

Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. Axel Rethwilm

**Verwandlung eines komplexen Retrovirus in ein
einfaches am Beispiel des Foamy Virus**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Maya Müller- Hermelink
aus Hamburg
Würzburg, Dezember 2007

Referent: Prof. Dr. med. Axel Rethwilm

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. Joachim Morschhäuser

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 17. März 2008

Die Promovendin ist Ärztin

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Retroviren	1
1.1.1. Geschichte und Klassifizierung.....	1
1.1.2. Aufbau und Genom der Retroviren	3
1.1.3. Replikationszyklus der Retroviren.....	6
1.2. Foamyviren	12
1.2.1. Geschichte	12
1.2.2. Aufbau und Genom	13
1.2.3. Replikationszyklus der Foamyviren	19
1.3. Vektoren und ihre Anwendung	21
1.3.1. Virale Vektoren.....	21
1.3.2. Foamyvirale Vektoren.....	25
1.4. Zielsetzung der Arbeit	28
2. Material	29
2.1. Geräte und Materialien	29
2.2. Chemikalien	31
2.3. Antiseren	33
2.4. Kits und gebrauchsfertige Substanzen	34
2.5. Enzyme	34
2.6. Nukleinsäuren	35
2.7. Oligonukleotide	35
2.7.1. Primer für präparative PCR	35

2.7.2.	Primer für analytische PCR.....	35
2.8.	Plasmidliste.....	36
2.9.	Kompetente Bakterien.....	36
2.10.	Zelllinien.....	37
2.11.	Lösungen, Medien und Puffer.....	37
2.11.1.	Bakterienkultur.....	37
2.11.2.	Plasmidpräparation (Minipräparation).....	38
2.11.3.	Agarose-Gelelektrophorese.....	38
2.11.4.	Polyacrylamidgel-Elektrophorese.....	39
2.11.5.	Western Blot.....	40
2.11.6.	Zellkultur.....	40
2.11.7.	Calciumphosphat-Transfektion.....	41
2.11.8.	β -Galactosidase Färbung von BHK/LTRlacZ-Zellen.....	42
2.11.9.	Infectious center assay.....	42
3.	Methoden.....	43
3.1.	Molekularbiologie.....	43
3.1.1.	Transformation.....	43
3.1.2.	Minipräparation von Plasmid-DNA.....	43
3.1.3.	Maxipräparation von Plasmid-DNA.....	44
3.1.4.	Ampicillin als Selektionsmarker.....	45
3.1.5.	Phenol/Chloroform Extraktion von DNA.....	45
3.1.6.	Ethanolpräzipitation.....	46
3.1.7.	Spektrophotometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.....	46
3.1.8.	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen.....	47

3.1.9.	Klenow-Auffüllreaktion.....	47
3.1.10.	Abbau überhängender 3'-Enden mittels T4-DNA-Polymerase.....	48
3.1.11.	Dephospholierung von 5'-Enden	48
3.1.12.	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	49
3.1.13.	Ligation von DNA-Fragmenten.....	50
3.1.14.	Agarosegel-Gelelektrophorese.....	50
3.1.15.	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	51
3.1.16.	Sequenzierung	52
3.1.17.	Präparation von DNA aus Zellkulturen.....	52
3.1.18.	Klonierung mit Hilfe des TOPO-TA-Cloning-Kit (Invitrogen)	53
3.2.	Proteinbiochemische Methoden.....	54
3.2.1.	Herstellung von Zellysaten für Western Blot.....	54
3.2.2.	Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE).....	55
3.2.3.	Western Blot.....	56
3.3.	Zellbiologische Methoden	57
3.3.1.	Zellkultur.....	57
3.3.2.	Transfektion mit Calciumphosphat (CaPO ₄)	58
3.3.3.	Polyfect-Transfektion.....	58
3.4.	Virologische Methoden.....	59
3.4.1.	Infektion von Zielzellen	59
3.4.2.	Virustitration mittels Infectious Centre Assay (ICA).....	59
3.4.3.	PFV-Titration mit BHK/LTR lacZ-Zellen	61
3.4.4.	Generierung viraler Überstände zur Transduktion von Zielzellen	62
4.	Ergebnisse	63

4.1.	Infektiöse Klone mit konstitutiv aktiven LTR-Promotoren.....	63
4.1.1.	Konstrukte mit rekombinanter 3'-LTR	63
4.1.2.	Konstrukte mit veränderter 5' und 3'-LTR.....	68
4.2.	Replikationskompetenz und Virustiter.....	69
4.2.1.	Nachweis der Replikationsfähigkeit.....	69
4.2.2.	Bestimmung der Virustiter in zellfreien Überständen.....	72
4.3.	Genetische Stabilität der rekombinanten Viren	73
4.3.1.	Stabilität der rekombinanten LTR.....	73
4.3.2.	Stabilität des tas-Gens.....	75
4.4.	Vereinfachte Foamy Virus Vektoren und Verpackungskonstrukte	78
4.4.1.	Vektorkonstruktion MMH8.....	78
4.4.2.	Analyse Vektor Transfer Effizienz.....	80
5.	Diskussion	81
5.1.	Foamyvirale Vektoren	81
5.1.1.	Replizierende Foamyvirus- Vektoren	83
5.1.2.	Konstruktion von FV mit konstitutiv aktivem Promoter	85
5.1.3.	Rekombination zwischen unterschiedlichen LTRs.....	87
5.2.	Virustiter und Replikationskinetik	89
5.2.1.	Replikationsverhalten der MMH-Konstrukte im Vergleich zu TS-Konstrukten 89	
5.2.2.	Promotor-Interferenz.....	90
5.2.3.	Nicht- replizierendes Vektorsystem.....	91
5.3.	Hypothese	93
5.4.	Zusammenfassung.....	94

6. Literatur	96
7. Abkürzungen	107

1. Einleitung

1.1. Retroviren

1.1.1. Geschichte und Klassifizierung

Das klassische Dogma der Molekularbiologie besagt, dass DNA als Matrize für RNA dient, welche in Protein translatiert wird. Erst Anfang der 70er Jahre gelang der experimentelle Nachweis, dass der genetische Informationsfluss auch von RNA zu DNA stattfinden kann.

1970 entdeckten Howard M. Temin und S. Mizutani sowie David Baltimore das dazugehörige Enzym, welches in der Lage ist, das RNA-Genom einiger Viren in cDNA umzuschreiben (Temin & Mizutani, 1970; Baltimore, 1970). Die Reverse Transkriptase schreibt RNA in doppelsträngige DNA um, was sich auch in der Bezeichnung „Retroviren“ widerspiegelt.

Inzwischen kennt man auch viele DNA-Sequenzen in Säugetieren (Pseudogene, einige stark repetitive Sequenzen und bestimmte Typen von Transposons), die durch Reverse Transkription entstanden sein müssen. Ebenso ist bekannt, dass die Reverse Transkription wesentlich für den Replikationszyklus der Hepadnaviren sowie der Pflanzen-Caulimoviren ist.

Das erste zur Familie der Retroviren gehörende Virus wurde bereits 1911 von Peyton Rous beschrieben und später nach ihm benannt: Das Rous-Sarkoma-Virus, welches Sarkome bei Geflügel hervorrufen kann. 1980 entdeckte Robert C. Gallo das HTLV (humanes T-Zell-Leukämie-Virus), das erste humanpathogene Retrovirus, das bei Menschen Tumorerkrankungen hervorrufen kann.

Auch das stark pathogene Human Immunodeficiency Virus (HIV), der Erreger der erworbenen Immunschwäche AIDS, gehört zur Gruppe der Retroviren. Diese Erkenntnis führte zu einer bis heute anhaltenden starken Forschungsaktivität auf dem Gebiet der Retroviren und bewirkte, dass heute viele Einzelheiten der Molekularbiologie dieser Virusfamilie bekannt sind.

Die Familie der Retroviren wird in zwei Subfamilien und sieben Genera unterteilt. Die Einteilung erfolgt anhand ihrer Unterschiede in den verursachten Erkrankungsformen sowie aufgrund morphologischer und genetischer Besonderheiten (Tab.1). Bei den Subfamilien gibt

es zum einen die Orthoretroviren, zu denen alle Gattungen außer den Spumaviren zählen. Die Spumaviren, für die in vivo keine Pathogenität bekannt ist (Linial 2000; Meiering & Linial, 2001), unterscheiden sich in vielen Merkmalen von allen anderen Retroviren, weshalb sie eine eigene Subfamilie bilden (Rethwilm, 2003).

In funktionaler Hinsicht werden einfache von komplexen Retroviren unterschieden (Cullen, 1991). Zur Gruppe der einfachen Retroviren zählt man die Alpha-, Beta- und Gammaretroviren, die nur die Strukturgene gag, pol und env besitzen. Die komplexen Retroviren, zu denen die Delta-, Epsilon-, Lenti- und Spumaretroviren gehören, besitzen weitere Gene, die akzessorische Proteine kodieren. Einige dieser Proteine sind replikationsnotwendige Regulatoren, die die Genexpression auf transkriptionaler sowie posttranskriptionaler Ebene beeinflussen.

Weiterhin kann man zwischen exogenen und endogenen Retroviren unterscheiden. Erstere besitzen in ihrem Genom alle Informationen, die für den Ablauf eines Infektionszyklus mit Freisetzung von infektiösen Viruspartikeln benötigt werden. Endogene Retroviren sind in die Keimbahn des Wirtsgenoms integriert und befinden sich in der Regel in nicht-funktionaler Form in fast jedem Genom im Tierreich (Boeckle & Stoye, 1997).

Subfamilie	Genus	Beispiel	Virusmorphologie	Genom
Orthoretroviren	Alpharetroviren	ALV (Avian Leukosis Virus)	Zentral liegende, sphärische Kapside „C-Partikel“	einfach
	Betaretroviren	MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus)	Exzentrisch liegende, sphärische Kapside	einfach
		MPMV (Mason-Pfizer Monkey Virus)	„B-Partikel“ (MMTV) oder Zylindrische Kapside „D-Partikel“ (MPMV)	
	Gammaretroviren	MuLV (Murine Leukemia Virus)	Zentral liegende, sphärische Kapside „C-Partikel“	einfach
Deltaretroviren	BLV (Bovine Leukemia	Zentral liegende, sphärische	komplex	

		Virus)	Kapside „C-Partikel“	
		HTLV (Human T-cell Leukemia Virus)		
	Epsilonretroviren	WDSV (Walleye Dermal Sarcoma Virus)	Zentral liegende, sphärische Kapside „C-Partikel“	komplex
	Lentiviren	HIV (Human Immunodeficiency Virus)	Konusförmige Kapside	komplex
Spumaretroviren	Foamyviren	PFV (Prototype Foamy Virus)	Zentral liegende, sphärische Kapside	komplex

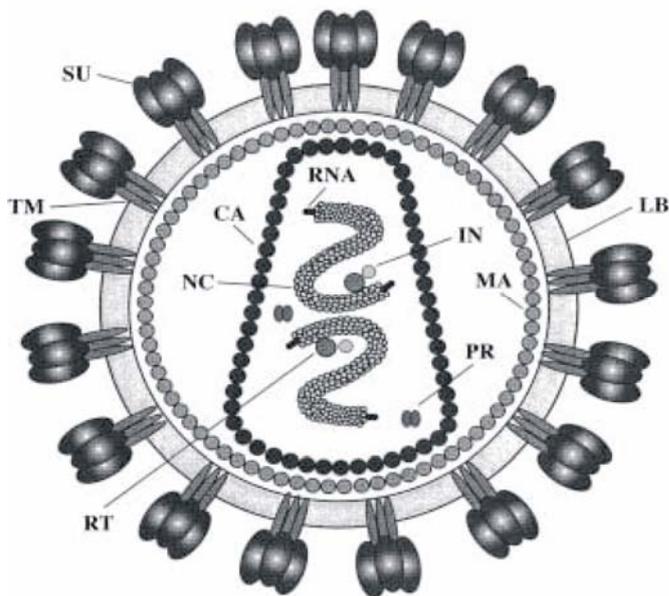
Tabelle 1: Die ICTV Nomenklatur der Retroviren (nach Rethwilm, 2003)

1.1.2. Aufbau und Genom der Retroviren

Die infektiösen Partikel der verschiedenen Retroviren sind alle ähnlich aufgebaut (Fig.1). Sie sind sphärisch und haben einen Durchmesser zwischen 80 und 120 nm. Das virale Kapsid ist von einer Lipiddoppelmembran umgeben, die von der Zytoplasmamembran der infizierten Wirtszelle abgeleitet ist. Mit dieser Membran sind zwei viral kodierte Hüllproteine (Env) assoziiert, welche in der Lage sind, an Rezeptoren auf der jeweiligen Zielzelle anzudocken und so den Eintritt zu ermöglichen. Das Transmembran-Protein (TM) ist mit einem hydrophoben Bereich von ca. 20 Aminosäuren in der Lipiddoppelschicht des Viruspartikels verankert. Das Surface-Protein (SU) ist meist nichtkovalent am außerhalb liegenden Teil von TM gebunden und verantwortlich für die Bindung an die zellulären Rezeptoren.

Unter der Hüllmembran befindet sich eine Schicht Matrixproteine (MA), die über aminoterminal angefügte Myristinsäurereste mit der Membraninnenseite verbunden sind (Goff, 2001).

Im Partikelinneren befindet sich das Kapsid, welches je nach Virustyp in seiner Struktur unterschiedlich ist. Die Viruskapside besitzen entweder eine sphärisch-ikosaedrische oder konische Form und befinden sich meist im Zentrum des Partikels.



CA	Kapsid	PR	Protease
IN	Integrase	RT	Reverse Transkriptase
LB	Lipiddoppelschicht	SU	Surfacedomäne
MA	Matrix	TM	Transmembrandomäne
NC	Nucleokapsid		

Abb. 1: Retroviruspartikel (schematische Darstellung). Abbildung modifiziert nach Freed & Martin, 2001.

Die Kapsidhülle wird aus den Kapsidproteinen (CA) gebildet. Im Inneren des Kapsids befindet sich das Virusgenom, welches aus zwei identischen Molekülen einzelsträngiger +-RNA besteht, die mit Nucleokapsidproteinen (NC) komplexiert sind. Als weitere Komponenten befinden sich im Kapsidinneren drei unterschiedliche Strukturproteine, welche für den viralen Replikationszyklus wichtig sind (siehe Abschnitt 1.3): Die reverse Transkriptase (RT), die Integrase (IN) sowie ein tRNA-Primer, der an die PBS (Primerbindungsstelle) gebunden ist und der Initiation der Reversen Transkriptase dient. Die virale Protease, die die Spaltung von Vorläuferproteinen vornimmt, liegt sowohl in als auch außerhalb des Kapsids (Vogt, 1997b).

Das Genom der Retroviren besteht aus einzelsträngiger RNA, die je nach Virustyp zwischen 7.000 Basen, wie beispielsweise beim MLV (Mausleukämievirus) und 12.000 Basen, etwa beim Spumaretrovirus, lang ist. Die Struktur eines RNA-Genoms, am Beispiel eines einfachen Retrovirus, ist in Abb.2 dargestellt.

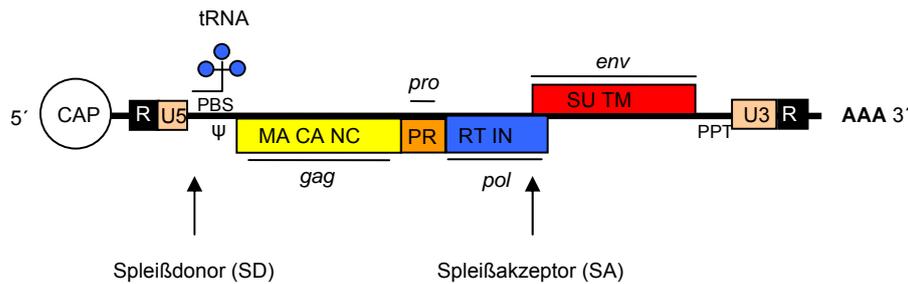


Abb. 2: Einfaches retrovirales Genom (schematische Darstellung).

Die retrovirale RNA besitzt eine 5'-Cap Struktur und am 3'-Ende einen ca. 200nt langen Poly-A-Schwanz. Damit verfügt sie über alle Charakteristika einer eukaryotischen mRNA. Das Genom aller einfachen Retroviren enthält drei ORF (offene Leseraster), die für Strukturproteine und Enzyme kodieren. Das gag-Gen (für gruppenspezifisches Antigen) kodiert für alle inneren Strukturproteine. Von 5' nach 3' liegen die Sequenzen für die Untereinheiten Matrixproteine (MA), Kapsidproteine (CA) und Nukleokapsid (NC). Das Gag-Protein wird als einzelnes Polypeptid synthetisiert, welches dann von der viralen Protease gespalten wird, wodurch die unabhängigen MA, CA und NC Proteine gebildet werden. Unmittelbar stromabwärts der gag-Region folgt das pol-Gen (für Polymerase), das für die Synthese der viralen Enzyme, der Protease, der Reversen Transkriptase und der Integrase, verantwortlich ist. Auch die Produkte des pol-Gens werden als Vorläuferprotein gebildet. Es handelt sich um ein Fusionsprotein zwischen den aminoterminalen Gag-Proteinen und den anschließenden pol-Domänen, die später durch die Protease freigesetzt werden. Alle Orthoretroviren haben einen Mechanismus entwickelt, der dafür sorgt, dass Gag sehr viel häufiger translatiert wird als Pol; zum Beispiel befindet sich bei MLV ein Stop-Codon zwischen gag und pol. Bei etwa jeder 20. Translation kommt es zu keiner Termination am Stop-Codon, was zu dem oben beschriebenen Gag/Pol Vorläuferprotein führt. Dieser Vorgang führt zu einem Verhältnis Gag gegenüber Gag/Pol von 20:1.

Weiter stromabwärts folgt das env-Gen (für Envelope), welches die Sequenz für zwei Hüllglykoproteine trägt, das SU- und das TM-Protein, die durch eine zelluläre Protease aus einem Vorläufermolekül gespalten werden. Komplexe Retroviren besitzen zusätzliche ORF, die für akzessorische Proteine kodieren.

Die kodierenden Regionen werden am 5'- und 3'-Ende von Kontrollsequenzen flankiert, die für die reverse Transkription sowie die Integration der cDNA in die zelluläre DNA und die Genexpression bedeutsam sind. Am 5'-Ende schließt sich direkt an die Cap-Struktur die R-Region an. Das R steht für redundant oder repeat, da diese Region in identischer Basenfolge und Orientierung auch am 3'-Ende zu finden ist. Der R-Region folgen im 5'-Bereich die als U5 (= unique, im Gegensatz zu R nur einmal vorhanden) bezeichnete Sequenzen, die für die Integration des Provirus in das Zellgenom wichtig sind. An U5 anschließend findet sich die Primer-Bindungsstelle (PBS) mit einer Länge von 18 Basen, an die ein tRNA-Primer bindet, der für die Minusstrangsynthese bei der Reversen Transkription nötig ist. Zwischen PBS und dem Start der kodierenden Region befindet sich die *Leader*-Region, bei MLV der Hauptpleissdonor (SD), der für die Produktion aller gespleissten mRNA-Moleküle verwendet wird, sowie das Verpackungssignal Psi, welches für die Verpackung der viralen RNA in sich bildende Viruspartikel notwendig ist. Im Anschluss an die kodierende Region befindet sich der Polypurintrakt (PPT) am 3'-Ende vor dem Start der U3-Region. Dies ist eine allen Retroviren eigene Folge von mindestens neun Adenosin- und Guanosinresten, die für die Initiation der Plus-Strang DNA-Synthese bei der reversen Transkription entscheidend ist (Telesnitsky & Goff, 1997). Im Anschluss daran folgt die U3-Region (*U* = unique, einmalig am 3'-Ende), die analog zum U5-Bereich nach ihrer Lage am 3'-Ende des Genoms bezeichnet wird. Sie enthält zahlreiche wichtige Sequenzen zur Kontrolle der Replikation und Genexpression (Promotor und Enhancer). Darauf folgt die 3'-terminale R-Region.

1.1.3. Replikationszyklus der Retroviren

Es sind vor allem zwei Merkmale im Replikationszyklus, die Retroviren von anderen Viren unterscheiden. Zum einen die Reverse Transkription (Umschreiben von einzelsträngiger RNA in doppelsträngige DNA) und zum anderen die Integration des reversen Transkripts in das Genom der Zielzelle.

Der Replikationszyklus des Retrovirus beginnt mit dem Andocken an den Rezeptor der Zielzelle (Abb.3). Viele verschiedene Zelloberflächenproteine können dabei als Rezeptoren für unterschiedliche Retroviren agieren. Als erstes wurde das CD4-Oberflächenprotein, das als Rezeptor für die Infektion mit HIV wichtig ist, identifiziert (Dagleish et al., 1984; Klatzmann et al., 1984).

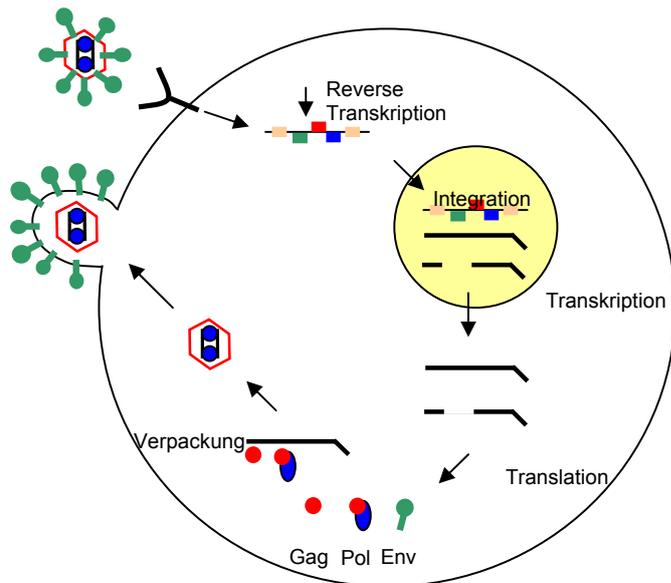


Abb. 3: Der retrovirale Replikationszyklus am Beispiel eines einfachen Retrovirus' (verändert nach Pietschmann, 2000).

Die auf der Oberfläche der Virushülle sitzende SU-Untereinheit dockt am Rezeptormolekül der Zielzelle an. Es kommt zu einer Konformationsänderung des Glykoproteins, was zur Aktivierung eines Fusionspeptids des TM-Proteins führt und die Verschmelzung der Virushülle mit der Zellmembran einleitet (Hunter, 1997).

Vermutlich ist die Interaktion vieler verschiedener Hüll- und Zellrezeptorproteine notwendig, um eine komplette Fusion einzuleiten. Die Fusion kann entweder direkt an der Cytoplasmamembran stattfinden, oder das Virus wird zuerst mittels Endocytose in die Zelle aufgenommen woraufhin die Fusion mit einem endosomalen Vesikel in der Zelle stattfindet (Russel & Marsh, 2001). Bei der Fusion verschmilzt die Hüllmembran des Virus mit der endosomalen Matrix und das Viruskapsid wird in das Zytoplasma der Wirtszelle entlassen. Nun wird das RNA-Genom als Komplex mit Proteinen freigelassen, ein Prozess der als

„Uncoating“ bezeichnet wird. Währenddessen oder nach Freisetzung der RNA in das Cytoplasma kommt es zur reversen Transkription. Dabei wird das einzelsträngige RNA-Genom in doppelsträngige DNA transkribiert.

Dieser Vorgang findet in einem Komplex statt, der mindestens aus NC, RT, IN und genomischer RNA besteht. Dafür werden Sequenzen von einem Ende der RNA dupliziert und die Kopie an das andere Ende platziert. Auf diese Weise finden sich beim Provirus auf beiden Seiten gleiche, aus U3, R und U5 gebildete Sequenzen. Diese werden als Long Terminal Repeats (LTR) bezeichnet und führen dazu, dass die provirale DNA länger als die genomische RNA ist.

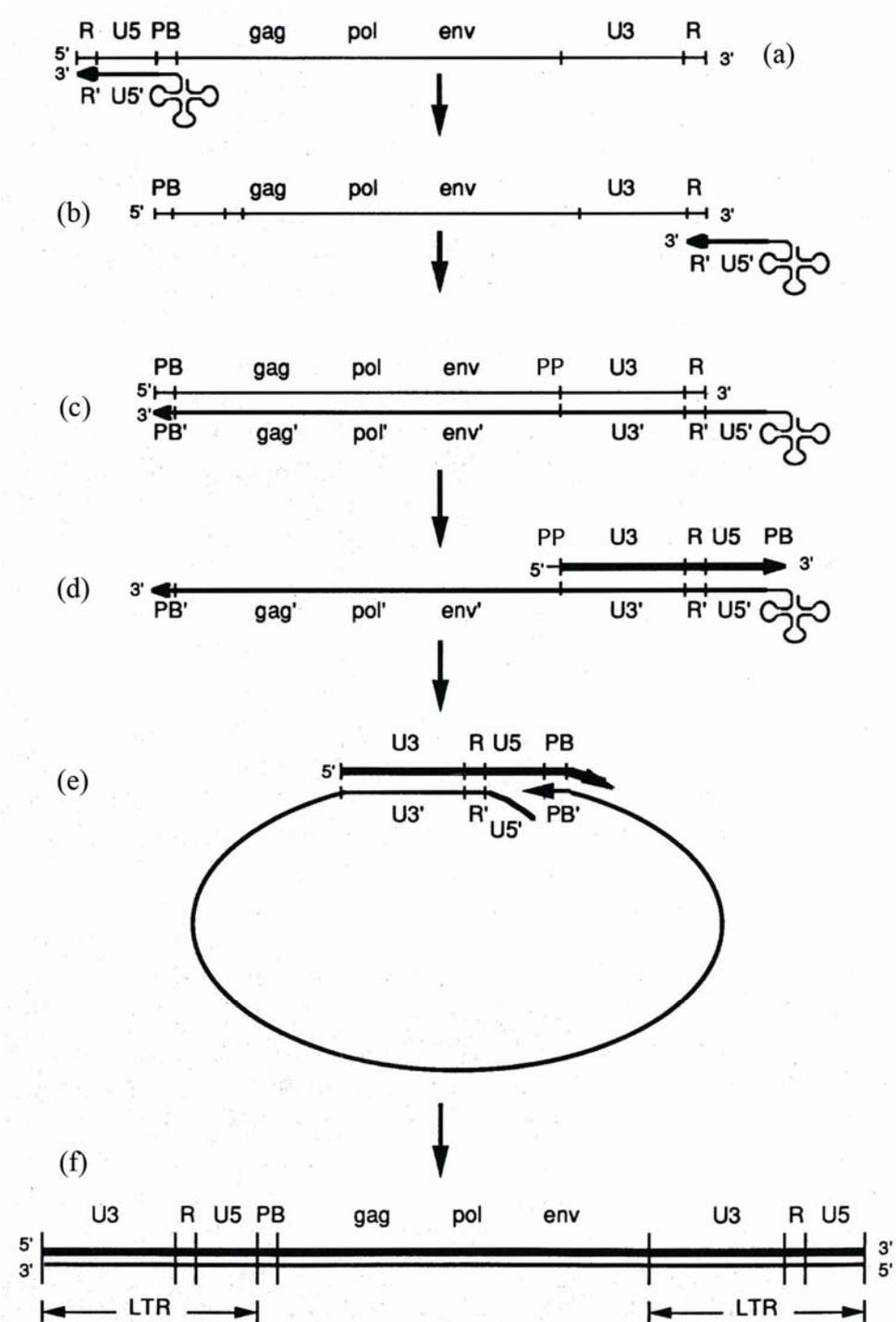


Abb.4: Modell für Reverse Transkription (nach Coffin, 1990).

Schwache Linien RNA Mittelkräftige Linien - Strang DNA Kräftige Linien + Strang DNA

Die RT beginnt am 3'-Ende des tRNA-Primers und kopiert bis zum 5'-Ende des Templates (a). Durch die RNaseH-Aktivität der RT wird das Template abgebaut und die neu synthetisierte -Strang strong-stop DNA springt zum 3'-Ende der RNA, um dort eine Basenpaarung im R-Bereich einzugehen (b). Dort kommt es entlang des RNA-Genoms zur Verlängerung der strong-stop DNA zur -Strang cDNA und zum Abbau der RNA durch die RNaseH (c). Lediglich der PPT am 3'-Ende des Genoms ist zunächst gegenüber der RNaseH resistent und dient als Primer für die +Strang strong-stop cDNA Synthese, bevor auch er eliminiert wird (d). Die +Strang strong-stop cDNA erstreckt sich über den Bereich U3, R, U5 bis hin zur tRNA, die nun auch durch die RNaseH hydrolysiert wird. Die +Strang strong-stop cDNA kann nun durch komplementäre Sequenzen der PBS mit der -Strang cDNA über ein zirkuläres Intermediat hybridisieren (e). Die beiden Stränge werden vervollständigt und die Enden aufgefüllt (f), so dass das Virusgenom schließlich als doppelsträngiges lineares DNA-Molekül vorliegt, bei dem die kodierenden Sequenzen von den LTR-Regionen flankiert werden.

Das Vorkommen von Templatesprüngen während der Reversen Transkription ist eine mögliche Erklärung für das Vorhandensein von zwei RNA-Genomen im Viruspartikel. Möglicherweise muss die RT vom 5'-Ende des einen RNA-Strangs zum 3'-Ende der Kopie hüpfen (intermolekulare Sprünge). Experimentell konnte gezeigt werden, dass die retrovirale DNA durch inter- und intramolekulare Sprünge gebildet wird. Demnach würde die Möglichkeit von intermolekularen Sprüngen die Effekte von Genomschäden verkleinern und durch die verbesserte Vermehrungsfähigkeit des Virus' einen Evolutionsvorteil bedeuten. Da die RT keine Korrekturlesefähigkeit besitzt, kommt es mit einer Wahrscheinlichkeit von 10^{-3} – 10^{-4} pro Base und Replikationszyklus zu Mutationen. Dies führt zusammen mit einer hohen Replikationsrate zu einer hohen Mutationsrate (Modrow & Falke, 1997; Vogt, 1997b).

Das doppelsträngige DNA-Genom gelangt mit den Kapsidkomponenten als so genannter Präintegrationskomplex in den Zellkern. Dies geschieht entweder im Rahmen der Mitose, wenn die Zellmembran aufgelöst und wiederhergestellt wird (Bukrinsky et al., 1992), oder im Falle der Lentiviren durch aktiven Transport in den Nukleus.

Im Zellkern wird das doppelsträngige DNA-Molekül in das Genom der Wirtszelle integriert. Der Integrationsprozess erfolgt in drei grundlegenden Schritten. Zuerst werden zwei Basen an

beiden 3'-Enden der proviralen DNA entfernt. Dadurch entstehen 5'-überhängende einzelsträngige Dinukleotide. Nun wird die zelluläre DNA an einer mehr oder weniger willkürlichen Stelle geschnitten, so dass 5'-überhängende Enden entstehen, je nach Virustyp sind sie 4-6 Basen lang.

