

# **Mechanismus der Polymerase-Inkorporation in foamyvirale Partikel**

**Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von  
Katrín Peters  
aus Wolfsburg

Würzburg, 2006

Eingereicht am: .....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: .....

Gutachter: .....

Gutachter: .....

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	ORTHORETROVIREN.....	2
1.1.1	<i>Aufbau</i> .....	2
1.1.2	<i>Genomorganisation</i> .....	3
1.1.3	<i>Virale Proteine</i> .....	5
1.1.3.1	Gag (Gruppenspezifisches Antigen).....	5
1.1.3.2	Pro und Pol (Protease & Polymerase).....	6
1.1.3.3	Env (envelope = Hülle).....	8
1.1.3.4	Regulatorische und akzessorische Proteine.....	9
1.1.4	<i>Replikationszyklus</i> .....	9
1.2	FOAMYVIREN.....	12
1.2.1	<i>Aufbau</i> .....	13
1.2.2	<i>Genomorganisation</i> .....	14
1.2.3	<i>Virale Proteine</i> .....	16
1.2.3.1	Gag (Gruppenspezifisches Antigen).....	16
1.2.3.2	Pol (Polymerase).....	17
1.2.3.3	Env (envelope = Hülle).....	18
1.2.3.4	Regulatorische und akzessorische Proteine.....	19
1.2.4	<i>Replikationszyklus</i> .....	20
1.3	FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG.....	21
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>23</b>
2.1	MATERIALIEN.....	23
2.1.1	<i>Chemikalien</i> .....	23
2.1.2	<i>Enzyme und Reaktionspuffer</i> .....	23
2.1.3	<i>Antibiotika</i> .....	23
2.1.4	<i>Bakterienstämme</i> .....	23
2.1.5	<i>Zelllinien</i> .....	24
2.1.6	<i>Größen-/Längenstandards</i> .....	24
2.1.7	<i>Antikörper</i> .....	24
2.1.8	<i>Plasmide</i> .....	24
2.1.8.1	Retrovirale Vektoren.....	24
2.1.8.2	Expressionsplasmide.....	25
2.1.9	<i>Oligonukleotide</i> .....	25
2.1.10	<i>Kits</i> .....	27
2.1.11	<i>Sonstiges Material</i> .....	27
2.2	PUFFER UND LÖSUNGEN.....	27
2.2.1	<i>Bakterienkultur</i> .....	27
2.2.2	<i>Puffer und Lösungen zur Analyse und Klonierung von DNA</i> .....	28
2.2.3	<i>Zellkultur</i> .....	30
2.2.4	<i>Puffer und Lösungen für zellbiologische Methoden</i> .....	30
2.2.5	<i>Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden</i> .....	31
2.2.6	<i>Puffer und Lösungen für RNA-Methoden</i> .....	32
2.2.7	<i>Standardlösungen und Puffer</i> .....	32
2.3	METHODEN.....	33
2.3.1	<i>Molekularbiologische Methoden</i> .....	33
2.3.1.1	Herstellung kompetenter Bakterien.....	33

## Inhaltsverzeichnis

---

2.3.1.2	Transformation kompetenter Bakterien.....	34
2.3.1.2.1	Lange Transformation .....	34
2.3.1.2.2	Quick-Transformation .....	34
2.3.1.3	Plasmidisolierung aus E. coli.....	35
2.3.1.3.1	Mini-Präparation von Plasmid-DNA .....	35
2.3.1.3.2	Maxi-Präparation von Plasmid-DNA .....	36
2.3.1.4	Spektrophotometrische Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen.....	36
2.3.1.5	DNA-Agarosegelelektrophorese .....	36
2.3.1.6	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	37
2.3.1.7	Restriktionsverdau von DNA .....	37
2.3.1.8	Ligation linearer DNA-Fragmente .....	38
2.3.1.9	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten .....	38
2.3.1.10	Umwandlung von überhängenden in glatte DNA-Enden.....	39
2.3.1.11	Hybridisierung und Einfügen von Oligonukleotiden .....	39
2.3.1.12	Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation von DNA.....	40
2.3.1.13	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	41
2.3.1.14	Sequenzierung von DNA.....	42
2.3.2	<i>Zellkulturmethoden</i> .....	43
2.3.2.1	Kultivierung adhärenter Zelllinien .....	43
2.3.2.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	44
2.3.2.3	Transfektion und Induktion .....	44
2.3.3	<i>Proteinbiochemische Methoden</i> .....	46
2.3.3.1	Herstellung von Zellysaten für die Proteingelelektrophorese .....	46
2.3.3.2	Tricin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	46
2.3.3.3	Western Blot.....	47
2.3.4	<i>Virologische Methoden</i> .....	49
2.3.4.1	Das retrovirale Infektionssystem.....	49
2.3.4.2	Infektionsanalyse.....	49
2.3.4.3	Viruspartikelpräparation.....	50
2.3.5	<i>RNA-Methoden</i> .....	51
2.3.5.1	Herstellung einer RNA-Sonde.....	51
2.3.5.2	RNase Protection Assay (RPA).....	52
2.3.5.3	RNA-Sekundärstrukturanalyse.....	54
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>55</b>
3.1	UNTERSUCHUNG DES MECHANISMUS DER INKORPORATION DES POL-PROTEINS IN FOAMYVIRALE PARTIKEL .....	55
3.2	UNTERSUCHUNG DER FÜR DIE POL-INKORPORATION NOTWENDIGEN RNA-SEQUENZBEREICHE .....	58
3.2.1	<i>Deletionsanalyse der cis-aktiven Sequenz I (CASI)</i> .....	59
3.2.2	<i>Deletionsanalyse der cis-aktiven Sequenz II (CASII)</i> .....	63
3.2.2.1	Deletionsanalyse der CASII .....	63
3.2.2.1.1	Deletionsanalyse der CASII im Ausgangsvektor pMH66.....	63
3.2.2.1.2	Deletionsanalyse der CASII im Ausgangsvektor pMD9.....	68
3.2.2.2	Deletionsanalyse des 3' Bereiches der CASII im Ausgangsvektor pMD9.....	73
3.2.2.3	Analyse des 5' Bereiches der PES <sub>nt4884-5628</sub> .....	77
3.2.2.4	Analyse des 3' Bereiches der PES <sub>nt4884-5628</sub> .....	80

# Inhaltsverzeichnis

---

3.3	UNTERSUCHUNG DER VORAUSSETZUNGEN AUF PROTEINEBENE FÜR DIE INKORPORATION DES FOAMYVIRUS POL-PROTEINS .....	84
3.3.1	<i>Analyse der Verpackung der Pol-Untereinheiten in foamyvirale Partikel..</i>	84
3.3.2	<i>Analyse der Notwendigkeit enzymatischer Aktivität der Enzyme des Pol- Vorläuferproteins für die Pol-Inkorporation .....</i>	87
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>90</b>
4.1	UNTERSUCHUNG DES MECHANISMUS DER POL-INKORPORATION IN FOAMYVIRALE PARTIKEL .....	91
4.2	UNTERSUCHUNG DER FÜR DIE POL-INKORPORATION NOTWENDIGEN RNA- SEQUENZBEREICHE .....	94
4.2.1	<i>Analyse der cis-aktiven Sequenz I (CASI).....</i>	94
4.2.2	<i>Analyse der cis-aktiven Sequenz II (CASII).....</i>	97
4.3	UNTERSUCHUNG DER PROTEINVORAUSSETZUNGEN FÜR DIE POL-INKORPORATION .....	105
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>108</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>121</b>
6.1	ZUSAMMENFASSUNG .....	121
6.2	SUMMARY .....	122
6.3	KLONIERUNGSSTRATEGIEN.....	124
6.4	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	126
6.5	ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	128
6.6	TABELLENVERZEICHNIS.....	129
6.7	ERKLÄRUNGEN .....	130
6.8	LEBENS LAUF .....	131
6.9	PUBLIKATIONS LISTE .....	132

# 1 Einleitung

Zur Familie der Retroviren (Retroviridae) gehören eine Vielzahl von Erregern, die unterschiedliche Vertebratenspezies infizieren. Allen gemein ist ihr Replikationszyklus, der sie von anderen Virusfamilien unterscheidet. Die Viruspartikel enthalten im allgemeinen ein RNA-Genom, welches nach dem Eindringen in die Zelle in DNA umgeschrieben und als sogenanntes Provirus in die zelluläre DNA integriert wird. Von diesem Provirus werden RNAs transkribiert, die als genomische RNA für Nachkommenviren oder als mRNA für die Translation von Virusproteinen dienen (Goff, 2001).

Einzigartig an diesem Lebenszyklus ist das Umschreiben von RNA in eine komplementäre DNA und die Integration dieser DNA in das zelluläre Genom. Hierfür sind zwei spezielle Enzyme nötig, die Reverse Transkriptase und die Integrase. Bis zur Entdeckung der Reversen Transkriptase (Baltimore, 1970; Temin & Mizutani, 1970) wurde davon ausgegangen, daß die genetische Information nur von DNA über RNA zum Protein fließt und niemals von RNA zu DNA. Neben den Retroviren besitzen nur noch zwei weitere Virusgruppen das Enzym Reverse Transkriptase, die Hepadna- und die Caulimoviren. Auch sie schreiben während ihres Lebenszyklus RNA in DNA um, allerdings integrieren sie im Gegensatz zu den Retroviren nicht in das Genom der Wirtszelle.

Die Retroviridae bestehen aus sieben Genera von denen sechs die Unterfamilie Orthoretrovirinae bilden. Der siebte Genus sind die Foamyviren (FV), sie bilden aufgrund vieler Unterschiede zu den anderen Genera eine eigene Unterfamilie: die Spumavirinae (Tab. 1). Zusätzlich kann man die Retroviren anhand ihrer Genomstruktur in zwei Gruppen einteilen. Die einfachen Retroviren codieren nur die kanonischen Gene *gag*, *pro*, *pol* und *env*, während die komplexen Retroviren neben diesen noch weitere Gene z. B. für regulatorische Proteine besitzen (Tab. 1).

Retroviren spielen als Pathogene unter Vertebraten eine große Rolle. Zu den bedeutendsten humanpathogenen Retroviren gehören das humane Immundefizienzvirus (HIV), Erreger der Immunschwäche AIDS (Barre-Sinoussi et al., 1983) und das humane T-Zell-Leukämie-Virus (HTLV), Verursacher von T-Zell-Leukämien (Poiesz et al., 1980).

**Tab. 1: Die ICTV-Nomenklatur der Retroviridae (verändert nach Rethwilm, 2003)**

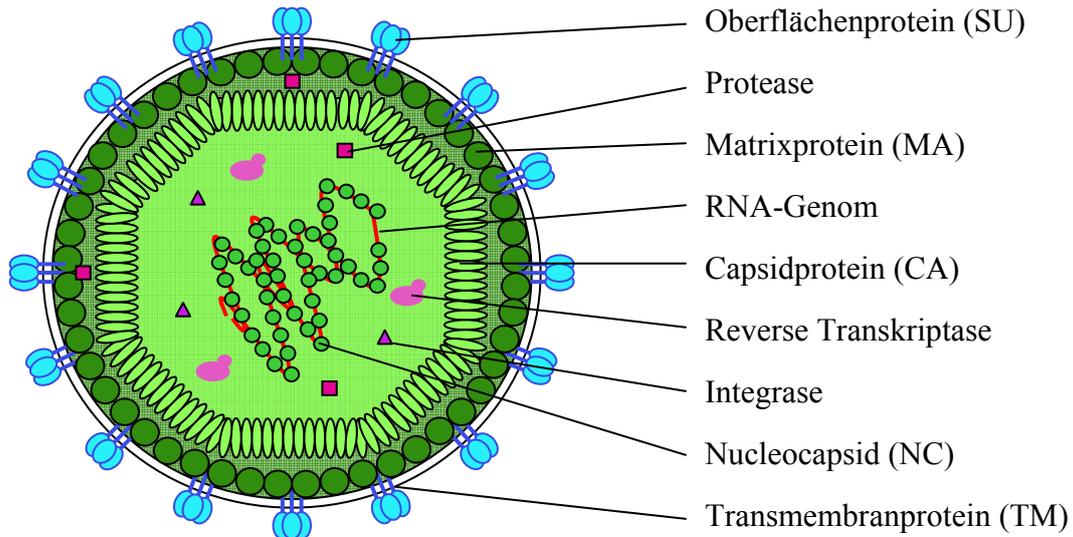
Unterfamilie	Genus	Beispiele	Genom
Orthoretrovirinae	Alpharetroviren	<i>Avian Leukosis Virus (ALV)</i> <i>Rous Sarcoma Virus (RSV)</i>	einfach
	Betaretroviren	<i>Mason-Pfizer Monkey Virus (MPMV)</i> <i>Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV)</i>	einfach & komplex*
	Gammaretroviren	<i>Murine Leukemia Virus (MuLV)</i>	einfach
	Deltaretroviren	<i>Human T-Cell Leukemia Virus (HTLV)</i> <i>Bovine Leukemia Virus (BLV)</i>	komplex
	Epsilonretroviren	<i>Walleye Dermal Sarcoma Virus (WDSV)</i>	komplex
	Lentiviren	<i>Human Immunodeficiency Virus (HIV)</i>	komplex
Spumaretrovirinae	Foamyviren	<i>Prototype Foamy Virus (PFV)</i>	komplex

\* Für MMTV wurde kürzlich ein zusätzliches, regulatorisches Protein beschrieben, damit ist MMTV das bislang einzig bekannte komplexe Betaretrovirus (Mertz et al., 2005).

## 1.1 Orthoretroviren

### 1.1.1 Aufbau

Orthoretroviren sind umhüllte Viren mit einem Durchmesser von 80-120 nm. Das Virusgenom besteht aus zwei einzelsträngigen, positiv orientierten Ribonukleinsäuren. Diese werden im reifen Partikel von Nukleokapsidproteinen (NC) stabilisiert und zusammen mit den viralen Enzymen Reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN) und Protease (PR) von einer Proteinhülle aus Kapsidproteinen (CA) umschlossen, wobei die Protease sich sowohl innerhalb als auch außerhalb dieses Kapsids befindet (Abb. 1). Das Kapsid wiederum ist von einer Matrix und diese von einer Hüllmembran umgeben, hierbei stellen die Matrix-Proteine (MA) ein Bindeglied zwischen dem Kapsid und der Hüllmembran dar. Die Hüllmembran stammt von der infizierten Zelle, in ihr ist ein virales Glykoprotein, das Transmembranprotein (TM) verankert. Ein zweites Glykoprotein, das Oberflächenprotein (SU), befindet sich außerhalb des Virions und ist mit dem Transmembranprotein assoziiert (Abb. 1) (Vogt, 1997a).



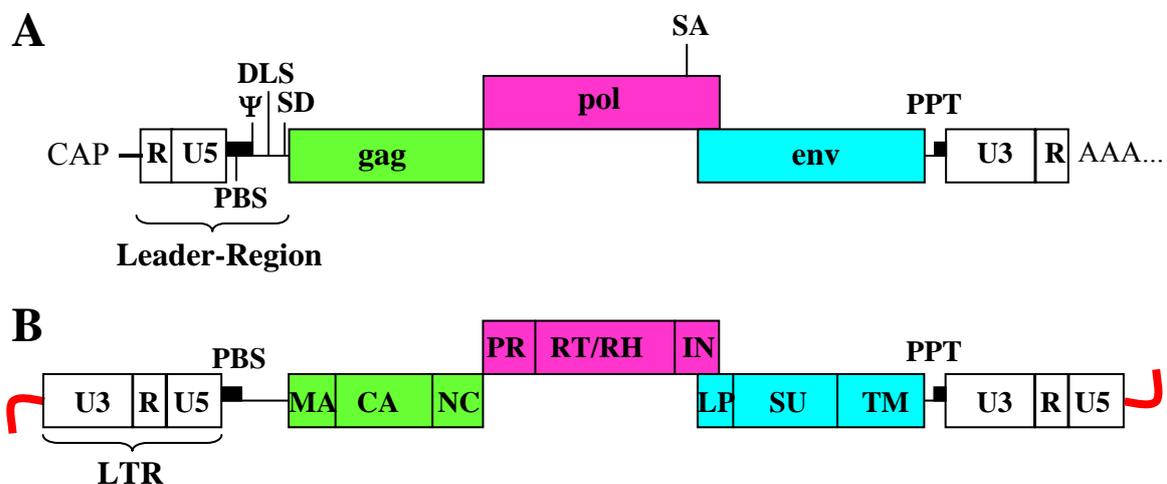
**Abb. 1: Typischer Aufbau eines Orthoretrovirus**

### 1.1.2 Genomorganisation

Das retrovirale Genom ist ein Homodimer zweier 7-12 kb großer, einzelsträngiger, positiv orientierter RNAs, die wie alle eukaryotischen mRNAs eine CAP-Struktur am 5' Ende aufweisen und am 3' Ende polyadenyliert sind (Abb. 2). Die RNA beginnt mit der R-Region, welche sich in identischer Basenfolge und gleicher Orientierung am 3' Ende der RNA wiederholt. Sie spielt bei der reversen Transkription eine entscheidende Rolle und ist zwischen 15 und 240 Nukleotide (nt) lang. Es folgt die U5-Region, die zwischen 60 und 200 nt umfaßt und für die Integration der viralen DNA wichtige Sequenzen enthält (Goff, 2001). Direkt anschließend liegt die aus 18 Nukleotiden bestehende Primerbindungsstelle (PBS). Im Viruspartikel ist an die PBS eine zelluläre tRNA hybridisiert, die als Primer für die Minusstrang-DNA-Synthese dient (Harada et al., 1975; Peters & Dahlberg, 1979; Vogt, 1997a). Zwischen der PBS und dem codierenden Bereich liegt die Leader-Region, eine kurze nicht codierende Sequenz, die gemeinsam mit der R- und U5-Region die 5' UTR (*untranslated region*) bildet. In der 5' UTR liegen weitere wichtige cis-aktive Sequenzen, wie die spezifische Erkennungssequenz für die Verpackung der genomischen RNA ins Partikel ( $\Psi$  = Psi-Element) (Berkowitz et al., 1996), mit Ausnahme der Alpharetroviren der Hauptpleißdonor und häufig auch eine Sequenz, die für die Dimerisierung der beiden viralen RNA-Moleküle entscheidend ist (*dimer linkage site*, DLS) (Vogt, 1997a).

Im codierenden Bereich des Genoms existieren mindestens drei offene Leserahmen (ORF) mit den Genen *gag*, *pol* und *env*. *Gag* codiert für die Matrix-, die Kapsid- und die Nukleokapsidproteine, *pol* für die Reverse Transkriptase und Integrase und *env* für die Glykoproteine (Abb. 2). Das Protease-Gen (*pro*) liegt meistens im *pol* oder im *gag* ORF, seltener stellt es einen eigenen, vierten offenen Leserahmen dar (siehe 1.1.3.2). Stromabwärts der codierenden Region liegt der Polypurintrakt (PPT), eine Folge von mindestens 9 Adenosin- und Guanosinresten, die für die Initiation der Plusstrang-DNA-Synthese wichtig sind. Anschließend folgt die 150 bis 1200 Nukleotide umfassende U3-Region (Abb. 2) (Goff, 2001), die wie die U5-Region Bindungsstellen der Integrase enthält. Außerdem ist sie essentiell für die Genexpression des Provirus, da sie den Promotor und weitere cis-aktive Sequenzen enthält.

Komplexe Retroviren besitzen neben den erwähnten Genen *gag*, *pro*, *pol* und *env* noch weitere regulatorische und akzessorische Gene. Diese liegen meistens 3' im Genom zwischen *pol* und der U3-Region und codieren beispielsweise für Transaktivatoren des Promotors (Vogt, 1997a).



**Abb. 2: Genomorganisation eines einfachen Retrovirus**

(A) *virales RNA-Genom*

(B) *integriertes DNA-Provirus*

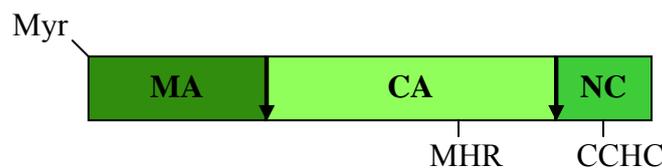
(PBS) Primerbindungsstelle; (Ψ) Verpackungssignal; (DLS) dimer linkage site; (SD) Spleißdonor; (SA) Spleißakzeptor; (PPT) Polypurintrakt; (AAA...) Polyadenylierung; (LTR) long terminal repeat; (MA) Matrixprotein; (CA) Kapsidprotein; (NC) Nukleokapsidprotein; (PR) Protease; (RT/RH) Reverse Transkriptase/RnaseH; (IN) Integrase; (LP) Leaderpeptid; (SU) Oberflächenuntereinheit und (TM) Transmembranuntereinheit des Glykoproteins

### 1.1.3 Virale Proteine

#### 1.1.3.1 Gag (Gruppenspezifisches Antigen)

Die Strukturproteine der Orthoretroviren, wie Matrix- (MA), Kapsid- (CA) und Nukleokapsidproteine (NC) werden vom *gag*-Gen codiert. Gag wird von einer mRNA translatiert, die der genomischen RNA entspricht. Es wird als Vorläuferprotein an freien Ribosomen synthetisiert, in den meisten Orthoretroviren kotranslational aminoterminal myristyliert (Henderson et al., 1983; Schultz et al., 1988; Wilcox et al., 1987) und interagiert über diesen Myristylinsäurerest mit den Fettsäuren der Plasmamembran. Der Nukleokapsidteil des Vorläuferproteins bindet die Verpackungssequenz der genomischen RNA und stellt deren Verpackung sicher. Während der Virusreifung wird das Vorläuferprotein von der viralen Protease in die Untereinheiten MA, CA und NC gespalten. In allen Orthoretroviren sind die Gag-Proteine ähnlich aufgebaut, aminoterminal liegt das MA, gefolgt von CA und NC (Abb. 3) (Vogt, 1997a). Darüber hinaus besitzen diverse Orthoretroviren noch weitere Gag-Protein-Spaltprodukte, mit unterschiedlichen, teilweise wenig bekannten Funktionen. Interessanterweise liegt in einigen Viren, z. B. HIV die Late-Domäne in diesen zusätzlichen Spaltprodukten. Late-Domänen interagieren während der Partikelmorphogenese mit der Exportmaschinerie der Zelle und gewährleisten die Abschnürung der Viruspartikel von der Zellmembran (Goff, 2001; Göttlinger et al., 1991, Huang et al., 1995; Swanstrom & Wills, 1997).

Die meisten Gag-Proteine der Orthoretroviren besitzen konservierte Sequenzbereiche, unter anderem die *major homology region* (MHR), eine Folge von 20 Aminosäuren unbekannter Funktion, im Kapsidprotein. Ein weiterer hoch konservierter Sequenzbereich, das CCHC-Motiv, liegt im Nukleokapsidprotein. Es ist eine charakteristische Abfolge von Cysteinen und Histidinen (CX<sub>2</sub>CX<sub>4</sub>HX<sub>4</sub>C), die einem Zinkfinger, einem typischen Nukleinsäurebindungsmotiv ähnelt. Hierbei handelt es sich um eine wichtige Bindungsstelle für die genomische RNA (Berkowitz et al., 1993; Clever et al., 1995; Vogt, 1997a).



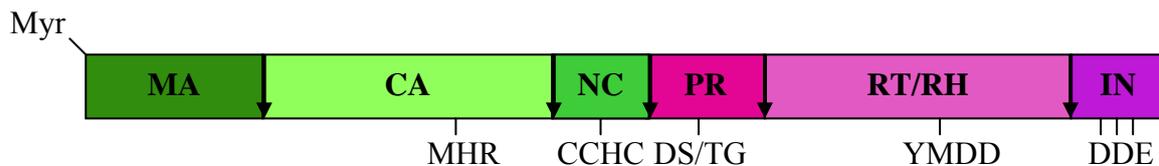
**Abb. 3: Gag-Vorläuferprotein eines Orthoretrovirus**

Die Schnittstellen der Protease sind durch Pfeile dargestellt. (Myr) Myristylinsäurerest; (MA) Matrixprotein; (CA) Kapsidprotein; (NC) Nukleokapsidprotein; (MHR) major homology region; (CCHC) CCHC-Motiv

### 1.1.3.2 Pro und Pol (Protease & Polymerase)

Die Besonderheiten im retroviralen Lebenszyklus sind das Umschreiben von RNA in DNA und die Integration dieser DNA ins Wirtsgenom. Die dafür verantwortlichen enzymatischen Aktivitäten, Reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN), werden durch das *pol*-Gen codiert. RT schreibt die RNA in DNA um und IN führt die Integration der linearen viralen DNA in das zelluläre Genom aus. Die RT besitzt neben der DNA-Polymerase-Aktivität eine RNaseH-Aktivität, die aus RNA/DNA-Hybriden den RNA-Anteil abbaut. Desweiteren wird eine viruseigene Protease (PR) codiert, die mit den zellulären Aspartat-Proteasen verwandt ist (Kato et al., 1989; Loeb et al., 1989; Goff, 2001) und unter anderem das Gag-Vorläuferprotein prozessiert. Das Gen für die Protease (*pro*) befindet sich bei den meisten Orthoretrovirusgenera im gleichen Leseraster wie *pol* (Gamma-, Epsilonretro- und Lentiviren), bei anderen in dem von *gag* (Alpharetroviren) und bei den Beta- und Deltaretroviren befindet es sich in einem eigenen Leseraster. Neben diesen Enzymen besitzen einige Orthoretroviren (z. B. EIAV, FIV, MPMV) noch ein weiteres Protein, eine dUTPase. Diese degradiert effizient und spezifisch Desoxyuridintriphosphate und verhindert so deren Einbau in die DNA während der reversen Transkription (Payne & Elder, 2001; Vogt, 1997a).

Die Reihenfolge der codierten Enzyme ist, mit Ausnahme der Sequenz für die dUTPase, in allen Retroviren gleich. Sie beginnt 5' mit der Protease, gefolgt von der Reversen Transkriptase einschließlich der RNaseH-Aktivität und endet 3' mit der Integrase (Abb. 4).



**Abb. 4: Gag-Pol-Vorläuferprotein eines Orthoretrovirus**

Die Schnittstellen der Protease sind durch Pfeile dargestellt. (Myr) Myristylinsäurerest; (MA) Matrixprotein; (CA) Kapsidprotein; (NC) Nukleokapsidprotein; (PR) Protease; (RT/RH) Reverse Transkriptase/RnaseH; (IN) Integrase; (MHR) major homology region; (CCHC) CCHC-Motiv; (DS/TG, YMDD, DDE) aktive Zentren der Enzyme

Die Pro- und Pol-Proteine werden als Gag-Pro-Pol-Fusionsproteine exprimiert und im Laufe der Virusreifung durch die virale Protease in die einzelnen Proteine gespalten. In den Genera Gamma- und Epsilonretroviren liegen *gag* und *pol* im gleichen Leseraster, getrennt durch ein Stopcodon. Durch Suppression dieses Stopcodons kommt es zur

Translation eines Gag-Pol-Vorläuferproteins (Philipson et al., 1978; Yoshinaka et al., 1985). In den meisten Fällen jedoch überlappen sich die Gene von Gag und Pol und liegen in unterschiedlichen Leserastern (Alpharetro- und Lentiviren). Hier kommt es nur dann zur Translation eines Gag-Pol-Fusionsproteins, wenn es zu einer Verschiebung des Leserasters um -1 kommt (Jacks & Varmus, 1985). Sowohl die Suppression der Termination als auch die Regulation über einen Leserasterwechsel geschieht verhältnismäßig selten und führt zu einem Expressionsverhältnis von Gag zu Reverser Transkriptase und Integrase von 10-20 zu eins (Hayman, 1978; Jamjoom et al., 1977; Oppermann et al., 1977).

Liegt *pro* in einem eigenen Leserahmen (Beta- und Deltaretroviren), so finden zwei ribosomale Leserasterwechsel statt, zunächst zwischen Gag und der Protease und ein weiteres Mal zwischen der Protease und der Reversen Transkriptase. Dies führt dazu, daß mehr Protease als Reverse Transkriptase oder Integrase synthetisiert wird (Jacks et al., 1987; Moore et al., 1987; Nam et al., 1993).

Im Fall der Alpharetroviren befindet sich die Protease im *gag*-Leseraster und bildet quasi die carboxyterminale Domäne von Gag. Dadurch werden gleiche Mengen Protease und Gag gebildet, gleichzeitig aber ca. 20 mal mehr Protease als Reverse Transkriptase und Integrase.

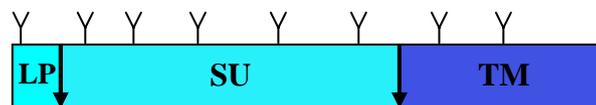
Bei allen Unterschieden in der Pol-Expression ist entscheidend, daß alle Orthoretroviren Gag-Pro-Pol-Fusionsproteine bilden. Durch die Kopplung der Expression von *gag* und *pol* wird sichergestellt, daß deutlich weniger Enzyme als Strukturproteine gebildet werden. Diese Kontrolle des Mengenverhältnisses zwischen Gag und Pol ist nicht nur ökonomisch sondern auch notwendig, da wesentlich mehr Strukturproteine als Enzyme zur Partikelbildung benötigt werden und die Protease in hoher Konzentration zytotoxisch ist (Kaplan & Swanstrom, 1991; Orlova et al., 2003). In den Genera, in denen große Mengen an Protease gebildet werden (z. B. Alpharetroviren), wird eine geringere Effizienz der Protease vermutet (Grinde et al., 1992; Swanstrom & Wills, 1997). Außerdem gewährleistet die Bildung eines Gag-Pro-Pol-Fusionsproteins eine effektive Verpackung der viralen Enzyme in das orthovirale Partikel und verhindert eine frühzeitige Aktivierung der enzymatischen Aktivität der Pol-Proteine vor dem Einbau ins virale Partikel (Swanstrom & Wills, 1997).

Zwischen den verschiedenen Orthoretrovirusgenera gibt es sehr wenige Übereinstimmungen auf der Nukleotidebene und nur begrenzte Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz der codierten Enzyme. Die Ausnahme ist eine konservierte Region in

der Reversen Transkriptase, diese zeigt eine Aminosäureidentität von einem bis zwei Dritteln. Trotz dieser geringen Übereinstimmungen sind die aktiven Zentren der Enzyme konserviert. In der Protease ist es ein DTG bzw. DSG-Motiv, in der Reversen Transkriptase ein YMDD-Motiv und in der Integrase ein charakteristisches DD<sub>35</sub>E-Motiv (Abb. 4) (Kulkosky et al., 1992; Swanstrom & Wills, 1997).

### 1.1.3.3 *Env (envelope = Hülle)*

Die essentielle Funktion der Glykoproteine umhüllter Viren ist die Adsorption des Partikels an die Zielzelle durch Bindung des zellulären Rezeptors und die folgende Fusion der viralen und zellulären Lipidmembran, um das Partikel ins Zytoplasma zu entlassen. Orthoretroviren besitzen zwei Glykoproteine, die von einem gemeinsamen Vorläuferprotein (Env) stammen. Das Env-Protein wird von einer gespalteten mRNA translatiert, die aminoterminal ein Leaderpeptid codiert. Dieses führt zu einer Assoziation mit dem Endoplasmatischen Reticulum (ER). Hier wird das Leaderpeptid entfernt und degradiert oder weiter prozessiert. Das Env-Vorläuferprotein wird während des Transports vom ER durch den Golgi-Apparat zur Plasmamembran glykosyliert und von zellulären Furin-ähnlichen Proteasen in zwei Untereinheiten gespalten (Swanstrom & Wills, 1997). Diese Spaltung in Oberflächen- (SU) und Transmembranuntereinheit (TM) ist essentiell für die Infektiosität des Virus (McCune et al., 1988; Perez et al., 1987; Vogt, 1997a) (Abb. 5). Die TM ist in der Membran verankert und mit der vollständig außerhalb des Virions liegenden SU assoziiert. Die Rezeptorbindung wird von der stark glykosylierten SU vermittelt, während die TM an der Fusion der Zell- mit der Virusmembran beteiligt ist. Die beiden Untereinheiten liegen in Trimeren vor, wobei die Oligomerisierung durch die TM vermittelt wird (Doms et al., 1990; Einfeld & Hunter, 1988 & 1994; Lu et al., 1995).



**Abb. 5: Env-Vorläuferprotein eines Orthoretrovirus**

Die Schnittstellen der zellulären Protease sind durch Pfeile dargestellt. (Y) Zuckerreste; (LP) Leaderpeptid; (SU) Oberflächenuntereinheit; (TM) Transmembranuntereinheit

#### **1.1.3.4 Regulatorische und akzessorische Proteine**

Die komplexen Retroviren besitzen neben den Strukturgenen *gag*, *pol* und *env* noch weitere Gene, die für regulatorische und akzessorische Proteine codieren. Diese Gene werden von ein- oder mehrfach gespleißten mRNAs codiert und liegen zumeist im 3' Bereich des Genoms.

Beispiele für regulatorische Proteine sind Tax und Tat von HTLV und den Lentiviren. Beide Proteine verstärken die Transkription, wirken aber auf unterschiedliche Weise. So bindet Tat direkt an neu transkribierte Virus-RNA, während Tax über Wirtsfaktoren mit der DNA interagiert (Modrow et al., 2003).

Zu den akzessorischen Proteinen gehört unter anderem Vif (*viral infectivity factor*) von HIV. Vif übt seine Funktion in der virusproduzierenden Zelle aus, indem es den Einbau von APOBEC3G (*Apolipoprotein B editing complex 3G*) in die Viruspartikel verhindert. APOBEC3G ist eine von T- sowie einer Reihe weiterer Zellen gebildete Deaminase, die bei Retroviren während der reversen Transkription in der Zielzelle im DNA-Minusstrang Cytosin zu Uracil desaminiert. Dies führt zur Degradation der DNA oder zur G→A Hypermutation. Vif induziert den proteasomalen Abbau von APOBEC3G nachdem es dies komplexiert hat und ermöglicht so die Produktion infektiöser Partikel (Conticello et al., 2003; Mariani et al., 2003; Mehle et al., 2004).

#### **1.1.4 Replikationszyklus**

Der Replikationszyklus der Orthoretroviren beginnt mit der Rezeptorbindung. Die Oberflächenuntereinheit des Glykoproteins bindet den Rezeptor, dies führt zu einer Konformationsänderung in der Transmembranuntereinheit und zur Aufnahme des Virus in die Zelle. Im Folgenden ändert sich die Struktur des Kapsids, das aber als unvollständige, partikuläre Struktur erhalten bleibt, in der die reverse Transkription stattfindet (Abb. 6). Die Reverse Tanskriptase beginnt am 3' OH-Ende eines an der Primerbindungsstelle gebundenen zellulären tRNA-Moleküls mit der Synthese einer Minusstrang-DNA. Der RNA-Anteil des entstehenden DNA/RNA-Hybrids wird von der RNaseH abgebaut und es kommt zu einem Matrizenwechsel über eine Hybridisierung der R-Regionen im neu synthetisierten DNA-Strang und im 3' Bereich des RNA-Genoms. Ausgehend hiervon kann die Synthese des Minusstranges fortfahren. Wieder wird der RNA-Anteil des entstehenden Hybrids abgebaut, mit Ausnahme des Polypurintraktes. Dieser dient als Primer für die Plusstrang-Synthese. Nach erneutem Matrizenwechsel, über die

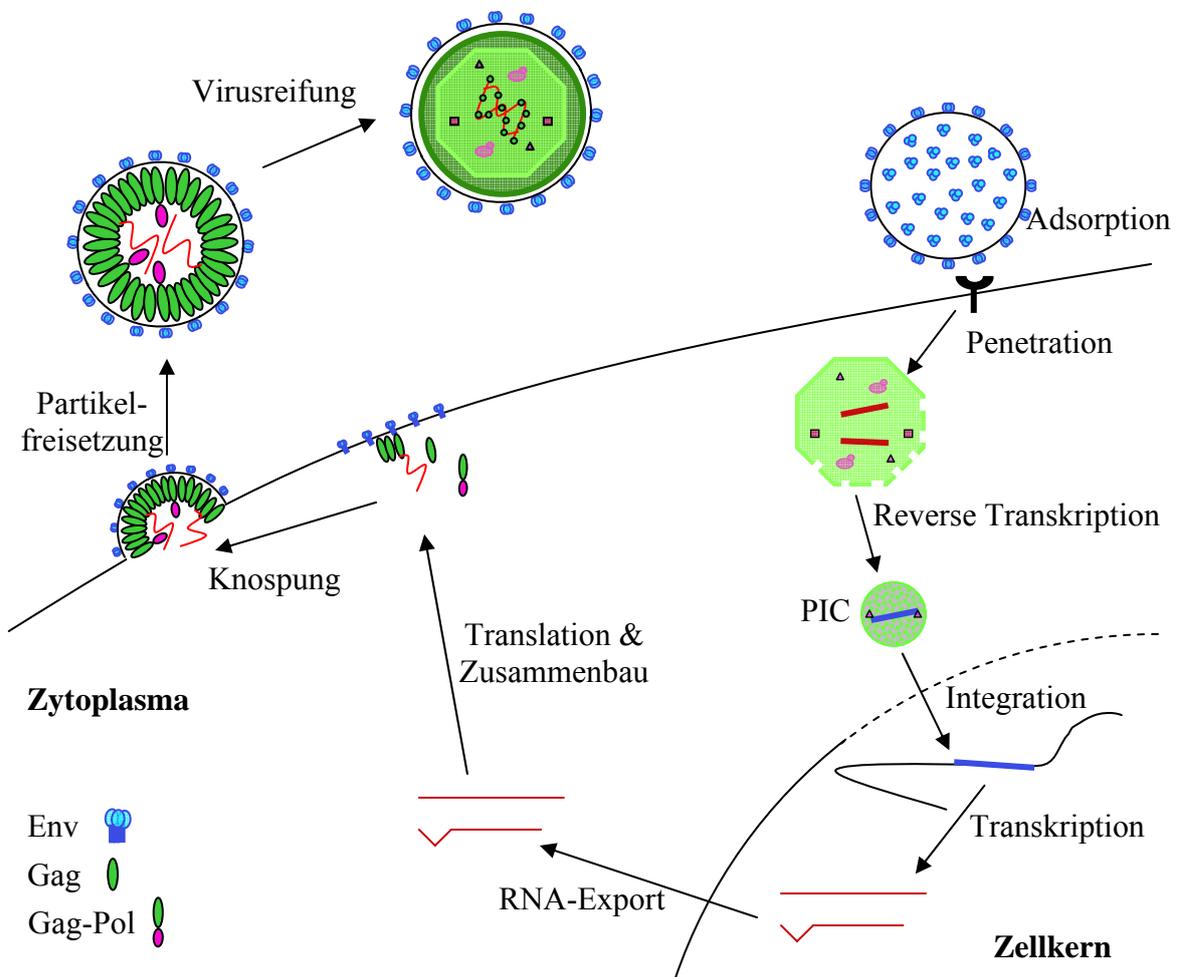
Hybridisierung der PBS der beiden DNA-Stränge, kann die Synthese der doppelsträngigen DNA (dsDNA) abgeschlossen werden. Während der reversen Transkription gelangt die U3-Region und mit ihr der Promotor an das 5' Ende des Provirus. Gleichzeitig wird die U5-Region an das 3' Ende des gebildeten Provirus kopiert, die neu gebildeten Sequenzen aus U3-R-U5 an beiden Enden heißen *long terminal repeats* (LTRs) (Abb. 2) und sind essentiell für Integration und Transkription des Provirus (Modrow et al., 2003).

Das nun doppelsträngige DNA-Genom ist mit der Integrase und weiteren viralen und zellulären Proteinen assoziiert, die zusammen den Präintegrationskomplex (PIC) bilden. Der PIC wird zum Zellkern transportiert und im Fall der Lentiviren aktiv durch die intakte nukleäre Membran in den Kern transportiert (Bukrinsky et al., 1992; Lewis et al., 1992; Weinberg et al., 1991) und dort ins Wirtsgenom integriert. Alle anderen Orthoretrovirusgenera benötigen eine mitotische Teilung und eine damit verbundene Auflösung der Kernmembran für die Etablierung eines Provirus (Lewis & Emerman, 1994; Miller et al., 1990; Roe et al., 1993; Varmus et al., 1977). Bei der Integration kommt es zur Duplikation von 4-6 Basenpaaren der benachbarten zellulären genomischen DNA und zum Verlust von zwei Basen an den Provirusenden.

Die Transkription beginnt am 5' LTR-Promotor an der Grenze zwischen U3 und R und terminiert in der 3' LTR an der Grenze zwischen R und U5. Es entstehen mindestens zwei RNA-Populationen. Erstere besteht aus ungespleißter RNA, diese dient sowohl als genomische RNA und wird in entstehende Viruspartikel verpackt, als auch als mRNA für Gag und Gag-Pol. Die zweite besteht aus einfach gespleißter RNA, bei der es sich um die Env-mRNA handelt. Im Falle der komplexen Retroviren werden die akzessorischen und regulatorischer Proteine von einfach oder mehrfach gespleißten mRNAs translatiert.

Nach der Transkription und nukleärem Export folgt die Translation. Env wird am rauen ER synthetisiert und auf dem Weg zur Plasmamembran gespalten, Gag wird an freien Ribosomen translatiert und in ca. 5% der Fälle wird ein Gag-Pol-Vorläuferprotein gebildet, sei es durch Stopcodonsuppression oder Leserasterwechsel (siehe 1.1.3.2). Außerdem wird Gag während der Synthese aminoterminal myristyliert und zur Zellmembran transportiert. Die Zusammenlagerung der Gag-Proteine zum Kapsid erfolgt entweder an der Zellmembran (C-Typ Morphogenese: Alpha-, Gamma-, Epsilonretroviren und Lentiviren) (Abb. 6), oder bereits im Zytoplasma (B/D-Typ Morphogenese: Beta- und Deltaretroviren) (Vogt, 1997a). Die Nukleokapsiddomäne des Gag-Vorläuferproteins interagiert mit dem Verpackungssignal der RNA und gewährleistet so die Verpackung der genomischen RNA (Berkowitz et al., 1993; Clever et al., 1995). Die Inkorporation von Pol in das entstehende

Viruskapsid erfolgt über das Gag-Pol-Vorläuferprotein (Jones et al., 1990; Park & Morrow, 1992). Das bedeutet Gag bildet die Struktur des Virions und ist für die Verpackung von genomischer RNA verantwortlich, während durch den Gag-Pol-Vorläufer die Partikelinkorporation von Pol gesichert wird. Bei Kontakt des Kapsids mit der Zellmembran stülpt sich diese aus und bildet sich abschnürende Vesikel (Abb. 6). Diese Partikel sind noch unreif und besitzen einen leicht sauren pH-Wert. Im Kapsid können die Proteasedomänen von Pol dimerisieren und in der leicht sauren Umgebung ihre Wirkung entfalten. Sie prozessieren nun autokatalytisch ihre Freisetzung und spalten Gag und Pol in deren Untereinheiten, es kommt zur Reifung des Kapsids (Abb. 6) (Modrow et al., 2003).



**Abb. 6: Der orthovirale Replikationszyklus**

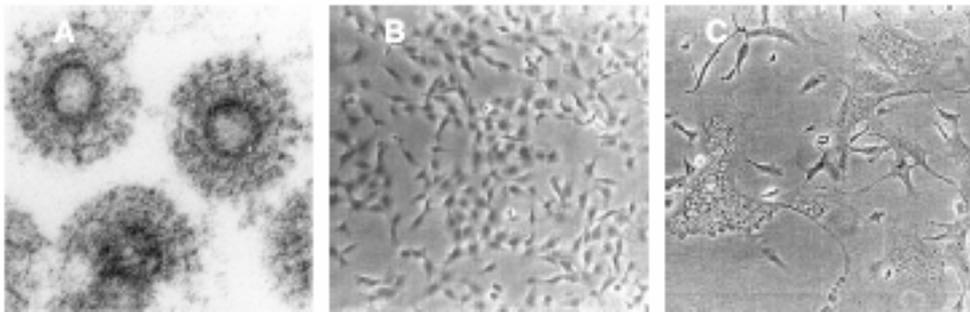
*Dargestellt ist der Replikationszyklus eines Retrovirus mit C-Typ-Morphogenese. Die virale RNA ist in rot, die DNA in blau dargestellt. (PIC) Präintegrationskomplex*

Der Zusammenbau von Kapsid und Knospung des Virions erfolgt auch ohne virale RNA, allerdings wird wahrscheinlich eine beliebige zelluläre oder virale RNA, für die Virusbildung benötigt. Wird Gag ohne die anderen Virusproteine exprimiert, kommt es zur Knospung unreifer virusähnlicher Partikel (*virus like particles* = VLP) an der Plasmamembran (Vogt, 1997a).

## 1.2 Foamyviren

Die zweite Unterfamilie der Retroviridae, die Spumaretrovirinae, teilt viele der beschriebenen Merkmale und Eigenschaften mit den Orthoretrovirinae, weist aber auch bemerkenswerte Unterschiede zu ihnen auf. Einige dieser Abweichungen im Lebenszyklus der Foamyviren zeigen Ähnlichkeiten mit den Hepadnaviren, daher werden die Foamyviren oft als Bindeglied zwischen Hepadna- und Orthoretroviren betrachtet.

Foamyviren sind *in vitro* in vielen Zelltypen zytopathisch. Nach Infektion kommt es zu einer raschen Bildung von Syncytien und multiplen Vakuolen in den dadurch entstehenden Riesenzellen, anschließend folgt der Zelltod. Die zahlreichen Vakuolen geben der Zellkultur ein „schaumiges“ Bild, von dem sich die Namen Spuma- (lat. = Schaum) und Foamy- (engl. = schaumig) Virus ableiten (Abb. 7).



**Abb. 7: (A) EM Aufnahme von Spumaviren (H. Zentgraf); (B) uninfizierte humane Fibroblasten; (C) PFV infizierte humane Fibroblasten mit zytopathischen Effekt (Picard-Maureau, 2003)**

Foamyviren (FV) wurden aus vielen Säugetieren isoliert, unter anderem aus Primaten (Hooks & Gibbs, 1975; Meiering & Linial, 2001), Katzen (Riggs et al., 1969; Winkler et al., 1997), Rindern (Johnson et al., 1988; Malmquist et al., 1969), Pferden (Tobaly-Tapiero et al., 2000) und Menschen (Achong et al., 1971). Die *in vivo*-Infektion ist im Gegensatz

zur *in vitro*-Infektion nicht zytopathisch und persistierend (Hooks & Gibbs, 1975; Falcone et al., 1999 & 2003; Linial, 2000; Meiering & Linial, 2001).

Trotz der Isolation des ersten Foamyvirus, sogar des ersten Retrovirus überhaupt, aus dem Menschen, sind diese kein natürliches Reservoir von Foamyviren (Ali et al., 1996; Schweizer et al., 1995). Das humane Isolat, anfänglich als Humanes Foamyvirus (HFV) bezeichnet, wurde mittlerweile durch Sequenzanalysen als Foamyvirus vom Schimpansen identifiziert (Herchenröder et al., 1994). Da dieses Isolat das am besten untersuchte Virus der Gruppe Foamyviren ist und als Modellvirus dient, wurde der Name prototypisches Foamyvirus (PFV) eingeführt (Rethwilm, 2003). Die Angaben im Folgenden beziehen sich, falls nicht anders angegeben, auf PFV.

Es sind zwar mehrere Foamyvirusinfektionen des Menschen bekannt, diese konnten aber alle auf Transspeziesinfektionen durch Foamyviren nicht-menschlicher Primaten zurückgeführt werden (Heneine et al., 1998 & 2003; Sandstrom et al., 2000; Switzer et al., 2004; Wolfe et al., 2004), während keine Hinweise auf natürlich vorkommende Infektionen des Menschen vorliegen (Ali et al., 1996; Schweizer et al., 1995). Wie auch in den natürlichen Wirten sind die Transspeziesinfektionen des Menschen persistierend, ohne daß ein pathogener Effekt durch das Virus beobachtet werden konnte. Ebenfalls nicht nachweisbar ist eine Virustransmission von Mensch zu Mensch (Boneva et al., 2002; Heneine et al., 2003; Linial, 2000; Meiering & Linial, 2001; Switzer et al., 2004).

