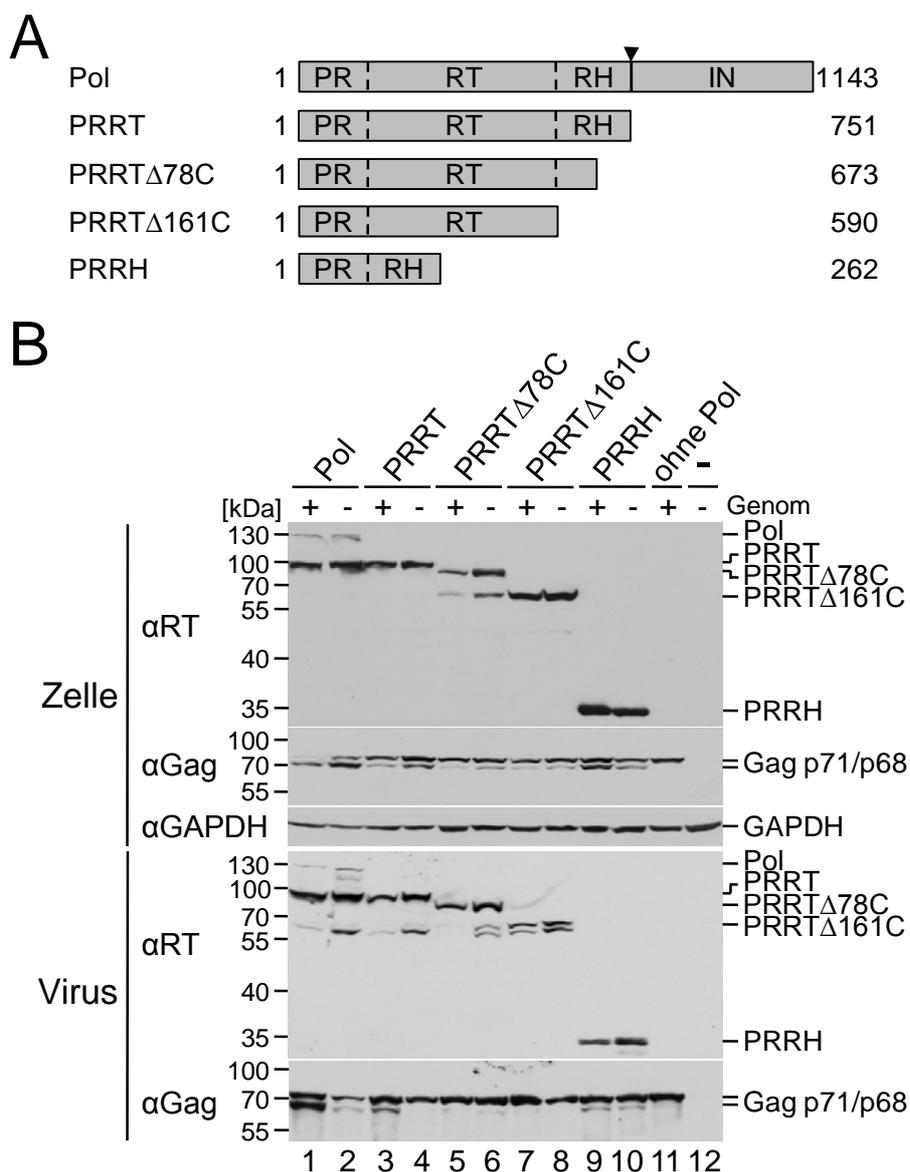


Abbildung 4.22: Die funktionelle RH-Domäne ist essenziell für die PR-Aktivität. (A) Schematische Darstellung der analysierten Pol-Verkürzungen (B) HEK 293T-Zellen wurden mit pcoPE, pcoPG4 und pcoPP oder je einem der unter A dargestellten Pol-Expressionsplasmide jeweils mit (+) und ohne (-) pMD9 transfiziert. Durch Westernblotanalysen mit monoklonalen anti-Gag- und anti-PRRT-Antikörpern wurden die Gag- und Pol-Proteine in den Virus- und Zellysaten nachgewiesen. Ladekontrolle: Detektion von GAPDH; links: Positionen des molekularen Größenmarkers; Pfeil: Pol RH/IN-Schnittstelle (aus Spannaus et al., 2014 - mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

Weder die pPRRT Δ 78C- noch die PRRT Δ 161C-Proteine katalysierten in rekombinanten Viruspartikeln mit PRRT-Proteinen vergleichbarer Gag-Prozessierung (Abbildung 4.22-4.23). Daraus wurde geschlossen, dass die RH-Domäne für die PR-Aktivierung essenziell ist. Um zu untersuchen, ob die funktionelle RH-Domäne für die Aktivierung der PR ausreicht, wurde die PR mit der RH fusioniert. Das resultierende pPRRH-Plasmid kodiert ein Fusionsprotein aus PR- (101 N-terminalen Aminosäuren von PRRT) und RH-Domäne (161 C-terminalen Aminosäuren von PRRT). Fragmente des pcoPP-Plasmids wurden mit den Oligonukleotidpaaren AfIII_s -

PRRHa oder PRRHs – RHXhola amplifiziert und in einer dritten PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden AflIIs und RHXhola fusioniert. Das *EcoRI* und *XhoI* verdaute Fusionsprodukt wurde in ein *EcoRI* und *XhoI* geschnittenes pco-Plasmid ligiert. Analog zu den RH-Deletionen wurde das PRRH-Protein auf Expression, Gag-Prozessierung und Inkorporation untersucht. Die Deletion der funktionellen RT-Domäne (Aminosäuren 102-590 von PRRT) resultierte in PRRT-vergleichbarer Gag-Maturation in den Zellysaten, während die Prozessierung der Gag-Proteine in den rekombinanten Viruspartikeln signifikant effizienter war als durch die C-terminalen RH-Deletionen (p-Wert<0,05; Abbildung 4.22-4.23).

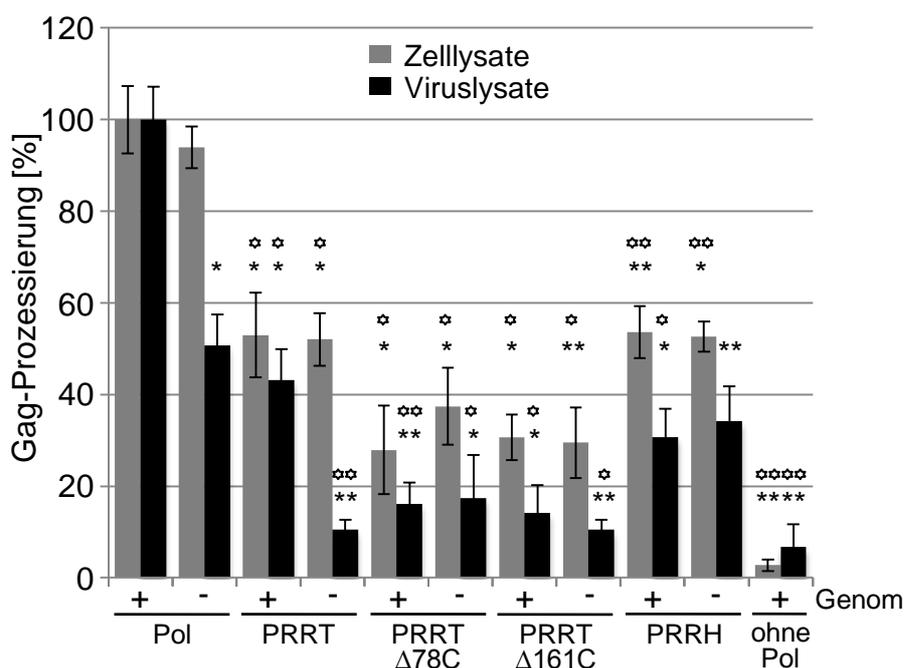


Abbildung 4.23: Durch die Deletion der funktionellen RH-Domäne wird die PR-Funktion nahezu vollständig inhibiert. Der Anteil der prozessierten Gag-Proteine in Zell- (graue Balken) und Viruslysaten (schwarze Balken) aus drei unabhängigen Experimenten wurde auf die Prozessierung der Gag-Proteine in Lysaten mit Pol-Proteinen (Zellysate: 75%; Viruslysate: 55%) normalisiert. Die Signifikanz der Unterschiede im Vergleich zur Gag-Maturation in den Lysaten mit Pol-Proteinen (mit Genom) wurde durch den gepaarten T-Test berechnet (ein Stern: p-Wert<0,05; zwei Sterne: p-Wert<0,01). Die Signifikanz der Unterschiede im Vergleich zur entsprechenden Maturation in Lysaten mit Pol-Proteinen (mit oder ohne Genom) wurde durch hohle sechseckige Sterne gekennzeichnet. Fehlerbalken: Standardabweichung (aus Spannaus et al., 2014 - mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

Dieses Ergebnis zeigte, dass die funktionelle RH-Domäne für die PR-Aktivierung ausreichend ist. Um auszuschließen, dass die unterschiedlichen Gag-Maturationseffizienzen der verkürzten Pol-Proteine auf fehlerhafter Expression oder Inkorporation beruhten, wurden zusätzlich die Mengen der verkürzten Pol-Proteine in den Zell- und Viruslysaten relativ zu den Pol-Proteinen quantifiziert. Aus diesen relativen Pol-Mengen wurden anschließend die Gag/Pol-Verhältnisse berechnet (Tabelle 4.3). Diese Werte waren für alle Zellysate ähnlich, was bedeutet, dass die

zelluläre Expression der verkürzten und der Pol-Proteine bei konstanten Gag-Mengen vergleichbar waren (Faktor < 2) (Abbildung 4.22 und Tabelle 4.3). In den Viruslysaten wurde für alle Pol-Derivate eine vektorgenomunabhängige Inkorporation nachgewiesen, was wahrscheinlich auf der Überexpression der Pol-Proteine beruhte (Abbildung 4.23 Tabelle 4.3). Es wurden sogar bis zu vierfach niedrigere Gag/Pol-Verhältnisse in Viruspartikeln ohne Vektorgenom detektiert (Tabelle 4.3).

Tabelle 4.3: Die Gag/Pol-Verhältnisse zeigten, dass verhältnismäßig ähnliche Pol-Mengen exprimiert worden waren. Nach der Quantifizierung der Gag- und Pol-spezifischen Signale in je drei Westernblotanalysen wurden aus den relativen Mittelwerten die Gag/Pol-Quotienten berechnet (aus Spannaus et al., 2014 - mit freundlicher Genehmigung von Elsevier).

Pol-Proteine	Genom	Gag/Pol-Verhältnis	
		Zellysate	Viruslysate
Pol	+	1	1
	-	0,7	0,3
PRRT	+	0,6	1,7
	-	0,6	0,4
PRRTΔ78C	+	0,5	1,4
	-	0,7	0,7
PRRTΔ161C	+	1	2,3
	-	1,2	0,9
PRRH	+	1,3	2,7
	-	1	1,2
ohne Pol	+	-	-

Möglicherweise war unter diesen Bedingungen die direkte Gag-Pol-Interaktion ausreichend, um die Pol-Proteine in die Viren aufzunehmen (Lee and Linial, 2008). Da alle Gag/Pol-Verhältnisse mit Vektorgenom zwischen 1 (Pol) und 2,7 (PRRH) lagen (Tabelle 4.3) und diese beiden Proteine in der Lage sind, Gag-Proteine zu prozessieren, sollten auch die inkorporierten Mengen der anderen verkürzten Pol-Proteine ausreichen, um eine klare Aussage über PR-Aktivität treffen zu können. In den Zellysaten hatte das Vektorgenom keinen Einfluss auf die Prozessierung der Gag-Proteine (Abbildung 4.22-4.23). In den Viruspartikeln mit Pol- oder PRRT-Proteinen war die PR-Aktivität eindeutig abhängig vom Vektorgenom, obwohl das Gag/Pol-Verhältnis niedriger war (Abbildung 4.22-4.23). Dass die Gag-Prozessierung durch die PRRH-Proteine unabhängig vom Vektorgenom war, suggeriert eine dimerstabilisierende Funktion der RH-Domäne durch möglicherweise unspezifische RNA-RH-Interaktionen. Der N-Terminus der RT schien in diesem Zusammenhang verantwortlich für die genomabhängige PR-Aktivierung zu sein, möglicherweise aufgrund der spezifische Interaktion mit dem PARM in der viralen Vektor-RNA (Hartl et al., 2011).

4.6.2 Die Substitution der funktionellen RNaseH-Domäne durch orthoretrovirale RNaseH-Domänen resultierte in Proteaseaktivität.

Um zu untersuchen, ob die dimerstabilisierende Funktion der foamyviralen RH-Domäne auch durch orthoretrovirale RH-Domänen erfüllt werden kann, wurde im pPRRT-Plasmid das RH-kodierende 3'-Ende des Leserasters durch HIV-1- (aus pNL4-3) oder Moloney-Murine-Leukämievirus (MoMLV; aus pCAMS)-RH kodierende Sequenzen ersetzt (Abbildung 4.24).

