

Molekulare Untersuchungen zur Integration von Foamyviren



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

vorgelegt von
Ali Nowrouzi
aus Teheran

Würzburg, 2007

Eingereicht am.....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:.....

Gutachter:.....

Gutachter:.....

Tag des Promotionskolloquiums:.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:.....

The knowledge of anything, since all things have causes, is not acquired or complete unless it is known by its causes.

Abu Ali Al-Husain Ibn Abdallad Ibn Sina (Avicenna)

930-1037 A.C; Iran

Marcel Barthel (†)

1	Einleitung	1
1.1	Historie der Retroviren	1
1.2	Foamyviren	4
1.2.1	Geschichte und Vorkommen.....	4
1.2.2	Genomorganisation, Morphologie und Genexpression	7
1.2.3	Der foamyvirale Replikationszyklus	12
1.2.4	Foamyvirale Vektoren	17
1.3	Retrovirale Integration	19
1.3.1	Die retrovirale Integrationsreaktion	19
1.3.2	Zelluläre Kofaktoren der retroviralen Integration	23
1.3.3	Das Integrationsmuster von Retroviren und Insertionelle Mutagenese.....	26
1.4	Fragestellung	29
1.4.1	Analyse des foamyviralen Integrationsmusters in humanen Zelllinien.....	29
1.4.2	Identifikation von mit der Foamyvirus Integrase interagierenden zellulären Proteinen ..	30
2	Material und Methoden.....	31
2.1	Materialien.....	31
2.1.1	Chemikalien	31
2.1.2	Enzyme und Reaktionspuffer	31
2.1.3	Bakterienstämme	32
2.1.4	Zelllinien.....	32
2.1.5	Antibiotika.....	33
2.1.6	Antikörper.....	33
2.1.7	Plasmide	34
2.1.8	Oligonukleotide	35
2.1.9	Größen-/Längenstandards	38
2.1.10	Kommerzielle Methodenkits	39
2.1.11	Sonstiges Material	39
2.2	Puffer und Lösungen	40
2.2.1	Bakterienkultur	40
2.2.2	Medien, Lösungen und Puffer für zellbiologische Methoden	41
2.2.3	Lösungen und Puffer zur Analyse und Klonierung von DNA.....	43
2.2.4	Lösungen und Puffer für proteinbiochemische Methoden	44
2.2.5	Standardlösungen und Puffer	48
2.3	Molekularbiologische Methoden	49
2.3.1	Isolation eukaryotischer genomischer DNA.....	49
2.3.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	50
2.3.3	Klonierung mit dem TOPO-TA-Cloning-Kit	51
2.3.4	DNA-Agarosegelelektrophorese	52
2.3.5	Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	53
2.3.6	Restriktionsverdau von DNA.....	53
2.3.7	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	54
2.3.8	Präzipitation von DNA.....	54
2.3.9	Ligation von linearen DNA-Fragmenten	55
2.3.10	Zusammenfügen von Oligonukleotiden	55
2.3.11	Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien	56
2.3.12	Transformation von DNA in kompetente <i>E. coli</i> -Bakterien	56
2.3.13	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	57
2.3.14	Spektrometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	59
2.3.15	Sequenzierung von DNA	59

2.4	Zellbiologische Methoden	60
2.4.1	Kultivierung adhärenter Zelllinien	60
2.4.2	Kultivierung nicht-adhärenter Zelllinien	61
2.4.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	62
2.4.4	Zellzahlbestimmung	62
2.4.5	Transfektion	63
2.4.6	Herstellung von Zelllysaten.....	66
2.4.6.1	Zelllysate für Western Blot	66
2.4.6.2	Zelllysate für Pull-Down-Experimente.....	67
2.4.7	Herstellung von transkriptionsaktiven Kernextrakten.....	68
2.4.8	Herstellung von eukaryotischen Zellen zur stabilen Expression von rekombinanten Proteinen mittels retroviralem Gentransfer	69
2.4.9	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	70
2.5	Proteinbiochemische Methoden	70
2.5.1	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese.....	70
2.5.2	Western Blot.....	72
2.5.3	Silberfärbung.....	73
2.5.4	Aufreinigung rekombinanter Proteine mit C-terminalem Flag-Tag in eukaryotischen Zellen	74
2.5.5	Pull-Down-assay	75
2.6	Virologische Methoden	76
2.6.1	Retrovirale Vektorsysteme	76
2.6.2	Produktion zellfreier, virushaltiger Überstände	78
2.6.3	Bestimmung der MOI (multiplicity of infection)	78
2.6.4	Inverse PCR zur Klonierung von retroviralen Integrationsstellen (RIS).....	79
2.6.5	Sequenzierung der retroviralen Integrationsstellen	82
2.7	siRNA-Methoden	83
2.8	Analyse der Integrationssequenzen	86
2.8.1	Überprüfung der Integrationssequenzen	86
2.8.2	Bioinformatische Methoden	86
3	Ergebnisse	88
3.1	Klonierung der retroviralen Integrationsstellen (RIS)	88
3.1.1	Retrovirale Vektoren und Transduktion von Zielzellen	90
3.1.2	Inverse PCR zur Klonierung von foamyviralen Integrationsstellen.....	93
3.2	Das Integrationsmuster von Foamyviren	98
3.2.1	Chromosomale Lokalisation der PFV Integrationsstellen (PFV IS) im humanen Genom	98
3.2.2	Die Integrationsfrequenz in transkribierte Regionen.....	101
3.2.3	Loakalisation der RIS in RefSeq Gene	103
3.2.4	Entfernung der retroviralen Intetgrationsstellen zum Transkriptionsstart bekannter Gene	105
3.2.5	Die Distanz von PFV Integrationsstellen zu bekannten Oncogenen	107
3.2.6	Die Integrationspräferenz in der Nähe zu CpG-reichen Inseln.....	109
3.2.7	Die zelluläre Basenzusammensetzung anPFV-Integrationsstellen	110
3.3	Identifikation PFV-Integrase-interagierender zellulärer Proteine	114
3.3.1	Expression von PFV Integrase in humanen Zellen.....	114
3.3.2	Aufreinigung der PFV-Integrase	117
3.3.3	Identifikation von zellulären Proteinen, die mit der PFV-Integrase interagieren.....	119
3.3.4	Untersuchungen über die Funktion der mit PFV-Integrase interagierenden zellulären Proteinen	123

4	Diskussion.....	125
4.1	Vergleich der Retroviralen Integrationsmuster.....	125
4.1.1	Die chromosomale Verteilung der Integrationsstellen	126
4.1.2	Die Integration in transkribierende Bereiche.....	128
4.1.3	Die Integration in regulatorische Bereiche	131
4.1.4	Die Nukleotid Zusammensetzung an retroviralen Integrationsstellen	136
4.1.5	Retrovirale Integrationsmuster und ihre Bedeutung für die Sicherheit in der Gentherapie	138
4.2	Potentielle zelluläre Kofaktoren der PFV Integrase	142
4.2.1	Eigenschaften und spekulative Rolle der identifizierten mit der PFV Integrase interagierende zelluläre Proteine	144
5	Literaturverzeichnis.....	148
6	Anhang	167
6.1	Zusammenfassung.....	167
6.2	Summary	169
6.3	Tabellen	171
6.4	Abkürzungsverzeichniss	174
6.5	Abbildungsverzeichnis	177
6.6	Tabellenverzeichnis	177
6.7	Erklärung.....	178
6.8	Lebenslauf.....	179
6.9	Publikationsliste	180

1 Einleitung

1.1 Historie der Retroviren

Retroviren wurden vor fast 100 Jahren aufgrund ihrer tumorinduzierenden Fähigkeiten bei Hühnern zum ersten Mal beschrieben. Nachdem die dänischen Wissenschaftler Vilhelm Ellermann und Oluf Bang erkannten, dass ein Virus die Ursache für die Entstehung einer Leukämie bei Hühnern war (Ellermann and Bang, 1908), konnte Peyton Rous am Rockefeller Institut in New York mit ultrafiltrierten Extrakten aus Geflügelsarkomen Tumorerkrankungen auf gesunde Hühner übertragen (Rous, 1911). Peyton Rous erhielt hierfür 1966 den Nobelpreis und das in den Extrakten enthaltene Virus, welches die Bildung von Tumoren verursachte, wurde nach ihm *Rous Sarkoma Virus* (RSV) genannt. Die von Ellermann und Bang entdeckten Viren werden im Allgemeinen als *Avian Leukosis Virus* (ALV) bezeichnet. In den folgenden Jahren konnten zahlreiche Viren isoliert werden, die bei Mäusen, Katzen, Kühen und Affen tumorinduzierende Eigenschaften entfalteten (Rosenberg and Jolicoeur, 1997). Die Klassifizierung dieser anfänglich aufgrund ihres onkolytischen Potentials noch als Oncornaviren bezeichnete Virusgruppe in die Familie der Retroviren erfolgte jedoch Jahre später, als 1970 Howard M. Temin und S. Mizutani sowie David Baltimore zeitgleich die Entdeckung machten, dass in Virionen von RSV das später als reverse Transkriptase (RT) bezeichnete Enzym enthalten (Baltimore, 1970; Temin and Mizutani, 1970). Dieses bis dahin unbekannte Enzym, welches die Fähigkeit besitzt RNA in DNA umzuschreiben, revolutionierte das bis dahin in der Biologie geltende zentrale Dogma des unidirektionalen genetischen Informationsflusses von DNA auf RNA. Die Forscher wurden für diese Entdeckung ebenfalls mit dem Nobelpreis gewürdigt. Zudem brachte die Kenntnis über die Existenz der RT den Beweis für die bis dahin in der wissenschaftlichen Gemeinde nicht allgemein anerkannten von Howard M. Temin im Jahre 1964 postulierte Provirus Hypothese. Temin erkannte damals schon, dass die Fähigkeit von RSV, infizierte Zellen stabil zu transformieren, nicht durch die virale RNA allein ausgelöst sein kann, sondern dass sehr früh im Replikationszyklus eine Umschreibung der viralen Erbinformation von RNA in DNA stattfinden muss. Diese Form des Virus nannte er Provirus. Beweis für diese damals als sehr radikal empfundene Hypothese gewann er aus Versuchen mit metabolischen Inhibitoren der DNA-Synthese, welche frühe Stadien der RSV-Infektion blockierten (Temin, 1964). Die Entdeckung der Reversen Transkriptase war zudem auch der Schlüssel zu seiner 1971 aufgestellten Protovirus Hypothese (Temin, 1971), in der nach dem genetischen Informationsfluss von

RNA zu DNA das Provirus in die Erbinformation der Wirtszelle integriert und dort stabil an Tochterzellen weitergegeben werden kann. Diese horizontale Übertragung von Erbinformationen war nicht nur für das Verständnis des Replikationszyklus von Retroviren von Bedeutung, sondern ließ auch Spekulationen über den Ursprung von Retroviren als ehemalige zelluläre mobile Elemente zu, welche die Fähigkeit zu einer extrazellulären Übertragung erlangt haben. Die Tatsache, dass Reverse Transkriptasen in Eukaryoten und auch in Bakterien weit verbreitet sind und ungefähr 10% des Säugertiergenoms aus sogenannten Retrotransposons bestehen, welche nur zu einer intrazellulären (vertikalen) Übertragung von Erbinformation fähig sind, spricht zum einen für die Bedeutung von mobilen Elementen in der Evolution und für den Ursprung der Retroviren.

Tab. 1: Klassifizierung der Familie der Retroviren (nach Rethwilm 2003, verändert)

Subfamilie	Genus	Wichtigste Vertreter	Genom	Virusmorphologie
Orthoretroviren	α -Retroviren	Rous Sarcoma Virus (RSV) Avian Leukosis Virus (ALV)	einfach	Zentral liegende, sphärische Kapside „C-Partikel“
	β -Retroviren	Mouse-Mammary-Tumor-Virus (MMTV)	Komplex*	Exzentrisch liegende, sphärische Kapside „B-Partikel“ (MMTV)
		Mason-Pfizer Monkey Virus (M-PMV)	einfach	Zylindrische Kapside „D-Partikel“ (M-PMV)
	γ -Retroviren	Murine Leukemia Viruses (MLVs) Feline Leukemia Viruses (FeLVs)	einfach	Zentral liegende, sphärische Kapside, „C-Partikel“
	δ -Retroviren	Human T-Cell Leukemia Virus 1 und 2 (HTLV-1 und 2) Bovine Leukemia Virus (BLV)	komplex	Zentral liegende, sphärische Kapside, „C-Partikel“
	ϵ -Retroviren	Walleye-Dermal-Sarcoma-Virus (WDSV)	komplex	Zentral liegende, sphärische Kapside, „C-Partikel“
Lentiviren	Human Immunodeficiency Virus 1 und 2 (HIV-1 und 2) Simian Immunodeficiency Viruses (SIVs)	komplex	Konusförmige Kapside	
Spumaretroviren	Foamyviren	Prototypic Foamy Virus (PFV) Simian Foamy Virus (SFV)	komplex	Zentral liegende, sphärische Kapside

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

In der Tat konnten wenige Jahre später die Mechanismen der reversen Transkription entschlüsselt (Telesnitsky and Goff, 1997) und integrierte provirale RSV-, ALV- und MLV- (*Murine Leukämie Virus*) Sequenzen identifiziert werden, die endgültig die Akzeptanz dieser Theorie bewirkten und ein zweites Charakteristikum der Retroviren, die Integration ins zelluläre Genom, enthüllten (de la Maza et al., 1975; Steffen and Weinberg, 1978; Varmus et al., 1973). Das virale in Kapitel 1.3.1 ausführlich beschriebene Integrase-Protein (IN-Protein) katalysiert diesen für den Lebenszyklus der Retroviren essentiellen Schritt. Anfang der achtziger Jahre wurde der erste humane onkogene Retrovirus HTLV (Humane T-Zell-Leukämie Virus) beschrieben (Gallo et al., 1981; Poiesz et al., 1980). Etwas später wurde durch die Identifizierung des humanen AIDS-(acquired immunodeficiency disease)-Epidemie-Erregers HIV (Barre-Sinoussi et al., 1983; Gallo et al., 1984; Levy et al., 1984) erneut das wissenschaftliche Interesse für Retroviren angefacht, was der Untersuchung von vielen Aspekten des retroviralen Lebenszyklus beigetragen hat. Neben der onkogenen Eigenschaft einiger Orthoretroviren, welche maßgeblich zum Verständnis der modernen Tumorbilogie beigetragen haben (Bishop, 1983; Varmus, 1984), stellen Retroviren aufgrund ihrer besonderen Eigenschaft, ihr Erbgut stabil in Zellen einzubringen, zusammen mit der Anfang der achtziger Jahre beginnenden Entwicklung von retroviralen Vektoren (Anderson, 1984; Joyner et al., 1983), attraktive Werkzeuge zur Korrektur von genetisch vererbaren Krankheiten in der somatischen Gentherapie dar (Gaspar and Thrasher, 2005; Verma and Weitzman, 2005). Die Familie der *Retroviridae* ist taxonomisch in zwei Unterfamilien eingeteilt, die der *Orthoretrovirinae* und die der *Spumaretrovirinae*. Die Unterfamilie der Orthoretroviren besteht aus sechs Genera, während die Unterfamilie der Spumaviren nur ein Genus, die Foamyviren umfasst. In Tab. 1 sind zu jedem Genus die charakteristischen Vertreter aufgelistet. Bis auf die Genera der aphotogenen Spumaviren und der inflammatorische und degenerative Erkrankungen hervorrufenden Lentiviren, deren bekanntester Vertreter das humane Immundefizienzvirus (HIV) ist, handelt es sich bei den restlichen Genera um Retroviren mit onkogenen Potential. Nach der Struktur des Genoms wird nochmals zwischen einfachen Retroviren und komplexen Retroviren unterschieden. Einfache Retroviren codieren nur für die vier elementaren Virusbestandteile *gag*, *pro*, *pol* und *env*, während komplexe Retroviren zusätzlich noch codierende Bereiche für akzesorische Proteine besitzen, welche regulatorische Funktionen erfüllen (Vogt, 1997a).

In den folgenden Kapiteln werden die Besonderheiten der Spumaviren, weshalb sie auch im Jahre 2002 vom ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) in eine Unterfamilie der Retroviren eingeteilt wurden (siehe Tab. 1), durch einen Vergleich mit den Spezifitäten von konventionellen Retroviren hervorgehoben.

1.2 Foamyviren

1.2.1 Geschichte und Vorkommen

Spumaretroviren, besser bekannt als Foamyviren (FV), wurden 15 Jahre vor der Definition von Retroviren und 15 Jahre vor der Entdeckung der ersten Immundefizienzviren beschrieben und als erstes nach der Entdeckung der Reversen Transkriptase von Temin, Mizutuna und Baltimore, als ein nicht tumorinduzierendes Retrovirus klassifiziert (Temin, 1971). Die Entdeckung war zugleich ungewöhnlich, da die ersten Foamyviren aus Zellkulturen von gesunden Affen der *Macacaceae*-Familie isoliert wurden. Aufgrund des schaumartig (Latein: *Spuma*, Schaum) aussehenden zytopathischen Effekts (CPE), den sie bei infizierten Zellen in Kulturen verursachten, bekamen sie ihren Namen. Charakteristikum des CPE ist die Formierung von großen Syncytien (siehe Abb. 1C), welche cytoplasmatische Vakuolen enthalten (Enders and Peebles, 1954; Rustigian et al., 1955).

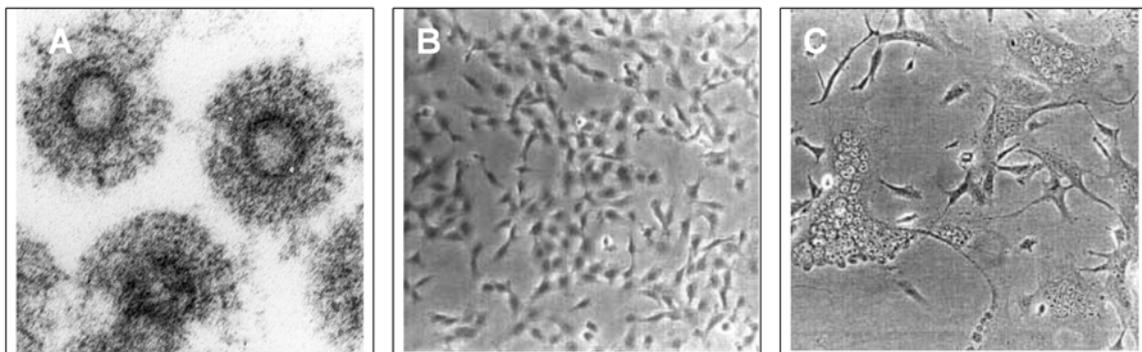


Abb. 1: EM Aufnahmen von Foamyviren und infizierte Zellkulturen

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

Obwohl FV alle bis jetzt untersuchten Zelllinien verschiedenen Ursprungs infizieren können und in vielen ein CPE zu sehen ist (Hooks and Gibbs, 1975), scheint jedoch die Replikation in zahlreichen natürlich infizierten Tieren (siehe Tab. 2), obwohl FV-DNA-Kopien in nahezu allen Gewebearten zu finden sind, auf die orale Mucosa beschränkt zu sein (Falcone et al., 1999). Darüber hinaus sind auch von anderen Säugetierfamilien Spumaviren beschrieben worden, welche in Tab. 2 aufgelistet sind.

**Tab. 2: Spumaviren-Isolate und ihre Wirte
(nach Meiering und Linial 2001, Falcone et al. 2003)**

Art	Virusisolat	Referenz
<u>Höhere Primaten (<i>Hominoidea</i>)</u>		
Mensch (<i>Homo Sapiens</i>)**	PFV (SFV _{cpz(hu)} , HFV)	Achong et al. 1971
Schimpanse (<i>Pan troglodytes</i>)	SFVcpz	Rogers et al. 1967 Hooks et al. 1972, Herchenröder et al. 1994,
Orang-Utan (<i>Pongo pymaeus</i>)	SFVora	McClure et al. 1994
Gorilla (<i>Gorilla gorilla</i>)	SFVgor (SFVgg)	Bieniasz et al. 1995
<u>Altweltaffen (<i>Catarrhini</i>)</u>		
Rundgesichtsmakkake (<i>Macaca cyclopsis</i>),	SFVmac	Johnston 1961
Javaneraffe (<i>Macaca fascicularis</i>)	SFVmac	Johnston 1961
Afrik. Grüne Meerkatze (<i>Chlorocebus aethiops</i>)	SFVagm	Stiles et al. 1964
Steppenpavian (<i>Papio cynocephalus</i>)	SFVbab	Rhodes-Feuillette et al. 1979
<u>Neuweltaffen (<i>Platyrrhini</i>)</u>		
Totenkopffaffe (<i>Saimiri sciureus</i>)	SFVsqu	Johnston 1971
Klammeraffe (<i>Ateles spec.</i>)	SFVspm	Hooks et al. 1973
Kapuzineraffe (<i>Cebus spec.</i>)	SFVcap	Hooks und Gibbs 1975
Weißbüschelaffe (<i>Callithrix jacchus</i>)	SFVmar	Marczynska et al. 1981
<u>Lemuren (<i>Lemuriformes</i>)</u>		
Riesengalago (<i>Otlemur crassi-caudatus ssp.</i>)	SFVgal	Johnston 1971
<u>Andere Säuger</u>		
Katze (<i>Felix domestica</i>)	FFV	Riggs et al. 1969
Rind (<i>Bos taurus</i>) (BSV)	BFV	Malmquist et al. 1969
Pferd (<i>Equus caballus</i>)	EFV	Tobaly-Tapiero et al. 2000

* angepasste Nomenklatur nach Meiering und Linial 2001, weitere gebräuchliche Bezeichnungen in Klammern.

** kein natürlicher Wirt, zoonotische Übertragung, vgl. Text.

Bei nicht-menschlichen Primaten erfolgt die Übertragung vermutlich über Speichel nach Bissverletzungen (Hooks and Gibbs, 1975) und kann, da die Übertragung des Virus nicht vom Alter der Virusträger abhängt, sowohl in Jungen als auch späteren Lebensabschnitten stattfinden (Neumann-Haefelin et al., 1983). Bei Rindern wurde vor kurzem auch eine Transmission von FV durch Milch beobachtet (Romen et al., 2007).

Wenn auch zahlreiche Untersuchungen zeigen konnten, dass artspezifische FV in bis jetzt allen Untersuchten wild lebenden Affenarten verbreitet sind, konnten, obwohl intensiv untersucht, keine pathogenen Eigenschaften auf eine natürliche FV-Infektion zurückgeführt werden (Falcone et al., 2003). Ausnahmen wurden mit replikationsdefekten FV-basierten Vektoren gemacht, welche letale neurologische Abnormalitäten in transgenen Mäusen verursachten, die vermutlich durch die viralen Tas- und Bet-Proteine (siehe 1.2.2) verursacht wurden und auf das zentrale Nervensystem beschränkt waren (Aguzzi, 1993; Aguzzi et al., 1996; Tschopp et al., 1996). Diese Beobachtung sind allerdings bis jetzt nur bei transgenen Mäusen aufgetreten und nicht im Verlaufe einer natürlichen Infektion mit FV (Falcone et al., 2003).

1971 wurden aus dem Nasopharynx-Karzinom eines kenianischen Patienten Spumaviren isoliert, die zunächst, da zu dieser Zeit die Existenz von HTLV-1 (human T-cell leukemia virus) noch nicht bekannt war, bei Menschen als Tumore verursachende Retroviren klassifiziert wurden und aufgrund ihres Ursprungs die Bezeichnung HFV (humanes Foamyvirus) bekamen (Achong et al., 1971a; Achong et al., 1971b). Neuere seroepidemiologische Studien und Sequenzanalysen dieses Isolates haben jedoch gezeigt, dass der Mensch kein natürlicher Wirt für Spumaviren ist (Saib and de The, 1996) und dass überdies eine hohe Übereinstimmung des ursprünglichen im Menschen isolierten FV mit Isolaten aus Schimpansen existiert (Herchenröder et al., 1994; Herchenröder et al., 1995; Schweizer and Neumann-Haefelin, 1995), so dass davon ausgegangen werden muss, dass kein ursprüngliches humanes FV existiert, sondern das damalige Isolat aufgrund einer zoonotischen Übertragung von einem Schimpansen in den Patienten gelangt war. Aufgrund dieser Hinweise wird das vom Menschen gewonnene Isolat heute als PFV (prototypische Foamyvirus) bezeichnet. Zoonotischen FV Übertragungen sind seitdem auch mehrmals bei Tierwärtern beobachtet worden und scheinen regelmäßig bei Angehörigen afrikanischer Jägergruppen aufzutreten (Heneine et al., 1998; Sandstrom et al., 2000; Schweizer et al., 1997; Switzer et al., 2004). Jedoch ist seit der Isolierung von PFV ebenfalls keine Pathogenität bei infizierten Menschen sowie eine Mensch-zu-Mensch Übertragung beobachtet worden (Heneine et al., 2003), so dass die biologische Rolle dieser Viren und die Mechanismen, die eine apathogene, persistierende Existenz im Wirt erlauben, noch immer, trotz einiger Hypothesen (Linial, 2000), ein Rätsel bleibt.

Auf den ersten Blick mag es für den Leser paradox erscheinen, die Unterfamilie der Spumaviren aufgrund ihres apathogenen Verhaltens genauer zu untersuchen, jedoch werden die in den nächsten Kapiteln zusammengefassten einzigartigen Besonderheiten der Spumaviren, weshalb sie evolutionsbiologisch oft als fehlendes Glied zwischen Retroviren und den einzigen anderen RT kodierenden Vertebratenviren, den

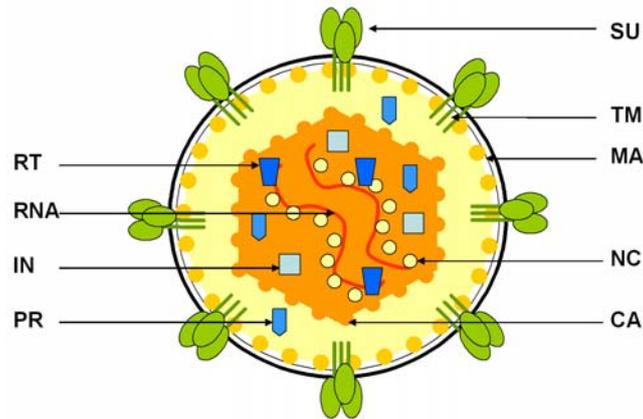
Hepadnaviren angesehen werden (Linial, 1999), mögliche Einblicke in die Evolution der Retroviren erlauben und in Hinblick auf die Fortschritte bei der Entwicklung von FV-basierten Vektoren (siehe 1.2.4) die Erforschung dieser Viren in ein anderes Licht stellen.

1.2.2 Genomorganisation, Morphologie und Genexpression

Wie die meisten Retroviren bestehen die infektiösen Partikel von Spumaviren aus sphärischen Proteinpartikel mit einer Größe von etwa 100 nm im Durchmesser, die von einer Lipidmembran umhüllt sind (siehe Abb. 1A & Abb. 2). In dieser Lipidmembran verankert befinden sich die viralen Hüllproteine (Env), die bei Foamyviren, wie in EM-Aufnahmen gezeigt werden konnte, ähnlich wie bei MLV und HIV-1 in Einheiten aus hexamerisch angeordneten Trimeren organisiert sind (Wilk et al., 2000). Das Innere des Partikels besteht aus einer sphärisch geformten elektronendichten Proteinhülle, das so genannte Kapsid, welches bei konventionellen Retroviren die zwei identischen einzelsträngigen (+)-Strang-RNAs umhüllt. Hier ist hervorzuheben, dass durch die Einzigartigkeit der Spumaviren, in ihren extrazellulären Partikeln bereits zum Teil revers transkribierte DNA zu enthalten (siehe 1.2.3), auch virale dsDNA im Kapsid enthalten sein können. Die Struktur des FV-Kapsids ist noch nicht vollständig untersucht, jedoch erweist sich die Zuordnung der bei allen Retroviren gemeinsamen Einteilung in Matrixproteine (M), Kapsidproteine (CA) und Nukleokapsidproteine (NC) als schwierig. Diese Proteine werden bei Orthoretroviren durch die Prozessierung des Gag-Vorläuferproteins durch virale Proteasen in reifen Partikel erzeugt (Vogt, 1997b). Bei FV wird jedoch das FV Gag-Vorläuferprotein untypisch für Retroviren überwiegend nur an einer Stelle prozessiert, so dass neben einem 71 kD großen Gag-Vorläuferprotein (pr71^{gag}) ein C-terminal minimal verkürztes 68 kD großes prozessiertes Gag-Protein (pr68^{gag}) in Viruspartikel nachweisbar ist (vgl. Abb. 2 A & B). Das 3 kD Große Spaltprodukt p3^{gag} konnte bis jetzt wahrscheinlich aufgrund seiner Größe nicht nachgewiesen werden (Flügel and Pfrepper, 2003). Untypisch für Retroviren ist auch das Vorhandensein des Partikel-assoziierten 18 kD großen Leaderpeptids (LD) von Env (vgl. Abb. 2 A & B), welcher im Gegensatz zu den Orthoretroviren ein essentieller Bestandteil des Virions ist (Lindemann et al., 2001; Wilk et al., 2001) und, wie vor kurzem gezeigt werden konnte, eine besondere Rolle bei der Partikelmorphogenese durch eine Interaktion mit dem N-Terminus des Gag-Proteins einnimmt (Cartellieri et al., 2005). Neben diesen strukturellen Komponenten sind die für die Replikation nötigen viralen Enzyme Reverse

Transkriptase (RT), Integrase (IN) und die Protease (PR), welche einzigartig bei FV überwiegend N-terminal fusioniert an dem Pol-Protein vorliegt (Flügel and Pfrepper, 2003; Löchelt and Flügel, 1996; Pfrepper et al., 1997), im Partikel enthalten.

A.



B.

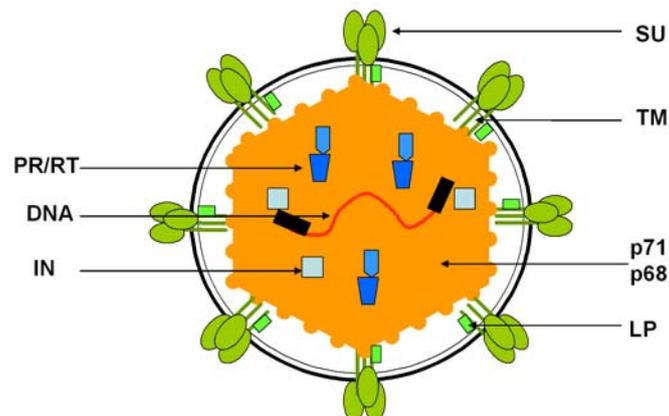


Abb. 2: Morphologie der Foamyvirus Partikel

Dargestellt ist schematisch die Morphologie von Orthoretroviren (A) und Spumaviren (B). Die prozessierten retroviralen Genprodukte Gag (orange), Pol (blau), Env (grün) sind farblich voneinander abgehoben. SU: Oberflächenuntereinheit; TM: Transmembranuntereinheit; LP: Leaderpeptide; MA: Matrixprotein; NC: Nucleokapsidprotein; CA: Kapsidprotein; RT: Reverse Transkriptase; IN: Integrase; PR: Protease; PR/RT: Spumavirus typisches PR-RT Fusionsprotein; RNA: genomische RNA; DNA: genomische DNA.

Der Genomaufbau der Spumaviren charakterisiert sie auf den ersten Blick als typische Vertreter der komplexen Retroviren, die neben den *gag*-, *pol*- und *env*-Genen am 3' Ende noch über weitere akzessorische Leseraster verfügen (siehe Abb. 3). Das Genom von PFV gehört mit einer 11,68 kB großen genomischen RNA und einer Proviruslänge von 13,25 kB mit den für Retroviren typischen LTRs (Long terminal repeats) an beiden Enden zu den größten retroviralen Genomen.

Als spezielles Element besitzen Spumaviren anders als alle anderen Retroviren neben dem U3-Promotor der LTRs, im 3'-Bereich des *env*-Gens einen zusätzlichen internen Promotor (IP) (Löchelt et al., 1993). Dieser Promotor besitzt im Gegensatz zu dem U3-Promotor eine schwache Basalaktivität (Yang et al., 1997), die zur Expression der kurzen subgenomischen mRNAs führt, welche den Transaktivator (Tas) und Bet kodieren (siehe Abb. 3 B). Das FV-Tas-Protein nimmt eine essentielle Rolle in der Regulation der FV-Genexpression ein, indem es sowohl den internen Promotor als auch den U3-Promotor, welcher ohne Tas inaktiv ist, aktiviert (Meiering et al., 2001; Rethwilm et al., 1991). Die Affinität von Tas-Bindungsstellen (TBS) zu Tas, die bei PFV stromaufwärts des IP und U3-Promotors in den so genannten TR-Elementen (engl: Tas response Elements) liegen (He et al., 1996) ist für den IP höher als für den U3-Promotor (Kang et al., 1998), so dass zunächst bei geringen Tas Mengen, vermutlich im Zusammenspiel mit anderen zellulären Proteinkomplexen (Blair et al., 1994), der IP positiv aktiviert wird, so dass folglich immer mehr Tas und Bet expremiert wird (Löchelt, 2003). Ab einer bestimmten Konzentration erfolgt die Aktivierung des LTR-Promotors (Rethwilm et al., 1991) und die Transkription der einfach und mehrfach gespleißten mRNAs, welche im Cytoplasma zu Gag, Pol und Env translatiert werden (siehe Abb. 3), sowie der genomischen RNA, welche in die FV-Partikel verpackt wird (Baldwin and Linial, 1998; Bodem et al., 1997; Löchelt, 2003)).

Über die Funktion von Bet ist bis vor kurzem viel spekuliert worden (Bock et al., 1998; Rethwilm, 2003), jedoch scheint, wie in Studien mit FV-basierten Vektoren gezeigt werden konnte (Löchelt et al., 2005; Russell et al., 2005), das FV-Bet-Protein eine ähnliche Rolle wie HIV-1 Vif zu spielen, welches den Einbau zellulärer APOBEC3-Proteine (Apolipoprotein B mRNA editing enzym catalytic complex 3) in die Viruspartikel verhindert (Sheehy et al., 2002; Simon et al., 1998). Dieser Mechanismus ermöglicht den Retroviren trotz der existierenden intrinsischen zellulären Immunität, welche offensichtlich gegen invasive fremde Nukleinsäuren gerichtet ist, die Replikation in APOBEC expremierenden Zellen zu vollenden (Cullen, 2006; Turelli and Trono, 2005). Versuche mit Bet defizienten und Wildtyp-FV zeigten jedoch, dass beide zu gleichem Masse durch das humane APOBEC3-Protein (hA3G) hypermutiert wurden (Delebecque et al., 2006), so dass über die natürliche Rolle von Bet diesbezüglich unterschiedliche, noch nicht geklärte Meinungen existieren.

Alle viralen mRNAs besitzen am 5'Ende ein Cap und sind am 3'Ende polyadenyliert. Die Kontrollmechanismen, die die Entstehung der verschiedenen Spleißvarianten bei PFV regulieren, sind noch nicht bekannt (Butsch and Boris-Lawrie, 2002), jedoch stellt die Gag-unabhängige Translation des Pro/Pol-Proteins bei Spumaviren eine weitere Besonderheit dieser Virusfamilie dar (siehe Abb. 3). Anders als bei den Orthoretroviren

(Vogt, 1997b), die Pro/Pol-Polyproteine als Gag-Fusionsproteine bilden, wird bei Spumaviren Pol von einer eigenen gespleißten mRNA translatiert (Enssle et al., 1996; Jordan et al., 1996; Yu et al., 1996). Als Konsequenz sind bei Spumaviren zur Regulierung des Mengenverhältnisses von synthetisiertem Gag- und Pol-Proteinen, die bei konventionellen Retroviren auf der Ebene der Translation kontrolliert werden (Jacks, 1990), und zur Inkorporation von Pol in die Viruspartikel, andere Mechanismen erforderlich, die unten erläutert werden.

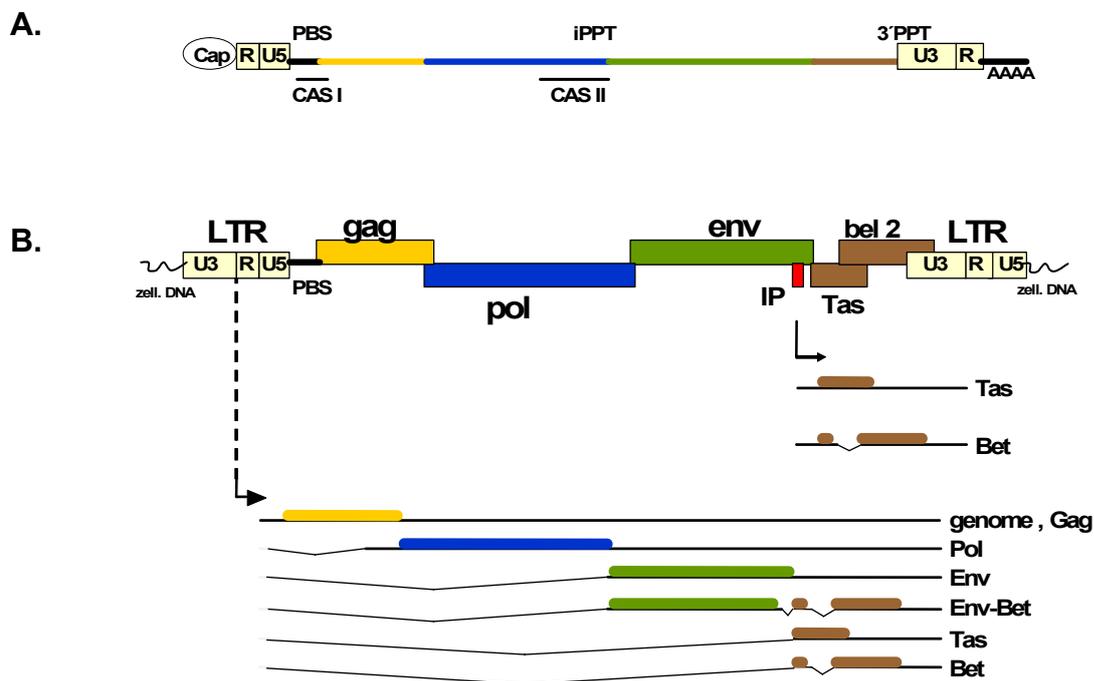


Abb. 3: Genomorganisation und Genexpression von PFV

(A) Schematische Darstellung der genomischen RNA von PFV. PBS: „Primer binding site“; CAS I und II: cis-aktive Sequenzbereiche I und II; PPT: Polypurintrakt; iPPT: interner Polypurintrakt; AAAAA: Polyadenylierung. (B) Schematische Darstellung des Provirus und der Genexpression (siehe Text) von PFV. IP: interner Promotor.

Die genomische RNA (siehe Abb. 3 A) von FV besitzt strukturelle Motive, welche für eine effiziente Verpackung, Dimerisierung und reversen Transkription des viralen RNA Genoms erforderlich sind. Wie bei allen Retroviren sind diese so genannten *cis*-aktiven Sequenzen (CAS) (siehe Abb. 3 A) oder auch PSI (engl: Packaging Signal) genannt durch Interaktionen mit Gag für die Isolierung der viralen genomischen RNA aus dem Gemisch aus zellulären mRNAs erforderlich (Banks et al., 1998; Berkowitz et al., 1996). Auch auf dieser Ebene zeigt sich die Besonderheit der Spumaviren. Spumaviren besitzen, wie

anhand der Entwicklung von PFV-basierten Vektoren gezeigt werden konnte, anders als bei anderen Retroviren, deren CAS-Elemente in der 5'-UTR (5'untranslatierte Region) zwischen Spleißdonor (5'SD) und dem Start des *gag*-Gens liegen, zusätzlich noch weitere cis-aktive Sequenzen, welche im *pol*-Gen liegen (Erlwein et al., 1998; Heinkelein et al., 1998) (siehe Abb. 3 A). Diese als CASII (cis-aktive Sequenz zwei) bezeichneten Sequenzen bilden zusammen mit etwa den ersten 450 Nukleotiden der 5'UTR (engl: 5'untranslated region), die als CASI (cis-aktive Sequenz eins) bezeichnet werden, das RNA-PSI der Spumaviren (Mergia and Heinkelein, 2003). Die 5'UTR enthält zusätzlich noch RNA-Dimerisierungssignale (Erlwein et al., 1997), die Primer binding site (PBS) und den für die Expression von Gag und Pol essentiellen Hauptspleißdonor (5'SD) in der R-Region (Heinkelein et al., 2000b; Russell et al., 2001). Interessanterweise hatte eine Deletion in der U5 und PBS des 5'UTR zwar kein Einfluss auf die Verpackung der genomischen RNA, jedoch konnte gezeigt werden, dass die für die Infektion essentielle Prozessierung von Gag ausblieb (Heinkelein et al., 2000b). Gleichzeitig hat die Beobachtung, dass ohne verpackte genomische RNA kein Pol ins Viruspartikel inkorporiert wird, eine weitere Besonderheit im Replikationszyklus der Spumaviren enthüllt (Heinkelein et al., 2002b). Genauere Analysen haben gezeigt, dass Sekundärstrukturen der genomischen RNA für die Pol-Inkorporation verantwortlich sind (Heinkelein et al., 2002b; Peters et al., 2005). Diese im Falle der Pol-Inkorporation als PES (Pol Enkapsidation Signal) bezeichneten Struktur motive residieren in den zuvor beschriebenen CASI- und CASII-Elementen (siehe Oben) und sorgen vermutlich durch Interaktionen mit Gag und Pol zum einen für die Inkorporation von Pol und zum anderen für die Verpackung der genomischen RNA (Heinkelein et al., 2002b; Linial and Eastman, 2003; Peters et al., 2005).

Der für die Initiation der Plusstrang-DNA-Synthese wichtige Polypurintrakt (PPT) liegt 5' der U3-Region (Tobaly-Tapiero et al., 1991). Neben diesem regulärem PPT gibt es im 3' Bereich des *pol*-Gens noch vier weitere Folgen von Purinen (Flügel et al., 1987), deren genaue Funktion unbekannt ist. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass eine von ihnen als interner PPT (iPPT) und damit als zweiter Initiationsort der Plusstrangsynthese dienen könnte (Charneau et al., 1992).

1.2.3 Der foamyvirale Replikationszyklus

Der Replikationszyklus von Spumaviren weicht in mehreren Aspekten von denen der Orthoretroviren ab. Die Besonderheiten, die überwiegend an Studien mit dem PFV-Isolat durchgeführt wurden, ergeben das Bild einer gemischten Replikationsstrategie, die Elemente von Retroviren, Retrotransposons und Hepadnaviren vereinigt. Der gravierendste Unterschied betrifft den Zeitpunkt der reversen Transkription. Nach dem doppelsträngige DNA in FV-Partikel detektiert wurden (Roy et al., 2003; Yu et al., 1996) und Versuche mit dem RT-Inhibitor Azido-Thymidine (AZT) darauf hindeuten, dass die reverse Transkription der RNA bei FV bereits in der virusproduzierenden Zelle stattfindet (siehe Abb. 4B) und nicht wie bei allen anderen Orthoretroviren nach Infektion der Zelle, wird angenommen, dass das funktionelle Genom der FV aus DNA besteht (Moebes et al., 1997; Roy et al., 2003; Yu et al., 1999). Die Beobachtung, dass isolierte DNA aus zellfreien Viruspartikeln für neue Infektionsrunden ausreicht, unterstützt diese Theorie (Roy et al., 2003; Yu et al., 1996). Die Tatsache, dass quantitativ mehr RNA als DNA in Viruspartikeln gefunden wurden, deutet allerdings eher für eine Mischung aus RNA- und DNA-haltigen Viruspartikeln hin, bei der die DNA-haltigen Partikel wahrscheinlich, obwohl noch nicht ausreichend analysiert, die funktionell aktive Fraktion darstellen (Rethwilm, 2003).

FV besitzen einen breiten Zelltropismus, der auf einen weit verbreiteten Zell-Rezeptor hindeutet (Lindemann and Goepfert, 2003). Das Fehlen von Zelllinien, die durch FV nicht infiziert werden können, erschwert die Identifikation des zellulären Rezeptors, welcher folglich auch bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht gefunden werden konnte (Lindemann and Goepfert, 2003). Bei den meisten Orthoretroviren ist die Penetration der Wirtszelle, die eine Einschleusung des viralen Kapsids in die Wirtszelle als Folge hat, pH-unabhängig. Nach der Bindung an den zellulären Rezeptor wird die Fusion zwischen der viralen und zellulären Membran durch eine Konformationsänderung der viralen Glycoproteine eingeleitet (Hunter, 1997).

Bei FV erfolgt nach der Bindung an den zellulären Rezeptor, bei der ein zweiteiliges Sequenzmotive der Oberflächeneinheit (SU) des Env-Vorläuferproteins (siehe Abb. 5) beteiligt ist (Duda et al., 2006), die Penetration der Wirtszelle durch einen pH-abhängigen Endocytoseweg (Picard-Maureau et al., 2003). Die genauen Mechanismen sind jedoch noch nicht ausreichend bekannt (Lindemann and Goepfert, 2003). Nach dem Eindringen der viralen Kapside ins Zytoplasma wird bei Orthoretroviren der Zerfall des Kapsids eingeleitet (engl. „uncoating“) (siehe Abb. 4A).

Während dieses sehr komplizierten Prozesses (Hunter, 1997) wird bei den meisten Orthoretroviren, durch bis jetzt noch nicht eindeutig geklärte Signale, die reverse Transkription der genomischen RNA eingeleitet (Telesnitsky and Goff, 1997). Wie schon erwähnt, findet dieser Prozess bei FV vermutlich, ähnlich wie bei den Hepadnaviren, bereits während der Partikelmorphogenese statt (Rethwilm, 2003), so dass bei FV Signale, welche die reverse Transkription einleiten, aus jetzt noch nicht geklärten Gründen zu einem anderen Zeitpunkt während der Partikelmorphogenese ausgelöst werden und bei dem Zerfall der FV-Kapside bereits vollständig reverse transkribierte DNA vorliegt.

Beim Zerfall der Kapside kommt es bei konventionellen Retroviren unabhängig von der RT-Aktivität noch zu strukturellen und funktionalen Modifikationen der Kapsidproteine, die zur Formierung von Nukleoprotein-Komplexen führen (Bowerman et al., 1989; Brown et al., 1987), welche aus der viralen DNA und viralen sowie zellulären Proteinen bestehen und als Preintegrationskomplexe (PIC) bezeichnet werden (Miller et al., 1997) (siehe Abb. 4). Bis jetzt wurden noch keine Versuche unternommen solche PIC von FV zu isolieren, jedoch gibt es Hinweise darauf, dass solche Nukleoprotein Komplexe auch bei FV vorhanden sind und sowie die PIC der Orthoretroviren (Sherman and Greene, 2002) bei dem Transport der viralen DNA zum Zellkern beteiligt sind (Petit et al., 2003; Saib et al., 1997). Dabei kommt es, wie bei HIV-1 gezeigt werden konnte (McDonald et al., 2002), zu einer Interaktion zwischen Proteinen der PIC und dem mikrotubuliorganisierenden Zentrum (MTOC), was einen Transport der viralen DNA über die Mikrotubuli (siehe Abb. 4) zum Zellkern auslöst (Petit et al., 2003; Saib et al., 1997). Hierbei spielen bei FV vermutlich weitere Prozessierungen Gag-Proteine an drei internen Protease-Schnittstellen (siehe Abb. 5B) eine wichtige Rolle (Flügel and Pfrepper, 2003; Pfrepper et al., 1999), die vermutlich zur Degradierung des Kapsids führen und die Bildung eines PIC-ähnlichen Komplexes begünstigen (Lehmann-Che et al., 2005).

Der Eintritt der viralen DNA in den Zellkern erfordert bei FV so wie bei allen anderen Orthoretroviren mit Ausnahme der Lentiviren (Lewis et al., 1992; Weinberg et al., 1991) den Zusammenbruch der Kernmembran während der Mitose (Bieniasz et al., 1995; Miller et al., 1990; Patton et al., 2004; Roe et al., 1993). Die virale Integrase katalysiert im Zusammenspiel mit zellulären Kofaktoren die Integration der viralen DNA ins zelluläre Genom (siehe 1.3) von wo aus die sequentielle Expression der regulatorischen und später der strukturellen Proteine von den U3-Promotor/Enhancer-Regionen der 5'LTR aus durch die RNA-Polymerase II erfolgen (Rabson and Graves, 1997).

Auf die Besonderheit der foamyviralen Expression wurde bereits in Kapitel 1.2.2 hingewiesen. Die genauen Mechanismen, welche die Expression von ungespleißter genomischer RNA und mehrfach gespleißte mRNAs regulieren sind bei FV noch nicht bekannt. Der Export von ungespleißten mRNAs wird vermutlich über ein CTE

(Constitutive transport element) ähnliches Motiv im *pol*-Gen reguliert (Löchelt, 2003). Das CTE wurde zuerst bei M-PMV (Mason-Pfizer monkey virus) identifiziert und konnte das Rev/Rev-responsive Element (RRE) bei HIV-1 funktionell ersetzen (Bray et al., 1994; Wodrich et al., 2001).

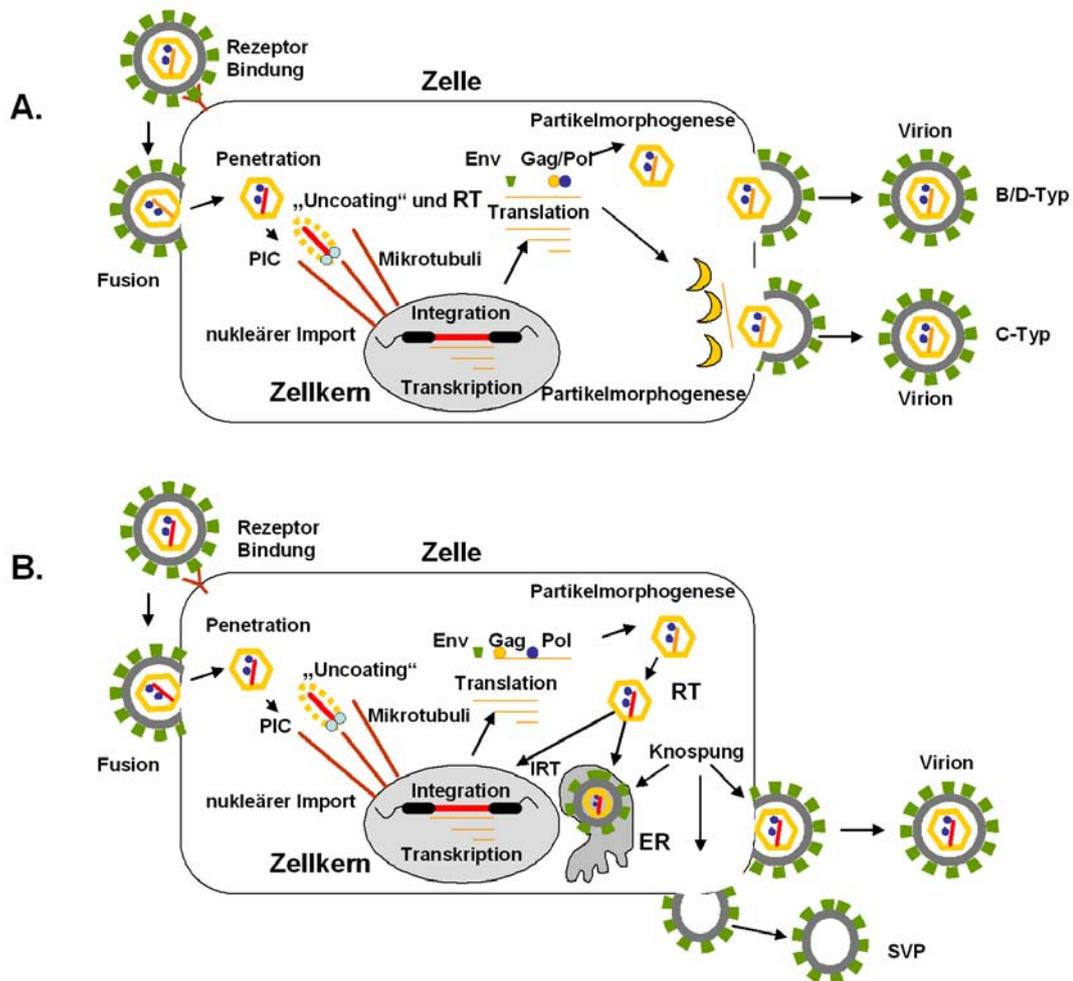


Abb. 4: Replikationszyklus von Orthoretroviren und Spumaviren.

Dargestellt ist der schematische Ablauf des Replikationszyklus von Orthoretroviren (A) und Spumaviren (B). Die retroviralen Proteine sind nach der in Abb. 2 verwendeten Farbkodierung gekennzeichnet. Das Provirus und die virale DNA ist in Rot wiedergegeben und die virale prägenomische RNA in Orange; PIC: Preintegrations-Komplex; IRT: intrazelluläre Retrotransposition; RT: reverse Transkription; ER: Endoplasmatisches Reticulum; SVP: subvirale Partikel.

Die zweite Besonderheit der FV zeigt sich, wie bereits angedeutet, bei genauerer Betrachtung der Partikelmorphogenese. Diese findet bei FV, ähnlich der B/D-Typ-Morphogenese mancher Orthoretroviren (Swanstrom and Wills, 1997), im Zytoplasma statt. Hierbei sorgen vermutlich CTRS-Motive (engl: cytoplasmic targeting and

retention signal), die im N-terminalen Teil von Gag identifiziert wurden (siehe Abb. 5 A) ähnlich wie bei M-PMV (Choi et al., 1999; Sfakianos et al., 2003) für die zytoplasmatische Partikelmorphogenese (Eastman and Linial, 2001). Die Abschnürung der Kapside findet so wie bei manchen endogenen Retroviren vor allem an intrazellulären Membranen statt (Baldwin and Linial, 1998; Fischer et al., 1998; Goepfert et al., 1999) (siehe Abb. 4).

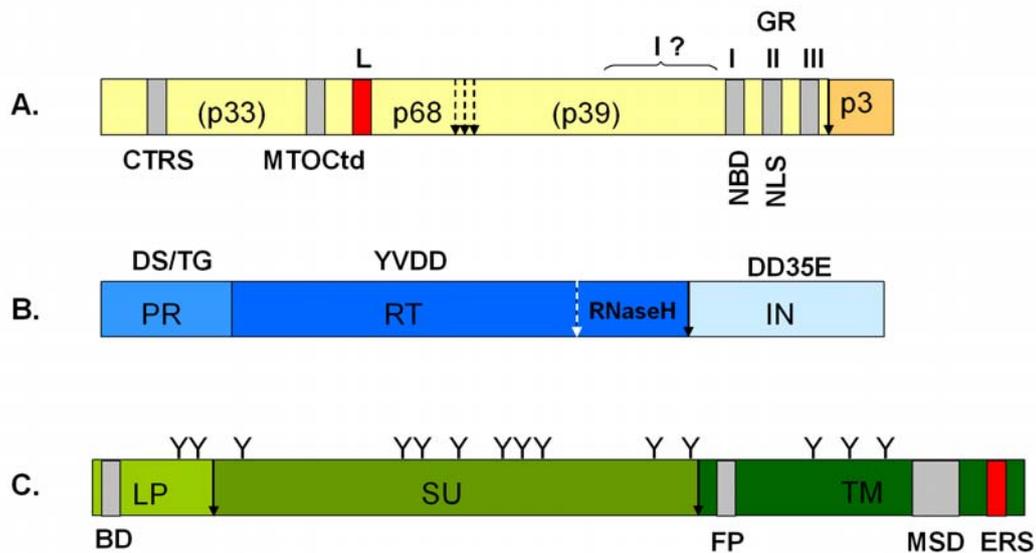


Abb. 5: Unprozessierte strukturelle PFV-Proteine.

Dargestellt sind die funktionellen Abschnitte der unprozessierten strukturellen Proteine von PFV zusammen mit für die Replikation essentiellen Domänen (graue und rote Kästchen). (A) Das PFV Gag-Protein wird überwiegend an einer Stelle prozessiert (schwarzer Pfeil). Sekundäre Protease Schnittstellen sind gekennzeichnet (schwarze gestückelte Pfeile). Die Produkte einer sekundären Prozessierung (siehe Text) sind in Klammern gesetzt. I: Interaktions-Domäne; L: Late-Domäne; CTRS: „cytoplasmic targeting and retention signal“; MTOctd: Mikrotubuli-Interaktions-Domäne (siehe 1.2.3); GR I-III: Glycin-Arginin reiche Protein-Abschnitte; NBD: Nukleinsäurebindungsdomäne; NLS: Nukleares Lokalisationssignal. (B) Das PFV Pol-Protein besteht aus den enzymatischen Untereinheiten Protease (PR), Reverse Transkriptase (RT) und der Integrase (IN) wird in zwei Untereinheiten (UE) gespalten. Eine Prozessierung (schwarzer Pfeil) trennt die PR-RT-UE (schwarzer Pfeil) von der IN-UE. Eine sekundäre Prozessierung (weißer Pfeil) verkürzt die PR-RT-UE (Flügel and Pfrepper, 2003; Pfrepper et al., 1998). DS/TG: aktives Zentrum der PR; YVDD: aktives Zentrum der RT; DD35E: aktives Zentrum der IN. (C) Das PFV Env-Protein wird an zwei Protease Schnittstellen (schwarze Pfeile) in die Oberflächeneinheit (SU), Transmembranuntereinheit TM und das Leaderpeptide (LP) gespalten. Die N-Glykolysierungsstellen (Lindemann and Goepfert, 2003) sind gekennzeichnet. BD: Budding-Domäne (Lindemann et al., 2001; Wilk et al., 2001); FP: Fusionspeptide (Wang and Mulligan, 1999); MSD: Membran-spannende Domäne (Pietschmann et al., 2000); ERS: ER-retrieval-signal (Goepfert et al., 1997; Goepfert et al., 1995).

Vermutlich sorgt das in der Transmembran-Untereinheit (TM-Untereinheit) des Env-Proteins befindlichen Dilysin-Motiv (siehe Abb. 5 C), welches als „ER-retrieval-signal“ fungiert und den Transport der FV Hüllproteine an die Zelloberfläche einschränkt (Goepfert et al., 1997; Goepfert et al., 1995), und die besondere Interaktion von Gag und

Env während der Partikelmorphogenese (Cartellieri et al., 2005; Yu et al., 2006) für die intrazelluläre Knospung. Interessanterweise findet bei EFV (siehe Tab. 2), wahrscheinlich aufgrund der Abwesenheit des ER-retrieval-Signals, die Knospung an der Plasmamembran statt (Tobaly-Tapiero et al., 2000).

Die spezifische Interaktion zwischen einer hoch konservierten Sequenz im LP (siehe Abb. 4C: BD) und dem N-Terminus von Gag während der Partikelmorphogenese (Cartellieri et al., 2005; Lindemann et al., 2001; Wilk et al., 2001) begründet wahrscheinlich auch die Beobachtung, dass FV sich nicht mit Glykoproteinen anderer Viren pseudotypisieren lassen (Pietschmann et al., 2000), so dass die strikte Abhängigkeit von autologem Env zur Freisetzung von FV-Kapsiden nötig ist (Baldwin and Linial, 1998; Fischer et al., 1998; Pietschmann et al., 1999). Zudem können FV in der Abwesenheit von Gag geringe Mengen an subviralen Partikel (SVPs) freisetzen (Shaw et al., 2003). SVPs sind für Retroviren nicht typisch, aber bei Hepadnaviren beschrieben worden (Nassal, 1996). Das legt Nahe, dass bei FV die Signale für die Freisetzung von Viruspartikel an der Plasmamembran hauptsächlich in Env und nicht wie bei anderen Retroviren in Gag liegen könnten (Lindemann and Goepfert, 2003).

Der im Replikationszyklus von FV späte Zeitpunkt der reversen Transkription, welcher bereits in der virusproduzierenden Zelle überwiegend abgeschlossen ist, begünstigt vermutlich auch die mit PFV-basierten Vektoren beobachtete intrazelluläre Retrotransposition (IRT), welche obwohl noch nicht ausreichend untersucht, für FV einzigartig zu sein scheint (siehe Abb. 4B). In Versuchen mit in Env deletierten PFV-basierten Vektoren, welche die vollständigen *gag* und *pol* Leseraster enthielten, zeigte sich bei Abwesenheit eines Extrazellulären Signalwegs eine Integration der Virus-DNA in mit dem Vektor transfezierte Zellen, die auf die Fähigkeit einer IRT hindeutet (Heinkelein et al., 2000a; Heinkelein et al., 2003). Vermutlich sind FV in der Abwesenheit eines extrazellulären Signalwegs, welcher durch das nicht vorhandene Env-Protein gegeben ist, in der Lage ihre bereits in der produzierenden Zelle reverse transkribierte cDNA zu integrieren, jedoch ist weder die biologische Rolle, die Häufigkeit, noch die Bedingungen, die eine IRT in natürlich infizierten Tieren begünstigen, ausreichend geklärt, so dass bis jetzt nur Spekulationen über die Bedeutung der IRT im Replikationszyklus der Spumaviren existieren (Rethwilm, 2003).

1.2.4 Foamyvirale Vektoren

Seit der Entwicklung der ersten replikationsinkompetenten retroviralen Vektorsysteme Anfang der achtziger Jahre, die zunächst nur auf MoMLV basiert waren (Mann et al., 1983; Williams et al., 1984), hat deren großes Potential zur Herstellung von transgenen Organismen (Dick et al., 1985; Eglitis et al., 1985; Keller et al., 1985; Miller et al., 1984; Williams et al., 1984) sowie ihre Anwendung in der somatischen Gentherapie (Anderson, 1984) die Entwicklung neuer alternativer retroviraler Vektorsysteme stimuliert (Miller, 1997). Neben den am meisten verbreiteten γ -retroviralen- und lentiviralen Vektorsystemen (Naldini et al., 1996a; Naldini et al., 1996b) bieten FV-basierte Vektoren, welche entweder auf SFV (siehe Tab. 2) oder PFV basiert sind, attraktive alternative Vektorsysteme, die aufgrund von einigen Vorteilen zurecht ihre Anwendung in der somatischen Gentherapie finden werden.

Die Generierung des PFV-Expressionsplasmids (pHSRV) Anfang der neunziger Jahre (Rethwilm et al., 1990) zusammen mit den oben zusammengefassten Erkenntnissen über die Replikationsstrategie von FV hat zur Entwicklung der ersten FV-basierten Vektoren geführt, welche zunächst noch replikationsfähig waren (Schmidt and Rethwilm, 1995). Durch eine schrittweise beginnende Deletion der strukturellen Gene folgten die ersten replikationsinkompetenten FV-Vektoren, in denen anfangs Teile des *env*-Gens und der akzessorischen Gene durch einer Markergen-Kassette, deren Expression von einem heterologen Promotor reguliert wurde, ersetzt wurden (Russell and Miller, 1996). Später wurde das gesamte *env-tas*-Leseraster sowie Teile des *gag*- und *pol*-Gens ersetzt (Erlwein et al., 1998; Heinkelein et al., 1998; Wu et al., 1998). Die Substitution der U3-Region in der 5'LTR des Vektors durch den CMV-Promotor (Fischer et al., 1998; Heinkelein et al., 1998; Moebes et al., 1997; Schenk et al., 1999; Trobridge and Russell, 1998; Wu and Mergia, 1999) sowie die Konstruktion von Verpackungsplasmiden, die entweder aus zwei separaten CMV getriebenen *gag/pol*- und *env*-Expressionsplasmiden (Heinkelein et al., 1998; Wu and Mergia, 1999) oder drei separaten *gag*-, *pol*- und *env*-Expressionsplasmiden bestanden (Heinkelein et al., 2002a; Park and Mergia, 2000; Trobridge et al., 2002a), stellt die dritte Generation von FV-Vektoren dar, welche nur noch die für eine effiziente Transduktion von Zielzellen minimalen essentiellen cis-aktiven Sequenzen (siehe 1.2.2) enthalten und nicht auf die Anwesenheit von replikationsfähigen Helferviren angewiesen sind (Mergia and Heinkelein, 2003).

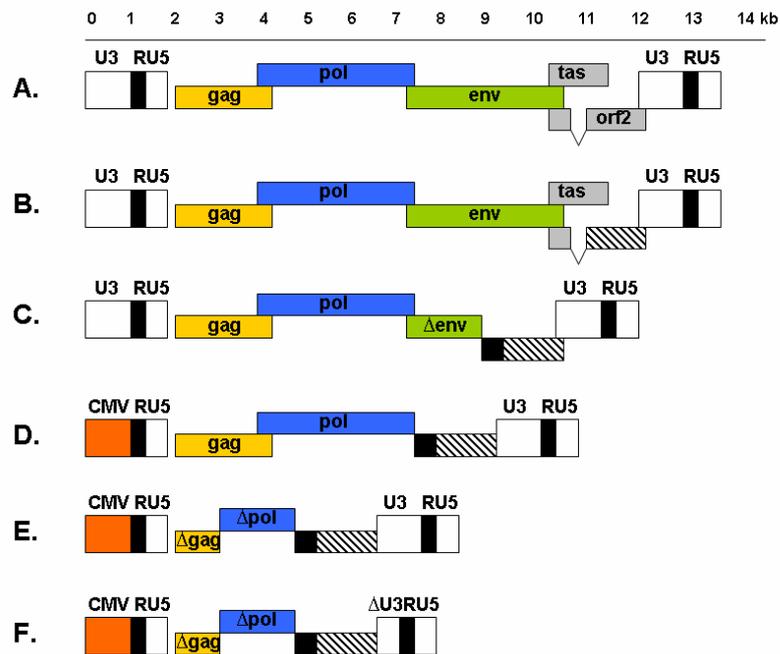


Abb. 6: Schematische Darstellung der publizierten FV Vektoren (nach Mergia und Heinkelein 2003, verändert)

(A) Provirales PFV Expressionsplasmid (Rethwilm et al., 1990). (B) Replikationsfähiger PFV-Vektor mit Substitution von orf2 durch Markergen (Schmidt and Rethwilm, 1995). (C) Replikationinkompetenter PFV-Vektor mit Substitution der akzessorischen Gene tas und bet durch eine Markergen-Kassette unter der Kontrolle eines zusätzlichen heterologen Promotor und Deletion in env (Russell and Miller, 1996). (D) PFV-Vektor mit interner Markergen-Kassette, welcher nur für Gag und Pol kodiert und durch eine Substitution der gesamten U3-Region in der 5'LTR durch den CMV-Promotor zur initialen Expression Tas unabhängig ist (Heinkelein et al., 1998; Trobridge and Russell, 1998). (E) CMV getriebener PFV Vektor mit essentiellen cis-aktiven Sequenzen in gag und pol (Δgag und Δpol). (F) CMV getriebener PFV Vektor mit essentiellen cis-aktiven Sequenzen in gag und pol sowie Deletion in U3 (ΔU3).