### **1.2.1 Aufbau**

Foamyviruspartikel haben einen Durchmesser von ca. 110 nm, wobei das Kapsid ohne Hülle einen Durchmesser von ungefähr 60 nm aufweist (Wilk et al., 2001). Das Kapsid wird aus einer Mischung aus prozessiertem und unprozessiertem Gag-Proteinen von eins zu vier gebildet (Cartellieri et al., 2005a; Fischer et al., 1998; Hahn et al., 1994). Bei dem prozessierten Gag handelt es sich um eine C-terminal um 3 kD verkürzte Version des unprozessierten Gag, nicht um eine Spaltung in mehrere Strukturproteine wie bei Orthoretroviren. Die viralen Enzyme konnten als Vorläufer-Protein und als deren Untereinheiten (PR-RT/RH, IN) im Virion detektiert werden, wobei eine separate virale Protease nicht nachweisbar ist (Flügel & Pfrepper, 2003; Netzer et al., 1993). Ähnlich vielen Orthoretroviren liegen die viralen Glykoproteine als Trimere vor (Wilk et al., 2000), allerdings ist neben der Oberflächen- und Transmembranuntereinheiten auch das Leaderpeptid des Env-Vorläuferproteins Bestandteil des Virions (Lindemann et al., 2001).

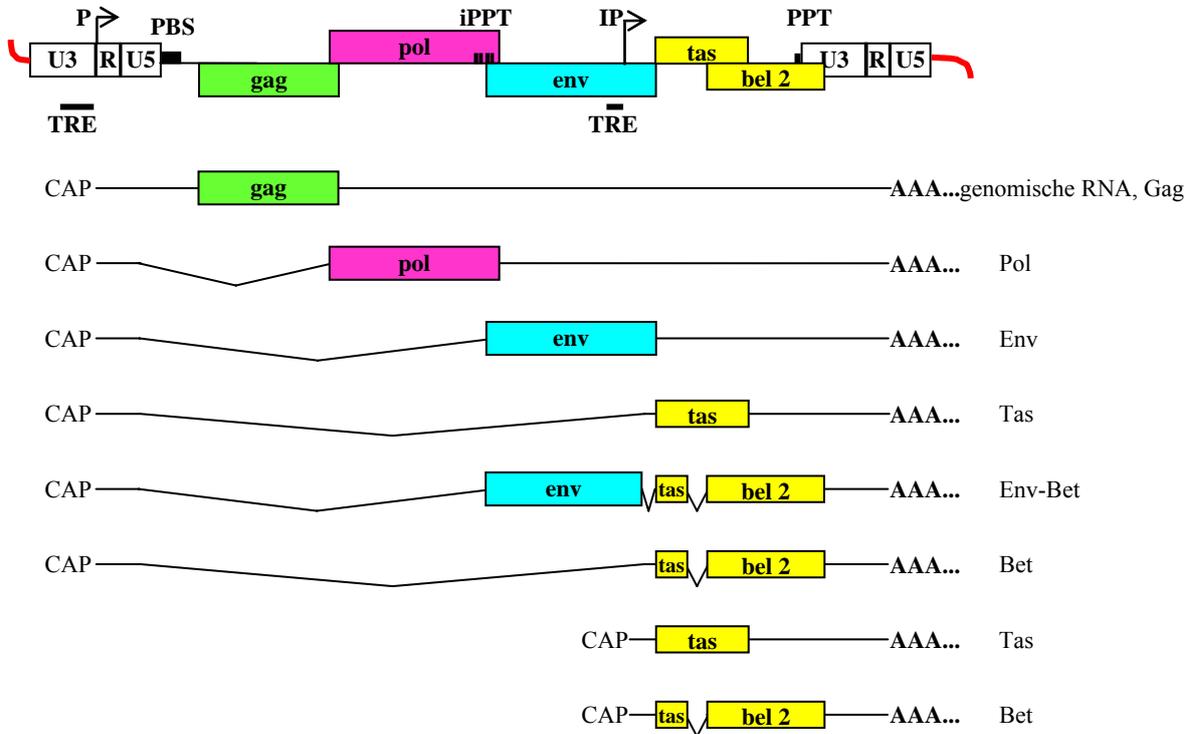
Interessanterweise enthalten Foamyviren im Vergleich zu Orthoretroviren neben RNA auch eine große Menge bereits revers transkribierter DNA im Partikel, und diese ist nach Extraktion aus Partikeln infektiös, wenn suszeptibele Zellen transfiziert werden. Experimente mit Inhibitoren der Reversen Transkriptase legen ebenfalls nahe, daß virale DNA die für die Infektion relevante Nukleinsäure ist (Moebes et al., 1997; Roy et al., 2003; Yu et al., 1999). Es gibt aber auch Hinweise darauf, daß das Genom im Partikel sowohl als RNA als auch als DNA vorliegen kann (Delelis et al., 2003) und die Reverse Transkription sowohl zu einem frühen wie auch einem späten Zeitpunkt der Replikation erfolgen kann.

### 1.2.2 Genomorganisation

Foamyviren haben das längste retrovirale Genom, so umfaßt z. B. die Länge der (prä)genomischen RNA von PFV 11,68 kb (Schmidt et al., 1997). Der Aufbau der RNA entspricht dem der Orthoretroviren (Abb. 8). Zusätzlich zu den Genen *gag*, *pol* und *env* besitzen Foamyviren stromabwärts von *env* und überlappend mit der U3-Region noch weitere offene Leseraster (Muranyi & Flügel, 1991), von denen zwei für die Proteine Tas und Bet codieren (siehe 1.2.3.4). Foamyviren gehören somit zu den komplexen Retroviren. Neben dem U3-Promotor besitzen Foamyviren einen internen Promotor (IP). Dieser liegt im *env*-Gen 5' der akzessorischen Leseraster (Campbell et al., 1994; Löchelt et al., 1993; Mergia, 1994) und ist essentiell für die Infektiosität (Löchelt et al., 1994 & 1995). Von diesem Promotor wird Tas, ein Transaktivator der Genexpression, exprimiert. Tas aktiviert sowohl den LTR- als auch den internen Promotoren über direkte Bindung an die Tas responsiven Elemente (TREs) (Erlwein & Rethwilm, 1993; Löchelt, 2003).

Auch bei den Foamyviren liegen essentielle cis-aktive Sequenzen, wie der Hauptspleißdonor und die Sequenz für die Dimerisierung des Genoms, in der 5' UTR. Die Dimerisierungssequenz liegt zwischen der PBS und *gag* und konnte auf drei Sequenzblöcke in einem Bereich von 160 Basenpaaren eingegrenzt werden (Cain et al., 2001; Erlwein et al., 1997), während der Hauptspleißdonor in der R-Region liegt. Der für die Initiation der Plusstrang-DNA-Synthese wichtige Polypurintrakt (PPT) liegt 5' der U3-Region. Neben diesem regulärem PPT gibt es im 3' Bereich des *pol*-Gens noch vier weitere Folgen von Purinen, deren genaue Funktion unbekannt ist (Abb. 8). Es gibt jedoch Hinweise darauf, daß eine von ihnen als interner PPT (iPPT) und damit als zweiter Initiationsort der Plusstrangsynthese dienen könnte. Zum einen ist die Sequenz des vierten iPPTs mit 9 Nukleotiden des regulären PPT identisch und zum anderen befindet sich im

Plusstrang der dsDNA eine 120 bp große Lücke, genau 5' dieses iPPT (Kupiec et al., 1988; Tobaly-Tapiero et al., 1991). Bei HIV-1 konnte ebenfalls eine Lücke im Plusstrang der DNA 5' eines iPPTs im 3' Bereich des *pol*-Gens identifiziert werden. Dieser iPPT dient als Initiationsort der Plusstrangsynthese und wird für die optimale Virusreplikation benötigt (Charneau & Clavel, 1991; Charneau et al., 1992).



**Abb. 8: Genomorganisation und Genexpression von PFV**

Die Pfeile symbolisieren die Transkriptionsstartpunkte und geben die Transkriptionsrichtung an. (TRE) *Tas responsive Elemente*; (P) *LTR-Promotor*; (PBS) *Primerbindungsstelle*; (iPPT) *interne Polypurintrakte*; (IP) *interner Promotor*; (AAA...) *Polyadenylierung*

Das Verpackungssignal des RNA-Genoms der Foamyviren ist unbekannt. Es wurden aber zwei cis-aktive Sequenzbereiche (CASI & II) identifiziert, die für einen effizienten Vektortransfer notwendig sind (Erlwein et al., 1998; Heinkelein et al., 1998; Wu et al., 1998), d. h. bei Expression von Gag und Env wird RNA, die CASI und CASII trägt, in das Viruspartikel verpackt. Die CASI Region ist ca. 650 bp lang, beginnt mit der U5-Region und endet im *gag*-Leserahmen. Die CASII Region dagegen umfaßt ca. 2 kb im 3' Bereich des *pol*-Gens (Heinkelein et al., 1998). RNA-Verpackung erfolgt auch dann noch, wenn Bereiche der nicht codierenden Region in CASI deletiert werden, so sind z. B. die Leader-Region und die U5-Region nicht essentiell für die RNA-Verpackung (Heinkelein et al., 2000a).

## 1.2.3 Virale Proteine

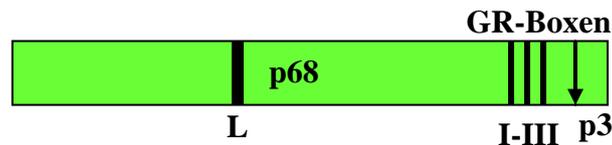
### 1.2.3.1 Gag (*Gruppenspezifisches Antigen*)

Das foamyvirale Gag wird, wie das orthoretrovirale Gag, von einer ungespleißten mRNA als Vorläuferprotein translatiert (Abb. 8). Im Gegensatz zu den Orthoretroviren erfolgt keine Prozessierung in Matrix, Kapsid und Nukleokapsid, sondern es wird lediglich ein kleines Peptid carboxyterminal durch die virale Protease abgespalten (Konvalinka et al., 1995). Diese Prozessierung ist essentiell für die Infektiosität der Viren (Enssle et al., 1997; Zemba et al., 1998) und die prozessierten und unprozessierten Formen (p71 und p68) kommen in einem Verhältnis von ca. eins zu vier im Kapsid vor (Cartellieri et al., 2005a). Es gibt weitere putative Spaltstellen in p71 und es wurde gezeigt, daß eine weitere Prozessierung von Gag in frühen Schritten der Infektion essentiell für eine produktive Infektion durch Foamyviren ist (Giron et al., 1997; Lehmann-Che et al., 2005; Pfrepper et al., 1999).

Foamyvirale Gag-Proteine besitzen keines der typischen konservierten Sequenzmotive der Orthoretroviren, wie die MHR oder das CCHC-Motiv (Linial, 1999; Maurer et al., 1988; Swanstrom & Wills, 1997), stattdessen liegen am C-Terminus des PFV Gag-Proteins drei Glycin- und Arginin-reiche Sequenzen (GR-Boxen) (Abb. 9) (Schliephake & Rethwilm, 1994). Die erste dieser Boxen bindet sowohl RNA als auch DNA und ist essentiell für die Virusinfektiosität (Stenbak & Linial, 2004; Yu et al., 1996b). Damit erinnert das foamyvirale Gag an das Core-Protein der Hepadnaviren, das ebenfalls in der Lage ist, sowohl RNA als auch DNA über eine carboxyterminale argininreiche Sequenz zu binden (Nassal, 1996). Die zweite Box ist ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) und verantwortlich für den Transport von Gag in den Zellkern (Schliephake & Rethwilm, 1994; Yu et al., 1996b). Diese Funktion scheint nicht notwendig für die Virusinfektiosität in Zellkultur zu sein, so zeigt z. B. FFV keine nukleäre Phase (Bodem et al., 1998; Meiering et al., 2000; Yu et al., 1996b). Die Funktion der dritten GR-Box ist unbekannt; sie ist im Foamyvirus der Katze (FFV) und des Pferdes (EFV) nicht vorhanden (Tobaly-Tapiero et al., 2000; Winkler et al., 1997).

PFV Gag-Proteine interagieren wahrscheinlich über ein aminotermiales coiled-coil-Motiv miteinander (Tobaly-Tapiero et al., 2001) und bauen sich intrazellulär zu Kapsiden zusammen. Der C-Terminus von Gag bindet die genomische RNA und vermittelt deren Inkorporation ins Partikel (Stenbak & Linial, 2004). Der aminotermiale Bereich des Gag-Proteins ist außerdem für die Interaktion mit dem Glykoprotein und für eine Freisetzung

der viralen Partikel aus der Wirtszelle essentiell (Cartellieri et al., 2005b). Desweiteren gibt es Hinweise auf ein zelluläres Transportsignal zwischen den Aminosäuren 40 und 60, das dem zellulärem Transportsignal von Retroviren des D-Typ-Morphogeneseweges ähnelt (Cartellieri et al., 2005b; Eastman & Linial, 2001). Eine für die Abschnürung des Partikels von der Zellmembran wichtige Late-Domäne konnte ebenfalls im PFV Gag-Protein nachgewiesen werden (Stange et al., 2005).



**Abb. 9: Gag-Vorläuferprotein von PFV**

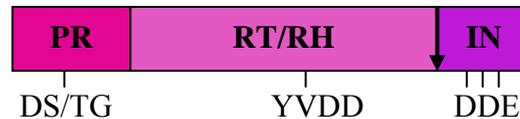
*Die Schnittstelle der viralen Protease ist durch einen Pfeil dargestellt. (L) Late-Domäne*

### 1.2.3.2 Pol (Polymerase)

Das foamyvirale Pol-Protein wird, im Gegensatz zu dem der Orthoretroviren, unabhängig von Gag von einer eigenen gespleißten mRNA translatiert (Abb. 8) (Enssle et al., 1996; Jordan et al., 1996; Löchelt & Flügel, 1996; Yu et al., 1996a). Das Vorläuferprotein (p127) wird autokatalytisch in zwei Untereinheiten prozessiert, die Protease-Reverse Transkriptase/RnaseH-Untereinheit (p85) und die Integrase-Untereinheit (p40) (Abb. 10) (Löchelt & Flügel, 1996; Netzer et al., 1993). Anders als in Orthoretroviren konnte die FV-Protease nicht als eigenständiges Protein nachgewiesen werden (Flügel & Pfrepper, 2003). Ihre Aktivität ist essentiell für die Bildung infektiöser Partikel (Konvalinka et al., 1995).

Die konservierten Sequenzmotive in den aktiven Zentren der orthoviralen Enzyme sind auch in FV-Pol zu finden (Abb. 10) (Kögel et al., 1995a, Pahl & Flügel, 1995), wenn auch teilweise mit geringen Modifikationen, z. B. hat die FFV-Protease ein DSQ- statt ein DS/TG-Motiv (Flügel & Pfrepper, 2003; Winkler et al., 1997). Im Gegensatz zu anderen retroviralen Polymerasen ist die foamyvirale RT  $Mn^{2+}$  und nicht  $Mg^{2+}$  abhängig (Kögel et al., 1995b), außerdem scheint sie viel prozessiver als die Reversen Transkriptasen der Orthoretroviren zu sein (Boyer et al., 2004; Rinke et al., 2002). Dies könnte den höheren DNA-Gehalt in foamyviralen Partikeln erklären. Der Pol-Vorläufer und die RT- und IN-Untereinheiten werden ebenso wie die Gag-Proteine in den Zellkern transportiert (Imrich et al., 2000), der Grund hierfür ist unbekannt.

Neben der Schnittstelle zwischen RT und IN gibt es Hinweise auf weitere putative Schnittstellen im Pol-Protein (Pfrepper et al., 1998), inwieweit diese im Infektionszyklus genutzt werden ist jedoch unbekannt.



**Abb. 10: Pol-Vorläuferprotein von PFV**

Die Schnittstelle der viralen Protease ist durch einen Pfeil dargestellt. (PR) Protease; (RT/RH) Reverse Transkriptase/RnaseH; (IN) Integrase; (DS/TG, YVDD, DDE) aktive Zentren der Enzyme

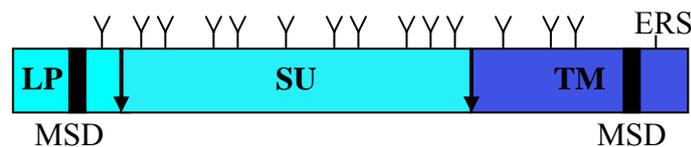
### 1.2.3.3 Env (envelope = Hülle)

Das 130 kD große Env-Protein der Foamyviren wird von einer gespleißten, subgenomischen mRNA am rauen ER translatiert (Abb. 8). Es ist nicht nur eines der größten retroviralen Glykoproteine, es unterscheidet sich auch noch in einigen besonderen Merkmalen von den Env-Proteinen anderer Retroviren. Eines dieser Merkmale ist das Leaderpeptid (LP): Im Gegensatz zu den Orthoretroviren ist das LP der FV relativ lang (18 kD) und essentieller Bestandteil des Virons (Lindemann et al., 2001). Das Vorläuferprotein wird während eines späten Zeitpunktes des Transports zur Oberfläche posttranslational von einer Furin-ähnlichen, zellulären Protease in drei funktionelle Untereinheiten, das 18 kD große LP, die 80 kD große Oberflächenuntereinheit (SU) und die 48 kD große Transmembranuntereinheit (TM) gespalten (Abb. 11) (Duda et al., 2004; Geiselhart et al., 2004). Alle drei Env-Untereinheiten werden umfangreich glykosyliert (Lüftenegger et al., 2005). Das Vorläuferprotein nimmt anfänglich eine Membrankonformation vom TypIII ein, bei der N- und C-Terminus ins Zytoplasma reichen. Nach Spaltung hat TM eine TypI-Konformation und seine extrazelluläre Domäne bindet SU. Das LP ist ein TypII-Transmembranprotein und trägt in seinem zytoplasmatischen Anteil ein konserviertes Sequenzmotiv, welches während der Partikelmorphogenese mit dem N-Terminus des Gag-Proteins interagiert (Cartellieri et al., 2005b; Lindemann et al., 2001; Wilk et al., 2001). Eine spezifische Interaktion zwischen LP und Gag ist ein möglicher Grund dafür, daß FV nicht mit den Hüllproteinen anderer Viren pseudotypisiert werden können (Lindemann et al., 1997; Pietschmann et al., 1999), während Orthoretroviren leicht pseudotypisierbar sind. Das Glykoprotein ist absolut notwendig für die Freisetzung von FV-Kapsiden (Baldwin & Linial, 1998; Fischer et al., 1998; Pietschmann et al., 1999), im

Gegensatz dazu knospen bei Orthoretroviren Gag-Partikel auch ohne Anwesenheit von Env.

Interessanterweise bildet FV-Env ebenso wie das Glykoprotein der Hepadnaviren subvirale Partikel (SVP). Die SVP von Foamyviren werden jedoch nur zu einem geringen Teil aus der Zelle entlassen (Shaw et al., 2003), wohingegen die SVP der Hepadnaviren in großer Zahl freigesetzt werden (Nassal, 1996).

Ein weiterer interessanter Punkt ist, daß FV, mit Ausnahme von EFV, hauptsächlich von intrazellulären Membranen knospen. Ein Grund hierfür ist ein Dilysin-Motiv in der zytoplasmatischen Domäne des TM, das als ER-Retentionssignal wirkt (Goepfert et al., 1995; 1997; 1999). Es führt zur Lokalisierung des Hüllproteins an intrazytoplasmatischen Membranen und mit Ausnahme von EFV und BFV besitzen alle FV dieses Signal (Abb. 11) (Goepfert et al., 1995; Tobaly-Tapiero et al., 2000).



**Abb. 11: Env-Vorläuferprotein von PFV**

Die Schnittstellen der zellulären Protease sind durch Pfeile dargestellt. (Y) Zuckerreste; (ERS) ER-Retentionsignal; (LP) Leaderpeptid; (SU) Oberflächenuntereinheit; (TM) Transmembranuntereinheit; (MSD) Membran durchspannende Domäne

#### 1.2.3.4 Regulatorische und akzessorische Proteine

Foamyviren besitzen mehrere zusätzliche offene Leseraster (Muranyi & Flügel, 1991), wobei nur von zweien ein Genprodukt bekannt ist. Das erste offene Leseraster (ORF-1) codiert für Tas (Abb. 8), einem Transaktivator der Gen-Expression. Es aktiviert sowohl den LTR- als auch den internen Promotor (IP) und ist essentiell für die Virusreplikation (Baunach et al., 1993; Keller et al., 1991; Löchelt et al., 1991; Rethwilm et al., 1991). Das 36 kD große Phosphoprotein bindet direkt an die DNA der beiden Promotoren (He et al., 1996; Kang et al., 1998; Kang & Cullen, 1998; Zou & Luciw, 1996), wobei es den internen Promotor mit höherer Affinität bindet (Kang et al., 1998). Tas aktiviert auch zelluläre Gene (Wagner et al., 2000) und es gibt Hinweise auf eine Beteiligung zellulärer Kofaktoren an der Aktivierung der Promotoren (He et al., 1996).

Neben Tas exprimieren FV noch ein weiteres akzessorisches Protein, das Bet-Protein. Bet wird von einer gespleißten mRNA translatiert, die Teile des ORF-1 mit dem ORF-2

verbindet (Abb. 8) (Muranyi & Flügel, 1991). Bet ist, ebenso wie Vif von HIV, wichtig für die Bildung infektiöser Partikel in Anwesenheit von Proteinen der APOBEC3-Familie. Bet bindet APOBEC3 und verhindert dessen Einbau ins Viruspartikel. Die genaue Funktionsweise ist unbekannt, scheint sich aber von der von Vif zu unterscheiden (Löchelt et al., 2005; Russell et al., 2005).

Ein weiteres Protein ist Env-Bet mit einer Größe von 170 kD. Es entsteht durch alternatives Spleißen, während dessen die extrazellulären Komponenten von Env an Bet fusioniert werden (Abb. 8) (Lindemann & Rethwilm, 1998). Env-Bet kann nicht in Partikeln nachgewiesen werden und ist für die Morphogenese infektiöser Partikel entbehrlich (Lindemann & Rethwilm, 1998).

### **1.2.4 Replikationszyklus**

Die Replikationsstrategie der Foamyviren weist, verglichen mit der der Orthoretroviren, einige Besonderheiten auf und ähnelt in einigen Aspekten der Replikationsstrategie der Hepadnaviren. Einer der auffallendsten Unterschiede in den Replikationszyklen von Orthoretro- und Foamyviren ist der Zeitpunkt der reversen Transkription. Orthoretroviren führen die reverse Transkription nach Eintritt in die Zielzelle zu einem frühen Zeitpunkt des Replikationszyklus aus (Abb. 6) (Roy et al., 2003; Telesnitzky & Goff, 1997; Trono, 1992). Bei Foamyviren und Hepadnaviren dagegen findet die reverse Transkription noch in der Produzentenzelle zu einem späten Zeitpunkt des Replikationszyklus statt (Abb. 12) (Moebes et al., 1997; Roy et al., 2003; Seeger & Hu, 1997; Yu et al., 1999).

Foamyviren besitzen einen breiten Zelltropismus, der Rezeptor ist jedoch unbekannt. Da aber bisher jede Zelllinie infiziert werden konnte, muß es sich um ein ubiquitäres Molekül handeln (Hill et al., 1999; Lindemann & Goepfert, 2003; Meiering & Linial, 2001). Nach Rezeptorbindung folgt die Penetration der Wirtszelle wahrscheinlich einem pH-abhängigen Endozytoseweg (Picard-Maureau et al., 2003). Anschließend zerfällt das Kapsid teilweise und es bildet sich ein Präintegrationskomplex. Dieser wird wahrscheinlich entlang der Mikrotubulie zum Zellkern transportiert (Petit et al., 2003; Saib et al., 1997). FV können wie alle Retroviren, mit Ausnahme der Lentiviren, nur sich teilende Zellen infizieren (Bieniasz et al., 1995) und benötigen eine Auflösung der Kernmembran bevor sie integrieren können. Nach Integration beginnt die Transkription am internen Promotor. Dieser hat eine geringe basale Aktivität und Tas und Bet werden gebildet. Tas aktiviert nun sowohl den internen als auch den LTR-Promotor, und es kommt zur verstärkten

Expression von Tas und Bet, gleichzeitig werden die Strukturgene transkribiert und (prä)genomische RNA gebildet (Linial, 1999; Löchelt et al., 1993; 1994; 1995).

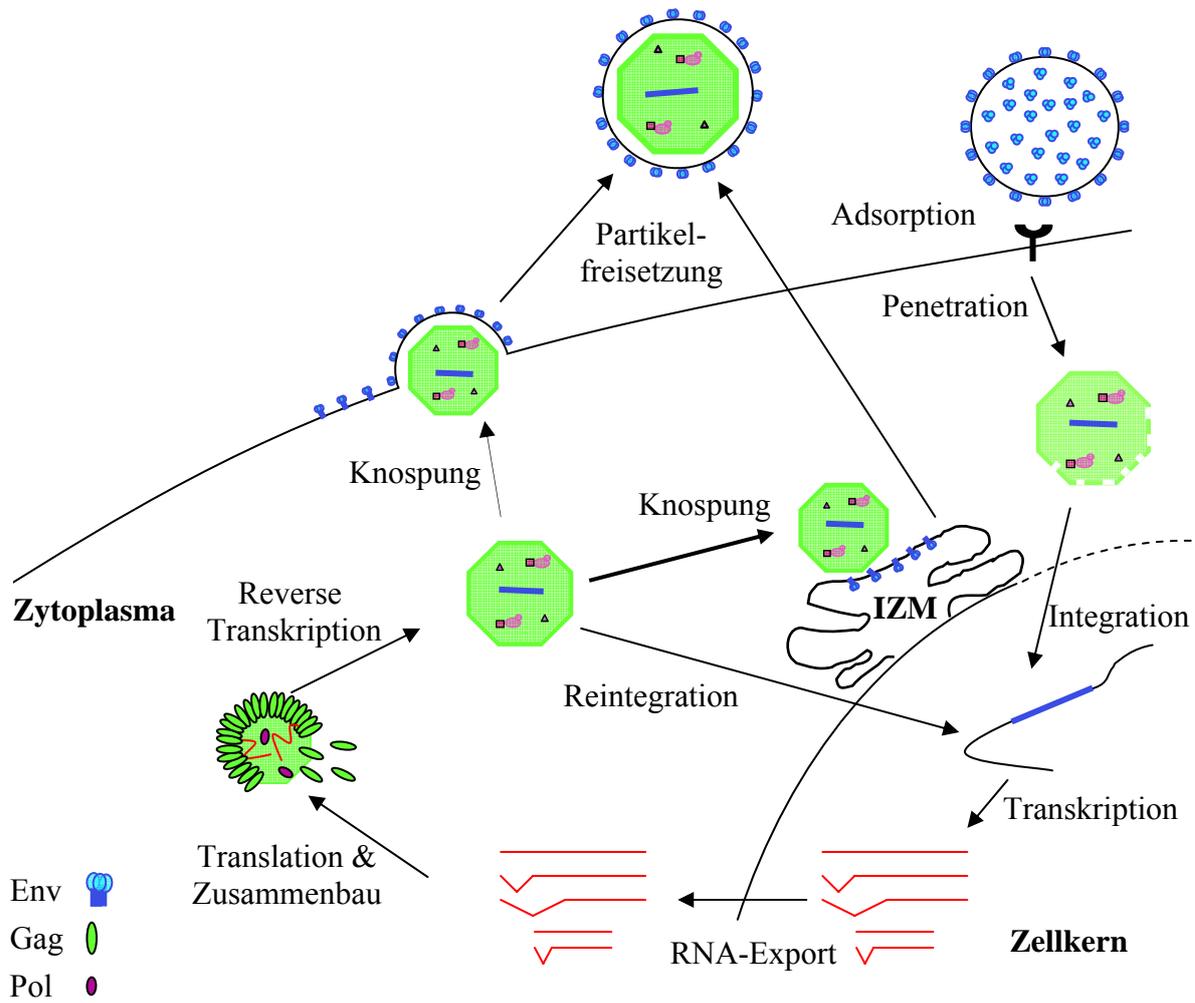
Das Gag-Protein wird von der (prä)genomischen RNA translatiert und bildet im Zytoplasma Kapside (ähnlich der B/D-Typ Morphogenese der Orthoretroviren), in die die (prä)genomische RNA verpackt wird (Abb. 12). Anders als in Hepadnaviren, in denen Pol und RNA miteinander interagieren und gemeinsam ins Kapsid inkorporiert werden (Bartenschlager & Schaller, 1992), erfolgt die Verpackung der FV-RNA unabhängig vom Pol-Protein (Baldwin & Linial, 1998). Das Pol-Protein wird, im Gegensatz zu dem der Orthoretroviren, von einer eigenen gespleißten mRNA translatiert (Enssle et al., 1996; Jordan et al., 1996; Löchelt & Flügel, 1996; Yu et al., 1996a) und auf unbekanntem Wege ins entstehende Partikel inkorporiert. Im entstehenden Kapsid beginnt die reverse Transkription, so daß Partikel mit fortgeschrittenen DNA-Genom die Zelle verlassen (Abb. 12) (Moebes et al., 1997; Yu et al., 1999). Die Kapside interagieren hauptsächlich mit den in intrazytoplasmatischen Membranen aber auch mit den in der Zellmembran enthaltenen Env-Proteinen und werden nur in Gegenwart ihres spezifischen Hüllproteins freigesetzt (Fischer et al., 1998; Pietschmann et al., 1999).

Das Virus mit funktionellem DNA-Genom kann, statt die Zelle zu verlassen, wieder in das Genom reintegrieren. Hierfür ist die Expression von Gag und Pol notwendig (Heinkelein et al., 2000b). Diesen intrazellulären Replikationszyklus gibt es neben den Hepadnaviren einzig bei FV (Abb. 12) (Heinkelein et al., 2000b) und die Folge sind multiple provirale Kopien im Genom.

### ***1.3 Fragestellung und Zielsetzung***

Im Vergleich zu den Orthoretroviren weisen Foamyviren zahlreiche Besonderheiten in ihrer Genomorganisation, der Proteinexpression und des Replikationszyklus auf (siehe 1.2). Eine dieser Besonderheiten ist die Expression des Pol-Vorläuferproteins. Orthoretroviren exprimieren Pol über ein Gag-Pol-Fusionsprotein, auf diese Weise wird das Verhältnis der gebildeten Strukturproteine und Enzyme reguliert und die Verpackung von Pol ins entstehende Kapsid gewährleistet und gesteuert.

Foamyviren hingegen exprimieren Pol von einer eigenen gespleißten mRNA unabhängig von Gag. Dieser innerhalb der Retroviren einzigartige Mechanismus führt zu der Frage, wie das Pol-Protein in foamyvirale Partikel verpackt wird. Die Untersuchung dieses Mechanismus ist Ziel dieser Arbeit.



**Abb. 12: Der Replikationszyklus von PFV**

Die virale RNA ist in rot und die DNA in blau dargestellt. (IZM) intrazytoplasmatische Membranen

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Falls nicht anders vermerkt, wurden die Chemikalien für diese Arbeit von folgenden Firmen bezogen: Appllichem, MBI Fermentas, Merck, Sigma-Aldrich und Roth. Wurde gezielt das Produkt eines bestimmten Herstellers verwendet, so ist dieser im Methodenteil gesondert erwähnt.

#### 2.1.2 Enzyme und Reaktionspuffer

CIAP ( <i>calf intestine alkaline phosphatase</i> )	MBI Fermentas
Klenow-Polymerase	MBI Fermentas
Pwo-Polymerase	Peqlab
Restriktionsenzyme	NEB, MBI-Fermentas
Ribonuklease A	Roche
RQ1-DNase	Promega
SP6 RNA-Polymerase	Boehringer Mannheim
10x Transkriptionspuffer	Boehringer Mannheim
T4 DNA-Ligase	MBI-Fermentas
T4 DNA-Polymerase	MBI Fermentas

#### 2.1.3 Antibiotika

	Stammkonzentration	Arbeitskonzentration
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
Penicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
Streptomycin	100 mg/ml	100 µg/ml

#### 2.1.4 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> DH5α	Arbeitsgruppe; Referenz Invitrogen
<i>E. coli</i> JM109	Arbeitsgruppe; Referenz Stratagene

## 2.1.5 Zelllinien

- 293T Humane embryonale Nierenzelllinie, die das SV40 große T-Antigen stabil exprimiert (Du Bridge et al., 1987)
- HT1080 Humane Fibrosarkomazelllinie, ATCC: CCL-121

## 2.1.6 Größen-/Längenstandards

### Nukleinsäurelängenstandards

- $\lambda$ -*HindIII* Marker eigene Herstellung
- $\lambda$ -*PstI* Marker eigene Herstellung

### Proteingrößenstandards

- RPN800 Rainbow Marker Amersham Biosciences

## 2.1.7 Antikörper

	Verdünnung im Western Blot
Maus $\alpha$ PFV Gag:	
SGG1 Hybridomaüberstand (Heinkelein et al., 2002a)	1:10
Maus $\alpha$ PFV Integrase:	
3E11 Hybridomaüberstand (Imrich et al., 2000)	1:3
Maus $\alpha$ PFV Reverse Transkriptase:	
15E10 Hybridomaüberstand (Imrich et al., 2000)	1:3
Ziege $\alpha$ Maus Immunoglobuline/HRP (DakoCytomation, DK)	1:1000

## 2.1.8 Plasmide

### 2.1.8.1 Retrovirale Vektoren

- pCgp1/M54: pCgp1 (Fischer et al., 1998) mit Mutation des *pol* ATG zu CTG (Enssle et al., 1996)
- pMD4 Heinkelein et al., 2002b
- pMD9 Heinkelein et al., 2002a
- pMH66 Martin Heinkelein

pMH68	Martin Heinkelein
pMH93	Heinkelein et al., 2000
pMH114	Heinkelein et al., 2000
pMH115	Heinkelein et al., 2000

### 2.1.8.2 Expressionsplasmide

pcDNA3	Invitrogen
pCpol2	Heinkelein et al., 1998
pCIgag2	Heinkelein et al., 2002a
pCenv1	Fischer et al., 1998
pcRT2	Imrich et al., 2000
pcIN1	Imrich et al., 2000
pczHSRV2/M61	Jörg Enssle
pczHSRV2/M83	Kombination der Einzelmutationen der aktiven Zentren der Reversen Transkriptase (M69; Moebes et al., 1997) und der Integrase (M73; Enssle et al., 1999) in pczHSRV2
pSP65	Promega
pSPHFV3	Heinkelein et al., 2002a

### 2.1.9 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide binden in PFV und wurden von Invitrogen produziert. Sie wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert, nachdem die Konzentration auf 100 pmol/ $\mu\text{l}$  eingestellt wurde.

**Tab. 2: Verwendete Oligonukleotide**

Primer	Sequenz (5'-3')	Bemerkung
#154	ccttcagtaaggcgaagacc	gag antisense Primer (Sequenzierprimer)
#196	gccaccaaggaagtatgtgg	pol sense Primer (Sequenzierprimer)
#327	gttactggtctgtaagaactac	gag antisense Primer (Klonierungs- und Sequenzierprimer)
#385	agccactcttttaaaattgcc	pol sense Primer (Sequenzierprimer)
#407	cactctgccaaggtgcagc	pol sense Primer (Sequenzierprimer)

## Material und Methoden

#444	atatactccacatcaactctta	pol sense Primer (Sequenzierprimer)
#453	ttagaataggaccagaggctttg	pol antisense Primer (Sequenzierprimer)
#560	gccgccaccatggcttcaggaagtaatgtgaa	gag sense Primer (Sequenzierprimer)
#564	gacaatggcttcaggaagtaatgtt	gag sense Primer (Sequenzierprimer)
#1800	cgcgcaattgtcgaatataagtcgggtttatttga	sense Mutageneseprimer zur Deletion der PBS
#1840	aaaagtcaactattggacctttgccaccttcac	sense Klonierungsprimer zur Klonierung von pKP25; enthält eine <i>HincII</i> -Schnittstelle
#1841	aaaagtcaacactagcgaactgttaaatctctc	sense Klonierungsprimer zur Klonierung von pKP26; enthält eine <i>HincII</i> -Schnittstelle
#1842	aacctgaatgggcaaaggaaagagtatacatttgg	sense Klonierungsoligo zur Klonierung von pKP27
#1843	aattccaaatgtatacctctttccttggcccattcaggtt	antisense Klonierungsoligo zur Klonierung von pKP27
#1844	ccaccttactaccactttgggg	pol antisense Primer (Klonierungs- und Sequenzierprimer)
#1845	tttttagcgctagcaagtgtatcttgattgcaaag	antisense Klonierungsprimer zur Klonierung von pKP30; enthält eine <i>Eco47III</i> -Schnittstelle
#1846	tttttagcgctagcaagttgtacaacaggcaatagg	antisense Klonierungsprimer zur Klonierung von pKP31; enthält eine <i>Eco47III</i> -Schnittstelle
#1849	ggtgattcactctgatcaaggtgc	pol sense Primer (Klonierungs- und Sequenzierprimer)

*Die Bezeichnung der Oligonukleotide erfolgte durch Nummern. In der mittleren Spalte ist die 5'-3' Sequenz angegeben. In der Spalte „Bemerkungen“ sind vorhandene Restriktionsenzymchnittstellen und die Verwendung des Oligonukleotides angegeben.*

### 2.1.10 Kits

Big Dye <sup>R</sup> Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
Direct Protect <sup>TM</sup> Lysate RPA	Ambion
ECL <sup>TM</sup> Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences
GENECLEAN <sup>R</sup> III Kit	Q BIOgene
GENECLEAN <sup>R</sup> Turbo For PCR	Q BIOgene
MERmaid Kit	Q BIOgene
North2South <sup>R</sup> Chemiluminescent Hybridization & Detection Kit	Perbio/Pierce
NucleoBond <sup>R</sup> PC500	Macherey-Nagel
PolyFect <sup>R</sup> Transfection Reagent	Qiagen
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen

### 2.1.11 Sonstiges Material

Blot Filterpapier	Schleicher & Schuell
Hybond <sup>TM</sup> -ECL <sup>TM</sup> Nitrocellulosemembran	Amersham Biosciences
Plastikmaterial	Costar, Eppendorf, Falcon, Greiner, Nunc, Roth
Röntgenfilme X-ray Retina XBD	Fotochemische Werke GmbH
Sterilfilter (0,22 µm, 0,45 µm)	Schleicher & Schuell
BrightStar <sup>TM</sup> -Plus Nylonmembran	Ambion
Polyallomer Ultrazentrifugentubes	Beckmann
QiaShredder	Qiagen

## 2.2 Puffer und Lösungen

### 2.2.1 Bakterienkultur

<b>5x LB-Medium</b>	LB Broth Base Lennox L (Invitrogen #12780-029)	100 g
	NaCl	25 g
	α-D Glucose	5 g
	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
	autoklavieren	

<b><i>LB-Agar</i></b>	LB Broth Base Lennox L	20 g
	Agar	20 g
	NaCl	5 g
	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
	autoklavieren	

Nach autoklavieren und abkühlen auf unter 60°C, das jeweilige Antibiotikum zugeben, Lösung in Petrischalen gießen, erstarren lassen und die Agarplatten bei 4°C aufbewahren.

<b><i>Ampicillin</i></b>	Ampicillin Natriumsalz	100 mg/ml
	0,2 µm steril filtrieren	

### 2.2.2 Puffer und Lösungen zur Analyse und Klonierung von DNA

<b><i>50x TAE</i></b>	Tris	2 M
	konzentrierte Essigsäure	5,71%
	EDTA pH 8,0	50 mM

<b><i>6x DNA-Probenpuffer</i></b>	Bromphenolblau	0,125%
	Sucrose	40%
	autoklavieren	

<b><i>3 M Natriumacetat pH 5,4</i></b>	Natriumacetat	3M
	pH 5,4 mit konzentrierter Essigsäure einstellen, autoklavieren	

<b><i>Transformationspuffer I</i></b>	Kaliumacetat	30 mM
	RbCl <sub>2</sub>	100 mM
	CaCl <sub>2</sub>	10 mM
	MnCl <sub>2</sub>	50 mM
	Glycerin	15%
	pH 5,8 mit 10% Essigsäure einstellen, 0,2 µm sterilfiltrieren	

## Material und Methoden

---

<b><i>Transformationspuffer II</i></b>	MOPS	10 mM
	RbCl <sub>2</sub>	100 mM
	CaCl <sub>2</sub>	75 mM
	Glycerin	15%
	pH 6,5 mit 1 M KOH einstellen, 0,2 µM sterilfiltrieren	
<b><i>Plasmidpräparationslösung I</i></b>	Tris-HCl pH 8,0	25 mM
	Glucose	50 mM
	EDTA pH 8,0	10 mM
	autoklavieren	
<b><i>Plasmidpräparationslösung II</i></b>	NaOH	0,2 N
	SDS	1%
<b><i>Plasmidpräparationslösung III</i></b>	Natriumacetat	3M
	pH 5,2 mit konzentrierter Essigsäure einstellen, autoklavieren	
<b><i>TE/RNase</i></b>	TE	0,1x
	RNaseA	100 µg/ml
<b><i>10x Hybridisierungspuffer</i></b>	NaCl	1 M
	Tris pH 7,8	0,1 M
	EDTA pH 8,0	1 mM
<b><i>Tris/MgCl<sub>2</sub></i></b>	Tris-HCl pH 9,0	200 mM
	MgCl <sub>2</sub>	5 mM
	autoklavieren	

### 2.2.3 Zellkultur

<b>Minimal Essential Medium (MEM)</b>	MEM (Hausmedium: 9,6 g/l Invitrogen #41500-083, 2,2 g/l NaHCO <sub>3</sub> )	
	FCS (Biochrom, Berlin)	5%-10%
	Glutamat	0,03%
	Penicillin	100 mg/l
	Streptomycin	100 mg/l
<b>Dulbeccos Modified Eagle Medium (D-MEM)</b>	D-MEM (Invitrogen #41966-29)	
	FCS (Biochrom, Berlin)	5%-10%
	Glutamat	0,03%
	Penicillin	100 mg/l
	Streptomycin	100 mg/l
<b>ATV</b>	NaCl	137 mM
	KCl	5,4 mM
	D-Glucose	5 mM
	NaHCO <sub>3</sub>	70 mM
	Trypsin	500 mg/l

### 2.2.4 Puffer und Lösungen für zellbiologische Methoden

<b>FACS-Puffer</b>	BSA	0,1%
	Natriumazid	0,02%
	in PBS	
<b>500 mM Natriumbutyrat</b>	Natrium-Buttersäure	500 mM
	in sterilem PBS	
	0,2 µm steril filtrieren	

## 2.2.5 Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden

<b><i>RIPA Puffer</i></b>	Tris-HCl pH 7,5	20 mM
	NaCl	300 mM
	Natrium-Deoxycholat	1%
	Triton X-100	1%
	SDS	0,1%
	Lagerung bei 4°C	
<b><i>20% Sucrose</i></b>	Sucrose	20%
	Tris pH 8,0	100 mM
	NaCl	100 mM
	EDTA pH 8,0	1 mM
<b><i>2x Probenpuffer für Proteinproben (2xPPP)</i></b>	Tris-HCl pH 6,8	125 mM
	SDS	4%
	Glycerin	23,25%
	β-Mercaptoethanol	10%
	Bromphenolblau	0,01%
<b><i>Gelpuffer</i></b>	Tris base	3 M
	SDS	0,3%
	pH 8,45 mit HCl einstellen	
<b><i>5x Kathodenpuffer</i></b>	Tris	500 mM
	Tricine	500 mM
	SDS	0,5%
<b><i>10x Anodenpuffer</i></b>	Tris-HCl pH 8,9	2 M
<b><i>Blotpuffer</i></b>	Tris	50 mM
	Glycin	40 mM
	SDS	0,037%
	Methanol	20%

<i>PBS-Tween</i>	Tween 20 in PBS	0,5%
------------------	-----------------	------

## 2.2.6 Puffer und Lösungen für RNA-Methoden

<i>Fäll-Mix</i>	Ammoniumacetat	1 M
	Glykogen	250 ng/μl

<i>5x TBE</i>	Tris base	450 mM
	Borsäure	450 mM
	EDTA pH 8,0	10 mM

<i>Equilibrierungspuffer</i>	Tris-HCl pH 8,0	0,28 M
------------------------------	-----------------	--------

<i>5% PAGE-Puffer</i>	Harnstoff	100 g
	Aqua dest. steril	62,5 ml
	5x TBE	40 ml

## 2.2.7 Standardlösungen und Puffer

<i>1 M Tris pH 8,0</i>	Tris	1 M
	pH 8,0 mit HCl einstellen, autoklavieren	

<i>10% SDS</i>	SDS	10%
	pH 7,2 mit HCl einstellen	

<i>PBS(+)</i>	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	4,3 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,4 mM
	CaCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	1,5 mM
	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	1 mM

<b>PBS(-) (ohne CaCl<sub>2</sub> &amp; MgCl<sub>2</sub>)</b>	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	4,3 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,4 mM
<b>TE pH 8,0</b>	Tris-HCl pH 8,0	10 mM
	EDTA pH 8,0	1 mM
<b>0,5 M EDTA pH 8,0</b>	EDTA	500 mM
	pH 8,0 mit NaOH einstellen, autoklavieren	

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.3.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien

(Puffer und Lösungen: 2.2.1 & 2.2.2)

Das Einbringen von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien wird als Transformation bezeichnet. Da nur wenige Bakterienstämme von Natur aus kompetent sind, wurden Wege gefunden, Kompetenz zu induzieren. Einer davon ist die Behandlung mit Calciumchlorid. Bei niedriger Temperatur und in Gegenwart von Calciumionen wechselwirken *E. coli*-Zellen und Plasmid-DNA miteinander und die Plasmid-DNA wird in die Zellen aufgenommen. Ein Hitzeschock erhöht die Transformationsrate, ist aber nicht unerlässlich.

- Inkubation einer Bakterienvorkultur über Nacht (ÜN) bei 37°C und 180 rpm
- 100 ml LB-Medium mit 1 ml der Vorkultur angeimpft
- bei 37°C, 200 rpm bis zu einer OD<sub>595</sub> von 0,2 bis 0,3 kultiviert
- Inkubation der Kultur für 5 min auf Eis
- bei 2500 rpm, 4°C für 10 min pelletiert
- Überstand verworfen, Pellet in 40 ml Transformationspuffer I aufgenommen
- bei 2500 rpm, 4°C für 10 min pelletiert
- Überstand gut abgesaugt, Pellet in 4 ml Transformationspuffer II aufgenommen

- Inkubation für 15 min auf Eis
- Bakterienlösung aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren
- Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$

### **2.3.1.2 Transformation kompetenter Bakterien**

#### **2.3.1.2.1 Lange Transformation (abgewandelt nach Sambrook et al., 1989)**

(Puffer und Lösungen: 2.2.1)

Für diese Methode wurden kompetente Bakterien des *E. coli*-Stammes DH5 $\alpha$  gewählt. Dieser zeichnet sich durch eine hohe Transformationsrate, aber eine im allgemeinen nur geringe Produktion von Plasmid-DNA aus. Wegen der leichten Transformierbarkeit wurde er für die Transformation von Ligationsansätzen verwendet.

- kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut
- vorsichtige Mischung von 20-200 ng DNA mit 100  $\mu\text{l}$  der Bakteriensuspension
- ca. 30 min Inkubation auf Eis
- Inkubation für 90 sec bei  $42^{\circ}\text{C}$  (Hitzeschock)
- 3 min auf Eis abgekühlt
- anschließend Zugabe von 1 ml 1x LB-Medium
- Inkubation für ca. 1 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 180 rpm
- Zentrifugation für 3 min bei 5000 rpm
- 1 ml Überstand abgenommen und verworfen, Pellet resuspendiert
- Bakterien auf einer auf  $37^{\circ}\text{C}$  vorgewärmten LB-Agarplatte ausplattiert
- Inkubation ÜN bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Brutschrank

#### **2.3.1.2.2 Quick-Transformation (Pope & Kent, 1996)**

Die Quick-Transformation benötigt große Mengen an eingesetzter DNA und ist daher für die Transformation von Ligationsansätzen ungeeignet. Diese Methode ist jedoch ausreichend, wenn ein Plasmid nur vermehrt und aufgereinigt werden soll, z. B. in einer Maxi-Präparation. In diesem Fall wurde der *E. coli*-Stamm JM109 verwendet, der eine hohe Ausbeute an Plasmid-DNA produziert.

- kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut
- 0,5  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA mit 50-100  $\mu\text{l}$  Bakteriensuspension gemischt

- ca. 10 min Inkubation auf Eis
- gesamter Ansatz auf einer auf 37°C vorgewärmten LB-Agarplatte ausgestrichen
- Inkubation ÜN bei 37°C im Brutschrank

### **2.3.1.3 Plasmidisolierung aus *E. coli***

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly, 1979). Diese Methode basiert darauf, daß es durch Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) und Natronlauge (NaOH) zur Denaturierung von DNA und zur Bildung von Protein-SDS-Komplexen kommt. Nach Zugabe von Natriumacetat fallen Protein-SDS-Komplexe und chromosomale DNA, nicht aber Plasmid-DNA aus. Anschließend kann die Plasmid-DNA von den Proteinen und der chromosomalen DNA getrennt und gereinigt werden.

#### **2.3.1.3.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA**

(Puffer und Lösungen: 2.2.1 & 2.2.2)

Nach alkalischer Lyse und Präzipitation der Proteine und chromosomaler DNA wurden diese durch Zentrifugation von der Plasmid-DNA getrennt. Anschließend erfolgte die Reinigung und Konzentration der Plasmid-DNA durch eine Ethanol-Fällung.

- 2 ml 1x LB-Medium + Antibiotikum (abhängig von der vom Plasmid codierten Antibiotikaresistenz) mit einer Bakterienkolonie angeimpft
- Inkubation über Nacht bei 37°C und 180 rpm
- 1-1,5 ml der Übernachtskultur bei 13 000 rpm pelletiert und den Überstand abgesaugt
- 100 µl Plasmidpräparationslösung I zugegeben, gevortext und ca. 5 min bei RT inkubiert
- 100 µl Plasmidpräparationslösung II zugegeben, gevortext und 5 min bei RT inkubiert
- 150 µl Plasmidpräparationslösung III zugegeben, invertiert und 10-20 min auf Eis inkubiert
- Zentrifugation für 15 min bei 14 000 rpm
- Überstand zu 1 ml Ethanol gegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert
- Zentrifugation für 15 min bei 14 000 rpm
- Überstand dekantiert
- mit 500 µl 70%igen Ethanol gewaschen und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert

- 1 min bei 14 000 rpm pelletiert
- Überstand abgesaugt und Pellet bei 37°C getrocknet
- Pellet in 50 µl TE/RNase Lösung resuspendiert

#### **2.3.1.3.2 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA**

Für die Präparation großer Mengen Plasmid-DNA wurde das *Plasmid DNA Purification Kit: NucleoBond PC500* von Macherey-Nagel verwendet. In diesem Fall erfolgte die Reinigung der Plasmid-DNA nach der alkalischen Lyse über eine Anionenaustauschsäule.

#### **2.3.1.4 Spektrophotometrische Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen**

Die Konzentration von Nukleinsäuren kann spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt werden. Eine optischen Dichte (OD) von eins bei dieser Wellenlänge entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 33 µg/ml einzelsträngiger DNA und 40 µg/ml RNA in wässriger Lösung.

Durch eine zusätzliche Messung bei 280 nm kann die Reinheit von DNA bestimmt werden. Der Quotient beider Messungen ( $OD_{260}/OD_{280}$ ) sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Ein Quotient unter 1,8 deutet auf eine Kontamination mit Proteinen und aromatischen Substanzen hin, ein Quotient über 2,0 verweist auf eine Kontamination durch RNA.

#### **2.3.1.5 DNA-Agarosegelelektrophorese**

(Puffer und Lösungen: 2.2.2)

DNA ist negativ geladen und wandert in einem Spannungsfeld in Richtung der Anode. Daher kann sie in einem Agarosegel, an dem eine elektrische Spannung anliegt, der Größe nach aufgetrennt werden. Je nach Größe der zu trennenden Fragmente werden unterschiedliche Agarosekonzentrationen verwendet, eine hohe Konzentration (bis 2%) wird für sehr kleine und eine niedrige (ab 0,7%) für große Fragmente gewählt.

Nach Einwiegen und Kochen der Agarose in 1x TAE-Puffer wurde sie abgekühlt (auf ca. 60°C), mit 1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und das Gel gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde dieses in eine mit 1x TAE gefüllte Kammer überführt und die Geltaschen mit DNA in 1x DNA-Probenpuffer beladen. Durch Anlegen einer Spannung von 20-105 V kam es zur Auftrennung der DNA-Fragmente. Da Ethidiumbromid in die DNA interkaliert

und unter UV-Licht fluoresziert, konnten die Fragmente auf diese Weise sichtbar gemacht werden.

### **2.3.1.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Um DNA aus einem Agarosegel zu isolieren, wurde das entsprechende Fragment unter schwacher UV-Beleuchtung aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert.

Für Fragmente über 200 bp wurden das Q BIOgene *GeneClean III Kit* und für Fragmente unter 200 bp Länge das Q BIOgene *Mermaid Kit* nach Anleitung verwendet. Bei der Elution mit Hilfe dieser Kits wurde die Agarose in einem Hochsalzpuffer geschmolzen, die DNA an Glasmilch gebunden, gewaschen, getrocknet und in Aqua dest. steril eluiert.

### **2.3.1.7 Restriktionsverdau von DNA**

Restriktionsendonukleasen erkennen doppelsträngige DNA sequenzspezifisch und spalten diese. Die Erkennungssequenz ist in den meisten Fällen palindromisch und entspricht häufig der Schnittstelle. Bei der Spaltung können glatte oder überhängende DNA-Enden entstehen.

Restriktionsverdau dient der Analyse von DNA, z. B. der Überprüfung nach einer DNA-Präparation oder präparativ als Werkzeug bei der Klonierung neuer Plasmide. Der analytische und der präparative Verdau unterscheiden sich hauptsächlich in der Menge der eingesetzten DNA und des Reaktionsvolumens.

<b>Reaktionsansatz:</b>	<b>analytisch</b>	<b>präparativ</b>
DNA	1 µg	5 - 10 µg
10x Puffer	2 µl	5 µl
Enzym	5 U	20 U
Aqua dest. steril	ad 20 µl	ad 50 µl

Die Hersteller geben für jedes Restriktionsenzym einen Puffer an, der optimale Reaktionsbedingungen liefert. Bei einem Verdau mit mehreren Enzymen wurde der Puffer gewählt, in dem alle Enzyme ihre größte Aktivität haben. Gab es keinen solchen Puffer, wurden die einzelnen Verdau getrennt durchgeführt.

Die Verdaue erfolgten 1,5 h bis über Nacht bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur, meistens 37°C.

### **2.3.1.8 Ligation linearer DNA-Fragmente**

Bei der Ligation werden DNA-Fragmente mit Hilfe einer Ligase aus dem T4-Phagen miteinander verknüpft. Dieses Enzym katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einer 3' Hydroxylgruppe und einem 5' Phosphatende, wobei es ATP als Kofaktor nutzt. Hierfür müssen die DNA-Enden entweder glatte oder komplementär einzelsträngige Überhänge aufweisen. Weiterhin ist es wichtig, daß die Insert-DNA im Überschuß vorhanden ist, das Verhältnis von Insert-DNA zu Vektor-DNA sollte zwischen 3:1 und 10:1 liegen. Als Vektor wird das DNA-Fragment bezeichnet, das die zur Vermehrung und Selektion nötigen Sequenzen trägt, z. B. den Bakterien-Ori und Antibiotikaresistenzen. Dieses Fragment kann sich nach einer Religation und Transformation in Bakterien vermehren und diesen bei einer Selektion das Wachstum ermöglichen. Eine solche Religation der Vektor-DNA kann durch deren Dephosphorylierung (siehe 2.3.1.9) verhindert werden.

#### **Reaktionsansatz:**

T4 DNA-Ligasepuffer	2 µl
DNA	100–500 ng
T4 DNA-Ligase	1,0 µl (5 Weiss Units)
Aqua dest. steril	ad 20 µl

Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 14°C, anschließend wurde eine Transformation in *E. coli* DH5α durchgeführt (siehe 2.3.1.2.1).

### **2.3.1.9 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten**

Soll eine Religation von Vektor-DNA-Fragmenten während der Ligation verhindert werden, kann das Enzym CIAP (*calf intestine alkaline phosphatase*) genutzt werden. Dieses dephosphoryliert freie 5' Enden von DNA.

Da das Enzym in den meisten gängigen Restriktionspuffern aktiv ist, wurde es direkt nach dem präparativen Restriktionsverdau zugegeben (10 U) und für 1 h bei 37°C inkubiert.

Anschließend erfolgte die Zugabe von EDTA auf eine Endkonzentration von 5 mM und das Erhitzen auf 75°C für 10 min zur Inaktivierung des Enzyms.

### ***2.3.1.10 Umwandlung von überhängenden in glatte DNA-Enden***

In einigen Fällen war es im Rahmen der Klonierungsstrategie nötig, überhängende DNA-Enden in glatte Enden umzuwandeln. Je nach Art der überhängenden Enden gibt es verschiedene Möglichkeiten: 5' Überhänge können sowohl aufgefüllt, als auch abgebaut werden, wohingegen 3' Überhänge nur abgebaut werden können.

In dieser Arbeit wurde das Klenow-Enzym verwendet, um mit Hilfe seiner 5'-3' Polymerase-Aktivität überhängende 5' Enden aufzufüllen, wohingegen die DNA-Polymerase des T4-Phagen zum Abbau von 3' Überhängen verwendet wurde.

#### **Auffüllen von 5' überhängenden Enden durch das Klenow-Enzym**

- Zugabe von 10 U Klenow-Enzym zu einem beendeten präparativen Restriktionsverdau
- Zugabe von dNTPs (Endkonzentration 1 mM), gemischt
- Inkubation bei 37°C für 30 min
- Inaktivierung des Enzyms bei 75°C für 15 min

#### **Abbau von 3' überhängenden Enden durch die T4-DNA-Polymerase**

- Zugabe von 10 U T4 DNA-Polymerase zu einem beendeten präparativen Restriktionsverdau
- Zugabe von dNTPs (Endkonzentration 0,1 mM), gemischt
- Inkubation bei 12°C für 20 min
- Inaktivierung des Enzyms bei 75°C für 15 min

### ***2.3.1.11 Hybridisierung und Einfügen von Oligonukleotiden***

(Puffer und Lösungen: 2.2.2)

Bei dieser Methode werden zwei komplementäre Oligonukleotide miteinander gepaart und anschließend in einen Vektor eingefügt. Auf diese Weise können z. B. kurze Sequenzen eingefügt oder ausgetauscht werden. Die Oligonukleotide müssen über den größten Teil ihrer Länge komplementär sein, damit sie sich aneinander lagern. Sie können nach

Hybridisierung in einen Vektor ligiert werden, wenn ihre Enden komplementär zu denen des Vektors sind. Sind die Oligonukleotide nicht kineasiert, darf der Vektor nicht dephosphoryliert werden.

### **Reaktionsansatz:**

Oligonukleotid 1 und 2	je 1 nmol
10x Hybridisierungspuffer	5 µl
Aqua dest. steril	ad 50 µl

Der Ansatz wurde im Wasserbad für 5 min auf 92°C erhitzt. Anschließend wurde das Wasserbad ausgeschaltet und kühlte sich innerhalb von 3 h bis ÜN auf Raumtemperatur ab. Während dieser Zeit erfolgte die Hybridisierung der Oligonukleotide und 2 µl dieses Ansatzes wurden anschließend in die Ligation eingesetzt.

### **2.3.1.12 Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation von DNA**

(Puffer und Lösungen: 2.2.2)

Die Phenol-Chloroform-Extraktion dient dem Entfernen von Protein- und Lipidverunreinigungen aus wässrigen DNA-Lösungen. Hierbei sammeln sich Proteine in der organischen Phase, während Nukleinsäuren in der wässrigen Phase verbleiben.

Die Phenol-Chloroform-Extraktion wurde durchgeführt, um die DNA-Matrizen für die *in vitro*-Transkription der RNase Protection Sonden (siehe 2.3.5.1) zu reinigen. Anschließend erfolgte die Präzipitation der DNA mit Isopropanol und Ethanol zur Entfernung der Phenolreste und Konzentration der DNA.

#### **Phenol-Chloroform-Extraktion**

- Auffüllen des DNA-Volumens mit sterilem Aqua dest. auf 500 µl
- Zugabe von einem Volumen Phenol, gevortext
- Zentrifugation bei 13 000 rpm für 4 min
- obere, wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt
- Zugabe von einem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1), gevortext
- Zentrifugation bei 13000 rpm für 4 min
- obere, wässrige Phase in neues Reaktionsgefäß überführt

- Zugabe von einem Volumen Chloroform, gevortext
- Zentrifugation bei 13 000 rpm für 4 min
- obere, wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt

### ***Ethanol-Präzipitation***

- Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2-5,4)
- Zugabe von 6/10 Volumen Isopropanol
- gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert
- Zentrifugation bei 13 000 rpm für 15 min
- Überstand dekantiert
- Zugabe von 1 ml 70%igem Ethanol
- Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur
- bei 13 000 rpm 15 min pelletiert und Überstand abgesaugt
- Pellet ca. 15 min bei 37°C getrocknet und in 20 µl sterilem Aqua dest. aufgenommen

### **2.3.1.13 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die PCR dient der Amplifizierung von definierten DNA-Fragmenten. Die Reaktion besteht im Wesentlichen aus drei sich wiederholenden Schritten. Der erste ist der Denaturierungsschritt, in dem die Temperatur soweit erhöht wird, daß es zu Trennung der beiden DNA-Stränge (der Matrize) kommt. Im zweiten Schritt wird die Temperatur gesenkt und es kommt zur Bindung zweier spezifischer Oligonukleotide (Primer) an die einzelsträngige DNA. Im dritten Schritt synthetisiert eine thermostabile Polymerase ausgehend vom 3' Ende der Primer einen zur Matrize komplementären DNA-Strang. Diese Abfolge wird 20-30 Mal wiederholt und es kommt zu einer exponentiellen Vermehrung der durch die Primer begrenzten DNA-Sequenz. Mit Hilfe von modifizierten Primern kann das amplifizierte Produkt modifiziert und mutiert werden.

Die Qualität und Quantität des Produktes wird durch die verwendete, thermostabile Polymerase beeinflusst. So besitzt z. B. die Taq-Polymerase eine hohe Reaktionsgeschwindigkeit, aber keine Korrekturaktivität, während die Pwo-Polymerase eine Korrekturaktivität besitzt, dafür aber eine wesentlich niedrigere Reaktionsgeschwindigkeit aufweist. Je nachdem, ob der Schwerpunkt auf Quantität oder Qualität gelegt wird, erfolgt die Wahl der Polymerase.

In dieser Arbeit wurden nur präparative PCRs durchgeführt, bei denen das Produkt möglichst fehlerfrei sein sollte. Aus diesem Grund wurde die Pwo-Polymerase verwendet.

**Reaktionsansatz:**

Plasmid-DNA	200 ng
Primer sense	100 pM
Primer antisense	100 pM
Puffer (10x)	5 µl Pwo-Puffer komplett
10 mM dNTP Mix	1 µl
Polymerase	2 U
Aqua dest. steil	ad 50 µl

Das Ansetzen der Reaktion erfolgte in 0,2 ml Dünnwand-Reaktionsgefäßen auf Eis, um falschen Primerbindungen vorzubeugen.

**PCR-Programm:**

Phase	Temperatur	Zeit	Zahl der Zyklen
Denaturierung	94°C	4 min	1
Denaturierung	94°C	30 sec	25
Primerbindung	ca. $T_m - 3^\circ\text{C}$	60 sec	
DNA-Synthese	72°C	pro 500 bp ca. 1 min	
Endtemperatur	4°C	$\infty$	1

$T_m$  bezeichnet die Schmelztemperaturen der Primer.

Zur Überprüfung der Reaktion wurde nach der PCR ein Zehntel des Ansatzes auf ein Agarosegel aufgetragen. Vor einer weiteren Verwendung des PCR-Produktes erfolgte eine Aufreinigung mit dem *GENECLEAN Turbo For PCR Kit* von Q BIOgene oder dem *Qiaquick PCR Purification Kit* von Qiagen.

**2.3.1.14 Sequenzierung von DNA**

(Puffer und Lösungen: 2.2.2)

Die Sequenzierung basiert auf dem Prinzip der Kettenabbruchmethode nach F. Sanger. Ähnlich der PCR beruht sie auf der Wiederholung dreier Schritte. Zunächst wird die zu sequenzierende DNA denaturiert, mit einem Primer hybridisiert und dieser anschließend

durch eine Polymerase durch Anhängen von Desoxynukleotiden verlängert. In dem Gemisch der Desoxynukleotide befinden sich auch mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Didesoxynukleotide. Wird eines dieser Didesoxynukleotide eingebaut, kann der Strang nicht mehr verlängert werden und es kommt zum Kettenabbruch. Da der Einbau zufällig erfolgt, haben die neuen DNA-Stränge unterschiedliche Längen. Die DNA-Stränge werden der Größe nach aufgetrennt, die Fluoreszenzfarbstoffe an ihren Enden mittels Laser angeregt und gemessen. Auf diese Weise kann die Sequenz bestimmt werden. Für die Sequenzierungen von Plasmiden wurde das Applied Biosystems *Big Dye Cycle Sequencing Kit* verwendet.

**Reaktionsansatz:**

Big Dye Mix	1 µl
5x Tris/MgCl <sub>2</sub>	1 µl
DNA	0,5 µg
Primer	3,3 pmol
Aqua dest. steril	ad 5 µl

**Thermocyclerprogramm:**

Phase	Temperatur	Zeit	Zahl der Zyklen
Denaturierung	95°C	20 sec	25
Primerbindung	50°C	15 sec	
DNA-Synthese	60°C	4 min	
Endtemperatur	4°C	∞	1

Nach der Sequenzierreaktion erfolgte die Aufreinigung und Sequenzierung im Haus.

## 2.3.2 Zellkulturmethoden

### 2.3.2.1 Kultivierung adhärenter Zelllinien

(Puffer und Lösungen: 2.2.3)

Die verwendeten Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Zellkulturflaschen gehalten. Dabei wurden für die jeweiligen Zelllinien folgende Medien

(angesetzt mit 10% FCS, 0,03% Glutamat und jeweils 100 µg/ml Penicillin und Streptomycin) eingesetzt:

293T	MEM
HT1080	D-MEM

Adhärente Zelllinien wachsen in Form eines Monolayers am Boden der Zellkulturflasche und müssen bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 60-80% (alle 3-4 Tage) gesplittet, d. h. verdünnt werden. Dazu wurde das Medium entfernt, die Zellen mit ATV gespült, mit ATV abgelöst und mit frischem Medium 1:5 bis 1:20 verdünnt.

### ***2.3.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen***

(Puffer und Lösungen: 2.2.3)

Um Zellen einzufrieren, wurden sie mit ATV abgelöst, für 10 min bei 1000 rpm pelletiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in einer 1:1 Mischung aus Medium und FCS mit 20% DMSO (Sigma #D2650) aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen in Aliquots von 1 ml bei -80°C eingefroren und nach 1-3 Tagen in flüssigen Stickstoff überführt.

Beim Auftauen von Zellen wurden zunächst 10 ml Medium auf Eis vorgelegt, die gefrorenen Zellen rasch in der Hand aufgetaut und sofort im vorgelegten Medium gewaschen. Nach Zentrifugation (10 min, 1000 rpm, 4°C) wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 5 ml frischem Medium resuspendiert und in einer kleinen Zellkulturflasche ausgesät.

Wichtig bei der Arbeit mit DMSO ist die Durchführung auf Eis, da DMSO sonst toxisch für die Zellen ist.

### ***2.3.2.3 Transfektion und Induktion***

(Puffer und Lösungen: 2.2.3 & 2.2.4)

Transfektion bezeichnet den Vorgang, bei dem Plasmid-DNA in eine eukaryotische Zelle eingeführt wird. In dieser Arbeit war Ziel der Transfektionen eine transiente Genexpression und Produktion von Viruspartikeln. Für eine Partikelpräparation aus dem Zellüberstand werden relativ hohe Virustiter benötigt, weshalb die Transfektion mit *PolyFect Transfection Reagent* von Qiagen erfolgte, da dieses im Vergleich zu anderen Transfektionsmethoden die höchsten Titer liefert.

PolyFect Reagenz ist ein sogenanntes aktiviertes Dendrimer Transfektionsreagenz. Es besitzt einen definierten sphärischen Aufbau mit einem zentralen Kern und radiären Ausläufern, die in geladenen Aminosäuregruppen enden. Gibt man DNA hinzu, formt sich eine kompakte Struktur mit einer positiven Ladung, welche es erlaubt, an negativ geladene Zellrezeptoren an der Zelloberfläche eukaryotischer Zellen zu binden. In der Zelle puffert das Reagenz den pH-Wert im Lysosom und inaktiviert auf diesem Wege die lysosomalen Nukleasen. Dies sichert die Stabilität der PolyFect-DNA-Komplexe.

Die transfizierten Zellen wurden nach 24 h Inkubation mit Natriumbutyrat induziert. Es ist bekannt, daß Natriumbutyrat ein Histondeacetylasehemmer ist und daß die Acetylierung von Histonen mit der transkriptionellen Aktivierung vieler eukaryotischer Gene korreliert. Die von Natriumbutyrat induzierte Expressionserhöhung ist also unspezifisch und betrifft auch Gene der transfizierten Zelle.

### ***Aussaat von Zellen***

- Aussaat von  $1,6 \times 10^6$  Zellen (293T) pro 6 cm Schalen in 5 ml Medium
- Inkubation ÜN bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>

### ***Transfektion***

- Medium gegen 4 ml frisches, vorgewärmtes Medium gewechselt
- Transfektionsansatz:

DNA-Gesamtmenge	4-7,5 µg (meistens 6 µg)
MEM ohne Zusätze	150 µl
PolyFect	30 µl
- 10 sec gevortext und 5-10 min bei Raumtemperatur inkubiert
- 1 ml Medium zugegeben, gemischt und langsam auf die Zellen getropft
- Inkubation über Nacht

### ***Induktion***

- Zugabe von Natriumbutyrat auf eine Endkonzentration von 8 mM
- nach 7-9 h Mediumwechsel gegen 2,5 – 3,5 ml frisches, vorgewärmtes Medium
- Inkubation über Nacht

## 2.3.3 Proteinbiochemische Methoden

### 2.3.3.1 Herstellung von Zellysaten für die Proteingelektrophorese

(Puffer und Lösungen: 2.2.5)

Eine Möglichkeit, zu untersuchen, ob Proteine von transfizierten Plasmiden (siehe 2.3.2.3) exprimiert werden, ist die Analyse von Zellysaten mittels Proteingelektrophorese und anschließendem Western Blot (siehe 2.3.3.2 & 2.3.3.3).

Durch Zugabe von Triton X-100 wurden die Zellmembranen permeabilisiert und die Zellen lysiert. Zusätzlich wurden SDS und  $\beta$ -Mercaptoethanol hinzugegeben, diese denaturieren Proteine und verhindern so störende Protein-Proteinwechselwirkungen.

- Zellen mit PBS(+) gewaschen
- Zugabe von 700  $\mu$ l RIPA Puffer
- 10-20 min Inkubation auf Eis, dabei wurden die Platten mehrmals geschwenkt
- Überführung der gelöste Zellen in einen QiaShredder und Zentrifugation für 1 min bei 13000 rpm
- 600  $\mu$ l des Eluats mit der gleichen Menge an 2x PPP gemischt
- 5 min bei 95°C gekocht
- kurzfristige Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$ , langfristige bei  $-80^{\circ}\text{C}$

### 2.3.3.2 Tricin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

(Puffer und Lösungen: 2.2.5)

Proteinproben lassen sich in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (modifiziert nach: Schägger & Jagow, 1987) anhand ihres Molekulargewichtes auftrennen. Polyacrylamidgelele bestehen aus einem Acryl-Bisacrylgemisch und ihr Trennbereich ist von der Konzentration und dem Verhältnis dieses Gemisches abhängig (hier 37,5:1). Die Polymerisierung des Acrylamids benötigt freie Radikale, die von Ammoniumpersulfat (APS) freigesetzt und von TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyldiamin) stabilisiert werden.

SDS denaturiert Proteine – besonders nach vorheriger Reduktion mit  $\beta$ -Mercaptoethanol oder DTT – und unterbindet so Protein-Proteinwechselwirkungen. Es ist ein anionisches Detergenz, das an hydrophobe Bereiche von Proteinen bindet. Dabei wird eine stark negative Ladung angelagert, die alle vorhandenen Ladungen überdeckt. Bei der Elektrophorese wandern deshalb alle Proteinkomplexe zur Anode und werden durch den Molekularsiebeffekt der porösen Polyacrylamidmatrix anhand ihres Molekulargewichts

aufgetrennt. Durch die Zugabe von Tricin wird eine bessere Trennung kleinerer Proteine (1-100 kD) erreicht.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich 8%ige Gele verwendet.

	<i>Trenngel 8%</i>	<i>Sammelgel 4%</i>
Acryl-Bisacrylamid Stammlösung (37,5:1)	5,3 ml	2,6 ml
Gelpuffer:	6,6 ml	5,0 ml
Glycerin (100% wasserfrei)	2,2 ml	-
Aqua dest. steril	6,0 ml	12,4 ml
10% APS	50 µl	150 µl
TEMED	20 µl	20 µl

Zunächst wurde das Trenngel gegossen und mit 1 ml Isopropanol überschichtet. Nach Auspolymerisierung (ca. 30 min) wurde das Isopropanol gründlich entfernt und anschließend das Sammelgel gegossen. In das Sammelgel wurde ein Kamm gesteckt, der beim Polymerisieren Taschen freihält, in die nach Entfernen die Proben gefüllt werden konnten. Beim Ansetzen der Lösungen für die Gele wurde darauf geachtet, daß APS und TEMED zum Schluss zugegeben wurden, da mit ihrer Zugabe die Polymerisierung startet. Nach Auspolymerisierung des Sammelgels wurden die Pufferkammern der Elektrophoreseapparaturs mit Kathoden- und Anodenpuffer gefüllt und 25-50 µl Probe bzw. 7 µl Rainbow-Marker aufgetragen. Die Trennung der Proteine erfolgte über Nacht bei 20-35 mA pro Gel.

### **2.3.3.3 Western Blot**

(Puffer und Lösungen: 2.2.5)

Ziel des Western Blots ist es, Proteine, die zuvor mittels Gelelektrophorese ihrem Molekulargewicht nach getrennt wurden (siehe 2.3.3.2), auf einer Membran zu fixieren und anschließend mit Hilfe von Antikörpern zu detektieren. Die Übertragung erfolgt in einem elektrischen Feld, in dem die Proteine sich auf den positiven Pol, die Anode zu bewegen und aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran wandern. Bei Zugabe eines spezifischen Antikörpers bindet dieser das zu detektierende Protein und wird im nächsten Schritt von einem zweiten Antikörper erkannt. Diese Bindung kann über ein an den sekundären Antikörper gekoppeltes Enzym, z. B. einer Peroxidase, nachgewiesen werden. Wird eine Detektionslösung (*ECL Western Blot Detection Kit*) zu den Peroxidase-

gekoppelten Antikörpern gegeben, kommt es zu einer Oxidation und zur Freisetzung von Lichtquanten (Chemolumineszenz). Diese Lichtemission kann durch die Belichtung eines Röntgenfilms detektiert werden.

In den beschriebenen Experimenten wurde das „semidry“-Verfahren genutzt, hierfür wurde der Blot wie folgt aufgebaut:

- Kathodenplatte (mit Blotpuffer befeuchtet)
- 3 Lagen Blot-Filterpapier (in Blotpuffer getränkt)
- Nitrocellulosemembran (in Blotpuffer getränkt)
- Acrylamidgel
- 2 Lagen Blot-Filterpapier (in Blotpuffer getränkt)
- Anodenplatte (mit Blotpuffer befeuchtet)

### ***Immunoblot***

- 90 min mit 10 mA/cm<sup>2</sup> geblottet
- Membran kurz mit PBS(-) gespült und schüttelnd 1 h bei Raumtemperatur in 4% Magermilchpulver in PBS blockiert
- Membran 3 x kurz mit PBS-Tween gespült
- Membran schüttelnd 1 h bei Raumtemperatur mit dem primären Antikörper, verdünnt in 4% Magermilchpulver in PBS(-), inkubiert
- Membran 3x kurz mit PBS-Tween gespült, 4 x 5 min mit PBS-Tween gewaschen
- Membran schüttelnd 1 h bei Raumtemperatur mit dem sekundärem Antikörper verdünnt in 4% Magermilchpulver in PBS(-) inkubiert
- Membran 3x kurz mit PBS-Tween gespült, 5 x 5 min mit PBS-Tween gewaschen

### ***Detektion***

- Nitrocellulosemembran kurz zwischen Whatman-Papier leicht getrocknet
- 4 ml ECL zugegeben, 90 sec einwirken gelassen und entfernt
- Membran in Frischhaltefolie gewickelt und in eine Fotokassette überführt
- in der Dunkelkammer Röntgenfilme für 10 sec bis 20 min belichtet und anschließend entwickelt, fixiert und getrocknet

## 2.3.4 Virologische Methoden

### 2.3.4.1 *Das retrovirale Infektionssystem*

Das in dieser Arbeit verwendete System diente der Herstellung von retroviralen Viruspartikeln, die nur einen Replikationszyklus durchlaufen können. Hierfür wurden 293T Zellen mit mehreren Plasmiden transfiziert (siehe 2.3.2.3), welche die zur Partikelbildung nötigen Komponenten unter Kontrolle eines CMV-Promotors exprimieren. Benötigt werden *gag*, *pol*, *env* und eine verpackbare RNA. Diese können entweder von einzelnen Plasmiden oder aber kombiniert codiert werden. Da die verpackbare RNA nicht alle zur Partikelbildung nötigen Sequenzen enthält, ist nach Partikelproduktion nur ein Infektionszyklus möglich.

Die getrennte Expression der einzelnen Viruskomponenten ermöglicht es, diese unabhängig voneinander zu untersuchen. So können Mutationen in eine der Komponenten eingeführt werden und deren Einfluss auf die Bildung von Partikeln, bzw. deren Infektiosität untersucht werden.

Trägt das Plasmid, das für die RNA codiert, zusätzlich zu den für die Verpackung nötigen Sequenzen noch ein Markergen, so kann dieses zur Ermittlung der Infektiosität genutzt werden. Die transfizierten Zellen produzieren Viruspartikel, die zur Infektion von Zielzellen verwendet werden, die DNA wird in den Zielzellen integriert und exprimiert. Die Expression des Markergens kann dann z. B. über eine FACS-Analyse detektiert und somit Schlüsse auf die Infektiosität der gebildeten Viruspartikel gezogen werden.

Die gebildeten Partikel können aber auch direkt untersucht werden, indem sie aus dem Überstand gewonnen werden und ihre Komponenten, z.. im Western Blot oder einem RPA, untersucht werden.

Die Präparation von Zellysaten transfizierter Zellen ermöglicht eine Überprüfung der Plasmidexpression (siehe 2.3.3.1).

### 2.3.4.2 *Infektionsanalyse*

#### **Infektion**

Um Zielzellen zu infizieren, nutzt man den Überstand transfizierter und induzierter Zellen (siehe 2.3.2.3). Vor der Infektion wurden die Zielzellen (HT1080) in 12-well Platten mit  $1 \times 10^4$  Zellen pro ml und well ausgesät und 2-4 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Der Überstand der transfizierten Zellen (293T) wurde mit einer sterilen Spritze abgezogen und

durch einen 0,45 µm Filter zellfrei filtriert. Anschließend wurde ein Teil dieses Überstandes (10-300 µl) auf die Zielzellen gegeben und diese inkubiert, um nach 3-4 Tagen eine Infektionsanalyse im Durchflußzytometer durchzuführen.

### **Durchflußzytometrische Infektionsanalyse**

(Puffer und Lösungen: 2.2.3 & 2.2.4)

Im Durchflußzytometer werden die Zellen durch eine dünne Kapillare geleitet, vereinzelt und mit einem Laser abgetastet. Über die Anregung von Fluorochromen mittels des Lasers kann die Expression von Markergenen in einer Zellpopulation direkt oder indirekt bestimmt werden. Die Fluorochrome werden entweder direkt vom Markergen codiert oder sind an einen Antikörper gebunden, der das Markerprotein detektiert. In dieser Arbeit wurde das *enhanced green fluorescent protein* (eGFP), ein bei einer Anregung von 488 nm grün fluoreszierendes Protein, eingesetzt. Neben der Fluoreszenz werden auch die Größe und Granularität der Zellen im Durchflußzytometer (FACS = *Fluorescence Activated Cell Sorting*) gemessen, dies ermöglicht Rückschlüsse auf den Zustand der Zellpopulation.

- 3 ml FACS-Puffer in FACS-Röhrchen vorgelegt
- infizierte Zellen mit 0,5 ml ATV gewaschen und in 0,5 ml ATV abgelöst
- Zellen in FACS-Röhrchen überführt
- 5 min bei 1200 rpm pelletiert
- Überstand abgegossen und Zellpellet in 80-200 µl FACS-Puffer resuspendiert

Die Messung wurde mit einem Becton-Dickinson FACScan durchgeführt und mit dem Programm *CellQuest* (ebenfalls Becton-Dickinson) ausgewertet.

### **2.3.4.3 Viruspartikelpräparation**

(Puffer und Lösungen: 2.2.5 & 2.2.6)

Viruspartikel wurden aus dem Überstand transfizierter Zellen gewonnen und die partikelassoziierten Proteine im Western Blot (siehe 2.3.3.3) und RNA im RNase Protection Assay (siehe 2.3.5.2) untersucht.

Nach Aussaat mehrerer 6 cm Schalen mit je  $1,5 \times 10^6$  Zellen pro Ansatz, PolyFect Transfektion und Induktion (siehe 2.3.2.3) erfolgte am vierten Tag die Partikelpräparation. Für eine Untersuchung der partikelassoziierten Proteine wurden vier Schalen, für die der partikelassoziierten RNA zwei Schalen benötigt.

### ***Partikelpräparation***

- Überstände der einzelnen Ansätze mit einer sterilen Spritze abgenommen, vereinigt und zellfrei filtriert (0,45 µm Filter)
- 2 ml 20% Sucroselösung in ein Ultrazentrifugenröhrchen vorgelegt
- 4-9 ml Überstand vorsichtig auf das Sucrosekissen geschichtet
- mit PBS(+) austariert
- 3 h Ultrazentrifugation bei 25 000 rpm
- Medium abgesaugt, Sucrose dekantiert und die Röhrchen umgedreht hingestellt
- Flüssigkeitsreste mit RNase freiem Papier entfernt

### ***Präparation von partikelassoziierten Proteinen***

- 40-75 µl einer 1:1 2x PPP-PBS Mischung zu den Partikeln gegeben, gevortexen
- Inkubation für 5 min auf Eis, gevortext und 5 min bei 95°C erhitzt
- Lagerung bei -80°C

### ***Präparation von partikelassoziiierter RNA***

- 60-75 µl Lysispuffer (*Direct Protect Lysate RPA Kit*) zu den Partikeln gegeben, gevortext
- Inkubation für 5 min auf Eis, gevortext
- Lagerung bis zur Untersuchung durch den RNase Protection Assay bei -80°C

## **2.3.5 RNA-Methoden**

### ***2.3.5.1 Herstellung einer RNA-Sonde***

Für den RNase Protection Assay wird eine markierte RNA-Sonde benötigt. Diese muß komplementär zu einem Stück der zu detektierenden RNA sein und sollte eine Länge von 200-500 Basen umfassen. Um zu gewährleisten, daß nur Sonden definierter Länge entstehen, wird das Ausgangsplasmid entsprechend linearisiert. Nach der Linearisierung erfolgt eine Phenol-Chloroform-Fällung (siehe 2.3.1.12), um eine möglichst saubere Matrize zu erhalten und anschließend die *in vitro*-Transkription der Sonde. Die Markierung der Sonde erfolgte in dieser Arbeit über den Einbau biotinylierter dUTPs mittels des *Biotin labeling Mix* von Roche.

### ***In vitro-Transkription***

linearisierte Sonden DNA	1 µl (1-2 µg)
10x Transkriptionspuffer	1 µl
RNase Inhibitor	20 U
Biotin labeling Mix (Roche)	1 µl
RNase freies Aqua bidest.	6 µl
SP6 RNA-Polymerase	0,5 µl

- Inkubation für 30 min bei 37°C
- Zugabe von 0,5 U RQ1-Dnase
- 15 min 37°C
- Zugabe von 20 µl Fäll-Mix und 75 µl 100% EtOH
- Zentrifugation für 20-25 min bei 13 000 rpm
- Überstand abgesaugt und das Pellet getrocknet
- Pellet in 50 µl Lysispuffer (*Direct Protect Lysate RPA Kit* von Ambion) aufgenommen
- Lagerung bei -80°C

### **2.3.5.2 RNase Protection Assay (RPA)**

(Puffer und Lösungen: 2.2.6)

Die Analyse partikelassoziierter RNA erfolgte mittels eines RNase Protection Assays unter Verwendung des *Direct Protect<sup>TM</sup> Lysate RPA Kits*. Die Partikel wurden in Lysispuffer aufgenommen (siehe 2.3.4.3), dieser enthält konzentriertes Guanidin-Thiocyanat, das Ribonukleasen inaktiviert und gleichzeitig schnell Zellen und Gewebe löst. Außerdem liefert es gute Bedingungen für Nukleinsäurehybridisierungen. Die markierte Sonde (siehe 2.3.5.1) wurde mit dem Lysat gemischt und nach Übernachtinkubation mit Ribonuklease behandelt. Die Sonde, die mit komplementärer RNA hybridisierte, ist vor dem Abbau geschützt und konnte auf einem Polyacrylamidgel separiert, auf eine positive Nylonmembran übertragen und anschließend visualisiert werden.

Genomische DNA wird unter den Bedingungen des *Direct Protect<sup>TM</sup> Lysate RPA Kits* nicht denaturiert und kann demzufolge nicht mit der Sonde hybridisieren.

### **Hybridisierung**

Viruspartikel in Lysispuffer	15-20 µl
1:75 – 1:100 verdünnte Sonde	5-10 µl
Lysispuffer ( <i>Direct Protect Lysate RPA Kit</i> )	ad 50 µl

- Positiv- und Negativkontrollen: Sonde in Lysispuffer
- ÜN Inkubation bei 37°C

### ***RNase Verdau mit Hilfe des Direct Protect Lysate RPA Kit von Ambion***

- Zugabe von 500 µl 1x *Digestionbuffer* mit *RNase Cocktail*
- Keine Zugabe von *RNase Cocktail* zur Positivkontrolle
- 30 min Inkubation bei 37°C
- Zugabe von 20 µl 10% Natrium- Sarcosyl und 10 µl Proteinase K (20 mg/ml)
- 30 min Inkubation bei 37°C
- Zugabe von 500 µl Isopropanol und Inkubation bei –20°C für 15 min
- 20-25 min Zentrifugation bei 14 000 rpm bei Raumtemperatur
- Abnahme des Überstand bis auf einen kleinen Rest
- 3 min bei 14 000 rpm
- Abnahme des restlichen Überstandes
- Resuspendierung des Pellets in 20 - 25 µl Gelladepuffer
- 3 min bei 95°C, gevortext und abzentrifugiert, danach auf Eis gestellt

### ***Separation der geschützten Fragmente***

- ein 5%iges denaturierendes Polyacrylamidgel wurde gegossen:

5% PAGE-Puffer	35 ml
Acryl-Bisacrylamid (19:1)	5 ml
10% APS	300 µl
TEMED	20 µl
- Vorlauf des Gels für ca. 30 min in 1x TBE
- Beladung des Gels mit der gesamten Probe und Lauf für 2-3 h bei 180–200 V
- Transfer der RNA-Fragmente auf eine positiv geladene Nylonmembran (BrightStar<sup>TM</sup>-Plus) durch blotten bei 280 mA
- Vernetzung der RNA und der Membran über UV (*cross linking*; 120 mJoule)

### ***Detektion mit dem North2South Chemiluminescent Hybridization and Detection Kit von Pierce/Perbio***

- 15 min blocken in 30 ml Blockierungspuffer schüttelnd bei Raumtemperatur

- Zugabe von 100 µl Strep-HRP Konjugat, Inkubation für 15 min schüttelnd bei Raumtemperatur
- 4 x 5 min gewaschen mit 40 ml 1x Waschpuffer und anschließender Schalenwechsel
- Inkubation 5 min schüttelnd bei RT in 30 ml Equilibrierungspuffer
- je 2 ml der *Luminol/Enhancer Solution* und der *Stable Peroxidase Solution* gemischt
- die feuchte Membran mit der Mischung bedeckt und für 5 – 8 min inkubiert
- Substrat abfließen lassen, Membran in Frischhaltefolie eingeschlagen und in eine Fotokassette überführt
- Belichtung der Röntgenfilme für 0,5 – 30 min und anschließend entwickelt, fixiert und getrocknet

### 2.3.5.3 RNA-Sekundärstrukturanalyse

Die RNA-Sekundärstrukturen für die verschiedenen in dieser Arbeit verwendeten Deletionsmutanten wurden mit Hilfe des mfold-Programms (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna>) ermittelt. In diesem werden die Sekundärstrukturen der RNA nach dem Prinzip der minimalen freien Energie berechnet (Zuker, 2003).

In dieser Arbeit wurden die Voreinstellungen des Programms beibehalten. Das bedeutet, es wurden keine Zwänge (*constraints*) vorgegeben und die Sekundärstruktur linearer RNA bei 37°C und 1 M NaCl ermittelt. Weiterhin wurden folgende Einstellungen beibehalten:

**Tab. 3: Einstellungen des Programms mfold**

Faltungsparameter	Vorgabe	Bedeutung
<i>percent suboptimality</i>	5	kontrolliert die Berechnung suboptimaler Faltungen
<i>Upper bound</i>	50	obere Grenze der Anzahl der berechneten Faltungen
<i>window parameter</i>	<i>default</i>	kontrolliert die Anzahl der Faltungen; Wenn <i>default</i> , gewählt wurde, so berechnet das Programm einen Wert aufgrund der Länge der Sequenz.
<i>maximum interior bulge/loop size</i>	30	maximale Größe einer internen Schleife oder Ausbuchtung
<i>maximum asymmetry of interior bulge/loop</i>	30	maximale Asymmetrie einer internen Schleife oder Ausbuchtung
<i>maximum distance between paired bases</i>	<i>no limit</i>	maximaler Abstand zwischen zwei gepaarten Basen innerhalb der Sequenz

## 3 Ergebnisse

### *3.1 Untersuchung des Mechanismus der Inkorporation des Pol-Proteins in foamyvirale Partikel*

Für die Bildung eines infektiösen foamyviralen Viruspartikels sind vier Komponenten erforderlich. Das Strukturprotein Gag bildet das Partikel und das Glykoprotein Env wird für die Freisetzung des Viruspartikels und die Infektion von Zellen benötigt (Baldwin & Linial, 1998; Fischer et al., 1998; Pietschmann et al., 1999). Weiterhin sind noch eine verpackbare infektiöse RNA und das Pol-Protein essentiell für die Infektiosität des gebildeten Viruspartikels.

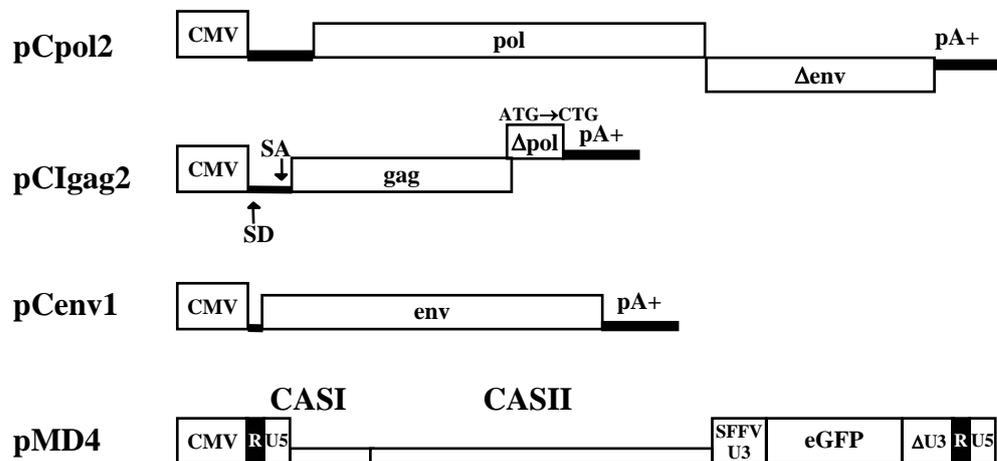
Das Pol-Protein (Pol) der Foamyviren wird von einer eigenen gespleißten mRNA unabhängig von Gag translatiert (Enssle et al., 1997; Jordan et al., 1996; Yu et al., 1996a). Daher kann die Inkorporation des Proteins nicht, wie bei den Orthoretroviren, über ein Gag-Pol-Fusionsprotein erfolgen. Hieraus ergibt sich die Frage nach dem Mechanismus der Pol-Inkorporation ins Viruspartikel. Grundsätzlich gäbe es mehrere Möglichkeiten, zu denen Protein-Protein-Interaktionen zwischen Pol und Gag oder Protein-Nukleinsäure-Interaktionen von Pol mit der genomischen RNA, die wiederum mit Gag-Proteinen wechselwirkt, gehören. Als eine dritte Variante käme noch die Kombination der beiden vorherigen Möglichkeiten in Frage. Bei Hepadnaviren, bei denen Pol ebenfalls unabhängig vom Kapsidprotein exprimiert wird, ist die Anwesenheit von Pol Voraussetzung für die Verpackung von prägenomischer RNA (Bartenschlager et al., 1990). Dies ist jedoch bei FV nicht der Fall (Baldwin & Linial, 1998).

In Versuchen mit Gag-exprimierenden FV-Vektoren, die keine RNA ins Viruspartikel inkorporieren, wurde keine Gag-Prozessierung im Partikel beobachtet, obwohl Pol mit funktionell aktiver Protease koexprimiert wurde (Heinkelein et al., 1998 & 2000a). Dies läßt den Schluß zu, daß bei FV die RNA für die Funktion von Pol notwendig ist. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die Beteiligung der RNA an der Pol-Inkorporation ins Viruspartikel. Andere Erklärungen wären, daß die RNA wichtig für die Funktionalität der Protease oder für eine „spaltbare“ Struktur von Gag ist.

Um dies zu untersuchen, wurde mit einem Vektorsystem gearbeitet, das auf Kotransfektion von vier Plasmiden beruht (Vier-Plasmidsystem; Heinkelein et al., 2002a). Verwendet wurde jeweils ein Plasmid für die Expression von Gag (pCIgag2; Heinkelein et al., 2002a),

Pol (pCpol2; Heinkelein et al., 1998) und Env (pCenv1; Fischer et al., 1998) und ein viertes zur Transkription eines Vektorgenoms (pMD4; Heinkelein et al., 2002b) (Abb. 13). Vorteil dieses Systems ist, daß die von den Verpackungskonstrukten (Gag, Pol, Env) gebildete mRNA nicht in relevanten Mengen ins Viruspartikel inkorporiert wird. Somit erlaubt das Vier-Plasmidsystem die Modifikation einer der Variablen Gag, Pol oder Vektor-RNA unabhängig von den anderen beiden.