Die 3'-Enden der Provirus-DNA ligieren nun mit den 5'-Enden der genomischen DNA. Zuletzt werden die Lücken und eventuelle falsch zugeordnete Basen durch DNA Reparatursysteme der Wirtszelle ergänzt und ausgebessert. Infizierte Zellen enthalten in der Regel 1-20 Kopien der Provirus-DNA. Es gibt keine spezifischen Integrationsstellen, allerdings gibt es eine gewisse globale und auch sehr lokale Präferenz, bestimmte Abschnitte der DNA für die Integration zu bevorzugen. Für gegebene Retroviren können diese Präferenzen unterschiedlich sein (s.u.).

Die Integration des Virusgenoms ist ausschlaggebend für die Expression der Virusgene. Dieser Prozess ähnelt der Produktion von zellulärer mRNA. Zelluläre DNA-abhängige RNA-Polymerase II transkribiert das Provirus, beginnend am U3-R-Übergang. Das Primärtranskript wird durch Wirtsenzyme am 5'-Ende mit der Cap-Struktur versehen und am 3'-Ende polyadenyliert. Die vom Provirus transkribierte mRNA-Kopie in voller Länge dient einerseits als genomische RNA für neue Viren und andererseits als mRNA für die Proteinexpression. Sie wird in das Cytoplasma transportiert und dort an den Ribosomen translatiert. Die Gag und Gag/Pro/Pol-Polyproteine bilden ein Vorläuferkapsid, in das die RNA verpackt wird. Zuvor muss die RNA mit ihrem Verpackungssignal Psi mit dem NC-Protein des Gag-Vorläufers interagieren. Die Glykoproteine werden von einer gespleissten mRNA translatiert. Eine Furin-ähnliche zelluläre Protease spaltet im Golgi-Apparat SU und TM aus dem Env-Vorläufermolekül. Nun kann das entstandene Kapsid mit den in die Zellmembran eingelagerten Env-Proteinen über die Matrixdomäne in Kontakt treten. Das unreife Virus trennt sich durch Knospung („Budding“) von der Wirtszelle. Dabei nimmt es einen Teil der Cytoplasmamembran, die dann die Virushülle bildet, mit eingelagerten Env-Proteinen mit (Goff, 2001). Die Reifung zu einem infektiösen Partikel erfolgt nach der Knospung, wenn die Protease die im Kapsid verpackten Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteine in ihre funktionsfähigen Untereinheiten spaltet.

1.2. Foamyviren

1.2.1. Geschichte

Foamyviren (Spumaretroviren), gehören zur Familie der Retroviren (siehe 1.1). Sie wurden das erste Mal 1954 in aus Affennierengewebe gewonnenen Zellkulturen beschrieben (Enders et al., 1954). 1955 konnte das erste Foamyvirus aus diesem Gewebe isoliert werden (Rustigian et al., 1955). Bis heute wurden viele verschiedene Isolate in unterschiedlichsten Tiergattungen gefunden.

Ein so genanntes humanes Isolat wurde 1971 aus lymphoblastoiden Zellen eines kenianischen Patienten mit Nasopharynxkarzinom gewonnen (Achong et al., 1971). Es war das erste Retrovirus überhaupt, das man aus menschlichem Gewebe isolieren konnte. Es wurde anfangs als Humanes Foamyvirus (HFV) bezeichnet, spätere Sequenzanalysen ergaben allerdings, dass aus dem Patienten ein Foamyvirus des Schimpansen ($SFV_{cpz(hu)}$) isoliert wurde (Herchenröder et al., 1994). Man geht davon aus, dass es sich um eine Transspeziesinfektion handelte, allerdings konnte auch eine Laborkontamination nicht ausgeschlossen werden (Meiering & Linial, 2001).

Ihren Namen verdanken die Foamyviren ihrem ausgeprägten cytopathischen Effekt (CPE), den sie in infizierten Zellkulturen hervorrufen können. Es bilden sich große multinukleäre Synzytien mit einem schaumartigen (engl.: foam) polyvakuolisierten Cytoplasma, welche zum Zelltod führen.

In vitro sind FV in der Lage, viele Zelltypen eines weiten Spektrums von Spezies zu infizieren (Hill et al., 1999; Mergia et al., 1996). Dennoch kann das Ergebnis einer solchen Infektion je nach Zelltyp sehr unterschiedlich ausfallen. Fibroblasten, wie zum Beispiel aus menschlichen embryonalen Lungen, Baby-Hamster-Nieren oder Mus dunni Schwanz-Fibroblasten sind besonders empfindlich für den zytopathischen Effekt nach FV-Infektion. Demgegenüber ist es ebenso möglich, eine ganze Reihe von Ziellinien ohne Auftreten von CPE in vitro chronisch zu infizieren. Beispielsweise konnten transformierte Zellen myeloischen, erythroiden oder auch lymphoiden Ursprungs chronisch infiziert werden (Mergia et al., 1996; Mikovits et al., 1996; Yu et al., 1996). So konnte nachgewiesen werden, dass humane Lymphozyten nach FV-Infektion CPE zeigten, wo hingegen in infizierten Monozyten kein CPE gefunden werden konnte

(Mikovits et al., 1996). Chronisch infizierte Zellen haben in Kultur zwar eine kontinuierliche Virusproduktion ohne erkennbaren Zelltod, produzieren aber deutlich niedrigere Virustiter als bei cytopathischen Infektionen (Yu et al., 1996). Bis heute weiß man nicht genau, was die unterschiedlichen Verläufe einer FV-Infektion bestimmt.

FV-Infektionen beim Menschen wurden über die Jahre mit vielen verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht, wie zum Beispiel mit M. Basedow (Wick et al., 1993), Myasthenia gravis (Saib et al., 1992) oder auch mit Multipler Sklerose (Westarp et al., 1992). Diese Hypothesen konnten aber nicht bestätigt werden, und bis heute gibt es keinen Hinweis auf ein humanpathogenes Potential von Foamyviren (Linial, 2000; Meiring & Linial, 2001). So wurde FV auch schon als „a virus in search of a disease“ (Weiss, 1988) beschrieben.

Menschliche FV-Infektionen treten immer als Transspeziesinfektionen auf und sind bei Tierpflegern in Primatenzentren und Zoos sowie bei Jägern von Affen in Afrika beschrieben worden. Eine zwischenmenschliche horizontale Übertragung von FV konnte nicht nachgewiesen werden (Callahan et al., 1999; Boneva et al., 2002). Die vermutliche Apathogenität und weitere Aspekte (näher erläutert in Abschnitt 3) machten FV für einen Einsatz als Vektoren in der Gentherapie attraktiv (Russel & Miller, 1996; Nestler et al., 1997; Hill et al., 1999; Lindemann et al., 2000; Trobridge, 2002).

1.2.2. Aufbau und Genom

Foamyviren unterscheiden sich in ihrer Morphologie von allen anderen Retroviren. Sie besitzen ein unreif aussehendes Kapsid (Core) (Saib et al., 1995). Ebenfalls kennzeichnend sind die prominenten Spikes auf der Oberfläche der Virushülle, die aus Envelope-Glykoproteinen gebildet werden. Im Elektronenmikroskop zeigen sich sphärische Partikel mit einem Durchmesser von 100-140nm und Spikes mit einer Länge von 5-15nm.

Das Genom des PFV ist mit 12-13kb das längste unter den Retroviren. Aufgrund ihres Genomaufbaus gehören die FV zu den komplexen Retroviren (Cullen, 1991; Löchelt & Flügel, 1995; Rethwilm, 1995; Linial, 1999). Neben den üblichen kodierenden Bereichen für gag, pol und env und den regulatorischen Elementen in den LTRs sind bei den FVs zwei zusätzliche ORFs identifiziert worden, die zwischen env und der 3'-LTR lokalisiert sind. Sie werden zusammenfassend als bel-Gene bezeichnet (bel= between env and LTR) (Flügel et al., 1987).

Ein akzessorischer ORF kodiert für das transaktivierende Protein Tas (Transaktivator von Spumaviren; auch als bel1 bezeichnet)(Rethwilm et al., 1991). Tas ist ein DNA-bindendes Protein.

Zusätzlich zu einem Promotor (P) in der U3-Region der LTR, der bei allen Retroviren vorkommt, besitzen FV einen zweiten Promotor, den „internal promotor“ (IP), am Ende des Env-Gens stromaufwärts der akzessorischen ORFs (Löchelt et al., 1994). Der U3-Promotor ist verantwortlich für die Genexpression von gag, pol und env, während der IP die Expression der akzessorischen Proteine steuert. Beide Promotoren benötigen Tas für eine starke Genexpression.

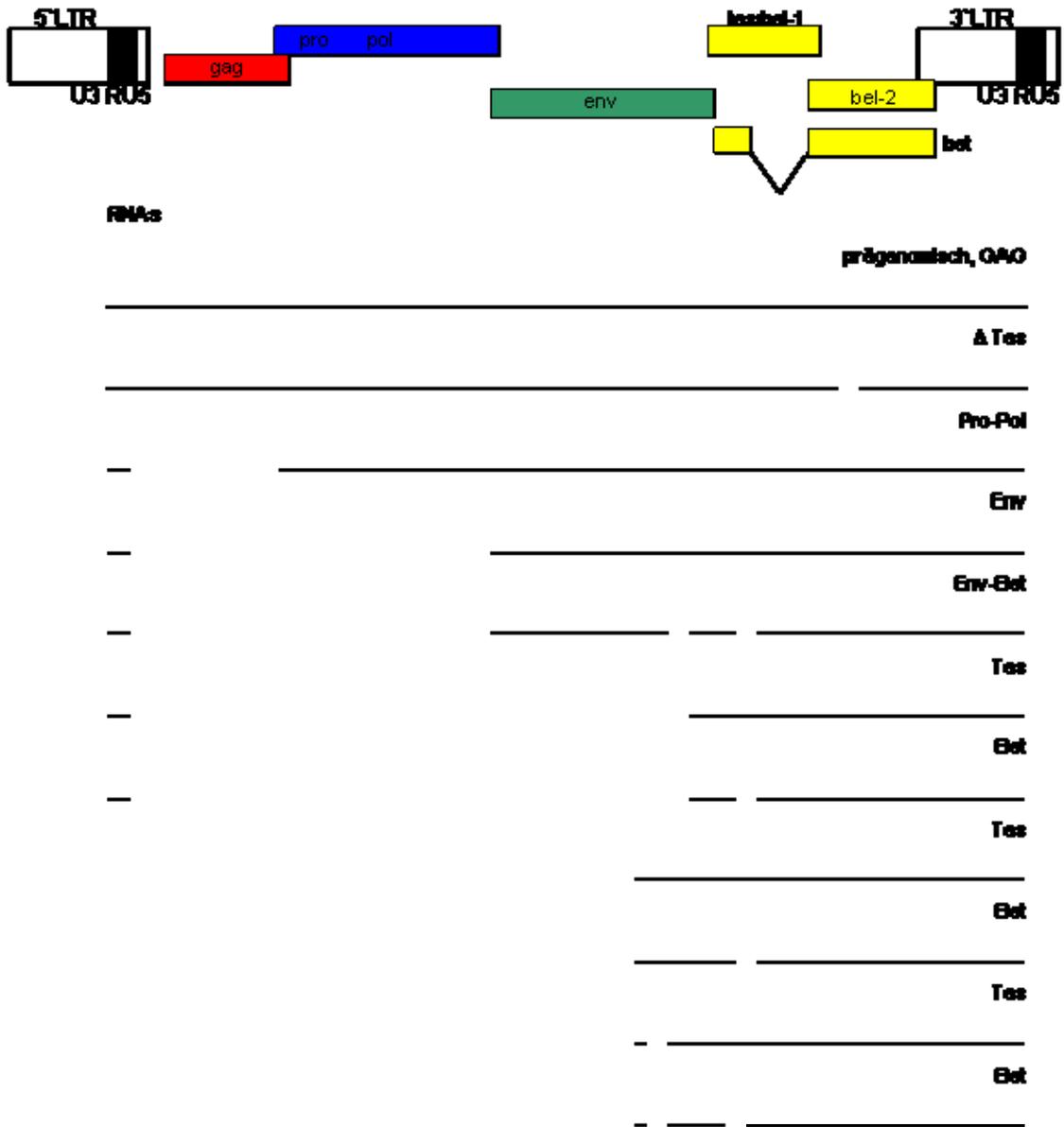


Abb.5: Schematische Darstellung des Genoms und der Genomexpression der Foamy Viren.

- gelb bel-1; bel-2; bet-Genprodukt (akzessorische Leserahmen)
- Linien RNA-Transkripte
- Unterbrechungen Entfernte Introns
- IP Interner Promotor

Der IP besitzt eine geringe Basalaktivität, während P ohne Tas stumm ist (Löchelt et al., 1994; Keller et al., 1991). Tas hat eine höhere Affinität zum IP als zu P (Kang et al., 1998). Die Basalaktivität des IP führt zu einer Synthese von Tas, welches wiederum den IP transaktiviert. Ist eine ausreichende Menge Tas synthetisiert worden, kommt es durch Tas zu einer Transaktivierung von P, an den Tas vermutlich mit höherer Avidität als zu IP bindet, und hiermit zur Synthese viraler genomischer RNA und der Proteine (Gag, Pol und Env), die in der zweiten Phase der Virusreplikation benötigt werden.

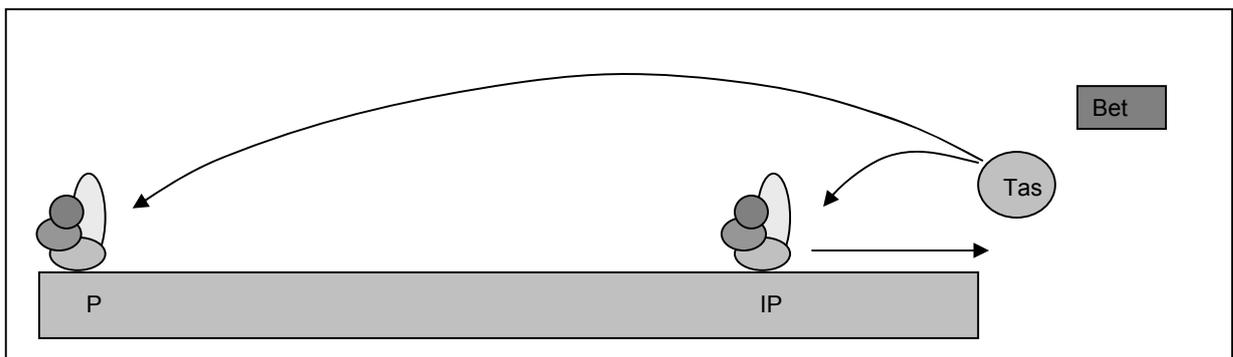


Abb.6: Zusammenhang Tas und Replikation (nach Linial, 2000). Schwarze Pfeile zeigen, dass IP und U3 Promotor (P) Tas für die Expression benötigen. Zusätzliche Transkriptionsfaktoren (elliptoide Elemente) werden möglicherweise zusätzlich benötigt. Der Einfluss von Bet ist noch nicht vollständig geklärt.

Das zweite IP-regulierte Protein, Bet (60 kD), entsteht aus einer multigespleissten mRNA und enthält einen Teil der tas-kodierenden Region (88 Aminosäuren) fusioniert mit dem kompletten bel2-ORF (Muranyi & Flügel, 1991). Die Funktion des Bet-Proteins ist noch unklar. In jüngeren Arbeiten wurde ermittelt, dass Bet das zelluläre Protein APOBEC3G antagonisiert (Löchelt et al., 2005). Dieser Auffassung ist in einer weiteren Publikation widersprochen worden. Möglicherweise sind die für die Experimente verwendeten Viren zu lange in APOBEC3G-negativen Zellen kultiviert worden, so dass sich die Bet-Effekte wegen angehäufter Mutationen im ORF2-Leserahmen nicht mehr exakt bestimmen ließen. Darüber hinaus zeigen stabil Bet-exprimierende Zelllinien eine Resistenz gegenüber einer FV-Superinfektion (Bock et al., 1998). Dieser Effekt von Bet für den FV Replikationszyklus ist ebenso ungeklärt wie die Frage, ob Bet für die Persistenz des Virus' in vivo eine wichtige Rolle spielt (Lecellier & Saib, 2000; Linial, 2000).

Auch bei den Strukturproteinen gibt es gravierende Unterschiede zwischen FV und den anderen Retroviren. Das Gag-Protein wird von einer ungespleissten mRNA als Vorläuferprotein von 71 kD translatiert, an dessen Carboxyterminus von einer viralen Protease ein 3 kD großes Fragment abgetrennt wird. Für die Infektiosität des Viruspartikels ist die Prozessierung zu einem p68 notwendig (Enssle et al., 1997; Giron et al., 1997; Zemba et al., 1998). Eine von den Orthoretroviren bekannte Spaltung des Gag-Vorläuferproteins in Matrix-, Capsid- und Nukleokapsid-Proteine ist für FV nicht beschrieben. Weiterhin verfügen FV im 3'-Bereich des Gag-Proteins nicht über die üblichen Cys-His-Boxen, die in der Nukleokapsiddomäne die Bindung von Gag an die genomische RNA bewerkstelligen, sondern besitzen Glycin-Arginin-reiche Sequenzen (GR-Boxen), die für die Nukleinsäurebindung sowie für den Transport des FV Gag-Proteins in den Zellkern verantwortlich sind (Schliephake & Rethwilm, 1994; Yu et al., 1996). Spezifische DNA- und RNA-bindenden Argininreste finden sich auch bei den Hepadnaviren im C-Terminus des Core-Proteins (Hatton et al., 1992; Nassal, 1992). Das 127 kD Pol-Vorläuferprotein wird in eine 40 kD Integrase und eine 85kD Protease-Reverse-Transkriptase-RNaseH prozessiert. Eine von der Polymerase abgespaltene Protease konnte bisher nicht nachgewiesen werden (Netzer et al., 1990; Pfrepper et al., 1999). Anders als bei den Orthoretroviren wird das pol ORF unabhängig vom gag ORF von einer gespleissten RNA exprimiert (Enssle et al., 1996; Jordan et al., 1996; Yu et al., 1996). Daraus ergab sich die Frage, wie bei FV die Enkapsidierung des Pol-Proteins abläuft, da bei Orthoretroviren Pol durch das anfusionierte Gag-Protein in das Partikel gebracht wird. In Beantwortung dieser Frage wurde herausgefunden, dass die prägenomische RNA für die Verpackung des aktiven Pol-Proteins benötigt wird, da Protein-Protein-Interaktionen von Pol und Gag für den Partikelzusammenbau nicht ausreichend sind (Heinkelein et al., 2002). Dies legte die Vermutung nahe, dass für die Bildung der FV-Kapside die prägenomische RNA sowohl mit Gag als auch mit Pol interagieren muss, und dass verschiedene *cis*-aktive Sequenzen (CAS) in der RNA dafür verantwortlich sind. Außerdem konnten Pol Produkte ebenso wie die Gag Produkte auch im Zellkern nachgewiesen werden, was möglicherweise mit dem intrazellulären Replikationszyklus der Foamyviren (s.u.) im Zusammenhang steht (Imrich et al., 2000).

Das env-Gen kodiert für einen 130kD Glykoproteinvorläufer, welcher von einer zellulären Protease in ein gp70-80 (SU), ein gp48 (TM) sowie ein 18kD Leaderpeptid (LP) gespalten wird (Giron et al., 1993; Lindemann & Göpfert, 2003; Lindemann et al., 2001; Wilk et al., 2001). Im Unterschied zu den Orthoretroviren können Foamyviruspartikel in der Abwesenheit von Env nicht knospen. Sie werden zwar im Zytoplasma gebildet, können aber nicht im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden (Baldwin et al., 1998; Fischer et al., 1998). Ebenso ist es nicht möglich, eine Pseudotypisierung, also das Ersetzen der Hüllproteine des Virus durch artfremde virale Hüllproteine, von FV-Kapsiden mit einem heterologen Env-Protein vorzunehmen (Lindemann et al., 1997; Pietschmann et al., 1999). All dies deutet auf eine spezifische Interaktion zwischen Viruskapsid und autologem Glykoprotein bei FV hin, wie sie bei Orthoretroviren nicht zu finden ist. Diese Spezifität der Kapsid-Env-Interaktion wird auf Seiten von Env durch LP vermittelt, das als Typ II Membranprotein integraler Bestandteil des Virions ist. Mit seinem N-Terminus interagiert es auf noch nicht bekannte Art mit dem N-Terminus von Gag (Cartellieri et al., 2005).

Kürzlich konnte von Shaw und Mitarbeitern (Shaw et al., 2003) gezeigt werden, dass bei alleiniger Expression von FV Env hüllproteinhaltige, subvirale Partikel (SVP) freigesetzt werden, die sich in ihrer Dichte nur geringfügig von FV-Partikeln unterscheiden, aber aufgrund fehlender Strukturproteine weder infektiös noch replikationsfähig sind. Diese Eigenschaft haben FV mit Hepadnaviren gemeinsam und unterscheiden sie von den Orthoretroviren. Die Bildung von SVPs durch Hepadnaviren ist die Grundlage für die Herstellung des HBV-Impfstoffes. Darüber hinaus befindet sich am C-Terminus der zytoplasmatischen Domäne der TM-Untereinheit ein ER Retentionssignal, welches bewirkt, dass FV hauptsächlich in das endoplasmatische Retikulum knospen (Goepfert et al., 1995, 1997). Ein ähnliches Signal findet sich ebenfalls bei Hepadnaviren im Surface-Protein, welches bei HBV unabkömmlich für die Knospung aus infizierten Zellen ist. Weiterhin findet man ein durch alternatives Spleißen entstandenes 170kD Env-Bet-Fusionsprotein (Lindemann et al., 1998; Giron et al., 1998). Dieses Fusionsprotein wird in den Zellkulturüberstand sekretiert, seine Funktion ist allerdings bis heute unbekannt.

1.2.3. Replikationszyklus der Foamyviren

Die Reverse Transkription, das Umschreiben vom retroviralen RNA-Genom in doppelsträngige DNA, kommt bei allen Retroviren vor (Telnitsky & Goff, 1997). Dennoch weisen die Foamyviren in ihrer Replikationsstrategie einige Besonderheiten auf und ähneln in einigen Aspekten den Hepadnaviren und Retrotransposons (Linial, 1999; Rethwilm, 2003).

Bei den Orthoretroviren findet die Reverse Transkription früh im Replikationszyklus statt, nach Infektion der Zelle (Vogt, 1997a). Bei Versuchen mit dem RT-Hemmer Azidothymidin (AZT) konnte gezeigt werden, dass die Reverse Transkription im Replikationszyklus der FV nicht früh, sondern, wie bei den Hepadnaviren, spät kurz vor der Freisetzung der Viruspartikel stattfindet (Moebes et al., 1997) und dass die so synthetisierte DNA infektiös ist (Yu et al., 1999; Roy et al., 2003). Es ist bekannt, dass FV-infizierte Zellen bis zu 1.000 oder mehr Kopien unintegrierter linearer viraler DNA enthalten (Mergia & Luciw, 1991; Moebes et al., 1997). Schweizer und Mitarbeiter zeigten, dass sobald der Virusreplikationszyklus in einer infizierten Zelle einsetzt, die in das Zellgenom integrierte DNA mit konventionellen Methoden (southern blot) nicht mehr nachgewiesen werden kann, da das Signal durch den Hintergrund der vielen linearen cDNA Moleküle zu schwach ist. Die späte Reverse Transkription des FV Genoms ist der Grund für diese Beobachtung. Damit scheinen FV DNA-Viren zu sein, die über eine RNA-Intermediat replizieren. Dies ist eine Beobachtung, die im scharfen Kontrast zu allen anderen Retroviren steht (Rethwilm, 2005). Ein Teil der DNA in infizierten Zellen enthält einzelsträngige Lücken am +Strang in der Nähe des zentralen Polypurintrakte (Kupiec, et al. 1988), vermutlich aufgrund einer diskontinuierlichen +Strang-Synthese bedingt durch zwei vorhandene Polypurintrakte. Diese Regionen werden vermutlich nach Penetration ergänzt. Weiterhin konnte in verschiedenen Experimenten gezeigt werden, dass reife extrazelluläre virale Partikel nicht nur DNA sondern auch RNA enthalten können, die allerdings für die Infektion keine Rolle zu spielen scheint (Yu et al., 1999; Roy et al., 2003). Da über die Effizienz der Reversen Transkription bei FV bisher wenig bekannt ist, könnte diese Virion-RNA durch abgebrochene Reaktionen während der Reversen Transkription entstanden sein.

Vor der Integration werden die orthoretroviralen linearen cDNAs durch die virale Integrase an beiden Enden prozessiert. Zumeist werden zwei Nukleotide entfernt, so dass das Provirus an

seinem 5'-Ende immer mit einem eigentlich internen Dinukleotid TG startet und am 3'-Ende immer von einem Dinukleotid CA terminiert wird. Anders ist die Situation bei FV. Vor der Integration kommt es bei FV zu einer asymmetrischen Prozessierung der viralen DNA (Enssle et al., 1999). Am 3'-Ende wird das terminale CAAT Motiv bei der Integration zu CA reduziert, während am 5'-Ende die Nukleotide (TGTG) vollständig erhalten bleiben (Enssle et al., 1999; Juretzek et al., 2003). Ein Grund für diese asymmetrische Reaktion ist nicht bekannt.

Eine weitere Ausnahme bei den FV besteht darin, dass sie zwei prinzipiell unterschiedliche Replikationswege verfolgen können (Heinkelein et al., 2000). Entweder verlässt das FV die Zelle um ein exogenes Retrovirus zu werden, oder es verhält sich wie ein Retrotransposon und kann wieder in das Genom der Wirtszelle springen, ohne die Zelle zu verlassen. Durch diese Möglichkeiten der intra- und extrazellulären Replikation bilden die FV eine Mittelstellung zwischen exogenen Retroviren und Retrotransposons. Der intrazelluläre Weg kann auch als Abkürzung in der Replikation verstanden werden, da er zu multiplen proviralen Kopien im Genom führt. Dies ist eine weitere Gemeinsamkeit mit den Hepadnaviren, die auch intrazellulär replizieren können, ohne dabei allerdings zu integrieren (Nassal & Schaller, 1993).

Wie in Abb. 7 dargestellt, teilen die FV einige Gemeinsamkeiten mit den Hepadnaviren und Retrotransposons, so dass die Vermutung naheliegt, dass sie ein evolutionäres Bindeglied zwischen den Retro- und den Hepadnaviren darstellen (Lecellier & Saib, 2000).

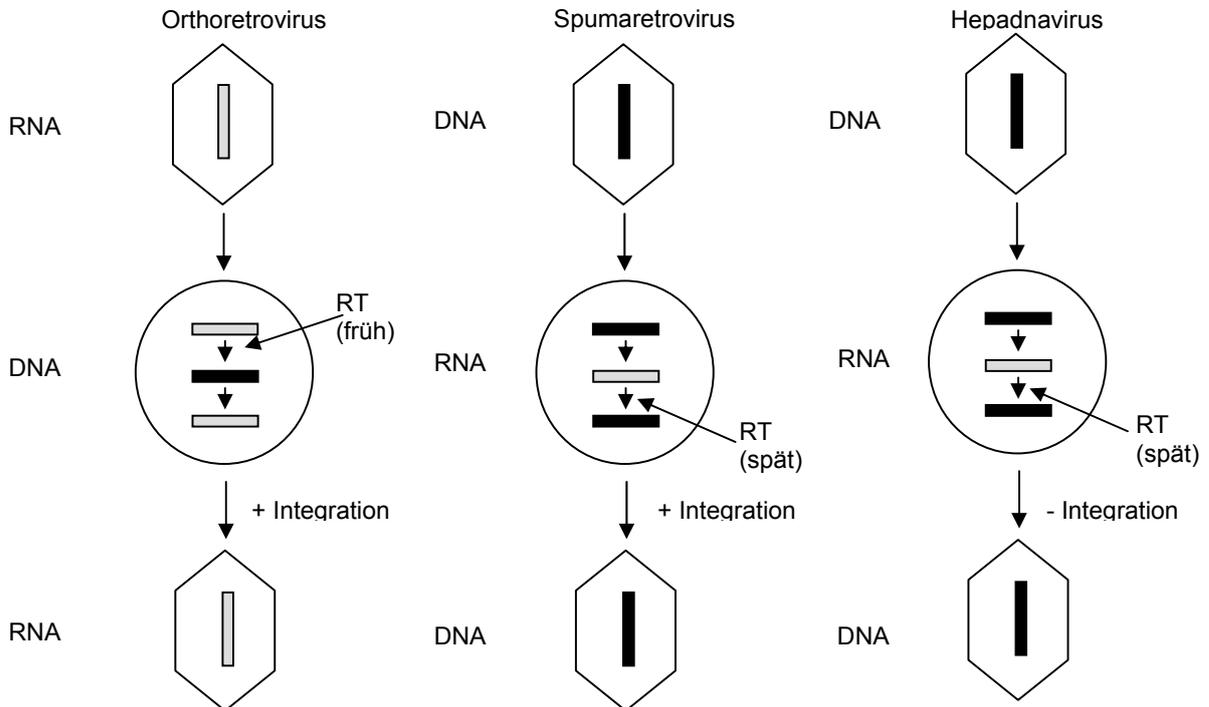


Abb. 7: Schematische Darstellung der Hauptunterschiede bei der Replikation von Orthoretroviren, Spumaretroviren und Hepadnaviren (nach Rethwilm, 2000).

1.3. Vektoren und ihre Anwendung

1.3.1. Virale Vektoren

Die Gentherapie ist eine vielversprechende neue Behandlungsmöglichkeit vieler Erkrankungen. Erfolgreicher Einsatz von Gentherapie setzt die Verfügbarkeit von Transportern voraus, um die Gene effizient befördern und exprimieren können. Dies ist schwieriger, als viele Forscher zu Beginn der Gentherapie-Ära Anfang der 90er Jahre gedacht hatten. Mehrzellige Organismen haben über Jahrtausende gelernt, sich vor dem Angriff umgebender Einflüsse – so auch der Inkorporation fremder DNA in ihr Genom – zu schützen. Viren allerdings sind sehr erfolgreich darin, diese Barrieren zu überwinden, und in der Lage, ihr genetisches Material in z. B. menschliche Zellen einzubringen. Deshalb gelten die Bemühungen der Gentherapie besonders viralen Vektoren, die therapeutische Gene in den Patienten bringen sollen.

Biologische Vektoren für Gentherapie entstanden aus verschiedenen Viren, so zum Beispiel HSV-1, Adenoviren, adeno-assoziierten Viren (AAV) und Retroviren (Kay et al., 2001; Robbins et al., 1998; Romano et al., 2005; Smith, 1999; Wolfe et al., 1999; Wu & Ataai, 2000). Retrovirale Vektoren werden am häufigsten verwendet, Fremd-DNA in das Zell-Genom zu bringen. Der Lebenszyklus von Retroviren enthält stabile Integration von viralem genetischem Material in das Wirts-Genom; die Expression der viralen Gene wird zum Teil durch Faktoren der Wirtszelle reguliert (Coffin et al., 1997).

Die klinische Anwendung retroviraler Vektoren beinhaltet humane Studien zur Behandlung genetischer Erkrankungen, Infektionskrankheiten und auch von Krebserkrankungen (Anderson, 1998; Morgan & Blaese, 2000; Mountain, 2000; Rochlitz, 2001). Retrovirale Vektoren werden außerdem auch in der Grundlagenforschung verwendet, wie zum Beispiel für Studien über Zelllinien, Mechanismen der Karzinogenese, Entwicklung und gewebespezifische Regulation bestimmter DNA-Sequenzen u.a.m. (Varmus 1988).