Durch die Substitution des U3-Promotors der 5'LTR durch einen konstitutiv aktiven Promotor und durch die Abwesenheit von Tas sind diese FV-Vektoren für die initiale Transkription zur Produktion von Viruspartikeln Tas-unabhängig und ähneln aufgrund der in Abwesenheit von Tas nicht aktiven LTRs (siehe 1.2.2) nach der Integration den sogenannten SIN-Vektoren (engl: self-inactivating vectors), welche aufgrund einer Deletion in der U3-Region (Yu et al., 1986) ebenfalls inaktive LTRs aufweisen.

Eine einfache Übernacht-Transduktion (Trobridge et al., 2002b) humaner pluripotenter hämatopoetischer Stammzellen (HSZ) mit FV-basierten Vektoren, welche in NOD/SCID-Mäusen (engl: nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice) erfolgreich repopulierten und sowohl das Potential zur lymphoiden sowie myeloiden Differenzierung aufwiesen (Josephson et al., 2004; Josephson et al., 2002), rechtfertigt die Anwendung von FV-basierten Vektoren in der somatischen Gentherapie hämatopoietischer Zellen. Ein Vergleich zwischen FV-basierten Vektoren, γ -retroviralen- und lentiviralen-Vektorsystemen (Leurs et al., 2003) zeigte sogar, obwohl

die natürliche FV-Infektion (Bieniasz et al., 1995) sowie die Transduktionseffizienz von FV-basierten Vektoren (Patton et al., 2004) ähnlich wie die der γ -Retroviren Zellzyklus abhängig zu sein scheint, im Vergleich zu lentiviralen Vektoren, eine nahezu gleiche Transduktionseffizienz von humanen CD34+ positiven Vorläuferzellen sowie hohe Transgen-Expressionsraten in heterotransplantierten NOD/SCID-Mäusen (Leurs et al., 2003). Eine stabile und effiziente Transgenexpression von mit FV-basierten Vektoren transduzierten HSZ konnte vor kurzem auch in klinisch relevanteren Tiermodellen (Hunde) erzielt werden (Kiem et al., 2007). Wahrscheinlich beruht die mit FV-basierten Vektoren beobachtete effektive Transduktion von sich selten teilenden Zellen auf einem im Vergleich zu anderen Retroviren nach der Penetration des Kapsids stabileren intermediären Zustand, welcher zum Teil durch die bereits in der virusproduzierenden Zelle stattfindende reverse Transkription (siehe 1.2.3) und der besseren Stabilität von DNA gegenüber RNA begünstigt wird (Kiem et al., 2007; Leurs et al., 2003). Trotz der zufrieden stellenden Resultate bezüglich der Transduktionseffizienz von HSZ und der Tatsache, dass bis jetzt für FV keine pathogenen Eigenschaften bekannt sind (siehe 1.2.1), befinden sich FV-basierte Vektoren noch in vorklinischen Stadium und müssen neben den in dieser Arbeit durchgeführten Analysen des Integrationsmusters (siehe 3.2) in gut ausgewählten Langzeit-Tiermodellen (von Kalle et al., 2004; Will et al., 2007) auf ihr genotoxisches Potential untersucht werden.

1.3 Retrovirale Integration

1.3.1 Die retrovirale Integrationsreaktion

Die retrovirale Integrase (IN) katalysiert vermutlich im Zusammenspiel mit zellulären Faktoren (siehe 1.3.2) in oligomeren-Komplexen (Bao et al., 2003; Faure et al., 2005; Jones et al., 1992) die Integration der viralen DNA in das Genom der infizierten Zelle. Der Mechanismus dieser Reaktion (siehe Abb. 7) kann in drei Schritte eingeteilt werden, die dem von Shapiro et al. 1979 postulierten Modell der Transposition des Bakterienphagen Mu ähneln. Im ersten Schritt werden nach der Bindung der IN-Komplexe an die att-sites der LTRs (Bushman and Craigie, 1990; Colicelli and Goff, 1985) zwei Nukleotide, welche distal zu den zwei an den Enden der LTRs lokalisierten phylogenetisch konservierten Nukleotiden (CA) positioniert sind, durch die Endonuclease Aktivität der IN abgespalten (Bushman and Craigie, 1991; Craigie et al., 1990; Katzman et al., 1989).

Hierbei bildet die IN an beiden Enden der viralen DNA stabile Komplexe. In diesen Komplexen ist die IN in Tetrameren angeordnet und mit jedem beiden Enden der LTRs verbunden, was vermutlich die aufeinander abgestimmte Integration (engl: concerted integration) der viralen DNA in das Genom der Wirtszelle gewährleistet (Craigie et al., 1990; Li and Craigie, 2005; Li et al., 2006). Dieser als 3'-Prozessierung bezeichnete Schritt resultiert in freien 3'-Hydroxylgruppen an beiden Enden der LTRs, welche im zweiten Schritt der Integrationsreaktion in einem nukleophilen Angriff die Phosphodiesterbindung der zellulären DNA brechen und den Strangtransfer einleiten (Engelman et al., 1991). Die Zielstellen auf beiden gegenüberliegenden DNA-Strängen sind je nach Virus um vier bis sechs Nukleotide versetzt (siehe Abb. 7). Da jeweils eine Phosphodiesterbindung zwischen der viralen und zellulären DNA neu gebildet wird, benötigt dieser Prozess keine externe Energiezufuhr (Brown et al., 1987). Die nach dem Strangtransfer entstehenden Lücken werden sehr wahrscheinlich durch zelluläre Reparatur-Enzyme geschlossen (Yoder and Bushman, 2000). Typisch für retrovirale Integrationsstellen sind die nach der Integration dublizierten Zielsequenzen (siehe Abb. 7) der zellulären DNA (Hughes et al., 1981; Majors and Varmus, 1981; Swanstrom et al., 1981).

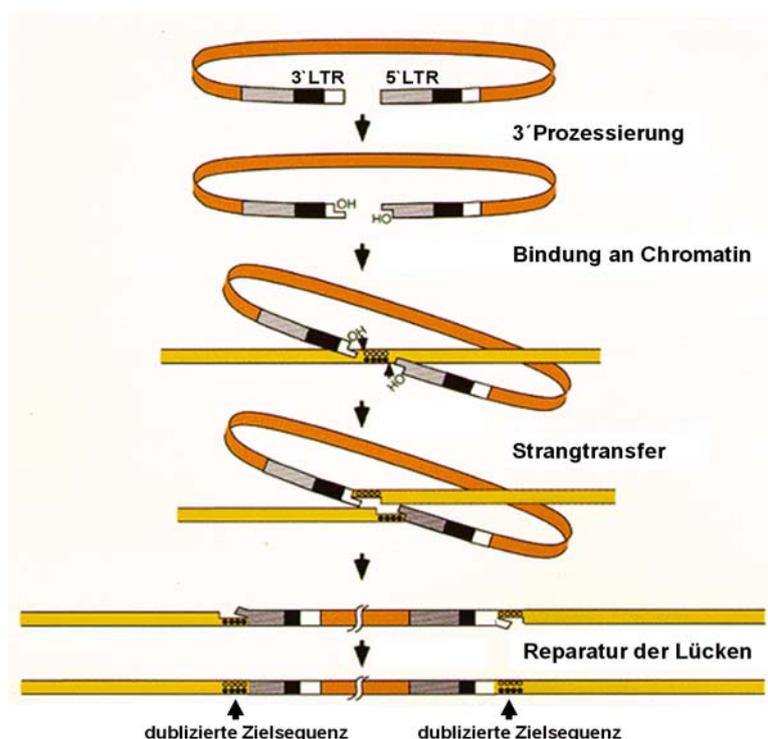


Abb. 7: Mechanismus der retroviralen Inetgration (modifiziert nach Brown, P.O 1997)

Dargestellt sind die grundsätzlichen Schritte der retroviralen DNA Integration (siehe Text). Farbkodierung der viralen LTR Regionen ist wie folgt: grau: U3; schwarz: R-Region; weiß: U5. Die vier schwarz und durchsichtig gepunkteten Basen auf der Ziel DNA (gelb) symbolisieren die unspezifische Erkennungssequenz der Ziel DNA (siehe Text), welche nach der Integration dupliziert wird.

Die Integration ist ein essentieller Schritt im Replikationszyklus aller Retroviren und ermöglicht erst die stabile Replikation des Provirus in sich teilenden Zellen und die effiziente Transkription der viralen Gene (Brown, 1997). Dieser Wendepunkt im Vermehrungszyklus von Retroviren gewährleistet auch das große Potential dieser Virusfamilie, ihre Anwendung als Vektoren in der somatischen Gentherapie (siehe 1.2.4) zu finden.

Alle bis jetzt charakterisierten IN-Proteine besitzen Aminosäure-Sequenzen, welche unter den diversen IN-Proteinen aller bis jetzt untersuchten Retroviren, Retrotransposons sowie prokaryotischen Transposons stark konserviert sind (Fayet et al., 1990; Johnson et al., 1986; Kulkosky et al., 1992). Zu den auffälligsten konservierten Strukturmotiven gehört zum einen das am aminoterminalen Ende der IN lokalisierte Zinkfinger ähnliche Motiv, welches auch als „HHCC“-Motiv (Johnson et al., 1986) bekannt ist und das im katalytischen Zentrum befindliche DD35E-Motiv (Khan et al., 1991). Nach Funktionalität wird die IN in drei Domänen eingeteilt (siehe Abb. 8). Die N-terminale Domäne (NTD) enthält das HHCC-Motiv und ist für die *in vitro*-Integrase-Aktivität essentiell (Khan et al., 1991; Schauer and Billich, 1992). Zum einen blockieren Mutationen in den konservierten Histidinen und Cystinen des HHCC-Motivs die Integration und Replikation *in vivo* (Cannon et al., 1994; Engelman et al., 1995) und zum anderen scheint die Bindung von Zink-Ionen die Struktur dieser Domäne zu stabilisieren (Burke et al., 1992; Bushman et al., 1993) und die Multimerisierung, welche die enzymatische Aktivität erhöht, der IN zu unterstützen (Zheng et al., 1996).

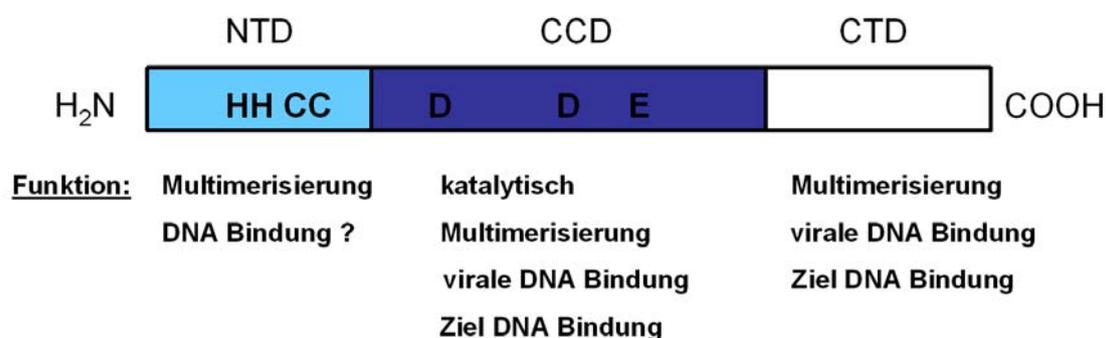


Abb. 8: Struktur und Funktion der retroviralen Integrase (modifiziert nach Tulure et al., 2004)

Dargestellt sind die Domänen der retroviralen Integrase sowie die Funktion der einzelnen Domänen. Die konservierten Regionen (siehe Text: HHCC-Motiv; DD35E-Motiv) der N-terminalen- (NTD) und zentralen Core-Domäne (CCD) sind hervorgehoben. CTD: C-terminale-Domäne.

Die sogenannte zentrale „Core“-Domäne (CCD) enthält das am besten konservierte DD35E-Motiv, welches das katalytische Zentrum der IN bildet und ist zudem auch bei DNA-Transposasen bakteriellen Ursprungs zu finden. Die Core-Domäne bildet dreidimensionale Strukturen (Bujacz et al., 1995; Bujacz et al., 1996), die der Bakteriophagen-MU-Transposase sehr stark ähneln (Rice and Mizuuchi, 1995). Vermutlich binden Metall-Ionen an den Carboxyl-Gruppen der drei konservierten AS und katalysieren dadurch die Integrationsreaktion (Engelman and Craigie, 1992; Engelman et al., 1994). Zum anderen liegen die Signale zu Erkennung des DNA-Substrates, den sogenannten „att-sites“ (engl: attachment sites), ebenfalls in der zentralen Core-Domäne (Brown, 1997). Das C-terminale Ende (CTD) der IN ist am schlechtesten konserviert und besitzt zwar DNA-Bindungsaktivität (Lutzke et al., 1994; Mumm and Grandgenett, 1991), die aber nicht die Spezifität der Core-Domäne gleicht. Vielmehr wird vermutet, dass die von dieser Domäne ausgehende Affinität zu DNA eher zur spezifischen Bindung der att-sites, welche überwiegend in der Core-Domäne zu residieren scheint (siehe oben), beisteuert (Brown, 1997; Katzman and Sudol, 1995) und ebenfalls für die Integrationreaktion essentiell ist (Bushman et al., 1993; Kulkosky et al., 1995; Wang et al., 2001).

Die Foamyvirale Integrase ist nicht so detailliert beschrieben wie das IN-Protein von HIV-1 oder ALV. Die limitierte Anzahl der Publikationen erlaubt jedoch die klassische oben zusammengefasste Einteilung in die drei funktionellen Domänen (Lee et al., 2005; Netzer et al., 1993; Pahl and Flügel, 1993; Pahl and Flügel, 1995) und unterstreicht die essentielle Rolle des IN-Proteins im Lebenszyklus von FV (Enssle et al., 1999; Meiering et al., 2000). Allerdings scheint der Mechanismus der foamyviralen Integration sich in einem wesentlichen Punkt von dem oben beschriebenen Mechanismus zu unterscheiden. Die 3' Prozessierung der viralen DNA Enden verläuft aus bis jetzt noch nicht bekannten Gründen vermutlich asymmetrisch (Enssle et al., 1999; Juretzek et al., 2004; Rethwilm, 2003). Sequenzierungen der viralen zellulären Übergänge von proviralen Sequenzen an beiden LTRs lässt vermuten, dass die 3' LTR zwar prozessiert wird, jedoch die 5' LTR unprozessiert bleibt (Juretzek et al., 2004; Rethwilm, 2003). Dies würde den klassischen Mechanismus des oben beschriebenen Strangtransfer beider LTRs bei FV erschweren, da ein 3' Hydroxylgruppe fehlen würde. Eine Mögliche Erklärung für dies Beobachtung ist die Hypothese das anders als bei anderen Retroviren sogenannten 2-LTR Varianten der viralen DNA (Brown, 1997), welche nicht als Substrate für die Integrationsreaktion angesehen werden, bei FV eine Art von intermediärem Zustand der proviralen Sequenz darstellen und von der IN prozessiert werden (Delelis et al., 2005). Nach solch einer Prozessierung wären an beiden LTR-Enden freie 3' OH-Gruppen frei, die zur Integration zur Verfügung stehen würden, ohne das an beiden Enden zwei Nukleotide entfernt

werden müssten (Delelis et al., 2005). Dieser Mechanismus würde zwar eine Lösung der scheinbar zuvor beobachteten asymmetrischen Prozessierung bieten, konnte aber in anderen Studien nicht bestätigt werden (Russell et al., 2002) und bleibt deswegen noch diskussionswürdig.

1.3.2 Zelluläre Kofaktoren der retroviralen Integration

Die ersten *in vitro* Studien, welche die funktionelle retrovirale Integration reproduzieren konnten wurden Ende der achtziger Jahre mit aus akut infizierten Zellen isolierten Nukleoprotein-Komplexen gemacht (Bowerman et al., 1989; Brown et al., 1987; Fujiwara and Mizuuchi, 1988) die später als Preintegrationskomplexe (PIC) bezeichnet wurden (Brown, 1997; Sherman and Greene, 2002). Diese Komplexe beinhalten neben viralen Proteinen (Bukrinsky et al., 1993; Farnet and Haseltine, 1991) auch zelluläre Faktoren, welche vermutlich als Kofaktoren an verschiedenen Stadien der Integrationsreaktion beteiligt sind (Farnet and Bushman, 1997; Li et al., 1998). In diesem stabilen Komplex, der die im vorigen Kapitel beschriebene Prozessierung und Strangtransfer-Reaktion einleitet (Ellison and Brown, 1994), gewährleistet die Sekundärstruktur der Virus-DNA die Interaktion der LTR-Enden mit den IN-Tetrameren (Bera et al., 2005) (siehe 1.3.1), Über die Rolle von zellulären Faktoren, welche *in vivo* aktiv an der Integration beteiligt sein könnten, existieren viele Studien, die anderswo zusammengefasst sind (Turlure et al., 2004; Van Maele et al., 2006). Von den meisten bis jetzt identifizierten potentiellen Kofaktoren der retroviralen Integration existieren nur vereinzelte Publikation, die zum Teil nicht reproduzierbar und deren direkte Rolle in der retroviralen Integration noch unklar sind. Hier werden nur einzelne Faktoren angesprochen, die am besten untersucht wurden. Solche Faktoren sind zum einen durch ihre spezifische Bindung an die virale DNA und eine direkte Interaktion mit dem IN-Protein charakterisiert.

Einer der ersten identifizierten Kofaktoren zellulären Ursprungs war BAF (engl: barrier-to-integration factor), welcher die Integration von Salz behandelten PICs, die *in vitro* nicht die Integration der viralen DNA bewerkstelligen können, vermutlich durch die Bindung an die virale DNA wiederherstellen konnte (Lee and Craigie, 1994). BAF ist ein hoch konserviertes Protein mit Doppelstrang-DNA-bindenden Eigenschaften, welches durch die Bindung an sogenannte nukleäre LEM-Domäne-Proteine LAP2, Emerin oder Man1, wahrscheinlich eine Rolle in der Chromatin Organisation einnimmt (Segura-Totten and Wilson, 2004; Shimi et al., 2004). BAF wurde als ein Faktor identifiziert, welcher die sogenannte Autointegration, die Integration des Provirus in sich

selbst (Brown, 1997), bei HIV-1 und MoMLV verhindert (Chen and Engelman, 1998; Lee and Craigie, 1994; Lee and Craigie, 1998). Weiterhin wurde BAF als eine Komponente der HIV-1-PICs identifiziert (Lin and Engelman, 2003) und interagiert zudem mit den Matrix-Proteinen von HIV-1, weshalb es vermutlich in geringen Mengen in HIV-1 Virionen detektiert wurde (Mansharamani et al., 2003). Die Rolle von Virionen-assoziiertes BAF scheint jedoch über die cytoplasmatische Rekrutierung nach Formierung der PICs vernachlässigbar zu sein (Van Maele and Debysers, 2005). Vielmehr scheint BAF während der Formierung der PICs die Integration durch eine Kompaktierung der Virus-DNA zum einen vor der Auointegration zu schützen und zum anderen die strukturellen Voraussetzungen zu liefern, welche für eine erfolgreich ablaufende Integrationsreaktion nötig sind (Harris and Engelman, 2000; Lee and Craigie, 1998). Interessanterweise konnte vor kurzem gezeigt werden, dass Komponenten der LEM-Proteine (LAP2 und Emerin), wahrscheinlich durch eine Interaktion mit PIC-assoziierten BAF eine wichtige Funktion während der Integration einnehmen und noch erstaunlicher, nach RNAi-induzierter Runterregulierung die Replikation von HIV-1 deutlich blockieren können (Jacque and Stevenson, 2006; Suzuki et al., 2004). PIC-assoziiertes BAF könnte vielleicht eine wichtige Rolle für die Assoziation der viralen DNA mit den LEM-Proteinen spielen, die wiederum für die *in vivo*-Integrationreaktion von Bedeutung sein könnten (Jacque and Stevenson, 2006; Suzuki et al., 2004).

Ein auf der gleichen Weise wie BAF identifiziertes zelluläres Protein, welches die Integrationsreaktion stimuliert, ist HMGA1 (Farnet and Bushman, 1997). HMGA1 ist ein Histon-Chromatin assoziiertes Protein, welches vermutlich durch eine Bindung an die viralen LTRs eine funktionelle Integration von mit Salzen behandelten inaktiven HIV-1 PICs wiederherstellen konnte (Farnet and Bushman, 1997; Li et al., 2000). Vermutlich stabilisiert HMGA1 den Komplex der IN-Multimere mit den beiden LTR-Enden durch DNA-beugende Eigenschaften (Van Maele et al., 2006). Überraschenderweise konnten jedoch mit Hühner Zellen, welche von HMGA1-Knockout-Hühnern isoliert wurden, keine Defekte in der Integration von HIV-1 festgestellt werden, so dass dieses Protein keine essentielle Rolle in der Integration von HIV-1 zu spielen scheint (Beitzel and Bushman, 2003).

Das bis heute am besten untersuchte mit der IN von HIV-1 interagierende zelluläre Protein, welches eine essentielle Rolle im Lebenszyklus von Lentiviren auf Ebene der Integration einnimmt ist, LEDGF/p75 (engl: Lens epithelium-derives growth Factor). LEDGF/p75 ist ein Transkriptionsfaktor (Llano et al., 2006; Turlure et al., 2006), welcher in Pull-down-Experimenten assoziiert mit nuklearen HIV-1-IN-Komplexen isoliert wurde, und welcher *in vitro* die Strangtransfer-Reaktion von HIV-1 deutlich stimulieren konnte (Cherepanov et al., 2003). Die Interaktion ist, wie später gezeigt werden konnte

Lentivirus-spezifisch (Busschots et al., 2005; Llano et al., 2004b). Die Lokalisation von LEDGF/p75 scheint genau mit HIV-1 IN zu korrelieren und deren nukleare Lokalisation und Chromatinbindung zu regulieren (Maertens et al., 2003). In Bezug auf die Integration schützt LEDGF/p75 zum einen die IN vor proteasomaler Degradation (Llano et al., 2004a) und erhöht zum anderen die Affinität der IN für chromosomale DNA (Busschots et al., 2005; Emiliani et al., 2005). Vor allem scheint die durch die Interaktion mit LEDGF/p75 erhöhte Affinität der IN für Chromatin den Transport der PICs zu chromosomaler DNA zu ermöglichen und für die deutliche Senkung der produktiven HIV-1-Replikation in Abwesenheit von LEDGF/p75 verantwortlich zu sein (Vandekerckhove et al., 2006). Fragwürdig bleibt, warum in Abwesenheit von LEDGF/p75 in der gleichen Studie HIV-1-basierte Vektoren zur Integration fähig waren (Vandekerckhove et al., 2006). Zudem konnte vor kurzem, anhand von Integrationsstellen-Analysen von HIV-1-basierten Vektoren in LEDGF/p75 exprimierenden und mittels siRNA nicht-LEDGF/p75-exprimierenden Zellen, LEDGF/p75 als ein Faktor identifiziert werden, welcher vermutlich die Integration von HIV-1 in aktiv transkribierende Bereiche und LEDGF/p75-regulierte Gene wenn auch gering beeinflusst (Ciuffi and Bushman, 2006). Ein weiterer zellulärer Faktor, das durch die Interaktion mit der IN von HIV-1 die Affinität von IN zu Chromatin steigert ist die vor kurzem identifizierte p300 Acetyltransferase (Cereseto et al., 2005). Dieses Protein erhöht durch eine posttranslationale Acetylierung von drei spezifischen Lysinen in der HIV-1-IN die Affinität dieses Proteins zu Chromatin. Die Acetylierung scheint ein essentieller Schritt im Lebenszyklus von HIV-1 zu sein, weshalb Mutationen an den drei spezifischen Lysinen die Replikation von HIV-1 blockieren.

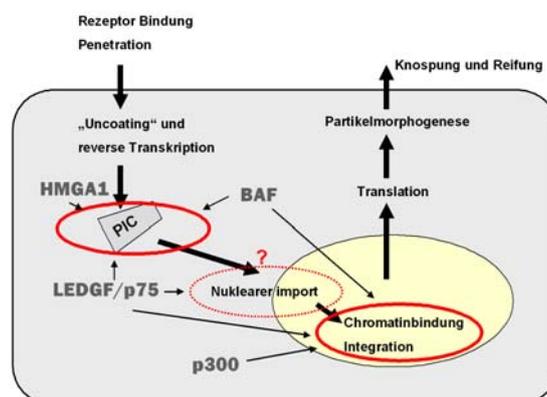


Abb. 9: Potentielle zelluläre Kofaktoren der Integration von HIV-1

Dargestellt sind verschiedenen Stadien (rote umrandet) der überwiegend bei HIV-1 identifizierten zellulären Proteinen, welche auf verschiedener Weise (siehe Text) als Kofaktoren der Integrationsreaktion agieren (schwarze Pfeile). Eine Funktion der hier aufgezählten zellulären Faktoren am Nuklearen Import ist noch nicht eindeutig geklärt (rot gestrichelt umrandet).

Aus den oben zusammengefassten Studien geht hervor, dass zelluläre Faktoren *in vivo* eine wichtige Funktion in dem korrekten Ablauf der retroviralen Integration übernehmen und als Kofaktoren agieren können. Die Aktivität ist nicht unbedingt auf die Integrationsreaktion selbst beschränkt, sondern findet vielmehr auf strukturelle oder transportverbundene Stadien vor der eigentlichen Integrationsreaktion statt (siehe Abb. 9). Die Erforschung solcher Interaktionen ermöglicht einen interessanten Einblick in die Strategien, welche verschiedene Retroviren entwickelt haben, um die zelluläre Maschinerie für ihre eigene Replikation effektiv zu nutzen.

1.3.3 Das Integrationsmuster von Retroviren und Insertionelle Mutagenese

Schon seit der Erkenntnis, dass die retrovirale Integration ein essentieller Schritt im Replikationszyklus von Retroviren ist (Varmus et al., 1973), wurden Versuche unternommen das Integrationsmuster verschiedener Retroviren in infizierten Zellen zu analysieren. Aus *in vitro*-Versuchen ging hervor, dass die Anzahl von potentiellen Integrationsstellen in Chromatin von der Struktur der Nucleosom-gebundenen-DNA beeinflusst wird und dass bestimmte Sequenzen, welche die Größe der kleinen und großen Furche, die Flexibilität und den Beugungsgrad der DNA beeinflussen, bevorzugt werden (Müller and Varmus, 1994; Pruss et al., 1994b; Pryciak et al., 1992; Pryciak and Varmus, 1992). Zudem konnten in früheren Studien DNase-I-hypersensitive Stellen als bevorzugte Orte der Integration identifiziert werden, was auf eine Integration in leichter zugängliche Chromatin-Regionen hindeutet (Rohdewohld et al., 1987; Vijaya et al., 1986). In der Tat gab es zu Beginn der neunziger Jahre durch Analysen einer geringen Anzahl von proviralen Sequenzen die ersten Hinweise, dass MoMLV bevorzugt in transkribierende Bereiche nahe zu den Transkriptionstartstellen (TSS) von Genen integriert (Mooslehner et al., 1990; Scherdin et al., 1990), so dass damals schon erkannt wurde, dass bestimmte Regionen aus bis jetzt nicht eindeutig geklärten Ursachen die Integration begünstigen.

Seit der Entschlüsselung des humanen Genoms zusammen mit der Entwicklung von molekularbiologischen Methoden, die die Klonierung von großen Mengen viraler Integrationsstellen (RIS) ermöglicht (Li et al., 1999; Silver and Keerikatte, 1989; Sorensen et al., 1993), wurden mehrere Studien zur Analyse des Integrationsmusters von Retroviren sowie Transposons und AAV (engl: adeno-associated virus) im humanen Genom durchgeführt, die auf eine virusspezifische nicht zufällige Verteilung der Integrationsstellen (IS) hindeuten (Bushman et al., 2005). Im Vergleich zu der nach dem

Zufallsprinzip erfolgenden Integration können die Integrationspräferenzen von Retroviren in die folgenden drei Gruppen eingeteilt werden: (I) Integration favorisiert Gene, (II) Integration favorisiert TSS von Genen, (III) Integration folgt dem Zufallsprinzip. Die Gründe für diese unterschiedlichen virusspezifischen Integrationsmuster sind noch nicht eindeutig geklärt, wobei nach jüngsten Studien die Rolle von zellulären Proteinen, die an der Selektion der Integrationsstellen beteiligt sind sehr wahrscheinlich ist.

Das wissenschaftliche Interesse am Integrationsmuster von Retroviren und retroviralen Vektoren hat seit den negativen Ereignissen der französischen Gentherapiestudie, in der gammaretrovirale murine leukemia virus (MLV)-basierende Vektoren für die Korrektur der X-linked severe combined immunodeficiency (XSCID) Krankheit eingesetzt wurden (Hacein-Bey-Abina et al., 2002a; Hacein-Bey-Abina et al., 2002b), großes wissenschaftliches Interesse erweckt. In dieser Studie führte die Integration des therapeutischen Vektors in der Nähe des zellulären Onkogens LMO-2 bei 3 von 9 behandelten Patienten zur Entwicklung einer akuten Leukämie (Hacein-Bey-Abina et al., 2003). Diese Insertionen und die damit verbundenene durch Enhancer und Promotor Elemente der LTRs ausgelöste überexpression des LMO2 Gens werden zum Teil als Ursache für die in diesen Patienten beobachtete neoplastische Transformation angesehen (Nienhuis et al., 2006).

Das Potential von Retroviren die Regulation von zellulären Genen, die in unmittelbarer Nähe liegen, zu beeinflussen wird als „insertionelle Mutagenese“ bezeichnet und ist seit langem dank Pionierarbeiten an den onkogenen Hühner-Retroviren schon bekannt (Hayward et al., 1981; Neel et al., 1981). Hierbei können die retroviralen LTR-Regionen, welche Promotor- und Enhancer-Aktivität besitzen (Laimins et al., 1984a; Laimins et al., 1984b; Weber and Schaffner, 1985), nach der Integration in das zelluläre Genom in der Nähe positionierte Gene oder Proto-Onkogene aktivieren, welche die Entstehung von Tumoren verursachen können (Cuyper et al., 1984; DesGroseillers et al., 1983; Selten et al., 1985; Tschlis and Lazo, 1991). In der Tat sind viele heute identifizierte Proto-Onkogene durch die Nutzung von onkogenen Retroviren identifiziert worden (Akagi et al., 2004; Suzuki et al., 2002).

Entgegen der Annahme, dass das Risikopotential zur Proto-Onkogen-Aktivierung ausgelöst durch integrierte retrovirale Vektoren als gering einschätzbar wäre, konnten auch in Mausmodellen nach der Transduktion von Knochenmarkzellen mit ähnlichen in der obigen Gentherapiestudie verwendeten auf MLV-basierten Vektoren Leukämien nachgewiesen werden, die zum Teil auf die Insertion des therapeutischen Vektors in der Nähe zu bekannten Proto-Onkogenen zurückzuführen waren (Li et al., 2002; Modlich et al., 2005). Diese insertionale Aktivierung von Genen ist nicht unbedingt auf die maligne Entwicklung beschränkt, sondern kann auch zur Aktivierung von Genen führen, welche die Selbsterneuerungs-Kapazität hämopoietischer Stammzellen beeinflussen können und zur klonalen Dominanz der Klone führen die eine bestimmte selbsterneuerungsfördernde

Insertion beinhalten (Kustikova et al., 2005). Dieses Phänomen ist auch in Patienten beobachtet worden, bei denen eine Korrektur der X-CGD-Krankheit (engl: x-linked chronic granulomatous disease) mit Hilfe von retroviral-basierten Vektoren unternommen wurde (Ott et al., 2006; Stein et al., 2006).

Die toxischen Nebenwirkungen retroviraler Vektoren sollten durch die Anwendung der sogenannten SIN-Vektoren (siehe 1.2.4 & 4.1.5) und einer angemessenen Menge an wieder retransplantierten transduzierten Zellen vermeidbar sein (Baum et al., 2003; von Kalle et al., 2004), jedoch stellt sich aus den oben zusammengefassten Kenntnissen über das Potential von Retroviren zur insertionalen Mutagenese die Frage, ob das Integrationsmuster verschiedener Retroviren das Risiko zur insertionalen Mutagenese beeinflusst. Einblicke in das Integrationsmuster von MLV-basierten Vektoren (Hematti et al., 2004; Wu et al., 2003) wiesen überraschenderweise auf starke Präferenzen für die Integration in der Nähe des Transkriptionsstarts (TS) von zellulären Genen hin. Diese Präferenz könnte zum Teil für die in Tiermodellen und klinischen Studien aufgetretenen Fälle von insertionaler Mutagenese verantwortlich sein, so dass neben dem rein wissenschaftlichen Interesse am Verständnis der Mechanismen, die für die viruspezifischen Integrationsmuster verantwortlich sind, die Evaluierung der Integrationspräferenzen von retroviral basierten Vektoren, welche in der somatischen Gentherapie Anwendung finden könnten, zum Teil das Abschätzen des Risikopotential dieser Vektoren zur insertionalen Mutagenese erleichtern könnte (Nienhuis et al., 2006).

1.4 Fragestellung

1.4.1 Analyse des foamyviralen Integrationsmusters in humanen Zelllinien

Aufgrund vor kurzem aufgetretener Fälle von akuter Leukämie bei drei von neun in der französischen Gentherapiestudie zur Heilung der angeborenen X-SCID Krankheit behandelten Patienten wird angenommen, dass das Integrationsmuster des auf MLV-basierten therapeutischen Vektors, welcher Präferenzen zur Integration in der Nähe der Transkriptionsstartstellen (TSS) von Genen besitzt, das Risiko zur insertioneller Mutagenese und die Aktivierung von Proto-Onkogenen begünstigt hat. Die Nachfrage an alternativen Vektorsystemen mit sichereren Integrationsmustern ist groß, so dass die Analyse der Integrationsmuster von Retroviren, welche das Potential besitzen in der somatischen Gentherapie Anwendung zu finden unerlässlich geworden ist und einen wichtigen Aspekt in der Sicherheit der Vektoren darstellt.

Die dritte Generation von Foamyvirus-basierenden Vektoren sind zu attraktiven alternativen Vektorsystemen herangereift, welche vor allem aufgrund ihrer nicht pathogenen Natur, ein gutes alternatives Vektorsystem darstellen(siehe 1.2.4), so dass die Analyse des Integrationsmusters von FV-basierten Vektoren von großem wissenschaftlichen Interesse ist.

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es eine ausreichende Anzahl von foamyviralen Integrationsstellen zu klonieren, die eine Analyse über das Integrationsmuster von FV-basierten Vektoren ermöglichen. Insbesondere die Präferenz zur Integration in transkribierende Berreiche, sowie TSS und regulatorischen Berreichen von Genen wurden im Vergleich zu ebenfalls im gleichen Testsystem klonierten HIV-1- und MLV-Integrationsstellen genauer untersucht. Die Resultate tragen zum einen zur Abschätzung der Sicherheit FV-basierter Vektoren bei, und geben Einblicke in die chromosomalen Regionen des humanen Genoms in denen FV bevorzugt integrieren.

1.4.2 Identifikation von mit der Foamyvirus Integrase interagierenden zellulären Proteinen

Die produktive Infektion von Retroviren erfordert die Integration der revers transkribierten viralen cDNA ins Genom der Wirtszelle. Das retrovirale Integrase Protein (IN) ist das Protein, welches die Integrationsreaktion steuert. *In vitro* ist die IN in der Lage, die zwei wesentlichen Schritte der Integrationsreaktion, die 3' Prozessierung und den Strangtransfer (siehe 1.3.1), in der Abwesenheit von anderen Faktoren zu bewerkstelligen. Für die funktionelle Integration *in vivo* gibt es jedoch Hinweise, die auf eine Involvierung von zellulären Proteinen hindeuten, welche als Kofaktoren während verschiedener Stufen der Integration eine Rolle spielen könnten. Zum einen können solche Faktoren den nukleären Import, die Stabilität und Struktur des Preintegration-Komplexes (PIC), die Integrationsreaktion selbst sowie die Reparatur der nach der Integration entstehenden Lücken katalysieren, aber auch an der Selektion der nicht dem Zufall folgenden Retrovirus-spezifischen Integrationsstellen beteiligt sein. Bis jetzt sind überwiegend für HIV-1 und MLV zahlreiche zelluläre Proteine identifiziert worden, welche entweder durch eine Interaktion mit der viralen IN oder durch die Assoziation mit Komponenten der PICs während der *in vivo* -Integration eine katalytische Rolle übernehmen könnten.

Der erste kritische Schritt zur Identifikation solcher Proteine besteht in der Etablierung eines Testsystems, das für den Nachweis einer spezifischen Wechselwirkung zwischen unbekanntem zellulären und viralen Proteinen geeignet ist. Neben Yeast-two-Hybrid-Assays bieten sogenannte Pulldown-Assays eine attraktive Alternative, unbekanntem zellulären Interaktionspartner der viralen IN zu identifizieren, die in darauffolgenden biochemischen Analysen auf eine mögliche Funktion während der Integration untersucht werden können.

Zelluläre Proteine, welche mit der foamyviralen IN interagieren und möglicherweise eine Rolle während der Integration oder Replikation von FV spielen sind bis heute noch nicht beschrieben, so dass neben der Analyse des foamyviralen Integrationsmusters, ein Testsystem basierend auf Pulldown assays mittels FV-IN exprimierenden humanen Zelllinien etabliert werden sollte, das zur Identifikation von mit der FV-IN interagierenden zellulären Proteinen verwendet werden kann. Mögliche Funktionen der mittels diesem Testsystem identifizierten zellulären Interaktionspartner der FV-IN können in darauffolgenden biochemischen Experimenten charakterisiert werden und zum Verständnis der Strategien beitragen, die sich FV, durch Wechselwirkungen mit zellulären Proteinen, zu nutze machen, um die Integration und Replikation zu ermöglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien werden nicht im Einzelnen aufgelistet. Bis auf wenige Ausnahmen, bei denen besonderer Wert darauf gelegt wurde, Produkte einer bestimmten Firma zu verwenden, wurden Chemikalien in dieser Arbeit von den folgenden Firmen bezogen: Applichem, Merck, Sigma-Aldrich und Roth. Die Ausnahmen werden im Methodenteil gesondert erwähnt.

2.1.2 Enzyme und Reaktionspuffer

CIAP (<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>)	MBI Fermentas
Pwo-Polymerase	Peqlab
Restriktionsenzyme	NEB, MBI-Fermentas
Ribonuklease A	Roche
T4 DNA-Ligase	MBI-Fermentas
T4 DNA-Polymerase	MBI Fermentas
Proteinase K	MBI-Fermentas

2.1.3 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169	Stratagene
<i>E. coli</i> JM109	<i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> (rK-, mK+), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , Δ (<i>lacproAB</i>), [F', <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lac</i> ^f Δ M15]	Promega
<i>E. coli</i> TOP10	F-, <i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15, Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Str ^R), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen

DH5 α und TOP10 *E. coli*-Stämme wurden ausschließlich für die Transformation von Ligationsreaktionen verwendet, während die JM109 *E. coli*-Stämme nur für Maxipräparationen von Plasmiden benutzt wurden.

2.1.4 Zelllinien

293T	Humane embryonale Nierenzelllinie, die das SV40 große T-Antigen stabil exprimiert (Du Bridge et al., 1987)
293	Humane embryonale Nierenzelllinie (ATCC:CRL-1573)
HT1080	Humane Fibrosarkomazelllinie (ATCC: CCL-121)
Hela	Humane Epithelkarzinomzelllinie (ATCC:CCL-2)

2.1.5 Antibiotika

	Stammkonzentration	Arbeitskonzentration
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
Penicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
Streptomycin	100 mg/ml	100 µg/ml
Zeocin (Sigma)	100 mg/ml	100 µg/ml

2.1.6 Antikörper

Foamyvirale Antikörper:

Maus- α -PFV IN 3E11 Hybridomaüberstand (Imrich et al., 2000)

Kommerzielle Antikörper:

Schwein- α -Kaninchen IgG-HRP Polyklonaler Antikörper (DakoCytomation)

Ziege- α -Maus IgG-HRP Polyklonaler Antikörper (DakoCytomation)

α -FlagM2 Polyklonaler Antikörper (Invitrogen)

α -DRBP76 Polyklonaler Antikörper, Isotype: Mouse IgG1
(BD Biosciences)

2.1.7 Plasmide

Retrovirale vektoren:

Plasmidname	Beschreibung
pMH123	CMV-getriebener PFV-basierter Vektor, welcher PFV-Gag und -Pol expremiert und die vollständige LTR-Region enthält. Die Expression von eGFPneo-Fusionsprotein liegt unter der Kontrolle des internen SFFV U3 Promotors. (Juretzek et al., 2004).
pMH124	Bis auf eine große Deletion in <i>gag</i> und <i>pol</i> (<i>Pacl x Swal</i>) Identisch mit pMH123 (diese Arbeit).
pGJ3/U3E	CMV-getriebener HIV-1-basierter SIN-Vektor, welcher HIV-1 Gag, Pol und Rev expremiert. Die LTR ist in der U3-Region deletiert. Die Expression von eGFP liegt unter der Kontrolle des internen SFFV U3 Promotors (Leurs et al., 2003).
pcAMS/U3E	CMV-getriebener Mo-MLV-basierter SIN-Vektor, welcher Mo-MLV Gag und Pol expremiert. Die LTR ist in der U3-Region deletiert. Die Expression von eGFP liegt unter der Kontrolle des internen SFFV U3-Promotors (Leurs et al., 2003).
pczCFG/IEZ	CMV-getriebener Mo-MLV-basierter Vektor mit vollständigen LTRs und einer IHRES, hinter der das eGFPzeo-Fusionsprotein kloniert ist. (Knodel et al., 1999)
pczCFG/IEZ-INC-flag	Bis auf eine FLAG-Peptide kodierende Sequenz Identisch mit pczCFG/IEZ (diese Arbeit)
pF6UGW	HIV-1-basierter SIN-Vektor mit zur Expression von shRNAs internem U6-Promotor. Enthält zusätzlich HIV-1-flap und das WRE (eng: woodchuck postranskriptionale regulatory element) des Woodchuck Hepatitis Virus. GFP steht unter der Kontrolle des humanen Ubiquitin-C-Promotors.

Expressionsplasmide:

Plasmidname	Beschreibung
pCHSRV2	Expressionsplasmid für ein CMV-Promotor getriebenes PFV-Provirus. (Moebes et al., 1997)

pCgp1	CMV-getriebenes PFV-Gag und Pol-Expressionskonstrukt. (Fischer et al., 1998)
pCenv1	CMV-getriebenes PFV-Env- Expressionskonstrukt mit intaktem internen SD/SA. (Fischer et al., 1998)
pczVSV-G	CMV-getriebenes VSV-G-Expressionskonstrukt (Pietschmann et al., 1999)
pHIT 60	CMV-getriebenes Mo-MLV-Gag und Pol-Expressionskonstrukt. (Soneoka et al., 1995)
pMDL g/p RRE	CMV-getriebenes HIV-1 Gag und Pol-Expressionskonstrukt mit RRE (eng: Rev Responsive Element). (Dull et al., 1998)
pRSV-Rev	RSV-getriebenes HIV-1 Rev-Expressionskonstrukt (Dull et al., 1998)

Weitere verwendete Plasmide:

Plasmidname	Beschreibung
pCDNA3.1neo	Expressionsvektor mit SV-40 ori und CMV-Promotor/Enhancer, Neomycin Resistenz. (Invitrogen)
pCRII-TOPO	(Invitrogen)

2.1.8 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden zur Synthese bei der Firma Invitrogen in Auftrag gegeben. Die Position der Bindungsstellen ist für PFV anhand der DNA-Sequenz von HSRV2 (Gen Bank Nr: Y07724), für HIV-1 anhand der HXB2 (Gen Bank Nr: AF033819) und für MLV anhand der Mo-MLV-Sequenz (Gen Bank Nr: AF033811) wiedergegeben. Gegenüber der Ursprungssequenz veränderte Nukleotide sind hervorgehoben.

Oligonukleotide für die Klonierung der retroviralen Integrationsstellen:

Nr.	5'→3' Sequenz	Beschreibung
#1830	Caatagacaatggcttcaggaagtaatgt	Senseprimer für die 1.PCR zur Klonierung der PFV-Integrationsstellen. Bindungsstelle in HSRV2: 1214-1242
#320	Gaggagcaggagtatttgggtaat	Antisenseprimer für die 1.PCR zur Klonierung der PFV-Integrationsstellen. Bindungsstelle in HSRV2: 73-92 und 10901-10924
#1976	Ggaggcatataaaagccaatagac	Senseprimer für die 1.PCR zur Klonierung der PFV-Integrationsstellen. Bindungsstelle in HSRV2: 1198-1221
#1975	Tccttcctgtaataactctcc	Antisenseprimer für die 1.PCR zur Klonierung der PFV-Integrationsstellen. Bindungsstelle in HSRV2: 73-90 und 10922-10900
#571	Aacttgatgtgaagctctgg	Senseprimer für die 2.PCR zur Klonierung der PFV-Integrationsstellen. Bindungsstelle in HSRV2: 1254-1274
#572	Tccttcctgtaataactctcc	Antisenseprimer für die 2.PCR zur Klonierung der PFV-Integrationsstellen. Bindungsstelle in HSRV2: 39-59 und 10887-10867
#1900	Gcgagagcgtcagtattaagc	Senseprimer für die 1.PCR zur Klonierung der HIV-1-Integrationsstellen. Bindungsstelle in HXB2: 797-817
#1901	Gtacaggcaaaaagcagatcttg	Antisenseprimer für die 1.PCR zur Klonierung der HIV-1-Integrationsstellen. Bindungsstelle in HXB2: 31-40
#1903	Gatcgatgggaaaattcgg	Senseprimer für die 2.PCR zur Klonierung der HIV-1-Integrationsstellen. Bindungsstelle in HXB2: 830-850
#1904	Gcagatctgtcttcttggg	Antisenseprimer für die 2.PCR zur Klonierung der HIV-1 -integrationsstellen. Bindungsstelle in HXB2: 20-40 und 9105-9125
#1907	Cacaaccagtcggtagatgtc	Senseprimer für die 1.PCR zur Klonierung der MLV-Integrationsstellen. Bindungsstelle in Mo-MLV: 875-895

#1908	Gcaagaggggtttattggatac	Antisenseprimer für die 1.PCR zur Klonierung der MLV-Integrationsstellen. Bindungsstelle in Mo-MLV: 294-314 und 8558-8578
#1909	Gcagaatggccaacctttaac	Antisenseprimer für die 1.PCR zur Klonierung der MLV-Integrationsstellen. Bindet nur im Vektor
#1910	Ctagcttgccaaacctacagg	Senseprimer für die 1.PCR zur Klonierung der MLV-Integrationsstellen. Bindungsstelle in Mo-MLV: 926-946

Oligonukleotide für die Klonierung der PFV Integrase (PFV IN):

Nr.	5'->3' Sequenz	Beschreibung
#4013	gtccgcggtccggatctaccatgtgtaatacctcaaaaaccaaacc	Senseprimer zur Klonierung von PFV-IN. Führt die <i>Rsr</i> II-Schnittstelle, Kozak Sequenz, und ATG 5' der ersten AS von PFV-IN ein. Bindet in HSRV2: 5370-5391
#4014	Ctaggagcgctttcattttttccaaatgatcc	Antisenseprimer zur Klonierung von PFV-IN. Tauscht das TAA Stoppsignal von PFV-IN gegen eine <i>Eco</i> 47III-Schnittstell aus. Bindet in HSRV2: 6517-6547

Oligonukleotide mit Flag-Peptid kodierender Sequenz:

Nr.	5'->3' Sequenz und Beschreibung
#4009	aattcacgctccgcggtccgacgagcgctgattacaaggacgacgatgacaagtag Sense-Oligonukleotid mit Flag-Peptid kodierender Sequenz und <i>Eco</i> RI-Schnittstelle sowie MCS am 5' Ende.

2.1.10 Kommerzielle Methodenkits

NucleoBond® PC500	Macherey-Nagel
GENECLEAN® III Kit	Q BIOgene
Big Dye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
ECL™ Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences
TA Cloning® Kit	Invitrogen
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen

2.1.11 Sonstiges Material

Sterilfilter (0,22 µm, 0,45 µm)	Schleicher & Schuell
Blot Filterpapier	Schleicher & Schuell
Hybond™-ECL™ Nitrocellulosemembran	Amersham Biosciences
Röntgenfilme X-ray Retina XBD	Fotochemische Werke GmbH
Dialyseschlauch	Roth
Plastikmaterial	Costar, Eppendorf, Falcon, Greiner, Nunc, Roth
Polyallomer Ultrazentrifugentubes	Beckmann
X-Gal	Roth
IPTG	Roth
Polyethylenimin	Polyscience
Protease Inhibitor Cocktail (EDTA-free)	Roche
ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel Freezer-Safe	Sigma
QiaShredder	Qiagen

2.2 Puffer und Lösungen

2.2.1 Bakterienkultur

5 x LB-Medium

100 g	LB-Broth Base Lennox L
25 g	NaCl
5 g	Glucose

Ad 1000ml Aqua_{dest}, autoklavieren.

Ampicillin

100 mg/ml	Ampicillin Natriumsalz
-----------	------------------------

0,2µm steril filtrieren, aliquotieren, Lagerung bei -20 °C.

LB-Agar

20g	LB Broth Base Lennox L
20g	NaCl
20g	Agar

Ad 1000ml Aqua_{dest}, autoklavieren.

Die LB-Agar-Lösung wurde nach dem Autoklavieren vor der Ampicillin-Zugabe auf ungefähr 60°C abgekühlt. Anschließend wurden die Agarplatten gegossen, abgekühlt und bei -4°C gelagert.

Transformationspuffer I für die Herstellung von kompetenten Bakterien

30 mM	Kaliumacetat
100 mM	RbCl ₂
10 mM	CaCl ₂
50 mM	MnCl ₂
15%	Glycerin

Mit 10% Essigsäure pH 5,8 einstellen.

Transformationspuffer II für die Herstellung von kompetenten Bakterien

10 mM	MOPS
100 mM	RbCl ₂
75 mM	CaCl ₂
15%	Glycerin

Mit 1 M KOH pH 6,5 einstellen und 0,2 µm steril filtrieren.

2.2.2 Medien, Lösungen und Puffer für zellbiologische Methoden

Minimal Essential Medium (MEM)

MEM (Hausmedium: 9,6 g/l Invitrogen #41500-083, 2,2 g/l NaHCO ₃)	
0,03%	Glutamat
100mg/ml	Penicillin
100mg/ml	Streptomycin
5%-10%	FCS (Biochrom)

Dulbeccos Modified Eagle Medium (D-MEM)

D-MEM (Invitrogen #41966-29)	
100mg/ml	Penicillin
100mg/ml	Streptomycin
10% (Dialysiert)	FCS (Biochrom)

Dulbeccos Modified Eagle Medium (D-MEM) ohne Methionin

D-MEM (Invitrogen #21013-024)	
100mg/ml	Penicillin
100mg/ml	Streptomycin
5% (Dialysiert)	FCS (Biochrom)

RPMI Medium

RPMI 1640 (Invitrogen #21875-034)	
100mg/ml	Penicillin
100mg/ml	Streptomycin
5%	FCS (Biochrom)

ATV

137 mM	NaCl
5,4 mM	KCl
5 mM	D-Glucose
70 mM	NaHCO ₃
500 mg/ml	Trypsin

PBS(+)

137 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
4,3 mM	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
1,4 mM	KH ₂ PO ₄
1,5 mM	CaCl ₂ x 4 H ₂ O
1 mM	MgCl ₂ x 6 H ₂ O

FACS-Puffer

0,1%	BSA
0,02%	Natriumazid
in PBS	

500 mM Natriumbutyrat

500 mM	Natrium-Buttersäure
In sterilem PBS(+)	
0,2 µm steril filtrieren	

2 M Kalziumchlorid (CaCl₂)

2 M	CaCl ₂
0,2 µm steril filtrieren	

2 x HBS

50 mM	Hepes
10 mM	KCl
12 mM	Dextrose x H ₂ O
280 mM	NaCl
1,5 mM	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O

Ein pH-Wert zwischen 6,9 und 7,2 wurde mit 1M KOH eingestellt und 0,45µm steril filtriert. Der optimale pH-Wert wurde mittels einer Transfektion für jede Charge neu ermittelt.

Polyethylenimin (PEI)

1 mg/ml PEI

in Aqua_{dest} lösen, 0,2µM steril filtrieren und bei -20°C in 1 ml Aliquots einfrieren.

2.2.3 Lösungen und Puffer zur Analyse und Klonierung von DNA

Plasmidpräparationslösung I

25 mM Tris-HCl pH 8,0

50 mM Glucose

10 mM EDTA pH 8,0

autoklavieren

Plasmidpräparationslösung II

0,2 M NaOH

1% SDS

Plasmidpräparationslösung III

3 M Natriumacetat

Mit konzentrierter Essigsäure ein pH 5,2 einstellen,

autoklavieren.

TE/RNase

0,1 x TE

100 µg/ml RNaseA

6x DNA-Probenpuffer

0,15% Bromphenolblau

40% Sucrose

autoklavieren

10 x Hybridisierungspuffer

1 M	NaCl
0,1 M	Tris pH 7,8
1 mM	EDTA pH 8

Tris/MgCl₂

200 mM	Tris-HCl pH 9,0
5 mM	MgCl ₂

autoklavieren, aliquotieren und bei -20°C lagern

3 M Natriumacetat pH 5,4

3 M	Natriumacetat
-----	---------------

pH 5,4 mit konzentrierter Essigsäure einstellen
autoklavieren

Lysispuffer zur Isolierung von genomischer eukaryotischer DNA

1 M	Tris-HCl pH 8,5
2 M	NaCl
0,5 M	EDTA pH 8,0
10 %	SDS

Vor Gebrauch wurde 1 % ProteinaseK hinzugegeben.

2.2.4 Lösungen und Puffer für proteinbiochemische Methoden

RIPA Puffer

20 mM	Tris-HCl pH 7,5
300 mM	NaCl
1%	Natrium-Deoxycholat
0,1%	SDS
1%	Triton X-100

100 CSK Puffer (Cherepanov et al., 2003)

10 mM	Pipes pH 6,8
100mM	NaCl
1 mM	MgCl ₂
10%	Sucrose
1 mM	Dithiothreitol (DTT)
0,5%	Nonidet P-40 (NP-40)

Eine Tablette EDTA-freier Protease Inhibitor Mix (Roche) wurde auf je 50 ml 100 CSK Puffer gegeben. Lagerung bei -20°C.

400 CSK Puffer (Cherepanov et al., 2003)

10 mM	Pipes pH 6,8
400mM	NaCl
1 mM	MgCl ₂
10%	Sucrose
1 mM	Dithiothreitol (DTT)

Eine Tablette EDTA-freier Protease Inhibitor Mix (Roche) wurde auf je 50 ml 400 CSK Puffer gegeben. Lagerung bei -20°C.

100 CSK Waschpuffer

10 mM	Pipes pH 6,8
100mM	NaCl
1 mM	MgCl ₂
10%	Sucrose
0,1%	Nonidet P-40 (NP-40)

Eine Tablette EDTA-freier Protease Inhibitor Mix (Roche) wurde auf je 50 ml 100 CSK Waschpuffer gegeben. Lagerung bei -20°C.

Lysispuffer

50 mM	Tris-HCl pH 8,0
150 mM	NaCl
1%	Nonidet P-40 (NP-40)

Eine Tablette EDTA-freier Protease Inhibitor Mix (Roche) wurde auf je 50 ml Lysispuffer gegeben. Lagerung bei -20°C.

Hypotonischer Puffer

10 mM	Tris-HCl pH 8,0
10 mM	KCl
1,5 mM	MgCl ₂

Vor Gebrauch wurden 500mM DTT und 250 mM PMSF hinzugegeben.

Kernextraktionspuffer

20 mM	Tris-HCl pH 8,0
420 mM	KCl
1,5 mM	MgCl ₂
0,2 mM	EDTA
25%	Glycerin

Vor Gebrauch wurden 500mM DTT und 250 mM PMSF hinzugegeben.

10 x Salzpuffer

300 mM	Tris-HCl pH 8,0
1,4 M	KCl
30 mM	MgCl ₂

Dialyse Puffer AM100

20 mM	Tris-HCl pH 8,0
100 mM	KCl
5 mM	MgCl ₂
0,2 mM	EDTA
20 %	Glycerin

2x Probenpuffer (2xPPP)

125 mM	Tris-HCl pH 6,8
23,25%	Glycerin
4%	SDS
10%	β-Mercaptoethanol
0,01%	Bromphenolblau

Gelpuffer

3 M	Tris base
0,3%	SDS
mit HCl pH 8,45 einstellen	

5x Kathodenpuffer

500 mM	Tris
500 mM	Tricine
0,5%	SDS

Vor Gebrauch wird die Stammlösung mit Aqua_{dest.} verdünnt (1 x Kathodenpuffer).

10x Anodenpuffer

2 M	Tris-HCl pH 8,9
-----	-----------------

Vor Gebrauch wird die Stammlösung mit Aqua_{dest.} verdünnt (1 x Anodenpuffer).

Blotpuffer

50 mM	Tris
40 mM	Glycin
20%	Methanol
0,037%	SDS

PBS-Tween

0,5%	Tween 20
In PBS(-)	

PBS(-)

137 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
4,3 mM	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
1,4 mM	KH ₂ PO ₄

Milchpulver

4%	Milchpulver
In PBS(-)	

Fixierlösung für Silbergele

50%	Methanol
12%	konzentrierte Essigsäure
0,05%	Formaldehyd (Stammlösung 37%)

Lösung A für Silbergele

0,01%	Na ₂ S ₂ O ₃ (Natriumthiosulfat)
-------	---

In H₂O_{dest} lösen

Silberfärbung-Lösung

0,1%	AgNO ₃ (Silbernitrat)
0,075%	Formaldehyd (Stammlösung 37%)

Kurz vor Gebrauch in Aqua_{dest} lösen.

Entwicklerlösung für Silbergele

10%	Na ₂ CO ₃ (Natriumcarbonat)
0,005%	Lösung A
0,05%	Formaldehyd (Stammlösung 37%)

Kurz vor Gebrauch in Aqua_{dest} lösen.

2.2.5 Standardlösungen und Puffer

50x TAE

2 M	Tris
50 mM	EDTA pH 8,0
5,71%	Konzentrierte Essigsäure

Vor Gebrauch wird die Stammlösung mit Aqua_{dest} verdünnt (1 x TAE).

1 x TE pH 8,0

10 mM	Tris-HCl pH 8,0
1 mM	EDTA pH 8,0

1 M Tris-HCl pH 6,8 - 8,0

1 M	Tris
-----	------

pH je nach Anforderungen mit HCl einstellen, autoklavieren

0,5 M PIPES pH 6,8

0,5 M Pipes
mit NaOH pH 6,8 einstellen

10% SDS

10% SDS
mit HCl pH 7,2 einstellen

0,5 M EDTA pH 8,0

500 mM EDTA
mit NaOH pH 8,0 einstellen

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Isolation eukaryotischer genomischer DNA

Die Isolation von genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen erfolgte nach konventionellen Methoden (Ausubel et al., 1987). Hierbei werden die Zellen zunächst mit Proteinase K und einem starkem Lysispuffer, der EDTA und als Detergent SDS enthält, lysiert. Anschließend wird die genomische DNA durch Zugabe von Isopropanol gefällt, gewaschen und in 0,1 x TE Puffer gelöst.

Für die Isolation der genomischen DNA aus 293 Zellen, die durch Zugabe von Virusüberstand provirale Sequenzen enthielten, wurden ca. 5×10^8 Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit 3 ml Proteinase K enthaltenen Lysispuffer für 3-5 min lysiert. Das Lysat wurde über Nacht bei 55°C inkubiert und die DNA durch Zugabe von Isopropanol im Verhältnis 1:1 durch starkes Schütteln gefällt. Mit Hilfe einer Glasangel wurde die DNA aus dem Gemisch entnommen und für 3-5 sec in 70% Ethanol gewaschen und anschließend in 200 µl 0,1 x TE Puffer gelöst. Die DNA wurde anschließend erneut über Nacht bei 55°C inkubiert und vermessen. 2,5 µg der so isolierten eukaryotischen genomischen DNA wurden auf ein 0,8 % Agarosegel auf Reinheit überprüft.

2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht es, eine große Anzahl von Kopien einer spezifischen DNA-Sequenz zu produzieren, welche zur Klonierung oder zur Einführung von Punkt-Mutationen eingesetzt werden kann (Mullis et al., 1986). Bei einer Reaktion wird die Matrizen-DNA durch hohe Temperaturen (95°C) in einzelsträngige DNA getrennt, welche als Matrize für die Synthese eines neuen komplementären Stranges dienen kann. Grundlage für diese Reaktion sind Oligonukleotide („Primer“), die komplementär zu kurzen Abschnitten an den flankierenden Regionen der zu amplifizierenden DNA sind. In der Hybridierungsphase binden diese „Primer“ bei geeigneter Temperatur, die nicht höher als die Schmelztemperatur des Primers liegen sollte, durch komplementäre Basenpaarung an die Zielsequenz. Durch die Anlagerung der Primer an die DNA werden freie 3'-Enden zur Verfügung gestellt, an denen in der Elongationsphase hitzestabile Polymerasen wie z.B. Taq-Polymerase (von *Thermophilus aquaticus*) oder Pfu-Polymerase (von *Pyrococcus furiosus*) die Synthese der Zielsequenz einleiten können. Durch mehrmaliges Wiederholen dieser Schritte (25-30 Mal) wird die Zielsequenz exponentiell angereichert. Eine so genannte „nested PCR“ erhöht durch einen zweiten PCR-Schritt, der dem ersten mit weiter innen gesetzten Primern folgt, die Sensibilität der PCR und erlaubt so auch die Klonierung von Fragmenten aus sehr geringen Mengen des Ausgangsmaterials. Eine Modifikation der Primer erlaubt es auf diese Art, Mutationen oder zusätzlich kodierte Schnittstellen an den Enden der Zielsequenz einzuführen, die die Klonierung des Amplikons erleichtern.

Bei der Klonierung von Expressionsplasmiden ist eine hohe Amplifikationsgenauigkeit von Bedeutung, so dass in dieser Arbeit für die Klonierung von pczCFG/IEZ-INC-flag die Pwo-DNA-Polymerase verwendet wurde. Diese Polymerase besitzt eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität und ist in der Lage, primäre Fehler der 5'-3'-Polymerase zu korrigieren (Proofreading-Aktivität). Nachfolgend ist ein typischer Reaktionsansatz beschrieben, wie er für die Amplifikation von DNA-Sequenzen für weitergehende Klonierungsarbeiten mit der Pwo-DNA-Polymerase verwendet wurde:

200-500 pg	Plasmid DNA
20 pmol	sense Primer (10 pmol/µl Stammlösung)
20 pmol	antisense Primer (10 pmol/µl Stammlösung)
5 µl	10 x Pwo Puffer Komplett (mit MgCl ₂)
1 µl	dNTPs (10 mM)
2 µl	Pwo-Polymerase (1U/µl)
Ad 50µl Aqua _{dest}	

Die Zielsequenz wurden im Thermocycler nach folgendem Protokoll amplifiziert:

95°C / 120 sec	Denaturierung der Matrizen DNA
95°C / 30 sec	Denaturierung
55°C-60°C / 60 sec	Hybridisierung
72°C / 60 sec/500kb	Elongation
25 Zyklen	
72°C / 600sec	finale Elongation

Für die Klonierung der retroviralen Integrationsorte im humanen Genom wurde die Taq-Polymerase für eine im nächsten Kapitel beschriebenen nested PCR verwendet.

2.3.3 Klonierung mit dem TOPO-TA-Cloning-Kit

Das kommerziell erhältliche TOPO-TA-Cloning-Kit erlaubt eine sehr effiziente und schnelle TA-Klonierung. Dieser Klonierungsansatz beruht auf der Entdeckung, dass die Taq-Polymerase keine glatten Enden, sondern mit Hilfe von einer unspezifischen, terminalen Transferase-Aktivität einzelne Desoxyadenosine (A) an das 3'-Ende des PCR-Produkts anfügt (Clark, 1988). Der in dem Kit enthaltene lineare pCRII-TOPO-Vektor enthält überhängende 3'-Thymidin-Reste, die eine Klonierung der PCR-Produkte über komplementäre TA-Basenpaarung erlauben. Die Besonderheit dieses Vektors ist, dass statt einer Ligase die Topoisomerase I des Vaccinia Virus für die Ligation verantwortlich ist. Von dieser Topoisomerase I ist bekannt, dass sie unspezifische dsDNA-Sequenzen bindet und dort die Phosphodiesterbindung nach 5'-CCCTT in einem Strang spaltet. Die hierbei freigeordnete Energie bleibt in Form einer kovalenten Bindung zwischen dem 3'-Phosphatrest des gespaltenen DNA-Stranges und dem Tyrosylrest 274 (Tyr-274) der Topoisomerase I erhalten und kann für die Verknüpfung der PCR-DNA mit dem Vektor benutzt werden. Dabei wird die Topoisomerase durch das freie 5'-Hydroxylende des PCR-Produktes nach Verknüpfung der DNA freigegeben.