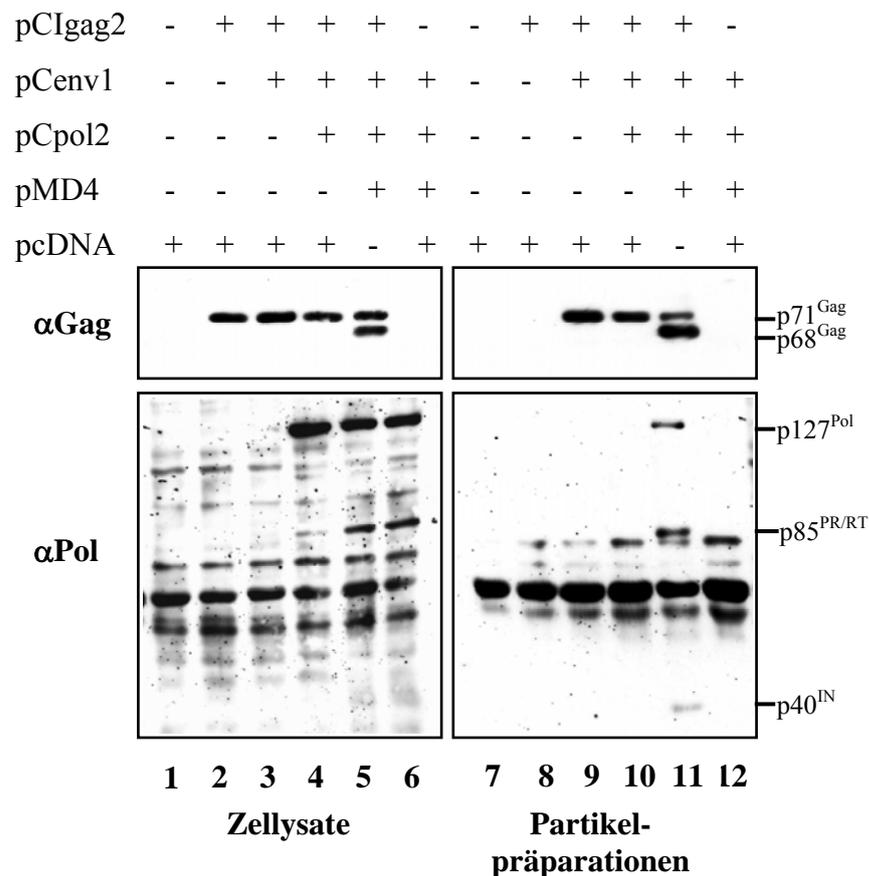
In den Expressionsplasmiden stehen die offenen Leseraster der PFV-Proteine unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven IE (*immediate early gene*) Promotor und Enhancer des humanen Cytomegalievirus (CMV). Das verpackbare Vektorgenom wird von pMD4 transkribiert. Dieses Plasmid enthält hinter dem CMV Enhancer/Promotor die cis-aktiven Sequenzen CASI und CASII, die für einen effizienten Vektortransfer erforderlich sind (Heinkelein et al., 1998). Anschließend folgt der U3-Promotor des *spleen focus forming virus* (SFFV), ein *enhanced green fluorescent protein*-Gen (*eGFP*) und die 3' LTR von PFV, in der die U3-Region bis auf für die Infektiosität wichtigen Sequenzen deletiert wurde (Abb. 13). Zusätzlich wurde das Plasmid pcDNA von Invitrogen als Kontrolle verwendet; hierbei handelt es sich um den Ausgangsvektor für die meisten in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte.



**Abb. 13: Expressionsplasmide und Vektor**

(CMV) Cytomegalievirus Promotor/Enhancer; ( $\Delta env$ ) teilweise deletierter env Leserahmen; (pA+) Polyadenylierungssignal; (SD) Spleißdonor; (SA) Spleißakzeptor; ( $\Delta pol$ ) teilweise deletierter pol Leserahmen; (CASI/CASII) cis-aktive Sequenz I/II; (SFFV U3) U3-Region des spleen focus forming virus; (eGFP) enhanced green fluorescent protein

Für die Analyse des Mechanismus der Pol-Inkorporation ins foamyvirale Partikel wurden Zellen mit unterschiedlichen Kombinationen der vier Plasmide transfiziert, induziert und 48 h nach Transfektion folgte die Präparation von Zellysaten und Viruspartikeln (siehe 2.3.3.1 & 2.3.4.3). Die zelluläre Expression der eingesetzten Plasmide wurde parallel zur Proteinanalyse der Partikelpräparationen mittels Western Blot überprüft (siehe 2.3.3.3). Das Ergebnis ist exemplarisch für einen Versuch in Abb. 14 dargestellt. Die foamyviralen Vorläuferproteine konnten in allen Zellysaten der Ansätze, in denen sie kotransfiziert wurden, gezeigt werden (Abb. 14: Gag Spuren 2-5; Pol Spuren 4-6). Trotz aktiver Protease, indiziert durch den Nachweis der RT-Untereinheit, war keine Spaltung von Gag ohne Kotransfektion von pMD4 zu detektieren (Abb. 14: Spur 4). Die Proteolyse von Pol war dagegen auch in Transfektionen ohne pCIgag2 gut nachweisbar, jedoch nur schwach in Transfektionen ohne pMD4 (Abb. 14: Vergleich der Spuren 5 & 6 mit 4).



**Abb. 14: Proteinanalyse der Zellysate und Partikelpräparationen**

*Gag-Proteine wurden mit dem primären monoklonalen Antikörper SGG1 und Pol-Proteine mit den primären monoklonalen Antikörpern 15E10 und 3E11 detektiert. Als sekundärer Antikörper diente in beiden Fällen αMaus HRP konjugierter Antikörper aus der Ziege.*

Partikelassoziiertes Pol-Protein konnte nur im Ansatz der Kotransfektion von pCpol2, pCIgag2, pCenv1 und pMD4 gezeigt werden (Abb. 14: Spur 11). Fehlte pMD4 und somit eine verpackbare RNA, war kein partikelassoziiertes Pol nachweisbar (Abb. 14: Spur 10).

Nur bei Kotransfektion von pCenv1 ließen sich der Export von Gag-Partikeln zeigen (Abb. 14: Vergleich der Spuren 8 mit 9-11) und im Transfektionsansatz ohne pCIgag2 (Abb. 14: Spur 12) war eine Detektion des Pol-Proteins nicht möglich. Diese Kontrollen schließen eine unspezifische Freisetzung von Proteinen aus. Eine weitere Proteinanalyse der Partikelpräparationen nach Auftrennung in einem Sucrose-Gradienten bestätigte, daß der Pol-Nachweis partikelspezifisch war (Heinkelein et al., 2002b).

Diese Daten zeigen, daß die Koexpression von viraler RNA essentiell für die Funktion der Protease im viralen Partikel ist und bestätigen, daß es nur bei Verpackung von Virus-RNA zu einer Inkorporation des Pol-Proteins in das Viruspartikel kommt.

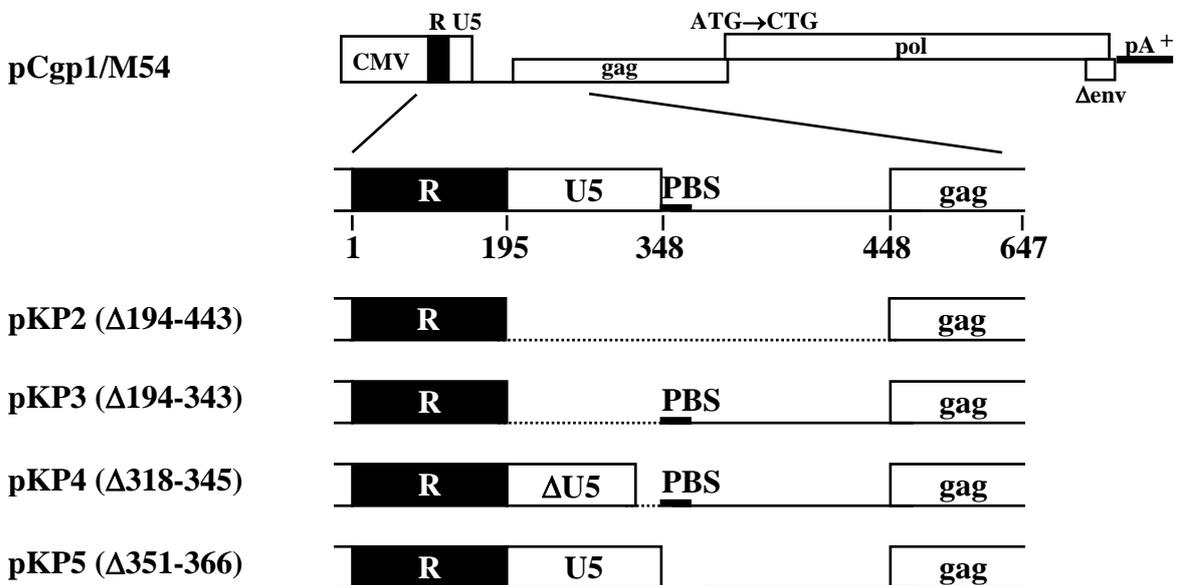
### ***3.2 Untersuchung der für die Pol-Inkorporation notwendigen RNA-Sequenzbereiche***

Im ersten Teil dieser Arbeit, der Untersuchung des Mechanismus der Inkorporation des Pol-Proteins ins foamyvirale Partikel, wurde gezeigt, daß für die Inkorporation von Pol die Verpackung von genomischer RNA essentiell ist (3.1; Heinkelein et al., 2002b). Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von Sequenzen auf Ebene der RNA, die notwendig für die Verpackung von Pol ins Partikel sind (PES = *Pol encapsidation sequences*). Neben den LTRs und benachbarten Sequenzen, die für die reverse Transkription und die Integration wichtig sind, konnten empirisch zwei cis-aktive Sequenzen (CASI & II) identifiziert werden, die ausreichend für effizienten Vektortransfer und damit auch für die Partikelbildung und -freisetzung sind (Erlwein et al., 1998; Heinkelein et al., 1998; 2000a; 2002a; Wu et al., 1998). Weiterhin wurde gezeigt, daß allein die cis-aktiven Sequenzen für die Verpackung von Virus-RNA ins Partikel genügen und bei Kotransfektion von Pol prozessiertes Gag im Partikel nachweisbar war (Heinkelein et al., 2000a & 2002a). Somit müssen die RNA-Elemente, die für die Verpackung von Pol oder RNA essentiell sind, in CASI und/oder CASII liegen. Zur näheren Definition der PES wurden deshalb Deletionen in diese cis-aktiven Sequenzen eingeführt und die Proteinzusammensetzung und der RNA-Gehalt von Viruspartikeln analysiert.

### 3.2.1 Deletionsanalyse der cis-aktiven Sequenz I (CASI)

Die CASI umfaßt ca. 650 nt beginnend mit dem Transkriptionsstart. In dieser Sequenz sind die R- und die U5-Region, die PBS, der Leader und ca. 200 nt des *gag*-Leserahmens enthalten (Heinkelein et al., 1998). Um für die Verpackung von Pol essentielle Sequenzen zu identifizieren, wurden verschiedene Sequenzbereiche der CASI deletiert. Anschließend wurde untersucht, ob der Nachweis des Pol-Proteins in Viruspartikeln, die in Anwesenheit dieser Deletionskonstrukte gebildet wurden, möglich ist. Um auszuschließen, daß ein negativer Pol-Nachweis aus fehlender RNA-Inkorporation resultierte, wurde parallel zu diesem der RNA-Gehalt der foamyviralen Partikel analysiert.

Als Ausgangskonstrukt für die Deletionsmutanten wurde das Plasmid pCgp1/M54 gewählt. Dies ist ein Expressionsvektor mit humanen Cytomegalievirus (CMV) Enhancer- und Promotorsequenzen, denen die Sequenzen der R- und U5-Region, des Leaders, die Gene *gag* und *pol* und anschließend ein Polyadenylierungssignal folgen (Abb. 15) (Fischer et al., 1998). Das *pol*-Startcodon ist zu CTG mutiert und somit nicht funktionell (Enssle et al., 1996). Das Plasmid enthält CASI und CASII und exprimiert eine RNA, die ins Viruspartikel verpackt wird und ausreichend für die Pol-Inkorporation ist. Gleichzeitig dient es als Expressionsplasmid für Gag.



**Abb. 15: Schematische Darstellung der CASI-Deletionskonstrukte**

Dargestellt ist der Ausgangsvektor pCgp1/M54 und die darin eingeführten Deletionen in CASI. Die angegebenen Zahlen beziehen sich auf die Nukleotide nach Transkriptionsstart von PFV. (CMV) Cytomegalievirus Promotor/Enhancer; (PBS) Primerbindungsstelle; (Δ*env*) teilweise deletierter *env* Leserahmen; (pA<sup>+</sup>) Polyadenylierungssignal

Die Größe der analysierten Deletionen umfaßt die gesamte Sequenz zwischen der R-Region und dem Start des *gag*-Gens (pKP2). In pKP3 ist die U5-Region deletiert, in pKP4 sind 28 bp direkt 5' der PBS und in pKP5 die PBS deletiert (Abb. 15). Die Klonierungsstrategien der pKP-Konstrukte sind im Anhang beschrieben.

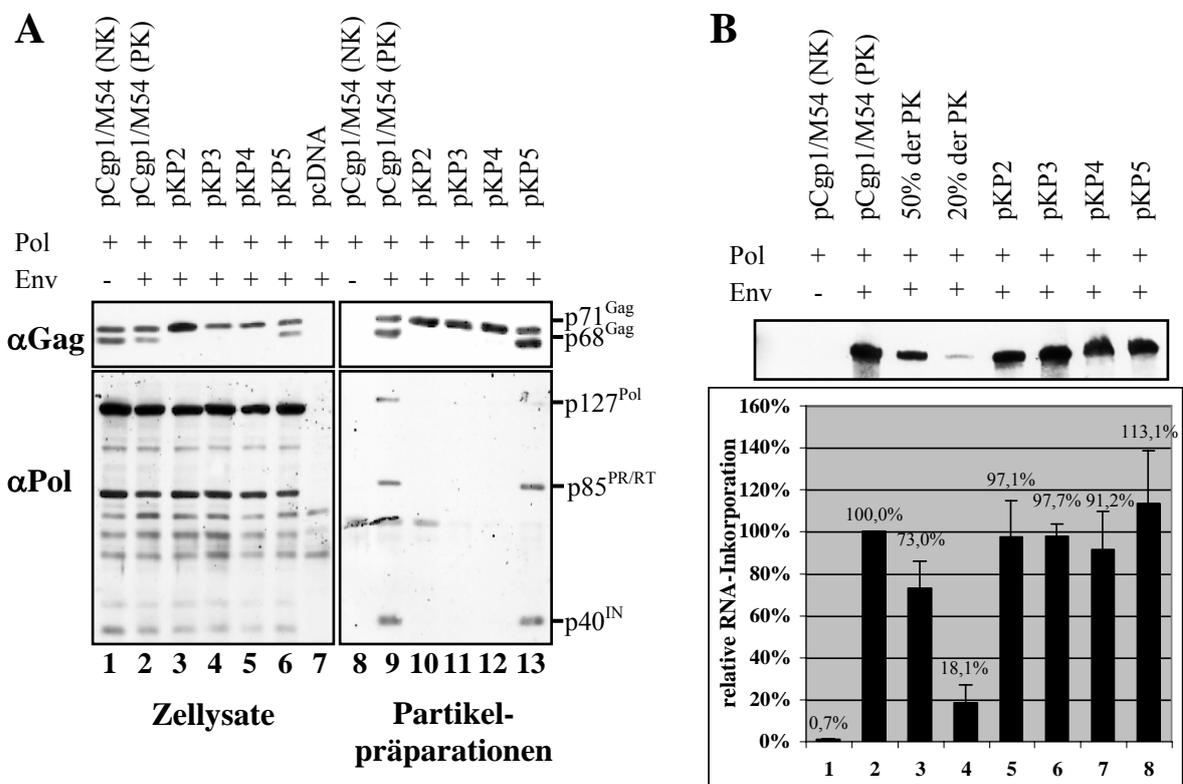
Eine Analyse der Pol-Verpackung ins Viruspartikel setzt die Expression von Pol und einer verpackbaren RNA voraus. Darüber hinaus werden das Strukturprotein Gag und das Glykoprotein Env für die Bildung und Freisetzung von Viruspartikeln benötigt. Zur Analyse der Deletionsmutanten wurden 293T Zellen mit Expressionsplasmiden für Env (pCenv1), Pol (pCpol2) und einem der zu untersuchenden Deletionskonstrukte (pKP2-pKP5) bzw. dem Ausgangsvektor pCgp1/M54 kotransfiziert. Die Transfektionsansätze wurden nach 24 h mit Natriumbutyrat induziert und die Herstellung von Zellysaten und die Präparation von Viruspartikeln aus zellfreiem Überstand der transfizierten Zellkulturen erfolgte 48 h nach Transfektion (siehe 2.3.3.1 & 2.3.4.3). Die zelluläre Expression von *gag* und *pol* wurde, ebenso wie die Partikelpräparationen, mittels Western Blot (siehe 2.3.3.3) untersucht und der RNA-Gehalt der Partikel mit Hilfe des RNase Protection Assays (RPA) (siehe 2.3.5.2) bestimmt.

Der Transfektionsansatz mit pCgp1/M54 diente als Positivkontrolle (PK). Da für die Freisetzung foamyviraler Partikel das Glykoprotein Env erforderlich ist (Baldwin & Linial, 1998; Fischer et al., 1998; Pietschmann et al., 1999), diente ein Transfektionsansatz mit pCgp1/M54 in dem pCenv1 durch pcDNA ersetzt wurde als Negativkontrolle (NK) für die Analyse der Viruspartikel. Als weitere Kontrolle erfolgte eine Transfektion nur mit pcDNA, von der ausschließlich Zellysate analysiert wurden.

Zur Absicherung der Ergebnisse wurden die Versuche mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt und mit mindestens zwei unabhängig voneinander hergestellten Plasmidpräparationen durchgeführt.

Das Ergebnis einer Proteinanalyse ist exemplarisch für einen Versuch in Abb. 16 dargestellt. Die Analyse der Zellysate diente der Überprüfung der Expression der viralen Proteine. Alle pKP-Konstrukte waren in der Lage, Gag zu exprimieren und bildeten das Strukturprotein in annähernd gleichen Mengen (Abb. 16A: Spuren 1-6). Die proteolytische Spaltung von Gag durch die virale Protease war nur in Lysaten von Zellen zu erkennen, die mit pCgp1/M54 (Abb. 16A: Spuren 1 & 2) oder pKP5 transfiziert worden waren (Abb. 16A: Spur 6).

Die Analyse der Viruspartikel hinsichtlich des Gag-Proteins zeigte ein ähnliches Bild: Nur bei Transfektion von pCgp1/M54 oder pKP5 mit pCpol2 und pCenv1 konnte die verkürzte Form von Gag nachgewiesen werden (Abb. 16A: Spuren 9 & 13). Das Pol-Protein ließ sich ebenfalls nur in Viruspartikeln dieser Transfektionsansätze detektieren, d. h. nur wenn Pol im Partikel nachweisbar war, kam es zur proteolytischen Spaltung von Gag. Der Vergleich der Spuren 8 und 9 zeigt, daß ohne Kotransfektion des Env-Expressionsplasmids weder partikelassoziiertes Gag- noch Pol-Protein detektiert werden konnte. Dies macht deutlich, daß keine Freisetzung von Gag oder Pol unabhängig von der Bildung foamyviraler Partikel erfolgte, und der Nachweis der Proteine in den Spuren 9-13 (Abb. 16A) partikelspezifisch war.



**Abb. 16: Analyse der Zellysate und Viruspartikel der CASI-Deletionskonstrukte**

**(A) Proteinanalyse der Zellysate und Viruspartikel der CASI-Deletionsmutanten**

Gag-Proteine wurden mit dem primären monoklonalen Antikörper SGG1 und Pol-Proteine mit den primären monoklonalen Antikörpern 15E10 und 3E11 detektiert. Als sekundärer Antikörper diente in beiden Fällen  $\alpha$ Maus HRP konjugierter Antikörper aus der Ziege.

**(B) Analyse des partikulären Virus-RNA-Gehaltes der CASI-Deletionsmutanten**

Die PK wurde gleich 100% gesetzt und eine Sondenkontrolle lieferte den Hintergrundwert. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Das Beispiel der RPA stammt aus dem gleichen Versuch wie der gezeigte Western Blot der Proteinanalyse.

Um auszuschließen, daß mangelnde RNA-Verpackung die Ursache für den negativen Nachweis von Pol in den Partikeln der Konstrukte pKP2, pKP3 und pKP4 war, wurde der RNA-Gehalt der Viruspartikel analysiert. Hierfür wurde eine Fraktion des Überstandes genutzt, von dem in der Proteinanalyse gezeigt wurde, daß er ungefähr gleiche Mengen an Protein und demzufolge Viruspartikeln enthält. Da die Gag-mRNA und die Virus-RNA in diesem Versuchsaufbau miteinander identisch waren, kann aus der gleichmäßigen Expression von Gag auf die Bildung von gleichen Mengen an Virus-RNA geschlossen werden. Für den RNA-Nachweis wurde eine *gag*-spezifische Sonde verwendet, deren Ausgangskonstrukt das mit *XbaI* linearisierte Plasmid pSPHFV3 (Heinkelein et al., 2002a) war. Die hiervon transkribierte antisense Sonde ist 349 nt lang und bindet an ein 334 nt Fragment der genomischen RNA im Bereich des *gag*-Gens von PFV.

Der Versuch wurde dreimal wiederholt, die Bandenintensität mit Hilfe des ImageQuant Programms von Molecular Dynamics quantifiziert und in Microsoft Excel ausgewertet (Abb. 16B). Die Bandenstärke der PK wurde gleich 100% partikelassoziierter RNA gesetzt und der RNA-Gehalt der anderen Partikel relativ dazu bestimmt. Ein Kontrollansatz, in dem keine RNA-Probe, sondern ausschließlich Sonde eingesetzt wurde, diente der Überprüfung des Versuchablaufs und der Bestimmung der Hintergrundwerte.

Wie Abb. 16B zu entnehmen ist, zeigten alle vier Deletionskonstrukte (pKP2-pKP5) und die PK (pCgp1/M54) annähernd gleiche Mengen Virus-RNA im Partikel (Abb. 16B: Spuren 2 & 5-8). In der NK war keine partikelassozierte RNA nachweisbar, da ohne das Glykoprotein keine extrazellulären Partikel gebildet werden. Dies zeigt, daß es nicht zur Freisetzung viraler RNA ohne die Bildung von Viruspartikeln kam. Um sicherzustellen, daß die verwendeten RNA-Mengen sich nicht im oberen Sättigungsbereich des RNase Protection Assays befanden, wurden in jedem Versuch Verdünnungen der PK eingesetzt. Diese Verdünnungen resultierten in einem reduzierten Nachweis von RNA (Abb. 16B: Spuren 3 & 4) und zeigten dadurch, daß sich Unterschiede in den Mengen eingesetzter RNA auch in den ermittelten Bandenintensitäten widerspiegelten.

### **Zusammenfassung der Analyse der CASI**

Die Analyse der CASI-Deletionen zeigte, daß keine der Deletionen einen Einfluß auf die RNA-Verpackung in das Viruspartikel hatte. In der Proteinanalyse konnte jedoch nur in den Präparationen der Viruspartikel der Transfektionsansätze der PK und mit pKP5 (Deletion der PBS) partikelassoziertes Pol detektiert werden. Dagegen war im

Transfektionsansatz mit pKP4, der Deletion von 28 nt direkt 5' der PBS, ebenso wie in den umfassenderen Deletionen in pKP2 und pKP3, kein partikelassoziiertes Pol-Protein nachweisbar.

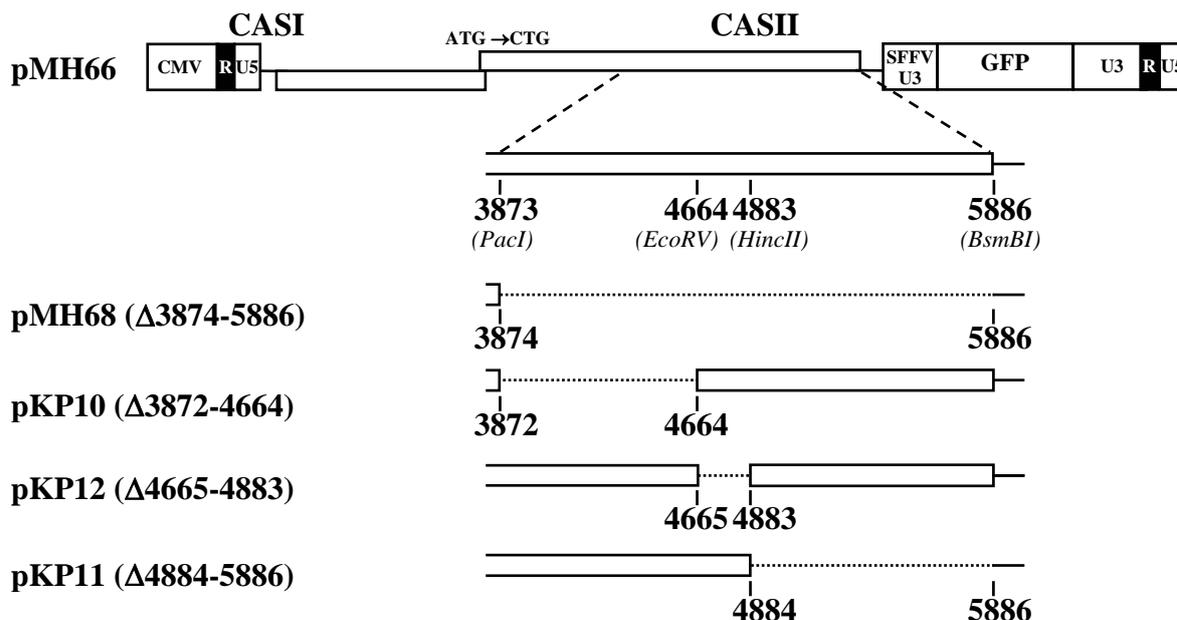
## **3.2.2 Deletionsanalyse der cis-aktiven Sequenz II (CASII)**

### **3.2.2.1 Deletionsanalyse der CASII**

#### **3.2.2.1.1 Deletionsanalyse der CASII im Ausgangsvektor pMH66**

Verglichen mit der CASI ist die CASII wesentlich ausgedehnter. Empirisch konnten ca. 2 kb im 3' Bereich des *pol*-Gens als notwendig für effizienten FV-Vektortransfer identifiziert werden (Heinkelein et al., 1998). Um für die Pol-Verpackung essentielle Sequenzen (PES) zu identifizieren, wurden basierend auf veröffentlichten Daten (Heinkelein et al., 1998) unterschiedliche Bereiche der CASII deletiert. Die Daten zeigen, daß die Deletion eines internen ca. 0,2 kb großen Fragments effizienten Vektortransfer erlaubt, während Deletionen des 5' oder des 3' Bereiches der CASII keinen Vektortransfer mehr ermöglichen (Heinkelein et al., 1998). Um zu analysieren, ob die fehlende Inkorporation von Pol oder von RNA die Ursache für den mangelnden Vektortransfer ist, wurden entsprechende Deletionen anhand vorhandener Restriktionsenzymststellen in das Plasmid pMH66 eingeführt. Dieses Ausgangskonstrukt enthält einen CMV Enhancer/Promotor gefolgt von der 5' UTR, *gag* und *pol*. Anschließend folgen die Sequenzen eines SFFV U3-Promotors, des Gens des *green fluorescent protein* (GFP) und die 3' LTR (Abb. 17). Dieses Plasmid enthält CASI und CASII, exprimiert also eine verpackbare RNA und dient gleichzeitig als Expressionsplasmid für Gag. Da das Startcodon des *pol*-Gens zu CTG mutiert ist, sollte Pol nicht exprimiert werden.

Ein Konstrukt, in dem die gesamte CASII im Ausgangsvektor pMH66 deletiert ist, existierte bereits (pMH68) und wurde im folgenden verwendet. Diese Deletion entspricht einer Deletion der Nukleotide (nt) 3874-5886 der (prä)genomischen RNA von PFV. Weiter wurde der 5' Bereich der CASII um ca. 800 bp verkürzt (nt 3872-4664; pKP10), eine ca. 200 bp umfassende interne Deletion (nt 4665-4883; pKP12) und eine ca. 1 kb große Deletion im 3' Bereich der CASII (nt 4884-5886; pKP11) in pMH66 eingeführt (Abb. 17). Die Klonierungsstrategien der pKP-Konstrukte sind im Anhang beschrieben. Alle im folgenden angegebenen Nukleotidzahlen beziehen sich auf die (prä)genomische RNA von PFV.



**Abb. 17: Schematische Darstellung der CASII-Deletionen im Ausgangsvektor pMH66**

Dargestellt ist der Ausgangsvektor pMH66 und die darin eingeführten Deletionen in CASII. Die angegebenen Zahlen beziehen sich auf die Nukleotide nach Transkriptionsstart von PFV. (CMV) Cytomegalievirus Promotor/Enhancer; (SFFV U3) U3-Region des spleen focus forming virus; (GFP) green fluorescent protein

Neben dem Strukturprotein Gag und einer verpackbaren Virus-RNA ist die Expression von Env für die Freisetzung von Viruspartikeln und Pol für die Analyse der Pol-Inkorporation in die Partikel essentiell (Baldwin & Linial, 1998; Fischer et al., 1998; Pietschmann et al., 1999). Daher wurden Expressionsplasmide für Env (pCenv1) und Pol (pCpol2) mit einer der zu analysierenden Deletionsmutanten (pMH68; pKP10-pKP12) bzw. dem Ausgangsvektor pMH66 in 293T-Zellen kotransfiziert. Die Induktion erfolgte nach 24 h, weitere 24 h später wurden Viruspartikel aus zellfreiem Überstand präpariert und Zellysate gewonnen (siehe 2.3.4.3 & 2.3.3.1). Weiterhin wurde zellfreier Überstand auf HT1080-Zellen übertragen und die Transduktionseffizienz der gebildeten Viruspartikel nach drei bis vier Tagen im FACS gemessen (siehe 2.3.4.2). Die Proteinexpression wurde in den Zellysaten analysiert und untersucht, ob partikelassoziiertes Pol-Protein mittels Western Blot (siehe 2.3.3.3) nachweisbar war. Parallel dazu wurde der RNA-Gehalt der Partikel mit Hilfe des RPA (siehe 2.3.5.2) ermittelt, um zu untersuchen, ob die eingeführten Deletionen einen Einfluß auf die Partikelinkorporation der Virus-RNA haben.

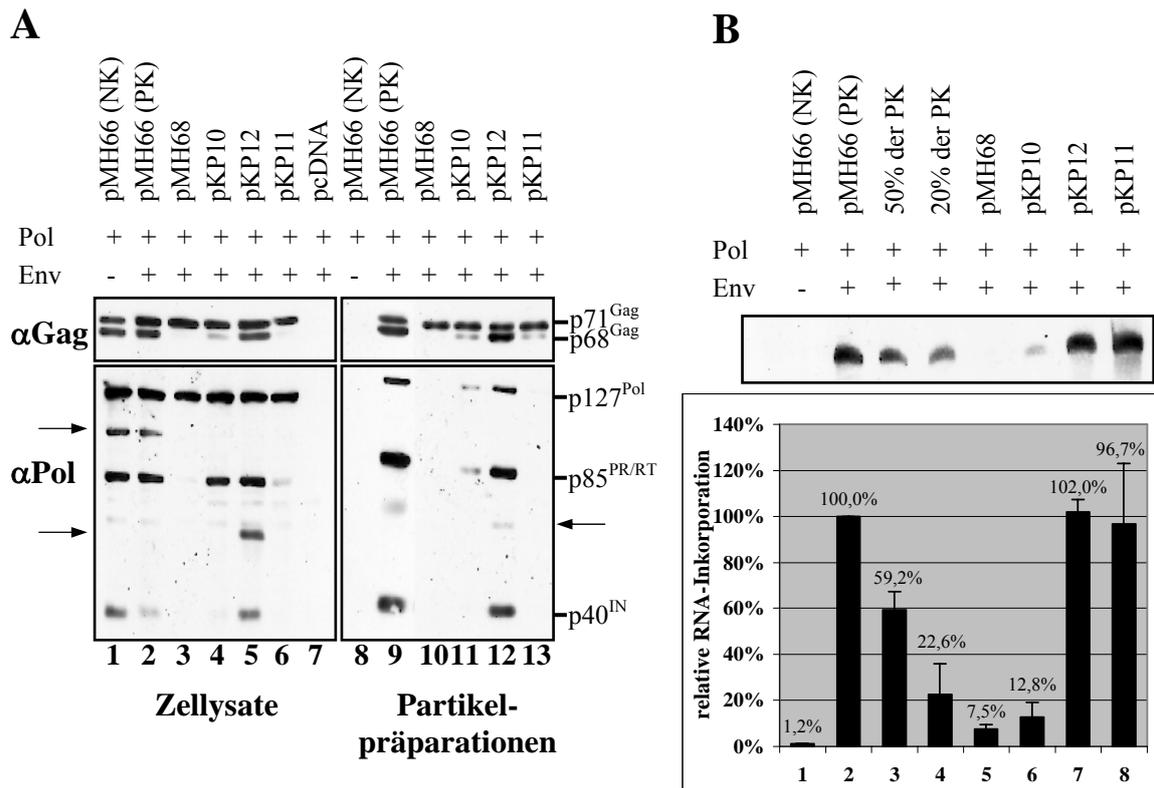
Der Transfektionsansatz mit pMH66 diente als Positivkontrolle (PK) und ein Ansatz mit pMH66, in dem pCenv1 durch pcDNA ersetzt wurde, als Negativkontrolle (NK) für die

Untersuchung der Viruspartikel bzw. des Überstandes. Zusätzlich erfolgte als weitere Kontrolle eine Transfektion nur mit pcDNA, von der die Zellysate und der Überstand analysiert wurden. Die Versuche wurden mit mindestens zwei voneinander unabhängigen Plasmidpräparationen durchgeführt und mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt.

In Abb. 18A ist das Ergebnis der Proteinanalyse exemplarisch für einen Versuch dargestellt. Die Analyse der zellulären Expression der Proteine Gag und Pol zeigte, daß diese gleichmäßig war. Dies machte deutlich, daß die eingeführten Deletionen keinen Einfluß auf die Gag-Expression hatten und da die verpackbare Virus-RNA gleichzeitig die mRNA von Gag ist, kann ebenfalls auf die Produktion gleicher Mengen Virus-RNA geschlossen werden. Proteolytische Spaltung von Gag wurde hauptsächlich in den Spuren 1, 2 und 5 beobachtet (Abb. 18A). In diesen Spuren waren ebenfalls die Untereinheiten von Pol zu detektieren. Es handelte sich hierbei um Zellysate aus Zellen, die mit pMH66, pKP10 oder pKP12 und pCpol2 kotransfiziert wurden.

Der Immunoblot der Partikelpräparation mit  $\alpha$ Gag-Antikörpern zeigte ähnliche Mengen an exprimierten Gag-Proteinen und somit etwa gleiche Mengen an präparierten Viruspartikeln. Die NK (Abb. 18A: Spur 8) wies weder Gag- noch Pol-Banden auf. Dies schließt eine partikelunspezifische Freisetzung von Pol- und Gag-Proteinen aus den transfizierten Zellen aus. Das Pol-Protein war in den Partikelpräparationen aus Transfektionen der PK und pKP12 deutlich und im Ansatz mit pKP10 schwach nachweisbar (Abb. 18A: Spuren 9, 11, 12).

Neben den Banden des Pol-Vorläuferproteins und seiner Untereinheiten wurden, sowohl im Western Blot der Zellysate, als auch sehr schwach in dem der Partikelpräparation, weitere Banden mit den  $\alpha$ Pol-Antikörpern detektiert (Abb. 18A: Spuren 1, 2, 5 & 12, gekennzeichnet mit  $\rightarrow$ ). Ursache für diese zusätzlichen Banden könnte die Nutzung eines zweiten Startcodons im durch die ATG zu CTG Mutation inaktivierten *pol*-Leserahmen des pMH66 Konstruktes sein. Die von diesem zweiten Startcodon aus exprimierten aberranten Pol-Proteine hätten, bedingt durch die verschiedenen Deletionen, unterschiedliche Längen. Dies ist im Immunoblot der Zellysate deutlich zu erkennen (Abb. 18A: Vergleich der Spuren 1 & 2 mit 5).



**Abb. 18: Analyse der Zellysate und Viruspartikel der CASII-Deletionen in pMH66**

**(A) Proteinanalyse der Zellysate und Viruspartikel der CASII-Deletionen in pMH66**

Gag-Proteine wurden mit dem primären monoklonalen Antikörper SGG1 und Pol-Proteine mit den primären monoklonalen Antikörpern 15E10 und 3E11 detektiert. Als sekundärer Antikörper diente in beiden Fällen  $\alpha$ Maus HRP konjugierter Antikörper aus der Ziege. (→) aberrante Pol-Proteinbanden

**(B) Analyse des partikulären Virus-RNA-Gehaltes der CASII-Deletionen in pMH66**

Die PK wurde gleich 100% gesetzt und eine Sondenkontrolle lieferte den Hintergrundwert. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

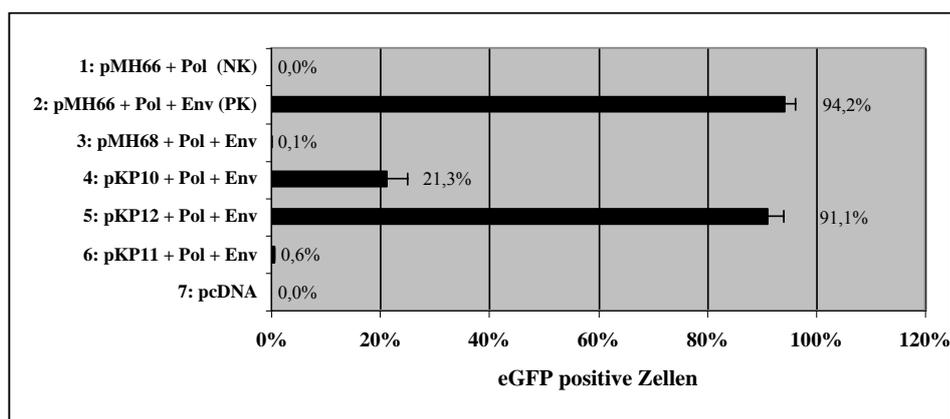
Anschließend wurde der RNA-Gehalt der Viruspartikel mittels RPA analysiert, um einen Einfluß der RNA-Inkorporation auf die Pol-Verpackung auszuschließen. Hierfür wurden Partikel aus zellfreiem Überstand untersucht, für den in der Proteinanalyse gezeigt wurde, daß er ungefähr gleiche Mengen an Gag-Protein und demzufolge Viruspartikeln enthält.

Als Ausgangskonstrukt für die RNA-Sonde diente, wie im vorherigen Versuch, das mit *Xba*I linearisierte Plasmid pSPHFV3 (siehe 3.2.2). Die Bandenintensitäten dreier Versuche wurden in ImageQuant von Molecular Dynamics quantifiziert und in Microsoft Excel ausgewertet. Die Werte der PK wurden gleich 100% gesetzt und die Menge der inkorporierten Virus-RNA der Proben in Bezug darauf bestimmt. Den Hintergrundwert lieferte ein Ansatz, in dem nur Sonde eingesetzt wurde. Wie zuvor wurden zwei Verdünnungen der

Positivkontrolle eingesetzt, um die Qualität der Quantifizierung abschätzen zu können. Bei Einsatz von 50% bzw. 20% der PK wurden Bandenintensitäten von 59% und 23% detektiert (Abb 18B: Ansätze 3 & 4) und zeigten dadurch eine deutliche Korrelation zwischen eingesetzten RNA-Mengen und ermittelten Bandenintensitäten. Die Mengen der im Viruspartikel inkorporierten RNA aus den Transfektionen mit pKP12 und pKP11 waren annähernd gleich und entsprachen denen der PK (Abb. 18B: Ansätze 7 & 8). Die Viruspartikel der Konstrukte pMH68 und pKP10 zeigten dagegen eine starke Reduktion der Menge inkorporierter RNA auf etwa 10% der PK (Abb. 18B: Ansätze 5 & 6).

Um die Infektiosität der in den verschiedenen Transfektionsansätzen gebildeten Partikel zu überprüfen und zu vergleichen, wurden die Transduktionsraten der einzelnen Ansätze im FACS ermittelt. Nach Transfektion und Induktion erfolgte am dritten Tag der Überstand-transfer. Hierfür wurden 30 µl zellfreier Überstand der Zellkulturen auf zuvor ausgesäte HT1080-Zellen übertragen und drei bis vier Tage danach mittels FACS die Transduktionseffizienz gemessen (siehe 2.3.4.2).

Die Mittelwerte aus drei Versuchen zeigen, daß die Kotransfektion von pKP12 eine ähnliche Transduktionseffizienz erreichte wie die PK (Abb. 19: Ansätze 5 & 2), während pMH68 und pKP11 keinen infektiösen Überstand produzierten (Abb. 19: Ansätze 3 & 6). Dagegen weist der Überstand des Ansatzes mit pKP10 eine Transduktionseffizienz von ca. 20% auf, dies entspricht ungefähr einer fünffachen Reduktion im Vergleich zur PK (Abb. 19: Ansatz 4).



**Abb. 19: Analyse der Transduktionseffizienzen der CASII-Deletionen in pMH66**

Die Graphik zeigt die Mittelwerte des Übertrags von 30 µl zellfreiem Überstand aus 3 Versuchen. Dargestellt sind absolute Werte (Anteil GFP positiver Zellen). Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

### **Zusammenfassung der Analyse der CASII-Deletionskonstrukte in pMH66**

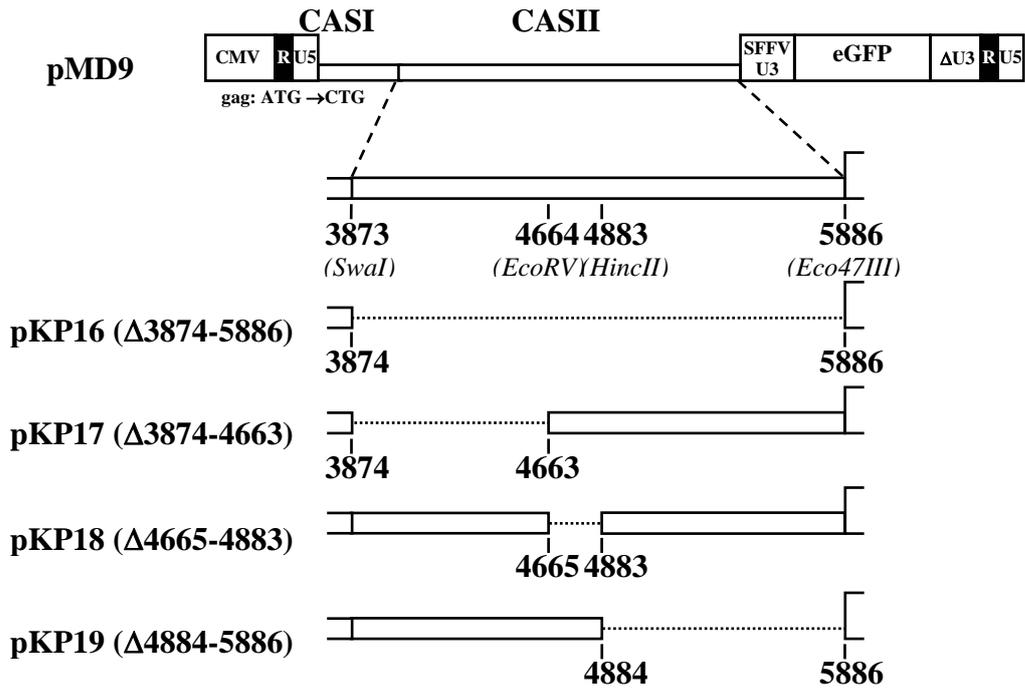
Die Analyse des partikulären Virus-RNA-Gehalts zeigte, daß bei Deletion des 5' Bereichs der CASII (nt 3872-4664; pMH68 & pKP10) nur deutlich reduzierte Mengen partikelassoziiierter RNA (etwa 10% der PK) detektiert werden konnten. Deletionen des 3' (nt 4884-5886; pKP11) bzw. des internen Bereichs (nt 4665-4883; pKP12) der CASII hatten dagegen keinen oder nur einen geringen Einfluß auf die RNA-Verpackung.

Bei Deletion der gesamten CASII (pMH66) waren nur Spuren von RNA und kein Pol im Viruspartikel nachweisbar und der Überstand war erwartungsgemäß nicht infektiös. Die Verkürzung des 5' Bereichs der CASII um ca. 0,8 kb (pKP10) führte zu stark reduzierter Detektion von partikelassoziiierter RNA. Im Gegensatz zur Gesamtdelation der CASII waren für dieses Konstrukt jedoch Spuren von Pol im Viruspartikel nachweisbar und der Überstand ergab eine Transduktionsrate von ca. 20% der PK. Die etwa 200 nt umfassende interne Deletion (pKP12) der CASII zeigte dagegen weder einen Einfluß auf RNA- oder Pol-Verpackung noch auf die Transduktionseffizienz der Partikel. Im Fall der Deletion des 3' Bereichs der CASII konnten trotz „wildtypischer“ RNA-Inkorporation kein partikelassoziiertes Pol-Protein und keine infektiösen Partikel nachgewiesen werden.

Sowohl in der Proteinanalyse der Zellysate als auch der Partikelpräparationen wurden zusätzlich Banden mittels der  $\alpha$ Pol-Antikörper detektiert. Hierbei handelte es sich vermutlich um aberrante Pol-Proteine und da diese teilweise auch in den Viruspartikelpräparationen nachweisbar waren, könnten sie Einfluß auf die Pol-Inkorporation haben. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde die gesamte Serie der Deletionen in einen anderen Vektor übertragen und dort analysiert (siehe 3.2.2.1.2).

#### **3.2.2.1.2 Deletionsanalyse der CASII im Ausgangsvektor pMD9**

Der Ausgangsvektor pMH66 enthält die gesamte *pol*-Sequenz und von dieser wurden unter Nutzung eines zweiten Startcodons im *pol*-Leserahmen verkürzte *pol*-Produkte gebildet. Aus diesem Grund wurden die in 3.2.2.1.1 untersuchten Deletionen (pMH68, pKP10, pKP12, pKP11) in einen anderen Vektorhintergrund überführt (Abb. 20). Als Ausgangsvektor diente das Konstrukt pMD9, das dem in 3.1 beschriebenen pMD4 entspricht. Einziger Unterschied ist eine Mutation des in CASI enthaltenen *gag*-Startcodon zu CTG, gefolgt von einem Stopcodon (Abb. 20). Der Ausgangsvektor enthält, abgesehen von CASII, keine Sequenzen des *pol*-Leserahmens und exprimiert daher keine aberranten Pol-Proteine. Die Klonierungsstrategien der pKP-Konstrukte sind im Anhang beschrieben.