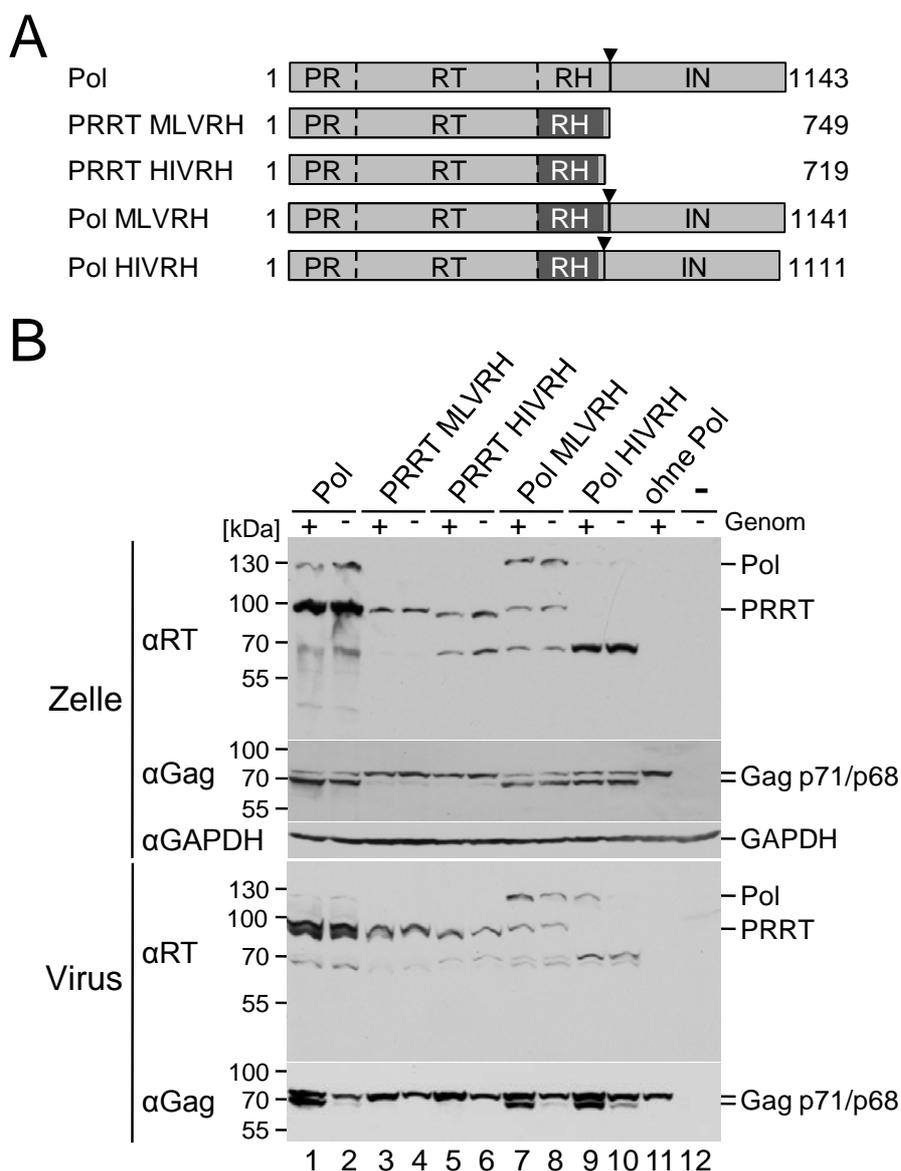


Abbildung 4.24: Die funktionellen RH-Domänen von MoMLV und HIV-1 ermöglichen die Aktivierung der foamyviralen PR. (A) Schematische Darstellung der analysierten RH-Substitutionen (B) HEK 293T-Zellen wurden mit pcoPE, pcoPG4 und pcoPP oder je einem der unter A dargestellten Pol-Expressionsplasmide jeweils mit (+) und ohne (-) pMD9 transfiziert. Durch Westernblotanalysen mit monoklonalen anti-Gag- und anti-PRRT-Antikörpern wurden Gag- und Pol-Proteine in den Virus- und Zellysaten nachgewiesen. Ladekontrolle: Detektion von GAPDH; links: Positionen des molekularen Größenmarkers (aus Spannaus et al., 2014 - mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

Für die PRRT-MoMLVRH-Fusion wurden zuerst Fragmente des pcoPP-Plasmids mit den Oligonukleotiden PolBamHIs und RTMLVRHa und des pCAMS-Vektors mit RTMLVRHs und MLVRHXhoIa in PCR-Reaktionen amplifiziert. In einer dritten PCR-Reaktion mit PolBamHIs und MLVRHXhoIa dienten diese überlappenden Produkte als Matrizen. Das dritte Produkt wurde mit *Bam*HI und *Xho*I verdaut und anschließend in das *Bam*HI und *Xho*I geschnittenen pcoPP-Plasmid ligiert. Die PRRT-HIVRH-Fusion wurde analog kloniert mit dem Unterschied, dass das pcoPP-Fragment mit PolBamHIs und RTHIVRHa und das pNL4-3-Fragment mit RTHIVRHs und HIVRHXhoIa in PCR-Reaktionen amplifiziert wurde. Für die dritte PCR-Reaktion wurden die Oligonukleotide PolBamHI und HIVRHXhoIa benutzt. Die beiden Plasmide pPRRT-MLVRH und PPRRT-HIVRH kodierten PRRT-Fusionsproteine mit durch HIV-1- oder MoMLV-RH substituierten RH-Domänen und einer C-terminalen Pol RH/IN-Schnittstelle. In einem weiteren Klonierungsschritt wurden diese beiden Expressionsplasmide am 3'-Ende des Pol-Leserasters um die IN-kodierende Sequenz ergänzt. Dafür wurde ein Fragment des pcoPP-Plasmids in einer PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden INAsiSIs und Stop+100a amplifiziert. Das Produkt wurde mit *Asi*SI und *Xho*I verdaut und anschließend in die *Asi*SI und *Xho*I geschnittenen pPRRT-MLVRH- und pPRRT-HIVRH-Vektoren ligiert. Die resultierenden Plasmide kodierten die foamyvirale Pol-Proteine mit einer durch HIV-1- oder MoMLV-RH substituierten RH-Domäne. Durch diese vier Plasmide wurden die RH-Substitutionen sowohl im Kontext des PRRT-Fusionsproteins als auch im Pol-Protein analysiert (Abbildung 4.24).

Tabelle 4.4: Die *pol*-Expression und Pol-Inkorporation waren genomunabhängig. Nach der Quantifizierung der Gag- und Pol-spezifischen Signale in je drei Westernblotanalysen wurden aus den relativen Mittelwerten die Gag/Pol-Quotienten berechnet (aus Spannaus et al., 2014 - mit freundlicher Genehmigung von Elsevier).

Pol-Proteine	Genom	Gag/Pol-Verhältnis	
		Zelllysate	Viruslysate
Pol	+	1	1
	-	0,8	0,4
PRRT MLVRH	+	2,6	1,5
	-	3,1	1,1
PRRT HIVRH	+	1,9	2,7
	-	1,8	3,6
Pol MLVRH	+	1,8	2,6
	-	1,5	1,5
Pol HIVRH	+	0,9	2,5
	-	0,8	1,9
ohne Pol	+	-	-

HEK 293T-Zellen wurden mit diesen Plasmiden und mit pcoPE, pcoPG4 und mit und ohne pMD9 transfiziert. Nach drei Tagen wurde die Infektiosität bestimmt und die Virus- und Zelllysate

wurden hergestellt, bevor sie in Westernblotanalysen untersucht wurden (Abbildung 4.24). Durch Quantifizierung der Pol-spezifischen Signale und Berechnung der Gag/Pol-Verhältnisse wurden wieder Expression und Inkorporation der verschiedenen Pol-Proteine untersucht mit dem Ergebnis, dass auch hier die Pol-Inkorporation genomunabhängig war (Abbildung 4.24, Tabelle 4.4). Sowohl die zellulären Proteinmengen als auch die Inkorporation der RH-Substitutionen waren im Vergleich zu den Pol-Proteinen reduziert (Tabelle 4.4).

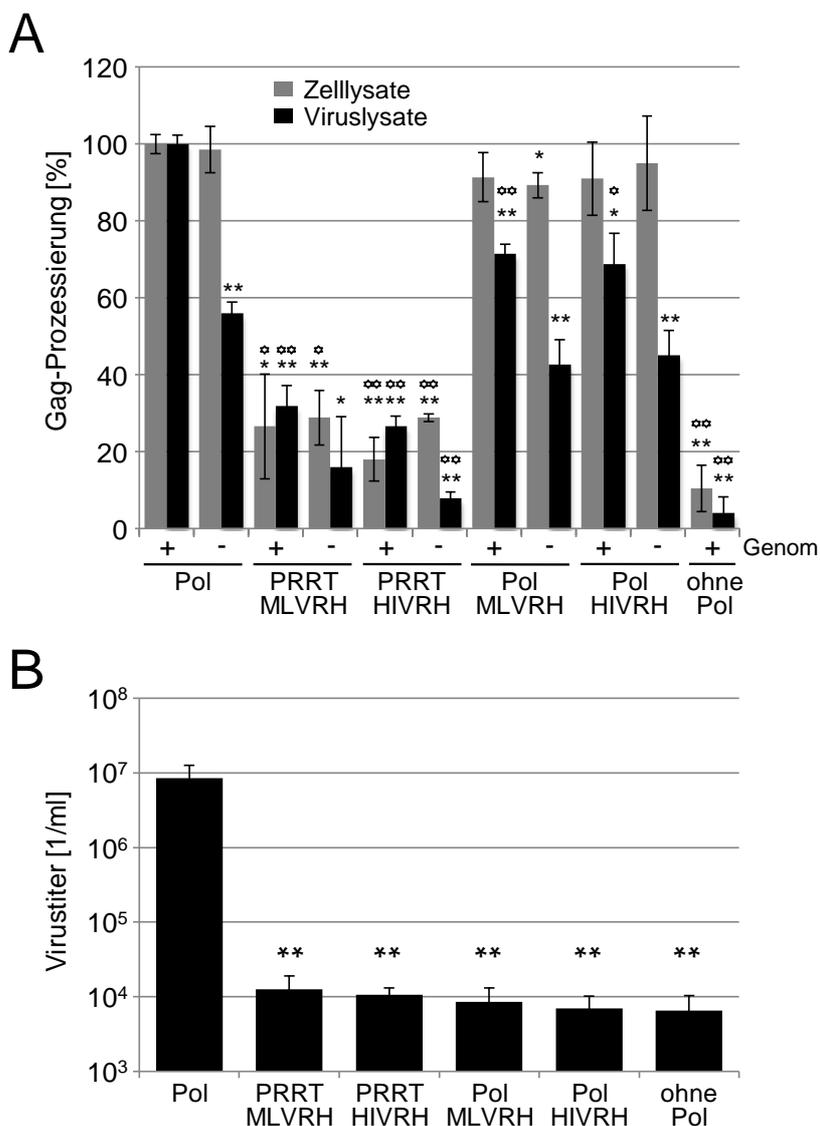


Abbildung 4.25: Die Pol-MLVRH- und die Pol-HIVRH-Proteine weisen nahezu gleiche PR-Aktivität wie die Pol-Proteine auf. (A) Anteil der prozessierten Gag-Proteine in Zell- (graue Balken) und Viruslysaten (schwarze Balken) aus drei unabhängigen Experimenten wurden auf die Gag-Prozessierung in den Lysaten mit nichtmodifizierten Pol-Proteinen (Zelllysate: 74%; Viruslysate: 55%) normalisiert. Die Signifikanz der Unterschiede im Vergleich zur Gag-Maturation mit Pol-Protein (mit Genom) wurde durch gepaarte T-Tests berechnet (ein Stern: p-Wert<0,05; zwei Sterne: p-Wert<0,01). Analog dazu wurde die Signifikanz der Unterschiede im Vergleich zur Gag-Maturation in den entsprechenden Lysaten mit Pol-Proteinen (mit oder ohne Genom) durch hohle sechseckige Sterne gekennzeichnet. Fehlerbalken: Standardabweichung (B) Die Virustiter wurden in drei unabhängigen Experimenten jeweils in Triplikaten bestimmt. Die Signifikanz der Unterschiede im Vergleich zu rekombinanten Viren mit Pol-Proteinen wurde gekennzeichnet (zwei Sterne: p-Wert<0,01). Fehlerbalken: Standardabweichung (aus Spannaus et al., 2014 - mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

Im Vergleich zum PRRT-Protein wurde in den Zell- und den Viruslysaten lediglich eine leichte Reduktion der Gag-Prozessierung durch die PRRT-MLVRH- und PRRT-HIVRH-Proteine detektiert (Abbildung 4.22-4.25). In den Viruslysaten war genomabhängige PR-Aktivierung nachweisbar (Abbildung 4.24-4.25). Dieses Experiment zeigte, dass sowohl die MoMLV-RH- als auch die HIV-RH-Domäne, ähnlich der foamyviralen RH-Domäne, im Kontext des PRRT-Proteins PR-Aktivierung ermöglichten. Für die Volllänge-Pol-MLVRH- und Volllänge-Pol-HIVRH- wurden im Vergleich zu den Pol-Proteinen ebenfalls nur leicht reduzierte Effizienzen der Gag-Prozessierung ermittelt (Abbildung 4.24-4.25). Auch für diese Proteine war genomabhängige PR-Aktivierung ausschließlich in den Viruslysaten nachweisbar (Abbildungen 4.24-4.25). Im Gegensatz zu den Pol- wurden die Pol-MLVRH- nur schwach und die Pol-HIVRH-Proteine gar nicht an der RH/IN-PR-Schnittstelle prozessiert (Abbildung 4.24-4.25). Dies war eine der möglichen Ursachen für die niedrige Infektiosität der rekombinanten Viren (Abbildung 4.25). Wahrscheinlicher ist es aber, dass die substituierten RH-Domänen zwar die PR-Aktivierung ermöglichten, jedoch nicht ihre primäre Funktion während der RT-Reaktion erfüllen konnten. Dieses Experiment bestätigte die vorhergehenden Experimente dahingehend, dass die funktionelle RH-Domäne auf eine unspezifische Weise essenziell für PR-Aktivität war, während die funktionelle RT-Domäne wahrscheinlich für die genomabhängige PR-Aktivierung benötigt wurde.