Speziell das zu den Gammaretroviren gehörende MLV (Moloney murine leukemia virus) wird zurzeit noch als Vektor der Wahl für klinische Gentherapie-Protokolle benutzt. Dieses Virus induziert T-Zelleukämien/Lymphome in Nagetieren mit einer langen Latenzzeit hauptsächlich durch den Mechanismus der Insertionsmutagenese. Es wurden eine Reihe unterschiedlicher Verpackungskonstrukte für das Vektorgenom entwickelt. Bei den Vektoren selbst konnten alle viralen Gene entfernt werden, so dass sie nicht mehr replikationskompetent sind und bis zu 8 kb exogener DNA aufnehmen können. Ein großer Nachteil der Gammaretroviren ist, dass sie nicht zum Gentransfer in nicht-teilungsfähige Zellen geeignet sind, da sie mindestens eine Zellteilung für die provirale Integration benötigen. Zusätzlich ist die Dauer der Genexpression mit diesen Vektoren *in vivo* oft sehr kurz (Miller et al., 1990; Roe et al., 1993; Springett et al., 1989). Ein weiterer Nachteil der MLV-Vektoren ist das Risiko der Insertionsmutagenese. Seit Aufschlüsselung des kompletten menschlichen Genoms sind großangelegte, sequenz-basierte Studien zum Integrationsmuster der Retroviren möglich (Schröder et al. 2002; Laufs et al. 2003). Integrationsorte viraler Vektoren sind von großem Interesse, um das Risiko einer Insertionsmutagenese abschätzen zu können.

Retrovirale Vektoren sind in der Lage, an unterschiedlichsten Stellen in das Genom zu integrieren, Es wurde in zahlreichen Arbeiten (Wu et al. 2003; Mitchell et al. 2004; Nowrouzi

et al. 2006) gezeigt, dass verschiedene retrovirale Vektoren eine sehr unterschiedliche Präferenz für die Integrationsorte in den menschlichen Chromosomen besitzen. HIV beispielsweise bevorzugt deutlich die Integration in aktive Gene (Carteau et al.1998; Schroder et al. 2002; Wu et al. 2003). MLV Vektoren hingegen favorisieren die Integration in der Nähe von Transkriptionsstartpunkten.

Eines der frühesten Modelle für den chromosomalen Einfluss auf den Integrationsort viraler Vektoren postuliert, dass kondensiertes Chromatin in inaktiven Regionen die Integration eher erschwert und daher sich die Integration bevorzugt auf offeneres Chromatin in aktiveren Regionen konzentriert (Panet and Cedar 1977; Vijaya et al. 1986; Rohdewohld et al.1987).

Dennoch scheint es unwahrscheinlich, dass die relative Zugänglichkeit der einzige Aspekt ist, der die Auswahl des Integrationsortes bestimmt, zumal HIV und MLV für sich jeweils unterschiedliche Zielsequenzen bevorzugen.

Studien an Ty-Retrotransposons von Hefen, eng verwandt mit Retroviren, haben gezeigt, dass sich Ty-Retrotransposons durch Interaktionen mit chromosomal gebundenen Proteinen an die Replikationsmaschinerie der Chromosomen binden und so die Integration an nahegelegenen Stellen lenken können (Boeke and Devine, 1998; Bushman, 2003; Sandmeyer, 2003). So ein Modell würde das Integrationsziel der unterschiedlichen Retroviren ebenfalls erklären (Bushman, 2003). Entsprechend dieser Theorie würde HIV vermehrt an Faktoren nahe aktiver Gene binden, während MLV eher an Faktoren nahe Transkriptionsstartpunkten binden könnte (Bushman, 1994; Goulaouic and Chow, 1996). Dies sind zwei von vielen unterschiedlichen Modellen für Integrationsmuster unterschiedlicher Retroviren, die zeigen sollen (Schröder et al., 2002; Wu et al., 2003; Mitchell et al., 2004; Nowrouzi et al., 2005), dass über die Auswahl von verschiedenen retroviralen Integrationssystemen die Integrationspunkte moduliert werden können und diese Erkenntnisse für eine sicherere Gentherapie genutzt werden könnte.

Die Beobachtungen zum Integrationsmuster von MLV zeigten, dass diese besonders die Gefahr einer Protoonkogenaktivierung durch ihre Integrationspräferenz nahe von Promotorregionen bergen(Wu et al., 2003; Mitchell et al., 2004; Nowrouzi et al., 2006). Dies kann gelegentlich in insertionaler Aktivierung von Onkogenen resultieren (Coffin et al., 1997; Bushman, 2001). So erkrankten drei Patienten mit XSCID (X-linked severe immunodeficiency

syndrome), die sich einer gentherapeutischen Behandlung mit MLV-Vektoren unterzogen hatten, an einer Leukämie. Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass die Erkrankung mit der Integration des therapeutischen retroviralen Vektors nahe des Transkriptionsstartpunktes des LMO2 Protoonkogens assoziiert war (Check, 2002; Haccin-Bey-Abina et al., 2003). Auch in Tiermodellen wurde die Aktivierung von Protoonkogenen durch retrovirale Vektoren beschrieben (Li et al., 2002; Donahue et al., 1992).

Zielzellen der lentiviralen Infektion sind nichtproliferierende Zellen wie terminal differenzierte Makrophagen, dendritische Zellen der Mukosa und T-Lymphozyten (Fauci, 1996; Levy, 1993). Der Präintegrationskomplex dieser Viren wird von der Zellkern-Maschinerie der Wirtszelle erkannt und aktiv durch die Kernporen transportiert, gefolgt von der Integration der proviralen DNA. Dies geschieht, ohne dass eine Zellteilung erforderlich ist (Bukrinsky et al., 1992; Gallay et al., 1996; Lewis & Emerman, 1994). Es wurde auch experimentell gezeigt, dass HIV-basierte Vektoren zum Gentransfer in sich nicht-teilende Zellen und terminal differenzierte Zellen in der Lage sind. Diese Vektoren versprechen in vivo effizienten Transfer, Integration und Langzeit-Expression von Transgenen in nichtmitotische Zielzellen, wie zum Beispiel ausdifferenzierte Neuronen (Naldini et al., 1996a, b). Die potentielle Gefahr dieser Vektoren, ein replikationskompetentes Virus zu generieren, macht den Gebrauch von HIV-Vektoren für die Gentherapie sehr fraglich. Die lentiviralen Vektoren können mit einem VSV-Envelope zum Gentransfer in menschliche Zellen pseudotypisiert werden, womit das Risiko einer Rekombination verringert werden kann (Federico, 1999; Klimatcheva et al., 1999; Poeschla et al., 1998; Schnell et al., 2000).

HIV zeigte bei der Analyse des Integrationsmusters in unterschiedlichen Experimenten eine starke Präferenz, sich in aktive Gene (Carteau et al., 1998; Schroder et al., 2002; Wu et al., 2003) zu integrieren. Das Risiko einer Schädigung des Wirtsgenoms durch Gen Knockout konnte noch nicht abgeschätzt werden.

So bleiben zusammengefasst große Bedenken bezüglich der Sicherheit und Wirksamkeit beim Einsatz lentiviraler Vektoren.

In dieser Arbeit sollen daher die Vorzüge und Möglichkeiten beim Einsatz foamyviraler Vektoren näher erörtert werden.

1.3.2. Foamyvirale Vektoren

FV haben verschiedene Eigenschaften, die ideal für die Konstruktion retroviraler Vektoren und den Transport heterologer Gene in verschiedene Spezies und Zelltypen sind. So scheint ihr bisher noch nicht identifizierter Rezeptor ubiquitär, mit der Folge, dass FV-Vektoren erfolgreich in viele verschiedene Zelltypen eindringen können (Hill et al., 1999; Mergia et al., 1996).

Bislang konnte keine Krankheit mit FV in Verbindung gebracht werden – weder bei natürlich, noch bei experimenteller Infektion (Weiß et al., 1988; Flügel et al., 1991; Linial, 2000; Mergia and Luciw, 1991; Schmidt et al., 1997). Menschen sind kein natürlicher Wirt von FV, es gibt nur Berichte über berufsbedingte Infektionen (z.B. bei Tierpflegern) (Schweizer et al. 1995, 1997; Callahan et al., 1999; Heneine et al., 1998; Sandstrom et al., 2000). Akzidentell infizierte Tierpfleger blieben während der bisherigen Beobachtungsdauer gesund und es konnte keine sekundäre Mensch-zu-Mensch Übertragung nachgewiesen werden (Heneine et al., 1998).

Die Größe des FV-Genoms (13 kb) erlaubt es, dass mehr heterologe DNA in foamyviralen Vektoren aufgenommen werden kann als bei onkoretroviralen oder lentiviralen Vektoren (8-10 kb).

Ein weiterer Vorteil ist, dass FV Vektoren in der Lage sind, Fremdgene in sich selten teilenden Zellen einzubringen. Es konnte gezeigt werden, dass die Transduktion solcher Zellen, wie beispielsweise hämatopoietische Stammzellen, durch FV-Vektoren deutlich effizienter als mit MLV-abgeleiteten Vektoren ist (Hirata et al., 1996).

Vergleicht man die Integrationspräferenzen von HIV, welches aktive Gene favorisiert und MLV, das die Integration nahe Transkriptionsstartpunkten bevorzugt, so ist das Integrationsmuster für FV davon unterschiedlich (Nowrouzi et al., 2006; Trobridge et al., 2006).

Kommt es aber dennoch bei FV zur Integration in einer transkribierenden Region des Genoms, dann eher in der Nähe von Transkriptionsstartpunkten. FV ist somit im Integrationsmuster MLV ähnlicher als HIV (Nowrouzi, 2006).

Allerdings muss mit einer genauen Aussage über die Integrationsmuster der unterschiedlichen Retroviren gewartet werden, bis alle viralen wie zellulären Faktoren identifiziert werden konnten, die zur Auswahl der unterschiedlichen Integrationsorte führt. Eine definitive Aussage über das Risiko der Insertionsmutagenese durch retrovirale Vektoren, die aus HIV, MLV oder FV hervorgegangen sind, kann also momentan noch nicht getroffen werden. Solch ein Risiko ist allerdings nicht nur durch das Integrationsprofil des jeweiligen Vektors, sondern auch durch die Anzahl transduzierter Zellen, die in den Patienten reinfundiert werden, definiert (von Kalle et al., 2004). Zudem spielt die Natur des Transgens und die Art der Krankheit, die therapiert werden soll, eine große Rolle in der klinischen Beurteilung der Gentherapie (Baum et al, 2003; von Kalle et al., 2004). Bei der Therapie von infausten Krankheiten, wie beispielsweise dem Glioblastom (fast 100% Mortalität), könnte das Risiko eines Zweitmalignoms durch Insertionsmutagenese in Kauf genommen werden.

Um das Risiko einer Protoonkogen Aktivierung zu reduzieren sind unterschiedliche Strategien entwickelt worden, wie zum Beispiel der Gebrauch von sich selbst inaktivierenden (SIN) MLV-Vektoren oder Insulatoren (Baum & Fehse, 2003; von Kalle et al., 2004). Auch hier bieten aus FV abgeleitete Vektoren einen Vorteil, da sie aufgrund des Fehlens des viralen Ψ Transaktivators, welcher Voraussetzung für die Transkription der LTR ist (Rethwilm, 1995) natürlicherweise von SIN-Charakter sind.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass FV Vektoren im Gegensatz zu onkoretroviralen Vektoren ideal geeignet sind, unstimulierte CD34-positive humane Zellen mit einem einfachen Protokoll zu transduzieren (Josephson et al., 2002; Leurs et al., 2003). Diese Beobachtung könnte mit verschiedenen Eigenschaften der FV assoziiert sein, wie z.B. dem Eintritt des viralen Genoms in den Zellkern in G1/S-Phase befindlicher Zellen, Komplettierung der cDNA-Synthese bereits während der Partikelproduktion, sowie Persistenz des Präintegrationskomplexes in sich nicht teilenden Zellen bis die Zellproliferation folgt.

Auch die große Anzahl von Rezeptoren auf humanen Stammzellen könnte die effiziente Transduktion durch FV-Vektoren unterstützen, da der momentan noch nicht identifizierte zelluläre Rezeptor von FV auf allen Säugerzellen, auch auf hämatopoetischen Stammzellen, exprimiert zu sein scheint.

Dies ist vielleicht sogar der größte Vorteil von FV Vektoren in prospektiven klinischen Studien, weil sie eine signifikante Reduktion der Anzahl genkorrigierter Zellen, die in den Patienten reinfundiert werden muss, erlauben würden.

Man kann Vektorsysteme grundsätzlich in replizierende und nicht replizierende Systeme unterteilen.

Replizierende Vektorsysteme müssen alle genetischen Informationen enthalten, die für die Virusreplikation notwendig sind. Die für die Replikation nicht essentiellen Bestandteile des viralen Genoms können durch therapeutische Gene ersetzt werden. Es konnte bereits an anderen komplexen Retroviren gezeigt werden, dass eine genetische Vereinfachung und damit eine Replikation unabhängig von den regulatorischen Proteinen nur mit Gag, Pro, Pol und Env möglich ist (Boris-Lawrie & Temin, 1995; Boris-Lawrie et al., 1997). Auch für Foamyviren wurden schon verschiedene vereinfachte Vektorsysteme entwickelt. So konnte in einer vorausgegangenen Arbeit gezeigt werden, dass eine genetische Vereinfachung des FV durch Einführung einer hybriden LTR mit konstitutiv aktivem IE CMV Enh./Prom.-Element möglich ist. Wegen der normalerweise starken Expression wurde der CMV-Promotor als Bestandteil der hybriden LTR gewählt. Die rekombinanten Viren waren auch nach Deletion des sonst essentiellen *tas*-Gens zur Replikation fähig. Sie zeigten allerdings gegenüber dem Wildtyp eine deutlich verlangsamte Replikationskinetik.

Unter replikationdefizienten Vektoren versteht man Vektoren, denen Genomabschnitte fehlen, welche für die Replikation notwendig sind. Die Vektorpartikel sind zwar in der Lage Zellen zu infizieren und ihr therapeutisches Gen einzubringen, können aber keine Synthese von neuen Partikeln bewirken. Nicht-replizierende Vektorsysteme sollen möglichst wenige virale Sequenzen beinhalten und eine möglichst hohe Transduktionsrate erzielen. Für FV sind verschiedene solcher Systeme charakterisiert worden.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, basierend auf Untersuchungen, in denen ein replikationsfähiges tas-unabhängiges FV hergestellt worden war, dessen tas-abhängiger U3-Promotor durch den konstitutiv aktiven CMV IE Promotor/Enhancer ersetzt worden war, ein vergleichbares Virus zu konstruieren, das über eine konstitutiv aktive U3-region eines simplen Retrovirus verfügt.

Im Anschluss an die Charakterisierung dieses Hybridvirus sollten replikationsdefekte FV-Vektoren mit der U3 Promotorregion des simplen Retrovirus etabliert werden.

2. Material

2.1. Geräte und Materialien

Autoklav	Münchener Medizin Mechanik & Melag
Bakterienschüttler	New Brunswick Scientific
Blottingfilterpapier	Whatman
Blotkammer	Uniwerkstatt
Computer	Apple Macintosh
Durchlichtmikroskop	Zeiss
Einwegspritzen	Braun
Eismaschine	Scotsman
Elektrophoresespannungsgeräte	Amersham Pharmacia Biotech
Elektrophoresekammern	Amersham Pharmacia Biotech
Filme	Agfa, Ilford
Filterpapier	Schleicher & Schuell
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss
Fotokamera	Zeiss, Contax
Gefrierschrank	Liebherr (-4°C), Colora (-80°C)
Glasmaterial	Schott, Sarstedt
Handschuhe	Kimberley-Clark
Heizblock	Eppendorf, Thermostat comfort
Inkubatoren (37°C)	Heraeus
Kühlschrank (4°C)	Liebherr

Laborwaage	Sartorius
Magnetrührer	Flatspin
Mikroskop	Zeiss
Mikrowelle	AEG
Neubauerzählkammer	Marienfeld, Superior
Nitrozellulosemembran	Hybond, Amersham Pharmacia Biotech
PCR-Gerät	Applied Biosystems, Perkin Elmer
pH-Meter	WTW, inoLab
Photometer	Amersham Pharmacia Biotech
Pipetten	Gilson
Pipettenspitzen	Maxym, Eppendorf
Pipettierhilfe	Integra Biosciences
Plastikgefäße	Nunc, Greiner, Eppendorf, Falcon
Quarzküvetten	Helma
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Eppendorf
Röntgenfilme	Agfa Cirux
Rotationsmischer	GLW
Sequenziergerät	310 Genetic Analyzer, Abi Prism
Sterilarbeitsbank	Antair, BSK
Sterilfilter	Schleicher & Schuell
Transilluminator	BioRad
UV-Handlampe	IALL
UV-Leuchttisch	Syngene
Vakuumtrockner	Christ

Vortexer	IKA, MS2 Minishaker
Wasserbäder	GFL, Haake
Wippe	Assistent
Zellkulturflaschen	Nunc, Greiner
Zellkulturbrutschrank	Heraeus
Zentrifugen	Beckham Coulter

2.2. Chemikalien

Acrylamid	Roth
AEC (3-Amino-9-Ethyl-carbazol)	Sigma
Agarose	Biozym
Ampizillin	Merck
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth
β -Mercaptoethanol	Sigma
Bisacrylamid	Roth
Bovines Serumalbumin (BSA)	Gerbu
Bromphenolblau (BPB)	Sigma
Chloroform	Roth
Desoxynukleotide	MBI-Fermentas
Dimethylformamid	Merck
EDTA (Titrplex®III)	Merck
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Roth

Fötales Kälberserum (FKS)	Gibco-BRL
Glukose	Merck
Glutardialdehyd	Merck
Glyzerol ICN	Biomedicals
Glyzin	Roth
Geneticin	Gibco-BRL
Hepes	Roth
Isopropanol	Merck
Kalziumchlorid	Merck
Kaliumferrizyanid	Merck
Kaliumferrozyanid	Merck
LB-Agar	Gibco-BRL
LB-Broth Base	Gibco-BRL
Magnesiumchlorid	Merck
Magermilchpulver	Lasana
Methanol	Merck
Natriumazetat	Merck
Natriumazid	Merck
Natriumbutyrat	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumdesoxycholat	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Phenol	Roth

Phenol/Chloroform	Roth
Rainbow-Marker	Amersham Biosciences
Saccharose	Merck
TEMED	Roth
Tricin	Roth
Tris-Base	Roth
Triton-X-100	Merck
Trypsin	Gibco-BRL
Tween 20	Serva
X-Gal	Sigma

2.3. Antiseren

α -gag: 011	Polyklonales Kaninchenserum gegen Baculovirus-exprimiertes FV Gag-Protein (Hahn et al., 1994)
α -bel 1: 007; 008	Polyklonales Kaninchenserum gegen von Baculovirus-exprimiertes FV Tas-Protein (Institut für Virologie, Würzburg)
161;162	Polyklonales Kaninchenserum gegen bakteriell exprimiertes FV Tas-Protein (Aguzzi et al., 1993)

2.4. Kits und gebrauchsfertige Substanzen

Auto-Seq 50	Amersham Biosciences
QUIAX II Gel Extraction Kit	Quiagen
Quiaprep Spin Miniprep Kit	Quiagen
Quiagen Plasmid Maxi Kit	Quiagen
ECL –Kit	Amersham Biosciences
Rainbow-Marker	Amersham Biosciences
1 kb Leiter	MBI Fermentas
Polyfect Transfection Reagent	Quiagen

2.5. Enzyme

CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase)	MBI Fermentas
Klenow Enzym	MBI Fermentas
Restriktionsenzyme	MBI, NEB
T4-DNA-Ligase, PEG 4000	MBI Fermentas
T4-DNA-Polymerase	MBI Fermentas
RNAse A	Pharmacia
TaqPolymerase	Promega

2.6. Nukleinsäuren

λ --DNA

MBI Fermentas

2.7. Oligonukleotide

2.7.1. Primer für präparative PCR

SFFV 1 5'- TGC CTC GAG CTG CAG TAA CGC CAT TTT GC -3'
→ $T_m = 69,5 \text{ }^\circ\text{C}$

SFFV 2 5'- TAT CGT CTC GCT CGC CGA GTG AGG GGT TGT G -3'
→ $T_m = 73,5 \text{ }^\circ\text{C}$

2.7.2. Primer für analytische PCR

SFFV 1 5'- TGC CTC GAG CTG CAG TAA CGC CAT TTT GC -3'
→ $T_m = 69,5 \text{ }^\circ\text{C}$

SFFV 2 5'- TAT CGT CTC GCT CGC CGA GTG AGG GGT TGT G -3'
→ $T_m = 73,5 \text{ }^\circ\text{C}$

10 5'- CCT CTT CCC AGA AGG G -3'
→ $T_m = 54,3 \text{ }^\circ\text{C}$

139 5'- CTT CGA CTG GAC ATT CAC GAG -3'
→ $T_m = 59,8 \text{ }^\circ\text{C}$

918 5'- TGT TCA TAT TCG CTA GCA TTA CTT CCT G -3'
→ $T_m = 62,2 \text{ }^\circ\text{C}$

535 5'- TCA TAG ACG TAC CTG GGA TGA GAG AC -3'
→ $T_m = 64,3 \text{ }^\circ\text{C}$

2.8. Plasmidliste

pTS07	Expressions-Plasmid für bel-1; bel-2 (Th. Schenk) mit IE-CMV-Promotor
pJR4	SFFV-Promoter enthaltendes Expressionsplasmid (J.Roy)
pCHSRV2	Expressionsplasmid für PFV Provirus (Moebes et al., 1997) mit IE-CMV-Promotor
pBluescriptSK+	Stratagene
pMD11	LacZ-transduzierender FV Vektor (Heinkelein et al., 2002)
pCenv-1	Expressions-Plasmid für ENV (Fischer et al., 1998) mit IE-CMV-Promotor
pCgp-1	Expressions-Plasmid für gag und pol (Fischer et al., 1998) mit IE-CMV-Promotor
pcDNA	Invitrogen
pEGFP-C1	BD Clontech

2.9. Kompetente Bakterien

E.coli DH5 α	Transformation von Ligationsansätzen
E.coli JM 109	Transformation zur präparativen Aufreinigung in großem Maßstab (Maxipräp)

2.10. Zelllinien

293 T	Embryonale humane Nierenzellen (ATCC:CRL-1573) die das SV40 Large-T-Antigen exprimieren (DuBridge et al.,1987)
HT 1080	Humane Fibrosarkomazellen (rasheed et al., 1974)
BHK-21	Nieren-Fibroblasten vom syrischen Hamster (Macpherson et al., 1962)
BHK/LTR lacZ	BHK-Zellen mit PFV-LTR abhängigen lacZ-Reportergergen (Schmidt und Rethwilm, 1995)

2.11. Lösungen, Medien und Puffer

2.11.1. Bakterienkultur

5x LB-Medium

20g GIBCO BRL LB Broth Base (Lennox L Broth Base)
ad 100 ml A. bidest
→Sterilisierung durch Autoklavieren

1x LB-Medium mit Ampicillin

20ml 5x LB-Medium
100µl Ampicillin (100mg/ml Stocklösung)
ad 80ml A.bidest

LB-Platten

40g DIFCO LB Agar, Miller
1000ml A.bidest
→ Sterilisierung durch Autoklavieren, bei einer Temperatur von 50°C, vor dem Gießen der Platten 1000µl Ampicillin (Endkonzentration 100 µl/ml)

2.11.2. Plasmidpräparation (Minipräparation)

TENS-Puffer

1M Tris-HCL, pH 8,0

0,5M EDTA, pH 8,0

10M NaOH

10% SDS

→ mit Aq.bidest auffüllen

Ethanol 70%

70ml Ethanol abs.

30ml Aq. Bidest

TE-Puffer 10x

10mM Tris pH 8,0

1 mM EDTA

2.11.3. Agarose-Gelelektrophorese

50 x TAE Stocklösung

242 g Tris-Base

37,2 g Na₂EDTA 2H₂O

57,1 ml Eisessig

→ mit Aq.bidest auf 1l auffüllen

Ethidiumbromid-Stammlösung 1%

10mg/ml Ethidiumbromid (ROTH)

Bromphenol-Blau Lösung (DNA Probenpuffer)

0,25 % Bromphenol Blue Sodium Salt (SIGMA)

7 ml Tridest steril

9 ml Glyzerin steril

2.11.4. Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Anodenpuffer 10x

2 M Tris Base pH 8,9

Kathodenpuffer 5x

0,5 M Tris, pH 8,25

0,5 M Tricin

10 % SDS (0,5 %)

Trenngelbuffer

1,5 M Tris-HCL, pH 8,8

Sammelgelbuffer

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

RIPA-Puffer für Proteinlysat

20 mM Tris, pH 7,5

0,3 M NaCl

1,0 % Na-desoxycholat

1,0 % Triton X-100

0,1 % SDS

Proteinprobenpuffer (4x)

0,25M Tris-HCL, pH 6,8

8 % SDS

20 % β -Mercaptoethanol

40 % Glycerol

0,008 % Bromphenolblau

2.11.5. Western Blot

Blotpuffer

48 mM Tris
39 mM Glycin
0,037 % SDS
200ml Methanol
→ mit Aq. bidest auf 1L auffüllen

Waschlösung für Westernblot

5 ml Tween 20
1 l PBS

Blocklösung

4% Magermilchpulver in PBS

Antikörperverdünnungspuffer

0,1% BSA in PBS

2.11.6. Zellkultur

DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium) + 10% FCS

500ml DMEM mit Glutamax
55ml FCS (GIBCO BRL Foetal Bovine Serum)
-> 30 min komplementinaktiviert bei 56°C
550µl Antibiotikamix (GIBCO Penicillin/Streptomycin)

Lösung adhärenter Zellen

0,5 ml Trypsin-EDTA (GIBCO) auf T25-Flasche

PBS (Phosphate Buffered Saline)

PBS von GIBCO für Zellkultur ansonsten:

10x PBS:

82,3 g NaHPO₄ (0,58M)

23,5 g NaH₂PO₄ (0,17 M)

40 g NaCl (0,69 M)

→ auf 1000ml A.bidest

Na-Butyrat

2,75g Na-Butyrat (SIGMA 500mM Stocklösung)

50 ml PBS (GIBCO)

→ 0,2µm steril filtrieren bei 4°C lagern

2.11.7. Calciumphosphat-Transfektion

HBS 2x

8,18 g NaCl

0,2 g Di-Natriumhydrogenphosphat

5,95 g Hepes

→ pH 6,95-7,1 einstellen

→ Aq.bidest. ad 500ml

→ sterilfiltrieren

CaCl₂

2M CaCl₂ in Aq. bidest.

→ 0,2µm sterilfiltrieren, bei -20°C lagern

3. Methoden

3.1. Molekularbiologie

3.1.1. Transformation

Unter Transformation versteht man das Einbringen von Fremd-DNA in Bakterien. Um eine hohe Effizienz der Transformation zu erreichen, müssen die Bakterien zuvor „kompetent“ gemacht werden, d.h. sie müssen in einem Zustand versetzt werden, der es der DNA ermöglicht, durch Zellwand und Zellmembran in das Bakterium zu gelangen. E.coli erreichen durch Aufnahme in +4°C 50mM CaCl-Lösung und anschließender Lagerung bei -70°C den Zustand der Kompetenz. Dieser ist nach 12-24h Lagerung bei -70°C (Dagert & Ehrlich, 1979) maximal.

Zur Transformation wurden die kompetenten Bakterien (100 µl pro Transformationsansatz) auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden sie mit 5-20 µl Ligationsansatz bzw. 1 ng Plasmid-DNA gemischt. Zur Steigerung der Transformationseffizienz wurde den Ligationsansätzen noch 1µl β-Mercaptoethanol zugesetzt. Der Bakterien-Plasmidmix wurde nach 30minütiger Inkubation auf Eis, für 30s bei 42° im Wasserbad einem Hitzeschock ausgesetzt. Anschließend folgte eine 2 min. dauernde Abkühlung auf Eis, bevor er, mit 250µl SOC-Medium versetzt, 1h bei 37°h geschüttelt wurde (180 rpm). Je nach Ansatz wurden 50–200µl auf mit Ampicillin versetzten Agarplatten ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht bebrütet.

3.1.2. Minipräparation von Plasmid-DNA

(Birnboim & Doly, 1979)

Die alkalische Lyse ist eine schnelle und unaufwendige Methode zur Isolierung von Plasmid-DNA aus kleinen Bakterienkulturvolumina. Die so gewonnene DNA kann dann z.B. Restriktionsverdau oder Sequenzierung analysiert werden.

Je 2ml 1x LB-Medium mit Ampicillin pro Reaktionsgefäß wurden durch einen mit einem sterilen Zahnstocher von der Agarplatte gepickten Einzelklon beimpft und bei 37°C über Nacht bei 180 rpm geschüttelt.

Nach Abzentrifugation (3 min bei 14 000 rpm) wurde das Pellet in 300 µl TENS resuspendiert. Durch das darin enthaltene NaOH wurde ein alkalisches Milieu geschaffen, welches zur Denaturierung der chromosomalen DNA führt. Bei der zirkulären Plasmid-DNA geschieht dies nur partiell. Das SDS sorgt für die Denaturierung der zellulären Proteine. Durch die anschließende Neutralisierung durch Zugabe von 150 µl Na-Acetat pro Reaktion wird erreicht, dass chromosomale DNA und Proteine Komplexe mit Natriumionen bilden und ausfallen. Die Plasmid-DNA hingegen verbleibt in Lösung. Nach Zentrifugation (5 min. bei 14 000 rpm) befinden sich so Plasmid-DNA und RNA im Überstand. Dieser wurde in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt und zur Präzipitation der doppelsträngigen DNA mit 0,9 ml eiskalten 100 % Ethanol gemischt. Anschließend wurde 2 min bei 14 000 rpm zentrifugiert.

Die DNA wurde noch zweimal mit 0,5 ml 70 % Ethanol gewaschen und jeweils für 5 min bei 14000 rpm abzentrifugiert, bevor sie in der Speedvac getrocknet und in 50 µl H₂O aufgenommen wurde. Zusätzlich wurde der zum Restriktionsverdau fertigen Miniprep 1µl RNase A zugesetzt, um die noch enthaltenen RNA-Reste zu verdauen.

3.1.3. Maxipräparation von Plasmid-DNA

Um Plasmid in größerer Menge und höherem Reinheitsgrad zu präparieren, wurde in dieser Arbeit der kommerziell erhältliche Plasmid Maxi Kit (Qiagen) verwendet. Bei der hier verwendeten Säule erhält man bis zu 500µg Plasmid-DNA.

Dazu wurden 10 µl einer über Nacht in 2 ml LB-Medium (mit Ampicillin) gewachsenen Bakterienkultur in 500 ml LB-Medium (mit Ampicillin) angeimpft. Diese wurden dann bei 37°C in einem Bakterienschüttler bei 180 rpm 12-16 h inkubiert.