**Abb. 20: Schematische Darstellung der CASII-Deletionen im Ausgangsvektor pMD9**

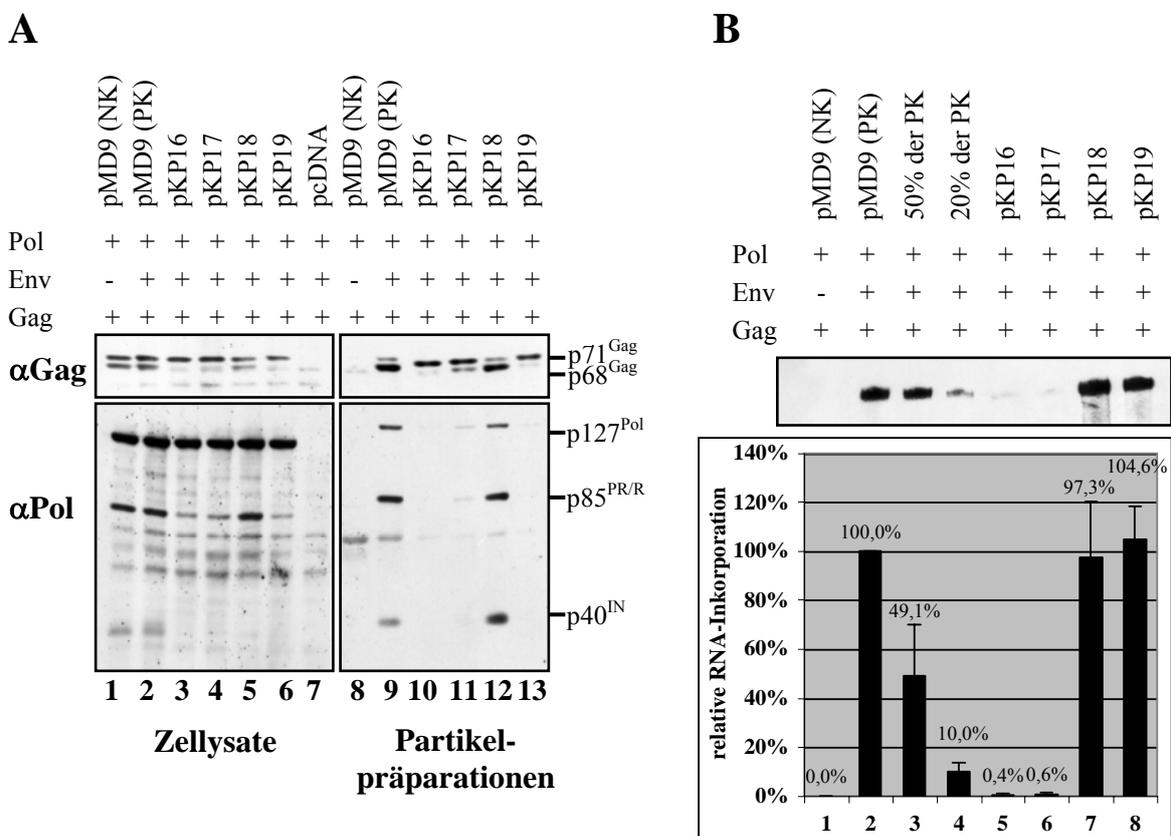
Dargestellt ist der Ausgangsvektor pMD9 und die darin eingeführten Deletionen in CASII. Die angegebenen Zahlen beziehen sich auf die Nukleotide nach Transkriptionsstart von PFV. (CMV) Cytomegalievirus Promotor/Enhancer; (SFFV U3) U3-Region des spleen focus forming virus; (eGFP) enhanced green fluorescent protein; (ΔU3) teilweise deletierte U3-Region

Da pMD9 nur eine verpackbare RNA exprimiert, wurden zusätzlich zu den Deletionskonstrukten und der Positivkontrolle (PK) pMD9 Expressionskonstrukte für Pol (pCpol2), Env (pCenv1) und Gag (pCIgag2) kotransfiziert. Im Fall der Negativkontrolle (NK) wurde pCenv1 durch pcDNA ersetzt. Ein weiterer Transfektionsansatz enthielt nur pcDNA und wurde zur Produktion von Zellysaten und Überstand genutzt. Alle Transfektionsansätze wurden wie zuvor behandelt und die zelluläre Expression von gag und pol ebenso wie die Proteinzusammensetzung und der Virus-RNA-Gehalt der Partikel untersucht. Weiterhin wurde zellfreier Überstand auf HT1080-Zellen übertragen und die Transduktionseffizienzen bestimmt. Die Versuche wurden zur Absicherung der Ergebnisse mindestens dreimal und mit zwei voneinander unabhängigen Plasmidpräparationen durchgeführt.

Das Ergebnis der Proteinanalyse, exemplarisch für einen Versuch in Abb. 21A dargestellt, entspricht dem der Proteinanalyse der Deletionen im pMH66-Ausgangsvektor. Deutliche Proteolyse von Gag, sowohl in den Zellysaten als auch in den Partikelpräparationen, war in

den Transfektionen der PK und pKP18 und wesentlich schwächer mit pKP17 detektierbar (Abb. 21A: Spuren 2, 4, 5 & 9, 11, 12). Der Nachweis von prozessiertem Gag korreliert mit der Detektion von partikelassoziiertem Pol: In den Versuchsansätzen der PK und pKP18 ist Pol-Protein gut (Abb. 21A: Spuren 9 & 12), in dem von pKP17 nur schwach nachweisbar (Abb. 21A: Spur 11). In der NK der Partikelpräparationen konnten keine foamyvirale Proteine detektiert werden. Dies schließt auch in diesem Versuchsaufbau eine partikelunspezifische Freisetzung der Proteine aus.

Im Gegensatz zur Proteinanalyse der Deletionen im pMH66-Hintergrund wurden keine weiteren Banden mit  $\alpha$ Pol-Antikörpern detektiert. Daher kann eine Störung der Partikelmorphogenese durch aberrante Pol-Proteine weitgehend ausgeschlossen werden.



**Abb. 21: Analyse der Zellysate und Viruspartikel der CASII Deletionen in pMD9**

**(A) Proteinanalyse der Zellysate und Viruspartikel der CASII-Deletionen pMD9**

Gag-Proteine wurden mit dem primären monoklonalen Antikörper SGG1 und Pol-Proteine mit den primären monoklonalen Antikörpern 15E10 und 3E11 detektiert. Als sekundärer Antikörper diente in beiden Fällen  $\alpha$ Maus HRP konjugierter Antikörper aus der Ziege.

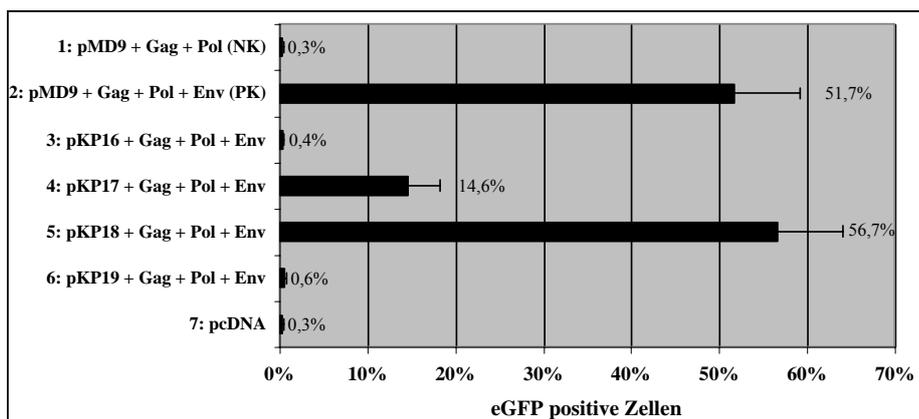
**(B) Analyse des partikulären Virus-RNA-Gehaltes der CASII-Deletionen in pMD9**

Die PK wurde gleich 100% gesetzt und eine Sondenkontrolle lieferte den Hintergrundwert. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Das Beispiel der RPA stammt aus dem gleichen Versuch wie der gezeigte Western Blot der Proteinanalyse.

Die Analyse des Virus-RNA-Gehaltes zeigte, daß die Partikel der Transfektionsansätze von pKP18 und pKP19 (Abb. 21B: Ansätze 7 & 8) ebenso viel Virus-RNA enthalten wie die der PK (Abb. 21B: Ansatz 2). Dagegen entsprach der RNA-Gehalt von Viruspartikeln aus Transfektionen mit pKP16 und pKP17 (Abb. 21B: Ansätze 5 & 6) dem Hintergrundwert.

Der RPA wurde mit einer 369 nt langen Sonde durchgeführt, die 297 nt der Sequenz um das zu CTG mutierte ehemalige *gag*-Startcodon bindet. Die Sonde wird von pKP20, das mit *MfeI* linearisiert wurde, transkribiert. Die Klonierungsstrategie des pKP20-Konstruktes ist im Anhang beschrieben. Die Auswertung dreier Versuche erfolgte wie oben (siehe 3.2.2.1.1) beschrieben. Die eingesetzten Verdünnungen resultierten in einem reduzierten Nachweis von RNA und zeigten, daß die verwendeten RNA-Mengen nicht im oberen Sättigungsbereich des RNase Protection Assays lagen.

Weiterhin wurden die Transduktionseffizienzen der in Anwesenheit der Deletionskonstrukte gebildeten Partikel mit denen der PK verglichen. Die Mittelwerte aus sechs unabhängigen Versuchen entsprachen denen der Deletionen im pMH66 Plasmidhintergrund (siehe 3.2.2.1.1). Der Transfektionsansatz mit pKP18 zeigte eine der PK ähnelnde Transduktionseffizienz (Abb. 22: Ansätze 2 & 5). Für die Versuchsansätze der NK, pKP16, pKP19 und pcDNA war keine Transduktion nachweisbar (Abb. 22: Ansätze 1, 3, 6 & 7) und der Überstand der Transfektion mit pKP17 wies eine ca. 3,5-fach reduzierte Transduktionseffizienz im Vergleich zur PK auf (Abb. 22: Ansatz 4).



**Abb. 22: Analyse der Transduktionseffizienzen der CASII-Deletionen in pMD9**

Die Graphik zeigt die Mittelwerte des Übertrags von 30 µl zellfreiem Überstand aus 6 Versuchen. Dargestellt sind absolute Werte (Anteile GFP positiver Zellen). Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

### **Zusammenfassung der Analyse der CASII-Deletionsmutanten in pMD9**

Auch diese Versuchsreihe zeigte, daß weder die Deletion der internen 200 nt (pKP18), noch die der 3' terminalen 1000 nt (pKP19) der CASII einen Einfluß auf die RNA-Inkorporation hat. Die interne Deletion wies ebenfalls keinen Effekt auf die Pol-Inkorporation und die Infektiosität der Viruspartikel auf, während die Deletion der 3' terminalen 1 kb trotz RNA-Inkorporation keine Pol-Verpackung und keine infektiösen Viruspartikel zeigte. Bei Entfernen der gesamten CASII (pKP16) führte dies dazu, daß weder RNA noch Pol im Viruspartikel detektiert wurden, außerdem wurden keine infektiösen Partikel gebildet. Bei Deletion des 5' Bereichs der CASII (pKP17) konnte ebenfalls keine RNA-Verpackung detektiert werden. Im Western Blot dagegen gelang der Nachweis von sehr wenig partikelassoziiertem Pol und die FACS-Analyse zeigte eine eindeutige, wenn auch deutlich reduzierte, Infektiosität des Überstandes.

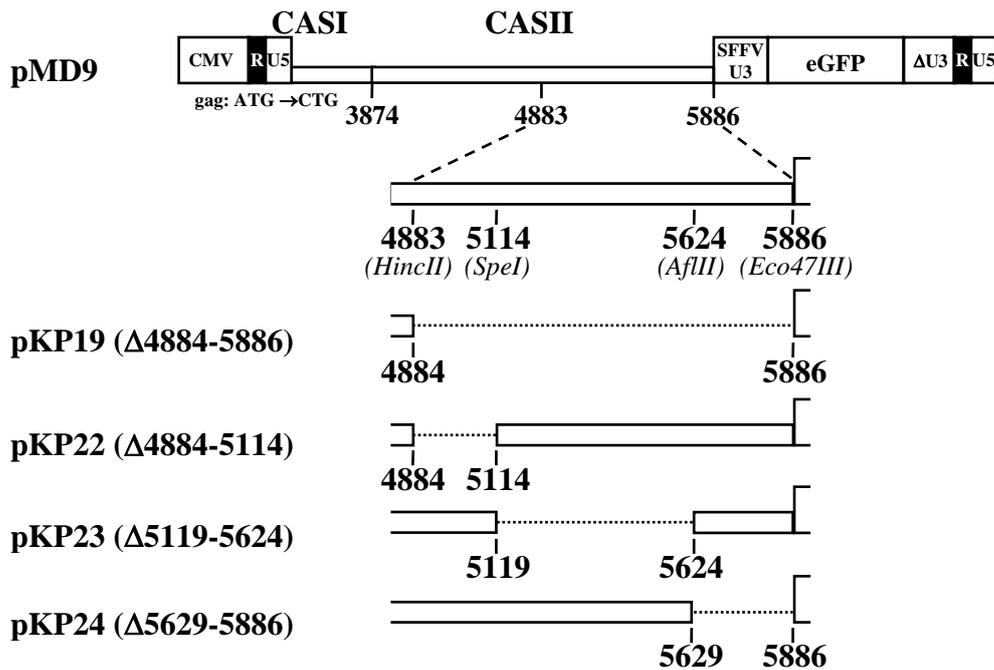
Die Daten der Proteinanalyse und der Analyse der Transduktionseffizienzen der Deletionen im pMD9- und pMH66-Ausgangskonstrukt entsprachen einander. Einzig die Mengen partikelassoziierter RNA der Transfektionsansätze mit pKP16 und pKP17 bzw. pMH68 und pKP10 stimmten zwischen den beiden Versuchsansätzen nicht überein. Während bei diesen Deletionen im Ausgangsvektor pMH66 geringe Mengen partikelassoziierter RNA (etwa 10% der PK) detektierbar waren, war für diese Deletionen im Ausgangsvektor pMD9 keine Virus-RNA im Partikel nachweisbar. Zusätzlich scheinen die Ergebnisse der Transfektion mit pKP17 der Hypothese zu widersprechen, daß es ohne RNA nicht zur Verpackung des Pol-Proteins und somit ebenfalls nicht zur Bildung infektiöser Partikel kommt. Aus diesem Grund wurde der RPA mit einer weiteren Sonde (pKP21; Klonierungsstrategie: siehe Anhang), die das *eGFP*-Gen detektiert, wiederholt. Aber auch in diesen Versuchen konnte in Kotransfektionen mit pKP17 keine partikelassoziierte RNA nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Eine Ursache hierfür könnte die Detektionsgrenze des RPAs sein. Einen Hinweis darauf liefert der Vergleich der eingesetzten Verdünnungen: So wurde im RPA des pMH66-Ansatzes für die 20% Verdünnung ein Wert von 22,6%, im RPA mit pMD9-Hintergrund dagegen nur ein Wert von 10% ermittelt. Dies deutet daraufhin, daß eine Reduktion der Mengen inkorporierter RNA auf 10% im RPA der pMD9-Konstrukte nicht detektierbar war.

Für die Deletion des Bereichs zwischen den Nukleotiden 4884-5886 der genomischen RNA (pKP19) konnte gezeigt werden, daß diese keinen Einfluß auf die RNA-, wohl aber auf die Pol-Verpackung hatte. Aus diesem Grund wurde dieser für die Pol-Verpackung essentielle Sequenzbereich (PES<sub>nt4884-5886</sub>) im folgenden näher untersucht.

### ***3.2.2.2 Deletionsanalyse des 3' Bereiches der CASII im Ausgangsvektor pMD9***

In den vorhergehenden Versuchen erwies sich ein ca. 1 kb großer Bereich im 3' Bereich der CASII (PES<sub>nt4884-5886</sub>) als entscheidend für die Verpackung von Pol ins Viruspartikel. Um diesen Bereich einzugrenzen, wurde er anhand vorhandener Restriktionsenzymststellen weiter unterteilt, verschiedene Bereiche deletiert und die Partikelinkorporation von Pol und genomischer RNA untersucht. Der Bereich zwischen den Nukleotiden 3874-4883 wurde dabei im Plasmid belassen, da er für effiziente Transduktionsraten und den Nachweis partikelassoziiierter RNA unerlässlich ist (siehe 3.2.2.1.2). Die Deletion des gesamten zu untersuchenden Bereichs zwischen den Nukleotiden 4884 und 5586 (pKP19) wurde in diesem Versuch aus 3.2.2.1.2 übernommen und diente als weitere Kontrolle. Das Plasmid pKP22 enthält eine 5' terminale Deletion, die 230 nt zwischen den Nukleotiden 4884 und 5114 der genomischen RNA umfaßt. In einem weiteren Konstrukt (pKP23) wurden die Nukleotide 5119 bis 5624 deletiert und die Deletion der Nukleotide 5629-5886 (pKP24) im 3' Bereich der CASII führte zu einer Verkürzung der (prä)genomischen RNA um 280 nt (Abb. 23). Die Klonierungsstrategien der pKP-Konstrukte sind im Anhang beschrieben.

Auch in dieser Serie diente pMD9 in Kotransfektion mit pCenv1, pCIgag2 und pCpol2 als Positivkontrolle (PK) und bei Kotransfektion von pcDNA statt pCenv1 als Negativkontrolle (NK). Der Versuchsaufbau und die Durchführung entsprachen den vorhergehenden Versuchen.

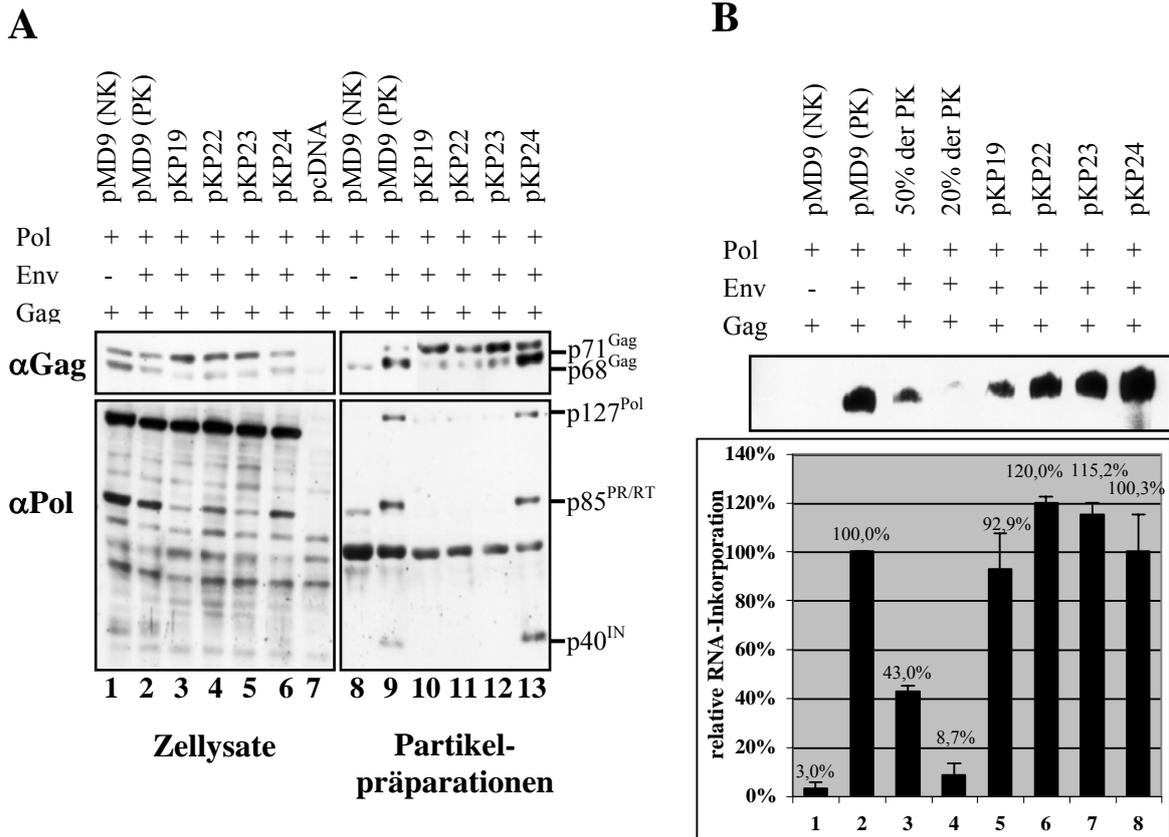


**Abb. 23: Schematische Darstellung der pMD9-Konstrukte mit Deletionen im 3' Bereich der CASII**

Dargestellt ist der Ausgangsvektor pMD9 und die darin eingeführten Deletionen in CASII. Die angegebenen Zahlen beziehen sich auf die Nukleotide nach Transkriptionsstart von PFV. (CMV) Cytomegalievirus Promotor/Enhancer; (SFFV U3) U3-Region des spleen focus forming virus; (eGFP) enhanced green fluorescent protein; ( $\Delta$ U3) teilweise deletierte U3-Region

Die Proteinanalyse der Zellysate ist exemplarisch anhand eines Versuchs in Abb. 24A dargestellt und belegte in allen Ansätzen, mit Ausnahme der Transfektion mit pcDNA, eine gleichmäßige Proteinexpression von Gag und Pol. Die Prozessierung der Vorläuferproteine war in allen Spuren erkennbar (Abb. 24A: Spuren 1-6), war in den Zellysaten der Transfektionsansätze mit pMD9 und pKP24 jedoch deutlich ausgeprägter nachweisbar (Abb. 24A: Spuren 1, 2 & 6).

Die Partikelpräparationen wiesen durch den Nachweis annähernd gleicher Gag-Mengen auf ähnliche Mengen an Viruspartikeln hin. Prozessiertes Gag und partikelassoziiertes Pol waren deutlich in den Transfektionsansätzen der PK und mit pKP24 (Abb. 24A: Spuren 9 & 13) detektierbar. Daß dieser Nachweis des Pol-Proteins partikelspezifisch war, zeigte der Kontrollansatz ohne pCenv, in dem erwartungsgemäß eine Freisetzung viraler Proteine unterblieb (Abb. 24A: Spur 8).



**Abb. 24: Analyse der Zellysate und Viruspartikel der Deletionen im 3' Bereich der CASII**

**(A) Proteinanalyse der Zellysate und Viruspartikel der Deletionen im 3' Bereich der CASII**

Gag-Proteine wurden mit dem primären monoklonalen Antikörper SGG1 und Pol-Proteine mit den primären monoklonalen Antikörpern 15E10 und 3E11 detektiert. Als sekundärer Antikörper diente in beiden Fällen  $\alpha$ Maus HRP konjugierter Antikörper aus der Ziege.

**(B) Analyse des partikulären Virus-RNA-Gehaltes der Deletionen im 3' Bereich der CASII**

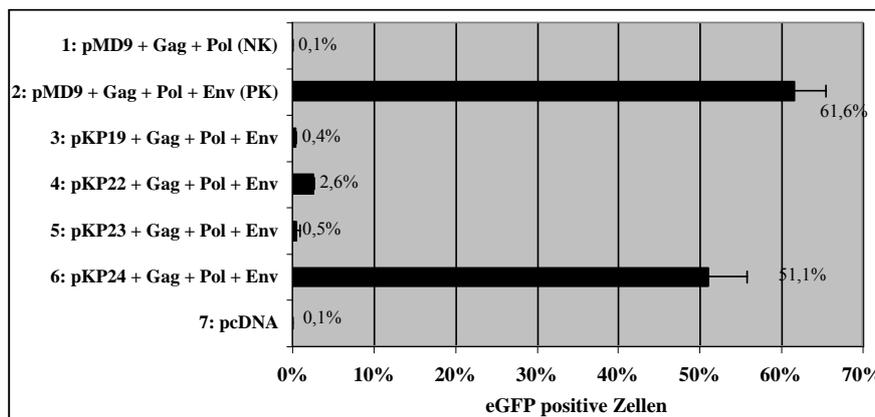
Die PK wurde gleich 100% gesetzt und eine Sondenkontrolle lieferte den Hintergrundwert. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

Um einen Einfluß der Deletionen auf die RNA-Verpackung auszuschließen, erfolgte eine Analyse des partikulären RNA-Gehaltes (Abb. 24B). Die Partikel aller Transfektionsansätze zeigten, mit Ausnahme der Negativkontrolle, ähnliche Mengen inkorporierter Virus-RNA. Keine der Deletionen hatte demzufolge einen Einfluß auf die Inkorporation von Virus-RNA.

Die Durchführung und Auswertung der RPAs entsprachen dem vorherigen Versuch (siehe 3.2.2.1.2). Es wurden vier Wiederholungen ausgewertet. Die eingesetzten Verdünnungen

der PK resultierten auch in dieser Versuchsreihe in der Detektion reduzierter RNA-Mengen.

Die Versuchsdurchführung der Analyse der Transduktionseffizienzen entsprach der unter 3.2.2.1.1 beschriebenen. Effizienten Vektortransfer zeigten nur die Transfektionsansätze der PK und pKP24 (Abb. 25: Ansätze 2 & 6). Die Überstände der Transfektionen der NK, bzw. der Transfektionen mit pKP19, pKP22, pKP23 sowie pcDNA zeigten keine Infektiosität (Abb. 25: Ansätze 1, 3, 4, 5 & 7).



**Abb. 25: Analyse der Transduktionseffizienzen der Deletionen des 3' Bereiches von CASII**

Die Graphik zeigt die Mittelwerte des Übertrags von 30 µl zellfreiem Überstand aus 5 Versuchen. Gezeigt sind die absoluten Werte (Anteil eGFP positiver Zellen). Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

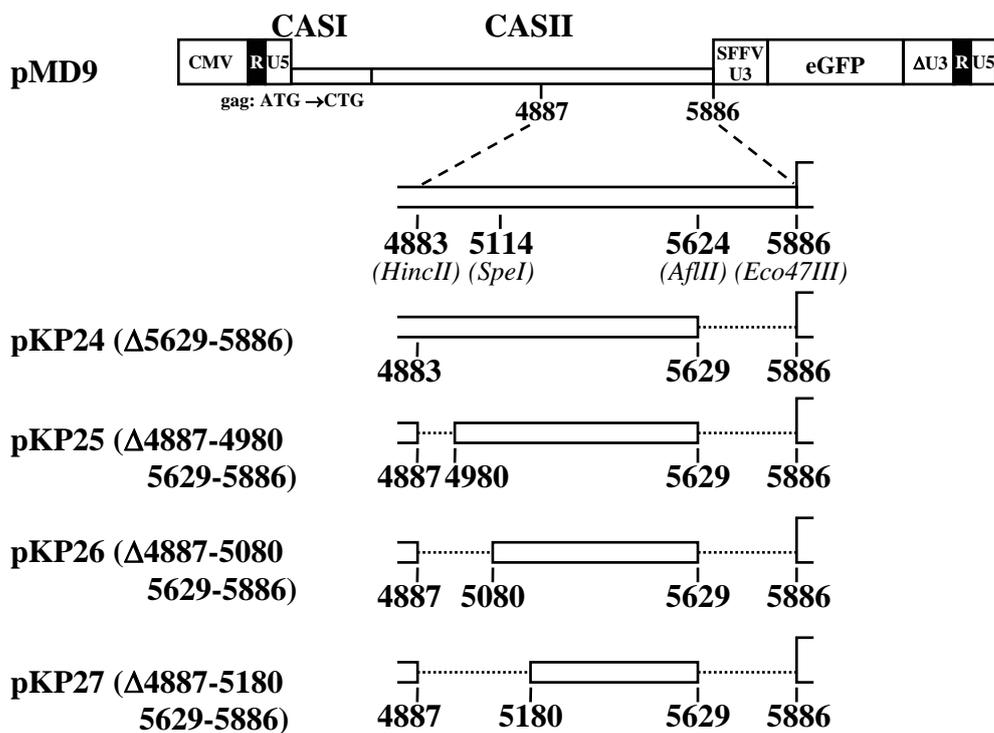
### Zusammenfassung der Analyse des 3' Bereiches von CASII in pMD9

Fehlte die Sequenz zwischen den Nukleotiden 4884 und 5886 (pKP19) der genomischen RNA, so wurden erwartungsgemäß Partikel gebildet, in die RNA, aber kein Pol inkorporiert wurde und die demzufolge nicht infektiös waren. Das gleiche Ergebnis wurde mit den Konstrukten pKP22 und pKP23 beobachtet. Sie enthalten Deletionen, die in einem Verlust der nt 4884-5114 bzw. nt 5119-5624 resultieren. Dagegen wurden bei Deletion der 3' terminalen 260 nt (pKP24; nt 5629-5886) der CASII infektiöse Partikel gebildet, in denen sowohl RNA, als auch Pol nachweisbar waren.

Der für die Pol-Inkorporation essentielle Bereich (PES) wurde somit auf ca. 750 nt zwischen den Nukleotiden 4884-5628 (PES<sub>nt4884-5628</sub>) der genomischen RNA eingegrenzt.

### 3.2.2.3 Analyse des 5' Bereiches der PES<sub>nt4884-5628</sub>

Da die in 3.2.2.2 definierte PES relativ umfassend ist (ca. 750 nt), wurde sie im folgenden weiter eingegrenzt. Als Ausgangskonstrukt für das Einfügen weiterer Deletionen in den 5' Bereich der PES<sub>nt4884-5628</sub> diente pKP24. Dies basiert auf dem pMD9-Vektor und hat eine Deletion im 3' Bereich der CASII (nt 5629-5886), die keinen Einfluß auf die Pol- oder RNA-Verpackung hat (siehe 3.2.2.2). Gleichzeitig diente sie neben pMD9 als weitere Positivkontrolle (PK). Es wurden Deletionen von 100 bp (pKP25), 200 bp (pKP26) und 300 bp (pKP27) in pKP24 eingeführt (Abb. 26) und die Partikelinkorporation von Pol und Virus-RNA untersucht. Parallel dazu erfolgte eine Analyse der Transduktionseffizienz. Die Klonierungsstrategien der pKP-Konstrukte sind im Anhang beschrieben. Der Versuchsaufbau, die Durchführung und die Kontrollen entsprachen den vorhergehenden Versuchen (siehe 3.2.2.1.2 & 3.2.2.2).



**Abb. 26: Schematische Darstellung der pMD9-Konstrukte mit Deletionen im 5' Bereich der PES<sub>nt4884-5628</sub>**

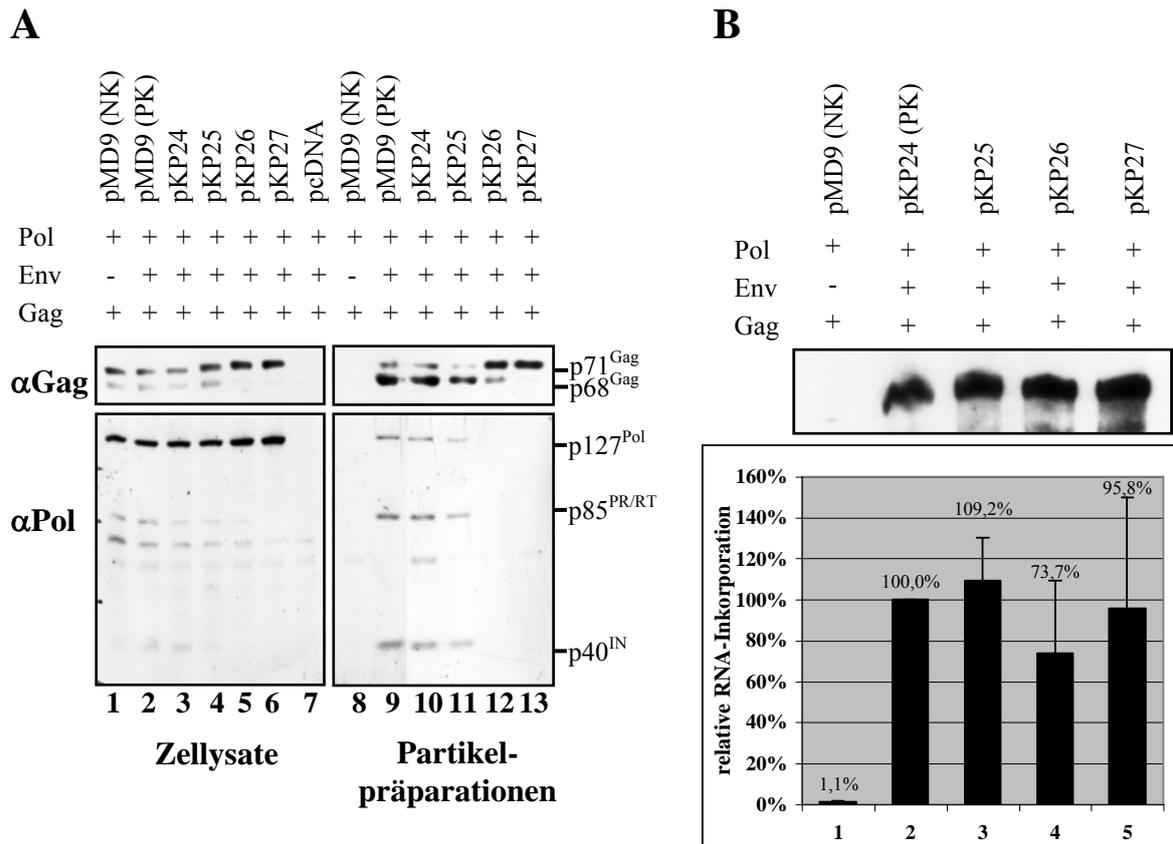
Dargestellt ist der Ausgangsvektor pMD9 und die darin eingeführten Deletionen in CASII. Die angegebenen Zahlen beziehen sich auf die Nukleotide nach Transkriptionsstart von PFV. (CMV) Cytomegalievirus Promotor/Enhancer; (SFFV U3) U3-Region des spleen focus forming virus; (eGFP) enhanced green fluorescent protein; (ΔU3) teilweise deletierte U3-Region

Die Proteinanalyse mittels Western Blot ist exemplarisch für einen Versuch in Abb. 27A dargestellt. Aus der Abbildung der Zellysate ist ersichtlich, daß die viralen Proteine in allen Ansätzen in vergleichbaren Mengen gebildet wurden.

Im Immunoblot der Partikelpräparationen wurden in der NK erwartungsgemäß keine Gag- oder Pol-spezifischen Banden nachgewiesen (Abb. 27A: Spur 8). Die ähnliche Intensität der partikelspezifischen Gag-Banden in den Spuren 9-13 deutete auf Bildung gleicher Partikelmengen hin. In starken Belichtungen war in allen Viruspartikeln, mit Ausnahme der NK und der Kotransfektion mit pKP27, partikelassoziiertes Pol nachweisbar. Die Bandenintensitäten der Transfektionen mit pKP24 entsprachen denen der PK, während die Banden des pKP25-Ansatzes schwächer nachweisbar waren (Abb. 27A: Spuren 9-11). Im Ansatz von pKP26 wurde in einigen der Versuchen kein (Abb. 27A: Spur 12), in anderen nur sehr schwach Pol-Protein detektiert (Daten nicht gezeigt). In den Transfektionsansätzen, in denen deutlich partikelassoziiertes Pol beobachtet werden konnte, war auch deutlich die prozessierte Variante von Gag nachzuweisen (Abb. 27A: Spuren 9-11). Eine schwache Gag-Spaltung war ebenfalls in den Partikeln aus Transfektionen von Zellen mit pKP26 (Abb. 27A: Spur 12) detektierbar.

Anschließend erfolgte der RPA zum Vergleich der Mengen der partikulären Virus-RNA. Als Ausgangskonstrukt für die Sonde diente, wie im vorherigen Versuch, das mit *MfeI* linearisierte Plasmid pKP20 (siehe 3.2.2.1.2). Die Bandenintensitäten vierer Versuche wurden in ImageQuant von Molecular Dynamics quantifiziert und in Microsoft Excel ausgewertet (Abb. 27B). Die Werte des Konstruktes pKP24 wurden gleich 100% gesetzt und die Mengen inkorporierter RNA in Bezug darauf bestimmt. In 3.2.2.2 wurde gezeigt, daß die Deletion in pKP24 keinen Einfluß auf die RNA-Inkorporation ins Viruspartikel hat. Den Hintergrundwert der RPA lieferte ein Ansatz, in dem keine Virus-RNA, sondern ausschließlich Sonde eingesetzt wurde.

Wie aus Abb. 27B ersichtlich ist, wurde in allen Ansätzen partikelassoziierte RNA detektiert. Dies zeigte, daß keine der Deletionen einen Einfluß auf die Partikelinkorporation der Virus-RNA hatte.



**Abb. 27:** Analyse der Zellysate und Viruspartikel der Deletionen im 5' Bereich der PES<sub>nt4884-5628</sub>

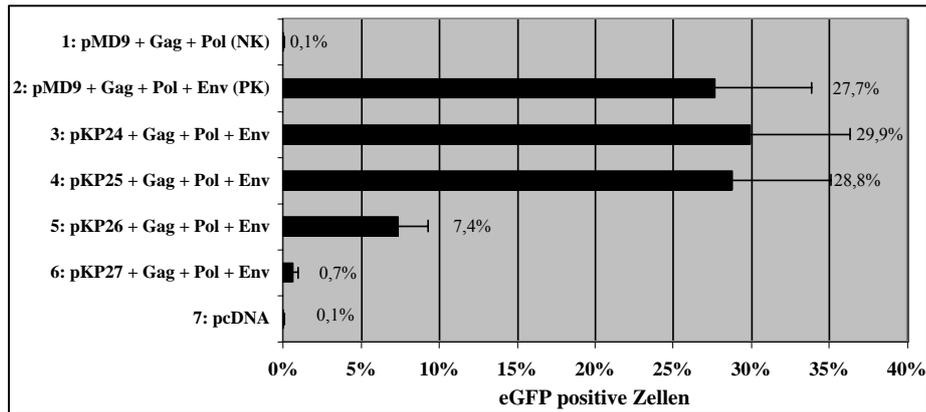
**(A) Proteinanalyse der Zellysate und Viruspartikel der Deletionen im 5' Bereich der PES<sub>nt4884-5628</sub>**

Gag-Proteine wurden mit dem primären monoklonalen Antikörper SGG1 und Pol-Proteine mit den primären monoklonalen Antikörpern 15E10 und 3E11 detektiert. Als sekundärer Antikörper diente in beiden Fällen  $\alpha$ Maus HRP konjugierter Antikörper aus der Ziege.

**(B) Analyse des partikulären Virus-RNA-Gehaltes der Deletionen im 5' Bereich der PES<sub>nt4884-5628</sub>**

Die PK wurde gleich 100% gesetzt und eine Sondenkontrolle lieferte den Hintergrundwert. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Das Beispiel der RPA stammt aus dem gleichen Versuch wie der gezeigte Western Blot der Proteinanalyse.

Die im nächsten Schritt durchgeführte FACS-Analyse zur Überprüfung und Vergleich der Transfektionseffizienzen zeigte erwartungsgemäß keine infektiösen Partikel in der NK und dem Transfektionsansatz mit pcDNA (Abb. 28: Ansätze 1 & 7). Ebenfalls negativ war der Ansatz mit pKP27 (Abb. 28: Ansatz 6), wohingegen die Transfektionsansätze mit pKP24 und pKP25 Transduktionsraten ähnlich der PK zeigten (Abb. 28: Ansätze 2-4). Im Gegensatz dazu war die Infektiosität des Überstandes aus der Transfektion mit pKP26 ca. vierfach geringer als die der PK (Abb. 28: Ansatz 5).



**Abb. 28: Analyse der Transduktionseffizienzen der Deletionen im 5' Bereich der  $PES_{nt4884-5629}$**

Die Graphik zeigt die Mittelwerte des Übertrags von 30  $\mu$ l zellfreiem Überstand aus 7 Versuchen. Dargestellt sind absolute Werte (Anteil eGFP positiver Zellen). Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

#### **Zusammenfassung der Analyse des 5' Bereiches der $PES_{nt4884-5629}$**

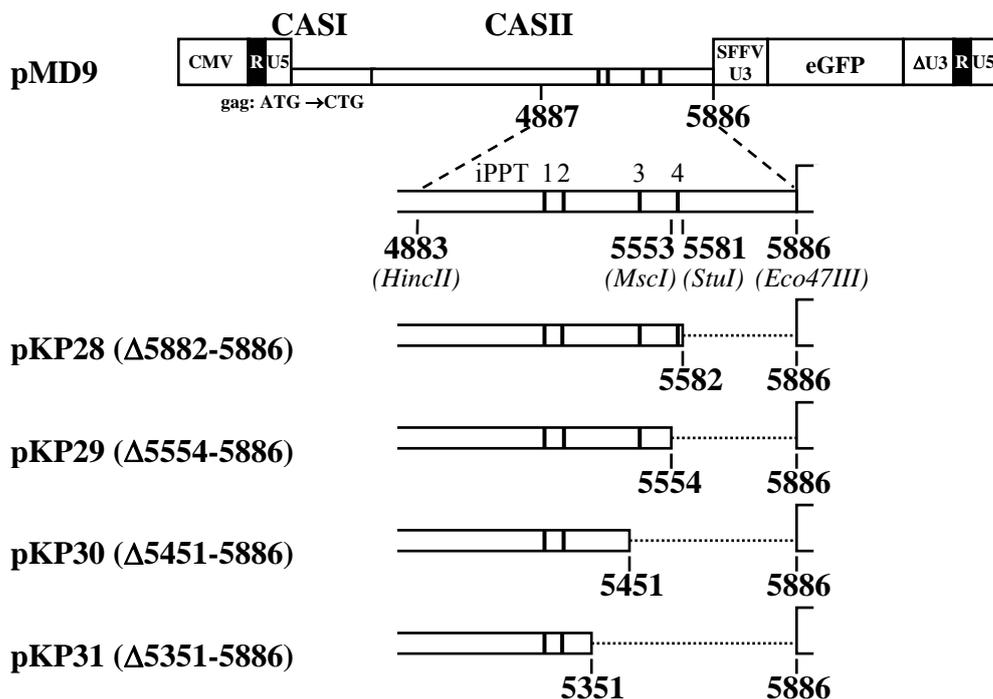
Der Transfektionsansatz mit pKP24 zeigte, wie im vorherigen Versuch, RNA- und Pol-Inkorporation und annähernd gleiche Mengen infektiöser Partikel wie die PK. Auch im Transfektionsansatz mit pKP25 ließen sich partikelassoziierte RNA und Pol und Transduktionsraten entsprechend der PK nachweisen. Die Deletion der 200 nt (pKP26) dagegen resultierte in deutlich weniger infektiösen Partikeln. In diesem Ansatz war der Nachweis von partikelassoziertem Pol stark reduziert, obwohl Virus-RNA verpackt wurde. Bei Erweiterung der Deletion auf 300 bp (pKP27) wurden keine infektiösen Partikel mehr gebildet und es war kein partikelassoziertes Pol nachweisbar, trotz der Inkorporation „wildtypischer“ Mengen von Virus-RNA.

#### **3.2.2.4 Analyse des 3' Bereiches der $PES_{nt4884-5628}$**

Im 3' Bereich des *pol*-Gens und damit im Bereich der  $PES_{nt4884-5628}$  liegen vier purinreiche Sequenzblöcke, von denen vermutet wird, daß mindestens einer von ihnen einen internen PPT (iPPT) darstellen könnte (Heinkelein et al., 1998; Kupiec et al., 1988; Tobaly-Tapiero et al., 1991). Der ursprünglich beschriebene iPPT entspricht bei einer Nummerierung von 5' nach 3' dem vierten (Abb. 29), und interessanterweise konnte 5' dieses iPPTs eine Lücke im DNA-Plusstrang von PFV identifiziert werden (Kupiec et al., 1988; Tobaly-Tapiero et al., 1991). HIV-1 weist ebenfalls eine Lücke im DNA-Plusstrang 5' eines iPPTs

im *pol*-Gen auf. Dieser iPPT dient als zweiter Initiationsort für die Plusstrangsynthese und wird für die optimale Virusreplikation benötigt (Charneau et al., 1992). Dies spricht für eine ähnliche Nutzung des vierten iPPTs in PFV.

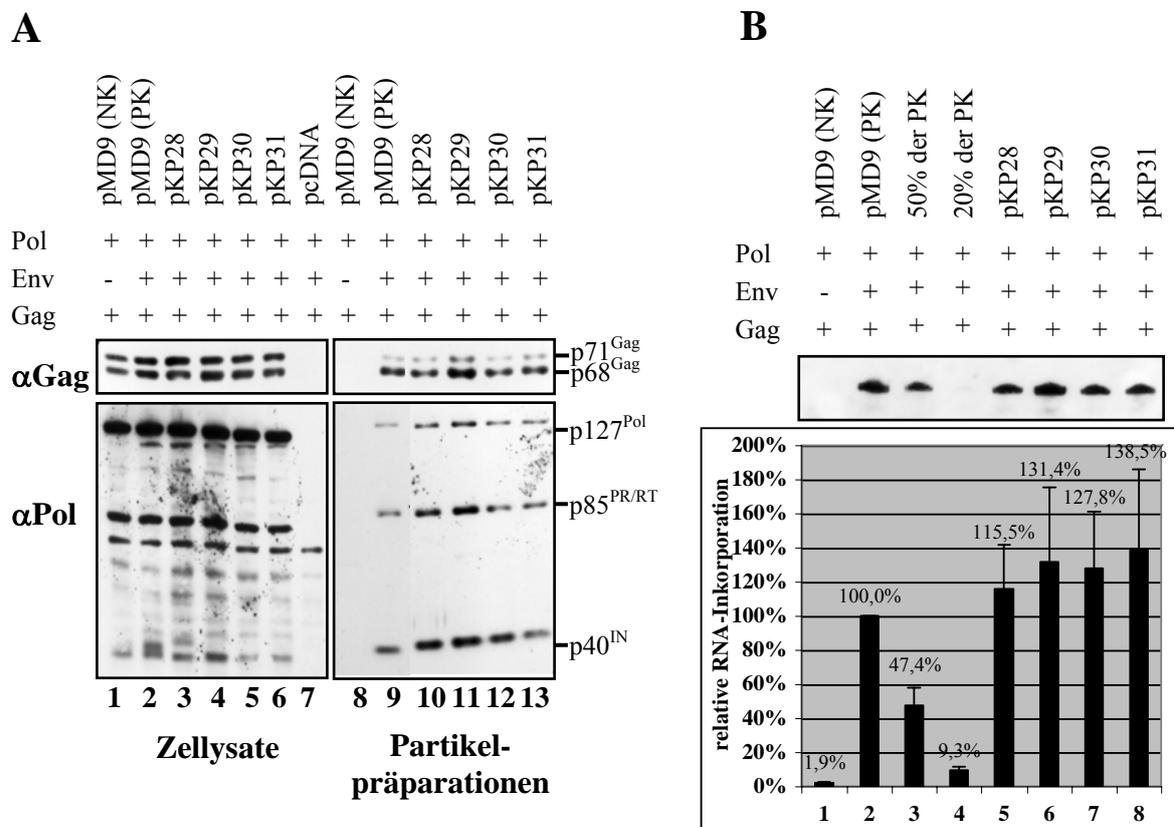
Um einen möglichen Einfluß des vierten iPPTs auf die Pol-Inkorporation in foamyvirale Viruspartikel zu analysieren, wurde beim Einfügen von Deletionen im 3' Bereich der PES<sub>nt4884-5628</sub> die erste so gewählt, daß der vierte potentielle iPPT erhalten blieb, während er in den anderen drei Deletionsmutanten fehlt (Abb. 29). Im Konstrukt pKP28 ist der vierte iPPT erhalten, und die Deletion umfaßt die Nukleotide 5582-5886 auf Ebene der genomischen RNA. Diese Deletion ist nur 48 nt größer als die des Konstruktes pKP24 aus 3.2.2.2. Durch Entfernen weiterer 28 nt wurde der vierte iPPT deletiert und das Konstrukt pKP29 kloniert. Diese Deletion umfaßt die Nukleotide 5554-5886. In den beiden folgenden Konstrukten pKP30 und pKP31 wurden weitere 100 bzw. 200 nt deletiert und neben dem vierten iPPT auch der dritte iPPT entfernt (Abb. 29). Die Klonierungsstrategien der pKP-Konstrukte sind im Anhang beschrieben. Der Versuchsaufbau, die Durchführung und die Kontrollen entsprachen den vorhergehenden Versuchen.