Für die TA-Klonierung der PCR-Fragmente zur Analyse der retroviralen Integrationsstellen wurden die in Kapitel 2.6.4 amplifizierten DNA-Fragmente verwendet. 3 µl der 1. PCR wurden wie folgt eingesetzt und 20-30 min bei Raumtemperatur inkubiert

Reaktionsansatz

- 3 µl DNA aus 1.PCR
- 1 µl Salt Solution (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl₂)
- 1 µl pCRII-TOPO vector
- ad 6 µl Aqua_{dest}

3 µl des Ansatzes wurden nach Angaben des Herstellers in TOP 10-kompetente Bakterien transformiert und der Rest bei -20°C gelagert.

Im Falle von PCR-Produkten, die mit der Pwo-Polymerase amplifiziert wurden und TA kloniert werden sollten, mussten die PCR-Proben, da „Proofreading“-Polymerasen keine 3´A-Überhänge produzieren, vor dem Ligieren nochmals mit 0,7-1 Unit Taq-Polymerase zum Anhängen der 3´A-Überhänge für 20 min bei 72°C inkubiert werden.

2.3.4 DNA-Agarosegelelektrophorese

Aufgrund der negativen Ladung der DNA eignen sich Agarosegele, an denen eine elektrische Spannung anliegt, für die Auftrennung von DNA-Fragmenten mit einer Größe von 100-20000 Basenpaaren. Während einer Elektrophorese werden die durch Restriktionsverdau entstandenen DNA-Fragmente im elektrischen Feld in Richtung der Anode nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente in 0,8%-2%igen Agarosegelen. Die Agarose wurde hierfür in 100 ml 1 x TAE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Nach dem Abkühlen der Lösung auf etwa 50-60 °C folgte eine Zugabe von 10µl Ethidiumbromid-Lösung (Stammlösung: 10 mg/ml). Die Mischung wurde dann luftblasenfrei in eine Gelkammer gegossen, bis zum Erstarren abgekühlt und in eine mit 1xTAE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer überführt. Die Proben wurden mit 1/10 des Probenvolumens mit DNA-Probenpuffer versetzt und in die Taschen des erstarrten Gels pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte anschließend durch das Anlegen einer Spannung von 75-90 V.

Durch das im Gel enthaltene Ethidiumbromid, welches in die DNA interkaliert und unter UV fluoresziert, wurden die DNA-Fragmente nach Auftrennung unter UV-Licht sichtbar gemacht und deren Größe mithilfe eines mit aufgetragenen Markers (siehe 2.1.9) bestimmt.

2.3.5 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um DNA-Fragmente aus einem Agarosegel zu isolieren, wurden die entsprechenden Fragmente, nachdem sie durch die Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, unter schwachem UV-Licht (354 nm) sichtbar gemacht. Das gewünschte DNA-Fragment wurde mit einem Skalpell möglichst sauber aus dem Gel geschnitten. Die DNA wurde mit Hilfe des Q BIOgene *GeneClean III Kit* gemäß den Angaben des Herstellers isoliert. Hierbei wurde das ausgeschnittene Agarosestück zunächst in einem Hochsalzpuffer geschmolzen, die DNA durch Zugabe von Glasmilch gebunden, gewaschen, getrocknet und in 25 µl Aqua dest. steril eluiert. Die Effizienz der Geleluion wurde durch nochmalige Gelelektrophorese (siehe 2.3.4) mit 2 µl des Eluats überprüft.

2.3.6 Restriktionsverdau von DNA

Prokaryotische Restriktionsendonukleasen erkennen spezifisch meist palindromische Basensequenzen in einer DNA-Doppelhelix und schneiden beide Stränge der Helix an oder in der Nähe dieser spezifischen Stellen. Hierbei resultierten, wenn die Schnittstellen des Enzyms versetzt sind, komplementäre einzelsträngige Enden, die eine spezifische Affinität zueinander besitzen und daher als kohäsive Enden (auch „klebrige“ Enden) bezeichnet werden. Erfolgt der Schnitt nicht versetzt, entstehen keine komplementären einzelsträngige Enden sondern so genannte glatte Enden. Aufgrund der Sequenzspezifität und der daraus resultierenden charakteristischen Bandenmuster werden Restriktionsenzyme analytisch zur Überprüfung von Plasmiden oder präparativ für weiterführende Klonierungsschritte verwendet.

Ein typischer Ansatz für einen analytischen Verdau wäre z.B. folgender:

DNA	1 µg
10x Puffer	2 µl
Enzym	5U
Aqua dest. steril	ad 20 µl

Ein typischer Ansatz für einen präparativer Verdau wäre z.B. folgender:

DNA	5-10 µg
10x Puffer	5 µl
Enzym	20U
Aqua dest. steril	ad 50 µl

2.3.7 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um bei einer Ligation die Religierung der Enden eines linearisierten Vektors sowie die Religierung von unvollständig verdauter Plasmid-DNA zu vermeiden, wurden die 5'-Enden der DNA mit dem Enzym „calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP)“ dephosphoryliert. Dadurch wurde die Bildung von Phosphodiesterbrücken zwischen den Enden verhindert. Da das Enzym in allen gängigen Restriktionspuffern aktiv ist und das für das Enzym essentielle Zink im Lagerungspuffer schon enthalten ist, wurde zu den bereits verdauten Restriktionsansätzen 1 µl CIAP (10 U/µl) hinzugegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend durch Zugabe von EDTA (Endkonzentration 5mM) und das Erhitzen auf 75°C für 10 min inaktiviert.

2.3.8 Präzipitation von DNA

Die Präzipitation wird zur Konzentrierung von DNA-Lösungen durchgeführt. Dabei wird den DNA-Molekülen die Hydrathülle durch Ethanol oder Isopropanol entzogen, was zu deren Aggregation und Präzipitation führt.

Die DNA-Lösung wurde mit einem 3-fachen Volumen Ethanol oder 0,6-fachen Volumen Isopropanol und 0,1-fachen Volumen 3 M Natriumazetat (pH 5,2) versetzt, gut durchgemischt und für 10 min bei 14000 rpm abzentrifugiert. Das Sediment wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in der gewünschten Menge H₂O oder 0,1 x TE Lösung aufgenommen.

2.3.9 Ligation von linearen DNA-Fragmenten

Für die Klonierung eines PCR-Fragmentes in einen geeigneten Vektor wurde eine Ligationsreaktion verwendet. Die T4-DNA-Ligase aus dem T4-Phagen ist ein Enzym, das in der Lage ist, sowohl glatte (blunt ends) als auch kohäsive Enden (sticky ends) miteinander zu verknüpfen. Die DNA-Ligase katalysiert eine Phosphodiesterbindung zwischen einer 3' Hydroxylgruppe des einen DNA-Strangs mit dem 5' Phosphatende des anderen Stranges. Zum Antrieb dieser Reaktion dient ATP als Energiequelle. Beim Ansetzen einer Ligationsreaktion wurde mindestens ein 3-facher überschuß von Insert-DNA im Verhältnis zur Vektor-DNA, welche die zur Vermehrung und Selektion nötigen Sequenzen trägt, eingesetzt. Die Reaktion wurde anschließend bei 14 °C über Nacht inkubiert.

Ein typischer Ansatz für eine Ligation wäre z.B. folgender:

Vektor-DNA	100 ng
Insert-DNA	300-1000 ng
10x T4 LigasePuffer	2 µl
T4 DNA-Ligase	1 µl (5U)
Aqua dest. steril	ad 20 µl

2.3.10 Zusammenfügen von Oligonukleotiden

Einzelstrang-Oligonukleotide lassen sich, wenn sie komplementär zueinander sind, zu kurzen Doppelstrang-Oligonukleotide zusammenfügen. Somit lassen sich für eine Klonierung nötige Restriktionsschnittstellen in ein Plasmid einführen. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit diese Methode zur Konstruktion von lentiviralen Vektoren, die so genannte small interfering RNAs (siRNAs) transkribieren, verwendet (2.7).

Zunächst wurde folgender Reaktionsmix mit nicht-kinasierten Oligonukleotiden angesetzt.

10 µl	Oligonukleotid 1 (100 pmol/µl)
10 µl	Oligonukleotid 2 (100 pmol/µl)
5µl	10 x Hybridisierungspuffer (siehe 2.2.3)
ad 50 µl	Aqua _{dest}

Der Ansatz wurde bei 95°C für 5 min gekocht und anschließend über Nacht im ausgeschalteten Wasserbad auf Raumtemperatur abgekühlt. Am nächsten Tag folgte bis zum Einsatz bei einer Ligation (siehe 2.3.9), die Lagerung der Proben erfolgte in 10 µl Aliquots bei -20°C.

2.3.11 Herstellung transformationskompetenter

***E. coli*-Bakterien**

Kompetente Bakterien sind Bakterien, die durch die hier beschriebene chemische Behandlung, deren Wirkung noch unklar ist, die Fähigkeit besitzen Plasmid-DNA durch ihre Zellmembran aufzunehmen. Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurden zunächst 5 ml LB-Medium mit dem jeweiligen Bakterienstamm (aus einer Glycerolstammkultur) beimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm in einem Bakterenschüttler geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde 100 ml LB Medium mit 1 ml der Übernachtskultur beimpft und die Lösung bis zu einer optischen Dichte von 0,2-0,3 bei einer Wellenlänge von 595 nm kultiviert. Diese Kultur wurde für 5 min auf Eis gehalten und anschließend für 10 min bei 2500 rpm abzentrifugiert (4 °C). Das Sediment wurde in 40 ml Transformationspuffer I (siehe 2.2.1) aufgenommen und erneut abzentrifugiert. Das Sediment wurde jetzt in 4 ml Transformationspuffer II (siehe 2.2.1) resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Abschließend wurde die in 300 µl-Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.3.12 Transformation von DNA in kompetente

***E. coli*-Bakterien**

Man spricht von einer Transformation, wenn fremde DNA, z.B. Plasmide, von kompetenten Bakterien aufgenommen werden. Diese Plasmide können, sofern sie einen für Bakterien geeigneten Replikationsursprung enthalten, replizieren. Das Plasmid kann so in Bakterien unbegrenzt vermehrt und aufgrund seiner bekannten Größe oder seiner Ringförmigkeit auch isoliert werden. Um die Bakterien erkennen zu können, die das gewünschte Plasmid aufgenommen haben, besitzt dieses Plasmid einen sogenannten Selektionsmarker, z.B. ein Gen, das eine Ampicillinresistenz kodiert. Dieser Marker sorgt dafür, dass bei der Ausstreichung der Bakterien auf antibiotikahaltigen (Ampicillin) Agarplatten nur Bakterien wachsen, die ein Plasmid mit Ampicillinresistenz aufgenommen haben.

Für die Transformation wurden 100 µl der kompetenten Bakteriensuspension verwendet. Man unterscheidet zwei Transformationsmethoden: Die erste, die sogenannte „Quick Transformation“, wurde angewandt, um bereits hergestellte Plasmide zu transformieren. Hierzu wurden 100 µl Bakteriensuspension mit 0,5-1 µg Plasmidlösung vermischt, 10 min auf Eis inkubiert und danach direkt auf antibiotikahaltige Agarplatten ausplattiert. Die sogenannte „Heat shock“-Methode wurde für die Transformation von neu ligierten oder chimären Plasmiden angewandt. Für diesen Transformationsansatz wurden 10 µl einer zuvor durchgeführten Ligationsreaktion zu 50 µl Bakteriensuspension zugegeben, für 30 min auf Eis inkubiert, danach 90 sek bei 42 °C (Hitzeschock) und anschließend 2 min wiederum auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl LB-Medium (ohne Antibiotikum) wurden die Bakterien 60 min bei 37 °C geschüttelt und anschließend 100 µl der Mischung auf ampicillinhaltige (100 µg/ml) LB-Agarplatten ausgestrichen, der Rest auf einer weiteren LB-Platte. Diese Aufteilung auf zwei Platten erleichtert das Picken von einzelnen Kolonien, falls die Bakterien sehr dicht gewachsen sind.

2.3.13 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Präparation von Plasmid-DNA aus transformierten, kompetenten Bakterien erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979). Hierbei wurden unter alkalischen Bedingungen die bakteriellen Proteine, die chromosomale und auch die Plasmid-DNA zunächst denaturiert. Das alkalische Lysat wurde anschließend mit 3 M Natriumacetat-Lösung neutralisiert. Die in dem Lysat herrschende hohe Salzkonzentration führt zur Ausfällung der Proteine, Zellresten und der chromosomalen DNA, während die Plasmid-DNA in Lösung bleibt. Die durch dieses Verfahren präzipitierten Bestandteile des Lysats lassen sich durch Zentrifugation sedimentieren und dadurch aus der Lösung entfernen. Die Plasmid-DNA kann aus der gereinigten Lösung mit Hilfe von Ethanol ausgefällt und gereinigt werden. Die Bezeichnungen „Mini-Präparation“ oder „Maxi-Präparation“ beschreiben in diesem Zusammenhang nur den Maßstab der Plasmidgewinnung. Im Einzelnen werden nun die unterschiedlichen Methoden beschrieben.

Mini-Präparation

Jeweils eine Bakterienkolonie von einer Transformantenplatte wurde in 2 ml 1 x LB-Medium, welches mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum versetzt wurde, überführt und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler (180 rpm) inkubiert. Am nächsten Morgen wurde 1,5 ml der Übernachtskultur bei 14000 rpm für 1 min abzentrifugiert und das Pellet in 100 µl Plasmidpräparationslösung I (siehe 2.2.3) durch vortexen resuspendiert. Die Einleitung der alkalischen Lyse erfolgte durch Zugabe von 100 µl Plasmidpräparationslösung II und der Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur. Zur Präzipitation der nicht erwünschten Bestandteile wurden dem Ansatz 150 µl Plasmidpräparationslösung III hinzugefügt und 10 min auf Eis inkubiert. Eine anschließende Zentrifugation für 15 min bei 14000 rpm sorgte für die Trennung der Plasmid-DNA von den Zellbestandteilen im Pellet. Durch die Zugabe des Überstandes in 1 ml Ethanol für 10 min bei RT konnte anschließend die Plasmid-DNA gefällt und bei 14000 rpm für 10 min abzentrifugiert werden. Die pelletierte Plasmid-DNA wurde anschließend mit 70% Ethanol für 3-5 min gewaschen und nach dem gründlichen Absaugen des Ethanols für 10-20 min bei 37°C getrocknet und in 50 µl TE/RNase resuspendiert. Ein Restriktionsverdau der Plasmid-DNA diente zur Identifizierung der korrekten Klone.

Maxi-Präparation

Für die Präparation großer Mengen Plasmid-DNA wurde eine Bakterienkolonie von einer Transformantenplatte in 200 ml 1 x LB-Medium, welches mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum versetzt wurde, überführt und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler (180 rpm) inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die gesamte Übernachtskultur bei 14000 rpm abzentrifugiert. Die Plasmid-Gewinnung erfolgte mit dem *Plasmid DNA Purification Kit: NucleoBond PC500* von Macherey-Nagel nach den Angaben des Herstellers. In diesem Fall erfolgte die Reinigung der Plasmid-DNA nach der alkalischen Lyse über eine Anionenaustauschsäule. Die pelletierte und gereinigte Plasmid-DNA wurde in 200-300 µl Aqua_{dest.} Die DNA wurde anschließend vermessen (siehe 2.3.14) und mit Aqua_{dest.} auf eine Konzentration von 1 µg/µl DNA verdünnt.

2.3.14 Spektrometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Extinktion einer 1:200 verdünnten wässrigen DNA-Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm, welche dem Absorptionsmaximum des π -Elektronen-Bindungssystems der DNA-Basen entspricht, unter Berücksichtigung der Verdünnung vermessen. Bei der Messung entspricht eine OD (optical density)-Einheit 50 $\mu\text{g/ml}$ dsDNA. Da auch andere π -Elektronen-Bindungssysteme bei dieser Wellenlänge absorbieren (z.B. Phenol, Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten), wurden die Proben auch zur Bestimmung der Reinheit bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Aus beiden OD-Werten (OD_{260} bzw. OD_{280}) wurde der Quotient errechnet, welcher Information über den Reinheitsgrad gibt. Für reine DNA sollte der Quotient zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Ein Quotient unter 1,8 deutet auf eine Kontamination mit aromatischen Aminosäuren hin, während ein Quotient über 2,0 auf eine Kontamination durch RNA hinweist.

2.3.15 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA basierte auf dem Prinzip der Kettenabbruchmethode nach F. Sanger. Hierbei dient die zu sequenzierende DNA, ähnlich wie bei einer PCR, als Matrize für eine Polymerisierungsreaktion. Die Reaktionsgemische enthalten einen zur DNA-Matrize komplementären Primer, eine Polymerase, alle vier Desoxynukleotide sowie auch eine geringe Menge von Didesoxynukleotide, die mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Diese Didesoxynukleotide führen aufgrund des Fehlens der 3'-OH-Gruppe nach dem Einbau in die wachsende einzelsträngige Nucleinsäurekette zum Kettenabbruch. Aufgrund des Überschusses an Desoxynukleotide erfolgt der Einbau der Didesoxynukleotide zufällig, so dass DNA-Einzelstränge synthetisiert werden, die sich in ihrer Länge jeweils um eine mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Base unterscheiden. Der Farbstoff wird nun durch einen Laser mit der für die Farbstoffe entsprechenden Wellenlänge angeregt und vermessen. Auf diese Weise lässt sich die DNA-Sequenz in speziellen Apparaturen sehr schnell basengenau bestimmen.

Die Sequenzierung in dieser Arbeit wurden mit dem Applied Biosystems *Big Dye Cycle Sequencing Kit* durchgeführt. Für jede Sequenzierung wurde folgender Reaktionsansatz angesetzt.

Reaktionsansatz:

0,5 µg	DNA
3,3 pmol	Primer
1 µl	5x Tris/MgCl ₂
1 µl	Big Dye Mix
ad 5 µl Aqua _{dest}	

Bei einer Sequenzierung von Plasmiden aus einer Minipräparation wurden 0,5 µl der in TE/RNase resuspendierten Plasmide in den Reaktionsansatz eingesetzt.

Nach folgendem Programm wurden die DNA-Einzelstränge im Thermocycler synthetisiert:

95°C / 20 sec	Denaturierung
50°C / 15 sec	Hybridisierung
60°C / 240 sec	Elongation
25 Zyklen	

Nach der Synthese der DNA-Einzelstränge erfolgte die Aufreinigung und Sequenzierung in der diagnostischen Abteilung unseres Instituts mit den ABI Primer 3100 Genetic Analyzer.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Kultivierung adhärenter Zelllinien

Die adhärenenten Zellen (Hela, 293, 293T und HT1080) wurden in Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Es wurden für die jeweiligen Zelllinien folgende Medien angesetzt (siehe 2.2.2):

Hela

MEM

+5% FCS,

+0,03% Glutamat und

+100 µg/ml Penicillin und Streptomycin

293 / 293T

MEM

+10% FCS,

+0,03% Glutamat

+100 µg/ml Penicillin und Streptomycin

HT1080

D-MEM

+10% FCS,

+100 µg/ml Penicillin und Streptomycin

Die Zellen wurden inkubiert, bis sie einen zu ca. 80% konfluenten Zellrasen bildeten. Die Zellsuspensionen wurden zweimal wöchentlich passagiert. Zum Passagieren wurde zunächst der Mediumüberstand abgenommen und die Zellen einmal mit ATV (siehe 2.2.2) gespült, anschließend mit ATV abgelöst und mit dem jeweiligen Medium 1:10- bis 1:20-fach verdünnt.

2.4.2 Kultivierung nicht-adhärenter Zelllinien

Nicht-adhärente Zelllinien werden in Suspension kultiviert. Hierfür werden in der Regel besondere Zellkulturbehälter eingesetzt, die einen integrierten Magnetrührer besitzen. Die Zellen werden, damit sie nicht verkleben, in diesen Flaschen unter ständigem Rühren in Suspension kultiviert.

In dieser Arbeit wurden nicht adhärenente Hela-Zellen in RPMI-Medium (siehe 2.2.2), dem jeweils 100 µg/ml Penicillin und Streptomycin und 5% FCS hinzugefügt wurden kultiviert. Alternativ zur Nutzung von speziellen Flaschen erfolgte die Kultivierung in normalen 100, 500 und 1000 ml Laborflaschen, denen ein Magnetrührer zugefügt wurde. Damit die Zellen nicht verklumpen, wurden die Flaschen im Brutschrank auf einen Magnetrührer gestellt und unter ständigem Rühren bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden alle 5-7 Tage nach der Bestimmung der Zellzahl (siehe 2.4.4), die mindestens 1x10⁶ Zellen/ml betragen sollte, 1:5-fach mit dem Medium verdünnt und weiter kultiviert.

2.4.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren von Zelllinien wurden für jedes Aliquot zirka 8×10^6 der Zellen zunächst mit ATV abgelöst und bei 4°C für 10 min bei 1000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml einer Mischung mit gleichem Anteil Medium und einer FCS-Lösung, dem 20% DMSO (Sigma #D2650) beigefügt wurde, resuspendiert. Anschließend folgte ein langsames Einfrieren der Zellen in besonders dafür konstruierten Zelleinfrierbehältern bei -80°C . Nach 1-2 Tagen wurden die Zellen für eine längere Lagerung endgültig in flüssigem Stickstoff gelagert. Nach 2-3 Wochen erfolgte eine Überprüfung über den Ausgang des Einfrierverfahrens durch ein erneutes Auftauen und Kultivieren der eingefrorenen Zellen.

Nach dieser Methode eingefrorene und in flüssigem Stickstoff gelagerte Zellen müssen beim Auftauen sehr schnell aus der mit DMSO versetzten Mischung entfernt werden, da DMSO beim Auftauen für die Zellen sehr toxisch ist. Hierfür wurden die eingefrorenen Aliquots sehr schnell im Brutschrank bei 37°C aufgetaut und in 10 ml kaltes Medium überführt. Nach 10 min Zentrifugation (1000 rpm) bei 4°C wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 5 ml frischem Medium vorsichtig resuspendiert und zunächst in einer kleinen Zellkulturflasche, wie in Kapitel 2.4.1 beschrieben, kultiviert. Die Zellen wurden im Anschluß in größere Zellkulturflaschen überführt.

2.4.4 Zellzahlbestimmung

Die Anzahl der Zellen wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dafür wurden die Zellen gut resuspendiert, so dass keine Zellklumpen mehr vorhanden waren. Auf die Zählkammer wurde ein Deckgläschen aufgelegt und $10 \mu\text{l}$ der Zellsuspension vom Rand her in die Zählkammer pipettiert. Auf Trypanblaufärbung zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen wurde hier verzichtet. Unter dem Lichtmikroskop wurden die Zellen in den vier großen Quadranten, die wiederum in 16 Felder unterteilt waren, ausgezählt. Die Zellzahl berechnet sich wie folgt: Der Abstand zwischen Zählkammer und dem Deckglas beträgt $0,1 \text{ mm}$. Die Fläche der Großquadrate beträgt $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$, so dass das Volumen eines solchen Quadrats $0,1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \mu\text{l}$ beträgt. Anhand der pro Großquadrat Q bestimmten Zellzahl N lässt sich die Zellzahl pro Milliliter verdünnter oder nicht verdünnter Zellsuspension ermitteln. Für N wurde der Mittelwert aus den vier ausgezählten Großquadraten verwendet (N/Q). Berechnet man nun den jeweiligen

Verdünnungsfaktor V ein, erhält man die Zelldichte D (Zellen/ml) in dem Kulturgefäß nach der Formel:

$$D = (N / Q) \times V \times 10^4$$

D : Zelldichte in der Kultur [Zellen / ml]

N : Zahl der gezählten Zellen

Q : Anzahl der ausgezählten Großquadrate

V : Verdünnungsfaktor bei der Trypanblaufärbung

10^4 : Kammerfaktor (Umrechnungsfaktor von Zellen/0,1 μ l, auf Zellen/ml)

2.4.5 Transfektion

Bei der Transfektion werden fremde Nukleinsäuren (z.B. Plasmid-DNS) von eukaryotischen Zellen aufgenommen. Verschiedene Reagenzien erlauben auf unterschiedliche Weisen eine Einschleusung der fremden Nukleinsäuren. Es handelt sich hierbei immer um transiente Transfektionsmethoden, da die in den eukaryotischen Zellen eingebrachten fremden Nukleinsäuren im Laufe der Zellteilungen verloren gehen. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Reagenzien nach den folgenden Methoden verwendet.

Calciumphosphat (HBS)-Transfektion

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur Analyse der retroviralen Integrationsorte wurde die Calciumphosphatmethode (Soneoka et al., 1995) verwendet. Der genaue Mechanismus der DNA-Aufnahme bei dieser Methode ist im Einzelnen noch nicht verstanden. Vermutlich wird die DNA an Calciumphosphatkristalle gebunden und durch Endozytose in die Zellen aufgenommen und dort zur Expression gebracht. Für die Transfektion wurden 293T-Zellen verwendet. Diese Zellen sind humane embryonale Nierenzellen, die stabil das große Simian-Virus (SV-40) T-Antigen exprimieren (DuBridge et al., 1987). Hierdurch kommt es nach der Aufnahme der Plasmide zur Replikation der Plasmide, die auch den SV40 T-Replikationsursprung (ori) tragen. Hierbei wird durch die Bindung des großen T-Antigens am ori und durch seine Helicase-Aktivität und der Interaktion mit zellulären DNA-Polymerasen eine effizientere DNA-Replikation initiiert. Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide enthielten so ein SV-40 ori, welches zu einer stärkeren Expression der auf diesen Plasmiden kodierten Proteine führt.

$1,6 \times 10^6$ 293T-Zellen wurden am Abend vor der Transfektion in 6 cm-Kulturschalen flächendeckend in 4 ml Kulturmedium ausgesät. Am nächsten Morgen wurde das Kulturmedium abgesaugt und 4 ml neues Medium auf die Zellen gegeben. Dazu wurde der Boden der Kulturschalen an einer Stelle markiert, so dass der Mediumwechsel ausschließlich an diesen Stellen durchgeführt wurde. Somit wurde vermieden, dass durch den Spülvorgang an verschiedenen Stellen Zellen durch das Hinzufügen von Kulturmedium weggespült wurden. Anschließend wurde der folgende Transfektionsmix hergestellt:

je 10 µg	Plasmid-DNA
50 µl	2,5 M CaCl ₂
ad 500 µl	Aqua _{dest} → vortexen
+ 500 µl	2x HBS pH 7,02-7,05

Die Zugabe von 2x HBS wurde sehr langsam und vorsichtig durchgeführt. Das Mischen der Lösung erfolgte jetzt durch das Hinzupipettieren von Luftbläschen. Der Transfektionsmix wurde nach 10-15 min Inkubationzeit bei Raumtemperatur tropfenweise und gleichmäßig auf die zuvor ausgesäten Zellen aufgetragen und 7-8 h im Brutschrank inkubiert. Um die Transfektion zu stoppen und den optimalen pH-Wert der Zellen zu sichern, wurde danach das Transfektionsmedium gegen 4 ml neuen Kulturmedium ausgetauscht. Durch die Zugabe von 80 µl einer 500 mM Natrium-Butyrat-Lösung am nächsten Tag erfolgte eine unspezifische Intensivierung der Transkription. Natrium-Butyrat ist ein Histondeacetylasehemmer, der durch die Hemmung der Histondeacetylasen die Transkription in eukaryotischen Zellen erhöht. Die Induktion wurde nach 8 h Inkubation im Brutschrank durch einen erneuten Mediumwechsel beendet. Für diesen letzten Mediumwechsel wurden 3 ml Kulturmedium verwendet. Nach einer weiteren Inkubation der transfizierten Zellen über Nacht konnten die Zellen entweder für proteinbiochemische Versuche direkt lysiert oder, im Falle einer Kotransfektion der Komponenten eines retroviralen Vektorsystems (siehe 2.6.1), der Überstand für virologische Methoden weiterverwendet werden (siehe 2.6.2).

Polyethyleneimine (PEI)-Transfektion

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit Polyethyleneimine (PEI) als Transfektionsreagenz verwendet. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass eine geringere Menge an Plasmid-DNA als bei der Calciumphosphat-Transfektion für eine effiziente Transfektion ausreicht.

PEI ist ein kationisches Polymer, welches Nukleinsäure-bindende und –kondensierende Eigenschaften besitzt. DNA-Polykation-Komplexe werden effizient von verschiedenen Zellarten durch Endocytose in das Cytosol aufgenommen. Der so genannte „Protonsponge-Effekt“ des Polykations wirkt gegen eine intrazelluläre Degradierung, so dass ein effizienter Gentransfer stattfinden kann (Kirschner et al., 2006). Die im Folgenden beschriebene für die Transfektion mit PEI verwendete Methode wurde von der Arbeitsgruppe von Dirk Lindemann an der Technischen Universität in Dresden etabliert. Es wurden ein Tag vor der Transfektion je nach Größe der Zellkulturplatte 293T-Zellen in folgenden Zellzahlen flächendeckend ausgesät

Zellzahl	Größe der Zellkulturplatte (mm)	Endvolumen (ml)
$2,0 \times 10^6$	60	5
$6,0 \times 10^6$	100	10

Am nächsten Tag wurde folgender Transfektionsmix angesetzt, kräftig gevortext und bei Raumtemperatur für 20-30 min inkubiert.

	60 mm Zellkulturplatte	100 mm Zellkulturplatte
DNA insgesamt	6 μ g	15 μ g
PEI (1 mg/ml)	18 μ l	45 μ l
MEM-Medium ohne Zusätze	476 μ l	1940 μ l

Während der Inkubationszeit folgte ein Mediumwechsel mit vorgewärmtem MEM-Medium (siehe 2.2.2). Für 6 cm Schalen wurde das alte Medium durch 2,5 ml MEM-Medium dem 12% FCS zugesetzt wurde, ausgetauscht. Bei 10 cm-Schalen wurden 4 ml MEM-Medium mit 15% FCS verwendet. Im Anschluss folgte die Zugabe des Transfektionsgemisches. Ähnlich wie bei der Calciumphosphat-Transfektion wurde am nächsten Morgen durch Zugabe von Natrium-Butyrat in einer Endkonzentration von 10 mM für 6-8h induziert. Es folgte ein letzter Mediumwechsel mit 3 ml vorgewärmten Medium für 6 cm-Schalen und 5 ml für 10 cm-Schalen. Die transfizierten Zellen wurden über Nacht inkubiert und am nächsten Tag entweder für proteinbiochemische Versuche direkt lysiert oder für virologische Methoden der Überstand zur Weiterverarbeitung abgenommen.

2.4.6 Herstellung von Zellysaten

Die Herstellung von Zellysaten eignet sich zur Untersuchung, ob die gewünschten Proteine, die auf Expressionsplasmiden kodiert sind auch expremiert werden, aber auch für weitere biochemische Untersuchung sowie der Immunpräzipitation und der Analyse von Protein-Protein-Interaktionen. Hierbei ist je nach Fragestellung und den physikalischen und biologischen Eigenschaften der zu untersuchenden Proteine die Zusammensetzung des Lysispuffers von großer Bedeutung. Die richtige Wahl und Menge der Detergenzien, Salzkonzentrationen sowie zusätzlicher Komponenten bestimmt über die Löslichkeit und Qualität der zu untersuchenden Proteine. Ist die Detektion eines löslichen nuklearen oder cytoplasmatischen Proteins mittels eines spezifischen Antikörpers Teil der Fragestellung, so können hoch stringente Lysispuffer (z.B RIPA-Puffer; siehe 2.2.4) mit starken Detergenzien und hohen Salzkonzentrationen verwendet werden, da in diesem Fall eine Erhaltung der nativen Proteinstruktur nicht erforderlich ist. Hier sorgt Triton X-100 oder NP-40 für die Permeabilisierung der Zellmembran, Natriumdodecylsulfat (SDS) für die Zerstörung fast aller nichtkovalenter Wechselwirkungen in nativen Proteinen und β -Mercaptoethanol zur Reduktion von Disulfidbrücken.

Sind Untersuchungen zur Identifikation von Protein-Protein-Interaktionen oder Versuche, die eine enzymatische Aktivität des Proteins voraussetzen, Teil der Fragestellung, muss die Menge und Konzentration der Komponenten sehr fein angepasst werden. In der Regel besitzen solche Lysispuffer keine oder geringe Mengen an Detergenzien und je nach der Löslichkeit des zu untersuchenden Proteins geringe oder keine Salz-Komponenten.

2.4.6.1 Zellysate für Western Blot

Zur Überprüfung, ob eine Expression von transfezierten Plasmiden oder von integrierten proviralen Sequenzen stattfindet, erfolgte die Lyse der Zellen mit RIPA-Puffer. Auf 4°C abgekühlter RIPA-Puffer wurde nach dem Waschen der Zellen mit PBS in folgenden Volumen direkt auf dicht bewachsene Zellkulturplatten gegeben.

Volumen (ml)	Durchmesser der Zellkulturplatte (mm)
1,2	100
0,6	60
0,25	35
0,25	30

Nach einer Inkubation auf Eis für 10-20 min und dem mehrmaligen Schwenken der Platten wurde das schleimig aussehende Zellysate in einem Qiashreder der Firma Qiagen überführt und für eine Minute bei 14 000 rpm nach Angaben des Herstellers zentrifugiert. Das auf diese Weise von der DNA getrennte Lysat wurde für die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (siehe 2.5.1) in einem 1:1 Verhältnis mit 2 x PPP (siehe 2.2.4) gemischt und für 5 min bei 95°C gekocht. Eine kurzfristige Lagerung erfolgte bei -20°C, eine langfristige Lagerung bei -80°C.

2.4.6.2 Zellysate für Pull-Down-Experimente

Zur Herstellung von Zellysaten, die für Pull-Down-Experimente genutzt werden sollten, erfolgte die Lyse der Zellen mit 100 CSK- und 400 CSK-Puffer (siehe 2.2.4) nach der Methode von Cherepanov et al., 2003. Hierfür wurden im ersten Schritt zirka 8×10^7 mit ATV abgelöste Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 8-10 ml kaltem 100CSK-Puffer, dem zuvor 0,5% NP-40 und ein EDTA-freier Protease Inhibitor Cocktail Mix (Roche) zugesetzt wurde, für 10-15 min auf Eis lysiert. NP-40 permeabilisiert sowohl die Zell- als auch die Kernmembran. Zur Trennung der unter diesen Bedingungen gelösten Proteine wurde das nukleare Pellet bei 4°C für 5 min mit 4000 rpm abzentrifugiert und der Überstand in 1 ml-Portionen aliquotiert, in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Zur Lösung von schwerer löslichen, gegebenenfalls mit nuklearen Strukturen assoziierten Proteinen erfolgte erneut eine Lyse des nuklearen Pellets mit 8-10 ml 400 CSK Puffer, dem nur EDTA-freier Protease Inhibitor Cocktail Mix zugesetzt wurde, für 10 min auf Eis. Anschließend wurde die genomische DNA bei 4°C und 7500 rpm für 5 min pelletiert und der Überstand wie zuvor beschrieben in 1 ml Aliquots, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.4.7 Herstellung von transkriptionsaktiven Kernextrakten

Zur Herstellung von eukaryotischen Kernextrakt-Gemischen die transkriptionsaktiv sind und auch in den im Kapitel 2.5.5 beschriebenen Pull-Down Experimenten benutzt werden sollten wurden nicht adhärenente HeLa-Zellen lysiert. Der Vorteil bei der Nutzung von nicht-adhärenenten Zellen liegt darin, dass diese in so genannten „Rollerbottles“ oder ähnlichen Behältern in sehr großen Volumen kultiviert werden können, so dass große Mengen an Kernextrakt für Experimente produziert und gelagert werden können.

Die HeLa-Zellen wurden zunächst wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben in 1 l-Flaschen so lang kultiviert, bis die Konzentration mindestens 1×10^6 Zellen/ml betrug. Anschließend wurden zirka 600 ml der Zellsuspension (ca. 6×10^8 Zellen) bei 4°C für 10 min bei 3500 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und einmal in PBS gewaschen. Auf ein Volumen-Zell-Pellet folgte eine Zugabe von 4-5 Volumenanteilen hypotonischer Puffer (siehe 2.2.4). Dem hypotonischen Puffer wurde zuvor zur Inhibierung von Proteinasen 0,5 mM PMSF und als Detergenz 0,5 mM DTT zugegeben. Der Puffer löst aufgrund seiner geringen Salzkonzentration nach dem osmotischen Prinzip eine Schwellung der Zellen aus, die unter dem Mikroskop verfolgt wurde. Die Zellmembran der angeschwollenen Zellen wurde auf Eis in einem Homogenisator mechanisch zerstört, während die Kernmembran im Mikroskop sichtbar intakt blieb. Nach der Homogenisierung wurde das Gemisch erneut bei 4°C für 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert, der Überstand (S100 Extrakt) mit 1/10 Volumenanteil 10 x Salzpuffer (siehe 2.2.4) versetzt und bis zum nächsten Zentrifugationschritt bei 4°C auf einem Rad gerührt. Das Pellet, welches die Zellkerne enthält, wurde nun mit 2 Volumenanteilen Kernextrakt-puffer (siehe 2.2.4), dem ebenfalls jeweils 0,5 mM PMSF und DTT zugegeben wurden, für 5 min lysiert. Nach einer erneuten Homogenisierung zur mechanischen Zerstörung der Kernmembran wurde das Gemisch für 30 min zusammen mit dem S100-Extrakt bei 4°C auf einem Rad gerührt und im Anschluss bei 4°C für 1h bei 45000 rpm in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Beide Überstände wurden separat in einen Dialyseschlauch (24 mm x 15 mm; MWCO: 8,0) überführt und gegen AM100 Dialyse-Puffer (siehe 2.2.4) für 5h dialysiert. Der S100 sowie der Kernextrakt wurden in 500 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff gefroren und für weitere Experimente bei -80°C gelagert.

2.4.8 Herstellung von eukaryotischen Zellen zur stabilen Expression von rekombinanten Proteinen mittels retroviralem Gentransfer

Retrovirale Vektoren können aufgrund ihrer Eigenschaft, ihr Genom in das des Wirtes stabil zu integrieren, zur Herstellung von eukaryotischen Zellen, welche stabil ein rekombinantes Protein exprimieren, verwendet werden. Hierbei dient der retrovirale Vektor, der alle essentiellen Sequenzen für die Integration, der reversen Transkription sowie die cis-aktiven RNA-Elemente enthält, als Rückrat für die Expression eines rekombinanten Proteins. Die Expression der Proteine kann entweder durch einen internen Promotor oder durch die virale LTR selbst kontrolliert werden. Weiterhin erlaubt die Präsenz einer eGFP-Zeozin Kasette zum einen die Bestimmung der Transduktionseffizienz und die Selektion von erfolgreich transduzierten Zellen.

In dieser Arbeit wurde ein in Kapitel 2.6.1 detailliert beschriebenes auf MLV-basiertes Vektorsystem verwendet. Für die stabile Expression der FV-Integrase, welche C-terminal mit einem Flag-tag fusioniert ist (IN/C-Flag), wurde der in Kapitel 2.6.2 beschriebene vektorhaltige Überstand in zwei Ansätzen direkt (ohne -80°C Lagerung) in verschiedenen Mengen (0,2, 0,5 und 1,0 ml) auf 2×10^4 zuvor in 12-well Platten ausgesäten HT1080 Zellen gegeben. Mittels FACS (siehe 2.4.9) wurde die Anzahl an eGFP-positiven Zellen in pro Ansatz ermittelt. Der zweite Ansatz diente der anschließenden Selektion der Zellen, die stabil die FV-Integrase zusammen mit dem Selektionsmarker (Zeozin) exprimierten. Für die Selektion wurden die HT1080-Zellen verwendet, die nach der Transduktion mit verschiedenen Mengen an Überstand im FACS mindestens 15-20% eGFP-positiv waren. Zur Selektion wurden zunächst die Zellen, welche in der 12-well Platte einen 80% konfluenten Zellrasen gebildet hatten, mit ATV gewaschen, abgelöst und in eine 6-well Platte überführt. Die Selektion folgte durch Zugabe von 0,1 mg/ml Zeozin. Nach 48h erfolgte erneut bei einem Teil der Zellen eine FACS-Analyse. Eine Selektion wurde als erfolgreich angesehen, wenn zirka 99% der untersuchten Zellen eGFP-positiv waren. Die erfolgreich selektionierten Zellen wurden dann in große Kulturflächen überführt und nach jeder fünften Passagierung, erneut um die hohe Anzahl an eGFP-positiven Zellen aufrecht zu halten, mit 0,1 mg/ml Zeozin selektioniert. Zur Lagerung wurde ein Teil der Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren (siehe 2.4.3). Ein Western Blot (siehe 2.5.2) diente zum Nachweis über eine effiziente Expression von FV IN/C-flag.

2.4.9 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Mit Hilfe der durchflusszytometrischen Analyse können Zellpopulationen hinsichtlich bestimmter physikalischer Eigenschaften charakterisiert werden. Dazu wird eine Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet und das Emissionsspektrum gemessen. Auf diese Weise lässt sich die Expression eines Markergens oder mehrerer Markergene in einer Zellpopulation entweder direkt mit Hilfe eines in der Zelle exprimierten Fluorochroms oder indirekt mit Hilfe eines gegen das Markergen gerichteten Antikörpers mit angebondenen Fluorochrom quantitativ bestimmen. Neben dem Anteil fluoreszierender Zellen und deren Fluoreszenz-Intensität kann auch die Größe und Granularität der Zellen bestimmt werden, was eine Aussage über den Zustand der Zellpopulation erlaubt.

FACS-Analysen wurden in dieser Arbeit ausschließlich für den Nachweis einer *enhanced green fluorescent protein* (eGFP)-Expression verwendet. Dieses Protein, welches bei der Anregung durch einen Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 488 nm grün fluoresziert, ist als Markergen weit verbreitet. Unter anderem werden zur Kontrolle der Transduktions-Effizienz eGFP-codierende Sequenzen in retroviralen Vektoren als Marker eingefügt.

Zur Messung der eGFP-Expression wurden zuvor mit retroviralen Vektoren transduzierte Zellen einmal mit ATV (siehe 2.2.2) gewaschen, mit ATV abgelöst und in 3 ml in FACS-Röhrchen vorgelegten FACS-Puffer (siehe 2.2.2) überführt. Die Röhrchen wurden für 5 min bei 1200 rpm pelletiert, der Überstand abgekippt und erneut je nach Größe des Zell-Pellets in 200-500 µl FACS-Puffer durch vortexen gründlich resuspendiert. Die Messung erfolgte direkt im Anschluss an einem Becton-Dickinson-FACScan und die Auswertung mit dem Programm *CellQuest* (ebenfalls Becton-Dickinson).

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Proteine lassen sich in einem elektrischen Feld anhand ihres Molekulargewichtes auftrennen. Unter denaturierenden Bedingungen werden Proteine hauptsächlich in

SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Polyacrylamidgele bestehen aus einem Acryl-Bisacrylgemisch. Ihr Trennbereich ist von der Konzentration und dem Verhältnis dieses Gemisches abhängig. Hierbei muss dem Proteingemisch 2x PPP (siehe 2.2.4), welches SDS und β -Mercaptoethanol enthält, zugesetzt worden sein. Wie in Kapitel 2.4.6 bereits beschrieben werden auf diese Weise die Proteine denaturiert. Zusätzlich binden sich SDS-Anionen an die Hauptketten -etwa ein SDS-Molekül auf zwei Aminosäurereste-, so dass ein Komplex aus SDS und denaturiertem Protein entsteht, dessen stark negative Ladung der Masse des Proteins ungefähr proportional ist und so im elektrischen Feld aufgetrennt werden kann. In dieser Arbeit wurde die Elektrophorese in vertikalen Tricin-SDS-Polyacrylamidgelen eingesetzt (modifiziert nach Schägger und Jagow 1987). Der Trennbereich liegt dabei je nach Acrylamidanteil und Vernetzungsgrad zwischen Acrylamid und Bisacrylamid bei 10-220 kDa. Die Polymerisierung des Acrylamids benötigt freie Radikale, die von Ammoniumpersulfat (APS) freigesetzt und von TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) stabilisiert werden. Unter diesen Bedingungen ist die Beweglichkeit der meisten Polypeptidketten dem Logarithmus ihrer Masse proportional. Es wurden in dieser Arbeit ausschließlich 8%ige Trenngelle verwendet, die mit einem 4%igen Sammelgel überschichtet und wie folgt angesetzt wurden.

	Trenngel 8%	Sammelgel 4%
Acryl-Bisacrylamid (Stammlösung 37,5:1)	5,3 ml	2,6 ml
Gelpuffer (siehe 2.2.4)	6,6 ml	5,0 ml
Glycerin	2,2 ml	-
Aqua _{dest} steril	6,0 ml	12,4 ml
10% APS	150 μ l	150 μ l
TEMED	20 μ l	20 μ l

Zuerst wurde das Trenngel gegossen und mit 1 ml Isopropanol überschichtet. Nach der Auspolymerisierung (ca. 30 min) wurde das Isopropanol vollständig entfernt und anschließend das Sammelgel gegossen und die entsprechenden Kämme eingesetzt. In die obere (-)-Kammer der Elektrophoreseapparatur wurde Kathodenpuffer und in die untere (+)-Kammer Anodenpuffer gegeben. Vor dem Auftragen der Proben mussten die Taschen des Sammelgels mit 1x Kathodenpuffer zum Entfernen von abgesetzten Gel- und Wasserresten, gründlich gespült werden. Im Anschluss folgte das Auftragen der in 2x PPP gekochten Proteinproben in die Taschen. Zur Bestimmung der Größe wurde in

einer Tasche ein Größenmarker aufgetragen. Die Trennung der Proteine erfolgte über Nacht bei 20-35 mA pro Gel.

2.5.2 Western Blot

Der so genannte Western Blot wird für die Übertragung von zuvor in Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf einen geeigneten Trägerfilter verwendet. Derart fixierte Proteine lassen sich spezifisch durch Immunfärbung nachweisen. Aufgrund der leichten Handhabung und der schnellen Übertragungsrate werden meist Nitrocellulose-Filter als Trägermaterial verwendet (Burnette, 1981). Hierfür werden spezielle Apparaturen benötigt, die eine elektrophoretische Übertragung auf den Träger erlauben. Diese bestehen meist aus zwei Graphitplatten, zwischen denen das Polyacrylamidgel und die Nitrocellulosemembran, welche auf der Anodenseite liegt, gelagert wird. In einem elektrischen Feld wandern so die Proteine zum positiven Pol der Anode und werden dabei auf der Membran immobilisiert.

In dieser Arbeit wurde das so genannte „Semidry“-Blottingverfahren verwendet. Vor dem eigentlichen Blotten wird die Nitrocellulosemembran (HYBOND™ ECL™; Amersham Biosciences) und 5 Lagen Whatman-Filterpapier für 10 min in Blotpuffer (siehe 2.2.4), inkubiert. Anschließend wurde auf die untere Platte der Apparatur (Anode) 3 Lagen Whatman-Filterpapier, die Nitrocellulosemembran, das Polyacrylamidgel und wieder 2 Lagen Whatman-Filterpapier luftblasenfrei gestapelt. Die zweite Platte (Kathode) wurde nun aufgesetzt und eine Stromstärke von 150 mA pro Blott ($1\text{mA}/\text{cm}^2$) für 90 min angelegt. Im Anschluss musste die Nitrocellulosemembran kurz mit Aqua dest abgespült, in PBS kurz geschwenkt und zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 1-2h in Blockierungslösung (4% Magermilchpulver in PBS) geschwenkt werden. Es folgte die Zugabe des primären Antikörpers, der zuvor in Abhängigkeit des Titers in Blockierungslösung verdünnt wurde, für mindesten 1h. Zum Entfernen von nicht gebundenen und unspezifisch gebundenen Antikörpern musste die Membran, bevor der ebenfalls in Blockierungslösung verdünnte zweite Antikörper hinzugegeben wurde, mit PBS-Tween für zweimal 10 min geschwenkt werden. Nach 1h Inkubation mit dem zweiten Antikörper wurde die Membran für viermal 10 min mit PBS-Tween gewaschen. In dieser Arbeit wurden sekundäre Antikörper verwendet, welche mit der Meeretichperoxidase gekoppelt sind. Hierbei erfolgt die Nachweisreaktion über die Oxidation von Luminol in einer Detektionslösung, wobei Photonen emittiert werden, die mittels Röntgenfilm oder CCD-Kamera nachgewiesen werden können.

Hierfür wurde die Nitrocellulosemembran mit Whatman-Papier leicht getrocknet, auf eine Glasplatte gelegt und mit 4 ml ECL-Lösung (*ECL Western Blot Detection Kit*) für 90 sec beschichtet. Im Anschluss wurde die Glasplatte mit Frischhaltefolie verpackt und in eine Fotokassette überführt. In der Dunkelkammer wurden durch Auflegen eines Röntgenfilms die Antikörper spezifischen Proteinbanden nach der Entwicklung und Fixierung des Films sichtbar gemacht.

2.5.3 Silberfärbung

Proteine, die in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt worden sind, können auf verschiedene Weise gefärbt werden. Neben der Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R250 sind Färbungen mit Silbernitrat 100- bis 1000-fach sensitiver, so dass Proteinmengen von 0,1-1,0 ng nachgewiesen werden können. Das Grundprinzip dieser Methode beruht auf der Reduktion von Silber-Ionen, die an den Seitenketten von Aminosäuren gebunden sind. In dieser Arbeit wurde ein modifiziertes Protokoll der ursprünglich von Sammons et al., 1981 entwickelten Methode durchgeführt. Die hierfür verwendeten Puffer und Lösungen sind in Kapitel 2.2.4 beschrieben.

Zunächst mussten hierfür die in einer SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgetrennten Proteine durch Zugabe einer Fixierlösung für mindestens 1h im Gel fixiert werden. Anschließend wurde die Fixierlösung verworfen und das Gel 3-mal mit 50%igem Ethanol gewaschen. Vor der Zugabe einer 0,1%igen Silbernitrat (AgNO_3)-Lösung wurde das Gel in einer Natriumthiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)-enthaltenen Lösung für 1 min geschwenkt und 3-mal für 30 sek in deionisiertem Wasser gewaschen. Es folgte eine Inkubation mit der Silbernitrat-Lösung für 20-30 min unter ständigem Schwenken. Anschließend wurde nach der Entfernung der Lösung drei Mal für 30 sek in deionisiertem Wasser gewaschen und durch Zugabe einer frisch angesetzten Natriumcarbonat (Na_2CO_3)-haltigen Lösung als Reduktionsmittel die mit Silbernitrat markierten Proteinbanden nach und nach sichtbar gemacht. Dieser Schritt erfolgte so lang bis die erwünschte Intensität der Proteinbanden erreicht wurde. Das Gel wurde nun zur Beendigung der Färbung 2-mal für 2 min mit deionisiertem Wasser gewaschen und dann für 30 min in Fixierlösung inkubiert. Zur Trocknung wurde das Gel zwischen zwei speziellen Folien gelegt und für 2 h im Geltrockner getrocknet.

2.5.4 Aufreinigung rekombinanter Proteine mit C-terminalem Flag-Tag in eukaryotischen Zellen

Proteine, die N oder C-terminal mit einem so genannten Flag-tag fusioniert sind und in prokaryotischen oder eukaryotischen Zellen expremiert werden, können mit Hilfe des kommerziell erhältlichen ANTI-FLAG[®] M2 Affinity Gel-Kit (Sigma) aufgereinigt werden. Hierbei kann nach dem Prinzip der Immunpräzipitation durch die spezifische Bindung des ANTI-FLAG M2 monoklonalen Antikörpers, der kovalent an Agarose gebunden ist, ein mit dem Flag Oktapeptid (N-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys-C)-fusioniertes Protein aus dem Proteingemisch isoliert und aufgereinigt werden. Solche Agarose-Antikörper-Verbindungen werden im Allgemeinen auch als „Beads“ bezeichnet. Wie in Kapitel 2.4.8 bereits erwähnt, wurden zur Expression von PFV IN/C-Flag in eukaryotischen Zellen MLV-basierte Vektoren (siehe 2.6.1) verwendet, die nach Integration im Wirtsgenom IN/C-flag stabil expremieren. Nach der Lyse der Zellen (siehe 2.4.6.2) musste zur Aufreinigung von IN/C-flag 1 ml der bei -80°C eingefrorenen Lysate zusammen mit 1 ml einer Negativkontrolle, die aus nicht IN/C-flag-expremierenden Zellen bestand (HT1080-Zellen), zunächst bei 4°C für 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert werden. Somit wurden alle nicht oder schwer löslichen Proteine aus dem Gemisch entfernt. Der Überstand wurde in einen neuen Eppendorf-Behälter überführt und zusammen mit 20-30 µl ANTI-FLAG[®] M2 Affinity Gel für 5-15h bei 4°C auf einem Rad gerührt. Die Aufreinigung des rekombinanten Fusionsproteins erfolgte durch mehrfach wiederholtes Waschen und Zentrifugieren (5000 rpm) der Beads. Die Salzkonzentration des Waschpuffers hat großen Einfluss auf den Reinheitsgrad des aufzureinigenden Proteins und muss je nach Fragestellung fein ausgesucht werden. Zur möglichst sauberen Aufreinigung von IN/C-flag wurden in dieser Arbeit die Beads 3-4-mal mit jeweils 1 ml 400 CSK-Puffer gewaschen. Jeweils 100 µl jedes Waschüberstandes wurden mit der gleichen Menge an 2 x PPP vermischt, für 5 min bei 95°C gekocht und für nachfolgende SDS-Polyacrylamidgele (10-50 µl pro Tasche) bei -20°C gelagert. Nach dem letzten Waschen wurden entweder direkt 100 µl 2 x PPP auf die pelletierten Beads gegeben und diese für das Auftragen auf SDS-Polyacrylamidgele (30 µl pro Tasche) bei 95°C für 5 min gekocht oder es wurden zum Eluieren der IN/C-flag-Proteine von den Beads 5 Volumenanteile FLAG-Peptide (Stocklösung 100 µg/ml) hinzugegeben und noch mal für 3-5h bei 4°C auf dem Rad gerührt. Der Überschuss an FLAG-Peptiden sorgt für die Eluation des IN/C-flag-Proteins, da sie eine hohe Affinität zum M2-Antikörper besitzen, so dass das zuvor gebundene IN/C-Flag-Protein verdrängt wird. Die Proben wurden erneut bei 5000 rpm zentrifugiert und der Überstand, der das eluierte Protein enthält, in einem 1:1 Verhältnis mit 2 x PPP

vermischt und bei 95°C für 5 min gekocht. Hiervon wurden 50 µl pro Tasche auf SDS-Polyacrylamidgele aufgetragen (siehe 2.5.1). Es folgte eine Silberfärbung (siehe 2.5.3) und Immunofärbung (siehe 2.5.2) der Gele.

2.5.5 Pull-Down-assay

Der so genannte „Pull-Down-Assay“ beschreibt eine Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen. Die minimale Voraussetzung für solche Experimente ist die Verfügbarkeit eines mit einem Tag fusionierten, rekombinanten und aufgereinigten Proteins, welches als Köder („Bait“) für die Suche nach interagierenden Proteinen („Prey“) dient.

Klassische Pull-Down-Assays ähneln sehr der Immunpräzipitation, außer dass hier ein Protein und nicht ein Antikörper zum Isolieren von Proteinen verwendet wird. Die Fusionsproteine werden in der Regel nach dem Prinzip der „Immobilized metal affinity chromatography“ (IMAC) zunächst in einer Säule gebunden. Die gebundenen Proteine können nun nach Zugabe von Proteingemischen als Köder für die Suche nach möglichen Interaktionspartnern dienen. Der kritische Parameter hierbei ist die Optimierung der Waschbedingungen zur Entfernung oder Verminderung von nicht spezifischen Protein-Bindungen. Starke Interaktionen, welche eine geringe Dissoziationskonstante und eine hohe Affinität zu dem „Bait“-Protein aufweisen, können am leichtesten nachgewiesen werden, da diese durch das intensive Waschen mit hoch ionischen Puffern nicht entfernt werden. Bei schwächeren Protein-Protein-Interaktionen müssen die Waschpuffer durch die Wahl der Salze, der Salzkonzentrationen und des pH-Wertes optimiert werden. Zusätzlich müssen zum Erhalt von biologisch signifikanten Ergebnissen wichtige Kontrollen, die meist aus einem Ansatz ohne dem „Bait“-Protein oder eines anderen Proteins bestehen, mitgeführt werden.

In dieser Arbeit wurden C-terminal mit einem FLAG-Tag fusionierte PFV-Integrase Proteine (INC-Flag), die in eukaryotischen Zellen expremiert (siehe 2.4.8) und anschließend gereinigt (siehe 2.5.4) wurden, als „Bait“ für die Suche nach interagierenden zellulären Proteinen verwendet. Dabei wurde die Aufreinigung und der Pull-Down-Assay nicht mit kommerziell erhältlichen Chromatographie-Säulen durchgeführt, sondern erfolgte direkt in Lösung mit Hilfe von so genannten ANTI-FLAG Beads (siehe 2.5.4). Wie bereits im vorherigen Kapitel beschrieben wurde 1 ml der 100CSK-Lysate (siehe 2.4.6.2) von IN/C-Flag-expremierenden HT1080-Zellen und normalen HT1080-Zellen, nachdem, durch Zentrifugation unlösliche Bestandteile im Gemisch entfernt wurden, zunächst mit 20-30µl

ANTI-FLAG Beads bei 4°C für 5h auf dem Rad gerührt. Die Beads wurden im Anschluss 4-mal mit 1 ml kaltem 400 CSK-Puffer gewaschen und erneut mit 200 µg /ml Hela-Kernextrakt (siehe 2.4.7) und dem gleichen Volumenanteil 1 x PBS (enthält Protease Inhibitor Mix) bei 4°C für 5-10h auf dem Rad gerührt. Im Anschluss wurden die Beads erneut mit 3-mal 100CSK-Puffer (enthält 0,1% NP-40) gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurden 100 µl des Überstandes in einem 1:1 Verhältnis mit 2 x PPP versetzt und für anschließende SDS-Polyacrylamidgele für 5 min bei 95°C gekocht und bei -20°C aufbewahrt. Die Beads wurden nach dem letzten Waschschrift in 100 µl 2 x PPP aufgenommen und ebenfalls für 5 min bei 95°C gekocht. Jeweils 30 µl der Überstände aus den ersten drei Waschschriften und 30 µl der gewaschenen und in 2 x PPP aufgenommenen Proben wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und mittels Elektrophorese aufgetrennt. Es folgte eine Silberfärbung (siehe 2.5.3) der Gele zur Identifizierung von Proteinbanden, die in dem IN/C-Flag-enthaltenen Ansatz vorhanden waren, aber in der Negativkontrolle fehlten. Der Rest der Proben wurde bis zur Identifizierung der Interaktionspartner mittels Multi-Tof-Massenspektrometrie bei -80°C gelagert.

2.6 Virologische Methoden

2.6.1 Retrovirale Vektorsysteme

Für die Klonierung der in dieser Arbeit zu analysierenden retroviralen Integrationsstellen (RIS) und zur Herstellung von eukaryotischen Zellen, die das PFV-INC-Flag Fusionsprotein stabil exprimieren (siehe 2.4.8), mussten zur Infektion von Zielzellen zunächst virushaltige Überstände generiert werden. In beiden Fällen erfolgte dies mit Hilfe von retroviralen Vektorsystemen. Retrovirale Vektorsysteme bestehen meist aus zwei oder drei Plasmiden, welche die für die Produktion von Viruspartikeln wichtigen Komponenten unter der Kontrolle eines CMV-Promotors separat exprimieren. Zwei-Plasmid-Systeme bestehen aus einem *gag-pol*-Expressionsplasmid, welches zusätzlich die für die Verpackung der viralen RNA und die für die Integration nötigen LTR-Sequenzen enthält, und einem Env-Expressionsplasmid, welches die Oberflächen-Proteine des Viruspartikels kodiert. In einem Drei-Plasmid-System enthält der sogenannte Vektor nur noch die für die Verpackung der viralen RNA essentiellen *cis*-aktiven Bereiche, die für die Integration essentiellen attachment sites (*att*-sites) sowie den für die reverse

Transkription wichtigen zentralen Polypurintrakt (cPPT). In diesem Fall erfolgte die Expression der Gag-Pol-Proteine sowie die der Env-Proteine von separaten Expressionsplasmiden. Die Insertion einer Markergenkassette, der die Expression von eGFP oder Selektionsmarkern (Zeocin, Neomycin) unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven internen Promotors steht, erlaubt eine Infektionsanalyse mittels FACS (siehe 2.4.9) und eine Selektion der Zellen entweder mit dem entsprechenden Antibiotikum oder über das Emissionsspektrum von eGFP in einem so genannten Zellsorter. Eine Kotransfektion (siehe 2.4.5) aller Komponenten des Vektorsystems in 293T-Zellen ermöglicht die Generierung von Viruspartikeln, die zur Infektion von Zielzellen verwendet werden können.

Für die Analyse der RIS wurde durch Kotransfektion von auf PFV-, MLV- und HIV-1-basierenden Zwei-Plasmid-Vektorsystemen mittels der Calciumphosphat-Methode (siehe 2.4.5) virushaltiger Überstand produziert (siehe 2.4.5 & 2.6.2). Bei allen anderen in dieser Studie generierten virushaltigen Überstände wurde Polyethyleneimine als Transfektions-Reagenz verwendet. Im Folgenden sind alle in dieser Studie verwendeten Vektorsysteme zusammengefasst (für Referenzen siehe Kapitel 2.1.7).

PFV-Vektorsystem zur Analyse des Integrationsmusters

pMH123 + pCenv1

pMH124 + pCgp1 + pCenv1

HIV-1-Vektorsystem zur Analyse des Integrationsmusters

pGJ3/U3E + pczVSV-G

MLV-Vektorsystem zur Analyse des Integrationsmusters

pcAMS/U3E + pczVSV-G

MLV-Vektorsystem zur Herstellung von stabil INC-Flag exprimierenden humanen Zellen

pczCFG/IEZ-INC-flag + pHIT 60 + pczVSV-G

siRNA-Vektorsystem

pF6UGW + pMDL g/p RRE + pRSV-Rev+ pczVSV-G

2.6.2 Produktion zellfreier, virushaltiger Überstände

Nach einer Kotransfektion von 293T-Zellen mit den geeigneten viralen Expressionsplasmiden (siehe 2.6.1) können zellfreie Virusüberstände 48h nach Transfektion (siehe 2.4.5) aller für die Generierung von viralen Partikeln nötigen Komponenten (siehe 2.6.1) geerntet werden. Hierfür wurde zunächst der Überstand der transfezierten Zellen mit einer Spritze abgenommen, zur Entfernung von abgelösten Zellen sterilfiltriert (0,45 µm) und entweder direkt auf Zielzellen gegeben oder in 0,5-1 ml Aliquots bei -80°C gelagert.

2.6.3 Bestimmung der MOI (multiplicity of infection)

Die MOI ist der Wert, der die Anzahl von infektiösen Einheiten in einer virushaltigen oder vektorhaltigen Lösung beschreibt. Sie errechnet sich aus dem Quotienten von infektiösen Vektor-Einheiten und der Anzahl ausgesäter Zellen. Im Idealfall würde, wenn jede Zelle nur einmal infiziert werden könnte, eine MOI von eins bedeuten, dass auf eine bestimmte Zahl von Zellen die gleiche Menge an infektiösen Einheiten zur Infektion oder Transduktion eingesetzt wurde, so dass jede Zelle eine Kopie des Provirus enthalten sollte. In diesem mathematischen Modell wird allerdings das Auftreten von mehrfach transduzierten Zellen nicht berücksichtigt, die eine Bestimmung der MOI über die Anzahl an infizierten oder transduzierten Zellen erschweren. Nach der Poisson-Verteilung ergibt sich eine andere Beziehung zwischen der Anzahl an infizierten Zellen und der MOI (siehe Tab. 3), welche für eine Abschätzung der infektiösen Einheiten von retroviralen Vektoren und der Kopienzahl an proviralen Sequenzen in erfolgreich transduzierten Zellen besser geeignet ist. In diesem mathematischen Modell wird postuliert, dass jede Zelle, unabhängig davon ob sie bereits transduziert wurde, die gleiche Wahrscheinlichkeit besitzt transduziert zu werden, so dass durch das Auftreten von mehrfach transduzierten Zellen bei einer MOI von eins neben einfach transduzierten auch mehrfach und gar nicht transduzierte Zellen vorhanden sein müssen (Fehse et al., 2004). Unter Berücksichtigung

dieser Bedingungen kann über die Anzahl an erfolgreich transduzierten Zellen, nach der folgenden Tabelle (verändert nach Fehse et al., 2004), die MOI bestimmt werden, welche zusätzlich eine Abschätzung über die Anzahl der in den Transduzierten Zellen enthaltenen proviralen Sequenzen erlaubt (Fehse et al., 2004).

Tab. 3 Prozentualer Anteil Marker-positiver Zellen pro MOI

MOI	0,05	0,1	0,2	0,3	0,5	0,7	1	2	3
Zellteilungs abhängig	2,5%	4,5%	9,5%	13,9%	22,1%	29,5%	39,3%	63,2%	77,7%
Zellteilungs unabhängig	4,5%	9,5%	13,9%	22,1%	29,5%	39,3%	63,2%	77,7%	91,8%

In diesem Modell wird zusätzlich die Fähigkeit zur Transduktion von sich nicht teilenden Zellen, so wie es bei Lentiviren der Fall ist, mitberücksichtigt. Da alle hier verwendeten Vektoren eGFP als Markergen enthielten, erfolgte die Bestimmung der MOI über die Anzahl von nach Transduktion eGFP-positiven Zellen mit FACS (siehe 2.4.9).