5. Diskussion

5.1 Viruskomposition und chromatographische Reinigung von Foamyviren

Alle Retroviren prozessieren ihre Pol- und Strukturproteine durch die virale PR (Coffin et al., 1997). In dieser Arbeit wurden zentrale Mechanismen der Regulation der foamyvirealen PR untersucht und aufgeklärt. Foamyviren enkapsidieren im Vergleich zu Orthoretroviren weniger Pol pro Gag-Molekül (Cartellieri et al., 2005a), was vermutlich durch die Gag-unabhängige Expression und der dadurch einzigartigen Inkorporation der foamyvirealen Pol-Proteine verursacht wird (Bodem et al., 1996; Heinkelein et al., 2002a; Jordan et al., 1996; Lee and Linial, 2008; Löchelt and Flügel, 1996; Muranyi and Flügel, 1991; Peters et al., 2005; Yu et al., 1996a). Um diese niedrige Pol-Konzentration in Foamyviren zu verifizieren, wurden hochreine Foamyviren benötigt, da *pol*-exprimierende Zellen nichtvirusassoziierte Pol-Proteine sezernieren (Swiersy et al., 2011). Der erste Schritt der Säulenchromatographie durch die Capto Core 700-Säulen hat sich als einfache und vor allem schnelle Methode erwiesen, nichtvirusassoziierte Proteine und Komplexe zu entfernen, die auch für die Reinigung anderer Viren adaptiert werden kann. Auf der Grundlage, dass Foamyviren an Heparin binden (Nasimuzzaman and Persons, 2012; Plochmann et al., 2012), stellt auch der zweite Schritt der Säulenchromatographie durch die Heparin Sepharose HP-Säule eine bei anderen Viren anwendbare Methode dar, da gezeigt wurde, dass eine Vielzahl anderer Viren wie zum Beispiel HIV-1 (de Witte et al., 2007; Mondor et al., 1998; Patel et al., 1993; Sapphire et al., 2001; Zhang et al., 2002), humane T-Zell-Leukämieviren Typ 1 (Jones et al., 2005; Pinon et al., 2003; Tanaka et al., 2012), Herpes Simplex Viren (WuDunn and Spear, 1989), Zytomegalieviren (Compton et al., 1993), Dengue Viren (Chen et al., 1997), respiratorische Synzytialviren (Feldman et al., 2000) und adenoassoziierte Viren Typ II (Summerford et al., 1999) an Heparin binden (zusammengefasst in Liu and Thorp, 2002). Insgesamt wurden durch die Säulenchromatographie über 99,997% der kontaminierenden Proteine und Komplexe entfernt. Dadurch wurde im Gegensatz zur herkömmlichen Iodixanolgradientenzentrifugation eine Reinheit erreicht, die die Identifizierung der Gag p71/p68- und der Env SU- und TM-Proteine im Silbergel ermöglichte. Darüber hinaus war die Reduktion der Infektiosität der rekombinanten Foamyviren, die durch die Säulenchromatographie gereinigt wurden, weitaus geringer als der Infektiositätsverlust bei der Reinigung durch Iodixanolgradientenzentrifugation (eigene Vorversuche). Durch eine durchgängige Reinigung bei 4°C könnte die Ausbeute an infektiösen Viruspartikeln wahrscheinlich noch gesteigert werden.

Nicht nur für die Analyse der Viruskomposition sondern besonders für die Anwendung von Foamyviren als gentherapeutische Vektoren ist eine effiziente Reinigung von großer Bedeutung. Da für Foamyviren kein Krankheitsbild bekannt ist, gelten foamyvirale Vektoren im Vergleich zu

anderen retroviralen Vektoren hinsichtlich schädlicher Nebeneffekte weitestgehend als ungefährlich (zusammenfassend diskutiert in: Lindemann and Rethwilm, 2011; Rethwilm, 2007). Allein die Reinigung von rekombinanten Foamyviren war im Vergleich zu anderen Retroviren - wie zum Beispiel HIV-1 - vergleichsweise ineffizient. Die entwickelte chromatographische Methode stellt besonders für gentherapeutische Zwecke eine vielversprechende Alternative dar. Die Erweiterungen des Reinigungsprotokolls durch eine Anionenaustauschchromatographie (UNOsphere Q) oder einer auf hydrophober Interaktion beruhender Chromatographie (HiTrap Phenyl HP)(Miller und Bodem, nicht publiziert; Miller, 2012) resultierten nicht in verbesserter Reinheit der Viruspartikel. Bei der Anionenaustauschchromatographie wurden vier virushaltige Fraktionen untersucht, die verschieden an die Säule gebunden hatten. Signifikante Unterschiede der Komposition der viralen Proteine wurden nicht festgestellt. Die unterschiedlich starke Bindung wurde möglicherweise durch unterschiedliche Glykosylierungen der Oberflächenproteine oder durch gegenseitige Bindung von Viruspartikeln verursacht. Die Reinigung durch die Capto Core 700- und die Heparin Sepharose HP-Säulen ist ausreichend, um reine und infektiöse Foamyviren zu produzieren.

Durch die Quantifizierung der Gag- und Pol-Proteine in gereinigten Foamyviren wurde bestätigt, dass Foamyviren weniger Pol-Proteine als Orthoretroviren enthalten. Das ermittelte Gag/PRRT-Verhältnis von 37:1 ist um mehr als Faktor zwei höher als die zuvor bestimmten Werte (Cartellieri et al., 2005a), die möglicherweise durch im Iodixanolgradienten komigrierende freie Pol-Proteine verfälscht worden waren. Aus den beiden Annahmen, dass foamyvirale Kapside aus einer ähnlichen Anzahl von Gag-Proteinen gebildet werden wie bei HIV-1 (ca. 2500/Virus (Carlson et al., 2008)) und dass foamyvirale Partikel zwei Genome enthalten, und aus dem ermittelten Gag/PRRT-Verhältnis von 37,4:1 ergibt sich die Inkorporation von ungefähr 33 Pol-Molekülen pro Genomkopie (66 pro Virus). Das sind circa fünfmal weniger Pol-Moleküle pro Viruspartikel als in Orthoretroviren, bei denen ausgehend von einer „frame-shift“-Effizienz von 5-20% etwa 175-500 GagPol-Vorläuferproteine inkorporiert werden (Jacks et al., 1987; Jacks et al., 1988). Grund für die geringere Pol-Menge in Foamyviren ist wahrscheinlich die einzigartige Gag-Genom-Pol-Interaktion während der Assemblierung der foamyviralen Partikel (Heinkelein et al., 2002a; Peters et al., 2005). Foamyviren benötigen aufgrund der höheren Prozessivität der RT (Hartl et al., 2010a; Rinke et al., 2002) und der limitierten Maturation der viralen Proteine durch die PR (Baldwin and Linial, 1999; Enssle et al., 1997; Konvalinka et al., 1995a; Löchelt and Flügel, 1996) wahrscheinlich weniger Pol-Proteine als Orthoretroviren.

Wie bei PFV interagiert auch bei HIV-1 der C-Terminus der Env- mit dem N-Terminus der Gag-Proteine (Cosson, 1996; Freed and Martin, 1996), jedoch werden durch die Prozessierung der Gag-Proteine an der MA/CA-Schnittstelle die HIV-1 Env-Trimere in der Membran beweglich, wodurch die lokale Konzentration von Env-Molekülen erreicht wird, die für eine ausreichende

Rezeptorbindung und für den Zelleintritt essenziell ist (Chojnacki et al., 2012). Durch diesen Mechanismus ist die geringe Env-Menge auf der Oberfläche von Lentiviren (7-8 Env-Trimere bei HIV-1) ausreichend für die Infektion (Chertova et al., 2002; Chojnacki et al., 2012; Zhu et al., 2003). Durch die limitierte Gag-Prozessierung mit nur einer Schnittstelle in Foamyviren ist vermutlich die Beweglichkeit der Env-Trimere in der viralen Membran reduziert, wodurch für die Rezeptorbindung und den Viruseintritt mehr Env-Moleküle benötigt werden. Wie bei anderen Retroviren sind auf der Oberfläche von Foamyviren eine Vielzahl der charakteristischen Env-Trimere in negativkontrastierten und kryoelektronenmikroskopischen Bildern zu erkennen (Wilk et al., 2001; Wilk et al., 2000). In dieser Arbeit wurde erstmalig das foamyvirale Gag/Env-Verhältnis mit 4:1 quantifiziert. Unter Annahme, dass das foamyvirale Kapsid aus 2500 Gag-Molekülen gebildet wird, entspricht dieses Verhältnis etwa 625 Env-Molekülen pro Viruspartikel (ca. 208 Env-Trimere pro Virus), was einen fundamentalen Unterschied zu HIV-1 darstellt. Dadurch wird wahrscheinlich die eingeschränkte Beweglichkeit der foamyviralen Env-Trimere kompensiert, die durch die limitierte Gag-Prozessierung verursacht wird.

5.2 Das Schnittstellenrepertoire der foamyviralen Protease

Für verschiedene Orthoretroviren wie HIV-1 wurde gezeigt, dass die Maturation der viralen Proteine geordnet abläuft, ausgelöst durch teilweise sehr unterschiedliche Prozessierungseffizienzen der einzelnen PR-Schnittstellen (Coffin et al., 1997; Pettit et al., 2005a; Pettit et al., 2004; Pettit et al., 2005b; Pettit et al., 1994; Wiegers et al., 1998). Für Foamyviren wurde hier festgestellt, dass die Gag p68/p3- und die Pol RH/IN-Schnittstelle *in vivo* sowohl im Kontext des Gag- als auch Pol-Proteins mit vergleichbarer Effizienz prozessiert wurden (Tabellen 5.1-5.2), was *in vitro*-PR-Experimenten bestätigten (Schneider et al., 2014). Das bedeutet, dass im Gegensatz zu HIV-1 bei der foamyviralen Gag- und Pol-Maturation, der Zeitpunkt nicht durch unterschiedliche Prozessierungseffizienzen der Schnittstellen reguliert wird (Pettit et al., 2005a; Pettit et al., 2004; Pettit et al., 2005b; Pettit et al., 1994; Wiegers et al., 1998). Im Kontext des Pol-Proteins wurde für die Gag p68/p3- und die Pol-RH/IN-Schnittstellen vergleichbare Prozessierung detektiert, während die Infektiosität jedoch reduziert war (Tabelle 5.2). Ein ähnlicher Effekt wurde für die Substitutionen Y748R und besonders Y748G in der Position P4' der Pol RH/IN-Schnittstelle beobachtet. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass das Tyrosin in Position P4' für RH- oder RT-Funktion benötigt wird. In älteren Studien wurde gezeigt, dass die Substitution der inneren sechs Aminosäuren der Pol RH/IN-Schnittstelle durch Alanin die Pol-Maturation inhibierte aber die Infektiosität um lediglich zwei Größenordnungen reduzierte (Roy and Linial, 2007). Die Substitution aller acht Aminosäuren dieser Schnittstelle resultierte in nichtinfektiösen Viren. Es ist möglich, dass die Substitution des

Tyrosins in Position P4' die RH-Aktivität inhibiert, da diese Aminosäure Teil der C-terminalen α -Helix der RH-Domäne ist (Leo et al., 2012a; Leo et al., 2012b).

Da die Prozessierungseffizienz der Gag p68/p3- und die Pol RH/IN-Schnittstelle ähnlich sind, wurde im Vorfeld vermutet, dass die Hybrid p68/IN-Schnittstelle auch mit vergleichbarer Effizienz geschnitten wird. Jedoch wurde für das Pol-p68/IN-Protein eine unerwartete Reduktion der Pol-Maturation detektiert. Die Einzelsubstitutionen in den Positionen P4' (Y748R) und P3' (V749A) resultierten in Prozessierungseffizienzen, die zwischen der der Hybrid p68/IN- und der Pol RH/IN-Schnittstelle liegen (Tabelle 5.2), was einen additiven Effekt dieser beiden Einzelsubstitutionen auf die Maturation wahrscheinlich macht. Im Kontext des Gag-Proteins war lediglich in den Zelllysaten die Effizienz des Schnittes der Hybrid p68/IN-Schnittstelle leicht reduziert (Tabelle 5.1). Da die Aminosäuresequenzen der Hybrid p68/IN-Schnittstellen im Gag- und im Pol-Protein identisch waren, kann dieser Unterschied durch den sterisch leichteren Zugang der Schnittstelle am C-Terminus des Gag-Proteins durch die virale PR erklärt werden.

Tabelle 5.1: Aminosäuresubstitutionen innerhalb der PFV Gag p68/p3-PR-Schnittstelle

	Schnittstelle	Aminosäuresequenz ^a	Infektiosität [%]	Maturations-effizienz	Maturations-effizienz [%]
	p68/p3 _{wt}	RAVN/TVTQ	100	0,42	100
FV-Vektorsystem ^b	p68/p3 _{R618G}	GAVN/TVTQ	10	0,33	79
	p68/p3 _{A619G}	RGVN/TVTQ	52	0,35	83
	p68/p3 _{V620G}	RAGN/TVTQ	<1	0,06	14
	p68/p3 _{N621G}	RAVG/TVTQ	5	0,87	208
	p68/p3 _{T622G}	RAVN/GVTQ	46	0,28	68
	p68/p3 _{V623G}	RAVN/TGTQ	<1	0,06	15
	p68/p3 _{T624G}	RAVN/TVGQ	30	0,39	74
	p68/p3 _{Q625G}	RAVN/TVTQ	10	0,33	78
	p68/p3 _{RH/IN}	YVVN/CNTK	105	0,47	112
	p68/p3 _{p68/IN}	RAVN/CNTK	72	0,42	99
	p68/p3 _{ACS}	GALG/ALGA	<1	0,05	11
provirales Plasmid ^c	p68/p3	RAVN/TVAQ	0		0
provirales Plasmid ^d	p68/p3	GAGN/TVTQ	0		0
	p68/p3	RAVN/AGAQ	0		0
	p68/p3	RAVN/TVT _L -HIV _{p6}	10		+
	p68/p3	REVN/TVTQ	100		NB
	p68/p3	RKVN/TVTQ	100		NB
provirales Plasmid ^e	p33/p5 _{I310E}	QHER/SVTG	0		0

a: substituierte Aminosäuren sind in grau dargestellt; b: aus dieser Arbeit; c: Baldwin and Linial, 1999; d: Enssle et al., 1997; e: Lehmann-Che et al., 2005; +: prozessiert, aber Effizienz wurde nicht quantifiziert; NB: nicht bestimmt; FV: Foamyvirus (aus Spannaus et al., 2014 - mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

Die geringe Pol-Konzentration in Foamyviren kann neben der limitierten Prozessierung auch durch der daraus resultierenden höheren Spezifität der foamyviralen PR kompensiert werden. Durch bakterielle Expression der Pol-Proteine und in *in vitro*-Peptidanalysen wurden sieben

potenzielle PR-Substrate in den foamyviralen Proteinen identifiziert, drei im Pol- und vier im Gag-Protein (Tabelle 5.3; Fenyőfalvi et al., 1999; Pfrepper et al., 1998; Pfrepper et al., 1999). In Foamyviren konnte jedoch nur die Prozessierung der Gag p68/p3 und der Pol-RH/IN-Schnittstelle nachgewiesen werden (Baldwin and Linial, 1999; Enssle et al., 1997; Konvalinka et al., 1995a; Löchelt and Flügel, 1996), während der Schnitt der potenziellen Gag p33/p5-Schnittstelle nur nach der Infektion für die Disassemblierung von Bedeutung zu sein scheint (Lehmann-Che et al., 2005). Um eine klare Aussage über das Schnittstellenrepertoire machen zu können, wurden deshalb nur die Aminosäurereste innerhalb der Gag p68/p3- und der Pol RH/IN-Schnittstelle identifiziert, die für effiziente Maturation und Infektiosität benötigt werden (Tabellen 5.1-5.2). Diese Ergebnisse und ältere *in vivo*-Analysen der foamyviralen PR-Schnittstellen zeigten, dass die Aminosäurereste Valin und Valin/Asparagin in den Positionen P2' und P2 essenziell für die Maturation durch die foamyvirale PR waren (Tabellen 5.1 und 5.2; Enssle et al., 1997; Lehmann-Che et al., 2005; Roy and Linial, 2007). Die Substitutionen in diesen Positionen durch kleine Aminosäuren wie Alanin oder Glycin resultierte in unprozessierten Proteinen und reduzierter Infektiosität (Tabellen 5.1-5.2), was suggeriert, dass in diesen Positionen größere Aminosäurereste für effiziente Prozessierung durch die foamyvirale PR benötigt werden.