**Abb. 29: Schematische Darstellung der pMD9-Konstrukte mit Deletionen im 3' Bereich der PES<sub>nt4884-5628</sub>**

Dargestellt ist der Ausgangsvektor pMD9 und die darin eingeführten Deletionen in CASII. Die angegebenen Zahlen beziehen sich auf die Nukleotide nach Transkriptionsstart von PFV. (CMV) Cytomegalievirus Promotor/Enhancer; (iPPT) interne Polypurintrakte 1-4; (SFFV U3) U3-Region des spleen focus forming virus; (eGFP) enhanced green fluorescent protein; (ΔU3) teilweise deletierte U3-Region

Das Ergebnis der Proteinanalyse ist exemplarisch für einen Versuch in Abb. 30A dargestellt. Der Immunoblot der Zellysate zeigte eine gleichmäßige Expression der Gag- und Pol-Proteine. Außerdem war in allen Spuren - mit Ausnahme der NK - die Prozessierung von Gag und die Reverse Transkriptase-Untereinheit von Pol nachweisbar. Unspezifische Freisetzung von Gag- und Pol-Proteinen konnte in der Analyse der Partikelpräparationen nicht nachgewiesen werden (Abb. 30A: Spur 8), und der Nachweis des Gag-Proteins deutete auf ähnliche Mengen an Partikeln hin. Die prozessierte Form von Gag ist ebenso wie das Pol-Vorläuferprotein und seine Untereinheiten in allen Ansätzen mit Ausnahme der NK nachweisbar.



**Abb. 30:** Analyse der Zellysate und Viruspartikel der Deletionen im 3' Bereich der PES<sub>nt4884-5628</sub>

**(A) Proteinanalyse der Zellysate und Viruspartikel der Deletionen im 3' Bereich der PES<sub>nt4884-5628</sub>**

Gag-Proteine wurden mit dem primären monoklonalen Antikörper SGG1 und Pol-Proteine mit den primären monoklonalen Antikörpern 15E10 und 3E11 detektiert. Als sekundärer Antikörper diente in beiden Fällen  $\alpha$ Maus HRP konjugierter Antikörper aus der Ziege.

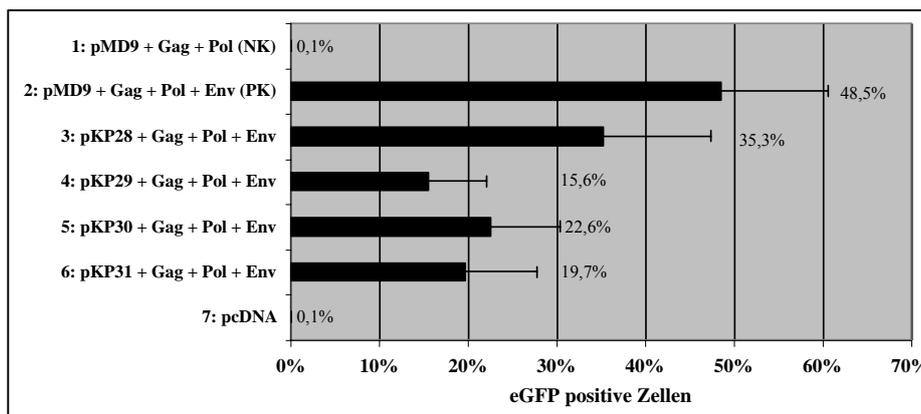
**(B) Analyse des partikulären Virus-RNA-Gehaltes der Deletionen im 3' Bereich der PES<sub>nt4884-5628</sub>**

Die PK wurde gleich 100% gesetzt und eine Sondenkontrolle lieferte den Hintergrundwert. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

Die Analyse des partikulären RNA-Gehaltes mittels RPA entsprach in Durchführung und Auswertung einschließlich Sonde und Kontrollen dem Versuch 3.2.2.1.2. Es wurden vier Wiederholungen ausgewertet. Die eingesetzten Verdünnungen der PK resultierten auch in dieser Versuchsreihe in der Detektion reduzierter RNA-Mengen.

Ein Nachweis von partikulärer RNA ließ sich mit Ausnahme der Negativkontrolle für alle Konstrukte führen (Abb. 30B). Trotz größerer Schwankungen als in den bisherigen Versuchen, deutet die Quantifizierung des RPA auf etwa gleiche Mengen inkorporierter RNA in den Partikeln aller Konstrukte hin.

Um die Transduktionseffizienzen der Deletionen im 3' Bereich der PES<sub>nt4884-5625</sub> zu analysieren, wurde entsprechend den vorherigen Versuchen eine FACS-Analyse durchgeführt. Diese zeigte, daß die Transduktionsrate vom Transfektionsansatz mit pKP28 etwas niedriger als die der PK war, während die von pKP29, pKP30 und pKP31 weniger als die Hälfte der infektiösen Partikel der PK aufwiesen. Hierbei schienen sich die Werte von pKP29, pKP30 und pKP31 ungefähr zu entsprechen (Abb. 31).



**Abb. 31: Analyse der Transduktionseffizienzen der Deletionen im 3' Bereich der PES<sub>nt4884-5628</sub>**

*Die Graphik zeigt die Mittelwerte des Übertrags von 30 µl zellfreiem Überstand aus 5 Versuchen. Dargestellt sind absolute Werte (Anteil eGFP positiver Zellen). Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.*

### **Zusammenfassung der Analyse des 3' Bereiches der PES<sub>nt4884-5628</sub>**

In allen Transfektionsansätzen der Deletionskonstrukte wurde Partikelinkorporation von RNA und Pol nachgewiesen. Die Mengen der verpackten RNA schienen hierbei gleich zu sein. Eine quantitative Aussage über die Mengen inkorporierten Pol-Proteins ist nicht

möglich, es ist aber in allen Transfektionsansätzen deutlich partikelassoziertes Pol nachweisbar.

Die Infektiosität von Transfektionsansatz pKP28 war etwas niedriger als die der PK. Die Transfektionsansätze mit pKP29, pKP30 und pKP31 produzierten dagegen, verglichen mit der PK, weniger als die Hälfte infektiöser Partikel. Demzufolge zeigten die Deletionen, die den vierten iPPT nicht mehr enthalten, bei gut nachweisbarer RNA- und Pol-Inkorporation eine eingeschränkte Infektiosität in der FACS-Analyse. Hierbei hat eine ausgedehnte Deletion, die den dritten iPPT einschließt, keine weitere Reduktion der Transduktionseffizienzen zur Folge.

### ***3.3 Untersuchung der Voraussetzungen auf Proteinebene für die Inkorporation des Foamyvirus Pol-Proteins***

#### **3.3.1 Analyse der Verpackung der Pol-Untereinheiten in foamyvirale Partikel**

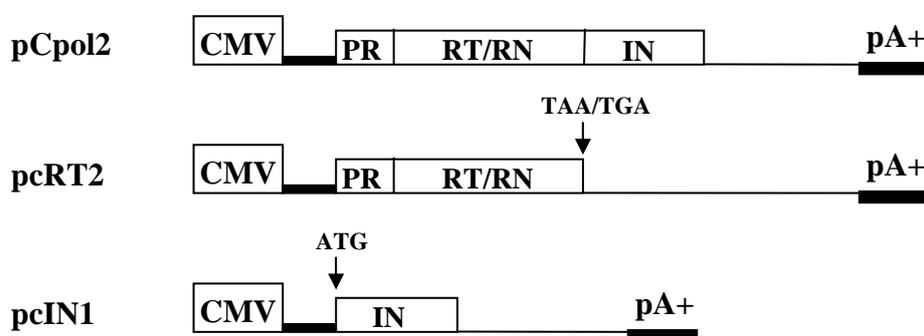
Das foamyvirale *pol*-Gen wird, anders als in Orthoretroviren, unabhängig von Gag exprimiert, gleicht aber im Aufbau dem der Orthoretroviren. Die Reihenfolge der Enzyme beginnt 5' mit der Protease, gefolgt von der Reversen Transkriptase, einschließlich der RNaseH-Aktivität und endet 3' mit der Integrase. Im Gegensatz zu den Orthoretroviren wird das Pol-Vorläuferprotein nur in zwei statt in drei oder vier Untereinheiten prozessiert: Die Protease-Reverse Transkriptase/RNaseH-Untereinheit (RT) und die Integrase-Untereinheit (IN) (Kögel et al., 1995; Löchelt & Flügel, 1996; Netzer et al., 1993).

In dieser Arbeit konnte dargelegt werden, daß die Inkorporation von Virus-RNA essentiell für die Verpackung des Pol-Proteins ins Viruspartikel ist (siehe 3.1). Ebenfalls konnte gezeigt werden, daß für die Pol-Inkorporation ins virale Partikel spezifische Sequenzabschnitte auf RNA-Ebene nötig sind (siehe 3.2). Diese Daten lassen die Vermutung einer direkten Interaktion zwischen Pol-Protein und Virus-RNA zu.

Daraus wiederum ergeben sich verschiedene Fragen, z. B.: Binden beide Untereinheiten unabhängig voneinander an die RNA oder wird das Vorläuferprotein für die Inkorporation ins Viruspartikel benötigt?

Um dies näher zu untersuchen, wurde mit dem zuvor beschriebenen Vier-Plasmidsystem (3.1; Heinkelein et al., 2002a) gearbeitet, in dem Expressionsplasmide für Gag, Pol, Env

und eine verpackbare RNA kotransfiziert wurden. Hierbei wurde das Pol-Plasmid gegen Expressionsplasmide für die Untereinheiten (RT & IN) des Pol-Proteins ausgetauscht. Die Expressionsplasmide für die Protease-Reverse Transkriptase-Untereinheit und die Integrase (pcRT2, pcIN1; Imrich et al., 2000) basieren auf dem Plasmid pCpol2. Das Plasmid pcRT2 enthält ein Stopcodon an der Schnittstelle der viralen Protease zwischen der RT- und der IN-Untereinheit (nach Pfrepper et al., 1998). In pcIN1 wurde der Lese-rahmen der Integrase an das *pol*-ATG fusioniert (Abb. 32). Beide Expressionsplasmide exprimieren Proteine der erwarteten Größe und diese werden von monoklonalen Antikörper gegen die entsprechende Untereinheit erkannt (Imrich et al., 2000). Alle weiteren verwendeten Plasmide wurden bereits in 3.2 beschrieben (Abb. 13 & Abb. 20).



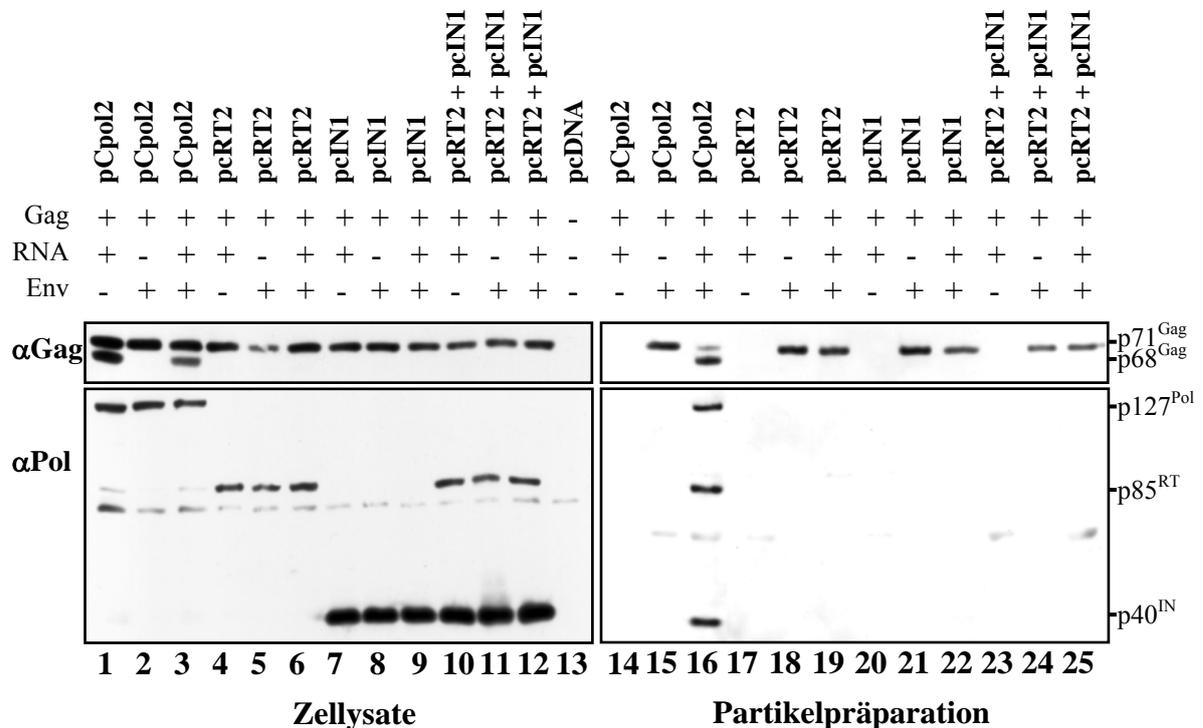
**Abb. 32: Expressionsplasmide des Pol-Vorläuferproteins und seiner Untereinheiten**

(CMV) Cytomegalievirus Promotor/Enhancer; (PR) Protease; (RT/RN) Reverse Transkriptase/RNaseH; (IN) Integrase; (pA+) Polyadenylierungssignal

Jedes der Pol-Expressionsplasmide (pCpol2, pcRT2, pcIN1) wurde mit pCIgag2, pCenv1 und pMD9 kotransfiziert, wobei der Ansatz mit pCpol2 als Positivkontrolle diente. Für jedes pol-Konstrukt wurden weiterhin Transfektionsansätze durchgeführt, in denen pCenv1 oder pMD9 durch pcDNA ausgetauscht wurde. Diese dienten als Negativkontrollen für die Partikelbildung und die Spezifität des Pol-Nachweises. Zusätzlich erfolgte eine Transfektion nur mit pcDNA, von der Zellysate, nicht aber Partikel, analysiert wurden. Einen Tag nach Transfektion erfolgte die Induktion mit Natriumbutyrate und weitere 24 h später die Präparation von Zellysaten und Partikeln. Anschließend wurde die zelluläre Expression von Gag und Pol bzw. der Pol-Untereinheiten mittels Western Blot kontrolliert. Die präparierten Viruspartikel wurden ebenfalls im Western Blot bezüglich der Inkorporation des Pol-Proteins bzw. der Untereinheiten analysiert.

Die Versuche wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander und mit zwei unabhängig voneinander hergestellten Plasmidpräparationen durchgeführt.

Das Ergebnis der Proteinanalyse ist exemplarisch für einen Versuch in Abb. 33 dargestellt. Die Analyse der Zellysate zeigte eine gleichmäßige Expression von Gag. Auch das Pol-Vorläuferprotein (Abb. 33: Spuren 1-3), bzw. die einzelnen Untereinheiten (Abb. 33: RT Spuren 4-6; IN Spuren 7-9; in Kombination Spuren 10-12) waren in den entsprechenden Zellysaten gut nachweisbar. Proteolytische Spaltung von Gag war jedoch nur bei Kotransfektion von pCpol2, pCIgag2 und pMD9 zu beobachten (Abb. 33: Spuren 1 & 3). In der Partikelpräparation zeigten nur Zellen, die mit Expressionsplasmiden für wild-typisches Pol, Gag und Env zusammen mit pMD9 transfiziert wurden, partikelassoziiertes Pol-Protein (Abb. 33: Spur 16). Auch die Spaltung von Gag war nur in Partikeln dieses Transfektionsansatzes zu beobachten. Bei Austausch von pCpol2 durch ein oder beide Expressionsplasmide der Pol-Untereinheiten, ließen sich keine Untereinheiten im Viruspartikel detektieren. Auch war bei Transfektionen mit dem Expressionsplasmid pcRT2, das für die Protease-Reverse Transkriptase Untereinheit codiert, keine Spaltung von Gag nachweisbar. Erwartungsgemäß unterblieb bei den Kontrollansätzen ohne pCenv1 eine Freisetzung viraler Proteine aus der Zelle.



**Abb. 33: Proteinanalyse der Verpackung der Pol-Untereinheiten ins Viruspartikel**

Gag-Proteine wurden mit dem primären monoklonalen Antikörper SGG1 und Pol-Proteine mit den primären monoklonalen Antikörpern 15E10 und 3E11 detektiert. Als sekundärer Antikörper diente in beiden Fällen  $\alpha$ Maus HRP konjugierter Antikörper aus der Ziege.

Die Analyse der Verpackung der Pol-Untereinheiten zeigte, daß weder die Protease-Reverse Transkriptase- noch die Integrase-Untereinheit ins foamyvirale Partikel verpackt wird. Auch bei Koexpression beider Untereinheiten des Pol-Proteins konnte keine der Untereinheiten im Viruspartikel nachgewiesen werden.

### **3.3.2 Analyse der Notwendigkeit enzymatischer Aktivität der Enzyme des Pol-Vorläuferproteins für die Pol-Inkorporation**

Um zu untersuchen, ob die enzymatischen Aktivitäten der Pol-Proteine essentiell für die Verpackung des Pol-Vorläuferproteins sind, wurden Expressionsplasmide mit Mutationen in den aktiven Zentren der Enzyme konstruiert (Abb. 34) und im Vier-Plasmidsystem analysiert.

Als Ausgangskonstrukt für die Aktivitätsmutanten diente pCpol2. In dieses Konstrukt wurden folgende Mutationen übertragen:

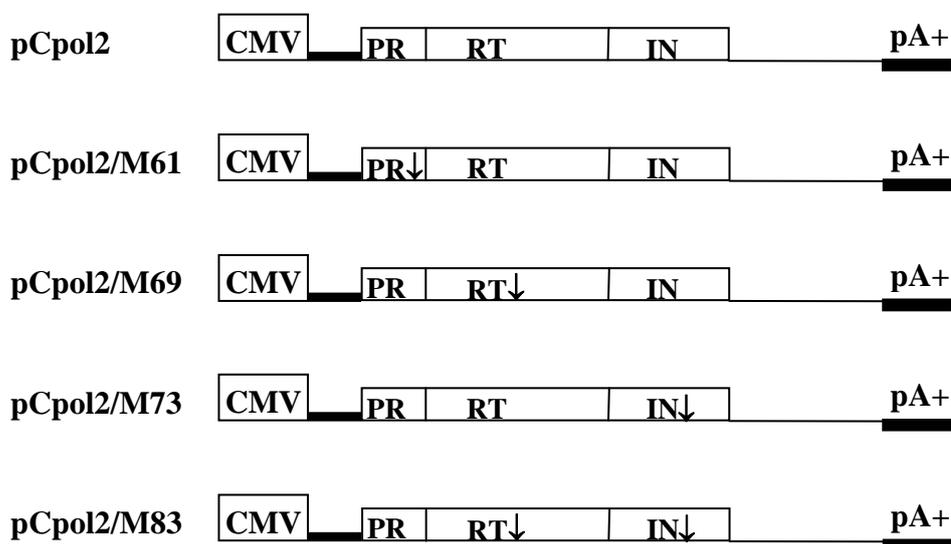
<b>Bezeichnung</b>	<b>Mutation</b>	<b>Ort der Mutation</b>
M61	DSG→DAG	Aktives Zentrum der Protease
M69	YVDD→GAAA	Aktives Zentrum der Reversen Transkriptase
M73	DD <sub>35</sub> E→DA <sub>35</sub> E	Aktives Zentrum der Integrase
M83	YVDD→GAAA DD <sub>35</sub> E→DA <sub>35</sub> E	Doppelmutation der aktiven Zentren von Reverser Transkriptase und Integrase

Durch die eingeführten Mutationen sind die jeweiligen Enzyme nicht mehr funktionell (PR: Jörg Enssle; RT: Moebes et al., 1997.; IN: Enssle et al., 1999). Die Klonierungsstrategien der pCpol2-Mutationskonstrukte sind im Anhang beschrieben.

Die verschiedenen Konstrukte wurden mit pCIgag2, pCenv1 und pMD9 kotransfiziert, nach 24 h induziert, weitere 24 h später erfolgte die Präparation von Partikeln und Zellysaten und deren Proteinanalyse mittels Western Blot.

Als Positivkontrolle diente pCpol2 in Kotransfektion mit pCIgag2, pCenv1 und pMD9. Drei weitere Ansätze mit pCpol2, in denen jeweils eines der Plasmide gegen pcDNA ausgetauscht wurde, dienten der Überprüfung der Partikelbildung und Proteinfreisetzung.

Als weitere Negativkontrolle wurde jede Mutante mit pcDNA statt mit pMD9 transfiziert. Zusätzlich erfolgte eine Transfektion mit pcDNA, von der nur Zellysate analysiert wurden. Die Versuche wurden mindestens dreimal unabhängig und mit zwei unabhängig voneinander hergestellten Plasmidpräparationen durchgeführt.

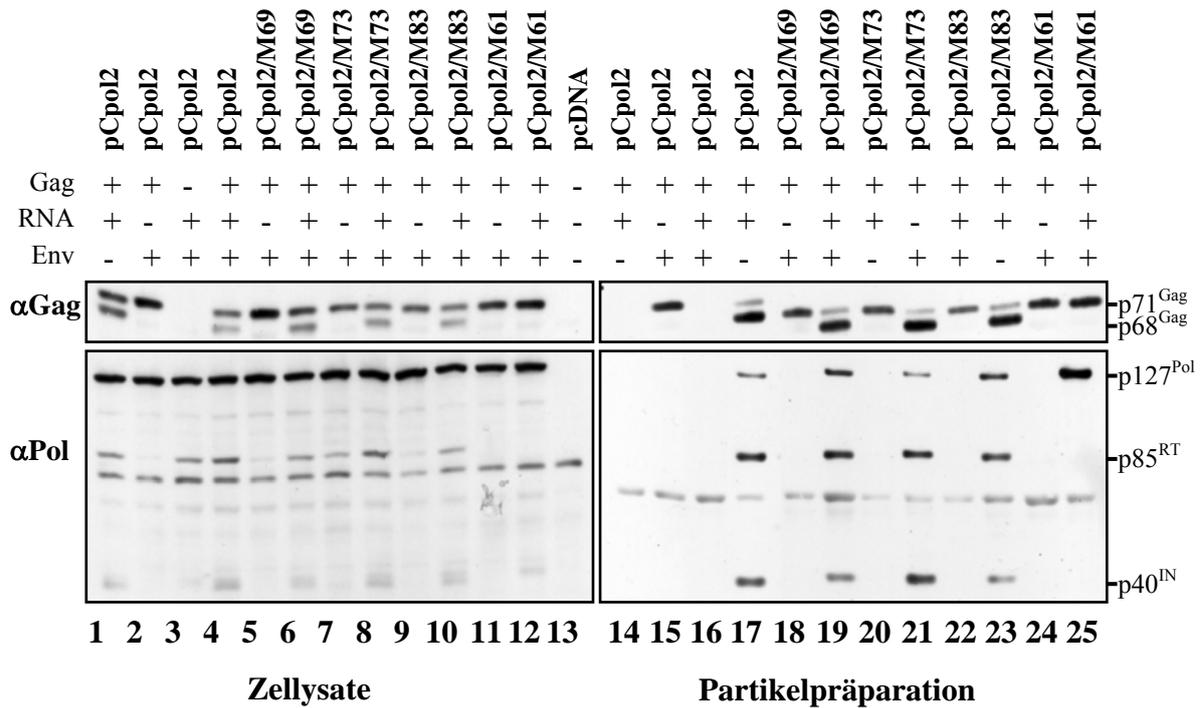


**Abb. 34: Überblick über die verschiedenen Pol-Expressionsplasmide mit Mutationen in den aktiven Zentren der Enzyme**

(CMV) Cytomegalievirus Promotor/Enhancer; (PR) Protease; (RT/RN) Reverse Transkriptase/RNaseH; (IN) Integrase; (pA+) Polyadenylierungssignal; (↓) markiert die inaktivierten Enzyme

Das Ergebnis der Proteinanalyse ist exemplarisch für einen Versuch in Abb. 35 dargestellt. Ein Nachweis der gleichmäßigen Expression der Gag- und Pol-Proteine ließ sich in allen Fällen, in denen Gag und Pol kotransfiziert wurden, führen. Prozessierung von Gag war nur zu beobachten, wenn pMD9 und eines der pCpol2-Konstrukte kotransfiziert wurden. Eine Ausnahme war erwartungsgemäß die Kotransfektion mit pCpol/M61, da es sich hierbei um das Konstrukt mit inaktivierter Protease handelte.

In der Analyse der Partikelpräparation war, bei Kotransfektion von pCenv1, pCIgag2 und pMD9 mit einem der Pol-Expressionskonstrukte, in allen Partikeln gespaltenes Gag und partikelassoziiertes Pol nachweisbar. Auch hier bildete die Transfektion mit pCpol2/M61 eine Ausnahme. In diesem Ansatz waren erwartungsgemäß weder Gag-Spaltung noch Pol-Untereinheiten nachweisbar, das Pol-Vorläuferprotein konnte jedoch gut in den Viruspartikeln gezeigt werden.



**Abb. 35: Proteinanalyse der Pol-Verpackung von Mutationen in aktiven Zentren der Enzyme**

*Gag-Proteine wurden mit dem primären monoklonalen Antikörper SGG1 und Pol-Proteine mit den primären monoklonalen Antikörpern 15E10 und 3E11 detektiert. Als sekundärer Antikörper diente in beiden Fällen  $\alpha$ Maus HRP konjugierter Antikörper aus der Ziege.*

Die Analyse der enzymatischen Aktivitäten des Pol-Proteins bezüglich der Pol-Inkorporation ins foamyvirale Partikel zeigte, daß keine der eingeführten Mutationen einen Einfluß auf die Pol-Verpackung hatte. Die Aktivität der einzelnen Enzyme des Pol-Proteins ist demzufolge nicht essentiell für die Inkorporation des Proteins ins foamyvirale Partikel.

## 4 Diskussion

Foamyviren weisen, verglichen mit den Orthoretroviren, zahlreiche Besonderheiten in ihrer Genomorganisation, der Proteinexpression und des Replikationszykluses auf (siehe 1.2). Einer dieser Unterschiede ist die Expression des Pol-Proteins: Orthoretroviren exprimieren Pol über ein Gag-Pol-Fusionsprotein (Hayman, 1978; Jamjoom et al., 1977; Oppermann et al., 1977). Je nach Genus wird diese Kopplung der Proteinexpression durch Stopcodonsuppression oder Leserasterverschiebung durch den zellulären Translationskomplex verursacht und führt zu einem reguliertem Mengenverhältnis von Strukturproteinen zu Enzymen von etwa 10-20:1 (Hayman, 1978; Jamjoom et al., 1977; Oppermann et al., 1977). Weiterhin gewährleistet das Fusionsprotein die Verpackung des Pol-Proteins in das entstehende Kapsid. Die aktive orthoretrovirale Protease ist ein Dimer (Vogt, 1997b) und erst im Kapsid ist die Konzentration von Fusionsproteinen hoch genug für eine Dimerisierung des Enzyms. Anschließend prozessiert die Protease autokatalytisch ihre Freisetzung aus dem Fusionsprotein und spaltet im weiteren Verlauf des Replikationszykluses die Gag- und Pol-Vorläuferproteine (Swanstrom & Wills, 1997). Eine Überexpression des Fusionsproteins führt zu einer frühzeitigen Aktivierung der Protease und damit auch zur vorzeitigen Prozessierung der viralen Proteine (Karacostas et al., 1993; Park & Morrow, 1991; Weaver et al., 1990). Die Expression von Pol als Gag-Pol-Fusionsprotein in Orthoretroviren hat also auch den Effekt, daß eine Aktivierung der enzymatischen Aktivitäten der Pol-Proteine vor dem Einbau in das virale Partikel verhindert wird (Linial, 1999; Swanstrom & Wills, 1997).

Im Gegensatz zum Mechanismus der Orthoretroviren exprimieren alle charakterisierten Foamyviren das Pol-Protein von einer eigenen gespleißten mRNA (Bodem et al., 1996; Enssle et al., 1996; Holzschu et al., 1998; Jordan et al., 1996; Lecellier et al., 2002; Löchelt & Flügel, 1996; Yu et al., 1996). Dieser von der Gag-Expression unabhängige Mechanismus führt zu zwei primären Fragen:

- 1.) Wie wird in Foamyviren das Verhältnis von Strukturproteinen zu Enzymen reguliert?
- 2.) Wie wird das Pol-Protein in das Viruspartikel inkorporiert?

Die erste Frage wurde hier nicht näher untersucht, es ist aber seit kurzem bekannt, daß das Verhältnis von foamyviralen Gag- zu Pol-Proteinen, ähnlich dem der Orthoretroviren, bei ungefähr 10-16:1 liegt (Cartellieri et al., 2005a). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der zweiten Frage, nach dem Mechanismus der Partikelinkorporation des Pol-Proteins, nachgegangen.

#### ***4.1 Untersuchung des Mechanismus der Pol-Inkorporation in foamyvirale Partikel***

Der Replikationszyklus der Foamyviren ähnelt in vielen Punkten eher dem der Hepadnaviren als dem der Orthoretroviren (Linial, 1999 & 2003; Rethwilm, 2003). Unter anderem exprimieren auch die Hepadnaviren ihr revers transkribierendes Enzym (P-Protein) unabhängig von ihrem Strukturprotein (Core-Protein) (Chang et al., 1989; Roychoudhury & Shih, 1990; Schlicht et al., 1989). In dieser Virusfamilie führen spezifische Interaktionen zwischen dem P-Protein und der prägenomischen RNA zu einer Koinkorporation der beiden Komponenten ins Partikel. Gleichzeitig löst wahrscheinlich diese Bindung den Partikelzusammenbau aus und gewährleistet so die Bildung von Kapsiden, die prägenomische RNA und das P-Protein enthalten (Bartenschlager et al., 1990; Bartenschlager & Schaller, 1992; Hirsch et al., 1990). Diese Regulation der Partikelmorphogenese trifft jedoch auf Foamyviren nicht zu, da hier die RNA-Inkorporation unabhängig vom Pol-Protein über Nukleinsäurebindungsmotive in Gag erfolgt (Baldwin & Linial, 1998; Stenbak & Linial, 2004; Yu et al., 1996). Für die Inkorporation des Pol-Proteins in foamyvirale Partikel verbleiben somit folgende Möglichkeiten:

- 1.) Direkte Wechselwirkungen zwischen den Pol- und Gag-Proteinen.
- 2.) Bindung des Pol-Proteins an die prägenomische RNA und Verpackung von Pol über die Partikelinkorporation der RNA.
- 3.) Eine Kombination der Möglichkeiten eins und zwei.

Einen ersten Hinweis darauf, daß Virus-RNA für die Funktionalität und/oder die Partikelinkorporation von Pol notwendig sein könnte, lieferten Versuche mit Gag-exprimierenden Vektoren, die keine RNA ins Viruspartikel inkorporieren. In diesen Fällen konnte keine Spaltung von partikelassoziiertem Gag beobachtet werden, trotz der

Koexpression des Pol-Proteins mit funktionell aktiver Protease (Heinkelein et al., 1998 & 2000a).

Erst die voneinander unabhängige Expression der einzelnen Viruskomponenten Gag, Pol, Env und verpackbarer RNA (Vier-Plasmidsystem, Heinkelein et al., 2002a) ermöglichte eine nähere Untersuchung dieser Frage. Hierbei ist entscheidend, daß die Modifikation oder das Fortlassen einer der Komponenten keinen Einfluß auf die Bildung der anderen hat. Somit war es möglich, die Abhängigkeiten zwischen den einzelnen Viruskomponenten während der Partikelmorphogenese zu analysieren.

Eine Untersuchung der zellulären Proteinexpression zeigte, daß es trotz aktiver Protease nicht zur Spaltung von Gag kam, wenn keine verpackbare RNA im Transfektionsansatz vorhanden war (Abb. 14: Spur 4). Die proteolytische Spaltung von zellulärem Pol in seine Untereinheiten war dagegen unabhängig von der Expression von Gag (Abb. 14: Vergleich der Spuren 5 & 6). Die Analyse von extra-zellulären Partikeln zeigte, daß nur bei Kotransfektion von Pol, Gag, Env und RNA partikelassoziertes Pol-Protein nachweisbar war (Abb. 14: Spur 11). Ohne verpackbare RNA konnte kein Pol-Protein im Viruspartikel und demzufolge auch keine Prozessierung von partikelassoziertem Gag-Protein beobachtet werden (Abb. 14: Spur 10).

Diese Ergebnisse schließen die Möglichkeit einer Partikelinkorporation des Pol-Proteins allein über Wechselwirkungen mit Gag aus und weisen auf eine Interaktion von Pol mit der RNA hin. Sie zeigen, daß die Inkorporation von viraler RNA Voraussetzung für die Verpackung von Pol in foamyvirale Partikel ist. Ein mögliches Modell für die Pol-Verpackung wäre demnach die Bindung von Pol an die RNA und eine dadurch vermittelte Inkorporation ins Viruspartikel. Das ohne verpackbare RNA auch in Zellysaten trotz aktiver Protease keine Gag-Prozessierung beobachtet werden konnte, verweist ebenfalls auf die virale RNA als Bindeglied zwischen Gag und Pol (Abb. 14: Spur 4).

In Hepadnaviren werden zelluläre Komponenten wie z. B. das Hitzeschockprotein 90 für die Bildung eines Komplexes aus P-Protein und prägenomischer RNA benötigt (Hu et al., 1997; Hu & Seeger, 1996). Vorstellbar wäre dies auch für Foamyviren. Ob es sich bei der Interaktion zwischen foamyviralem Pol und viraler RNA um eine direkte Bindung handelt oder ob andere virale oder zelluläre Proteine beteiligt sind, kann jedoch aus den vorliegenden Daten nicht geschlossen werden. Eine Theorie wäre, daß eine Kombination von Pol-RNA-Interaktionen und Gag-Pol-Wechselwirkungen für die Partikelinkorporation des Pol-Proteins notwendig ist. Wechselwirkungen zwischen Pol und Gag wurden in dieser

Studie nicht untersucht und können nicht ausgeschlossen werden. In früheren Studien zur Rolle der GR-Boxen im C-Terminus des Gag-Proteins wurde berichtet, daß die erste und zweite GR-Box wichtig für effiziente Pol-Verpackung sind (Baldwin & Linial, 1999; Stenbak & Linial, 2004). Allerdings wurde in beiden Studien durch die eingeführten Mutationen in Gag die zelluläre Expression von Pol stark herabgesetzt und/oder die RNA-Inkorporation gestört. Daher kann aus diesen Ergebnissen nicht auf eine für die Pol-Verpackung wichtige Gag-Pol-Interaktion geschlossen werden.

Es ist bemerkenswert, daß die Prozessierung von zellulärem Pol in Abwesenheit von verpackbarer RNA deutlich schwächer als in deren Anwesenheit war (Abb. 14: Vergleich der Spuren 4, 5 & 6). Die foamyvirale Protease ist ebenso wie die orthoretroviralen als Dimer aktiv (Pfrepper et al., 1998). Möglicherweise führt die Interaktion von Pol und viraler RNA dazu, daß eine kritische Proteasekonzentration überschritten und so die Dimerisierung des Enzyms erleichtert wird. Auf diese Weise würde auch in Foamyviren eine frühzeitige Aktivierung der Protease und somit eine vorzeitige Prozessierung des Pol-Proteins unterbunden werden. Die Ursache für die dennoch beobachtete schwache Proteaseaktivität könnte die Expression der einzelnen Viruskomponenten im Vier-Plasmidsystem sein. Es ist anzunehmen, daß auch in Foamyviren das Expressionsverhältnis von Gag und Pol reguliert wird. So führen z. B. Manipulationen am Startcodon von *gag* zu einer verstärkten Expression von Pol (Baldwin & Linial, 1999) und Mutationen im 3' Bereich des *gag*-Gens zu einer verminderten Pol-Expression (Stenbak & Linial, 2004). Die getrennte Expression der einzelnen Viruskomponenten im Vier-Plasmidsystem verhindert diese Regulierung. Außerdem führt die Expression der Proteine unter Kontrolle eines konstitutiv aktiven CMV-Promotors sehr wahrscheinlich zu einer Überexpression.

Weitere Untersuchungen bezüglich möglicher Gag-Pol-Wechselwirkungen sind, ebenso wie der Nachweis einer direkten Bindung von Pol an die genomische RNA, bzw. der Beteiligung anderer zellulärer oder viraler Proteine, notwendig um den Mechanismus der Verpackung des Pol-Proteins ins foamyvirale Partikel vollständig zu klären.

## ***4.2 Untersuchung der für die Pol-Inkorporation notwendigen RNA-Sequenzbereiche***

In Foamyviren wurden empirisch zwei cis-aktive Sequenzen (CASI und II) identifiziert, die für einen effizienten Vektortransfer notwendig sind (Erlwein et al., 1998; Heinkelein et al. 1998 & 2000a; Wu et al 1998). Die CASI umfaßt ca. 650 nt, beginnt mit dem Transkriptionsstart und endet im *gag*-Leserahmen (nt 1-647). Die CASII ist mit 2 kb wesentlich größer und liegt im 3' Bereich des *pol*-Gens (nt 3873-5886) (Heinkelein et al., 1998). Da eine RNA, die diese beiden Sequenzbereiche enthält, bei Kotransfektion von foamyviralen Gag, Pol und Env in die gebildeten Partikel verpackt wird und die Inkorporation von Pol vermittelt (siehe 3.1; Heinkelein et al., 2002b), müssen die für die Pol-Inkorporation essentielle Sequenzen (*pol encapsidation sequences* = PES) in CASI und/oder CASII liegen.

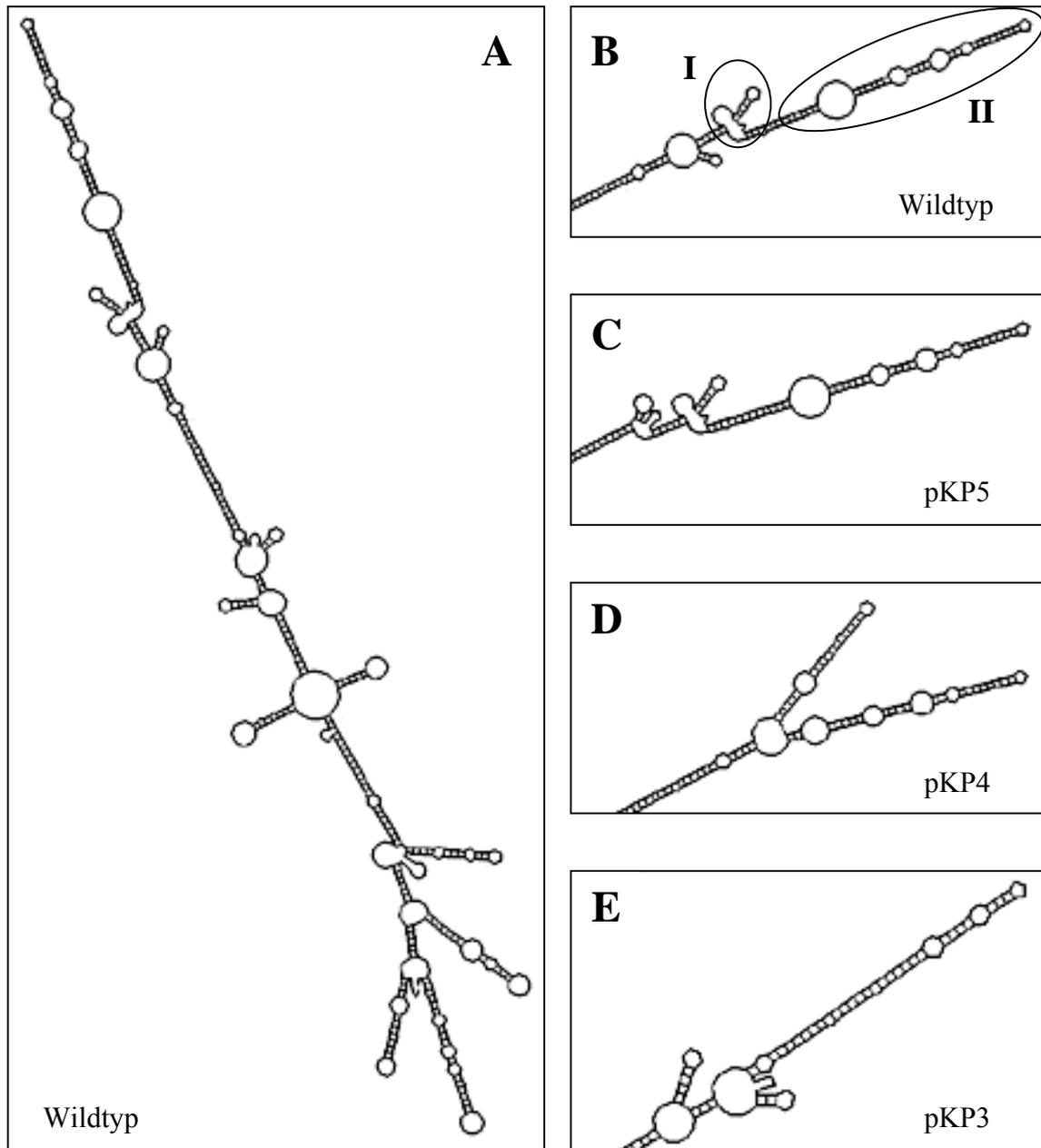
### **4.2.1 Analyse der cis-aktiven Sequenz I (CASI)**

In einer früheren Studie wurde der Einfluß der 5' UTR auf die Verpackung der viralen RNA in das Viruspartikel untersucht. Heinkelein et al., 2000a konnten darin zeigen, daß Deletionen im Bereich zwischen der R-Region und dem Startcodon von *gag* keinen Einfluß auf die RNA-Verpackung haben. Außerdem konnte eine kurze Sequenz in der U5-Region identifiziert werden, die für die Spaltung des Gag-Proteins erforderlich ist.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Deletionsanalyse der CASI bestätigte, daß die Deletionen zwischen der R-Region und dem *gag*-Startcodon (pKP2-pKP5) keinen Einfluß auf die Inkorporation der viralen RNA in das Viruspartikel haben (Abb. 16B). Außerdem konnte gezeigt werden, daß gleiches für eine Deletion der PBS gilt ( $\Delta$ 351-366 in pKP5; Abb. 16B). Weiterhin erwies sich, daß bei Deletion einer 28 nt lange Sequenz in der U5-Region der verpackbaren RNA ( $\Delta$ 318-348 in pKP4) kein partikelassoziiertes Pol-Protein detektiert werden konnte und demzufolge auch keine Spaltung des Gag-Proteins beobachtet wurde (Abb. 16A: Spur 12). Diese 28 Nukleotide sind also essentiell für die Pol-Verpackung ins Viruspartikel und stellen somit eine PES (PES<sub>nt318-345</sub>) dar. Interessanterweise ist die benachbarte PBS (nt 351-366) nicht essentiell für die Partikelinkorporation des Pol-Proteins (Abb. 16A: Spur 13). Dies wurde bereits in früheren Studien gezeigt (Baldwin und Linial, 1999) und in diesen Versuchen bestätigt.

Diese Daten zeigen auch, daß nicht RNA-Inkorporation *per se* für die Verpackung des Pol-Proteins in das virale Partikel ausreichend ist, sondern, daß eine spezifische Interaktion zwischen Pol und der viralen RNA stattfindet und dafür bestimmte Sequenzen in der RNA benötigt werden. Diese sind in den Deletionskonstrukten pKP2-pKP4 entweder nicht vorhanden oder nicht zugänglich.

Da die 5' Region des FV-Genoms eine hoch geordnete Struktur besitzt (Mergia et al., 1992; Park & Mergia, 2000), kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Deletion der PES<sub>nt318-345</sub> eine Änderung der sekundären RNA-Struktur zur Folge hat. Eine Analyse der Sekundärstruktur der CASI zeigt zwei auffällige Strukturelemente (Abb. 36: I & II). Die Haarnadelschleife I ist verhältnismäßig kurz, wohingegen die Haarnadelschleife II einen auffällig langen Stamm mit mehreren internen Schleifen aufweist. Beide Strukturelemente bleiben auch bei Deletion der PBS ( $\Delta$ 351-366 in pKP5) erhalten (Abb. 36 A-C). Sie gehen jedoch bei Deletion der PES<sub>nt318-345</sub> (in pKP4) und auch in der umfassenderen Deletion der U5-Region ( $\Delta$ 194-343 in pKP3) verloren (Abb. 36 D & E). Gleiches gilt für die Deletionen der, mit Ausnahme der R-Region, gesamten 5' UTR ( $\Delta$ 194-443 in pKP2) (Daten nicht gezeigt). Dies weist darauf hin, daß Teile einer oder beider Haarnadelschleifenstrukturen die Interaktionsdomäne für die Wechselwirkungen mit dem Pol-Protein darstellen. Bei der PES<sub>nt318-345</sub> würde es sich demnach nicht um eine direkte Bindungsstelle von Pol handeln. Der Großteil der von Proteinen erkannten und gebundenen RNA-Strukturen ist einzelsträngig und hoch strukturiert. Es handelt sich hierbei häufig um Haarnadelschleifen, aber es werden auch interne Schleifen oder Ausbuchtungen gebunden (Varani, 1996). Weiterhin gibt es auch Proteine, die doppelsträngige RNA oder nicht-sequenzspezifisch einzelsträngige RNA binden (Varani, 1996). Ohne weitere Analysen ist daher keine Aussage darüber möglich, welches der gefundenen Strukturelemente mit dem Pol-Protein interagieren könnte. Durch die Einführung von Punktmutationen, die gezielt einzelne Strukturelemente zerstören, könnte ermittelt werden, welche RNA-Elemente für die Pol-Inkorporation ins virale Partikel notwendig sind.



**Abb. 36: RNA-Sekundärstrukturen von Deletionen in CASI**

Die RNA-Strukturen wurden mit Hilfe des mfold-Programms (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna>) ermittelt (siehe 2.3.5.3). Dargestellt sind jeweils die Strukturen mit der größten freien Energie. (A) Struktur der gesamten CASI; (B) Ausschnitt aus (A); (I), (II) RNA-Strukturelemente, die mit zunehmender Deletion verloren gehen; (C), (D) und (E) sind die (B) entsprechenden Ausschnitte aus den Sekundärstrukturen der CASI von pKP5, pKP4 und pKP3.

#### 4.2.2 Analyse der cis-aktiven Sequenz II (CASII)

In den bisherigen Arbeiten zur CASII von PFV sind die Angaben zu deren Größe widersprüchlich. Einerseits wird eine relativ ausgedehnte CASII von ungefähr 2 kb in der 3' Region des *pol*-Gens definiert (Heinkelein et al., 1998; Trobridge et al., 2002), andererseits eine nur ca. 700 nt umfassende CASII für effizienten Vektortransfer als ausreichend befunden (nt 4861-5540; Erlwein et al., 1998). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen beruhen auf der von Heinkelein et al., 1998 definierten CASII zwischen den Nukleotiden 3873-5886. Für eine Deletion der gesamten CASII wurde eine Reduktion des RNA-Gehaltes im Virion um 80% publiziert, wobei keine infektiöser Partikel mehr gebildet wurden (Heinkelein et al., 1998).

In dieser Arbeit erwies sich der 3' Bereich zwischen den Nukleotiden 4884-5886 (pKP11 & pKP19:  $\Delta$ 4884-5886) als essentiell für die Pol-Verpackung (Abb. 18A & 21A: Spuren 13), ohne einen Einfluß auf den RNA-Gehalt der Viruspartikel zu haben (Abb. 18B & 21B: Ansätze 8). Diese Daten deuten darauf hin, daß der Bereich direkt an der Interaktion zwischen Pol und Virus-RNA beteiligt ist und es sich um eine PES handelt ( $PES_{nt4884-5886}$ ).