2.6.4 Inverse PCR zur Klonierung von retroviralen Integrationsstellen (RIS)

Die Klonierung von RIS aus zuvor mit retroviralen Vektoren (siehe 2.6.1) transduzierten humanen Zellen (siehe 2.6.3) erfolgte mittels inverser PCR (Li et al., 1999). Hierbei wurde die genomische DNA zunächst mit einem so genannten „4-cutter“-Restriktionsenzym, das auch in der proviralen Sequenz schneidet, in kleine Fragmente zerteilt. Die Vorteile bei der Nutzung eines 4-cutter-Enzyms liegen in der statistischen Häufigkeit, in der die Vier-Basen-Erkennungssequenz des Restriktionsenzym im humanen Genom zu finden sind. Die Erkennungssequenz eines 4-cutter-Enzyms sollte statistisch gesehen alle 256 bp auftreten, so dass die DNA in sehr kleine Stücke geschnitten werden kann. Neben rein zellulären Fragmenten entstehen durch den Verdau auch Fragmente, welche die 5'LTR-Region bis einschließlich der ersten folgenden Schnittstelle im Vektor sowie den Übergang in die 5' flankierende humane zelluläre Sequenz besitzen. Solche Sequenzen werden im Folgenden als proviral-zelluläre Sequenzen bezeichnet (siehe Abb. 10). Des

Weiteren werden auch Fragmente produziert, welche die 3'LTR-Region und den Übergang in die 3' flankierende zelluläre Sequenz enthalten (siehe Abb. 10). Nach der Behandlung mit der T4-DNA-Ligase ligieren diese Fragmente mit sich selbst, so dass zirkuläre DNAs entstehen, welche zur Klonierung der zur 5'LTR flankierenden zellulären Sequenzen mittels virusspezifischen Primern, die in der LTR- (siehe Abb. 10; LTR-Primer; P1) und in der *gag*-Sequenz (siehe Abb. 10; *gag*-Primer; P2) binden, verwendet werden können.

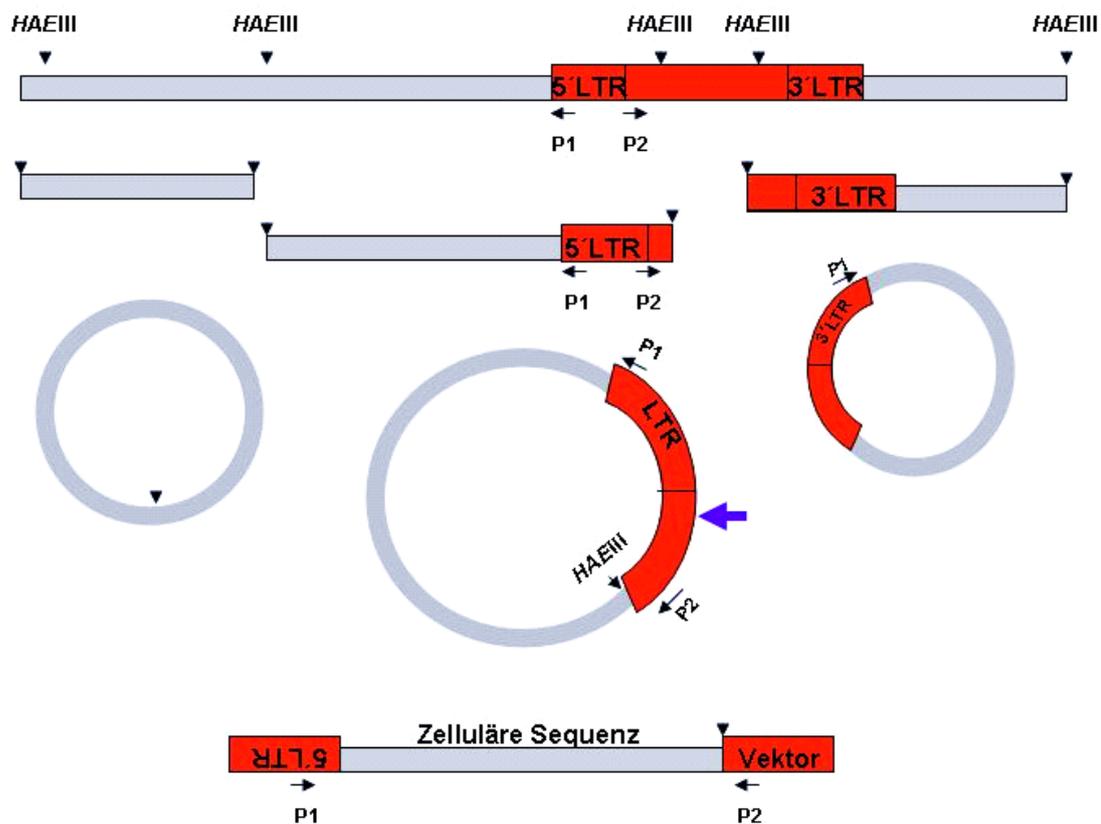


Abb. 10: Die inverse PCR zur Klonierung von RIS

Die Abbildung stellt das Prinzip der inverse PCR dar. Integrierte provirale Sequenzen werden, nachdem die genomische DNA mit Restriktionsenzymen (*schwarze Pfeilköpfe*), welche auch in der proviralen Sequenz schneiden (rot), zusammen mit den flankierenden zellulären Sequenzen (*grau*) mittels virusspezifischen Primern (*P1; P2*) in einer inversen PCR amplifiziert. Hierfür müssen die nach dem Verdau entstehenden linearen Fragmente, welche die proviralen-zellulären Übergänge enthalten (siehe Text), ligiert werden, so dass zirkuläre DNAs entstehen die als Matrize für die Amplifikation der RIS dienen. Aufgrund der Bindungsstellen der Primer werden nur die proviralen-zellulären Sequenzen am 5'-Ende (*5'LTR*) der RIS amplifiziert. Eine vor der PCR durchgeführte Linearisierung der zirkulären DNAs durch geeignete Restriktionsenzyme (*blauer Pfeil*), dient zur Beseitigung von unerwünschten Sekundärstrukturen, welche die Resultate der PCR behindern könnten.

Die zirkulären DNAs, welche die 3'LTR- und die flankierende zelluläre Sequenz besitzen, werden in der PCR nicht amplifiziert, da hier nur eine Bindung des LTR-Primers erfolgt. Der Name der inversen PCR beruht darauf, dass die Primer zunächst in entgegengesetzter Richtung liegen und erst nach der Ligation zueinander zeigen. Um mögliche Störungen bei der PCR, die durch Sekundärstrukturen der zirkulären DNA ausgelöst werden können, zu vermeiden, wurde die DNA nochmals vor der PCR mit einem Restriktionsenzym, welches nur einmal in der zirkulären DNA schneidet, linearisiert (siehe Abb. 10).

Für die Klonierung der RIS wurden zunächst 2,5 µg genomische DNA (siehe 2.3.1) aus retroviral transduzierten 293-Zellen über Nacht bei 37°C mit 5U *Hae*III (PFV und HIV-1) oder *Nla*III (MLV) Restriktionsenzymen verdaut. Das Enzym wurde anschließend 20 min bei 65°C inaktiviert, die DNA mit Ethanol präzipitiert (2.3.8) und in 20 µl 20 mM Tris-HCL pH 7,5 resuspendiert. 5µl (0,6 µg) der resuspendierten DNA-Lösung wurden mit 0,5 Units T4-DNA-Ligase bei 14°C über Nacht ligiert (2.3.9). Die Ligase wurde 20 min bei 65°C inaktiviert und 5 µl (0,12 µg) des Ligationsansatzes erneut mit 5 Units *Afl*III oder *Avr*II für 5 h bei 37°C zur Linearisierung verdaut. Das Enzym wurde für 20 min bei 65°C inaktiviert. 2,5 µl (12,5 ng) des Ansatzes wurden in die nested PCR eingesetzt. Die nested PCR wurde unter Standardbedingungen mit den in Tab. 4 dargestellten Oligonukleotiden und den entsprechenden Hybridisierungstemperaturen durchgeführt. 10 µl der 1. und 2. PCR wurden auf ein 0,8 % Agarosegel (siehe 2.3.4) überprüft und 3 µl der 1.PCR zur Sequenzierung (siehe 2.3.15) in den pCRII-TOPO-Vektor ligiert (siehe 2.3.3).

Tab. 4: Für die Klonierung der RIS verwendete Primer Paare und Hybridisierungstemperatur (für Sequenzen der Oligos siehe 2.1.8)

	PFV (pMH123)	PFV (pMH124)	MLV	HIV-1
1.PCR	#1830 + #320	#1976 + #1975	#1907 + #1908	#1900 + #1901
Primer Nr.	58°C	58°C	58°C	58°C
2.PCR	#571 + #572	#571 + #572	#1909 + #1910	#1903 + #1904
Primer Nr.	55°C	55°C	55°C	55°C

Ein typischer Reaktionsansatz wurde wie folgt angesetzt:

2,5 µl	DNA aus letztem Verdau / aus 1.PCR
25 pmol	sense Primer (10 pmol/µl Stammlösung)
25 pmol	antisense Primer (10 pmol/µl Stammlösung)
2,5 µl	NH ₄ SO ₄ Taq Puffer
2,0 µl	MgCl ₂ (25 mM)
1,25 µl	dNTPs (10 mM)
1,0 µl	Taq-Polymerase (1U/µl)
ad 50µl Aqua _{dest}	

Für die 2.PCR wurden 2,5 µl aus der 1. PCR eingesetzt.

Die Zielsequenz wurde im Thermocycler nach folgendem Protokoll amplifiziert:

95°C / 60 sec	Denaturierung der Matrizen DNA
95°C / 30 sec	Denaturierung
55-58°C / 60 sec	Hybridisierung
72°C / 120 sec	Elongation
30 Zyklen	
72°C / 600sec	finale Elongation

2.6.5 Sequenzierung der retroviralen Integrationsstellen

Zur Sequenzierung wurden 3µl der in der 1.PCR amplifizierten RIS nach den Angaben des Herstellers in den pCRII-TOPO-Vektor ligiert (siehe 2.3.3), in *E. coli* transformiert und mittels Restriktionsverdau das Vorhandensein der mit inverse PCR klonierten RIS in den aus *E. coli* isolierten Plasmiden nachgewiesen. Anschließend erfolgte je nach Orientierung des ligierten Fragments eine Sequenzierung mit den im TOPO-TA-Cloning-Kit mitgelieferten M13-Reverse oder M13-Forward-Primern. Bei der Wahl der Primer musste, da lediglich eine Länge von 600 bp der Sequenz lesbar ist, für eine vollständige Identifizierung des zellulären Anteils darauf geachtet werden, dass die Sequenzierung je nach Orientierung des Inserts von der LTR Seite aus initiiert wurde (siehe Abb. 11).

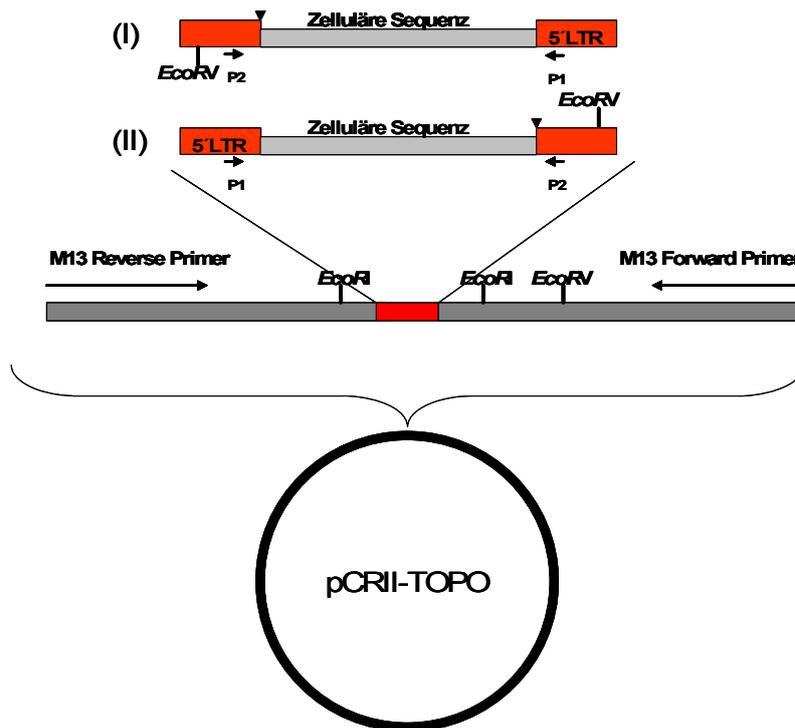


Abb. 11: Klonierung in den pCRII-TOPO-Vektor

Dargestellt ist die Klonierungsstelle im pCRII-TOPO-Vektor sowie die möglichen Orientierungen der ligierten RIS. Der pCRII-TOPO-Vektor ist so konstruiert, dass die mittels PCR amplifizierte RIS (rote Box) über komplementäre TA-Basenpaarung mit Hilfe der Topoisomerase I in den Vektor kloniert werden können (siehe 2.3.3). Die um die Klonierungsstelle lokalisierten EcoRI-Schnittstellen können zur Identifikation von Klonen verwendet werden, welche eine amplifizierte RIS enthalten. Bei den PFV-IS konnte zusätzlich durch ein EcoRV-Verdau, welcher einmal im pCRII-TOPO Vektor und einmal in der *gag*-Sequenz der klonierten PFV-IS schneidet, die Orientierung des Inserts bestimmt werden. Bei der Orientierung (I) wurde der M13 Forward Primer und bei der Orientierung (II) der M13-Reverse-Primer zur Sequenzierung gewählt, P1: LTR-Primer; P2: Gag Primer; schwarzer Pfeilkopf: *Hae*III-Restriktionsstelle.

2.7 siRNA-Methoden

RNA silencing oder RNA interference (RNAi) wurde zuerst als eine Art von Immunabwehr gegen Transposons und RNA-Viren in Pflanzen, später aber in der Nematode *Caenorhabditis elegans* (Fire et al., 1998) und in *Drosophila* (Hammond et al., 2000) beschrieben. Der Mechanismus beruht auf der Prozessierung von Doppelstrang-RNA-Molekülen (dsRNAs) in kurze 21-25 nukleotidgroße dsRNA-Fragmente durch das dsRNA erkennende RNase-Enzym DICER. Diese als short interfering RNAs (siRNAs) bezeichneten prozessierten RNA-Moleküle werden wiederum in den als RISC (dsRNA-inducing silencing complex) bekannten Endoribonuklease-Komplex eingebaut und lösen

ein Degradation von mRNA-Molekülen aus, die eine komplementäre Sequenz zu dem mit RISC assoziierten siRNA-Strang (antisense) aufweisen. Folglich wird eine post-transkriptionale Inhibierung des Gens ausgelöst (siehe Abb. 12). Seit der Entdeckung dieses Systems und der Entwicklung von molekularbiologischen Methoden zur Auslösung dieser Prozesse wird RNAi zur post-transkriptionalen Inhibierung von zellulären Genen verwendet und hat sich als eine eindrucksvolle Methode zur Analyse der Funktion von Proteinen und Genen bewährt. Mit der Erkenntnis, dass so genannte shRNAs (short hairpin RNAs) ebenfalls von DICER erkannt werden und eine RNAi-Reaktion auslösen, wurden neben transienten Methoden, die eine direkte Transfektion von siRNAs beinhalten, auch Methoden auf der Basis von retroviralen Vektoren entwickelt, welche ein shRNA-Molekül nach der Integration ins Genom stabil von einem speziellen Promotor (H1 oder U6) aus exprimieren können (Barton and Medzhitov, 2002; Brummelkamp et al., 2002). Der Vorteil der H1- oder U6-Promotoren liegt darin, dass die Transkription von der RNA-Polymerase III (Pol III) kontrolliert wird. Diese besitzt eine gut definierte Transkriptionsstart- und Termination-Sequenz mit fünf aufeinander folgenden Thyminen (T5) und sorgt für die Transkription von kleinen RNAs, welche nicht polyadenyliert sind (siehe Abb. 12). In dieser Arbeit wurde zur Inhibierung von NF90 (Nuclear Factor 90) mittels der RNAi-Methode ein lentivirales Vektorsystem (siehe 2.6.1; F6UGW) auf der Basis von HIV-1 (Lois et al., 2002; Lu et al., 2004) verwendet, welches durch eine mit dem U6-Promotor getriebene siRNA-Expressionskassette eine stabile Expression von shRNAs gewährleistet (freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von der AG Reichart aus der Abteilung für Immunologie unseres Hauses). Für die Transkription einer funktionsfähigen shRNA mussten zunächst spezielle Oligonukleotide konstruiert werden (siehe Abb. 12). Beide Oligonukleotide (sense und antisense) mussten zu einem Doppelstrang zusammen gefügt (siehe 2.3.10) und in den mit *HpaI* und *XhoI* verdauten F6UGW-Vektor ligiert und sequenziert werden. Nach einer PEI-Transfektion (siehe 2.4.5) von 293T-Zellen mit dem in Kapitel 2.6.1 beschriebenen Vektorsystem wurden die Viruspartikel geerntet (siehe 2.6.2) und mit einer MOI von 1-2 in zwei unabhängigen Ansätzen auf 2×10^4 zuvor in 12-well Platten ausgesäte HT1080-Zielzellen gegeben (siehe 2.6.3). 48h nach der Transduktion folgte die Ermittlung der Transduktionseffizienz mit einem der Ansätze mittels FACS (siehe 2.4.9), während der zweite Ansatz von der 12-well-Platte in 10 cm Zellkulturschalen überführt wurde.

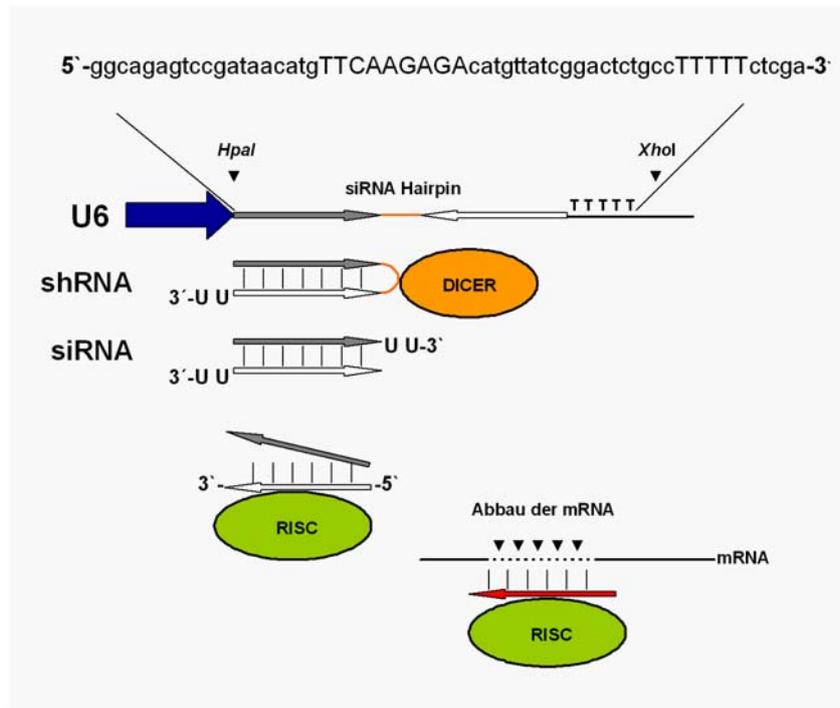


Abb. 12: Aufbau und Mechanismus der siRNA-Expressionskassette

Die Expression von genspezifischen shRNAs wird von dem RNA-Polymerase III (Pol III) U6-Promotor reguliert. Die 23 bp große (*grau Pfeil*) NF90 spezifische Anfangssequenz (sense) der Oligos ist durch einen kurzen Spacer mit der umgedrehten komplementären Sequenz (*weißer Pfeil*) getrennt und hört mit fünf aufeinander folgenden Thymidinen und der *XhoI*-Schnittstelle auf. Nach der Transkription werden kurze shRNA-ähnliche Strukturen mit dem typischen 2 Nukleotid großen 3'- Überhängen und der Haarnadel (*orange*) synthetisiert. Der DICER erkennt diese Strukturen und spaltet die shRNA in der Haarnadel, wodurch die typischen siRNAs mit den jeweils 2 nt großen 3'-Überhängen entstehen. Der RISC-Komplex bindet diese siRNAs und löst nach der Degradierung des sense-siRNA-Stranges den als RNAi bekannten Abbau von komplementären NF90-mRNAs aus.

Nach dem die Zellen in den 10 cm-Schalen einen 80% konfluenten Zellrasen gebildet hatten, wurden sie mit ATV gewaschen, abgelöst und die eGFP-positiven Zellen von den nicht eGFP-positiven am Zellsorter getrennt (mit freundlicher Unterstützung von Christian Linden im eigenen Hause durchgeführt). Es folgte zur weiteren Kultivierung eine Überführung der nun durchgehend eGFP-positiven Zellen in kleine (20 cm²), später aber in mittlere (70 cm²) Zellkulturflaschen (siehe 2.4.1). Zur Kontrolle einer erfolgreichen Runterregulierung der NF90 Expression wurde ein Teil der Zellen lysiert (siehe 2.4.6) und die Menge an NF90 im Western Blot (siehe 2.5.2) mit NF90-pezifischen Antikörpern (siehe 2.1.6; α -DRBP76) im Vergleich zu normalen Zellen quantifiziert.

2.8 Analyse der Integrationssequenzen

2.8.1 Überprüfung der Integrationssequenzen

Nach der Sequenzierung der mittels inverser PCR generierten und in den pCRII-TOPO Vektor klonierten RIS, wurden die Sequenzen nach folgenden Auswahlkriterien überprüft. Zunächst wurde kontrolliert, ob die für die jeweiligen untersuchten Retroviren typischen Enden der 5`LTR vorhanden waren. Danach wurde untersucht, ob die erste zur Zerkleinerung der genomischen DNA verwendete Restriktionsschnittstelle, die nach der 5`LTR-Sequenz folgte, mindestens 25 bp entfernt lag. Im Falle der PFV- und HIV-1-Integrationssequenzen wurde die erste *HaeIII*-(GGCC) oder im Falle der MLV-Integrationssequenzen die *NlaIII*-Schnittstelle gesucht. Nun wurden die ersten 10 Basen nach dem Ende der 5`LTR in einer Tabelle erfasst und multiple Integrationssequenzen, die exakt die gleiche Sequenz enthielten, markiert. Bei solchen Sequenzen ist es sehr unwahrscheinlich, dass sie genau die identische Integrationsstelle repräsentieren. Vielmehr handelt es sich hier um bestimmte Fragmente, die als Folge der PCR in dem Gemisch an amplifizierten Fragmenten überrepräsentiert sind und so auch in mehreren untersuchten Klonen nach der TOPO-Ligation zu finden sind. Diese multiple Sequenzen wurden in der Auswertung als eine Integrationssequenz angesehen. Für die Lokalisation der RIS im humanen Genom und der bioinformatischen Auswertung wurde nur der zelluläre Anteil der Sequenzen, beginnend mit der ersten nach dem Ende der 5`LTR befindlichen Base und endend nach der ersten *HaeIII*- oder *NlaIII*-Schnittstelle, verwendet.

2.8.2 Bioinformatische Methoden

Zur Lokalisation der Integrationsstellen im humanen Genom wurden die zuvor nach bestimmten Auswahlkriterien ausgewerteten zellulären Sequenzen (siehe 2.8.1) durch weitere bioinformatische und statistische Analysen mit freundlicher Unterstützung von Marcus Dittrich und Prof. Dr. Thomas Dandekar am Lehrstuhl für Bioinformatik der Universität Würzburg ausgewertet. Die chromosomale Lokalisation der Integrationsstellen wurde mit dem „May 2004 freeze“ der humanen Sequenz (NCBI35) des „International Human genome sequencing Consortium“ mit Hilfe des BLAT-Algorithmus (Kent et al., 2002) erstellt. Hierbei wurden nur chromosomale Treffer als gültig angesehen

und zu weiteren Analysen verwendet, welche mit der ersten nach der 5`LTR folgenden zellulären Base begannen und deren Homologien >95% betragen. Der RefSeq-Gen-Katalog sowie die CpG-Island-Annotationen wurden von dem UCSC ftp server (<ftp://hgdownload.cse.ucsc.edu>) bezogen. Als Kontrolle für die Signifikanz von Präferenzen oder fehlende Präferenzen für bestimmte Regionen der chromosomalen DNA wurden alle ermittelten Retrovirus-spezifischen Integrationsmuster mit einem Integrationsmuster verglichen, welches nach einem Zufallsprinzip generiert wurden. Hierfür wurden 10 000 Integrationssequenzen nach dem Zufallsprinzip mittels einer Computer-Simulation erstellt, die auf die gleiche Weise wie die RIS ausgewertet wurden. Zusätzlich unterliefen alle Analysen einem χ^2 -Test um die statistische Signifikanz der Ergebnisse zu untersuchen.

Zur Untersuchungen der spezifischen Nukleotid-Präferenzen an retroviralen Integrationsstellen wurden 1000 der den RIS flankierenden Nukleotidsäuren untersucht. Nach der Methode von Wu et al., 2005 und Holman & Coffin 2005 wurde für jede Position die Häufigkeit für das Vorkommen bestimmter Nuekleotidsäuren statistisch ermittelt und mit der allgemeinen Verteilung aller vier Nukleotidbasen im humanen Genom verglichen. Signifikante Abweichungen von der allgemeinen Verteilung der Basen wurden durch einem χ^2 -Test bestätigt.

Für die Analyse der PFV-Integrationsereignisse in Proto-Onkogene oder zur Untersuchung der Distanz der Integrationsstellen zu bekannten Proto-Onkogenen wurde die „Cancer Gene Census“-Datenbank des Sanger Instituts verwendet. Diese Datenbank enthält insgesamt die spezifischen Daten von 346 potentiellen Oncogenen. Über die LocusLink-oder Entrez Gene-Erkennungsnummer musste die chromosomale Lokalisation der Oncogene ermittelt werden, so dass für jede PFV-Integrationssequenz die Distanz und die relative Orientierung zum am nächsten liegenden Onkogen festgehalten werden konnte.

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung der retroviralen Integrationsstellen (RIS)

Zur Analyse des Integrationsmusters von auf Foamyvirus basierten Vektoren musste, um eine statistisch relevante Aussage treffen zu können, eine ausreichende Anzahl an integrierten proviralen Sequenzen kloniert werden. Diese müssen den zur LTR flankierenden zellulären Sequenzanteil besitzen, welcher nach der Sequenzierung eine Lokalisation der RIS im humanen Genom erlaubt. Zusätzlich sollten die Integrationsstellen (IS) zweier weiterer Retroviren (HIV-1 und MLV), von denen das Integrationsmuster bereits zu Beginn dieser Studie bekannt war (Mitchell et al., 2004; Schröder et al., 2002; Wu et al., 2003), als Kontrolle für das Testsystem mitanalysiert werden.

Hierfür wurde eine Methode basierend auf der in Kapitel 2.6.4 beschriebenen inverse PCR (siehe Abb. 10) zur effizienten Klonierung der retroviralen Integrationsstellen etabliert. Im Folgenden wird das experimentelle Modell kurz zusammengefasst. Zunächst wurden, wie in Abb. 13 schematisch zusammengefasst ist, die retroviralen Vektorpartikel mittels Transfektion von 293T-Zellen generiert und in vier unabhängigen Ansätzen mit einer MOI von eins oder weniger auf 2×10^5 in 6-well-Zellkulturplatten ausgesät. 293-Zellen gegeben. 48h nach der Transduktion folgte zur Bestimmung der Transduktionseffizienz mit etwa ein Viertel der Zellen aus allen vier Ansätzen eine FACS-Analyse, während der andere Teil in mittlere Zellkulturplatten überführt noch weitere vier bis fünf Tage bis zur Isolation der genomischen DNA expandiert wurde. Nach der Isolation der genomischen DNA folgte die inverse PCR zur Amplifikation von integrierten proviralen Sequenzen mit zellulärem Übergang. Um möglichst viele IS in dem polyklonalen PCR-Gemisch unterscheiden zu können folgte eine Ligation der Amplifikate aus der ersten PCR-Reaktion (30 Zyklen) aller Ansätze in den pCRII-TOPO Vektor, gefolgt von einer Transformation in *E.coli* TOP10- oder DH5 α -kompetente Bakterien. Aus den fünf unabhängigen PCR-Ansätzen wurden nach der TA-Klonierung die Klone mit proviralen zellulären Übergängen im Anschluss mittels Restriktionsverdau der Minipräparationen identifiziert und je nach Orientierung im Vektor von der LTR-Seite aus sequenziert. Der humane zelluläre Anteil der klonierten RIS wurde anschließend für die

Analyse des Integrationsmusters im humanen Genom lokalisiert und statistisch ausgewertet.

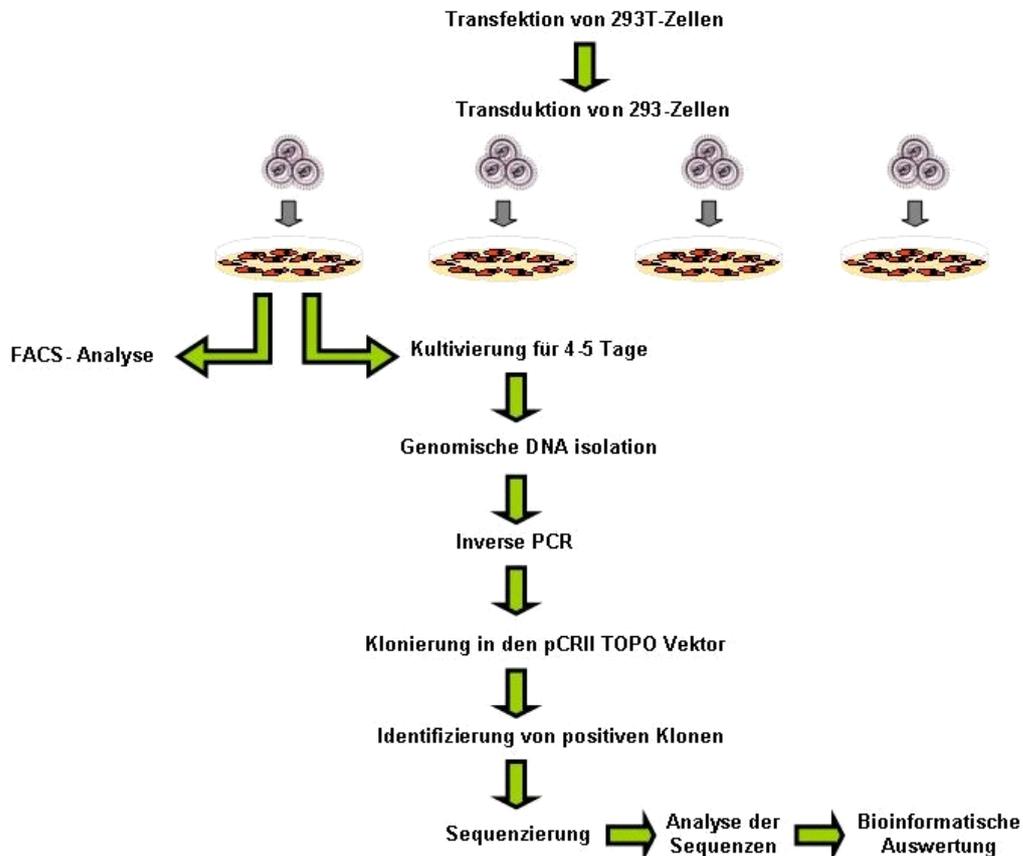


Abb. 13: Experimentelles Modell zur Klonierung und Analyse von retroviralen Integrationsstellen

Dargestellt ist schematisch das experimentelle Modell zur Generierung von retroviralen Integrationsstellen (RIS). Die Produktion von retroviralen Vektoren erfolgte durch die Transfektion von 293T-Zellen. Für jedes Virus wurden 293-Zellen in jeweils 4 verschiedenen Ansätzen mit den Viruspartikeln transduziert. Die MOI betrug 1 oder weniger und wurde mit ein Viertel der Zellen aus jedem Ansatz mittels FACS-Analyse bestätigt. Der andere Teil der Zellen wurde für vier bis fünf Tage in mittleren Zellkulturflaschen weiter kultiviert, bis die genomische DNA aller vier Ansätze isoliert wurde. Es folgte eine inverse PCR zur Klonierung der RIS, die wiederum in den pCRII-TOPO-Vektor ligiert wurden. Nach der Transformation in kompetente *E. coli*-Bakterien wurden für jeden der vier Ansätze 10 bis 15 Klone mittels Mini-Präparation durch Restriktionsverdau mit EcoRV (PFV) oder EcoRI (MLV und HIV-1) untersucht und die positiven Klone, welche retrovirale Integrationssequenzen enthielten, je nach Orientierung des Inserts mit pCRII spezifischen Primern sequenziert. Nach der Analyse der Sequenzen folgte die Lokalisation der Integrationsstellen im humanen Genom und die bioinformatische Auswertung der Daten.

3.1.1 Retrovirale Vektoren und Transduktion von Zielzellen

Für die Klonierung und Analyse von integrierten proviralen Sequenzen, wurde die humane 293-Zelllinie mit PFV-, HIV-1 und MLV-basierenden Vektoren (siehe Abb. 14) nach der in Kapitel 2.6 beschriebenen Methoden transduziert. Die Produktion der hierfür benötigten retroviralen Viruspartikel erfolgte durch eine Calciumphosphat-Transfektion von 293T-Zellen. Nach Kotransfektion der Zellen mit den Komponenten der Vektorsysteme wurde nach 24h mit Natriumbutyrat induziert und nach 48h die Viruspartikel aus dem zellfreien Überstand geerntet. Der Überstand wurde nicht eingefroren, sondern in unterschiedlichen Mengen direkt auf 2×10^5 zuvor (ca. 2h) ausgesäte 293-Zellen gegeben. Um für die Analyse des PFV-Integrationsmusters eine ausreichende Anzahl an polyklonalen Integrationsstellen zu erlangen, wurden vier unabhängige Ansätze transduziert (siehe Abb. 13 & Tab. 5; Anatz 2-5). Zusätzlich musste sichergestellt werden, dass bei der Klonierung der RIS mittels inverse PCR keine endogenen humanen Sequenzen durch die spezifischen Primer amplifiziert werden und dass keine Plasmid-Kontaminationen vorhanden waren. Deshalb wurde eine Negativkontrolle mitgeführt in der der Vektor durch das nicht integrationsfähige pcDNAneo-Plasmid ersetzt wurde (siehe siehe Tab. 5; Anatz 1). Nach 48h Stunden folgte zur Ermittlung der Transduktionseffizienz eine FACS-Analyse (siehe Tab. 5) mit ca. ein viertel der Zellen, während der Rest in mittlere (70 cm^2) Zellkulturflaschen überführt und noch weiter vier bis fünf Tage, bis zur Isolation der genomischen DNA, kultiviert wurde (vgl. Abb. 13). Die große Deletion in pMH124 (siehe Abb. 14) inhibiert die bei Foamyviren vorkommende intrazelluläre Retrotransposition (IRT), da von diesem Vektor kein funktionelles FV-Gag- und Pol- Protein expremiert wird und folglich auch keine IRT stattfinden kann (Heinkelein et al., 2000a).

Der Grund für die zusätzliche Analyse des PFV-Integrationsmusters mit einem solchen nicht zur IRT fähigen PFV-Vektors lag in der Überlegung, dass, obwohl durch die Abwesenheit des PFV-Transaktivators Tas bei FV keine Transkription von den LTRs aus stattfinden kann, es nicht ausgeschlossen werden konnte, dass nach der Integration des Vektors in der Nähe von humanen Transkriptionseinheiten eine IRT von PFV-basierten Vektoren, welche eine vollständiges *gag*- und *pol*-Gen kodieren, stattfinden könnte. Die Einflüsse einer, wenn auch nur hypothetisch möglichen, durch humane Transkriptionseinheiten ausgelöste IRT auf das Integrationsmuster von FV war nicht bekannt und sollte deshalb berücksichtigt werden

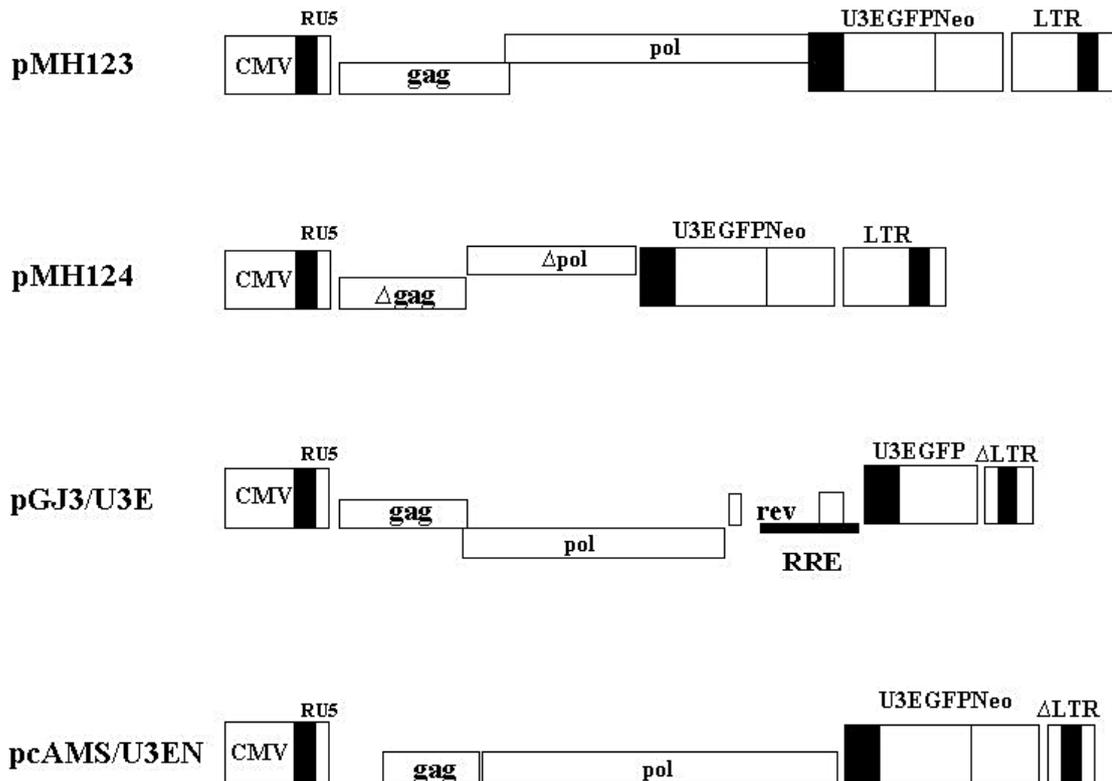


Abb. 14: Darstellung der retroviralen Vektoren

Alle retrovirale Vektoren, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind replikationsinkompetent. Bis auf pMH124 besitzen alle Vektoren die zur Integration notwendigen LTRs sowie die *gag*- und *pol*-Gene in voller Länge. pMH124 wurde in *gag* und *pol* (Δgag und Δpol) deletiert und ist aufgrund dessen nicht zur intrazellulären Retrotransposition fähig (siehe Text). Alle Vektoren enthalten eine interne Markergen-Kassette, die die Expression eines eGFP-Neo-Fusionsproteins oder nur eGFP (siehe pGJ3/U3E) durch den konstitutiv aktiven U3-Promotor (SFFV U3) erlaubt. Alle LTRs sind entweder wie bei pGJ3/U3E und pcAMS/U3EN durch eine Deletion in der U3-Region (ΔLTR) oder wie im Falle von pMH123 und pMH124 durch die Abwesenheit des FV Transaktivator Gens (*tas*) nicht aktiv. Die initiale Transkription der Vektoren wird nach der Transfektion von 293T-Zellen durch den CMV (humane cytomegalovirus enhancer / promotor) getrieben. pGJ3/U3E und pcAMS/U3EN wurden durch die Kotransfektion mit pczVSV-G mit dem VSV-Glycoprotein pseudotypisiert, während die Typisierung bei pMH123 und pMH124 durch pCenv1 mit den PFV-Glycoproteinen erfolgte. pCgp1 wurde als zusätzliches Verpackungsplasmid mit pMH124 kotransfiziert (siehe 2.6.1); RU5: RU5-Region der 5'LTR; RRE: *rev* responsive element; *rev*: HIV *rev* Gen.

Bei der Analyse der Integrationsmuster konnten jedoch keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen beiden Vektoren festgestellt werden, so dass im Weiteren die Datensätze zusammen ausgewertet wurden. Im Folgenden werden die Datensätze, welche mit dem zur IRT nicht fähigen pMH124-Vektor generiert wurden als PFV/pMH124 und die mit dem zur IRT fähigen pMH123-Vektor als PFV/pMH123 bezeichnet.

Wie in Tab. 5 zu sehen ist, waren die Virustiter der verschiedenen Vektorsysteme nicht gleich. pMH124 erreichte bei der Zugabe der gleichen Mengen an Virusüberstand nur ca. 1/3 der Transduktionseffizienz von pMH123, während pcAMS/U3EN noch geringere Titer aufwies und im FACS eine durchschnittliche Transduktionsrate von 9 % erzielte. pMH123 und pGJ3/U3E

zeigten die höchsten Transduktionsraten und erreichten nahezu eine MOI 1. Die Berechnung der MOI erfolgte nach dem in Kapitel 2.6.3 beschriebenen mathematischen Modell.

Bevor die inverse PCR und die dafür nötigen Vorschriften durchgeführt werden konnten, musste die genomische DNA isoliert und vermessen werden. Deren Konzentration ist ebenfalls in Tab. 5 zusammengefasst.

Tab. 5: Transduktionseffizienz der retroviralen Vektoren

PFV/pMH123

Ansatz	Neg. Kontrolle	2	3	4	5
Überstand Volumen (ml)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Transduktion (%)	0	31	40	29	33
MOI	0	0,8	1,0	0,7	0,8
Konz isolierte genomische DNA (µg/µl)	0,8	1,1	1,4	0,6	0,9

PFV/pMH124

Ansatz	Neg. Kontrolle	2	3	4	5
Überstand Volumen (ml)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Transduktion (%)	0	20,3	17,3	14,3	16,7
MOI	0	0,4	0,4	0,3	0,4
Konz isolierte genomische DNA (µg/µl)	1,1	0,8	0,9	0,9	1,1

HIV-1

Ansatz	Neg. Kontrolle	2	3	4	5
Überstand Volumen (ml)	2,0	3,0	3,0	3,0	2,0
Transduktion (%)	0	37,7	43,0	50,6	64
MOI	0	0,7	0,8	0,9	1,0
Konz isolierte genomische DNA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	0,9	0,8	0,4	0,6	0,6

MLV

Ansatz	Neg. Kontrolle	2	3	4	5
Überstand Volumen (ml)	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Transduktion (%)	0	11,0	8,0	7,0	10,0
MOI	0	0,2	0,2	0,2	0,2
Konz isolierte genomische DNA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	1,4	1,1	2,0	3,6	2,6

3.1.2 Inverse PCR zur Klonierung von foamyviralen Integrationsstellen

Nach der Isolierung und Vermessung der genomischen DNA wurden nach der in Kapitel 2.6.4 beschriebenen Methode die RIS mittels inverse PCR kloniert. Wie schon in Kapitel 3.1 erwähnt sollte die PCR für eine möglichst polyklonale Zusammensetzung der amplifizierten RIS sorgen. Es galt eine minimale, aber für die Klonierung ausreichende Zyklenzahl festzulegen und die Generierung von so genannten „multiplen Sequenzen“ so gering wie möglich zu halten. Deshalb wurden hierfür zunächst die optimalen PCR Bedingungen festgelegt. Wie in Tab. 6 zusammengefasst wurden PFV-Integrationsstellen

(PFV-IS) mit einer nested-PCR in jeweils 25 Zyklen und eine in jeweils 30 Zyklen amplifiziert. Die Produkte jedes PCR-Schritts wurden nach dem in Abb. 13 dargestellten Verfahren kloniert und aus jeder PCR-Reaktion nach der Sequenzierung der RIS die Ausbeute an erhaltenen polyklonalen retroviralen Integrationsstellen miteinander verglichen (siehe Tab. 6) Entscheidendes Kriterium für die Wahl der Amplifikate aus der 1.PCR (30 Zyklen) zur weiteren Klonierung war die Beobachtung, dass diese PCR-Bedingungen die best mögliche Ausbeute an polyklonalen Sequenzen mit proviralen zellulären Übergang lieferten (siehe Tab. 6). Eine nested PCR erhöhte zwar die Ausbeute der positiven *E-coli*-Klone (vgl. Tab. 6: 2. PCR 25 & 30 Zyklen) minderte jedoch die polyklonale Zusammensetzung. In den untersuchten Klonen wurden unter diesen Bedingungen häufig auftretende identische Sequenzen (multiple Sequenzen) gefunden, da bestimmte Amplifikate aufgrund einer effizienteren Amplifizierung während der PCR im Gemisch im Überschuss vorhanden sind, so dass sie bevorzugt in den Vektor ligieren und deshalb auch bevorzugt in den untersuchten Klonen zu finden sind.

Die Resultate der inverse PCR sind nachdem die Produkte der 1. und 2. PCR auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen wurden, in Abb. 15 für jeden Vektor, welcher in dieser Studie verwendet wurde, wiedergegeben. Obwohl die 2. PCR nicht zur Klonierung der RIS diente, wurde sie trotzdem zur Detektion von möglichen Plasmid-Kontaminationen, welche nur nach einer 2. PCR im Agarosegel erkennbar waren, durchgeführt.

Tab. 6: Ausbeute an klonierten retroviralen Integrationsstellen (RIS) unter verschiedenen PCR-Bedingungen

PCR	Positive <i>E-coli</i> Klone	Klone mit RIS
25 Zyklen 1.PCR	61% (27/44)	29% (13/44)
25 Zyklen 2.PCR	78% (11/14)	64% (9/14)
30 Zyklen 1.PCR	70% (115/162)	56% (91/162)
30 Zyklen 2.PCR	85% (36/42)	54% (23/42)

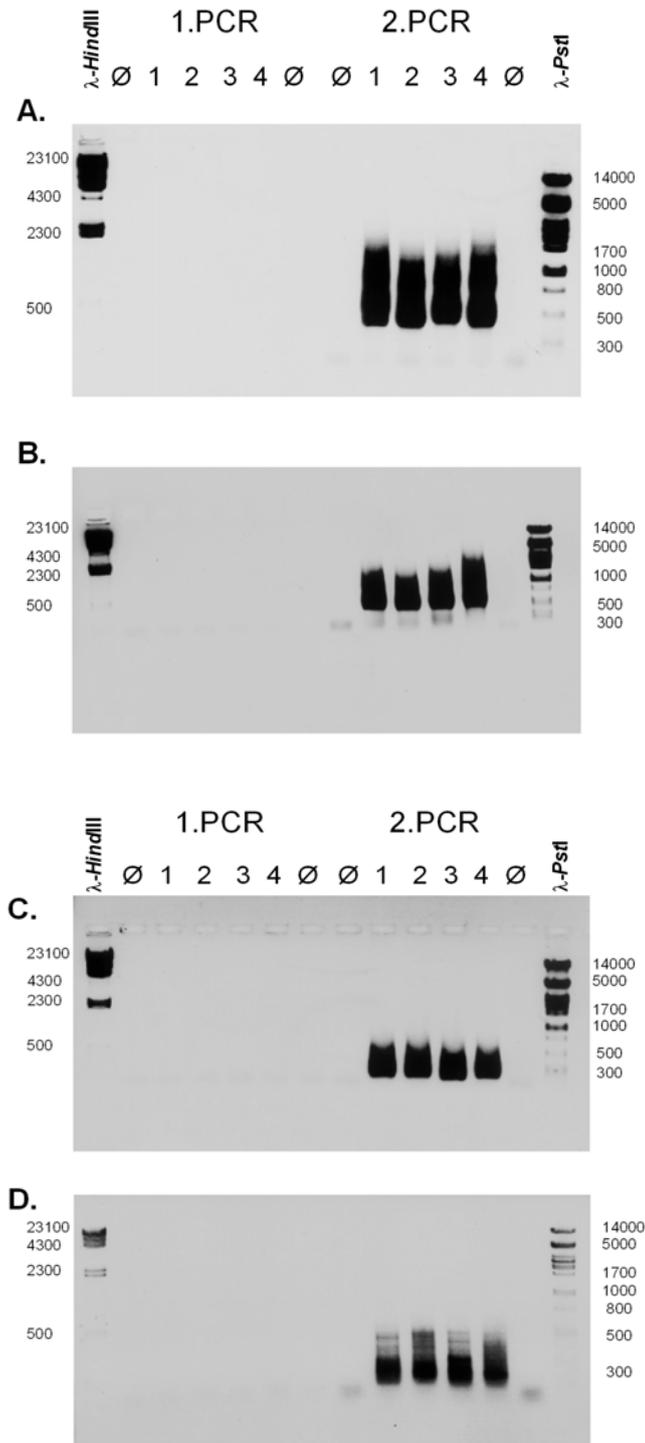


Abb. 15: Nested PCR zur Klonierung der RIS

Dargestellt sind, exemplarisch für jeden Vektor, die auf ein Agarosegel aufgetragenen Amplifikate der zur Klonierung von RIS durchgeführten nested PCR, wobei nur die Produkte der 1.PCR verwendet wurden (siehe Text für Details). Für jeden Vektor (A: pMH123; B: pMH124; C: pcAMS/U3EN; D: pGJ3/U3E) sind jeweils 10 μ l der 1. und 2. PCR aus den vier (Spur 1-4) unabhängig durchgeführten Ansätzen (siehe Abb. 13) zusammen mit zwei Negativkontrollen (\emptyset) auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Als Größenmarker sind λ HindIII und λ PstI aufgetragen.

Wie in Abb. 15 zu erkennen reicht die Sensivität der 1. PCR, obwohl zur weiteren Klonierung verwendet, nicht für eine Visualisierung der amplifizierten RIS auf Agarosegelen aus, so dass nur zur Kontrolle für eine erfolgreiche Amplifikation der RIS die 2. PCR durchgeführt wurde. Charakteristisch für das Bandenmuster nach der 2. PCR sind die in der Größenordnung von 200-1000 bp entstehenden schmierig aussehenden DNA-Banden (siehe Abb. 15, 2. PCR: Spur 1-4), die sehr wahrscheinlich durch die unterschiedlichen Größen der in den klonierten RIS enthaltenen zellulären Sequenzen hervorgerufen werden (siehe Abb. 16). Auffallend ist, dass die amplifizierten PFV-IS im Durchschnitt größer waren als die HIV-1- und MLV-IS (vgl. Abb. 15: A/B mit C/D).

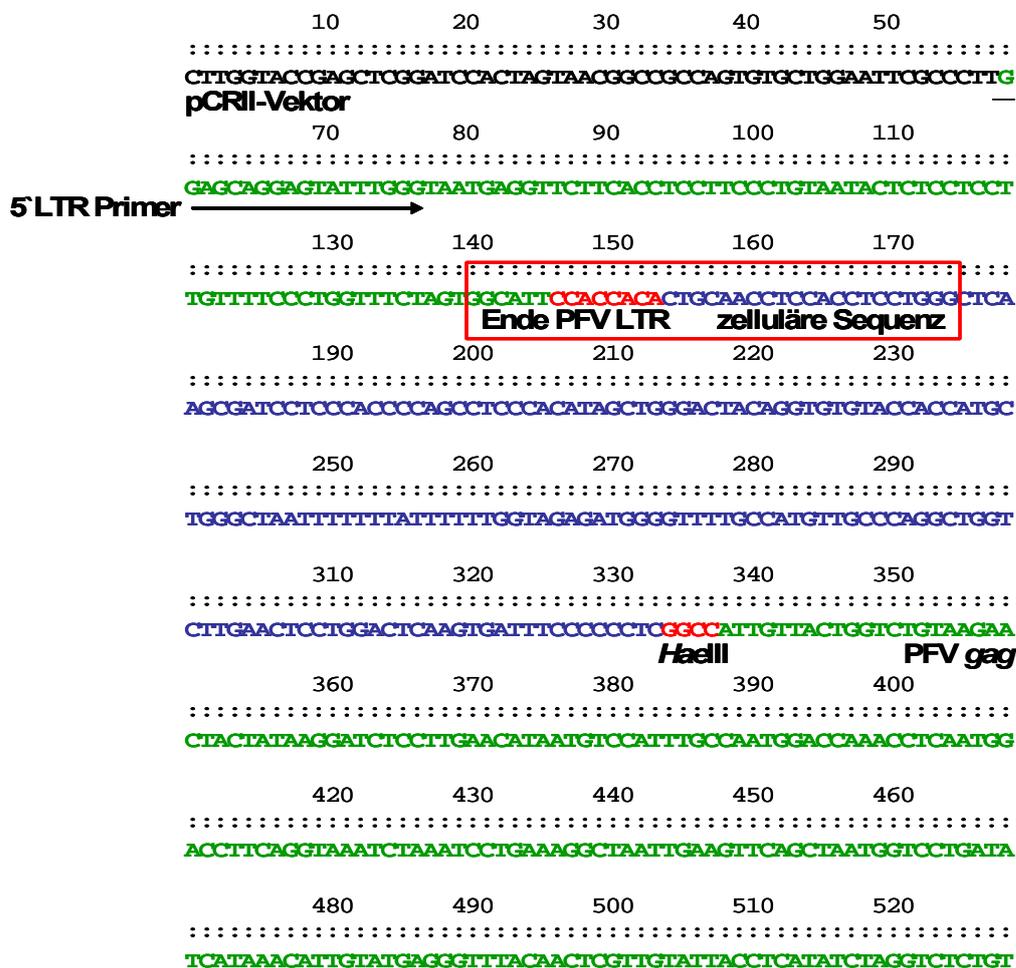


Abb. 16: Sequenzierung im pCRII-TOPO-Vektor

Sequenzierung der pCRII-TOPO-Plasmide mit ligierten PFV-IS, schwarze Basen: pCRII-TOPO-Sequenz; grüne Basen: PFV-Sequenz; rote Basen: Ende der 5'LTR und *HaellI*-Schnittstelle; rote Box: proviral-zellulärer Übergang.

Dieser Unterschied ist dadurch zu erklären, dass unter Berücksichtigung der Distanz der Primer-Bindungsstellen zu den Schnittstellen der zur Fragmentierung verwendeten Enzyme im Vektor (siehe 2.6.4), welche im PFV-Vektor entfernter lagen als bei den HIV-1- und MLV-Vektoren, unterschiedliche mittlere Größen der Amplifikate zu erwarten waren. Rechnerisch wäre bei der Klonierung der PFV-IS, nach Addierung der zu erwarteten Größe der zellulären Sequenz (ca 250 bp) eine mittlere Bandengröße von 600 bp zu erwarten, während bei den MLV- und HIV-1-IS eine mittlere Bandengröße von ca. 300 bp zu erwarten war (vgl Abb. 15; A und B mit C und D).

Die auf diese Weise klonierten RIS wurden zur Sequenzierung in den pCRII-TOPO Vektor ligiert und je nach Orientierung des Inserts mit den im TOPO-TA-Cloning-Kit enthaltenen Primern sequenziert. Die Resultate solch einer Sequenzierung sind in Abb. 16 exemplarisch für die PFV-IS wiedergegeben. Für die Auswertung wurden nur Sequenzen verwendet, die die 5'LTR-Sequenz mit den charakteristischen Enden und den Übergang in die zelluläre Sequenz, welche mit der ersten *HaeIII* (bei PFV und HIV-1) oder *NlaIII* (bei MLV) -Schnittstelle endete, besitzen. Idealerweise sollte die terminierende Restriktionsschnittstelle als Folge der inversen PCR in die viralen *gag* Sequenz übergehen (siehe Abb. 16). In wenigen Fällen folgten nach der ersten *HaeIII*- oder *NlaIII*-Schnittstelle der zellulären Sequenz nicht wie erwartet die viralen *gag* Sequenzen, sondern weitere Basenfolgen humanen Ursprungs. Hierbei handelt es sich entweder um sehr große Fragmente, die das Resultat eines unvollständigen Verdau sein könnten oder um nach dem Verdau entstehende rein zelluläre Fragmente (siehe Abb. 10), welche sich im Zuge der Ligation zwischen die zelluläre und die virale *gag* Sequenz eingeschoben haben.

Tab. 7: Anzahl der in dieser Arbeit generierten Klone mit proviralen-zellulären Übergängen

Virus	Mini- Präparation	Positive Minis	Multiple Sequenzen	Einzigartige RIS
PFV (pMH123)	720	597	200	397
PFV (pMH124)	650	575	202	373
MLV	300	244	69	175
HIV-1	140	111	8	103

Zur Auswertung wurde in solchen Fällen nur die zelluläre Sequenz, welche den wahren proviralen zellulären Übergang enthielt, bis zur ersten *Ha*ellI- oder *Not*I-Schnittstelle verwendet. Zur Beseitigung der im Zuge der PCR entstandenen multiplen Sequenzen wurden die zellulären Komponenten der RIS tabellarisch erfasst und die mehrmals vorkommenden exakt identischen Sequenzen aussortiert. Die Anzahl der in dieser Studie generierten einzigartigen RIS sind in Tab. 7 zusammen mit der Ausbeute an positiven Minipräparationen und der nach der Sequenzierung aussortierten multiplen Sequenzen dargestellt.

3.2 Das Integrationsmuster von Foamyviren

3.2.1 Chromosomale Lokalisation der PFV Integrationsstellen (PFV IS) im humanen Genom

Nach der Klonierung und Sequenzierung der PFV-, MLV- und HIV-1-Integrationsstellen wurden die multiplen Sequenzen aussortiert und die restlichen zur 5`LTR flankierenden zellulären Sequenzen mit dem „May 2004 freeze“ der humanen Sequenz (NCBI35) des „International Human genome sequencing Consortium“ mit Hilfe des BLAT Algorithmus (Kent et al., 2002) chromosomal lokalisiert. Es wurden nur chromosomale Treffer als gültig angesehen und zu weiteren Analysen verwendet, welche mit der ersten nach der 5`LTR folgenden zellulären Base begannen und deren Homologien >95% betrugten. Wie in Tab. 8 zusammengefasst ist, konnten ca. 80% der klonierten RIS im humanen Genom lokalisiert werden. Die restlichen Sequenzen waren entweder zu kurz oder erfüllten nicht die angeforderten Auswahlkriterien. Die Sequenzen aller im humanen Genom lokalisierten RIS sind in der NCBI-Datenbank gespeichert (siehe 6.3; Tab. 13)

Um Aussagen über die Signifikanz bestimmter Integrationsmuster treffen zu können, wurden zusätzlich 10 000 Integrationsstellen, welche mit Hilfe einer dem Zufallsprinzip folgenden Computer-Simulation erstellt wurden, auf die gleiche Weise wie die RIS untersucht. Einfachheitshalber wird dieser Datensatz in den folgenden Kapiteln als „IS-random“ bezeichnet.

Tab. 8: Anzahl an in dieser Arbeit untersuchten retroviralen Integrationsstellen

Auf Virus basierter Vektor	Anzahl an klonierten Integrationsstellen	Im humanen Genom lokalisierte Integrationsstellen	Nicht lokalisierte Integrationsstellen	Ausbeute %
PFV (MH123)	397	329	68	82.9
PFV (MH124)	373	299	74	80.2
MLV (pcAMS/U3E)	175	141	34	80.6
HIV-1 (pGJ3/U3E)	103	87	16	84.5

Wie in Abb. 17 B dargestellt ist, konnten bei PFV keine Vorlieben für die Integration in bestimmte Chromosomen festgestellt werden. Diese Aussage konnte nach einer Normalisierung der Integrationsfrequenzen der klonierten RIS, in einzelnen humane Chromosomen, auf die mittels den IS-random Datensatz erwartete zufällige Integrationsfrequenz in einzelne Chromosomen getroffen werden. Die Ermittlung der IS-random-Daten erfolgte unter Berücksichtigung der Chromosomengröße und der Annahme, dass jede Position entlang der Chromosomen mit der gleichen Wahrscheinlichkeit Ort der Integration sein kann (siehe Abb. 17 B). HIV-1-basierte Vektoren zeigen dagegen im Einklang mit Resultaten aus anderen Studien (Mitchell et al., 2004) eine statistisch signifikant hohe Integrationsfrequenz in die Chromosomen 16, 17, 19 und 22, und MLV-basierte Vektoren in Chromosom 17 (vgl. Abb. 17 B). Weiterhin fällt auf, dass die Verteilung der PFV-IS entlang der Chromosomen nicht gleichmäßig verläuft. Vielmehr ist, wie auch schon in anderen Studien berichtet wurde (Schröder et al., 2002; Trobridge et al., 2006), eine Anhäufung von PFV-IS in bestimmten chromosomalen Bereichen sowie eine Vermeidung bestimmter Regionen zu beobachten (siehe Abb. 17 A). Mögliche Gründe für diese Unterschiede werden in der Diskussion geliefert.

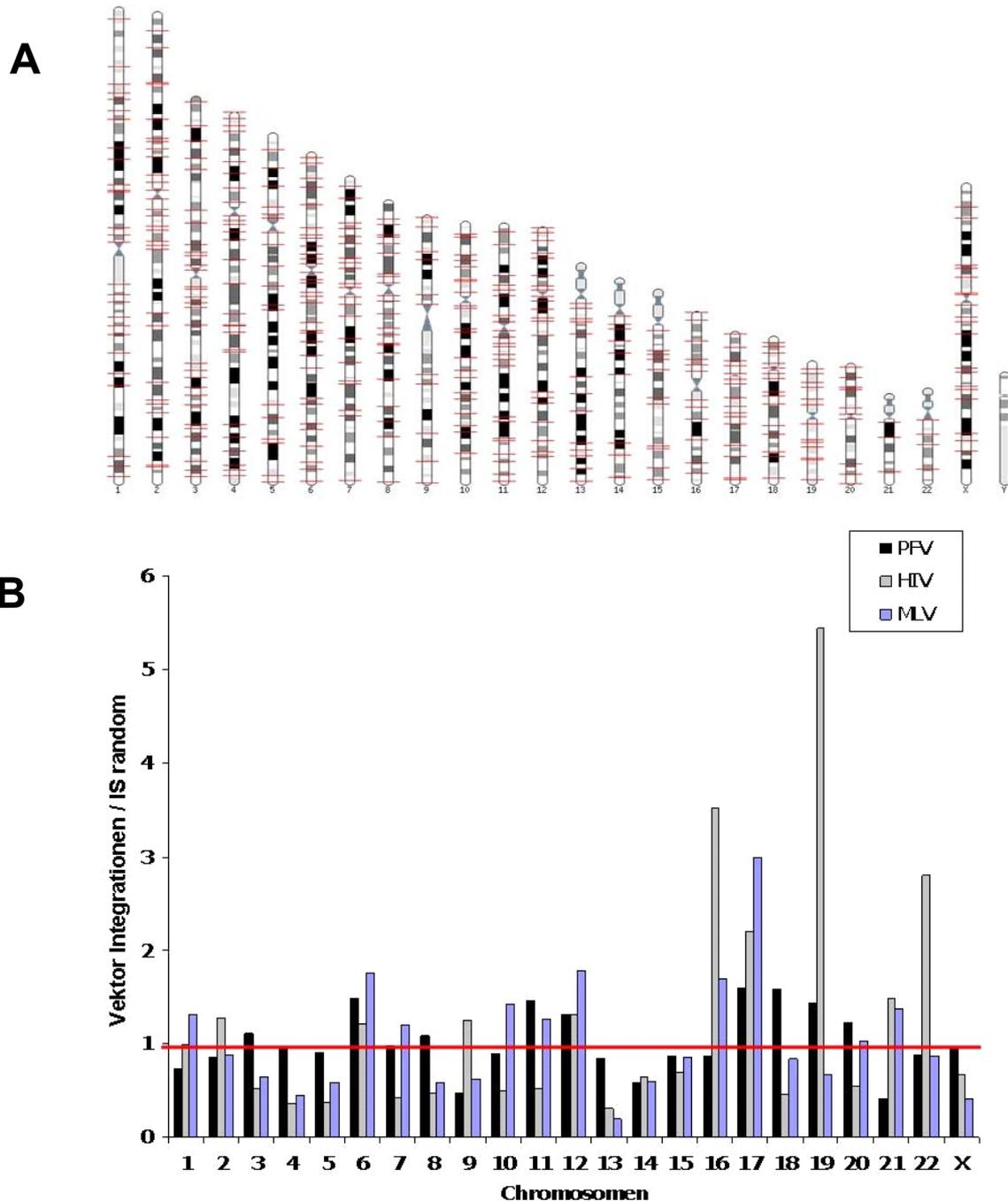


Abb. 17: Chromosomale Verteilung der retroviralen Integrationsstellen

(A) In dieser Abbildung wird die chromosomale Verteilung der PFV-Integrationsstellen (*rote Linien*) entlang der individuellen Chromosomen dargestellt. Die Abwesenheit an Integrationen in dem Y-Chromosom liegt im weiblichen Ursprung der in dieser Arbeit verwendeten 293-Zelllinie (Graham et al., 1977). (B) Dargestellt ist die Integrationsfrequenz der PFV-, HIV-1- und MLV-Vektoren in einzelne humane Chromosomen. Die Y-Achse stellt den Quotienten aus tatsächlich ermittelten Treffern und den IS-random-Wert (siehe Text) dar. Die rote Linie bei 1 markiert den Wert, bei dem die tatsächlich beobachtete Integrationsfrequenz der Vektoren dem mittels Computer-Simulation ermittelten Zufallswert gleicht. Das heißt, dass ein Wert >1 für eine Bevorzugung der Integration steht, während ein Wert < 1 für eine Vermeidung der Integration steht.

3.2.2 Die Integrationsfrequenz in transkribierte Regionen

Transkribierte Regionen repräsentieren etwa 1/3 (33%) des humanen Genoms (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001). Entgegen der Annahme, dass die retrovirale Integration nach dem Zufallsprinzip erfolgt, so dass eine Integration in transkribierende Regionen mit einer Wahrscheinlichkeit von ca 30% stattfinden sollte, konnte in mehreren unabhängigen Studien gezeigt werden, dass solche Regionen von Lentiviren so wie HIV-1 oder SIV bevorzugt werden. In der ersten Studie von Schröder et al., 2002, in der dieser Aspekt der Integration für Wildtyp HIV-1 und HIV-1-basierten Vektoren untersucht wurde, befanden sich 69 % der 524 untersuchten HIV-1 Integrationsstellen in transkribierenden Bereichen. Diese Tendenz zur bevorzugten Integration in transkribierte Regionen wurde in der Arbeit von Wu et al., 2003, in der 379 HIV-1- und 903 MLV-Integrationsstellen miteinander verglichen wurden, bestätigt. In dieser Studie analysierten die Autoren die Integrationshäufigkeit von HIV-1 und MLV in so genannte RefSeq-Gene mit dem Ergebnis, dass 58% aller untersuchten HIV-1- und 34% der MLV-Integrationen in diese Bereiche fielen.