Dies wird durch die p33/p5-Schnittstelle mit einem Isoleucin in Position P2 bestätigt, die zwar mit geringer Effizienz prozessiert wird (Tabelle 5.3), jedoch eine funktionelle foamyvirale PR-Schnittstelle darstellt (Lehmann-Che et al., 2005; Pfrepper et al., 1999). Nach der Substitution des Isoleucins in der Position P2 der p33/p5-Schnittstelle wurde kein Prozessierungsprodukt mehr detektiert. Neben diesen essenziellen Aminosäureresten in den Positionen P2' und P2 sind die anderen Positionen innerhalb der Gag p68/p3- und der Pol RH/IN-Schnittstelle entweder variabel oder es werden kleine Aminosäuren toleriert (Tabellen 5.1-5.2). Besonders durch die Einzelsubstitutionen zu Glycin in den Positionen P4', P1' und P4 wurde die Prozessierungseffizienz nur schwach oder gar nicht beeinträchtigt (Tabelle 5.1-5.2). Umso überraschender war es, dass beim Sequenzvergleich der Gag p68/p3- und der Pol RH/IN-Schnittstelle gerade die Aminosäurereste in der Position P1' identisch und in Position P4 sehr ähnlich waren.

Um weitere Aussagen über die einzelnen Positionen der foamyviralen PR-Schnittstellen zu machen, wurden die Ergebnisse der *in vitro*-PR-Experimente mit einbezogen (Tabelle 5.3; Fenyőfalvi et al., 1999; Pfrepper et al., 1998; Pfrepper et al., 1999). Die Bedeutung des Valins in Position P2' wurde durch die Analysen der vorhergesagten Pol PR/RT-Schnittstelle mit einem Glutamatrest in dieser Position bestätigt, bei der selbst nach langer Inkubation über Nacht nur kleine Mengen Produkt nachgewiesen werden konnten (Tabelle 5.3). In den PR-Analysen der Ty1 RT/IN-Schnittstelle mit Isoleucin in der Position P2' wurden die Peptide effizient

prozessiert. Wie schon bei der p33/p5-Schnittstelle resultiert ein Isoleucin in Position P2' in einer funktionellen foamyviralen Schnittstelle (Tabelle 5.3).

Tabelle 5.2: Aminosäuresubstitutionen innerhalb der PFV Pol RH/IN-PR-Schnittstelle

	Schnittstelle	Aminosäuresequenz ^a	Infektiosität [%]	Maturations-effizienz	Maturations-effizienz [%]
FV-Vektorsystem ^b	RH/IN _{wt}	YVVN/CNTK	100	0,76	100
	RH/IN _{Y748G}	GVVN/CNTK	12	0,62	83
	RH/IN _{V749G}	YGVN/CNTK	93	0,45	60
	RH/IN _{V750G}	YVGN/CNTK	11	0,08	11
	RH/IN _{N751G}	YVVG/CNTK	104	0,60	81
	RH/IN _{C752G}	YVVN/GNTK	70	0,41	55
	RH/IN _{N753G}	YVVN/CGTK	15	0,17	22
	RH/IN _{T754G}	YVVN/CNGK	64	0,47	63
	RH/IN _{K755G}	YVVN/CNTG	92	0,75	100
	RH/IN _{p68/p3}	RAVN/TVTQ	20	0,74	97
	RH/IN _{p68/IN}	RAVN/CNTK	12	0,18	24
	RH/IN _{Y748R}	RVVN/CNTK	17	0,51	66
	RH/IN _{V749A}	YAVN/CNTK	36	0,62	80
	RH/IN _{ΔCS}	GALG/ALGA	10	0,06	8
	provirales Plasmid ^c	RH/IN	YVVA/ANTK	63	
RH/IN		YVGH/WNTK	38		0
RH/IN		YVAA/AATK	19		0
RH/IN		YAAA/AAAK	7		0
RH/IN		AAAA/AAAA	<1		0

a: substituierte Aminosäuren sind in grau dargestellt; b: aus dieser Arbeit; c: Roy and Linial, 2007; +: prozessiert, aber Effizienz wurde nicht quantifiziert; FV: Foamyvirus (aus Spannaus et al., 2014 - mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

In *in vitro*-PR-Experimenten wurde gezeigt, dass neben Asparagin oder Valin auch Peptide mit Isoleuzin oder Threonin in Position P2 prozessiert wurden (Tabelle 5.3; Fenyőfalvi et al., 1999). In der Position P1 aller Schnittstellen und Peptide, die durch die foamyvirale PR prozessiert wurden, war entweder eine kleine oder eine nukleophile Aminosäure lokalisiert (Tabellen 5.1-5.3; Baldwin and Linial, 1999; Fenyőfalvi et al., 1999; Pfrepper et al., 1998; Pfrepper et al., 1999). Für die vier Peptide mit anderen Aminosäuren in Position P1 (Prolin, Glutamin, Tyrosin oder Asparagin) wurde keine oder nur sehr ineffiziente Prozessierung detektiert (Tabelle 5.3; Fenyőfalvi et al., 1999; Pfrepper et al., 1999). Die Aminosäure Threonin in der Position P3 der Gag p68/p3- und der Pol RH/IN-Schnittstelle ist in allen Foamyviren in Primaten konserviert (Pfrepper et al., 1998; Pfrepper et al., 1999). Dies suggeriert, dass Threonin in Position P3 für die Prozessierung der foamyviralen Schnittstellen in Zellkulturen essenziell ist. Jedoch wurden in den *in vitro*-PR-Experimenten auch Peptide mit Histidin, Lysin, Glutamin, Glycin, Aspartat oder Leucin in Position P3 prozessiert (Fenyőfalvi et al., 1999; Pfrepper et al., 1998; Pfrepper et al., 1999). Sowohl im Kontext der Gag p68/p3- als auch der Pol RH/IN-Schnittstelle resultierte in dieser Arbeit der Austausch von Threonin durch Glycin in reduzierter Prozessierungseffizienz

auf 74% bzw. 63% (Tabelle 5.1-5.2). Demnach wird das Threonin in Position P3 in den foamyviralen PR-Schnittstellen für optimale Prozessierungseffizienzen benötigt. Die anderen Positionen der foamyviralen PR-Schnittstellen scheinen auch nach Einbeziehung der *in vitro*-PR-Experimente variabel zu sein, da ein großes Aminosäurerepertoire für die Positionen P4', P3', P1', und P4 publiziert wurde (Tabellen 5.1-5.3). Trotzdem hat die foamyvirale PR *in vivo* im Gegensatz zu orthoretroviralen PRs ein sehr beschränktes Schnittstellenrepertoire (Coffin et al., 1997), da die in PFV invarianten Positionen P2' und P2 in den Gag p68/p3- und den Pol RH/IN-Schnittstellen sowohl in bovinen als auch in primatenspezifischen Foamyviren konserviert sind (Pfrepper et al., 1998; Pfrepper et al., 1999). Wahrscheinlich ist durch die wenigen Schnittstellen die Spezifität der foamyviralen PR höher als die anderer Retroviren, wodurch die geringe PR-Konzentration in Foamyviren kompensiert wird.

Tabelle 5.3: In foamyviralen *in vitro*-PR-Experimenten geschnittene Peptide

	Schnittstelle	Aminosäuresequenz	Maturations-effizienz [%]
PR-Experimente ^a	p68/p3	RAVN/TVTQ	100
	p33/p5	QHIR/SVTG	15
	p3,5/p1,5	DGVF/PVTT	NB
	p1,5/p29	RIIN/AILG	36
PR-Experimente ^{b, c}	RH/IN	YVVN/CNTK	100
	PR/RT	HWEN/QVGH	+
	RT/RH	EGVF/YTDG	+
PR-Experimente ^c	Ty1 PR/IN	PTIN/NVHT	7
	Ty1 IN/RT	HLIA/AVKA	67
	Ty3 RT/IN	RAVY/TITP	33
	Ty3 RT/IN	NVVS/TIQS	+
	Ty3 RT/IN	NVVS/TIQS	+

a: Pfrepper et al., 1999; b: Pfrepper et al., 1998; c: Fenyőfalvi et al., 1999;
 +: prozessiert, aber Effizienz wurde nicht quantifiziert; NB: nicht bestimmt
 (aus Spannaus et al., 2014 - mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass durch die invarianten Positionen P2' und P2 das Schnittstellenrepertoire der foamyviralen PR *in vivo* sehr beschränkt ist. Für HIV-1 wurde gezeigt, dass erhöhte oder verminderte Prozessierungseffizienz der PR-Schnittstellen die Infektiosität direkt beeinträchtigte (Kozisek et al., 2012). In Foamyviren wird scheinbar ein größerer Anteil unprozessierter Gag- und Pol-Proteine toleriert. Sogar reduzierte Pol-Maturation auf fast 50% resultierte in Virustitern vergleichbar mit rekombinanten Viren mit nichtmodifizierten Pol-Proteinen, während die Reduktion auf unter 25% Pol-Maturation die Infektiosität stark beeinträchtigte. Auf Grund des niedrigen Pol-Gehalts in Foamyviren kann diese Toleranz nur auf die höhere Prozessivität der foamyviralen RT und die limitierte und hochspezifische Prozessierung der viralen Proteine durch die Foamyvirus-PR zurückgeführt werden. Darüber hinaus weisen unprozessierte foamyvirale Pol- und Gag-Pol-Proteine sowohl

PR- als auch reduzierte RT-Aktivität auf, was bedeutet, dass die komplette Pol-Maturation wahrscheinlich in erster Linie für die IN-Aktivität benötigt wird (Hütter et al., 2013; Roy and Linial, 2007; Swiersy et al., 2011).

5.3 Die reverse Transkription wird durch die Gag-Prozessierung reguliert.

Die Hybrid p68/p3-Schnittstelle wurde im Kontext des Gag-Proteins effizienter prozessiert als im Pol-Protein (Tabellen 5.1-5.2). Deshalb wurde die Funktion der Gag-Prozessierung in p68 Gag und das p3-Peptid untersucht, die essenziell für die Produktion infektiöser Viren ist (Baldwin and Linial, 1999; Enssle et al., 1997). Für Foamyviren mit unprozessierten p71 Gag wurde keine offensichtliche morphologische Veränderung detektiert (Konvalinka et al., 1995a). Die Deletion des C-terminalen p3-Peptides resultierte in einer leichten Reduktion der Infektiosität um eine Größenordnung, obwohl eine p3-Funktion bisher nicht nachgewiesen werden konnte (pers. Mitteilung Frau Prof. Birgitta Wöhr). Hier wurde gezeigt, dass die Maturation der Gag-Proteine eine regulatorische Funktion für die RT-Reaktion hat. Unprozessierte Gag-Proteine inhibieren die RT-Reaktion während oder direkt nach dem ersten Matrizenwechsel, da keine U3-spezifische DNA in rekombinanten Viruspartikeln mit nichtmaturierten Gag-Proteinen detektiert wurde, woraus sich folgendes Modell ergibt (Abbildung 5.1).

PFV Gag-Proteine binden an die genomische RNA (Stenbak and Linial, 2004; Yu et al., 1996b), was möglicherweise sterisch den ersten Matrizenwechsel verhindert. Dies resultiert in einer Verzögerung der RT-Reaktion, bis für Infektiosität ausreichende Mengen Gag- und Pol-Proteine prozessiert wurden. Die Regulation ist essenziell, da die foamyvirale PR-Aktivität abhängig von der viralen RNA ist, die jedoch während der RT-Reaktion durch die RNaseH degradiert wird. Durch diesen einzigartigen Regulationsmechanismus wird bei Foamyviren durch die Gag-Prozessierung die RT-Reaktion reguliert, welche im Gegenzug durch den Abbau der genomischen RNA die Gag- und Pol-Maturation terminiert (Abbildung 5.1). Da reife Foamyviren auch Gag p71-Proteine enthalten, müssen nicht alle Gag-Proteine prozessiert werden. Demnach wird für den ersten Matrizenwechsel nur eine bestimmte Konzentration von Gag p71-Proteinen benötigt. Da die Gag p68/p3- und die Pol RH/IN-Schnittstelle mit vergleichbarer Effizienz prozessiert werden, Foamyviren 37 mal mehr Pol- als Gag-Proteine enkapsidieren und intramolekulare Reaktionen schneller ablaufen als intermolekulare, sollte im Zeitraum der Gag-Maturation auch ausreichende Pol-Prozessierung gewährleistet sein. Für die Schnittstellenanalysen bedeutet diese Regulation, dass die beobachteten Reduktionen der Gag-Maturation durch Substitutionen innerhalb der Gag p68/p3-Schnittstelle wahrscheinlich einen viel stärkeren Effekt gehabt hätten, wenn sie nicht durch die verzögerte PR-Inaktivierung kompensiert worden wären. Eine ineffiziente Pol-Prozessierung hat keinen Einfluss auf den

Zeitpunkt der RT-Reaktion und hat dadurch auch keinen Einfluss auf den Zeitraum der PR-Aktivität. Aus diesem Grund ist die reduzierte Prozessierungseffizienz durch die Hybrid p68/IN-Schnittstelle im Pol-Protein viel deutlicher als im Kontext von Gag.

Bei HIV-1 wurde gezeigt, dass die Inhibierung der viralen PR ebenfalls in signifikanter Reduktion der RT-Aktivität resultiert (Babe and Craik, 1994), was jedoch im Gegensatz zu den Foamyviren wahrscheinlich auf der fehlenden Prozessierung der GagPol-Proteine und nicht der Gag-Proteine beruht. Die Abhängigkeit der RT-Aktivität von der Maturation viraler Proteine ist der Grund für die hohe Wirksamkeit von PR-Inhibitoren auf Retroviren (Shen et al., 2008).