Die Deletion des 5' Bereiches der CASII (pKP10:  $\Delta$ 3872-4664; pKP17:  $\Delta$ 3874-4663) hingegen resultierte in einer deutlichen Reduktion partikelassoziierter RNA, teilweise bis unter die Nachweisgrenze (Abb. 18B & 21B: Ansätze 6). In der Proteinanalyse war der Nachweis von partikelassoziertem Pol-Protein und Gag-Spaltung nur in Spuren möglich (Abb. 18A & 21A: Spuren 11). Außerdem zeigte die FACS-Analyse geringe Mengen infektiöser Partikel. Die von den Deletionsmutanten im 5' Bereich der CASII erhaltenen Ergebnisse legen nahe, daß nur minimale, teilweise mit der verwendeten Methode nicht detektierbare Mengen Virus-RNA ins Partikel inkorporiert werden und diese eine geringe Pol-Verpackung vermitteln, die wiederum zu einer schwachen Gag-Prozessierung und letztendlich zur Bildung weniger infektiöser Partikel führt. Die verminderte Pol-Verpackung dieser Deletionsmutanten wäre somit eine Folge des verminderten RNA-Gehaltes dieser Partikel und kann im Rahmen dieser Experimente nicht auf die Deletion einer PES in diesem Bereich zurückgeführt werden.

Die Ursache der Reduktion von detektierbaren partikelassozierten RNA-Mengen in diesen Experimenten ist nicht bekannt und bedarf weiterer Untersuchungen. Eine Ursache könnte die Entfernung eines RNA-Verpackungssignals sein. Soweit bekannt, befinden sich die

Verpackungssignale von Retroviren im 5' Bereich des Genoms (Banks et al., 1997; Berkowitz et al., 1996), für Foamyviren konnte jedoch bisher kein RNA-Verpackungssignal identifiziert werden. Stattdessen wurde gezeigt, daß Deletionen der U5-Region, der PBS und der Leader-Region keinen Effekt auf die RNA-Inkorporation in Viruspartikel haben (Heinkelein et al., 2000a). Es ist aber unwahrscheinlich, daß ein einzelnes Verpackungssignal im 5' Bereich der CASII liegt, da es in diesem Fall nicht zu einer Differenzierung zwischen (prä)genomischer RNA und der mRNA von Pol käme. Außerdem spricht die Tatsache, daß bei Deletion des 3' Bereiches der CASII (nt 3874-4663) teilweise Spuren partikelassoziierter RNA nachweisbar waren, bzw. infektiöse Partikel gebildet wurden, gegen die Theorie eines einzelnen Verpackungssignals in diesem Bereich. Einige der Verpackungssequenzen der Orthoretroviren sind trotz intensiver Untersuchungen komplex und schwer zu definieren (Banks et al., 1997). Das Verpackungssignal von HIV-1 scheint z. B. aus mehreren Elementen im 5' Bereich des Virusgenoms zu bestehen, die in additiver Weise wirken (Berkowitz et al., 1996). Möglicherweise handelt es sich bei dem Verpackungssignal der Foamyviren ebenfalls um ein mehrteiliges additiv wirkendes Element. Weitere für die Verpackung der (prä)genomischen Virus-RNA notwendige Sequenzen könnten für die beobachtete minimale RNA-Verpackung bei Deletion der nt 3874-4663 verantwortlich sein. Außerdem könnten weitere Verpackungsequenzen eine Differenzierung zwischen genomischer und Pol-mRNA ermöglichen.

Eine andere Erklärung für die Reduktion des RNA-Gehaltes der Viruspartikel könnte die Bildung instabiler Virus-RNA, die vor einer Interaktion mit Gag und Pol zum großem Teil abgebaut wird, sein. In diesem Fall wäre es möglich, daß durch die Deletion der nt 3872-4664 ein RNA stabilisierendes Element entfernt wurde und die gebildete Virus-RNA ohne dieses Element im Zytoplasma schnell abgebaut wird. Ein Beispiel für ein solches Element ist ein 263 nt großes RNA-Fragment in HIV-1, das stromabwärts des RRE liegt und die virale RNA in Gegenwart von Rev zu stabilisieren scheint (Suptawiwat et al., 2003).

Ebenfalls möglich wäre, daß die Deletion in der CASII einen negativen Einfluß auf den Export der Virus-RNA aus dem Zellkern hat und somit ein Großteil der viralen RNA im Nukleus verbleibt. So besitzen wahrscheinlich alle einfachen Retroviren sogenannte konstitutive Transportelemente (CTEs), die den Transport von nicht vollständig gespleißter Virus-RNA aus dem Kern regulieren (Banks et al., 1997). Das CTE des MPMV z. B. liegt im 3' Bereich des Genoms zwischen env und der U3-Region (Bray et al., 1994). Eine

Deletion dieses Elementes führt dazu, daß keine ungespleißten viralen RNAs im Zytoplasma nachweisbar sind und demzufolge keine Replikation mehr stattfindet (Ernst et al., 1997). Gegen diese beiden Theorien sprechen die Ergebnisse des Versuchansatzes im pMH66-Hintergrund (3.2.2.1.1). Hier dienen die Konstrukte sowohl als Expressionsvektoren für Gag, als auch als Ausgangsvektoren für die Transkription einer verpackbaren RNA. Bei Deletion des 5' Bereiches der CASII ( $\Delta$ 3872-4664 in pKP10) wurde keine Reduktion der Expression des Gag-Proteins beobachtet (Abb. 18A: Spur 4), dies deutet auf die Produktion wildtypischer Mengen an Vektor-RNA hin, die ins Cytoplasma transportiert werden und dort ausreichend stabil für die Expression von Gag sind.

Ein erster möglicher Ansatz zur Klärung der Ursache des reduzierten RNA-Gehaltes in Viruspartikeln bei Deletion des 5' Bereiches der CASII, wäre eine vergleichende quantitative Analyse zytoplasmatischer und nukleärer Virus-RNA.

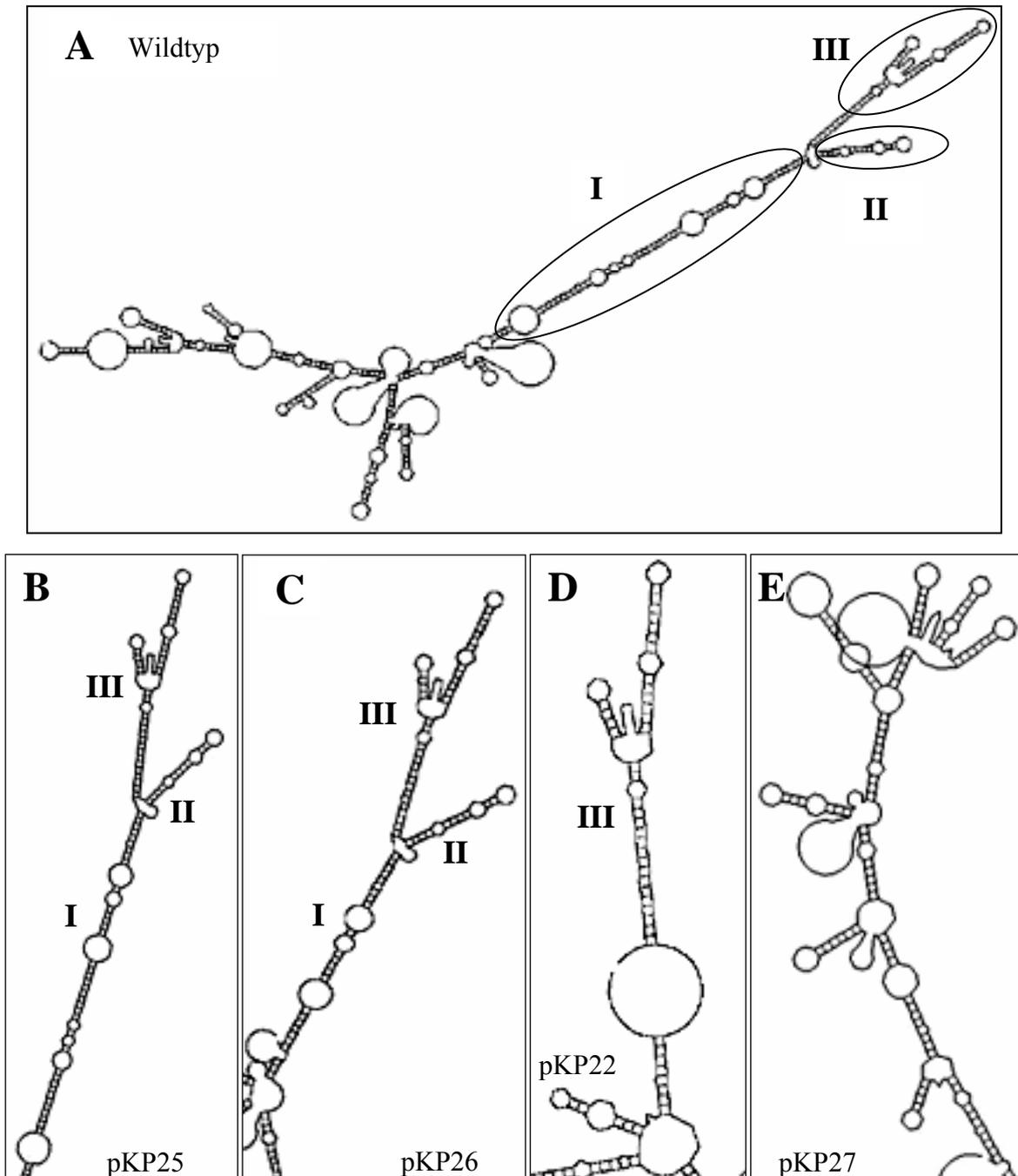
Diese Daten führen zu einem Modell, in dem die CASII in zwei Elemente mit unterschiedlichen Funktionen geteilt werden kann. Die 5' Region der CASII hat entscheidenden Einfluß auf den RNA-Gehalt des Viruspartikels, während die 3' Region ohne Einfluß auf den RNA-Gehalt, aber entscheidend für die Pol-Inkorporation ins Viruspartikel ist und somit als PES<sub>nt4884-5886</sub> bezeichnet werden kann. Zwischen diesen Elementen liegt eine kurze Sequenz für die keine cis-aktive Funktion nachweisbar war. Letzteres stimmt mit früheren Daten überein, die zeigen, daß diese ca. 200 internen Nukleotide nicht für einen effizienten Vektortransfer benötigt werden (Heinkelein et al., 1998). Dieses Modell erklärt auch die beobachteten Ergebnisse, daß bei einer Deletion der gesamten CASII eine Reduktion der RNA-Inkorporation auf ca. 20% und keine infektiösen Partikel nachgewiesen werden konnten (Heinkelein et al., 1998). Die Reduktion des RNA-Gehaltes der Partikel beruht auf der Deletion des 5' Bereiches der CASII. Da ebenfalls die PES<sub>nt4884-5886</sub> deletiert wurde, konnte kein Pol inkorporiert und somit keine infektiösen Partikel gebildet werden. Eine zweigeteilte Natur der CASII könnte auch die Diskrepanz zwischen den Größen der bisher definierten cis-aktiven Sequenzen im *pol*-Gen erklären. Die von Erlwein et al., 1998 ermittelte CASII stimmt ungefähr mit der PES<sub>nt4884-5886</sub> überein. Dies deutet darauf hin, daß die, durch die Deletion der nt 3874-4663 verursachte, verringerte RNA-Inkorporation und damit verbundene Reduktion der Bildung infektiöser Viruspartikel entweder durch den Versuchsaufbau nicht detektiert oder als nicht wesentlich angesehen wurde.

Die identifizierte PES konnte in einem weiteren Versuch zunächst auf 720 nt (nt 4884-5628) verkürzt werden (siehe 3.2.2.2). Beim Versuch, die 5' Grenze dieser PES<sub>nt4884-5628</sub> näher zu definieren, konnte für die 5' terminalen 100 nt keine cis-aktive Funktion nachgewiesen werden (pKP25:  $\Delta$ 4887-4980) (siehe 3.2.2.3). Wurden dagegen umfangreichere Mutationen (pKP22, pKP26, pKP27), die über das Nukleotid 4980 hinausgehen analysiert, so wurde eine zunehmende Reduktion der Gag-Prozessierung, der Pol-Inkorporation in das virale Partikel und der Transduktionsrate der gebildeten Viruspartikel beobachtet (Abb. 24A, 25, 27A & 28). Dabei zeigte keine der eingeführten Deletionen einen Einfluß auf den RNA-Gehalt der Viruspartikel.

Die Analyse des 3' Bereiches der CASII zeigte, daß ein für die Pol-Inkorporation essentieller Sequenzbereich ab dem Nukleotid 4980 beginnt, dessen schrittweise zunehmende Deletion in pKP22, pKP26 und pKP27 letztendlich zum kompletten Verlust von Gag-Prozessierung, Pol-Verpackung und Infektiosität in pKP27 führt.

Bei einer Analyse der sekundären RNA-Strukturen der PES<sub>nt4884-5628</sub> zeigen sich drei verschiedene Strukturelemente (Abb. 37: I, II & III). Alle drei Strukturen bleiben bei Deletion der 5' terminalen 100 nt ( $\Delta$ 4887-4980 in pKP25) erhalten. Bei Ausdehnung der Deletion auf 200 nt ( $\Delta$ 4887-5080 in pKP26) wird zunächst ein auffällig langer doppelsträngiger Paarungsbereich mit sieben internen Schleifen deutlich verkürzt (Abb 25: Vergleich B & C, Struktur I). Bei Deletion der Nukleotide 4884-5115 (in pKP22) ist dieser Paarungsbereich, ebenso wie das Strukturelement II, komplett verschwunden und bei einer weiteren Ausdehnung der Deletion auf die Nukleotide 4884-5180 (in pKP27) gehen alle drei Strukturelemente verloren. Da in Transfektionsansätzen mit pKP26 sowohl geringe Mengen infektiöser Partikel, als auch eine geringe Gag-Prozessierung, Pol-Inkorporation jedoch nur vereinzelt beobachtet werden konnte, führt dies zu einem Modell, in dem der auffallend lange Paarungsbereich der RNA einschließlich der sieben Schleifen an der Pol-Inkorporation beteiligt ist und zu der Annahme, daß eine Verkürzung dieses Bereiches zu verminderter oder schwächerer Pol-Bindung führt.

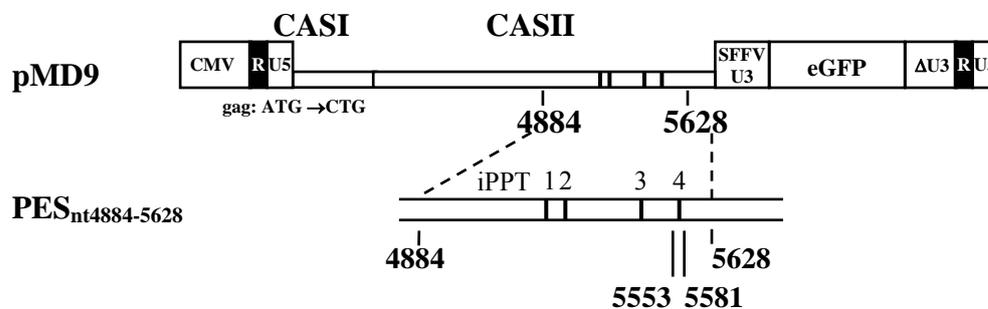
Ohne eine weitere Analyse der RNA-Sekundärstrukturen, z. B. über die Einführung von Punktmutationen, die gezielt einzelne Strukturelemente zerstören, ist jedoch keine Aussage darüber möglich, welches der Strukturelemente die Pol-Verpackung ins foamyvirale Partikel vermittelt.



**Abb. 37: RNA-Sekundärstrukturen verschiedener Deletionen in CASII**

Die RNA-Strukturen wurden mit Hilfe des mfold-Programms (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna>) ermittelt (siehe 2.3.5.3). Dargestellt sind jeweils die Strukturen mit der größten freien Energie. (A) Struktur der  $PES_{nt4884-5628}$  mit Rahmen um den Bereich, der in den Ausschnitten (B), (C) und (D) für die Nukleotide 4980-5628 (in pKP25), 5080-5628 (in pKP26) und 5115-5628 (in pKP22) dargestellt ist. (I), (II), (III) RNA-Strukturelemente, die mit zunehmenden Deletionen verloren gehen.

Der 3' Bereich der PES<sub>nt4884-5628</sub> enthält vier interne Polypurintrakte (Abb. 38), von denen einer möglicherweise als zweiter Initiationsort der Plusstrangsynthese dient. Frühere Analysen der CASII zeigten, daß eine Deletion des vierten iPPT Gentransduktion gestattet (Erlwein et al., 1998; Heinkelein et al., 1998; Kupiec et al., 1988; Tobaly-Tapiero et al., 1991). Allerdings führt diese Deletion auch zu einer Reduktion der Transduktionseffizienz auf ca. 50% (Heinkelein et al., 1998). Aus diesem Grund wurde zur Analyse des 3' Bereiches der PES<sub>nt4884-5628</sub> zunächst der gesamte Bereich 3' der iPPTs (pKP28: Δ5582-5886) und in einer zweiten Deletion der vierte iPPT entfernt (pKP29: Δ5553-5886). In einer dritten und vierten Deletion wurden weitere Sequenzen des 3' Bereiches der CASII und damit auch der dritte iPPT entfernt (Abb. 29 & Abb. 38).



**Abb. 38: Schematische Darstellung der PES<sub>nt4884-5628</sub> und der darin enthaltenen iPPT**

Dargestellt ist der Vektor pMD9 und die PES<sub>nt4884-5628</sub>. Die angegebenen Zahlen beziehen sich auf die Nukleotide nach Transkriptionsstart von PFV. (CMV) Cytomegalievirus Promotor/Enhancer; (iPPT) interne Polypurintrakte 1-4; (SFFV U3) U3-Region des spleen focus forming virus; (eGFP) enhanced green fluorescent protein; (ΔU3) teilweise deletierte U3-Region

Alle untersuchten 3' terminalen Deletionen der PES<sub>nt4884-5628</sub> inkorporierten Pol in signifikanten Mengen (Abb. 30A). Die FACS-Analyse zeigte allerdings, entsprechend den veröffentlichten Daten, eine auf die Hälfte reduzierte Transduktionseffizienz für alle Konstrukte ohne den vierten iPPT (Abb. 31). Eine Ausdehnung der Deletion auf den dritten iPPT (in pKP30 und pKP31), dagegen hatte keinen weiteren Einfluß auf die Infektiosität. Diese Versuchsreihe legt nahe, daß die in diesem Bereich liegenden iPPT einen Einfluß auf die Infektiosität haben. Der ursprünglich beschriebene vierte iPPT (Kupiec et al., 1988; Topaly-Tapiero et al., 1991) scheint dabei die wesentliche Struktur zu sein. In dem Bereich der nt 5351-5628 konnten keine Sequenzen gefunden werden, die einen wesentlichen Einfluß auf die Pol-Inkorporation ins virale Partikel zeigen. Daher

erlaubt diese Versuchsreihe die Eingrenzung der für die Pol-Verpackung essentiellen Sequenz (PES<sub>nt4884-5628</sub>) 3' terminal um ca. 280 nt auf die Nukleotide 4884-5351.

Die Strukturanalyse der RNA zeigt, daß alle drei zuvor identifizierten Sekundärstrukturelemente in allen Konstrukten enthalten bleiben (Daten nicht gezeigt).

Es gibt Hinweise auf ein konstitutives RNA-Transport-Element in der CASII (Wodrich et al., 2001). Der 3' Bereich der CASII ist scheinbar orientierungsspezifisch fähig, die nukleäre Restriktion von HIV RNAs aufzuheben (Wodrich et al., 2001). Eine Deletion im 3' Bereich der CASII (pKP11) ergab in den durchgeführten Versuchen jedoch weder einen Einfluß auf den Virus-RNA-Gehalt viraler Partikel (Abb. 18B: Ansatz 8), noch auf die Gag-Expression von zytoplasmatischer genomischer RNA (Abb. 18A: Spur 11). Da die Transkription, der RNA-Transport ins Zytoplasma und die Gag-Expression Voraussetzungen für die RNA-Verpackung sind, sprechen diese Ergebnisse gegen die Existenz eines für Foamyviren essentiellen RNA-Transport-Elements in diesem Bereich.

Aufgrund theoretischer Überlegungen wurde bisher davon ausgegangen, daß, ähnlich den Hepadnaviren, nur wenige Pol-Moleküle im foamyviralem Partikel vorhanden sind (Bartenschlager et al., 1992; Böttcher et al., 1997; Boyer et al., 2004; Conway et al., 1997; Rinke et al., 2002). Ein Hinweis darauf wird in der Tatsache gesehen, daß die Reverse Transkriptase/RNaseH von PFV *in vitro* deutlich aktiver als die von HIV-1 ist (Boyer et al., 2004; Rinke et al., 2002). Kürzlich wurden jedoch Daten publiziert, die ein Gag/Pol-Verhältnis ähnlich dem von Orthoretroviren nahelegen (Cartellieri et al., 2005a). In jener Studie wurde das relative Verhältnis von Gag- zu Pol-Proteinen ermittelt aber nicht die absolute Anzahl der Pol-Moleküle im Viruspartikel bestimmt. Legt man jedoch Zahlen von 2000-5000 Gag-Molekülen pro orthoviralem Virion auch für Foamyviren zugrunde, würden PFV-Virionen etwa 100-300 Pol-Proteine enthalten (Benjamin et al., 2005; Briggs et al., 2003 & 2004; Parker et al., 2001). Eine Inkorporation solcher Mengen an Pol-Proteinen ist durch eine einfache Bindung an die PES kaum denkbar. Es ist aber vorstellbar, daß mehrere Pol-Moleküle an die ermittelten Strukturelemente in der RNA binden. Möglicherweise kommt es auch durch Protein-Protein-Interaktionen zur Bildung größerer Komplexe. Ein Beispiel hierfür wäre das Rev-Protein von HIV-1. Rev bindet an die RNA des RRE-Elementes und anschließend folgt eine Multimerisierung des Proteins vermittelt durch Protein-Protein- und Protein-RNA-Interaktionen (Iwai et al., 1992; Malim & Cullen, 1990 & 1991; Malim et al., 1990; McDonald et al., 1992). Ein ähnliches Modell

könnte erklären, warum es bei Deletion der nt 4887-5080 (in pKP26) und einer damit verbundenen Verkürzung der charakteristischen doppelsträngigen RNA-Struktur in CASII (Abb. 25: Vergleich der Struktur I in A und C) zu einer deutlich verringerten Partikelinkorporation des Pol-Proteins kommt. Auch ein Einfluß von Gag-Pol-Interaktionen oder einer Kombination von Pol-Pol- und Gag-Pol-Interaktionen kann nicht ausgeschlossen werden.

Cartellieri et al., 2005a haben das Verhältnis von Gag zu Pol mit einem Vollängenklon des PFV analysiert, wohingegen in der vorliegenden Arbeit mit einer subgenomischen RNA gearbeitet wurde. Für die Suche nach minimalen (prä)genomischen RNA-Sequenzen für die Pol-Verpackung ist eine subgenomische RNA ausreichend, das PFV-Genom enthält jedoch möglicherweise außerhalb von CASI und CASII weitere Elemente, die die Partikelinkorporation des Pol-Proteins verstärken. Eventuell ermöglicht eine initiale Bindung des Pol-Proteins an die PES die Bindung von Pol an weitere Elemente außerhalb der CAS. Dies könnte erklären, wie es möglich ist, daß die relativ kurzen PES die Inkorporation von 100-300 Pol-Molekülen vermitteln können.

Faßt man die Ergebnisse der Analyse der CASII zusammen, so ergibt dies eine wahrscheinliche Eingrenzung der PES auf den Bereich zwischen den Nukleotiden 4980-5351. Dieser Bereich weist auch in der Sekundärstrukturanalyse der RNA die bereits erwähnten drei Strukturelemente auf (Daten nicht gezeigt).

Während die 5' Grenze der wahrscheinlichen PES<sub>nt4980-5351</sub> relativ klar definiert ist, ist die 3' Grenze noch offen und kann möglicherweise noch weiter eingegrenzt werden. Ebenfalls möglich wäre es, anhand der RNA-Strukturanalyse Punktmutationen einzuführen um zu überprüfen, ob die in dieser Arbeit vorgeschlagenen Sekundärstrukturen wirklich an der Pol-Inkorporation beteiligt sind. Im Rahmen solcher Arbeiten wäre es sinnvoll, eine Möglichkeit der Quantifizierung der detektierten Proteine zu etablieren, um die Mengen an partikelassoziiertem Pol-Protein besser vergleichen und genauere Aussagen treffen zu können. Ebenfalls interessant wäre eine Analyse zum Einfluß des Abstandes zwischen den beiden CAS-Elementen auf die RNA- und Pol-Verpackung. So bilden z. B. Vektoren, die eine Reporterenkassette zwischen CASI und CASII tragen bis zu 90% weniger infektiöse Partikel (Heinkelein et al., 2002a).

### ***4.3 Untersuchung der Proteinvoraussetzungen für die Pol-Inkorporation***

In dieser Arbeit wurde zunächst der Mechanismus der Pol-Inkorporation ins Viruspartikel untersucht und dies führte zu einem Modell in dem die Verpackung des Pol-Proteins durch Interaktionen mit der viralen RNA vermittelt wird. Anschließend wurden die für diese Interaktion wichtigen Sequenzbereiche der (prä)genomischen Virus-RNA näher bestimmt. Im nächsten Schritt wurde der Frage nach den Voraussetzungen auf Ebene des Pol-Proteins für die erfolgreiche Inkorporation in das Viruspartikel nachgegangen.

Das Pol-Protein der Foamyviren gleicht im Aufbau dem der Orthoretroviren. Es wird als ein Vorläuferprotein gebildet. Dieses ist mit einer aminoterminalen Protease (PR), gefolgt von einer Reversen Transkriptase, einschließlich der RNaseH-Aktivität (RT) und einer carboxyterminalen Integrase (IN) ausgestattet. Dieses Vorläuferprotein wird autokatalytisch in zwei – nicht drei wie in Orthoretroviren - Untereinheiten gespalten: Die 85 kD große PR/RT- und die 40 kD große IN-Untereinheit (Kögel et al., 1995a; Löchelt & Flügel, 1996; Netzer et al., 1993). Die für die Bildung infektiöser Partikel notwendige Prozessierung von Gag erfolgt wahrscheinlich während des Partikelzusammenbaus durch die virale Protease (Enssle et al., 1997; Giron et al., 1997). Zusammen mit der Tatsache, daß die reverse Transkription in Foamyviren bereits in der Produzentenzelle stattfindet (Moebes et al., 1997; Roy et al, 2003; Yu et al., 1996b & 1999), spricht dies für eine Aktivierung und Prozessierung des Pol-Proteins in der virusproduzierenden Zelle. Daraus ergibt sich die Frage, ob die Untereinheiten einzeln oder aber als Vorläuferprotein mit der RNA interagieren und in das Viruspartikel verpackt werden. Einen ersten Hinweis auf die Antwort dieser Frage ergab die Analyse des Mechanismus der Pol-Inkorporation ins foamyvirale Partikel (siehe 3.1 & 4.1). Hier konnte nur in Anwesenheit von RNA eine effiziente Pol-Spaltung beobachtet werden. Dies führt zu der Vermutung, daß das Vorläuferprotein mit der (prä)genomischen RNA interagiert und es erst nach dieser Interaktion zur Proteolyse des Pol-Proteins kommt (siehe 4.1). Daraus wiederum ergibt sich die Frage, ob die Interaktion von Pol mit der RNA durch eine der Untereinheiten oder durch das Vorläuferprotein selbst vermittelt wird.

Um diesen Fragen nachzugehen, wurde wiederum im Vier-Plasmidsystem gearbeitet und das Pol-Expressionskonstrukt durch Expressionsplasmide für eine oder beide Untereinheiten des Pol-Proteins ausgetauscht (Imrich et al., 2000). Die Proteinanalyse zeigte, daß einzeln exprimierte Untereinheiten des Pol-Proteins nicht im Viruspartikel

nachweisbar waren. Auch eine Koexpression von RT und IN lies keinen Nachweis der Untereinheiten im Partikel zu (Abb. 33: Spuren 19, 22 & 25).

Weiterhin wurde der Einfluß der Enzymaktivitäten untersucht. Bereits bekannt war, daß die Aktivität der Protease für die Inkorporation des PFV Pol-Proteins entbehrlich ist (Baldwin & Linial, 1999). Um dies für unseren Versuchsaufbau zu bestätigen und einen möglichen Einfluß der Aktivität der Reversen Transkriptase und der Integrase auf die Pol-Inkorporation auszuschliessen, wurde die Partikelinkorporation von Pol-Proteinen mit Mutationen der aktiven Zentren der Enzyme analysiert. Hierbei konnte gezeigt werden, daß keine der eingeführten Mutationen der aktiven Zentren der Enzyme die Inkorporation des Proteins in das Viruspartikel stört (Abb. 35).

Außerdem wurde deutlich, daß die An- oder Abwesenheit von Gag keinen signifikanten Einfluß auf die Proteolyse von Pol hatte (Abb. 35: Vergleich der Spuren 3 & 4), wohingegen ohne Virus-RNA eine deutlich reduzierte Pol-Spaltung beobachtet werden konnte (Abb. 35: Spuren 2; 5, 7 & 9). Dies unterstützt das in 4.1 aufgestellte Modell in dem das Pol-Vorläuferprotein unabhängig von Gag mit der RNA interagiert und diese Interaktion die Spaltung des Proteins in seine Untereinheiten erleichtert.

Diese Ergebnisse zeigen, daß das Vorläuferprotein unabhängig von den bekannten enzymatischen Aktivitäten der Protease, Reversen Transkriptase und Integrase die Partikelinkorporation von Pol vermittelt. Auch in Hepadnaviren ist die enzymatische Aktivität des P-Proteins für die Interaktion mit der prägenomischen RNA nicht notwendig; eine intakte Struktur des P-Proteins ist jedoch essentiell (Pollack & Ganem, 1994; Wang et al., 1994).

Obwohl eine Bindung an die RNA Voraussetzung für die reverse Transkription ist, gelang für die Reverse Transkriptase-Untereinheit kein Nachweis der Partikelinkorporation. Eine Erklärung hierfür könnte eine in 4.2 diskutierte Multimerisierung von Pol sein. Möglicherweise bindet die RT-Untereinheit an die RNA und die IN-Untereinheit vermittelt eine Multimerisierung des Proteins, ähnlich dem Rev-Protein von HIV. In Rev sind das Bindungs- und das Multimerisierungsmotiv des Proteins zwar benachbart, aber nicht miteinander identisch (Malim & Cullen, 1991). Die RT-Untereinheit könnte in diesem Modell zwar an die RNA binden, aber nicht multimerisieren und dies würde dazu führen, daß nur sehr wenige Moleküle der RT in das Viruspartikel verpackt werden. Diese geringe

Anzahl an RT-Molekülen wäre wahrscheinlich im Western Blot nicht nachzuweisen und würde eventuell auch nicht für eine detektierbare Spaltung des Gag-Proteins ausreichen. Kürzlich veröffentlichte Daten ergaben für die beiden Pol-Untereinheiten in hochgradig gereinigten foamyviralen Partikeln ein relatives Verhältnis von ungefähr einem RT- zu zwei IN-Molekülen (Cartellieri et al., 2005a). Dies scheint dem dargestellten Ergebnis, daß das Vorläuferprotein die Partikelinkorporation des Pol-Proteins vermittelt, zu widersprechen. Eine mögliche Erklärung könnte die bereits in der Produzentenzelle stattfindende reverse Transkription der Foamyviren sein (Moebs et al., 1997; Roy et al., 2003; Yu et al., 1999). Wäre die reverse Transkription vor der Fertigstellung des Viruskapsid abgeschlossen, so könnte sich die RT-Untereinheit vom Genom lösen und nur teilweise im Virion verbleiben. Die Integrase hingegen müßte aktiv in das Virion eingebaut werden, da sie im weiteren Replikationsverlauf noch benötigt wird. Es gibt zwar Hinweise auf die Notwendigkeit von Gag für die reverse Transkription (Enssle et al., 1997; Heinkelein et al., 2000b), aber keinen darauf, daß die RT-Reaktion im vollständig ausgebildeten Viruskapsid stattfindet.

Aus denen in dieser Arbeit ermittelten Daten läßt sich folgendes Modell der Pol-Inkorporation in foamyvirale Partikel entwickeln: Das Pol-Vorläuferprotein bindet an die virale RNA und hierfür sind die PES<sub>nt318-345</sub> und PES<sub>nt4980-5351</sub> notwendig. Diese Bindung ermöglicht die Pol-Inkorporation in das Viruspartikel über die Interaktion zwischen der viralen RNA und Gag. Möglicherweise wird die RNA-Gag-Interaktion durch Wechselwirkungen zwischen den Proteinen Gag und Pol verstärkt. Die Pol-RNA-Interaktion erleichtert, wahrscheinlich unabhängig von Wechselwirkungen mit Gag, die Proteolyse von Pol und es kommt im sich bildenden Kapsid zur reversen Transkription und zur Spaltung von Gag.

Dieses Modell spiegelt einmal mehr die Mittelstellung der Foamyviren zwischen den Orthoretroviren und den Hepadnaviren wider. Ähnlich den Orthoretroviren ist die Interaktion zwischen Gag und RNA ausreichend für die Verpackung der Foamyvirus-RNA ins Partikel (Baldwin & Linial, 1999; Berkowitz et al., 1993; Clever et al., 1995). Andererseits ist die Interaktion zwischen RNA und Pol sowohl in Hepadnaviren (Bartenschlager et al., 1990; Bartenschlager & Schaller, 1992; Hirsch et al., 1990), als auch in Foamyviren notwendig für die Partikelinkorporation des Pol-Proteins und anschließende reverse Transkription.

## 5 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
- Ali M., Taylor G. P., Pitman R. J., Parker D., Rethwilm A., Cheinsong-Popov R., Weber J. N., Bieniasz P. D., Bradley J. & McClure M. O. (1996):** No evidence of antibody to human foamy virus in widespread human populations. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 12, 1473-1483
- Baldwin D. N. & Linial M. L. (1998):** The roles of pol and env in the assembly of human foamy virus. *J. Virol.* 72, 3658-3665
- 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, 6378-6393
- Baltimore D. (1970):** RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226, 1209-1211
- Banks J. D., Beemon K. L. & Linial M. L. (1997):** RNA regulatory elements in the genomes of simple retroviruses. *Seminars in Virology* 8, 194-204
- Barre-Sinoussi F., Cherman J. C., Rey F., Nugeyre M. T., Chamaret S., Gruest J., Dauguet C., Axler-Blin C., Vezinet-Brun F., Rouzioux C., Rozenbaum W. & Montagnier L. (1983):** Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome. *Science* 220, 868-871
- Bartenschlager R., Junker-Niepmann M. & Schaller H. (1990):** The P gene product of hepatitis B virus is required as a structural component for genomic RNA encapsidation. *J. Virol.* 64, 5324-5332
- Bartenschlager R. & Schaller H. (1992):** Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome. *EMBO* 11, 3413-3420
- Baunach G., Maurer B., Hahn H., Kranz M. & Rethwilm, A. (1993):** Functional analysis of human foamy virus accessory reading frames. *J. Virol.* 67, 5411-5418
- Berkowitz R. D., Luban J. & Goff S. P. (1993):** Specific binding of human Immunodeficiency virus type 1 gag polyprotein and nucleocapsid protein to viral RNAs detected by RNA mobility shift assays. *J. Virol.* 67, 7190-7200
- Berkowitz R., Fisher J. & Goff S. P. (1996):** RNA-Packaging. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 214, 177-218
- Bieniasz P. D., Rethwilm A., Pitman R., Daniel M. D., Chrystie I. & McClure M. O. (1995):** A comparative study of higher primate foamy viruses, including a new virus from gorilla. *Virology* 207, 217-228
- Birnboim H. C. & Doley J. (1970):** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523
- 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, 9024-9027
- Bodem J., Motomi Z. & Flügel R. M. (1998):** Nuclear localization of the functional bel 1 transactivator but not of the gag proteins of the feline foamy virus. *Virology* 251, 22-27
- Böttcher B., Wynne S. A. & Crowther R. A. (1997):** Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy. *Nature* 386, 88-91

- Boneva R. S., Grindon A. J., Orton S. L., Switzer W. M., Shanmugan V., Hussain A. I., Bhullar J. E., Chamberland M. E., Heneine W., Folks T. M. & Chapman L. E. (2002):** Simian foamy virus infection in a blood donor. *Transfusion* 42, 886-891
- Boyer P. L., Stenbak C. R., Clark P. K., Linial M. L. & Hughes S. H. (2004):** Characterization of the polymerase and RNase H activities of human foamy virus reverse transcriptase. *J. Virol.* 78, 6112-6121
- Briggs J. A. G., Wilk T., Welker R., Kräusslich H. G. & Füller S. D. (2003):** Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *EMBO* 22, 1707-1715
- Briggs J. A. G., Simon M. N., Gross I., Kräusslich H. G., Füller S. D., Vogt V. M. & Johnson M. C. (2004):** The stoichiometry of gag protein in HIV-1. *Nature Structural & Molecular Biology* 11, 672-675
- Bukrinsky M. I., Sharova N., Dempsey M. P., Stanwick T. L., Bukrinskaya A. G., Haggerty S. & Stevenson M. (1992):** Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6580-6584
- Cain D., Erlwein O., Grigg A., Russell R. A. & McClure M. (2001):** Palindromic sequence plays a critical role in human foamy virus dimerization. *J. Virol.* 75, 3731-3739
- Campbell M., Renshaw-Gegg L., Renne R. & Luciw P. A. (1994):** Characterization of the internal promoter of simian foamy virus. *J. Virol.* 68, 4811-4820
- 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, 44-50
- 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, 12464-12476
- Chang L. J., Pryciak P., Ganem D. & Varmus H. E. (1989):** Biosynthesis of the reverse transcriptase of hepatitis B viruses involves *de novo* translational initiation not ribosomal frameshifting. *Nature* 337, 364-368
- Charneau P., Alizon M. & Clavel F. (1992):** A second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication. *J. Virol.* 66, 2814-2820
- Clever J., Sasseti C. & Parslow T. G. (1995):** RNA secondary structure and binding sites for gag gene products in the 5' packaging signal of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 69, 2101-2109
- Conticello S. G., Harris R. S. & Neuberger M. S. (2003):** The Vif protein of HIV triggers degradation of the human antiretroviral DNA deaminase APOBES3G. *Curr. Biol.* 13; 2009-2013
- Conway J. F., Cheng N., Zlotnick A., Wingfield P. T., Stahl S. J. & Steven A. C. (1997):** Visualization of the 4-helix bundle in the hepatitis B virus capsid by cryo-electron microscopy. *Nature* 386, 91-94
- Delelis O., Saib A. & Sonigo P. (2003):** Biphasic DNA synthesis in spumaviruses. *J. Virol.* 77, 8141-8146
- Doms R. W., Earl P. L., Chakrabarti S. & Moss B. (1990):** Human immunodeficiency virus types 1 and 2 and simian immunodeficiency virus env proteins possess a functionally conserved assembly domain. *J. Virol.* 64, 3537-3540
- DuBridg 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, 13865-13870
- Eastman S. W. & Linial M. L. (2001):** Identification of a conserved residue of foamy virus gag required for intracellular capsid assembly. *J. Virol.* 75, 6857-6864
- Einfeld D. & Hunter E. (1988):** Oligomeric structure of a prototype retrovirus glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8688-8692
- Enssle J., Jordan I., Mauer B. & Rethwilm A. (1996):** Foamy virus reverse transcriptase is expressed independently from the Gag protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 4137-4141
- Enssle J., Fischer N., Moebes A., Maurer B., Smola U. & Rethwilm A. (1997):** Carboxy-terminal cleavage of the human foamy virus Gag precursor molecule is an essential step in the viral lifecycle. *J. Virol.* 71, 7312-7317
- Enssle J., Moebes A., Heinkelein M., Panhuysen M., Mauer B., Schweizer M., Neumann-Haefelin D. & Rethwilm A. (1999):** An active foamy virus integrase is required for virus replication. *J. Gen. Virol.* 80, 1445-1452
- Erlwein O. & Rethwilm A. (1993):** Bel-1 transactivator responsive sequences in the long terminal repeat of human foamy virus. *Virology* 196, 256-268
- Erlwein O., Cain D., Fischer N., Rethwilm A. & McClure M. O. (1997):** Identification of sites that act together to direct dimerization of human foamy virus RNA *in vitro*. *Virology* 229, 251-258
- Erlwein O., Bieniasz P. D. & McClure M. O. (1998):** Sequences in pol are required for transfer of human foamy virus -based vectors. *J. Virol.* 72, 5510-5516
- Ernst R. K., Bray M., Rekosh D. & Hammarskjöld M. L. (1997):** A structured retroviral RNA element that mediates nucleocytoplasmic export of intron containing RNA. *Mol. Cell. Biol.* 17, 135-144
- Falcone V., Leupold J., Clotten J., Urbanyi E., Herchenröder O., Spatz W., Volk B., Böhm N., Toniolo A., Neumann-Haefelin D. & Schweizer M. (1999):** Sites of simian foamy virus persistence in naturally infected african green monkeys: latent provirus is ubiquitous, whereas viral replication is restricted to the oral mucosa. *Virology* 257, 7-14
- Falcone V., Schweizer M. Neumann-Haefelin D. (2003):** Replication of primate foamy viruses in natural and experimental hosts. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 277, 161-180
- 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, 1610-1615
- Flügel R. M. & Pfrepper K.I. (2003):** Proteolytic processing of foamy virus gag and pol proteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 277, 63-88
- Geiselhart V., Bastone P., Kempf T., Schnolzer M. & Lochelt M. (2004):** Furin-mediated cleavage of the feline foamy virus env leader protein. *J. Virol.* 78, 13573-13581
- Giron M.-L., Colas S., Wybier J., Rozain F. & Emanoil-Ravier R. (1997):** Expression and maturation of human foamy virus gag precursor polypeptides. *J. Virol.* 71, 1635-1639
- Goepfert P. A., Wang G. & Mulligan, M. J. (1995):** Identification of an ER retrieval signal in a retroviral glycoprotein. *Cell* 82, 543-544

- Goepfert P. A., Shaw K. L., Ritter G. D. & Mulligan M. J. (1997):** A sorting motif localizes the foamy virus glycoprotein to the endoplasmatic reticulum. *J. Virol.* 71, 778-784
- Goepfert P. A., Shaw K., Wang G., Bansal A., Edwards B. H. & Mulligan M. J. (1999):** An endoplasmatic reticulum retrieval signal partitions human foamy virus maturation to intracytoplasmatic membranes. *J. Virol.* 73, 7210-7217
- Göttlinger H. G., Dorfman T., Sodroski J. G. & Haseltine W. A. (1991):** Effect of mutations affecting the p6b gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 3195-3199
- Goff S. P. (2001):** Retroviridae: The retroviruses and their replication. In: *Fields - Virology*, Fourth Edition; Knipe D. M., Howley P. M., Griffin D. E., Lamb R. A., Martin M. A., Roizman B. & Straus S. E.; Lippincott Williams & Wilkins; 1871-1939
- Grinde B., Cameron C. E., Leis J., Weber I. T., Wlodawer A., Burstein H. & Skalka A. M. (1992):** Analysis of substrate interactions of the rous sarcoma virus wild type and mutant proteases and human immunodeficiency virus-1 protease using a set of systematically altered peptide substrates. *J. Biol. Chem.* 267, 9491-9498
- Hahn H., Baunach G., Bräutigam S., Mergia A., Neumann-Haefelin D., Daniel M. D., McClure M. O. & Rethwilm A. (1994):** Reactivity of primate sera to foamy virus Gag and bet Proteins. *J. Gen. Virol.* 75, 2635-2644
- 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, 3487-3497
- Hayman M. J. (1978):** Viral polyproteins in chick embryo fibroblasts infected with Avian Sarcoma Leukosis Viruses. *Virology* 85, 241-252
- He F., Blair W. S., Fukushima J. & Cullen, B. (1996):** The human foamy virus bel-1 transcription factor is a sequence specific DNA binding protein. *J. Virol.* 70, 3902-3908
- Heinkelein M., Schmidt M., Fischer N., Moebes A., Lindemann D., Enssle J. & Rethwilm A. (1998):** Characterization of a *cis*-acting sequence in the *pol* region required to transfer human foamy virus vectors. *J. Virol.* 72, 6307-6314
- Heinkelein M., Thurow J., Dressler M., Imrich H., Neumann-Haefelein D., McClure M. O. & Rethwilm A. (2000a):** Complex effects of deletions in the 5' untranslated region of primate foamy virus on viral gene expression and RNA packaging. *J. Virol.* 74, 3141-3148
- Heinkelein M., Pietschmann T., Jarmy G., Dressler M., Imrich H., Thurow J., Lindemann D., Bock M., Moebes A., Roy J., Herchenroeder O. & Rethwilm, A. (2000b):** Efficient intracellular retrotransposition of an exogenous primate retrovirus genome. *EMBO J.* 19, 3436-3455
- Heinkelein M., Dressler M., Jarmy G., Rammling M., Imrich H., Thurow J., Lindemann D. & Rethwilm A. (2002a):** Improved primate foamy virus vectors and packaging constructs. *J. Virol.* 76, 3744-3784
- Heinkelein M., Leurs C., Rammling M., Peters K., Hanenberg H. & Rethwilm A. (2002b):** Pregenomic RNA is required for efficient incorporation of pol polyprotein into foamy virus capsids. *J. Virol.* 76, 10069-10073
- Henderson L. E., Krutzsch H. C. & Oroszlan S. (1983):** Myristyl amino-terminal acylation of murine retrovirus proteins: An unusual post-translational protein modification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 339-343

- Heneine W., Switzer W. M., Sandstrom P., Brown J., Vedapuri S., Schable C. A., Khan A. S., Lerche N. W., Schweizer M., Neumann-Haefelin D., Chapman L. E. & Folks T. M. (1998):** Identification of a human population infected with simian foamy viruses. *Nat. Med.* 4, 403-407
- Heneine W., Schweizer M., Sundstrom P. & Folks T. (2003):** Human infection with foamy viruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 277, 181-196
- Herchenröder O., Renne R., Loncar D., Cobb E. K., Murthy K. K., Schneider J., Mergia A. & Luciw P. A. (1994):** Isolation, cloning and sequencing of simian foamy viruses from chimpanzees (SFVcpz): high homology to human foamy virus (HFV). *Virology* 201, 187-199
- Hill C. L., Bieniasz P. D. & McClure M. O. (1999):** Properties of human foamy virus relevant to its development as a vector for gene therapy. *J. Gen. Virol.* 80, 2003-2009
- 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, 2177-2182
- Hooks J. J. & Gibbs C. J. (1975):** The foamy viruses. *Bacteriological Reviews* 39, 169-185
- Hu J. & Seeger C. (1996):** Hsp90 is required for the activity of a hepatitis B virus reverse transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 1060-1064
- Hu J., Toft T. & Seeger C. (1997):** Hepadnavirus assembly and reverse transcription require a multi-component chaperone complex which is incorporated into nucleocapsids. *EMBO* 16, 59-68
- Huang M., Orenstein J. M., Martin M. A. & Freed E. O. (1995):** P6<sup>gag</sup> is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. *J. Virol.* 69, 6810-6818
- Imrich H., Heinkelein M., Herchenröder O. & Rethwilm, A. (2000):** Primate foamy virus Pol proteins are imported into the nucleus. *J. Gen. Virol.* 81, 2941-2947
- Iwai S., Pritchard C., Mann D. A., Karn J. & Gait M. J. (1992):** Recognition of the high affinity binding in rev-response element RNA by the human immunodeficiency virus type-1 rev protein. *Nucl. Acids Res.* 20, 6465-6472
- Jacks T. & Varmus H. E. (1985):** Expression of the Rous sarcoma virus pol gene by ribosomal frameshifting. *Science* 230, 1237-1242
- 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. USA* 84, 4298-4302
- Jamjoom G. A., Naso R. B. & Arlinghaus R. B. (1977):** Further characterization of intracellular precursor polyproteins of Rauscher Leukemia Virus. *Virology* 78, 11-34
- 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
- Jones T. A., Blaug G., Hansen M. & Barklis E. (1990):** Assembly of gag-beta-galactosidase proteins into retrovirus particles. *J. Virol.* 64, 2265-2279
- 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, 314-319
- Kang Y., Blair W. S. & Cullen B. R. (1998):** Identification and functional characterization of a high-affinity bel-1 DNA binding site located in the human foamy virus internal promoter. *J. Virol.* 72, 504-511