Tab. 9: Integration in RefSeq Gene

Virus	Vektor	Integration in RefSeq Gene (%)	χ^2 -Test
PFV	pMH123	27,36	0.117378
PFV	pMH124	27,42	0.142372
HIV-1	pGJ3/U3E	55,17	0.000002
MLV	pcAMS/U3E	41,13	0.012369
PFV (gesamt)	pMH123 + pMH124	27,39	0.031902
IS random	Computer-Simulation	30,99	0.446775

Als RefSeq Gene bezeichnet man alle in der Reference Sequenz (RefSeq)-Datenbank gesammelten Gene, welche auf der Basis von bekannten mRNAs charakterisiert sind (Pruitt et al., 2000; Pruitt et al., 2005).

Die Präferenzen von PFV-basierten Vektoren, in transkribierte Regionen zu integrieren wurden anhand der klonierten PFV-IS untersucht. Hierfür wurde der RefSeq-Genkatalog von dem UCSC ftp server (<ftp://hgdownload.cse.ucsc.edu>) bezogen. Die Position der dort enthaltenen Gene wurde zunächst im humanen Genom lokalisiert und alle Integrationsereignisse, welche zwischen dem Transkriptionsstart und Transkriptionsende der RefSeq-Gene lagen, gezählt. Zusätzlich wurden um einen Vergleichswert zu erhalten, der bei einer zufälligen Integration in die RefSeq Gene zu erwarten wäre, die mittels Computer-Simulation generierten 10 000 Zufälligen Integrationsstellen (IS-random) auf gleiche Weise analysiert.

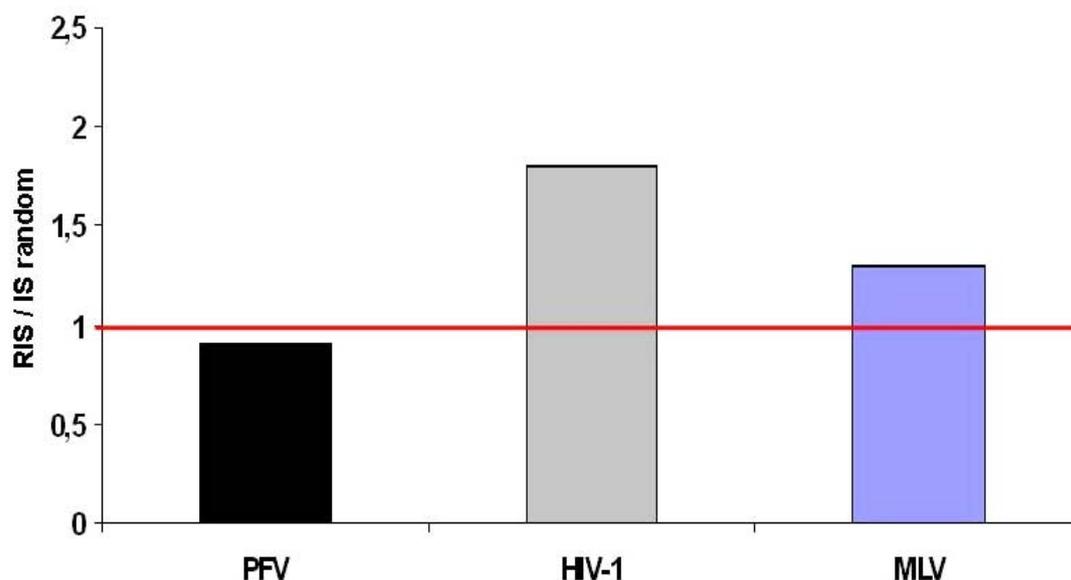


Abb. 18: Die Integrationsfrequenz in RefSeq-Gene

Dargestellt ist die Integrationsfrequenz aller in dieser Arbeit untersuchten RIS in RefSeq-Gene. Die Werte sind auf die zu erwartenden IS random-Werte (siehe Text) normalisiert. Die rote Linie bei 1 markiert den Wert, bei dem die tatsächlich beobachtete Integrationsfrequenz der Vektoren in RefSeq-Gene dem mittels Computer-Simulation ermittelten Zufallswert gleicht. Das heißt, dass ein Wert >1 für eine Bevorzugung der Integration und ein Wert < 1 für eine Vermeidung der Integration in RefSeq-Gene steht. Die PFV-Resultate sind aus dem mit pMH123 und pMH124 ermittelten Datensätzen zusammen errechnet worden (siehe Text).

Wie in Tab. 9 zu erkennen ist, würde man bei einer nach dem Zufallsprinzip erfolgten Integration von Retroviren ins humane Genom genau 31% in RefSeq-Gene annehmen. Wie zu erwarten war und wie bereits publiziert wurde (Mitchell et al., 2004; Schröder et al., 2002), konnte die stärkste Favorisierung für die Integration in RefSeq-Gene für HIV-1 beobachtet werden. Hier lagen 55% der 87 untersuchten HIV-1-IS in RefSeq Gene, was

für eine verglichen mit der zufälligen Integration nahezu 2-fach höhere Integrationshäufigkeit steht (siehe Abb. 18). MLV zeigte in dieser Analyse ebenfalls im Einklang vorheriger Studien (Mitchell et al., 2004; Wu et al., 2003) eine leichte bevorzugte Integration in diese Bereiche (41%). Interessanterweise fiel auf, dass bei beiden in dieser Arbeit klonierten PFV-Datensätzen mit den Vektoren pMH123 und pMH124 (siehe 3.1.1) die Integrationsfrequenz in RefSeq-Gene mit 27% geringer oder nahezu gleich dem IS-random-Wert war (siehe Tab. 9 & Abb. 18), so dass bei PFV von keiner Bevorzugung einer Integration in transkribierte Regionen gesprochen werden kann. Die Resultate beweisen zum einen die Reproduzierbarkeit des in dieser Studie etablierten Testsystems zur Klonierung und Auswertung der RIS, da die für HIV-1 und MLV ermittelten Werte den aus anderen oben zusammengefassten Studien sehr gut gleichen. Zum anderen geht aus Tab. 9 hervor, dass, wie zu erwarten war, keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den mit pMH123 und pMH124 generierten PFV IS zu beobachten sind, so dass für alle folgenden Analysen beide Datensätze zusammen ausgewertet wurden.

3.2.3 Lokalisation der RIS in RefSeq Gene

Des Weiteren wurde untersucht, ob bestimmte Bereiche innerhalb der RefSeq-Gene eine Anhäufung von proviralen Integrationsstellen aufweisen. Hierfür wurden die RefSeq-Gene, welche nach der in Abb. 18 analysierten Fragestellung RIS enthielten, in zehn gleich große Segmente aufgeteilt und die Integrationsfrequenz in jedem einzelnen Segment gezählt. Zur Detektierung von bevorzugten Gensegmenten folgte ebenfalls ein Vergleich mit den IS-random-Daten, die eine zufällige Verteilung der Integrationsstellen innerhalb der RefSeq Gene simulieren (siehe Abb. 19). In dieser Analyse fiel auf, dass, obwohl mit PFV-basierten Vektoren keine bevorzugte Integration in Gene zu beobachten war (siehe Abb. 18), ca 34% (58/172) der in RefSeq-Genen identifizierten Integrationsstellen in den ersten beiden Segmenten nahe zum Transkriptionsstart und folglich auch in der Nähe von Promotoren zu finden waren. Das ist ein 2-fach höherer Wert, als der im Falle einer zufälligen Verteilung zu erwarten wäre, so dass man von einer statistisch signifikanten Bevorzugung der ersten Gensegmente sprechen kann, jedoch repräsentieren diese nur ca. 9% (58/628) aller in dieser Studie untersuchter PFV Integrationsstellen, während es bei MLV um ca 20% (28/141) der untersuchten Klone handelt.

Die Beobachtung, dass die ersten Segmente überdurchschnittlich viele integrierte provirale Sequenzen aufwiesen, wurde zuvor auch in einer anderen Studien zur Analyse

des MLV Integrationsmusters beobachtet (Mitchell et al., 2004) und konnte in dieser Studie auch mit den 141 klonierten und untersuchten MLV-IS bestätigt werden. Für MLV ist, wie in Abb. 19 zu erkennen ist, diese Präferenz sogar noch stärker, jedoch lässt sich durch die geringe Anzahl an MLV-IS, welche in dieser Arbeit kloniert und untersucht wurden, kein direkter Vergleich anstellen. Im Einklang mit den publizierten Daten konnte diese Tendenz für die Integration in die ersten Segmente von RefSeq-Genen nicht bei HIV-1-basierten Vektoren gemacht werden. Obwohl HIV-1 die stärkste Präferenz für die Integration in Gene aufweist, scheinen nicht die ersten Segmente, sondern die Segmente 3 und 4, die mehr in der Mitte der Gene liegen, bevorzugt zu werden (siehe Abb. 19). Trotz der hierfür noch nicht geklärten Mechanismen scheint dieser Aspekt von PFV-Vektoren, bevorzugt in die ersten Gensegmente zu integrieren, auf ein mit MLV näher verwandtes Integrationsmuster hinzudeuten.

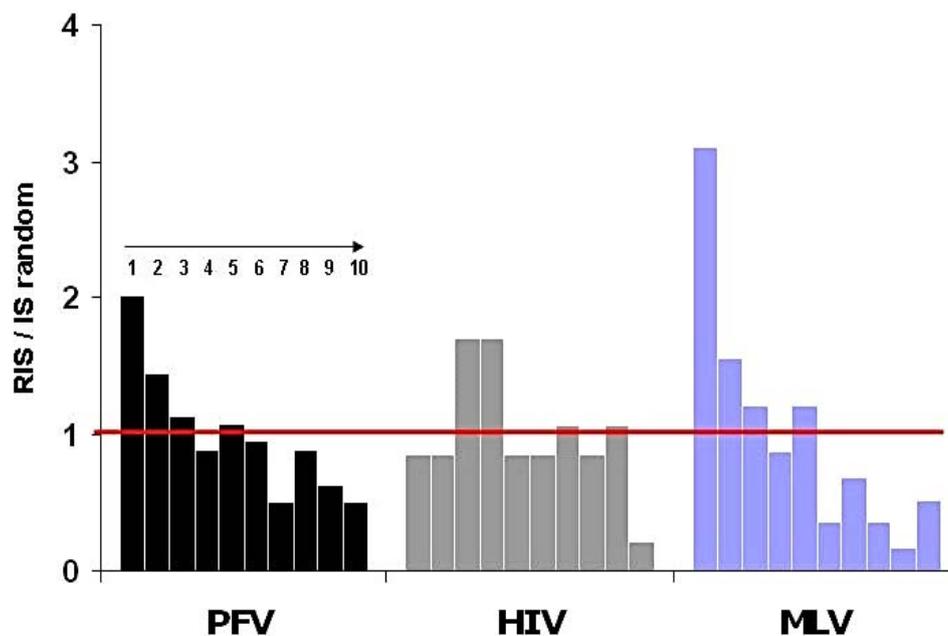


Abb. 19: Verteilung der Integrationsstellen in RefSeq Genen

Alle RefSeq-Gene, welche PFV-, HIV-1- und MLV- Integrationsstellen enthielten, wurden in zehn gleich große Segmente geteilt. Die Nummerierung der Segmente erfolgte nach der Orientierung des Gens (schwarzer Pfeil) vom Transkriptionsstart (Segment 1) aufwärts bis zum Transkriptionsende (Segment 10). Die Anzahl der Integrationen in jedem Segment wurde gezählt und auf die mittels Computer-Simulation generierten zufälligen IS random Werte (rote Linie) normalisiert. Ein Wert >1 steht für eine Bevorzugung und ein Wert <1 für eine Vermeidung der jeweiligen Segmente.

3.2.4 Entfernung der retroviralen Integriationsstellen zum Transkriptionsstart bekannter Gene

Das Potential von Retroviren die Regulation von zellulären Genen, die in unmittelbarer Nähe liegen, zu aktivieren wurde bereits in der Einleitung angesprochen. Dieser Aspekt wird am deutlichsten, wenn unter den aktivierten Genen Proto-Onkogene oder Gene betroffen sind, welche in der Kontrolle der Zellteilung eine aktive Rolle spielen. Eine Aktivierung solcher Gene durch die integrierten proviralen LTR-Regionen kann die Entstehung von Tumoren auslösen (Cuypers et al., 1984; DesGroseillers et al., 1983; Selten et al., 1985; Tschlis and Lazo, 1991). Obwohl solch eine Aktivierung der Gene von integrierten Retroviren in beiden Orientierungen (Selten et al., 1984) und auch über eine größere Distanz von bis zu 100kb ausgelöst werden kann (Bartholomew and Ihle, 1991; Lazo et al., 1990), scheint es plausibel, dass eine Nähe zu zellulären Promotoren oder anderen regulatorischen Bereichen (siehe 3.2.6) das Risiko einer Aktivierung erhöhen könnte (Nienhuis et al., 2006). Eine Analyse über die Entfernung der RIS zu Transkriptionsstartstellen (TSS) bekannter Gene kann in diesem Zusammenhang für die Abschätzung der Sicherheit retroviraler Vektoren von Bedeutung sein (siehe auch 1.3.3). Die Präferenz für MLV-basierte Vektoren bevorzugt um den TS zu integrieren, konnte in dieser Studie mit den 141 untersuchten MLV-IS ebenfalls nachgewiesen werden. Nahezu 30% der Integrationsstellen befanden sich in einer 2,5kb großen Distanz in beiden Orientierungen zum TS der Gene (siehe Abb. 20 B). Dabei konnten im Vergleich zur zufälligen Integration (IS-random) ein 14-fach höherer Wert in einer Distanz von 2,5 kb stromaufwärts der TSS und ein 10-fach höherer Wert stromabwärts der TSS beobachtet werden, was für eine deutliche Präferenz dieser Regionen spricht.

Die Analyse von PFV diesbezüglich zeigte ebenfalls eine leichte Präferenz zur Integration in einer Distanz von 2,5kb von den TSS, welche jedoch mit nur ca. 8 % aller hier untersuchten PFV-IS deutlich geringer liegen als die für MLV (32%).

Zusammengefasst lagen im Vergleich zur Zufälligen Integration 4-mal mehr Integrationen in einer Distanz von 2,5 kb stromaufwärts der TSS und 2,5-mal mehr in einer Distanz von 2,5 kb stromabwärts der TSS (vgl Abb. 20 A). Interessanterweise konnten bei der Untersuchung der HIV-1-Integrationsstellen, wie bereits publiziert wurde (Mitchell et al., 2004; Wu et al., 2003), keine solche Präferenzen beobachtet werden. Vielmehr scheint HIV-1 aus bis jetzt ungeklärten Gründen diese Regionen zu vermeiden und bevorzugt dagegen eine Integration in weiter vom TS entfernt positionierte Regionen.

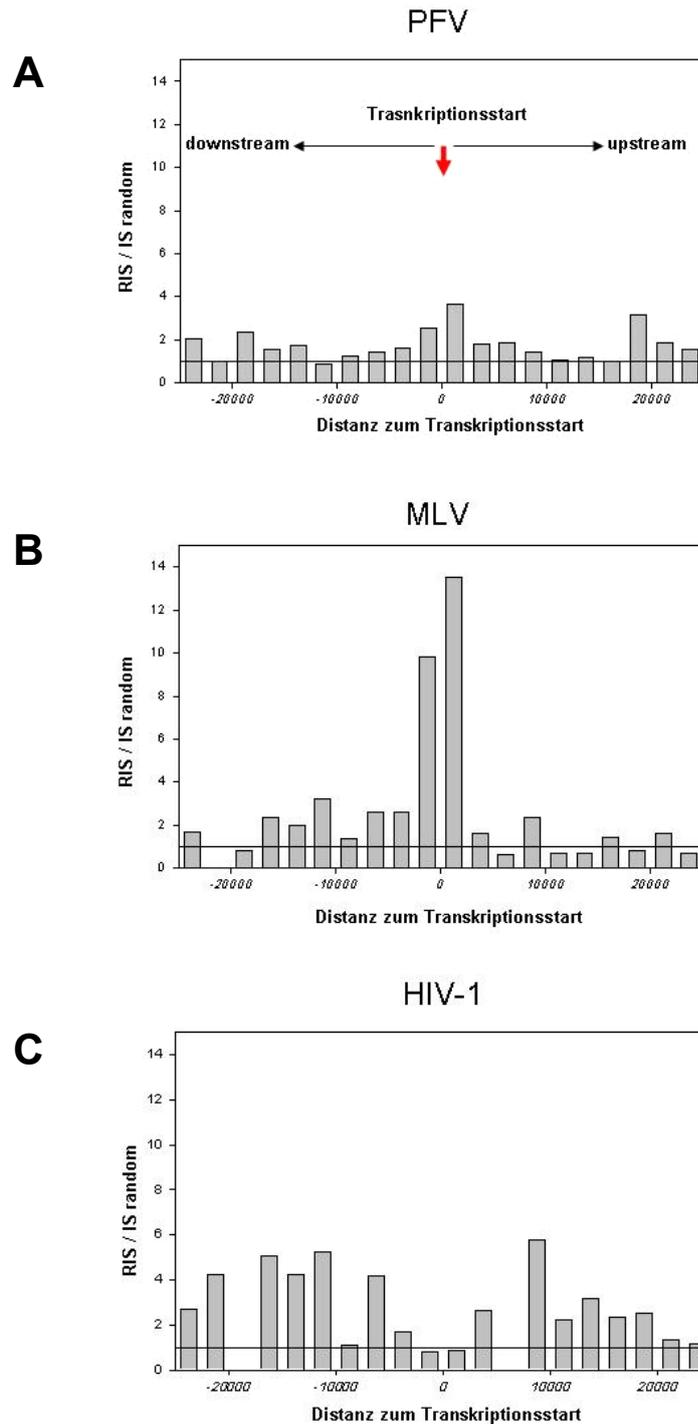


Abb. 20: Distanz der Integrationsstellen zum Transkriptionsstart von Genen

Dargestellt ist die Distanz der RIS vom Transkriptionsstart der Gene (roter vertikaler Pfeil). Vom TS aus wurden die stromaufwärts und stromabwärts gelegenen Sequenzen in 2,5 kb große Bereiche (graue Säulen) eingeteilt und die Anzahl an Integrationen von PFV (A), MLV (B) und HIV-1 (C) in jedem Fenster gezählt. Dargestellt sind Integrationen in einer Distanz von maximal 25 kb. Die Anzahl der Integrationen in jedem Fenster wurde gezählt und auf die mittels Computer-Simulation generierten zufälligen IS random-Werte (schwarze Linie) normalisiert. Ein Wert >1 steht für eine Bevorzugung und ein Wert <1 für eine Vermeidung der jeweiligen Fenster.

3.2.5 Die Distanz von PFV Integrationsstellen zu bekannten Oncogenen

Wie bereits in Kapitel 1.3.3 und im vorherigen Kapitel angesprochen wurde kann die Integration von manchen Retroviren ins Wirtsgenom die Entstehung von Tumoren verursachen. Bei einer Integration des Provirus in der Nähe von zellulären Proto-Onkogenen kann eine Aktivierung dieser Gene durch die Promotor/Enhancer-Elemente, welche in den viralen LTRs vorhanden sind, zur Bildung von Tumoren führen (Uren et al., 2005). Die Integration in Tumorsuppressor-Gene kann dagegen zu einer Inaktivierung dieser Gene führen, die ebenfalls die Bildung von Tumoren begünstigen können (Uren et al., 2005). Tatsächlich sind viele heute bekannte Tumor induzierende Gene durch häufig und wiederholt auftretende RIS in der Nähe von Proto-Onkogenen identifiziert worden (Suzuki et al., 2002). Obwohl für die Bildung von Tumoren meist mehrere kooperierende Ereignisse erforderlich sind (Bishop, 1983; Varmus, 1984), stellt die insertionelle Mutagenese ein für die therapeutische Anwendung von retroviralen Vektoren nicht zu vernachlässigendes Risiko dar.

Aufgrund der moderat vorhandenen Präferenz von FV in der Nähe der TSS von Genen zu integrieren wurde analysiert, wie viele potentielle Proto-Onkogene sich in der Nähe der 628 untersuchten FV Integrationsstellen befanden. Hierfür wurde wie in Kapitel 2.8.2 beschrieben von der „Gene Census“ Datenbank des Sanger Instituts die spezifischen Daten von 346 potentiellen Proto-Onkogenen bezogen und anhand ihrer LocusLink- oder Entrez Gene-Erkennungsnummer die Position im humanen Genom festgelegt. Alle FV-Integrationen, die sich in Proto-Onkogenen oder in einer Distanz von 500kb zu dieser befanden, wurden identifiziert. Zusätzlich wurde die Orientierung des integrierten PFV-Vektors zum Leseraster der betroffenen Onkogene bestimmt. In Tab. 10 sind die PFV-IS, die im Leseraster von Proto-Onkogenen stattfanden, aufgelistet. Insgesamt befanden sich 1% der PFV-Integrationen (7/628) in bekannten Proto-Onkogenen. Die Distanz zu den TSS betrug bei allen in Onkogenen befindlichen integrierten Proviren mehr als 10 kb, wobei 4 von den 7 Integrationen in Orientierung des Leserasters sich befanden. Das Mucin 1 (MUC1) Gen wurde hierbei 2-mal getroffen.

In Tab. 14 (siehe 6.3) sind alle in einer Distanz von bis zu 500 kb von den PFV-IS entfernt gelegenen Proto-Onkogene zusammengefasst. 3,3 % (21 / 628) der PFV-Integrationen befanden sich in einer Reichweite von 100 kb zu bekannten zellulären Proto-Onkogenen, was dem nach dem Zufallprinzip erwarteten Wert von 3,2 % entspricht (Trobridge et al., 2006).

Tab. 10: PFV Integrationen in bekannte zelluläre Proto-Onkogene

Locus	Name	Gene ID	Chromosom	Entfernung zum TS (kb)	Orientierung
LCX	leukemia-associated protein with a CXXC domain	80312	10q21	12065	R
GNAS	guanin nucleotide binding protein (G protein), alpha stimulating activity polypeptide 1	2778	20q13.2	17583	R
PDE4DIP	phosphodiesterase 4D interacting protein (myomegalin)	9659	1q12	34612	R
BRCA2	familial breast/ovarian cancer gene 2	675	13q12	80329	F
MUC1	mucin 1, transmembrane	4582	1q21	174985	F
EGFR	epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian)	1958	7p12.3-p12.1	232914	F
MUC1	mucin 1, transmembrane	4582	1q21	324339	F

(R, reverse; F, forward)

Im Bezug auf wiederholte Insertionen oder so genannte „hotspots“ von FV in der Nähe eines bestimmten Proto-Onkogens fiel die wiederholte Integration (3 mal) in einer Reichweite von 250 kb stromaufwärts zum Transkriptionstart des EGFR-Gens (epidermal growth factor receptor) sowie die zwei Integrationen in einer Distanz von ungefähr 150 kb stromaufwärts vom TS des FLI1-Gens (friend leukemia virus integration 1) auf (siehe Tab. 14).

Ob diese Integrationsereignisse das Potential besitzen, auch tatsächlich die Bildung von Tumoren induzieren zu können, wurde in dieser Studie nicht untersucht und erfordert zur Analyse andere Testsysteme, welche in Kapitel 4.1.5 der Diskussion angesprochen werden.

3.2.6 Die Integrationspräferenz in der Nähe zu CpG-reichen Inseln

So genannte CpG-reiche Inseln sind Sequenzabschnitte im Vertebratengenom, die sich im Vergleich zu anderen Bereichen des Genoms durch einen hohen Gehalt an Guanin (G) und Cytosin (C) und eine Anhäufungen von CpG-Dinukleotiden auszeichnen (Bird, 1986). Das humane Genom enthält etwa 45 000 solcher Bereiche (Antequera and Bird, 1993b), die überwiegend mit dem 5'-Ende aller Haushaltsgene assoziiert sind (Gardiner-Garden and Frommer, 1987). Neuste Studien haben gezeigt, dass ein großer Teil der CpG-Inseln in der Nähe des Transkriptionsstarts (TS) der Gene zu finden ist (Yamashita et al., 2005), wobei auch ein weiterer Teil, dessen Rolle noch nicht ausreichend geklärt ist, nicht in der Nähe des TS liegt (Larsen et al., 1992; Takai and Jones, 2002). Aufgrund der Anhäufung von Bindestellen für Trankriptionsfaktoren, sowie die über DNA-Methylierung regulierte Kontrolle der Genexpression werden CpG-reiche Inseln oft mit regulatorischen Funktionen während der Genexpression assoziiert (Antequera and Bird, 1993a), so dass möglicherweise das Risiko zu der in Kapitel 3.2.4 beschriebenen insertionellen Mutagenese bei einer Integration in oder in die Nähe solcher Regionen, erhöht sein könnte. Zur Analyse über die Präferenzen von PFV in der Nähe zu CpG-reichen Inseln zu integrieren wurde die CpG-Island-Annotationen von dem UCSC ftp server (<ftp://hgdownload.cse.ucsc.edu>) bezogen. Alle in einer Reichweite von +/- 1kb, +/- 5kb und +/- 10kb befindlichen PFV-, MLV- und HIV-1-IS wurden lokalisiert und mit der erwarteten rein zufälligen Intergationsfrequenz (IS-random) in der Nähe zu CpG-reichen Inseln verglichen.

Eine deutlich signifikante Anhäufung von MLV-Integrationen in einer Nähe von +/- 1kb zu CpG-reichen Inseln konnte auch mit den in dieser Studie klonierten MLV-IS beobachtet werden. MLV-Vektoren integrierten in die Nähe von CpG-reichen Inseln nahezu 12-fach höher (siehe Abb. 21) als die mittels Computer-Simulation ermittelten Zufallsintegrationen (IS-random). Das sind ca. 30% aller hier untersuchten MLV-IS, die in einer Distanz von +/- 1kb zu CpG-reichen Inseln liegen. Solche Präferenzen konnten mit den HIV-1- und PFV-basierten Vektoren nicht beobachtet werden. Obwohl eine im Vergleich zur zufälligen Integration nahezu 2-fach höhere Integrationsfrequenz in einer Distanz von +/- 1kb ermittelt wurde, entspricht das 6,3 % aller hier untersuchten PFV-IS und 4,6 % aller HIV-1 Integrationsstellen. Mit zunehmender Distanz nimmt im Vergleich zu den zufälligen Integrationen die Häufigkeit an proviralen Sequenzen nicht deutlich ab, sondern bleibt dagegen immer in der Größenordnung von 2 über den zufälligen Wert. Zusammenfassend scheinen PFV-basierte Vektoren im Vergleich zu MLV-Vektoren keine starke Präferenz für die Integration in der Nähe von CpG-reichen Inseln aufzuweisen und

ähneln in dieser Hinsicht eher dem Integrationsmuster von HIV-1-basierten Vektoren. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass die Wahl des *HaellI*-Enzyms, welches bei der Klonierung der PFV- und HIV-1-IS zur Fragmentierung der genomischen DNA verwendet wurde, die Selektion von zu CpG-reichen Inseln näher gelegenen RIS begünstigte und die PFV- und HIV-1-Werte deswegen auch eigentlich niedriger als die hier ermittelte Werte liegen könnten. Dieser Aspekt wird ausführlich in Kapitel 4.1.3 diskutiert.

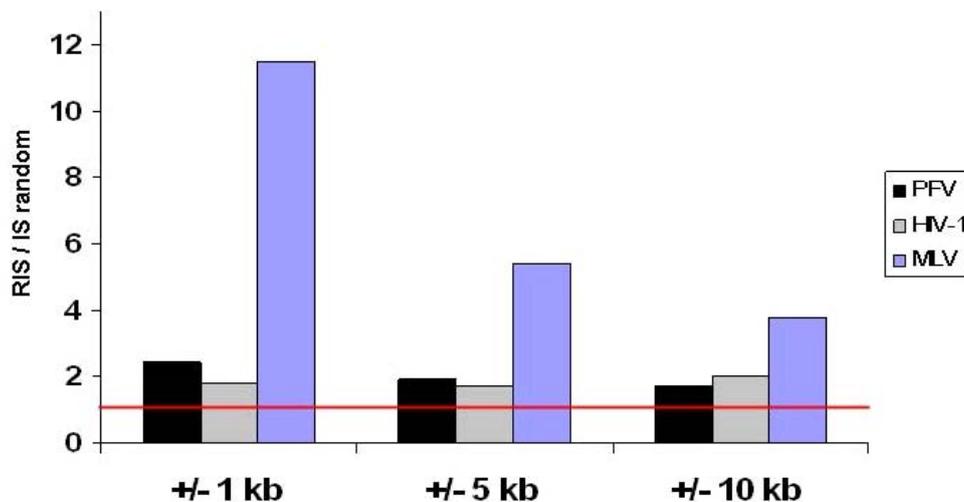


Abb. 21: Die Entfernung der retroviralen Integrationsstellen von CpG-Inseln

Dargestellt ist die Integrationsfrequenz der PFV-, HIV-1- und MLV-Vektoren in einer Distanz von +/- 1, 5 und 10kb der CpG-reichen Inseln. Die gezählten Integrationsereignisse wurden gegen die mittels Computer-Simulation ermittelten zufälligen Integrationsstellen (IS random; rote Linie) normalisiert. Ein Wert >1 steht für eine Bevorzugung und ein Wert < 1 für eine Vermeidung der Integration in diese Regionen.

3.2.7 Die zelluläre Basenzusammensetzung an

PFV-Integrationsstellen

Schon seit der Entdeckung, dass die Integration des viralen Genoms in der der Wirtszelle ein essentieller Schritt im Replikationszyklus von RSV ist (Varmus et al., 1973) und auch auf andere Retroviren zutrifft (Goff, 1990; Hughes et al., 1978; Steffen and Weinberg, 1978), wurden Versuche eingeleitet, die primären dafür erforderlichen Nukleotid-Sequenzen zu identifizieren. Während die für die Integration erforderlichen viralen Sequenzen, die sogenannten att-sites (eng: attachment sites), für die meisten

Retroviren gut untersucht und charakterisiert sind (siehe 1.3.1), konnten biochemische *in vitro*-Studien zur Integration von HIV-1 kein Beweis für ein spezifisches zelluläres Sequenzmotiv liefern (Bor et al., 1996; Pruss et al., 1994a; Pryciak et al., 1992). Vor kurzem wurde in zwei unabhängigen Studien nach einer Analyse der zellulären Nukleotid-Zusammensetzungen an aus mehreren Studien generierten RIS eine statistisch signifikante Präferenz für das Vorkommen bestimmter Nukleotide an bestimmten Positionen festgestellt, welche eine schwache palindromische Sequenz bilden (Holman and Coffin, 2005; Wu et al., 2005).

Zur Feststellung, ob solche Nukleotid-Präferenzen auch für foamyvirale Integrationsstellen charakteristisch sind, wurden die Basenzusammensetzungen in einer Distanz von 1000 Basen in beiden Orientierungen um die PFV-IS auf statistisch signifikante Abweichungen zur allgemeinen Basenverteilung im humanen Genom untersucht. Aufgrund des hohen Anteils der Basen Adenin (A) und Thymin (T) gegenüber von Guanin (G) und Cytosin (C) im humanen Genom (60% AT und 40% GC) kann rechnerisch die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten der einzelnen Basen an jeder zufälligen Position auf 30 % für A oder T und 20% für G oder C geschätzt werden (Wu et al., 2005). Die in dieser Studie mittels der IS-random-Daten errechnete allgemeine Verteilung der vier Basen im humanen Genom stimmte mit 28% für A und T und 21% für C und G mit der in Wu et al., 2005 geschätzten Verteilung gut überein.

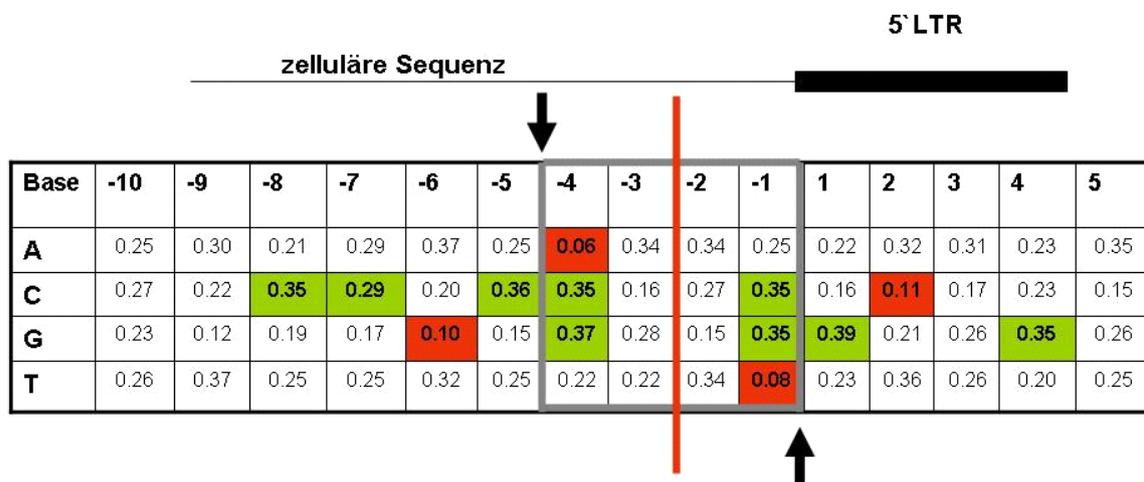


Abb. 22: Basenzusammensetzung an den PFV-Integrationsstellen

Dargestellt ist die beobachtete Verteilung der Basen bis 10 Basen stromabwärts (-10) und 5 Basen stromaufwärts (5) der PFV-Integrationsstellen, welche zwischen die Position -1 und 1 fallen. Ein Wert von 1 steht für 100%. Signifikante Abweichungen von > 10% zur allgemeinen Verteilung der Basen, welche 28% / 21% / 21% / 28% für A / C / G / T betragen, sind für eine bevorzugte Präferenz (grün) und für eine Vermeidung (rot) durch farbliche Kästchen hervorgehoben. Das graue Kästchen markiert die nach der Integration duplizierte zelluläre Sequenz (siehe Text). Die Positionen des Strang-Transfers sind mit schwarzen Pfeilen symbolisiert. Die rote Linie markiert die symmetrische Achse der resultierenden palindromischen Sequenz (siehe Text).

Wie in Abb. 22 zu erkennen ist, konnten bei der Analyse der Basenverteilungen um die PFV-IS an Position -1 und -4 signifikanten Präferenzen für die Nukleotide G und C und eine Vermeidung der A- und T-Nukleotide festgestellt werden (vgl. auch Abb. 23). Weiterhin wurden auch Präferenzen für G an Position 1 und C an Position -5 gefunden. Statistisch signifikante Abweichungen von der erwarteten Verteilung der Nukleotide konnten auch von der Integrationsstelle in weiter entfernt gelegenen Positionen nachgewiesen werden (siehe Abb. 22 und Abb. 23: Position -8 und 4). Bei näherer Betrachtung ist ein Palindrom mit einer Sequenz von CC(A)CCN:NGG(T)NG oder CC(A)CGN:NCG(T)NG zu erkennen, dessen Symmetrieachse (angedeuetet durch den Doppelpunkt) in der Mitte der bei FV typischen 4 Basenpaar-Erkennungssequenz liegt, welche wie in Kapitel 1.3.1 beschrieben nach der Integration dupliziert wird (Enssle et al., 1999). Die eingeklammerten Basen sollen die Vermeidung von A und T an Position -1 und -4 symbolisieren.

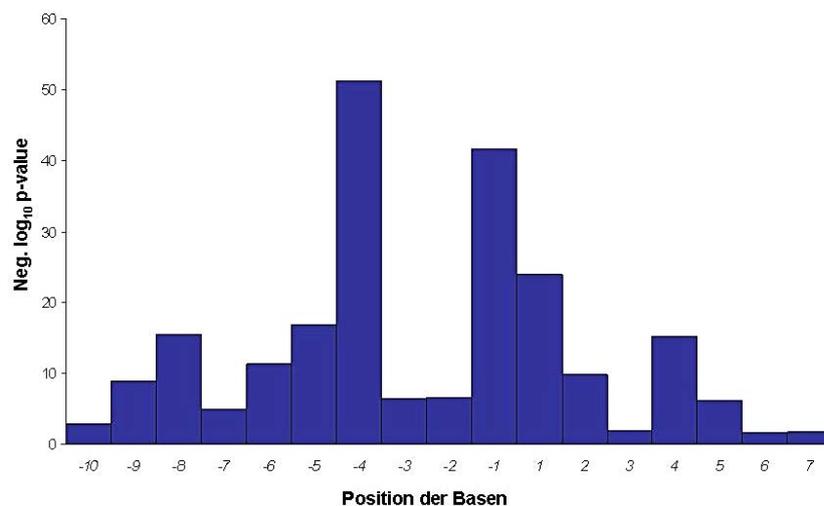


Abb. 23: Neg. log₁₀-Werte des χ²-Testes für die Basenzusammensetzung der PFV-Integrationsstellen

Dargestellt sind die Ergebnisse des χ²-Testes zur Analyse der Signifikanz der von der erwarteten zufälligen Basenverteilung des humanen Genoms abweichenden beobachteten Basenzusammensetzung an den PFV-Integrationsstellen (vgl. Abb. 22). Die y-Achse gibt die negativen log₁₀-Werte des χ²-Testes in einer Distanz von -10 und 7 Basen zu den FV Integrationsstellen (x-Achse) wieder. Die Integration von FV fällt wie in Abb. 22 zwischen -1 und 1, während die Strangtransfer-Reaktion zwischen -5 und -4 sowie -1 und 1 stattfindet.

Zusammengefasst sind, wie bereits für andere Retroviren berichtet wurde, bestimmte Nukleotide an den FV-Integrationsstellen zu finden, welche nahezu 2-fach häufiger, aber auch nahezu 2-fach weniger, als nach der allgemein zufälligen Verteilung der Basen zu erwarten wäre, vorgekommen. Diese signifikanten Abweichungen normalisieren sich jedoch in Distanzen von mehr als 10 Basen (siehe Abb. 24), so dass angenommen

werden kann, dass bestimmte Basenzusammensetzungen zum Teil die foamyvirale Integration begünstigen. Interessanterweise sind die stärksten Abweichungen von der erwarteten allgemeinen Basenverteilung an den Positionen zu finden, an denen die Strangtransfer-Reaktion stattfindet (siehe Abb. 22).

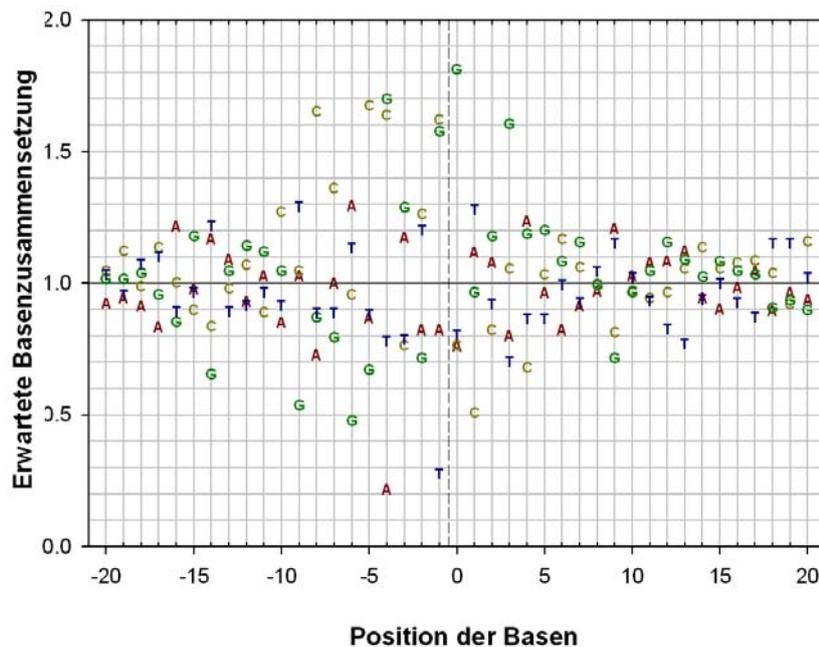


Abb. 24: Basenzusammensetzung der PFV-Integrationsstellen

Dargestellt ist der Quotient der beobachteten Basenzusammensetzung an den PFV-IS und der mittels Computer-Simulation erhaltenen zufälligen Verteilungen der Basen im humanen Genom (y-Achse). Ein Wert >1 steht für eine Bevorzugung und ein Wert <1 für eine Vermeidung bestimmter Basen an dieser Position. Die x-Achse gibt die Position in Distanz zum Ort der PFV Integration, welche zwischen -1 und 0 fällt, wieder.

3.3 Identifikation PFV-Integrase-interagierender zellulärer Proteine

In Kapitel 1.3.2 wurde die Rolle von zellulären Proteinen, welche durch eine Interaktion mit der retroviralen Integrase (IN) als Kofaktoren der Integrationsreaktion agieren können, ausführlich zusammengefasst.

Der erste kritische Schritt in der Analyse der Funktion solcher Kofaktoren ist die Suche nach zellulären Proteinen, welche mit den IN-Proteinen interagieren. Vieler solcher zellulären Proteine wurden bis jetzt mit Yeast-two-hybrid oder Ko-Immünpräzipitation Methoden identifiziert (Engelman, 2003; Turlure et al., 2004).

In dieser Studie wurden neben den Analysen zum Integrationsmuster von PFV-basierten Vektoren im humanen Genom (siehe 3.2) zelluläre Proteine identifiziert, welche mit der PFV-IN interagieren.

Die Methode, die hierfür angewandt wurde, basierte auf der von Cherepanov et al., 2003 beschriebene Vorgehensweise. Zunächst wurden mittels retroviralem Gentransfer humane Zellen generiert, die stabil die PFV-IN exprimieren, welche C-terminal mit einem FLAG-tag fusioniert ist (INC-Flag). Diese Zellen dienten in darauf folgenden Pull-Down-Experimenten durch die Immunpräzipitation von INC-Flag mit dem ANTI-FLAG[®] M2 Affinity Gel-Kit, die im Folgenden als FLAG-Beads bezeichnet werden, zur Suche nach mit der PFV-IN interagierenden humanen zellulären Proteinen.

3.3.1 Expression von PFV Integrase in humanen Zellen

Die stabile Expression von PFV-INC-Flag in humanen Zellen wurde durch die Nutzung eines retroviralen Vektors bewerkstelligt. Hierfür wurde zunächst der auf MLV-basierte Vektor pczCFG/IEGZ modifiziert. In die *EcoRI*- und *BamHI*-Schnittstellen erfolgte die Klonierung einer Oligonukleotide-Kassette, welche eine FLAG-Peptid kodierende Sequenz sowie zusätzlich eine MCS (Multi Cloning site) enthielt.

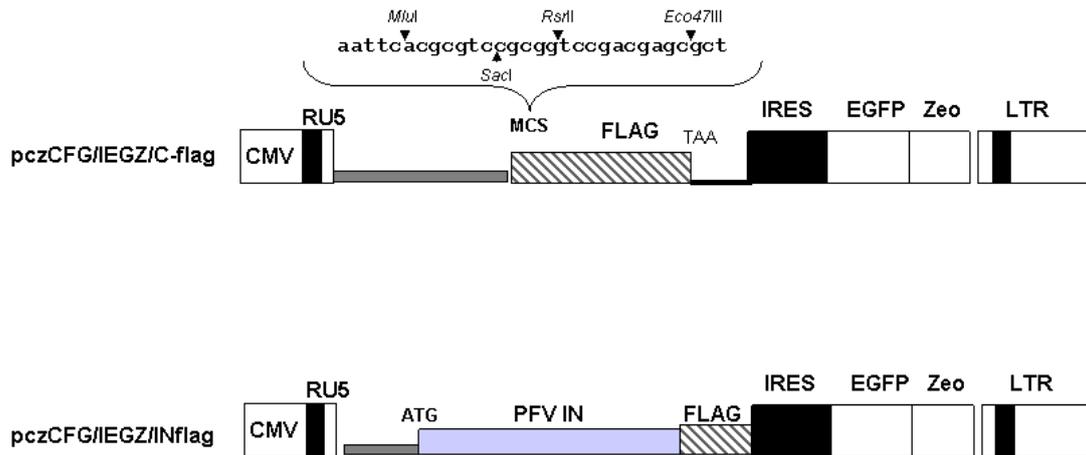


Abb. 25: Retroviraler Vektor zur stabilen PFV-IN-Expression in humanen Zellen

Der LTR getriebene auf MLV-basierte Vektor pczCFG/IEGZ/C-flag enthielt neben der Flag kodierenden Sequenz, welche mit einer Terminationssequenz (TAA) endete, eine zusätzlich „multi cloning site“ (MCS). In dem pczCFG/IEGZ/INflag-Vektor wurde die PFV-IN mit *RsrII* und *Eco47III* in frame mit der C-terminal positionierten FLAG-Sequenz kloniert (siehe Text). Der Vektor enthält eine interne eGFP/Zeozin-Markergen-Kassette, welche nach der IRES (internal ribosomal entry site) positioniert ist. Die Transkription der Vektoren wird bei der Transfektion durch den humanen Cytomegalovirus Promotor (CMV) getrieben; RU5: RU5-Region der 5'LTR; ATG: Startcodon; LTR: long terminal repeat.

Die Oligonukleotid-Kassette wurde zur C-terminalen Fusion der FLAG-Peptide-Sequenz mit der IN konstruiert, so dass zur Termination des resultierenden Fusionsproteins ein terminales Stopcodon (TAA) am 3'-Ende eingefügt wurde (siehe Abb. 25, pczCFG/IEGZ/C-flag). Zur Klonierung der IN mittels PCR wurde das PFV-Provirus pcHSRV2 (Moebes et al., 1997) als Matrize verwendet. Die PCR erfolgte unter Standardbedingungen mit den Primern #4013 und #4014. Der Primer #4013 fügte mittels Primermutagenese eine *RsrII*-Schnittstelle, eine für die richtige Nutzung des ATG-Startcodons notwendige Kosak Sequenz (Kozak, 1986) sowie das Startcodon (ATG) am 5'-Ende der ersten Aminosäure (AS) von PFV-IN ein. Der Primer #4014 wurde so konstruiert, das das am 3'-Ende im pcHSRV2-Provirus enthaltene Stopcodon gegen eine *Eco47III*-Schnittstelle ausgetauscht wurde. Nach Aufreinigung der amplifizierten IN-Sequenz mit Hilfe des PCR-Purification-Kits (Quiagen) erfolgte ein Verdau mit *RsrII* und *Eco47III* mit anschließender Aufreinigung über ein Agarosegel. Die PFV IN wurde nun in den ebenfalls mit *RsrII* und *Eco47III* verdauten, dephosphorylierten pczCFG/IEGZ/C-flag-Vektor „in frame“ mit dem C-terminalen FLAG-tag gesetzt (siehe Abb. 25, pczCFG/IEGZ/INC-flag). Zur Produktion von viralen Partikeln wurden zunächst 293T-Zellen mit dem Vektor zusammen mit pHIT60 und pczVSV-G mittels Polyethylenimin kotransfiziert. Nach 24h folgte eine Induktion mit Natriumbutyrat und nach 48h konnten die Viruspartikel aus dem zellfreien Überstand geerntet werden. Zur

Transduktion wurden 2×10^4 HT1080-Zellen in einer 12-well Zellkulturplatte in zwei Ansätzen ausgesät und jeweils 1 ml des zellfreien Überstands aus der Transfektion hinzugegeben. Nach 48h wurden im FACS 20% der transduzierten Zellen als eGFP-positiv identifiziert (Daten nicht gezeigt). Die transduzierten Zellen sollten jedoch möglichst alle mindestens eine Vektorkopie enthalten, so dass die erfolgreich transduzierten Zellen hierfür mit Zeozin selektioniert wurden. Nach 72h wurde mit FACS die Effizienz der Selektion überprüft.

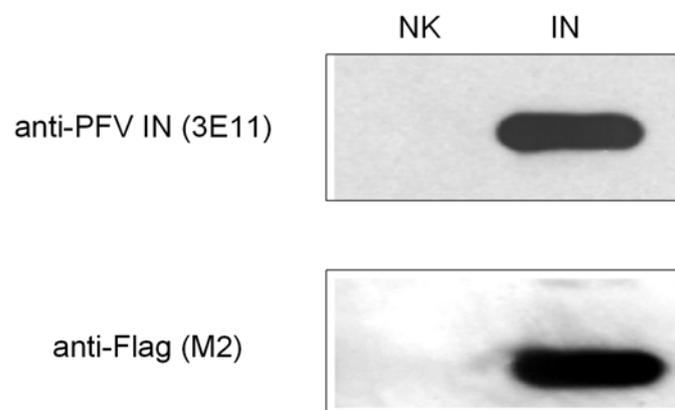


Abb. 26: Western Blot von PFV IN exprimierenden Zellen zum Nachweis der IN Expression

Der Western Blot zum Nachweis der IN-Expression mit normalen HT1080 Zellen (NK) und IN-exprimierenden HT1080 Zellen (IN) mit PFV IN spezifischen (E311) und Flag (M2) spezifischen Antikörpern.

Nach der Selektion waren 99% der Zellen eGFP positiv, so dass alle Zellen mindestens eine Kopie des IN exprimierenden Vektors enthielten.

Eine stabile Expression des IN-Proteins konnte im Western Blot mit monoklonalen IN (E311)- und FLAG (M2)-Antikörpern nachgewiesen werden. Wie in Abb. 26 zu erkennen ist, ist ein Nachweis des C-terminal mit dem FLAG-Peptide fusionierten PFV IN-Proteins mit beiden Antikörpern möglich. Die Expression ist stabil und konnte auch noch nach einem Jahr nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

3.3.2 Aufreinigung der PFV-Integrase

Die durch retroviralem Gentransfer generierten humanen HT1080-Zellen, welche stabil C-terminal mit FLAG fusionierte PFV IN Proteine exprimieren und einfachheitshalber im folgenden als HT1080/INC-Flag-Zellen bezeichnet werden, wurden in Pull-Down-Experimenten zur Suche von interagierenden zellulären Proteinen verwendet. Hierfür musste zunächst überprüft werden ob die IN über die C-terminal fusionierte FLAG-Sequenz sich mit Hilfe von so genannten FLAG-Beads aufreinigen lässt. Zudem mussten die Bedingungen der Aufreinigung, bevor die Pull-down-Experimente gestartet werden konnten, optimiert werden.

Die PFV-IN besitzt wie alle anderen retrovirale Integrase Proteine ein Kern-Lokalisations Signal, so dass die IN überwiegend im Zellkern vorhanden ist (Imrich et al., 2000).

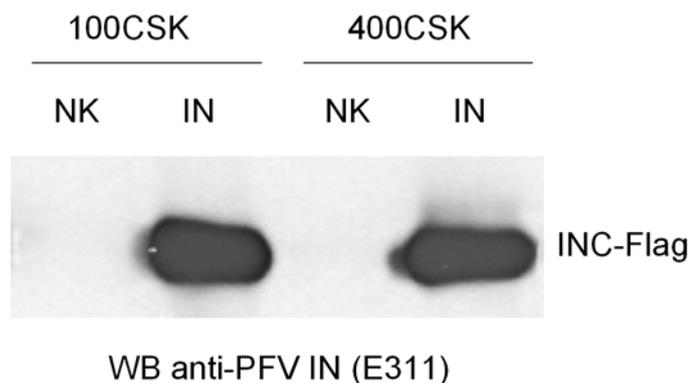


Abb. 27: Western Blot von 100 und 400CSK Lysaten mit IN spezifischen Antikörpern

Western Blot mit PFV I- spezifischen monoklonalen Antikörper (E311). Aufgetragen sind 50µl der 100CSK- und 400CSK-Lysate (siehe Text) aus normalen HT1080-Zellen (NK) und HT1080/INC-Flag-Zellen (IN).

Um die native Struktur der PFV-IN beizubehalten und gleichzeitig die im Kern lokalisierte IN-Fraktion isolieren zu können, wurden die HT1080/INC-Flag-Zellen zusammen mit normalen HT1080-Zellen, welche als Negativkontrolle dienten, nach Cherepanov et al., 2003 mit einem modifizierten CSK-Puffer, der einmal 100mM (100CSK) und einmal 400mM (400CSK) NaCl enthielt, lysiert. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit 100CSK-Puffer, dem 0,5% NP-40 zugesetzt wurde, lysiert. Unter diesen Bedingungen wird durch NP-40 die Zell- und Kernmembran permeabilisiert, so dass neben der cytoplasmatischen auch die Kernfraktion im Lysat vorhanden ist. Wie in Abb. 27 zu erkennen ist, konnte bei der Lyse mit dem 100CSK-Puffer und einer anschließenden

Zentrifugation zum abtrennen der restlichen Zellkerne ein großer Teil der INC-Flag-Proteine im Überstand gelöst und im Western Blot mit PFV-IN-spezifischen Antikörpern (E311) nachgewiesen werden. Eine erneute Lyse der pelletierten Zellkerne mit dem 400CSK-Puffer zeigte jedoch, dass ähnlich wie bei dem HIV-1-IN-Protein (Cherepanov et al., 2003) eine nahezu gleiche Menge an INC-Flag-Proteinen nach der Lyse mit 100CSK-Puffer noch mit unlöslichen nuklearen Strukturen assoziiert war, welche durch eine erneute Lyse mit den höheren Salzkonzentrationen des 400CSK-Puffers gelöst werden konnte. Beide Zellysate, die aufgrund der verschiedenen Salzkonzentration im Folgenden als 100CSK-Lysate und 400CSK-Lysate bezeichnet werden, wurden zur Aufreinigung der rekombinanten PFV-IN über Nacht mit 20µl Flag-beads bei 4°C auf dem Rad inkubiert. Anschließend wurden die an den Flag-beads gebundenen INC-Flag-Proteine zur Beseitigung von unspezifischen Protein-Protein-Interaktionen 3-mal mit jeweils 1ml 400CSK Puffer, gewaschen. Der Überstand aus jedem Waschvorgang wurde aufgehoben und zum Auftragen auf SDS-Gele in einem 1:1 Verhältnis mit 2xPPP-Puffer gemischt. In Abb. 28 ist das Ergebnis einer Aufreinigung (Spur 3 und 4) und der Eluation der an den Flag-Beads-gebundenen INC-Flag-Proteins (Spur 5 und 6) aus den 100CSK Lysaten exemplarisch wiedergegeben. Wie nach der Silberfärbung der SDS-Gele zu erkennen ist, konnten unter den in mehreren Versuchen optimierten Bedingungen die rekombinanten PFV INC-Flag-Proteine mit Flag-Beads effizient aufgereinigt werden (siehe Spur 4). Vor der Elution der INC-Flag-Proteine durch die Zugabe von Flag-Peptide waren im Gel zwei dicke und zwei dünnere Proteinbanden zu erkennen, welche in der NK auch vorhanden waren (vgl Spur 3 und 4).

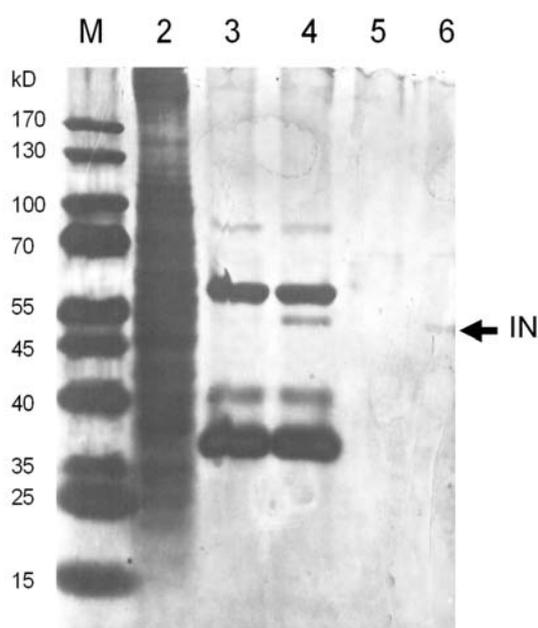


Abb. 28: Aufreinigung von INC-Flag

Silber gefärbtes SDS-Gel, Spur 1: Proteinmarker; Spur 2: Überstand des 1. Waschschrilles; Spur 3: Flag-Aufreinigung, HT1080 Zellen (Negativekontrolle;NK); Spur 4: Flag-Aufreinigung HT1080/INC-Flag-Zellen; Spur 5: Eluation mit Flag Peptide (NK); Spur 6: Eluation von INC-Flag mit Flag- Peptiden. Die Proteinmarkergrößen sind in kD wiedergegeben. Der schwarze Pfeil markiert das aufgereinigte (Spur 4) und von den Flag-Beads mit Flag-Peptide n eluierte (Spur 6) INC-Flag-Protein.

Die dickeren Banden sind Komponenten der Flag-Beads, welche mit dem im Western Blot eingesetzten sekundären Antikörper nachweisbar sind, und zeigen das quantitativ die gleichen Mengen an Beads eingesetzt wurden, während die zwei dünneren Banden wahrscheinlich unspezifisch gebundene Proteine repräsentieren, welche durch die Waschbedingungen nicht beseitigt worden sind. Nach der Elution dagegen war im Silber gefärbten SDS-Gel neben einer sehr schwachen Bande bei ungefähr 70 kD nur das gereinigte INC-flag Fusionsprotein zu erkennen (vgl Spur 6), welches für biochemische Analysen zur Funktion des auf dieser Weise eukaryotisch expremierten rekombinanten PFV IN-Proteins verwendet werden kann.

3.3.3 Identifikation von zellulären Proteinen, die mit der PFV-Integrase interagieren

Zur Suche nach mit der PFV IN wechselwirkenden zellulären Proteinen wurden zwei Strategien verfolgt. Zum einen wurde das in HT1080-Zellen stabil expremierte INC-Flag Protein zunächst wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben mit Flag-Beads aufgereinigt und erneut, noch immer an den Beads gebunden, mit Kernextrakten aus Hela-Zellen, zur Identifikation von spezifischen Protein-Interaktionen inkubiert (vgl. Abb. 29A) und zum anderen wurden Protein-Interaktionen durch Ko-Immunitäzitation direkt aus den CSK-Lysaten ohne Zugabe des Kernextraktes nachgewiesen (vgl. Abb. 29B). Die erste Methode ähnelt sehr den klassischen Pull-down-Experimenten, außer dass hier die Isolierung der Köder-Proteine -in diesem Fall PFV-INC-Flag- nicht über Chromatographie-Säulen, sondern direkt in Lösung durch die Verwendung des ANTI-FLAG[®] M2 Affinity Gel-Kit über ANTI-FLAG M2 monoklonale Antikörper, welche kovalent an Agarose gebunden sind, erfolgt.

In Abb. 30 ist exemplarisch das Ergebnis eines Pull-Down Experiments gezeigt, welches nach der in Kapitel 2.5.5 beschriebenen Methoden durchgeführt wurde (siehe auch Abb. 29A). Im silbergefärbten SDS-Gel konnten nach einer initialen Aufreinigung des INC-Flag-Proteins (siehe Abb. 30, Spur 5 und 6) und Zugabe von 200µg Kernextrakt aus Hela-Zellen nach dem Waschen der Beads (3x mit 0,1% NP-40 100CSK-Puffer) zur Entfernung von unspezifischen Protein-Protein-Interaktionen vier Proteinbanden in der INC-Flag-haltigen Probe erkannt werden (siehe Abb. 30, rote Pfeile A-D), welche in der Negativkontrolle nicht vorhanden waren (vgl. Abb. 30, Spur 7 und 8). Bei diesen Proteinen handelt es sich um potentielle mit der PFV IN interagierende zelluläre Proteine.

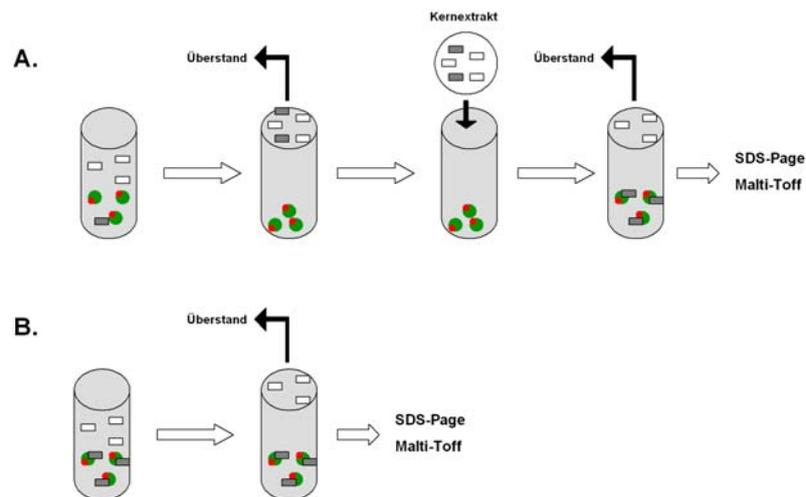


Abb. 29: Experimentelles Modell zur Identifikation von mit der PFV IN interagierenden zellulären Proteinen

(A) Pull-Down von zellulären Interaktionspartnern der PFV IN. (B) Ko-Immunpräzipitation von zellulären mit der PFV IN interagierenden Proteinen; roter Kreis: Flag-Beads; grüner Kreis: INC-Flag; weiße Rechtecke: nicht mit INC-Flag interagierende zelluläre Proteine; graue Rechtecke: mit INC-Flag interagierende zelluläre Proteine

Zur Identifizierung der interagierenden Proteine wurde der Rest der Proben aus Spur 7 und 8 in der Arbeitsgruppe von Prof. Albert Sickmann am Rudolph-Virchow Zentrum Würzburg erneut auf ein SDS-Gel aufgetragen, die zu analysierenden Proben aus dem Gel ausgeschnitten und mittels Maldi-Tof-Massenspektrometrie untersucht. Eine für die Identifizierung ausreichende Menge an Protein war nur für die Proteinbanden B und C (siehe Abb. 30) gegeben. Die mittels Maldi-Tof-Massenspektrometrie identifizierten Proteine sind in Tab. 11 wiedergegeben. Deren Funktion und Spekulationen über ihre Rolle als Kofaktoren der PFV Integration werden in Kapitel 4.2 der Diskussion behandelt. Nachdem in den oben beschriebenen Pull-Down-Experimenten wiederholt die mittels Massenspektrometrie identifizierten potentiellen mit der PFV-IN-interagierenden zellulären Proteine ADAR1 und NF90 detektiert werden konnten, sollten die Interaktionen, im Falle einer spezifischen Interaktionen, mittels direkter Ko-Immunpräzipitation durch den ANTI-FLAG-M2-monoklonalen Antikörper ohne Zugabe von Kernextrakten ebenfalls nachweisbar sein (siehe Abb. 29B).

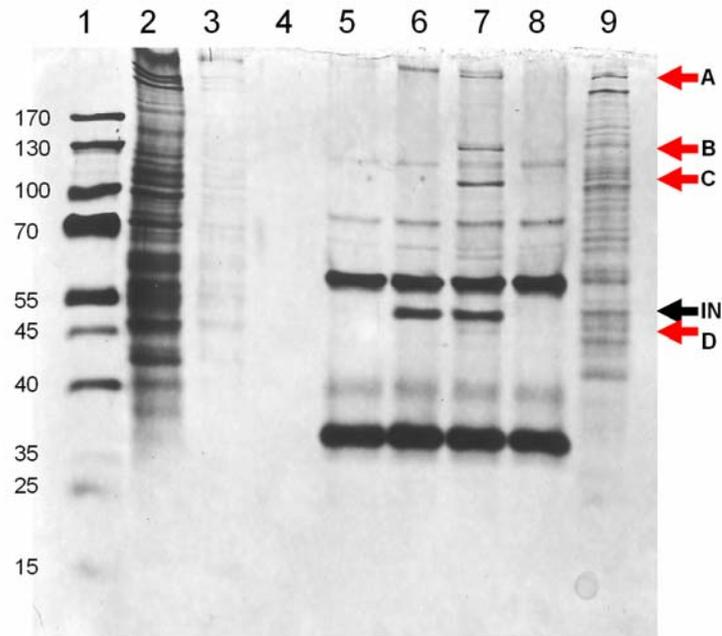


Abb. 30: Pull-Down zur Identifikation von mit PFV-IN interagierenden zellulären Proteinen

Silbergefärbtes SDS-Gel des Pull-Down-Experiments. Die Spuren 2-6 stellen die initialen Aufreinigung von INC-Flag (Spur 6) zusammen mit der Negativkontrolle (Spur 5) und den Überständen der Waschschrte 1-3 dar (Spur 2: 1. Waschschrte; Spur 3: 2. Waschschrte; Spur 4: 3. Waschschrte). Die Spuren 7 und 8 geben die Ergebnisse der zweiten Aufreinigung des INC-Flag-Proteins (Spur 7) zusammen mit der Negativkontrolle (Spur 8) nach Zugabe von 200µg Kernextrakt wieder. Spur 9: Der Überstand aus dem ersten Waschschrte nach Zugabe von Kernextrakt; Spur 1: Proteinmarker in kD. Rote Pfeile markieren die Proteinbanden aus Spur 7, die mit dem INC-Flag-Protein koimmunpräzipiert wurden.