Nach Überführung der Suspension in ein 500 ml Bechergesäß wurden die Bakterien durch Zentrifugation (6000 rpm für 15 min bei 4°C) in einem JA-10 Rotor geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 10 ml Puffer P1 (mit RNase A) resuspendiert. Anschließend wurden 10 ml Puffer 2 hinzupipettiert und nach vorsichtigem Mischen durch Invertieren 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Dadurch wurden die Bakterien alkalisch lysiert (siehe Minipräparation).

Durch die Zugabe von 10 ml Puffer P3, der ebenfalls mittels Invertieren eingemischt wurde, und Inkubation für 20 min. auf Eis wurden genomische DNA, Proteine, Zelltrümmer und SDS präzipitiert. Dieses Präzipitat wurde bei 8000 rpm für 30 min bei 4 °C in einem JA-10 Rotor abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend gleich entfernt und zweimal über dieselbe Säule, die vorher durch 10 ml Puffer QBT äquilibriert wurde, laufen geschickt. Dann wurde die Säule, an deren Matrix sich die DNA gebunden hatte, zweimal mit Puffer QC gewaschen. Anschließend wurde die DNA mit 15 ml Puffer QF aus der Säulenmatrix eluiert. Durch Hinzugabe von 10,5 ml Isopropanol wurde die DNA präzipitiert und durch Zentrifugation für 1 h bei 4000rpm in einem JA-10 Rotor pelletiert.

Nach zweimaligen Waschen mit 5ml 70 % Ethanol, jeweils anschließendem Zentrifugieren (4400 rpm für 10 min. in einem JA-10 Rotor) wurde das DNA-Pellet luftgetrocknet und in 200µl H₂O oder TE-Puffer aufgenommen.

Zuletzt wurde die Konzentration mittels Photometrie (siehe unten) oder quantitativer Analyse im Agarose-Gel bestimmt.

3.1.4. Ampicillin als Selektionsmarker

Um nach Transformation von Plasmid-DNA diejenigen Bakterienzellen, die die Plasmid-DNA aufgenommen haben, anreichern zu können benötigt man Selektionsmarker. Üblicherweise werden Marker verwendet, die auf dem Plasmid kodiert sind. Auf diese Weise entsteht ein neuer Phänotyp, welcher Bakterien, die erfolgreich transformiert wurden, leicht selektierbar macht.

Die für diese Arbeit konstruierten Plasmide besitzen alle das Ampicillinresistenzgen als Selektionsmarker. Dieses Gen kodiert ein Enzym, welches sich im periplasmatischen Raum des Bakteriums befindet und die Hydrolyse des Ampicillin-β-Lactam Rings katalysiert.

3.1.5. Phenol/Chloroform Extraktion von DNA

(Sambrook et al., 1989)

Häufig enthalten Nukleinsäurelösungen unerwünschte Verunreinigungen, zumeist handelt es sich dabei um Proteine. Die Phenol/Chloroform-Extraktion eignet sich dazu, die

Nukleinsäurelösungen von diesen Verunreinigungen zu befreien. Somit können z.B. auch vorher zugegebene Enzyme inaktiviert und entfernt werden.

Die zu reinigende Lösung wurde mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol überschichtet und durch ca. 5-10 sec. Vortexen gründlich durchmischt.

Anschließend wurde der Ansatz bei 14.000 rpm für 30 Sek. zentrifugiert und die obere, wässrige Phase unter Vermeidung der Interphase abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Auf diese Weise wurden Verschmutzungen denaturiert. Sie sammelten sich in der organischen Phase beziehungsweise an der Grenzschicht zwischen den beiden Phasen an, während die Nucleinsäuren in der wässrigen Phase blieben. Durch eine anschließende Alkoholfällung wurden die verbleibenden Phenolreste entfernt.

3.1.6. Ethanolpräzipitation

Um eine DNA-Lösung zu konzentrieren oder von störenden Salzen zu befreien, wird eine Ethanolpräzipitation durchgeführt.

Hierbei wurde dem DNA-Ansatz 1/10 Vol. 3M Na-Acetat (einfach geladenes Salz) und 2-3 Vol. 100% Ethanol (eisgekühlt) hinzu gegeben. Bei kleinen DNA-Fragmenten (wenige hundert Basenpaare) wurde zusätzlich 1ml (10mg/ml) Glykogen hinzugefügt. Der Ansatz wurde für 1h bei - 80 °C inkubiert. Dabei wurde die DNA durch Entzug der Hydrathülle ausgefällt. Anschließend wurde der Ansatz bei 14 000 rpm für 20 Min. zentrifugiert und zweimal mit 500 µl 70% (-20°C) Ethanol gewaschen, um ihn von Salz- und Ethanolresten zu reinigen. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 14000 rpm für 10 Min. wurde das Pellet ca. 20 Min. in der SpeedVac getrocknet und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer aufgenommen.

3.1.7. Spektrophotometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration von Nukleinsäuren in Lösung lässt sich mit Hilfe eines Spektrophotometers bestimmen. Dies geschieht über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum des Pi-Systems der Basen.

Die zu vermessende DNA-Suspension wurde 1:100 mit A. bidest auf ein Endvolumen von 400 µl verdünnt und in eine Quarzglasküvette gefüllt. Als Referenzprobe wurde eine Küvette mit 400µl A. bidest. verwendet. Aus der mittels Photometer gemessenen optischen Dichte bei 260 nm konnte anschließend mit folgender Formel die Konzentration errechnet werden:

$$C (\mu\text{g/ml}) = OD_{260} \times V \times F$$

C = Konzentration

V = Verdünnungsfaktor

F = Multiplikations-Koeffizient

Aus dem Verhältnis der OD_{260} und der OD_{280} kann man eine Aussage über den Reinheitsgrad der Lösung treffen. Eine proteinfreie Nucleinsäurelösung weist ein Verhältnis von 1,8-2,0 auf. Niedrigere Werte sprechen für eine Kontamination mit anderen Substanzen z.B. Proteinen. Höhere Werte sprechen für RNA in der Lösung.

3.1.8. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme bakteriellen Ursprungs, die spezifisch 4-8 Basenpaare in einer palindromischen DNA-Sequenz erkennen und spalten können. Sie sind sehr präzise und schneiden unter den richtigen Pufferbedingungen nur in ihrer Zielsequenz. Man verwendet sie zu analytischen Zwecken, um ein bestimmtes Plasmid anhand seines typischen Bandenmusters zu identifizieren sowie zu präparativen Zwecken, um im Rahmen einer Klonierung ein spezifisches Spaltprodukt zu gewinnen. Im analytischen Ansatz wurden 0,2 bis 1,0 µg DNA in 20 µl Endvolumen, im präparativen 5 bis 10µg in 30 bis 50µl Endvolumen gespalten. Die Reaktionen wurden, je nach Herstellerangabe, mit Pufferlösungen und, wenn angegeben mit 0,01 Volumenanteil BSA versehen und das jeweilige Enzym im 2 bis 5fachen Überschuss (um unvollständige Spaltung zu verhindern) hinzugegeben. Anschließend wurde der Ansatz bei der empfohlenen Reaktionstemperatur für 2 bis 16 Stunden inkubiert.

3.1.9. Klenow-Auffüllreaktion

Klenow-Fragment ist die Bezeichnung für den größeren von zwei Peptid-Abschnitten der DNA-Polymerase 1 des Bakteriums Escherichia coli. Dieses Fragment besitzt zwei Enzymfunktionen, nämlich die 5'-3'-Polymerase-Funktion, bei der DNA-Bausteine verknüpft

werden, und eine schwache 3'-5'-Exonuklease-Funktion, bei der falsch eingebaute DNA-Bausteine vom 3'-Ende her wieder entfernt werden.

Die 5'-3'-Polymerase Funktion des Klenow-Fragment wird verwendet, um glatte Enden (blunt ends) an DNA-Fragmenten zu schaffen, an denen nach Spaltung mit Restriktionsenzymen 5'-Überhänge entstehen (Abb.8).



Abb. 8: Darstellung der Funktion der Klenow-Polymerase

Hierzu wurde dem Restriktionsverdau 2µl dNTPs (10mM), 2µl Puffer (vom Hersteller angegeben) und 1-2-µl Klenow-Enzym zugegeben, und mit A.bidest. zu einem Gesamtvolumen von 20µl aufgefüllt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz für 30 Min. bei 37 °C inkubiert. Die DNA wurde mit einer anschließenden Ethanolpräzipitation wieder gereinigt.

3.1.10. Abbau überhängender 3'-Enden mittels T4-DNA-Polymerase

Die T4-DNA-Polymerase stammt aus dem Bacteriophagen T4. Die 5'-3' DNA-Polymerase ist denen des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I sehr ähnlich; sie besitzt aber eine starke 3'-5' Exonuklease, die sich dazu eignet überhängende 3'-Enden von DNA-Fragmenten nach Restriktionsverdau zu glätten.

Dem Reaktionsansatz wurden 4µl 5x Reaktionspuffer, 1µl 2mM dNTPs (Endkonzentration 0,1 mM) und 1U T4-DNA-Polymerase hinzugegeben und zu einem Gesamtvolumen von 20 µl mit A. bidest aufgefüllt. Anschließend wurde der Restriktionsverdau für 20 Min. bei 11°C inkubiert und die Reaktion bei 70 °C für 10 Min gestoppt. Wie bei der Klenow-Reaktion wurde der Ansatz noch mit einer Ethanolpräzipitation gereinigt.

3.1.11. Dephospholierung von 5'-Enden

Beim Verdau eines Vektors mit einem Restriktionsenzym entstehen zwei kompatible Enden, die sich wieder miteinander ligieren lassen können. Diese Selbstligation kann man verhindern,

indem man die Vektor-DNA dephosphoryliert. Dazu wird die calf intestine alkaline phosphatase (Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm, CIP) verwendet. Hierbei werden an den nach dem Restriktionsverdau entstehenden 5'-Enden der DNA-Fragmente die Phosphatreste durch die CIP entfernt, die zu einer Selbstligation nötig wären. Das Fragment, das man einsetzen möchte, besitzt noch Phosphatreste an beiden Enden und kann daher noch mit der Vektor-DNA ligieren.

Dem Restriktionsverdau wurden 5 µl Puffer (vom Hersteller angegeben), 1 µl CIP (20u/µl) hinzugegeben und mit A. bidest zu einem Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde anschließend für 30 Min bei 37 ° inkubiert und anschließend für 10 Min. bei 75 ° inaktiviert.

3.1.12. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (Mullis et al., 1986) ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA aus einem bestimmten Genom-Abschnitt. Voraussetzung ist, dass man zumindest einen Teil der Nukleotidsequenz kennt. Man verwendet den bekannten Teil der DNA zur Synthese von zwei Oligonukleotiden, deren Basenfolge jeweils zu einem der DNA-Stränge komplementär ist und die an entgegengesetzten Punkten der Region liegen, die vermehrt werden soll. Diese Primer, die günstigsterweise aus 18-30 Basen bestehen sollten, dienen als Starter für die in-vitro-DNA Synthese, welche von der DNA-Polymerase katalysiert wird, und bestimmen auch den Endpunkt des DNA-Fragments.

Das typische PCR-Programm besteht aus 3 Schritten: einem Denaturierungsschritt, einem Annealingschritt und einem Elongationsschritt. Denaturiert wird bei 94 °C, wobei sich die Stränge der Matrizen-DNA trennen. Anschließend kommt es bei einer Temperatur von 58 °C zur Hybridisierung der im starken Überschuss vorhandenen Oligonukleotiden mit der nun einzelsträngigen Matrizen -DNA. Beim folgenden Elongationsschritt kommt es bei einer Temperatur von 72 °C, dem Temperaturoptimum der thermostabilen Taq-Polymerase, zur Verlängerung der Oligonukleotide bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt, die der Matrizen-DNA gleicht. Diesen Zyklus kann man beliebig oft wiederholen und so die Matrizen-DNA exponentiell vermehren.

Der Reaktionsansatz wurde in 0,5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt und setzte sich wie folgt zusammen: je 1 µl (20 pmol) flankierten den Primer, 5µl 10 mM dNTPs, 5µl 10 x PCR-Puffer, 4 µl 25 mM MgCl₂, 100ng Matrizen-DNA und 0,5 µl Taq-Polymerase, Der Ansatz wurde zu einem Reaktionsvolumen von 50 µl mit A. bidest aufgefüllt. Als Standardprogramm wurden 35 Zyklen gewählt mit je 30 Sek. bei 94 °C, 1 Min bei 58 °C und 2 Min. bei 72 °.

3.1.13. Ligation von DNA-Fragmenten

Die T4 Ligase ist ein Enzym, welches in der Lage ist, freie phosphorylierte 5'-DNA-Enden mit 3'-OH-Enden zu verbinden. Das Prinzip besteht darin, dass unter ATP-Verbrauch zwischen der 5'-Phosphatgruppe und der Hydroxylgruppe am 3'-Ende der DNA eine Phosphodiesterbindung entsteht. Als Vektor-DNA wurde ein linearisiertes dephosphoryliertes Plasmid verwendet, das ein Ampicillin-Resistenzgen trägt.

Dazu wurden 100ng Vektor DNA mit 3-10fachem molarem Überschuss an Insert-DNA vermischt. Diesem Ansatz wurden dann 2 µl Ligase-Puffer und 1 µl T4-DNA-Ligase hinzugegeben und A. bidest zu einem Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde dann über Nacht bei 14 °C inkubiert.

3.1.14. Agarosegel-Gelelektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese ist eine Methode, DNA-Fragmente von 0,1 bis 30 kB Länge voneinander zu trennen. Dabei werden die DNA-Fragmente, je nach Molekülgröße, aufgrund der daraus resultierenden Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld im Agarosegel aufgetrennt. Die Laufstrecke ist umgekehrt proportional zum Logarithmus der Fragmentlänge d.h. große DNA-Fragmente durchlaufen Agarosegel langsamer als kleine. Je höher die Agarosekonzentration im Gel, umso mehr liegt der optimale Trennbereich in Richtung kleinerer Fragmente.

Die Tabelle gibt die optimalen Trennbereiche an:

Fragmentlänge (kb)	Agarosekonzentration (%)
1,0 bis 30 kb	0,5 %
0,8 bis 12 kb	0,7 %

0,5 bis 7 kb	1,0 %
0,4 bis 6 kb	1,2 %
0,2 bis 3 kb	1,5 %
0,1 bis 2 kb	2,0 %

Mit der Agarosegel-Elektrophorese ist es möglich präparative DNA von Nebenfragmenten zu befreien oder DNA-Abschnitte, nach Restriktionsverdau, aufgrund ihres typischen Bandenmusters zu identifizieren.

Je nach benötigtem Trennbereich wurden 0,5 bis 2,0 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer durch Erhitzen (in der Mikrowelle) gelöst. Dann wurden 3 µl Ethidiumbromid (1mg/ml) hinzugegeben, ein Farbstoff der zwischen DNA-Stränge interkaliert und unter UV-Licht die DNA als fluoreszierende Bande sichtbar macht. Nach Abkühlung auf ca. 50 °C konnte mit Hilfe eines Kammes in einer dafür vorbereitete Gelkammer ein Gel mit Taschen gegossen werden. Das erstarrte Gel wurde in eine mit TAE gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die DNA-Proben wurden mit 1x BPB versehen und in die Taschen pipettiert. Anschließend wurde Spannung (zwischen 60 und 120 mV) an die Elektrophoresekammer angelegt. Als Größenmarker wurde ein 1 kb Leiter der Fa. MBI eingesetzt. Die DNA/Ethidiumbromidkomplexe wurden nach Auftrennung entweder mit einem Transilluminator oder bei präparativen Ansätzen zum Schutze der DNA mit einer UV-Handlampe (Strahlung geringerer Intensität) sichtbar gemacht.

3.1.15. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Elution der gewünschten DNA-Fragmente erfolgt nach Auftrennung im Agarosegel mit Hilfe des NucleoSpin Extract Kit von Macherey-Nagel oder mit einem Kit von Qiagen. Hierzu wurden die DNA Fragmente mit einer UV-Handlampe bei einer Wellenlänge von 365 nm sichtbar gemacht und die entsprechenden Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit einer Pinzette in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Die weitere Isolierung der DNA erfolgte nach Angaben des jeweiligen Herstellers.

3.1.16. Sequenzierung

Grundlage der Sequenzierung von DNA ist die Methode des stochastischen Kettenabbruchs nach Sanger (Sanger et al., 1977), unter Verwendung fluorchrom-markierter Didesoxynukleotide. Hiermit kann die Basenabfolge der DNA präzise bestimmt werden.

Die Sequenzierungen wurden mit dem Ready Reaction Cycle Sequencing Kit von Applied Biosystems durchgeführt und automatisch ausgewertet. Das Kit enthält die AmpliTaq FS Polymerase und beruht auf der Amplifikation eines DNA-Stranges in einer linearen PCR.

Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen: 2 µl Premix (Big Dye, welches die markierten Didesoxynukleotide enthielt), 200-500 ng DNA und 10 pmol Oligonukleotid aufgefüllt mit A. bidest zu einem Gesamtvolumen von 10µl. Da die Template –DNA sehr sauber sein muss, wurde sie vorher über Säulen aufgereinigt. Als Cycling-Programm wurden 25 Zyklen gewählt mit je 10 Sek. bei 96 °C (Denaturierung), 5 Sek. bei 45-60 °C (Hybridisierung abhängig von der Schmelztemperatur des Hybrids), und 4 Min. bei 60 °C (Elongation). Dann folgt eine Aufreinigung über Autoseq G-50 Säulen, um unverbrauchte fluorchrom-markierte Nukleotide zu entfernen. Zur Homogenisierung der Matrix wurden die Säulen gevortext, für 2 Min. bei 5000 rpm zentrifugiert und die obere wässrige Phase entfernt. Anschließend wurden die Säulen zweimal mit A. bidest gewaschen. Die Sequenzierungsproben wurden auf die Säulen aufgetragen und für 2 Min. bei 5000 rpm zentrifugiert.

Nach Trocknung wurde das Pellet in 15 µl TSR (template suppression reagent: ABI Prism) aufgenommen. Danach muss die DNA bei 90°C noch für 2 Min. denaturiert werden. Nach Überführung in spezielle Sequenzierungstubes wurden die Proben bis zur Aufarbeitung im Sequenzierer bei 4 °C gelagert. Die Auftrennung und Auswertung erfolgte im ABI Prism 3700 Sequenzierer.

3.1.17. Präparation von DNA aus Zellkulturen

Zur Präparation genomischer DNA aus Zellkulturen wurde das DNazol-Reagens der Firma Qiagen verwendet. DNazol ist ein nicht-organisches Reagens aus Guanidinisothiozyanat mit dem die Zellen der Zellkultur lysiert bzw. homogenisiert werden können. In nachfolgenden Schritten kann die genomische DNA mit Hilfe von Ethanol präzipitiert werden. Anschließend

kann die DNA in Wasser oder TE-Puffer gelöst werden. Der Vorteil dieser Methode besteht in der schnellen Isolation der DNA (10 bis 30 Min.) sowie in der theoretischen DNA-Ausbeute von 70 bis 100 %.

Ablauf:

Zunächst wurden 1×10^7 Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin aus der Kulturflasche abgelöst. Nach Resuspension wurden die Zellen in ein Falconröhrchen gegeben und für 10 Min. bei 2000 rpm zentrifugiert. Das entstehende Zellpellet wurde zweimal mit PBS gewaschen und daraufhin mit 1ml DNazol lysiert. Die freigesetzte genomische DNA wurde durch Zugabe von 500 μ l 100 % EtOH/1 ml DNazol präzipitiert. Dazu wurde der Inhalt des Röhrchens vorsichtig gemischt und der Ansatz für 1 bis 3 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die nachfolgende Zentrifugation für 10 Min. bei 13000 rpm und 4°C wurde die DNA pelletiert. Das DNA-Pellet wurde noch zweimal mit 70 % EtOH gewaschen und nach kurzem Antrocknen in der gewünschten Menge TE/Rase A-Puffer resuspendiert.

3.1.18. Klonierung mit Hilfe des TOPO-TA-Cloning[®]-Kit (Invitrogen)

Ein weiterer Klonierungsansatz beruht auf der Entdeckung von Clark, 1988, dass die Taq-Polymerase keine Fragmente mit glatten Enden produziert, sondern mit Hilfe einer unspezifischen, terminalen Transferase-Aktivität einzelne Desoxyadenosine (A) an das 3'-Ende des PCR-Produkts anfügt. Durch die Konstruktion eines linearen Vektors mit überhängenden 3'-Thymidin-Resten lassen sich PCR-Fragmente sehr effizient klonieren. Diese Methode wird daher als TA-Klonierung bezeichnet. Eine Variante dieser Klonierungsstrategie bietet der TOPO-TACloning-Kit (Invitrogen). Statt einer Ligase wird hier ein mit Topoisomerase I „aktivierter“ TA-Vektor (pCR.II-TOPO) verwendet.

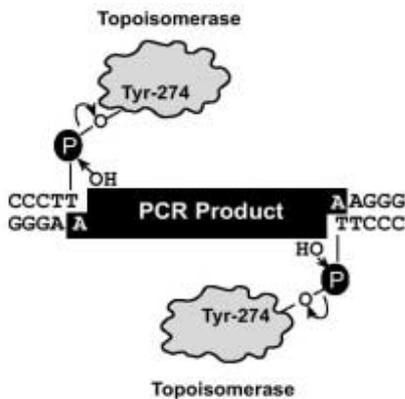


Abb. 9: Prinzip des TOPO-TA-Cloning-Kit. Das PCR-Produkt mit überhängenden 3'-Enden (schwarz) wird flankiert von der doppelsträngigen Vektor-DNA. Diese verfügt vor dem Inserieren des PCR-Fragments über eine kovalent gebundene Topoisomerase I (grau). Abbildung entnommen aus dem Handbuch des Kits.

Es ist bekannt, dass die Topoisomerase I des Vaccinia-Virus an spezifischen Stellen an dsDNA bindet und dort die Phosphodiester-Bindung nach 5'-CCCTT in einem Strang spaltet. Die freigewordene Energie bleibt in Form einer kovalenten Bindung zwischen dem 3'-Phosphatrest des gespaltenen DNA-Stranges und einem Tyrosylrest (Tyr-274) erhalten. Ein freies 5'-Hydroxylende ist in der Lage, die Topoisomerase unter Verknüpfung von DNA-Enden freizugeben (Abb.9).

Für die Klonierung wurden kurz zuvor mit Taq-Polymerase amplifizierte PCR-Fragmente verwendet, die wenn nötig noch über ein Gel aufgereinigt wurden. Pro Reaktionsansatz wurden 0,5 bis 1 µl Vektor eingesetzt. Dazu wurden 0,4 bis 4 µl PCR-Produkt und zusätzlich 1 µl Salzlösung (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl₂) gegeben. Die Reaktion wurde gemischt und 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion nach Angaben des Herstellers direkt in chemisch kompetente Bakterien transformiert (TOP10, Invitrogen).

3.2. Proteinbiochemische Methoden

3.2.1. Herstellung von Zellysaten für Western Blot

Proteingemische, die über die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihrer Molekularmasse aufgetrennt werden sollen, müssen spezifisch vorbereitet werden.

Unter Zugabe von SDS (in RIPA-Puffer und PPP enthalten), einem anionischen Detergens, werden auf hydrophobe Wechselwirkungen beruhende Bindungen innerhalb des Proteins aufgehoben. Als Folge davon gehen auch die höheren Proteinstrukturen verloren, so dass das Protein linearisiert wird. β -Mercaptoethanol (im PPP enthalten) bewirkt durch eine Reduktion der Disulfidbrücken eine teilweise Denaturierung. Durch Erhitzen (Kochen) der Probe wird eine vollständige Denaturierung erreicht.

Zur Herstellung von Zellysaten aus transfizierten Zellen wurde das Medium abgenommen und die Zellen vorsichtig 1-2mal mit PBS gespült. Dann wurden die Zellen unter Zugabe von 1 ml RIPA-Puffer für 10 Min auf Eis lysiert. Während dieser Inkubationszeit wurden in Eppendorfröhrchen 400 μ l 2x PPP vorgelegt. In die vorbereiteten Röhrchen wurden anschließend 400 μ l des Zellysates hinzugegeben, dieses Gemisch wurde gevortext, um die Viskosität zu vermindern und anschließend 10 Min unter Aufkochen bei 94 °C denaturiert.

3.2.2. Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)

Die selektive Größe eines Proteins und seine Zusammensetzung aus Untereinheiten können durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ermittelt werden. Polyacrylamid-Gele werden durch Polymerisation aus Monomeren hergestellt und bilden eine stark vernetzte dreidimensionale Matrix. Die Porengröße dieses Gitters kann, je nach Größe des zu detektierenden Proteins, durch eine Veränderung in der Konzentration des Acrylamids individuell eingestellt werden. Da jedes Protein-Molekül durch die vorherige SDS-Zugabe mit einer großen Anzahl von negativen Ladungen umgeben ist, wandern alle Proteine bei Anlegung einer Spannung zur Anode. Hier wurde eine modifizierte Tricine-SDS-Gelelektrophorese Schägger und Jagow (Schägger & Jagow, 1987) durchgeführt, dabei passieren die Proteine erst ein Sammelgel. In diesem werden sie zu einer scharfen Bande fokussiert, bevor sie in das eigentliche Trenngel einwandern. Hierdurch kommt es zu einer besser Auftrennung und hohen Schärfe der Proteinbanden.

In die vorbereitete Apparatur wurde zuerst ein 10% Trenngel gegossen, auf welches nach Polymerisation dann ein 5% Sammelgel geschichtet und ein Geltaschenkamm eingeführt wurde. Nach der Polymerisierung wurde die obere Kammer der Gelapparatur mit Kathodenpuffer, die untere mit Anodenpuffer gefüllt und der Kamm entfernt. Nach Spülung

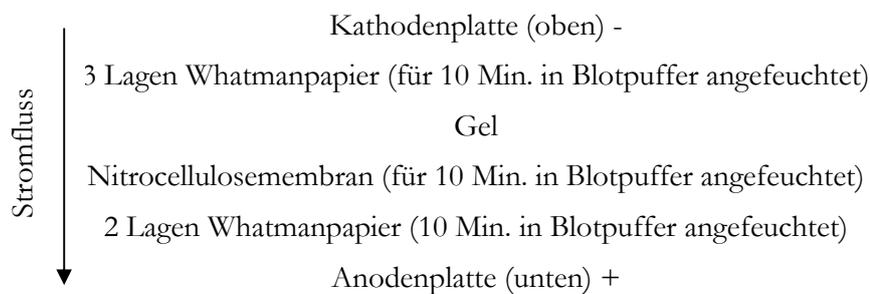
der Sammelgeltaschen mit Kathodenpuffer wurden je 80µl der gebrauchsfertigen Proben einpipettiert. Als Größenmarker wurden 7 µl Rainbow-Marker (Amersham Bioscience) verwendet. Die Elektrophorese wurde über Nacht bei einer Stromstärke von 35 mA durchgeführt.

3.2.3. Western Blot

Der Western Blot (Towbin et al., 1979) ist ein Arbeitsverfahren, bei dem Proteine entsprechend ihrer Größe zuerst gelelektrophoretisch aufgetrennt und dann auf eine Nitrocellulosemembran übertragen werden. Diesen Vorgang nennt man Blotten. Die Proteine auf der Nitrocellulose-Membran können nun, mittels eines markierten Antikörpers, analysiert werden. Ein erster spezifischer Antikörper erkennt das nachzuweisende Protein. Ein zweiter Antikörper der gegen den Fc-Teil des ersten Antikörpers gerichtet und Peroxidase-gekoppelt ist, kann nun an den ersten Antikörper binden und ihn auf diese Weise markieren.

Zum Nachweis der Antigen-Antikörper-Komplexe wurde ECL-Kit (Amersham) verwendet. Hierbei wird durch eine peroxidase-vermittelte Oxidation von Luminol Licht emittiert. Dieses kann auf einem Röntgenfilm nach Entwicklung als Schwärzung sichtbar gemacht werden.

Die Apparatur zur Übertragung auf die Nitrocellulosemembran baute sich wie folgt auf:



Durch Anlegung eines elektrischen Feldes (90 Min. bei 150 mA), kommt es zur Wanderung der negativ geladenen Proteine in Richtung Anode. Somit wandern die Proteine in der Apparatur vom Gel zur Nitrocellulose, wo sie haften bleiben.

Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran 1 Stunde bei Raumtemperatur in 5% Magermilchpulver, das in PBS gelöst wurde geschwenkt, um mögliche unspezifische Bindungsstellen zu blocken. Nun wurde die Membran 3mal kurz mit PBS/Tween-20 (0,5%)

gespült, bevor die 1. Antikörperverdünnung (Verdünnungsfaktor, je nach Antikörper) aufgetragen wurde und über Nacht bei 4 °C inkubiert wurde. Nun folgte wieder ein Waschschrift, bei welchem die Membran zweimal für 10 Min. in PBS/Tween-20 geschwenkt wurde, bevor der 2. Antikörper (1:1000 verdünnt) in die Blocklösung pipettiert wurde. Dieser verblieb für 1 h auf der Membran.

Die Membran wurde dann nochmals 3x 10 Min. mit PBS/0,5% Tween-20 gewaschen.

Für die Fotoreaktion mit Hilfe der ECL-Lösungen wurde die Membran erst auf einem Filterpapier getrocknet und auf eine Glasplatte gelegt. Je 1 ml ECL-Lösung I und II wurden gleichmäßig auf die Membran verteilt und dort für 1 Min. belassen. Nach Entfernung der überschüssigen Flüssigkeit mittels Filterpapier folgte eine kurze Antrocknung der Membran, bevor sie auf einer Glasplatte mit Klarsichtfolie überzogen wurde. Je nach Stärke der Antikörper-Bindung wurde ein Röntgenfilm unterschiedlich lang mit der Membran exponiert, die Zeiten betragen zwischen 15 Sek. und 5 Min.

3.3. Zellbiologische Methoden

3.3.1. Zellkultur

Es wurden adhärenente Zellen verwendet, die in 25 cm², 75 cm² und 6cm Schalen kultiviert wurden. Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden an Steril-Arbeitsbänken durchgeführt. Als Kulturmedium fungierte DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium) mit 10% FCS (fetal calf serum), das mit einem Antibiotikamix (GIBCO Penicillin/Streptomycin) versehen wurde. Die Lagerung der Zellkulturflaschen erfolgte in Zellkultur-Brutschränken bei einer Temperatur von 37 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 95% und 5% CO₂-Gehalt.

Zeigte sich unter dem Mikroskop in der Kulturflasche eine 80 % Konfluenz der Zellen, wurde das Medium abgenommen und der Zellrasen mit PBS gespült. Nun wurde den Zellen 0,5 ml Trypsin zugegeben und für 2 Min. im Brutschrank inkubiert, bis sich die Zellen vollständig abgelöst hatten. Nach Verdünnung in Kulturmedium wurden 90 % der Zellsuspension verworfen und die verbliebenen 10 % in frische Kulturflaschen eingesät und mit neuem Medium aufgefüllt. Diese Teilung der Zellen erfolgte alle 2-4 Tage.

3.3.2. Transfektion mit Calciumphosphat (CaPO₄)

Unter Transfektion versteht man die Aufnahme von freier DNA in eukaryotische Zellen. Bei der Calcium-Phosphat-Transfektion bindet sich die freie DNA an Calcium-Phosphat, bildet mit diesen Präzipitate, welche dann durch Endozytose in die Zellen aufgenommen werden.

