

DISSERTATION

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der Bayerischen
Julius-Maximilians-Universität Würzburg (Dr. rer. nat.)



Abschätzung der Genauigkeit der foamyviralen Genomreplikation

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Kathleen Gärtner
aus Dippoldiswalde

Würzburg, 2008

Eingereicht am

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter:

Gutachter:

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Zusammenfassung

Foamyviren (FVs) sind die genetisch stabilsten Viren der Retrovirus-Familie. Dies steht im Gegensatz zur Fehlerrate, die für die rekombinante FV Reverse Transkriptase (RT) gefunden wurde. Um die Genauigkeit der FV Genomreplikation *in vivo* zu ermitteln, analysierten wir das Auftreten von Mutationen nach FV-Vektortransfer in einer einzigen Replikationsrunde. Die Sequenzanalyse von mehr als 90000 Nukleotiden ergab 39 Mutationen. Dies entspricht einer Fehlerrate von ungefähr 4×10^{-4} pro Base und Replikationszyklus, wobei alle Mutationen Transitionen von G zu A waren. Eine schwache Expression von APOBEC-Enzymen in den vektorproduzierenden Zellen konnte als wahrscheinlichste Ursache für diesen Typ an Mutationen nachgewiesen werden. Das akzessorische FV Bet Protein wirkt APOBEC entgegen. Kotransfektion von Zellen mit einem *bet*-Expressionsplasmid resultierte in einer signifikanten Reduktion an Mutationen bei über 170000 zusätzlich sequenzierten Basen. Zwei Mutationen konnten nicht der APOBEC-Aktivität zugeschrieben werden, deshalb postulieren wir eine idealisierte FV-Mutationsrate von angenähert $7,5 \times 10^{-6}$ pro Base und Replikationszyklus. Im Gegensatz zu *in vitro*-Analysen wurde nur eine einzige Deletion und keine Insertion bei mehr als 260000 sequenzierten Basen identifiziert.

Die Analyse der Rekombinationsrate von FV-Vektorgenomen ergab mehr als ein zusätzliches Template-Switching-Ereignis pro reverser Transkription. Wir konnten auch zeigen, dass ein bestimmtes FV-Partikel in der Lage zum Crosstransfer eines heterologen FV-Genoms ist, jedoch mit einer reduzierten Effizienz als bei Verwendung des homologen Vektors. Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse einerseits, dass das Kopieren des FV-Genoms mit höherer Genauigkeit geschieht als bisher angenommen, auf der anderen Seite ist Rekombination bei FV-Genomen wahrscheinlich.

Summary

Foamy viruses (FVs) are the genetically most stable viruses of the retrovirus family. This contrasts to the error rate found for recombinant FV reverse transcriptase (RT). To investigate the accuracy of FV genome copying *in vivo* we analyzed the occurrence of mutations after a single round of FV vector transfer. Sequence analysis of more than 90,000 nts revealed 39 mutations. This corresponds to an error rate of approx. 4×10^{-4} per site and replication cycle. All mutations were transitions from G to A. A residual expression of APOBEC enzymes in vector producer cells was found to be likely responsible for this type of mutation. The accessory FV Bet protein is implicated to counteract APOBEC. Cotransfection of cells with a *bet* expression plasmid resulted in a significant drop of mutations among over 170,000 additional sequenced bases. Since two mutations were not correlated to APOBEC activity, we postulate an idealized FV mutation rate of close to 7.5×10^{-6} per site and replication cycle. In contrast to *in vitro* studies only one deletion and no insertion was identified among the more than 260,000 sequenced bases.

Analysis of the recombination frequency of FV vector genomes revealed more than one additional template-switching event per reverse transcription. We also show that a given FV particle is able to cross-transfer a heterologous FV genome, although at reduced efficiency than the homologous vector. Taken together, our results indicate that FV genome copying is of higher accuracy than thought previously. On the other hand recombination among FV genomes appears to be likely.

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung	1
1.1	Retroviren – Allgemeine Übersicht	1
1.2	Foamyviren	2
1.2.1	Allgemeine Einleitung	2
1.2.2	Genomorganisation von Foamyviren im Vergleich zu HIV-1	4
1.2.3	Vergleich der PFV- und HIV-1-Proteine	7
1.2.4	Replikationszyklus der Foamyviren	13
1.3	Charakterisierung der Reversen Transkriptase	15
1.3.1	Reverse Transkriptase und Ablauf der Reversen Transkription	15
1.3.2	Hohe Diversität des retroviralen Genoms durch die Eigenschaften der Reversen Transkriptase	18
1.4	Zelluläre Restriktionsfaktoren	20
1.4.1	Eigenschaften verschiedener zellulärer Restriktionsfaktoren	20
1.4.2	Interaktion von HIV-1 Vif mit hAPOBEC3G und hAPOBEC3F	21
1.5	Aufgabenstellung dieser Arbeit	23
1.5.1	Charakterisierung der Reversen Transkriptase von PFV	23
1.5.2	Möglichkeit des Crosspackaging bei Foamyviren	24
2	Materialien und Methoden	26
2.1	Verwendete Geräte und Materialien	26
2.2	Chemikalien	27
2.3	Kits	28
2.4	Enzyme	28
2.5	Verwendete Organismen	29
2.6	Nukleinsäuren	29
2.7	Verwendete Seren	34
2.8	Methoden	35
2.8.1	Nachweis und Klonierung von Nukleinsäuren	35
2.8.1.1	Präparation von mRNA aus eukaryotischen Zellen mit dem RNeasy® Mini Kit	35
2.8.1.2	cDNA-Synthese aus isolierter RNA mit dem iScript™ cDNA Synthese Kit	36
2.8.1.3	Polymerase-Kettenreaktion zur Klonierung von DNA-Fragmenten (lineare PCR)	36
2.8.1.4	„nested“ PCR zur Erhöhung der Ausbeute einer linearen PCR von genomischer DNA	37
2.8.1.5	PCR zur Sequenzbestimmung von DNA	38
2.8.1.6	Quantitative RealTime PCR von präparierter cDNA	39
2.8.1.7	Aufreinigung von PCR-Produkten mit dem Sigma GenElute™ PCR Clean-Up Kit	40
2.8.1.8	Agarosegele zur Auftrennung von DNA-Fragmenten	41
2.8.1.9	Elution von Plasmid-DNA oder DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit dem QiaQuick Gel Extraction Kit (Qiagen)	42
2.8.1.10	Restriktionsverdau von DNA	43
2.8.1.11	Dephosphorylierung linearisierter Plasmide	43
2.8.1.12	Ligation von DNA	44
2.8.1.13	Transformation kompetenter Bakterien	44
2.8.1.14	Aufreinigung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i> mittels der TENS-Methode	45
2.8.1.15	Aufreinigung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i> mittels Machery-Nagel-Maxi-Kits	46
2.8.1.16	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	47
2.8.2	Zellzucht und Virusanzucht	47
2.8.2.1	Zellzucht	47
2.8.2.2	Transfektion von Säugerzellen mit Polyethylenimin	49
2.8.2.3	Infektion von Zielzellen mit Virusüberstand	51
2.8.2.4	Partikelpräparation aus Virusüberständen	52

2.8.2.5	Selektion infizierter 293-Zellen mit Antibiotika	53
2.8.2.6	Gewinnung von Einzelzellkolonien selektierter 293-Zellen mit Klonierungshütchen	53
2.8.2.7	FACS-Analyse infizierter Zellen	54
2.8.2.8	Sortieren fluoreszierender Einzelzellklone in 96-Loch-Platten mit FACSDiVa Optima	55
2.8.2.9	Aufreinigung genomischer DNA aus Säugerzellen mittels Qiagen Blood and Tissue Kit	55
2.8.3	Proteinpräparation	56
2.8.3.1	Herstellen von Proteinlysat aus transfizierten Zellen	56
2.8.3.2	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese und Westernblot	57
3	Ergebnisse	60
3.1	Bestimmung der Mutationsrate des Prototypischen Foamyvirus	60
3.1.1	Klonierung des Vektors pKG83	60
3.1.2	Versuchsablauf zur Bestimmung der foamyviralen Mutationsrate in Zellkultur	61
3.1.3	Bestimmung der foamyviralen Mutationsrate in Zellkultur unter Berücksichtigung zellulärer Restriktionsenzyme	63
3.1.3.1	Die foamyvirale Mutationsrate ohne koexprimiertes Bet (Einfluss von APOBEC-Proteinen)	63
3.1.3.2	Bestimmung der absoluten Expression von hA3G und hA3F und ihre Normalisierung auf House-Keeping-Gene	68
3.1.4	Wiederholung des Versuches mit koexprimiertem PFV Bet und Berechnung der Mutationsrate	70
3.2	Bestimmung der Template Switching Rate des Prototypischen Foamyvirus (PFV)	73
3.2.1	Klonierung der Plasmide	73
3.2.2	Die Template Switching Rate von PFV im Vergleich zu MLV	74
3.2.3	Nachweis des Template-Switchings durch Analyse der zellulären Integrate	79
3.3	Crosspackaging zwischen SFV und PFV	82
3.3.1	Klonierung von pKG84	82
3.3.2	Gegenseitige Verpackung des Genoms der verwandten Viren SFV und PFV	83
4	Diskussion	88
4.1	Die Diversität von Foamyviren im Vergleich zu anderen Retroviren	88
4.1.1	Die <i>in-vivo</i> -Mutationsrate von PFV ist vergleichbar zu bereits publizierten Daten	88
4.1.2	Die PFV-Template-Switching-Rate liegt zwischen der von HIV-1 und MLV	94
4.1.3	Crosspackaging verwandter Foamyviren	98
4.2	Charakterisierung der Diversität von Foamyviren	101
5	Literaturverzeichnis	105
6	Anhang	119
6.1	Abkürzungsverzeichnis	119
6.2	Abbildungsverzeichnis	122
6.3	Tabellenverzeichnis	122
6.4	Lebenslauf	123
6.5	Veröffentlichungen:	124
	Erklärung	125

1 Einleitung

1.1 *Retroviren – Allgemeine Übersicht*

Die Familie der Retroviridae umfasst umhüllte, positiv-strängige RNA- (Ribonukleinsäure) Viren, die in zwei Subfamilien, Orthoretrovirinae und Spumaretrovirinae, eingeteilt werden. Orthoretrovirinae werden in sechs Genera unterteilt (α - bis ϵ -Retroviren und Lentiviren), bei den Spumaretrovirinae findet man dagegen nur ein Genus, die Spumaviren (Foamyviren).

Zur Familie der Retroviren gehören viele Krankheitserreger (human- und tierpathogene), als deren wichtigster humanpathogener Vertreter das Humane Immundefizienzvirus (HIV) zu nennen ist. Aber auch bei anderen Tierarten findet man pathogene Orthoretroviren, z. B. das Murine Leukämievirus (MLV) der Maus, das Bovine Leukämievirus (BLV) beim Rind oder das Rous-Sarkomvirus (RSV) bei Hühnern.

Retroviren werden anhand ihrer Genomorganisation in zwei unterschiedliche Gruppen eingeteilt, einfache (ohne akzessorische Gene) bzw. komplexe (mit akzessorischen Genen). Beispiele für einfache Retroviren sind z. B. das Mason-Pfizer Monkey Virus (MPMV), das Spleen Nekrose Virus (SNV) oder MLV. Zu den komplexen Retroviren gehört z. B. das Prototypische Foamyvirus (PFV), HIV-1, das Simiane Immundefizienzvirus (SIV) oder das humane T-Zell lymphotrope Virus (HTLV).

Retroviren zeichnen sich unter allen Virusfamilien durch die Kombination verschiedener, interessanter Merkmale aus. Sie besitzen eine Reverse Transkriptase (RT; siehe 1.3), welche die Fähigkeit besitzt, RNA in DNA (Desoxyribonukleinsäure) umzuschreiben (Baltimore, 1970, Temin & Mizutani, 1970). Dieses Enzym, welches wesentliche Entwicklungen in der Molekularbiologie zur Folge gehabt hat, findet man außer bei Retroviren nur noch bei Hepadnaviren (Beck & Nassal, 2007) und einigen Pflanzenviren (Caulimoviren) (Hull et al., 1987). Eine weitere wichtige Eigenschaft der Retroviren ist die obligate Integration ihres Genoms in das Genom der infizierten Wirtszelle während des Replikationszyklus (Lewinski & Bushman, 2005). Dies führt dazu, dass ihr Genom, außer durch vertikale Verbreitung mittels Viruspartikeln, während der Mitose auch horizontal an die Tochterzellen, als sogenanntes Provirus, weitergegeben werden kann. Als Proviren können Retroviren lange Zeit in der Zelle inaktiv sein, meist weisen sie dann keine bzw. nur eine schwache Proteinexpression auf. So können sie sich vor dem Wirtsimmunsystem verbergen und infizierte Zellen werden nicht erkannt und eliminiert. Die Integration der viralen DNA in das Wirtszellgenom macht die Bekämpfung pathogener Retroviren wie HIV schwierig, da es

kaum möglich ist, das Provirus aus dem Wirtsgenom wieder zu entfernen. Sarkar et al., 2007 zeigen Ansätze, um mit Rekombinasen, welche an unterschiedliche HIV-1 Stämme angepasst wurden, die Proviren aus dem Wirtszellgenom auszuschneiden. Die Bedeutung für eine praktische Anwendung ist jedoch (noch) gering, da notwendigerweise alle betroffenen Zellen im menschlichen Organismus erreicht werden müssen und die statistische Wahrscheinlichkeit dafür sehr gering ist. Außerdem können Mutanten auftreten, die von den Rekombinasen nicht erkannt werden.

Zusätzlich besitzen retrovirale RTs hohe Mutationsraten (Svarovskaia et al., 2003), was ständig zur Generierung neuer Resistenzen führt und ebenfalls ein großes Problem bei der HIV-Therapie darstellt. Durch das Vorliegen einer Population von Viren, welche die unterschiedlichsten Mutationen tragen, gibt es statistisch immer Viren, die zufällig Resistenzen gegen die eingesetzten antiretroviralen Medikamente aufweisen und so der Behandlung entgehen. Man wendet daher Kombinationen verschiedener Wirkstoffe an, um die Selektion auf einzelne Mutationen zu verringern.

Die für Retroviren typischen Eigenschaften, speziell die Integration, kann man andererseits auch nutzen, um z. B. retrovirale Vektoren für die Gentherapie zu entwickeln. In bisherigen Studien fanden vor allem gamma- und lentivirale Vektoren Anwendung (Hacein-Bey-Abina et al., 2003, Mandel et al., 2008, Zhang et al., 2008), aber auch mit Foamyviren wurden bereits erfolgreiche Tierversuche zur Behandlung von Gendefekten durchgeführt (Bauer et al., 2008, Kiem et al., 2007).

1.2 Foamyviren

1.2.1 Allgemeine Einleitung

Foamyviren (FV) sind in vielen Säugetierarten verbreitet, z. B. in Affen (Simianes Foamyvirus, SFV; Brown et al., 1978, Herchenröder et al., 1994, Meiering & Linial, 2001), Katzen (Felines Foamyvirus, FFV; Riggs et al., 1969), Rindern (Bovines Foamyvirus, BFV; Renshaw et al., 1991) oder Pferden (Equines Foamyvirus, EFV; Tobaly-Tapiero et al., 2000). Humane Foamyviren wurden bisher nicht identifiziert, obwohl man das Prototypische Foamyvirus (PFV; früher Humanes Foamyvirus, HFV) zuerst aus dem Nasenpharynxkarzinom eines Menschen isoliert hatte (Achong et al., 1971a, Achong et al., 1971b). Serologische und Sequenzvergleiche mit SFV aus Schimpansen zeigten, dass beide Viren zu einem hohen Prozentsatz identisch sind. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass hier eine Zoonose, also lediglich eine Übertragung des Virus vom Affen auf den Menschen,

stattgefunden hatte (Herchenröder et al., 1994). Auch HIV ist durch seine Übertragung von Primaten auf den Menschen ein Beispiel für eine Zoonose (Hahn et al., 2000), welche bei den betroffenen Personen zur Ausbildung einer Immunschwäche (AIDS) führt (Van Heuverswyn et al., 2006). Im Unterschied dazu konnten Foamyviren bisher nicht mit Krankheiten assoziiert werden, sie gelten daher als apathogen (Linial, 2000, Meiering & Linial, 2001, Schweizer et al., 1995). Zusätzlich sind während langjähriger Studien keine Mensch-zu-Mensch-Übertragungen beobachtet worden, was ihre Ausbreitung im Menschen verhindert (Boneva et al., 2002, Meiering & Linial, 2001, Switzer et al., 2002).

Foamyviren besitzen ein äußerst stabiles Genom, welches sich vermutlich in den letzten 30 Millionen Jahren koevolutionär mit ihren Wirten entwickelt hat. Der Vergleich von SFV-Spezies in Primaten hat gezeigt, dass das Auftreten von Mutationen im foamyviralen Genom *in vivo* (in Primaten) im Vergleich zu HIV-1 sehr gering ist (Switzer et al., 2005, Thümer et al., 2007, Verschoor et al., 2004), was möglicherweise mit ihrer geringen Replikation im Wirtsorganismus zu tun hat. Trotz Vorhandensein proviraler DNA in verschiedenen Geweben, konnte die Replikation von Foamyviren lediglich in der oralen Mucosa nachgewiesen werden (Falcone et al., 1999; Murray et al., 2008).

In mit Foamyviren infizierten Gewebekulturen kann man in vielen Zelllinien einen ausgeprägten zytopathischen Effekt erkennen, was im Gegensatz zu ihrer Apathogenität steht. Typischerweise bilden sich große mehrkernige Zellen (Synzytien; Mergia et al., 1996). Sie entstehen durch Env-vermittelte Membranverschmelzung infizierter Zellen mit ihren Nachbarzellen. Dabei bindet das auf der infizierten Zelle exprimierte foamyvirale Env (Hüllprotein) an den Rezeptor einer benachbarten, nicht-infizierten Zelle und veranlasst die Fusion der Membranen (siehe 1.2.3). Neben der Synzytienbildung durch Foamyviren kann man in Zellkultur eine Vakuolisierung in den Zellen erkennen, was unter dem Mikroskop wie Schaum aussieht. Diese Beobachtung hat den Foamyviren ihren Namen eingebracht (foam = englisch: Schaum; Meiering & Linial, 2001). Es ist jedoch bisher nicht klar, was der Ursprung dieser Vakuolen ist.

Versuche mit dem RT-Hemmer Azidothymidin (AZT) haben gezeigt, dass die reverse Transkription von Foamyviren spät im Replikationszyklus stattfindet, das heißt in der virusproduzierenden Zelle (Kretzschmar et al., 2008, Roy et al., 2003, Yu et al., 1999). Bei Zugabe von AZT zu den Produktionszellen zeigte sich, im Gegensatz z. B. zu HIV-1, eine stark reduzierte FV-Replikation. Dieser Effekt konnte nicht beobachtet werden, wenn AZT zu den Zielzellen gegeben wurde. Dies führte jedoch zur Hemmung der Replikation bei HIV-1. Bei Foamyviren konnte außerdem in den Viruspartikeln doppelsträngige (ds)DNA

nachgewiesen werden (Roy et al., 2003, Yu et al., 1999). Im Vergleich zu Orthoretroviren besteht also das infektiöse Genom von Foamyviren aus dsDNA (Moebes et al., 1997, Roy et al., 2003, Yu et al., 1999).

Foamyviren besitzen mit einer Größe von 12 bis 13 kb (Kilobasen) im Gegensatz zu anderen Retroviren ein sehr großes Genom (Lecellier & Saib, 2000). Teile dieses Genoms kann man eliminieren und die zur Bildung von Viruspartikeln nötigen Proteine und Enzyme (Gag, Pol, Env) in *trans* exprimieren (Bieniasz et al., 1997, Heinkelein et al., 2002a, Russell & Miller, 1996, Schmidt & Rethwilm, 1995). Die deletierten Bereiche im viralen Genom kann man durch virusfremde Gene ersetzen, welche dann durch die entstandenen Viruspartikel auf Zielzellen übertragen und dort im Wirtsgenom stabil integriert und exprimiert werden. Eine erneute Virusreplikation erfolgt dabei nicht, da die dafür notwendigen Virusproteine nicht mehr im Vektorgenom kodiert werden. Dies eröffnet Möglichkeiten zum Einsatz von Foamyviren in der somatischen Gentherapie, ähnlich gamma- oder lentiviralen Vektoren, wobei die Kombination verschiedener Eigenschaften sie diesen überlegen macht. Dazu zählen unter anderem ihre Apathogenität, die hohe Verpackungskapazität, eine erhöhte physikalische Stabilität ihrer Partikel, stabile Expression des Transgens in der Zielzelle oder dass ihr infektiöses Genom aus dsDNA besteht, was ihm eine höhere Stabilität als dem RNA-Genom von Gamma- oder Lentiviren in sich selten teilenden Zellen gewährleistet (Übersicht bei Rethwilm, 2007a).

1.2.2 Genomorganisation von Foamyviren im Vergleich zu HIV-1

Einfache und komplexe Retroviren unterscheiden sich anhand ihrer Genomorganisation. Das provirale Genom einfacher Retroviren besteht aus den 5'- und 3'-Long Terminal Repeats (LTR) an beiden Enden des Provirus, den offenen Leserahmen für die Strukturproteine (*gag*, *pol*, *env*) und verschiedenen *cis*-aktiven Sequenzen, welche unter anderem für die Virusreplikation oder die Verpackung der genomischen RNA notwendig sind. Komplexe Retroviren besitzen außer dieser „Grundausstattung“ weitere akzessorische Gene, welche für zusätzliche Proteine kodieren. Sie üben unter anderem wichtige regulatorische Funktionen bei der Replikation der Viren aus (siehe 1.2.3 und 1.2.4).

Eine Übersicht über die Genomorganisation von Foamyviren ist in der Abb. 1. 1 A dargestellt. Sie gehören zu den komplexen Retroviren. Ihr provirales Genom umfasst die offenen Leserahmen (*orfs*) für die drei Strukturgene *gag*, *pol* und *env*, an welche sich die akzessorischen Gene *tas* (*bel-1*) und *bet* anschließen. Begrenzt ist das Provirus am 5'- und am

3'-Ende durch die LTRs, welche sich in die U3- (Unique, einzigartige Sequenz am 3'-Ende auf RNA-Ebene), R- (Repeat, wiederholte Sequenz an den Genomenden) und U5-Region (Unique, einzigartige Sequenz am 5'-Ende auf RNA-Ebene) gliedern (Rethwilm et al., 1990). Auch das provirale Genom von HIV-1 (siehe Abb. 1. 2) besteht aus den *orfs* für die Gene *gag*, *pol* und *env*, welche von den LTR-Bereichen, bestehend aus U3, R und U5, flankiert sind. Die akzessorischen Gene von HIV-1 (*tas*, *vif*, *rev*, *vpr*, *vpu*) sind zwischen dem *pol*- und *env*-Gen lokalisiert bzw. entstehen durch alternatives Spleißen der *env*-mRNA. Die Funktionen der verschiedenen Proteine sind unter 1.2.3 erläutert.

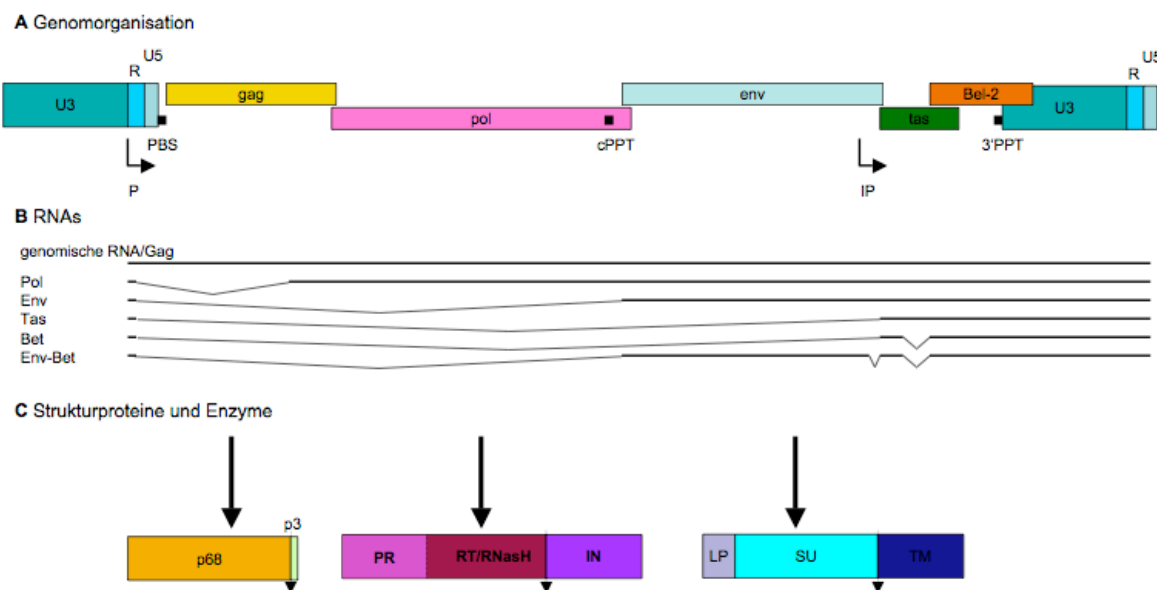


Abb. 1. 1: (A) Genomorganisation, (B) RNAs, (C) Strukturproteine und Enzyme von PFV, die Pfeile in den jeweiligen Proteinen geben die Prozessierungsstellen der Proteine an; U3/R/U5 – Bestandteile der long terminal repeats; PBS – Primerbindungsstelle; P – LTR-Promoter; IP – interner Promoter; gag – Leserahmen von Gag; pol – Leserahmen von Pol; env – Leserahmen von Env; tas – Transaktivator; bel-2 – Leserahmen des Bel-2; 3'PPT – Polypurintrakt; cPPT – zentraler Polypurintrakt; p68, p3 – Gag-Proteinuntereinheiten; PR – Protease; RT/RNaseH – Reverse Transkriptase mit RNaseH-Aktivität; IN – Integrase; LP – Leaderpeptid; SU – Surface-Untereinheit; TM - Transmembranuntereinheit

Außer den Leserahmen für die unterschiedlichen Gene findet man im Genom der Retroviren verschiedene *cis*-aktive Bereiche, welche bei der Replikation bzw. Proteinexpression eine wichtige Rolle spielen. Im U3-Bereich der LTRs liegt der Promoter, welcher mit Hilfe der Transaktivatorproteine Tas (PFV) bzw. Tat (HIV-1) die Expression der Strukturgene steuert (siehe 1.2.3). Foamyviren besitzen als Besonderheit im Gegensatz zu Orthoretroviren neben dem LTR-Promoter im *env*-Bereich einen zweiten, internen Promoter (IP), der die Expression der akzessorischen Gene vermittelt (Kang et al., 1998, Löchelt et al., 1994, Rethwilm et al.,

1991). Weitere *cis*-aktive Bereiche sind die Primerbindungsstelle (PBS) und der Polypurintrakt (PPT). An die PBS der (prä-) genomischen RNA ist eine spezifische tRNA gebunden ($tRNA^{lys1,2}$ bei PFV, $tRNA^{lys,3}$ bei HIV-1; Rethwilm, 2007b, Wain-Hobson et al., 1985), die als Primer bei der Initiation der reversen Transkription des (-)DNA-Stranges dient. Der PPT am 3'-Ende des viralen Genoms dient als Primer für die Synthese des (+)DNA-Stranges (siehe 1.2.4). Sowohl bei HIV-1, als auch bei Foamyviren gibt es einen weiteren, zentralen Polypurintrakt (cPPT), der vermutlich ebenfalls wichtig für die Replikation ist und als zweiter Replikationsstartpunkt dient (Kupiec et al., 1988, Tobaly-Tapiero et al., 1991, Van Maele et al., 2003). Weiterhin besitzen Retroviren ein Verpackungssignal und Dimerisierungssignal im 5'-Bereich ihres Genoms, welche für die Inkorporation der RNA in das virale Partikel bzw. die Dimerisierung homologer RNA-Moleküle verantwortlich sind (Cain et al., 2001, Erlwein et al., 1997, Greutorex & Lever, 1998).

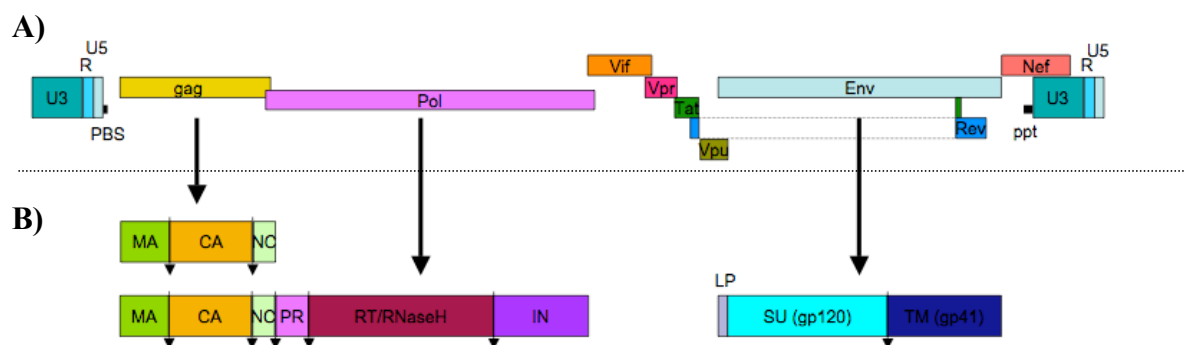


Abb. 1. 2: (A) Genomorganisation, (B) Strukturproteine und Enzyme von HIV-1, die Pfeile in den jeweiligen Proteinen geben die Prozessierungsstellen der Proteine an; U3/R/U5 – Bestandteile der long terminal repeats; PBS – Primerbindungsstelle; gag– Leserahmen des Gag-Proteins; pol – Leserahmen von Pol; env – Leserahmen von Env; vif – Virus-Infektivitätsfaktor; vpr – virales Protein R; tat – Transaktivator; rev – Expressionsregulator; vpu – virales Protein U; nef – Negativfaktor; ppt – Polypurintrakt; MA – Matrix; CA – Kapsid; NC – Nukleokapsid; PR – Protease; RT/RNaseH – Reverse Transkriptase mit RNaseH-Aktivität; IN – Integrase; LP – Leaderpeptid; SU – Surface-Untereinheit; TM - Transmembranuntereinheit

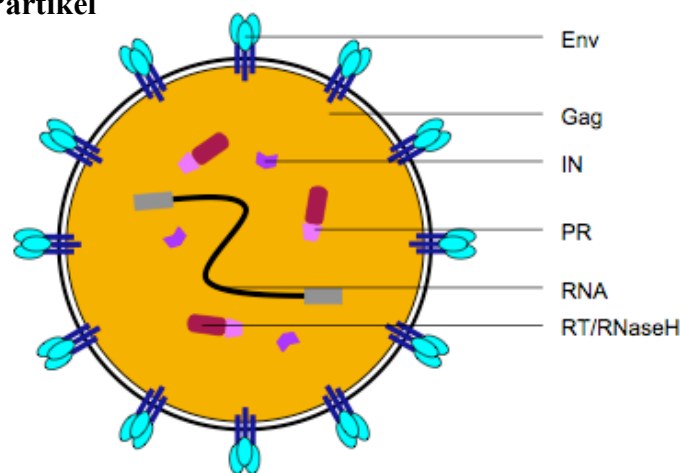
Wie unter 1.2.1 bereits erwähnt, ist die infektiöse Nukleinsäure von Foamyviren doppelsträngige DNA, welche (neben RNA) in die viralen Partikel verpackt wird (Roy et al., 2003, Yu et al., 1999). Sie sind also Retroviren, die ein doppelsträngiges DNA-Genom besitzen und über ein RNA-Intermediat replizieren. Das Genom von HIV-1 dagegen besteht aus diploider RNA und die Replikation erfolgt über ein DNA-Intermediat. In seine viralen Partikel verpackt HIV-1 zwei einzelsträngige, positiv orientierte, homologe RNA-Moleküle [ss(+)RNA].

1.2.3 Vergleich der PFV- und HIV-1-Proteine

Abb. 1. 3 zeigt eine schematische Darstellung der Viruspartikel von PFV und HIV-1.

Der Aufbau der retroviralen Partikel ist in seinen Grundsätzen ähnlich. Das Genom ist mit Gag-Proteinen assoziiert (bei HIV-1 das sogenannte Core), welche ihrerseits mit Env interagieren und zur Verpackung des Genoms und der Pol-Proteine führen. Retroviren sind umhüllte Viren, das heißt, sie sind mit einer von der Zellmembran abstammenden Hülle umgeben, in welche die Env-Proteine eingelagert sind. Durch Env erfolgt die Interaktion des Virus mit dem Rezeptor der Zielzelle und die Vermittlung der Fusion der Virus- mit der Zellmembran.

A: Foamyvirales Partikel



B: HIV-1-Partikel

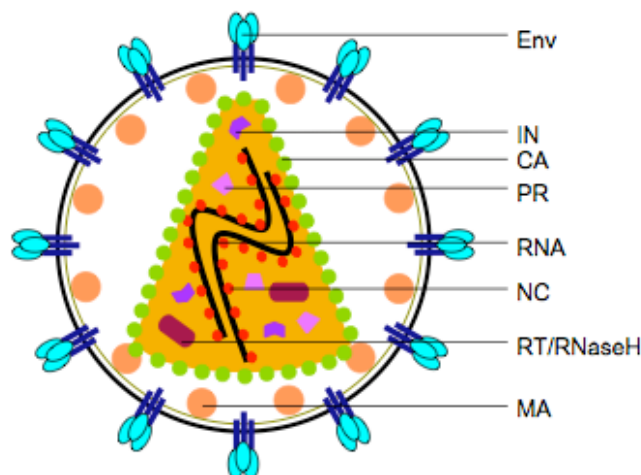


Abb. 1. 3: Vergleich eines foamyviralen mit einem HIV-1-Partikel; A) schematischer Aufbau eines foamyviralen Viruspartikels, Env – Envelope Protein, Gag – Gag-Protein, PR – Protease, IN – Integrase, RT/RNaseH – Reverse Transkriptase mit RNaseH-Aktivität, DNA – Genom; B) schematischer Aufbau eines HIV-1-Viruspartikels; Env – Envelope Protein, MA – Matrixprotein, CA – Kapsidprotein, IN – Integrase, PR – Protease, RNA – Genom, NC – Nukleokapsid, RT/RNaseH – Reverse Transkriptase mit RNaseH-Aktivität

Gag-Protein (gruppenspezifisches Antigen)

Das Gag-Protein vermittelt sowohl bei Foamyviren, als auch bei HIV-1 die Verpackung des Genoms in die viralen Partikel. Die Expression von Gag erfolgt von der ungespleißten, viralen mRNA (genomische bzw. Gag-mRNA). Es entsteht ein Gag-Vorläuferprotein, welches bei HIV-1 55 Kilodalton (kD), bei PFV 71 kD groß ist (siehe Abb. 1. 1 C und Abb. 1. 2 B). Seine Prozessierung erfolgt durch die jeweilige virale Protease (kodiert durch *pol*, siehe unten; Pettit et al., 2005, Pfrepper et al., 1999). Bei PFV kommt es dabei lediglich zur Verkürzung des Gag-Vorläuferproteins um 3 kD (Giron et al., 1997), wogegen bei HIV-1 die Matrix- (MA), Kapsid- (CA) und Nukleokapsid- (NC) Proteine entstehen (Freed, 2001). Das Gag-Protein bei HIV-1 ist wichtig für das Knospen (englisch: Budden) der Viruspartikel, das MA-Protein interagiert mit Env. HIV-Gag kann auch allein, ohne Env-Protein, Virus-ähnliche Partikel bilden, was vor allem durch die MA-Untereinheit vermittelt wird, welche mit der Plasmamembran assoziiert ist (Fiorentini et al., 2006). Die Interaktion mit dem HIV-Genom erfolgt über das NC-Protein. Es besitzt ein Zink-Finger-ähnliches Motiv (Cis-His-Motiv, CCHC) und kann so an die genomische RNA binden (Fiorentini et al., 2006). NC hat wichtige Aufgaben während der Reversen Transkription, indem es z. B. das Binden der Primer-tRNA an die Primerbindungsstelle stimuliert und den Strang-Transfer fördert (Ottmann et al., 1995). Außerdem lagert es sich an die genomische RNA, welche dadurch nicht mehr zur Proteinsynthese verwendet werden kann, sondern als Ribonukleoprotein-Komplex in die Viruspartikel verpackt wird (Darlix et al., 1995). Das dritte durch die Prozessierung entstehende Gag-Protein ist CA. Es bindet an den Ribonukleoproteinkomplex, und sein C-terminaler Bereich ist ebenfalls wichtig für den Budding-Prozess (Ganser-Pornillos et al., 2008).

Die Gag-Proteine der Foamyviren sind nicht in der Lage, ohne Env virusähnliche Partikel (VLPs) zu bilden (Shaw et al., 2003) und weisen keine Prozessierung in MA, CA und NC auf. Das foamyvirale Gag besitzt zwei GR-Boxen (Glycin-Arginin-reich; Yu et al., 1996b). In der GR-Box I befindet sich eine nukleinsäurebindende Domäne (Yu et al., 1996b), die GR-Box II besitzt ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS), welches den Kernimport des Gag-Proteins vermittelt (Schliephake & Rethwilm, 1994). Letzteres ist eine Besonderheit bei Foamyviren und bei anderen Retroviren nicht zu beobachten, jedoch ist die Funktion des Kernimportes von Gag noch unklar. Auch die L- (late-) Domänen des Gag-Proteins spielen eine große Rolle, sie sind wichtig für das Knospen und das Assembly der Viruspartikel (Stange et al., 2005).

Pol-Protein (Polymerase, enzymatische Aktivitäten)

Die Genprodukte der *pol*-Region bilden Enzyme, die zur Virusreplikation der Retroviren notwendig sind. Dies sind die Protease (PR), Reverse Transkriptase (RT) mit RNaseH-Aktivität und Integrase (IN) (siehe Abb. 1. 1 C, Abb. 1. 2 B; Katz & Skalka, 1994). Auch bei der Pol-Expression weisen Foamyviren einen signifikanten Unterschied zu Orthoretroviren auf. Das Pol-Vorläuferprotein wird im Gegensatz zu HIV-1 nicht als Gag-Pol-Fusionsprotein exprimiert, sondern von einer eigenen, gespleißten mRNA (Linial, 1999, Löchelt & Flügel, 1996). Die Bildung des Gag-Pol-Fusionsproteins wird durch eine Leserasterverschiebung um +1 verhindert, was die Frage aufwirft, wie Pol in das virale Partikel verpackt wird. Heinkelein et al., 2002b hat gezeigt, dass die RNA als Brücken-Molekül fungiert, das heißt, ohne virale RNA kann kein Pol-Protein in das Virus verpackt werden. Das Pol-Vorläuferprotein wird ebenso wie Gag durch die virale Protease prozessiert. Diese ist als Dimer aktiv und spaltet die Integrase (IN), welche für die Integration der foamyviralen DNA in das Wirtszellgenom verantwortlich ist, vom Pol-Vorläuferprotein ab. Die zweite entstehende Pol-Untereinheit besteht aus Protease und RT mit RNaseH-Aktivität (Katz & Skalka, 1994).