Tab. 11: MALDI-ToF-Massenspektrometrie der mit der PFV IN interagierenden Proteine

Proteinbande (Abb 21; Spur 7)	Name	Nummer	Molekulare Masse (kD)
B	double-stranded RNA-specific adenosin deaminase (DSRAD) ADAR1	P55265	137
C	nuclear factor of activated T-cells 90kD (NF90)	Q12906	95

Hierfür wurden die gleichen oben beschriebenen 100CSK-Zellysate verwendet. 1ml der HT1080- und HT1080/INC-Flag-Lysate wurde mit 20µl FLAG-beads auf dem Rad bei 4°C über Nacht inkubiert, 3-mal mit 1ml 0,1% NP-40 100CSK-Puffer gewaschen, in 100µl 2xPPP aufgenommen, für 5 min bei 95°C gekocht und jeweils 30µl auf ein SDS-Gel aufgetragen. Es folgte eine Silberfärbung der SDS-Gele sowie ein Western Blot mit NF90-spezifischen Antikörpern (α -DRBP76). Die Ergebnisse einer solchen Ko-Immunitäzitation sind in Abb. 31 zu sehen. Nach der Silberfärbung der SDS-Gele fielen, obwohl unter diesen Bedingungen deutlich mehr unspezifisch gebundene Proteine zu sehen waren zwei Proteinbanden auf, welche in der Negativkontrolle nicht zu finden waren. Laut ihrer molekularen Größe standen die Proteinbanden in guter Übereinstimmung mit den in Pull-Down-Experimenten identifizierten Proteine (siehe Abb. 31B). Ein zusätzlicher Western Blot mit NF90-spezifischen Antikörpern brachte den Beweis, dass tatsächlich das NF90-Protein mit PFV-IN immunpräzipitiert wurde (siehe Abb. 31A, Spur 5). Ein Western Blot mit DSRAD spezifischen Antikörpern wurde nicht durchgeführt.

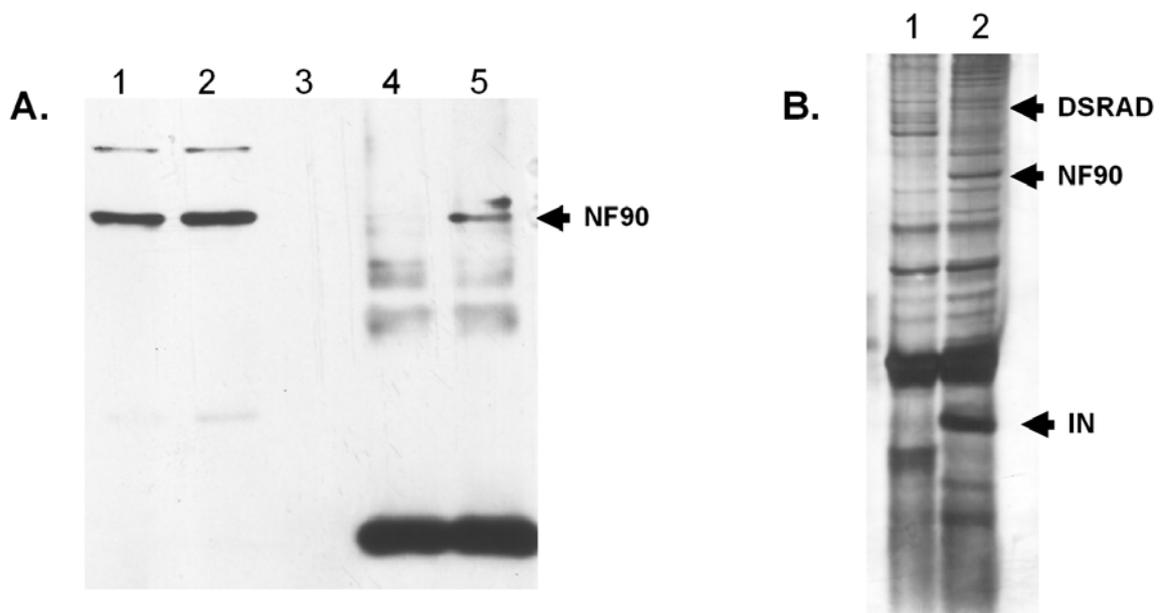


Abb. 31: Ko-Immunitäzitation von NF90 und DSRAD mit Flag spezifischen Antikörpern

(A) Immunpräzipitation von PFV IN mit ANTI-Flag M2 Antikörper und Western Blot mit NF90-spezifischem Antikörper (DRBP76). Spur 1: Lysate von HT1080-Zellen; Spur 2: Lysate von HT1080/INC-Flag-Zellen; Spur 3: Überstand aus dem 1. Waschschrift; Spur 4: Immunpräzipitation der HT1080-Lysate; Spur 5: Immunpräzipitation der HT1080/INC-Flag-Lysate. (B) Silberfärbung der Immunpräzipitation, Spur 1: Immunpräzipitation der HT1080-Lysate; Spur 2: Immunpräzipitation der HT1080/INC-Flag-Lysate. (B) Silbergefärbtes SDS-Gel des gleichen Experiments. Spur 1: Immunpräzipitation der HT1080-Lysate; Spur 2: Immunpräzipitation der HT1080/INC-Flag-Lysate

3.3.4 Untersuchungen über die Funktion der mit PFV-Integrase interagierenden zellulären Proteinen

Um eine mögliche Funktion der in Pull-Down-Experimenten identifizierten mit dem PFV IN-Protein interagierenden Proteine NF90 und ADAR1 (siehe Tab. 11) im Replikationszyklus von FV oder während der Integrationsreaktion genauer zu untersuchen, wurde versucht, über die siRNA-Technologie eine Senkung in der zellulären Expression beider Proteine zu bewirken, um so einen möglichen Einfluss auf die FV-Replikation oder Integration zu analysieren. Wie in Kapitel 2.7 ausführlich beschrieben wurde die Expression von NF90- und ADAR1-spezifischen siRNAs mittels speziell hierfür entwickelten lentiviral basierten Vektoren bewerkstelligt in die siRNA Sequenzen für beide Proteine in unabhängigen Konstrukten eingeführt wurden. Nach der Trennung der erfolgreich transduzierten Zellen im Zellsorter (mit freundlicher Unterstützung von Christian Linden im eigenen Haus durchgeführt), folgte nach der Lyse der siRNA exprimierenden Zellen sowie der nicht siRNA-exprimierenden Zellen, ein Western Blot zur Quantifizierung der Proteine. Hierfür wurden gleiche Zellzahlen lysiert und die gleiche Proteinkonzentration aufgetragen. Ein Western Blot wurde im Rahmen dieser Arbeit nur für NF90 durchgeführt und nicht für ADAR1. Wie in Abb. 32 zu erkennen ist, konnte mit einem der 3 untersuchten Klone (siehe Abb. 32; Spur 2) eine im Vergleich zu den nicht transduzierten Zellen (siehe Abb. 32; Spur 1) geringere NF90-Konzentration festgestellt werden, welche vermutlich durch die siRNA-Sequenzen ausgelöst wurde. Eine im Western Blot zusätzliche detektierbare unspezifische Bande, welche mit dem NF90-spezifischen polyklonalen Antikörper nachweisbar war, kann in diesem Fall zur Kontrolle über den Einsatz von vergleichbaren Mengen an Zell-Lysaten dienen (siehe Abb. 32; Kontrolle). Trotz der Herunterregulierung von NF90 erwies sich jedoch eine weitere Arbeit zur Untersuchung möglicher Funktionen während der Integrationsreaktion von FV, mit diesen Zellen als schwierig, da als Folge der Senkung von NF90 oder anderen uns unbekanntem Gründen, die Wachstumsrate der siRNA-behandelten Zellen im Vergleich zu normalen Zellen drastisch gesenkt wurde. Unter diesen Bedingungen konnte kein Vergleich über die Integrationseffizienz oder Replikationsfähigkeit von FV zwischen normalen Zellen und Zellen, welche NF90 in geringeren Mengen exprimieren, angestellt werden (siehe 4.2)

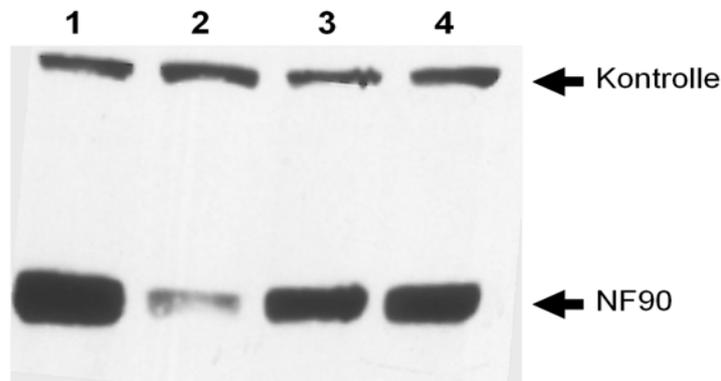


Abb. 32: Western Blot zur Quantifizierung von NF90 nach der Anwendung von NF90-spezifischen siRNAs

Western Blot mit NF90-spezifischen Antikörper (α -DRBP76; siehe 2.1.6) von Lysaten aus normalen HT1080-Zellen (Spur 1) und Zellen, welche mit lentiviralen Vektoren die gegen NF90-gerichtete siRNAs exprimieren (Spur 2-4). Bei den Lysaten aus Spur 2-4 handelt es sich um Zellen die mit unterschiedlichen lentiviralen Vektoren transduziert wurden, welche die identische siRNA Sequenz enthalten sollten, aber aufgrund von Sekundärstrukturen, die von den speziell für die siRNA-Expression konstruierten Oligonukleotiden verursacht werden, nicht vollständig sequenziert werden konnten.

Gleiche Beobachtungen wurden mit den für ADAR1 spezifischen siRNAs gemacht. Obwohl in diesem Fall kein Western Blot zum Nachweis einer erfolgreichen herunterregulierung von ADAR1 gemacht wurde, konnte eine drastische Verringerung in der Wachstumsrate der Zellen beobachtet werden, welche ähnlich wie bei NF90 keine Analyse über die Funktion des Proteins erlaubten. Der Einfluß von ADAR1 an der Regulierung des Zellzyklus wurde vor kurzem von einer anderen Arbeitsgruppe ebenfalls beschrieben (Wang et al., 2006b).

Die Funktion dieser identifizierten Proteine im Bezug auf die foamyvirale Integration und Replikation bleibt im Unklaren und kann aufgrund der offensichtlichen Involvierung beider Proteine an der Regulation der Zellteilung, nicht über die siRNA-Technik analysiert werden. Weitere anders konstruierte Experimente sind erforderlich um eine mögliche Rolle von NF90 und ADAR1 im Replikationszyklus von Spumaviren genauer zu charakterisieren (siehe 4.2).

4 Diskussion

4.1 Vergleich der Retroviralen Integrationsmuster

Zur Analyse des Integrationsmusters foamyviral-basierter Vektoren wurden in dieser Arbeit mittels inverser PCR 628 PFV-, 141 MLV- und 87 HIV-1-Integrationsstellen (IS) im humanen Genom lokalisiert. Anhand der geringeren Anzahl an mit analysierten MLV- und HIV-1-IS und der guten Übereinstimmung der für diese Viren erhaltenen Integrationsmuster mit zuvor von anderen Gruppen publizierten Daten (Mitchell et al., 2004; Schröder et al., 2002; Wu et al., 2003), wird ersichtlich, dass die experimentelle Durchführung und die Methode der inversen PCR eine statistisch erwartungstreue Evaluierung des PFV-Integrationsmusters ermöglicht haben.

Die Resultate dieser Studie zeigen, dass Foamyviren im Vergleich zu MLV und HIV-1 unterschiedliche Präferenzen für die Integration in bestimmte chromosomale Regionen aufweisen, die auf ein näher dem Zufall folgendem Integrationsmuster hindeuten. Statistisch signifikante Unterschiede wurden am deutlichsten bei der Betrachtung der Integrationsfrequenz in sogenannte RefSeq-Gene (siehe 3.2.2), der Nähe der Integrationsstellen zu den TSS von Genen (siehe 3.2.4) und CpG-reichen Inseln (siehe 3.2.6). FV zeigen im Vergleich zu einer rein mittels Computersimulation erhaltenen zufälligen Verteilung der IS und im Gegensatz zu HIV-1, welches signifikante Präferenzen für die Integration in Gene aufweist und MLV, das die Integration in der Nähe von TSS- und CpG-reichen Inseln bevorzugt, keine Präferenz zur Integration in RefSeq-Gene sowie keine starken Präferenzen zur Integration in der Nähe von TSS- und CpG-reichen Inseln. Jedoch zeigt sich im Falle einer Integration in RefSeq-Gene, ähnlich wie bei MLV, eine deutliche Präferenz für die ersten Genssegmente, welche näher zum TSS liegen (siehe 3.2.2). Zudem konnten bei genauerer Betrachtung der Basenzusammensetzungen an der Zielsequenz der klonierten PFV-IS im humanen Genom, im Einklang mit bereits bekannten Präferenzen bestimmter Basen um den IS von HIV-1 und MLV (Holman and Coffin, 2005; Wu et al., 2005), statistisch signifikante Abweichungen von der allgemeinen zufälligen Basenverteilung im humanen Genom festgestellt werden, die ebenfalls auf eine Bevorzugung und Vermeidungen bestimmter Basen an der nach der Integration duplizierten Zielsequenz des humanen Genoms hindeuten (siehe 3.2.7).

In Tabelle 12 sind die Präferenzen zur Integration in Gene, in der Nähe zu TSS und in der Nähe zu CpG-reichen Inseln von allen bis heute untersuchten Retroviren zusammengefasst.

Tab. 12: Die Integrations-Präferenzen verschiedener Retroviren

Virus	Gene	TSS	CpG-reiche Inseln	Referenz
HIV	+	-	-	(Schröder et al., 2002) (Wu et al., 2003)
SIV	+	-	-	(Hematti et al., 2004)
MLV	±	+	+	(Wu et al., 2003) (Mitchell et al., 2004) (Hematti et al., 2004)
ALV	±	-	-	(Narezkina et al., 2004)
ASLV	±	-	-	(Mitchell et al., 2004)
PFV	-	±	±	(Trobridge et al., 2006) (Nowrouzi et al., 2006)
EIAV	+	-	±	(Hacker et al., 2006)
HTLV-1	±	-	-	(Derse et al., 2007)

Im Folgenden werden die Ergebnisse, welche die oben zusammengefasste Schlussfolgerung des PFV-Integrationsmusters im humanen Genom unterstützen, und die experimentelle Durchführung genauer diskutiert und Hypothesen geliefert, welche die nicht zufällige und viruspezifische Verteilung der RIS (siehe Tab. 12) adressieren.

4.1.1 Die chromosomale Verteilung der Integrationsstellen

Bei der Betrachtung der Integrationsfrequenzen von PFV, MLV und HIV-1 in die einzelnen humanen Chromosomen wird ersichtlich, dass zwischen den hier untersuchten Retroviren unterschiedliche Präferenzen für die Integration existieren (siehe 3.2.1; Abb. 17 B). Weder eine karyotypische Analyse der hier verwendeten 293-Zelllinie (mit freundlicher Unterstützung von A. Hörnig und Prof. H. Höhn), die keine auffallenden Abnormalitäten in der Anzahl einzelner Chromosomen zeigte (Daten nicht gezeigt), noch eine Untersuchung

über die Korrelation zwischen Integrationshäufigkeit und Chromosomengröße lieferten Gründe, welche die beobachteten Präferenzen von HIV-1 in Chromosom 16, 17, 19 und 22 und von MLV in Chromosom 17 zu integrieren, erklären könnten. Diese Präferenzen von HIV-1 und MLV für individuelle Chromosomen sind von anderen Gruppen ebenfalls detektiert worden, wobei die Gründe hierfür auch noch unklar sind (Mitchell et al., 2004; Schröder et al., 2002). Wahrscheinlich spiegelt die beobachtete Verteilung der HIV-1-IS die Präferenz von HIV-1, in Gene zu integrieren wieder, denn die signifikante Bevorzugung individueller Chromosomen ist unabhängig von der Größe auf die besonders genreichen Chromosomen 16, 17, 19 und 22 beschränkt, so dass hier auch mehr integrierte provirale Sequenzen lokalisiert sind (Mitchell et al., 2004; Schröder et al., 2002). Für HIV-1 ist diese Verteilung deutlich ausgeprägter als für MLV, was auch in guter Korrelation zu den hier beobachteten Integrationsfrequenzen in RefSeq-Genen steht (siehe 3.2.2; Tab. 9). Vermutlich ist auch aus diesem Grund nach der Analyse der PFV-IS keine Bevorzugung von individuellen Chromosomen, welche genreich sind, detektierbar, da PFV keine Präferenzen zur Integration in Gene aufweist (siehe 3.2.2; Abb. 18).

Eine mögliche Rolle der intrazellulären Position der einzelnen Chromosomen im Zellkern, welche in Abhängigkeit ihrer Gendichte, Genexpression und Größe der Chromosomen in einem hoch dynamischen Modell in verschiedenen Kompartimenten des Zellkerns zu variieren scheinen (Foster and Bridger, 2005), wurde in diesem Zusammenhang ebenfalls diskutiert (Bushman, 2003; Mitchell et al., 2004; Schröder et al., 2002). Hypothesen diesbezüglich basieren auf der Annahme, dass die unterschiedlichen Positionen von genreichen Chromosomen, die mehr im Zellkerninneren liegen, und genarmen Chromosomen, welche eher in der Zellkernperipherie positioniert sind, möglicherweise einen Einfluss auf die retrovirale Integration nehmen könnten. Dies würde zumindestens für HIV-1 und MLV, welche im Gegensatz zu PFV Präferenzen für individuelle Chromosomen besitzen, voraussetzen, dass der Kontakt der viralen DNA mit der chromosomalen DNA auf bestimmte Kompartimente innerhalb des Zellkerns beschränkt ist, während dies für PFV, aufgrund seiner zufälligen Verteilung innerhalb der Chromosomen, eher unwahrscheinlich zu sein scheint. Diesbezüglich existieren bis jetzt lediglich Spekulationen, die in komplizierten Experimenten mithilfe der FISH-Methode (engl: „fluoreszenz *in situ* hybridization“), welche zur Visualisierung von integrierten proviralen Sequenzen auf Chromosomen verwendet werden kann (Laufs et al., 2003), eventuell adressiert werden können. Eine genauere Untersuchung zur Korrelation zwischen dem dynamischen Modell der Chromosomen-Positionierung während der Zellteilung und den Regionen der retroviralen Integration dürfte von großem wissenschaftlichen Wert sein und könnte ergänzende Erklärungen zu den bei HIV-1 und MLV beobachteten Präferenzen für individuelle Chromosomen liefern.

Weiterhin fiel auf, dass die Verteilung der Integrationsstellen innerhalb der Chromosomen nicht gleichmäßig stattfindet. Vielmehr enthält jedes Chromosom große Regionen, in den keine provirale PFV-Sequenzen gefunden wurden, und Regionen, in den eine Anhäufung von IS zu finden waren. Es ist nicht vollkommen auszuschließen, dass die Wahl des Restriktionsenzym, welches zur inversen PCR verwendet wurde, die Klonierung der näher zu den Restriktionsschnittstellen des Enzyms liegenden integrierten proviralen Sequenzen begünstigt hat. In diesem Zusammenhang würde eine eher ungleichmäßige Verteilung des Restriktionsschnittstellen eine Verzerrung der Daten verursachen, die allerdings aufgrund der Tatsache, dass diese Beobachtungen auch für HIV-1 gemacht wurden (Schröder et al., 2002) und die Wahl und der Vergleich von unterschiedlichen verwendeten Enzymen in diesem Fall keine Auswirkung auf die resultierenden Integrationsmuster hatte (Mitchell et al., 2004), eher unwahrscheinlich ist. Es kann also ausgeschlossen werden, dass solche über sehr große Distanzen (Megabasen) vorkommenden ungleichmäßigen Verteilungen der IS durch den Verdau der genomischen DNA verursacht werden, sondern es deutet vielmehr darauf hin, dass möglicherweise andere noch ungeklärte Mechanismen in der regionalen Verteilung der Integrationsereignisse entlang der Chromosomen beteiligt sind und dass chromosomale Regionen existieren, welche zum einen bevorzugt werden, aber auch Regionen, welche die retrovirale Integration nicht unterstützen. Solche Beobachtungen wurden ebenfalls in einer anderen Studie zur Analyse des foamyviralen Integrationsmusters in HSZ gemacht (Trobridge et al., 2006).

4.1.2 Die Integration in transkribierende Bereiche

Die Integration des Virus in die chromosomale DNA des Wirts ist wie in Kapitel 1.3 bereits erläutert ein essentieller Schritt im Lebenszyklus der Retroviren und gewährleistet die produktive Expression der für die Replikation nötigen viralen Gene. Es erscheint plausibel, dass der Ort der Integration im Genom der Wirtszelle, besonders nach der Aufteilung des humanen Genoms in transkriptionsfördernde und transkriptionshemmende Einheiten, die Effektivität der viralen Transkription beeinflusst (Lewinski et al., 2005). Nach der eindrucksvollen Entschlüsselung des menschlichen Genoms wird der prozentuale Anteil von transkribierenden oder codierenden Regionen auf zirka 33 % und die Anzahl an Genen auf 30 000 geschätzt (Venter et al., 2001), die in dem sogenannten RefSeq-Gen Katalog, welcher auf der Grundlage von bekannten mRNA-Molekülen basiert, annotiert sind (Pruitt et al., 2005). In diesem Zusammenhang ist es erstaunlich, dass, obwohl transkribierende Bereiche nur 1/3 des gesamten humanen Genoms umfassen, mehr als

die Hälfte der in dieser und anderen Studien klonierten HIV-1-IS in sogenannten RefSeq-Genen zu finden waren, während die Integrationsfrequenz von PFV in RefSeq-Gene keinerlei Präferenzen aufwies und sogar, wenn auch nur schwach, unter dem nach dem Zufallsprinzip zu erwartendem Wert lag (Abb. 18 & Tab. 9). Ergänzend zum Integrationsmuster von PFV zeigt der Avian Sarcoma Leukosis Virus (ASLV) in humanen Zellen ebenfalls eine ähnliche Vermeidungen transkribierter Einheiten (Mitchell et al., 2004). MLV weist auch schwache Präferenzen für transkribierende Regionen auf, die aber deutlich unter den Werten der Lentiviren liegen. Diese virusspezifischen Unterschiede in der Präferenz zur Integration in transkribierende Regionen deuten darauf hin, dass bestimmte noch nicht eindeutig geklärte Mechanismen bei der Wahl der Selektion von retroviralen Integrationsstellen beteiligt sind, die sich von Virus zu Virus offensichtlich unterscheiden müssen und möglicherweise die evolutionäre Persistenz der verschiedenen Genera der Retroviren je nach ihren Ansprüchen fördern (Bushman, 2003). Versuche mit HIV-1-basierten Vektoren legen nahe, dass eine schwache virale Expression mit der Integration in Regionen, die entweder genarm, heterochromatisch oder sehr stark expremiert werden, korreliert (Lewinski et al., 2005; Maxfield et al., 2005), so dass möglicherweise HIV-1 und seine Präferenz in Gene zu integrieren dem Virus eine Lösung bieten, seine Expression innerhalb der kurzen Lebensdauer der infizierten Zellen auf Höchstleistung zu bringen (Bushman, 2003). Im Fokus steht hier eine schnelle Replikation auf Kosten der Wirtszelle. Auf der anderen Seite würde eine Integration in Regionen, welche die virale Transskription hemmen und nichtkodierend sind, vielleicht der zellulären Maschinerie am wenigsten schaden und die Persistenz des Virus ermöglichen (Bushman, 2003; Lewinski et al., 2005). Eine Strategie, die es den Hefe-LTR-Retrotransposons, die die Integration in genarme Regionen favorisieren (Xie et al., 2001; Zou and Voytas, 1997), möglicherweise ermöglicht, in ihren sehr dicht mit kodierenden Bereichen versehenen Wirt, ohne großen genetischen Schaden zu verursachen, erhalten zu bleiben (Bushman, 2003). Es ist hoch spekulativ, und erfordert ergänzende Versuche, das apathogene Verhalten der Spumaviren und die geringe Virusreplikation in infizierten Organismen auf die hier beobachtete geringe Präferenz, in transkribierte Regionen zu integrieren, zurückzuführen. Jedoch wäre es interessant das Integrationsmuster von hoch transkribierten, integrierten PFV-Sequenzen mit denen von nicht expremierenden proviralen Sequenzen nach Lewinski et al., 2005 zu vergleichen, um die chromosomalen Regionen zu identifizieren, welche die Replikation von FV entweder fördern oder hindern. Letzterer Punkt ist insbesondere interessant, weil *in vitro*-Versuche, welche den Einfluss der Chromatin-Struktur auf die Integration von ASV und HIV-1 untersuchten, darauf hindeuten, dass unterschiedliche Präferenzen für kompakte Chromatin-Strukturen vorhanden sind, die die

Integration von HIV-1 in lockere Chromatin-Konformationen, wie sie in exprimierenden Genen zu finden sind, steuern, während ASV eine kompaktere Struktur, ähnlich wie in weniger aktiven chromosomalen Regionen, bevorzugt (Taganov et al., 2004). Es ist allgemein akzeptiert, dass heterochromatische Regionen eine Transkription des integrierten Vektors beeinträchtigen, so dass Untersuchungen über den Aspekt der Integration in transkriptionsfördernde und transkriptionshemmende chromosomale Regionen und die dort vorhandenen Chromatin-Eigenschaften auch im Zusammenhang mit der bei retroviralen Vektoren beobachteten zellulären Inaktivierung („silencing“) stehen könnten (Ellis, 2005). Im Verlaufe der Expandierung von transduzierten embryonalen oder hämatopoetischen Stammzellen ist eine zunehmende Inaktivierung der Vektoren beobachtet worden, deren Ursachen dem Einfluss benachbarter chromosomaler Regionen zugeschrieben werden, die eine Inaktivierung entweder durch DNA-Methylierung oder durch die Hyperacetylierung der an den RIS vorhandenen, Chromatin-gebundenen Histon-Proteine begünstigen (Yao et al., 2004).

Unklar ist, warum sich bei genauerer Betrachtung der RIS die Verteilung der integrierten proviralen Sequenzen unterscheidet. Bei der Einteilung der Gene in 10 gleich große Segmente (siehe Abb. 19) wurden bei MLV im Gegensatz zu HIV-1 im Einklang mit anderen Studien mehr provirale Sequenzen in den ersten beiden Gensegmenten lokalisiert. HIV-1 favorisierte die Integration in mehr zur Mitte des Gens gelegene Positionen, während PFV ebenfalls, wenn auch deutlich niedriger als die hier klonierten MLV-IS, eine Präferenz in die ersten Gensegmente, welche näher zum TS der Gene lagen zeigte. Vereinfacht lassen sich diese Beobachtungen wie folgt darstellen: Obwohl PFV keine Präferenz für die Integration in transkribierte Regionen aufweist, scheint es bei einer Integration in Gene zu einer bevorzugten Insertion in Gensegmente, welche näher zum TSS gelegen sind, zu kommen, die aber nur etwa 5 % der gesamten hier untersuchten PFV-IS ausmachen.

Bei der Interpretation der oben zusammengefassten Daten muss klargestellt werden, dass die hier angewandte Definition der transkribierenden Regionen sich auf die in der RefSeq-Gen-Annotation-befindlichen potentiell transkribierenden Einheiten beschränkt und nicht auf die zur Zeit der Integration tatsächlich aktiv transkribierten Gene. In anderen Worten erlauben die hier zusammengefassten Ergebnisse nicht, eine Aussage über die Korrelation von aktiv transkribierten Genen und foamyviralen Integrationsstellen zu treffen. Diese Frage wurde in einer anderen im Labor von Prof. David W. Russell an der Universität Washington durchgeführten Studie zur Analyse des PFV-Integrationsmusters in HSZ adressiert. Hier zeigte sich im Gegensatz zu HIV-1 (Mitchell et al., 2004; Schröder et al., 2002) keine Präferenz von PFV in aktiv transkribierte Gene zu integrieren (Trobridge et al., 2006). Zu bemerken ist, dass auch in anderer Hinsicht die Ergebnisse

bezüglich des Integrationsmusters von Spumaviren in Trobridge et al., 2006, trotz anderer experimenteller Durchführungen, mit den hier gelieferten Resultaten gut übereinstimmen. Es bleibt abzuwarten, ob die bei Retroviren beobachteten unterschiedlichen Präferenzen zur Integration in Gene und vor allem zu Integration in unterschiedliche Segmente der Gene auf virusspezifische Interaktionen der PICs mit diversen zellulären Chromatin-bindenden Proteinen zurückzuführen sind (Bushman et al., 2005; Engelman, 2005). Solch ein Modell, in dem mittels den Spezifitäten zellulärer Chromatin-bindender Proteine, welche durch die Interaktion mit Komponenten der PICs die Selektion der RIS regulieren, ist bei LTR-Retrotransposons der Hefe beobachtet worden (Zhu et al., 2003) und könnte auch auf Retroviren zutreffen (Bushman et al., 2005; Cereseto and Giacca, 2004; Ciuffi and Bushman, 2006). Versuche zur Suche zellulärer Interaktionspartner, welche vor allem mit der viralen Integrase interagieren, und die Evaluierung ihrer Funktionen sollte Klarheit in dieser Frage bringen (siehe 4.2).

4.1.3 Die Integration in regulatorische Bereiche

Ein anderer Gesichtspunkt der retroviralen Integration, welcher ebenfalls zur Diversität der virusspezifischen retroviralen Integrationsmuster beiträgt, aber vor allem für die Anwendung von retroviral basierten Vektoren in der somatischen Gentherapie von Bedeutung sein dürfte, betrifft die Präferenzen zur Integration in potentielle regulatorische Bereiche des Genoms. Dieser Aspekt der Integration und das wahrscheinlich damit verbundene erhöhte Risiko zu insertionellen Mutagenese (siehe 1.3.3) ist insbesondere nach den Nebenwirkungen bei drei von neun im Verlaufe der X-SCID-Gentherapie-Studie behandelten Patienten ins Rampenlicht gerückt worden (siehe 1.3.3). Im Verlaufe dieser ansonsten erfolgreich ablaufenden klinischen Studie zur Heilung einer genetisch vererbaren Krankheit des hämatopoitischen Systems wurde erkannt, dass in T-Zellen der drei an Leukämie erkrankten X-SCID-Patienten provirale Integrationen des therapeutischen, auf MLV-basierten Vektors in der Nähe des bekannten LMO2-Proto-Onkogens vorhanden waren (Hacein-Bey-Abina et al., 2003). Diese Insertionen in den retransplantierten HSZ werden zum Teil als Ursache für die in diesen Patienten beobachtete neoplastische Transformation angesehen (Nienhuis et al., 2006).

Kurze Zeit nach diesem für die gentherapeutische Anwendung retroviraler Vektoren tragischen Rückschlag konnten Prof. Shawn M. Burgess und seine Mitarbeiter am National Institutes of Health, Bethesda, USA, zumindest für MLV im Gegensatz zu HIV-1 Präferenzen zur Integration in der Nähe von TSS bekannter Gene und CpG-reicher Inseln

zeigen (Wu et al., 2003), was möglicherweise für das hohe tumorinduzierende Potential der auf MLV-basierten Vektoren, welches auch in Maus-Modellen beobachtet wurde (Li et al., 2002), verantwortlich ist (Nienhuis et al., 2006).

Die Ergebnisse, die hier mit den MLV- und HIV-1-IS produziert und analysiert wurden, entsprechen trotz der im Vergleich anderer Studien geringen Menge an analysierten MLV- und HIV-1-IS erstaunlich genau den zuvor von anderen Gruppen publizierten Tendenzen zur Integration von MLV in regulatorische Bereiche und die Vermeidung dieser Bereiche für HIV-1 (siehe Abb. 20 & Abb. 21). Dies unterstreicht zum einen die Reproduzierbarkeit des hier, basierend auf der Klonierung der RIS mittels inverse PCR, etablierten Testsystems und zum anderen den Ausschluss von systematischen Fehlern, die eine Verzerrung des analysierten PFV- Integrationsmusters verursachen könnte. Geringe Unterschiede sind nur in den absoluten Zahlen zu finden, deren mögliche Ursachen hier angesprochen werden.

Hinsichtlich der Präferenzen von PFV, in regulatorische Bereiche zu integrieren, ist folgende Schlussfolgerung zu ziehen: Im Vergleich zu HIV-1, welches diese Regionen vermeidet, zeigt sich bei der Analyse des PFV-Integrationsmusters eine leichte Präferenz zur Integration in der Nähe der TSS bekannter Gene, die aber deutlich niedriger ausfällt als die hier für MLV ermittelten Werte. Was die Präferenz, in der Nähe von CpG-reichen Inseln zu integrieren, betrifft, zeigt sich ein ähnliches Bild. Hier ist zu erwähnen, dass die Werte, die hier ermittelt wurden, im Allgemeinen für MLV und HIV-1 nahezu zweifach höher liegen als die zuvor in Wu., et al 2003 publizierten Daten. Zum einen kann dies an den unterschiedlich verwendeten Annotationen des veröffentlichten humanen Genoms (November 2002 gegen März 2004 Annotation), an den unterschiedlichen verwendeten Zelllinien, aber auch an der Wahl des zur Klonierung der PFV- und HIV-1 verwendeten Restriktionsenzym *HaeIII* liegen, welches aufgrund seiner GGCC-Erkennungssequenz häufiger in GC-reichen Regionen der CpG-reichen Inseln schneiden könnte und so möglicherweise unerwartet eine Verzerrung der ermittelten Daten verursacht hat. Für die Klonierung der MLV-IS wurde jedoch ein anderes Enzym verwendet (*NlaIII*), das keine GC-reichen Erkennungssequenzen besitzt, so dass hier andere unbekannte Gründe eine Verzerrung der Daten in Richtung der Integration in der Nähe von CpG-reichen Inseln hervorgerufen haben könnten, welche jedoch keinerlei Konsequenzen für die folgende Schlussfolgerung mit sich tragen: Aus den Daten wird ersichtlich, dass MLV die Integration in der Nähe von CpG-reichen Inseln bevorzugt, während PFV ähnlich wie HIV-1, unter der Berücksichtigung der hier im Vergleich anderer Studien allgemeinen höheren absoluten Werte (siehe oben), keine starke Präferenzen für diese Regionen besitzt (siehe Abb. 21).

Die starken Präferenzen von MLV, die im Vergleich eher schwachen Präferenzen von PFV und die für HIV-1 überhaupt nicht vorhandene Bevorzugung, in der Nähe der TSS von Genen zu integrieren, kann rückblickend bereits bei der Betrachtung der Gensegment-Verteilung (siehe Abb. 19) der RIS erkannt werden. Hier zeigte sich schon eine Präferenz von PFV und MLV, stromabwärts in der Nähe der TSS von RefSeq-Genen zu integrieren, die allerdings für PFV bei der Betrachtung der absoluten Zahlen der hier lokalisierten PFV-IS gegenüber MLV zu relativieren ist.

Über die Mechanismen, die eine mögliche Erklärung für die Präferenzen von Retroviren, zum einen bevorzugt in regulatorische Bereiche zu integrieren und zum anderen wie im Falle der Lentiviren diese zu vermeiden, kurieren bis jetzt nur Theorien, die erneut wie oben bereits angesprochen auf die Rolle von zellulären Kofaktoren hindeuten, die im Zusammenspiel mit Komponenten der retroviralen PICs die Integration in regulatorische Regionen begünstigen können oder auch vermeiden. Mögliche Interaktionen der MLV- Integrase mit Transkriptionsfaktoren wurden in diesem Zusammenhang diskutiert, sind aber durch bis zum heutigen Tage fehlende experimentelle Daten schwer zu beweisen. Interessant ist in diesem Zusammenhang das von Prof. Frederik D. Bushman und seinen Mitarbeitern studierte Verhalten von HIV-1-Chimeren, in denen das Integrase- sowie das *gag*-Gen von MLV ersetzt wurden. Das Integrationsmuster von HIV-1 konnte in dieser Studie statistisch signifikant und eindrucksvoll in die Richtung von MLV gelenkt werden. Diese Beobachtung zeigt, dass allein durch die Substitution der Integrase eine erhöhte Präferenz zur Integration in regulatorische Regionen erzielt werden konnte (Lewinski et al., 2006). Diese Resultate unterstützen die Theorie, dass die virale Integrase, aber auch überraschenderweise und unerwartet Derivate der Gag-Proteine höchstwahrscheinlich im Zusammenspiel spezifischer Interaktionen mit zellulären Proteinen die Selektion der RIS mit den resultierenden virusspezifischen Integrationsmustern bestimmen (Lewinski et al., 2006).

Was sind die Gründe und vor allem welche Konsequenzen könnten die in diesem und vorherigen Kapitel beschriebenen unterschiedlichen Integrationsmuster im Bezug auf die Replikation der Retroviren haben?

Zum einen wird ersichtlich, dass die verschiedenen Genera der Orthoretroviren und ebenso die Familie der Spumaviren im Verlaufe ihrer Evolution unterschiedliche Mechanismen entwickelt haben, die es ihnen ermöglichen, ihr Erbgut in verschiedene chromosomale Regionen des Wirtes zu integrieren. Diese sind erstaunlicherweise entgegen klassischen Annahmen nicht in allen Fällen dem Zufallsprinzip folgend und von Virus zu Virus identisch, so dass zu Recht Fragen über die Rolle der Integrationsmuster für das Überleben der Viren gestellt werden, die nicht leicht experimentell zu beantworten sind und deshalb nur aus Hypothesen bestehen.

Ein vielleicht nicht zu vernachlässigender Punkt betrifft den genauen Zeitpunkt des nuklearen Imports und der chromosomalen Integration. Die unterschiedlichen Zellzyklus- Abhängigkeiten gammaretroviraler, foamyviraler und lentiviraler Vektoren wurden bereits in der Einleitung erläutert, so dass möglicherweise auch die Integration zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Zellzykluses stattfinden könnte. Die Fähigkeit der Lentiviren und lentiviralen Vektoren, nicht-teilende Zellen effizient zu transduzieren (Naldini et al., 1996b), und gleichzeitig ihre Favorisierung für transkribierende Regionen könnten möglicherweise von unterschiedlichen chromosomalen Struktureigenschaften während unterschiedlichen Zeitpunkten der Integration herrühren, welche die bevorzugte Integration in Gene begünstigen (Bushman et al., 2005). Ein Vergleich der Integrationsstellen HIV-1-basierter Vektoren in ruhenden Zellen und sich teilenden Zellen erhöhte in diesem Zusammenhang sogar die Favorisierung zur Integration in transkribierte Gene, was beweist, dass in der Tat der Zellzyklus möglicherweise einen geringen Einfluss auf die Wahl der RIS einnehmen kann (Ciuffi et al., 2006). Dieser kann aber nicht allein für die unterschiedlich beobachteten Präferenzen zur Integration in regulatorische Regionen verantwortlich sein.

Eine Theorie zur Erklärung für die von MLV entwickelte Integrationsstrategie, welche mögliche Vorteile für die Replikation des Virus bietet, wurde vor kurzem in sogenannten „Promotor trapping“-Versuchen geliefert. Hier zeigte sich die Präferenz von MLV, in Promotornähe zu integrieren, als eine effiziente Strategie des Virus die zelluläre Transkriptionsmaschinerie zur Expression des im Vektor enthaltenen Markergens zu verwenden, so dass möglicherweise die Integration von MLV in Promotornähe eine Strategie darstellt, die virale Expression durch die Interaktion mit benachbarten zellulären Einflüssen zu optimieren (De Palma et al., 2005a). Dies deutet aber auch auf ein wahrscheinlich erhöhtes Risiko zur insertionellen Mutagenese hin (siehe 4.1.5), die von RIS, welche sich in der Nähe von zellulären Promotoren befinden, ausgeht (De Palma et al., 2005b). Eine andere interessante Beobachtung, die vielleicht eine Erklärung für die bevorzugte Integration von MLV in der Nähe von CpG-reichen Inseln liefert, deutet erneut auf eine im Laufe der Evolution entwickelte Strategie hin, welche gegen die Inaktivierung des Vektors durch DNA-Methylierung gerichtet ist. Es ist nicht verwunderlich, dass bei einer Präferenz zur Integration in der Nähe von TSS der Gene auch Präferenzen zur Integration in der Nähe von CpG-reichen Inseln zu beobachten sind, zumal diese Regionen überwiegend am 5'-Ende von TSS zu finden sind, jedoch könnte eine Integration in diese Regionen unerwartete Bedeutungen für die Expression des integrierten Vektors haben. CpG-reiche Inseln sind normalerweise gegen die zelluläre Methylierungsmaschinerie geschützt und werden nur in Ausnahmefällen methyliert, was eine Inaktivierung von benachbarten Genen zur Folge hat, die seit jüngerer Zeit auf eine

zuvor unterschätzte epigenetische Regulation der Genexpression durch DNA-Methylierung hindeut, was auch eine Bedeutung für die moderne Tumorbologie mit sich zu tragen scheinen (Ducasse and Brown, 2006). Die Einfügung von Fragmenten aus CpG-reichen Inseln neben den Promotoren retroviral-basierter Vektoren bewahrte, vermutlich aufgrund der gegen DNA-Methylierung schützenden Funktion der CpG-reichen Inseln, den Vektor vor Inaktivierung (Hejnar et al., 2001; Williams et al., 2005). In diesem Zusammenhang könnte eine Integration in der Nähe von CpG-reichen Inseln ebenfalls die virale Expression von viralen Promotoren optimieren, die aufgrund häufig enthaltener DNA-Methylierungsstellen, welche besonders bei den LTRs der Gammaretroviren zu finden sind (Ellis, 2005), effizienter inaktiviert werden (Hejnar et al., 2001). Unterstützend zu dieser Hypothese wäre es interessant, den Methylierungsgrad der in der Nähe der RIS enthaltenen CpG-reichen Inseln, mittels moderner molekularbiologischer Methoden (Dupont et al., 2004), genauer zu untersuchen.

Eine Interpretation der foamyviralen Integrationsmuster ist in diesem Zusammenhang schwerer zu deuten, da es weder Präferenzen zur Integration in transkribierende Bereiche, noch starke Präferenzen für regulatorische Regionen aufweist. Ähnlich wie ASLV (Mitchell et al., 2004) erfolgt das foamyvirale Integrationsmuster eher nach dem Zufallsprinzip, mit im Vergleich zu MLV Abweichungen in der Integrationsfrequenz in der Nähe der TSS. Eine Spekulation, die auch für ASLV getroffen wurde (Bushman et al., 2005; Mitchell et al., 2004), deutet darauf hin, dass Retroviren, welche ein eher zufälliges Integrationsmuster besitzen, möglicherweise eine Strategie entwickelt haben, den Schaden im Genom der Wirtszelle so gering wie möglich zu halten. Im Zusammenhang mit dem apathogenen Verhalten der Spumaviren und der bis jetzt weder beim Wildtyp FV, noch bei der Anwendung PFV-basierter Vektoren in präklinischen Modellen aufgetretene insertionelle Mutagenese klingt diese Vermutung plausibel. Zu bemerken ist, dass das Risiko zur insertionellen Mutagenese nicht allein durch die Integration des Vektors begünstigt wird, sondern vielmehr durch die Enhancer- und Promotor-Elemente der viralen LTRs (Laimins et al., 1984a; Skalka et al., 1983), die sich in Hinblick auf die insertionelle Aktivierung zellulärer Gene nicht von Virus zu Virus gleich verhalten. Zudem kann durch die Entwicklung von sogenannten SIN-Vektoren (Zufferey et al., 1998) mit deletierten Enhancer/Promotor-Elementen der LTRs und nicht zuletzt durch die Einfügung von sogenannten Insulator-Sequenzen (Valenzuela and Kamakaka, 2006) in den LTRs, welche die Interaktionen des integrierten Vektors mit den benachbarten zellulären Transkriptionseinheiten verringern (Neff et al., 1997; Ramezani et al., 2003), das Risiko deutlich gesenkt werden (Baum et al., 2006b).

Die hier und in anderen Studien analysierten Integrationsmuster verschiedener retroviral basierter Vektoren zeigt zum einen in Hinsicht auf die angewandte Seite retroviraler

Vektoren in der Gentherapie, dass das Risiko zur insertionellen Mutagenese ausgelöst durch die Integration der Vektoren in unerwünschte chromosomale Regionen nicht für jedes Vektorsystem gleich sein muss, und zum anderen in rein wissenschaftlicher Hinsicht, dass die verschiedenen Genera der Retroviren unterschiedliche Strategien entwickelt haben ihre Integration ins Wirtsgenom zu steuern, die möglicherweise den genetischen Schaden für den Wirt unterschiedlich beeinflussen. Die Evaluierung der einzelnen Integrationsmuster im Hinblick auf die genotoxische Nebenwirkung retroviraler Vektoren kann mit dieser Studie nicht getroffen werden und bedarf der Untersuchung von klinisch relevanten Tiermodellen (Will et al., 2007), welche die vor kurzem enthüllten Auswirkungen von Selektion und klonaler Dominanz vereinzelt transduzierter und retransplantierte HSZ mit spezifischen proviralen Integrationsstellen berücksichtigen (Kustikova et al., 2005; Ott et al., 2006).

4.1.4 Die Nukleotid Zusammensetzung an retroviralen Integrationsstellen

Neben den oben zusammengefassten Ergebnissen bezüglich der Verteilung der PFV-IS auf chromosomaler Ebene wurden zusätzlich die Basenzusammensetzungen der humanen chromosomalen DNA, welche an den hier klonierten PFV-IS vorhanden waren, statistisch untersucht. Im Einklang mit zuvor von anderen Gruppen durchgeführten Studien wurden statistisch signifikante Abweichungen von der rein rechnerisch ermittelten, allgemeinen zufälligen Verteilung der Nukleotide im humanen Genom an PFV-IS gefunden. Diese Abweichungen deuten auf eine Bevorzugung, aber auch auf eine Vermeidung bestimmter Nukleotide an bestimmten Positionen hin, die interessanterweise ähnlich wie HIV-1, MLV und ASLV (Holman and Coffin, 2005; Wu et al., 2005), schwache palindromische Sequenzmotive an den Zielstellen der PFV-Integration erkennen lassen, deren Symmetrie in der Mitte der nach Integration dublizierten Zielsequenz zu finden ist (siehe Abb. 22).

Wie können diese Abweichungen hinsichtlich der in der chromosomalen DNA stattfindenden retroviralen Integration interpretiert werden?

Zur Beantwortung dieser Frage erweist sich ein Einblick in die Struktureigenschaften der in Nukleosomen verpackten genomischen DNA als nützlich. Die Grundeinheit des Chromatins setzt sich bei allen Eukaryoten aus Nucleosomen zusammen, die aus Histon-Oktameren bestehen, welche mit ca. 147 bp der genomischen DNA umwickelt sind und von ca. 10-50 bp Nucleosom-freien DNA-Abschnitten voneinander getrennt werden (Richmond and Davey, 2003). Neuste Studien haben bestätigt, dass die translationale

sowie die rotationale Positionierung der genomischen DNA in diesen Einheiten stark von den Beugungseigenschaften der DNA-Sequenz geprägt ist (Segal et al., 2006). Die Positionierung der DNA in den Nucleosomen bestimmt auch maßgeblich, welche Sequenzabschnitte an der kleinen und großen Furche der DNA-Doppelhelix an der Oberfläche der Nucleosomen vorhanden sind (Richmond and Davey, 2003). Die kleine und die große Furche sind bevorzugte Orte von Protein-DNA-Interaktionen. Im Bezug auf die Basenzusammensetzungen an den PFV-IS könnte möglicherweise die Bevorzugung und Vermeidung bestimmter Basen auf favorisierte Struktureigenschaften der viralen Integrationsmaschinerie für Nucleosom-gebundene genomische DNA hindeuten, welche den komplexen Anforderungen der aufeinander abgestimmten Integration (eng: concerted Integration) zu Recht werden (Holman and Coffin, 2005; Wu et al., 2005).

Die in dieser und in anderen Studien anhand der enorm großen Anzahl an *in vivo* klonierter RIS gemachten Beobachtungen erlauben, eine statistisch signifikante Bevorzugung oder Abweichung zu detektieren, und bestätigen zugleich ältere Ende der achtziger und Anfang der neunziger Jahre publizierte Daten. Diese zum Teil mit rekombinanten IN-Proteinen oder isolierten retroviralen PIC-Komplexen und synthetischen Oligonukleotiden durchgeführte *in vitro*-Experimente deuteten ebenfalls auf bestimmte integrationsfördernde Struktureigenschaften von Nucleosom-gebundener DNA hin (Brown, 1997). Aus diesen klassischen *in vitro*-Studien ging hervor, dass DNA, welche in Nucleosomen verpackt ist, gegenüber sogenannter nackter, nicht mit Histonen verpackter DNA als Integrationsziel bevorzugt wird (Pryciak et al., 1992; Pryciak and Varmus, 1992). Zudem war eine Bevorzugung von stark verdrehter DNA, wie sie auch an der Oberfläche der Nucleosomen zu finden ist, und eine Korrelation zwischen DNase 1-hypersensitiven Stellen und RIS (Vijaya et al., 1986) berichtet worden, die alle durch die Basenzusammensetzung in der Sequenz der Ziel-DNA beeinflusst werden (Müller and Varmus, 1994; Pruss et al., 1994a; Pruss et al., 1994b). In diesem Modell ist die um Nucleosomen gewundene DNA vor allem an der zur Außenseite verdrehten großen Furche der DNA-Doppelhelix der retroviralen Integrationsmaschinerie zugänglich, so dass vermutlich auch in diesen Sequenzbereichen der Strangtransfer stattfindet (Brown, 1997). Die hier an PFV-IS detektierten Abweichungen zur allgemein zufälligen Basenverteilung im humanen Genom resultieren nicht in sequenzspezifischen Zielsequenzen der Integration, sondern weisen darauf hin, dass die Wahrscheinlichkeit für das Vorfinden bestimmter Basen in den Regionen, in denen der Strangtransfer eingeleitet wird, erhöht ist, während andere Basen an diesen Stellen eher vermieden werden. Für die PFV-IS zeigte sich eine statistisch signifikante Bevorzugung von Guanin und Cytosin an den Strangtransfer-Positionen, während Adenin und Thymin hier absolut vermieden

wurden (siehe Abb. 22 & Abb. 23). Eine mögliche Erklärung für diese Basenmuster ist in Wu et al., 2005 gegeben und deutet ebenfalls wie die älteren *in vitro*-Daten auf bevorzugte strukturelle Eigenschaften der retroviralen Integrationsmaschinerie für um Nucleosomen gewundene DNA hin. Die Autoren ermittelten anhand der Sequenzmotive in der Umgebung der RIS von HIV-1, SIV, MLV und ASLV in einem rein mathematischen Modell eine Erhöhung an möglichen strukturellen Veränderungen der DNA, welche allesamt die Verdrehung und Beugung der DNA steigerten sowie die Beschaffenheiten der großen und kleinen Furche der DNA-Doppelhelix für DNA-Protein-Interaktionen zugänglicher machten. Vermutlich wird auch aus diesen Gründen die Integration an solchen Sequenzmotiven bevorzugt. Diese Erkenntnisse könnten zudem auch darauf hindeuten, dass an bevorzugten Kontaktstellen der retroviralen Integrationsmaschinerie mit der Ziel-DNA des Wirts, aufgrund ihrer offensichtlich erhöhten Verdrehung, mehr freie Energie zur Vollendung der Strangtransfer-Reaktion zur Verfügung stehen könnte.

Die oben zusammengefassten Erkenntnisse über die Struktureigenschaften der retroviralen Zielsequenzen in der genomischen DNA des Wirtes treffen, aufgrund der hier ermittelten Bevorzugungen und Vermeidungen bestimmter Basen, sehr wahrscheinlich für Spumaviren auch zu und zeigen, dass neben den unterschiedlichen virusspezifischen Integrationsmustern von Retroviren auch gemeinsame Strategien entwickelt wurden, welche im Laufe der Evolution erhalten geblieben sind und selbst auf ähnliche Weise in den zu Retroviren ferner verwandten *mariner* Transposons (Liu et al., 2005) zu finden sind.

4.1.5 Retrovirale Integrationsmuster und ihre Bedeutung für die Sicherheit in der Gentherapie

Neben dem für die virologische Gemeinde wissenschaftlichen Wert wurde die Analyse des Integrationsmusters verschiedener retroviral basierter Vektoren vor allem hinsichtlich des Risikopotentials zur insertionellen Mutagenese bei der somatischen Gentherapie angeregt. Die Analyse der RIS in humanen Zelllinien oder in HSZ, die in Kultur gehalten wurden, hat zwar zum Verständnis virusspezifischer Integrationsmuster beigetragen und darauf hingedeutet, dass das Risikopotential verschiedener retroviraler Vektoren hinsichtlich insertioneller Mutagenese nicht gleich zu sein scheint, kann aber die komplexeren Mechanismen, die sich in lebenden Organismen abspielen, wie Selektion, klonale Dominanz oder die Einflüsse der verschiedenen Transgene nicht simulieren (Baum et al., 2006a). Unter diesen Einflüssen kann der Selektionsdruck, welcher auf die

transduzierten und retransplantierten HSZ in lebenden Organismen ausgeübt wird, und die insertionelle Aktivierung von Genen, die z.B. die Selbsterneuerungskapazität HSZ erhöht, eine Selektion bestimmter RIS auslösen (Nienhuis et al., 2006). Die grundlegenden Unterschiede zwischen dem Integrationsmuster der Gammaretroviren (MLV) und der Lentiviren (in diesem Fall SIV) wurden in einem klinisch relevanten Tiermodell mit Rhesusaffen, deren Granulozyten und Lymphozyten sechs Monate bis sechs Jahre nach Transplantation mit retroviral transduzierten CD34⁺-Zellen auf RIS untersucht wurden, zwar bestätigt (Hematti et al., 2004), jedoch zeigte sich bei genauerer Untersuchung von 22 Rhesusaffen, die zum Teil sieben Jahre zuvor mit MLV-basierten Vektoren transduzierte und transplantierte CD34⁺-Zellen erhalten hatten, eine überraschende Beobachtung.

In den ca. 700 untersuchten gammaretroviralen IS wurden 14 unabhängige Integrationsereignisse im MDS1-EVI1-Locus lokalisiert, welche in 9 von 22 behandelten Rhesusaffen vorhanden waren (Calmels et al., 2005). Die provirale Insertion in der Nähe des MDS1-EVI1-Locuses wurde interessanterweise zuvor auch in Mausmodellen gemacht, in der das Auftreten von klonaler Dominanz als Folge einer Promotor-Aktivierung durch MLV-basierte Vektoren erstmals beschrieben wurde (Kustikova et al., 2005). Die Wahrscheinlichkeit, 14 Integrationen in einem Locus zu finden, wird als gering eingeschätzt (Calmels et al., 2005; Nienhuis et al., 2006), so dass vermutlich die Integration in diesem Locus und die insertionelle Aktivierung die Fitness einer primitiven CD34⁺-Vorläuferzelle erhöht, die sehr wahrscheinlich zur Dominanz dieser Klone führt, ohne zwingend die Zellen zu transformieren (Kustikova et al., 2005). Solche häufig auftretenden retroviralen Insertionsstellen, die im Englischen als „Common Integration sites“ oder CIS bezeichnet werden, sind schon seit langem vor allem bei onkogenen Retroviren bekannt und in der Regel in der Nähe von Proto-Onkogenen oder anderen den Zellzyklus regulierenden Genen zu finden (Lund et al., 2002; Rosenberg and Jolicoeur, 1997). Bei ALV z.B. ist erforscht, dass 80% der durch den Virus induzierten Tumore provirale Insertionen in der Nähe des bekannten *c-myc*-Onkogens enthalten, das die Expression des Gens beeinflusst (Rosenberg and Jolicoeur, 1997). Die Risiken der Proto-Onkogen-Aktivierung für die somatische Gentherapie mit retroviral basierten Vektoren wurden jedoch als gering angesehen und vielleicht sogar unterschätzt (Cornetta et al., 1991).

Die Promotor-Aktivierung von *MDS1-Evil* sowie von drei weiteren Genen (*PRDM16* und *SETBP1*) durch benachbarte provirale Sequenzen führte in der klinischen Studie zur Heilung der X-CGD-Krankheit (Stein et al., 2006) unter der Leitung von Prof. Manuel Grez am Georg-Speyer-Haus, Frankfurt am Main, ebenfalls zur klonalen Dominanz dieser aktivierten Klone, welche wahrscheinlich durch eine Erhöhung der

Selbsterneuerungskapazität einer primitiven myeloiden Vorläuferzelle verursacht wurden (Ott et al., 2006). Dass insertionelle Mutagenese zur Fitness und unter der Bedingung des dem Selektionsdrucks zur klonalen Dominanz bestimmter Klone beitragen kann, ist eine neue Erkenntnis (Kustikova et al., 2005) und verkompliziert die Interpretation solcher Ereignisse und ihre Auswirkungen für die retrovirale Gentherapie. In der neusten konstruierten IDD-Datenbank (engl: Insertional dominance database) haben Prof. Christopher Baum und seine Mitarbeiter an der Medizinischen Hochschule in Hannover in Kooperation mit anderen Gruppen retrovirale Insertionsstellen, welche zur klonalen Dominanz oder Transformation beigetragen haben, gesammelt und charakterisiert (Kustikova et al., 2007). Die Autoren schlussfolgern aus Analysen der RIS verschiedener auf MLV-, HIV-1- und PFV-basierter Vektoren mit den in der IDD-Datenbank gesammelten Genen, dass das Risiko zur insertionellen Mutagenese unter Berücksichtigung der spezifischen Integrationsmuster, trotz der hier und in Trobridge et al., 2006 für PFV gezeigten geringeren Integrationsfrequenz zur Nähe von TSS, die Wahrscheinlichkeit zur Insertion in IDD-Gene für PFV-basierte Vektoren nur geringfügig gesenkt wird. Das zeigt, dass selbst bei den vermeidlich sicheren Integrationsmustern der PFV-, aber auch HIV-1-basierten Vektoren, wenn auch geringer, trotzdem ein Restrisiko zur zufälligen Insertion in der Nähe unerwünschter Gene bestehen bleibt (Kustikova et al., 2007). Die hier ermittelten PFV-IS wurden ebenfalls auf Insertionen in der Nähe von bekannten Proto-Onkogenen, welche in der Cancer Gene Census“-Datenbank enthalten sind (siehe 2.8.2), mit dem Ergebnis untersucht, dass sich ca. 3 % der PFV-Insertionen in einer Reichweite von 100 kb zu den TSS bekannter Onkogene befanden. Potentielle „hot spots“ der PFV-Integration wurden in einer Reichweite von 250 kb stromaufwärts zum TS des EGFR-Gens (epidermal growth factor receptor), welches 3-mal getroffen wurde, sowie zwei Integrationen in einer Distanz von ungefähr 150 kb stromaufwärts vom TS des FLI1-Gens (friend leukemia virus integration 1) gefunden, deren Auswirkungen im Rahmen dieser Studie nicht untersucht wurden und andere Testsysteme (siehe unten) erfordern.

Überraschenderweise sind die oben beschriebenen Fälle klonaler Dominanz oder die Entstehung von Tumoren seltener mit SIN-Vektoren beobachtet worden. Das Risiko zur insertionellen Mutagenese mittels Promotor-Aktivierung kann deshalb vermutlich allein durch die Deletion von Enhancer/Promotor-Elementen der viralen LTRs und die Nutzung eines internen Promotors, welcher die Transkription des Transgens oder Markergens reguliert, deutlich reduziert werden. Hier ist, wie bereits in der Einleitung angesprochen, zu erwähnen, dass die foamyviralen LTR-Regionen in der Abwesenheit des viralen Tas-Proteins dem SIN-Typ entsprechen und inaktiv sind. Neuste Studien mit transgenen tumoranfälligen Mäusen (eng: Tumor prone mice) deuten ebenfalls auf ein geringeres

Risiko zur Proto-Onkogen-Aktivierung mit lentiviralen SIN-Vektoren hin (Montini et al., 2006), jedoch konnte in einer anderen Studie insertionelle Mutagenese auch mit einem lentiviral basierten SIN-Vektor beobachtet werden, die auf eine Promotor Aktivierung durch einen starken im Vektor enthaltenen internen Promotor hindeutet (Modlich et al., 2006), so dass die richtige Wahl des Promotors in Zukunft ebenfalls überdacht werden muss. Die Einfügung von Chromatin-Insulatoren (Valenzuela and Kamakaka, 2006) in virale Vektoren könnte sich in diesem Zusammenhang als nützlich erweisen (Evans-Galea et al., 2007; Ramezani et al., 2003). Es ist zwingend erforderlich, ergänzend zu den hier analysierten Integrationsmustern, die Sicherheit spumaviraler Vektoren in ähnlich funktionellen Modellen zu testen. Trotz der oben bezüglich lentiviraler SIN-Vektoren beschriebener Daten wurden vor kurzem auch in Mäusen Tumore durch lentivirale Vektoren induziert, die nicht zwingend auf eine insertionelle Mutagenese bekannter Proto-Onkogene schließen lassen, sondern auch andere Mechanismen sowie die Aktivierung von endogenen Retroviren zulassen könnten (Siapati et al., 2007; Themis et al., 2005). Zudem muss seit der Enthüllung funktionaler nichtkodierender RNA-Moleküle (Claverie, 2005; Zamore and Haley, 2005) die Auswirkungen einer veränderten Expression dieser RNA-Moleküle im Bezug auf die genotoxische Wirkung retroviraler Vektoren neu überdacht werden. In diesem Zusammenhang wurden vor kurzem auch retroviral aktivierte miRNAs detektiert, welche vermutlich Tumore induziert haben (Wang et al., 2006a). Auch wenn diese Studie noch nicht von anderen Gruppen bestätigt wurde, könnten aufgrund diverser regulatorischer Funktionen, die miRNAs auszeichnen (Zhang et al., 2007), die Auswirkungen einer Aktivierung von miRNA-Transkripten für den Ausgang einer retroviralen Gentherapie, vor allem aufgrund ihrer jüngst erkannten onkogenen Eigenschaften (Wu et al., 2007), nicht bedeutungslos sein und erfordern genauere Untersuchungen. Interessant ist diesbezüglich auch, dass bevorzugte Chromosomenbruchstellen, die im Englischen als sogenannte „fragil sites“ bezeichnet werden, als CIS retroviraler Vektoren identifiziert wurden (Bester et al., 2007) und diese auch als miRNA-kodierende Regionen bekannt sind (Calin et al., 2004).

Es ist allgemein anerkannt, dass kooperierende und komplexere Ereignisse als nur eine Promotoraktivierung durch den Vektor erforderlich sind, um die Entstehung von Tumoren zu begünstigen (Baum and von Kalle, 2003), so dass zur Zeit neben dem Potential zur Genaktivierung auch die Rolle der in den Vektoren enthaltenen Transgene, die Wahl eines geeigneten Promotors, die Einfügung von Chromatin-Insulatoren sowie die Anzahl an Vektorkopien intensiv in Hinblick auf die genotoxischen Nebenwirkungen retroviraler Vektoren untersucht werden (Baum et al., 2003; Fehse et al., 2004; Nienhuis et al., 2006; von Kalle et al., 2004).

Die in diesem Kapitel zusammengefassten neusten Erkenntnisse über die Mechanismen, die das genotoxische Potential integrierter retroviral basierter Vektoren erhöhen, deuten daraufhin, dass trotz der bis jetzt erfolgreich durchgeführten klinischen Gentherapie-Studien, welche eindrucksvoll in einer Mehrzahl der behandelten Patienten die Korrektur von genetisch vererbaren Krankheiten bewirkt haben, aufgrund der Manipulierung des Erbguts ein Restrisiko von Nebenwirkungen bestehen bleibt, welches nicht allein durch vermeidlich vorteilhaftere Integrationsmuster beseitigt werden kann (Kustikova et al., 2007; Nienhuis et al., 2006). Die Ursachen sind erkannt und werden in Zukunft sehr wahrscheinlich zur Entwicklung komplexerer Vektorsysteme führen, welche die Vorteile verschiedener Vektorsysteme vereinen und die Sicherheit der retroviralen Gentherapie steigern werden (Baum et al., 2006a; Baum et al., 2006b; Verma and Weitzman, 2005). Es ist zwingend erforderlich, die Sicherheit von PFV-basierten Vektoren, besonders aufgrund einiger Vorteile, die sie gegenüber anderen Vektoren mit sich tragen, in klinisch relevanten langjährigen Tiermodellen (Will et al., 2007) auf ihr genotoxisches Potential hin zu untersuchen. Diesbezüglich sind in einer Studie mit Hunden, die mit FV-Vektoren transduzierte und retransplantierte CD34+-Zellen erhalten haben, bis jetzt keine FV-induzierten Komplikationen aufgetreten (Kiem et al., 2007), so dass Spumaviren sehr wahrscheinlich sichere alternative Vektorsysteme darstellen könnten, die ihre Anwendung in der Gentherapie finden sollten.

4.2 Potentielle zelluläre Kofaktoren der PFV Integrase

Die retrovirale Integration *in vivo* stellt Retroviren vor die große Herausforderung, die zellulären Transportwege für ihre Nutzen effizient auszubeuten und durch die Wahl des Integrationsortes in den komplexen Gegebenheiten der chromosomalen DNA die Expression ihres Erbgutes zur Vollendung ihres Replikationszykluses zu nutzen. Die unterschiedlichen, nicht dem Zufall folgenden virusspezifischen Integrationsmuster und die Nutzen, welche diese für die Expression der viralen Gene möglicherweise haben könnten, wurden in den vorherigen Kapitel bereits ausführlich diskutiert. Doch was könnten die Ursachen für diese unterschiedlichen Integrationsmuster sein?