Am Tag vor der Transfektion wurden $0,5 \times 10^6$ 293 T (wenn nicht anders angegeben) pro 6 cm Schale in 4ml DMEM + 10% FKS eingesät, so dass sie am Transfektionstag ca. 2/3 konfluent waren. Am Folgetag wurden zuerst alle benötigten Lösungen auf 37°C erwärmt und das Medium 1 h vor Transfektion in den 6 cm Schalen gewechselt. Nun wurde der Transfektionsmix angesetzt, in welchem pro Schale in einem Eppendorf-Gefäß 5-20 µl DNA mit 50 µl CaCl₂ vermischt und mit A. bidest zu einem Gesamtvolumen von 500 µl aufgefüllt wurden. Den Reaktionsansätzen wurden dann langsam 500 µl HBS (pH 7,05-7,1) hinzuge tropft. Der Ansatz wurde mehrfach durch Invertieren gemischt und für 15 Min. bei RT inkubiert. Schließlich wurde er in kreisenden Bewegungen vorsichtig auf die Zellkultur pipettiert, die Schalen leicht geschwenkt und für 8h im Brutschrank inkubiert, bevor das Medium erneut gewechselt wurde. Besaßen die transfizierten Plasmide einen CMV-Promotor, unter dessen Kontrolle Proteine exprimiert wurden, erfolgte 24h p.t. eine Induktion der Proteinsynthese durch Zugabe von 80 µl Natriumbutyrat (10mM). Diese Stimulation wurde nach weiteren 8 h durch Mediumwechsel beendet. 32-56 h nach Transfektion erreicht die Expression der transfizierten Plasmide ihre maximal Stärke, aus diesem Grunde wurden die Zellen, sowie ihr Überstand in diesem Zeitfenster für nachfolgenden Experimente weiterverarbeitet.

3.3.3. Polyfect-Transfektion

Eine Alternative zur Ca-Phosphat-Transfektion ist die Polyfect-Transfektion, die den Vorteil der gesteigerten Transfektions-Effizienz besitzt.

Das Polyfect-Reagens ist ein aktiviertes Dendrimer, welches die zu transfizierende Plasmid-DNA zu kompakten Strukturen assembliert, so dass sie optimal für die Endozytose in die Zielzelle präpariert ist. Außerdem ist Polyfect in der Lage, an negativ geladenen Rezeptoren zu binden. In der Zelle puffert es die Lysosomen, was zu einer Inhibition lysosomaler Nukleasen

führt. Damit sind die DNA-Komplexe stabil und können unbeschadet in die Zelle transportiert werden.

Am Tag 1 der Transfektion wurden $1,7 \times 10^6$ 293 T Zellen mit 4ml DMEM + 10% FKS in 6cm-Schalen eingesät. Am Tag 2 wurde zuerst das Medium durch 3ml frisches Medium ersetzt. 6µl der zu transfizierenden DNA wurden in 150µl serumfreien, antibiotikafreien DMEM aufgenommen, 15 Sek. gevortext und 40 µl Polyfect-Reagenz dazupipettiert und mit der Pipette vorsichtig gemischt. Dieses Gemisch wurde zur Komplexbildung für 10 Min bei RT inkubiert. Anschließend wurde dem Ansatz 1ml frisches DMEM+10% FKS hinzugegeben und vorsichtig auf die Zellen getropft.

Es erübrigte sich ein weiterer Mediumwechsel bei dieser Methode und die Zellen und ihr Überstand wurden nach 24h-48h, zum Zeitpunkt der maximalen Expression, weiterverarbeitet.

3.4. Virologische Methoden

3.4.1. Infektion von Zielzellen

Zum Nachweis der Infektiosität und Replikationsfähigkeit der Plasmidkonstrukte wurden Zellen mit nach Transfektion gewonnenen zellfreien Virusüberständen infiziert.

Als Zielzelle wurden BHK-WT Zellen verwendet. Dazu wurden vor Infektion 10^5 BHK-WT in T25 Flaschen eingesät. Nach Absetzen dieser Zellen, meist nach 5-8h, wurde 3ml zellfreier Überstand zum Kulturmedium hinzupipettiert. Die Zellen wurden dann weiter im Brutschrank kultiviert. Kam es zu einer lytischen Infektion der Zielzellen, konnten bei Bedarf frische, noch nicht infizierte BHK-WT Zellen hinzugegeben werden, um eine weitere Zellkultivierung und damit Beobachtung der Zellen zu ermöglichen.

3.4.2. Virustitration mittels Infectious Centre Assay (ICA)

Zur Titration der Virusüberstände wurde ein modifizierter Infectious Centre Assay (Baunach et al., 1993) angewendet. Infizierte Zellen können mit einem gegen virale Kapsidantigene gerichteten spezifischen Antikörper in Verbindung mit einem peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper markiert werden. Die peroxidase-katalysierte Umsetzung des Substrates 3-Amino-9-Ethylcarbazol resultiert in einer braunroten Färbung infizierter Zellen.

In eine 48-Well-Platte wurden 5×10^5 BHK-21-Zellen je Napf ausgesät und nach Absetzen der Zellen mit dem zu titrierenden Überstand in Verdünnungsstufen von 10^0 bis 10^{-5} infiziert. Nach 24 Std. erfolgte ein Mediumwechsel. Am vierten Tag p.i. wurde das Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit 0,5ml PBS – 0,1% BSA je Napf gewaschen und anschließend mit eiskaltem Methanol bei -20°C 30 Min. fixiert. Der spezifische Antikörper $\alpha\text{Gag 011}$ wurde 1:200 in PBS – 0,1% BSA verdünnt. Zu jedem Napf der 48-Well-Platte wurden 100 μl der Antikörper-Verdünnung gegeben und 45 Min. bei 37°C inkubiert. Es folgten 3 Waschschrte mit 0,5ml PBS – 0,1% BSA für je 5 Min. auf einer Wippe. Der sekundäre peroxidase-gekoppelte Antikörper wurde ebenfalls 1:200 in PBS – 0,1% BSA verdünnt und je 100 μl pro Napf für eine 45-minütige Inkubation bei 37°C verwendet. Nach weiteren 3 Waschschrten wurde 0,5ml der frisch angesetzten Färbelösung pro Napf zugegeben und die Reaktion 30 Min. in Dunkelheit gehalten. Nach Abnehmen der Färbelösung und einmaligem Spülen mit A. bidest wurden die Platten getrocknet und bei 4°C gelagert bzw. unter einem Lichtmikroskop ausgewertet.

Ausgezählt wurden Plaque Forming Units (PFU), d.h. braunrot gefärbte Einzelzellen oder Zellcluster, die aus einer einzigen infizierten Zelle durch Mitose oder Synzytienbildung hervorgingen. Das Ergebnis ist in PFU/ml Überstand angegeben.

3.4.3. PFV-Titration mit BHK/LTR lacZ-Zellen

(Schmidt & Rethwilm, 1995)

Zur Bestimmung von Virustitern nach Transfektion mit proviralen PFV-Konstrukten wurden BHK/LTR lacZ – Zellen verwendet. Dies sind Indikatorzellen, die ein LacZ-Reportergen besitzen, welches unter der Kontrolle einer PFV-LTR steht. Da die PFV-LTR nur in Gegenwart des viralen Transaktivators *tas* nennenswerte Aktivität zeigt, eignen sich diese Zellen zur Analyse von Infektionsereignissen.

Nach erfolgreicher Infektion der BHK/LTR-lacZ-Zellen mit FV, exprimiert dieses den viralen Transaktivator *tas*, welcher wiederum mit der PFV-LTR der Indikatorzelle interagiert. Dieses führt zur Expression des LacZ-Reportergens, welches sich in einer enzymatischen Farbreaktion nachweisen lässt. Auf diese Weise können infizierte Zellen leicht nachgewiesen und der Virustiter bestimmt werden. Ebenso können sie auch zum Nachweis der *Tas* Funktion in einem Kokultivierungsassay genutzt werden.

Zur Virustiterbestimmung wurde der Überstand 48h nach Transfektion geerntet und steril durch einen Filter mit 0,45µm Filter Porenweite filtriert. In Eppendorfgefäßen wurde dann mit den zellfreien Virusüberständen eine Verdünnungsreihe in einem Volumen von 1,3 ml (unverdünnt bis 10^{-5}) angelegt. Die BHK/LTR-LacZ-Zellen, die am Vorabend mit einer Zelldichte vom 2×10^4 pro Napf in 12-Napf-Schalen ausgesät worden waren, wurden dann mit jeweils 1ml des verdünnten Überstandes infiziert. Nach 48 h wurden die infizierten Zellen in einem histochemischen LacZ-Assay angefärbt. Zunächst wurde das Medium aus den Näpfen entfernt und die Zellen dann 1x mit PBS gewaschen. Nun wurden die Zellen mit 1ml LacZ-Fixierlösung (0,5% Glutaraldehyd in PBS) für 15 Min bei 4°C fixiert. Nachdem die Zellen 2 x mit PBS gewaschen worden waren, wurden pro Napf 2ml LacZ-Färbelösung, die vorher frisch aus der Stammlösung hergestellt worden war, pipettiert und bei 37°C inkubiert. Nach 3-4 Stunden war die Farbreaktion soweit fortgeschritten, dass man die Zellen unter dem Mikroskop auswerten konnte.

3.4.4. Generierung viraler Überstände zur Transduktion von Zielzellen

Nach Transfektion von virusexprimierender DNA konnten aus dem Nährmedium gereifte Vektorpartikel geerntet werden. Das Medium wurde dazu mit einer sterilen Spritze aufgenommen und durch einen sterilen 0,45 µm-Filter (FP 30/0,45 CA-S; Schleicher & Schuell) passagiert um Zellen und Zelltrümmer herauszufiltern. Zellfreie Überstände wurden aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt oder für kurze Zeit bei 4°C gelagert. Dieser Vektorüberstand konnte zur Transduktion von Zielzellen verwendet werden.

4. Ergebnisse

4.1. Infektiöse Klone mit konstitutiv aktiven LTR-Promotoren

4.1.1. Konstrukte mit rekombinanter 3'-LTR

Die Retroviren werden funktionell in zwei Gruppen aufgeteilt:

1. Die einfachen Retroviren, die nur die drei Gene gag, pol und env besitzen
2. Die komplexen Retroviren, die zusätzliche Gene haben, welche die virale Genexpression regulieren. Diese können zwei unterschiedliche Arten von Proteinen kodieren, die in die Regulation der Genexpression involviert sind, zum einen transkriptionale und zum anderen posttranskriptionale Regulatoren. Foamy Viren gehören zur Gruppe der komplexen Retroviren, sie kodieren für einen Trans-activator (Tas), der auf transkriptionaler Ebene aktiv ist (siehe Einleitung).

Die Konversion eines komplexen Retrovirus' in ein einfaches Retrovirus konnte bereits für verschiedene komplexe Retroviren gezeigt werden (Boris-Lawrie et al., 1997; Boris-Lawrie & Temin, 1995). Auch für Foamy Viren wurde in einer vorangegangenen Arbeit (Schenk et al., 1999) die Replikationsfähigkeit mit einem konstitutiven aktiven U3 Promotor und deletierten akzessorischen Genen gezeigt, allerdings mit deutlich abgeschwächter Replikationsfähigkeit. In dieser Arbeit sollte ein weiteres Virus mit einem tas-negativen FV Genom und konstitutiv aktiven U3 Promotor aus einem simplen Retrovirus, dem spleen focus forming Virus (SFF-Virus), generiert, und dessen Replikationsfähigkeit untersucht werden.

Die Klonierungsstrategie zur Konstruktion dieses Hybridvirus sah folgendermaßen aus:

Das Plasmid pHSRV2 ist ein infektiöser Klon des Prototypen Foamy Virus (PFV) mit verkürzten U3 Regionen in der 3' und 5'-LTR. Die Replikationsfähigkeit in Zellkulturen wird durch diese Deletionen nicht beeinträchtigt (Schmidt & Rethwilm, 1995). In pHSRV2 als Basis wurde die U3-Region im Bereich der 3'-LTR bis auf 212 bp deletiert und auf diese Weise der tas-abhängige Promotor entfernt. Dieser wurde ersetzt durch ein Teil der LTR, Promotor und

Enhancer-Elemente enthaltend, des Friend Spleen Focus Forming Virus (SFFV). Dies ist ein bei Säugetieren vorkommendes einfaches Gammaretrovirus. Auf diese Weise sollten nach Transfektion und Durchlaufen des Replikationszyklus infektiöse Klone entstehen, die in 3' und 5'-LTR rekombinant sind, d.h. in diesen Bereichen die SFFV-LTR-Bereiche enthalten. Zunächst wurde aus einem Subklon ein 380 bp großes DNA-Fragment mit Hilfe der Restriktionsenzyme Asc1 und Pst1, die beide im selben Puffer aktiv sind, herausgeschnitten. Dieses Fragment entsprach der Promotor/Enhancer Kasette der SFFV-LTR.

Anschließend wurde der am 5'-Ende, nach PstI entstandene 3'-Überhang mittels T4-Polymerase abgedaut. Der nach Asc1 Spaltung vorhandene 5'-Überhang am 3'-Ende wurde in einer Klenow-Reaktion aufgefüllt. Dadurch entstanden an beiden Seiten des Fragments glatte Enden. Vor Ligation wurde das Fragment über ein Agarosegel aufgereinigt. Das Plasmid pTS07 beinhaltet Teile der verkürzten 3'-LTR aus dem infektiösen Klon von pHSRV2, sowie eine Promotor/Enhancer Kasette des Cytomegalievirus (CMV), die Teile der U3 Region ersetzt (Schenk et al., 1999). Die im Plasmid pTS 07 enthaltene foamyvirale Sequenz beginnt am Bel-U3-Übergangsbereich, von der Cla1-Spaltstelle 228bp vor dem tas Stopcodon bis 212 bp in die U3 Region, dort schließt sich dann ein CMV Promotor an und nachfolgend die foamyvirale R-Region.

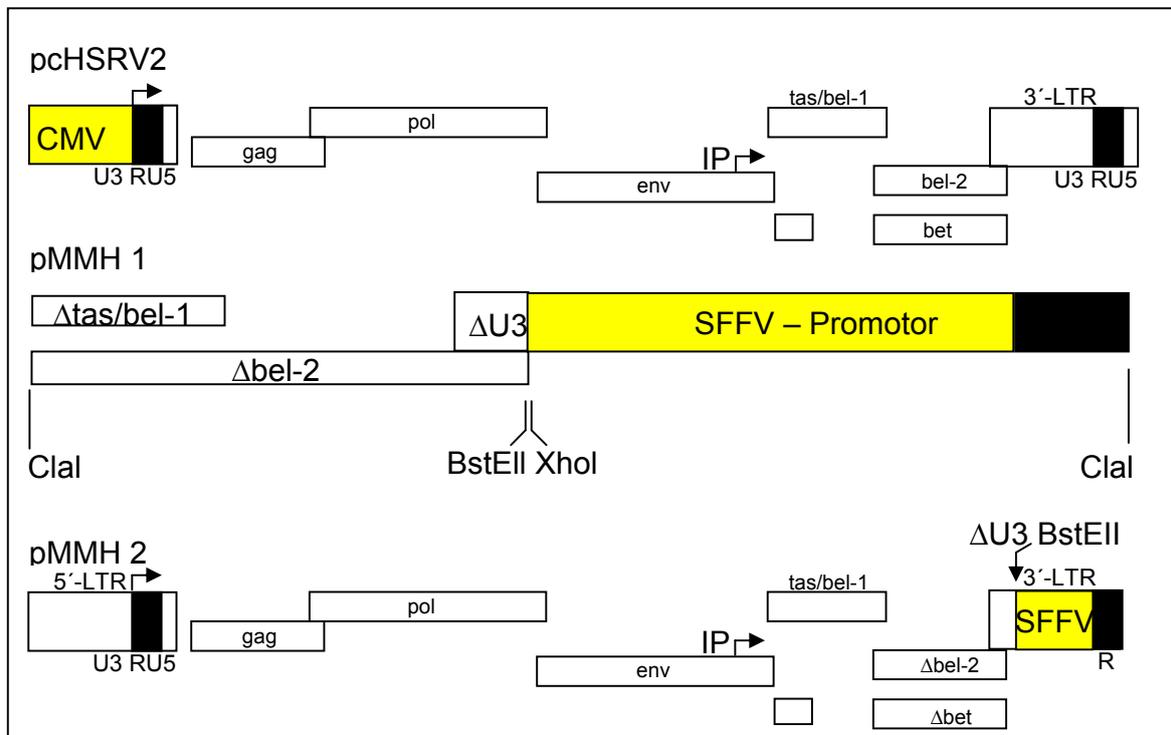


Abb. 10: Überblick über die verwendeten Plasmide: Struktur der rekombinanten LTR in pMMH1, sowie des daraus hervorgehenden Klons pMMH2. Transkriptionstarts sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Aus dem Plasmid pTS07 wurde mit Hilfe der Enzyme XhoI und SacI ein 68bp großes DNA-Fragment herausgeschnitten, welches der CMV Promotor Sequenz entsprach. Der dadurch entstandene 5'-Überhang wurde mit Hilfe des Klenow Enzyms aufgefüllt. Der durch die SacI Spaltung entstandene 3'-Überhang wurde durch eine T4 Polymerasereaktion abgedaut. Dadurch entstanden am offenen Plasmid pTS07 am 5' wie am 3'-Ende glatte Enden. Der Vektor pTS07 wurde durch CIP dephosphoryliert und über ein Agarosegel aufgereinigt. Als Ligationsprodukt, mit pTS07 als Vektor und der U3 Region von SFFV als zu inserierendes Fragment entstand der Vorklon pMMH1 (Abb.10).

Im nächsten Klonierungsschritt wurde aus pHSRV2 mittels ClaI-Spaltung ein 2,2 kb großes Fragment entfernt und durch das ebenfalls mit ClaI aus pMMH1 isolierte 1,6 kb Fragment ersetzt. Der resultierende Klon pMMH2 (Ligation aus Vektor pHSRV2 und Fragment aus pMMH1) besitzt eine rekombinante 3'-LTR. Diese besteht aus den 5' gelegenen 212bp der foamyviralen U3-Region, der SFFV Promotor-Enhancer Kasette, der foamyviralen R-Region

und 7 Nukleotide der U5-Region. Durch die Deletion eines Teils der U3-Region wurde der bet-ORF um 135 Nukleotide gekürzt. In der anschließenden Sequenzierung des Konstrukts pMMH2 ergab sich eine Deletion von 6 Nukleotiden im U3-R-Übergang direkt am foamyviralen Transskriptionsstart (Abb.11).

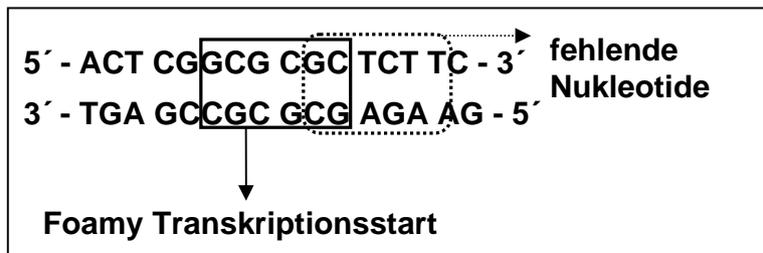


Abb. 11: Lage der Deletion in pMMH2

Bei der durchgeführten Transfektion mit dem am Transkriptionsstart deletierten Konstrukt pMMH2 ergab sich folgende Beobachtung:

Nach Transfektion mit pMMH2 war 4 Tage p.t. ein erster CPE sichtbar. Der infektiöse Überstand wurde 11 Tage p.t. geerntet und auf BHK-WT-Zellen sowie BHK/LTRlacZ - Zellen gegeben. Es konnte nach 48 h der erste CPE beobachtet werden. Beim anschließenden Anfärben der BHK/LTRlacZ - Zellen ergab sich ein Titer von $1,5 \times 10^3$ PFU pro ml. Im nächsten Schritt wurde die genomische DNA aus MMH2 infizierten BHK-Zellen extrahiert, um eine mögliche Rekombination der LTR nachzuweisen und die Deletion am Transkriptionsstart zu überprüfen. Es wurde eine analytische PCR über die 5'-LTR aus genomischer DNA infizierter Zellen mit den Primern #535 (sense) und #918 (anti-sense) durchgeführt und die entstandenen PCR Produkte im Agarosegel aufgereinigt.

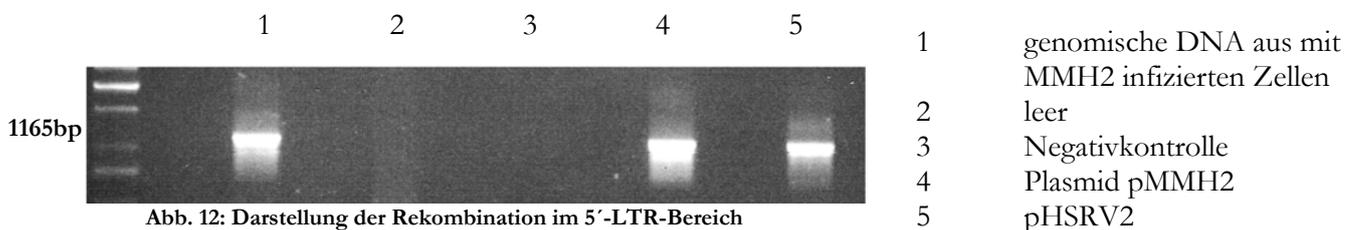
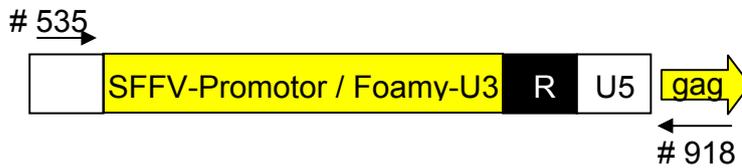


Abb. 12: Darstellung der Rekombination im 5'-LTR-Bereich

Mit diesem Ergebnis war eine Rekombination im Falle von MMH2 infizierter Zellen sehr wahrscheinlich, da Bande 1 und 4 sich in der Länge entsprechen. Im Falle der Hybrid-LTR müsste die Bande 200 bp kleiner sein.

Zur genauen Sequenzanalyse wurde das PCR Fragment über die 5'-LTR aus der genomischen DNA mit MMH2 infizierter Zellen sequenziert. Auch hier ergab sich die Sequenz einer Wildtyp-LTR. Damit war das Rekombinationsereignis zwischen hybrider 3'-LTR und wildtypischer 5'-LTR in mit pMMH2 transfizierten Zellen nachgewiesen. Da nicht auszuschließen war, dass die kleine Deletion am Transskriptionsstart, die bei der Klonierung von pMMH2 aufgetreten ist, dafür verantwortlich war, wurde pMMH2 neu hergestellt. Hierzu wurde der SFFV Promotor aus pJR4 über PCR amplifiziert mit den Primern #1132 (sense) und #1133 (anti-sense) und anschließend mit Hilfe des TA-Topo-Clon-Kits (Invitrogen) kloniert. Aus dem Topoklon wurde mit gleichen Enzymen wie im Vorkonstrukt das dem SFFV-Promotor entsprechende DNA-Fragment herausgespalten und über Ligation in den Vektor pTSO7 eingesetzt. Bei der Sequenzierung über die 3'-LTR des neuen Plasmids pMMH1 ergaben sich keine Deletionen im Transskriptionsstart und SFFV Promotor. Daraufhin wurde, wie oben beschrieben, pMMH1 in pHSRV eingesetzt und es entstand, mit diesmal fehlerfreier Sequenz, das neue Plasmid pMMH2.

4.1.2. Konstrukte mit veränderter 5' und 3'-LTR

In pMMH2 sind zwei unterschiedliche LTRs im selben Plasmid vorhanden, wobei der SFFV-Promotor in der 3'-LTR und der foamyvirale U3-Promotor in der 5'-LTR von identischen Sequenzen flankiert werden. Dadurch könnte es wieder zu einem Rekombinationsereignis zwischen den unterschiedlichen Binnensequenzen kommen mit dem Risiko, dass wieder wildtypischer Virus entsteht. Zu Vermeidung einer erneuten Rekombination wurden weitere Plasmide konstruiert, bei denen die U3-Region in der 5'-LTR durch eine CMV IE Promotor-Enhancer Kassetten ersetzt wurde. Dabei wurde pcHSRV2 (Moebes et. al., 1997) als Basis verwendet (Abb.10). Dies ist ein Konstrukt, bei dem die U3-Region der 5'-LTR durch den IE Promotor und Enhancer des CMV ersetzt ist. Der Transkriptionsstart des CMV-Promotors ist dabei identisch zum foamyviralen Transkriptionsstart in pHSRV2. Diese Promotor/Enhancer Kassetten steuert nach transienter Transfektion die Transkription der genomischen RNA und die Expression viraler Proteine. Es entstehen infektiöse Viren mit foamyviralen U3-Regionen in den 5' und 3'-LTRs. Durch die Verwendung einer hybriden 5' und 3'-LTR sollte sichergestellt werden, dass nach Transfektion von Zellen mit dem rekombinanten Plasmid nicht wieder durch Rekombinationsereignisse wildtypischer Virus entstehen kann.

Das Plasmid pMMH2 wurde mit Acc 65 I gespalten, anschließend das 5'-Überhang-Ende mit Klenow-Polymerase geglättet. Danach wurde pMMH 2 mit Kpn2I nachgespalten. Auf diese Weise wurde ein 7,0 kb großes Fragment, welches den Bereich von der 5'-LTR bis zum Beginn von env enthält, aus pMMH 2 entfernt. Aus dem Plasmid pcHSRV wurde durch MluI-Spaltung ein 6,8 kb großes Fragment isoliert, die Enden mit Klenow-Polymerase geglättet und mit Kpn2I nachgespalten. Das pcHSRV2-Fragment wurde in den Vektor pMMH 2 inseriert. Daraus resultierte das Plasmid pMMH 4.

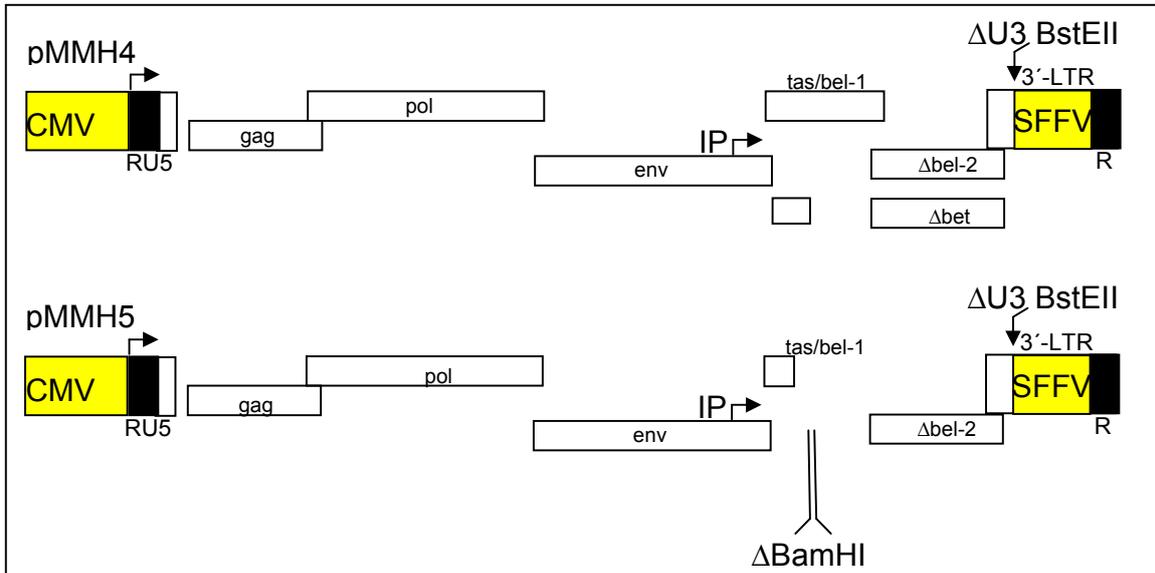


Abb. 13: Darstellung der Konstrukte pMMH4 und pMMH5

In pMMH4 wurde durch BamHI-Spaltung ein 208 bp großes Fragment im tas-Gen entfernt. Durch anschließende Religation von pMMH4 entstand pMMH5 mit deletiertem tas (Bauach et al., 1993).

Die Nomenklatur der Viren, die nach Transfektion der Plasmid-Konstrukte in Zellkulturen entstanden, entspricht der Benennung der Plasmide, ohne vorangestelltes „p“.

4.2. Replikationskompetenz und Virustiter

4.2.1. Nachweis der Replikationsfähigkeit

Die Replikationskompetenz der Foamyviren mit rekombinanter LTR wurde in unabhängigen Experimenten analysiert. Es wurden 3×10^6 293 T-Zellen mit einer Negativkontrolle und jeweils 10 µg pcHSRV2 (Positivkontrolle), pMMH4 und pMMH5 transfiziert. Nach 8h wurde zur Steigerung der Expression mit Natriumbutyrate induziert. 48h nach Transfektion erfolgte die Gewinnung von zellfreien Lysaten und die Infektion von BHK-Zellen (1. Generation) (Abb. 14).

Diese erste Generation wurde ca. 30 Tage kultiviert, bevor daraus zellfreie Lysate für die Infektion einer weiteren Generation BHK-Zellen (2. Generation) gewonnen wurde. In den BHK-Zellen erster Generation konnte vier Tage nach Infektion mit Überständen pcHSRV2-

transfizierter Zellen ein deutlich erkennbarer CPE beobachtet werden. Bei den mit MMH4-Überständen infizierten Zellen waren nach 7 Tagen der erste CPE sichtbar. Bei den mit MMH5-Überständen infizierten Zellen waren nach 9 Tagen CPE zu sehen. Wildtypischer Virus führte in infizierten Zellen also schneller zur Synzytienbildung als MMH 4 und MMH 5.