Das Gag-Pol-Fusionsprotein bei HIV-1 wird ebenfalls von der viralen Protease prozessiert. Die Entstehung des Fusionsproteins wird möglich durch die Verschiebung des *pol*- gegenüber des *gag-orfs* um -1 (Freed, 2001). Dadurch kann es am Ribosom zu einer Leserasterverschiebung kommen, was während der Proteinexpression nicht zur Terminierung am *gag*- sondern erst am *pol*-Stopcodon führt (Wilson et al., 1988). Da dieses Ereignis nicht bei jedem Ablesen der RNA auftritt, führt der beschriebene Mechanismus dazu, dass im Vergleich zu Gag geringere Mengen an Pol in der Zelle vorliegen (ca. 5-10 % von Gag; Hung et al., 1998, Shehu-Xhilaga et al., 2001).

Durch die Bildung eines Gag-Pol-Fusionsproteins ist die Verpackung von Pol in die viralen Partikel gewährleistet, da dessen Gag-Komponente mit anderen Gag-Molekülen, welche bereits in das Partikel inkorporiert wurden, interagieren kann. Die Prozessierung des Gag- bzw. Gag-Pol-Vorläuferproteins durch die Protease (PR) sorgt nach dem Knospen von HIV dafür, dass es in den nicht-infektiösen Viruspartikeln zu grundlegenden morphologischen Veränderung und zur Reifung kommt, wodurch sie infektiös werden (Hill et al., 2005).

Ein essentielles Enzym im Replikationszyklus der Retroviren, welches durch *pol* kodiert wird, stellt die RT dar (siehe 1.3). Sie schreibt virale, einzelsträngige RNA in doppelsträngige DNA um. Assoziiert mit der RT ist die RNaseH-Aktivität, die dafür sorgt, dass während der (-)DNA-Synthese der genomische (+)RNA-Strang abgebaut wird (Schatz et al., 1990).

Ein weiteres Enzym, welches durch *pol* kodiert wird, ist die Integrase (IN). Sie vermittelt die Integration des revers transkribierten retroviralen Genoms als Provirus in das Wirtszellgenom. Die IN besitzt in ihrer N-terminalen Domäne ein Zink-Finger-ähnliches Motiv (HHCC-Motiv), das ein einzelnes Zinkion bindet. Dies führt zur Stabilisierung der Konformation der Integrase und zur Erhöhung ihrer enzymatischen Aktivität (Burke et al., 1992). Im aktiven Zentrum der Integrase findet man ein hochkonserviertes D₂D₃-E-Motiv, welches für die enzymatische Aktivität essentiell ist (Vink et al., 1993). Diese zentrale Domäne ist die am höchsten konservierte Region in retroviralen Integrasen. Im C-terminalen Bereich der Integrase befindet sich die DNA-bindende Domäne, die außerdem eine Rolle in der 3'-Prozessierung und der Integrationsaktivität spielt (Pahl & Flügel, 1995; Übersicht bei Freed, 2001).

Auch bei der Integration ihres Genoms weisen Foamyviren Unterschiede gegenüber HIV-1 auf. Die 3'-Prozessierung vor der Integration, bei welcher zwei Nukleotide am 3'-Ende beider Seiten der linearen, doppelsträngigen DNA entfernt werden, erfolgt bei Foamyviren nicht an beiden LTR-Enden, sondern nur an der 5'-seitigen U5-Region (Enssle et al., 1999, Juretzek et al., 2004).

Env-Protein (Envelope, Hüllprotein)

Das Hüll- oder Glycoprotein (Env) von Retroviren wird von einer gespleißten mRNA exprimiert. Es ist in der Plasmamembran inkorporiert und wechselwirkt mit einem spezifischen Rezeptor auf der Membran der Wirtszelle. Der zelluläre Rezeptor von HIV-1 ist das CD4-Oberflächenmolekül auf T-Zellen (Bour et al., 1995), wobei weitere Korezeptoren (CXCR5, CCR5) bei der Interaktion von Viruspartikel und Zellmembran eine Rolle spielen (Berger et al., 1999, Doms & Peiper, 1997). Die Fusion der Wirtszell- mit der Virusmembran wird nach der Rezeptorbindung ebenfalls durch Env vermittelt (McManus & Doms, 2000).

Der Rezeptor der Foamyviren ist nicht bekannt, aber vermutlich ist es ein ubiquitär exprimiertes Oberflächenprotein, da PFV sehr viele verschiedene Zelllinien infizieren kann (Mergia et al., 1996).

Das Env-Protein von HIV-1 wird als 160 kD großes Vorläuferprotein (gp160) exprimiert (Abb. 1. 2 B; Freed & Martin, 1995). Dieses wird am rauen Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und in dessen Membran durch ein N-terminales Signalpeptid verankert. Während des Transportes zur Zytoplasmamembran über den sekretorischen Weg des Golgi-Apparates kommt es durch zelluläre Proteasen zur Prozessierung des Env-Vorläufers in Surface-Untereinheit (SU; gp120) und Transmembran-Untereinheit (TM; gp41). Die TM-

Untereinheit bleibt in der Membran verankert und ist nicht-kovalent mit gp120 verbunden (Freed, 2001).

Auch bei PFV wird das Env-Vorläuferprotein (gp130) in die Membran des rauhen ER inkorporiert. Sein Transport zur Zellmembran erfolgt ebenfalls über den Golgi-Apparat, wobei es zur Glykosylierung und Prozessierung des Vorläuferproteins in SU (gp80) und TM (gp48) kommt (siehe Abb. 1. 1 C; Goepfert et al., 1999). Diese Reifungsprozesse sind für die virale Replikation und die Infektiosität der Viren von großer Wichtigkeit. Die TM-Untereinheit ist mit der membranspannenden Domäne (MSD) in der zellulären Membran verankert und vermittelt außerdem die Interaktion mit dem Gag-Protein (Pietschmann et al., 2000). Das Kapsid der Foamyviren wird im Zytoplasma zusammengesetzt und erst mit Hilfe von Env kann die Knospung erfolgen (Shaw et al., 2003).

Das foamyvirale Env-Protein besitzt eine ER-„Rückhalte“-Sequenz (ER-retrieval-Signal), die seine Lokalisation im ER vermittelt. Dadurch kann es auch zur intrazellulären Knospung in das ER kommen (Goepfert et al., 1999, Linial, 1999), was eine Parallele zu Hepadnaviren aufzeigt (Bruss & Ganem, 1991). Eine weitere Gemeinsamkeit zu ihnen ist die Bildung subviraler Partikel (VLP) in der Abwesenheit von Gag (Beck & Nassal, 2007, Shaw et al., 2003). Dieser Vorgang kann bei Orthoretroviren nicht beobachtet werden.

Akzessorische Proteine von HIV-1 (Tat, Rev, Vif, Vpu)

HIV-1 kodiert für eine Reihe unterschiedlicher akzessorischer Proteine deren Funktion zum Teil noch nicht vollständig geklärt ist. Eine wichtige Rolle im Replikationszyklus spielt das Transaktivatorprotein Tat. Es wird von einer gespleißten mRNA unter Kontrolle des LTR-Promoters exprimiert und steuert mit Hilfe zellulärer Proteine die Transkription der viralen Proteine (Chang & Zhang, 1995). Über den LTR-Promoter wird die Expression der akzessorischen Proteine durch zelluläre Transaktivatoren über gespleißte mRNAs vermittelt. Dadurch kommt es zur Tat-Synthese in der Zelle, was wiederum zur mRNA-Synthese der übrigen Strukturproteine führt, indem ein Elongationsstop bei der Proteinsynthese, welcher ohne Tat besteht, durch dieses aufgehoben wird (Gag, Pol, Env; Dayton et al., 1986, Fisher et al., 1986). Der Bereich für die Tat-Bindung ist die sogenannte TAR-Region (transactivator responsive element), welche sich an der Grenze von U3- und R-Bereich befindet (Berkhout et al., 1989).

Rev ist ein Protein, welches eine große Rolle beim Export viraler ungespleißter RNA (genomische bzw. Gag-mRNA) bzw. unvollständig gespleißter viraler RNA (Env-, Vif-, Vpu-RNA) aus dem Nukleus spielt. Rev bindet an das Rev-responsible Element (RRE) der RNA

und kann sie so über den CRM1-Weg (Chromosome maintenance region 1) in das Zytoplasma transportieren (Cullen, 2003). Über ein NLS wird das freigewordene Rev-Protein dann zurück in den Kern transportiert.

Die Funktion des Vif-Proteins (virion infectivity factor) von HIV-1 wurde erst in den letzten Jahren geklärt, nachdem man beobachtet hatte, dass Vif-defiziente Viren, die in bestimmten Zelllinien produziert wurden nicht mehr infektiös waren. Sheehy et al., 2002 identifizierten in diesen nicht-permissiven Zellen ein Protein (CEM15, später APOBEC3G; siehe 1.4), welches für diesen Effekt verantwortlich ist. Inzwischen sind weitere Restriktionsfaktoren bekannt, mit denen Vif interagieren und sie so aus dem Replikationszyklus entfernen kann (siehe 1.4). Das Vpu-Protein findet man nur bei HIV-1 und SIVcpz (Schimpansen-SIV). Es ist ein integrales Membranprotein, welches die Virus-Freisetzung erhöht und die Degradierung des viralen CD4-Rezeptors vermittelt (Margottin et al., 1998, Strebel et al., 1988).

Akzessorische Proteine von PFV (Tas, Bet)

Das Tas-Protein von PFV ist der Transaktivator für die Expression der foamyviralen Proteine. Es besitzt eine zentrale DNA-bindende Domäne und bildet Dimere oder Multimere (Rethwilm, 2007b). Tas bindet mit hoher Affinität an den internen Promoter (IP) und mit niedrigerer Affinität an den LTR-Promoter des Provirus (He et al., 1996). Der IP liegt im *env*-Bereich des Genoms und steuert die Expression der akzessorischen Proteine Tas und Bet. Er ist schwach aktiv, das heißt durch zelluläre Transaktivatoren kommt es in der Wirtszelle zu einer basalen Expression der akzessorischen Proteine (Delelis et al., 2003). Das exprimierte Tas erhöht zu Beginn des Replikationszyklus durch die erhöhte Affinität an den IP seine eigene Expression und damit seine Konzentration in der Zelle. Ist die Menge an exprimiertem Tas ausreichend hoch, kommt es durch die Bindung an den LTR-Promoter zur Transkription der viralen mRNAs von Gag, Pol und Env und dadurch zur Expression der viralen Proteine (Campbell et al., 1996, Delelis et al., 2003, Kang et al., 1998).

Als weiteres akzessorisches Protein der Foamyviren wird Bet über ein gespleißtes Transkript vom IP exprimiert. Es ist ein zytoplasmatisches Protein, welches sekretiert werden kann und besitzt die Fähigkeit, Zellen vor einer Superinfektion zu schützen (Bock et al., 1998). Löchelt et al., 2005 und Russell et al., 2005 konnten zeigen, dass Bet ebenso wie Vif bei HIV-1 mit zellulären antiviralen Restriktionsfaktoren (APOBEC-Proteine) interagieren kann und diese aus dem Replikationszyklus entfernt. Dadurch wird das Einfügen von Mutationen in das foamyvirale Genom verhindert und die Vitalität der Viren erhöht (siehe 1.4).

1.2.4 Replikationszyklus der Foamyviren

Der Replikationszyklus der Foamyviren ist in Abb. 1. 4 dargestellt (nach Linial, 1999). Er beginnt wie bei allen Retroviren mit der Interaktion des Env-Hüllproteins und dem Rezeptor der Wirtszelle. Der zelluläre Rezeptor von FV konnte bisher nicht identifiziert werden. Vermutlich ist es ein ubiquitär exprimiertes Oberflächenmolekül, da FVs in der Lage sind, eine große Anzahl verschiedener Zelllinien zu infizieren. Durch die Fusion der Virus- und der Wirtszellmembran mit Hilfe von Env (Pietschmann et al., 2000) kommt es zur Freisetzung des infektiösen viralen Genoms in das Zytoplasma, welches im Fall der Foamyviren aus dsDNA besteht (Roy et al., 2003, Yu et al., 1996a). Dies ist ein signifikanter Unterschied zu Orthoretroviren (z. B. HIV-1), bei denen genomische RNA in die Viruspartikel verpackt und bereits in der frühen Phase des Replikationszyklus, also nach der Infektion der Zielzelle, von der RT in dsDNA umgeschrieben wird (siehe Abb. 1. 5 b).

Die vorliegende DNA wird nun durch die Integrase als Provirus in das Wirtszellgenom integriert. Mit Hilfe zellulärer Transkriptionsfaktoren erfolgt bei Foamyviren über den Internen Promoter die Expression des Transaktivators Tas, worauf Tas bei ausreichender Konzentration den LTR-Promoter aktiviert (Delelis et al., 2003). Dadurch kommt es zur Bildung der mRNAs der Strukturproteine Gag, Pol und Env, zu deren Expression und zur Synthese der genomischen RNA. Im Gegensatz zu FV besitzt HIV-1 keinen Internen Promoter, die Expression seines Transaktivators (Tat) erfolgt ebenso wie die Expression aller anderen viralen Proteine über den LTR-Promoter. Die Tat-Expression ist wichtig für die Synthese der viralen Strukturproteine.

Erst jetzt, also spät im Replikationszyklus, erfolgt bei Foamyviren das Umschreiben der genomischen RNA in dsDNA durch die foamyvirale RT (siehe 1.3.1; (Moebes et al., 1997), welche über die Interaktion mit Gag in das virale Partikel verpackt wird. Trotz Vorliegen des viralen Genoms als dsDNA wird in die Partikel allerdings auch RNA verpackt (Heinkelein et al., 2002b, Lecellier & Saib, 2000, Linial, 1999, Roy et al., 2003, Yu et al., 1999). Die Zusammenlagerung der Gag- und Pol-Proteine mit dem Genom erfolgt im Zytoplasma, während Env im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums über den Golgi-Apparat glykosyliert, prozessiert und zur Zytoplasmamembran transportiert wird (Goepfert et al., 1999). Die im Zytoplasma gebildeten Kapside assoziieren schließlich mit Env und es kommt zur Knospung der Viruspartikel.

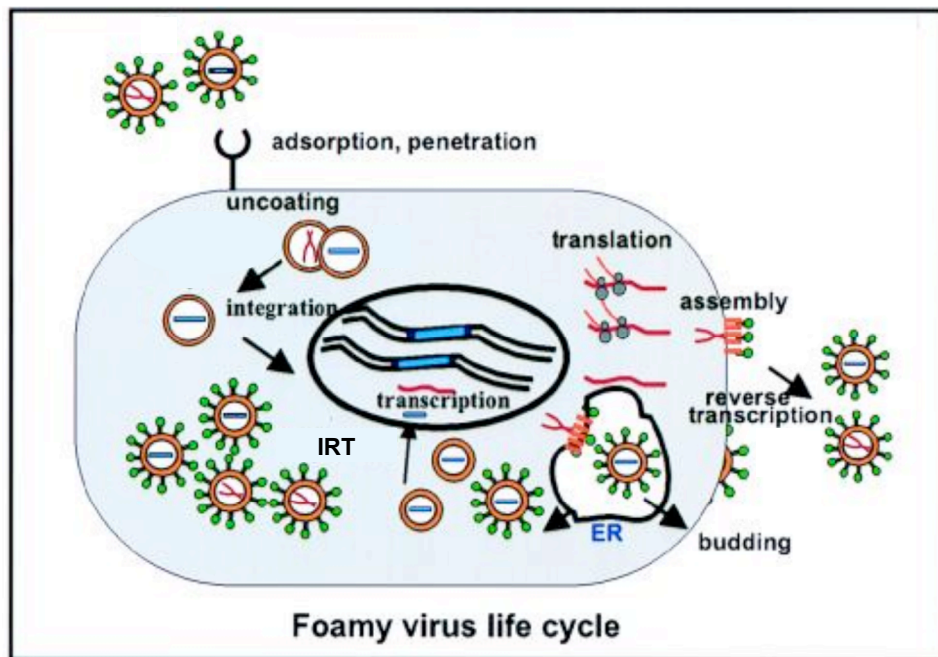


Abb. 1. 4: Der foamyvirale Replikationszyklus; nach Linial, 1999), Erläuterungen siehe Text

Die Viruspartikel von HIV erfahren nach dem Knospen eine Reifung. Durch die virale Protease findet die Prozessierung ihrer Gag- und Pol-Proteine statt, wodurch sie infektiös werden (Balvay et al., 2007).

Durch das Vorliegen viraler dsDNA in der Virus-produzierenden Zelle, erschließt sich für Foamyviren die Möglichkeit der intrazellulären Retrotransposition (IRT). Dieses Ereignis konnte von Heinkelein et al., 2003 bestätigt werden.

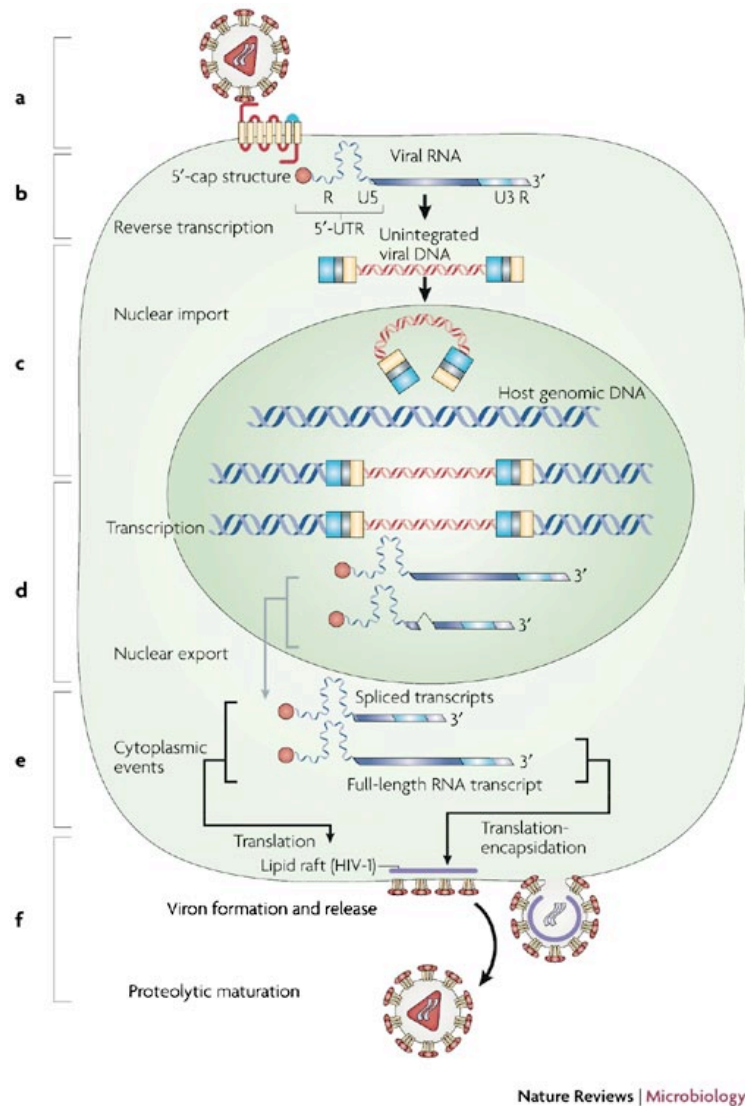


Abb. 1. 5: Replikationszyklus der Orthoretroviren am Beispiel von HIV-1 (Balvay et al., 2007); a – Env-Rezeptor-Interaktion, b – Membranfusion, Reverse Transkription, c – nukleärer Import, Integration, mRNA-Synthese, d – mRNA-Reifung, Spleißen, e – Proteinsynthese, Assembly, f - Budding

1.3 Charakterisierung der Reversen Transkriptase

1.3.1 Reverse Transkriptase und Ablauf der Reversen Transkription

Retroviren sind RNA-Viren, die jedoch ihr Genom während der Replikation obligat in die Wirtszell-DNA integrieren müssen. Da es in den Wirtszellen kein Enzym gibt, welches das Umschreiben von RNA in DNA durchführen kann, müssen Retroviren eine eigene RNA-abhängige DNA-Polymerase kodieren, die Reverse Transkriptase (RT). Sie ist auf dem *pol*-Gen lokalisiert und mit einer RNaseH-Aktivität gekoppelt (siehe 1.2.3). Die Entdeckung der

RT 1970 durch Temin & Mizutani, 1970 und Baltimore, 1970 sorgte für große Diskussionen, da bis dahin das Dogma des unidirektionalen Informationsflusses galt, welches besagt, dass genetische Informationen nur von DNA- auf RNA-Ebene weitergegeben werden kann. Mit der Entdeckung der RT ergaben sich nicht nur neue Sichtweisen auf den Replikationszyklus der Retroviren, sondern auch interessante Anwendungsmöglichkeiten dieses Enzyms. Inzwischen findet die RT Einsatz in vielen molekularbiologischen Bereichen, wie z. B. zur Erstellung von cDNA-Banken oder zur Bestimmung von RNA-Gehalten in Zellen durch quantitative RealTime Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR; Bustin et al., 2005).

Aufgebaut ist die retrovirale RT aus zwei Domänen. N-terminal befindet sich die DNA-Polymerase-Aktivität, c-terminal die RNaseH-Aktivität. Das Enzym ist als Dimer aktiv, wobei die Zusammensetzung variieren kann. Bei MLV liegt die RT z. B. als Homodimer vor (Georgiadis et al., 1995), während die HIV-1 RT ein Heterodimer aus der gesamten RT (DNA-Polymerase und RNaseH) und einem verkürzten Fragment (nur DNA-Polymerase) bildet (Huang et al., 1998). Im aktiven Zentrum der Polymerase-Untereinheit findet sich ein konserviertes Aminosäuremotiv (YXDD), welches für die Polymerase-Aktivität verantwortlich ist. In der RNaseH-Domäne findet man ein metallbindendes Motiv, dessen Mutation zum Verlust der RNaseH-Aktivität führt (Sharma et al., 2005).

Eine allgemeine Übersicht über den Ablauf der reversen Transkription bei Retroviren zeigt die Abb. 1. 6. Die genomische RNA ist ähnlich aufgebaut wie die provirale DNA, wobei ihre nicht-kodierenden Bereiche am 5'- und am 3'-Ende kürzer als die LTR-Bereiche (U3, R, U5) des Provirus sind. Am 5'-Ende der RNA fehlt die U3-Region, umgekehrt besitzt das 3'-Ende keine U5-Region.

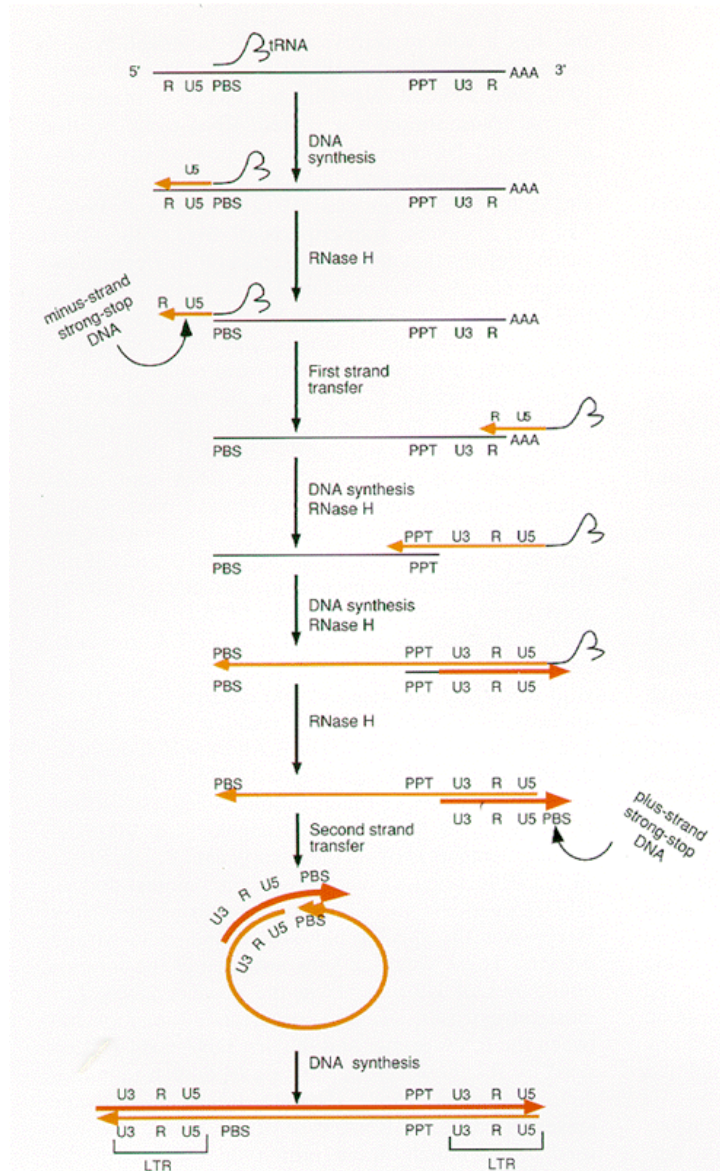


Abb. 1. 6: Reverse Transkription bei Retroviren (Coffin et al., 1997)

Die Initiation der reversen Transkription erfolgt an der Primer-Bindungsstelle (PBS), an welche eine zelluläre tRNA, die bei Foamyviren für Lysin ($tRNA^{Lys1,2}$) kodiert, gebunden ist (De Celis et al., 1994). Die Synthese des (-)DNA-Stranges erfolgt von der PBS bis zur 5'-R-Region, das heißt bis zum 5'-Ende des RNA-Stranges. Der RNA-Anteil des entstandenen DNA/RNA-Hybrids wird durch die RNase-Aktivität der mit der RT assoziierten RNaseH abgebaut. Es entsteht die Minus-Strang-strong-stop-DNA [(-)sssDNA]. Nun kommt es zum ersten Strangtransfer während der viralen DNA-Synthese. Durch die kurzen homologen R-Bereiche an beiden Enden der viralen RNA kann die (-)sssDNA vom 5'- zum 3'-Ende der RNA „springen“ und dort erneut an sie binden. Die (-)DNA-Synthese erfolgt nun bis zum Ende (PBS) des verbliebenen RNA-Stranges, welcher wiederum durch die RNaseH abgebaut

wird. Dieser Verdau ist nicht vollständig, da an purinreichen Sequenzen in der RNA (Polypurintrakt, PPT) die RNaseH in ihrer Funktion behindert wird, so dass hier einige RNA-Basen stehen bleiben. Diese dienen ihrerseits als Primer für die (+)DNA-Synthese, welche bis zur PBS im (-)DNA-Strang fortgesetzt wird. Nach Entfernen der dort gebundenen tRNA durch die RNaseH erfolgt der zweite Strangtransfer im Replikationszyklus der Retroviren, bei dem es zur Assoziation der komplementären PBS-Bereiche im (-) und (+)DNA-Strang kommt. Dies macht die vollständige Synthese der dsDNA möglich.

1.3.2 Hohe Diversität des retroviralen Genoms durch die Eigenschaften der Reversen Transkriptase

Die Reverse Transkriptase (RT) hat im Gegensatz zu zellulären DNA-Polymerasen den Nachteil, dass sie keine Korrekturlesefähigkeit besitzt. Dies bedeutet, dass eine, während der Synthese der viralen dsDNA eingefügte falsche Basenpaarung nicht korrigiert werden kann. Das kann einerseits zum Abbruch der Synthesereaktion führen, andererseits zum Einfügen von Mutationen in das retrovirale Genom, wenn die RT trotz der Fehlpaarung die Synthese der dsDNA beendet. Da die RT die gesamte virale dsDNA synthetisiert, kann es sowohl im (-)DNA- als auch im (+)DNA-Strang zum Einfügen von Mutationen kommen.

Retrovirale RTs besitzen eine hohe Mutationsrate, die bei HIV-1 *in vivo* $3,4 \times 10^{-5}$ pro Base pro Replikationszyklus beträgt (Mansky & Temin, 1995). Dies führt zum Auftreten verschiedenster Mutationen innerhalb einer Viruspopulation, die somit kein einheitliches Genom mehr aufweist. Dadurch liegen im infizierten Wirt stets Viren mit unterschiedlichen Mutationen vor, weshalb ihre Population als Quasispezies definiert wird.

Neben dem Einfügen von Mutationen ist der Strangtransfer (englisch: Template-Switching) zwischen homologen RNA-Matrizen während der reversen Transkription eine Eigenschaft der RT. Normalerweise erfolgt das „switchen“ der RT zweimal während der Synthese der viralen dsDNA (siehe 1.3.1), zuerst zwischen den homologen R-Regionen während der (-)DNA-Strang-Synthese, danach zwischen den PBSs bei der (+)DNA-Strang-Synthese (Zhang & Temin, 1994). Da in die Viruspartikel je zwei homologe RNA-Moleküle verpackt werden, können diese Ereignisse intra- oder intermolekular stattfinden. Die Homologie der RNA-Moleküle macht außerdem das Template-Switching in anderen Bereichen als den R- bzw. PBS-Regionen möglich. Während der reversen Transkription kann die RT also entweder nur einen RNA-Strang als Matrize für die DNA-Synthese verwenden, oder sie springt währenddessen auf das zweite homologe RNA-Molekül (siehe Abb. 1. 7).

Dieses Ereignis wurde bereits für verschiedene Retroviren, wie z. B. das Murine Leukämievirus (MLV) oder HIV-1 bestätigt. Dabei zeigte MLV eine geringe Rate von 4,7 % (Anderson et al., 1998) innerhalb von 1 kb pro Replikationsrunde, im Gegensatz zu HIV-1, mit einer Rate von 42,4 % (Rhodes et al., 2003) pro 1 kb pro Replikationsrunde. Nähere Analysen ergaben jedoch, dass die TS-Rate von MLV ähnlich der von HIV-1 ist (Onafuwa et al., 2003). Dies liegt daran, dass coexprimierte RNA-Moleküle präferentiell gemeinsam verpackt werden (Onafuwa et al., 2003, Zhuang et al., 2006). Dieses Ereignis kann zur Kombination von Mutationen führen, welche die Vitalität von Viren begünstigen. Wurde zum Beispiel eine Zelle von zwei Viren mit unterschiedlichen, für die jeweiligen Viren positiven Mutationen infiziert, kann eine Rekombination zwischen diesen beiden Genomen stattfinden und das dadurch entstandene Virus beide Mutationen kombinieren. Außer der Kombination unterschiedlicher Genome mit Hilfe der RT durch das Ereignis des Template Switchings können noch andere Mutationen durch die RT auftreten, wie das Einfügen von Insertionen oder Deletionen in den DNA-Strang (Pathak & Temin, 1990, Temin, 1993).

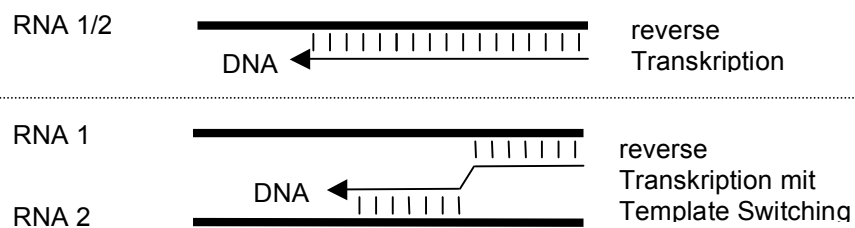


Abb. 1. 7: Ereignis des Template Switchings während der Reversen Transkription

Auch Rekombination zwischen wenig homologen Sequenzen kann stattfinden. Dadurch kann es vorkommen, dass die Virus-DNA mit zellulären Bereichen rekombiniert. Dieses Ereignis ist jedoch mehr als 1000fach niedriger als die virale, homologe Rekombination und mit einer Rate von weniger als 0,1 % vernachlässigbar (Onafuwa et al., 2003). Rekombination zwischen wenig homologen, pathogenen Viren stellt jedoch eine Gefahr dar, die zum Auftreten von Viren mit verändertem Wirtsspektrum oder veränderter Pathogenität führen kann. Motomura et al., 2008 haben das Auftreten solcher Rekombinanten zwischen HIV-1 und HIV-2 gezeigt.

Die Auswirkungen der beschriebenen Mutationen sind für die Viren unterschiedlich. Das Einfügen von Stop-Codons in die Leserahmen, das Einfügen von Insertionen oder Deletionen sowie der Austausch von Aminosäuren in den viralen Proteinen können für das Virus letal sein und zu einem Funktionsverlust der betroffenen Enzyme führen. Es ist aber auch möglich, dass den Retroviren durch die Mutationen ein Vorteil bei der Anpassung an veränderte

Umweltbedingungen verschafft wird, was unter anderem zu ihrer hohen genetischen Diversität führt. Dies kann ihnen einen Vorteil gegenüber dem Immunsystem des Wirtes bringen, die Erweiterung ihres Wirtsspektrums zur Folge haben oder die Entwicklung von Resistenzen gegen antiretrovirale Medikamente fördern.

Da die RT im retroviralen Replikationszyklus eine so wichtige Rolle spielt, jedoch in eukaryotischen Zellen nicht vorkommt, stellt sie ein sehr gutes Ziel besonders in der HIV-Therapie dar. Therapeutische Anwendung finden z. B. chemisch aufgearbeitete Nukleosid- oder Nukleotidanaloga, welche in den neusynthetisierten DNA-Strang eingebaut werden. Da die retrovirale RT diese Fehler nicht korrigieren kann, kommt es zum Kettenabbruch und es kann kein vollständiges virales Genom synthetisiert werden.

1.4 Zelluläre Restriktionsfaktoren

1.4.1 Eigenschaften verschiedener zellulärer Restriktionsfaktoren

Gegen eingedrungene Pathogene in den Organismus haben Wirbeltiere verschiedene Schutzmechanismen entwickelt. Dazu gehört die angeborene, unspezifische Immunantwort (Monozyten/Makrophagen, Komplementsystem), welche ungerichtet gegen Krankheitserreger wirkt. Die spezifische, adaptive Immunantwort wirkt gerichtet gegen Pathogene (B-Lymphozyten, Antikörper). In der letzten Zeit sind außerdem eine Reihe von zellulären Restriktionsfaktoren identifiziert worden, welche eine antivirale Wirkung innerhalb von Zellen besitzen. Das erste bekannte Restriktionsenzym war das humane APOBEC3G, welches als CEM15 von Sheehy et al., 2002 identifiziert wurde. Die genaue Wirkungsweise von Vif gegen dieses Protein wurde erst später geklärt (siehe 1.4.2).

Im Laufe der Zeit wurden weitere zelluläre Restriktionsfaktoren entdeckt, die ebenfalls antivirale Wirkung, jedoch unterschiedliche Wirkmechanismen besitzen. Solche Restriktionsfaktoren sind z. B. AID (activation-induced deaminase), verschiedene APOBEC-Proteine (apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like complex 3) oder TRIM5 (Harris et al., 2003, Harris & Liddament, 2004, Luban, 2007).

Am besten charakterisiert sind die Proteine der APOBEC-Familie, da diese eine sehr starke Wirkung gegen HIV-1 zeigen (Harris & Liddament, 2004) und somit in der HIV-Therapie eine Rolle spielen könnten. APOBEC-Proteine findet man nur bei Vertebraten, wobei im Laufe der Evolution vom Fisch zum Menschen ihre Anzahl zugenommen hat. Die Ursache dafür war wahrscheinlich die Vervielfältigung der Gene in den Chromosomen (Übersicht bei Harris & Liddament, 2004). Die APOBEC-Familie im Menschen umfasst elf Proteine (AID,

humanes APOBEC1, APOBEC2, APOBEC3A, 3B, 3C, 3D, 3DE, 3F, 3G und 3H). Sie weisen entweder eine (AID, hA1, hA2, hA3A, hA3C, hA3D, hA3H) oder zwei Deaminase-Domänen (hA3B, hA3D-3E, hA3F, hA3G) auf, mit welcher sie über eine Zink-Finger-Domäne Nukleinsäure (RNA oder DNA) binden können (Harris & Liddament, 2004). Ihre Wirkung besteht in der Deaminierung von Nukleotiden, wodurch es zum Einfügen von Mutationen in das virale Genom kommt (siehe Abb. 1. 8). Die Expression der APOBEC-Proteine ist je nach Zelltyp unterschiedlich und die genaue Funktion ist noch nicht für alle Enzyme geklärt.

Die Wirkung der APOBEC-Proteine beschränkt sich jedoch nicht nur auf die Restriktion von Viren. Für APOBEC3A, 3B und 3G konnte eine Wirkung gegen intrazelluläre Retrotransposons gezeigt werden (Bogerd et al., 2006, Chen et al., 2006, Esnault et al., 2006). APOBEC3G und 3B sind in der Lage die reversen Transkripte der Retrotransposons zu editieren und so durch Einfügen von Mutationen die Funktion ihrer Proteine zu stören (Bogerd et al., 2006, Esnault et al., 2006). Der Wirkmechanismus von APOBEC3A ist noch nicht geklärt (Bogerd et al., 2006). Das Beispiel zeigt, dass Zellen Mechanismen entwickelt haben, um ihr Genom vor der Integration von Retroelementen und dadurch vor Mutationen und Zerstörung wichtiger Gene zu schützen.

AID spielt eine bedeutende Rolle in B- und T-Zellen, wo es für die Reifung der Immunglobuline notwendig ist. Durch Deaminierungen auf DNA-Ebene kommt es in den Bereichen, welche Antigene erkennen, zur somatischen Hypermutation, was eine höhere Diversität der Antikörper zur Folge hat. Auch bei der Isotypänderung der Antikörper (z. B. von IgM zu IgG) ist AID beteiligt (Durandy, 2003, Franca et al., 2006, Harris & Liddament, 2004)

1.4.2 Interaktion von HIV-1 Vif mit hAPOBEC3G und hAPOBEC3F

Wie unter 1.4.1 erwähnt, ist Vif bei HIV dafür verantwortlich, dass die Infektiosität des Virus in bestimmten, APOBEC-exprimierenden Zellen erhalten bleibt. Um eine mögliche Anwendung dieser Proteine im Bereich der HIV-Therapie zu erreichen, ist die Charakterisierung der APOBEC-Vif-Interaktion notwendig. Da das humane APOBEC3G (hA3G) und APOBEC3F (hA3F) den größten Einfluss auf die HIV-Replikation zeigen, sind diese die am besten untersuchten Mitglieder dieser Familie.