Ohne Zweifel stellen das virale IN-Protein sowie vermutlich auch Derivate der Gag-Proteine die Hauptkomponenten dar, welche die resultierenden Spezifitäten zur Integration in bestimmte chromosomale Regionen dirigieren. Jedoch ist aufgrund der fehlenden Sequenzspezifität aller bis heute untersuchter IN-Proteine *in vitro*, die bis auf gewisse bevorzugte strukturelle Motive der in Nucleosomen verpackten DNA nahezu an

allen Positionen der chromosomalen DNA binden können, die Rolle von zellulärem Chromatin bindenden Proteinen als Kofaktoren der *in vivo*-Integration sehr wahrscheinlich (Bushman et al., 2005; Suzuki and Craigie, 2007). Einige der bekanntesten bis heute identifizierten zellulären Kofaktoren der retroviralen Integration und ihre einzelnen Funktionen, welche sich nicht nur auf die Wahl der Integrationsorte beschränken, sind in der Einleitung bereits zusammengefasst. Anhand der evaluierten Ergebnisse, die gerade mal eine Hand voll potentieller zellulärer Proteine als Kofaktoren der Integration zulassen, wird ersichtlich, dass trotz intensiv durchgeführter Versuche die Identifikation solcher Proteine und die Interpretation ihrer Funktionen bezüglich der Integration die wissenschaftliche Gemeinde vor eine Herausforderung stellt (Turlure et al., 2004; Van Maele et al., 2006). Zudem fehlen noch überzeugende experimentelle Daten, die auf eine direkte Verbindung zellulärer Proteine an der Wahl der RIS und die daraus resultierenden virusspezifischen Integrationsmuster hindeuten (Ciuffi and Bushman, 2006), so dass bis jetzt die Rolle von analysierten zellulären Kofaktoren eher in Prozessen, welche die Struktur der retroviralen PICs, den nuklearen Import und die Affinität der viralen DNA zu Chromatin fördern, zu finden sind (siehe Abb. 9). Kürzlich wurde zwar LEDGF/p75 als ein Faktor beschrieben, welcher die Integration von HIV-1 in transkribierende Einheiten und in LEDGF/p75 regulierte Gene steuert (Ciuffi et al., 2005), jedoch könnten diese Ergebnisse auch darauf beruhen, dass das allgemeine Transkriptionsprofil der Zelle durch die Herunterregulierung von LEDGF/p75 mittels siRNAs verändert wurde, so dass eine genaue Involvierung des Proteins an der Selektion der HIV-1-IS noch vorsichtig in weiteren Experimenten geklärt werden muss. Widersprüchlich ist auch die Tatsache, dass LEDGF/p75 als Transkriptionsfaktor rein hypothetisch an Promotoren zellulärer Gene bindet, während HIV-1 diese Regionen wie hier besprochen vermeidet. In diesem Zusammenhang ist die Rolle von LEDGF/p75 als ein Faktor, der die Wahl der HIV-1-IS steuert, fraglich.

Die hier konstruierten humanen Zelllinien, welche mittels retroviralem Gentransfer das mit einem FLAG-Peptid C-terminal fusionierte PFV IN-Protein stabil exprimieren, haben den Grundstein dafür gelegt, in Pull-down-Experimenten zelluläre Proteine zu identifizieren, welche durch ihre Interaktion mit dem PFV-IN-Protein möglicherweise eine Art von Virus-Wirt-Wechselwirkung repräsentieren, die es den Spumaviren erlaubt, zelluläre Signalwege humaner Zellen für die Vollendung ihrer Integration oder andere Schritte ihres Replikationszyklus auszunutzen. Darüber hinaus können die in humanen Zellen exprimierten PFV-IN-Proteine effizient gereinigt werden und z.B. zur Charakterisierung der viralen in den LTRs enthaltenen „att-sites“ in biochemischen Experimenten mit synthetischen Oligonukleotiden dienen (Craigie et al., 1991).

Zwei der hiergefundenen zellulären Proteine, welche mit der PFV-IN wiederholt koimmunpräzipiert wurden, konnten mittels Maldi-Tof-Massenspektrometrie als nuklear Faktor 90 (NF90) und RNA-spezifische Adenosine Deaminase 1 (ADAR1) identifiziert werden (siehe Tab. 11) und stellen potentielle zelluläre Interaktionspartner der PFV-IN dar.

Über die Funktion von NF90 und ADAR1, während der Integration oder Replikation von FV als Kofaktoren zu wirken, konnten mittels der RNAi-Technologie keine experimentellen Daten geliefert werden, die eine Aussage über die Rolle beider Proteine zulassen, so dass im folgenden Kapitel kurz die Spezifitäten der Proteine und ihre rein hypothetische Bedeutung als Kofaktoren während der FV-Integration oder anderer Stadien der FV-Replikation zusammengefasst werden.

4.2.1 Eigenschaften und spekulative Rolle der identifizierten mit der PFV Integrase interagierende zelluläre Proteine

NF90 wurde erstmals zusammen mit seinem zellulären Interaktionspartner NF45 (nuklear Faktor 45) in einem Komplex mit dem sogenannten Ku-Protein, eine DNA- bindende Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK), aus humanen T-Zellen als ein potentieller Transkriptionsfaktor mit Spezifitäten für in manchen Promotoren befindlichen NF-AT-Bindungsstellen identifiziert (Corthesy and Kao, 1994; Kao et al., 1994; Shi et al., 2007). ADAR1 ist zur gleichen Zeit beschrieben und zunächst als ein Protein angesehen worden, welches die Konvertierung von Adenin zu Inosin in dsRNA bewirkt (Kim et al., 1994a; Kim et al., 1994b), so dass es zu den heute bekannten, im Englischen als „RNA-editing“ bezeichneten Proteinen gezählt werden kann (Valente and Nishikura, 2005). Neben der ursprünglichen Rolle als RNA-editing-Protein werden aus neusten Kenntnissen diesem Protein auch regulatorische Funktionen während der Genexpression und Zellteilung (Nie et al., 2005; Wang et al., 2006b) sowie Chromatin-bindene Eigenschaften zugeschrieben (Herbert et al., 1997; Schade et al., 1999). Beide Proteine gehören zur Klasse der Anfang der neunziger Jahre identifizierten Doppelstrang-RNA-bindenden Proteine (DRBP), die durch die Präsenz eines zwischen Prokaryoten und Eukaryoten hoch konservierten dsRNA-bindendes-Aminosäuren-Motivs (St Johnston et al., 1992) charakterisiert sind und diverse essentielle Funktionen in der Regulation der Genexpression, der Zellteilung und in der Abwehr von viralen Infektionen einnehmen (Saunders and Barber, 2003).

NF90 und seine nur am C-terminalen Ende unterscheidbare Isoform NF110 (nuklear Faktor 110) werden durch alternatives Spleißen vom ILF3-Gen (Interleukin Enhancer Bindungsfaktor 3) transkribiert (Duchange et al., 2000) und sind überwiegend im Zellkern an Chromatin gebunden lokalisiert (Reichman et al., 2003). Interessanterweise wird teilweise während der Mitose, vermutlich ausgelöst durch eine Phosphorylierungs-bedingte Konformationsveränderung, NF90 und NF110 ins Zytoplasma rekrutiert (Parrott et al., 2005). NF90 wird eine Bindung an bestimmten Promotoren zugesagt, die vermutlich in Kooperation mit anderen bis jetzt nicht identifizierten Transkriptionsfaktoren stattfindet und sowohl aktivierend als auch inhibierend auf die Genexpression wirken kann (Reichman et al., 2002). Neben diesen regulatorischen Funktionen interagiert NF90 mit zahlreichen zellulären Komplexen, die alle essentielle Funktionen an der Reparatur von DNA-Strangbrüchen oder an der Chromatin-Reorganisation einnehmen. Wie schon oben angedeutet ist die DNA-bindende Untereinheit des DNA-PK-Komplexes ein Interaktionspartner von NF90 (Ting et al., 1998). Interessanterweise wurde DNA-PK mit den Reparaturen der nach dem Strangtransfer entstehenden Lücken in der Ziel-DNA in Verbindung gebracht (Daniel et al., 2004; Daniel et al., 1999). Ein Befund, der allerdings von anderen Gruppen in Frage gestellt wurde (Ariumi et al., 2005; Baekelandt et al., 2000; Li et al., 2001). Zudem wird NF90 von der Protein-Arginin-Methyltransferase I (PRMT1) methyliert (Tang et al., 2000), was die Affinität von DNA-bindenden Proteinen zu DNA erhöht und die Lokalisation im Zellkern befindlicher Proteinen verändert (Stallcup, 2001). In diesem Zusammenhang wird die post-translationale *in vivo*-Methylierung von Proteinen oft mit der Chromatin-Reorganisation in Verbindung gebracht (Stallcup, 2001).

Die Chromatin-bindenden Eigenschaften, die Interaktion mit einigen DNA-bindenden Komplexen sowie die Interaktion mit PRMT1, welches wiederum durch die Methylierung von Histonen eine aktive Rolle an der Organisation von Chromatin spielt, sowie zuletzt eine aktive Teilnahme an der Regulation der Zellteilung lassen Spekulationen über eine Funktion von NF90 als Kofaktor der foamyviralen Integration auf Ebene der Chromatinbindung oder des nuklearen Imports zu, die in weiteren Experimenten evaluiert werden müssen. Hier könnte NF90 entweder direkt eine Funktion erfüllen oder als ein Verbindungsprotein dienen, welches die Interaktion der foamyviralen Integrationsmaschinerie mit den oben aufgezählten mit NF90 interagierenden Komplexen bewerkstelligt.

ADAR-1 wird hauptsächlich, obwohl es ebenfalls DNA-bindende Eigenschaften besitzt (Herbert et al., 1997; Herbert et al., 1995) und im Zellkern lokalisiert ist (Eckmann et al., 2001), wie oben bereits erwähnt mit so genannten RNA-editing-Aktivitäten in Verbindung gebracht. Auch wenn die Funktion von ADAR1 als Kofaktor der PFV-Integration, aufgrund der primären Aktivität des Proteins als

RNA-editing-Enzym, eher ausgeschlossen werden kann, deuten die im Protein enthaltenen Bindungsstellen für die sogenannte Z-DNA-Konformation der DNA-Doppelhelix (Herbert and Rich, 1999) und die Tatsache, dass ADAR1 häufig in Verbindung mit viralen Infektionen erwähnt wurde (Saunders and Barber, 2003), vielleicht doch auf eine Funktion im Replikationszyklus von FV hin, die ebenfalls noch experimentell untersucht werden muss.

NF90 und ADAR1 scheinen zudem miteinander zu interagieren (Nie et al., 2005), was die Interpretation der in Pull-Down-Experimenten erhaltenen Daten in dem Maße erschwert, dass ohne ergänzende biochemische Versuche mit rekombinanten Proteinen nicht ausgeschlossen werden kann, dass nur einer der beiden mit der PFV-IN-koimmunpräzipierten Proteine möglicherweise mit der IN interagiert, während das andere Protein nur durch seine Interaktion mit dem eigentlichen IN-interagierenden Protein passiv koimmunpräzipiert wird. Es bleibt abzuwarten, ob NF90, ADAR1 oder beide Proteine unabhängig voneinander eine Interaktion mit dem IN-Protein eingehen.

Versuche, die Funktion beider Proteine mittels RNAi induzierter Herunterregulierung zu evaluieren, sind aufgrund der drastischen Abnahme in der Zellteilung, die zum Teil zum Tod der Zellen führte, gescheitert. Es kann zwar nicht ausgeschlossen werden, dass die mittels lentiviralen-Vektoren expremierten shRNAs eine toxische Wirkung auf die Zellen ausgeübt haben, jedoch sind unterstützend zu unseren Ergebnissen für beide Proteine von anderen Gruppen ähnliche Beobachtungen gemacht worden (Wang et al., 2006b), so dass sich die RNAi-basierte Vorgehensweise zur Analyse über die Funktionen von NF90 und ADAR1 im Replikationszyklus von Foamyviren durch eine stabile Herunterregulierung der Proteinexpression, sich nicht als nützlich erwiesen hat. Eine transiente Herunterregulierung der Proteine ist wahrscheinlich möglich (Nie et al., 2005), kann aber aufgrund der kurzen Zeitspanne, in der die Translation der Proteine verringert wird, eine Evaluierung ihrer Funktion während der Integration und Replikation der FV erschweren. Es ist aber dennoch interessant, dass beide der hier identifizierten Proteine eine aktive Rolle in der Regulation der Zellteilung zu spielen scheinen, da es bei einer rein hypothetischen Überlegung nicht abwegig erscheint, dass sich die virale Integrationsmaschinerie die Eigenschaften von Proteinen, welche an der Zellteilung beteiligt sind und so wie NF90 und ADAR1 sogar im Laufe der Mitose ihre intrazelluläre Position kurzzeitig wechseln, zu Nutze macht, um passiv im Verlauf der Zellteilung in den Zellkern zu gelangen. Das foamyvirale IN-Protein besitzt zwar eigene nukleare Lokalisationssignale, aber eine Verbesserung der Kernlokalisation durch die Interaktion mit anderen zellulären Proteinen, sowie im Falle von HIV-1 die Interaktion mit LEDGF/p75 (Maertens et al., 2003), ist sehr wahrscheinlich. Um die hier in Pull-Down-Experimenten identifizierten Interaktionen genauer zu untersuchen, wäre es sinnvoll, die Kolo-kalisation

der Proteine mittels Fluoreszenzmikroskopie zu analysieren. Zudem könnten mit rekombinanten Proteinen in biochemischen Versuchen die Interaktionen bestätigt werden und mögliche Einflüsse der Proteine auf z.B. die Affinität der PFV-IN für Chromatin, ähnlich wie für LEDGF/p75 (Busschots et al., 2005), analysiert werden. Ergänzend zu den oben erwähnten Versuchen muss, um die richtige Faltung des C-terminal mit dem FLAG-Peptide fusionierten IN-Proteins zu bestätigen, die Aktivität des gereinigten IN-Proteins auf seine Funktionalität in *in vitro* getestet werden.

Es wird ersichtlich, dass die vielseitigen Funktionen dieser hier identifizierten Proteine die Untersuchungen im Bezug auf die Integration oder andere Stadien des foamyviralen Replikationszykluses sehr erschweren. Die zellulären IN-interagierenden Proteine besitzen wie bereits in der Einleitung angesprochen ein großes Potential, eine Rolle als Kofaktoren der retroviralen Integration einzunehmen. Neben der Wahl des Integrationsortes können diese auch auf Ebene des nuklearen Imports, der Chromatin-Assoziation und zuletzt der Stabilität des PICs agieren, so dass eine genauere biochemische Untersuchung zu rechtfertigen ist und zudem ein interessanter Einblick in die Wechselwirkungen der Foamyviren mit ihrem Wirt geliefert werden könnte.

5 Literaturverzeichnis

- Achong, B. G., Mansell, P. W., and Epstein, M. A. (1971a): A new human virus in cultures from a nasopharyngeal carcinoma. *Journal of Pathology* **103**, P18.
- Achong, B. G., Mansell, P. W., Epstein, M. A., and Clifford, P. (1971b): An unusual virus in cultures from a human nasopharyngeal carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* **46**, 299-307.
- Aguzzi, A. (1993): The foamy virus family: molecular biology, epidemiology and neuropathology. *Biochimica et Biophysica Acta* **1155**, 1-24.
- Aguzzi, A., Marino, S., Tschopp, R., and Rethwilm, A. (1996): Regulation of expression and pathogenic potential of human foamy virus in vitro and in transgenic mice. *Curr Top Microbiol Immunol* **206**, 243-73.
- Akagi, K., Suzuki, T., Stephens, R. M., Jenkins, N. A., and Copeland, N. G. (2004): RTCGD: retroviral tagged cancer gene database. *Nucleic Acids Res* **32**, D523-7.
- Anderson, W. F. (1984): Prospects for human gene therapy. *Science* **226**, 401-9.
- Antequera, F., and Bird, A. (1993a): CpG islands. *EXS* **64**, 169-85.
- Antequera, F., and Bird, A. (1993b): Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 11995-9.
- Ariumi, Y., Turelli, P., Masutani, M., and Trono, D. (2005): DNA damage sensors ATM, ATR, DNA-PKcs, and PARP-1 are dispensable for human immunodeficiency virus type 1 integration. *J Virol* **79**, 2973-8.
- Baekelandt, V., Claeys, A., Cherepanov, P., De Clercq, E., De Strooper, B., Nuttin, B., and Debyser, Z. (2000): DNA-Dependent protein kinase is not required for efficient lentivirus integration. *J Virol* **74**, 11278-85.
- Baldwin, D. N., and Linial, M. L. (1998): The roles of Pol and Env in the assembly pathway of human foamy virus.[see comment]. *J Virol* **72**, 3658-65.
- Baltimore, D. (1970): RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* **226**, 1209-11.
- Banks, J. D., Yeo, A., Green, K., Cepeda, F., and Linial, M. L. (1998): A minimal avian retroviral packaging sequence has a complex structure. *J Virol* **72**, 6190-4.
- Bao, K. K., Wang, H., Miller, J. K., Erie, D. A., Skalka, A. M., and Wong, I. (2003): Functional oligomeric state of avian sarcoma virus integrase. *J Biol Chem* **278**, 1323-7.
- Bartholomew, C., and Ihle, J. N. (1991): Retroviral insertions 90 kilobases proximal to the Evi-1 myeloid transforming gene activate transcription from the normal promoter. *Molecular & Cellular Biology* **11**, 1820-8.
- Barton, G. M., and Medzhitov, R. (2002): Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 14943-5.
- Barre-Sinoussi, F.; Chermann, J. C.; Rey, F.; Nugeyre, M. T.; Chamaret, S.; Gruest, J.; Dauguet, C.; Axler-Blin, C.; Vezinet-Brun, F.; Rouzioux, C.; Rozenbaum, W and Montagnier, L. (1983): Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868-71.
- Baum, C., Dullmann, J., Li, Z., Fehse, B., Meyer, J., Williams, D. A., and Von Kalle, C. (2003): Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells. *Blood* **101**, 2099-114.
- Baum, C., Kustikova, O., Modlich, U., Li, Z., and Fehse, B. (2006a): Mutagenesis and oncogenesis by chromosomal insertion of gene transfer vectors. *Human Gene Therapy* **17**, 253-63.
- Baum, C., Schambach, A., Bohne, J., and Galla, M. (2006b): Retrovirus vectors: toward the plentivirus? *Mol Ther* **13**, 1050-63.
- Baum, C., and Von Kalle, C. (2003): Gene therapy targeting hematopoietic cells: better not leave it to chance. *Acta Haematologica* **110**, 107-9.
- Beitzel, B., and Bushman, F. (2003): Construction and analysis of cells lacking the HMGA gene family. *Nucleic Acids Res* **31**, 5025-32.
- Bera, S., Vora, A. C., Chiu, R., Heyduk, T., and Grandgenett, D. P. (2005): Synaptic complex formation of two retrovirus DNA attachment sites by integrase: a fluorescence energy transfer study. *Biochemistry* **44**, 15106-14.
- Berkowitz, R., Fisher, J., and Goff, S. P. (1996): RNA packaging. *Current Topics in Microbiology & Immunology* **214**, 177-218.

- Bester, A. C., Schwartz, M., Schmidt, M., Garrigue, A., Hacein-Bey-Abina, S., Cavazzana-Calvo, M., Ben-Porat, N., Kalle, C. V., Fischer, A., and Kerem, B. (2007): Fragile sites are preferential targets for integrations of MLV vectors in gene therapy. *Gene Ther* **14**, 282.
- Bieniasz, P. D., Weiss, R. A., and McClure, M. O. (1995): Cell cycle dependence of foamy retrovirus infection. *J Virol* **69**, 7295-9.
- Bird, A. P. (1986): CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* **321**, 209-13.
- Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-23.
- Bishop, J. M. (1983): Cellular oncogenes and retroviruses. *Annual Review of Biochemistry* **52**, 301-54.
- Blair, W. S., Bogerd, H., and Cullen, B. R. (1994): Genetic analysis indicates that the human foamy virus Bel-1 protein contains a transcription activation domain of the acidic class. *Journal of Virology* **68**, 3803-8.
- Bock, M., Heinkelein, M., Lindemann, D., and Rethwilm, A. (1998): Cells expressing the human foamy virus (HFV) accessory Bet protein are resistant to productive HFV superinfection. *Virology* **250**, 194-204.
- Bodem, J., Löchelt, M., Yang, P., and Flügel, R. M. (1997): Regulation of gene expression by human foamy virus and potentials of foamy viral vectors. *Stem Cells* **15 Suppl 1**, 141-7.
- Bor, Y. C., Miller, M. D., Bushman, F. D., and Orgel, L. E. (1996): Target-sequence preferences of HIV-1 integration complexes in vitro. *Virology* **222**, 283-8.
- Bowerman, B., Brown, P. O., Bishop, J. M., and Varmus, H. E. (1989): A nucleoprotein complex mediates the integration of retroviral DNA. *Genes & Development* **3**, 469-78.
- Bray, M., Prasad, S., Dubay, J. W., Hunter, E., Jeang, K. T., Rekosh, D., and Hammariskjold, M. L. (1994): A small element from the Mason-Pfizer monkey virus genome makes human immunodeficiency virus type 1 expression and replication Rev-independent. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1256-60.
- Brown, P. O. (1997): Integration. In: Coffin, J.M., Hughes, S. H., und Varmus, E. H. (Hrsg.): *Retroviruses. 1. Aufl.*, ColdSpring Harbor Laboratory Press, Cold Spring harbor, New York.
- Brown, P. O., Bowerman, B., Varmus, H. E., and Bishop, J. M. (1987): Correct integration of retroviral DNA in vitro. *Cell* **49**, 347-56.
- Brummelkamp, T. R., Bernards, R., and Agami, R. (2002): A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296**, 550-3.
- Bujacz, G., Jaskolski, M., Alexandratos, J., Wlodawer, A., Merkel, G., Katz, R. A., and Skalka, A. M. (1995): High-resolution structure of the catalytic domain of avian sarcoma virus integrase. *J Mol Biol* **253**, 333-46.
- Bujacz, G., Jaskolski, M., Alexandratos, J., Wlodawer, A., Merkel, G., Katz, R. A., and Skalka, A. M. (1996): The catalytic domain of avian sarcoma virus integrase: conformation of the active-site residues in the presence of divalent cations. *Structure* **4**, 89-96.
- Bukrinsky, M. I., Sharova, N., McDonald, T. L., Pushkarskaya, T., Tarpley, W. G., and Stevenson, M. (1993): Association of integrase, matrix, and reverse transcriptase antigens of human immunodeficiency virus type 1 with viral nucleic acids following acute infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 6125-9.
- Burke, C. J., Sanyal, G., Bruner, M. W., Ryan, J. A., Lafemina, R. L., Robbins, H. L., Zeff, A. S., Middaugh, C. R., and Cordingley, M. G. (1992): Structural implications of spectroscopic characterization of a putative zinc finger peptide from HIV-1 integrase. *J Biol Chem* **267**, 9639-44.
- Burnette, W. N. (1981): "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* **112**, 195-203.
- Bushman, F., Lewinski, M., Ciuffi, A., Barr, S., Leipzig, J., Hannenhalli, S., and Hoffmann, C. (2005): Genome-wide analysis of retroviral DNA integration. *Nature Reviews. Microbiology* **3**, 848-58.
- Bushman, F. D. (2003): Targeting survival: integration site selection by retroviruses and LTR-retrotransposons. *Cell* **115**, 135-8.
- Bushman, F. D., and Craigie, R. (1990): Sequence requirements for integration of Moloney murine leukemia virus DNA in vitro. *J Virol* **64**, 5645-8.
- Bushman, F. D., and Craigie, R. (1991): Activities of human immunodeficiency virus (HIV) integration protein in vitro: specific cleavage and integration of HIV DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 1339-43.

- Bushman, F. D., Engelman, A., Palmer, I., Wingfield, P., and Craigie, R. (1993): Domains of the integrase protein of human immunodeficiency virus type 1 responsible for polynucleotidyl transfer and zinc binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 3428-32.
- Busschots, K., Vercammen, J., Emiliani, S., Benarous, R., Engelborghs, Y., Christ, F., and Debyser, Z. (2005): The interaction of LEDGF/p75 with integrase is lentivirus-specific and promotes DNA binding. *J Biol Chem* **280**, 17841-7.
- Butsch, M., and Boris-Lawrie, K. (2002): Destiny of unspliced retroviral RNA: ribosome and/or virion? *J Virol* **76**, 3089-94.
- Calin, G. A., Sevignani, C., Dumitru, C. D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M., and Croce, C. M. (2004): Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2999-3004.
- Calmels, B., Ferguson, C., Laukkanen, M. O., Adler, R., Faulhaber, M., Kim, H. J., Sellers, S., Hematti, P., Schmidt, M., Von Kalle, C., Akagi, K., Donahue, R. E., and Dunbar, C. E. (2005): Recurrent retroviral vector integration at the Mds1/Evi1 locus in nonhuman primate hematopoietic cells. *Blood* **106**, 2530-3.
- Cannon, P. M., Wilson, W., Byles, E., Kingsman, S. M., and Kingsman, A. J. (1994): Human immunodeficiency virus type 1 integrase: effect on viral replication of mutations at highly conserved residues. *J Virol* **68**, 4768-75.
- Cartellieri, M., Herchenröder, O., Rudolph, W., Heinkelein, M., Lindemann, D., Zentgraf, H., and Rethwilm, A. (2005): N-terminal Gag domain required for foamy virus particle assembly and export. *J Virol* **79**, 12464-76.
- Cereseto, A., and Giacca, M. (2004): Integration site selection by retroviruses. *AIDS Reviews* **6**, 13-21.
- Cereseto, A., Manganaro, L., Gutierrez, M. I., Terreni, M., Fittipaldi, A., Lusic, M., Marcello, A., and Giacca, M. (2005): Acetylation of HIV-1 integrase by p300 regulates viral integration. *Embo J* **24**, 3070-81.
- Charneau, P., Alizon, M and Clavel, F. (1992): A second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication. *J Virol* **66**, 2814-20.
- Chen, H., and Engelman, A. (1998): The barrier-to-autointegration protein is a host factor for HIV type 1 integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15270-4.
- Cherepanov, P., Maertens, G., Proost, P., Devreese, B., Van Beeumen, J., Engelborghs, Y., De Clercq, E., and Debyser, Z. (2003): HIV-1 integrase forms stable tetramers and associates with LEDGF/p75 protein in human cells. *J Biol Chem* **278**, 372-81.
- Choi, G., Park, S., Choi, B., Hong, S., Lee, J., Hunter, E., and Rhee, S. S. (1999): Identification of a cytoplasmic targeting/retention signal in a retroviral Gag polyprotein. *J Virol* **73**, 5431-7.
- Ciuffi, A., and Bushman, F. D. (2006): Retroviral DNA integration: HIV and the role of LEDGF/p75. *Trends in Genetics* **22**, 388-95.
- Ciuffi, A., Llano, M., Poeschla, E., Hoffmann, C., Leipzig, J., Shinn, P., Ecker, J. R., and Bushman, F. (2005): A role for LEDGF/p75 in targeting HIV DNA integration. *Nat Med* **11**, 1287-9.
- Ciuffi, A., Mitchell, R. S., Hoffmann, C., Leipzig, J., Shinn, P., Ecker, J. R., and Bushman, F. D. (2006): Integration site selection by HIV-based vectors in dividing and growth-arrested IMR-90 lung fibroblasts. *Mol Ther* **13**, 366-73.
- Clark, J. M. (1988): Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* **16**, 9677-86.
- Claverie, J. M. (2005): Fewer genes, more noncoding RNA. *Science* **309**, 1529-30.
- Colicelli, J., and Goff, S. P. (1985): Mutants and pseudorevertants of Moloney murine leukemia virus with alterations at the integration site. *Cell* **42**, 573-80.
- Cornetta, K., Morgan, R. A., and Anderson, W. F. (1991): Safety issues related to retroviral-mediated gene transfer in humans. *Hum Gene Ther* **2**, 5-14.
- Corthesy, B., and Kao, P. N. (1994): Purification by DNA affinity chromatography of two polypeptides that contact the NF-AT DNA binding site in the interleukin 2 promoter. *J Biol Chem* **269**, 20682-90.
- Craigie, R., Fujiwara, T., and Bushman, F. (1990): The IN protein of Moloney murine leukemia virus processes the viral DNA ends and accomplishes their integration in vitro. *Cell* **62**, 829-37.
- Craigie, R., Mizuuchi, K., Bushman, F. D., and Engelman, A. (1991): A rapid in vitro assay for HIV DNA integration. *Nucleic Acids Res* **19**, 2729-34.
- Cullen, B. R. (2006): Role and mechanism of action of the APOBEC3 family of antiretroviral resistance factors. *J Virol* **80**, 1067-76.

- Cuypers, H. T., Selten, G., Quint, W., Zijlstra, M., Maandag, E. R., Boelens, W., Van Wezenbeek, P., Melief, C., and Berns, A. (1984): Murine leukemia virus-induced T-cell lymphomagenesis: integration of proviruses in a distinct chromosomal region. *Cell* **37**, 141-50.
- Daniel, R., Greger, J. G., Katz, R. A., Taganov, K. D., Wu, X., Kappes, J. C., and Skalka, A. M. (2004): Evidence that stable retroviral transduction and cell survival following DNA integration depend on components of the nonhomologous end joining repair pathway. *J Virol* **78**, 8573-81.
- Daniel, R., Katz, R. A., and Skalka, A. M. (1999): A role for DNA-PK in retroviral DNA integration. *Science* **284**, 644-7.
- De La Maza, L. M., Faras, A., Varmus, H., Vogt, P. K., and Yunis, J. J. (1975): Integration of avian sarcoma virus specific DNA in mammalian chromatin. *Experimental Cell Research* **93**, 484-6.
- De Palma, M., Montini, E., De Sio, F. R., Benedicenti, F., Gentile, A., Medico, E., and Naldini, L. (2005a): Promoter trapping reveals significant differences in integration site selection between MLV and HIV vectors in primary hematopoietic cells. *Blood* **105**, 2307-15.
- De Palma, M., Montini, E., Santoni De Sio, F. R., Benedicenti, F., Gentile, A., Medico, E., and Naldini, L. (2005b): Promoter trapping reveals significant differences in integration site selection between MLV and HIV vectors in primary hematopoietic cells. *Blood* **105**, 2307-15.
- Delebecque, F., Suspene, R., Calattini, S., Casartelli, N., Saib, A., Froment, A., Wain-Hobson, S., Gessain, A., Vartanian, J. P., and Schwartz, O. (2006): Restriction of foamy viruses by APOBEC cytidine deaminases. *J Virol* **80**, 605-14.
- Delelis, O., Petit, C., Leh, H., Mbemba, G., Mouscadet, J. F., and Sonigo, P. (2005): A novel function for spumaretrovirus integrase: an early requirement for integrase-mediated cleavage of 2 LTR circles. *Retrovirology* **2**, 31.
- Derse, D., Crise, B., Li, Y., Princler, G., Lum, N., Stewart, C., Mcgrath, C. F., Hughes, S. H., Munroe, D. J., and Wu, X. (2007): HTLV-1 integration target sites in the human genome: comparison with other retroviruses. *J Virol*.
- Desgroseillers, L., Villemur, R., and Jolicoeur, P. (1983): The high leukemogenic potential of Gross passage A murine leukemia virus maps in the region of the genome corresponding to the long terminal repeat and to the 3' end of env. *Journal of Virology* **47**, 24-32.
- Dick, J. E., Magli, M. C., Huszar, D., Phillips, R. A., and Bernstein, A. (1985): Introduction of a selectable gene into primitive stem cells capable of long-term reconstitution of the hemopoietic system of W/W^v mice. *Cell* **42**, 71-9.
- Dubridge, R. B., Tang, P., Hsia, H. C., Leong, P. M., Miller, J. H., and Calos, M. P. (1987): Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* **7**, 379-87.
- Ducasse, M., and Brown, M. A. (2006): Epigenetic aberrations and cancer. *Mol Cancer* **5**, 60.
- Duchange, N., Pidoux, J., Camus, E., and Sauvaget, D. (2000): Alternative splicing in the human interleukin enhancer binding factor 3 (ILF3) gene. *Gene* **261**, 345-53.
- Duda, A., Luftenegger, D., Pietschmann, T., and Lindemann, D. (2006): Characterization of the prototype foamy virus envelope glycoprotein receptor-binding domain. *J Virol* **80**, 8158-67.
- Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R. J., Nguyen, M., Trono, D., and Naldini, L. (1998): A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* **72**, 8463-71.
- Dupont, J. M., Tost, J., Jammes, H., and Gut, I. G. (2004): De novo quantitative bisulfite sequencing using the pyrosequencing technology. *Anal Biochem* **333**, 119-27.
- Eastman, S. W., and Linial, M. L. (2001): Identification of a conserved residue of foamy virus Gag required for intracellular capsid assembly. *J Virol* **75**, 6857-64.
- Eckmann, C. R., Neunteufl, A., Pfaffstetter, L., and Jantsch, M. F. (2001): The human but not the *Xenopus* RNA-editing enzyme ADAR1 has an atypical nuclear localization signal and displays the characteristics of a shuttling protein. *Mol Biol Cell* **12**, 1911-24.
- Eglitis, M. A., Kantoff, P., Gilboa, E., and Anderson, W. F. (1985): Gene expression in mice after high efficiency retroviral-mediated gene transfer. *Science* **230**, 1395-8.
- Ellermann, V., and Bang, O. (1908): Experimentelle Leukämie bei Hühnern. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig* **46**, 595-609.
- Ellis, J. (2005): Silencing and variegation of gammaretrovirus and lentivirus vectors. *Hum Gene Ther* **16**, 1241-6.

- Ellison, V., and Brown, P. O. (1994): A stable complex between integrase and viral DNA ends mediates human immunodeficiency virus integration in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 7316-20.
- Emiliani, S., Mousnier, A., Busschots, K., Maroun, M., Van Maele, B., Tempe, D., Vandekerckhove, L., Moisant, F., Ben-Slama, L., Witvrouw, M., Christ, F., Rain, J. C., Dargemont, C., Debyser, Z., and Benarous, R. (2005): Integrase mutants defective for interaction with LEDGF/p75 are impaired in chromosome tethering and HIV-1 replication. *J Biol Chem* **280**, 25517-23.
- Enders, J. F., and Peebles, T. C. (1954): Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. *Proc Soc Exp Biol Med* **86**, 277-286.
- Engelman, A. (2003): The roles of cellular factors in retroviral integration. *Current Topics in Microbiology & Immunology* **281**, 209-38.
- Engelman, A. (2005): The ups and downs of gene expression and retroviral DNA integration. [comment]. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 1275-6.
- Engelman, A., and Craigie, R. (1992): Identification of conserved amino acid residues critical for human immunodeficiency virus type 1 integrase function in vitro. *J Virol* **66**, 6361-9.
- Engelman, A., Englund, G., Orenstein, J. M., Martin, M. A., and Craigie, R. (1995): Multiple effects of mutations in human immunodeficiency virus type 1 integrase on viral replication. *J Virol* **69**, 2729-36.
- Engelman, A., Hickman, A. B., and Craigie, R. (1994): The core and carboxyl-terminal domains of the integrase protein of human immunodeficiency virus type 1 each contribute to nonspecific DNA binding. *J Virol* **68**, 5911-7.
- Engelman, A., Mizuuchi, K., and Craigie, R. (1991): HIV-1 DNA integration: mechanism of viral DNA cleavage and DNA strand transfer. *Cell* **67**, 1211-21.
- Enssle, J., Jordan, I., Mauer, B., and Rethwilm, A. (1996): Foamy virus reverse transcriptase is expressed independently from the Gag protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 4137-41.
- Enssle, J., Moebes, A., Heinkelein, M., Panhuysen, M., Mauer, B., Schweizer, M., Neumann-Haefelin, D., and Rethwilm, A. (1999): An active foamy virus integrase is required for virus replication. *Journal of General Virology* **80**, 1445-52.
- Erlwein, O., Bieniasz, P. D., and McClure, M. O. (1998): Sequences in pol are required for transfer of human foamy virus-based vectors. *J Virol* **72**, 5510-6.
- Erlwein, O., Cain, D., Fischer, N., Rethwilm, A., and McClure, M. O. (1997): Identification of sites that act together to direct dimerization of human foamy virus RNA in vitro. *Virology* **229**, 251-8.
- Evans-Galea, M. V., Wielgosz, M. M., Hanawa, H., Srivastava, D. K., and Nienhuis, A. W. (2007): Suppression of Clonal Dominance in Cultured Human Lymphoid Cells by Addition of the cHS4 Insulator to a Lentiviral Vector. *Mol Ther* **15**, 801-9.
- Falcone, V., Leupold, J., Clotten, J., Urbanyi, E., Herchenröder, O., Spatz, W., Volk, B., Böhm, N., Toniolo, A., Neumann-Haefelin, D., and 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., and Neumann-Haefelin, D. (2003): Replication of primate foamy viruses in natural and experimental hosts. *Current Topics in Microbiology & Immunology* **277**, 161-80.
- Farnet, C. M., and Bushman, F. D. (1997): HIV-1 cDNA integration: requirement of HMG I(Y) protein for function of preintegration complexes in vitro. *Cell* **88**, 483-92.
- Farnet, C. M., and Haseltine, W. A. (1991): Determination of viral proteins present in the human immunodeficiency virus type 1 preintegration complex. *J Virol* **65**, 1910-5.
- Faure, A., Calmels, C., Desjobert, C., Castroviejo, M., Caumont-Sarcos, A., Tarrago-Litvak, L., Litvak, S., and Parissi, V. (2005): HIV-1 integrase crosslinked oligomers are active in vitro. *Nucleic Acids Res* **33**, 977-86.
- Fayet, O., Ramond, P., Polard, P., Prere, M. F., and Chandler, M. (1990): Functional similarities between retroviruses and the IS3 family of bacterial insertion sequences? *Mol Microbiol* **4**, 1771-7.
- Fehse, B., Kustikova, O. S., Bubenheim, M., and Baum, C. (2004): Poisson—it's a question of dose. *Gene Therapy* **11**, 879-81.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-11.

- Fischer, N., Heinkelein, M., Lindemann, D., Enssle, J., Baum, C., Werder, E., Zentgraf, H., Müller, J. G., and Rethwilm, A. (1998): Foamy virus particle formation. *J Virol* **72**, 1610-5.
- Flügel, R. M., and Pfrepper, K. I. (2003): Proteolytic processing of foamy virus Gag and Pol proteins. *Current Topics in Microbiology & Immunology* **277**, 63-88.
- Flügel, R. M., Rethwilm, A., Maurer, B., and Darai, G. (1987): Nucleotide sequence analysis of the env gene and its flanking regions of the human spumaretrovirus reveals two novel genes. *Embo J* **6**, 2077-84.
- Foster, H. A., and Bridger, J. M. (2005): The genome and the nucleus: a marriage made by evolution. Genome organisation and nuclear architecture. *Chromosoma* **114**, 212-29.
- Fujiwara, T., and Mizuuchi, K. (1988): Retroviral DNA integration: structure of an integration intermediate. *Cell* **54**, 497-504.
- Gallo, R. C., Poiesz, B. J., and Ruscetti, F. W. (1981): Regulation of human T-cell proliferation: T-cell growth factor and isolation of a new class of type-C retroviruses from human T-cells. *Haematology & Blood Transfusion* **26**, 502-14.
- Gallo, R. C., Salahuddin, S. Z., Popovic, M., Shearer, G. M., Kaplan, M., Haynes, B. F., Palker, T. J., Redfield, R., Oleske, J., and Safai, B. (1984): Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**, 500-3.
- Gardiner-Garden, M., and Frommer, M. (1987): CpG islands in vertebrate genomes. *Journal of Molecular Biology* **196**, 261-82.
- Gaspar, H. B., and Thrasher, A. J. (2005): Gene therapy for severe combined immunodeficiencies. *Expert Opin Biol Ther* **5**, 1175-82.
- Goepfert, P. A., Shaw, K., Wang, G., Bansal, A., Edwards, B. H., and Mulligan, M. J. (1999): An endoplasmic reticulum retrieval signal partitions human foamy virus maturation to intracytoplasmic membranes. *J Virol* **73**, 7210-7.
- Goepfert, P. A., Shaw, K. L., Ritter, G. D., Jr., and Mulligan, M. J. (1997): A sorting motif localizes the foamy virus glycoprotein to the endoplasmic reticulum. *J Virol* **71**, 778-84.
- Goepfert, P. A., Wang, G., and Mulligan, M. J. (1995): Identification of an ER retrieval signal in a retroviral glycoprotein. *Cell* **82**, 543-4.
- Goff, S. P. (1990): Integration of retroviral DNA into the genome of the infected cell. *Cancer Cells* **2**, 172-8.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., and Nairn, R. (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**, 59-74.
- Hacein-Bey-Abina, S., Fischer, A., and Cavazzana-Calvo, M. (2002a): Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency. *International Journal of Hematology* **76**, 295-8.
- Hacein-Bey-Abina, S., Le Deist, F., Carlier, F., Bouneaud, C., Hue, C., De Villartay, J. P., Thrasher, A. J., Wulffraat, N., Sorensen, R., Dupuis-Girod, S., Fischer, A., Davies, E. G., Kuis, W., Leiva, L., and Cavazzana-Calvo, M. (2002b): Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy.[see comment]. *New England Journal of Medicine* **346**, 1185-93.
- Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C. S., Pawliuk, R., Morillon, E., Sorensen, R., Forster, A., Fraser, P., Cohen, J. I., De Saint Basile, G., Alexander, I., Wintergerst, U., Frebourg, T., Aurias, A., Stoppa-Lyonnet, D., Romana, S., Radford-Weiss, I., Gross, F., Valensi, F., Delabesse, E., Macintyre, E., Sigaux, F., Soulier, J., Leiva, L. E., Wissler, M., Prinz, C., Rabbitts, T. H., Le Deist, F., Fischer, A., and Cavazzana-Calvo, M. (2003): LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1.[see comment][erratum appears in Science. 2003 Oct 24;302(5645):568]. *Science* **302**, 415-9.
- Hacker, C. V., Vink, C. A., Wardell, T. W., Lee, S., Treasure, P., Kingsman, S. M., Mitrophanous, K. A., and Miskin, J. E. (2006): The integration profile of EIAV-based vectors. *Molecular Therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy* **14**, 536-45.
- Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., and Hannon, G. J. (2000): An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells. *Nature* **404**, 293-6.
- Harris, D., and Engelman, A. (2000): Both the structure and DNA binding function of the barrier-to-autointegration factor contribute to reconstitution of HIV type 1 integration in vitro. *J Biol Chem* **275**, 39671-7.
- Hayward, W. S., Neel, B. G., and Astrin, S. M. (1981): Activation of a cellular onc gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukemia. *Nature* **290**, 475-80.
- He, F., Blair, W. S., Fukushima, J., and Cullen, B. R. (1996): The human foamy virus Bel-1 transcription factor is a sequence-specific DNA binding protein. *J Virol* **70**, 3902-8.

- Heinkelein, M., Dressler, M., Jarmy, G., Rammling, M., Imrich, H., Thurow, J., Lindemann, D., and Rethwilm, A. (2002a): Improved primate foamy virus vectors and packaging constructs. *J Virol* **76**, 3774-83.
- Heinkelein, M., Leurs, C., Rammling, M., Peters, K., Hanenberg, H., and Rethwilm, A. (2002b): Pregenomic RNA is required for efficient incorporation of pol polyprotein into foamy virus capsids. *J Virol* **76**, 10069-73.
- Heinkelein, M., Pietschmann, T., Jarmy, G., Dressler, M., Imrich, H., Thurow, J., Lindemann, D., Bock, M., Moebes, A., Roy, J., Herchenröder, O., and Rethwilm, A. (2000a): Efficient intracellular retrotransposition of an exogenous primate retrovirus genome. *EMBO Journal* **19**, 3436-45.
- Heinkelein, M., Rammling, M., Juretzek, T., Lindemann, D., and Rethwilm, A. (2003): Retrotransposition and cell-to-cell transfer of foamy viruses. *J Virol* **77**, 11855-8.
- Heinkelein, M., Schmidt, M., Fischer, N., Moebes, A., Lindemann, D., Enssle, J., and Rethwilm, A. (1998): Characterization of a cis-acting sequence in the Pol region required to transfer human foamy virus vectors. *J Virol* **72**, 6307-14.
- Heinkelein, M., Thurow, J., Dressler, M., Imrich, H., Neumann-Haefelin, D., McClure, M. O., and Rethwilm, A. (2000b): Complex effects of deletions in the 5' untranslated region of primate foamy virus on viral gene expression and RNA packaging. *J Virol* **74**, 3141-8.
- Hejnar, J., Hajkova, P., Plachy, J., Elleder, D., Stepanets, V., and Svoboda, J. (2001): CpG island protects Rous sarcoma virus-derived vectors integrated into nonpermissive cells from DNA methylation and transcriptional suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 565-9.
- Hematti, P., Hong, B. K., Ferguson, C., Adler, R., Hanawa, H., Sellers, S., Holt, I. E., Eckfeldt, C. E., Sharma, Y., Schmidt, M., Von Kalle, C., Persons, D. A., Billings, E. M., Verfaillie, C. M., Nienhuis, A. W., Wolfsberg, T. G., Dunbar, C. E., and Calmels, B. (2004): Distinct genomic integration of MLV and SIV vectors in primate hematopoietic stem and progenitor cells. *Plos Biology* **2**, e423.
- Heneine, W., Schweizer, M., Sandstrom, P., and Folks, T. (2003): Human infection with foamy viruses. *Current Topics in Microbiology & Immunology* **277**, 181-96.
- 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., and Folks, T. M. (1998): Identification of a human population infected with simian foamy viruses.[see comment]. *Nature Medicine* **4**, 403-7.
- Herbert, A., Alfken, J., Kim, Y. G., Mian, I. S., Nishikura, K., and Rich, A. (1997): A Z-DNA binding domain present in the human editing enzyme, double-stranded RNA adenosine deaminase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 8421-6.
- Herbert, A., Lowenhaupt, K., Spitzner, J., and Rich, A. (1995): Double-stranded RNA adenosine deaminase binds Z-DNA in vitro. *Nucleic Acids Symp Ser*, 16-9.
- Herbert, A., and Rich, A. (1999): Left-handed Z-DNA: structure and function. *Genetica* **106**, 37-47.
- Herchenröder, O., Renne, R., Loncar, D., Cobb, E. K., Murthy, K. K., Schneider, J., Mergia, A., and Luciw, P. A. (1994): Isolation, cloning, and sequencing of simian foamy viruses from chimpanzees (SFVcpz): high homology to human foamy virus (HFV). *Virology* **201**, 187-99.
- Herchenröder, O., Turek, R., Neumann-Haefelin, D., Rethwilm, A., and Schneider, J. (1995): Infectious proviral clones of chimpanzee foamy virus (SFVcpz) generated by long PCR reveal close functional relatedness to human foamy virus. *Virology* **214**, 685-9.
- Holman, A. G., and Coffin, J. M. (2005): Symmetrical base preferences surrounding HIV-1, avian sarcoma/leukosis virus, and murine leukemia virus integration sites.[see comment][erratum appears in Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Apr 26;102(17):6238]. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 6103-7.
- Hooks, J. J., and Gibbs, C. J., Jr. (1975): The foamy viruses. *Bacteriological Reviews* **39**, 169-85.
- Hughes, S. H., Mutschler, A., Bishop, J. M., and Varmus, H. E. (1981): A Rous sarcoma virus provirus is flanked by short direct repeats of a cellular DNA sequence present in only one copy prior to integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 4299-303.
- Hughes, S. H., Shank, P. R., Spector, D. H., Kung, H. J., Bishop, J. M., Varmus, H. E., Vogt, P. K., and Breitman, M. L. (1978): Proviruses of avian sarcoma virus are terminally redundant, co-extensive with unintegrated linear DNA and integrated at many sites. *Cell* **15**, 1397-410.
- Hunter, E. (1997): Viral entry and receptors. In: Coffin, J.M., Hughes, S. H., und Varmus, E. H. (Hrsg.): *Retroviruses. 1.Aufl.*, ColdSpring Harbor Laboratory Press, Cold Spring harbor, New York.
- Imrich, H., Heinkelein, M., Herchenröder, O., and Rethwilm, A. (2000): Primate foamy virus Pol proteins are imported into the nucleus. *Journal of General Virology* **81**, 2941-7.

- Jacks, T. (1990): Translational suppression in gene expression in retroviruses and retrotransposons. *Current Topics in Microbiology & Immunology* **157**, 93-124.
- Jacque, J. M., and Stevenson, M. (2006): The inner-nuclear-envelope protein emerlin regulates HIV-1 infectivity.[see comment]. *Nature* **441**, 641-5.
- Johnson, M. S., McClure, M. A., Feng, D. F., Gray, J., and Doolittle, R. F. (1986): Computer analysis of retroviral pol genes: assignment of enzymatic functions to specific sequences and homologies with nonviral enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 7648-52.
- Jones, K. S., Coleman, J., Merkel, G. W., Laue, T. M., and Skalka, A. M. (1992): Retroviral integrase functions as a multimer and can turn over catalytically. *J Biol Chem* **267**, 16037-40.
- Jordan, I., Enssle, J., Guttler, E., Mauer, B., and Rethwilm, A. (1996): Expression of human foamy virus reverse transcriptase involves a spliced pol mRNA. *Virology* **224**, 314-9.
- Josephson, N. C., Trobridge, G., and Russell, D. W. (2004): Transduction of long-term and mobilized peripheral blood-derived NOD/SCID repopulating cells by foamy virus vectors. *Human Gene Therapy* **15**, 87-92.
- Josephson, N. C., Vassilopoulos, G., Trobridge, G. D., Priestley, G. V., Wood, B. L., Papayannopoulou, T., and Russell, D. W. (2002): Transduction of human NOD/SCID-repopulating cells with both lymphoid and myeloid potential by foamy virus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8295-300.
- Joyner, A., Keller, G., Phillips, R. A., and Bernstein, A. (1983): Retrovirus transfer of a bacterial gene into mouse haematopoietic progenitor cells. *Nature* **305**, 556-8.
- Juretzek, T., Holm, T., Gärtner, K., Kanzler, S., Lindemann, D., Herchenröder, O., Picard-Maureau, M., Rammling, M., Heinkelein, M., and Rethwilm, A. (2004): Foamy virus integration. *J Virol* **78**, 2472-7.
- Kang, Y., Blair, W. S., and 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**, 504-11.
- Kao, P. N., Chen, L., Brock, G., Ng, J., Kenny, J., Smith, A. J., and Corthesy, B. (1994): Cloning and expression of cyclosporin A- and FK506-sensitive nuclear factor of activated T-cells: NF45 and NF90. *J Biol Chem* **269**, 20691-9.
- Katzman, M., Katz, R. A., Skalka, A. M., and Leis, J. (1989): The avian retroviral integration protein cleaves the terminal sequences of linear viral DNA at the in vivo sites of integration. *J Virol* **63**, 5319-27.
- Katzman, M., and Sudol, M. (1995): Mapping domains of retroviral integrase responsible for viral DNA specificity and target site selection by analysis of chimeras between human immunodeficiency virus type 1 and visna virus integrases. *J Virol* **69**, 5687-96.
- Keller, G., Paige, C., Gilboa, E., and Wagner, E. F. (1985): Expression of a foreign gene in myeloid and lymphoid cells derived from multipotent haematopoietic precursors. *Nature* **318**, 149-54.
- Kent, W. J. (2002): BLAT—the BLAST-like alignment tool. *Genome Research* **12**, 656–664.
- Khan, E., Mack, J. P., Katz, R. A., Kulkosky, J., and Skalka, A. M. (1991): Retroviral integrase domains: DNA binding and the recognition of LTR sequences. *Nucleic Acids Res* **19**, 851-60.
- Kiem, H. P., Allen, J., Trobridge, G., Olson, E., Keyser, K., Peterson, L., and Russell, D. W. (2007): Foamy-virus-mediated gene transfer to canine repopulating cells. *Blood* **109**, 65-70.
- Kim, U., Garner, T. L., Sanford, T., Speicher, D., Murray, J. M., and Nishikura, K. (1994a): Purification and characterization of double-stranded RNA adenosine deaminase from bovine nuclear extracts. *J Biol Chem* **269**, 13480-9.
- Kim, U., Wang, Y., Sanford, T., Zeng, Y., and Nishikura, K. (1994b): Molecular cloning of cDNA for double-stranded RNA adenosine deaminase, a candidate enzyme for nuclear RNA editing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 11457-61.
- Kirschner, M., Monrose, V., Paluch, M., Techodamrongsin, N., Rethwilm, A., and Moore, J. P. (2006): The production of cleaved, trimeric human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) envelope glycoprotein vaccine antigens and infectious pseudoviruses using linear polyethylenimine as a transfection reagent. *Protein Expr Purif* **48**, 61-8.
- Knodel, M., Kuss, A. W., Lindemann, D., Berberich, I., and Schimpl, A. (1999): Reversal of Blimp-1-mediated apoptosis by A1, a member of the Bcl-2 family. *European Journal of Immunology* **29**, 2988-98.
- Kozak, M. (1986): Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* **44**, 283-92.

- Kulkosky, J., Jones, K. S., Katz, R. A., Mack, J. P and 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* **5**, 2331-8.
- Kulkosky, J., Katz, R. A., Merkel, G., and Skalka, A. M. (1995): Activities and substrate specificity of the evolutionarily conserved central domain of retroviral integrase. *Virology* **206**, 448-56.
- Kustikova, O., Fehse, B., Modlich, U., Yang, M., Dullmann, J., Kamino, K., Von Neuhoff, N., Schlegelberger, B., Li, Z., and Baum, C. (2005): Clonal dominance of hematopoietic stem cells triggered by retroviral gene marking. *Science* **308**, 1171-4.
- Kustikova, O. S., Geiger, H., Li, Z., Brugman, M. H., Chambers, S. M., Shaw, C. A., Pike-Overzet, K., De Ridder, D., Staal, F. J., Von Keudell, G., Cornils, K., Nattamai, K. J., Modlich, U., Wagemaker, G., Goodell, M. A., Fehse, B., and Baum, C. (2007): Retroviral vector insertion sites associated with dominant hematopoietic clones mark "stemness" pathways. *Blood* **109**, 1897-907.
- Laimins, L. A., Gruss, P., Pozzatti, R., and Khoury, G. (1984a): Characterization of enhancer elements in the long terminal repeat of Moloney murine sarcoma virus. *J Virol* **49**, 183-9.
- Laimins, L. A., Tschlis, P., and Khoury, G. (1984b): Multiple enhancer domains in the 3' terminus of the Prague strain of Rous sarcoma virus. *Nucleic Acids Research* **12**, 6427-42.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., Fitzhugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., Levine, R., Mcewan, P., Mckernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J. P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J. C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R. H., Wilson, R. K., Hillier, L. W., Mcpherson, J. D., Marra, M. A., Mardis, E. R., Fulton, L. A., Chinwalla, A. T., Pepin, K. H., Gish, W. R., Chissoe, S. L., Wendl, M. C., Delehaunty, K. D., Miner, T. L., Delehaunty, A., Kramer, J. B., Cook, L. L., Fulton, R. S., Johnson, D. L., Minx, P. J., Clifton, S. W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J. F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., et al. (2001): Initial sequencing and analysis of the human genome.[see comment][erratum appears in Nature 2001 Aug 2;412(6846):565 Note: Szustakowki, J [corrected to Szustakowski, J]]. *Nature* **409**, 860-921.
- Larsen, F., Gundersen, G., Lopez, R., and Prydz, H. (1992): CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics* **13**, 1095-107.
- Laufs, S., Gentner, B., Nagy, K. Z., Jauch, A., Benner, A., Naundorf, S., Kuehlcke, K., Schiedlmeier, B., Ho, A. D., Zeller, W. J., and Fruehauf, S. (2003): Retroviral vector integration occurs in preferred genomic targets of human bone marrow-repopulating cells. *Blood* **101**, 2191-8.
- Lazo, P. A., Lee, J. S., and Tschlis, P. N. (1990): Long-distance activation of the Myc protooncogene by provirus insertion in Mlvi-1 or Mlvi-4 in rat T-cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 170-3.
- Lee, H. S., Kang, S. Y., and Shin, C. G. (2005): Characterization of the functional domains of human foamy virus integrase using chimeric integrases. *Mol Cells* **19**, 246-55.
- Lee, M. S., and Craigie, R. (1994): Protection of retroviral DNA from autointegration: involvement of a cellular factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 9823-7.
- Lee, M. S., and Craigie, R. (1998): A previously unidentified host protein protects retroviral DNA from autointegration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1528-33.
- Lehmann-Che, J., Giron, M. L., Delelis, O., Löchelt, M., Bittoun, P., Tobaly-Tapiero, J., De the, H., and Saib, A. (2005): Protease-dependent uncoating of a complex retrovirus. *J Virol* **79**, 9244-53.
- Leurs, C., Jansen, M., Pollok, K. E., Heinkelein, M., Schmidt, M., Wissler, M., Lindemann, D., Von Kalle, C., Rethwilm, A., Williams, D. A., and Hanenberg, H. (2003): Comparison of three retroviral vector systems for transduction of nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice repopulating human CD34+ cord blood cells. *Human Gene Therapy* **14**, 509-19.

- Levy, J. A., Hoffman, A. D., Kramer, S. M., Landis, J. A., Shimabukuro, J. M., and Oshiro, L. S. (1984): Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* **225**, 840-2.
- Lewinski, M. K., Bisgrove, D., Shinn, P., Chen, H., Hoffmann, C., Hannenhalli, S., Verdin, E., Berry, C. C., Ecker, J. R., and Bushman, F. D. (2005): Genome-wide analysis of chromosomal features repressing human immunodeficiency virus transcription. *J Virol* **79**, 6610-9.
- Lewinski, M. K., Yamashita, M., Emerman, M., Ciuffi, A., Marshall, H., Crawford, G., Collins, F., Shinn, P., Leipzig, J., Hannenhalli, S., Berry, C. C., Ecker, J. R., and Bushman, F. D. (2006): Retroviral DNA integration: viral and cellular determinants of target-site selection. *PLoS Pathogens* **2**, e60.
- Lewis, P., Hensel, M., and Emerman, M. (1992): Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. *Embo J* **11**, 3053-8.
- Li, J., Shen, H., Himmel, K. L., Dupuy, A. J., Largaespada, D. A., Nakamura, T., Shaughnessy, J. D., Jr., Jenkins, N. A., and Copeland, N. G. (1999): Leukaemia disease genes: large-scale cloning and pathway predictions. *Nat Genet* **23**, 348-53.
- Li, L., Farnet, C. M., Anderson, W. F., and Bushman, F. D. (1998): Modulation of activity of Moloney murine leukemia virus preintegration complexes by host factors in vitro. *J Virol* **72**, 2125-31.
- Li, L., Olvera, J. M., Yoder, K. E., Mitchell, R. S., Butler, S. L., Lieber, M., Martin, S. L., and Bushman, F. D. (2001): Role of the non-homologous DNA end joining pathway in the early steps of retroviral infection. *Embo J* **20**, 3272-81.
- Li, L., Yoder, K., Hansen, M. S., Olvera, J., Miller, M. D., and Bushman, F. D. (2000): Retroviral cDNA integration: stimulation by HMG I family proteins. *J Virol* **74**, 10965-74.
- Li, M., and Craigie, R. (2005): Processing of viral DNA ends channels the HIV-1 integration reaction to concerted integration. *J Biol Chem* **280**, 29334-9.
- Li, M., Mizuuchi, M., Burke, T. R., Jr., and Craigie, R. (2006): Retroviral DNA integration: reaction pathway and critical intermediates. *EMBO Journal* **25**, 1295-304.
- Li, Z., Dullmann, J., Schiedmeier, B., Schmidt, M., Von Kalle, C., Meyer, J., Forster, M., Stocking, C., Wahlers, A., Frank, O., Ostertag, W., Kuhlcke, K., Eckert, H. G., Fehse, B., and Baum, C. (2002): Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science* **296**, 497.
- Lin, C. W., and Engelman, A. (2003): The barrier-to-autointegration factor is a component of functional human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *J Virol* **77**, 5030-6.
- Lindemann, D., and Goepfert, P. A. (2003): The foamy virus envelope glycoproteins. *Current Topics in Microbiology & Immunology* **277**, 111-29.
- Lindemann, D., Pietschmann, T., Picard-Maureau, M., Berg, A., Heinkelein, M., Thurow, J., Knaus, P., Zentgraf, H., and Rethwilm, A. (2001): A particle-associated glycoprotein signal peptide essential for virus maturation and infectivity. *J Virol* **75**, 5762-71.
- Linial, M. (2000): Why aren't foamy viruses pathogenic? *Trends in Microbiology* **8**, 284-9.
- Linial, M. L. (1999): Foamy viruses are unconventional retroviruses. *Journal of Virology* **73**, 1747-55.
- Linial, M. L., and Eastman, S. W. (2003): Particle assembly and genome packaging. *Current Topics in Microbiology & Immunology* **277**, 89-110.
- Liu, G., Geurts, A. M., Yae, K., Srinivasan, A. R., Fahrenkrug, S. C., Largaespada, D. A., Takeda, J., Horie, K., Olson, W. K., and Hackett, P. B. (2005): Target-site preferences of Sleeping Beauty transposons. *J Mol Biol* **346**, 161-73.
- Llano, M., Delgado, S., Vanegas, M., and Poeschla, E. M. (2004a): Lens epithelium-derived growth factor/p75 prevents proteasomal degradation of HIV-1 integrase. *J Biol Chem* **279**, 55570-7.
- Llano, M., Vanegas, M., Fregoso, O., Saenz, D., Chung, S., Peretz, M., and Poeschla, E. M. (2004b): LEDGF/p75 determines cellular trafficking of diverse lentiviral but not murine oncoretroviral integrase proteins and is a component of functional lentiviral preintegration complexes. *J Virol* **78**, 9524-37.
- Llano, M., Vanegas, M., Hutchins, N., Thompson, D., Delgado, S., and Poeschla, E. M. (2006): Identification and characterization of the chromatin-binding domains of the HIV-1 integrase interactor LEDGF/p75. *Journal of Molecular Biology* **360**, 760-73.
- Löchelt, M. (2003): Foamy virus transactivation and gene expression. *Current Topics in Microbiology & Immunology* **277**, 27-61.
- Löchelt, M., and 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. *Journal of Virology* **70**, 1033-40.

- Löchelt, M., Muranyi, W., and Flügel, R. M. (1993): Human foamy virus genome possesses an internal, Bel-1-dependent and functional promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7317-21.
- 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., and Munk, C. (2005): The antiretroviral activity of APOBEC3 is inhibited by the foamy virus accessory Bet protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 7982-7.
- Lois, C., Hong, E. J., Pease, S., Brown, E. J., and Baltimore, D. (2002): Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* **295**, 868-72.
- Lu, W., Yamamoto, V., Ortega, B., and Baltimore, D. (2004): Mammalian Ryk is a Wnt coreceptor required for stimulation of neurite outgrowth. *Cell* **119**, 97-108.
- Lund, A. H., Turner, G., Trubetskoy, A., Verhoeven, E., Wientjens, E., Hulsman, D., Russell, R., Depinho, R. A., Lenz, J., and Van Lohuizen, M. (2002): Genome-wide retroviral insertional tagging of genes involved in cancer in Cdkn2a-deficient mice. *Nat Genet* **32**, 160-5.
- Lutzke, R. A., Vink, C., and Plasterk, R. H. (1994): Characterization of the minimal DNA-binding domain of the HIV integrase protein. *Nucleic Acids Res* **22**, 4125-31.
- Maertens, G., Cherepanov, P., Pluymers, W., Busschots, K., De Clercq, E., Debyser, Z., and Engelborghs, Y. (2003): LEDGF/p75 is essential for nuclear and chromosomal targeting of HIV-1 integrase in human cells. *J Biol Chem* **278**, 33528-39.
- Majors, J. E., and Varmus, H. E. (1981): Nucleotide sequences at host-proviral junctions for mouse mammary tumour virus. *Nature* **289**, 253-8.
- Mann, R., Mulligan, R. C., and Baltimore, D. (1983): Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell* **33**, 153-9.
- Mansharamani, M., Graham, D. R., Monie, D., Lee, K. K., Hildreth, J. E., Siliciano, R. F., and Wilson, K. L. (2003): Barrier-to-autointegration factor BAF binds p55 Gag and matrix and is a host component of human immunodeficiency virus type 1 virions. *J Virol* **77**, 13084-92.
- Maxfield, L. F., Fraize, C. D., and Coffin, J. M. (2005): Relationship between retroviral DNA-integration-site selection and host cell transcription.[see comment]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 1436-41.
- Mcdonald, D., Vodicka, M. A., Lucero, G., Svitkina, T. M., Borisy, G. G., Emerman, M., and Hope, T. J. (2002): Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J Cell Biol* **159**, 441-52.
- Meiering, C. D., Comstock, K. E., and Linial, M. L. (2000): Multiple integrations of human foamy virus in persistently infected human erythroleukemia cells. *Journal of Virology* **74**, 1718-26.
- Meiering, C. D., Rubio, C., May, C., and Linial, M. L. (2001): Cell-type-specific regulation of the two foamy virus promoters. *J Virol* **75**, 6547-57.
- Mergia, A., and Heinkelein, M. (2003): Foamy virus vectors. *Current Topics in Microbiology & Immunology* **277**, 131-59.
- Mertz, J. A., Simper, M. S., Lozano, M. M., Payne, S. M., and Dudley, J. P. (2005): Mouse mammary tumor virus encodes a self-regulatory RNA export protein and is a complex retrovirus. *J Virol* **79**, 14737-47.
- Miller, A. D. (1997): Development and applications of retroviral vectors. In: Coffin, J.M., Hughes, S. H., und Varmus, E. H. (Hrsg.): *Retroviruses*. 1.Aufl., ColdSpring Harbor Laboratory Press, Cold Spring harbor, New York.
- Miller, A. D., Eckner, R. J., Jolly, D. J., Friedmann, T., and Verma, I. M. (1984): Expression of a retrovirus encoding human HPRT in mice. *Science* **225**, 630-2.
- Miller, D. G., Adam, M. A., and 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**, 4239-42.
- Miller, M. D., Farnet, C. M., and Bushman, F. D. (1997): Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J Virol* **71**, 5382-90.
- Mitchell, R. S., Beitzel, B. F., Schröder, A. R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C. C., Ecker, J. R., and Bushman, F. D. (2004): Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. *Plos Biology* **2**, E234.
- Modlich, U., Bohne, J., Schmidt, M., Von Kalle, C., Knoss, S., Schambach, A., and Baum, C. (2006): Cell-culture assays reveal the importance of retroviral vector design for insertional genotoxicity. *Blood* **108**, 2545-53.