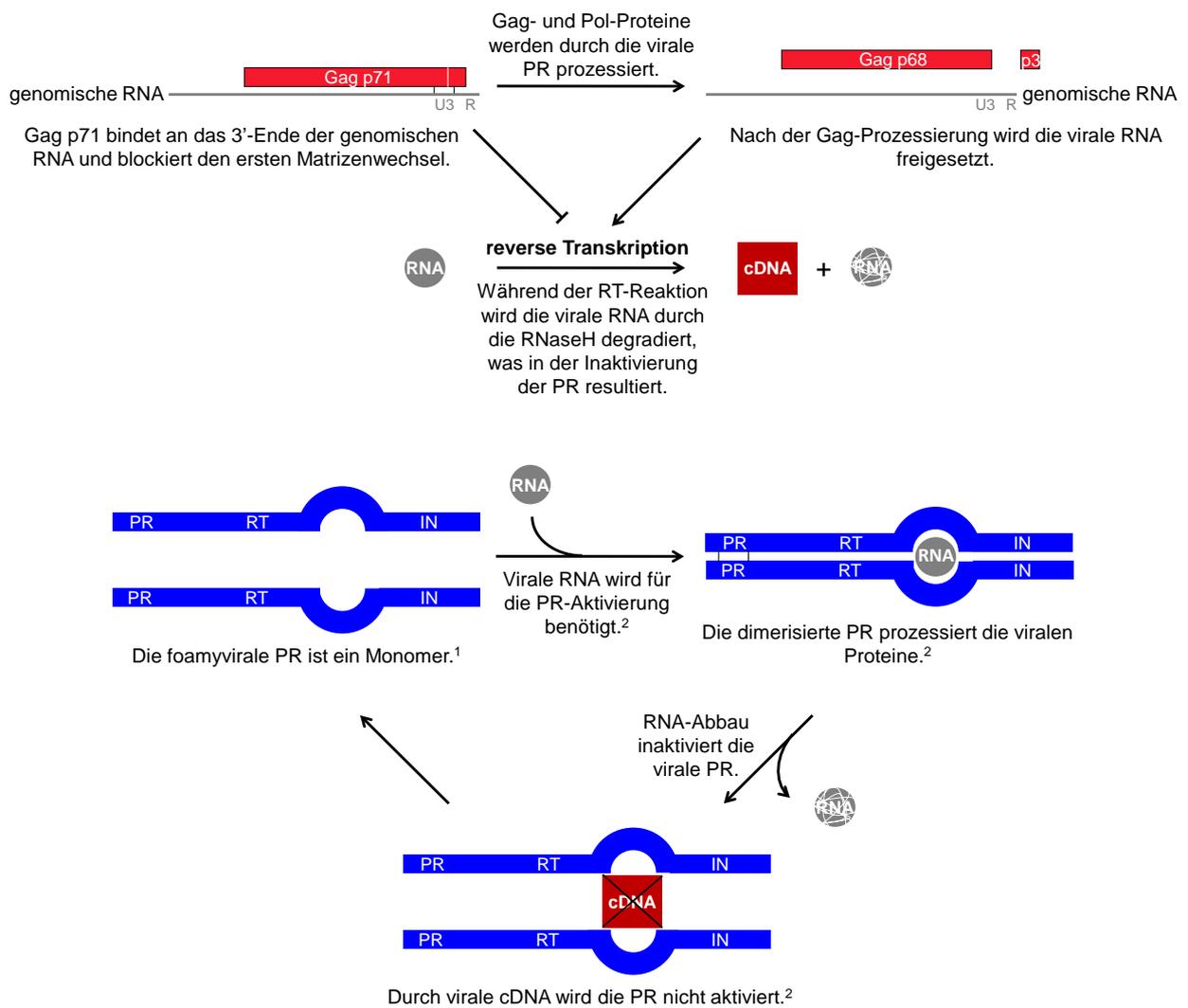


Abbildung 5.1: Schematisches Modell der Regulation der foamyviralen reversen Transkription und der Prozessierung der Gag-Proteine. hellrot: Gag-Proteine; grau: genomische RNA; dunkelrot: cDNA; blau: Pol-Proteine; 1: Hartl et al., 2008; 2 Hartl et al., 2010b (aus Spannaus et al., 2013 - mit freundlicher Genehmigung von ASM)

5.4 Unprozessiertes Gag ist für optimale Infektiosität essenziell.

Trotz des foamyviralen Regulationsmechanismus für PR- und RT-Aktivität sind in Foamyviren nicht 100% der Gag-Proteine prozessiert. Das bereits zuvor publizierte foamyvirale Gag p71/p68-Verhältnis von 1:4,2 (Cartellieri et al., 2005a) wurde in dieser Arbeit mit dem Verhältnis von 1:5,6 bestätigt. Durch die Analyse von rekombinanten Viren mit verschiedenen Verhältnissen von Gag p71 Δ CS- und Gag p68-Proteinen wurde gezeigt, dass genau die Viruspartikel mit dem wildtypischen Gag p71/p68-Verhältnis von etwa 1:6 die infektiösesten waren. Das HIV-1-Kapsid ist hauptsächlich aus Kapsidhexameren und zwölf Kapsidpentameren aufgebaut (Ganser et al., 1999; Li et al., 2000). Möglicherweise erfüllen die Gag p71-Proteine eine ähnliche stabilisierende Funktion wie die Pentamere bei HIV-1. Die Toleranz von unprozessierten Gag-Proteinen steht im direkten Kontrast zu Orthoretroviren wie HIV-1, wo kleine Veränderungen der Gag-Maturation in einer deutlichen Reduktion der Infektiosität resultieren (Müller et al., 2009). Jedoch waren im Vergleich zu rekombinanten Viren mit Gag-Proteinen selbst die mit wildtypischem Gag p71 Δ CS/p68-Verhältnis weniger infektiös. Durch einen Anteil der an das Vektorgenom gebundenen, nicht prozessierbaren Gag p71 Δ CS-Proteine könnte die RT-Reaktion leicht inhibiert und somit die Infektiosität reduziert werden. Möglicherweise wird Gag p71 normalerweise zu einem späteren Zeitpunkt im Lebenszyklus weiter prozessiert. Demnach wird im Gegensatz zu HIV-1 die unvollständige Prozessierung der foamyviralen Gag-Proteine nicht nur toleriert, sondern ist für höchste Infektiosität essenziell. Somit ist die Verzögerung der RT-Reaktion durch p71 Gag und dadurch die verspätete Inaktivierung der foamyviralen PR auf die Bildung infektiöser Viruspartikel mit optimalem Gag p71/p68-Verhältnis ausgelegt.

5.5 Die Rolle der Pol-Domänen für die Proteaseaktivität

Im Kontext des PRRT-Fusionsprotein wird die foamyvirale PR in Gegenwart der genomischen RNA aktiviert (Hartl et al., 2011). Die PR wird als Untereinheit des Pol-Proteins enkapsidiert, für welches ebenfalls PR-Aktivität nachgewiesen wurde (Hütter et al., 2013; Roy and Linial, 2007; Swiersy et al., 2011). Um zu beantworten, welche Proteinbestandteile für foamyvirale PR-Aktivität benötigt werden, wurde in dieser Arbeit ausführlich die Rolle der einzelnen Pol-Domänen analysiert. Hier wurde gezeigt, dass die IN in *trans* nicht essenziell für die PR-Aktivität ist, da Gag-Proteine in Zellen genomabhängig durch PRRT-Proteine prozessiert werden. Im proviralen Kontext resultierte die IN-Deletion in Gag-Prozessierung in den Viruspartikeln. Die Effizienz der Gag-Maturation durch die PRRT-Proteine war geringer als durch die Pol-Proteine, was wahrscheinlich durch reduzierte Inkorporation von PRRT-Proteinen verursacht worden war, da für effiziente Pol-Inkorporation die IN-Domäne benötigt wird (Peters et al., 2005). Durch die IN-unabhängige Inkorporation von PRRT durch GagPRRT-Fusionsproteine in Kombination

mit PR-Aktivität-defizienten GagPolD/A-Fusionsproteinen wurden reife und infektiöse Viruspartikel produziert. Die IN wird für die Produktion von infektiösen Viruspartikeln benötigt jedoch nicht für die Aktivität der foamyviralen PR in *cis*. Wie schon die *in vitro*-PR-Analysen verweisen alle diese Experimente auf eine IN-unabhängige PR-Aktivität (Hartl et al., 2011; Hartl et al., 2010b). Die nachgewiesene IN-abhängige PR-Aktivität (Lee et al., 2011) beruhte wahrscheinlich auf der reduzierten Expression und Inkorporation der C-terminalen IN-Verkürzungen im Vergleich zum Pol-Protein. Dass die foamyvirale PR-Aktivität nicht durch die Pol-Prozessierung reguliert wird, unterstreicht die Bedeutung der Aktivierung durch die genomische RNA.

Im Gegensatz zur IN- ist die RH-Domäne essenziell für PR-Aktivität. Dies stimmt mit den Ergebnissen von *in vitro*-PR-Experimenten überein, in denen PRRT-Proteine mit C-terminalen Deletionen unter physiologischen Bedingungen auch mit PARM keine PR-Aktivität aufweisen (Schneider et al., 2014). Die PRRT-Proteine mit C-terminalen RH-Deletionen waren nicht in der Lage, Gag-Proteine zu prozessieren, während genomunabhängige PR-Aktivität im Kontext des PRRH-Fusionsproteins nachweisbar war. Dies weist stark darauf hin, dass der N-Terminus der RT-Domäne die spezifische RNA-abhängige Aktivierung vermittelt, während der C-Terminus der RT (funktionelle RH-Domäne) entweder durch Protein-Protein-Interaktion oder durch unspezifische RNA-Interaktion für die Stabilisierung des PRRT-Dimers verantwortlich ist. Das bestätigt, dass im Gegensatz zu den Orthoretroviren die foamyvirale RT-Domäne zwei Funktionen erfüllt, nämlich die RT-Reaktion zu katalysieren und die PR zu aktivieren (Hartl et al., 2011; Schneider et al., 2014).

Die unspezifische Bindung der funktionellen RH-Domäne an RNA wurde durch RH-Substitutionen in Pol und PRRT durch die HIV-1- oder MoMLV-RH-Domänen weiter untersucht. Diese RH-Substitutionen resultierten in genomabhängiger Gag-Prozessierung annähernd auf dem Niveau der nicht modifizierten Pol- und PRRT-Proteine, was bestätigt, dass die RNA-RH-Interaktionen sequenzunspezifisch sind. Jedoch waren die rekombinanten Viruspartikel mit den RH-Substitutionen im Kontext des Pol-Proteins nicht infektiös, da die foamyvirale RH-Domäne sowohl Bedeutung für die richtige Konformation und Stabilität der RT haben, als auch spezifisch für den Abbau der foamyviralen RNA sein kann. Die genomunabhängige Pol-Inkorporation wurde wahrscheinlich durch die Kombination verschiedener Faktoren, nämlich der Überexpression der Pol-Proteine, dem zusätzlichen Raum in den Viruspartikeln ohne Vektorgenom und eine bereits zuvor beschriebene direkte Gag-Pol-Interaktion, ausgelöst (Lee and Linial, 2008).

In dieser Arbeit wurde detailliert die Bedeutung des wechselseitigen Regulationsmechanismus von PR-Aktivität und der RT-Reaktion bei Foamyviren analysiert. Die geringe Anzahl inkorporierter Pol-Proteine wird durch die limitierte Prozessierung und die hohe Spezifität der

foamyviralen PR kompensiert. Zusätzlich wird durch vergleichbare Prozessierungseffizienzen der Gag p68/p3- und der Pol-RH/IN-Schnittstelle und der Inhibition der RT-Reaktion durch p71 Gag und der somit verzögerten PR-Inaktivierung die Prozessierung der viralen Proteine durch die Gag-Maturation kontrolliert.

Literaturverzeichnis

- Achong, B. G., Mansell, P. W., Epstein, M. A., Clifford, P., 1971. An unusual virus in cultures from a human nasopharyngeal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 46, 299-307.
- Adachi, A., Gendelman, H. E., Koenig, S., Folks, T., Willey, R., Rabson, A., Martin, M. A., 1986. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J Virol* 59, 284-91.
- Andreeva, N. S., 1991. A consensus template for the aspartic proteinase fold. *Adv Exp Med Biol* 306, 559-72.
- Babe, L. M., Craik, C. S., 1994. Constitutive production of nonenveloped human immunodeficiency virus type 1 particles by a mammalian cell line and effects of a protease inhibitor on particle maturation. *Antimicrob Agents Chemother* 38, 2430-9.
- Baldwin, D. N., Linial, M. L., 1998. The roles of Pol and Env in the assembly pathway of human foamy virus. *J Virol* 72, 3658-65.
- Baldwin, D. N., Linial, M. L., 1999. Proteolytic activity, the carboxy terminus of Gag, and the primer binding site are not required for Pol incorporation into foamy virus particles. *J Virol* 73, 6387-93.
- Baltimore, D., 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226, 1209-11.
- Bandecchi, P., Matteucci, D., Baldinotti, F., Guidi, G., Abramo, F., Tozzini, F., Bendinelli, M., 1992. Prevalence of feline immunodeficiency virus and other retroviral infections in sick cats in Italy. *Vet Immunol Immunopathol* 31, 337-45.
- Bartenschlager, R., Schaller, H., 1992. Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome. *EMBO J* 11, 3413-20.
- Bodem, J., Löchelt, M., Yang, P., Flügel, R. M., 1997. Regulation of gene expression by human foamy virus and potentials of foamy viral vectors. *Stem Cells* 15 Suppl 1, 141-7.
- Bodem, J., Löchelt, M., Winkler, I., Flower, R. P., Delius, H., Flügel, R. M., 1996. Characterization of the spliced pol transcript of feline foamy virus: the splice acceptor site of the pol transcript is located in gag of foamy viruses. *J Virol* 70, 9024-7.
- Brown, P. O., Bowerman, B., Varmus, H. E., Bishop, J. M., 1987. Correct integration of retroviral DNA in vitro. *Cell* 49, 347-56.
- Carlson, L. A., Briggs, J. A., Glass, B., Riches, J. D., Simon, M. N., Johnson, M. C., Müller, B., Grünewald, K., Kräusslich, H. G., 2008. Three-dimensional analysis of budding sites and released virus suggests a revised model for HIV-1 morphogenesis. *Cell Host Microbe* 4, 592-9.
- Cartellieri, M., Rudolph, W., Herchenröder, O., Lindemann, D., Rethwilm, A., 2005a. Determination of the relative amounts of Gag and Pol proteins in foamy virus particles. *Retrovirology* 2, 44.
- Cartellieri, M., Herchenröder, O., Rudolph, W., Heinkelein, M., Lindemann, D., Zentgraf, H., Rethwilm, A., 2005b. N-terminal Gag domain required for foamy virus particle assembly and export. *J Virol* 79, 12464-76.
- Chang, H. K., Wang, B. Y., Yuh, C. H., Wei, C. L., Ting, L. P., 1989. A liver-specific nuclear factor interacts with the promoter region of the large surface protein gene of human hepatitis B virus. *Mol Cell Biol* 9, 5189-97.
- Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R. E., Fromm, J. R., Esko, J. D., Linhardt, R. J., Marks, R. M., 1997. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med* 3, 866-71.