Die Enzyme hA3G und hA3F sind Cytidin-Deaminasen, welche Cytidin zu Uracil deaminieren können. Dies erfolgt präferenziell in einzelsträngiger DNA (Yu et al., 2004). Die

Anwesenheit von Uracil in DNA führt entweder zu deren Fragmentierung und Abbau, da diese als fehlerhaft erkannt wird, oder zur Inkorporation eines Adenin (statt Guanin) während der Synthese des entsprechenden komplementären Stranges. Die Aktivität von hA3G und hA3F ist also durch das Einfügen von G- (Guanin) zu-A-Hypermutationen gekennzeichnet, wobei hA3G und hA3F für die Deaminierung unterschiedliche Konsensussequenzen bevorzugen. So mutiert hA3G vorwiegend GG, hA3F dagegen eher GA (Holmes et al., 2007, Liddament et al., 2004).

Während des retroviralen Replikationszyklus kommt es bei der (-)DNA-Synthese zum Abbau des RNA-Anteils im entstandenen DNA/RNA-Hybrid (siehe 1.3.1). Somit stellt der gebildete DNA-Einzelstrang ein gutes Ziel für die Aktivität der APOBEC-Enzyme dar. Da die retrovirale Reverse Transkriptase keine Korrekturlesefähigkeit besitzt, kann sie die eingefügten Mutationen nicht entfernen. Für verschiedene Retroviren wie HIV-1 (Rose & Korber, 2000, Vartanian et al., 1994) und SNV (Kim et al., 1996) wurde das Auftreten von G-zu-A-Hypermutationen im (+)DNA-Strang bereits gezeigt. Weiterhin konnten für hA3G und hA3F außer der DNA-Editierung noch weitere antivirale Wirkungen nachgewiesen werden. Sie reduzieren z. B. die Akkumulation und somit die Verfügbarkeit retroviraler Transkripte in den Zellen (Holmes et al., 2007, Newman et al., 2005).

Die schützende Wirkung des Vif-Proteins in Bezug auf das HIV-Genom besteht in der Ubiquitinierung von hA3G und hA3F mit Hilfe weiterer zellulärer Proteine, was zum proteasomalem Abbau der APOBEC-Proteine führt. Kobayashi et al., 2005 konnten die Bildung eines Ubiquitin-Ligase-Komplexes unter Beteiligung der Proteine Cullin5, ElonginB, ElonginC und Vif zeigen, welcher die Polyubiquitinierung von hA3G induziert. Dadurch wird es zu den Proteasomen dirigiert und dort prozessiert. Dies führt zur Abnahme der hA3G-Konzentration in der Zelle (Sheehy et al., 2003). Ohne Vif kann der Ubiquitin-Ligase-Komplex nicht gebildet werden, hA3G wird in die viralen Partikel verpackt und kann in den Zielzellen seine deaminierende Wirkung auf den neusynthetisierten (-)DNA-Strang ausüben (siehe Abb. 1. 8 b), was zum Einfügen von G-zu-A-Mutationen im (+)DNA-Strang führt.

Auch Foamyviren haben einen APOBEC-Antagonisten entwickelt, das Bet-Protein. Im Gegensatz zu Vif kommt es durch Bet jedoch nicht zu einer Degradierung und Konzentrationsabnahme von hA3G in der Zelle (Löchelt et al., 2005, Russell et al., 2005). Die genaue Wirkungsweise von Bet ist noch nicht geklärt. Obwohl diskutiert (Delebecque et al., 2006), gibt es Hinweise, dass Bet die Inkorporation von APOBEC in die Viruspartikel verhindert (Löchelt et al., 2005, Russell et al., 2005).

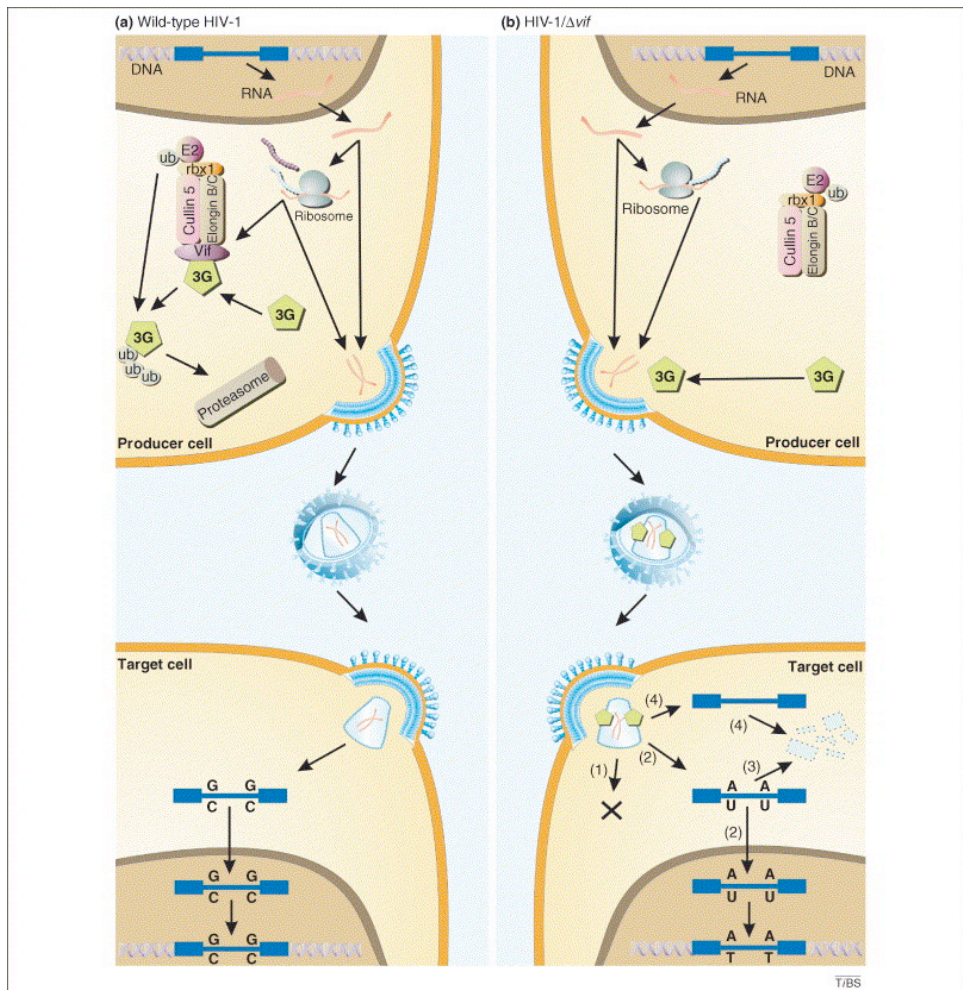


Abb. 1. 8: Wirkung von APOBEC3G und Vif auf die Synthese des retroviralen Genoms (Holmes et al., 2007)

1.5 Aufgabenstellung dieser Arbeit

1.5.1 Charakterisierung der Reversen Transkriptase von PFV

Ziel der Arbeit war die molekularbiologische Charakterisierung der foamyviralen Reversen Transkriptase in Bezug auf Mutationsrate und Rekombination/Template Switching-Rate.

Wie in 1.2.1 beschrieben, sind Foamyviren apathogen, besitzen eine hohe Verpackungskapazität und ihr Genom integriert stabil in das ihrer Wirtszellen. Dadurch stellen sie unter anderem ein interessantes Werkzeug im Bereich der Gentherapie dar. Um Foamyviren als gentherapeutische Vektoren so sicher wie möglich zu machen, ist es wichtig, möglichst alle Schritte in ihrem Replikationszyklus zu kennen und zu charakterisieren. Die Analyse der foamyviralen Integrationsorte im eukaryotischen Genom zeigte bereits, dass Foamyviren ein anderes, mehr zufälliges Integrationsmuster aufweisen, als z. B. MLV oder HIV-1 (Nowrouzi

et al., 2006, Trobridge et al., 2006). Im Gegensatz zu HIV-1 bevorzugen sie zur Integration nicht die aktiven Gene, was ein klarer Vorteil ist. Auch die Charakterisierung der foamyviralen RT ist im Zusammenhang mit der Entwicklung foamyviraler, gentherapeutischer Vektoren wichtig, da z. B. durch das Einfügen von Mutationen durch die RT oder die Rekombination des Genoms beim Template Switching das therapeutische Gen zerstört oder so verändert werden kann, dass es wirkungslos wird. Aufgrund der offensichtlich hohen Stabilität ihres Genoms in ihren Wirten (Switzer et al., 2005) lag die Vermutung nahe, dass Foamyviren auch in Hinsicht auf Mutationsrate und Template-Switching-Rate einen Unterschied bzw. Vorteil gegenüber Orthoretroviren zeigen.

Zur Rekombinationsrate liegen für verschiedene Retroviren bereits Daten vor. So wurde für HIV-1 eine Rate von 42,4% (Rhodes et al., 2003), für MLV dagegen von nur 4,7% (Anderson et al., 1998) pro Replikationszyklus und einem Markerabstand von 1000 Basen ermittelt. Diese Arbeit zeigt, in welcher Größenordnung die RT des Prototypischen Foamyvirus zwischen zwei RNA-Templates springen kann und wie sie sich dabei von MLV unterscheidet. Bei den Experimenten wurde jedoch die präferentielle Verpackung koexprimierter RNAs nicht berücksichtigt.

Zur Bestimmung der Mutationsrate der foamyviralen RT gibt es ebenfalls Daten, die jedoch in *in vitro*-Experimenten ermittelt wurden. Sie zeigten, dass die Mutationsrate in etwa so hoch ist wie die der HIV-1-RT (Boyer et al., 2007). Die vorliegende Arbeit sollte zeigen, wie hoch die Mutationsrate der foamyviralen RT *in vivo* (Zellkultur) ist und zusätzlich den Einfluss von Bet auf die G-zu-A-Mutationshäufigkeit zeigen.

1.5.2 Möglichkeit des Crosspackaging bei Foamyviren

Das Crosspackaging des Genoms unterschiedlicher Retroviren ist ein interessanter Punkt bei der Entwicklung gentherapeutischer Vektoren der ebenfalls zur Erhöhung ihrer Sicherheit beiträgt. Die Produktion der viralen Partikel erfolgt meist durch transiente Transfektion von Verpackungszelllinien mit einem Plasmid, das als RNA-Donor dient, oder durch Transfektion von Zellen mit Plasmidsystemen, welche die verschiedenen viralen Komponenten einzeln (*in trans*) zur Verfügung stellen. Dadurch entsteht die Möglichkeit der Rekombination zwischen den homologen viralen Sequenzen, was die Bildung replikationsfähiger Viren zur Folge haben kann. Durch die Verwendung eines heterologen Genoms in Bezug auf die viralen Proteine wird die Homologie zwischen den Nukleinsäuresequenzen der verwendeten Plasmide verringert, welche für die verpackbare RNA bzw. die Strukturproteine kodieren.

Somit ist die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Rekombinanten und damit replikationskompetenten Viren herabgesetzt.

Es konnte bereits für verschiedene Viren das Crosspackaging ihres Genoms gezeigt werden. So ist es möglich, RNA des Murinen Leukämievirus (MLV) mit Proteinen des Spleen Nekrose Virus (SNV) zu verpacken (Yin & Hu, 1997), das SNV-Genom wird jedoch nicht durch MLV-Proteine verpackt (Certo et al., 1998). Auch für HIV-1 wurden Crosspackaging-Versuche durchgeführt, wobei sich gezeigt hat, dass HIV-1-Proteine das Genom von HIV-2, SIV und FIV verpacken konnte, mit HIV-2-Proteinen und HIV-1-Genom jedoch keine infektiösen Partikel gebildet wurden (Strappe et al., 2005). Die HIV-1-RNA kann in SNV-Partikel inkorporiert werden (Parveen et al., 2004).

Durch Crosspackaging des Genoms mit Proteinen verwandter Viren kann es zur Veränderung des Zelltropismus der entstehenden Partikel kommen, wie Goujon et al., 2003 beobachten konnten. Sie zeigten, dass die Transduktionseffizienz von HIV-1-Partikeln, welche das SIV-Genom verpackten, auf bestimmten humanen Zelllinien (Dendritische Zellen, Makrophagen) herabgesetzt war, während sie auf anderen die gleiche Effizienz wie die parentalen HIV-1-Viren zeigten. Dies macht deutlich, dass auch die Transduktionseffizienz von bestimmten Zelllinien ein wichtiges Merkmal für die Charakterisierung der heterologen Viruspartikel ist.

In dieser Arbeit sollte gezeigt werden, ob das Genom des Prototypischen Foamyvirus mit Proteinen des Simian Foamyvirus (Rhesusmakaken-Isolat) verpackt werden kann bzw. umgekehrt. Die beiden Viren weisen eine Homologie ihrer Nukleotidsequenz zwischen 50 % und 80 % auf, je nach untersuchtem Genomabschnitt (Herchenröder et al., 1994). Es sollte die Effizienz der Transduktion humaner Zellen durch parentale und heterologe Viruspartikel getestet werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Verwendete Geräte und Materialien

Autoklav	H+P Labortechnik GmbH (Varioklav Dampfsterilisator)
Bakterienbrutschrank	Heraeus
Bakterienschüttler	New Brunswick Scientific
Blotkammer	Institutswerkstatt
Eismaschine	Scotsman AF 10
Elektrophoresekammern	Institutswerkstatt
Elektrophoresespannungsgeber	Consort (E455)
FACSCalibur	BD Biosciences
FACSDiVa Optima	BD Biosciences
Filterpapier	Whatman
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss (Axiovert S100)
Gefrierschrank	Bosch
Handschuhe	Kimberly-Clark; Roth
Heizblock	Stuart Scientific
Kühlschrank (+4°C)	Bosch
Laborwaage	Sartorius (BP 2100 S)
Magnetrührer	GLW (M32)
Mikroskop	Zeiss (Axiovert 25)
Mikrowelle	Bosch
Neubauerzählkammer	Marienfeld
Hybond TM -ECL TM -Nitrozellulosemembran	Amersham Biosciences
PCR-Maschine (TPersonal)	PE Applied Biosystems
pH-Meter	inoLab (WTW)
Photometer	Eppendorf, Pharmacia Biotech
Pipetten	Gilson, Eppendorf
Plastikküvetten	Brand
Plastikmaterial	Greiner, Eppendorf, Nunc
Real Time PCR-Maschine (iCycleriQ)	BioRad
Röntgenfilme X-ray Retina XBD	Noras

SDS-Elektrophoresekammern	Institutswerkstatt
Sequenziergerät	Applied Biosystems (ABI PRISM™ 3100 Genetic Analyser)
Sterilarbeitsbank	Nuaire
Sterilfilter (0,22 µm, 0,45 µm)	Schleicher & Schuell
Ultrazentrifuge (Discovery 90SE)	Sorvall
Ultrazentrifugenröhrchen (Polyallomer)	Beckmann
Ultrazentrifugenrotor (Surespin 630)	Sorvall
UV-Handlampe	A. Hartenstein
Vortexer	GLW (L46)
Wasserbad	IKA® TER2
Wippe	Heidolph (Duomax 1030), Assistent
Zellkulturbrutschrank	Hereaus
Zentrifugen	Eppendorf, Heraeus, Beckmann Coulter

2.2 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien von den Firmen Hartenstein, Appllichem, Merck, Roth und Sigma-Aldrich bezogen.

Angefärbter Proteinmarker	MBI Fermentas
Bovines Serumalbumin (BSA)	New England BioLabs (NEB)
Desoxynukleotid-Mix (dNTPs)	MBI Fermentas
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM)	Invitrogen Corp. (Gibco)
Fluorescein	BioRad
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrome AG
Penicillin	Invitrogen Corporation (Gibco)
Streptomycin	Invitrogen Corporation (Gibco)
LB Terrific Broth	Invitrogen Corporation (Gibco)
Trypsin	Invitrogen Corporation (Gibco)
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen
Zeocin	Cayla

2.3 Kits

BigDye Terminator® v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
iScript™ cDNA Synthesis Kit	BioRad
Squeeze'n Freeze Kit	BioRad
QIAGEN® Blood and Tissue Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAshredder™	Qiagen
QuantiTect Primer Assays:	Qiagen
hA3G: Hs_APOBEC3G_1_SG	QuantiTect Primer Assay (200) (QT00070770)
Actinβ: Hs_SDHALP1_2_SG	QuantiTect Primer Assay (200) (QT01677802)
SDHA: Hs_ACTB_2_SG	QuantiTect Primer Assay (200) (QT01680476)
GAPDH: Hs_GAPDH_2_SG	QuantiTect Primer Assay (200) (QT01192646)
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Nucleobond® PC500	Machery und Nagel
GenElute PCR Clean-Up Kit	Sigma

2.4 Enzyme

Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)	MBI Fermentas
Klenow Fragment	MBI Fermentas
Powerstrip Polymerase (Pwo)	PeqLab
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, NEB
RNaseA	Roth
T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas
T4 DNA-Polymerase	MBI Fermentas
Thermus aquaticus-Polymerase (Taq)	PeqLab

2.5 Verwendete Organismen

Tab. 2. 1: *E.coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle
DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lac</i> <i>UI69</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M 15) <i>hsdR17</i> <i>recA1end A1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	Invitrogen (Karlsruhe, D)
JM109	<i>e14</i> ^(McrA⁻) <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i> (τ K- mk+) <i>supE44</i> <i>relA1</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) [<i>F'</i> <i>traD36</i> <i>proAB</i> <i>lacI</i> ^q Δ M15]	Stratagene (Amsterdam, NL)
Top10F'	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen (Karlsruhe, D)

Tab. 2. 2: Zelllinien

Stamm	Beschreibung	Quelle
HEK 293T	humane Nierenzellen, die das große T-Antigen von SV40 stabil exprimieren	ATCC: CRL-11268
HEK 293	humane Nierenzellen	ATCC: CRL-1573
HeLa	Cervikale Carcinomzellen von Henrietta Lacks (1951)	ATCC: CCL-2
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells	Abteilung für Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Würzburg, Hr. Opitz

2.6 Nukleinsäuren

Tab. 2. 3: Vektoren

Bezeichnung	Größe (bp)	Verwendung	Quelle
pCHSRV-2	16183	PCR-Template	Moebes et al., 1997
pMD9	9940	RNA-Donor	Heinkelein et al., 2002a
pCZIgag2	8827	CMV-getriebenes Expressionsplasmid für PFV Gag	Heinkelein et al., 2002a
pCZIpol	10185	CMV-getriebenes Expressionsplasmid für PFV Pol	Stange et al., 2005
pCZenvEM002	7948	CMV-getriebenes Expressionsplasmid für PFV Env	Lindemann & Rethwilm, 1998
pLENbet	7150	CMV-getriebenes Expressionsplasmid für PFV Bet, im MLV-Kontext	Bock et al., 1998

Bezeichnung	Größe (bp)	Verwendung	Quelle
pHIT60	12394	Verpackung von MLV-DNA in Viruspartikel mit Hilfe von pczVSV-G wt	Soneoka et al., 1995
pMH119	12978	RNA-Donor; Klonierungsvektor	Michael Bock/ Bianca Fries, persönlich
pCIpol	7594	CMV-getriebenes Expressionsplasmid für SFV Pol	Ayalew Mergia, persönlich
pCIenv3.5	7475	CMV-getriebenes Expressionsplasmid für SFV Env	Ayalew Mergia, persönlich
pCIgag-1	5934	CMV-getriebenes Expressionsplasmid für SFV Gag	Ayalew Mergia, persönlich
pEGFPD	12965	SFV-Vektor mit Expressionskassette für EGFP-Markerprotein	Ayalew Mergia, persönlich
pczVSV-G wt (pcVG-wt)	6691	Verpackung von MLV-DNA in Viruspartikel mit Hilfe von pHIT60	Pietschmann et al., 1999
pcDNA3.1 zeo+	5015	Kontrollplasmid ohne Expressionskassette	Invitrogen
pcDNA hA3F	nicht bekannt	Expressionsplasmid für hAPOBEC3F	Bryan Cullen, persönlich
pcDNA hA3G	nicht bekannt	Expressionsplasmid für hAPOBEC3G	Bryan Cullen, persönlich
pGEM®-T Easy	3016	TA-Klonierung von PCR-Produkten	Promega
pSilencer 2.0-U6	3130	Testen von siRNAs	Ambion
psiCheck 2.0	6273	Testen von Genexpressionen mittels Luciferase-Assay	Promega

Tab. 2. 4: Expressionsplasmide für die Herstellung stabiler Zelllinien

Plasmidbezeichnung	Größe (bp)	Genommerkmale	Quelle
pJS30-1kb	nicht bekannt	MLV Vektor mit Expressionskassette für Hygromycin- und Neomycinresistenz	Anderson et al., 1998
pJA31-1kb	nicht bekannt	MLV Vektor mit Expressionskassette für Neomycinresistenz, Mutation in Hygromycinresistenzgen	Anderson et al., 1998
pJA32-1kb	nicht bekannt	MLV Vektor mit Expressionskassette für Hygromycinresistenz, Mutation in Neomycinresistenzgen	Anderson et al., 1998
pKG80	11708	PFV Vektor mit Expressionskassette für Hygromycin- und Neomycinresistenz	diese Arbeit

Plasmidbezeichnung	Größe (bp)	Genommerkmale	Quelle
pKG81	11706	PFV Vektor mit Expressionskassette für Neomycinresistenz, Mutation in Hygromycinresistenzgen	diese Arbeit
pKG82	11709	PFV Vektor mit Expressionskassette für Hygromycinresistenz, Mutation in Neomycinresistenzgen	diese Arbeit
pKG83	10224	PFV Vektor mit Expressionskassette für EGFP (eukaryotischer Marker) und LacZ (prokaryotischer Marker)	diese Arbeit
pKG84	10189	PFV Vektor mit Expressionskassette für EGFP unter dem CMV-Promoter	diese Arbeit

Plasmidkarten:

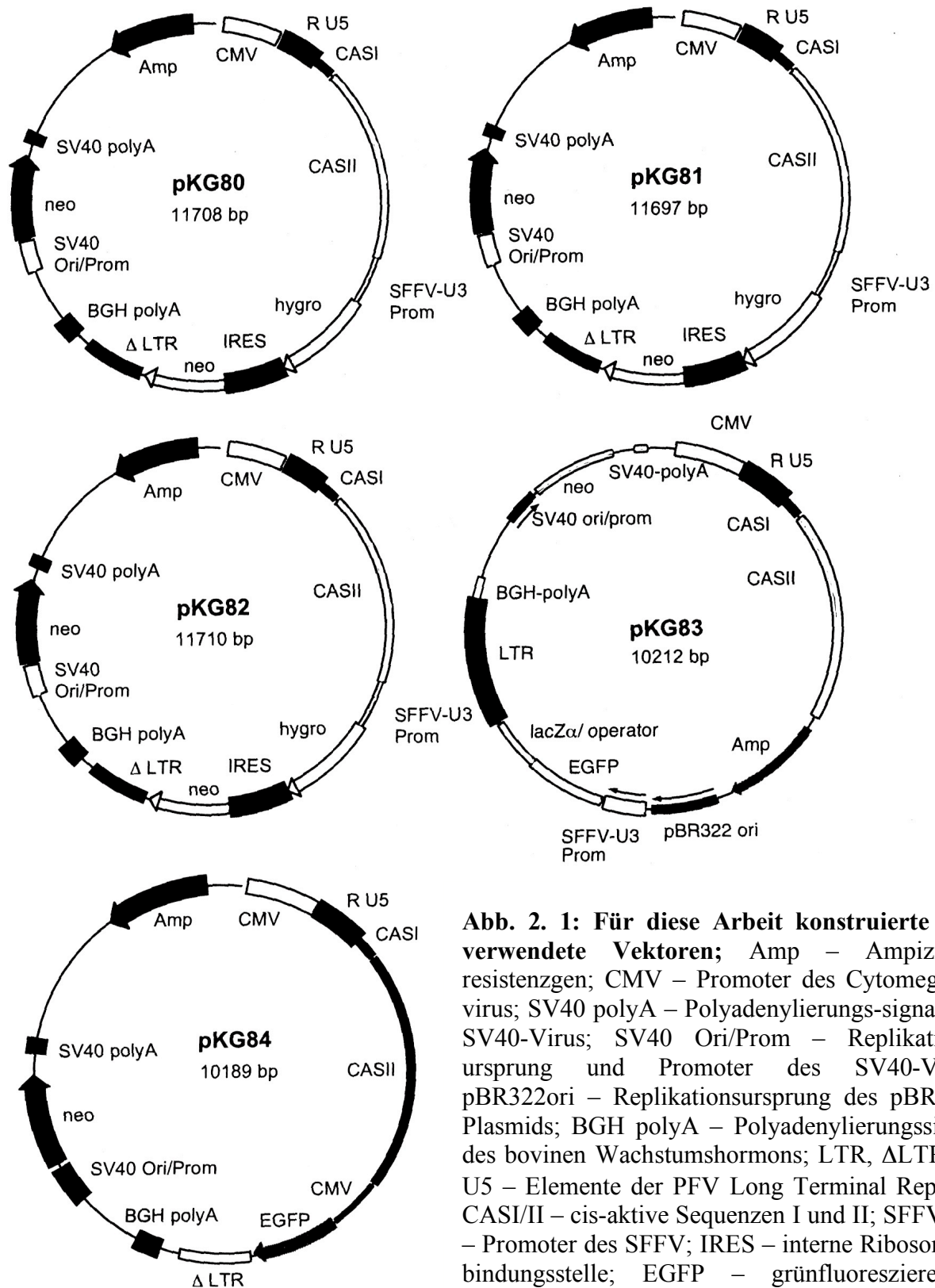


Abb. 2. 1: Für diese Arbeit konstruierte und verwendete Vektoren; Amp – Ampizillin-resistenzgen; CMV – Promoter des Cytomegalievirus; SV40 polyA – Polyadenylierungs-signal des SV40-Virus; SV40 Ori/Prom – Replikationsursprung und Promoter des SV40-Virus; pBR322ori – Replikationsursprung des pBR322-Plasmids; BGH polyA – Polyadenylierungssignal des bovinen Wachstumshormons; LTR, ΔLTR, R, U5 – Elemente der PFV Long Terminal Repeats; CASI/II – cis-aktive Sequenzen I und II; SFFV-U3 – Promoter des SFFV; IRES – interne Ribosomenbindungsstelle; EGFP – grünfluoreszierendes Protein; lacZα/ operator – LacZα-Fragment und Operator; hygro – Hygromycinresistenzgen; neo – Neomycinresistenzgen

Tab. 2. 5: Primer

Primer (Nr.)	Sequenz (5' -> 3')	T _m in °C	Verwendungszweck
651	ACAACAACGTGACT GAACAGC	58,4	Sequenzierprimer
1854	GCGAGAGCCTGACCT ATTG	57,9	Klonierungsprimer für Hygro-IRES- Neo-Kassette, Sequenzierprimer
1855	AAGGAATCGGTCAAT ACAC	42,1	Sequenzierprimer
1856	GATGAATCCAGAAAA GC	41,2	Klonierungsprimer für Hygro-IRES- Neo-Kassette, Sequenzierprimer
1857	GATACTTTCTCGGCAG G	52,9	Sequenzierprimer
1873	CATCTTCTTCTGGAGG	50	Sequenzierprimer
1874	CGTCCGAGGGCAAAG G	68,8	Sequenzierprimer
1875	GGACGATTGCGTCGC ATCG	63,2	Sequenzierprimer
1876	CGGTGTCGTCCATCAC	62,5	Sequenzierprimer
1877	GGCGCAGCTATTTACC	56,3	Sequenzierprimer
1878	AACCTGCGTGCAATC C	56,3	Sequenzierprimer
1879	ATGCCGCCGTGTTCCG	68,8	Sequenzierprimer
1880	CCAAGCGAAACATCG C	56,3	Sequenzierprimer
1881	GGCGAATGGGCTGAC C	68,8	Sequenzierprimer
1882	CCGAACCACGGGGAC G	75	Sequenzierprimer
1883	GCAGTTCCTCTGGAA G	56,3	Sequenzierprimer
1884	CGAGGCCCCAGATCA G	68,8	Sequenzierprimer
1885	CCGGGCCCTCACATTG	68,8	Sequenzierprimer
4229	CGGCGGCCGCTCGA GGTTGGCGGGTGTGCG GGGCTG	84,3	Amplifikationsprimer für <i>lacZα</i> - Fragment (mit <i>NotI</i> -Schnittstelle)
4230	CGGCGGCCGCGGCTT TACAC	67,5	Amplifikationsprimer für <i>lacZα</i> - Fragment (mit <i>NotI</i> -Schnittstelle)
4250	CATAAGCTTACTTACT TATCGC	36,4	PCR-Primer, Sequenzierprimer
4251	CTTCTTCAACCTTTGC TGAATGGG	45,8	Sequenzierprimer
4252	AATGAATAAAGCGCA TGAGGCAC	43,5	Sequenzierprimer
4253	ACAACGATCGGAGGA CCGAAGGAGC	60	Sequenzierprimer
4254	CCACTGAGCGTCAGA CCC	66,7	PCR-Primer, Sequenzierprimer
4255	CCACCTCTGACTTGAG CGTC	60	Sequenzierprimer

Primer (Nr.)	SEQUENZ (5' -> 3')	Tm in °C	Verwendungszweck
4256	GCTGGACGGCGACGT AAACG	65	Sequenzierprimer
4257	CCAACGAGAAGCGCG ATCACATGG	58,3	Sequenzierprimer
4258	GCAAGGCGATTAAGT TGGGTAAC	47,8	Sequenzierprimer
4259	TTCAGCTCGATGCGGT TCACCAG	56,5	Sequenzierprimer
4260	CCTGGAAACATCTGA TGGG	52,6	Sequenzierprimer
4261	GAGTCCAACCCGGTA AGACAC	57,1	Sequenzierprimer
4262	TGCTGCAATGATACC GCGAGAC	54,5	Sequenzierprimer
4263	CTTCGGGGCGAAAAC TCTCAAG	54,5	Sequenzierprimer
4264	CTGGAGGGGTGGATG GATGG	65	Sequenzierprimer
4265	GAGGGTTGGGCCATA TCTGGG	61,9	Sequenzierprimer
4294	GAACTCGTCAAGAAG GCG	55,6	Sequenzierprimer
4286	GCCCGGACTGTGTGG CGAAGC	67,6	RealTime-PCR-Primer zur Amplifikation eines hA3F-Fragments
4287	CCTGACTCAGCCTGCA GAGCG	65,7	RealTime-PCR-Primer zur Amplifikation eines hA3F-Fragments

2.7 Verwendete Seren

Als primäre Antikörper wurden folgende Immunglobuline (IgG) und Seren verwendet:

anti-PFV-Integrase (3E11) (Maus), Hybridoma-Überstand	1:10	(Imrich et al., 2000)
anti-PFV-Protease (15E10) (Maus), Hybridoma-Überstand	1:10	(Imrich et al., 2000)
anti-PFV-Gag (SGG1) (Maus), Hybridoma-Überstand	1:10	(Heinkelein et al., 2002a)
anti-SFV-Gag (Kaninchen), polyklonal	1:100	(Kretzschmar et al., 2008)
anti-SFV-Pol (animal 9099) (Kaninchen), polyklonal	1:100	(Kretzschmar et al., 2008)
anti-Bet, polyklonal (Kaninchen)	1:1000	(Bock et al., 1998)
anti-hA3G, (Ziege)	1:500	(SantaCruz)

Sekundäre Antikörper:

Anti-Maus IgG, Peroxidase-Konjugat (Ziege)	1:3000 (DAKO)
Anti-Rabbit IgG, Peroxidase-Konjugat (Ziege)	1:2000 (DAKO)
Anti-Ziege IgG, Peroxidase-Konjugat (Esel)	1:3000 (SantaCruz)

2.8 Methoden

2.8.1 Nachweis und Klonierung von Nukleinsäuren

2.8.1.1 Präparation von mRNA aus eukaryotischen Zellen mit dem RNeasy[®] Mini Kit

Bei der Präparation von messenger Ribonukleinsäure (mRNA) musste vor allem darauf geachtet werden, dass diese nicht durch Ribonukleasen (RNasen) denaturiert wurden, da diese sehr stabil sind und im Labor überall zu finden sind. RNasen werden auch bei der Lyse der zu präparierenden Zellen frei und müssen inaktiviert werden.

Nach Ablösen der adhärennten Zellen und Zentrifugation der entsprechenden Zellzahl (1×10^7 Zellen, 20000 g, 5 Minuten [min]) wurde das Pellet, nachdem es resuspendiert war, in 600 μ l RLT-Puffer aufgenommen, welcher durch seine hohe Salzkonzentration die Lyse der Zellen bewirkt. Der Puffer enthielt Guanidin-Thiocyanat, weiterhin wurde β -Mercaptoethanol zugegeben. Beide Substanzen sorgten für die Denaturierung der freigesetzten RNasen, indem z. B. β -Mercaptoethanol die Disulfidbrücken zerstörte. Zur Homogenisierung des Zelllysates wurde dieses durch einen Qiashreder bei maximaler Geschwindigkeit (v_{\max}) für zwei Minuten in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Danach erfolgte durch Zugabe von 70 %igem Ethanol die Präzipitation der RNA, welche dann an die Silikat-Membran der Qiagen-Säule gebunden wurde (8000 g, 15 Sekunden [sek]). Die RNA wurde mit 700 μ l RW1-Puffer (8000 g, 15 sek) und 500 μ l RPE-Puffer (8000 g, 2 min) gewaschen und dann bei v_{\max} eine Minute getrocknet. Für die Elution der RNA (30 μ l, 8000 g, 1 min) war es wichtig, RNase-freies Wasser zu benutzen.

2.8.1.2 cDNA-Synthese aus isolierter RNA mit dem iScript™ cDNA Synthese Kit

Für die Synthese von copy DNA (cDNA) aus präparierter mRNA wurden zu 1 µg mRNA 4 µl iScript Mix und 1 µl modifizierte, M-MLV-basierte (Moloney Murine Leukemia Virus) Reverse Transkriptase (RT) gegeben. Die RT beinhaltet außerdem eine RNaseH-Aktivität, welche durch den Abbau der RNA während der Synthese eine höhere Sensitivität gewährleistete. Das Temperaturregime zur Amplifikation ist in Tab. 2. 6 dargestellt.

Die synthetisierte cDNA wurde bei 4 °C im Kühlschrank gelagert, da sie hier stabil ist und mehrfaches Einfrieren und Auftauen zum Scheren der cDNA geführt hätte.

Tab. 2. 6: Temperaturregime zur Amplifikation von cDNA

Temperatur	Zeit
25 °C	5 min
42 °C	30 min
85 °C	5 min

2.8.1.3 Polymerase-Kettenreaktion zur Klonierung von DNA-Fragmenten (lineare PCR)

Modifiziert nach Mullis et al., 1986, Mullis, 1987, Saiki et al., 1985.

DNA-Fragmente können mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) von einer Template-DNA amplifiziert werden. Voraussetzung hierfür ist, dass die Sequenz der zu amplifizierenden DNA bekannt ist, zumindest der Abschnitte, an welche die eingesetzten Primer binden. Primer sind kurze Oligonukleotide, die zu diesen Sequenzen komplementär sind. Sie wurden so konstruiert, dass sie an ihrem 3'-Ende exakt an die Template-DNA binden. Zur Erhöhung der Stabilität des Primer-Template-Komplexes sollten die Primer hier mindestens ein Guanin oder Cytosin tragen, da diese Basen Dreifachwasserstoff-Brückenbindungen zur komplementären Base ausbilden, im Gegensatz zu Adenin und Thymin, deren Zweifachwasserstoff-Brückenbindungen schwächer sind.

Wichtig ist, dass die Template-DNA in destilliertem Wasser (A. dest.) bzw. 1:10 TE-Puffer (Tris-Ethylendiamintetraessigsäure; EDTA) aufgenommen wird (Protokoll siehe 2.8.1.14), da Spuren von Salzen, Detergenzien oder anderen Stoffen die Amplifikation inhibieren können.

Die eigentliche PCR wurde in einem Temperatur-Zeitregime von Denaturierung/Primer-Anlagerung/DNA-Amplifikation (Denaturierung/Annealing/Elongation) durchgeführt. Durch Erhitzen auf 95 °C wurde die doppelsträngige DNA in Einzelstränge dissoziiert, was es den Primern ermöglichte, sich bei nachfolgender Abkühlung auf deren Annealingtemperatur (T_m , siehe Tab. 2. 7) an die komplementäre Sequenz anzulagern. Der gebildete Primer-Template-Komplex stellte das Substrat der DNA-Polymerase dar, welche unter optimalen Bedingungen bei 72 °C (Pwo-Polymerase) bzw. 68 °C (Taq-Polymerase) den Primer verlängert. Durch mehrfache Wiederholung dieses Temperatur-Zeitregimes können geringste DNA-Mengen vervielfältigt werden.

Da in dieser Arbeit auch Primer verwendet wurden, die am 5'-Ende so modifiziert waren, dass sie eine Restriktionsenzymstichstelle in der amplifizierten DNA einfügten (Mutageneseprimer), wurden in solchen Reaktionen die ersten fünf Zyklen der PCR mit niedrigeren Annealingtemperaturen ($T_m - 5$ °C) durchgeführt, um ein hinreichendes Annealing der Primer zu ermöglichen.

Tab. 2. 7: PCR-Temperaturregime zur DNA-Amplifizierung; (T_m – spezifische Schmelztemperatur der Primer; t – Amplifikationszeit für die unterschiedlichen PCR-Produkte)

Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
1 x	95 °C	2 min
30 x	95 °C	30 sek
	T_m	1 min
	72 °C (Pwo) bzw. 68 °C (Taq)	t

2.8.1.4 „nested“ PCR zur Erhöhung der Ausbeute einer linearen PCR von genomischer DNA

Um die Ausbeute einer PCR zu erhöhen, gibt es die Möglichkeit einer „nested“ PCR. Hierbei wurde an eine vorausgegangene lineare PCR eine zweite PCR mit einem zweiten Primerpaar angeschlossen. Dieses Primerpaar wurde so konstruiert, dass seine Bindungsstellen zwischen dem ersten Primerpaar lagen, das heißt, die neuen Primer binden am PCR-Produkt der vorausgegangenen PCR. Das Temperaturregime wurde nach dem gleichen Muster wie in der

linearen PCR angelegt (Tab. 2. 7). Das Durchführen einer „nested“ PCR erhöhte die Spezifität und die Ausbeute der PCR.