- Kang Y. & Cullen B. R. (1998):** Derivation and functional characterization of a consensus DNA binding sequence for the *tas* transcriptional activator of simian foamy virus type 1. *J. Virol.* 72, 5502-5509
- Kaplan A. H. & Swanstrom R. (1991):** The HIV-1 *gag* precursor is processed via two pathways: the implications for cytotoxicity. *Biomed. Biochim. Acta.* 50, 647-653
- Karacostas V., Wolffe E. J., Nagashima K., Gondy M. A. & Moss B. (1993):** Overexpression of the HIV-1 *gag-pol* polyprotein results in intracellular activation of HIV-1 protease and inhibition of assembly and budding of virus-like particles. *Virology* 193, 661-671
- Katoh I., Ikawa Y. & Yoshinaka Y. (1989):** Retrovirus protease characterized by a dimeric aspartic proteinase. *J. Virol.* 63, 2226-2232
- Keller A., Partin K. M., Lochelt M., Bannert H., Flügel R. M. & Cullen B. R. (1991):** Characterization of the transcriptional trans activator of human foamy retrovirus. *J. Virol.* 65, 2589-2594
- Kögel D., Aboud M. & Flügel R. M. (1995a):** Mutational analysis of the reverse transcriptase and ribonuclease H domains of the human foamy virus. *Nucleic Acids Research* 23, 2621-2625
- Kögel D., Aboud M. & Flügel R. M. (1995b):** Molecular biological characterization of the human foamy virus reverse transcriptase and ribonuclease H domains. *Virology* 213, 97-108
- Konvalinka J., Löchelt M., Zentgraf H., Flügel R. M. & Kräusslich H.-G. (1995):** Active foamy virus proteinase is essential for virus infectivity but not for formation of a *pol* polyprotein. *J. Virol.* 69, 7264-7268
- Kulkosky J., Jones K. S., Katz R. A., Mack J. P. & Skalka A. M. (1992):** Residues critical for retroviral integrative recombination in a region that is highly conserved among retroviral/retrotransposon integrases and bacterial insertion sequence transposases. *Mol. Cell. Biol.* 12, 2331-2338
- Kupiec J.-J., Tobaly-Tapiero J., Canivet M., Santilliana-Hayat M., Flügel R. M., Peries J. & Emanoil-Ravier R. (1988):** Evidence for a gapped linear duplex DNA intermediate in the replicative cycle of human and simian spumavirus. *Nucleic Acids Research* 19, 9557-9565
- 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, 9244-9253
- Lecellier C. H., Neves M., Giron M. L., Tobaly-Tapiero J. & Saib A. (2002):** Further characterization of equine foamy virus reveals unusual features among the foamy viruses. *J. Virol.* 76, 7220-7227
- Lewis P., Hensel M. & Emerman M. (1992):** Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. *EMBO* 11, 3053-3058
- Lewis P. F. & Emerman M. (1994):** Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J. Virol.* 68, 510-516
- Lindemann D., Bock M., Schweizer M. & Rethwilm, A. (1997):** Efficient pseudotyping of murine leukemia virus particles with chimeric human foamy virus envelope proteins. *J. Virol.* 71, 4815-4820
- Lindemann D. & Rethwilm, A. (1998):** Characterization of a human foamy virus 170-kilodalton *env*-*bet* fusion protein generated by alternative splicing. *J. Virol.* 72, 4088-4094

- 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 budding. *J. Virol.* 75, 5762-5771
- Lindemann, D. & Goepfert, P. A. (2003):** The foamy virus envelope glycoproteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 277, 111-129
- Linial M. L. (1999):** Foamy viruses are unconventional retroviruses. *J. Virol.* 73, 1447-1455
- Linial, M. L. (2000):** Why aren't foamy viruses pathogenic? *Trends Microbiol.* 8, 284-289
- Linial M. L. & Eastman S. W. (2003):** Particle assembly and genome packaging. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 277, 89-110
- 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
- Löchelt M., Muranyi W. & Flügel R. M. (1993):** Human foamy virus genome possesses an internal, bel-1-dependent and functional promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 7317-7321
- Löchelt M., Flügel R. M. & Aboud M. (1994):** The human foamy virus internal promoter directs expression of the functional bel-1 transactivator and bet protein early after infection. *J. Virol.* 68, 638-645
- Löchelt M., Yu S.F. & Flügel R. M. (1995):** The human foamy virus internal promoter is required for efficient gene expression and infectivity. *Virology* 206, 601-610
- 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, 1033-1040
- Löchelt M., Romen, F., Bastone P., Muckenfuss H., Kirchner N., Kim Y. B., Truyen U., Rosler U., Battenberg M., Saib A., Flory E., Cichutek K. & Munk C. (2005):** The antiretroviral activity of APOBEC3 is inhibited by the foamy virus accessory bet protein. *PNAS* 102, 7982-7987
- Loeb D. D., Hutchinson III C. A., Edgell M. H., Farmerie W. G. & Swanstrom R. (1989):** Mutational analysis of human immunodeficiency virus type I protease suggests functional homology with aspartic proteases. *J. Virol.* 63, 111-121
- Lu M., Blacklow S. W. & Kim P. S. (1995):** A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nat. Struct. Biol.* 2, 1075-1082
- Lüftenegger D., Picard-Maureau M., Stanke N., Rethwilm A. & Lindemann D. (2005):** Analysis and function of prototype foamy virus envelope N glycosylation. *J. Virol.* 79, 7664-7672
- Malim M. H., Tiley L. S., McCarn D. F., Rusche J. R., Hauber J. & Cullen B. R. (1990):** HIV-1 structural gene expression requires binding of the rev trans-activator to its RNA target sequence. *Cell* 60, 675-683
- Malim M. H. & Cullen B. R. (1991):** HIV-1 structural gene expression requires the binding of multiple rev monomers to the viral RRE: Implications for HIV-1 latency. *Cell* 65, 241-248
- 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
- Mariani R., Chen D., Schrofelbauer B., Navarro F., König R., Bollman B., Munk C., Nymark-McMahon H. & Landau N. R. (2003):** Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell* 114, 21-31

- 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, 1590-1597
- McCune J. M., Rabin L. B., Feinberg M. B., Lieberman M., Kosek J.C., Reyes G. R. & Weisman I. L. (1988):** Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell* 53, 55-67
- McDonald D, Hope T. J. & Parslow T. G. (1992):** Posttranscriptional regulation by the human immunodeficiency virus type 1 rev and human T-cell leukemia virus type 1 rex proteins through a heterologous RNA binding site. *J. Virol.* 66, 7232-7238
- Mehle A., Strack B., Ancuta P., Zhang C., McPike M. & Gabuzda D. (2004):** Vif overcomes the innate antiviral activity of APOBEC3G by promoting its degradation in the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 279, 7792-7798
- Meiering C. D., Comstock K. E. & Linial M. L. (2000):** Multiple integrations of human foamy virus in persistently infected human erythroleukemia cells. *J. Virol.* 74, 1718-1726
- Meiering C. D. & Linial M. L. (2001):** Historical perspective of foamy virus epidemiology and infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 165-176
- Mergia A., Pratt-Lowe E., Shaw K. E., Renshaw-Gegg L. W. & Luciw P. A. (1992):** cis-acting regulatory regions in the long terminal repeat of simian foamy virus type 1. *J. Virol.* 66, 251-257
- Mergia A. (1994):** Simian foamy virus type 1 contains a second promoter located at the 3' end of the *env* gene. *Virology* 199, 219-222
- Mertz J. A., Simper M. S., Lozano M. M., Payne S. M. & Dudley J. P. (2005):** Mouse mammary tumor virus encodes a self-regulatory RNA export protein and is a complex retrovirus. *J. Virol.* 79, 14737-14747
- Miller D. G., Adam M. A. & Miller A. D. (1990):** Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol. Cell. Biol.* 10, 4239-4242
- Modrow S., Falke D. & Truyen U. (2003):** Molekulare Virologie. 2. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin.
- 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, 7305-7311
- Moore R., Diyon M., Smith R., Peters G. & Dickson C. (1987):** Complete nucleotide sequence of a milk-transmitted mouse mammary tumor virus: two frameshift suppression events are required for translation of *gag* and *pol*. *J. Virol.* 61, 480-490
- Muranyi W. & Flügel R. W. (1991):** Analysis of splicing patterns of human spumaretrovirus by polymerase chain reaction reveals complex RNA structures. *J. Virol.* 65, 727-735
- Nam S. H., Copeland T. D., Hatanaka M. & Oroszlan S. (1993):** Characterization of ribosomal frameshifting for expression of *pol* gene products of human T-cell leukemia virus type I. *J. Virol.* 67, 196-203
- Nassal M. (1996):** Hepatitis B virus morphogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 214, 297-337
- 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, 336-338
- Oppermann H., Bishop J. M., Varmus H. E. & Levintow L. (1977):** A joint produce of the genes *gag* and *pol* of Avian Sarcoma Virus: a possible precursor of reverse transcriptase. *Cell* 12, 993-1005

- Orlova M., Yueh A., Leung J. & Goff S. P. (2003):** Reverse transcriptase of Moloney murine leukemia virus binds to eukaryotic release factor 1 to modulate suppression of translation termination. *Cell* 115, 319-331
- 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, 2957-2966
- Parker S. D., Wall J. S. & Hunter E. (2001):** Analysis of Mason Pfizer monkey virus gag particles by scanning transmission electron microscopy. *J. Virol.* 75, 9543-9548
- Park J. & Mergia A. (2000):** Mutational analysis of the 5' leader region of simian foamy virus type 1. *Virology* 274, 203-212
- Park J. & Morrow C. D. (1991):** Overexpression of the gag-pol precursor from human immunodeficiency virus type 1 proviral genomes results in efficient proteolytic processing in the absence of virion production. *J. Virol.* 65, 5111-5117
- Park J. & Morrow C. D. (1992):** The nonmyristylated Pr160gag-pol polyprotein of human immunodeficiency virus type 1 interacts with Pr55gag and is incorporated into viruslike particles. *J. Virol.* 66, 6304-6313
- Payne S. L. & Elder J. H. (2001):** The role of retroviral dUTPases in replication and virulence. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2, 381-388
- Perez L. G. & Hunter E. (1987):** Mutations within the proteolytic cleavage site of the Rous sarcoma virus glycoprotein that block processing to gp85 and gp37. *J. Virol.* 61, 1609-1914
- Peters G. & Dahlberg J. E. (1979):** RNA-directed DNA synthesis in Moloney murine leukemia virus: interaction between the primer tRNA and the genome RNA. *J. Virol.* 31, 398-407
- Petit C., Giron M.-L., Tobaly-Tapiero J., Bittoun P., Real E., Jacob Y., Tordo N., de The H. & Saib A. (2003):** Targeting of incoming retroviral gag to the centrosome involves a direct interaction with the dynein light chain 8. *J. Cell. Sci.* 116, 3433-3442
- 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, 7648-7652
- 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 foamy virus. *J. Virol.* 73, 7907-7911
- Philipson L., Andersson P., Olshesky U., Weinberg R., Baltimore D. & Gesteland R. (1978):** Translation of MuLV and MSV RNAs in nuclease-treated reticulocyte extracts: enhancement of the gag-pol polypeptide with yeast suppressor tRNA. *Cell* 13, 189-99.
- 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, 4722-4730
- Picard-Maureau M. (2003):** Molekulare Analyse der Penetration von Foamyviren und Konstruktion und Charakterisierung von Adenovirus-Foamyvirus Hybridvektoren. *Doktorarbeit*
- Pietschmann T., Heinkelein M., Heldmann M., Zentgraf H., Rethwilm A. & Lindemann D. (1999):** Foamy virus capsids require the cognate envelope protein for particle export. *J. Virol.* 73, 2613-2621

- Pietschmann T., Zentgraf H., Rethwilm A. & Lindemann D. (2000):** An evolutionary conserved positively charged amino acid in the putative membrane spanning domain of the foamy virus envelope protein controls fusion activity. *J. Virol.* 74, 4474-4482
- Poiesz B. J., Ruscetti F. W., Gazdar A. F., Bunn P. A., Minna J. D. & Gallo R. C. (1980):** Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 7415-7419
- Pollack J. R. & Ganem D. (1994):** Site specific RNA binding by hepatitis B virus reverse transcriptase initiates two distinct reactions: RNA packaging and DNA synthesis. *J. Virol.* 68, 5579-5587
- Pope B. & Kent H. M. (1996):** High efficiency 5 min transformation of Escherichia Coli. *Nucleic Acids Res.* 24,536-537
- Rethwilm A., Erlwein O., Baunach G., Maurer B. ter Meulen V. (1991):** The transcriptional transactivator of human foamy virus maps to the bel 1 genomic region. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 941-945
- Rethwilm A. (2003):** The replication strategy of Foamy Viruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 277, 1-26
- Riggs J. L., Oshiro L. S., Taylor D. O. & Lennette E. H. (1969):** Syncytium-forming agent isolated from domestic cats. *Nature* 222, 1190-1191
- 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, 7560-7570
- Roe T., Reynolds T. C., Yu G. & Brown P. O. (1993):** Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *EMBO J.* 12, 2099-2108
- Roy J., Rudolph W., Juretzek T., Gärtner K., Bock M., Herchenröder O., Lindemann D., Heinkelein M. & Rethwilm A. (2003):** Feline foamy virus genome and replication strategy. *J. Virol.* 77, 11324-11331
- Roychoudhury S. & Shih C. (1990):** cis rescue of a mutated reverse transcriptase gene of human hepatitis B virus by creation of an internal ATG. *J. Virol.* 64, 1063-1069
- Russell R. A., Wiegand H. L., Moore M. D., Schäfer A., McClure M. O. & Cullen B. R. (2005):** Foamy virus bet proteins function as novel inhibitors of the APOBEC3 family of innate antiretroviral defense factors. *J. Virol.* 79, 8724-8731
- Saib A., Puvion-Dutilleul F., Schmid M., Peries J. & de The H. (1997):** Nuclear targeting of incoming human foamy virus gag proteins involves a centriolar step. *J. Virol.* 71, 1155-1161
- Sambrook J., Fritsch E. F. & Maniatis T. (1989):** Molecular Cloning, a laboratory manual. 2.Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sandstrom P.A., Phan K. O., Switzer W. M., Fredeking T., Chapman L., Heneine W. & Folks T. M. (2000):** Simian foamy virus infection among zoo keepers. *Lancet* 355, 551-552
- Schägger H. & Jagow G. (1987):** Tricine–sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDA. *Anal. Biochem.* 166, 368-379
- Schlicht H. J., Radziwill G. & Schaller H. (1989):** Synthesis and encapsidation of duck hepatitis B virus reverse transcriptase do not require formation of core-polymerase fusion proteins. *Cell* 56, 85-92
- Schliephake A. W. & Rethwilm A. (1994):** Nuclear localization of foamy virus gag precursor proteins. *J. Virol.* 68, 4946-4954

- Schmidt M., Herchenröder O., Heeney J. & Rethwilm A. (1997):** Long terminal repeat U3 length polymorphism of human foamy virus. *Virology* 230, 167-178
- Schultz A. M., Henderson L. E. & Oroszlan S. (1988):** Fatty acylation of proteins. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4, 611-647
- Schweizer M., Turek R., Hahn H., Schliephake A., Netzer K. O., Eder G., Reinhardt M., Rethwilm A. & Neumann-Haefelin D. (1995):** Markers of foamy virus infections in monkeys, apes and accidentally infected humans: appropriate testing fails to confirm suspected foamy virus prevalence in humans. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 11, 161-170
- Seeger C. & Hu J. (1997):** Why are hepadnaviruses DNA and not RNA viruses? *Trends Microbiol.* 5, 447-450
- Shaw K. L., Lindemann D., Mulligan M. J. & Goepfert P.A. (2003):** The retroviral envelope glycoprotein of foamy virus is sufficient for particle budding and release. *J. Virol* 77, 2338-2348
- Stange A., Mannigel I., Peters K., Heinkelein M., Stanke N., Cartellieri M., Gottlinger H., Rethwilm A., Zentgraf H. & Lindemann D. (2005):** Characterization of prototype foamy virus gag late assembly domain motifs and their role in particle egress and infectivity. *J. Virol.* 79, 5466-5476
- 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, 9423-9430
- Suptawiwat O., Sutthent R., Lee T. H. & Auewarakul P. (2003):** Intragenic HIV-1 env sequences that enhance gag expression. *Virology* 309, 1-9
- Swanstrom R. & Wills J. W. (1997):** Synthesis, assembly and processing of viral proteins. In *Retroviruses* 1. Aufl.; Coffin J. M., Hughes S. H. & Varmus E. V.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 263-335
- Switzer W. M., Bhullar V., Shanmugam V., Cong M., Parekh B., Lerche N. W., Yee J. L., Ely J. J., Boneva R., Chapman L. E., Folks T. M. & Heneine W. (2004):** Frequent simian foamy virus infection in persons occupationally exposed to nonhuman primates. *J. Virol.* 78, 2780-2789
- Telesnitsky A. & Goff S. P. (1997):** Reverse transcriptase and the generation of retroviral DNA. In *Retroviruses* 1. Aufl.; Coffin J. M., Hughes S. H. & Varmus E. V.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 121-160
- Temin H.M. & Mizutani S. (1970):** RNA dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226, 1211-1213
- Tobaly-Tapiero J., Kupiec J. J., Santillana-Hayat M., Canivet M., Peries J. & Emanoil-Ravier R. (1991):** Further characterization of the gapped DNA intermediates of human spumavirus: evidence for a dual initiation of plus-strand DNA synthesis. *J. Gen. Virol.* 72, 605-608
- 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, 4064-4073
- 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, 4367-4375
- Trobridge G., Josephson N., Vassilopoulos G., Mac J. & Russell D. W. (2002):** Improved foamy virus vectors with minimal viral sequences. *Mol. Ther.* 6, 321-328
- Trono D. (1992):** Partial reverse transcripts in virions from human immunodeficiency and murine leukemia viruses. *J. Virol.* 66, 4893-4900
- Varani G. (1996):** RNA-Protein intermolecular recognition. *Acc. Chem. Res.* 30, 189-192

- Varmus H. E., Padgett T., Heasley S., Simon G. & Bishop J. M. (1977):** Cellular functions are required for the synthesis and integration of avian sarcoma virus-specific DNA. *Cell* 11, 307-319
- Vogt V. M. (1997a):** Retroviral virions and genomes. In *Retroviruses* 1. Aufl.; Coffin J. M., Hughes S. H. & Varmus E. V.; *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 27-70
- Vogt V. M. (1997b):** Proteolytic processing and particle maturation. *Curr.Top. Microbiol. Immunol.* 214, 95-131
- Wagner A., Doerks A., Aboud M., Alonso A., Tokino T., Flügel R. M. & Löchelt M. (2000):** Induction of cellular genes is mediated by the bel 1 transactivator in foamy virus-infected human cells. *J. Virol.* 74, 4441-4447
- Wang G.H., Zoulim F., Leber E. H., Kitson J. & Seeger C. (1994):** Role of RNA in enzymatic activity of the reverse transcriptase of hepatitis B viruses. *J. Virol.* 67, 6507-6517
- Weinberg J. B., Matthews T. J., Cullen B. R. & Malim M. H. (1991):** Productive human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection of nonproliferation human monocytes. *J. Exp. Med.* 174, 1477-1482
- Weaver T. A., Talbot K. J. & Panganiban A. T. (1990):** Spleen necrosis virus gag polyprotein is necessary for particle assembly and release but not for proteolytic processing. *J. Virol.* 64, 2642-2652
- Wilcox C., Hu J. S. & Olson E. N. (1987):** Acylation of proteins with myristic acid occurs cotranslationally. *Science* 238, 1275-1278
- 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.* 2885-2887
- 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
- Winkler I., Bodem J., Haas L., Zemba M., Delius H., Flügel R. M. & Löchelt M. (1997):** Characterization of the genome of feline foamy virus and its proteins show distinct features different from those of primate spumavirus. *J. Virol.* 71, 6727-6741
- Wodrich H., Bohne J., Gumz E., Welker R. & Kräusslich H.-G. (2001):** A new RNA element located in the coding region of a murine endogenous retrovirus can functionally replace the rev/rev-responsive element system in human immunodeficiency virus type 1 gag expression. *J. Virol.* 75, 10670-10682
- Wolfe N.D., Switzer W. M., Carr J. K., Bhullar V. B., Shanmugam V., Tamoufe U., Prosser A. T., Torimiro J. N., Wright A., Mpoudi-Ngole E., McCutchan F. E., Birx D. L., Folks T. M., Burke D. S. & Heneine W. (2004):** Naturally acquired simian retrovirus infections in central african hunters. *Lancet* 363, 932-937
- Wu M., Chari S., Yanchis T. & Mergia A. (1998):** Cis-acting sequences required for simian foamy virus type 1 vectors. *J. Virol.* 72, 3451-3454
- Yoshinaka Y., Katoh I., Copeland T. D. & Oroszlan S. (1985):** Murine leukemia virus protease is encoded by the gag-pol gene and is synthesized through suppression of an amber termination codon. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 1618-1622
- 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, 1579-1581

- 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, 8255-8262
- Yu S. F., Sullivan M. D. & Linial M. L. (1999):** Evidence that the human foamy virus genome is DNA. *J. Virol.* 73, 1565-1572
- Zemba T., Wilk T., Rutten T., Wagner A., Flügel R. M & Löchelt M. (1998):** The carboxy-terminal p3Gag domain of the human foamy virus is required for efficient virus infectivity. *Virology* 247, 7-13
- Zou J. X. & Luciw P. A. (1996):** The transcriptional transactivator of simian foamy virus 1 binds to a DNA target element in the viral internal promoter. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:326-330
- Zuker M. (2003):** Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acid Research* 31, 3406-3415

## 6 Anhang

### 6.1 Zusammenfassung

In allen Retroviren, mit Ausnahme der Foamyviren (FV), wird das Pol-Protein als Gag-Pol-Fusionsprotein exprimiert. Dieser Mechanismus sichert die Inkorporation von Pol in das virale Partikel. FV unterscheiden sich in vielen Merkmalen von den Orthoretroviren, unter anderem wird das Pol-Protein von einer eigenen gespleißten mRNA translatiert. Diese von Gag unabhängige Expression führt zu der Frage nach dem Mechanismus der Pol-Inkorporation in foamyvirale Partikel.

Unter Nutzung eines transienten FV-Vektor Transfektionssystems, das auf der Kotransfektion von vier separaten Expressionseinheiten zur Produktion von Gag, Pol, Env und einer Vektor-RNA beruht, konnte gezeigt werden, daß (prä)genomische RNA für die effiziente Partikelinkorporation von Pol notwendig ist. Protein-Protein-Interaktionen zwischen Pol und Gag sind deshalb nicht ausreichend für die Bildung vollständiger Viruspartikel.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob es möglich ist spezifische Sequenzen in der Virus-RNA zu identifizieren, die für die Inkorporation des Pol-Proteins essentiell sind. Empirisch wurden bereits zwei cis-aktive Sequenzen (CAS) identifiziert, die, zusammen mit den *long terminal repeats* (LTR) und benachbarten Sequenzen für die reverse Transkription und Integration, ausreichend für effizienten FV-Vektortransfer sind. Daher müssen RNA-Elemente, die für die Verpackung des Pol-Proteins nötig sind, in diesen beiden CAS liegen. Durch das Einführen von Deletionen und anschließender Analyse der Proteinzusammensetzung und des RNA-Gehaltes von Viruspartikeln, wurden die für die Pol-Inkorporation essentiellen RNA-Sequenzen identifiziert.

In dieser Arbeit konnten zwei RNA-Sequenzelemente definiert werden, die für die Partikelinkorporation des Pol-Proteins notwendig sind, diese wurden PES (*Pol encapsidation sequences*) genannt. Keines der beiden Sequenzelemente hat einen signifikanten Einfluß auf die Verpackung der Vektor-RNA, wohingegen bereits die Deletion einer der PES zu einer signifikanten Reduktion der Pol-Verpackung führt. Eine PES, die möglicherweise nur 30 nt umfaßt, liegt unmittelbar 5' der PBS (Nukleotide 318-345, relativ zu PFV Transkriptionsstart) und die zweite PES mit einer wahrscheinlichen Länge von 370 nt liegt in der 3' Region des *pol*-Gens (Nukleotide 4980-5351).

Diese Ergebnisse führen zu einem Model, in dem die (prä)genomische RNA von FV als eine Art Brückenmolekül zwischen Gag und Pol fungiert. Die RNA interagiert auf der einen Seite über die PES mit Pol und auf der anderen Seite mit Gag über die GRI-Box im carboxyterminalen Bereich des Proteins und vermittelt so die Inkorporation des Pol-Proteins in das Gag-Kapsid.

Weiterhin wurden die Voraussetzungen auf Proteinebene für die Verpackung des Pol-Proteins untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, daß nur das Pol-Vorläuferprotein und weder die einzelne Reverse Transkriptase- noch die Integrase-Untereinheit in das foamyvirale Partikel verpackt wird. Die enzymatischen Aktivitäten der Protease, der Reversen Transkriptase oder der Integrase des Pol-Proteins sind für die Verpackung jedoch nicht essentiell.

## ***6.2 Summary***

In all retroviruses with the exception of foamy virus (FV), the Pol protein is expressed as a Gag-Pol precursor, which facilitates Pol incorporation into the viral particle. FVs diverge from orthoretroviruses in many ways. One of it is that the Pol protein is translated from a spliced mRNA independently of Gag. This method of expression raises the question of the mechanism of Pol incorporation into the viral particle.

Using a transient FV vector transfection system based on cotransfection of four separate expression units to generate Gag, Pol, Env, and a vector RNA, it is shown that (pre)genomic RNA is required for efficient virion incorporation of Pol. Thus, protein-protein interactions of Pol with Gag are not sufficient to complete particle assembly.

It is further investigated whether specific sequences on the RNA which allow for Pol protein incorporation can be identified. Two empirically identified cis-acting sequences (CAS) are, together with the long terminal repeats (LTR) and adjacent sequences required for reverse transcription and integration, sufficient to allow efficient FV vector transfer. Thus, any RNA element required for Pol protein encapsidation must be confined to these two CAS. By introducing deletions into the CAS elements and analyzing the protein compositions and RNA contents of FV particles, the RNA sequence elements required for Pol protein incorporation were identified.

It is demonstrated that two distinct sequences in the RNA, which were termed Pol encapsidation sequences (PES), are required to incorporate Pol protein into the FV capsid.

Neither element has any significant effect on RNA packaging. However, deletion of either PES resulted in a significant reduction in Pol encapsidation. One PES, which can be as short as 30 nt, is located just 5' to the PBS (nucleotides 318-345 relative to PFV start of transcription) and another PES of probably 370 nt is located in the 3' Region of the *pol* gen (nucleotides 4980-5351).

These results lead to a model in which the (pre)genomic RNA serves as a bridging molecule for the interaction of Pol with Gag. On the one hand the RNA interacts with Pol via the PES and on the other hand with Gag via the GRI box in the carboxy terminus of Gag. This way RNA mediates encapsidation of Pol into the viral particle.

Furthermore, the requirements on the protein level for encapsidating Pol protein were investigated. It is shown that only the Pol precursor, but not the individual reverse transcriptase or integrase subunits, is incorporated into FV particles. However, the enzymatic activities of the FV Pol protein are not required for encapsidation, at least as far as protease, reverse transcriptase, and integrase activities are concerned.

### 6.3 Klonierungsstrategien

**Tab. 4: Klonierungsstrategien der hergestellten Konstrukte**

Plasmid	Vektor-hintergrund	Insert	Kurzbeschreibung
pKP1	pMH66 x <i>MluI</i> <i>PacI</i> <sup>1</sup> →9058 bp	1: pMH66 x <i>MluI</i> <i>MfeI</i> →947 bp 2: pMH66 x <i>PacI</i> <i>EcoRV</i> →3167 bp 3: PCR-Produkt (#327/#1300 an pMH66) x <i>MfeI</i> <i>EcoRV</i> →341 bp	ΔPBS in pMH66
pKP2	pCgp1/M54 x <i>SwaI</i> <i>MluI</i> <sup>1</sup> →8504 bp	pMH115 x <i>SwaI</i> <i>MluI</i> →2392 bp	ΔU5- und der Leader-Region in pCgp1/M54
pKP3	pCgp1/M54 x <i>SwaI</i> <i>MluI</i> <sup>1</sup> →8504 bp	pMH114 x <i>SwaI</i> <i>MluI</i> →2491 bp	ΔU5 in pCgp1/M54
pKP4	pCgp1/M54 x <i>SwaI</i> <i>MluI</i> <sup>1</sup> →8504 bp	pMH93 x <i>SwaI</i> <i>MluI</i> →2613 bp	Δ194-443 in pCgp1/M54
pKP5	pCgp1/M54 x <i>SwaI</i> <i>MluI</i> <sup>1</sup> →8504 bp	pKP1 x <i>SwaI</i> <i>MluI</i> →2625 bp	ΔPBS in pCgp1/M54
pKP10	pMH66 x <i>PacI</i> <sup>3</sup> <i>EcoRI</i> <sup>1</sup> →12185 bp	pMH66 x <i>EcoRI</i> <i>EcoRV</i> →551 bp	Δ3872-4664 in pMH66
pKP11	pMH66 x <i>BsmBI</i> <sup>2</sup> <i>PacI</i> <sup>1</sup> →11498 bp	pMH66 x <i>PacI</i> <i>HincII</i> →1012 bp	Δ4884-5886 in pMH66
pKP12	pMH66 x <i>BsmBI</i> <sup>2</sup> <i>PacI</i> <sup>1</sup> →11498 bp	1: pMH66 x <i>BsmBI</i> <i>HincII</i> →1019 bp 2: pMH66 x <i>PacI</i> <i>EcoRV</i> →0,79 kb	Δ4665-4883 in pMH66
pKP16	pMD9 x <i>SwaI</i> <i>Eco47III</i> →7895 bp		Δ3874-5886 in pMD9
pKP17	pMD9 x <i>SwaI</i> <i>EcoRI</i> <sup>1</sup> →8584 bp	pMD9 x <i>EcoRI</i> <i>EcoRV</i> →551 bp	Δ3874-4663 in pMD9
pKP18	pMD9 x <i>EcoRV</i> <i>BamHI</i> <sup>1</sup> →8242 bp	pMD9 x <i>BamHI</i> <i>HincII</i> →1479 bp	Δ4665-4883 in pMD9
pKP19	pMD9 x <i>NheI</i> <i>Eco47III</i> <sup>1</sup> →7903 bp	pMD9 x <i>NheI</i> <i>HincII</i> →1016 bp	Δ4884-5886 in pMD9
pKP20	pspHFV5 x <i>BbsI</i> <i>MfeI</i> <sup>1</sup> →3484bp	pMD9 x <i>BbsI</i> <i>MfeI</i> →212 bp	RPA- Sondenplasmid; Bindung ums <i>gag</i> CTG
pKP21	psp65 x <i>EcoRI</i> <sup>2</sup> <i>BamHI</i> <sup>1</sup> →2983 bp	pMD9 x <i>NotI</i> <sup>2</sup> <i>BamHI</i> →737 bp	RPA-Sondenplasmid; Bindung in <i>eGFP</i>
pKP22	pMD9 x <i>BsmBI</i> <i>NdeI</i> <sup>1</sup> →6887 bp	1: pMD9 x <i>NdeI</i> <i>HincII</i> →2021 bp 2: pMD9 x <i>SpeI</i> <sup>2</sup> <i>BsmBI</i> →799 bp	Δ4884-5114 in pMD9
pKP23	pMD9 x <i>BsmBI</i> <i>NheI</i> <sup>1</sup> →7892 bp	1: pMD9 x <i>SpeI</i> <sup>2</sup> <i>NheI</i> ( <i>MfeI</i> ) →1249 bp 2: pMD9 x <i>AflIII</i> <sup>2</sup> <i>BsmBI</i> ( <i>EcoRV</i> ) →289 bp	Δ5119-5624 in pMD9
pKP24	pMD9 x <i>EcoRI</i> <i>Eco47III</i> <sup>1</sup> →9251 bp	pMD9 x <i>AflIII</i> <sup>2</sup> <i>EcoRI</i> ( <i>SwaI</i> ) →411 bp	Δ5629-5886 in pMD9
pKP25	pKP24 x <i>NheI</i> <i>EcoRI</i> <sup>1</sup> →8312 bp	1: pKP24 x <i>NheI</i> <i>HincII</i> →1014 bp 2: PCR-Produkt (#1840/#1844 an pMD9) x <i>EcoRI</i> <i>HincII</i> →244 bp	Δ4887-4980 in pKP24

## Anhang

pKP26	pKP24 x <i>NheI EcoRI</i> <sup>1</sup> →8312 bp	1: pKP24 x <i>NheI HincII</i> →1014 bp 2: PCR-Produkt (#1841/#1844 an pMD9) x <i>EcoRI HincII</i> →144 bp	Δ4887-5080 in pKP246
pKP27	pKP24 x <i>NheI EcoRI</i> <sup>1</sup> →8312 bp	1: pKP24 x <i>NheI HincII</i> →1014 bp 2: Oligos #1842/#1843 <sup>4</sup>	Δ4887-5180 in pKP24
pKP28	pMD9 x <i>Eco47III EcoRI</i> <sup>1</sup> →9249 bp	pMD9 x <i>EcoRI StuI</i> →364 bp	Δ5582-5886 in pMD9
pKP29	pMD9 x <i>Eco47III EcoRI</i> <sup>1</sup> →9249 bp	pMD9 x <i>EcoRI MscI (SpeI)</i> →336bp	Δ5553-5886 in pMD9
pKP30	pMD9 x <i>Eco47III EcoRI</i> <sup>1</sup> →9249 bp	PCR-Produkt (#1845/#1849 an pMD9) x <i>EcoRI Eco47III</i> →250 bp	Δ5451-5886 in pMD9
pKP31	pMD9 x <i>Eco47III EcoRI</i> <sup>1</sup> →9249 bp	PCR-Produkt (#1846/#1849 an pMD9) x <i>EcoRI Eco47III</i> →150 bp	Δ5351-5886 in pMD9
pCpol2 /M61	pCpol2 x <i>SwaI PacI</i> <sup>1</sup> →9389 bp	pczHSRV2 M61 x <i>SwaI PacI</i> →1829 bp	PR↓ in pCpol2
pCpol2 /M69	pCpol2 x <i>SwaI PacI</i> <sup>1</sup> →9389 bp	pczHSRV2 M83x <i>SwaI PacI</i> →1829 bp	RT↓ in pCpol2
pCpol2 /M73	pCpol2 x <i>PacI BspEI</i> <sup>1</sup> →8905 bp	pczHSRV2 M83 x <i>PacI BspEI</i> →2309 bp	IN↓ in pCpol2
pCpol2 /M83	pCpol2 x <i>SwaI BspEI</i> <sup>1</sup> →7076 bp	pczHSRV2 M83 x <i>SwaI BspEI</i> →4140 bp	RT↓ & IN↓ in pCpol2

Die angegebenen Plasmide wurden mit den Restriktionsenzymen verdaut, modifiziert, über Agarosegelelektrophorese getrennt und die Fragmente mit den angegebenen Größen nach Elution ligiert. Die korrekte Sequenz der Konstrukte wurde durch analytischen Verdau mit verschiedenen Restriktionsenzymen und Sequenzierungen überprüft. (1) Dephosphorylierung der Fragmente; (2) Auffüllen überhängender Enden mittels Klenowenzym; (3) Abbau überhängender Enden mittels T4 DNA-Polymerase; (4) hybridisierte Oligonukleotide; Methoden siehe 2.3.1

## 6.4 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	Env	Hüllprotein ( <i>envelope</i> )
ψ	Verpackungssignal (Psi)	ER	Endoplasmatisches Retikulum
μ	mikro		
Abb.	Abbildung	FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
AIDS	<i>Aquired immunodeficiency syndrome</i>	FCS	Fötales Kälberserum
APOBEC3G	<i>Apolipoprotein B editing complex 3G</i>	FFV	Felines Foamyvirus
APS	Ammoniumpersulfat	FV	Foamyvirus/ Foamyviren
ATP	Adenosinotrisulfat	g	Gramm
α	Anti	Gag	Gruppenspezifisches Antigen
b	Basen	h	Stunde(n)
BFV	Bovines Foamyvirus	HIV	Humanes Immundefizienzvirus
bp	Basenpaare	HRP	Meeretich-Peroxisdase
bzw.	beziehungsweise	IN	Integrase
CA	Kapsidprotein	IP	interner Promotor
ca.	circa	iPPT	interner Polypurintrakt
CAS	cis-aktive Sequenzen	IZM	intrazytoplasmatische Membranen
CMV	Cytomegalievirus		
d. h.	das heißt	kD	Kilo-Dalton
dest.	destilliert	L	Late-Domäne
DLS	<i>dimer linkage site</i>	l	Liter
DNA	Desoxyribonukleinsäure	LP	Leaderpeptid
dNTP	Desoxyribonukleotid- triphosphat	LTR	<i>long terminal repeat</i>
ds	doppelsträngig	M	Molar
DTT	Dithiothreitol	MA	Matrixprotein
dUTP	Desoxyuracilphosphat	mA	Milliamper
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	MHR	<i>major homology region</i>
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>	min	Minute(n)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	mM	Millimolar
EFV	Equines Foamyvirus	mRNA	messenger RNA
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>	MSD	membranspannende Domäne
		Myr	Myristilinsäure
		NC	Nukleokapsidprotein
		ng	Nanogramm

## Anhang

NK	Negativkontrolle	rpm	Umdrehungen pro Minute
NLS	Kernlokalisationsignal	RRE	<i>rev responsive element</i>
nm	Nanometer	RT	Reverse Transkriptase
nmol	nanomolar	RT/RH	Reverse Transkriptase/
nt	Nukleotide		RNaseH
OD	Optische Dichte	SA	Spleißakzeptor
ORF	offener Leserahmen	SD	Spleißdonor
ori	Replikationsstartpunkt	SDS	Natriumdodecylsulfat
P	Promotor	sec	Sekunde(n)
PAGE	Polyacrylamid- gelelektrophorese	SFFV	<i>spleen focus forming virus</i>
PBS	Primerbindungsstelle	SU	Oberflächenuntereinheit
PCR	Polymerasekettenreaktion	SVP	Subvirale Partikel
PES	Polymerase- Enkapsidierungssequenz	TEMED	N, N, N', N' – Tetramethylethylendiamin
PFV	prototypischer Foamyvirus	TM	Transmembranuntereinheit
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydro- niumionenkonzentration	TRE	Tas responsives Element
PIC	Präintergrationskomplex	Tris	Trishydroxy- methylaminomethan
PK	Positivkontrolle	tRNA	<i>transfer RNA</i>
pmol	picomolar	U	Enzymeinheit (Unit)
Pol	Polymerase	u. a.	unter anderem
PPP	Proteinprobenpuffer	ŮN	über Nacht
PPT	Polypurintrakt	USA	<i>United States of America</i>
PR	Protease	UTR	<i>untranslated region</i>
pro	Protease-Gen	UV	ultraviolett
RNA	Ribonukleinsäure	V	Volt
RPA	<i>RNase Protection Assay</i>	Vif	<i>viral infectivity factor</i>
		VLP	<i>virus like particle</i>
		z. B.	zum Beispiel

## 6.5 *Abbildungsverzeichnis*

Abb. 1: Typischer Aufbau eines Orthoretrovirus.....	3
Abb. 2: Genomorganisation eines einfachen Retrovirus.....	4
Abb. 3: Gag-Vorläuferprotein eines Orthoretroviruses.....	5
Abb. 4: Gag-Pol-Vorläuferprotein eines Orthoretroviruses .....	6
Abb. 5: Env-Vorläuferprotein eines Orthoretroviruses .....	8
Abb. 6: Der orthovirale Replikationszyklus.....	11
Abb. 7: (A) EM Aufnahme von Spumaviren (H. Zentgraf); (B) uninfizierte humane Fibroblasten; (C) PFV infizierte humane Fibroblasten mit zytopathischen Effekt (Picard-Maureau, 2003)	12
Abb. 8: Genomorganisation und Genexpression von PFV .....	15
Abb. 9: Gag-Vorläuferprotein von PFV .....	17
Abb. 10: Pol-Vorläuferprotein von PFV .....	18
Abb. 11: Env-Vorläuferprotein von PFV .....	19
Abb. 12: Der Replikationszyklus von PFV .....	22
Abb. 13: Expressionsplasmide und Vektor .....	56
Abb. 14: Proteinanalyse der Zellysate und Partikelpräparationen .....	57
Abb. 15: Schematische Darstellung der CASI-Deletionskonstrukte.....	59
Abb. 16: Analyse der Zellysate und Viruspartikel der CASI-Deletionskonstrukte .....	61
Abb. 17: Schematische Darstellung der CASII-Deletionen im Ausgangsvektor pMH66 .....	64
Abb. 18: Analyse der Zellysate und Viruspartikel der CASII-Deletionen in pMH66 .....	66
Abb. 19: Analyse der Transduktionseffizienzen der CASII-Deletionen in pMH66 .....	67
Abb. 20: Schematische Darstellung der CASII-Deletionen im Ausgangsvektor pMD9 .....	69
Abb. 21: Analyse der Zellysate und Viruspartikel der CASII Deletionen in pMD9.....	70
Abb. 22: Analyse der Transduktionseffizienzen der CASII-Deletionen in pMD9 .....	71
Abb. 23: Schematische Darstellung der pMD9-Konstrukte mit Deletionen im 3' Bereich der CASII .....	74
Abb. 24: Analyse der Zellysate und Viruspartikel der Deletionen im 3' Bereich der CASII.....	75
Abb. 25: Analyse der Transduktionseffizienzen der Deletionen des 3' Bereichs von CASII.....	76
Abb. 26: Schematische Darstellung der pMD9-Konstrukte mit Deletionen im 5' Bereich der PES <sub>nt4884-5628</sub> .....	77
Abb. 27: Analyse der Zellysate und Viruspartikel der Deletionen im 5' Bereich der PES <sub>nt4884-5628</sub> .....	79
Abb. 28: Analyse der Transduktionseffizienzen der Deletionen im 5' Bereich der PES <sub>nt4884-5629</sub> .....	80
Abb. 29: Schematische Darstellung der pMD9-Konstrukte mit Deletionen im 3' Bereich der PES <sub>nt4884-5628</sub> .....	81
Abb. 30: Analyse der Zellysate und Viruspartikel der Deletionen im 3' Bereich der PES <sub>nt4884-5628</sub> .....	82
Abb. 31: Analyse der Transduktionseffizienzen der Deletionen im 3' Bereich der PES <sub>nt4884-5628</sub> .....	83

Abb. 32: Expressionsplasmide des Pol-Vorläuferproteins und seiner Untereinheiten.....	85
Abb. 33: Proteinanalyse der Verpackung der Pol-Untereinheiten ins Viruspartikel.....	86
Abb. 34: Überblick über die verschiedenen Pol-Expressionsplasmide mit Mutationen in den aktiven Zentren der Enzyme .....	88
Abb. 35: Proteinanalyse der Pol-Verpackung von Mutationen in aktiven Zentren der Enzyme .....	89
Abb. 36: RNA-Sekundärstrukturen von Deletionen in CASI .....	96
Abb. 37: RNA-Sekundärstrukturen verschiedener Deletionen in CASII.....	101
Abb. 38: Schematische Darstellung der PES <sub>nt4884-5628</sub> und der darin enthaltenen iPPTs.....	102

## ***6.6 Tabellenverzeichnis***

Tab. 1: Die ICTV-Nomenklatur der Retroviridae (verändert nach Rethwilm, 2003) .....	2
Tab. 2: Verwendete Oligonukleotide .....	25
Tab. 3: Einstellungen des Programms mfold .....	54
Tab. 4: Klonierungsstrategien der hergestellten Konstrukte .....	124

## ***6.7 Erklärungen***

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, daß ich die Dissertation „Mechanismus der Polymerase-Inkorporation in foamyvirale Partikel“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Zudem erkläre ich, daß diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

Katrin Peters

## **6.8 Lebenslauf**

Name: Katrin Martina Peters  
Geburtsdatum: 15. September 1975  
Geburtsort: Wolfsburg

### **Schulbildung:**

1981-1985 Grundschule Plockhorst  
1985-1987 Orientierungsstufe Edemissen  
1987-1991 Realschule Edemissen  
1991-1994 Gymnasium am Silberkamp, Peine; Abitur 06/1994

### **Studium:**

10/1994-03/1997 Diplomstudiengang Biologie an der Technischen Universität  
Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig; Vordiplom 09/1996  
04/1997-09/2001 Fortsetzung des Studiums der Biologie an der Universität  
Hohenheim; Diplom 09/2001  
Diplomarbeit: „Interaktion zwischen den Tumorsuppressoren CD44 und Merlin“  
am Institut der Mikrobiologie und Molekularbiologie der Universität  
Hohenheim in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Kuhn

### **Promotion:**

ab 01/2002 Promotion am Institut für Virologie der Bayerischen Julius-  
Maximilians Universität Würzburg in der Arbeitsgruppe von Prof.  
Dr. A. Rethwilm  
Thema: Mechanismus der Polymerase-Inkorporation in foamyvirale Partikel

Würzburg, den

Katrin Peters

## **6.9 Publikationsliste**

**Heinkelein M., Leurs C., Rammling M., Peters K., Hanenberg H. & Rethwilm A. (2002b):** Pregenomic RNA is required for efficient incorporation of pol polyprotein into foamy virus capsids. *J. Virol.* 76, 10069-10073

**Stange A., Mannigel I., Peters K., Heinkelein M., Stanke N., Cartellieri M., Gottlinger H., Rethwilm A., Zentgraf H. & Lindemann D. (2005):** Characterization of prototype foamy virus gag late assembly domain motifs and their role in particle egress and infectivity. *J. Virol.* 79, 5466-5476

**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, 7005-7013

## **Danksagung**

Ich danke an erster Stelle meinem Doktorvater, Prof. Dr. Axel Rethwilm, der die Betreuung meiner Promotion übernommen und die Entwicklung der Arbeit stets mit großem Interesse verfolgt hat. Durch viele nützliche Anregungen und Hinweise hat er maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Prof. Dr. Jürgen Kreft möchte ich für die Bereitschaft danken, die Zweitkorrektur zu übernehmen.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Martin Heinkelein, der mich als Betreuer im Labor in jeder Hinsicht unterstützt hat und ohne dessen Anregungen und Hinweise diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre. Durch seine zahlreichen guten Ideen hat er meine Projekte maßgeblich vorangebracht und mir bis zum Ende beigestanden.

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen (auch ehemaligen) Mitarbeitern der Labore 050-052 für die gute und angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Ich möchte mich besonders bei Kathleen Gärtner und Heike Wagner für ihre praktische und moralische Unterstützung beim Zusammenschreiben dieser Arbeit bedanken.

Ich möchte allen meinen Freunden danken, die einfach nur für mich da waren und mich unterstützt haben. Ganz besonderem Dank gilt hierbei Dorothee Bogedain und Martina Lieb, denen die meisten richtig gesetzten Kommata in dieser Arbeit zu verdanken sind. Für alle falsch oder nicht gesetzten Kommata trage ich die alleinige Verantwortung.

Auch Cindy Nitschke, die mit ihrem unvergleichlichem Charme darauf bestanden hat, gesondert in dieser Danksagung erwähnt zu werden, möchte ich, ebenso wie Tatiana Wiktorowicz, danken. Vielen Dank für die vielen gemeinsam durchlittenen Tage und Nächte, die Ablenkungen und den Druck im richtigen Moment.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und Geschwistern. Danke, daß es Euch gibt.