- Modlich, U., Kustikova, O. S., Schmidt, M., Rudolph, C., Meyer, J., Li, Z., Kamino, K., Von Neuhoff, N., Schlegelberger, B., Kuehlicke, K., Bunting, K. D., Schmidt, S., Deichmann, A., Von Kalle, C., Fehse, B., and Baum, C. (2005): Leukemias following retroviral transfer of multidrug resistance 1 (MDR1) are driven by combinatorial insertional mutagenesis. *Blood* **105**, 4235-46.
- Moebes, A., Enssle, J., Bieniasz, P. D., Heinkelein, M., Lindemann, D., Bock, M., McClure, M. O., and Rethwilm, A. (1997): Human foamy virus reverse transcription that occurs late in the viral replication cycle. *J Virol* **71**, 7305-11.
- Montini, E., Cesana, D., Schmidt, M., Sanvito, F., Ponzoni, M., Bartholomae, C., Sergi, L. S., Benedicenti, F., Ambrosi, A., Di Serio, C., Doglioni, C., Von Kalle, C., and Naldini, L. (2006): Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. *Nature Biotechnology* **24**, 687-96.
- Mooslehner, K., Karls, U., and Harbers, K. (1990): Retroviral integration sites in transgenic Mov mice frequently map in the vicinity of transcribed DNA regions. *J Virol* **64**, 3056-8.
- Müller, H. P., and Varmus, H. E. (1994): DNA bending creates favored sites for retroviral integration: an explanation for preferred insertion sites in nucleosomes. *EMBO Journal* **13**, 4704-14.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G and Erlich, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51**, 263-73.
- Mumm, S. R., and Grandgenett, D. P. (1991): Defining nucleic acid-binding properties of avian retrovirus integrase by deletion analysis. *J Virol* **65**, 1160-7.
- Naldini, L., Blomer, U., Gage, F. H., Trono, D., and Verma, I. M. (1996a): Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11382-8.
- Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., Verma, I. M., and Trono, D. (1996b): In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**, 263-7.
- Narezkina, A., Taganov, K. D., Litwin, S., Stoyanova, R., Hayashi, J., Seeger, C., Skalka, A. M., and Katz, R. A. (2004): Genome-wide analyses of avian sarcoma virus integration sites. *J Virol* **78**, 11656-63.
- Nassal, M. (1996): Hepatitis B virus morphogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* **214**, 297-337.
- Neel, B. G., Hayward, W. S., Robinson, H. L., Fang, J., and Astrin, S. M. (1981): Avian leukosis virus-induced tumors have common proviral integration sites and synthesize discrete new RNAs: oncogenesis by promoter insertion. *Cell* **23**, 323-34.
- Neff, T., Shotkoski, F., and Stamatoyannopoulos, G. (1997): Stem cell gene therapy, position effects and chromatin insulators. *Stem Cells* **15 Suppl 1**, 265-71.
- Netzer, K. O., Schliephake, A., Maurer, B., Watanabe, R., Aguzzi, A., and Rethwilm, A. (1993): Identification of pol-related gene products of human foamy virus. *Virology* **192**, 336-8.
- Neumann-Haefelin, D., Rethwilm, A., Bauer, G., Gudat, F., and Zur Hausen, H. (1983): Characterization of a foamy virus isolated from Cercopithecus aethiops lymphoblastoid cells. *Medical Microbiology & Immunology* **172**, 75-86.
- Nie, Y., Ding, L., Kao, P. N., Braun, R., and Yang, J. H. (2005): ADAR1 interacts with NF90 through double-stranded RNA and regulates NF90-mediated gene expression independently of RNA editing. *Mol Cell Biol* **25**, 6956-63.
- Nienhuis, A. W., Dunbar, C. E., and Sorrentino, B. P. (2006): Genotoxicity of retroviral integration in hematopoietic cells. *Mol Ther* **13**, 1031-49.
- Nowrouzi, A., Dittrich, M., Klanke, C., Heinkelein, M., Rammling, M., Dandekar, T., Von Kalle, C., and Rethwilm, A. (2006): Genome-wide mapping of foamy virus vector integrations into a human cell line. *Journal of General Virology* **87**, 1339-47.
- Ott, M. G., Schmidt, M., Schwarzwaelder, K., Stein, S., Siler, U., Koehl, U., Glimm, H., Kuhlcke, K., Schilz, A., Kunkel, H., Naundorf, S., Brinkmann, A., Deichmann, A., Fischer, M., Ball, C., Pilz, I., Dunbar, C., Du, Y., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Luthi, U., Hassan, M., Thrasher, A. J., Hoelzer, D., Von Kalle, C., Seger, R., and Grez, M. (2006): Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med* **12**, 401-9.
- Pahl, A., and Flügel, R. M. (1993): Endonucleolytic cleavages and DNA-joining activities of the integration protein of human foamy virus. *J Virol* **67**, 5426-34.

- Pahl, A., and 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. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 2957-66.
- Park, J., and Mergia, A. (2000): Mutational analysis of the 5' leader region of simian foamy virus type 1. *Virology* **274**, 203-12.
- Parrott, A. M., Walsh, M. R., Reichman, T. W., and Mathews, M. B. (2005): RNA binding and phosphorylation determine the intracellular distribution of nuclear factors 90 and 110. *J Mol Biol* **348**, 281-93.
- Patton, G. S., Erlwein, O., and McClure, M. O. (2004): Cell-cycle dependence of foamy virus vectors. *Journal of General Virology* **85**, 2925-30.
- Peters, K., Wiktorowicz, T., Heinkelein, M., and Rethwilm, A. (2005): RNA and protein requirements for incorporation of the Pol protein into foamy virus particles. *J Virol* **79**, 7005-13.
- Petit, C., Giron, M. L., Tobaly-Tapiero, J., Bittoun, P., Real, E., Jacob, Y., Tordo, N., De the, H., and 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**, 3433-42.
- Pfrepper, K. I., Löchelt, M., Rackwitz, H. R., Schnolzer, M., Heid, H., and Flügel, R. M. (1999): Molecular characterization of proteolytic processing of the Gag proteins of human spumavirus. *J Virol* **73**, 7907-11.
- Pfrepper, K. I., Löchelt, M., Schnolzer, M., and Flügel, R. M. (1997): Expression and molecular characterization of an enzymatically active recombinant human spumaretrovirus protease. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **237**, 548-53.
- Pfrepper, K. I., Rackwitz, H. R., Schnolzer, M., Heid, H., Löchelt, M., and Flügel, R. M. (1998): Molecular characterization of proteolytic processing of the Pol proteins of human foamy virus reveals novel features of the viral protease. *J Virol* **72**, 7648-52.
- Picard-Maureau, M., Jarmy, G., Berg, A., Rethwilm, A., and Lindemann, D. (2003): Foamy virus envelope glycoprotein-mediated entry involves a pH-dependent fusion process. *J Virol* **77**, 4722-30.
- Pietschmann, T., Heinkelein, M., Heldmann, M., Zentgraf, H., Rethwilm, A., and Lindemann, D. (1999): Foamy virus capsids require the cognate envelope protein for particle export. *J Virol* **73**, 2613-21.
- Pietschmann, T., Zentgraf, H., Rethwilm, A., and Lindemann, D. (2000): An evolutionarily conserved positively charged amino acid in the putative membrane-spanning domain of the foamy virus envelope protein controls fusion activity. *J Virol* **74**, 4474-82.
- Poiesz, B. J., Ruscetti, F. W., Gazdar, A. F., Bunn, P. A., Minna, J. D., and 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 U S A* **77**, 7415-9.
- Pruitt, K. D., Katz, K. S., Sicotte, H., and Maglott, D. R. (2000): Introducing RefSeq and LocusLink: curated human genome resources at the NCBI. *Trends in Genetics* **16**, 44-7.
- Pruitt, K. D., Tatusova, T., and Maglott, D. R. (2005): NCBI Reference Sequence (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Research* **33**, D501-4.
- Pruss, D., Bushman, F. D., and Wolffe, A. P. (1994a): Human immunodeficiency virus integrase directs integration to sites of severe DNA distortion within the nucleosome core. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5913-7.
- Pruss, D., Reeves, R., Bushman, F. D., and Wolffe, A. P. (1994b): The influence of DNA and nucleosome structure on integration events directed by HIV integrase. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 25031-41.
- Pryciak, P. M., Sil, A., and Varmus, H. E. (1992): Retroviral integration into minichromosomes in vitro. *EMBO Journal* **11**, 291-303.
- Pryciak, P. M., and Varmus, H. E. (1992): Nucleosomes, DNA-binding proteins, and DNA sequence modulate retroviral integration target site selection. *Cell* **69**, 769-80.
- Rabson, A. B., and Graves, B. J. (1997): Synthesis and processing of viral RNA. In: Coffin, J.M., Hughes, S. H., und Varmus, E. H. (Hrsg.): *Retroviruses*. 1.Aufl., ColdSpring Harbor Laboratory Press, Cold Spring harbor, New York.
- Ramezani, A., Hawley, T. S., and Hawley, R. G. (2003): Performance- and safety-enhanced lentiviral vectors containing the human interferon-beta scaffold attachment region and the chicken beta-globin insulator. *Blood* **101**, 4717-24.

- Reichman, T. W., Muniz, L. C., and Mathews, M. B. (2002): The RNA binding protein nuclear factor 90 functions as both a positive and negative regulator of gene expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **22**, 343-56.
- Reichman, T. W., Parrott, A. M., Fierro-Monti, I., Caron, D. J., Kao, P. N., Lee, C. G., Li, H., and Mathews, M. B. (2003): Selective regulation of gene expression by nuclear factor 110, a member of the NF90 family of double-stranded RNA-binding proteins. *J Mol Biol* **332**, 85-98.
- Rethwilm, A. (2003): The replication strategy of foamy viruses. *Current Topics in Microbiology & Immunology* **277**, 1-26.
- Rethwilm, A., Baunach, G., Netzer, K. O., Maurer, B., Borisch, B., and Ter Meulen, V. (1990): Infectious DNA of the human spumaretrovirus. *Nucleic Acids Research* **18**, 733-8.
- Rethwilm, A., Erlwein, O., Baunach, G., Maurer, B., and Ter Meulen, V. (1991): The transcriptional transactivator of human foamy virus maps to the bel 1 genomic region. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 941-5.
- Rice, P., and Mizuuchi, K. (1995): Structure of the bacteriophage Mu transposase core: a common structural motif for DNA transposition and retroviral integration. *Cell* **82**, 209-20.
- Richmond, T. J., and Davey, C. A. (2003): The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature* **423**, 145-50.
- Roe, T., Reynolds, T. C., Yu, G., and Brown, P. O. (1993): Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *Embo J* **12**, 2099-108.
- Rohdewohld, H., Weiher, H., Reik, W., Jaenisch, R., and Breindl, M. (1987): Retrovirus integration and chromatin structure: Moloney murine leukemia proviral integration sites map near DNase I-hypersensitive sites. *J Virol* **61**, 336-43.
- Romen, F., Backes, P., Materniak, M., Sting, R., Vahlenkamp, T. W., Riebe, R., Pawlita, M., Kuzmak, J., and Löchelt, M. (2007): Serological detection systems for identification of cows shedding bovine foamy virus via milk. *Virology*.
- Rosenberg, N., and Jolicoeur, P. (1997): Retroviral pathogenesis. In: Coffin, J.M., Hughes, S. H., und Varmus, E. H. (Hrsg.): *Retroviruses*. 1.Aufl., ColdSpring Harbor Laboratory Press, Cold Spring harbor, New York, S. 475-586.
- Rous, P. (1911): A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumore cells. *Exp. Med.* **13**, 397-411.
- Roy, J., Rudolph, W., Juretzek, T., Gärtner, K., Bock, M., Herchenröder, O., Lindemann, D., Heinkelein, M., and Rethwilm, A. (2003): Feline foamy virus genome and replication strategy. *J Virol* **77**, 11324-31.
- Russell, D. W., and Miller, A. D. (1996): Foamy virus vectors. *J Virol* **70**, 217-22.
- Russell, R. A., Critchley, R., Vassaux, G., and McClure, M. O. (2002): Human foamy virus integrase fails to catalyse the integration of a circular DNA molecule containing an LTR junction sequence. *Gene Therapy* **9**, 1326-32.
- Russell, R. A., Wiegand, H. L., Moore, M. D., Schafer, A., McClure, M. O., and Cullen, B. R. (2005): Foamy virus Bet proteins function as novel inhibitors of the APOBEC3 family of innate antiretroviral defense factors. *J Virol* **79**, 8724-31.
- Russell, R. A., Zeng, Y., Erlwein, O., Cullen, B. R., and McClure, M. O. (2001): The R region found in the human foamy virus long terminal repeat is critical for both Gag and Pol protein expression. *J Virol* **75**, 6817-24.
- Rustigian, R., Johnston, P., and Reihart, H. (1955): Infection of monkey kidney tissue cultures with viruslike agents. *Proc Soc Exp Biol Med* **88**, 8-16.
- Saib, A., and De the, H. (1996): Molecular biology of the human foamy virus. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes & Human Retrovirology* **13 Suppl 1**, S254-60.
- Saib, A., Puvion-Dutilleul, F., Schmid, M., Peries, J., and De the, H. (1997): Nuclear targeting of incoming human foamy virus Gag proteins involves a centriolar step. *J Virol* **71**, 1155-61.
- Sandstrom, P. A., Phan, K. O., Switzer, W. M., Fredeking, T., Chapman, L., Heneine, W., and Folks, T. M. (2000): Simian foamy virus infection among zoo keepers. *Lancet* **355**, 551-2.
- Saunders, L. R., and Barber, G. N. (2003): The dsRNA binding protein family: critical roles, diverse cellular functions. *Faseb J* **17**, 961-83.
- Schade, M., Turner, C. J., Lowenhaupt, K., Rich, A., and Herbert, A. (1999): Structure-function analysis of the Z-DNA-binding domain Zalpha of dsRNA adenosine deaminase type I reveals similarity to the (alpha + beta) family of helix-turn-helix proteins. *Embo J* **18**, 470-9.
- Schauer, M., and Billich, A. (1992): The N-terminal region of HIV-1 integrase is required for integration activity, but not for DNA-binding. *Biochem Biophys Res Commun* **185**, 874-80.

- Schenk, T., Enssle, J., Fischer, N., and Rethwilm, A. (1999): Replication of a foamy virus mutant with a constitutively active U3 promoter and deleted accessory genes. *Journal of General Virology* **80**, 1591-8.
- Scherdin, U., Rhodes, K., and Breindl, M. (1990): Transcriptionally active genome regions are preferred targets for retrovirus integration. *J Virol* **64**, 907-12.
- Schmidt, M., and Rethwilm, A. (1995): Replicating foamy virus-based vectors directing high level expression of foreign genes. *Virology* **210**, 167-78.
- Schröder, A. R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J. R., and Bushman, F. (2002): HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* **110**, 521-9.
- Schweizer, M., Falcone, V., Gange, J., Turek, R., and Neumann-Haefelin, D. (1997): Simian foamy virus isolated from an accidentally infected human individual. *J Virol* **71**, 4821-4.
- Schweizer, M., and Neumann-Haefelin, D. (1995): Phylogenetic analysis of primate foamy viruses by comparison of pol sequences. *Virology* **207**, 577-82.
- Segal, E., Fondufe-Mittendorf, Y., Chen, L., Thastrom, A., Field, Y., Moore, I. K., Wang, J. P., and Widom, J. (2006): A genomic code for nucleosome positioning. *Nature* **442**, 772-8.
- Segura-Totten, M., and Wilson, K. L. (2004): BAF: roles in chromatin, nuclear structure and retrovirus integration. *Trends Cell Biol* **14**, 261-6.
- Selten, G., Cuypers, H. T., and Berns, A. (1985): Proviral activation of the putative oncogene Pim-1 in MuLV induced T-cell lymphomas. *EMBO Journal* **4**, 1793-8.
- Selten, G., Cuypers, H. T., Zijlstra, M., Melief, C., and Berns, A. (1984): Involvement of c-myc in MuLV-induced T cell lymphomas in mice: frequency and mechanisms of activation. *EMBO Journal* **3**, 3215-22.
- Sfakianos, J. N., Lacasse, R. A., and Hunter, E. (2003): The M-PMV cytoplasmic targeting-retention signal directs nascent Gag polypeptides to a pericentriolar region of the cell. *Traffic* **4**, 660-70.
- Shaw, K. L., Lindemann, D., Mulligan, M. J., and Goepfert, P. A. (2003): Foamy virus envelope glycoprotein is sufficient for particle budding and release. *J Virol* **77**, 2338-48.
- Sheehy, A. M., Gaddis, N. C., Choi, J. D., and Malim, M. H. (2002): Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* **418**, 646-50.
- Sherman, M. P., and Greene, W. C. (2002): Slipping through the door: HIV entry into the nucleus. *Microbes Infect* **4**, 67-73.
- Shi, L., Qiu, D., Zhao, G., Corthesy, B., Lees-Miller, S., Reeves, W. H., and Kao, P. N. (2007): Dynamic binding of Ku80, Ku70 and NF90 to the IL-2 promoter in vivo in activated T-cells. *Nucleic Acids Res.*
- Shimi, T., Koujin, T., Segura-Totten, M., Wilson, K. L., Haraguchi, T., and Hiraoka, Y. (2004): Dynamic interaction between BAF and emerin revealed by FRAP, FLIP, and FRET analyses in living HeLa cells. *J Struct Biol* **147**, 31-41.
- Siapati, E. K., Bigger, B. W., Kashofer, K., Themis, M., Thrasher, A. J., and Bonnet, D. (2007): Murine leukemia following irradiation conditioning for transplantation of lentivirally-modified hematopoietic stem cells. *Eur J Haematol* **78**, 303-13.
- Silver, J., and Keerikatte, V. (1989): Novel use of polymerase chain reaction to amplify cellular DNA adjacent to an integrated provirus. *J Virol* **63**, 1924-8.
- Simon, J. H., Gaddis, N. C., Fouchier, R. A., and Malim, M. H. (1998): Evidence for a newly discovered cellular anti-HIV-1 phenotype. *Nat Med* **4**, 1397-400.
- Skalka, A. M., Tschlis, P. N., Malavarca, R., Cullen, B., and Ju, G. (1983): Viral sequences determining the oncogenicity of avian leukosis viruses. *Progress in Clinical & Biological Research* **119**, 105-18.
- Soneoka, Y., Cannon, P. M., Ramsdale, E. E., Griffiths, J. C., Romano, G., Kingsman, S. M., and Kingsman, A. J. (1995): A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Research* **23**, 628-33.
- Sorensen, A. B., Duch, M., Jorgensen, P., and Pedersen, F. S. (1993): Amplification and sequence analysis of DNA flanking integrated proviruses by a simple two-step polymerase chain reaction method. *J Virol* **67**, 7118-24.
- St Johnston, D., Brown, N. H., Gall, J. G., and Jantsch, M. (1992): A conserved double-stranded RNA-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10979-83.
- Stallcup, M. R. (2001): Role of protein methylation in chromatin remodeling and transcriptional regulation. *Oncogene* **20**, 3014-20.
- Steffen, D., and Weinberg, R. A. (1978): The integrated genome of murine leukemia virus. *Cell* **15**, 1003-10.

- Stein, S., Siler, U., Ott, M. G., Seger, R., and Grez, M. (2006): Gene therapy for chronic granulomatous disease. *Curr Opin Mol Ther* **8**, 415-22.
- Suzuki, T., Shen, H., Akagi, K., Morse, H. C., Malley, J. D., Naiman, D. Q., Jenkins, N. A., and Copeland, N. G. (2002): New genes involved in cancer identified by retroviral tagging. *Nat Genet* **32**, 166-74.
- Suzuki, Y., and Craigie, R. (2007): The road to chromatin - nuclear entry of retroviruses. *Nat Rev Microbiol* **5**, 187-96.
- Suzuki, Y., Yang, H., and Craigie, R. (2004): LAP2alpha and BAF collaborate to organize the Moloney murine leukemia virus preintegration complex. *EMBO Journal* **23**, 4670-8.
- Swanstrom, R., Delorbe, W. J., Bishop, J. M., and Varmus, H. E. (1981): Nucleotide sequence of cloned unintegrated avian sarcoma virus DNA: viral DNA contains direct and inverted repeats similar to those in transposable elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 124-8.
- Swanstrom, R., and Wills, J. W. (1997): Synthesis, assembly and processing of viral proteins. In: Coffin, J.M., Hughes, S. H., und Varmus, E. H. (Hrsg.): *Retroviruses*. 1.Aufl., ColdSpring Harbor Laboratory Press, Cold Spring harbor, New York.
- Switzer, W. M., Bhullar, V., Shanmugam, V., Cong, M. E., Parekh, B., Lerche, N. W., Yee, J. L., Ely, J. J., Boneva, R., Chapman, L. E., Folks, T. M., and Heneine, W. (2004): Frequent simian foamy virus infection in persons occupationally exposed to nonhuman primates. *J Virol* **78**, 2780-9.
- Taganov, K. D., Cuesta, I., Daniel, R., Cirillo, L. A., Katz, R. A., Zaret, K. S., and Skalka, A. M. (2004): Integrase-specific enhancement and suppression of retroviral DNA integration by compacted chromatin structure in vitro. *J Virol* **78**, 5848-55.
- Takai, D., and Jones, P. A. (2002): Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3740-5.
- Tang, J., Kao, P. N., and Herschman, H. R. (2000): Protein-arginine methyltransferase I, the predominant protein-arginine methyltransferase in cells, interacts with and is regulated by interleukin enhancer-binding factor 3. *J Biol Chem* **275**, 19866-76.
- Telesnitsky, A., and Goff, S. P. (1997): Reverse transcriptase and the generation of retroviral DNA. In: Coffin, J.M., Hughes, S. H., und Varmus, E. H. (Hrsg.): *Retroviruses*. 1.Aufl., ColdSpring Harbor Laboratory Press, Cold Spring harbor, New York.
- Temin, H. M. (1964): Nature of the provirus of Rous sarcoma. *National Cancer Institute Monograph* **17**, 557-570.
- Temin, H. M. (1971): The provirus hypothesis: speculations on the significance of RNA-directed DNA synthesis for normal development and for carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute* **46**, 3-7.
- Temin, H. M., and Mizutani, S. (1970): RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus.[erratum appears in Nature. 1970 Jul 4;227(5253):102]. *Nature* **226**, 1211-3.
- Themis, M., Waddington, S. N., Schmidt, M., Von Kalle, C., Wang, Y., Al-Allaf, F., Gregory, L. G., Nivsarkar, M., Themis, M., Holder, M. V., Buckley, S. M., Dighe, N., Ruthe, A. T., Mistry, A., Bigger, B., Rahim, A., Nguyen, T. H., Trono, D., Thrasher, A. J., and Coutelle, C. (2005): Oncogenesis following delivery of a nonprimate lentiviral gene therapy vector to fetal and neonatal mice. *Mol Ther* **12**, 763-71.
- Ting, N. S., Kao, P. N., Chan, D. W., Lintott, L. G., and Lees-Miller, S. P. (1998): DNA-dependent protein kinase interacts with antigen receptor response element binding proteins NF90 and NF45. *J Biol Chem* **273**, 2136-45.
- Tobaly-Tapiero, J., Bittoun, P., Neves, M., Guillemain, M. C., Lecellier, C. H., Puvion-Dutilleul, F., Gicquel, B., Zientara, S., Giron, M. L., De the, H., and Saib, A. (2000): Isolation and characterization of an equine foamy virus. *J Virol* **74**, 4064-73.
- Tobaly-Tapiero, J., Kupiec, J. J., Santillana-Hayat, M., Canivet, M., Peries, J., and 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** (Pt 3), 605-8.
- Trobridge, G., Josephson, N., Vassilopoulos, G., Mac, J., and Russell, D. W. (2002a): Improved foamy virus vectors with minimal viral sequences. *Molecular Therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy* **6**, 321-8.
- Trobridge, G., Vassilopoulos, G., Josephson, N., and Russell, D. W. (2002b): Gene transfer with foamy virus vectors. *Methods in Enzymology* **346**, 628-48.
- Trobridge, G. D., Miller, D. G., Jacobs, M. A., Allen, J. M., Kiem, H. P., Kaul, R., and Russell, D. W. (2006): Foamy virus vector integration sites in normal human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 1498-503.

- Trobridge, G. D., and Russell, D. W. (1998): Helper-free foamy virus vectors. *Human Gene Therapy* **9**, 2517-25.
- Tschopp, R. R., Brandner, S., Marino, S., Bothe, K., Horak, I., Rethwilm, A., and Aguzzi, A. (1996): Analysis of the determinants of neurotropism and neurotoxicity of HFV in transgenic mice. *Virology* **216**, 338-46.
- Tsichlis, P. N., and Lazo, P. A. (1991): Virus-host interactions and the pathogenesis of murine and human oncogenic retroviruses. *Current Topics in Microbiology & Immunology* **171**, 95-171.
- Turelli, P., and Trono, D. (2005): Editing at the crossroad of innate and adaptive immunity. *Science* **307**, 1061-5.
- Turlure, F., Devroe, E., Silver, P. A., and Engelman, A. (2004): Human cell proteins and human immunodeficiency virus DNA integration. *Frontiers in Bioscience* **9**, 3187-208.
- Turlure, F., Maertens, G., Rahman, S., Cherepanov, P., and Engelman, A. (2006): A tripartite DNA-binding element, comprised of the nuclear localization signal and two AT-hook motifs, mediates the association of LEDGF/p75 with chromatin in vivo. *Nucleic Acids Research* **34**, 1663-75.
- Uren, A. G., Kool, J., Berns, A., and Van Lohuizen, M. (2005): Retroviral insertional mutagenesis: past, present and future. *Oncogene* **24**, 7656-72.
- Valente, L., and Nishikura, K. (2005): ADAR gene family and A-to-I RNA editing: diverse roles in posttranscriptional gene regulation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **79**, 299-338.
- Valenzuela, L., and Kamakaka, R. T. (2006): Chromatin insulators. *Annu Rev Genet* **40**, 107-38.
- Van Maele, B., Busschots, K., Vandekerckhove, L., Christ, F., and Debyser, Z. (2006): Cellular co-factors of HIV-1 integration. *Trends in Biochemical Sciences* **31**, 98-105.
- Van Maele, B., and Debyser, Z. (2005): HIV-1 integration: an interplay between HIV-1 integrase, cellular and viral proteins. *AIDS Reviews* **7**, 26-43.
- Vandekerckhove, L., Christ, F., Van Maele, B., De Rijck, J., Gijsbers, R., Van Den Haute, C., Witvrouw, M., and Debyser, Z. (2006): Transient and stable knockdown of the integrase cofactor LEDGF/p75 reveals its role in the replication cycle of human immunodeficiency virus. *J Virol* **80**, 1886-96.
- Varmus, H. E. (1984): The molecular genetics of cellular oncogenes. *Annual Review of Genetics* **18**, 553-612.
- Varmus, H. E., Vogt, P. K., and Bishop, J. M. (1973): Integration of deoxyribonucleic acid specific for Rous sarcoma virus after infection of permissive and nonpermissive hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**, 3067-71.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P., Ballew, R. M., Huseon, D. H., Wortman, J. R., Zhang, Q., Kodira, C. D., Zheng, X. H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P. D., Zhang, J., Gabor Miklos, G. L., Nelson, C., Broder, S., Clark, A. G., Nadeau, J., Mckusick, V. A., Zinder, N., Levine, A. J., Roberts, R. J., Simon, M., Slayman, C., Hunkapiller, M., Bolanos, R., Delcher, A., Dew, I., Fasulo, D., Flanigan, M., Florea, L., Halpern, A., Hannenhalli, S., Kravitz, S., Levy, S., Mobarry, C., Reinert, K., Remington, K., Abu-Threideh, J., Beasley, E., Biddick, K., Bonazzi, V., Brandon, R., Cargill, M., Chandramouliswaran, I., Charlab, R., Chaturvedi, K., Deng, Z., Di Francesco, V., Dunn, P., Eilbeck, K., Evangelista, C., Gabrielian, A. E., Gan, W., Ge, W., Gong, F., Gu, Z., Guan, P., Heiman, T. J., Higgins, M. E., Ji, R. R., Ke, Z., Ketchum, K. A., Lai, Z., Lei, Y., Li, Z., Li, J., Liang, Y., Lin, X., Lu, F., Merkulov, G. V., Milshina, N., Moore, H. M., Naik, A. K., Narayan, V. A., Neelam, B., Nusskern, D., Rusch, D. B., Salzberg, S., Shao, W., Shue, B., Sun, J., Wang, Z., Wang, A., Wang, X., Wang, J., Wei, M., Wides, R., Xiao, C., Yan, C., et al. (2001): The sequence of the human genome.[see comment][erratum appears in Science 2001 Jun 5;292(5523):1838]. *Science* **291**, 1304-51.
- Verma, I. M., and Weitzman, M. D. (2005): Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu Rev Biochem* **74**, 711-38.
- Vijaya, S., Steffen, D. L., and Robinson, H. L. (1986): Acceptor sites for retroviral integrations map near DNase I-hypersensitive sites in chromatin. *J Virol* **60**, 683-92.
- Vogt, P. K. (1997a): Historical introduction to the general properties of retroviruses. In: Coffin, J.M., Hughes, S. H., und Varmus, E. H. (Hrsg.): *Retroviruses*. 1.Aufl., ColdSpring Harbor Laboratory Press, Cold Spring harbor, New York.
- Vogt, V. M. (1997b): Retroviral virions and genomes. In: Coffin, J.M., Hughes, S. H., und Varmus, E. H. (Hrsg.): *Retroviruses*. 1.Aufl., ColdSpring Harbor Laboratory Press, Cold Spring harbor, New York.

- Von Kalle, C., Fehse, B., Layh-Schmitt, G., Schmidt, M., Kelly, P., and Baum, C. (2004): Stem cell clonality and genotoxicity in hematopoietic cells: gene activation side effects should be avoidable. *Seminars in Hematology* **41**, 303-18.
- Wang, C. L., Wang, B. B., Bartha, G., Li, L., Channa, N., Klinger, M., Killeen, N., and Wabl, M. (2006a): Activation of an oncogenic microRNA cistron by provirus integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 18680-4.
- Wang, G., and Mulligan, M. J. (1999): Comparative sequence analysis and predictions for the envelope glycoproteins of foamy viruses. *J Gen Virol* **80 (Pt 1)**, 245-54.
- Wang, H., Hou, Z., Wu, Y., Ma, X., and Luo, X. (2006b): p150 ADAR1 isoform involved in maintenance of HeLa cell proliferation. *BMC Cancer* **6**, 282.
- Wang, J. Y., Ling, H., Yang, W., and Craigie, R. (2001): Structure of a two-domain fragment of HIV-1 integrase: implications for domain organization in the intact protein. *Embo J* **20**, 7333-43.
- Weber, F., and Schaffner, W. (1985): Enhancer activity correlates with the oncogenic potential of avian retroviruses. *EMBO Journal* **4**, 949-56.
- Weinberg, J. B., Matthews, T. J., Cullen, B. R., and Malim, M. H. (1991): Productive human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection of nonproliferating human monocytes. *J Exp Med* **174**, 1477-82.
- Wilk, T., De Haas, F., Wagner, A., Rutten, T., Fuller, S., Flügel, R. M., and Löchelt, M. (2000): The intact retroviral Env glycoprotein of human foamy virus is a trimer. *J Virol* **74**, 2885-7.
- Wilk, T., Geiselhart, V., Frech, M., Fuller, S. D., Flügel, R. M., and Löchelt, M. (2001): Specific interaction of a novel foamy virus Env leader protein with the N-terminal Gag domain. *Journal of Virology* **75**, 7995-8007.
- Will, E., Bailey, J., Schuesler, T., Modlich, U., Balcik, B., Burzynski, B., Witte, D., Layh-Schmitt, G., Rudolph, C., Schlegelberger, B., Von Kalle, C., Baum, C., Sorrentino, B. P., Wagner, L. M., Kelly, P., Reeves, L., and Williams, D. A. (2007): Importance of Murine Study Design for Testing Toxicity of Retroviral Vectors in Support of Phase I Trials. *Mol Ther*.
- Williams, D. A., Lemischka, I. R., Nathan, D. G., and Mulligan, R. C. (1984): Introduction of new genetic material into pluripotent haematopoietic stem cells of the mouse. *Nature* **310**, 476-80.
- Williams, S., Mustoe, T., Mulcahy, T., Griffiths, M., Simpson, D., Antoniou, M., Irvine, A., Mountain, A., and Crombie, R. (2005): CpG-island fragments from the HNRPA2B1/CBX3 genomic locus reduce silencing and enhance transgene expression from the hCMV promoter/enhancer in mammalian cells. *BMC Biotechnol* **5**, 17.
- Wodrich, H., Bohne, J., Gumz, E., Welker, R., and Krausslich, 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**, 10670-82.
- Wu, M., Chari, S., Yanchis, T., and Mergia, A. (1998): cis-Acting sequences required for simian foamy virus type 1 vectors. *J Virol* **72**, 3451-4.
- Wu, M., and Mergia, A. (1999): Packaging cell lines for simian foamy virus type 1 vectors. *J Virol* **73**, 4498-501.
- Wu, W., Sun, M., Zou, G. M., and Chen, J. (2007): MicroRNA and cancer: Current status and prospective. *Int J Cancer* **120**, 953-60.
- Wu, X., Li, Y., Crise, B., and Burgess, S. M. (2003): Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration.[see comment]. *Science* **300**, 1749-51.
- Wu, X., Li, Y., Crise, B., Burgess, S. M., and Munroe, D. J. (2005): Weak palindromic consensus sequences are a common feature found at the integration target sites of many retroviruses. *J Virol* **79**, 5211-4.
- Xie, W., Gai, X., Zhu, Y., Zappulla, D. C., Sternglanz, R., and Voytas, D. F. (2001): Targeting of the yeast Ty5 retrotransposon to silent chromatin is mediated by interactions between integrase and Sir4p. *Mol Cell Biol* **21**, 6606-14.
- Yamashita, R., Suzuki, Y., Sugano, S., and Nakai, K. (2005): Genome-wide analysis reveals strong correlation between CpG islands with nearby transcription start sites of genes and their tissue specificity. *Gene* **350**, 129-36.
- Yang, P., Zemba, M., Aboud, M., Flügel, R. M., and Löchelt, M. (1997): Deletion analysis of both the long terminal repeat and the internal promoters of the human foamy virus. *Virus Genes* **15**, 17-23.
- Yao, S., Sukonnik, T., Kean, T., Bharadwaj, R. R., Pasceri, P., and Ellis, J. (2004): Retrovirus silencing, variegation, extinction, and memory are controlled by a dynamic interplay of multiple epigenetic modifications. *Mol Ther* **10**, 27-36.

- Yoder, K. E., and Bushman, F. D. (2000): Repair of gaps in retroviral DNA integration intermediates. *J Virol* **74**, 11191-200.
- Yu, S. F., Baldwin, D. N., Gwynn, S. R., Yendapalli, S., and Linial, M. L. (1996): Human foamy virus replication: a pathway distinct from that of retroviruses and hepadnaviruses. *Science* **271**, 1579-82.
- Yu, S. F., Eastman, S. W., and Linial, M. L. (2006): Foamy virus capsid assembly occurs at a pericentriolar region through a cytoplasmic targeting/retention signal in Gag. *Traffic* **7**, 966-77.
- Yu, S. F., Sullivan, M. D., and Linial, M. L. (1999): Evidence that the human foamy virus genome is DNA. *J Virol* **73**, 1565-72.
- Yu, S. F., Von Ruden, T., Kantoff, P. W., Garber, C., Seiberg, M., Ruther, U., Anderson, W. F., Wagner, E. F., and Gilboa, E. (1986): Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 3194-8.
- Zamore, P. D., and Haley, B. (2005): Ribo-gnome: the big world of small RNAs. *Science* **309**, 1519-24.
- Zhang, B., Wang, Q., and Pan, X. (2007): MicroRNAs and their regulatory roles in animals and plants. *J Cell Physiol* **210**, 279-89.
- Zheng, R., Jenkins, T. M., and Craigie, R. (1996): Zinc folds the N-terminal domain of HIV-1 integrase, promotes multimerization, and enhances catalytic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13659-64.
- Zhu, Y., Dai, J., Fuerst, P. G., and Voytas, D. F. (2003): Controlling integration specificity of a yeast retrotransposon. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5891-5.
- Zou, S., and Voytas, D. F. (1997): Silent chromatin determines target preference of the *Saccharomyces* retrotransposon Ty5. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7412-6.
- Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R. J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L., and Trono, D. (1998): Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol* **72**, 9873-80.

6 Anhang

6.1 Zusammenfassung

Die Integration der viralen DNA in die des Wirtsgenoms ist ein essentieller Schritt im Lebenszyklus der Retroviren. Das wissenschaftliche Interesse an der Analyse von retroviralen Integrationsmustern ist, vor allem in Hinblick auf die Anwendung von retroviral basierten Vektoren in der somatischen Gentherapie, neu angefacht worden. Entgegen der Annahme, dass die retrovirale Integration dem Zufallsprinzip folgend stattfindet, konnten in den letzten Jahren für verschiedene Genera der Retroviren virusspezifische Integrationsmuster enthüllt werden, die auf eine Bevorzugung von bestimmten chromosomalen Regionen hindeuten, deren Mechanismen noch nicht ausreichend geklärt sind. Für die Sicherheit von therapeutisch anwendbaren Vektoren ist die Analyse von retroviralen Integrationsmuster daher unerlässlich geworden.

Foamyvirus (FV)-basierte Vektoren besitzen ein großes Potential, in der somatischen Gentherapie ihre Anwendung zu finden, so dass eine Analyse ihrer Integrationsmuster im humanen Genom erforderlich ist.

Hierfür wurden humane 293-Zellen mit FV-basierten Vektoren transduziert und mittels inverser PCR 628 FV-Integrationsstellen kloniert, die zur Analyse von verschiedenen Aspekten des foamyviralen Integrationsmusters im humanen Genom lokalisiert wurden. Als Vergleich und als Kontrolle wurden 141 Murine Leukämie Virus-(MLV)- und 87 Humane Immundefizienz Virus-(HIV)-Integrationsstellen ebenfalls kloniert und analysiert. Im Vergleich zu HIV, welches die Integration in Gene bevorzugt, und MLV, welches eine starke Präferenz zur Integration in regulatorische Bereiche in der Nähe von Transkriptionsstartstellen (TSS) von Genen besitzt, konnten mit den hier ermittelten FV-Daten weder Präferenzen zur Integration in Gene, noch starke Präferenzen für regulatorische Bereiche beobachtet werden. Eine leichte Bevorzugung zur Integration in der Nähe der TSS war zu erkennen, die allerdings deutlich schwächer ausfiel als bei MLV. Weiterhin wurden bei der Betrachtung der Basenzusammensetzungen in der Umgebung der FV-Integrationsstellen statistisch signifikante Präferenzen für bestimmte Basen an bestimmten Positionen beobachtet, die ein schwaches Palindrom bildeten, dessen Symmetrieachse sich im Zentrum der nach der Integration duplizierten zellulären Sequenz befand.

Eine aktive Teilnahme von mit der viralen Integrase (IN) interagierenden zellulären Proteinen an der retroviralen Integrationsreaktion *in vivo* und an der Wahl der retroviralen Integrationsstellen ist sehr wahrscheinlich. Solche mit der IN interagierende zelluläre Proteine sind für FV noch unbekannt, so dass hierfür ein experimentelles Testsystem etabliert wurde.

Mit Hilfe von humanen Zellen, welche mittels retroviralem Gentransfer stabil C-terminal mit einem FLAG-Peptid fusionierte FV IN-Proteine exprimierten, wurden in Pull-down-Experimenten und MALDI-ToF-Massenspektrometrie zwei zelluläre Proteine (NF90 und ADAR1) identifiziert, welche mit dem FV IN-Protein interagieren und aufgrund ihrer Spezifitäten potenzielle Kofaktoren der foamyviralen Integration darstellen könnten.

Eine RNAi-basierte Runterregulierung der Expression beider Proteine konnte, aufgrund der essentiellen Rolle beider Proteine an der Regulation der Zellteilung, keine experimentellen Daten liefern, die eine Analyse über die Funktion beider Proteine an der Integrationsreaktion von FV zulassen. Die Funktion beider Proteine muss in biochemischen Versuchen noch evaluiert werden und könnte einen interessanten Einblick in die Wechselwirkungen von FV mit ihrem Wirt liefern.

Neben der Identifikation der zwei mit der IN interagierenden zellulären Proteine zeigen die hier präsentierten Daten zusammenfassend, dass das Integrationsmuster der FV sich von MLV und HIV-1 unterscheidet und nahezu dem Zufallsprinzip folgt. Aufgrund der im Vergleich zu MLV deutlich schwächeren Präferenz zur Integration in der Nähe von regulatorischen Bereichen und der im Vergleich von HIV-1 überhaupt nicht vorhandene Bevorzugung zur Integration in Gene stellen FV-basierte Vektoren interessante alternative Vektorsysteme für die somatische Gentherapie dar.

6.2 Summary

The Integration of the viral DNA into the host genome is an essential step in the lifecycle of retroviruses. With respect to the application of retroviral based vectors for somatic gene therapy the analysis of retroviral integration patterns has gained scientific interest.

Contrary to the assumption that the retroviral integration into the host genome occurs by chance virus specific integration patterns have been uncovered in the last few years virus, which suggest that certain chromosomal regions are preferred sites of integration. In regard to the safety assessment of potentially applicable retroviral vectors the analysis of integration patterns has become indispensable.

Foamy virus-(FV)-based vectors have evolved to promising alternative vector systems, which have a good capability to be used in clinical gene therapy trials, thus the evaluation of their integration pattern in the human genome is required.

To accomplish this, 293 cells were transduced with FV vectors and the integration sites into the cellular genome were determined by a high-throughput method based on inverse PCR. For comparison, a limited number of murine leukemia virus (MLV) and human immunodeficiency virus (HIV) integration sites were analysed in parallel. Altogether, 628 FV, 87 HIV and 141 MLV distinct integration sites were mapped to the human genome.

Compared with the integration-site preferences of HIV, which strongly favours active genes, and MLV, which favours integration near transcription-start sites (TSS), our results indicate that FV integration has neither of these preferences. However, once integration has occurred into a transcribed region of the genome, FVs tend to target promoter-close regions, albeit with less preference than MLV. Furthermore, by analysing the base composition surrounding the FV integration sites our study revealed statistical significant preferences for certain bases at certain positions resulting in a palindromic consensus sequence, which was centred on the virus-specific, four-base-duplicated target site.

The mechanism which regulate the virus specific integration site selection are up to now not well understood, however cellular Proteins, which interact with the viral integrase (IN) protein, are most likely mediators.

Such proteins have so far not been identified and analyzed for FV, thus an experimental test system for the identification of cellular proteins interacting with the FV IN was established. For this purpose human cells stably expressing the FV IN, which was C-terminally fused to the FLAG-peptide were generated via retroviral transduction and used in pull-down-assays.

Two cellular proteins were identified (NF90 and ADAR1) which showed interaction with FV IN in pull-down-assays and which because of their specificities constitute potential cofactors of the FV integration *in vivo*.

Using the RNAi approach the down regulation of NF90 and ADAR1 could not provide any experimental data towards their function on FV integration, because both Proteins appeared to have an essential role in the regulation of the cell cycle and a dramatic decrease in cell division was observed after down regulation of both Proteins. The Function of both Proteins needs to be determined by biochemical assays and can potentially reveal interesting insights in the interplay of FV with cellular proteins.

In summary, apart from the identification of two cellular proteins, which interact with the FV IN-protein, it is shown that the integration pattern of FVs appears to be unique compared with those of other retroviral genera. On the basis of the weak preferences for FV to integrate near to TSS and the absent preferences for genes, FV-based vectors comprise interesting alternative vector systems.

6.3 Tabellen

Tab. 13: NCBI Zugangsnummer der klonierten RIS

Virus	Vektor	NCBI Zugangsnummer
PFV	pMH123 + pMH124	DQ192669 - DQ193287
HIV-1	pGJ3/U3E	DQ193288 - DQ193374
MLV	pcAMS/U3EN	DQ193375 - DQ193515

Tab. 14: Distanz der PFV-IS vom TSS bekannter Proto-Onkogene

Locus	Name	Gene ID	Chromosome	Position zum TSS	O.r.t
FLT4	fms-related tyrosine kinase 4	2324	5q35.3	-488812	F
KRAS2	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog	3845	12p12.1	-462305	F
ALO17	KIAA1618 protein	57714	17q25.3	-446372	R
TFE3	transcription factor binding to IGHM enhancer 3	7030	Xp11.22	-444675	F
EIF4A2	eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 2	1974	3q27.3	-430828	R
ATF1	activating transcription factor 1	466	12q13	-426117	F
TFE3	transcription factor binding to IGHM enhancer 3	7030	Xp11.22	-401953	F
BHD	folliculin, Birt-Hogg-Dube syndrome	201163	17p11.2	-400069	R
TNFRSF6	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6 (FAS)	355	10q24.1	-382743	F
WHSC1L1	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1-like 1 (NSD3)	54904	8p12	-374400	F
IL21R	interleukin 21 receptor	50615	16p11	-349806	F
CYLD	familial cylindromatosis gene	1540	16q12-q13	-348406	F
WT1	Wilms tumour 1 gene	7490	11p13	-338302	R
SUZ12	suppressor of zeste 12 homolog (Drosophila)	23512	17q11.2	-336681	R
ELKS	ELKS protein	23085	12p13.3	-335146	R
SSX4	synovial sarcoma, X breakpoint 4	6759	Xp11.23	-311901	R
NACA	nascent-polypeptide-associated complex alpha polypeptide	4666	12q23-q24.1	-311801	F
FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1	2260	8p11.2-p11.1	-288050	F
FUS	fusion, derived from t(12;16) malignant liposarcoma	2521	16p11.2	-284115	R
LASP1	LIM and SH3 protein 1	3927	17q11-q21.3	-274503	F
AF1Q	ALL1-fused gene from chromosome 1q	10962	1q21	-273933	R
HOXA9	homeo box A9	3205	7p15-p14.2	-221305	R
TCF12	transcription factor 12 (HTF4, helix-loop-helix transcription factors 4)	6938	15q21	-209870	F
BMPR1A	bone morphogenetic protein receptor, type IA	657	10q22.3	-206840	R
PMS1	PMS1 postmeiotic segregation increased 1	5378	2q31-q33	-202384	F

(S. cerevisiae)					
HOXA11	homeo box A11	3207	7p15-p14.2	-201624	R
HSPCB	heat shock 90kDa protein 1, beta	3326	6p12	-195168	F
HOXA13	homeo box A13	3209	7p15-p14.2	-186758	R
SSX1	synovial sarcoma, X breakpoint 1	6756	Xp11.23-p11.22	-183730	R
NF2	neurofibromatosis type 2 gene	4771	22q12.2	-183207	F
TAL1	T-cell acute lymphocytic leukemia 1 (SCL) epidermal growth factor receptor	6886	1p32	-182539	R
EGFR	(erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian)	1956	7p12.3-p12.1	-165911	R
FLI1	Friend leukemia virus integration 1	2313	11q24	-153323	R
WHSC1L1	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1-like 1 (NSD3)	54904	8p12	-130764	R
FLI1	Friend leukemia virus integration 1 myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia	2313	11q24	-111204	R
MLLT6	(trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 6 (AF17)	4302	17q21	-109978	F
BCL3	B-cell CLL/lymphoma 3	602	19q13	-108213	R
SIL	TAL1 (SCL) interrupting locus	6491	1p32	-98163	R
PER1	period homolog 1 (Drosophila)	5187	17p13.1-17p12	-63267	F
HLXB9	homeo box HB9	3110	7q36	-46894	F
FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1	2260	8p11.2-p11.1	-44414	R
CREBBP	CREB binding protein (CBP)	1387	16p13.3	-43826	R
RPL22	ribosomal protein L22 (EAP)	6146	3q26	-38872	R
SBDS	Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein	51119	7q11	-23574	F
PCM1	pericentriolar material 1 (PTC4)	5108	8p22-p21.3	-22244	R
NOTCH1	Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila) (TAN1)	4851	9q34.3	-18204	F
CBFB	core-binding factor, beta subunit	865	16q22	-14551	F
MDS1	myelodysplasia syndrome 1	4197	3q26	-7316	R
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	596	18q21.3	-4921	F
LCX	leukemia-associated protein with a CXXC domain	80312	10q21	12065	R
GNAS	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha stimulating activity polypeptide 1	2778	20q13.2	17583	R
BCL3	B-cell CLL/lymphoma 3	602	19q13	20020	F
PDE4DIP	phosphodiesterase 4D interacting protein (myomegalin)	9659	1q12	34612	R
FVT1	follicular lymphoma variant translocation 1	2531	18q21.3	43473	F
SH3GL1	SH3-domain GRB2-like 1 (EEN)	6455	19p13.3	63477	R
HSPCB	heat shock 90kDa protein 1, beta	3326	6p12	67704	F
BRCA2	familial breast/ovarian cancer gene 2	675	13q12	80329	F
ARNT	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator	405	1q21	90969	F
PRKAR1A	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha (tissue specific extinguisher 1)	5573	17q23-q24	109339	F
HIST1H4I	histone 1, H4i (H4FM)	8294	6p21.3	109492	R
EWSR1	Ewing sarcoma breakpoint region 1 (EWS)	2130	22q12	152087	F
BIRC3	baculoviral IAP repeat-containing 3	330	11q22-q23	164749	R
MUC1	mucin 1, transmembrane	4582	1q21	174985	F
DDB2	damage-specific DNA binding protein 2	1643	11p12	176484	R
BRCA1	familial breast/ovarian cancer gene 1	672	17q21	200916	R
MYCL1	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog 1, lung carcinoma derived (avian)	4610	1p34.3	214644	F
EGFR	epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian)	1956	7p12.3-p12.1	232914	F
EGFR	epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian)	1956	7p12.3-p12.1	247004	R

EGFR	epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian)	1956	7p12.3-p12.1	251856	F
SH3GL1	SH3-domain GRB2-like 1 (EEN)	6455	19p13.3	260578	R
PCM1	pericentriolar material 1 (PTC4)	5108	8p22-p21.3	266371	F
ALO17	KIAA1618 protein	57714	17q25.3	267428	R
EVI1	ecotropic viral integration site 1	2122	3q26	267583	R
LMO2	LIM domain only 2 (rhombotin-like 1) (RBTN2)	4005	11p13	268685	F
CBL	Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming	867	11q23.3	277786	R
POU2AF1	POU domain, class 2, associating factor 1 (OBF1)	5450	11q23.1	278617	F
KIT	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog	3815	4q12	292529	F
SS18	synovial sarcoma translocation, chromosome 18	6760	18q11.2	313068	R
IL2	interleukin 2	3558	4q26-q27	318018	R
NF1	neurofibromatosis type 1 gene	4763	17q12	319998	R
MUC1	mucin 1, transmembrane	4582	1q21	324339	F
LIFR	leukemia inhibitory factor receptor	3977	5p13-p12	334506	F
SSX4	synovial sarcoma, X breakpoint 4	6759	Xp11.23	340278	F
WHSC1L1	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1-like 1 (NSD3)	54904	8p12	347882	F
DEK	DEK oncogene (DNA binding)	7913	6p23	355066	F
BTG1	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	694	12q22	357610	R
KIT	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog	3815	4q12	366249	R
BIRC3	baculoviral IAP repeat-containing 3	330	11q22-q23	384096	R
SS18	synovial sarcoma translocation, chromosome 18	6760	18q11.2	388690	F
SDHD	succinate dehydrogenase complex, subunit D, integral membrane protein	6392	11q23	406383	R
AF1Q	ALL1-fused gene from chromosome 1q	10962	1q21	432560	F
FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1	2260	8p11.2-p11.1	434232	F
IL21R	interleukin 21 receptor	50615	16p11	452509	F
TP53	tumor protein p53	7157	17p13	473706	F
PMS2	PMS2 postmeiotic segregation increased 2 (S. cerevisiae)	5395	7p22	480253	F
DDIT3	DNA-damage-inducible transcript 3	1649	12q13.1-q13.2	483416	F
NF1	neurofibromatosis type 1 gene	4763	17q12	505433	R
MLLT1	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 1 (ENL)	4298	19p13.3	555078	R
MLLT1	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 1 (ENL)	4298	19p13.3	561040	R
TRIP11	thyroid hormone receptor interactor 11	9321	14q31-q32	568535	F
TRIP11	thyroid hormone receptor interactor 11	9321	14q31-q32	568535	F
GAS7	growth arrest-specific 7	8522	17p	588918	R
GPC3	glypican 3	2719	Xq26.1	590110	R
MLLT3	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 3 (AF9)	4300	9p22	606755	F
MYST4	MYST histone acetyltransferase (monocytic leukemia) 4 (MORF)	23522	10q22	625698	F
EGFR	epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian)	1956	7p12.3-p12.1	658715	F
MDS1	myelodysplasia syndrome 1	4197	3q26	783479	R
JAZF1	juxtaposed with another zinc finger gene 1	221895	7p15.2-p15.1	793771	R

TSS: Transkriptionsstart-Stelle; O.r.t: Orientierung des PFV Provirus zum Leseraster der Proto-Onkogene F: forward; R: reverse.

6.4 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	DNA	Desoxyribonukleinsäure
μ	mikro	dNTP	Desoxyribonukleotid-triphosphat
A	Adenin	ds	doppelsträngig
AAV	Adenoassoziiertes Virus	DTT	Dithiothreitol
Abb.	Abbildung	dUTP	Desoxyuracilphosphat
AIDS	Aquired immundeficiency syndrome	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ALV	aviäre Leukoseviren	ECL	Enhanced Chemiluminescence
APOBEC	Apolipoprotein B mRNA editing enzym	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
APS	Ammoniumpersulfat	EFV	Equines Foamyvirus
AS	Aminosäure	eGFP	enhanced green fluorescent protein
ATP	Adenosinotrisulfat	EM	Elektronenmikroskopie
AZT	azidothymidin	Env	Hüllprotein (<i>envelope</i>)
α	Anti	ER	Endoplasmatisches Retikulum
b	Basen	FACS	fluorescence activated cell sorter
BAF	Barrier-to-autointegration factor	FCS	Fötales Kälberserum
Bet		FFV	Felines Foamyvirus
bp	Basenpaare	FV	Foamyvirus/ Foamyviren
bzw.	beziehungsweise	G	Guanin
C	Cytosin	g	Gramm
CA	Kapsidprotein	Gag	Gruppenspezifisches Antigen
ca.	circa	h	Stunde(n)
CAS	cis-aktive Sequenzen	HIV	Humanes Immundefizienzvirus
CIS	common integration sites	HMGA1	High-mobility group proteins
CMV	Cytomegalievirus	HRP	Meerretich-Peroxydase
CPE	Zytopathischer Effekt	HSZ	Hämatopoetische Stammzellen
CSK	Cytoskelett		
CTE	Constitutive transport element		
CTRS	cytoplasmic targeting and retention signal		
dest.	destilliert		

HTLV-1	Humane T-Zell-Leukämie Virus 1	NOD nm	Nonobese diabetic Nanometer
IN	Integrase	nmol	nanomolar
IP	interner Promotor	nt	Nukleotide
iPPT	interner Polypurintrakt	OD	Optische Dichte
PSI	Packaging Signal	ORF	offener Leserahmen
IS	Integrationsstelle	ori	Replikationsstartpunkt
ITR	intrazelluläre retrotransposition	PAGE	Polyacrylamid- gelelektrophorese
kD	Kilo-Dalton	PBS	Primerbindungsstelle
L	Late-Domäne	PCR	Polymerasekettenreaktion
l	Liter	PFV	prototypischer Foamyvirus
LEDGF	Lens epithelium-derived growth factor	pH	negativer dekadischer Logarithmus der
LP	Leaderpeptid		Hydroniumionen- konzentration
LTR	long terminal repeat		
M	Molar	PIC	Präintegrationskomplex
MA	Matrixprotein	PK	Positivkontrolle
mA	Milliamper	pmol	picomolar
MHR	major homology region	Pol	Polymerase
MLV	Mausleukämievirus	PPP	Proteinprobenpuffer
Mo-MLV	Moloney- Mausleukämievirus	PPT PR	Polypurintrakt Protease
M-PMV	Mason-Pfizer-Affen-Virus	pro	Protease-Gen
min	Minute(n)	PIC	preintegrations Komplex
mM	Millimolar	RefSeq	Referenz Sequenz
mRNA	messenger RNA	RIS	retrovirale Integrationsstellen
MOI	multiplicity of infection		
MSD	membranspannende Domäne	RNA rpm	Ribonukleinsäure Umdrehungen pro Minute
MTOC	Mikrotubuli organisierendes Zentrum	RRE RSV	rev responsive element Rous-Sarkomavirus
Myr	Myristilinsäure	RT	Reverse Transkriptase
NC	Nukleokapsidprotein	RT/RH	Reverse Transkriptase/ RNaseH
ng	Nanogramm		
NK	Negativkontrolle	SA	Spleißakzeptor
NLS	Kernlokalisierungssignal		

SCID	severe combined immunodeficiency disease	Tris	Trishydroxy- methylaminomethan
SD	Spleißdonor	TSS	Transkriptionsstartstelle
SDS	Natriumdodecylsulfat	TS	Transkriptionsstart
sec	Sekunde(n)	U	Enzymeinheit (Unit)
SFFV	spleen focus forming virus	U3	unique 3
SIN	self inactivating	U5	unique 5
SU	Oberflächenuntereinheit	UTR	untranslated region
SVP	Subvirale Partikel	UV	ultraviolet
T	Thymidin	V	Volt
Tas	Transaktivator von Spumaviren	Vif z. B.	viral infecivity factor zum Beispiel
TBS	Tas-Bindungsstellen	X-CGD	X-linked
TEMED	N, N, N', N' – Tetramethylethylendiamin		chronic granulomatous disease
TM	Transmembranuntereinheit	X-SCID	X-linked severe combined
TRE	Tas responsives Element		immunodeficiency disease

6.5 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: EM Aufnahmen von Foamyviren und infizierte Zellkulturen	4
Abb. 2: Morphologie der Foamyvirus Partikel	8
Abb. 3: Genomorganisation und Genexpression von PFV.....	10
Abb. 4: Replikationszyklus von Orthoretroviren und Spumaviren.....	14
Abb. 5: Unprozessierte strukturelle PFV-Proteine.....	15
Abb. 6: Schematische Darstellung der publizierten FV Vektoren.....	18
Abb. 7: Mechanismus der retroviralen Inetgration.....	20
Abb. 8: Struktur und Funktion der retroviralen Integrase.....	21
Abb. 9: Potentielle zelluläre Kofaktoren der Integration von HIV-1	25
Abb. 10: Die inverse PCR zur Klonierung von RIS.....	80
Abb. 11: Klonierung in den pCRII-TOPO-Vektor	83
Abb. 12: Aufbau und Mechanismus der siRNA-Expressionskassette	85
Abb. 13: Experimentelles Modell zur Klonierung und Analyse von retroviralen.....	89
Abb. 14: Darstellung der retroviralen Vektoren.....	91
Abb. 15: Nested PCR zur Klonierung der RIS.....	95
Abb. 16: Sequenzierung im pCRII-TOPO-Vektor	96
Abb. 17: Chromosomale Verteilung der retroviralen Integrationsstellen.....	100
Abb. 18: Die Integrationsfrequenz in RefSeq-Gene	102
Abb. 19: Verteilung der Integrationsstellen in RefSeq Genen	104
Abb. 20: Distanz der Integrationsstellen zum Transkriptionsstart von Genen.....	106
Abb. 21: Die Entfernung der retroviralen Integrationsstellen von CpG-Inseln.....	110
Abb. 22: Basenzusammensetzung an den PFV-Integrationsstellen	111
Abb. 23: Neg. log ₁₀ -Werte des χ^2 -Testes für die Basenzusammensetzung der PFV-Integrationsstellen	112
Abb. 24: Basenzusammensetzung der PFV-Integrationsstellen	113
Abb. 25: Retroviraler Vektor zur stabilen PFV-IN-Expression in humanen Zellen.....	115
Abb. 26: Western Blot von PFV IN expremierenden Zellen zum Nachweis der IN Expression.....	116
Abb. 27: Western Blot von 100 und 400CSK Lysaten mit IN spezifischen Antikörpern.....	117
Abb. 29: Eperimentelles Modell zur Identifikation von mit der PFV IN interagierenden zellulären Proteinen	120
Abb. 30: Pull-Down zur Identifikation von mit PFV-IN interagierenden zellulären Proteinen.....	121
Abb. 31: Ko-Immünpräzipitation von NF90 und DSRAD mit Flag spezifischen Antikörpern.....	122
Abb. 32: Western Blot zur Quantifizierung von NF90 nach der Anwendung von NF90-spezifischen siRNAs	124

6.6 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Klassifizierung der Familie der Retroviren.....	2
Tab. 2: Spumaviren-Isolate und ihre Wirte	5
Tab. 3 Prozentualer Anteil Marker-positiver Zellen pro MOI	79
Tab. 4: Für die Klonierung der RIS verwendete Primer Paare und Hybridisierungstemperatur.....	81
Tab. 5: Transduktionseffizienz der retroviralen Vektoren	92
Tab. 6: Ausbeute an klonierten retroviralen Intragationsstellen (RIS) unter	94
Tab. 7: Anzahl der in dieser Arbeit generierten Klone mit proviralen-zellulären Übergängen	97
Tab. 8: Anzahl an in dieser Arbeit untersuchten retroviralen Integrationsstellen.....	99
Tab. 9: Integration in RefSeq Gene	101
Tab. 10: PFV Integrationen in bekannte zelluläre Proto-Onkogene	108
Tab. 11: Maldi-Tof-Massenspektrometrie der mit der PFV IN interagierenden Proteine.....	121
Tab. 12: Die Integrations-Präferenzen verschiedener Retroviren.....	126
Tab. 13: NCBI Zugangsnummer der klonierten RIS.....	171
Tab. 14: Distanz der PFV-IS vom TSS bekannter Proto-Onkogene.....	171

6.7 Erklärung

Hiermit erkläre ich an eides statt, daß ich die Dissertation „Molekulare Untersuchungen zur Integration von Foamyviren“ 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.

Heidelberg, den 4.5.2007

Ali Nowrouzi

6.8 Lebenslauf

Geburtsdatum: 09.02.1976
Geburtsort: Teheran / Iran
Nationalität: iranisch / deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1982-1986 Grundschole Kronberg-Schönberg im Taunus
 1986-1987 Gesamtschole mit gymnasialer Oberstufe Kronberg im Taunus
 1987-1992 Deutsche Schole London (Gymnasium)
 1992-1996 Aufbaugymnasium Alzey, Abschluss: Abitur

Hochschulbildung:

10/1996-10/1998 Grundstudium Biologie an der Bayerischen Julius-Maximilian-Universität Würzburg, Abschluss: Vordiplom
 10/1998-11/2002 Hauptstudium Biologie an der Bayerischen Julius-Maximilian-Universität Würzburg, Abschluss: Diplom
 11/2002-12/2006 Promotion am Institut für Virologie der Bayerischen Julius-Maximilians Universität Würzburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Rethwilm.
 seit 2/2007 PostDoc am Deutschen Krebsforschungszentrum; Nationales Zentrum für Tumorerkrankungen; Abteilung Translationale Onkologie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr Christof von Kalle.

Stipendien:

11/2002-10/2005 Internationale Graduierten Kolleg GRK 587/2
 "Gene Regulation in and by Microbial Pathogens"

Heidelberg, den 04.05.2007

Ali Nowrouzi

6.9 Publikationsliste

Nowrouzi, A., Dittrich, M., Klanke, C., Heinkelein, M., Rammling, M., Dandekar, T., von Kalle, C., and Rethwilm, A. (2006) Genome-wide mapping of foamy virus vector integrations in a human cell line. *Journal of General Virology* 87:1339-1347.

Kretzschmar, B., Nowrouzi, A., Hartl, M., Gärtner, K., Wiktorowicz, T., Herchenröder, O., Kanzler, S., Rudolph, W., Mergia, A., Wöhrl, B., and Rethwilm, A. (2007) AZT-resistant foamy virus. *Journal of Virology* (eingereicht)

Erstautoren sind unterstrichen

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Prof. Dr Axel Rethwilm bedanken, der die Betreuung meiner Promotion übernommen hat. Seine Geduld und sympathische Art hat für ein sehr ausgeglichenes Arbeitsklima gesorgt, in der nicht nur das Erforschen verschiedener Aspekte der Foamyviren mir eine Freude bereitete, sondern auch das tägliche warten auf die Frage: „Was gibt's neues Ali?“.

An zweiter Stelle möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr Thomas Dandekar und Marcus Dittrich vom Lehrstuhl für Bioinformatik der Universität Würzburg bedanken, die maßgeblich bei der Auswertung der großen Anzahl an klonierten retroviralen Integrationsstellen beteiligt waren. Zudem bedanke ich mich bei Prof. Dr Thomas Dandekar für sein Interesse an dieser Arbeit und für seine Bereitschaft, die vorliegende Dissertation zu begutachten.

Ein großer Dank gilt Dr. Martin Heinkelein, der die Anfänge der vorliegenden Arbeit eingeleitet hat. Alle aktiven und ehemaligen Mietglieder der AG Rethwilm danke ich ebenfalls. Insbesondere möchte ich mich bei Matthias Rammling bedanken, den ohne seine Unterstützung bei der Durchführung unendlich vieler Minipräparationen hätte das Klonieren nur halb soviel Spaß gemacht. Auch bei Dr. Benedikt Weißbrich und der diagnostischen Abteilung unseres Institutes möchte ich mich für die Durchführung der vielen Sequenzierungen bedanken.

Dr. Mark Kirschner möchte ich für die wohlgemeinten kritischen Ratschläge beim Zusammenschreiben dieser Arbeit und bei der Durchführung verschiedener Experimente bedanken.

Weiterhin bin ich Dorothea Karl unendlich dankbar. Ihre Unterstützung in schweren Zeiten und nicht zuletzt ihre geduldige Korrektur der vorliegenden Arbeit sowie die Hilfe bei meinem beruflich bedingten Umzug nach Heidelberg hat mir sehr geholfen. Ich hoffe, dass unsere Freundschaft nie endet.

Meinen Eltern sowie meiner Familie danke ich dafür, dass sie trotz der Ferne mich während meinem Studium immer unterstützt haben und mich bei meinen Besuchen in meinem Heimatland mit Energie aufgeladen haben.

Zuletzt danke ich Dr. Manfred Schmidt, Prof. Dr. Christof von Kalle sowie der gesamten AG von Kalle für Ratschläge und der Unterstützung beim anfertigen der vorliegenden Arbeit.

Heidelberg, den 04.05.2007

Ali Nowrouzi