2.8.1.5 PCR zur Sequenzbestimmung von DNA

MgCl₂-Puffer:

200 mM Tris-HCl, pH 9,0

5 mM MgCl₂

autoklaviert, aliquotiert und bei -20 °C gelagert

Modifiziert nach Sanger et al., 1977.

Die Sequenzierung wurde zur Bestimmung und Überprüfung der korrekten Sequenz von PCR-Produkten und Plasmiden, die durch die Klonierung von PCR-Produkten entstanden waren, genutzt.

Unter Verwendung des kommerziellen Kits der Firma Applied Biosystems wurde eine asymmetrische PCR mit nur einem Primer nach dem Temperaturregime in Tab. 2. 8 durchgeführt. Das eingesetzte BigDye-Gemisch aus DNA-Polymerase, Desoxynukleotiden (dNTPs) und Polymerase-Puffer enthielt zusätzlich Didesoxynukleotide (ddNTPs). Diese trugen kovalent gebunden je nach Base (Adenin, Thymin, Guanin, Cytosin) einen unterschiedlichen Farbstoff. Wurde ein ddNTP in den neu synthetisierten Strang eingebaut, kam es zum Kettenabbruch, das heißt, die Synthese des DNA-Doppelstrangs wurde unterbrochen. Die dadurch entstandenen einzelsträngigen Fragmente wurden so endständig mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert.

Die Synthese der markierten DNA-Einzelstränge erfolgte in einem Gesamtansatz von 5 µl. Dazu wurden jeweils 3,3 pmol des entsprechenden Primers, 1 µl des BigDye-Gemisches, MgCl₂-Puffer in der Verdünnung 1:5 und 0,5 µl DNA-Template eingesetzt. Nach der Synthese der DNA-Einzelstränge erfolgte die Aufreinigung und Sequenzierung in der diagnostischen Abteilung unseres Institutes mit dem ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer.

Tab. 2. 8: Temperaturregime für eine Sequenzier-PCR

Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
1 x	95 °C	2 min
25 x	95 °C	20 sek
	50 °C	15 sek
	60 °C	4 min

2.8.1.6 quantitative RealTime PCR von präparierter cDNA

Die quantitative RealTime PCR (qRT-PCR) ist eine sehr sensitive Methode zum Nachweis und zur Quantifizierung von Nucleinsäuren, bei der die Messung der DNA-Mengen sofort während der PCR im entsprechenden Reaktionsgefäß erfolgt. Das Prinzip beruht auf dem Nachweis von DNA oder RNA durch Fluoreszenz-Farbstoffe, in diesem Fall SYBRGreen, welches die Eigenschaft besitzt, sich in doppelsträngige Nucleinsäure einzulagern. Für die PCR werden Primer eingesetzt, welche für die zu untersuchenden Gene spezifisch sind und mit denen kurze Abschnitte [maximal 200 Basenpaare (bp)] dieser Gene amplifiziert werden. Es wird hierbei eine PCR-Reaktion durchgeführt (siehe 2.8.1.3), bei der es während der Amplifikation des Ausgangsstranges zur Einlagerung des Fluoreszenzfarbstoffes kommt. Die Konzentration an doppelsträngiger Nucleinsäure und somit die Menge an eingelagertem SYBRGreen nimmt dabei mit jedem Zyklus logarithmisch zu. Wird der Farbstoff nun mit einer bestimmten Wellenlänge angeregt, kommt es zur Emission von Licht, welches von der RealTime-PCR-Maschine gemessen wird. Sobald die Menge an Nucleinsäure eine bestimmte Konzentration erreicht hat, wird dies durch einen Anstieg der Emission von Licht in dem entsprechenden Reaktionsgefäß angezeigt. Beginnt die Emission bereits bei einem sehr niedrigen Zyklus, ist die Nucleinsäurekonzentration im entsprechenden Ansatz sehr hoch.

Durch die Bestimmung der Schmelztemperatur der erhaltenen PCR-Produkte und deren Vergleich mit einer Positivkontrolle konnte außerdem getestet werden, ob das amplifizierte Produkt auch spezifisch war. Je nach Basenzusammensetzung denaturierte der neusynthetisierte DNA-Doppelstrang bei unterschiedlich hohen Temperaturen. Besaß er z. B. einen hohen GC-Gehalt, war seine Schmelztemperatur höher, da die Trennung der Dreifachwasserstoffbrücken zwischen Guanin und Cytosin mehr Energie benötigte als die der Zweifachwasserstoffbrücken zwischen Adenin und Thymin.

Für jeden RealTime-PCR-Ansatz wurde 1 µl der Präparation aus der cDNA-Synthese eingesetzt. Weiterhin befand sich im Ansatz 0,2 % Fluorescein, 10 µl SYBRGreen (2x

Mastermix) und 1 µl Primermix (kommerziell erhältlich). Der Ansatz wurde mit nukleasefreiem, sterilem Wasser auf 20 µl Gesamtmenge aufgefüllt. Das Temperaturregime für eine RealTime PCR mit Schmelzpunktbestimmung der PCR-Produkte ist in Tab. 2. 9 dargestellt.

Tab. 2. 9: Temperaturregime einer RealTime PCR mit Schmelzpunktbestimmung

Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
1 x	95 °C	5 min
45 x	95 °C	10 sek
	60 °C	30 sek
1 x	95 °C	1 min
1 x	52 °C	1 min
86 x (Schmelzpunktbestimmung)	52 °C (Temperaturerhöhung nach jedem Zyklus um 0,5 °C)	10 sek

Durch Normalisierung der Expression der zu untersuchenden Gene gegen eine Standardkurve von ubiquitär exprimierten Genen („House Keeping“ Gene) konnte man die relative Expression der Proteine in den verschiedenen Zelllinien abschätzen. Dazu wurden die DNA-Konzentrationen der Positivkontrollen (amplifizierte PCR-Produkte) der ausgewählten „House Keeping“ Gene vermessen (Actin β , Succinat-Dehydrogenase-Untereinheit A, GAPDH) und in den Konzentrationen 10^{-2} bis 10^{-10} ng für die RealTime PCR zur Erstellung einer Standardkurve eingesetzt. In den zu testenden Zelllinien wurde anschließend die Expression dieser Gene bestimmt. Die Expressionsmenge des unbekanntes, uns interessierenden Gens wurde dann ins Verhältnis zur Expressionsmenge dieser Gene gesetzt und so die relative Expression bestimmt. Zur Auswertung wurde das GeNorm, VBA Applet für Excel verwendet (Vandesompele et al., 2002).

2.8.1.7 Aufreinigung von PCR-Produkten mit dem Sigma GenElute™ PCR Clean-Up Kit

Nach einer PCR-Reaktion musste das erhaltene PCR-Produkt für eine weitere Verwendung von den im Ansatz enthaltenen dNTPs, Salzen und der Polymerase befreit werden, da diese Bestandteile in weiteren Reaktionen stören können. Das zur Aufreinigung verwendete Kit war

in der Lage, DNA-Fragmente mit Größen zwischen 100 bp und 10 Kilo-Basenpaaren (kb) aufzureinigen.

Nachdem die im Kit enthaltene Silikat-Säule mit Equilibrierungspuffer equilibriert war, wurde sie mit dem PCR-Ansatz, welcher vorher mit der fünffachen Menge Bindepuffer verdünnt wurde, beladen. Durch Zentrifugation bei 16000 g für eine Minute erfolgte die Bindung der PCR-Fragmente an die Silikat-Säule. Die DNA wurde anschließend mit 500 µl Waschpuffer (enthielt Ethanol) gewaschen (1 min, v_{\max}) und zwei Minuten bei v_{\max} getrocknet. Die Elution der PCR-Fragmente erfolgte mit 30 µl A. dest., wobei die Säule für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend eine Minute bei v_{\max} zentrifugiert wurde.

2.8.1.8 Agarosegele zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

50x TAE (Tris-Azetat-Puffer), pH 8,3 (Stocklösung):

2 M Trisbase

1 M Eisessig

0,1 M Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (pH 8,0)

Agarosegele: Je nach Größe der zu untersuchenden DNA-Fragmente wurden Gele mit Konzentrationen zwischen 0,6 % bis 2 % Agarose hergestellt

Bromphenolblau-Lösung für Agarose-Gel-Elektrophorese:

0,25 % Natriumsalz-Bromphenolblau (BPB)

30 % Glyzerin (steril)

in A. dest.

Ethidiumbromid (EB):

0,2 µg/ml Gel

Agarose-Gelsysteme dienen sowohl der Trennung und Analyse von linearen DNA-Fragmenten und superhelikaler Plasmid-DNA als auch zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten, wie zum Beispiel enzymatisch verdauter DNA. Die Agarosegel-Elektrophoresen wurden in horizontalen Flachbettgelen mit entsprechenden Apparaturen durchgeführt. Durch Variation der Agarose-Konzentration können lineare DNA-Fragmente der Größen 0,1 bis 60 kb separiert werden. Tab. 2. 10 gibt eine Übersicht über die Trennbereiche und die entsprechend optimalen Agarose-Konzentrationen. Die Wanderungsgeschwindigkeit der

Fragmente hing nicht nur von ihrer Kettenlänge, sondern auch von ihrer Konformation ab (linear, nicked-circular, superhelikal, doppel- oder einzelsträngig).

Sichtbar gemacht wurde die DNA als DNA-Ethidiumbromidkomplex, die Ethidiumbromidkonzentration (EB-Konzentration) betrug dabei 0,2 µg EB pro ml Agarose. Dieses lagerte sich interkalierend zwischen die Basen der Nukleinsäuren ein. Durch Anregung mit ultraviolettem (UV)-Licht im Wellenlängenbereich 254, 302 oder 366 Nanometer (nm) emittierte der DNA-Ethidiumbromidkomplex im Bereich von 500-590 nm das Licht, welches dadurch als rot-orange-leuchtende Bande zu erkennen war.

Die zu trennenden DNA-Proben wurden mit 6fachem Bromphenolblau-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen gefüllt. Das im Puffer enthaltene Glycerin sorgte dafür, dass die DNA-Probe nicht aus den Taschen diffundierte. Die Auftrennung der Proben erfolgte in Elektrophoresekammern mit 1 x TAE unter Stromstärken von 20 Volt (über Nacht) bis 120 Volt (V), je nach Abstand der Elektroden (ca. 4 V/cm) und in Abhängigkeit davon, ob das Gel zur Analyse präparativer oder analytischer Verdaue verwendet wurde (siehe 2.8.1.10).

Tab. 2. 10: Übersicht von Agarosekonzentrationen zur Auftrennung von DNA-Proben

Agarose-Konzentration (%)	Kettenlänge (kb)
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

2.8.1.9 Elution von Plasmid-DNA oder DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit dem QiaQuick Gel Extraction Kit (Qiagen)

Wie in 2.8.1.8 beschrieben, konnten mit Agarosegelen unterschiedlich große DNA-Fragmente aufgetrennt werden. Zur weiteren Verwendung, z. B. für eine Klonierung, mussten sie aus dem Agarosegel eluiert werden. Dabei wurden die entsprechenden Fragmente mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in 3 Volumen des Puffers QG aufgenommen. Durch Inkubation bei 50 °C und unter Einwirkung von chaotrophen Salzen (im QC-Puffer enthalten) kam es zur Auflösung der Agarose und die DNA wurde freigesetzt.

Nun wurde die Lösung auf ein Säulchen gegeben, das eine Silikat-Gel-Membran besaß, an welche die freigewordene DNA binden konnte. Die restlichen Lösungsbestandteile wurden abzentrifugiert (20000 g, 1 min). Ein Waschschrift mit Puffer QG entfernte noch enthaltene Agarosebestandteile von der Membran, das Waschen mit Puffer PE (enthielt Ethanol) entfernte zurückgebliebene Salze. Zum Trocknen wurde das Säulchen eine weitere Minute bei 20000 g zentrifugiert. Die Elution der DNA erfolgte mit 25 µl A. dest. bei 20000 g für eine Minute.

2.8.1.10 Restriktionsverdau von DNA

Beim Restriktionsverdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen erfolgte eine Hydrolyse des DNA-Doppelstranges an Sequenzbereichen, die für die unterschiedlichen Enzyme spezifisch sind. Restriktionsverdaue wurden verwendet, um DNA-Fragmente für Klonierungen herzustellen (präparativer Verdau) und um zu testen, ob bei einer Klonierung das richtige DNA-Fragment in den Vektor eingesetzt wurde (analytischer Verdau). Zum enzymatischen Verdau von DNA wurde in der Regel 1 Unit Enzym pro 1 µg DNA eingesetzt. Der Verdau erfolgte unter der für das Enzym optimalen Temperatur und im optimalen Puffer (von den Firmen angegeben). Setzte man bei einem Verdau zwei verschiedene Enzyme ein, wurde der Puffer verwendet, in dem beide Enzyme optimal arbeiteten. Konnte kein für beide Enzyme geeigneter Puffer gefunden werden, wurden die Enzyme nacheinander zugegeben, indem das zuerst verwendete Enzym vor Einsatz des zweiten entfernt oder inaktiviert wurde. Der analytische Verdau von Plasmid-DNA erfolgte mindestens eine Stunde, präparative Verdaue wurden mindestens drei Stunden inkubiert.

2.8.1.11 Dephosphorylierung linearisierter Plasmide

Bei einer Ligation (siehe 2.8.1.12) werden linearisierte DNA-Fragmente miteinander verbunden. Dies kann nur geschehen, wenn bei mindestens einem dieser DNA-Fragmente das 5'-Ende phosphoryliert ist. Um eine Selbstligation des verdauten Plasmid-Hintergrundes, welcher alle zur Replikation in Bakterien notwendigen Gene besitzt, zu verhindern, wurden hier die Phosphatreste der freien 5'-Enden entfernt. Das Plasmid-Fragment ist somit an beiden, durch Verdau freigewordenen Enden dephosphoryliert und kann durch die Ligase nicht mehr zirkularisiert werden. Die Dephosphorylierung erfolgte durch das Enzym Calf

Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP). Pro 10 µg DNA wurde in der Regel 1 µl CIAP (entspricht 10 U) eingesetzt. Das Enzym hat in allen angegebenen Puffern der Firmen MBI Fermentas und New England Biolabs enzymatische Aktivität.

2.8.1.12 Ligation von DNA

Die Ligation wurde zum Zusammenfügen von DNA-Fragmenten mit linearen Plasmidfragmenten eingesetzt, welche jeweils gleichartig komplementäre Einzelstrang-Enden oder glatte Enden (Blunt-End) aufwiesen. Durchgeführt wurde die Ligation jeweils in einem Ansatz von 20 µl. Der Ligationsansatz enthielt 2 µl Ligasepuffer (10x), 1 µl Ligase (1000 Units/µl), 1 µl bis 7 µl lineares Plasmid (jeweils ca. 1 µg DNA) und Insertmengen von 5 µl bis 10 µl (ebenfalls etwa 1 µg DNA). Das restliche Volumen des Ansatzes wurde mit A. dest. aufgefüllt. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 14 °C oder zwei bis drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

2.8.1.13 Transformation kompetenter Bakterien

LB-Medium (flüssig, 5x), autoklaviert

- 100 g/l GIBCO BRL® LB Broth Base (Lennox L Broth Base)
- 5 g/l Glucose
- 25 g/l Natriumchlorid
- 100 µg/ml Ampizillin (0,2 µm sterilfiltriert)

LB-Medium (fest), autoklaviert:

- 20 g/l GIBCO BRL® LB Broth Base (Lennox L Broth Base)
- 20 g/l Agar
- 5 g/l Natriumchlorid
- 100 µg/ml Ampizillin (0,2 µm sterilfiltriert)

SOA: 10 mM NaCl
in 1 x LB-Medium (flüssig)

SOB: 2,5 mM KCl
10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄
in SOA

SOC: 20 % Glucose in SOB

Modifiziert nach Hanahan, 1983.

Ziel einer Transformation von Bakterien ist das Einbringen von Vektor-DNA in die Bakterien zu deren Vervielfältigung. Dazu wurden kompetente Bakterienzellen (verschiedene *Escherichia coli*-Stämme) mit 10 µl des Ligationsansatzes (siehe 2.8.1.12) 30 min auf Eis inkubiert. Der genaue Vorgang der Einschleusung der DNA in die Bakterien ist ungeklärt. Man nimmt an, dass es bei der Inkubation auf Eis zur Anlagerung der Vektor-DNA an die Membranen der Bakterienzellen kommt. Nun folgte ein Hitzeschock, bei dem vermutlich temporär Löcher in der Membran entstehen, durch welche die DNA in die Zellen gelangt. Anschließend wurde der Ansatz für eine Stunde bei 37 °C in SOC-Medium inkubiert. In dieser Erholungsphase kam es zur Teilung und zum Wachstum der Bakterienzellen. Durch Ausplattieren der Zellen auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum wurden die Bakterienzellen selektiert. Da die eingebrachten Plasmide Antibiotikaresistenzgene trugen, konnten nur jene Zellen anwachsen, die das Plasmid aufgenommen und dadurch die entsprechende Resistenz erworben hatten.

2.8.1.14 Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* mittels der TENS-Methode

TENS-Lösung: 10 mM Tris-HCl pH 8,0
1 mM EDTA pH 8,0
0,1 N NaOH
1,0 % Natriumdodecylsulfat (SDS)

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl pH 8,0
0,5 mM EDTA
s100 µg/ml RNase A

Mit der TENS-Methode war es möglich, Plasmide aus transformierten Bakterien (verschiedene *E. coli*-Stämme) zu isolieren. Die erhaltene DNA wurde für Testverdaue (siehe 2.8.1.10) eingesetzt, um Klone zu finden, die für weitere Analysen verwendet werden konnten. Die TENS-Methode war im Gegensatz zur Aufreinigung von Plasmid-DNA mit Kits, z. B. dem Machery-Nagel-Maxi-Kit (siehe 2.8.1.15), schlecht geeignet, um die isolierten Plasmide in einer Sequenzierreaktion oder Transfektion einzusetzen, da noch enthaltene Reste

von Natriumdodecylsulfat (SDS) die Sequenzierreaktion inhibieren konnten und die Transfektion beeinflussten.

Die in 2 ml 1 x LB-Flüssigmedium (mit Antibiotikum) angewachsenen Bakterienzellen wurden abzentrifugiert, das Medium abgegossen und das Pellet resuspendiert. Danach wurde 300 µl TENS-Lösung zu den Bakterien pipettiert. Das darin enthaltene NaOH zerstörte die Bakterienzellwände und das SDS die Zellmembran. Durch weitere Salze in der TENS-Lösung entstand zusätzlich außerhalb der Zellen ein hoher osmotischer Druck (hypertonische Lösung), was zum Platzen der Bakterienzellen führte. Dadurch wurde ihr Zellinhalt frei. Durch Zugabe von 150 µl Natriumazetat (3 M, pH 5,2), wodurch der pH-Wert der Lösung erniedrigt wurde, kam es zur Fällung der Bakterienproteine und der genomischen DNA, komplexiert mit dem SDS. Die Entstehung der SDS-Proteinkomplexe wurde durch Inkubation des Ansatzes auf Eis noch verstärkt. Der SDS-Proteinkomplex wurde durch Zentrifugation (10 min, 20000 g) pelletiert. Die restlichen, nun im Überstand befindlichen Nukleinsäuren (Plasmide und RNA), wurden mit 2/3 Volumen Isopropanol gefällt und ebenfalls abzentrifugiert (10 min, 20000 g). Das Plasmid-Pellet wurde mit 70 %igem, eiskaltem Ethanol gewaschen und bei 37 °C getrocknet. Die Resuspendierung der Plasmide erfolgte in 0,1 x TE-Puffer mit RNaseA (100 µg/ml). Die RNaseA verdaute die ebenfalls gefällte RNA, so dass am Ende das gereinigte Plasmid vorlag.

2.8.1.15 Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* mittels des Machery-Nagel-Maxi-Kits

Nachdem mit der TENS-Methode und nachfolgendem, enzymatischem Verdau geeignete Klone für weitere Versuche ausgewählt werden konnten, mussten die Plasmide für eine Transfektion in ausreichender Menge und vor allem für Sequenzierungen mit entsprechender Reinheit vorliegen. Dazu wurden die Bakterien mit 150 ml 1 x LB-Medium mit Antibiotikum neu angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach Ernten der Bakterien (15 min, 5000 rpm, 4 °C, GS-3 Rotor) wurde das erhaltene Pellet in Puffer S1 resuspendiert. Dieser enthielt verschiedene Salze, wodurch die Bakterien einem hohen osmotischen Außendruck ausgesetzt wurden und nach Zugabe des Lysispuffers (S2) lysiert werden konnten. Weiterhin befand sich im Puffer S1 RNase, welche die freiwerdende RNA während der Aufreinigung verdaute. Nach Zugabe des dritten Puffers (S3) kam es zur Fällung der bakteriellen Proteine und der genomischen DNA. Dieser Vorgang wurde durch Inkubation für fünf Minuten auf Eis verstärkt. Nach Filtration der Lösung durch einen angefeuchteten Faltenfilter befand sich die

zu isolierende Plasmid-DNA im Durchfluss, welcher auf die Silikat-Säulen (mit Silizium-Membran) gegeben wurde. Dort erfolgte eine elektrostatische Bindung der DNA an die Säule, welche vorher mit Equilibrierpuffer N2 equilibriert wurde. Nach einem Waschschrift mit Puffer N3 wurde die DNA mit Elutionspuffer N5 eluiert und durch Isopropanolfällung aufkonzentriert. Das Isopropanol zerstörte die Hydrathülle der DNA, wodurch die DNA gefällt wurde und abzentrifugiert werden konnte (4000 rpm, 60 min, 4 °C). Das entstandene Pellet wurde mit 70 %igem, eiskaltem Ethanol gewaschen, danach getrocknet und schließlich in 50 µl bis 200 µl A. dest. aufgenommen.

2.8.1.16 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Messung der Nukleinsäurekonzentrationen erfolgte mittels eines Photometers der Firma Eppendorf. Dazu wurde die zu vermessende DNA-Probe verdünnt (Maxi-DNA 1:20) und in eine UV-Küvette gegeben. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte bei OD_{260} , da dies das Absorptionsmaximum der in der DNA enthaltenen Purine und Pyrimidine ist. Bei den aromatischen Aminosäureresten von Proteinen dagegen liegt dieses bei OD_{280} . Das Verhältnis der beiden Werte ($OD_{260}:OD_{280}$) gibt Auskunft über die Reinheit der Proben, es soll zwischen 1,7 und 2 liegen. Niedrigere Werte zeigen eine Proteinverunreinigung in der Probe an.

Die Konzentration und die Reinheit der Nukleinsäuren (RNA oder DNA) konnte direkt am Gerät abgelesen werden.

2.8.2 Zellzucht und Virusanzucht

2.8.2.1 Zellzucht

Zellkulturmedium:

- D-MEM: GIBCO™ Dulbecco's MEM mit Glutamax-I (mit Natrium Pyruvate,
mit 4500 mg/l Glucose, mit Pyridoxine)
- mit 10 % Fötalem Kälberserum (FCS)
- mit 0,03 % Glutamat
- mit 10 µg/ml PenicillinG
- mit 10 µg/ml Streptomycin

MEM: Hausmedium (9,6 g/l Invitrogen #41500-083, 2,2 g/l NaHCO₃)
mit 5 % oder 10 % Fötalem Kälberserum (FCS)
mit 0,03 % Glutamat
mit 10 µg/ml PenicillinG
mit 10 µg/ml Streptomycin

ATV:
137 mM NaCl
5,4 mM KCl
5 mM D-Glucose
70 mM NaHCO₃
500 mg/ml Trypsin

Einfriermedium:

10 % Dimethylsulfoxid (DMSO)
90 % fötales Kälberserum (FCS)

Zellen wurden für Transfektionen und Infektionen in T25-, T75-Zellkulturflaschen, 6cm-, 10cm-Petrischalen, 96-, 48-, 12- und 6-Loch-Platten angezüchtet. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂ in MEM bzw. D-MEM, dem Penicillin, Streptomycin und 5 % bzw. 10 % FCS zugegeben wurde. Die Zellen wurden gesplittet, das heißt abtrypsiniert (mit ATV abgelöst) und in geringerer Anzahl neu eingesät, wenn sich ein konfluenten Zellrasen gebildet hatte. In der Regel erfolgte dies alle zwei bis drei Tage. Für Transfektionen und Infektionen von Zellen mussten definierte Zellzahlen in die entsprechenden Kulturgefäße eingesät werden (siehe Tab. 2. 11). Dazu wurden die Zellen in einer Neubauerzählkammer gezählt und die Zellzahl pro ml mit dem entsprechenden Kammerfaktor (x 10000) berechnet.

Zum Anziehen von Einzelzellklonen wurden einzelne Zellen in die Löcher von 96-Loch-Platten sortiert (siehe 2.8.2.6). Nachdem sie eine ausreichend große Kolonie gebildet hatten, wurden solche Klone über 48-Loch-Platten bis in 12-Loch-Platten hochgezogen.

Tab. 2. 11: Übersicht der eingesäten Zellzahlen für Transfektionen und Infektionen

Zelllinie	Kulturgefäß	ingesäte Zellzahl
293T/293	10cm-Petrischale	6×10^6
	6cm-Petrischale	2×10^6
	6-Loch-Platte	4×10^5
	12-Loch-Platte	1×10^4
HeLa/HT1080	10cm-Petrischale	1×10^6
	6cm-Petrischale	6×10^5
	6-Loch-Platte	1×10^5
	12-Loch-Platte	1×10^4

Werden Zellen längere Zeit nicht benötigt, können sie bei -80 °C oder in Stickstofftanks (-196 °C) gelagert werden. Dazu wurden die abgelösten Zellen pelletiert (5 min, 1200 rpm), das Medium abgenommen und das Zellpellet in Einfriermedium vorsichtig resuspendiert. Danach mussten die Zellen so schnell wie möglich in den Gefrierschrank gebracht werden, da das im Einfriermedium enthaltene DMSO toxisch auf die Zellen wirkte.

Sollten eingefrorene Zellen wieder in Kultur gebracht werden, wurden diese schnell (37 °C) aufgetaut, in Kulturmedium (mit FCS und Antibiotika) aufgenommen, abzentrifugiert und in frischem Medium in die Kulturflaschen überführt. Die Kultivierung erfolgte unter den oben angegebenen Bedingungen.

2.8.2.2 Transfektion von Säugerzellen mit Polyethylenimin

Polyethylenimin (PEI):

100 mg/ml PEI (Stocklösung)

Sterilfiltration mit $0,45\text{ }\mu\text{m}$ Filter, Lagerung bei -20 °C

Natrium-Butyrat (50 x):

500 mM Na-Butyrat in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gelöst

Sterilfiltration mit $0,2\text{ }\mu\text{m}$ Filter, Lagerung bei 4 °C

Die Transfektion von Säugerzellen wurde genutzt, um fremde DNA (Plasmid-DNA) in die Zellen einzubringen. Die auf den Plasmiden kodierte Proteine wurden von den Zellen transkribiert und translatiert und konnten danach zum Beispiel im Fall des grün

fluoreszierenden Proteins (EGFP) durch Fluoreszenz im UV-Mikroskop oder nach Zelllyse im Westernblot mit entsprechenden Antikörpern nachgewiesen werden (siehe 2.8.3.2). Ein weiteres Ziel war die Produktion von Viruspartikeln mit Hilfe von Helferplasmiden. Die verwendete DNA musste bei einer Transfektion einen sehr hohen Reinheitsgrad aufweisen, weshalb nur DNA verwendet wurde, die mit dem Machery-Nagel Maxi-Kit aufgereinigt worden war (siehe 2.8.1.15).

Die Polyethylenimin-Transfektion (PEI) ist im Gegensatz zur Transfektion von Zellen mit z. B. Polyfect (Qiagen) oder Fugene (Roche) eine preiswerte Methode, um DNA in Zellen einzubringen. PEI ist ein kationisches Polymer, welches nukleinsäurebindende und -kondensierende Eigenschaften besitzt. Solche DNA-Polykationen-Komplexe werden effizient von verschiedenen Zelltypen aufgenommen. Durch den Protonsponge-Effekt des Polykations wird einer intrazellulären Degradierung entgegengewirkt, so dass ein effizienter Gentransfer stattfinden kann.

Die eingesetzten Mengen an DNA, PEI und Medium sind in Tab. 2. 12 dargestellt. Die einzubringende Plasmid-DNA wurde in Medium ohne FCS, Glutamat und Penicillin/Streptomycin vorgelegt, das PEI wurde ebenfalls in Medium ohne die oben genannten Zusätze pipettiert, um zu vermeiden, dass sie Komplexe mit dem PEI bilden. Würden solche Komplexe in die Zellen aufgenommen, können sie toxisch wirken. Die PEI-Mischung wurde anschließend zur vorgelegten DNA gegeben und gut gemischt. Bei der anschließenden Inkubation des Ansatzes für 20 min bei Raumtemperatur kam es zur Komplexbildung des PEI mit der DNA. Nach einem Mediumwechsel der zu transfizierenden Produktionszellen wurde das DNA-PEI-Gemisch kreisförmig auf die Zellen getropft. Die Kulturschalen wurden danach in den Brutschrank gestellt und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Tab. 2. 12: eingesetzte Transfektionsmengen

	6cm-Schale	10cm-Schale
eingesetzte DNA-Menge	6µg	16µg
DNA-Gesamtansatz mit Medium	250µl	1000µl
Eingesetzte PEI-Menge	18µl	45µl
PEI-Gesamtansatz mit Medium	250µl	1000µl
neues Medium auf den Zellen	2,5ml	4ml

Bei Transfektionen mit Plasmiden, welche einen CMV-Promoter enthielten, wurde dieser 24 Stunden nach der Transfektion mit Na-Butyrat induziert, um die Proteinexpression zu erhöhen. Nach sieben bis acht Stunden wurde das Natriumbutytrat durch einen Mediumwechsel entfernt, da es die Teilung der Zellen behinderte.

2.8.2.3 Infektion von Zielzellen mit Virusüberstand

Retrovirale Vektoren eignen sich gut, um DNA-Abschnitte stabil in das Genom von Zielzellen zu integrieren. Dazu wurden diese mit Hilfe von Viruspartikeln in die Zielzellen eingebracht. Um zu gewährleisten, dass die Zielzellen nur die gewünschten DNA-Regionen einbauten und nicht das gesamte Genom eines replikationsfähigen Virus, wurden die zu verpackende RNA und die verschiedenen Verpackungs- und Kapsidproteine getrennt auf unterschiedlichen Plasmiden (MLV-System: pHIT60 und pczVSV-G wt; PFV-System: pCZIpol, pCZenvEM002, pCZIgag2 plus jeweiliges RNA-Donor-Plasmid) in den virusproduzierenden Zellen kodiert. Ihre Expression stand unter der Kontrolle von nicht-retroviralen Promotoren. Die Helferplasmide besaßen kein Verpackungssignal, welches zur Verpackung der DNA in die Viruspartikel notwendig ist. Dadurch standen zwar alle zur Virusproduktion nötigen Proteine zur Verfügung, konnten jedoch nicht als Genom ins Viruspartikel verpackt werden. Nur das Plasmid, welches die zu verpackende RNA kodierte, lieferte das in das Viruspartikel zu verpackende Genom. Die Virusproduktion erfolgte mittels Transfektion (siehe 2.8.2.2) in Produktionszelllinien, in diesem Fall 293T-Zellen. Der Virusüberstand wurde nach 72 Stunden abgenommen und durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert, um die Partikel von den Zellen und Zelltrümmern zu trennen.

Die Zielzellen wurden etwa zwei Stunden bzw. einen Tag vor Infektion mit der entsprechenden Zellzahl in Kulturschalen eingesät, damit sie sich am Boden der Kulturgefäße absetzen konnten. Dann wurde der Virusüberstand in der entsprechenden Verdünnung zugegeben. Die Zellen wurden danach im Brutschrank unter den in 2.8.2.1 angegebenen Bedingungen inkubiert. Es erfolgte die Adhäsion der Viruspartikel an die Zellmembran, worauf die Virus- und die Zellmembran miteinander fusionierten. So gelangte das im Viruspartikel enthaltene Genom in die Zielzelle. Da das in die Zielzelle eingebrachte virale Genom am 5'- und 3'-Ende von einer LTR-Region begrenzt wurde, erfolgte mit Hilfe der ebenfalls im Viruspartikel verpackten viralen Proteine, wie Integrase, Reverse Transkriptase

und Protease, nach reverser Transkription die Integration der DNA in das Wirtszellgenom. Die so entstandenen stabilen Zelllinien exprimierten nun permanent das eingebrachte Protein.

2.8.2.4 Partikelpräparation aus Virusüberständen

2 x Proteinprobenpuffer (PPP) für Westernblot:

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

Sucrose:

- 100 mM Tris, pH 8
- 100 mM NaCl
- 1 mM EDTA, pH8
- 20 % Sucrose

Sterilfiltration mit 0,2 μ m Filter

Für die Präparation von viralen Proteinen aus Viruspartikeln für den Westernblot wurden diese in großem Maßstab produziert (Transfektion siehe 2.8.2.2). 24 Stunden nach der Natriumbutyrat-Induktion wurde der Virusüberstand geerntet und mit einem 0,45 μ m-Filter filtriert. Nun wurden 6 ml 20 %ige Sucrose in Ultrazentrifugenröhrchen mit dem Virusüberstand überschichtet. Nach dem Austarieren der Zentrifugenröhrchen auf höchstens 0,01 g Differenz wurde der Überstand 3 Stunden bei 4 °C und 25000 rpm in der Ultrazentrifuge mit dem Surespin 630-Rotor zentrifugiert. Durch die größere Dichte der Viruspartikel im Vergleich zur Sucrose wurden diese im Röhrchen pelletiert. Da das Zellkulturmedium eine geringere Dichte als die Sucrose besaß, blieb es als Schicht darüber und vermischte sich nicht mit dieser.

Nach dem Zentrifugieren wurde das Zellkulturmedium und die Sucrose bis auf einen Rest abgesaugt. Dieser Rest wurde abgegossen und das leere Zentrifugenröhrchen, ohne es wieder umzudrehen, auf Zellstoff getrocknet. Der letzte Tropfen des Mediums wurde mit RNase-freiem Papier aus dem Röhrchen gewischt.

Das Viruspellet wurde dann in 120 μ l einfach konzentriertem PPP (verdünnt mit PBS) aufgenommen und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Zum Lösen und Lysieren der Partikel wurde

das Röhrchen mehrmals gevortext. Anschließend erfolgte die Denaturierung der viralen Proteine für 10 Minuten bei 95 °C.

2.8.2.5 Selektion infizierter 293-Zellen mit Antibiotika

Die Selektion von 293-Zellen, in welche mit Hilfe von Viruspartikeln stabil Antibiotikaresistenzen eingebracht wurden, erfolgte 24 Stunden nach Infektion dieser Zellen mit den entsprechenden Viruspartikeln. Nachdem die Menge der benötigten Antibiotika (gelöst in MEM mit 10 % FCS) experimentell bestimmt wurde, ergaben sich die in Tab. 2. 13 angegebenen Konzentrationen.

Nach jeweils drei Tagen wurde das Selektionsmedium auf den Zellen gewechselt. Bei Hygromycin-selektierten Zellen zeigten sich bereits nach einer Woche abgestorbene, nicht-resistente Zellen und resistente Zellkolonien, bei G418 dauerte die Selektion zwei Wochen.

Tab. 2. 13: Antibiotikakonzentrationen zur Selektion von 293-Zellen

Antibiotikum	Konzentration auf den Zellen
G418	600 µg/ml
Hygromycin	250 µg/ml
G428 + Hygromycin	400 µg/ml + 150 µg/ml

2.8.2.6 Gewinnung von Einzelzellkolonien selektierter 293-Zellen mit Klonierungshütchen

Zur Gewinnung von antibiotikaresistenten Einzelzellkolonien wurden diese mit Klonierungshütchen separiert und konnten danach abtrypsiniert und in 48-Loch-Platten überführt werden. Um die Einzelzellklone zu erhalten, wurden die Zellen mit einer sehr niedrigen MOI (multiplicity of infection) von weniger als 0,01 infiziert und anschließend selektiert (siehe 2.8.2.5). Dadurch wurde zum einen eine Doppelinfektion der Zellen nahezu ausgeschlossen und zum anderen lagen die Zellkolonien in so großen Abständen zueinander, dass ein versehentliches, gleichzeitiges Picken zweier Kolonien vermieden wurde.

Die gewonnenen Einzelzellkolonien wurden nun so lange expandiert, bis die Zellzahl zum Einfrieren oder zur Gewinnung von genomischer DNA ausreichend war (siehe 2.8.2.1 und 2.8.2.9).

2.8.2.7 FACS-Analyse infizierter Zellen

FACS-Puffer:

0,1 % Rinderserumalbumin (BSA)

0,02 % Natriumazid

in PBS

In einem FACSCalibur (fluorescence activated cell sorter) können Zellen grundsätzlich nach spezifischen Merkmalen, wie z. B. ihrer Größe und Granularität, unterschieden werden. Dazu wurden die abgelösten und in FACS-Puffer aufgenommenen Zellen in einem Flüssigkeitsstrom durch eine Kapillare im Gerät gesaugt. Bei diesem Vorgang werden die Zellen an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Befindet sich eine Zelle im Flüssigkeitsstrom, wird der Laser abgelenkt, die Zelle somit registriert und das abgelenkte Licht in zwei verschiedenen Winkeln gemessen. Mit dem geradlinig ausgesendeten Licht (dem sogenannten Forward Scatter, FSC) wird die Größe der Zellen bestimmt. Je weniger des ausgesendeten Lichtes noch im Detektor registriert wird, desto größer ist die analysierte Zelle. Mit dem seitlich abgelenkten Licht wird die Granularität der Zellen gemessen (Side Scatter, SSC). Je granulärer eine Zelle ist, desto mehr wird das auftreffende Licht abgelenkt. Die Zellen können dann in Abhängigkeit ihrer Größe und Granularität mit Hilfe eines Computerprogrammes (Cell Quest Pro) in einem Diagramm dargestellt werden.

Auch Zellen, die fluoreszierende Proteine exprimieren, können mit dem FACSCalibur analysiert werden. Diese Fluoreszenz wird in den Zellen, je nach Wellenlänge, mit dem entsprechenden Laser einer bestimmten Wellenlänge angeregt und das emittierte Licht gemessen. Wurde die Fluoreszenz durch die Infektion mit Viruspartikeln vermittelt, indem das fluoreszierende Protein auf dem viralen Genom kodiert wurde, kann man durch eine FACS-Analyse den Titer des verwendeten Überstandes bestimmen.