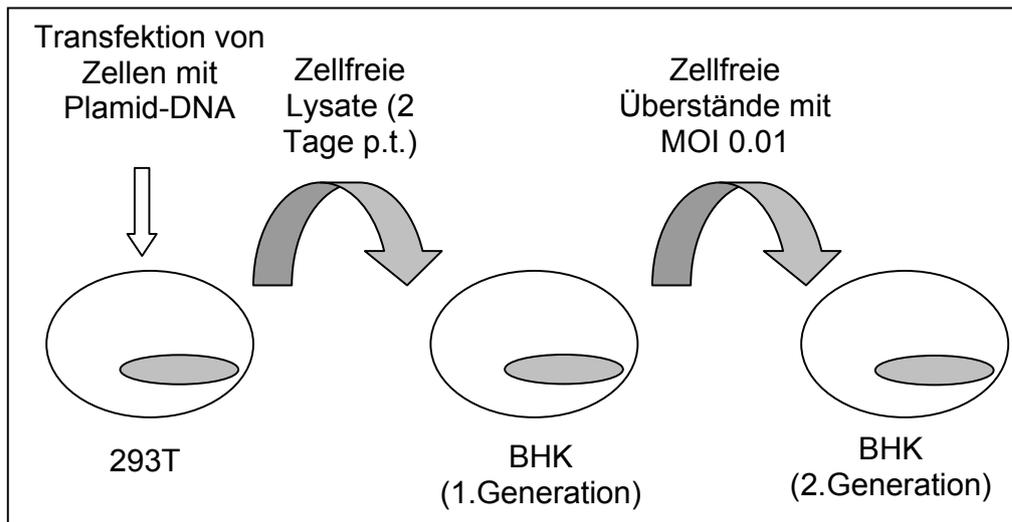
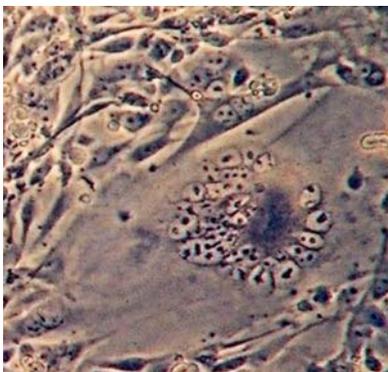
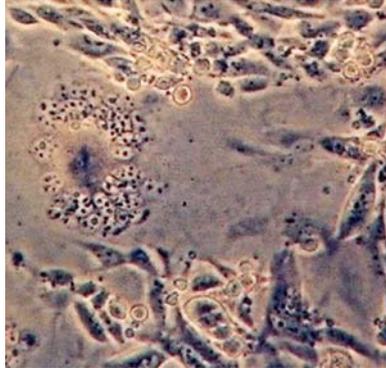


Abb. 14: Strategie der Infektionsexperimente zum Nachweis der Replikationskompetenz der Konstrukte pMMh4 und pMMH5: zwei Tage nach Transfektion der Plasmid-DNA in 293 T-Zellen wurden BHK-Zellen (1.Generation) mit zellfreien Lysaten infiziert. Zellfreie Kulturüberstände dieser Zellen wurden 20-30 Tage später zur Infektion von BHK-Zellen (2. Generation) genutzt.

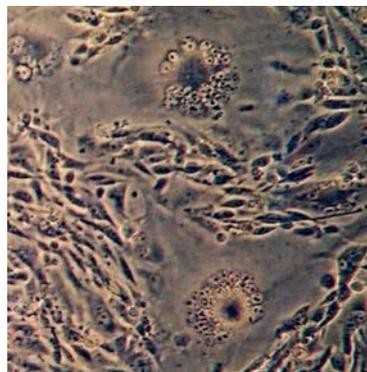
Mock



HSRV2



MMH4



MMH5

Abb. 15: 7-12 Tage nach Infektion mit pMMH4 und pMMH5 zeigten sich foamyvirus-typische CPEs in Form mehrkerniger Synzytien mit schaumiger Vakuolisierung.

Nach Infektion einer zweiten Generation BHK-Zellen waren zwischen dem 7-12.Tag in MMH4 und MMH5-infizierten Zielzellkulturen (2.Gen.) foamy-typischer CPE als Zeichen einer sich entwickelnden lytischen Infektion zu beobachten (Abb.15).

Aus diesen Zielzellen zweiter Generation wurden nach 20 bzw. 40 Tage p.i Zellysate für eine Western-Blot-Analyse gewonnen. Es konnte sowohl in HSRV2 als auch in MMH4 und MMH5 infizierten Zellen Gag-Proteine mit dem Serum α Gag (011) nachgewiesen werden (Abb.16).

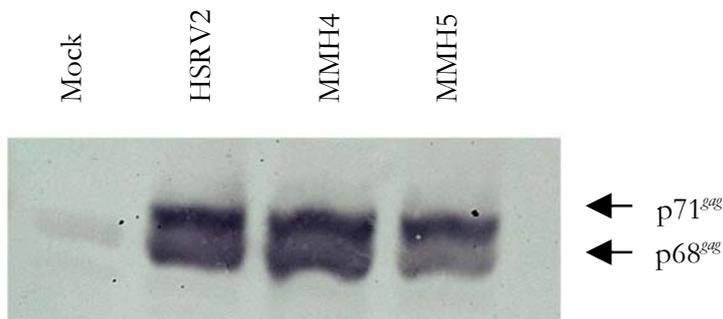


Abb. 16: Nachweis der Gag-Expression in infizierten BHK: Die Zellen wurden 20 bzw. 40 Tage nach Infektion lysiert. Als spez. Serum wurde α -Gag 011 verwendet.

Mit diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Konstrukte MMH4 und MMH5 mit rekombinanter LTR in der Lage sind, ohne *tas* zu replizieren und infektiös zu sein. Allerdings im Vergleich zu HSRV2 mit verlangsamer Replikationskinetik.

4.2.2. Bestimmung der Virustiter in zellfreien Überständen

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die beschriebene verlangsamte Replikationskinetik der Konstrukte mit hybrider LTR (MMH4 und MMH5) mit geringeren Virustitern einhergeht. Hierzu wurden die im Zellkulturüberstand freigesetzten Partikel quantifiziert und eine Viruskinetik erstellt.

Zunächst wurden die Virustiter in zellfreien Überständen mittels eines β -Galaktosidase Assays mit der Indikatorzelllinie BHK/LTR lacZ (Schmidt & Rethwilm, 1997) ermittelt. Diese Zelllinie trägt das β -Galactosidase-Gen, welches unter der Kontrolle einer foamyviralen LTR exprimiert wird. Dieser Promotor wird aktiviert, sobald *Tas* vorhanden ist, d.h., sobald die BHK/LTR lacZ Zellen mit *Tas* produzierenden Viren infiziert sind. Diese Zellen lassen sich dann fixieren und unter einer enzymatischen Reaktion blau färben. Bei den hier verwendeten Konstrukten war eine Titration nur für MMH4 möglich, aufgrund der *tas* – deletierten Variante MMH5.

Um eine Virustitration für beide Konstrukte möglich zu machen wurde ein modifizierter ICA durchgeführt. Infizierte Zellen der 2. Generation wurden über Markierung des Gag Proteins mit einem spezifischem Antiserum (α Gag 011) braunrot angefärbt. Der Virustiter wurde in PFU/ml angegeben.

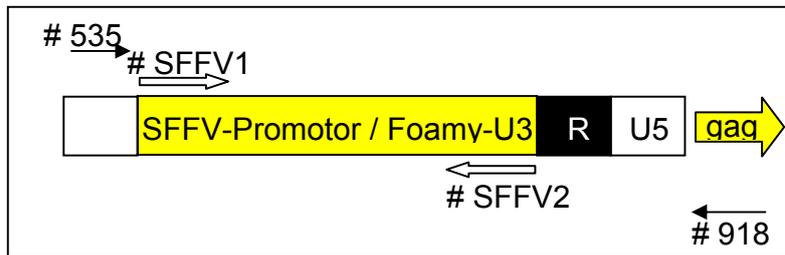
Bei den mit MMH4 und MMH5 infizierten Zellen (2. Generation) konnten 15 und 20 Tage nach Infektion Virustiter im Bereich von $1,4 \times 10^2$ bis $3,0 \times 10^3$ PFU/ml im zellfreien Überstand ausgezählt werden. Bei HSRV2 konnten bereits 2-4 Tage nach Infektion deutlich höhere Titer im Bereich bis $4,5 \times 10^5$ festgestellt werden.

4.3. Genetische Stabilität der rekombinanten Viren

4.3.1. Stabilität der rekombinanten LTR

In einem weiteren Versuch wurde die genetische Stabilität der hybriden LTR über einen längeren Zeitraum untersucht. Dazu wurde 20 und 40 Tage nach Infektion DNA aus den BHK Zellen (2. Gen.) präpariert. Diese wurde mit PCR unter Verwendung verschiedener Oligonukleotide analysiert.

Das erste Primerpaar # 535 (Beginn der U3-Region, sense) und # 918 (Gag-Leader Bereich, antisense) amplifizierte über die gesamte Promotorregion. Im Falle der hybriden LTR wurde ein Fragment von 985 bp erwartet, bei der foamyviralen LTR sollte das Amplifikat 1165 bp groß sein. Bei den Proben aus MMH4 und MMH5 infizierten Zellen zeigten sich zu beiden Zeitpunkten (20 und 40 Tage) Amplifikate in erwarteter Größe (Abb.17.1).



	Genomische DNA						Plasmid-kontrolle	
	A.bidest	Mock	MMH4/1	MMH4/2	pMMH4	pMMH5	MMH5	pHSRV2
	1	2	3	4	5	6	7	8

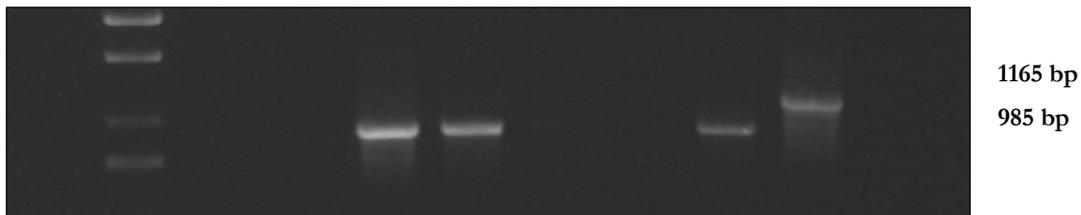


Abb. 17.1: PCR über 5'-LTR: Mit Primern #535 und #918

→ zu erwartende Banden mit den Primern #535 und #918:

-Foamy-WT: 1165 bp

-MMH4 und 5: 985 bp

Eine weitere analytische PCR wurde über den SFFV-Promotor-Bereich mit den Primern # SFFV1 (Beginn SFFV-Promotor, sense) und # SFFV2 (Übergang SFFV-Promotor/Foamy-U3, antisense) durchgeführt. Hierbei sollte sich für die hybride LTR von MMH4 und MMH5 ein Fragment von 340 bp Länge ergeben, für die foamyvirale LTR sollte sich kein Amplifikat ergeben. Dies konnte zu beiden Zeitpunkten stabil gezeigt werden (Abb.17.2).

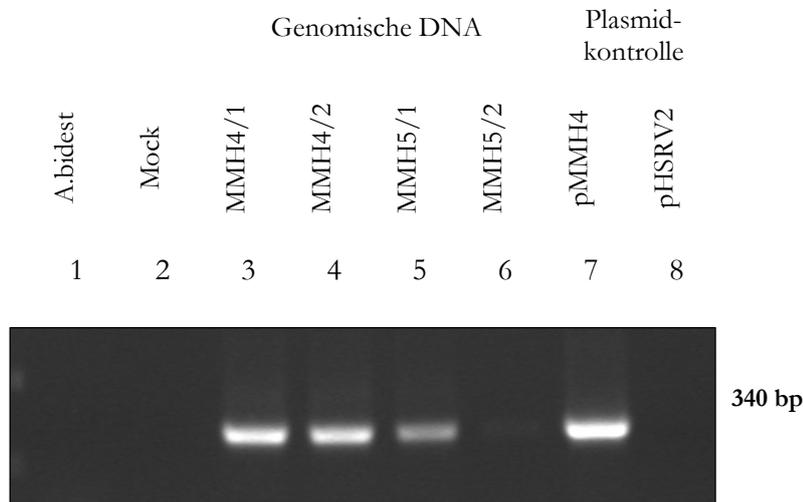


Abb. 17.2: Analytische PCR über 5'-LTR: Mit Primern #SFFV1 und #SFFV2

→ zu erwartende Banden mit den Primern #SFFV1 und #SFFV2:

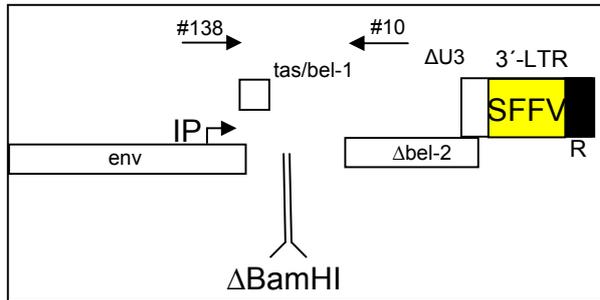
-Foamy-WT: keine

-MMH4 und 5: 340 bp

4.3.2. Stabilität des tas-Gens

MMH4 und MMH5 verhielten sich also hinsichtlich ihrer Replikationskinetik und ihres Virustiters sehr ähnlich. Es zeigte sich, dass MMH4-Viren mit Tas gegenüber MMH5-Viren ohne Tas keinen deutlichen Vorteil hinsichtlich ihres Replikationsverhaltens besaßen. Um zu untersuchen, ob bei MMH4-Viren in Langzeitkulturen Tas deletiert wurde, wurde in BHK-Zielzellen (2. Gen.) eine analytische PCR über den tas-Bereich durchgeführt. Hierzu wurde 20 und 40 Tage nach Infektion von Zielzellen (2. Generation) DNA aus den Zellkulturen präpariert und eine PCR mit den Primern #138 (sense) und # 10 (antisense) durchgeführt.

Dabei konnte für MMH4 ein 1079 bp Fragment, was dem vollständigen tas-Gen entspricht, nachgewiesen werden. Für MMH5 ergab sich ein 871 bp langes Fragment, wodurch die BamHI-Deletion bestätigt werden konnte. Allerdings zeigten sich für MMH4 für alle Ansätze in der Gelaufreinigung neben der Hauptbande von 1079 bp noch kleinere Banden, die mit Deletionen vereinbar sind (Abb.18).



Δ.bidest	Mock	MMH4/1	MMH4/2	MMH5/1	MMH5/2	pHSRV2
1	2	3	4	5	6	7

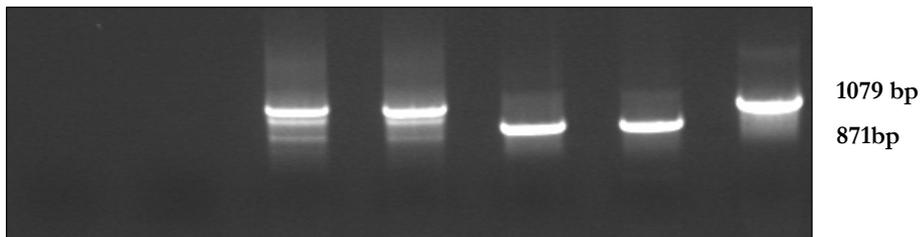
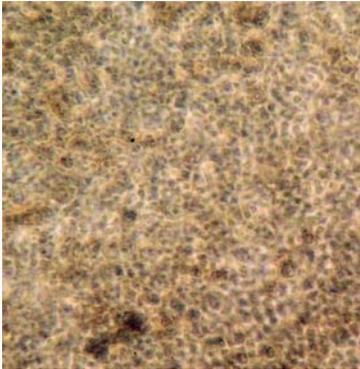


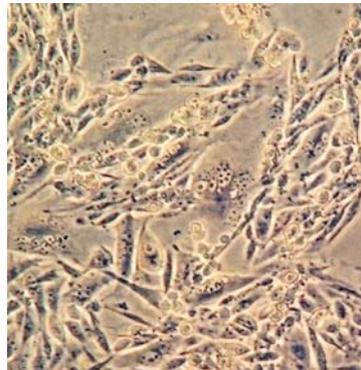
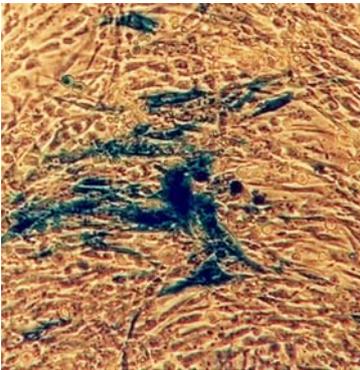
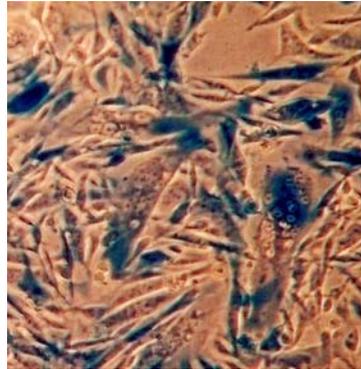
Abb. 18: PCR zur Analyse des tas-Gens: bei DNA aus MMH4infizierten Zellen zeigten sich neben der erwarteten tas-Bande Nebenbanden, die mit Deletionen zu vereinbaren sind.

Um die Funktionsfähigkeit des Tas-Proteins bei MMH4 zu untersuchen, sowie seine Dysfunktionalität bei MMH5 wurde ein Kokultivierungsassay mit der Indikatorzelllinie BHK/LTRlacZ durchgeführt. Hierzu wurden BHK-Zellen (2. Gen.) zweier unabhängiger Experimente 14 Tage nach Infektion mit BHK/-LTRlacZ-Zellen kokultiviert. Nach zwei Tage erfolgte die Fixierung und Färbung. Bei MMH4, sowie bei der HSRV2-Kontrolle konnte eine deutliche Blaufärbung der Synzytien gezeigt werden. Die bei der Kokultivierung mit MMH5-infizierten Zellen aufgetretenen Synzytien blieben, ebenso wie die Negativkontrolle, ungefärbt (Abb.19).

Mock



HSRV2



MMH4

MMH5

Abb. 19: Kokultivierungsassay mit BHK/LTRlacZ-Zellen zum Nachweis des funktionsfähigen Tas-Proteins. Bei MMH4 und HSRV2 infizierten Kulturen war CPE mit deutlicher Blaufärbung sichtbar. Die in MMH5 infizierten Kulturen aufgetretenen Synzytien blieben wie Mock-Zellen farblos, weil ohne Anwesenheit von Tas keine β -Galactosidase Expression erfolgt.

Mit diesem Experiment war die genetische Stabilität und Funktionsfähigkeit von Tas, sowie des Tas-Proteins bei MMH4 ebenso für den untersuchten Zeitraum nachgewiesen worden, wie seine Abwesenheit bei MMH5.

4.4. Vereinfachte Foamy Virus Vektoren und Verpackungskonstrukte

4.4.1. Vektorkonstruktion MMH8

Foamyviren sind zugkräftige Kandidaten in der Entwicklung von retroviralen Vektorsystemen (Mergia and Heinkelein, 2003). Solche Vektorsysteme sind vornehmlich aus zwei Komponenten zusammengesetzt:

Zum einen bestehen sie aus dem eigentlichen Vektor, mit den genetischen Elementen, die in cis erforderlich sind für RNA-Genom Dimerisation und Verpackung, reverser Transkription, Provirus-Integration und Transgen-Expression. Zum anderen beinhalten sie eine Verpackungszellinie, die das virale Gag, Pol und Env in trans bereitstellt. (Miller, 1997; 1992).

In vorausgegangenen Untersuchungen wurden zwei in cis agierende Sequenzen (CAS I und CAS II) identifiziert, die für den Transfer von FV Vektoren benötigt werden (Erlwein et al., 1998; Heinkelein et al., 1998; Wu et al., 1998). Das eine Sequenzelement ist in der 5'untranslatierten Region (UTR) lokalisiert und reicht bis in den gag Leserahmen hinein (CASI). Es ist für die Expression und Prozessierung von Gag und Pol Proteinen notwendig (Heinkelein et al., 1998; Russel et al., 2001). Die andere Sequenz liegt in der 3'pol Region (CASII). Seitdem bekannt ist, dass ein unvollständiges Gag Protein von CasI-haltigen Vektoren gebildet werden und auf diese Weise mit dem Gag aus den Verpackungskonstrukten deutlich interferieren kann, wurden schon früher Vektoren generiert, bei denen die Gag Initiation Sequenz funktionell deletiert ist (Heinkelein et al. 2002). Zusätzlich wurde der größte Teil der 3'U3 Region entfernt, so dass auch bei zufälliger Integration in der Nähe von zellulären Enhancerelementen keine Gesamtvektor RNA mehr gebildet werden kann. Um eine Titration der Vektoren zu ermöglichen, wurde der LacZ-Gen als Reporter verwendet. Bei der Konstruktion wurde folgendermaßen vorgegangen:

Der pMMH8 Vektor ist abgeleitet von pMD11 (Heinkelein et al., 2002). Zunächst wurde pMD11 mit NruI und Esp3I gespalten und die Enden mittels Klenowreaktion zu glatten Enden aufgefüllt. Die daraus entstandene und zur weiteren Klonierung verwendete Sequenz enthielt den immediate-early gene Enhancer/Promotor von humanen CMV, die 5'PFV Sequenz bis Nukleotid 645 (CAS I) und die 3'pol Sequenz von Nukleotid 3871 bis 5885 (CASII). Dieser Abschnitt wurde zunächst in den mit Sma I (schneidet blunt end) geöffneten

Klonierungsvektor pBluescript SK+ inseriert, wodurch das Zwischenkonstrukt pMMH6 erhalten wurde.

Im nächsten Klonierungsschritt wurde aus dem Vektor pMD11 eine 3187 nt große Sequenz durch NruI und AscI-Spaltung herausgetrennt und anschließend mit Klenowenzym zu glatten Enden aufgefüllt. Diese Sequenz enthielt das lacZ Markergen mit nuklearem Lokalisations-Signal (nlsLacZ) (Riviere, I. et al.1995) und wurde in durch BamHI-Spaltung und Klenow-Behandlung geöffnete pMMH6 3' zur CASII inseriert, so dass pMMH7 erhalten wurde. Im letzten Klonierungsschritt wurde das 4386 bp große Acc65I/BglII Fragment des Plasmids pMMH4 mit der hybriden 3'-LTR mit dem XhoI/NotI gespaltenen Fragment von pMMH7 ligiert, nachdem durch Klenow-Enzym stumpfe Enden erzeugt worden waren. Das so etablierte Konstrukt pMMH8 ist in Abb. 20 dargestellt.

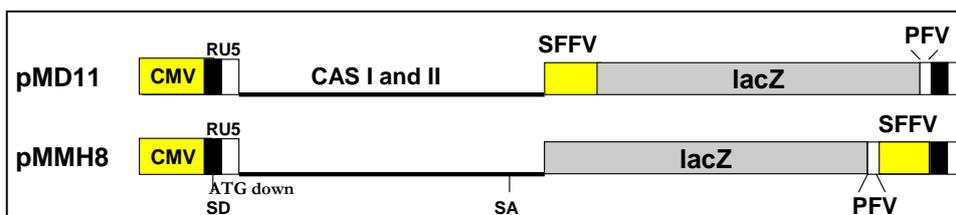


Abb. 20: Schematische Darstellung pMMH8 und pMD11: die Region die in der 3'LTR als PFV gekennzeichnet ist, weist den verbleibenden Teil der PFV U3- Region der LTR auf, die für die Integration notwendig ist. SD und SA sind die Haupt 5'Spleißdonor und Spleißakzeptoren.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten die Markergenexpression in Vektoren zu steuern, so kann man das Markergen durch den viralen LTR-Promotor oder durch alternatives Spleißen exprimieren lassen. Im Falle von pMMH8 funktioniert die lacZ-Expression unter der Kontrolle des SFFV-Promotors 5' nach Spleißen der mRNA. Da pMMH8 einen tas-unabhängigen LTR-Promotor besitzt ist ein interner Promotor für die Expression des Reportergens nicht notwendig. Da MMH8 über keinen internen Promotor verfügt, um die Expression des Transgens zu treiben, ist seine Herstellung wahrscheinlich auf ein gespleißtes Transkript angewiesen. Dieses wird von der konstitutiv aktiven hybriden 5' -LTR, die nach reverser Transkription generiert wird, exprimiert. Ein solches Transkript würde dem Hauptspleißdonor in der FV R- Region und den am 3'-Ende des pol-Gens gelegenen Spleißakzeptor der env mRNA benutzen

4.4.2. Analyse Vektor Transfer Effizienz

Im nächsten Schritt wurde untersucht, wie effizient der neu entwickelte Vektor pMMH8 im Vergleich zu pMD11 in der Lage ist, das LacZ Markergen zu übertragen. Dazu wurden 293 T Zellen, die 24h zuvor mit einer Dichte von $1,8 \times 10^6$ in 6-cm-Durchmesser Schalen eingesät worden waren, mit den Vektoren pMD 11 und pMMH8 zusammen mit gleichen Mengen an pCgagpol und pCenv Verpackungskonstrukten mit Lipofectamin transfiziert. 72h nach Transfektion wurde der Überstand abgenommen und durch ein $0,45\mu\text{M}$ Filter passagiert. Mit 3ml des zellfreien Überstand wurden anschließend HT1080 Zielzellen transduziert. Diese waren einen Tag vor Transduktion mit einer Dichte von 10^4 pro Well in 12 Well-Platten gesät worden.

Bei insgesamt vier Experimenten unter Verwendung von jeweils zwei verschiedenen DNA-Präparationen ergab sich eine durchschnittliche Titerreduktion von pMMH8 gegenüber pMD11 auf 10%.

5. Diskussion

5.1. Foamyvirale Vektoren

Retrovirale Vektoren sind wegen der stabilen Integration ihres Genoms in das Wirtsgenom von besonderem Interesse für gentherapeutische Ansätze. Die Foamyviren sind eine Subfamilie innerhalb der Retroviren. Sie folgen einem einzigartigen Replikationszyklus, der sich deutlich von dem der Orthoretroviren unterscheidet und viele Analogien zu den Hepadnaviren zeigt. FV-Vektoren nehmen aufgrund einiger Besonderheiten einen wichtigen Platz innerhalb der retroviralen Vektoren ein.

Die Infektion von natürlichen Wirten durch FV gilt als apathogen (Falcone et al., 2003). Dennoch konnte FV DNA in jedem Organ von infizierten Tieren nachgewiesen werden. Der virale Rezeptor scheint ubiquitär vorhanden zu sein, was auf ein weites Gewebespektrum der FV hinweist (Lindemann et al., 2000). Ihre offensichtliche Apathogenität sowie ihre Fähigkeit, aufgrund eines ubiquitären Rezeptors nahezu jeden Zelltyp zu transduzieren, machen foamyvirale Vektoren zu einem vielversprechenden Werkzeug in der Gentherapie.

Anders als Lentiviren erfordern FV, genau wie MLV (Murines Leukämie Virus), für die Integration und Replikation teilungsfähige Zellen (Trobridge et al., 2004; Bieniasz et al., 2005), was gerade für den Einsatz von retroviralen Vektoren in der Krebstherapie bedeutsam ist.

Der Mensch gehört nicht zum natürlichen Wirtsspektrum, deshalb ist eine präexistente Immunität unwahrscheinlich (Heneine et al., 2003). Menschen können aber leicht und dauerhaft durch FV infiziert werden. Die Infektion ist nicht übertragbar auf andere Menschen, auch nicht durch Geschlechtsverkehr, und es konnte keine Krankheit mit diesen sehr seltenen Tier-zu-Mensch Übertragungen in Verbindung gebracht werden. Bei ihrem Einsatz als retrovirale Vektoren erlaubt die Größe des FV-Genoms (13 kb), dass sie im Vergleich zu anderen Retroviren längere therapeutische Gene verpacken können (bis zu 9 kb) (Trobridge et al., 2002).

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei retroviralen Vektoren ist ihr Integrationsort. Ein Vorteil integrierender Vektoren besteht darin, dass sie über einen langen Zeitraum das integrierte Transgen exprimieren können, wie insbesondere bei transduzierten proliferierenden hämatopoetischen Zellen nachgewiesen wurde. Allerdings bringt die Integration in das Genom der Wirtszellen auch die Gefahr der sogenannten Insertionsmutagenese mit sich, da hierbei unter Umständen zelluläre Onkogene aktiviert werden können. Dass diese Gefahr nicht nur theoretisch besteht, zeigt die Erfahrung bei Patienten mit X-SCID (x-linked severe congenital immunodeficiency), die nach erfolgreicher Gentherapie der zugrunde liegenden Krankheit eine akute Leukämie entwickelten, da die retroviralen Vektoren nahe des LMO2 Protoonkogens integrierten und dieses Gen somit konstitutiv aktivierten (Check, 2002; Hacein-Bey-Abina et al., 2003).

Eine weitere Gefahr ist der Funktionsverlust zellulärer Gene durch Integration der retroviralen Vektoren in funktionelle Regionen der Gentranskription.

Anders als HIV zeigt FV keine Präferenz, in funktionelle Gene zu integrieren. Die Affinität, in der Nähe von Transkriptionsstartpunkten und CpG Inseln der Promotorregionen zu integrieren, scheint geringer als bei MLV (Trobridge et al., 2006). Erfolgt allerdings eine Integration von FV in einer dieser Regionen, dann eher in der Nähe von Transkriptionsstartpunkten. Damit ähnelt es in dieser Hinsicht MLV mehr als HIV (Nowrouzi, 2006), was prinzipiell die Möglichkeit einer Insertionsmutagenese nicht ausschließt.

Insgesamt scheint aber in allen bislang getesteten Systemen das Risiko von Mutationen, Aktivierung und Disruption zellulärer Gene für FV im Vergleich zu HIV und MLV dennoch geringer zu sein. Eine definitive Schlussfolgerung über das Risiko der Insertionsmutagenese durch retrovirale Vektoren, die aus HIV, MLV oder FV hervorgegangen sind, kann aber derzeit noch nicht gemacht werden. Dieses Risiko ist allerdings nicht nur durch das Integrationsprofil des jeweiligen Vektors, sondern vor allem durch die Anzahl transduzierter Zellen, die in den Patienten reinfundiert werden, definiert (von Kalle et al., 2004).

Hier bieten FV-Vektoren einen großen Vorteil, da sich CD34-positive hämatopoetische Stammzellen mit einem einfachen Übernachtprotokoll (Josephson et al., 2002; Leurs et al.,

2003) transduzieren lassen. Hierdurch wird eine signifikante Reduktion der Anzahl genkorrigierter Zellen, die in den Patienten reinfundiert werden, erreicht.

Außerdem spielen die Natur des Transgens und die Art der Krankheit, die geheilt werden soll, eine große Rolle im klinischen Ergebnis der Gentherapie (Baum et al, 2003; von Kalle et al., 2004).

Es sind unterschiedliche Strategien entwickelt worden, wie zum Beispiel der Gebrauch von sich selbst inaktivierenden (SIN) MLV-Vektoren oder Insulatoren, um das Risiko einer Protoonkogenaktivierung zu reduzieren (Baum & Fehse, 2003; von Kalle et al., 2004). Aus FV entwickelte Vektoren sind auch in dieser Hinsicht von Vorteil, da sie natürlicherweise aufgrund des Fehlens des viralen Tas Transaktivators, welcher eine Voraussetzung für die Transkription der LTR ist, den Charakter von SIN-Vektoren besitzen (Rethwilm, 1995).

Grundsätzlich können aus FV zwei Vektorsysteme hergestellt werden:

A Replizierende Foamyvirus- Vektoren

B Nicht replizierende Foamyvirus Vektoren

5.1.1. Replizierende Foamyvirus- Vektoren

Replizierende Vektorsysteme enthalten alle genetischen Informationen, die für die Replikation notwendig sind. Die Bereiche, die nicht für die Replikation essentiell sind, können durch therapeutische Gene ersetzt werden.

Die replizierenden Vektorsysteme können sich im Wirtsorganismus vermehren und so die Problematik bei der Herstellung eines hohen Vektortiters vermindern. Allerdings stellen sie so auch ein höheres Risiko durch die in vivo Vermehrung und Infektion weiterer Zielzellen in der klinischen Anwendung dar. Ein weiterer Nachteil der replizierenden Vektoren ist ihr in Relation zu den nicht replizierenden Vektoren größeres Genom und damit eine geringere Kapazität für therapeutische Gene.