- Cherepanov, P., Maertens, G., Proost, P., Devreese, B., Van Beeumen, J., Engelborghs, Y., De Clercq, E., Debysse, Z., 2003. HIV-1 integrase forms stable tetramers and associates with LEDGF/p75 protein in human cells. *J Biol Chem* 278, 372-81.
- Chertova, E., Bess, J. W., Jr., Crise, B. J., Sowder, I. R., Schaden, T. M., Hilburn, J. M., Hoxie, J. A., Benveniste, R. E., Lifson, J. D., Henderson, L. E., Arthur, L. O., 2002. Envelope glycoprotein incorporation, not shedding of surface envelope glycoprotein (gp120/SU), is the primary determinant of SU content of purified human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus. *J Virol* 76, 5315-25.
- Choi, G., Park, S., Choi, B., Hong, S., Lee, J., Hunter, E., Rhee, S. S., 1999. Identification of a cytoplasmic targeting/retention signal in a retroviral Gag polyprotein. *J Virol* 73, 5431-7.
- Chojnacki, J., Staudt, T., Glass, B., Bingen, P., Engelhardt, J., Anders, M., Schneider, J., Müller, B., Hell, S. W., Kräusslich, H. G., 2012. Maturation-dependent HIV-1 surface protein redistribution revealed by fluorescence nanoscopy. *Science* 338, 524-8.
- Coffin, J. M., Hughes, S. H., Varmus, H. E., 1997. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY).
- Compton, T., Nowlin, D. M., Cooper, N. R., 1993. Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* 193, 834-41.
- Cosson, P., 1996. Direct interaction between the envelope and matrix proteins of HIV-1. *EMBO J* 15, 5783-8.
- de Witte, L., Bobardt, M., Chatterji, U., Degeest, G., David, G., Geijtenbeek, T. B., Galloway, P., 2007. Syndecan-3 is a dendritic cell-specific attachment receptor for HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 19464-9.
- Dettenhofer, M., Yu, X. F., 1999. Highly purified human immunodeficiency virus type 1 reveals a virtual absence of Vif in virions. *J Virol* 73, 1460-7.
- di Marzo Veronese, F., Copeland, T. D., DeVico, A. L., Rahman, R., Oroszlan, S., Gallo, R. C., Sarnagadharan, M. G., 1986. Characterization of highly immunogenic p66/p51 as the reverse transcriptase of HTLV-III/LAV. *Science* 231, 1289-91.
- Dimitrov, D. S., 2004. Virus entry: molecular mechanisms and biomedical applications. *Nat Rev Microbiol* 2, 109-22.
- DuBridges, R. B., Tang, P., Hsia, H. C., Leong, P. M., Miller, J. H., Calos, M. P., 1987. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* 7, 379-87.
- Duda, A., Stange, A., Lüftenegger, D., Stanke, N., Westphal, D., Pietschmann, T., Eastman, S. W., Linial, M. L., Rethwilm, A., Lindemann, D., 2004. Prototype foamy virus envelope glycoprotein leader peptide processing is mediated by a furin-like cellular protease, but cleavage is not essential for viral infectivity. *J Virol* 78, 13865-70.
- Eastman, S. W., Linial, M. L., 2001. Identification of a conserved residue of foamy virus Gag required for intracellular capsid assembly. *J Virol* 75, 6857-64.
- Ellermann, V., Bang, O., 1908. Experimentelle Leukämie bei Hühnern. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig.* 46, 595-609.
- Enders, J. F., Peebles, T. C., 1954. Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. *Proc Soc Exp Biol Med* 86, 277-86.
- Enssle, J., Fischer, N., Moebes, A., Mauer, B., Smola, U., Rethwilm, A., 1997. Carboxy-terminal cleavage of the human foamy virus Gag precursor molecule is an essential step in the viral life cycle. *J Virol* 71, 7312-7.

- Feldman, S. A., Audet, S., Beeler, J. A., 2000. The fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus facilitates virus attachment and infectivity via an interaction with cellular heparan sulfate. *J Virol* 74, 6442-7.
- Fenyőfalvi, G., Bagossi, P., Copeland, T. D., Oroszlan, S., Boross, P., Tozser, J., 1999. Expression and characterization of human foamy virus proteinase. *FEBS Lett* 462, 397-401.
- Fischer, N., Heinkelein, M., Lindemann, D., Enssle, J., Baum, C., Werder, E., Zentgraf, H., Müller, J. G., Rethwilm, A., 1998. Foamy virus particle formation. *J Virol* 72, 1610-5.
- Flint, S. J., Enquist, L. W., Racaniello, V. R., Skalka, A. M., 2009. Principles of Virology. ASM Press.
- Freed, E. O., Martin, M. A., 1996. Domains of the human immunodeficiency virus type 1 matrix and gp41 cytoplasmic tail required for envelope incorporation into virions. *J Virol* 70, 341-51.
- Ganser, B. K., Li, S., Klishko, V. Y., Finch, J. T., Sundquist, W. I., 1999. Assembly and analysis of conical models for the HIV-1 core. *Science* 283, 80-3.
- Geiselhart, V., Schwantes, A., Bastone, P., Frech, M., Lochelt, M., 2003. Features of the Env leader protein and the N-terminal Gag domain of feline foamy virus important for virus morphogenesis. *Virology* 310, 235-44.
- Geiselhart, V., Bastone, P., Kempf, T., Schnölzer, M., Löchelt, M., 2004. Furin-mediated cleavage of the feline foamy virus Env leader protein. *J Virol* 78, 13573-81.
- Goldstone, D. C., Flower, T. G., Ball, N. J., Sanz-Ramos, M., Yap, M. W., Ogrodowicz, R. W., Stanke, N., Reh, J., Lindemann, D., Stoye, J. P., Taylor, I. A., 2013. A unique spumavirus Gag N-terminal domain with functional properties of orthoretroviral matrix and capsid. *PLoS Pathog* 9, e1003376.
- Golomb, M., Grandgenett, D. P., 1979. Endonuclease activity of purified RNA-directed DNA polymerase from avian myeloblastosis virus. *J Biol Chem* 254, 1606-13.
- Gupta, K., Curtis, J. E., Krueger, S., Hwang, Y., Cherepanov, P., Bushman, F. D., Van Duyne, G. D., 2012a. Solution conformations of prototype foamy virus integrase and its stable synaptic complex with U5 viral DNA. *Structure* 20, 1918-28.
- Gupta, P., Garg, P., Roy, N., 2012b. Identification of novel HIV-1 integrase inhibitors using shape-based screening, QSAR, and docking approach. *Chem Biol Drug Des* 79, 835-49.
- Gustchina, A., Weber, I. T., 1990. Comparison of inhibitor binding in HIV-1 protease and in non-viral aspartic proteases: the role of the flap. *FEBS Lett* 269, 269-72.
- Hackett, A. J., Pfister, A., Arnstein, P., 1970. Biological properties of a syncytia-forming agent isolated from domestic cats (feline syncytia-forming virus). *Proc Soc Exp Biol Med* 135, 899-904.
- Hamann, M. V., Müllers, E., Reh, J., Stanke, N., Effantin, G., Weissenhorn, W., Lindemann, D., 2014. The cooperative function of arginine residues in the Prototype Foamy Virus Gag C-terminus mediates viral and cellular RNA encapsidation. *Retrovirology* 11, 87.
- Harada, F., Sawyer, R. C., Dahlberg, J. E., 1975. A primer ribonucleic acid for initiation of in vitro Rous sarcoma virus deoxyribonucleic acid synthesis. *J Biol Chem* 250, 3487-97.
- Hare, S., Gupta, S. S., Valkov, E., Engelman, A., Cherepanov, P., 2010. Retroviral intasome assembly and inhibition of DNA strand transfer. *Nature* 464, 232-6.
- Hartl, M. J., Wöhrl, B. M., Rösch, P., Schweimer, K., 2008. The solution structure of the simian foamy virus protease reveals a monomeric protein. *J Mol Biol* 381, 141-9.
- Hartl, M. J., Mayr, F., Rethwilm, A., Wöhrl, B. M., 2010a. Biophysical and enzymatic properties of the simian and prototype foamy virus reverse transcriptases. *Retrovirology* 7, 5.

- Hartl, M. J., Bodem, J., Jochheim, F., Rethwilm, A., Rösch, P., Wöhrl, B. M., 2011. Regulation of foamy virus protease activity by viral RNA: a novel and unique mechanism among retroviruses. *J Virol* 85, 4462-9.
- Hartl, M. J., Schweimer, K., Reger, M. H., Schwarzinger, S., Bodem, J., Rösch, P., Wöhrl, B. M., 2010b. Formation of transient dimers by a retroviral protease. *Biochem J* 427, 197-203.
- Hechler, T., Materniak, M., Kehl, T., Kuzmak, J., Löchelt, M., 2012. Complete genome sequences of two novel European clade bovine foamy viruses from Germany and Poland. *J Virol* 86, 10905-6.
- Heinkelein, M., Leurs, C., Rammling, M., Peters, K., Hanenberg, H., Rethwilm, A., 2002a. Pregenomic RNA is required for efficient incorporation of pol polyprotein into foamy virus capsids. *J Virol* 76, 10069-73.
- Heinkelein, M., Dressler, M., Jarmy, G., Rammling, M., Imrich, H., Thurow, J., Lindemann, D., Rethwilm, A., 2002b. Improved primate foamy virus vectors and packaging constructs. *J Virol* 76, 3774-83.
- Holzschu, D. L., Delaney, M. A., Renshaw, R. W., Casey, J. W., 1998. The nucleotide sequence and spliced pol mRNA levels of the nonprimate spumavirus bovine foamy virus. *J Virol* 72, 2177-82.
- Hooks, J., Gibbs, C. J., Jr., Chopra, H., Lewis, M., Gajdusek, D. C., 1972. Spontaneous transformation of human brain cells grown in vitro and description of associated viurs particles. *Science* 176, 1420-2.
- Hooks, J. J., Gibbs, C. J., Jr., 1975. The foamy viruses. *Bacteriol Rev* 39, 169-85.
- Hütter, S., Müllers, E., Stanke, N., Reh, J., Lindemann, D., 2013. Prototype foamy virus protease activity is essential for intraparticle reverse transcription initiation but not absolutely required for uncoating upon host cell entry. *J Virol* 87, 3163-76.
- Imrich, H., Heinkelein, M., Herchenröder, O., Rethwilm, A., 2000. Primate foamy virus Pol proteins are imported into the nucleus. *J Gen Virol* 81, 2941-7.
- Ingr, M., Uhlikova, T., Strisovsky, K., Majerova, E., Konvalinka, J., 2003. Kinetics of the dimerization of retroviral proteases: the "fireman's grip" and dimerization. *Protein Sci* 12, 2173-82.
- Ishima, R., Ghirlando, R., Tozser, J., Gronenborn, A. M., Torchia, D. A., Louis, J. M., 2001. Folded monomer of HIV-1 protease. *J Biol Chem* 276, 49110-6.
- Jacks, T., Townsley, K., Varmus, H. E., Majors, J., 1987. Two efficient ribosomal frameshifting events are required for synthesis of mouse mammary tumor virus gag-related polyproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 4298-302.
- Jacks, T., Power, M. D., Masiarz, F. R., Luciw, P. A., Barr, P. J., Varmus, H. E., 1988. Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* 331, 280-3.
- Jacobs, R. M., Pollari, F. L., McNab, W. B., Jefferson, B., 1995. A serological survey of bovine syncytial virus in Ontario: associations with bovine leukemia and immunodeficiency-like viruses, production records, and management practices. *Can J Vet Res* 59, 271-8.
- Jaskolski, M., Miller, M., Rao, J. K., Leis, J., Wlodawer, A., 1990. Structure of the aspartic protease from Rous sarcoma retrovirus refined at 2-Å resolution. *Biochemistry* 29, 5889-98.
- Johnson, R. H., de la Rosa, J., Abher, I., Kertayadnya, I. G., Entwistle, K. W., Fordyce, G., Holroyd, R. G., 1988. Epidemiological studies of bovine spumavirus. *Vet Microbiol* 16, 25-33.
- Johnston, P. B., 1961. A second immunologic type of simian foamy virus: monkey throat infections and unmasking by both types. *J Infect Dis* 109, 1-9.
- Johnston, P. B., 1971. Taxonomic features of seven serotypes of simian and ape foamy viruses. *Infect Immun* 3, 793-9.