Durch die Messung der Emission nicht-infizierter Zellen wurde die Hintergrundfluoreszenz der jeweils verwendeten Zelllinie bestimmt, die Emission fluoreszierender Zellen war entsprechend höher und konnte in dem vom Computerprogramm erstellten Diagramm abgelesen werden. Die Auswertung dieser Ergebnisse erfolgte ebenfalls mit dem Computerprogramm Cell Quest Pro.

2.8.2.8 Sortieren fluoreszierender Einzelzellklone in 96-Loch-Platten mit FACSDiVa Optima

Das Sortieren von fluoreszierenden Zellen beruht auf dem gleichen Prinzip wie die FACS-Analyse (siehe 2.8.2.7), mit dem Unterschied, dass die Zellen nach Ablösen und Pelletieren in Zellkulturmedium aufgenommen wurden und das zum Sortieren verwendete Gerät die Fähigkeit besaß, positive Zellen nicht nur zu erkennen, sondern gleichzeitig in entsprechende Kulturgefäße (z. B. Einzelzellklone in 96-Loch-Platten) zu überführen. Das Gerät arbeitet dabei sehr genau, weshalb falsch sortierte Zellen (z. B. zwei Zellen in ein Loch) nahezu ausgeschlossen sind. Eine Fehlerquelle, die man allerdings in Betracht ziehen musste, ist das Zusammenhaften von nicht gut vereinzelt Zellen bei der Verwendung von adhärenenten Zelllinien. Dadurch können z. B. negative Zellen, die mit positiven Zellen verbunden sind, nicht erkannt werden, da die Dublette als positiv erkannt und entsprechend sortiert wird. Deshalb ist es wichtig, die Zellen während der Ernte gut zu vereinzeln und das Zellpellet nach Zentrifugation gut zu resuspendieren, damit sich möglichst keine Zellaggregate mehr in der Lösung befinden.

2.8.2.9 Aufreinigung genomischer DNA aus Säugerzellen mittels Qiagen Blood and Tissue Kit

Um zelluläre, genomische DNA zur weiteren Analyse zu isolieren, wurde sie mit Hilfe des Qiagen Blood and Tissue Kits isoliert. Die eluierten DNA-Fragmente hatten dabei laut Benutzerhandbuch eine Größe von durchschnittlich 30 kb Länge, die größten Fragmente waren 50 kb groß. Zur Isolierung der DNA wurden zwischen 2×10^6 und 6×10^6 Zellen geerntet, abzentrifugiert (1200 rpm, 5 min) und in 200 μ l PBS resuspendiert. Durch Zugabe von ProteinaseK und Inkubation bei 55 °C wurden die Zellen lysiert. Der Puffer AL, welcher ebenfalls zur Probe gegeben wurde, enthielt chaotrophe Salze, führte dadurch zur Lyse der Zellen und schaffte eine optimierte Umgebung für die Bindung der DNA an die Silikat-Gel-Membran der Qiagen-Säulchen. Zum Fällern der DNA wurde nach dem Lyse-Schritt 200 μ l absoluter Ethanol zugegeben. Nun wurde das Zellysate auf ein Qiagen-Säulchen gegeben und bei niedriger Umdrehungszahl abzentrifugiert (≤ 6000 g, 1 min). Hierbei wurde die DNA an die Silikatmembran der Säulchen gebunden, alle anderen Zellbestandteile wurden herausgefiltert. Nun folgten zwei Waschschrte, mit Puffer AW1 (≤ 6000 g, 1 min) und Puffer

AW2 (20000 g, 1 min). Um die Membran zu trocknen, wurde das Säulchen nochmals eine Minute bei 20000 g zentrifugiert.

Die Elution der genomischen DNA aus den Säulchen erfolgte zweimal mit je 100 µl bzw. einmal mit 50 µl A. dest. und Zentrifugation bei ≤ 6000 g für 1 min.

2.8.3 Proteinpräparation

2.8.3.1 Herstellen von Proteinlysate aus transfizierten Zellen

RIPA-Puffer:

- 20 mM Tris, pH 7,4
- 0,3 M NaCl
- 1 % Na-Desoxycholat
- 1 % Triton X-100
- 0,1 % SDS

2 x Proteinprobenpuffer (PPP) für Westernblot:

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

Proteinlysate von transfizierten Zellen wurden benötigt, um im Westernblot die synthetisierten Proteine der in die Zellen eingebrachten Plasmiden nachweisen zu können. Dazu wurde von transfizierten Zellen das Medium abgenommen und diese mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Um die Proteine z. B. für eine Auftrennung in einem SDS-Gel zu präparieren und für Antikörper zugänglich zu machen, mussten die Zellen vorher lysiert und die DNA geschert werden. Auf die Zellen wurden dazu 0,2 ml bis 1 ml RIPA-Puffer gegeben und diese für 10 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde dabei alle drei Minuten vorsichtig geschwenkt. Die im Proteinlysate enthaltene DNA wurde im Qiashredder durch Zentrifugation (2 min, V_{\max}) geschert. Danach wurde eine adäquate Menge an 2 x PPP (Proteinprobenpuffer mit β -Mercaptoethanol) zur Denaturierung der Proteine zugegeben. Die Proben wurden für fünf Minuten bei 95 °C denaturiert. Das

Lysat konnte für den Westernblot eingesetzt oder bis zu seiner Verwendung bei -80 °C gelagert werden.

2.8.3.2 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese und Westernblot

Gele für SDS-Page (für Westernblot):

Tricingel-Puffer:

3 M Trisbase

0,3 % SDS

einstellen des pH-Wertes auf pH 8,45 mit konzentrierter Salzsäure

Trenngel (8 %) (20 ml):

6 ml A. dest.

5,3 ml Acryl-Bisacrylamid-Lösung (PAA30; 37,5 Anteile Acrylamid zu 1 Anteil Bisacrylamid)

6,6 ml Tricingel-Puffer

2,2 ml Glyzerin

0,2 ml 10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS)

0,02 ml TEMED

Sammelgel (4 %) (20 ml):

12,3 ml A. dest.

2,7 ml Acryl-Bisacrylamid-Lösung (PAA30)

5,0 ml Tricingel-Puffer

0,2 ml 10 % (w/v) APS

0,02 ml TEMED

Kathodenpuffer (5 x):

0,5 M Trisbase (pH 8,25)

0,5 M Tricin

0,5 % SDS

Anodenpuffer (10 x):

2,0 M Trisbase

einstellen des pH-Wertes auf pH 8,9

Lösungen für den Westernblot

10 x Transferpuffer:

0.025 M Tris

0.192 M Glyzin

5 % (v/v) Methanol (frisch zugeben)

Waschpuffer, pH 7,5:

0,25 % (v/v) Tween20

in PBS

Blocklösung, pH 7,5:

5 % Trockenmilch

in PBS

ECL-LösungA:

2,5 mM Luminol

400 μ M p-Cumarsäure

in 0,1 M Tris-HCl (pH 8,5, mit 1 % DMSO)

ECL-LösungB:

5,4 mM H₂O₂

in 0,1 M Tris-HCl (pH 8,5); frisch angesetzt!

Für die Gelelektrophorese wurde die diskontinuierliche SDS-Page nach Laemmli, 1970 verwendet. Der Westernblot als eine Möglichkeit zum Nachweis spezifischer Proteine im Elektropherogramm beruht auf der Spezifität von Antikörpern. Dabei wurden die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Membran wurde dann mit einem spezifischen Antikörper (primärer Antikörper) gegen das nachzuweisende Protein inkubiert. Danach schloss sich eine Inkubation der Membran mit einem gegen den primären Antikörper gerichteten und Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper an.

Für die SDS-Page wurden zuerst die Glasscheiben und die Spacer der Gelkammern gut mit Aceton gesäubert, um Proteinverunreinigungen durch vorhergehende Gelläufe zu entfernen. Nach dem Zusammensetzen der Gelkammer wurde das Trenngel und danach das Sammelgel eingefüllt. Um eine gleichmäßige Phasengrenze zum Sammelgel zu erhalten, erfolgte sofort nach dem Einfüllen des Trenngels eine Überschichtung mit Isopropanol. War das Trenngel polymerisiert (nach ca. einer Stunde), wurde der Alkohol entfernt und das Sammelgel eingefüllt. Der Probenkamm wurde sofort luftblasenfrei in das Sammelgel eingesetzt.

Nach Auspolymerisieren des Sammelgels wurden die Pufferkammern mit 1 x Anodenpuffer (obere Kammer) bzw. 1 x Kathodenpuffer (untere Kammer) aufgefüllt. Der Kamm wurde nun vorsichtig entfernt und die Probenaschen mit Anodenpuffer gespült, um ein gleichmäßiges Einfüllen der Proben zu gewährleisten, was wiederum die gleichmäßige Auftrennung der Proben förderte. Nachdem die Proben in die Taschen gefüllt waren, wurde eine konstant niedrige Spannung von ca. 1,8 mA/cm (Milliampere pro Zentimeter) über Nacht angelegt, so dass die Pufferfront am nächsten Morgen bis an den unteren Rand der Gelkammer gelaufen war. Danach wurde die Gelkammer aus der Elektrophoreseapparatur genommen und nur das Trenngel, in welchem sich die aufgetrennten Proben befanden, für den Westernblot eingesetzt. Dazu wurden nacheinander Filterpapierstreifen, Nitrocellulosemembran, SDS-Gel und nochmals Filterpapierstreifen luftblasenfrei in die Blotapparatur gelegt. Die angelegte Spannung betrug $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Gelfläche. Dabei war zu beachten, dass die Anode auf der Seite der Nitrocellulosemembran angeschlossen wurde, da die Proteine durch die Anlagerung von SDS negative Ladungen trugen, und somit von der Kathode aus dem Gel zur Anode wanderten. Der Transfer erfolgte für 1,5 Stunden. Zum Abschluss wurde die Membran mit A. dest. gespült und konnte für die Immunreaktion eingesetzt werden.

Um das unspezifische Binden des primären Antikörpers an die Membran zu vermeiden, wurde sie mit Blocklösung für eine Stunde bei Raumtemperatur vorinkubiert. Danach gab man den primären Antikörper in frischer Blocklösung zur Membran und inkubierte mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach diesem Schritt wurden die freien und unspezifisch angelagerten Antikörper in mehreren Waschsritten mit Waschpuffer von der Membran entfernt. Nun erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, welcher mit einem Enzym (Meerrettich-Peroxidase) gekoppelt war. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für eine Stunde.

Nach erneutem, mehrmaligem Waschen der Membran, konnten die Antikörper-Protein-Konjugate detektiert werden. Die Detektion der Antikörper-Protein-Konjugate erfolgte durch die Meerrettich-Peroxidase- (HRP) Reaktion. Dazu wurde die Membran mit der selbstgemachten ECL-Lösung (ECL-LösungA und ECL-LösungB im Verhältnis 1:1) für eine Minute inkubiert. Bei Umsatz des in der Lösung enthaltenen Substrates erfolgte die Emission von Licht, welche mittels eines Röntgenfilmes detektiert werden konnte.

3 Ergebnisse

3.1 Bestimmung der Mutationsrate des Prototypischen Foamyvirus

3.1.1 Klonierung des Vektors pKG83

Die Bestimmung der Mutationsrate erfolgte über die Analyse foamyviraler Integrate in mit Viruspartikeln infizierten Zielzellen. Um den Selektionsdruck zu vermeiden, der beim Verwenden eukaryotischer Marker oder anderer eukaryotischer Proteine entsteht, so nur eine negative Selektion zulässt und dadurch stille Mutationen „aussortiert“, wurden Sequenzen in den verwendeten Vektor eingesetzt, welche keine eukaryotischen Proteine kodierten und für die Analyse herangezogen. Diese Bereiche bestanden aus einem Ampizillinresistenzgen mit zugehörigem prokaryotischen Promoter und dem *lacZα*-Fragment mit Operator. In Abb. 3. 1 ist der verwendete PFV-Vektor (pKG83) dargestellt. Er besitzt außer den prokaryotischen Bereichen alle für den Transfer des PFV-Genoms notwendigen Bereiche, wie Long Terminal Repeats (LTRs), Verpackungssignal (cis-aktive Sequenz I und II, CASI/II) und ein eukaryotisches Markergen (EGFP) zur Selektion infizierter Zielzellen. Die prokaryotischen Bereiche in den Integraten der Zielzellen wurden später sequenziert, mit der Ausgangssequenz des Vektors pKG83 verglichen und so die Mutationsrate von PFV ermittelt. Der Vektor pKG83 wurde konstruiert, indem die Vektoren pMH119 und pMD9 mit *EcoRI* und *MluI* verdaut und pMH119 danach durch Zugabe von alkalischer Phosphatase aus dem Kälberdarm (calf intestine alkaline phosphatase, CIAP) dephosphoryliert wurde. Der Vektor pMH119 war ein foamyviraler Vektor, welcher die Leseraster für die Gag- und Pol-Proteine trug und bei dem das Ampizillinresistenzgen mit dem prokaryotischen Promoter zur Selektion in Bakterien zwischen den foamyviralen LTRs lag.

Das Insertfragment aus pMD9 wurde in den Vektorhintergrund von pMH119 ligiert. Dadurch ergab sich der Austausch der *gag-pol*-Leseraster gegen die CASI/II-Kassette aus pMD9. So war zwar die Verpackung der pMH119-RNA gewährleistet, es erfolgte aber keine Gag- bzw. Pol-Expression durch diesen Vektor mehr. Der erhaltene Vektor pMH119 CASI/II wurde nun mit *NotI* verdaut, mit CIAP behandelt und ein *lacZα*-Fragment eingesetzt, welches vorher aus dem Vektor pUC19 mit den Primern #4229 und #4230 und der Pwo-Polymerase amplifiziert worden war. Das verwendete Temperaturregime bestand aus einer initialen Denaturierung für 2 min bei 95 °C, Denaturierung für 15 sek bei 95 °C, Annealing der Primer für 1 min bei 60 °C, Elongation für 40 sek bei 72 °C. Die letzten drei Schritte wurden jeweils fünfmal wiederholt. Die eingesetzte Annealingtemperatur war in diesen fünf Zyklen etwa 5 °C

niedriger als das berechnete Optimum der Primer, um ein ausreichendes Anlagern dieser an das Template zu gewährleisten, da die Primer durch eingefügte *NotI*-Restriktionschnittstellen nicht zu 100 % an das Template binden konnten. Die so in das PCR-Produkt eingefügten Schnittstellen wurden bei den nachfolgenden Klonierungsschritten benötigt. Nach diesen ersten fünf Zyklen erhöhte sich die Annealingtemperatur für 20 Zyklen auf 65 °C (optimale Annealingtemperatur der Primer), um die Bildung unspezifischer PCR-Produkte zu minimieren. Das erhaltene PCR-Produkt wurde über ein Agarosegel und das Qiaquick Gel Extraction Kit aufgereinigt, mit *NotI* verdaut und in den linearisierten pMH119 CASI/II-Vektor gesetzt, um den Vektor pKG83 zu konstruieren.

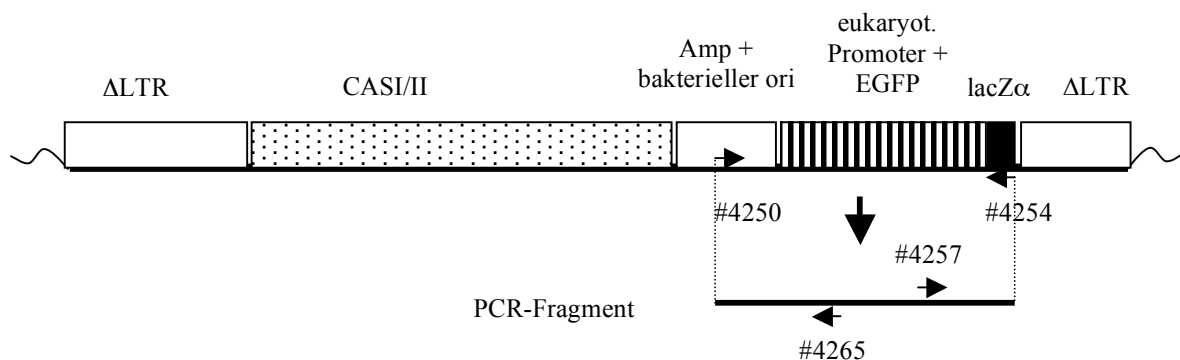


Abb. 3. 1: Kassette des Vektors pKG83 zur Bestimmung der *in-vivo* Mutationrate bei PFV; ΔLTR – deletierte Long Terminal Repeats; CASI/II – cis-aktive Sequenz I und II; Amp – Ampizillinresistenzgen; EGFP – Grün fluoreszierendes Protein

3.1.2 Versuchsablauf zur Bestimmung der foamyviralen Mutationsrate in Zellkultur

Die Bestimmung der Mutationsrate von PFV erfolgte in einer einzigen Replikationsrunde, da replikationsinkompetente Viruspartikel zur Transduktion der Zielzellen verwendet wurden. Zur Partikelproduktion wurden 293T-Zellen in 6cm-Schalen mit den Plasmiden pKG83, pCZIgag2, pCZenvEM002 und pCZIpil (ohne bzw. mit pLENbet; siehe 3.1.3 und 3.1.4) transfiziert. Als Transfektionsreagenz diente Polyethylenimin (PEI). Am Tag nach der Transfektion erfolgte die Induktion der Zellen mit Natriumbutyrate, ein Mediumwechsel nach acht Stunden und die Ernte der Viruspartikel wiederum einen Tag später. Dazu wurde der Überstand von den 293T-Zellen abgenommen, durch einen 0,45 µm-Filter filtriert, Aliquots bei -80 °C eingefroren und nach dem Auftauen in verschiedenen Verdünnungen auf Zielzellen (HeLa) gegeben. Da es bei der Lagerung bei -80 °C im Vergleich zu direkt

geerntetem Überstand zu einem Titerverlust kommt, wurden die Titer der Überstände erst nach dem Einfrieren mittels FACS-Analyse bestimmt. Somit war gewährleistet, dass alle Aliquots eines Überstandes den gleichen Titer aufwiesen.

Zielzellen wurden danach so mit dem verdünnten Überstand infiziert, dass die Infektionsrate zwischen 2 % und 5 % lag (Infektion mit 1:30-Verdünnung), um Doppelinfektionen zu vermeiden. Für die Gewinnung von Einzelzellklonen erfolgte die Selektion positiver (grün fluoreszierender) Zellen mit dem FACSDiVa Cellsorter in 96-Loch-Platten, welche in 12-Loch-Platten expandiert wurden, nachdem sie angewachsen waren. Wenn für jeden Einzelzellklon ausreichend Zellen hochgewachsen waren, wurde ein Teil in Einfriermedium in flüssigem Stickstoff gelagert und von dem anderen Teil genomische DNA geerntet (mittels Qiagen Blood and Tissue Kit), die zur Analyse des foamyviralen Integrats eingesetzt wurde.

Zur Sequenzanalyse der Integrate erfolgte eine PCR aus je 1 µl der geernteten genomischen DNA der Einzelzellklone (30 µl Gesamt-PCR-Ansatz). Als Polymerase wurde die Pwo eingesetzt, da sie eine geringere Mutationsrate aufweist, als die Taq-Polymerase. Dadurch minimierte sich die Verfälschung der Ergebnisse durch Einfügen von Mutationen über die verwendete Polymerase. Die PCR erfolgte unter Zugabe von 5 % DMSO, um Sekundärstrukturen zu vermeiden, die durch GC-reiche Sequenzen in der genomischen DNA hervorgerufen werden konnten. Das Temperaturregime der PCR bestand aus einem initialen Denaturierungsschritt für 2 min bei 95 °C, danach folgten 30 sek Denaturierung, 1 min Annealing der Primer #4250 und #4254 bei 55 °C und 3 min Elongation bei 72 °C. Diese drei Schritte wurden 35mal wiederholt, um eine ausreichende Menge an amplifiziertem PCR-Produkt zu gewährleisten. Am Ende schloss sich ein finaler Elongationsschritt für 10 min bei 72 °C an, um auch unvollständige PCR-Produkte zu vervollständigen. Das entstandene PCR-Produkt mit den jeweiligen Primern ist in Abb. 3. 1 unter der Vektorkassette dargestellt.

Um zu testen, ob die PCR funktioniert hat, wurden je 5 µl auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen und auf das Vorhandensein einer ca. 2200 bp-Bande getestet. Eine erfolgreiche PCR ist für einige Klone exemplarisch in Abb. 3. 2 gezeigt.

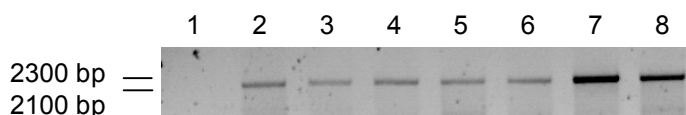


Abb. 3. 2: PCR aus genomischer DNA von pKG83-Einzelzellklonen; 1 – H₂O-Negativkontrolle; 2 – Klon 83B/079; 3 – Klon 83B/083; 4 – Klon 83B/089; 5 – Klon 83B/149; 6 – Klon 83B/196; 7 – Klon 83B/203; 8 – Klon 83B/246

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit dem Sigma GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Elution in je 30 µl A. dest.). Jeweils 0,5 µl des aufgereinigten Produktes wurden für die nachfolgende Sequenzierung eingesetzt. Sequenziert wurde mit dem BigDye Terminator® v1.1 Cycle Sequencing Kit und den Primern #4257 bzw. #4265. Mit Primer #4257 erfolgte die Sequenzierung des *lacZα*-Fragmentes, mit Primer #4265 erhielt man die Sequenz eines Teils des Ampizillinresistenzgens (siehe Abb. 3. 1). Die erhaltenen Sequenzen wurden mit den entsprechenden Bereichen der Ausgangssequenz von pKG83 verglichen und die gefundenen Mutationen ins Verhältnis zur Gesamtanzahl sequenzierter Basen gesetzt, um so die Mutationsrate zu ermitteln (siehe 3.1.3 und 3.1.4).

3.1.3 Bestimmung der foamyviralen Mutationsrate in Zellkultur unter Berücksichtigung zellulärer Restriktionsenzyme

3.1.3.1 Die foamyvirale Mutationsrate ohne koexprimiertes Bet (Einfluss von APOBEC-Proteinen)

Die Versuche zur Bestimmung der foamyviralen Mutationsrate wurden, wie unter 3.1.2 beschrieben, zuerst ohne koexprimiertes Bet-Protein durchgeführt. Es wurden insgesamt 110 Klone und eine Basenanzahl von 93003 bp sequenziert und mit der Ausgangssequenz von pKG83 verglichen. Ein Beispiel für das Annealing eines sequenzierten Einzelzellklons (PCR) mit der Ausgangssequenz ist in Abb. 3. 3 gezeigt. Unter allen erfolgreich sequenzierten Klonen konnten 39 Mutationen identifiziert werden, bei denen es sich ausschließlich um G-zu-A-Mutationen handelte. Setzte man diese Zahl ins Verhältnis zur Gesamtanzahl sequenzierter Basen, ergab sich eine Mutationsrate von $4,2 \times 10^{-4}$ pro Base pro Replikationszyklus. Diese Rate wäre sehr hoch und das ausschließliche Auftreten nur einer Mutationsart war sehr auffällig. Dies ließ auf die Beteiligung von APOBEC-Proteinen schließen, die als zelluläre Restriktionsfaktoren Mutationen in das Virusgenom einfügen und so zu dessen Degradierung führen können (siehe 1.4). Um deren Einfluss zu bestätigen, wurde eine Expressionsanalyse des humanen APOBEC3F (hA3F) und 3G (hA3G) mittels quantitativer RealTime-PCR (qRT-PCR) in den verwendeten Zelllinien durchgeführt und der Versuch mit koexprimiertem Bet-Protein wiederholt (siehe 3.1.4).

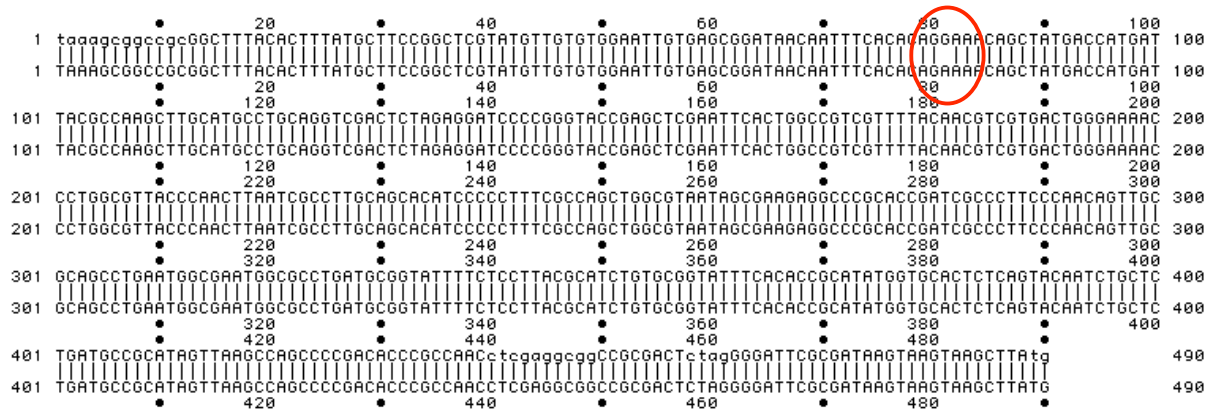


Abb. 3. 3: Annealing des *lacZ α* -Fragments des Einzelzellklons 83/060 mit der Ausgangssequenz von pKG83; obere Sequenz: Ausgangssequenz von pKG83; untere Sequenz: Klon 83/060 mit G-zu-A-Mutation an Position 81 (hervorgehoben)

Das APOBEC-Protein mit dem stärksten mutagenen Einfluss auf Retroviren ist hA3G, weshalb wir dessen Expression in den Zellen als erstes überprüften. Da bisher die zelluläre Expression der APOBEC-Proteine durch Westernblots nicht gezeigt werden konnte (Russell et al., 2005), gingen wir davon aus, dass die Expression der Proteine nur gering war. Auch wir konnten keine Expression von hA3G in 293T-Zellen im Westernblot nachweisen (siehe Abb. 3. 4). In Zellen, die mit einem hA3G-Expressionsplasmid transfiziert wurden, war dagegen eine deutliche hA3G-Proteinbande auf einer Höhe von 42 kD zu erkennen. Für hA3F stand kein Antikörper zur Verfügung, weshalb dessen Protein-Expression nicht über einen Westernblot untersucht werden konnte.



Abb. 3. 4: Westernblot von Zelllysaten aus 293T-Zellen zum Testen auf hA3G-Expression; 1 – Zelllysate mit pLENbet; 2 – Zelllysate mit pcDNA hA3G (Positivkontrolle); 3 – Zelllysate mit pcDNA3.1 zeo(+)+ pLENbet; 4 – Zelllysate mit pcDNA hA3G (Negativkontrolle)

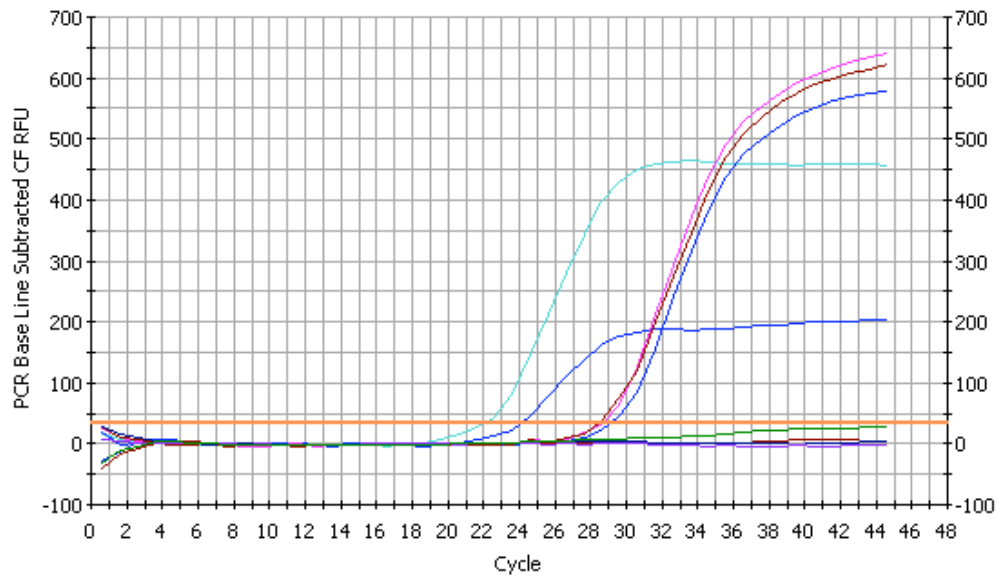
Die qRT-PCR ist eine Methode, mit der geringe Mengen an mRNAs in Zellen nachweisbar sind. Wenn die mRNA eines Proteins nachgewiesen wird, kann daraus geschlossen werden, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit auch die Expression dieses Proteins stattfindet. Mit dieser Methode sollte die Expression der APOBEC-Proteine hA3F und hA3G nachgewiesen werden. Dazu erfolgte von jeweils 5×10^6 Zellen der Zelllinien 293T (virusproduzierende Zellen), HeLa (Zielzellen) und PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells, Positivkontrolle) mittels des RNeasy Mini Kits (Qiagen) die Ernte zellulärer RNA. PBMCs

dienten in den Versuchen als Positivkontrolle, da sie verschiedene APOBEC-Proteine nachweisbar exprimierten (Liddament et al., 2004, Wiegand et al., 2004). Für die eingesetzte Zellzahl ergab sich für 293T-Zellen eine RNA-Konzentration von 0,92 µg/µl, für HeLa-Zellen 1,672 µg/µl und für PBMCs 0,271 µg/µl. Jeweils 1 µg der isolierten RNA wurde für eine cDNA-Synthese eingesetzt (iScript™cDNA Synthesis Kit, BioRad; Gesamtansatz 6 µl). Für die qRT-PCR erfolgte der Einsatz von 1 µl der synthetisierten cDNA. Zum Nachweis von hA3G wurden kommerziell erhältliche und getestete Primerpaare eingesetzt (Qiagen), um ein Fragment des untersuchten hA3G zu amplifizieren. Abb. 3. 5 A zeigt die Expressions- und die Schmelzkurve einer solchen qRT-PCR. Es ist deutlich zu erkennen, dass sowohl 293T-Zellen, als auch PBMCs signifikante Mengen an hA3G exprimierten, da jeweils nach ca. 23 Zyklen (PBMC) bzw. 29 Zyklen (293T-Zellen) ein PCR-Produkt auftrat. HeLa-Zellen dagegen zeigten keine Expression.

Um die Spezifität der PCR-Produkte zu überprüfen, wurden ihre Schmelzkurven bestimmt. Die Abb. 3. 5 B zeigt, dass alle gebildeten PCR-Produkte aus der qRT-PCR die gleiche Schmelztemperatur von etwa 83,5 °C und somit die gleiche Basensequenz aufwiesen. Somit ergab sich für die untersuchten Zelllinien ein spezifisches PCR-Produkt für hA3G, welches nach Sequenzierung eindeutig der hA3G-Sequenz zugeordnet werden konnte.

Zum Testen der Zellen auf die Expression der hA3F-mRNA wurde eine qRT-PCR durchgeführt, bei der die Primer #4286 und #4287 eingesetzt wurden. HeLa-Zielzellen wurden nicht auf hA3F getestet, da die APOBEC-Proteine bei PFV ihre Wirkung in den Produktionszellen ausüben, da dort die reverse Transkription ihres Genoms stattfindet. In den Zielzellen haben die APOBEC-Proteine keinen Einfluss mehr auf das PFV-Genom. Außerdem nimmt man an, dass hA3G und hA3F koexprimiert werden (Liddament et al., 2004, Wiegand et al., 2004). Da in den HeLa-Zellen keine hA3G-Expression nachzuweisen war, kann man davon ausgehen, dass auch hA3F nicht exprimiert wurde.

Abb. 3. 6 zeigt das Auftreten eines spezifischen PCR-Produktes von hA3F in PBMCs nach ca. 21 Zyklen, in 293T-Zellen nach etwa 25 Zyklen. Auch hier wurde die Spezifität der Primer und damit des PCR-Produktes durch die Bestimmung der Schmelzkurve (Schmelztemperatur etwa 88 °C) bestätigt. Dies bedeutet, dass auch hA3F in 293T-Zellen und PBMCs exprimiert wurde. Die Ergebnisse zeigen, dass der Einfluss der APOBEC-Proteine bei der Untersuchung der foamyviralen Mutationsrate berücksichtigt werden muss.

A: Expressionskurve

PBMC (2)	PCR-Produkt tritt auf in Zyklus	22.2
PBMC (3)	PCR-Produkt tritt auf in Zyklus	24.2
293T (1)	PCR-Produkt tritt auf in Zyklus	29.2
293T (2)	PCR-Produkt tritt auf in Zyklus	28.8
293T (3)	PCR-Produkt tritt auf in Zyklus	28.6
HeLa (1)	negativ	
HeLa (2)	negativ	
HeLa (3)	negativ	
H ₂ O-Kontrolle	negativ	

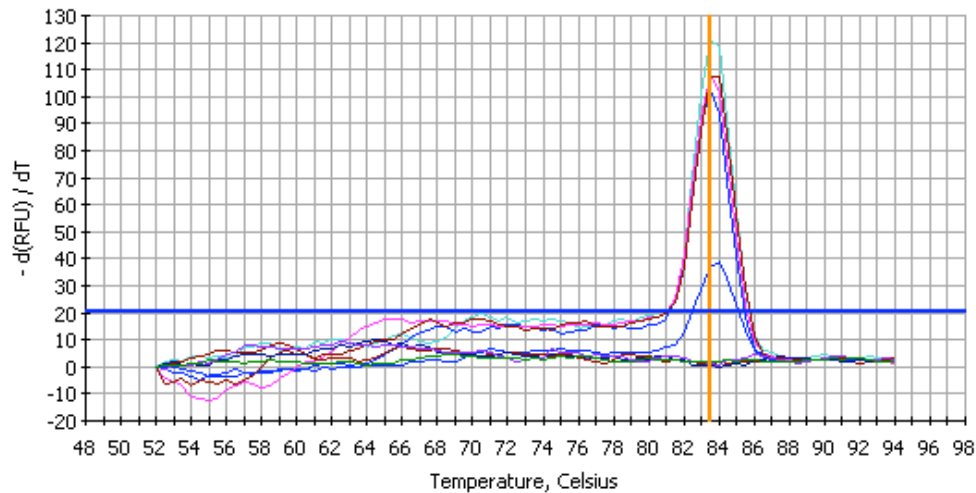
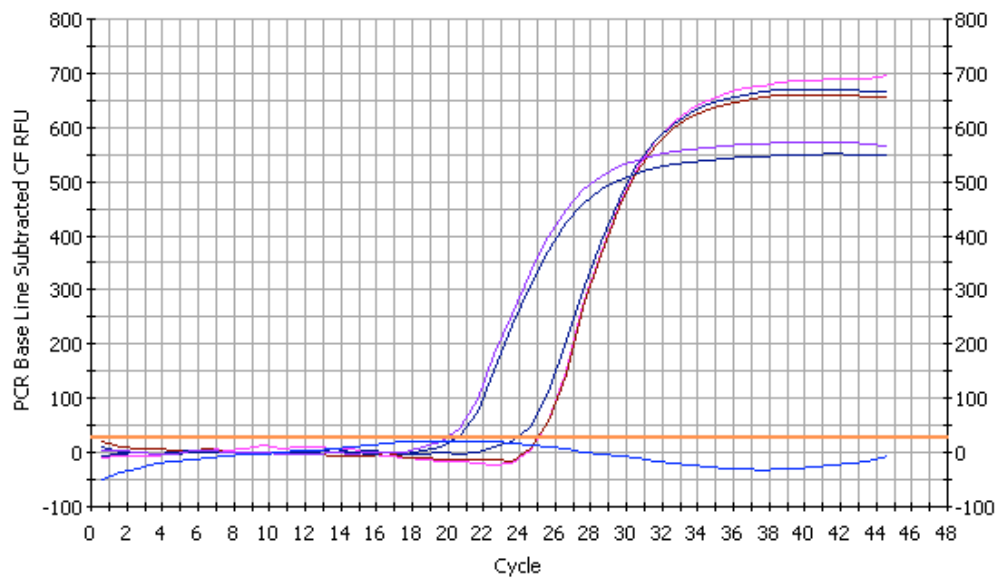
B: Schmelzkurve

Abb. 3. 5: Expressionskurve (A:) mit zugehöriger Schmelzkurve (B:) einer RealTime PCR; zur Bestimmung der Expression von hA3G in PBMCs, HeLa- und 293T-Zellen

A: Expressionskurve

PBMC (1)	PCR-Produkt tritt auf in Zyklus	20.9
PBMC (2)	PCR-Produkt tritt auf in Zyklus	20.5
293T-Zellen (1)	PCR-Produkt tritt auf in Zyklus	25.3
293T-Zellen (2)	PCR-Produkt tritt auf in Zyklus	25.3
293T-Zellen (3)	PCR-Produkt tritt auf in Zyklus	24.3
H2O-Kontrolle	negativ	

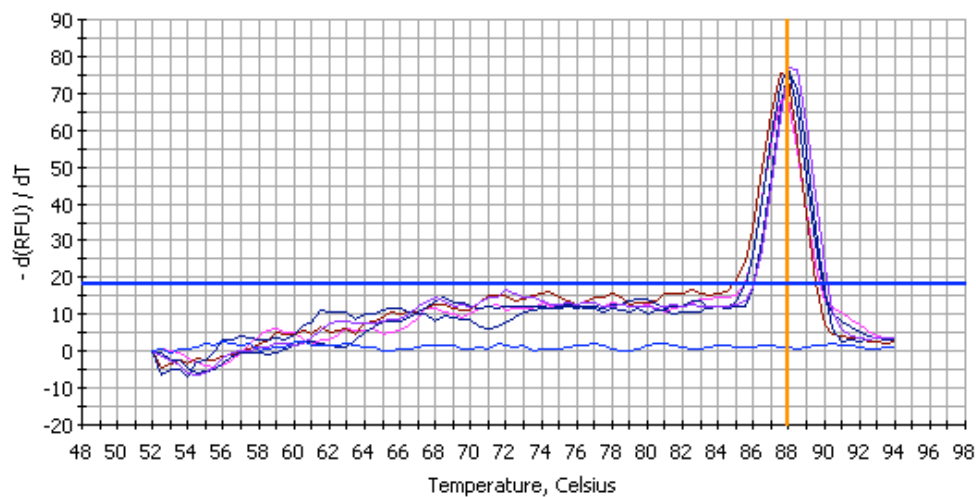
B: Schmelzkurve

Abb. 3. 6: Expressionskurve (A:) mit zugehöriger Schmelzkurve (B:) einer RealTime PCR; zur Bestimmung der Expression von hA3F in PBMCs und 293T-Zellen

3.1.3.2 Bestimmung der absoluten Expression von hA3G und hA3F und ihre Normalisierung auf House-Keeping-Gene

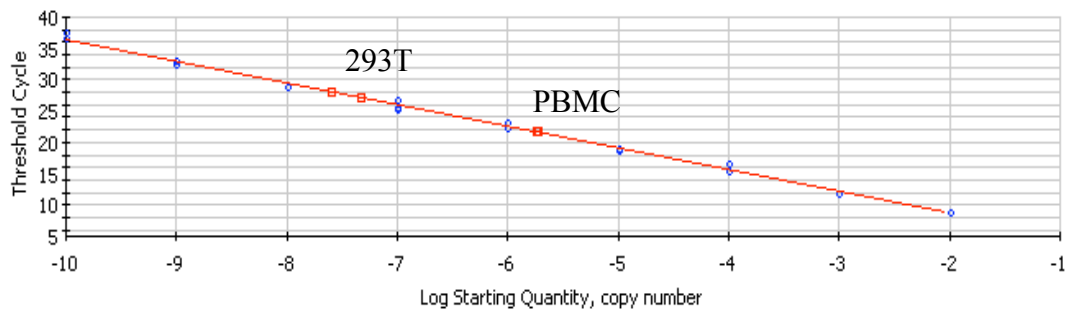
Nachdem gezeigt werden konnte, dass die 293T-Produktionszellen hA3G und hA3F exprimierten, sollte eine Analyse der Expressionsmenge erfolgen. Um diese in den Zellen abschätzen zu können, wurden Standards der entsprechenden PCR-Produkte von hA3F und hA3G hergestellt, das heißt, die Konzentration der PCR-Produkte, die durch die qRT-PCR entstanden waren, wurde photometrisch bestimmt und in den Verdünnungen 1×10^{-2} bis 1×10^{-10} ng/ μ l (verdünnt in 10er Potenzen) für die qRT-PCR eingesetzt. Die Synthese der PCR-Produkte der verschiedenen Verdünnungen erfolgte somit nacheinander, entsprechend der eingesetzten Standard-DNA-Konzentration. Je nachdem, in welchem Zyklus das PCR-Produkt der zu untersuchenden Zelllinien auftrat, konnte deren Expressionsmenge im Vergleich zu den definierten Mengen der Standardkurve bestimmt werden. Als Positivkontrolle dienten PBMCs.