Es gibt verschiedene Anwendungsbereiche, in denen replikationskompetente FV-Vektoren von Interesse sein könnten und getestet wurden. Hierbei ist der Einsatz der FV aufgrund ihrer Apathogenität bei der Entwicklung von effektiven rekombinanten Impfstoffen von großem Interesse. So konnte beispielsweise für einen replikationskompetenten feline FV-Vektor die

Applizierbarkeit, Effizienz und Sicherheit beim Transfer von Impfantigenen in Katzen gezeigt werden (Schwantes et al., 2003).

Weiterhin laufen Untersuchungen, in denen replizierende Vektorsysteme für den Transport und die Expression von Suizidgenen im Rahmen der Krebstherapie dienen sollen (Nestler et al., 1997). Von K. Culver und Z. Ram konnte 1992 im Rattengliommodell gezeigt werden, dass durch in vivo Gentransfer des Herpes-Simplex-Thymidin-Kinase-Gens mittels retroviraler Vektoren nach systemischer Applikation von Ganciclovir zunächst eine Umwandlung in Ganciclovirmonophosphat und über die zelluläre Kinase eine Umwandlung in das toxische Ganciclovirtriphosphat erfolgt (Culver and Ram, 1992). Nach systemischer Gabe dieser Substanz wird nur in den infizierten Zellen die toxische Substanz gebildet. Die Hoffnung ist, dass diese zielgerichtete Chemotherapie mit weniger Nebenwirkungen und größerem Erfolg als konventionelle Therapien behaftet ist.

Derzeit wird ein replikationskompetentes FV-Vektorsystem, zur gezielten Bekämpfung des Glioblastoms im Tiermodell getestet (Heinkelein et al., 2005). Da Tumorzellen meist sich rasch teilende Zellen sind, können sie effizient mit FV-Vektoren infiziert werden. Allerdings zeigten erste Ergebnisse im Mausmodell mit HSV-TK kodierenden FV- Vektoren, dass die Verabreichung der entsprechenden Vorläufersubstanz nach erfolgreicher Replikation des Vektors keinen Vorteil in der Verhinderung des Tumorwachstums ergab, wenn sie mit alleiniger Vektorreplikation als Kontrolle verglichen wurde. Die nur mit Vektor behandelten Tiere zeigten ein deutlich längeres Überleben als unbehandelte Tiere. Dies lässt sich vermutlich durch eine onkolytische Aktivität des Vektors erklären. Allerdings wurde auch gezeigt, dass die Vektorreplikation nicht auf den Tumor begrenzt war. Der Vektor war und blieb in verschiedenen Geweben bis hin zu den Gonaden dauerhaft nachweisbar.

Zusammenfassend gibt es damit doch verschiedene problematische Aspekte bei der Anwendung replikationsfähiger FV-Vektoren. Auch wenn es bisher keine Hinweise darauf gibt, dass FV selbst pathogen werden und sich von Mensch zu Mensch ausbreiten können, kann das Risiko einer Adaption des Virus und eine dadurch entstehende neue humane retrovirale Infektion nicht ausgeschlossen werden. Auch die AIDS- Pandemie entstand durch spezieübergreifende Übertragung eines affenspezifischen Retrovirus auf den Menschen (Wolfe, 2004). Die Spätfolgen einer FV-Infektion sind in den bislang vorliegenden vergleichbar

kurzen Studien nicht abschätzbar, AIDS nach HIV-Infektion entsteht ebenfalls erst nach vielen Jahren. Gerade beim Einsatz der FV-Vektoren bei immunsupprimierten Patienten (z.B. Krebspatienten) ist das Risiko einer eventuellen Pathogenität schlecht abschätzbar. Unter diesem Aspekt ist die Gefahr einer Rekombination der replikationsfähigen Vektoren mit endogenen Retroviren, aus denen das menschliche Genom zu acht Prozent besteht, relevant, da durch einen derartigen Prozess replikationsfähige Viren mit möglicherweise völlig veränderten Eigenschaften entstehen können. Allerdings ist die Rekombinationswahrscheinlichkeit für FV eher gering, da keine Homologien zwischen endogenen RV und FV bestehen.

Diese Probleme berücksichtigend, sollten replikationsfähige Vektoren nicht verwendet werden. Klinische Phase I-Studien bei infausten Krankheiten wie beispielsweise dem Glioblastom (Mortalität fast 100%) erfordern die strengsten Kontrollen des Infektionsschutzes.

5.1.2. Konstruktion von FV mit konstitutiv aktivem Promoter

Ziel im ersten Teil der Arbeit war die Konstruktion eines replikationsfähigen Virus mit einem tas unabhängigen FV Genom und konstitutiv aktivem U3 Promotor.

Die Konversion eines komplexen Retrovirus in ein einfaches Retrovirus konnte bereits für verschiedene komplexe Retroviren gezeigt werden (Boris-Lawrie et al., 1997; Boris-Lawrie and Temin, 1995). So wurde für die genetisch vereinfachten BLV (bovine leukemia virus)-Varianten gegenüber dem Wildtyp-BLV nur ein geringfügig reduziertes Replikationsverhalten gezeigt (Boris-Lawrie et al., 1997). Die Konstrukte dieser Untersuchung verwendeten eine hybride LTR, unter Einsatz des Promotorelements des SNV (spleen necrosis virus), eines einfachen Retrovirus.

Auch für FV konnte in einer vorangegangenen Arbeit (Schenk et al., 1999) die Replikationsfähigkeit mit einem konstitutiven aktiven U3 Promotor und deletierten akzessorischen Genen gezeigt werden, indem die tas-abhängige U3-Region durch einen CMV Promotor ersetzt wurde. Allerdings war die Replikationskinetik dieser Viren deutlich verlangsamt und der Virustiter im zellfreien Medium vermindert.

In der Annahme, dass das Promotorelement eines einfachen Retrovirus aufgrund seiner phylogenetischen Nähe der genetischen Umgebung eines vereinfachten FV besser angepasst sein könnte, wurde in diesen Arbeiten der Promotor aus dem SFFV (spleen focus forming virus) verwendet. Dies ist ein bei Säugetieren vorkommendes einfaches Retrovirus aus der Gruppe der Gammaretroviren.

Für den Einsatz der SFFV-LTR sprach auch, dass dieser Promotor eine effiziente Transkription nicht nur in Fibroblasten sondern auch in vielen Zelltypen der myeloischen Reihe ergab (Baum et al., 1995). Eine hohe Aktivität der SFFV-Promotoren zeigte sich dabei nicht nur in multipotenten Stammzellen, sondern auch in bereits differenzierten Zellen der myeloischen Reihe. Hingegen ist die Aktivität von CMV-Promotoren in hämatopoetischen Zellen signifikant vermindert (Yam et al., 2002). Auch im Vergleich mit MLV Vektoren, den derzeit am häufigsten eingesetzten retroviralen Vektoren, ergibt die SFFV-LTR in hämatopoetischen Zellen eine höhere Expression (Longmore et al., 1993). Diese Ergebnisse waren ein weiterer Aspekt, der mit dem Einsatz des SFFV-Promotors bei der Konstruktion eines foamyviralen Virus mit konstitutiv aktivem Promotor geprüft werden sollte, da insbesondere der Einsatz gentherapeutischer Vektoren auf Stammzebene von großem Interesse ist und breite klinische Anwendung finden könnte.

Dabei ist zu beachten, dass es zwei Zielelemente von ψ gibt. ψ wirkt wenigstens teilweise indem es sich unmittelbar an die Sequenzen stromaufwärts des FV Transkriptionsstarts bindet (He et al., 1996; Zou & Luciw, 1996). Zusätzlich zum konventionellen U3 LTR Promoter haben FV jedoch einen zweiten internen Promoter (IP), der sich im Bereich des *env* Gens stromaufwärts der akzessorischen Gene befindet (Löchelt et al., 1993). Die Aktivität beider Promotoren ist von ψ abhängig. Für die Replikation werden beide Promotoren benötigt (Löchelt et al., 1995; Rethwilm 1995).

In der U3-Region vom PFV gibt es verschiedene Bereiche, die für die Replikation und Integration des Virus notwendig sind und bei der Konstruktion des konstitutiv aktiven Promotors erhalten bleiben mussten. Das 5'-terminale Ende der U3 Region ist gleichzeitig der 5'-Terminus der linearen viralen DNA. Bei anderen Retroviren schneidet die virale Integrase zunächst die äußeren Enden der LTR, die aus einem AT-Motiv bestehen. Je ein Dinukleotid wird entfernt. Durch Umlagerung der Phosphodiesterbindung wird die zelluläre DNA

geöffnet, wobei 5'-Überhänge von 4-6 Basenpaaren entstehen. Gleichzeitig erfolgt die Verknüpfung der 5'-terminalen Basen der Wirtszell-DNA mit den 3'-terminalen Basen des Provirusgenoms. Die Ergänzung der Lücken und der Abbau der 5'-Überhänge erfolgt durch zelluläre Reparatursysteme. So werden die flankierenden zellulären Sequenzen verdoppelt, während von der linearen Virus-DNA die jeweils endständigen zwei Basenpaare verloren gehen (Goff, 2001). Die Integration der proviralen DNA scheint bei FV hingegen mit einer asymmetrischen Prozessierung der viralen DNA einherzugehen. Während am 3'-Ende das terminale CAAT-Motiv bei Integration zu CA reduziert wird, bleiben die Nukleotide am 5'-Terminus (TGTG) vollständig erhalten. Vier Basenpaare werden verdoppelt (Enssle, 1999). Für andere Retroviren wurde beschrieben, dass spezifische Sequenzen von ca. 8 bis 12 bp Länge am 5'-Ende benötigt werden, um eine Integration möglich zu machen (Panganiban & Temin, 1983). Durch in vitro Studien konnte gezeigt werden, dass für PFV mindestens 5bp (ACAAT) am 3'-Ende benötigt werden, damit die Integrase das Substrat am 3'-Terminus der U5 Region effizient schneidet (Pahl & Flügel, 1993). Weiterhin sind drei Bereiche in der U3 Region identifiziert worden (Erlwein & Rethwilm, 1993), die für die Transaktivierung des LTR Promotors verantwortlich sind (TRE). Bei der Konstruktion der hybriden LTR wurde der tas-abhängige Promotor mit allen TREs entfernt, aber die für die Integration wichtigen Sequenzen am 5'-Terminus der U3-Region erhalten. Dafür musste der Bereich zwischen der BstE II Schnittstelle (entspricht Position – 571 relativ zum Transkriptionsstart) und dem Beginn der R-Region, der dem Transkriptionsstartpunkt entspricht, deletiert werden. Dieser Bereich wurde durch das SFFV promotor/enhancer Element ersetzt. Die entstandenen Endklone (MMH 2/4/5/8), die prinzipiell auf dem Vektor pHRSV2 basieren, beinhalten im 5' gelegenen CMV-Promotor den gleichen Transkriptionsstart wie der wildtypische FV-LTR-Promotor (Moebes et al, 1993). Nach der bislang vorliegenden Datenlage war zu erwarten, dass die so entstandene hybride LTR zur Integration fähig sein und eine von tas unabhängige Promotoraktivität besitzen sollte.

5.1.3. Rekombination zwischen unterschiedlichen LTRs

Betrachtet man den Replikationszyklus der Retroviren, so zeigt sich, dass die retroviralen RNA-Transkripte, ausgehend vom integrierten Provirus oder einem infektiösen DNA-Plasmid – Klon, mit der R-Region beginnen. Während der reversen Transkription werden dann zwei

vollständige LTRs generiert. Dabei ist die am 3'-Ende der RNA gelegene U3-Region auch die Vorlage für die Synthese der proviralen U3-Region der 5'-LTR.

Da in dieser Arbeit die LTR des Foamyvirus durch einen konstitutiv aktiven Promotor des SFF-Virus ersetzt wurde, sollte die 3'-LTR des infektiösen DNA-Klons so modifiziert werden, dass nach Transfektion in Zellkulturen rekombinante Viren mit hybrider 5'-LTR entstehen.

Das auf pHSRV2 basierende Plasmid pMMH2 besitzt eine hybride 3'-LTR und eine foamyvirale 5'-LTR. Nach Transfektion mit pMMH2 waren bereits nach kurzer Zeit Synzytien sichtbar. Eine analytische PCR und Sequenzierung über die LTR ergab die Wildtyp-LTR, die vermutlich durch Rekombinationsereignisse zustande gekommen war. Diese Rekombination könnte dadurch zustande gekommen sein, dass die Bereiche die beide Promotoren flankieren, identisch sind.

Um ein solches Rekombinationsereignis zu vermeiden, wurden anschließend die Plasmide pMMH 4 und 5 so konstruiert, dass die Transkription des Plasmids nicht von einer foamyviralen LTR gesteuert wurde, sondern stattdessen von einem CMV IE Enhancer/Promotor Element. Diesem Promotorelement fehlen die stromaufwärts gelegenen 5' terminalen Sequenzen der U3-Region von PFV.

Auch in früheren Arbeiten mit foamyviralen Vektoren kam es zur Rekombination zwischen den U3-Regionen unterschiedlicher 5' und 3'-LTR (Schmidt et al., 1997).

So konstruierten Bastone et al. 2004 einen Self inactivating Vektor (SIN- Vektor) in dem der foamyvirale Promotor in der 3'-LTR ausgeschaltet wurde. Durch Rekombination mit dem 5' gelegenen CMV-Promotor entstanden replikationskompetente Viren. Interessant ist dies vor allem deshalb, weil bei dieser Rekombination nicht auf beiden Seiten des Promotors identische Sequenzen waren, sondern nur am 3'-Ende. Die 5'-Enden waren nicht homolog. Es reichten anscheinend schon kurze Homologien in der Basenfolge der 5'-Sequenzen um zusammen mit den homologen 3'-Sequenzen eine Rekombination zu ermöglichen. Dies steht im Kontrast zu den Daten dieser Arbeit. Es kam in dieser Arbeit, wie auch in der Arbeit von Schenk et al. (Schenk et al., 1999) zu keinen nachweisbaren Rekombinationen, wenn nur die 3'-Enden homolog waren.

5.2. Virustiter und Replikationskinetik

5.2.1. Replikationsverhalten der MMH-Konstrukte im Vergleich zu TS-Konstrukten

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch Einführung eines konstitutiv aktiven SFFV-Promotors an Stelle des tas-abhängigen U3 Promotors ein replikationskompetentes trans-Aktivator- negatives FV generiert wurde. Die rekombinanten Viren waren auch nach Deletion des sonst essentiellen tas-Gens replikationsfähig. Im Vergleich zu Wildtyp-FV zeigten die MMH-Konstrukte jedoch eine verzögerte Replikationskinetik und einen erniedrigten Virustiter.

In einer Vorarbeit wurde wegen der normalerweise starken Expression der CMV-Promotor als Teil der hybriden LTR gewählt (Schenk et al., 1999). Diese Konstrukte (TS-Konstrukte) waren zwar replikationsfähig, jedoch auch mit deutlich reduziertem Replikationsverhalten. Der CMV-Promotor entstammt einem Herpesvirus und ist entwicklungsgeschichtlich weit von den Retroviren entfernt. Als Weiterführung dieser Arbeit sollte hier die hybride LTR mit dem Promotorbereich der U3-Region eines einfachen Retrovirus verwendet werden. Dies beruht auf der Vorstellung, dass aufgrund der phylogenetischen Nähe das SFFV-Virus der genetischen Umgebung von FV besser angepasst wäre. So zeigten beispielsweise die genetisch vereinfachten BLV-Varianten, mit hybrider LTR eines einfachen Retrovirus gegenüber dem Wildtyp-BLV nur ein geringfügig reduziertes Replikationsverhalten (Boris-Lawrie et al., 1995; 1997).

Bei den TS-Konstrukten war in Zielzellkulturen erst 20-30 Tage nach Infektion foamyvirus-typischer CPE als Zeichen der sich langsam entwickelnden lytischen Infektion sichtbar. Demgegenüber zeigten die MMH 4 und 5-Konstrukte dieser Arbeit bereits zwischen dem 7. – 12. Tag sichtbare Synzytien. In den Wildtyp-FV Kontrollen waren bereits zwischen dem 2. – 4. Tag deutliche Zeichen einer lytischen Infektion zu beobachten.

Der Virustiter in zellfreien Kulturüberstand bei den MMH-Konstrukten zeigte gegenüber den TS-Konstrukten keinen signifikanten Unterschied. 25 Tage nach Infektion (2. Gen.) war er bei beiden Konstrukten zwischen $1,5 \times 10^2$ bis $3,0 \times 10^3$ PFU/ml und damit um 3 log-Stufen niedriger als bei den mit HSRV2 infizierten Kulturen.

Zusammenfassend zeigte sich bei den MMH-Konstrukte eine etwas bessere Replikationskinetik gegenüber den TS-Konstrukten, wenn diese auch gegenüber dem Wildtyp noch deutlich verzögert war. Allerdings zeigte sich kein Unterschied im extrazellulären Titer der MMH-Konstrukte gegenüber den TS-Varianten.

Für Foamyviren ist die Integration in das Wirtszellgenom essentieller Bestandteil des Replikationszyklus (Brown, 1997; Enssle et al., 1999). Für das SFFV ist die Integration ebenfalls notwendig. Die Transkription der integrierten Provirus-DNA wird bei den vereinfachten Foamyviren mit hybrider LTR durch das SFFV-Promotor-Element gesteuert.

Das Cytomegalievirus integriert aber normalerweise nicht in das Genom der Wirtszelle. Eine Reduzierung der CMV-Promotor-gesteuerten Transkription von Reportergenen nach Integration in das zelluläre Genom wurde beschrieben (Foecking & Hofstetter, 1986). Eine Verringerung der Aktivität des CMV-Promotors nach Integration in das Wirtszellgenom könnte auch für das reduzierte Replikationsverhalten der vereinfachten Foamyviren mit CMV-LTR gegenüber den vereinfachten Foamyviren mit SFFV-LTR mitverantwortlich sein.

5.2.2. Promotor-Interferenz

Ein weiterer Grund für das verbesserte Replikationsverhalten von MMH4+5 gegenüber vereinfachten Foamyviren mit CMV-LTR könnte das geringere Risiko einer Promotorinterferenz sein.

Bei der Promotorinterferenz kommt es in retroviralen Vektoren, die ein Gen unter der Kontrolle eines internen Promotors exprimieren, zur reduzierten Genexpression, da sich der LTR-Promotor und der interne Promotor wechselseitig negativ beeinflussen (Emerman & Temin, 1986).

Bei foamyviralen Vektoren wurde nachgewiesen, dass die Einführung eines SV40-Promotors zusätzlich zu den LTR-Promotoren und dem IP verschiedene hemmende Wirkungen zeigte. Einerseits wurde unter der Kontrolle des heterologen Promotors ein Reportergen weniger stark exprimiert als unter der Kontrolle des foamyviralen IP. Andererseits zeigten diese Viren zusätzlich ein reduziertes Replikationsverhalten. Es ist daher von einer negativen Beeinflussung der foamyviralen Promotoren durch die Fremdpromotoren auszugehen.

Auch im Falle der pMMH-Konstrukte ist eine sich negativ auswirkende Interferenz zwischen dem IP und der hybriden LTR oder zwischen den Promotoren beider hybrider LTRs in dem Provirus nicht auszuschließen. Allerdings liegen die zwei unterschiedlichen LTR-Promotoren relativ weit voneinander entfernt, was die Promotorinterferenz unwahrscheinlich macht. Außerdem sind die Endkonstrukte MMH 5 und 8 tas-unabhängig, womit die Funktion des IP entfällt und die Wahrscheinlichkeit einer Interferenz weiter minimiert wird.

Bei den Konstrukten mit dem CMV-Promotor liegen zwei identische Kopien in ungewöhnlicher räumlicher Nähe in einem hybriden retroviralen Integrat, dies könnte sich deshalb hemmend auf die Aktivität des für die Replikation wichtigen 5'-gelegenen Elementes auswirken.

5.2.3. Nicht- replizierendes Vektorsystem

Nicht- replizierenden Vektorsystemen fehlen die in trans benötigten Gene, die für die Replikation wichtig sind. Die Vektorpartikel sind zwar in der Lage Zellen zu infizieren und ihr therapeutisches Gen einzubringen, können aber keine Synthese von neuen Partikeln bewirken. Nicht-replizierende Vektorsysteme sollten möglichst wenige virale Sequenzen beinhalten und eine möglichst hohe Transduktionsrate erzielen.

Für die Produktion nicht- replizierender Vektorsysteme werden zwei Komponenten benötigt: der replikationsdefiziente Vektor und die Verpackungskonstrukte. Die Konstruktion des Vektors basiert auf einem retroviralen Genom, von dem alle viralen Gene entfernt wurden, und nur diejenigen Elemente erhalten bleiben, die in cis benötigt werden, um das Verpacken, die reverse Transkription und die Integration in das Genom der Zielzellen zu ermöglichen. Die für die Replikation benötigten viralen Funktionen werden durch die Verpackungskonstrukte in trans bereitgestellt.

Mögliche Folgen, die im Abschnitt zu den replizierenden foamyviralen Vektoren (5.1.1) eingehend beschrieben wurden, können von chronischer Virämie bis hin zur Insertionsmutagenese mit weiteren unvorhersehbaren Folgen wie zum Beispiel Gen-Knockout oder Bildung maligner Tumoren reichen.

Aus diesen Gründen müssen die replikationsdefizienten Vektoren und ihre Verpackungszelllinien soweit optimiert werden, dass diese Risiken weitestmöglich verringert werden.

Die ungeplante Produktion replikationsfähiger Retroviren stellt eines der größten Sicherheitsprobleme hinsichtlich des Einsatzes retroviraler Vektoren dar. Wie bereits unter 5.1.2. „Rekombination unterschiedlicher LTRs“ näher erörtert wurde, können Rekombinationen bereits zwischen sehr kurzen Regionen der Homologie (7-11bp) auftreten (Chong et al., 1998). So konnte beim Einsatz von FV SIN-Vektoren, die aufgrund einer deletierten 3'-LTR nicht replikationsfähig waren, durch sehr kurze Regionen der Homologie eine Rekombination mit dem 5' gelegenen CMV Promotor entstehen, was zu einem replikationsfähigen Virus führte (Bastone et al., 2004).

Deshalb werden Verpackungszelllinien genutzt, bei denen die Helfergene gagpol und env als separate transkriptionelle Einheiten eingesetzt werden. Auf diese Weise müssten mindestens vier Rekombinationsereignisse auftreten, um ein replikationsfähiges Virus zu bilden. Da Rekombinationen mit dem Vektor in homologen Regionen auftreten, kann dieses Risiko weiter reduziert werden, in dem man Vektoren einsetzt, die nur minimale Homologien mit den Helferplasmiden besitzen.

Bei dem replikationsdefizienten Vektor pMMH8 sollten diese Sicherheitsaspekte berücksichtigt und optimiert werden. So wurde der größte Teil der foamyviralen 3'U3 Region entfernt und durch die Promotorregion des SFFV ersetzt. Weiter beinhaltet pMMH8 zwei in cis-agierende Sequenzen (CAS I und CAS II), die in vorausgegangenen Untersuchungen identifiziert wurden und für den Transfer von FV Vektoren benötigt werden (Erlwein et al., 1998; Heinkelein et al., 1998; Wu et al., 1998). Das eine Sequenzelement ist in der 5'untranslatierten Region (UTR) lokalisiert, reicht bis in den gag Leserahmen hinein (CAS I) und ist essentiell für die Expression und Prozessierung von Gag und Pol Proteinen (Heinkelein et al., 1998; Russel et al., 2001). Die andere Sequenz liegt in der 3'pol Region (CAS II). Seitdem bekannt ist, dass ein unkomplettes gag Protein von CasI-haltigen Vektoren gebildet werden kann und auf diese Weise mit dem gag aus den Verpackungskonstrukten deutlich interferieren kann, wurden schon früher Vektoren generiert, bei denen die Gag-Initiationssequenz funktionell inaktiviert wurde (Heinkelein et al., 2002).

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Genexpression in Vektoren zu steuern, zum Beispiel durch einen zusätzlichen internen Promotor. Im Falle von pMMH8 funktioniert die lacZ-Expression vermutlich unter der Kontrolle des SFFV-Promotors 5' durch alternatives Spleißen der mRNA. Da pMMH8 einen konstitutiv aktiven LTR-Promotor besitzt, ist ein interner Promotor für die Expression des Reportergens nicht notwendig.

Durch alternatives Spleißen ist zur Genexpression kein zusätzlicher interner Promotor notwendig, was das Risiko Promotorinterferenz verringern sollte und das Verpackungslimit auf bis zu 9kb steigern sollte. Es zeigte sich allerdings, dass die Modifikationen am Vektor negative Auswirkungen auf die Transduktionsraten gegenüber dem Ausgangsvektor hatten. Mit pMMH8 konnten nur 10% der Transduktionseffizienz gegenüber bereits bestehenden PFV-Vektorsystemen erreicht werden.

Zusammenfassend muss gesagt werden, dass auch wenn die nicht-replikationsfähigen Vektorsysteme immer weiter verbessert werden und die Wahrscheinlichkeit des ungeplanten Auftretens replikationsfähiger Viren weiter verringert wird, es derzeit nicht möglich scheint, ein solches Ereignis vollkommen auszuschließen.

5.3. Hypothese

Sowohl bei den in dieser Arbeit konstruierten replikationsfähigen, wie auch replikationsdefizienten Vektorsystemen zeigten sich durch die Verwendung eines konstitutiv aktiven U3 Promotors und die Einführung einer hybriden LTR Funktionseinbußen gegenüber den auf Wildtyp-FV beruhenden Systemen.

Die Genexpression vom Wildtyp-FV ist sehr komplex, so muss zunächst unter der Kontrolle eines internen Promotors der Transaktivator Tas synthetisiert werden. Über die Aktivierung des IP wird seine eigene Expression soweit gesteigert, bis ausreichend Tas vorhanden ist. Tas aktiviert den für tas niedrig affineren LTR-Promotor der U3 Region und sorgt damit für die Expression der übrigen viralen Gene (Rethwilm, 1995; Linial, 1999). (Siehe Abb.6) Dieses aufeinander abgestimmte System von zwei Promotoren und einem transkriptionellen Transaktivator, das sich im Laufe der Evolution des Virus entwickelt hat, garantiert eine optimale Virusreplikation.

Das Verändern dieses geradezu genialen koordinierten Zusammenspiels durch Einführung einer hybriden LTR mit konstitutiv aktivem Promotor scheint das langsam gewachsene Gleichgewicht im System der RNA-Transkription derart zu stören, dass eine Replikation bzw. Transduktion zwar noch möglich ist, allerdings nur noch in suboptimaler Art und Weise.

Das Promotorelement eines einfachen Retrovirus, wie es in dieser Arbeit verwendet wurde, scheint aufgrund seiner phylogenetischen Nähe, der genetischen Umgebung eines vereinfachten PFV besser angepasst zu sein, als das einem Herpesvirus entstammende Promotorelement, was sich in einer besseren Replikationsfähigkeit unserer Konstrukte zeigte. Insgesamt waren die pMMH- Konstrukte den foamyviralen Promotoren in ihrer Replikationsfähigkeit, Transduktionseffizienz und Höhe des Virustiters deutlich unterlegen.

Es wird sich in Zukunft zeigen, ob man durch geänderte Strategien, z. B. durch Einsatz wirtszelleigener Promotoren, aus dem beschriebenen Dilemma herauskommt.

5.4. Zusammenfassung

Die Foamyviren nehmen aufgrund verschiedener Charakteristika ihrer Replikationsstrategie eine Sonderstellung innerhalb der Retroviren ein. Aufgrund dieser Besonderheiten, wie zum Beispiel der viralen Genexpression oder dem Zeitpunkt ihrer reversen Transkription im Replikationszyklus, werden sie einer eigenen Subfamilie zugeordnet, den Spumaviren. Funktionell zählen sie zu den komplexen Retroviren, da sie neben dem minimalen Gensatz der einfachen Retroviren Gag, Pol und Env noch zwei weitere akzessorische Leserahmen aufweisen.

Einer der Leserahmen kodiert für Tas, einem transkriptionellen Transaktivator, der für die Replikation der Foamyviren notwendig ist.

In dieser Arbeit sollte ein infektiöser Klon, mit konstitutiv aktivem Promotor durch genetische Vereinfachung des prototypischen Foamy Virus (PFV) konstruiert werden. Dieser Klon trägt den Promotor eines einfachen Retrovirus, des Spleen Focus Forming Virus, im Kontext einer hybriden LTR. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Konstrukt, sowie ein weiteres mit funktionaler Deletion des Tas-Gens, in transfizierten Zellkulturen zur Freisetzung genetisch vereinfachter, infektiöser Viren führte. Weiterhin konnte ihre Replikationskompetenz und

genetische Stabilität nachgewiesen werden. Diese Vektorkonstrukte hatten im Vergleich zu genetisch vereinfachten Vorkonstrukten mit konstitutiv aktiven immediate early gene (IE) Promotor und Enhancer des Cytomegalievirus (CMV) eine verbesserte Replikationskinetik. Gegenüber den Wildtypvarianten zeigten die rekombinanten Viren mit SFFV-Promotor jedoch eine verzögerte Replikationskinetik, sowie erniedrigte Virustiter im zellfreien Kulturüberstand.

In der Weiterführung der Arbeit sollte die genetische Vereinfachung mit SFFV-Promotor an einem bestehenden replikationsinkompetenten PFV-Vektorsystem angewendet werden. Die dadurch erreichte Verringerung der foamyviralen Sequenzen und daraus entstehende Reduktion homologer Sequenzen sollte einen weiteren Sicherheitsaspekt darstellen. Durch die Vektorkonstruktion ergab sich weiterhin eine Erhöhung des Verpackungslimits auf fast 9Kb.

Mit dem neuen Vektorkonstrukt konnte jedoch gegenüber den Vorkonstrukten nur eine geringe Transduktionseffizienz erreicht werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass eine genetische Vereinfachung von PFV und seine Replikation mit einem heterologen Promotor in einer hybriden LTR möglich ist. Damit ist eine Voraussetzung für die Konstruktion PFV-basierter Vektoren zur Gentherapie unter Verwendung gewebespezifischer Promotoren gegeben.

6. Literatur

Achong, B. G., P. W. Mansell, et al. (1971). "An unusual virus in cultures from a human nasopharyngeal carcinoma." J Natl Cancer Inst **46**(2): 299-307.

Anderson WF (1998) Human gene therapy. Nature 392: 25-30.

Baldwin, D. N. and M. L. Linial (1998). "The roles of Pol and Env in the assembly pathway of human foamy virus." J Virol **72**(5): 3658-65.

Baltimore, D. (1970). "RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses." Nature 226(5252): 1209-11.

Baum, C. and B. Fehse (2003). "Mutagenesis by retroviral transgene insertion: risk assessment and potential alternatives." Curr Opin Mol Ther **5**(5): 458-62.

Bieniasz, P. D., R. A. Weiss, et al. (1995). "Cell cycle dependence of foamy retrovirus infection." J Virol **69**(11): 7295-9.

Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513.

Bock, M., M. Heinkelein, et al. (1998). "Cells expressing the human foamy virus (HFV) accessory Bet protein are resistant to productive HFV superinfection." Virology **250**(1): 194-204.