- Jones, K. S., Petrow-Sadowski, C., Bertolette, D. C., Huang, Y., Ruscetti, F. W., 2005. Heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of human T-cell leukemia virus type 1 virions into CD4+ T cells. *J Virol* 79, 12692-702.
- Jordan, I., Enssle, J., Guttler, E., Mauer, B., Rethwilm, A., 1996. Expression of human foamy virus reverse transcriptase involves a spliced pol mRNA. *Virology* 224, 314-9.
- Katoh, I., Ikawa, Y., Yoshinaka, Y., 1989. Retrovirus protease characterized as a dimeric aspartic proteinase. *J Virol* 63, 2226-32.
- Katoh, I., Yasunaga, T., Ikawa, Y., Yoshinaka, Y., 1987. Inhibition of retroviral protease activity by an aspartyl proteinase inhibitor. *Nature* 329, 654-6.
- Konvalinka, J., Löchelt, M., Zentgraf, H., Flügel, R. M., Kräusslich, H. G., 1995a. Active foamy virus proteinase is essential for virus infectivity but not for formation of a Pol polyprotein. *J Virol* 69, 7264-8.
- Konvalinka, J., Litterst, M. A., Welker, R., Kottler, H., Rippmann, F., Heuser, A. M., Kräusslich, H. G., 1995b. 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, 7180-6.
- Kozisek, M., Henke, S., Saskova, K. G., Jacobs, G. B., Schuch, A., Buchholz, B., Müller, V., Kräusslich, H. G., Rezacova, P., Konvalinka, J., Bodem, J., 2012. Mutations in HIV-1 gag and pol compensate for the loss of viral fitness caused by a highly mutated protease. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 4320-30.
- Kulkosky, J., Skalka, A. M., 1994. Molecular mechanism of retroviral DNA integration. *Pharmacol Ther* 61, 185-203.
- Lee, E. G., Linial, M. L., 2008. The C terminus of foamy retrovirus Gag contains determinants for encapsidation of Pol protein into virions. *J Virol* 82, 10803-10.
- Lee, E. G., Roy, J., Jackson, D., Clark, P., Boyer, P. L., Hughes, S. H., Linial, M. L., 2011. Foamy retrovirus integrase contains a Pol dimerization domain required for protease activation. *J Virol* 85, 1655-61.
- Lehmann-Che, J., Giron, M. L., Delelis, O., Löchelt, M., Bittoun, P., Tobaly-Tapiero, J., de The, H., Saib, A., 2005. Protease-dependent uncoating of a complex retrovirus. *J Virol* 79, 9244-53.
- Leo, B., Hartl, M. J., Schweimer, K., Mayr, F., Wöhr, B. M., 2012a. Insights into the structure and activity of prototype foamy virus RNase H. *Retrovirology* 9, 14.
- Leo, B., Schweimer, K., Rösch, P., Hartl, M. J., Wöhr, B. M., 2012b. The solution structure of the prototype foamy virus RNase H domain indicates an important role of the basic loop in substrate binding. *Retrovirology* 9, 73.
- Li, S., Hill, C. P., Sundquist, W. I., Finch, J. T., 2000. Image reconstructions of helical assemblies of the HIV-1 CA protein. *Nature* 407, 409-13.
- Lindemann, D., Rethwilm, A., 2011. Foamy virus biology and its application for vector development. *Viruses* 3, 561-85.
- Lindemann, D., Pietschmann, T., Picard-Maureau, M., Berg, A., Heinkelein, M., Thurow, J., Knaus, P., Zentgraf, H., Rethwilm, A., 2001. A particle-associated glycoprotein signal peptide essential for virus maturation and infectivity. *J Virol* 75, 5762-71.
- Liu, J., Thorp, S. C., 2002. Cell surface heparan sulfate and its roles in assisting viral infections. *Med Res Rev* 22, 1-25.
- Löchelt, M., Flügel, R. M., 1996. The human foamy virus pol gene is expressed as a Pro-Pol polyprotein and not as a Gag-Pol fusion protein. *J Virol* 70, 1033-40.

- Löchelt, M., Zentgraf, H., Flügel, R. M., 1991. Construction of an infectious DNA clone of the full-length human spumaretrovirus genome and mutagenesis of the bel 1 gene. *Virology* 184, 43-54.
- Louis, J. M., Ishima, R., Nesheiwat, I., Pannell, L. K., Lynch, S. M., Torchia, D. A., Gronenborn, A. M., 2003. Revisiting monomeric HIV-1 protease. Characterization and redesign for improved properties. *J Biol Chem* 278, 6085-92.
- Malmquist, W. A., Van der Maaten, M. J., Boothe, A. D., 1969. Isolation, immunodiffusion, immunofluorescence, and electron microscopy of a syncytial virus of lymphosarcomatous and apparently normal cattle. *Cancer Res* 29, 188-200.
- Mannigel, I., Stange, A., Zentgraf, H., Lindemann, D., 2007. Correct capsid assembly mediated by a conserved YXXLGL motif in prototype foamy virus Gag is essential for infectivity and reverse transcription of the viral genome. *J Virol* 81, 3317-26.
- Martin, P. D., Vickrey, J. F., Proteasa, G., Jimenez, Y. L., Wawrzak, Z., Winters, M. A., Merigan, T. C., Kovari, L. C., 2005. Wide Open 1.3a Structure of a Multi-drug Resistant Hiv-1 Protease Represents a Novel Drug Target. *Structure* 13, 1.
- Materniak, M., Kuzmak, J., 2012. Occurrence of equine foamy virus infection in horses from poland. *Proceedings of the 9th International Foamy Virus Conference. Bethesda MD USA, 29-30 May 2012.*
- Maurer, B., Bannert, H., Darai, G., Flügel, R. M., 1988. Analysis of the primary structure of the long terminal repeat and the gag and pol genes of the human spumaretrovirus. *J Virol* 62, 1590-7.
- Miller, A. D., Buttimore, C., 1986. Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. *Mol Cell Biol* 6, 2895-902.
- Miller, C., 2012. Charakterisierung foamyviraler Partikel. Bachelor-Thesis.
- Miller, M., Jaskolski, M., Rao, J. K., Leis, J., Wlodawer, A., 1989. Crystal structure of a retroviral protease proves relationship to aspartic protease family. *Nature* 337, 576-9.
- Moebes, A., Enssle, J., Bieniasz, P. D., Heinkelein, M., Lindemann, D., Bock, M., McClure, M. O., Rethwilm, A., 1997. Human foamy virus reverse transcription that occurs late in the viral replication cycle. *J Virol* 71, 7305-11.
- Moelling, K., 1974. Characterization of reverse transcriptase and RNase H from friend-murine leukemia virus. *Virology* 62, 46-59.
- Mondor, I., Ugolini, S., Sattentau, Q. J., 1998. Human immunodeficiency virus type 1 attachment to HeLa CD4 cells is CD4 independent and gp120 dependent and requires cell surface heparans. *J Virol* 72, 3623-34.
- Müller, B., Anders, M., Akiyama, H., Welsch, S., Glass, B., Nikovics, K., Clavel, F., Tervo, H. M., Keppler, O. T., Kräusslich, H. G., 2009. HIV-1 Gag processing intermediates trans-dominantly interfere with HIV-1 infectivity. *J Biol Chem* 284, 29692-703.
- Müllers, E., Stirnnagel, K., Kaulfuss, S., Lindemann, D., 2011a. Prototype foamy virus gag nuclear localization: a novel pathway among retroviruses. *J Virol* 85, 9276-85.
- Müllers, E., Uhlig, T., Stirnnagel, K., Fiebig, U., Zentgraf, H., Lindemann, D., 2011b. Novel functions of prototype foamy virus Gag glycine- arginine-rich boxes in reverse transcription and particle morphogenesis. *J Virol* 85, 1452-63.
- Muranyi, W., Flügel, R. M., 1991. Analysis of splicing patterns of human spumaretrovirus by polymerase chain reaction reveals complex RNA structures. *J Virol* 65, 727-35.
- Nakamura, K., Miyazawa, T., Ikeda, Y., Sato, E., Nishimura, Y., Nguyen, N. T., Takahashi, E., Mochizuki, M., Mikami, T., 2000. Contrastive prevalence of feline retrovirus infections between northern and southern Vietnam. *J Vet Med Sci* 62, 921-3.

- Nasimuzzaman, M., Persons, D. A., 2012. Cell Membrane-associated heparan sulfate is a receptor for prototype foamy virus in human, monkey, and rodent cells. *Mol Ther* 20, 1158-66.
- Navia, M. A., Fitzgerald, P. M., McKeever, B. M., Leu, C. T., Heimbach, J. C., Herber, W. K., Sigal, I. S., Darke, P. L., Springer, J. P., 1989. Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1. *Nature* 337, 615-20.
- Netzer, K. O., Schliephake, A., Maurer, B., Watanabe, R., Aguzzi, A., Rethwilm, A., 1993. Identification of pol-related gene products of human foamy virus. *Virology* 192, 336-8.
- Pahl, A., Flügel, R. M., 1993. Endonucleolytic cleavages and DNA-joining activities of the integration protein of human foamy virus. *J Virol* 67, 5426-34.
- Pahl, A., Flügel, R. M., 1995. Characterization of the human spuma retrovirus integrase by site-directed mutagenesis, by complementation analysis, and by swapping the zinc finger domain of HIV-1. *J Biol Chem* 270, 2957-66.
- Pamba, R., Jeronimo, C., Archambault, D., 1999. Detection of bovine retrospumavirus by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 78, 199-208.
- Patel, M., Yanagishita, M., Roderiquez, G., Bou-Habib, D. C., Oravec, T., Hascall, V. C., Norcross, M. A., 1993. Cell-surface heparan sulfate proteoglycan mediates HIV-1 infection of T-cell lines. *AIDS Res Hum Retroviruses* 9, 167-74.
- Pearl, L. H., Taylor, W. R., 1987. A structural model for the retroviral proteases. *Nature* 329, 351-4.
- Peters, G., Harada, F., Dahlberg, J. E., Panet, A., Haseltine, W. A., Baltimore, D., 1977. Low-molecular-weight RNAs of Moloney murine leukemia virus: identification of the primer for RNA-directed DNA synthesis. *J Virol* 21, 1031-41.
- Peters, K., Wiktorowicz, T., Heinkelein, M., Rethwilm, A., 2005. RNA and protein requirements for incorporation of the Pol protein into foamy virus particles. *J Virol* 79, 7005-13.
- Pettit, S. C., Lindquist, J. N., Kaplan, A. H., Swanstrom, R., 2005a. Processing sites in the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Gag-Pro-Pol precursor are cleaved by the viral protease at different rates. *Retrovirology* 2, 66.
- Pettit, S. C., Everitt, L. E., Choudhury, S., Dunn, B. M., Kaplan, A. H., 2004. Initial cleavage of the human immunodeficiency virus type 1 GagPol precursor by its activated protease occurs by an intramolecular mechanism. *J Virol* 78, 8477-85.
- Pettit, S. C., Clemente, J. C., Jeung, J. A., Dunn, B. M., Kaplan, A. H., 2005b. Ordered processing of the human immunodeficiency virus type 1 GagPol precursor is influenced by the context of the embedded viral protease. *J Virol* 79, 10601-7.
- Pettit, S. C., Moody, M. D., Wehbie, R. S., Kaplan, A. H., Nantermet, P. V., Klein, C. A., Swanstrom, R., 1994. The p2 domain of human immunodeficiency virus type 1 Gag regulates sequential proteolytic processing and is required to produce fully infectious virions. *J Virol* 68, 8017-27.
- Pfrepper, K. I., Löchelt, M., Schnölzer, M., Flügel, R. M., 1997. Expression and molecular characterization of an enzymatically active recombinant human spumaretrovirus protease. *Biochem Biophys Res Commun* 237, 548-53.
- Pfrepper, K. I., Rackwitz, H. R., Schnölzer, M., Heid, H., Löchelt, M., Flügel, R. M., 1998. Molecular characterization of proteolytic processing of the Pol proteins of human foamy virus reveals novel features of the viral protease. *J Virol* 72, 7648-52.
- Pfrepper, K. I., Löchelt, M., Rackwitz, H. R., Schnölzer, M., Heid, H., Flügel, R. M., 1999. Molecular characterization of proteolytic processing of the Gag proteins of human spumavirus. *J Virol* 73, 7907-11.

- Picard-Maureau, M., Jarmy, G., Berg, A., Rethwilm, A., Lindemann, D., 2003. Foamy virus envelope glycoprotein-mediated entry involves a pH-dependent fusion process. *J Virol* 77, 4722-30.
- Pinon, J. D., Klasse, P. J., Jassal, S. R., Welson, S., Weber, J., Brighty, D. W., Sattentau, Q. J., 2003. Human T-cell leukemia virus type 1 envelope glycoprotein gp46 interacts with cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Virol* 77, 9922-30.
- Plochmann, K., Horn, A., Gschmack, E., Armbruster, N., Krieg, J., Wiktorowicz, T., Weber, C., Stirnagel, K., Lindemann, D., Rethwilm, A., Scheller, C., 2012. Heparan sulfate is an attachment factor for foamy virus entry. *J Virol* 86, 10028-35.
- Rasheed, S., Nelson-Rees, W. A., Toth, E. M., Arnstein, P., Gardner, M. B., 1974. Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer* 33, 1027-33.
- Rethwilm, A., 2007. Foamy virus vectors: an awaited alternative to gammaretro- and lentiviral vectors. *Curr Gene Ther* 7, 261-71.
- Rhee, S. S., Hunter, E., 1990. Structural role of the matrix protein of type D retroviruses in gag polyprotein stability and capsid assembly. *J Virol* 64, 4383-9.
- Rhim, H., Park, J., Morrow, C. D., 1991. Deletions in the tRNA(Lys) primer-binding site of human immunodeficiency virus type 1 identify essential regions for reverse transcription. *J Virol* 65, 4555-64.
- Rinke, C. S., Boyer, P. L., Sullivan, M. D., Hughes, S. H., Linial, M. L., 2002. Mutation of the catalytic domain of the foamy virus reverse transcriptase leads to loss of processivity and infectivity. *J Virol* 76, 7560-70.
- Rogers, N. G., Basnight, M., Gibbs, C. J., Gajdusek, D. C., 1967. Latent viruses in chimpanzees with experimental kuru. *Nature* 216, 446-9.
- Rous, P., 1911. A Sarcoma of the Fowl Transmissible by an Agent Separable from the Tumor Cells. *J Exp Med* 13, 397-411.
- Roy, J., Linial, M. L., 2007. Role of the foamy virus Pol cleavage site in viral replication. *J Virol* 81, 4956-62.
- Rustigian, R., Johnston, P., Reihart, H., 1955. Infection of monkey kidney tissue cultures with virus-like agents. *Proc Soc Exp Biol Med* 88, 8-16.
- Sakalian, M., Hunter, E., 1999. Separate assembly and transport domains within the Gag precursor of Mason-Pfizer monkey virus. *J Virol* 73, 8073-82.
- Saphire, A. C., Bobardt, M. D., Zhang, Z., David, G., Gallay, P. A., 2001. Syndecans serve as attachment receptors for human immunodeficiency virus type 1 on macrophages. *J Virol* 75, 9187-200.
- Sawyer, R. C., Dahlberg, J. E., 1973. Small RNAs of Rous sarcoma virus: characterization by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and fingerprint analysis. *J Virol* 12, 1226-37.
- Schlicht, H. J., Schaller, H., 1989. The secretory core protein of human hepatitis B virus is expressed on the cell surface. *J Virol* 63, 5399-404.
- Schliephake, A. W., Rethwilm, A., 1994. Nuclear localization of foamy virus Gag precursor protein. *J Virol* 68, 4946-54.
- Schneider, A., Peter, D., Schmitt, J., Leo, B., Richter, F., Rösch, P., Wöhrle, B. M., Hartl, M. J., 2014. Structural requirements for enzymatic activities of foamy virus protease-reverse transcriptase. *Proteins* 82, 375-85.
- Shen, L., Peterson, S., Sedaghat, A. R., McMahon, M. A., Callender, M., Zhang, H., Zhou, Y., Pitt, E., Anderson, K. S., Acosta, E. P., Siliciano, R. F., 2008. Dose-response curve slope sets class-specific limits on inhibitory potential of anti-HIV drugs. *Nat Med* 14, 762-6.