Die RNA-Isolierung und cDNA-Synthese aus den Zellen erfolgte wie unter 3.1.3.1 beschrieben. Für die qRT-PCR wurde je 1 μ l der cDNA eingesetzt. Die absoluten Zahlen durch die Bestimmung mittels Standardkurve betragen für hA3G in PBMCs $1,84 \times 10^{-6}$ ng/ μ l und in 293T-Zellen $3,66 \times 10^{-8}$ ng/ μ l, was etwa 50fach niedriger ist als in PBMCs. Die Konzentration von hA3F war für PBMCs $4,0 \times 10^{-6}$ ng/ μ l, was ca. 18mal höher ist als bei 293T-Zellen mit $2,27 \times 10^{-7}$ ng/ μ l. Die Werte zeigten weiterhin eine höhere, absolute Konzentration von hA3F in den Zellen, das heißt, dessen Expression war stärker als die von hA3G (siehe Abb. 3. 7).

A: Standardkurve für hA3G

Correlation Coefficient: 0.998 Slope: -3.474 Intercept: 1.741 $Y = -3.474 X + 1.741$
 PCR Efficiency: 94.0 %

□ Unknowns
 ○ Standards

**B: Standardkurve für hA3F**

Correlation Coefficient: 0.999 Slope: -3.321 Intercept: 3.181 $Y = -3.321 X + 3.181$
 PCR Efficiency: 100.0 %

□ Unknowns
 ○ Standards

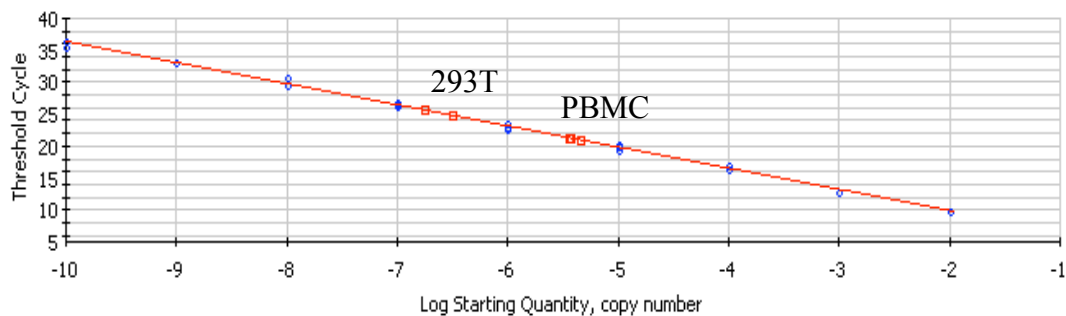


Abb. 3. 7: Standardkurven; A: Expression von hA3G; B: Expression von hA3F in 293T-Zellen und PBMCs

Um eine Aussage über die absoluten Unterschiede der Expressionen zu treffen, wurden die hA3G- und hA3F-Werte auf House-Keeping-Gene (ubiquitär exprimierte Gene) normalisiert. Dazu wurden die RNA-Mengen von Actin β , GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) und SDHA (Succinat-Dehydrogenase, Untereinheit A) in den jeweiligen Zelllinien über eine Standardkurve wie oben beschrieben, bestimmt und die hA3G- bzw. hA3F-Expression auf diese Werte normalisiert. Die Auswertung erfolgte durch das GeNorm VBA Applet für Excel (Vandesompele et al., 2002). Die resultierenden Diagramme in Abb. 3. 8 zeigen, dass die Expression der untersuchten APOBEC-Proteine wie zu erwarten in den PBMCs höher war, als in den 293T-Zellen. Auch hier bestätigte sich, dass die Expression von hA3F im Vergleich zu hA3G in den 293T-Zellen höher war, wenn man die Expression in PBMCs als Referenz setzte. Es ist also davon auszugehen, dass der Einfluss von hA3G wahrscheinlich geringer ist als der von hA3F. Dies ist bei der Auswertung der Ergebnisse der Mutationsrate zu beachten.

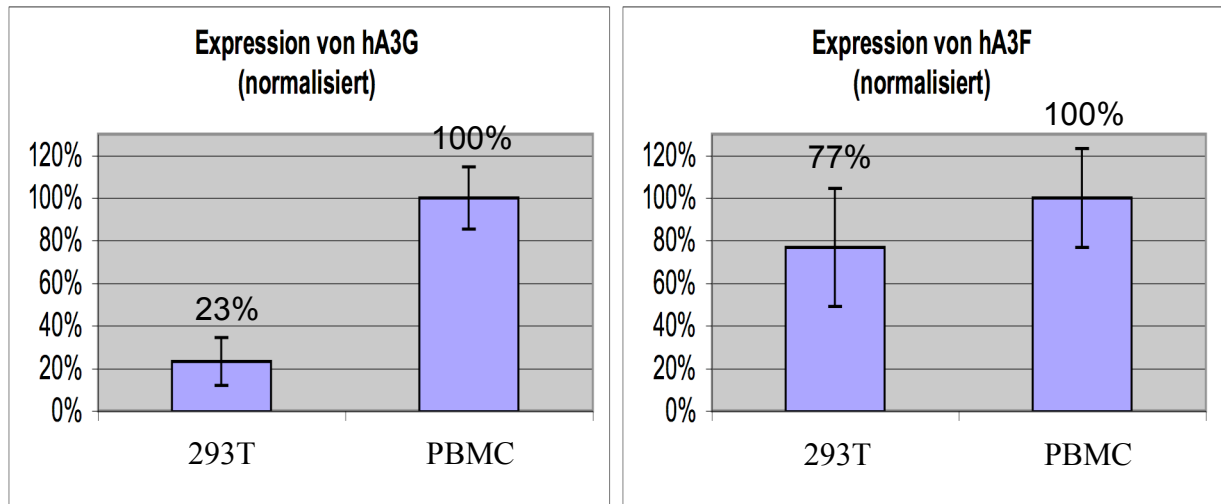


Abb. 3. 8: Normalisierung der hA3G- und hA3F-Proteine in 293T-Zellen und PBMCs gegen die House-Keeping-Gene Actin β , GAPDH, SDHA

3.1.4 Wiederholung des Versuches mit koexprimiertem PFV Bet und Berechnung der Mutationsrate

Das Bet-Protein ist ein akzessorisches PFV-Protein, welches mit zellulären Restriktionsfaktoren interagiert (siehe 1.1.3.1, 1.4.3). Um den Einfluss der APOBEC-Proteine während der reversen Transkription und damit auf die Mutationsrate von PFV zu vermindern, wurde der in 3.1.3.1 beschriebene Versuch mit durch transiente Transfektion der 293T-Produktionszellen koexprimiertem Bet-Protein (kodiert durch den Vektor pLENbet) wiederholt, da keine stabilen, Bet-exprimierenden Zellen zur Verfügung standen. Dadurch wurde zwar der Einfluss der APOBEC-Proteine nicht gänzlich unterdrückt, da mit Sicherheit nicht alle transfizierten 293T-Zellen, die PFV-Partikel produzierten, gleichzeitig das Bet-Protein exprimierten, aber es war ein deutlicher Einfluss auf die G-zu-A-Mutationsrate zu erwarten.

Insgesamt wurden bei diesem Versuch aus 236 Klonen 172368 bp sequenziert. Dabei konnten 35 G-zu-A-Mutationen gefunden werden. Zusätzlich konnten 2 A-zu-G-Mutationen und eine Deletion von 49 Basenpaaren bei drei weiteren Klonen analysiert werden. Zwei weitere Mutationen, die beim ersten Durchgang der Sequenzierungen in zwei Klonen auftraten (G-zu-C; A-zu-C), konnten nach der zweiten Sequenzierung nicht bestätigt werden.

Betrachtet man nur die G-zu-A-Mutationen, ergibt sich im Gegensatz zu den Versuchen, die ohne Bet durchgeführt wurden ($4,2 \times 10^{-4}$) eine Mutationsrate von 2×10^{-4} . Dies war eine Reduktion um mehr als die Hälfte, was den Einfluss des Bet-Proteins deutlich zeigte.

Weiterhin fiel auf, dass die Anzahl der Mutationen pro analysierten Klon deutlich niedriger war als bei den Versuchen ohne Bet. Meist fand sich je Klon nur eine Mutation (20 Klone), 6 Klone besaßen zwei mutierte Gs, während nur ein Klon drei Mutationen gleichzeitig zeigte. Ohne kotransfiziertes Bet konnte jeweils ein Klon mit sechs bzw. fünf mutierten Gs gefunden werden, je zwei Klone hatten drei oder vier Mutationen, sechs Klone wiesen nur eine G-zu-A-Mutation auf.

A)	<u>ohne Bet</u>	<u>mit Bet</u>
A-zu-G		2 x
G-zu-C		1 x (nicht bestätigt)
A-zu-C		1 x (nicht bestätigt)
G-zu-A	39 x	35 x
 B)		
bevorzugt von hA3F	GA 15 x	GA 16 x
bevorzugt von hA3G	GG 8 x	GG 10 x
	GT 2 x	GT 1 x
	GC 14 x	GC 8 x

Abb. 3. 9: Anzahl der Mutationen in den Versuchen mit und ohne Bet; A) Gesamtanzahl aller Mutationen; B) Vergleich der Anzahl der G-zu-A-Mutationen in Hinsicht auf die verschiedenen 3'-seitig angrenzenden Basen

Da bekannt ist, dass für hA3F und hA3G an der 3'-Position des mutierten Gs (Sequenz des komplementären Strangs) bevorzugt ein A (hA3F) bzw. ein G (hA3G) steht (Holmes et al., 2007, Liddament et al., 2004) und durch die transiente Transfektion der 293T-Zellen mit dem Bet-Protein der Einfluss dieser Proteine auf die Mutationsrate nicht gänzlich ausgeschlossen werden konnte, wurden bei der Berechnung der Mutationsrate diese Klone nicht dazugezählt, um der wahren Mutationsrate von PFV näher zu kommen. Im Versuch ohne Bet blieben 16 Mutationen übrig, die nicht diesen Kontext zeigten, während mit Bet nur noch neun G-zu-A-Mutationen berücksichtigt werden bräuchten. Die entsprechende Anzahl an Mutationen in Hinsicht auf die angrenzende 3'-seitige Base ist in Abb. 3. 9 dargestellt. Da weiterhin die APOBEC-Proteine nicht ausschließlich in den erwähnten Kontexten G-zu-A-Mutationen bewirken, wurden sämtliche G-zu-A-Mutationen als APOBEC-Artefakte aus den Berechnungen herausgenommen. Somit ergab sich auf eine Gesamtbasenanzahl von 265371 bp (aus beiden Experimenten) eine Gesamtmutationsrate (A-zu-G-Mutationen und Deletion) von $1,1 \times 10^{-5}$ pro Base pro Replikationszyklus und eine Mutationsrate pro Base (A-zu-G-Mutationen) von $7,5 \times 10^{-6}$ pro Replikationszyklus.

Der Klon 83B/231 zeigte eine Deletion von 49 bp. Meist treten solche Deletionen, die durch retrovirale Reverse Transkriptasen hervorgerufen werden, an homologen Sequenzen auf. Eine Analyse der bei Klon 83B/231 aufgetretenen Deletion zeigte allerdings keine auffälligen Homologien oder Basensequenzen, wie in Abb. 3. 10 dargestellt ist.

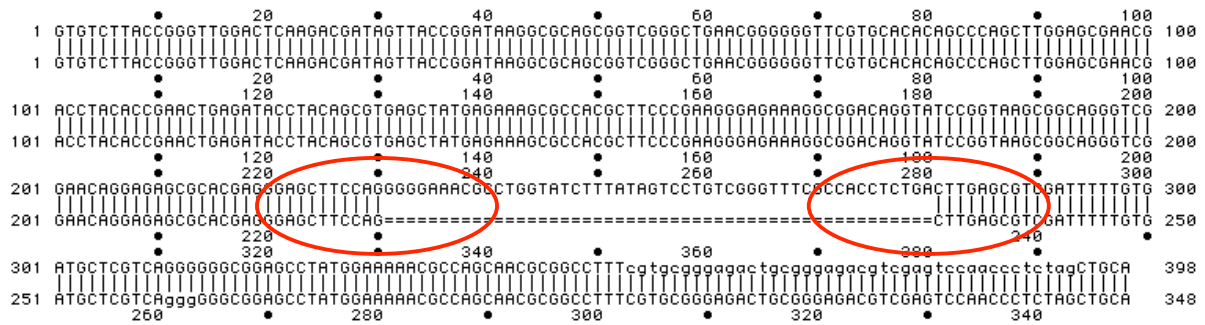


Abb. 3. 10: Annealing eines Teils des Ampizillin-Fragments des Einzelzellklons 83B/231 mit der Ausgangssequenz von pKG83; obere Sequenz: Ausgangssequenz von pKG83; untere Sequenz: Klon 83B/231 mit 49 bp-Deletion

3.2 *Bestimmung der Template Switching Rate des Prototypischen Foamyvirus (PFV)*

3.2.1 Klonierung der Plasmide

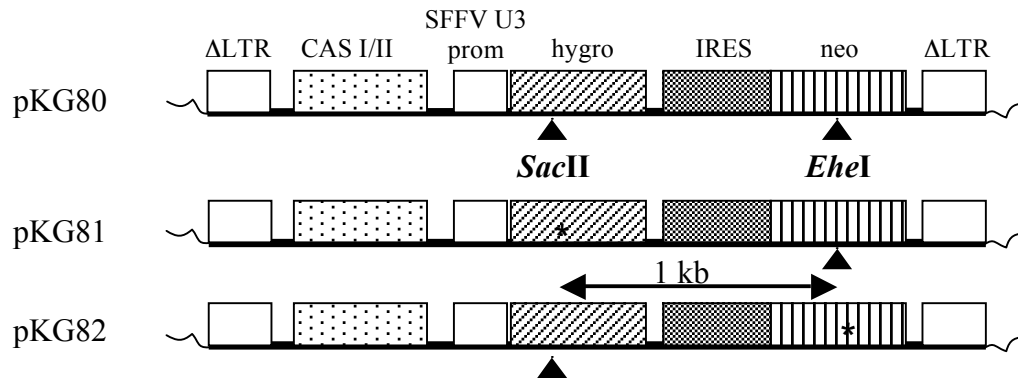
Bisherige Versuche zur Bestimmung der Template Switching Rate wurden meist mittels Resistenzgenen durchgeführt, die in Virusplasmide kloniert wurden und deren Rekombination über Selektion mit den entsprechenden Antibiotika ermittelt wurde. Die in den hier dargestellten Versuchen verwendeten Plasmide enthielten ebenfalls zwei Antibiotikaresistenzgene, welche für Hygromycinresistenz (Hygro) bzw. Neomycinresistenz (Neo) kodierten, separiert durch ein IRES-Element (internal ribosomal entry site). Die ursprüngliche Kasette, welche später in die PFV-Vektoren gesetzt wurde, stammte aus den MLV-Vektoren pJS30, pJA31-1kb und pJA32-1kb (Anderson et al., 1998). Die Vektoren unterschieden sich darin, dass pJA31-1kb eine Deletion von zwei Basen im Hygro-Resistenzgen besaß, wodurch dieses inaktiviert und außerdem eine *SacII*-Enzymschnittstelle zerstört wurde. Entsprechend enthielt pJA32-1kb eine Insertion von zwei Basen im Neo-Resistenzgen, welche ebenfalls dessen Inaktivierung zur Folge hatte und eine *EheI*-Enzymschnittstelle zerstörte. Somit kodierten pJA31-1kb und pJA32-1kb nur jeweils für ein Resistenzgen. Die beiden Mutationen lagen 1000 bp auseinander und ließen die Bestimmung der Template-Switching Rate in diesem Abstand zu (siehe Abb. 3. 11).

Um die entsprechenden Kassetten in den foamyviralen Kontext zu setzen, erfolgte eine PCR mit der *Pwo*-Polymerase und den Primern #1854 und #1856. Es wurden 25 Zyklen durchgeführt, wobei 2 min bei 95 °C denaturiert wurde, das Annealing erfolgte für 1 min bei 59 °C, die Elongation bei 72°C für 2 min 30 sek. Das PCR-Produkt wurde danach mit *Taq*-Polymerase und neuen dNTPs 30 min bei 72 °C inkubiert, um jeweils ein Nukleotid an die 3'-Enden der PCR-Produkte anzuhängen und es über TA-Klonierung in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO zu setzen. Die Überprüfung der Sequenz erfolgte mit den Primern #1854 bis #1856 und #1873 bis #1885. Aus den entstandenen pCR[®]2.1-TOPO-JS/JA-Vektoren wurden die Kassetten mit den Enzymen *BstXI* und *EcoRV* ausgeschnitten und in den mit *BamHI* und *NotI* linearisierten Vektor pMD9 ligiert. Die überhängenden Enden von pMD9 wurden vorher jeweils mit T4-DNA-Polymerase abgedaut bzw. mit Klenow-Enzym aufgefüllt.

Die entstandenen Plasmide pKG80, pKG81 und pKG82 enthielten entsprechend den oben beschriebenen MLV-Vektoren beide funktional aktive Resistenzgene (pKG80), das Neo- und das mutierte Hygro-Resistenzgen (pKG81) oder das Hygro- und das mutierte Neo-

Resistenzgen (pKG82). Die Expressionskassetten der MLV-Ausgangsplasmide und die konstruierten PFV-Plasmide sind in Abb. 3. 11 dargestellt.

A:



B:

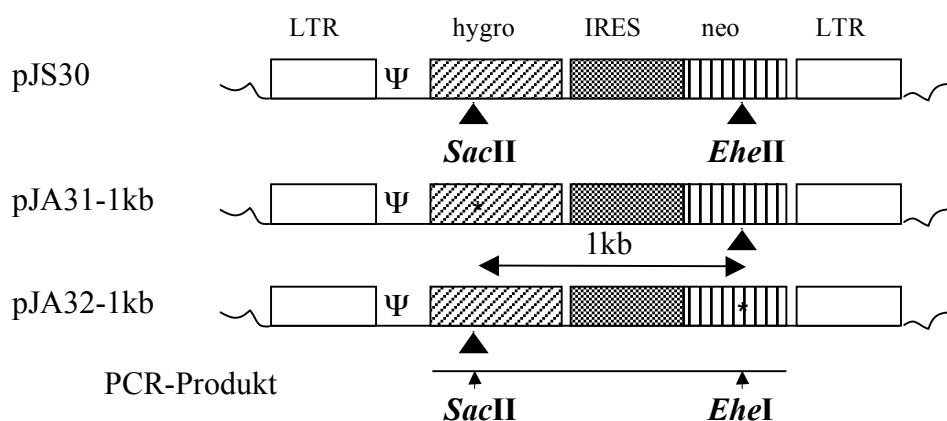


Abb. 3. 11: A: Kassetteln der PFV- Expressionsplasmide; B: MLV-Expressionsplasmide und entstehendes PCR-Produkt der viralen Integrate (nach Anderson et al., 1998); LTR – long terminal repeats; Hygro – Hygromycinresistenzgen; ΔLTR – deletierte long terminal repeats (ΔU3-Prom); CAS I/II – Cis-aktive Sequenz I und II (Verpackungssignal von PFV); SFFV U3 prom – Promoter des Spleen Focus Forming Virus; IRES – internal ribosomal entry site; Ψ - Verpackungssignal von SFV; Neo – Neomycinresistenzgen; *SacII*, *EheI* – Enzymschnittstellen des PCR-Produktes; * - eingefügte Mutationen in den Genen

3.2.2 Die Template Switching Rate von PFV im Vergleich zu MLV

Die Transfektion der 293T-Zellen zur Virusproduktion über das Vier-Plasmid-System erfolgte mit Polyethylenimin (PEI). Der virushaltige Überstand wurde geerntet, über einen 0,45 µm-Filter filtriert, Aliquots bei -80 °C eingefroren und danach der Titer durch Infektion von 293-Zielzellen mit unterschiedlichen Verdünnungen bestimmt. Das Einfrieren diente dazu, für jede Infektion mit Aliquots des gleichen Überstandes den gleichen Titer zu

gewährleisten, da beim Einfrieren des geernteten Überstandes bei -80 °C stets ein Titerverlust auftritt. Da die in diesem Versuch verwendeten Plasmide pKG80, pKG81 und pKG82 (PFV-Vektoren) und pJS30, pJA31-1kb und pJA32-1kb (MLV-Vektoren) nur jeweils für die verpackbare RNA der jeweiligen Viren kodierten, erfolgte zur Virusproduktion die Kotransfektion der 293T-Zellen mit den Plasmiden pCZIpol, pCZenvEM002 und pCZIgag2 (für PFV) bzw. pHIT60 und pczVSV-G wt (für MLV), welche die entsprechenden Gag-, Pol- und Env-Proteine kodierten. Da die entstandenen Partikel nicht mehr für die viralen Proteine kodierten, die zur Replikation und Partikelbildung notwendig sind, waren die geernteten Viruspartikel nicht mehr in der Lage, nach ihrer Integration in das Wirtsgenom weiter zu replizieren. Die Bestimmung der Template-Switching Rate erfolgte also innerhalb einer Replikationsrunde.

Für die Ermittlung der Template-Switching-Rate für PFV wurden die Zielzellen mit einem niedrigen Titer infiziert, der einer multiplicity of infection (MOI) von weniger als 0,01 entsprach (Anzahl der infektiösen Viruspartikel pro Zelle). Nach Selektion mit den entsprechenden Antibiotika ließ sich aus der Rate der doppelresistenten im Vergleich zu den einzelresistenten Klonen die Template-Switching-Rate berechnen.

Tab. 3. 1: Selektion mit den verschiedenen Antibiotika und Wachstum der selektierten Zellen

	<u>Selektion/Wachstum</u>		
	G418	Hygro	G418+Hygro
pKG80	+/+	+/+	+/+
pKG81	+/+	+/-	-/-
pKG82	+/-	+/+	-/-
pKG81+pKG82	+/+	+/+	+/+
	G418	Hygro	G418+Hygro
pJS30	+/+	+/+	+/+
pJA31-1kb	+/+	+/-	-/-
pJA32-1kb	+/-	+/+	-/-
pJA31-1kb+pJA32-1kb	+/+	+/+	+/+

Die Infektion von 293-Zielzellen (1×10^4 Zellen je Loch einer 12-Loch-Platte) erfolgte mit verschiedenen Verdünnungen der Überstände, die von den jeweiligen Plasmiden über das

Vier-Plasmid-System erzeugt wurden (1:2, 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000). Nach 24 Stunden begann die Selektion der verschiedenen Infektionen (je nach eingesetztem Plasmid) mit 600 µg/ml G418 (ein Neomycinanalogon), 250 µg/ml Hygro oder 400 µg/ml G418 plus 150 µg/ml Hygro (Schema siehe Tab. 3. 1). Die erhaltenen resistenten Klone wurden in geeigneten Verdünnungen ausgezählt.

Die Titerbestimmung der einzelnen Plasmide (pKG80, pKG81, pKG82, pJS30, pJA31-1kb, pJA32-1kb) diente dazu, ihre Expression zu überprüfen und sollte für die nur für G418- bzw. Hygro-Resistenz kodierenden Plasmide etwa gleich sein. Die entsprechenden Ergebnisse aus drei verschiedenen, unabhängigen Experimenten sind in Tab. 3. 2 dargestellt. Dabei zeigte sich, dass zwar in den unterschiedlichen Experimentansätzen größere Titerunterschiede zu erkennen waren, aber die innerhalb eines Experimentes ermittelten Werte in den meisten Fällen vergleichbar waren. Auch sieht man deutlich, dass für die MLV-Plasmide viel niedrigere Titer erreicht wurden, als für die PFV-Plasmide.

Tab. 3. 2: Titerbestimmung der Ausgangsplasmide zur Expressionsbestimmung (Viruspartikel pro ml)

pKG80

	Hygro	G418	G418+Hygro
Exp.1	51000	40000	27000
Exp.2	36000	22000	32000
Exp.3	300000	320000	290000

	pKG81		pKG82	
	Hygro	G418	Hygro	G418
Exp.1	0	31000	61500	0
Exp.2	0	47000	48000	0
Exp.3	0	140000	100000	0

pJS30

	Hygro	G418	G418+Hygro
Exp.1	1500	1100	1900
Exp.2	1300	1000	950
Exp.3	2400	2950	2450

	pJA31-1kb		pJS32-1kb	
	Hygro	G418	Hygro	G418
Exp.1	0	970	1170	0
Exp.2	0	300	515	0
Exp.3	0	395	370	0

Zur Bestimmung der Template-Switching-Rate wurden 293T-Zellen entweder mit den Plasmiden pKG81 und pKG82 (für PFV) bzw. pJA31-1kb und pJA32-1kb (für MLV) und den entsprechenden Gag-, Pol- und Env-Helferplasmiden kotransfiziert. Da pro retroviralen Partikel statistisch zwei genomische RNAs verpackt werden und diese Verpackung optimalerweise zufällig erfolgt, ergaben sich in diesem Fall drei verschiedene RNA-Kombinationen in den Partikeln. Die beiden homozygoten Viruspopulationen trugen jeweils zwei gleiche RNAs, die das gleiche Resistenzgen kodierten (nur Hygro- bzw. nur Neo-Resistenzgen). Die dritte Population war heterozygot, sie verpackte je eine RNA für Hygro- und eine für Neo-Resistenz.

Bei Retroviren dient die RNA in der Zielzelle während der reversen Transkription als Matrize zur (-)DNA-Strang-Synthese. In den meisten Fällen verwendet die Reverse Transkriptase (RT) nur einen RNA-Strang zum Umschreiben. Es kommt aber vor, dass die RT durch die Homologie der beiden RNAs die reverse Transkription an einem RNA-Strang beginnt und dann auf den zweiten springt. Dieses Ereignis des „Switchens“ wurde in dem hier verwendeten Versuchsansatz so dargestellt, dass nach Infektion der Zielzellen mit dem Virusüberstand der oben beschriebenen Mischpopulation doppelresistente Kolonien anwuchsen, die nicht durch eine Doppelinfektion zweier verschiedener, homozygoter Viren entstanden waren. Das bedeutet, die infizierten Zielzellen enthielten nur ein Integrat mit beiden Antibiotikaresistenzgenen, welches durch das Springen der RT zwischen den unterschiedlichen Templates entstanden war.

Der hier beschriebene Versuchsansatz gilt uneingeschränkt für die verwendeten MLV-Plasmide, da diese die reverse Transkription in den Zielzellen durchführen. Bei PFV gibt es die Besonderheit, dass das Umschreiben der viralen RNA in DNA bereits in der virusproduzierenden Zelle stattfindet. Dies bedeutet, dass das mögliche Template-Switching-Ereignis nicht in der Zielzelle, sondern bereits in der Produktionszelle passiert. In den hier durchgeführten Versuchen erfolgte die Virusproduktion sowohl für MLV als auch für PFV über transiente Transfektion der Plasmide, welche für die Strukturproteine bzw. die RNA kodierten. Dadurch waren die Versuchsbedingungen für beide Viren gleich und die Ergebnisse blieben vergleichbar.

Die Titer für die kotransfizierten Plasmide mit unterschiedlichen Resistenzen sind in Tab. 3. 3 dargestellt. An den Werten erkennt man, dass die Titer für die MLV-Plasmide relativ konstant waren und bei der Einzelselektion mit Hygro bzw. Neo keine großen Unterschiede in der Kolonienzahl in den verschiedenen Experimenten aufwiesen. Für PFV dagegen gab es erhebliche Schwankungen zwischen den Kolonienzahlen der einzeln selektierten Zellen. Da

aber keine Tendenz zu erkennen ist, dass in den Ansätzen immer die mit Hygro selektierten Koloniezahlen höher waren als die mit G418 selektierten, ist davon auszugehen, dass sich diese Schwankungen infolge des experimentellen Ansatzes ergaben. Die Anzahl der doppelresistenten Kolonien ist für beide Viren im Vergleich zu den einzelresistenten deutlich niedriger.

Tab. 3. 3: Titerbestimmung der mit heterologen Plasmiden transfizierten 293T-Zellen (Viruspartikel pro ml) und Template-Switching Rate (TS-Rate)

pKG81+pKG82

	Hygro	G418	G418+Hygro	TS-Rate
Exp.1	21000	7000	3200	12,90%
Exp.2	22500	16500	4300	12,39%
Exp.3	1400	4100	600	12,24%
				12,51%
			Std-Fehler:	1,81%

pJA31-1kb+pJA32-1kb

	Hygro	G418	G418+Hygro	TS-Rate
Exp.1	170	170	20	6,25%
Exp.2	220	150	6	1,65%
Exp.3	320	495	26	3,30%
				3,73%
			Std-Fehler:	1,35%

Um die Template-Switching-Rate der jeweiligen Viren zu ermitteln, wurde die Anzahl der doppelresistenten Klone durch die Gesamtanzahl der Viruspartikel im Virusüberstand geteilt. Die Gesamtanzahl der Viruspartikel errechnete sich aus der Summe der einzelresistenten Kolonien, von denen jeweils die Anzahl der doppelresistenten Kolonien abgezogen wurde, da in der Anzahl der einzelresistenten auch die doppelresistenten Kolonien enthalten waren. Dazu wurde dann die Anzahl der doppelresistenten Kolonien addiert. Die Formel für diese Berechnung ist in Abb. 3. 12 dargestellt. Die Template-Switching-Rate (TS-Rate) nach dieser Formel beträgt für PFV 12,51 % und für MLV 3,73 % (siehe Tab. 3. 3, letzte Spalte). Die für MLV ermittelte Template-Switching-Rate liegt damit nur 1 % unter der bereits publizierten von 4,7 % und ist somit vergleichbar (Anderson et al., 1998), allerdings ist sie deutlich niedriger als die für PFV ermittelte von 12,51 %.

$$TS = \frac{d(R)}{[Hygro(R) - d(R)] + [G418(R) - d(R)] + d(R)}$$

Abb. 3. 12: Formel zur Berechnung der Template-Switching-Rate; *TS* – Template-Switching-Rate; *d(R)* – Anzahl der doppelresistenten Kolonien; *Hygro(R)* – Anzahl der Hygro-resistenten Kolonien; *G418(R)* – Anzahl der G418-resistenten Kolonien

3.2.3 Nachweis des Template-Switchings durch Analyse der zellulären Integrate

Die ermittelten Template-Switching-Raten sind nur aussagekräftig, wenn die doppelresistenten Einzelzellklone tatsächlich durch ein Template-Switching-Ereignis und nicht durch eine Doppelinfektion zweier Viren, die für unterschiedliche Resistenzen kodierten, entstanden waren. Um dies nachzuprüfen, wurden die Integrate in den Wirtszellen analysiert, indem die genomische DNA einiger Einzelzellklone geerntet, durch eine nested PCR amplifiziert (erstes Primerpaar #1854, #4294; zweites Primerpaar #1855, #1856) und die PCR-Produkte mittels Restriktionsverdau analysiert wurden. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte über das Qiagen PCR Purification Kit. Das erhaltene PCR-Produkt ist in Abb. 3. 11 B unter den Vektoren dargestellt. Wie unter 3.2.1 beschrieben, besaßen die Expressionskassetten unterschiedliche Mutationen, die je eine Schnittstelle in den jeweiligen Resistenzgenen zerstörten. In den Vektoren pJA31-1kb und pKG81 wurde die *SacII*-Schnittstelle im Hygro-Resistenzgen zerstört, in pJA32-1kb und pKG82 die *EheI*-Schnittstelle im Neo-Resistenzgen. Somit wurden die PCR-Produkte nur dann mit beiden Enzymen verdaut, wenn, wie in den Ausgangsplasmiden pKG80 und pJS30, beide Resistenzen kodiert wurden, das heißt wenn durch Template-Switching wieder beide Resistenzen auf einem proviralen Integrat lagen (siehe Abb. 3. 13 A). Das aus der genomischen DNA der Einzelzellklone erhaltene PCR-Produkt hatte eine Größe von etwa 2200 bp. Im Fall, dass beide Resistenzen in einem Provirus vorlagen, kam es zum vollständigen Verdau des PCR-Produktes in je 2 Fragmente sowohl mit *EheI* als auch mit *SacII* (siehe Abb. 3. 13 A). Wäre die Doppelresistenz der untersuchten Einzelzellkolonie auf eine Doppelinfektion mit zwei homozygoten Viruspartikeln zurückzuführen, würde der Verdau des PCR-Produktes in beiden Fällen unvollständig bleiben, da das PCR-Produkt als Gemisch der beiden Integrate vorläge, welche jeweils nur eine Enzymschnittstelle aufweisen. Das Bandenmuster würde also drei Banden zeigen, im Gegensatz zum vollständigen Verdau des PCR-Produktes eines rekombinierten Provirus (siehe Abb. 3. 13 B).

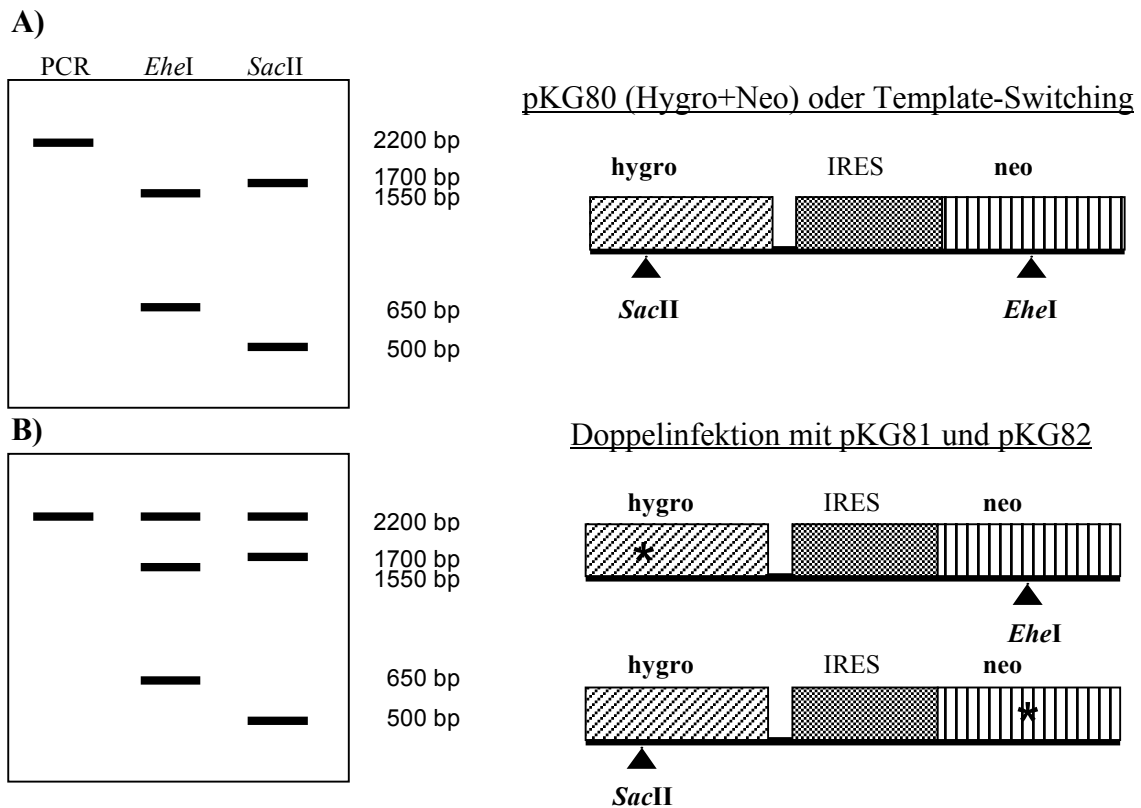
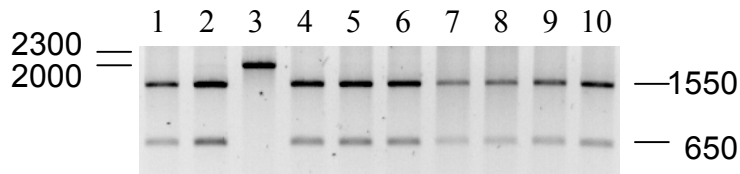
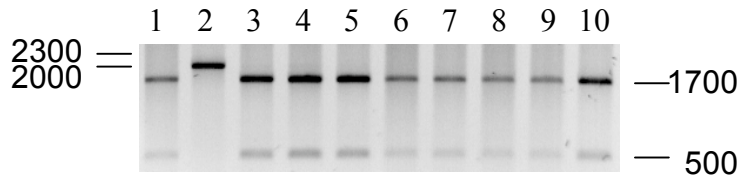
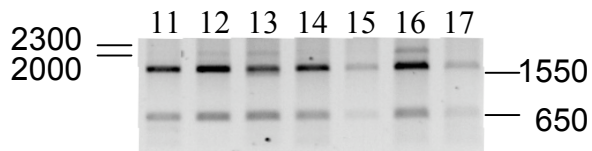


Abb. 3. 13: Verdaumuster der PCR-Produkte der Inserts der Einzelzellklone; die linke Seite zeigt jeweils das Bandenmuster der PCR-Produkte bei Ausgangsplasmid oder Template-Switching (A) bzw. Doppelinfektion (B); die rechte Seite zeigt die Integrate in den Einzelzellklonen mit den entsprechenden Enzymschnittstellen

Für MLV wurden 19 Einzelzellkolonien analysiert, für PFV 28 Kolonien. Alle untersuchten Klone wiesen das gleiche Verdaumuster auf, welches exemplarisch für einige Klone in Abb. 3. 14 dargestellt ist. Die Spuren 1, 2 und 3 in Abb. 3. 14 A zeigen Einzelzellklone, welche durch Infektion mit Überständen der einzeln transfizierten Vektoren pKG80, pKG81 und pKG82 produziert wurden. Man erkennt deutlich, dass die Integrate der pKG81- und pKG82-Vektoren jeweils nur von einem der eingesetzten Enzyme verdaut wurden (Spuren 2 und 3), wogegen beim Ausgangsvektor pKG80 (Spur 1), wie auch sämtlichen untersuchten Einzelzellkolonien der Verdau durch beide Enzyme erfolgte. Das heißt, dass alle analysierten Klone (sowohl von PFV, als auch von MLV) durch ein Template-Switching-Ereignis entstanden waren.