Boeke, J. D. and S. E. Devine (1998). "Yeast retrotransposons: finding a nice quiet neighborhood." Cell **93**(7): 1087-9.

Boeke, J. D. and J. P. Stoye (1997). Retrotransposons, endogenous retroviruses, and the evolution of retroelements. Retroviruses. J. M. Coffin, S. H. Hughes and H. E. Varmus. Plainview, N. Y., Cold Spring Harbour Laboratory Press: 343-435.

Boneva, R. S., A. J. Grindon, et al. (2002). "Simian foamy virus infection in a blood donor." Transfusion **42**(7): 886-91.

Boris-Lawrie, K., V. Altanerova, et al. (1997). "In vivo study of genetically simplified bovine leukemia virus derivatives that lack tax and rex." J Virol **71**(2): 1514-20.

Boris-Lawrie, K. and H. M. Temin (1995). "Genetically simpler bovine leukemia virus derivatives can replicate independently of Tax and Rex." J Virol **69**(3): 1920-4.

- Bukrinsky, M. I., N. Sharova, et al. (1992). "Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(14): 6580-4.
- Bushman, F. D. (1994). "Tethering human immunodeficiency virus 1 integrase to a DNA site directs integration to nearby sequences." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(20): 9233-7.
- Bushman, F. D. (2003). "Targeting survival: integration site selection by retroviruses and LTR-retrotransposons." Cell **115**(2): 135-8.
- Callahan, M. E., W. M. Switzer, et al. (1999). "Persistent zoonotic infection of a human with simian foamy virus in the absence of an intact orf-2 accessory gene." J Virol **73**(11): 9619-24.
- Carteau, S., C. Hoffmann, et al. (1998). "Chromosome structure and human immunodeficiency virus type 1 cDNA integration: centromeric alphoid repeats are a disfavored target." J Virol **72**(5): 4005-14.
- Cartellieri, M., O. Herchenroder, et al. (2005). "N-terminal Gag domain required for foamy virus particle assembly and export." J Virol **79**(19): 12464-76.
- Check, E. (2002). "Gene therapy: shining hopes dented -but not dashed." Nature **420**(6917): 735.
- Chong, H., W. Starkey, et al. (1998). "A replication-competent retrovirus arising from a split-function packaging cell line was generated by recombination events between the vector, one of the packaging constructs, and endogenous retroviral sequences." J Virol **72**(4): 2663-70.
- Cullen, B. R. (1991). "Human immunodeficiency virus as a prototypic complex retrovirus." J Virol **65**(3): 1053-6.
- Culver, K. W., Z. Ram, et al. (1992). "In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors." Science **256**(5063): 1550-2.
- Dagert, M. and S. D. Ehrlich (1979). "Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells." Gene **6**(1): 23.
- Dalglish, A. G., P. C. Beverley, et al. (1984). "The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus." Nature **312**(5996): 763-7.
- Donahue, R. E., S. W. Kessler, et al. (1992). "Helper virus induced T cell lymphoma in nonhuman primates after retroviral mediated gene transfer." J Exp Med **176**(4): 1125-35.
- Enders, J. F. and T. C. Peebles (1954). "Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles." Proc Soc Exp Biol Med **86**(2): 277-86.
- Enssle, J., I. Jordan, et al. (1996). "Foamy virus reverse transcriptase is expressed independently from the Gag protein." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(9): 4137-41.

- Enssle, J., N. Fischer, et al. (1997). "Carboxy-terminal cleavage of the human foamy virus Gag precursor molecule is an essential step in the viral life cycle." J Virol **71**(10): 7312-7.
- Epstein, M. A. (2004). "Simian retroviral infections in human beings." The Lancet (Correspondence) **364**: 137-140.
- Erlwein, O., P. D. Bieniasz, et al. (1998). "Sequences in pol are required for transfer of human foamy virus-based vectors." J Virol **72**(7): 5510-6.
- Erlwein, O. and A. Rethwilm (1993). "BEL-1 transactivator responsive sequences in the long terminal repeat of human foamy virus." Virology **196**(1): 256-68.
- Falcone, V., M. Schweizer, et al. (2003). "Replication of primate foamy viruses in natural and experimental hosts." Curr Top Microbiol Immunol **277**: 161-80.
- Fauci, A. S., G. Pantaleo, et al. (1996). "Immunopathogenic mechanisms of HIV infection." Ann Intern Med **124**(7): 654-63.
- Federico, M. (1999). "Lentiviruses as gene delivery vectors." Curr Opin Biotechnol **10**(5): 448-53.
- Fischer, N., M. Heinkelein, et al. (1998). "Foamy virus particle formation." J Virol **72**(2): 1610-5.
- Flügel, R. M., A. Rethwilm, et al. (1987). "Nucleotide sequence analysis of the env gene and its flanking regions of the human spumaretrovirus reveals two novel genes." EMBO J **6**(7): 2077-84.
- Gallay, P., V. Stitt, et al. (1996). "Role of the karyopherin pathway in human immunodeficiency virus type 1 nuclear import." J Virol **70**(2): 1027-32.
- Giron, M. L., F. Rozain, et al. (1993). "Human foamy virus polypeptides: identification of env and bel gene products." J Virol **67**(6): 3596-600.
- Giron, M. L., S. Colas, et al. (1997). "Expression and maturation of human foamy virus Gag precursor polypeptides." J Virol **71**(2): 1635-9.
- Goepfert, P. A., G. Wang, et al. (1995). "Identification of an ER retrieval signal in a retroviral glycoprotein." Cell **82**(4): 543-4.
- Goepfert, P. A., K. L. Shaw, et al. (1997). "A sorting motif localizes the foamy virus glycoprotein to the endoplasmic reticulum." J Virol **71**(1): 778-84.
- Goff, S.P (2001).Retroviridae: The retrovirus and their replication. Fields Virology. D. M. Knipe and P. M. Howley. Philadelphia, Lippincott: 1871-1939.

- Goulaouic, H. and S. A. Chow (1996). "Directed integration of viral DNA mediated by fusion proteins consisting of human immunodeficiency virus type 1 integrase and Escherichia coli LexA protein." *J Virol* **70**(1): 37-46.
- Gunji, Y., T. Ochiai, et al. (2000). "Gene therapy for cancer." *Surg Today* **30**(11): 967-73.
- Hacein-Bey-Abina, S., C. Von Kalle, et al. (2003). "LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1." *Science* **302**(5644): 415-9.
- Hacein-Bey-Abina, S., C. von Kalle, et al. (2003). "A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency." *N Engl J Med* **348**(3): 255-6.
- Hacein-Bey-Abina, S., G. de Saint Basile, et al. (2003). "Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency." *Methods Mol Biol* **215**: 247-59.
- Hatton, T., S. Zhou, et al. (1992). "RNA-and DNA-binding activities in hepatitis B virus capsid protein: a model for their roles in viral replication." *J Virol* **66**(9): 5232-41.
- He, F., W. S. Blair, et al. (1996). "The human foamy virus Bel-1 transcription factor is a sequence-specific DNA binding protein." *J Virol* **70**(6): 3902-8.
- Heinkelein, M., U. Hoffmann, et al. (2005). "Experimental therapy of allogeneic solid tumors induced in athymic mice with suicide gene-transducing replication-competent foamy virus vectors." *Cancer Gene Ther* **12**(12): 947-53.
- Heinkelein, M., C. Leurs, et al. (2002). "Pregenomic RNA is required for efficient incorporation of pol polyprotein into foamy virus capsids." *J Virol* **76**(19): 10069-73.
- Heinkelein, M., M. Schmidt, et al. (1998). "Characterization of a cis-acting sequence in the Pol region required to transfer human foamy virus vectors." *J Virol* **72**(8): 6307-14.
- Heinkelein, M., M. Dressler, et al. (2002). "Improved primate foamy virus vectors and packaging constructs." *J Virol* **76**(8): 3774.
- Heneine, W., M. Schweizer, et al. (2003). "Human infection with foamy viruses." *Curr Top Microbiol Immunol* **277**: 181-96.
- Heneine, W., W. M. Switzer, et al. (1998). "Identification of a human population infected with simian foamy viruses." *Nat Med* **4**(4): 403-7.
- Herchenröder, O., R. Renne, et al. (1994). "Isolation, cloning, and sequencing of simian foamy viruses from chimpanzees (SFVcpz): high homology to human foamy virus (HFV)." *Virology* **201**(2): 187-99.

- Hill, C. L., P. D. Bieniasz, et al. (1999). "Properties of human foamy virus relevant to its development as a vector for gene therapy." J Gen Virol **80**: 2003-9.
- Hirata, R. K., A. D. Miller, et al. (1996). "Transduction of hematopoietic cells by foamy virus vectors." Blood **88**(9): 3654-61.
- Hunter, E. (1997). Viral Entry and receptors. Retroviruses. J. M. Coffin, S. H. Hughes and H. E. Varmus. Plainview, N. Y., Cold Spring Harbour Laboratory Press:71-119.
- Imrich, H., M. Heinkelein, et al. (2000). "Primate foamy virus Pol proteins are imported into the nucleus." J Gen Virol **81**(Pt 12): 2941-7.
- Jordan, I., J. Enssle, et al. (1996). "Expression of human foamy virus reverse transcriptase involves a spliced pol mRNA." Virology **224**(1): 314-9.
- Josephson, N. C., G. Vassilopoulos, et al. (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**(12): 8295-300.
- Juretzek, T., T. Holm, et al. (2004). "Foamy virus integration." J Virol **78**(5): 2472-77.
- von Kalle, C., B. Fehse, et al. (2004). "Stem cell clonality and genotoxicity in hematopoietic cells: gene activation side effects should be avoidable." Semin Hematol **41**(4): 303-18.
- Kang, Y. and B. R. Cullen (1998). "Derivation and functional characterization of a consensus DNA binding sequence for the tas transcriptional activator of simian foamy virus type 1." J Virol **72**(7): 5502-9.
- Keller, A., K. M. Partin, et al. (1991). "Characterization of the transcriptional trans activator of human foamy retrovirus." J Virol **65**(5): 2589.
- Kay MA, Glorioso JC, Naldini L (2001). "Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics," Nature Med.**7**:33-40.
- Klatzmann, D., E. Champagne, et al. (1984). "T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV." Nature **312**(5996): 767-8.
- Klimatcheva, E., J. D. Rosenblatt, et al. (1999). "Lentiviral vectors and gene therapy." Front Biosci **4**: D481.
- Kupiec, J. J., J. Tobaly-Tapiero, et al. (1988). "Evidence for a gapped linear duplex DNA intermediate in the replicative cycle of human and simian spumaviruses." Nucleic Acids Res **16**(20): 9557-65.
- Laufs, S., B. Gentner, et al. (2003). "Retroviral vector integration occurs in preferred genomic targets of human bone marrow-repopulating cells." Blood **101**(6): 2191-8.

- Lecellier, C. H. and A. Saïb (2000). "Foamy viruses: between retroviruses and pararetroviruses." Virology **271**(1): 1-8.
- Lewis, P. F. and M. Emerman (1994). "Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus." J Virol **68**(1): 510.
- Leurs, C., M. Jansen, et al. (2003). "Comparison of three retroviral vector systems for transduction of nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice repopulating human CD34+ cord blood cells." Hum Gene Ther **14**(6): 509-19.
- Levy, D. N., L. S. Fernandes, et al. (1993). "Induction of cell differentiation by human immunodeficiency virus 1 vpr." Cell **72**(4): 541-50.
- Li, Z., J. Dullmann, et al. (2002). "Murine leukemia induced by retroviral gene marking." Science **296**(5567): 497.
- Lindemann, D. and A. Rethwilm (1998). "Characterization of a human foamy virus 170-kilodalton Env-Bet fusion protein generated by alternative splicing." J Virol **72**(5): 4088-94.
- Lindemann, D. and P. A. Goepfert (2003). "The foamy virus envelope glycoproteins." Curr Top Microbiol Immunol **277**: 111-29.
- Lindemann, D., M. Bock, et al. (1997). "Efficient pseudotyping of murine leukemia virus particles with chimeric human foamy virus envelope proteins." J Virol **71**(6): 4815-20.
- Lindemann, D., M. Heinkelein, et al. (2000). Aspects of foamy virus vectors: host range and replication-competent vectors. Viral vectors basic science and gene therapy. A. Cid-Arregui and A. García-Carrancá. Natick, M.A., Eaton Publishing: 515-22.
- Lindemann, D., T. Pietschmann, et al. (2001). "A particle-associated glycoprotein signal peptide essential for virus maturation and infectivity." J Virol **75**(13): 5762-71.
- Linial, M. (2000). "Why aren't foamy viruses pathogenic?" Trends Microbiol **8**(6): 284-9.
- Linial, M. L. (1999). "Foamy viruses are unconventional retroviruses." J Virol **73**(3): 1747-55.
- Löchelt, M. and R. M. Flügel (1995). The molecular biology of human and primate spuma retroviruses. "The Retroviridae". J. A. Levy. New York, Plenum Press. **4**: 239-292.
- Lochelt, M., F. Romen, et al. (2005). "The antiretroviral activity of APOBEC3 is inhibited by the foamy virus accessory Bet protein." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(22): 7982-7.
- Löchelt, M., R. M. Flügel, et al. (1994). "The human foamy virus internal promoter directs the expression of the functional Bel 1 transactivator and Bet protein early after infection." J Virol **68**(2): 638-45.

- Lochelt, M., W. Muranyi, et al. (1993). "Human foamy virus genome possesses an internal, Bel-1-dependent and functional promoter." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(15): 7317-21.
- Longmore, G. D., P. Pharr, et al. (1993). "Both megakaryocytopoiesis and erythropoiesis are induced in mice infected with a retrovirus expressing an oncogenic erythropoietin receptor." Blood **82**(8): 2386.
- Meiering, C. D. and M. L. Linial (2001). "Historical perspective of foamy virus epidemiology and infection." Clin Microbiol Rev **14**(1): 165-76.
- Mergia, A. and M. Heinkelein (2003). "Foamy virus vectors." Curr Top Microbiol Immunol **277**: 131-59.
- Mergia, A. and P. A. Luciw (1991). "Replication and regulation of primate foamy viruses." Virology **184**(2): 475-82.
- Mergia, A., N. J. Leung, et al. (1996). "Cell tropism of the simian foamy virus type 1 (SFV-1)." J Med Primatol **25**(1): 2-7.
- Mikovits, J. A., P. M. Hoffman, et al. (1996). "In vitro infection of primary and retrovirus-infected human leukocytes by human foamy virus." J Virol **70**(5): 2774-80.
- Miller, A. D., D. G. Miller, et al. (1993). "Use of retroviral vectors for gene transfer and expression." Methods Enzymol **217**: 581-99.
- Miller, A. D. (1992). "Retroviral vectors." Curr Top Microbiol Immunol **158**: 1-24.
- Miller, D. G., M. A. Adam, et al. (1990). "Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection." Mol Cell Biol **10**(8): 4239-42.
- Mitchell, R. S., B. F. Beitzel, et al. (2004). "Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences." PLoS Biol **2**(8): E234.
- Modrow S.& Falke D. (1997). Molekulare Virologie.1. Aufl. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
- Moebes, A., J. Enssle, et al. (1997). "Human foamy virus reverse transcription that occurs late in the viral replication cycle." J Virol **71**(10): 7305-11.
- Mountain, A. (2000). "Gene therapy: the first decade." Trends Biotechnol **18**(3): 119-28.
- Mullis, K., F. Faloona, et al. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51** Pt 1: 263.

- Naldini, L., U. Blomer, et al. (1996). "In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector." Science **272**(5259): 263-7.
- Nassal, M. (1992). "Conserved cysteines of the hepatitis B virus core protein are not required for assembly of replication-competent core particles nor for their envelopment." Virology **190**(1): 499-505.
- Nassal, M. and H. Schaller (1993). "Hepatitis B virus replication." Trends Microbiol **1**(6): 221-8.
- Nestler, U., M. Heinkelein, et al. (1997). "Foamy virus vectors for suicide gene therapy." Gene Ther **4**(11): 1270-7.
- Netzer, K. O., A. Rethwilm, et al. (1990). "Identification of the major immunogenic structural proteins of human foamy virus." J Gen Virol **71**: 1237-41.
- Nowrouzi, A., M. Dittrich, et al. (2006). "Genome-wide mapping of foamy virus vector integrations into a human cell line." J Gen Virol **87**(Pt 5): 1339-47.
- Pahl, A. and R. M. Flügel (1993). "Endonucleolytic cleavages and DNA-joining activities of the integration protein of human foamy virus." J Virol **67**(9): 5426-34.
- Panet, A. and H. Cedar (1977). "Selective degradation of integrated murine leukemia proviral DNA by deoxyribonucleases." Cell **11**(4): 933-40.
- Pfrepper, K. I., M. Löchelt, et al. (1999). "Molecular characterization of proteolytic processing of the Gag proteins of human spumavirus." J Virol **73**(9): 7907-11.
- Pietschmann, T., M. Heinkelein, et al. (1999). "Foamy virus capsids require the cognate envelope protein for particle export." J Virol **73**(4): 2613-21.
- Rethwilm, A. (1995). "Regulation of foamy virus gene expression." Curr Top Microbiol Immunol **193**: 1-24.
- Rethwilm, A. (2003). Foamy Viruses. Berlin, Springer.
- Rethwilm, A., O. Erlwein, et al. (1991). "The transcriptional transactivator of human foamy virus maps to the bel 1 genomic region." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(3): 941-5.
- Riviere, I., K. Brose, et al. (1995). "Effects of retroviral vector design on expression of human adenosine deaminase in murine bone marrow transplant recipients engrafted with genetically modified cells." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(15): 6733-7.
- Robbins P, Tahara H, Ghivizzani S (1998) Viral vectors for gene therapy. Trends Biotechnol **16**:35-40.

- Rohdewohld, H., H. Weiher, et al. (1987). "Retrovirus integration and chromatin structure: Moloney murine leukemia proviral integration sites map near DNase I-hypersensitive sites." J Virol **61**(2): 336-43.
- Roe, T., T. C. Reynolds, et al. (1993). "Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis." Embo J **12**(5): 2099-108.
- Romano, G. (2005). "Current development of lentiviral-mediated gene transfer." Drug News Perspect **18**(2): 128-34.
- Roy, J., W. Rudolph, et al. (2003). "Feline foamy virus genome and replication strategy." J Virol **77**(21): 11324-31.
- Russell, R. A., Y. Zeng, et al. (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**(15): 6817-24.
- Russell, D. W. and A. D. Miller (1996). "Foamy virus vectors." J Virol **70**(1): 217-22.
- Rustigian, R., P. Johnston, et al. (1955). "Infection of monkey kidney tissue cultures with virus-like agents." Proc Soc Exp Biol Med **88**(1): 8-16.
- Saib, A., J. Peries, et al. (1995). "Recent insights into the biology of the human foamy virus." Trends Microbiol **3**(5): 173-8.
- Saib, A., M. Canivet, et al. (1994). "Human foamy virus infection in myasthenia gravis." Lancet **343**(8898): 666.
- Sandmeyer, S. (2003). "Integration by design." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(10): 5586-8.
- Sandstrom, P. A., K. O. Phan, et al. (2000). "Simian foamy virus infection among zoo keepers." Lancet **355**(9203): 551-2.
- Schagger, H. and G. von Jagow (1987). "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa." Anal Biochem **166**(2): 368-79.
- Schenk, T., J. Enssle, et al. (1999). "Replication of a foamy virus mutant with a constitutively active U3 promoter and deleted accessory genes." J Gen Virol **80**: 1591-8.
- Schliephake, A. W. and A. Rethwilm (1994). "Nuclear localization of foamy virus Gag precursor protein." J Virol **68**(8): 4946-54.
- Schmidt, M., O. Herchenröder, et al. (1997). "Long terminal repeat U3 length polymorphism of human foamy virus." Virology **230**(2): 167-78.
- Schwantes, A., U. Truyen, et al. (2003). "Application of chimeric feline foamy virus-based retroviral vectors for the induction of antiviral immunity in cats." J Virol **77**(14): 7830-42.

- Schweizer, M., R. Turek, et al. (1995). "Markers of foamy virus infections in monkeys, apes, and accidentally infected humans: appropriate testing fails to confirm suspected foamy virus prevalence in humans." *AIDS Res Hum Retroviruses* **11**(1): 161-70.
- Schweizer, M., V. Falcone, et al. (1997). "Simian foamy virus isolated from an accidentally infected human individual." *J Virol* **71**(6): 4821-4.
- Schroder, A. R., Shinn P., et al. (2002). "HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots." *Cell* **110**(4): 521-9.
- Shaw, K. L., D. Lindemann, et al. (2003). "Foamy virus envelope glycoprotein is sufficient for particle budding and release." *J Virol* **77**(4): 2338-48.
- Smith A,(1999) Gene therapy-where are we? *Lancet* 354:1-4.
- Springett, G. M., R. C. Moen, et al. (1989). "Infection efficiency of T lymphocytes with amphotropic retroviral vectors is cell cycle dependent." *J Virol* **63**(9): 3865-9.
- Telesnitsky,A. & Goff S.P (1997). Reverse Transcriptase and the generation of retroviral DNA. *Retroviruses*. J. M. Coffin, S. H. Hughes and H. E. Varmus. Plainview, N. Y., Cold Spring Harbour Laboratory Press:121-160.
- Temin, H. M. and S. Mizutani (1970). "RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus." *Nature* 226(5252): 1211-3.
- Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(9): 4350.
- Trobridge, G. D., D. G. Miller, et al. (2006). "Foamy virus vector integration sites in normal human cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(5): 1498-503.
- Trobridge, G. and D. W. Russell (2004). "Cell cycle requirements for transduction by foamy virus vectors compared to those of oncovirus and lentivirus vectors." *J Virol* **78**(5): 2327-35.
- Trobridge, G., N. Josephson, et al. (2002). "Improved foamy virus vectors with minimal viral sequences." *Mol Ther* **6**(3): 321-8.
- Varmus, H. (1988). "Retroviruses." *Science* **240**(4858): 1427-35.
- Vijaya, S., D. L. Steffen, et al. (1986). "Acceptor sites for retroviral integrations map near DNase I-hypersensitive sites in chromatin." *J Virol* **60**(2): 683-92.
- Vogt V.M (1997).Retroviral virions and genomes. *Retroviruses*. J. M. Coffin, S. H. Hughes and H. E. Varmus. Plainview, N. Y., Cold Spring Harbour Laboratory Press: 1-25.

- Weiss, R. A. (1988). "Foamy retroviruses. A virus in search of a disease." Nature **333**(6173): 497-8.
- Westarp, M. E., H. H. Kornhuber, et al. (1992). "Human spuma retrovirus antibodies in amyotrophic lateral sclerosis." Neur Psych Br Res **1**: 1-4.
- Wick, G., K. Trieb, et al. (1993). "Possible role of human foamy virus in Graves' disease." Intervirology **35**(1-4): 101-7.
- Wilk, T., V. Geiselhart, et al. (2001). "Specific interaction of a novel foamy virus Env leader protein with the N-terminal Gag domain." J Virol **75**(17): 7995-8007.
- Wolfe, D., W. F. Goins, et al. (1999). "Engineering herpes simplex virus vectors for CNS applications." Exp Neurol **159**(1): 34-46.
- Wolfe, N. D., W. M. Switzer, et al. (2004). "Naturally acquired simian retrovirus infections in central African hunters." Lancet **363**(9413): 932-7.
- Wu, N. and M. M. Atai (2000). "Production of viral vectors for gene therapy applications." Curr Opin Biotechnol **11**(2): 205-8.
- Wu, X., Y. Li, et al. (2003). "Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration." Science **300**(5626): 1749-51.
- Wu, M., S. Chari, et al. (1998). "cis-Acting sequences required for simian foamy virus type 1 vectors." J Virol **72**(4): 3451-4.
- Yam, P. Y., S. Li, et al. (2002). "Design of HIV vectors for efficient gene delivery into human hematopoietic cells." Mol Ther **5**(4): 479-84.
- Yu, S. F., D. N. Baldwin, et al. (1996). "Human foamy virus replication: a pathway distinct from that of retroviruses and hepadnaviruses." Science **271**(5255): 1579-82.
- Yu, S. F., J. Stone, et al. (1996). "Productive persistent infection of hematopoietic cells by human foamy virus." J Virol **70**(2): 1250-4.
- Zemba, M., T. Wilk, et al. (1998). "The carboxy-terminal p3Gag domain of the human foamy virus Gag precursor is required for efficient virus infectivity." Virology **247**(1): 7-13.
- Zou, J. X. and P. A. Luciw (1996). "The transcriptional transactivator of simian foamy virus 1 binds to a DNA target element in the viral internal promoter." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(1): 326-30.

7. Abkürzungen

A	Adenin	A	Ampere
A	Alanin	A.	Aqua
α	anti	abs.	absolut
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol	AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
ALV	Avian Leucosis Virus	al.	altera
AS	Aminosäuren	APS	Ammoniumpersulfat
Aufl.	Auflage	ATP	Adenosintriphosphat
AZC	5-Azacytidin		
Bel	between env and LTR	BLV	Bovine Leukemia Virus
bp	Basenpaare	BPB	Bromphenolblau
BSA	Bovines Serumalbumin	bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration	C	Cytosin
C	Kohlenstoff	°C	Grad Celsius
CA	Kapsid	ca.	circa
CD	cluster of differentiation	CIP	calf intestine phosphatase
Ci	Currie	cpz	chimpanzee
CMV	Cytomegalievirus	Cys	Cystein
D	Aspartat	d	Tage (days)
D	Dalton	d.h.	das heißt
Δ	Deletion	DLS	dimer linkage structure
DI	defective interfering virus	dNTP	Desoxynukleotid
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium	DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithioerythritol		
E	Glutamat	E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	EM	Elektronenmikroskop
engl.	Englisch	Enh.	Enhancer
Env	envelope	ER	endoplasmatisches Retikulum
Fc	kristallisierbares Fragment	FCS	Fötales Kälberserum
FeLV	Feline Leukemia Virus	FFV	Feline Foamy Virus
Fig.	Figur	FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gramm	G	Guanin
Gag	gruppenspezifisches Antigen	Gen.	Generation

GFP	green fluorescent protein	gp	Glykopeptid Boxen
GR	Glycin-Arginin-reiche		
HBV	Hepatitis-B Virus	His	Histidin
HIV	Human Immunodeficiency	HSRV	Humanes Spumaretrovirus Virus
HTLV	Human T-Lymphotropic Virus	hu	human
ICA	infectious centre assay	IE	immediate early gene
IN	Integrase	inkl.	inklusive
IP	interner Promotor	IRES	internal ribosome entry site
k	kilo	kb	Kilobasen
l	Liter	LB	Lipidbilayer
lg	Logarithmus zur Basis 10	LTR	long terminal repeat
M	molar	μ	mikro
m	milli	MA	Matrix
MEM	minimal essential medium	MES	2-(N-Morpholino)-Ethan- Sulfonsäure
Met	Methionin	Mg	Magnesium
Min.	Minuten	mind.	mindestens
MLV	Murine Leukemia Virus	MMH	Kennzeichnung der eigenen Vektorkonstrukte
MMTV	Mouse Mammary Tumor Virus	Mn	Mangan
mol	Mol	MPMV	Mason-Pfizer Monkey Virus
n	nano	N	normal
NC	Nukleokapsid	Nef	negative factor
neo	Neomycin	NLS	nukleäres Lokalisationssignal
NRE	negativ regulierendes Element	nt	Nukleotide
OD	optische Dichte	ORF	open reading frame
p	Peptid	p	Plasmid
p	pico	ψ	Psi (Verpackungssignal)
PAGE	Polyacrylamidgel- Elektrophorese	PBS	phosphate buffered saline
PBS	primer binding site	PCR	polymerase chain reaction
PFU	plaque forming units	PFV	Prototype Foamy Virus
pH	potentia hydrogenii	p.i.	post infectionem
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid	PNK	Polynukleotidkinase
PNP	purine nucleoside phosphorylase	POD	Peroxidase

Pol	Polymerase	PPP	Protein-Proben-Puffer
PPT	Polypurintrakt	PR	Protease
Pro	Protease	Prom.	Promotor
p.t.	post transfectionem		
R	redundante Region	Rev	regulator of expression of virion proteins
RH	RNase H	RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotationen pro Minute	RRE	rev response element
RSV	Rous Sarcoma Virus	RT	reverse Transkriptase
RxRE	rex response element		
S	Schwefel	SA	Spleißakzeptor
SD	Spleißdonator	SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sek.	Sekunden	SFFV	Spleen Focus Forming
SFV	Simian Foamy Virus	SIN	self inactivating
SIV	Simian Immunodeficiency	SNV	Spleen Necrosis Virus
Std.	Stunden	s.u.	siehe unten
SU	surface	SV40	Simian Virus 40
T	Thymin	TAR	transactivator response region
Tas	Transaktivator der Spumaviren transcription	Tat	transactivator
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin	TM	transmembran
TRE	tas/tax response element	Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
			-101 -
U	Uracil	U	unique
u	units	u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett		
V	Volt	Vif	viral infectivity factor
Vpr	viral protein rapid	Vpu	viral protein u
X-SCID	x-linked severe congenital immundeficiency	z.B.	zum Beispiel
%	Prozent	&	und

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Axel Rethwilm für die Bereitstellung des Themas, die freundliche Betreuung und große Unterstützung während der Anfertigung der Dissertation bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Thomas Schenk, der meine Arbeit im Labor betreute und ohne dessen Hilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Auch den anderen Mitgliedern des Institutes für Virologie in Dresden, vor allem Dr. Thomas Juretzek, Dr. Wolfram Rudolph, Dr. Marc Cartellieri, Dr. Ottmar Herchenröder, Dr. Jaqueline Roy und Sylvia Kanzler möchte ich danken für die vielen Anregungen und die Unterstützung, die ich in der Zeit erfahren durfte.

Dr. Melanie Hauck danke ich sehr für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die nette Arbeitsatmosphäre im Labor.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frederik bedanken, der mir mit viel Verständnis, Geduld und großer Unterstützung bis zur Fertigstellung der Arbeit zur Seite stand.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name	Maya Müller-Hermelink
Geboren	15.12.1977
Geburtsort	Kiel

Schulbildung

1984 – 1988	Grundschule in Kiel und Würzburg
1988 -1997	Wirsberg-Gymnasium Würzburg, humanistischer Zweig
1997	Abitur, Großes Latinum

Hochschulausbildung

1997 – 1999	Studium der Humanmedizin an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität in Greifswald
1999 – 2004	Studium der Humanmedizin an der Carl-Gustav-Carus Universität Dresden

Praktische Erfahrung

April bis Juli 2003	Praktisches Jahr Terial Innere Medizin, Hämato/Onkologie, Universitätsklinikum Carl-Gustav-Carus, TU Dresden
August bis November 2003	Praktisches Jahr Terial, Pädiatrie, Children's Hospital, University of Washington, Seattle, Washington, USA
Dezember 2003 bis März 2004	Chirurgie, Tygerberg Hospital, University of Stellenbosch, Stellenbosch, Südafrika

Berufliche Tätigkeit

seit 09/2004

Assistenzärztin in der Abteilung für pädiatrische
Hämato/Onkologie des UKE Hamburg

Promotion

März 2002 bis Juli 2003

Experimentelle Arbeit am Institut für Virologie an der Carl-
Gustav-Carus Universität Dresden.