- Stenbak, C. R., Linial, M. L., 2004. Role of the C terminus of foamy virus Gag in RNA packaging and Pol expression. *J Virol* 78, 9423-30.
- Stiles, G. E., 1968. Serologic screening of rhesus and grivet monkeys for SV40 and the foamy viruses. *Proc Soc Exp Biol Med* 127, 225-30.
- Stirnagel, K., Lüftenegger, D., Stange, A., Swiersy, A., Müllers, E., Reh, J., Stanke, N., Grosse, A., Chiantia, S., Keller, H., Schwille, P., Hanenberg, H., Zentgraf, H., Lindemann, D., 2010. Analysis of prototype foamy virus particle-host cell interaction with autofluorescent retroviral particles. *Retrovirology* 7, 45.
- Summerford, C., Bartlett, J. S., Samulski, R. J., 1999. AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat Med* 5, 78-82.
- Sundquist, W. I., Kräusslich, H. G., 2012. HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a006924.
- Swiersy, A., Wiek, C., Reh, J., Zentgraf, H., Lindemann, D., 2011. Orthoretroviral-like prototype foamy virus Gag-Pol expression is compatible with viral replication. *Retrovirology* 8, 66.
- Tanaka, A., Jinno-Oue, A., Shimizu, N., Hoque, A., Mori, T., Islam, S., Nakatani, Y., Shinagawa, M., Hoshino, H., 2012. Entry of human T-cell leukemia virus type 1 is augmented by heparin sulfate proteoglycans bearing short heparin-like structures. *J Virol* 86, 2959-69.
- Temin, H. M., Mizutani, S., 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226, 1211-3.
- Tobaly-Tapiero, J., Bittoun, P., Giron, M. L., Neves, M., Koken, M., Saib, A., de The, H., 2001. Human foamy virus capsid formation requires an interaction domain in the N terminus of Gag. *J Virol* 75, 4367-75.
- Tobaly-Tapiero, J., Bittoun, P., Neves, M., Guillemin, M. C., Lecellier, C. H., Puvion-Dutilleul, F., Gicquel, B., Zientara, S., Giron, M. L., de The, H., Saib, A., 2000. Isolation and characterization of an equine foamy virus. *J Virol* 74, 4064-73.
- Verma, I. M., 1975. Studies on reverse transcriptase of RNA tumor viruses III. Properties of purified Moloney murine leukemia virus DNA polymerase and associated RNase H. *J Virol* 15, 843-54.
- Veverka, V., Bauerova, H., Zabransky, A., Pichova, I., Hrabal, R., 2001. Backbone resonance assignment of protease from Mason-Pfizer monkey virus. *J Biomol NMR* 20, 291-2.
- Veverka, V., Bauerova, H., Zabransky, A., Lang, J., Ruml, T., Pichova, I., Hrabal, R., 2003. Three-dimensional structure of a monomeric form of a retroviral protease. *J Mol Biol* 333, 771-80.
- Wieggers, K., Rutter, G., Kottler, H., Tessmer, U., Hohenberg, H., Krausslich, H. G., 1998. Sequential steps in human immunodeficiency virus particle maturation revealed by alterations of individual Gag polyprotein cleavage sites. *J Virol* 72, 2846-54.
- Wilk, T., Geiselhart, V., Frech, M., Fuller, S. D., Flügel, R. M., Löchelt, M., 2001. Specific interaction of a novel foamy virus Env leader protein with the N-terminal Gag domain. *J Virol* 75, 7995-8007.
- Wilk, T., de Haas, F., Wagner, A., Rutten, T., Fuller, S., Flügel, R. M., Löchelt, M., 2000. The intact retroviral Env glycoprotein of human foamy virus is a trimer. *J Virol* 74, 2885-7.
- Winkler, I., Bodem, J., Haas, L., Zemba, M., Delius, H., Flower, R., Flügel, R. M., Löchelt, M., 1997. Characterization of the genome of feline foamy virus and its proteins shows distinct features different from those of primate spumaviruses. *J Virol* 71, 6727-41.
- Winkler, I. G., Löchelt, M., Flower, R. L., 1999. Epidemiology of feline foamy virus and feline immunodeficiency virus infections in domestic and feral cats: a seroepidemiological study. *J Clin Microbiol* 37, 2848-51.

- Wlodawer, A., Gustchina, A., 2000. Structural and biochemical studies of retroviral proteases. *Biochim Biophys Acta* 1477, 16-34.
- Wlodawer, A., Miller, M., Jaskolski, M., Sathyanarayana, B. K., Baldwin, E., Weber, I. T., Selk, L. M., Clawson, L., Schneider, J., Kent, S. B., 1989. Conserved folding in retroviral proteases: crystal structure of a synthetic HIV-1 protease. *Science* 245, 616-21.
- WuDunn, D., Spear, P. G., 1989. Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *J Virol* 63, 52-8.
- Yu, S. F., Linial, M. L., 1993. Analysis of the role of the bel and bet open reading frames of human foamy virus by using a new quantitative assay. *J Virol* 67, 6618-24.
- Yu, S. F., Sullivan, M. D., Linial, M. L., 1999. Evidence that the human foamy virus genome is DNA. *J Virol* 73, 1565-72.
- Yu, S. F., Eastman, S. W., Linial, M. L., 2006. Foamy virus capsid assembly occurs at a pericentriolar region through a cytoplasmic targeting/retention signal in Gag. *Traffic* 7, 966-77.
- Yu, S. F., Baldwin, D. N., Gwynn, S. R., Yendapalli, S., Linial, M. L., 1996a. Human foamy virus replication: a pathway distinct from that of retroviruses and hepadnaviruses. *Science* 271, 1579-82.
- Yu, S. F., Edelmann, K., Strong, R. K., Moebes, A., Rethwilm, A., Linial, M. L., 1996b. The carboxyl terminus of the human foamy virus Gag protein contains separable nucleic acid binding and nuclear transport domains. *J Virol* 70, 8255-62.
- Zabranska, H., Tuma, R., Kluch, I., Svatos, A., Ruml, T., Hrabal, R., Pichova, I., 2007. The role of the S-S bridge in retroviral protease function and virion maturation. *J Mol Biol* 365, 1493-504.
- Zemba, M., Wilk, T., Rutten, T., Wagner, A., Flügel, R. M., Löchelt, M., 1998. The carboxy-terminal p3Gag domain of the human foamy virus Gag precursor is required for efficient virus infectivity. *Virology* 247, 7-13.
- Zhang, Y. J., Hatzioannou, T., Zang, T., Braaten, D., Luban, J., Goff, S. P., Bieniasz, P. D., 2002. Envelope-dependent, cyclophilin-independent effects of glycosaminoglycans on human immunodeficiency virus type 1 attachment and infection. *J Virol* 76, 6332-43.
- Zhu, P., Chertova, E., Bess, J., Jr., Lifson, J. D., Arthur, L. O., Liu, J., Taylor, K. A., Roux, K. H., 2003. Electron tomography analysis of envelope glycoprotein trimers on HIV and simian immunodeficiency virus virions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15812-7.

Ursprung der Abbildungen

A part of this work (Figures 4.17-4.21) has been adapted from the original article "The prototype foamy virus protease is active independently of the integrase domain." by **Spannaus, R.**, Hartl, M. J., Wohrl, B. M., Rethwilm, A., Bodem, J., *Retrovirology* 2012, 9, 41, (doi:10.1186/1742-4690-9-41; <http://www.retrovirology.com/content/9/1/41>). The original article is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

A part of this work (Figures 4.15-4.16) has been adapted from the original article: Copyright © American Society for Microbiology "Foamy virus Gag p71-p68 cleavage is required for template switch of the reverse transcriptase." by **Spannaus, R.**, Schneider, A., Hartl, M. J., Wohrl, B. M., Bodem, J., *J Virol* 2013, 87, 7774-6 (doi:10.1128/JVI.00833-13; <http://jvi.asm.org/content/87/13/7774>). RightsLink® - Permission Request: Authors in ASM journals retain the right to republish discrete portions of his/her article in any other publication (including print, CD-ROM, and other electronic formats) of which he or she is author or editor, provided that proper credit is given to the original ASM publication. ASM authors also retain the right to reuse the full article in his/her dissertation or thesis. For a full list of author rights, please see: http://journals.asm.org/site/misc/ASM_Author_Statement.xhtml.

A part of this work (Figures 4.7-4.14, 4.22-4.25 and Tables 4.3, 4.4, 5.1-5.3) has been adapted from the original article: Copyright © Elsevier "Determination of the protease cleavage site repertoire—The RNase H but not the RT domain is essential for foamy viral protease activity." by **Spannaus, R.**, Bodem, J., *Virology* 2013, 454-455, 145-156 (doi:10.1016/j.virol.2014.01.013; <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2014.02.013>), with permission from Elsevier.

Eigene Publikationen

- Spannaus, R.**, Hartl, M. J., Wöhrl, B. M., Rethwilm, A., Bodem, J., 2012. The prototype foamy virus protease is active independently of the integrase domain. *Retrovirology* 9, 41, doi:10.1186/1742-4690-9-41.
- Spannaus, R.**, Schneider, A., Hartl, M. J., Wöhrl, B. M., Bodem, J., 2013. Foamy virus Gag p71-p68 cleavage is required for template switch of the reverse transcriptase. *J Virol* 87, 7774-6, doi:10.1128/JVI.00833-13.
- Spannaus, R.**, Bodem, J., 2014. Determination of the protease cleavage site repertoire—The RNase H but not the RT domain is essential for foamy viral protease activity. *Virology* 454-455, 145-156, doi:10.1016/j.virol.2014.01.013.
- Wu, H., Bock, S., Snitko, M., Berger, T., Weidner, T., Holloway, S., Kanitz, M., Diederich, W. E., Steuber, H., Walter, C., Hofmann, D., Weißbrich, B., **Spannaus, R.**, Acosta, E. G., Bartenschlager, R., Engels, B., Schirmeister, T., Bodem, J., 2015. Novel Dengue virus NS2B/NS3 protease inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 59(2):1100-9. doi: 10.1128/AAC.03543-14.

Poster

- Spannaus, R.**, Bodem, J., 2012. Activation of Foamy Virus Protease is Independent of Integrase. Fisher, R., Henke, S., Zahn, J., Jacobs, G. B., Jochheim, F., **Spannaus, R.**, Preiser, W., Bodem, J., 2012. Molekulare mechanisms of viral resistance and protease activation.
- Spannaus, R.**, Bodem, J., 2012. Regulation of the Foamy Virus Protease Activity.
- Spannaus, R.**, Brunner, T., Bodem, J., 2013. Regulation of Foamy viral maturation and reverse transcription.

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
BFV	bovines Foamyvirus
Bp	Basenpaare
CTRS	zytoplasmatisches Targeting-Retentionssignal
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EFV	equines Foamyvirus
FFV	felines Foamyvirus
FPLC	schnelle Proteinflüssigkeitschromatographie
FV	Foamyvirus
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GR-Box	Glycin-Arginin reiches Motif
HIV-1	humanes Immundefizienzvirus Typ 1
HP	"high performance"
HRP	Meerrettichperoxydase
IN	Integrase
kDa	Kilodalton
LTR	lange terminale Repetition
MEM	minimales essenzielles Medium
MoMLV	Moloney Mausleukämievirus
MPMV	Mason-Pfizer Affenvirus
mRNA	Boten-RNA
ORF	offenes Leseraster
PARM	proteaseaktivierendes RNA-Motif
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PFV	prototypisches Foamyvirus
PPT	Polypurintrakt
PR	Protease
RIPA	Radioimmunoprecipitationsassay
RH	RNaseH
RNA	Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkriptase
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SFV	simianes Foamyvirus
SU	Oberflächenuntereinheit
tRNA	Transfer-RNA
Wt	Wildtyp

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Regulation der foamyviralen Proteaseaktivität“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled “Regulation of the foamy viral Protease Activity” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor similar form.

Würzburg, 25.02.2015

Ort,

Datum

Unterschrift

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Dr. Jochen Bodem für die Unterstützung und die freundliche Betreuung während meiner Doktorarbeit bedanken, wobei er nicht nur die wissenschaftliche Diskussion pflegte, sondern auch um mein leibliches Wohl bemüht war... Aprikosenkuchen... Fahrrad... Bobbahn!!!

Prof. Birgitta Wöhrl danke ich für die fachkundige Betreuung, unsere erfolgreiche Kooperation, die Übernahme des zweiten Gutachtens und ganz besonders für die Anregung, mich mit erfolgreichen Wissenschaftlerinnen auseinanderzusetzen.

Vielen Dank an Prof. Georg Krohne für seine unkomplizierte Art und für seine Bereitschaft, Teil meines Prüfungskomitees zu sein.

Prof. Thomas Hünig danke ich für die Zusage, die Leitung meiner Verteidigung zu übernehmen.

Bei Prof. Martin Löchelt möchte ich mich für die Bereitstellung des anti-Integrase-Antiserums bedanken.

Ich bedanke mich bei Theresa Brunner für ihre Unterstützung, die Durchführung der PCR-Reaktionen und ganz besonders für ihr herzhaftes Lachen.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Juliane Zahn für die schöne Zeit innerhalb und außerhalb des Labors und ihre zuverlässige Korrekturfunktion.

Ein großes Dankeschön auch an Steffi, Becki, Eva, Chris213, Jonas und alle anderen Laborkollegen für die Unterstützung und die Ablenkung, wenn sie einmal nötig war - strobbelst du noch oder strippest du schon???

Mein aufrichtiger Dank gilt meinen Eltern und dem Rest meiner Familie, die mir so gut Sie konnten zur Seite standen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Veronika nicht zuletzt für die fachkundigen Diskussionen über deutsche Rechtschreibung. Danke Schatz für dein Verständnis, den Rückhalt und deine Liebe!

...und natürlich den Jungs!