A: PFV PCR-Verdaue*EheI*-VerdauPFV-Einzelzellklone:

- 1 – KG80
- 2 – KG81
- 3 – KG82
- 4 – P1
- 5 – P2
- 6 – P4
- 7 – P5
- 8 – P6
- 9 – P7
- 10 – P8

SacII-Verdau**B: MLV PCR-Verdaue***EheI*-VerdauMLV-Einzelzellklone:

- 11 – M10
- 12 – M11
- 13 – M12
- 14 – M14
- 15 – M17
- 16 – M18
- 17 – M19

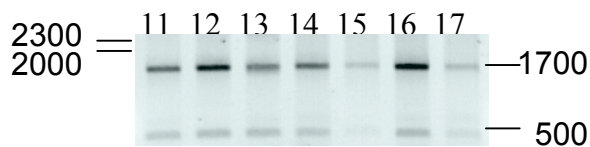
SacII-Verdau

Abb. 3. 14: Verdaue einiger Einzelzellklone (EZ-Klone) der doppelresistenten PFV-Klone (A) bzw. MLV-Klone (B)

3.3 Crosspackaging zwischen SFV und PFV

3.3.1 Klonierung von pKG84

Durch die Verpackung eines foamyviralen Genoms durch heterologe Proteine kann es zur Entstehung neuer Virusvarianten kommen. Dies ist insbesondere im Zusammenhang mit dem Template-Switching ein wichtiger Punkt für die Charakterisierung der Foamyviren, da diese dadurch neue Eigenschaften erwerben können und so z. B. pathogene Eigenschaften erwerben können.

Das Crosspackaging, das heißt, die Fähigkeit verwandter Viren ihr Genom gegenseitig durch die jeweiligen Proteine zu verpacken, sollte getestet werden, indem über ein Vier-Plasmid-System die Infektiosität heterologer Partikel aus verwandten Foamyviren getestet wurde. Die Ermittlung der Effizienz der Verpackung des heterologen Genoms erfolgte durch Titerbestimmung der entstandenen Viruspartikel mittels Expression eines Markerproteins (EGFP) in infizierten Zielzellen. Es standen hierfür die Plasmide pEGFPD, ein SFV-Plasmid, und pMD9, ein PFV-Plasmid zur Verfügung. Beide trugen das *egfp*-Gen, wobei es in pEGFPD der Kontrolle des CMV-Promoters (Promoter des Cytomegalievirus) unterlag, in pMD9 dagegen der Kontrolle des SFFV-U3-Promoters (U3-Promoter des Spleen Focus Forming Virus). Um die Vektoren anzugleichen und eine einheitliche Expression des *egfp*-Gens in beiden Vektoren zu gewährleisten, erfolgte der Austausch des SFFV-U3-Promoters in pMD9 gegen den CMV-Promoter von pEGFPD. Dazu wurde der pEGFPD-Vektor mit *Asp718* geschnitten, die Enden mit Klenow-Fragment und dNTPs aufgefüllt und danach mit *NotI* verdaut. Das erhaltene Fragment wurde in den pMD9-Vektor gesetzt, der mit *NotI* und *Eco47III* geschnitten worden war. Um zu sehen, ob das Fragment richtig ligiert war, erfolgte neben einem Testverdau eine Ansequenzierung des neu entstandenen Vektors mit dem Primer #651. Dies bestätigte, dass der SFFV-U3-Promoter in pMD9 gegen den CMV-Promoter ausgetauscht war. Der erhaltene Vektor pKG84 enthielt die gleiche CMV-EGFP-Kassette wie pEGFPD, wodurch beide Vektoren eine vergleichbare GFP-Expression vermittelten (siehe Abb. 3. 15). Die gag-pol-Kassette im Vektor pEGFPD entspricht dem Verpackungssignal CASI/II von pKG84. Damit keine Gag- bzw. Pol-Expression durch pEGFPD vermittelt wird, wurde das ATG- (Start-) Codon zu einem TAG- (Stop-) Codon mutiert und weitere Stop-Codons in das Leseraster von *gag* eingefügt.

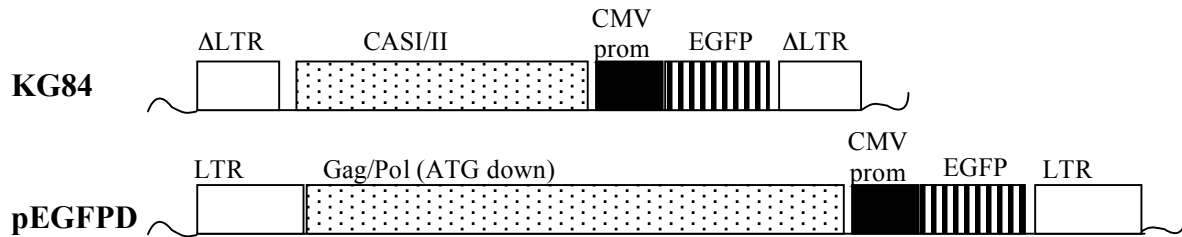


Abb. 3. 15: Expressionskassetten der Plasmide pKG84 und pEGFPD zur Bestimmung der Crosspackaging-Kapazität; ΔLTR – deletierte long terminal repeats von PFV; LTR – Long terminal repeat von SFV; CASI/II – cis-aktive Sequenzen I und II; CMV prom – Promoter des Cytomegalievirus; EGFP – grünfluoreszierendes Protein

3.3.2 Gegenseitige Verpackung des Genoms der verwandten Viren SFV und PFV

SFVmac und PFV sind zwei verwandte Foamyviren. PFV (früher humanes Foamyvirus, HFV) ist aus einem Menschen isoliert worden (Achong et al., 1971b). Sequenzvergleiche mit einem Schimpansen-Foamyvirus (SFVcpz) zeigten, dass es seinen Ursprung in Schimpansen hatte, woraus man schloss, dass hier eine Zoonose stattgefunden (Herchenröder et al., 1994) und SFVcpz bereits Mutationen akkumuliert hatte. Trotz ihrer Verwandtschaft (Sequenzhomologie zwischen 40 % und 80 %, je nach untersuchtem Genomabschnitt) weisen beide Viren (PFV und SFVcpz) auch im Vergleich zu anderen foamyviralen Primatenisolaten erhebliche Unterschiede in ihrer Sequenz auf. In den hier dargestellten Versuchen sollte getestet werden, inwieweit PFV und SFVmac in der Lage sind, ihr Genom gegenseitig zu verpacken und Zielzellen zu infizieren.

Das SFV-Expressionssystem bestand aus den Plasmiden pEGFPD (kodierte für die verpackbare SFV-RNA, mit EGFP-Markerprotein), pCIpol, pCIenv3.5 und pCIgag-1 (kodierte jeweils für die Pol-, Env- und Gag-Proteine von SFV). Im PFV-System wurden die Vektoren pKG84 (kodierte für die verpackbare PFV-RNA, mit EGFP-Markerprotein), pCZIpol, pCZenvEM002, pCZigag2 (kodierte jeweils für die Pol-, Env- und Gag-Proteine von PFV) verwendet.

Um zu testen, ob SFV-RNA mit den Gag-, Pol- und Env-Proteinen von PFV verpackt werden konnte (und umgekehrt), wurden 293T-Zellen mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert und Viruspartikel produziert. Die Versuchsansätze für das Crosspackaging mit den jeweiligen Plasmidkombinationen sind in Tab. 3. 4 dargestellt. Die im UV-Mikroskop bestimmte Transfektionseffizienz der Produktionszelllinien betrug dabei zwischen 80 % und 90 % und

war in allen vier Ansätzen vergleichbar. Als Negativkontrolle diente die Transfektion mit dem leeren Vektor pcDNA3.1 zeo(+).

Die von den 293T-Zellen gebildeten Viruspartikel wurden geerntet, indem sie durch einen 0,45 µm-Filter filtriert wurden. Die Titerbestimmung erfolgte auf HT1080-Zellen mittels FACS-Analyse vier Tage nach deren Infektion mit unterschiedlichen Verdünnungen der Überstände. Für die Berechnung der Crosspackaging-Werte wurde eine geeignete Verdünnung ausgewählt (1:100), die keine zu hohen Titer aufwies, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch Doppelinfektion der Zielzellen zu vermindern.

Tab. 3. 4: Kombination der verschiedenen Vektoren für Crosspackaging-Experimente

	PFV-Proteine	SFV-Proteine	pKG84	pEGFPD
Ansatz 1 (Kontrolle 1)	+		+	
Ansatz 2 (Kontrolle 2)		+		+
Ansatz 3		+	+	
Ansatz 4	+			+

Die Kontrollansätze (PFV-RNA mit PFV-Proteinen, Ansatz 1; bzw. SFV-RNA mit SFV-Proteinen, Ansatz 2) wurden gemacht, um den Ausgangstiter der beiden parentalen Viren zu bestimmen.

In Abb. 3. 16 A sind die absoluten Werte der FACS-Analyse aus vier Experimenten dargestellt. Das Diagramm zeigt, dass ein Crosspackaging zwischen den unterschiedlichen Vektoren möglich ist, wobei die Transduktion von HT1080-Zielzellen durch PFV höher war als durch SFV. Bei Infektion der HT1080-Zielzellen mit einer 1:100-Verdünnung der Überstände zeigten PFV-Partikel eine Transduktionsrate von 51,25 %, bei SFV waren es nur 19,32 %, was etwa 2,7mal niedriger war. Die Verpackung von SFV-RNA mit PFV-Proteinen zeigte eine Transduktionsrate von 13,51 %, während sie bei der Verpackung von PFV-RNA mit SFV-Proteinen nur bei 6,43 % lag. Der Unterschied in der Infektionseffizienz war hier 2,1fach. Um eine qualitative Aussage über die Verpackungsfähigkeit der verschiedenen Foamyviren treffen zu können, wurden die Werte gegen die Titer der Kontrollansätze 1 und 2 normalisiert (siehe Abb. 3. 16 B). Man erkennt, dass der Titer für die Verpackung von SFV-RNA mit PFV-Proteinen im Vergleich zur Verpackung von PFV-RNA etwa 74 % niedriger war. PFV-RNA wurde im Gegensatz zu SFV-RNA mit 67 % geringerer Effizienz von SFV-Proteinen verpackt. Die nicht-homologe Verpackung des Genoms der beiden hier untersuchten, eng verwandten Viren war also möglich, allerdings gegenüber dem homologen

Genom um drei Viertel (SFV-Verpackung durch PFV-Proteine) bzw. zwei Drittel (PFV-Verpackung durch SFV-Proteine) reduziert.

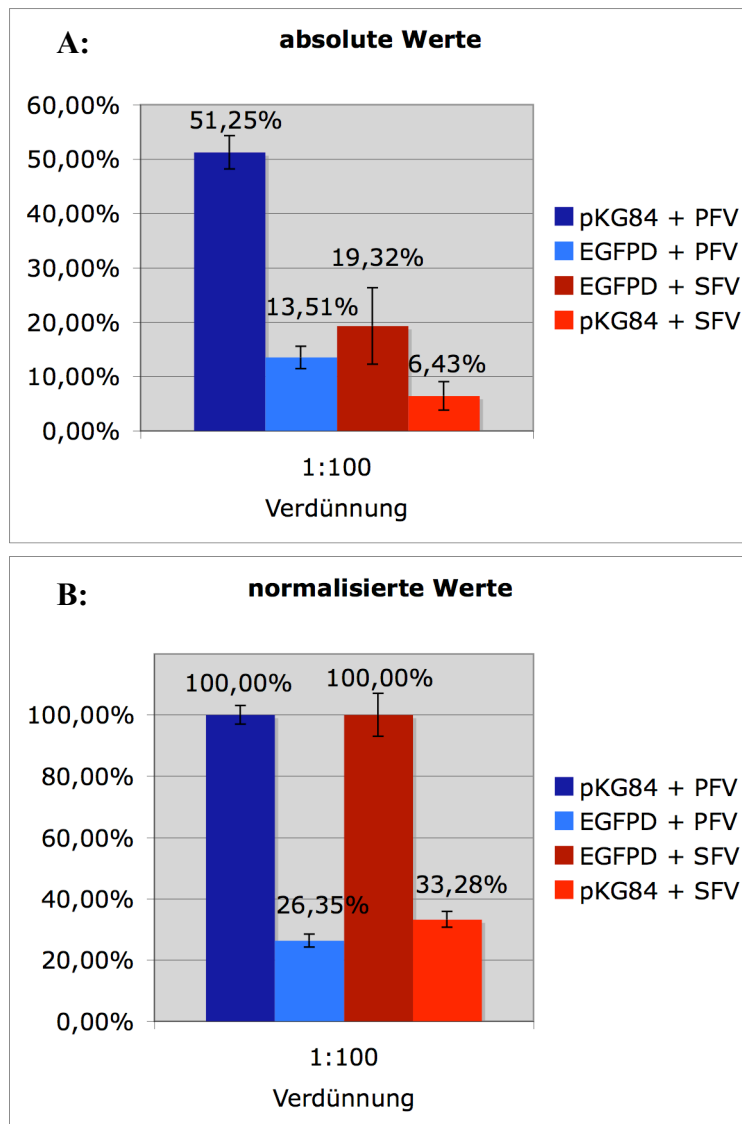


Abb. 3. 16: Titerbestimmung des Crosspackaging der verschiedenen Foamyviren; pKG84 – RNA-Donor von PFV; EGFPD – RNA-Donor von SFV (pEGFPD); PFV – Verpackungsplasmide von PFV; SFV – Verpackungsplasmide von SFV

Die Expression der Proteine in den Zellysaten und die Proteinmenge in den produzierten Partikeln wurde mittels Westernblot getestet, um zu zeigen, dass eine gleichmäßige Expression der Proteine stattfand. Die Präparation der Zellysate erfolgte über Lyse der Zellen mit RIPA-Puffer (je 700 µl pro 10cm-Schale), Inkubation auf Eis für 10 min, scheren der DNA mittels Qiashredder und Aufnahme der Proben in 2xPPP (Proteinprobenpuffer). Es schloss sich die Denaturierung der Proteine bei 95 °C für 10 min an. Als Negativkontrolle für

die Zelllysate wurden 293T-Zellen verwendet, die mit pcDNA3.1 zeo(+) transfiziert worden waren.

Die Viruspartikel wurden über eine Partikelpräparation (Zentrifugation über 20 % Sucrose) aufgereinigt, das Pellet getrocknet, danach in einmal PPP/PBS aufgenommen, 10 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 95 °C denaturiert.

Die Westernblots in Abb. 3. 17 zeigen, dass sowohl in den Zelllysaten, als auch in den Viruspartikeln alle Proteine mehr oder weniger stark nachgewiesen werden konnten und ihre Expression für die verschiedenen Ansätze vergleichbar war. Für die PFV-Proteine erkennt man eine gleichmäßige Gag- und auch Pol-Expression sowohl in den Zelllysaten, als auch in den Partikeln (Abb. 3. 17 A). Dies ließ auf eine gleichmäßige Proteinmenge in den Zellen und Partikeln schließen. Für die SFV-Proteine zeigt der Gag-Blot, dass dessen Expression in den Zellen kaum nachweisbar war. Dies kann möglicherweise daran liegen, dass die Proteinmenge im Gel (limitiert durch die Größe der Taschen) zu gering war und die Nachweisgrenze der Proteine dadurch erreicht wurde. Da man jedoch in den Proben der SFV-Partikelpräparationen eine gleichmäßige Gag-Menge sieht, kann davon ausgegangen werden, dass die Expression von Gag in den Zelllysaten und damit auch die Partikelproduktion ausreichend und vergleichbar war. Dies wurde ebenfalls durch die gleichmäßige Pol-Expression bestätigt, die sich sowohl in den Zelllysaten, als auch in den Partikelpräparationen zeigte.

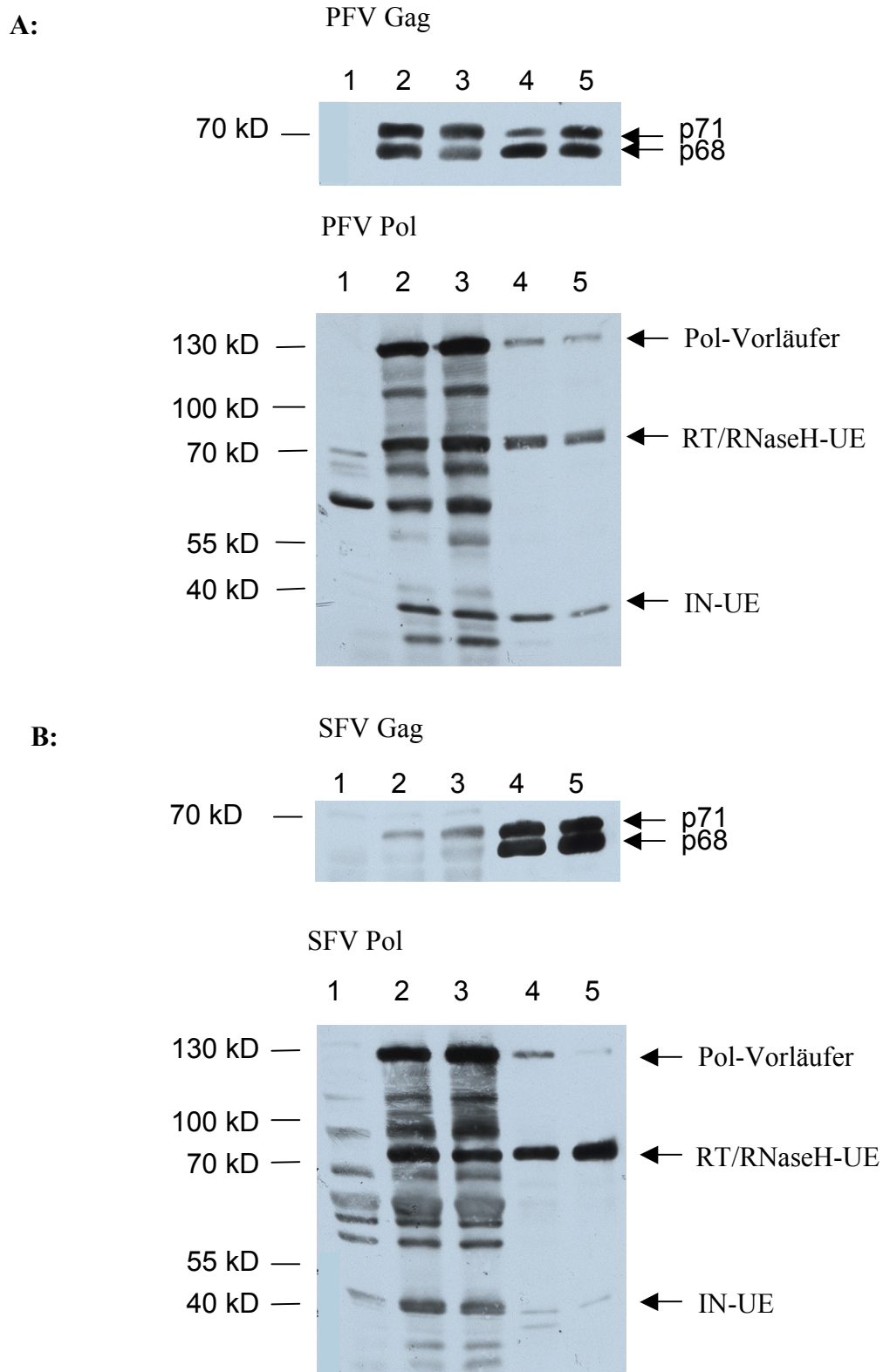


Abb. 3. 17: Westernblots der Zellysate und Partikelpräparationen; 1 – Negativkontrolle; 2 – Zellysate: pKG84-RNA mit PFV- bzw. SFV-Proteinen; 3 – Zellysate: EGFPD-RNA mit PFV- bzw. SFV-Proteinen; 4 – Partikelpräparation: pKG84-RNA mit PFV- bzw. SFV-Proteinen; 5 – Partikelpräparation: EGFPD-RNA mit PFV- bzw. SFV-Proteinen; RT/RNaseH-UE – Reverse Transkriptase mit RNaseH-Untereinheit; IN-UE – Integrase-Untereinheit

4 Diskussion

4.1 Die Diversität von Foamyviren im Vergleich zu anderen Retroviren

Die besonderen Eigenschaften der retroviralen Reversen Transkriptase (RT) haben eine hohe Diversität der Viren in der Familie der Retroviridae zur Folge. Die Diversität ist ein Merkmal der Komplexität dieser Viren und stellt ein Problem bei der Entwicklung antiretroviraler Medikamente und Therapien dar. Foamyviren, welche das einzige Genus in der Subfamilie der Spumaretroviridae bilden, weisen im Gegensatz zu anderen Retroviren eine geringe Diversität auf. Ihr Genom scheint sehr stabil zu sein und sich in den letzten 30 Millionen Jahren mit ihren Wirten koevolutionär entwickelt zu haben (Mansky, 1998, Switzer et al., 2005, Thümer et al., 2007). Die RT spielt eine essentielle Rolle im Lebenszyklus der Retroviren und ihre Charakterisierung ist ein wichtiger Schritt bei der Entwicklung und Erhöhung der Sicherheit gentherapeutischer Vektoren und ein interessanter Aspekt bei der Resistenzbildung gegen antiretrovirale Medikamente, z. B. in der HIV-Forschung.

Die Diversität von Retroviren ist unter anderem gekennzeichnet durch das Einfügen von Mutationen in das virale Genom entweder durch die zelluläre RNA-Polymerase II (bei der Bildung der genomischen viralen RNA) oder durch die RT (Mutationsrate), die Kombination unterschiedlicher Proteine mit den Genomen verwandter Viren (englisch: Crosspackaging) und der Rekombination zwischen ähnlichen Genomen (Template-Switching), was zu neuen Eigenschaften der Viren führen kann (Jones et al., 1994, Onafuwa et al., 2003, Svarovskaia et al., 2003, Temin, 1993). In dieser Arbeit wurden die erwähnten Charakteristika für die RT des Prototypischen Foamyvirus (PFV) bestimmt. Die Charakterisierung der Eigenschaften von foamyviralen Proteinen (vor allem der RT) ist ein wichtiger Schritt auf dem Weg zur Anwendung von Foamyviren als gentherapeutische Vektoren.

4.1.1 Die *in-vivo*-Mutationsrate von PFV ist vergleichbar zu bereits publizierten Daten

Durch ihre hohe genetische Stabilität und Apathogenität ist die Bestimmung der Mutationsrate der foamyviralen RT ein interessanter Aspekt bei ihrer Charakterisierung. Foamyviren können bis heute mit keiner Krankheit assoziiert werden und besitzen daher keine Notwendigkeit, sich an Medikamente anzupassen. Nach einer Infektion werden sie dennoch vom wirtseigenen Immunsystem als Antigene erkannt und es bilden sich Antikörper.

Ihre Replikation ist meist gering und nur in Zellen der oralen Mucosa nachzuweisen, obwohl provirale DNA in vielen Geweben nachgewiesen werden kann (Falcone et al., 1999; Murray et al., 2008). Dadurch ist das Auftreten von Mutanten innerhalb des Wirtes eher gering, im Gegensatz z. B. zu HIV-1 (Wei et al., 2004).

Bisherige Experimente von Boyer et al., 2007 zur Bestimmung der Mutationsrate der RT von PFV wurden *in vitro* durchgeführt, das heißt, mit einer rekombinanten RT. Hierfür wurde das *lacZα*-Markergen verwendet, über welches durch Blau-Weiß-Selektion des revers transkribierten Gens in Bakterien die Mutationsrate bestimmt wurde. Diese Methode hatte vor allem den Nachteil, dass nur Mutationen gefunden werden konnten, die zu einem Funktionsverlust des Markergens führten. Stille Mutationen wurden nicht erfasst.

Im Gegensatz zu den *in vitro*-Experimenten hatte der in der vorliegenden Arbeit verwendete Versuchsansatz zwei Vorteile. Es wurde einerseits die Mutationsrate *in vivo* in Zellkultur getestet, das heißt, in einer natürlicheren Umgebung für das Virus, bei der auch zelluläre Proteine, welche die Replikation und die Mutationsrate beeinflussen können, zur Verfügung standen. Andererseits konnten wir durch die Analyse nicht-kodierender Sequenzen ohne Selektionsdruck alle in einer Replikationsrunde auftretenden Mutationen, auch die stillen, erfassen (siehe 3.1).

Die ersten durchgeführten Experimente zeigten bei 93003 sequenzierten Basen aus 110 Klonen ausschließlich G-zu-A-Mutationen (39 Stück), was eine Mutationsrate von $4,2 \times 10^{-4}$ ergab. Diese hohe Rate und das Auftreten nur einer einzigen Mutationsart führten wir auf die Expression von APOBEC-Proteinen in den virusproduzierenden 293T-Zellen zurück, deren mRNA-Synthese wir mittels quantitativer RealTime-PCR (qRT-PCR) nachweisen konnten. Der qRT-PCR-Nachweis erfolgte für das humane APOBEC3F (hA3F) und APOBEC3G (hA3G), da diese beiden Mitglieder der APOBEC-Familie am besten charakterisiert sind und den größten Einfluss auf die Mutationsrate, das heißt das Einfügen von G-zu-A-Mutationen in das Virusgenom haben (Esnault et al., 2006). Die Verringerung ihres Einflusses erfolgte durch die Expression des Bet-Proteins über Kotransfektion der virusproduzierenden 293T-Zellen mit dem Vektor pLENbet (Bock et al., 1998). Durch die Koexpression von Bet verringerte sich die Anzahl der APOBEC-assoziierten G-zu-A-Mutationen um mehr als die Hälfte (siehe unten). Es konnte bereits für andere Retroviren, z. B. HIV-1 (Vartanian et al., 1994) und SNV (Kim et al., 1996), gezeigt werden, dass während ihrer Replikation ein hoher Prozentsatz an G-zu-A-Mutationen auftritt. Diese waren auf die Wirkung von APOBEC-Proteinen zurückzuführen (Rose & Korber, 2000). Auch auf Foamyviren haben Enzyme der

APOBEC-Familie einen restringierenden Effekt und führen zur Substitution von G zu A in deren Genom (Löchelt et al., 2005), was unsere Ergebnisse bestätigten (siehe 3.1.4).

Die nachgewiesenen mRNA-Konzentrationen der beiden untersuchten APOBEC-Proteine und somit wahrscheinlich auch deren Protein-Expression waren in den untersuchten Zellen unterschiedlich. Die Bestimmung der mRNA-Konzentrationen erfolgte aus jeweils 5×10^6 Zellen. Die absolute Konzentration der hA3F-mRNA in den 293T-Produktionszellen war mit $2,27 \times 10^{-7}$ ng/ μ l etwa 6,2mal so hoch wie die hA3G-Konzentration mit $3,66 \times 10^{-8}$ ng/ μ l (siehe Tab. 4. 1). Es war also davon auszugehen, dass hA3F einen größeren Einfluss auf das Auftreten der G-zu-A-Mutationen hatte. Dies wurde auch dadurch deutlich, dass die meisten Mutationen im GA-Kontext aufgetreten waren (siehe Abb. 3. 9), welcher von hA3F bevorzugt wird (Review bei Holmes et al., 2007). In PBMCs war die absolute Expression von hA3F im Vergleich zu hA3G nur 2,2fach höher (siehe Tab. 4. 1).

Es zeigte sich außerdem, dass die 293T-Zellen im Vergleich zu PBMCs, bei denen die Expression von hA3F und hA3G bekannt ist, viel niedrigere Konzentrationen aufwiesen (auf die mRNA-Konzentration der house-keeping Gene normalisierte Werte: 2/3 bzw. 3/4 der PBMC-Konzentrationen, siehe Tab. 4. 1). Da sich die Gruppe der PBMCs aus Zellen des Immunsystems zusammensetzt, müssen sie sich ständig gegen eindringende Pathogene (unter anderem auch Viren) wehren. Dies übt vermutlich Selektionsdruck in der Richtung aus, dass sich diese Zellen in ständiger Bereitschaft zur Bekämpfung von Pathogenen befinden müssen und dadurch immer einen gewissen Level an zellulären Restriktionsfaktoren exprimieren (Aguiar & Peterlin, 2008, Chiu & Greene, 2006). Deshalb können in ihnen wahrscheinlich höhere Mengen an APOBEC-Proteinen nachgewiesen werden als in den untersuchten 293T-Zellen (Nierenfibroblastenzellen). In verschiedenen Zelltypen sind also die Expressionsmengen der verschiedenen APOBEC-Proteine und ihr Verhältnis zueinander unterschiedlich, was bereits in verschiedenen Zelltypen und Geweben gezeigt wurde (Liddament et al., 2004, Wiegand et al., 2004).

Der Nachweis der Expression von hA3F und hA3G in den 293T-Zellen konnte von uns und anderen Gruppen im Westernblot nicht gezeigt werden (Russell et al., 2005). Vermutlich war die Expressionsmenge dieser Proteine in den Zellen für diesen Nachweis nicht ausreichend. Da in den meisten Experimenten für die Produktion von Viruspartikeln 293T-Zellen verwendet werden, welche sehr gut mit verschiedenen Transfektionsreagenzien transfiziert werden können, stellt sich die Frage, welchen Einfluss das Vorhandensein der nachgewiesenen Restriktionsfaktoren, trotz der scheinbar nur geringen Expression hat. Zwar werden hohe Titer in den Produktionszellen erreicht, durch die Wirkung der APOBEC-

Proteine kann es aber zum Einfügen einer höheren Anzahl an Mutationen in das Virusgenom kommen. Es wäre weiterhin interessant zu wissen, welche der anderen humanen APOBEC-Proteine in 293T-Zellen exprimiert werden, da z. B. auch für das hA3B das Einfügen von G-zu-A-Mutationen in das Genom verschiedener Viren gezeigt werden konnte (Baumert et al., 2007, Baunach et al., 1993). Dieser Nachweis könnte mittels weiterer qRT-PCR-Experimente gegen die verschiedenen Proteine untersucht werden.

Für zukünftige Experimente sollten 293T-Zellen verwendet werden, die das Bet-Protein stabil exprimieren, da das exprimierte foamyvirale Bet mit verschiedenen APOBEC-Proteinen interagiert, diese dadurch aus dem Replikationszyklus entfernt und somit das Genom der Foamyviren vor Mutationen durch diese Proteine schützt (Russell et al., 2005). Dadurch wäre eine gleichmäßige Expression in allen Produktionszellen gewährleistet. Leider standen solche Zellen für die hier durchgeführten Versuche nicht zur Verfügung, weshalb die 293T-Zellen mit dem pLENbet-Vektor transient transfiziert wurden. Für diesen Ansatz erfolgte keine Optimierung der eingesetzten Plasmidkonzentrationen. In den durchgeführten Experimenten wurden die verschiedenen PFV-Plasmide inklusive pLENbet im gleichen Verhältnis eingesetzt. Bei weiteren Versuchen, bei denen das Bet-Plasmid für transiente Transfektionen eingesetzt wird, sollte eine Optimierung der Plasmidverhältnisse vorgenommen werden.

Tab. 4. 1: APOBEC-Konzentrationen in den verwendeten Zelllinien

	absolute Werte	gegen die House Keeping Gene normalisierte Werte
PBMC hA3F	$4,0 \times 10^{-6} \text{ ng}/\mu\text{l}$	100 %
293T hA3F	$2,27 \times 10^{-7} \text{ ng}/\mu\text{l}$	77 %
PBMC hA3G	$1,84 \times 10^{-6} \text{ ng}/\mu\text{l}$	100 %
293T hA3G	$3,66 \times 10^{-8} \text{ ng}/\mu\text{l}$	23 %

Der Einfluss der nachgewiesenen APOBEC-Proteine auf das Auftreten von Mutationen im foamyviralen Genom konnte durch das Bet-Protein verringert werden. Dies zeigte sich durch die Reduktion der identifizierten G-zu-A-Mutationen mit koexprimiertem Bet im Vergleich zu den Experimenten ohne Bet. Bei 172368 sequenzierten Basen waren es nur 35 G-zu-A-Mutationen, somit war die Rate mit 2×10^{-4} um mehr als die Hälfte niedriger als bei den Experimenten ohne koexprimiertes Bet-Protein ($4,2 \times 10^{-4}$). Dies bestätigte den Einfluss von Bet auf verschiedene APOBEC-Proteine, schließt allerdings nicht aus, dass auch weitere

zelluläre Proteine mit Bet oder einem der anderen foamyviralen Proteine interagieren können und dadurch Einfluss auf die Mutationsrate oder die Replikation haben.

Wie bereits erwähnt, präferieren hA3F und hA3G verschiedene Nachbarbasen 3'-seitig des mutierten G (bezogen auf den komplementären Strang). hA3F mutiert bevorzugt im GA-Kontext, hA3G im GG-Kontext (Holmes et al., 2007). Abb. 3. 9 zeigt deutlich, dass mehr als die Hälfte der aufgetretenen Mutationen eine dieser beiden Basenfolgen aufwies. Die G-zu-A-Mutationen treten jedoch nicht ausschließlich im Kontext der angegebenen Basen auf. Da Boyer et al., 2007 zeigen konnten, dass die foamyvirale RT *in vitro* bevorzugt G-zu-A-Substitutionen durchführt (35 % aller Punktmutationen), ist eine Zuordnung der G-zu-A-Mutationen entweder zur Aktivität der APOBEC-Proteine oder derjenigen der foamyviralen RT so nicht möglich. Dies ist nur bestimmbar, wenn zur Virusproduktion für die dargestellten Versuche Zellen verwendet werden, die keine APOBEC-Proteine exprimieren.

```

GCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGG***GTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTG
|||||
GCGCACGAGGGAGCTTCCAG=====CTTGAGCGTCGATTTTTGTG
  
```

Abb. 4. 1: Analyse der flankierenden Sequenzen der Deletion in Klon 83B/231; es sind keine repetitiven Sequenzen erkennbar; obere Sequenz: Ausgangssequenz von pKG83; untere Sequenz: Klon 83B/231 mit 49 bp-Deletion; hervorgehoben sind die Bereiche, an denen die Deletionen aufgetreten sind, es zeigen sich keine Sequenzhomologien

Bei der Sequenzanalyse der foamyviralen Integrate in Anwesenheit des Bet-Proteins wurden fast doppelt so viele Basenpaare sequenziert wie ohne Bet. Damit stieg auch die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten weiterer Mutationen, wie die beiden A-zu-G-Mutationen und der Klon mit einer Deletion von 49 Basenpaaren zeigten (siehe 3.1.4). Diese Mutationen können der foamyviralen RT zugeordnet werden. Deletionen sind typisch für RTs, wobei solche Ereignisse meist an Sequenzhomologien oder Bereichen mit aufeinander folgenden gleichen Basen im Genom auftreten (Jones et al., 1994; Boyer et al., 2007). Die von uns analysierte Deletion in Klon 83B/231 weist allerdings weder Homologien noch Basenwiederholungen an den Übergängen der Deletion auf (siehe Abb. 4. 1). Boyer et al., 2007 zeigten in den *in vitro*-Versuchen, dass die foamyvirale RT eine hohe Anzahl an Deletionen und Insertionen in das untersuchte Gen einfügte. Diese Beobachtung konnte in den von uns durchgeführten *in vivo*-Versuchen (in Zellkultur) nicht bestätigt werden. Bei einer Anzahl von insgesamt 256371 Basen aus beiden Experimenten (mit und ohne Bet) trat nur eine einzige Deletion auf.

Da in den hier gezeigten Experimenten in Hinsicht auf die G-zu-A-Mutationen nicht zwischen der Aktivität der APOBEC-Proteine und der foamyviralen RT unterschieden werden konnte und außerdem durch die transiente Transfektion der 293T-Produktionszellen mit pLENbet die Expression von Bet nicht in allen Zellen gewährleistet war, wurden alle G-zu-A-Mutationen den APOBEC-Proteinen zugeschrieben. Die übrigen drei Mutationen (2 x A-zu-G, eine Deletion) ergaben eine Gesamtmutationsrate von $1,1 \times 10^{-5}$ pro Base pro Replikationszyklus bzw. eine Mutationsrate pro einzelner Base von $7,5 \times 10^{-6}$ pro Replikationszyklus. Der Vergleich mit dem *in vitro*-Wert für Basensubstitutionen von $5,8 \times 10^{-5}$ (Boyer et al., 2007) zeigt, dass die *in vivo*-Rate um ein vielfaches höher war (ca. 7,4fach). Der Unterschied im Vergleich zu allen aufgetretenen Mutationen lag sogar bei 14,2 (*in vitro* Rate von $1,7 \times 10^{-4}$ bei Boyer et al., 2007). Dieses Ergebnis war unerwartet, da in unserem Versuchsansatz alle möglichen auftretenden Mutationen erfasst wurden. Allerdings konnten durch die dargestellte Berechnung G-zu-A-Mutationen, welche durch die foamyvirale RT verursacht wurden, nicht berücksichtigt werden. Trotz allem ist das Ergebnis mit der hohen Stabilität des foamyviralen Genoms im Laufe der Evolution in Einklang zu bringen.

Dieser Unterschied zwischen *in vitro*- und *in vivo*-Daten kann verschiedene Ursachen haben. Bereits publizierte Werte für die Gammaretroviren MLV bzw. SNV bei Verwendung des gleichen Markergens zeigen, dass die *in vivo* in Zellkultur ermittelten mit den *in vitro* bestimmten Zahlen weitgehend übereinstimmten (Übersicht bei Svarovskaia et al., 2003). Bei HIV-1 als Vertreter der Lentiviren wurde dagegen ein gegenteiliger Effekt festgestellt (ähnlich zu den von uns gezeigten Raten für PFV). *In vitro* war die Mutationsrate etwa 17mal höher als die ermittelte *in vivo*-Rate (Mansky & Temin, 1995, Roberts et al., 1988). Dies kann wahrscheinlich darauf zurückzuführen sein, dass *in vivo* verschiedene virale oder zelluläre Proteine einen Einfluss auf die reverse Transkription haben, die bei der aufgereinigten RT *in vitro* nicht zugegen sind und somit ihren Einfluss nicht ausüben können. So beschreiben z. B. Boyer et al., 2004 und Gao et al., 2007, dass das Nukleokapsid (NC) von HIV-1 die Prozessivität der RT von HIV-1 steigern kann, was einen Einfluss auf die Mutationsrate hat, indem es das Einfügen von Mutationen durch die RT reduziert. Da beim Gag-Protein der Foamyviren keine Prozessierung stattfindet und somit kein NC zur Verfügung steht, sind vermutlich noch andere Faktoren beteiligt, welche die Prozessivität der RT steigern. Möglicherweise haben die foamyviralen Gag- oder Env-Proteine einen Einfluss auf die Mutationsrate von Foamyviren.

Auch zelluläre Proteine können einen Einfluss auf die Mutationsrate von Retroviren ausüben. So wurde z. B. für das Ty1 Retroelement in Hefen gezeigt, dass in Hefezellen ohne den

exprimierten Transkriptionsfaktor SII die Inkorporation von Mutationen stieg (Gabriel et al., 1996). Dies lässt die Vermutung zu, dass der Unterschied in der *in vitro* und *in vivo* Mutationsrate von Foamyviren ebenfalls an der Einwirkung zellulärer Proteine während des Replikationszyklus liegen könnte. So wie die APOBEC-Proteine, die durch das Einfügen von Mutationen einen negativen Einfluss auf die Virusreplikation haben, könnten andere Proteine eine positive Wirkung haben und so z. B. durch die RT eingefügte Mutationen im synthetisierten DNA-Doppelstrang reparieren oder die Prozessivität der PFV-RT beeinflussen.

Eine weitere Fehlerquelle stellt die zelluläre RNA-Polymerase II dar, welche die prägenomische virale mRNA synthetisiert. Diese besitzt wie die virale RT ebenfalls eine höhere Mutationsrate als die DNA-Polymerase, sie ist aber wahrscheinlich geringer als die der RT. Die genaue Mutationsrate der eukaryotischen RNA-Polymerase II ist noch nicht bekannt. Es ist jedoch davon auszugehen, dass sie relativ gering ist, da gezeigt werden konnte, dass sie eine 3'→5'-Reparaturfähigkeit besitzt (Gnatt et al., 2001, Thomas et al., 1998).

Die Beispiele weisen darauf hin, dass es mit Sicherheit weitere Faktoren gibt, deren Einfluss man in einem Zellkultursystem (noch) nicht berücksichtigen kann, wodurch die Bestimmung der genauen Mutationsrate schwierig wird. Um alle zellulären und viralen Faktoren zu erfassen, könnte man die Mutationsrate des replikationsfähigen PFV bestimmen, indem man statt des Vier-Plasmid-Systems zur Virusproduktion das vollständige Virus verwendet und nach der Integration Teile seines Genoms sequenziert. Dadurch würde das Ergebnis nicht mehr durch das Vorhandensein von Markergensequenzen verfälscht oder durch die Abwesenheit viraler Proteine, welche die reverse Transkription der RT beeinflussen können. Dies hätte aber wiederum den Nachteil, dass nicht gewährleistet ist, dass nur eine Replikationsrunde stattfindet, da das verwendete Virus vollständig replikationskompetent wäre. Außerdem führen für das Virus letale Mutationen zur Eliminierung nicht mehr funktionsfähiger Partikel. Aus diesen Gründen ist dieser Versuchsansatz schwer realisierbar.

4.1.2 Die PFV-Template-Switching-Rate liegt zwischen der von HIV-1 und MLV

Während des retroviralen Replikationszyklus kommt es bei der Synthese der viralen doppelsträngigen DNA obligatorisch zweimal zum „Springen“ der RT innerhalb des Genoms (siehe Replikationszyklus Abb. 1. 7). Diese Ereignisse sind mit hoher Wahrscheinlichkeit intramolekular, so dass für die Generierung des Provirus eigentlich nur eine RNA notwendig ist (Hu & Temin, 1990). Die Verpackung eines zweiten genomischen Strangs in ein

Viruspartikel hat aber mehrere Vorteile. So können z. B. Strangbrüche in einem RNA-Strang repariert werden, indem die RT auf den zweiten springt. Dieses „Switching“-Ereignis ist auch zwischen anderen Bereichen homologer RNA-Stränge möglich. Dabei kann es zur Kombination von Eigenschaften verschiedener Viren kommen, die z. B. die gleiche Zelle infiziert haben. Dadurch können sich für das neu entstandene Virus Vorteile gegenüber dem parentalen Virus ergeben, wie z. B. ein erweitertes Wirtsspektrum (kann die Wahrscheinlichkeit von Zoonosen erhöhen), das „Entkommen“ vor dem Immunsystem des Wirtes oder die Resistenz gegen antiretrovirale Medikamente (HIV-1). Somit ist auch die Template-Switching-Rate (TS-Rate) ein Merkmal der Diversität von Retroviren.

Um die TS-Rate von PFV zu bestimmen, wurden Vektoren konstruiert, ähnlich zu den bei Anderson et al., 1998 publizierten MLV-Vektoren (siehe 3.2.3). Es wurde ermittelt, wie hoch die Rekombination zwischen zwei Antibiotikaresistenzgenen innerhalb eines Abstandes von 1 kb (Kilobase) und in einer einzigen Replikationsrunde war. Die Produktion der Viruspartikel erfolgte nicht mittels Verpackungszelllinien, sondern mit einem Vier-Plasmid-System durch transiente Transfektion, wobei als Kontrolle unter den gleichen Versuchsbedingungen die MLV-Vektoren mitgeführt wurden. Es zeigte sich dabei, dass die TS-Rate für PFV mit 12,5 % rund 3,4mal höher war als für MLV (3,7 %). Dies bedeutet, dass während einer Replikationsrunde statistisch mehr als ein interner Strangtransfer im foamyviralen Genom (ca. 12 kb) stattfindet.

Der bereits für MLV publizierte Wert bei Anderson et al., 1998 betrug 4,7 %, wobei im Unterschied zu unseren Versuchen Verpackungszelllinien zur Virusproduktion verwendet wurden. Die von uns ermittelte Rate war trotz abweichender Versuchsdurchführung im Vergleich dazu nur um 1 % niedriger, was einen Vergleich der Zahlen möglich machte. Auch für HIV-1 (Rhodes et al., 2003) und das Spleen Nekrose Virus (SNV; Jones et al., 1994) wurden bereits TS-Raten publiziert, welche über Rekombination zweier Antibiotikaresistenzgene ermittelt wurden. Für HIV-1 betrug die Rate 42,4 %, für SNV 6 % (siehe Tab. 4. 2). Somit nimmt PFV mit einer Rate von 12,5 % eine Zwischenstellung zwischen MLV/SNV (beides Gammaretroviren) und HIV-1 (Lentivirus) ein.

Zur Ermittlung der TS-Raten von PFV wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt (siehe 3.3), wobei große Schwankungen der Virustiter beobachtet werden konnten. Trotzdem war die TS-Rate unabhängig vom jeweiligen Ansatz gleich, womit die Reproduzierbarkeit der Raten gewährleistet war. Die für MLV ermittelten Ergebnisse zeigten außerdem im Vergleich zu den von Anderson et al., 1998 publizierten Daten, dass der Versuchsansatz und die Versuchsdurchführung keinen Einfluss auf die Rate des Template-Switchings haben.

Da für PFV bisher keine Verpackungszelllinien zur Verfügung stehen, konnte kein Vergleich zwischen den unterschiedlichen Versuchsansätzen (transiente Transfektion im Gegensatz zu Verpackungszelllinien) gemacht werden. Vermutlich ist dies für den Versuch auch unerheblich, da Foamyviren im Gegensatz zu MLV die reverse Transkription in der virusproduzierenden Zelle durchführen und nicht erst in der Zielzelle (Roy et al., 2003, Yu et al., 1999). In dem hier verwendeten Versuchsansatz waren die transient transfizierten Zellen gleichzeitig die Produktionszellen, was bedeutete, dass mehrere Kopien an Plasmid-DNA, bzw. daraus synthetisierter prägenomischer Virus-RNA pro Zelle vorlagen, zwischen denen die RT springen konnte. Durch die sich dadurch ergebende hohe Anzahl an vollständiger genomischer mRNA in den Produktionszellen, könnte argumentiert werden, dass die Wahrscheinlichkeit des Template-Switchings erhöht war. Da aber weiterhin angenommen wurde, dass die Anzahl an zur Verfügung stehenden RNA-Molekülen die Prozessivität der RT nicht beeinflusste, konnte man diesen Punkt vernachlässigen und die ermittelten Werte blieben mit denen von MLV vergleichbar.

Tab. 4. 2: Daten der Template Switching Raten; 1) Anderson et al., 1998; 2) Rhodes et al., 2003; 3) Jones et al., 1994

	Daten aus dieser Arbeit	publizierte Daten
PFV	12,5 %	---
MLV	3,7 %	4,7 % ¹⁾
HIV-1	---	42,4 % ²⁾
SNV	---	6 % ³⁾

Bei den genannten Beispielen für verschiedene Viren und der in dieser Arbeit bestimmten TS-Rate von PFV wird optimalerweise angenommen, dass die Verpackung der beiden Genome im Viruspartikel zufällig erfolgt und in jedem Abschnitt des Genoms die gleiche Wahrscheinlichkeit des Template-Switchings besteht. Es gibt aber weitere Faktoren, die den Strangtransfer von Retroviren beeinflussen können. So kommt es an ausgeprägten Sekundärstrukturen der RNA zu einer verlangsamten DNA-Synthese oder zum Pausieren der RT, was das „switchen“ der HIV-1- und PFV-RT fördert (Boyer et al., 2004, Gao et al., 2007). So stellte die IRES-Sequenz zwischen den beiden Antibiotikaresistenzgenen bei den in dieser Arbeit verwendeten Vektoren einen Bereich dar, der Sekundärstrukturen bilden und dadurch den Strangtransfer fördern konnte. Um solche Sekundärstrukturen zu vermeiden, wirkt bei HIV-1 das Nukleokapsid (NC) bei der reversen Transkription mit. Es verhindert

durch seine Anlagerung an den RNA-Strang dessen Faltung in Sekundärstrukturen, so dass die RT besser arbeiten kann (Gao et al., 2007). Auf die PFV-RT hat das NC von HIV-1 nur einen geringen Einfluss (Boyer et al., 2004). Ob foamyvirale Proteine die Prozessivität der PFV-RT erhöhen können, wurde noch nicht untersucht. Wahrscheinlich können auch verschiedene zelluläre Proteine die Rekombination von Foamyviren beeinflussen, allerdings sind solche bisher noch nicht bekannt. Ein weiterer wichtiger Punkt, der einen Einfluss auf die Rekombinationsrate haben kann, könnte die Rekombination der transfizierten Plasmide in den virusproduzierenden Zellen durch zelluläre Enzyme sein. Onafuwa et al., 2003 konnten in Experimenten mit HIV-1 und MLV zeigen, dass diese Rekombination jedoch mit einer Rate von unter 1 % vernachlässigbar ist.

Für die Rekombination sind fast immer zumindest kurze homologe Abschnitte im Genom notwendig. Daher ist es möglich, dass neben der Rekombination zwischen den homologen viralen RNAs auch Rekombination zwischen heterologen Sequenzen unterschiedlicher Viren mit kurzen homologen Bereichen stattfindet. Kürzlich zeigten Motomura et al., 2008, dass zwischen den beiden entfernter verwandten Viren HIV-1 und HIV-2 (Sequenzhomologie von 55-60 % auf Nukleinsäureebene; Peeters et al., 1991) Rekombination auftreten kann. Diese ist mit einer Frequenz von 0,2 % zwar sehr gering, sie kann aber dennoch zur Entstehung neuer Viren führen, die möglicherweise eine veränderte Pathogenität aufweisen. Somit wäre es theoretisch möglich, dass auch Foamyviren mit pathogenen Viren rekombinieren und neue Eigenschaften erwerben, wie z. B. ein erweitertes Wirtsspektrum, Übertragung von Mensch zu Mensch im Fall von PFV oder das Auftreten pathogener Eigenschaften. Dies ist insofern wichtig, da kürzlich die Koinfektion verschiedener Foamyvirusstämme in Primaten bzw. von Foamyviren und HIV in Menschen gezeigt werden konnte (Calattini et al., 2007, Switzer et al., 2008).

Durch die Verwendung sehr niedriger MOIs (multiplicity of infection) bei der Infektion der Zielzellen wurde ausgeschlossen, dass die in den hier gezeigten Versuchen entstandenen doppelresistenten Kolonien durch eine Doppelinfektion (durch homologe Neo- bzw. Hygro-Viren) entstanden waren. Diese hätten das Ergebnis der Template-Switching-Rate verfälscht. Die Analyse der Integrate der jeweiligen Zellklone bestätigte, dass keine der untersuchten, doppelresistenten Einzelzellkolonien durch eine Doppelinfektion entstanden war (siehe Abb. 3. 14). Bei Foamyviren ist es ausgeschlossen, dass in der Zielzelle aus zwei Virusgenomen ein Provirus entsteht, da bei ihnen die reverse Transkription bereits in den virusproduzierenden Zellen stattfindet. Ihr infektiöses Genom ist also dsDNA, welches auch in den Partikeln nachweisbar ist (Roy et al., 2003, Yu et al., 1999). Daher kann die

Rekombination zwischen foamyviralen DNA-Genomen in der Zielzelle ausgeschlossen werden.

Auch bei MLV wurde die Doppelinfektion von Zielzellen durch Verwendung einer niedrigen MOI verhindert. Da ihr RNA-Genom erst in den Zielzellen revers transkribiert wird, besteht theoretisch die Möglichkeit der Rekombination zwischen den Genomen zweier Viruspartikel, welche die gleiche Zielzelle infiziert haben. Hu & Temin, 1990 konnten zeigen, dass bei SNV, welches wie MLV zum Genus Gammaretroviren gehört, nach Doppelinfektionen nicht ein Provirus auftritt, sondern immer zwei. Auch für die in dieser Arbeit gezeigten doppelresistenten MLV-Klone bestätigte die Analyse der proviralen Integrate der Zielzellen, dass keiner dieser Klone durch eine Doppelinfektion entstanden war.

4.1.3 Crosspackaging verwandter Foamyviren

Das Crosspackaging des Genoms nahe verwandter Foamyviren ist möglich, wie die dargestellten Ergebnisse in Kapitel 3.3 zeigen. Humane Zielzellen konnten mit den entstandenen Partikeln infiziert werden. Dies bedeutet, dass das Genom des Prototypischen Foamyvirus (PFV) mit Proteinen des Simian Foamyvirus eines Rhesusmakaken (SFVmac) bzw. umgekehrt verpackt werden kann (im Weiteren als heterologe Viren bezeichnet). Die Transduktionseffizienz der entstandenen heterologen Viren war dabei im Vergleich zu den Partikeln mit homologem Genom deutlich niedriger. Die absoluten Werte zeigten, dass reine PFV-Partikel mit einer Transduktionseffizienz von 51 % auf den verwendeten HT1080-Zielzellen 3,6mal höhere Werte aufwiesen, als die unter den gleichen Bedingungen mit dem heterologen SFV-Genom erreichte Transduktionsrate von 14 %. Den gleichen Trend zeigten die Versuche mit den SFV-Proteinen. Hier war der Prozentsatz der mit homologen SFV-Partikeln infizierten Zielzellen im Vergleich zu den heterologen (mit PFV-Genom) 3,2fach höher (siehe Tab. 4. 3, zweite Spalte). Die Normalisierung der Werte auf die entsprechenden homologen Viren bestätigte, dass diese Reduktion um die gleiche Größenordnung, die Effizienz zur Übertragung der jeweiligen heterologen Genome in den beiden Ansätzen war etwa um den gleichen Prozentsatz niedriger. Bei heterologen PFV-Partikeln verringerte sich die Transduktionseffizienz auf HT1080-Zielzellen im Vergleich zu den parentalen PFV-Partikeln um 74 %. Wurde das SFV-Genom mit PFV-Proteinen verpackt, war die Transduktionseffizienz auf den Zielzellen um 67 % geringer als bei homologen SFV-Partikeln. (siehe Tab. 4. 3 erste Spalte). Die Übertragung des heterologen viralen Genoms

mittels PFV- bzw. SFV-Proteinen scheint also hinsichtlich ihrer Effizienz in der gleichen Größenordnung zu liegen.

Die unterschiedlichen absoluten Transduktionswerte zwischen parentalen und heterologen Partikeln lagen nicht an einer reduzierten Expression der viralen Proteine in den transfizierten 293T-Zellen, wie die Westernblots zeigten (siehe Abb. 3.17). Sowohl die Zellysate als auch die Partikelpräparationen zeigten gleichmäßige Proteinmengen. Neben der Quantifizierung der Proteinmengen wäre es weiterhin interessant gewesen, die Menge an verpackter DNA zu bestimmen, z. B. durch einen Southernblot der aufgereinigten Partikel. Dieser Versuch könnte Aufschluss geben, ob in den heterologen Viren eine geringere Verpackung der Genome erfolgte, was zur reduzierten Transduktionseffizienz im Vergleich zu den homologen Partikeln geführt haben könnte.

Tab. 4. 3: Transduktionseffizienzen bei der Verpackung der unterschiedlichen Foamyvirus-Genome

	normalisierte Werte	absolute Werte
PFV-Genom mit PFV-Proteinen	100 %	51 %
SFV-Genom mit PFV-Proteinen	33 %	14 %
SFV-Genom mit SFV-Proteinen	100 %	19 %
PFV-Genom mit SFV-Proteinen	26 %	6 %

Unabhängig von den Unterschieden zwischen homologen und heterologen Partikeln erkennt man an den absoluten Zahlen, dass die SFV-Partikel grundsätzlich die hier verwendeten HT1080-Zielzellen schlechter infizierten als die entsprechenden PFV-Partikel. Parentale SFV-Viren infizierten die HT1080-Zielzellen etwa 2,7mal schlechter als parentale PFV-Partikel. Bei heterologen SFV-Partikeln betrug die Reduktion der Transduktionseffizienz im Gegensatz zu den entsprechenden heterologen PFV-Partikeln das 2,3fache. Diese Unterschiede zwischen der Transduktionseffizienz parentaler und heterologer Viren können ihre Ursache möglicherweise in der Wahl der verwendeten Zielzellen haben, welche humanen Ursprungs waren. PFV ist ein humanes Foamyvirus-Isolat, SFVmac dagegen stammt aus einem Rhesusmakaken. Trotz relativ hoher Verwandtschaft der beiden Viren (50 % bis 80 % Sequenzhomologie auf Nukleinsäureebene, abhängig vom untersuchten Bereich; Herchenröder et al., 1994) hat PFV scheinbar genug Mutationen akkumuliert, um sich an den menschlichen zellulären Rezeptor zu adaptieren und dadurch einen veränderten Zelltropismus

im Vergleich zu SFV_{mac} zu entwickeln. So war es wahrscheinlich in der Lage, die in den hier gezeigten Versuchen verwendeten humanen HT1080-Zielzellen besser zu infizieren als SFV_{mac}. Die Wiederholung der Crosspackaging-Versuche von SFV_{mac} und PFV auf nicht-humanen Primatenzellen (z. B. Vero-Zellen aus Grünen Meerkatzen) könnte zeigen, ob diese Vermutung richtig ist. Man würde dabei erwarten, dass die Anzahl der durch SFV-Partikel infizierten Zielzellen höher ist, als die durch PFV infizierten, jedoch die Reduktion der Transduktionseffizienzen nach Verpackung der heterologen Genome ähnlich unterschiedlich wie in den hier dargestellten Versuchen. Bei Goujon et al., 2003 wird erwähnt, dass auch HIV-1 und SIV einen unterschiedlichen Zelltropismus aufweisen. HIV-1 kann humane Zellen besser als SIV infizieren, letzteres zeigt dagegen eine höhere Transduktionseffizienz auf Vero-Zellen.

Interessant ist, dass sogar auf verschiedenen humanen Zelllinien ein veränderter Zelltropismus heterologer lentiviraler Vektoren auftreten kann. Goujon et al., 2003 zeigten, dass ein heterologer HIV-1-Vektor (mit verpacktem SIV-Genom) verschiedene Zelltypen (z. B. HeLa und andere humane Zelllinien) mit nahezu gleicher Effizienz infiziert wie der verwendete homologe HIV-1-Vektor, jedoch Dendritische Zellen (DC) und Makrophagen mit sehr viel geringerer. Dies lag nicht an der Anzahl der Viruspartikel im Überstand, da die Quantität der Proteine im Westernblot und die Menge der viralen Genome im Slot Blot vergleichbar waren (Goujon et al., 2003). Die Quantifizierung von viralen Proteinen und viraler RNA und die unterschiedliche Infizierbarkeit verschiedener Zelltypen durch die hergestellten heterologen Viren zeigen, dass die Möglichkeit des Crosspackagings keine Aussage über die Effizienz des Gentransfers eines Vektors zulässt.

Aber nicht nur der unterschiedliche Zelltropismus der Vektoren kann ein Grund für eine schlechtere Transduktionseffizienz sein. So kann auch die Funktion verschiedener viraler Enzyme durch die fremde RNA beeinflusst sein. Es ist möglich, dass die Reverse Transkriptase das heterologe Genom nicht mit gleicher Effizienz wie das homologe revers transkribiert oder die Integrase bei der Integration des Provirus in das Wirtszellgenom behindert ist. Weiterhin kann die Verpackung des Genoms in die viralen Partikel beeinflusst sein, da das „fremde“ Genom möglicherweise ein abweichendes Verpackungssignal aufweist, so dass dessen Interaktion mit dem Gag-Protein gestört ist. Es ist publiziert (Yang & Temin, 1994, Yin & Hu, 1997), dass durch den Austausch des Verpackungssignals beim Spleen Nekrose Virus (SNV) gegen das Verpackungssignal des murinen Leukämievirus (M-MLV) oder des murinen Sarkomvirus (M-MSV) die Replikationsfähigkeit von SNV kaum beeinflusst ist (bei Verpackung durch SNV-Proteine). Das Verpackungssignal von HIV-1

oder das des bovinen Leukämievirus (BLV) zeigte diesen Effekt nicht, die entstandenen heterologen Viren konnten nicht mehr replizieren. Im Gegensatz dazu ist es nicht möglich, ein SNV-basiertes Genom mit MLV-Proteinen zu verpacken (Certo et al., 1998). Ähnliche Effekte zeigten sich beim Crosspackaging von SNV und HIV-1, wobei SNV-Proteine das HIV-1-Genom mit niedriger Effizienz verpacken können, umgekehrt aber keine Verpackung der RNA erfolgt (Parveen et al., 2004).

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass Foamyviren in der Lage sind, Genome entfernter verwandter Stämme zu verpacken. Dadurch kann es zum Beispiel in Zellen, welche mit zwei verschiedenen Stämmen infiziert sind, zur Bildung heterologer Partikel kommen. Dies kann, wie bereits erwähnt, zur Änderung charakteristischer Eigenschaften führen (z. B. Apathogenität, Zelltropismus, Verpackungskapazität). Im Zusammenhang mit der Fähigkeit des Template-Switchings sind dies wichtige zu berücksichtigende Punkte für die Charakterisierung der Foamyviren und ihre Anwendbarkeit als gentherapeutische Vektoren.

In Hinsicht auf die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse und die diskutierten Aspekte des Crosspackagings wäre es interessant zu testen, ob auch bei weiter entfernten Viren die Möglichkeit besteht, das Genom gegenseitig zu verpacken. So könnte man z. B. versuchen, Viruspartikel mit PFV-Proteinen und dem Genom des Felinen Foamyvirus (FFV), des Bovinen Foamyvirus (BFV) oder des Equinen Foamyvirus (EFV) zu produzieren und testen, ob und in welchen Größenordnungen diese auf humane Zielzellen übertragbar sind. So könnte man heterologe Vektoren konstruieren, deren Wahrscheinlichkeit zur Rekombinanten extrem verringert ist oder die in Tiermodellen Anwendung finden können. Andererseits ist bei der Anwendung von Vektoren in der Gentherapie ein hoher Titer der eingesetzten Viruspartikel notwendig. Die hier produzierten heterologen Viren zeigen jedoch eine enorme Titerreduktion um 2/3 bzw. 3/4 im Vergleich zu den parental Viren. Somit sind solche Viren für den Einsatz in der Gentherapie ungeeignet, der Titer könnte aber möglicherweise durch das Einfügen von Mutationen in die jeweiligen Strukturproteine erhöht werden.

4.2 Charakterisierung der Diversität von Foamyviren

Unter anderem durch ihre Apathogenität und die stabile Integration ihres Genoms in die Wirtszell-DNA weisen Foamyviren gute Eigenschaften auf, die sie als Vektoren beim Einsatz in der somatischen Gentherapie interessant machen. Daher ist die Untersuchung der bei ihrer Replikation essentiellen Schritte wichtig, um ihre Sicherheit bei einer möglichen Anwendung abzuschätzen. In dieser Arbeit erfolgte die Charakterisierung der Diversität von Foamyviren

in Hinsicht auf die foamyvirale Reverse Transkriptase, da diese eine grundlegende Rolle im Replikationszyklus von Foamyviren spielt. Die Untersuchungen sollten ermitteln, ob die hohe Stabilität des foamyviralen Genoms auf die Aktivität der RT zurückzuführen ist.

Es konnte gezeigt werden, dass die Rekombinationsrate der foamyviralen RT zwischen der von MLV (Gammaretrovirus) und HIV-1 (Lentivirus) liegt (siehe 3.2, 4.1.2). PFV nimmt in dieser Hinsicht also eine Zwischenstellung zwischen diesen Viren/Genera ein. Die Bestimmung der *in vivo* Mutationsrate zeigte einen deutlichen Unterschied zu der bereits publizierten *in vitro* Rate (Boyer et al., 2007), sie ist allerdings im Bereich der Mutationsrate von anderen Retroviren (siehe 4.1.1; Übersicht bei Svarovskaia et al., 2003). Diese beiden erwähnten Eigenschaften (Template-Switching, Mutationsrate) sind wichtige Punkte bei der Entwicklung von Foamyviren als Vektoren in der Gentherapie, da sie eine Aussage darüber zulassen, wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, dass ein Gen durch das Einfügen von Mutationen verändert bzw. zerstört wird. Es zeigt sich diesbezüglich kein signifikanter Vorteil von Foamyviren im Vergleich zu anderen lenti- oder gammaretroviralen Vektoren. Bezieht man jedoch in die Charakterisierung die Ergebnisse anderer untersuchter Eigenschaften ein, erkennt man, dass Foamyviren durchaus weiterhin gute Chancen für den Einsatz in der somatischen Gentherapie besitzen.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Verpackung von foamyviralen Genomen mit Proteinen verwandter Foamyviren möglich ist (siehe 4.1.3). Dies zieht jedoch eine Titerreduktion nach sich. Die Verwendung heterologer Vektoren und die Tatsache, dass Rekombination zwischen wenig homologen Viren sehr gering ist (Motomura et al., 2008), kann stark zur Erhöhung der Sicherheit gentherapeutischer Vektoren beitragen. Durch die Kombination der Virusproteine mit nicht-homologen Genomen wird die Entstehung von Rekombinanten und somit das Auftreten infektiöser Viren, was schließlich zur Elimination des therapeutischen Gens führen kann, bei der Partikelproduktion verringert. Andererseits werden für den Einsatz in der Gentherapie hohe Titer zur Infektion der Zielzellen benötigt (Hacein-Bey-Abina et al., 2003, Zhang et al., 2008; Bauer et al., 2008, Kiem et al., 2007). Bei der Herstellung heterologer Viruspartikel von PFV zeigte sich eine Reduktion um etwa 3/4 im Vergleich zu den parentalen Viren, was einen Nachteil bei ihrer Verwendung darstellt. Möglicherweise kann jedoch durch das Einfügen von Mutationen in die Strukturproteine der Titer der heterologen Partikel wieder erhöht werden kann. Um dies zu testen, sind weitere Versuche notwendig.

Es konnte auch gezeigt werden, dass die Diversität von Foamyviren nicht nur von den viralen Proteinen abhängt, sondern auch durch zelluläre Faktoren beeinflusst wird, wie z. B. den

APOBEC-Proteinen. Diese erhöhen nicht nur im foamyviralen, sondern auch in anderen (retro)viralen Genomen das Einfügen von Mutationen. Es ist anzunehmen, dass eukaryotische Zellen weitere Mechanismen entwickelt haben, um sich vor eindringenden Viren zu schützen. Dazu gehört z. B. die Synthese der Enzyme TRIM5 oder AID (Activation-induced Cytidin Deaminase; Luban, 2007). Aber auch Viren besitzen ihrerseits Proteine, um dem Einfluss der zellulären Faktoren entgegenzuwirken (Bet bei Foamyviren, Vif bei HIV-1 als APOBEC-Antagonisten). Dies zeigt die Notwendigkeit der Anpassung der Zellen auf der einen Seite, die sich vor dem Pathogen schützen müssen, und Retroviren auf der anderen Seite, welche bei ihrer Replikation auf die Zellen angewiesen sind. Durch die hohe Diversität sind sie in der Lage, sich schnell an antivirale Faktoren, die von den Zellen exprimiert werden, anzupassen, durch Zoonose ihr Wirtsspektrum zu erhöhen oder ihre Pathogenität zu verändern. Anscheinend sind Foamyviren in dieser Hinsicht keinem so großen Druck ausgesetzt, da sie im Laufe ihrer Entwicklung weniger Mutationen akkumuliert haben. Wahrscheinlich ist dies auf ihre geringe Replikationsaktivität im Wirtsorganismus zurückzuführen, da die Eigenschaften ihrer Reversen Transkriptase wenig von denen anderer Retroviren (z. B. von HIV-1, MLV) abweichen. Auch ihre Apathogenität könnte dieser Tatsache Rechnung tragen, da kein Selektionsdruck durch das Immunsystem des Wirtes ausgeübt wird und sich dadurch keine Mutationen im foamyviralen Genom anreichern können.

Somit zeigt sich beim Vergleich der Eigenschaften der RT von Foamyviren und anderen Retroviren kein signifikanter Unterschied. Jedoch in Kombination mit anderen bereits untersuchten Eigenschaften, rücken Foamyviren wieder stärker in den Fokus zur Entwicklung gentherapeutischer Vektoren. Ein entscheidender Vorteil, den Foamyviren gegenüber anderen retroviralen Vektoren aufweisen, ist z. B. ihr Integrationsmuster im Genom der Wirtszelle, welches stark von dem von MLV oder HIV-1 abweicht (Nowrouzi et al., 2006, Trobridge et al., 2006). Foamyviren zeigten weder eine Präferenz zur Integration in aktive Gene, wie HIV-1, noch in die Nähe von Transkriptionsstartpunkten, wie MLV. Die Verteilung der Integrate im Genom der Wirtszellen war eher mit dem durch ein Computerprogramm ermittelten zufälligen Spektrum zu vergleichen (Nowrouzi et al., 2006, Trobridge et al., 2006). Ein Nachteil der bisher für gentherapeutische Therapien verwendeten gamma- oder lentiviralen Vektorsysteme war das gehäufte Auftreten von Tumoren nach der Retransplantation der behandelten Zellen (Hacein-Bey-Abina et al., 2003, Zhang et al., 2008). Dies lag meist daran, dass Zellen nach Aktivierung von Oncogenen (durch Integration in deren Nähe) unkontrollierte Proliferation zeigten, welche auf klonale Expansion einzelner Zellen zurückzuführen war. Dies war in Langzeitstudien (zwei bis drei Jahre) sowohl im

Tiermodell (Zhang et al., 2008), als auch in humanen Patienten zu beobachten (Hacein-Bey-Abina et al., 2003).

An Hunden durchgeführte Langzeitstudien mit foamyviralen Vektoren zeigten diese Eigenschaft nicht (Bauer et al., 2008, Kiem et al., 2007). Nach zwei Jahren wurde das Transgen weiterhin von einer polyklonalen Zellpopulation exprimiert und klonale Selektion war nicht zu beobachten.

Das foamyvirale Integrationsmuster, ein schnelles Protokoll zur Transduktion von Zielzellen, ihre Fähigkeit zur Infektion sich selten teilender Zellen (z. B. Stammzellen) und ein breiter Zelltropismus sind nur einige positive Eigenschaften dieser Viren (Rethwilm, 2007a). Somit tragen sowohl die in dieser Arbeit ermittelten Werte zur Diversität als auch die anderen genannten Vorteile der Foamyviren dazu bei, dass Gentherapie durch Foamyviren mit geringeren Nebenwirkungen als bei gamma- und lentiviralen Vektoren möglich und eine Anwendung beim Menschen vorstellbar ist. Die genannten Eigenschaften der Foamyviren sorgen dafür, dass ihre Verwendung als gentherapeutische Vektoren weiterhin Gegenstand der Forschung sein wird und sie zum Einsatz kommen lassen können.

5 Literaturverzeichnis

- Achong, B. G., Mansell, P. W. & Epstein, M. A. (1971a). A new human virus in cultures from a nasopharyngeal carcinoma. *J Pathol* **103**, 18.
- Achong, B. G., Mansell, P. W., Epstein, M. A. & Clifford, P. (1971b). An unusual virus in cultures from a human nasopharyngeal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **46**, 299-307.
- Aguiar, R. S. & Peterlin, B. M. (2008). APOBEC3 proteins and reverse transcription. *Virus Res.*
- Anderson, J. A., Bowman, E. H. & Hu, W. S. (1998). Retroviral recombination rates do not increase linearly with marker distance and are limited by the size of the recombining subpopulation. *J Virol* **72**, 1195-202.
- Baltimore, D. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* **226**, 1209-11.
- Balvay, L., Lopez Lastra, M., Sargueil, B., Darlix, J. L. & Ohlmann, T. (2007). Translational control of retroviruses. *Nat Rev Microbiol* **5**, 128-40.
- Bauer, T. R., Jr., Allen, J. M., Hai, M., Tuschong, L. M., Khan, I. F., Olson, E. M., Adler, R. L., Burkholder, T. H., Gu, Y. C., Russell, D. W. & Hickstein, D. D. (2008). Successful treatment of canine leukocyte adhesion deficiency by foamy virus vectors. *Nat Med* **14**, 93-7.
- Baumert, T. F., Rosler, C., Malim, M. H. & von Weizsacker, F. (2007). Hepatitis B virus DNA is subject to extensive editing by the human deaminase APOBEC3C. *Hepatology* **46**, 682-9.
- Baunach, G., Maurer, B., Hahn, H., Kranz, M. & Rethwilm, A. (1993). Functional analysis of human foamy virus accessory reading frames. *J Virol* **67**, 5411-8.
- Beck, J. & Nassal, M. (2007). Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol* **13**, 48-64.
- Berger, E. A., Murphy, P. M. & Farber, J. M. (1999). Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* **17**, 657-700.
- Berkhout, B., Silverman, R. H. & Jeang, K. T. (1989). Tat trans-activates the human immunodeficiency virus through a nascent RNA target. *Cell* **59**, 273-82.
- Bieniasz, P. D., Erlwein, O., Aguzzi, A., Rethwilm, A. & McClure, M. O. (1997). Gene transfer using replication-defective human foamy virus vectors. *Virology* **235**, 65-72.
- Bock, M., Heinkelein, M., Lindemann, D. & Rethwilm, A. (1998). Cells expressing the human foamy virus (HFV) accessory Bet protein are resistant to productive HFV superinfection. *Virology* **250**, 194-204.

- Bogerd, H. P., Wiegand, H. L., Doehle, B. P., Lueders, K. K. & Cullen, B. R. (2006). APOBEC3A and APOBEC3B are potent inhibitors of LTR-retrotransposon function in human cells. *Nucleic Acids Res* **34**, 89-95.
- Boneva, R. S., Grindon, A. J., Orton, S. L., Switzer, W. M., Shanmugam, V., Hussain, A. I., Bhullar, V. B., Chamberland, M. E., Heneine, W., Folks, T. M. & Chapman, L. E. (2002). Simian foamy virus infection in a blood donor. *Transfusion* **42**, 886-91.
- Bour, S., Geleziunas, R. & Wainberg, M. A. (1995). The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD4 receptor and its central role in promotion of HIV-1 infection. *Microbiol Rev* **59**, 63-93.
- Boyer, P. L., Stenbak, C. R., Clark, P. K., Linial, M. L. & Hughes, S. H. (2004). Characterization of the polymerase and RNase H activities of human foamy virus reverse transcriptase. *J Virol* **78**, 6112-21.
- Boyer, P. L., Stenbak, C. R., Hoberman, D., Linial, M. L. & Hughes, S. H. (2007). In vitro fidelity of the prototype primate foamy virus (PFV) RT compared to HIV-1 RT. *Virology*.
- Brown, P., Nemo, G. & Gajdusek, D. C. (1978). Human foamy virus: further characterization, seroepidemiology, and relationship to chimpanzee foamy viruses. *J Infect Dis* **137**, 421-7.
- Bruss, V. & Ganem, D. (1991). The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 1059-63.
- Burke, C. J., Sanyal, G., Bruner, M. W., Ryan, J. A., LaFemina, R. L., Robbins, H. L., Zeff, A. S., Middaugh, C. R. & Cordingley, M. G. (1992). Structural implications of spectroscopic characterization of a putative zinc finger peptide from HIV-1 integrase. *J Biol Chem* **267**, 9639-44.
- Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T. & Pfaffl, M. W. (2005). Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *J Mol Endocrinol* **34**, 597-601.
- Cain, D., Erlwein, O., Grigg, A., Russell, R. A. & McClure, M. O. (2001). Palindromic sequence plays a critical role in human foamy virus dimerization. *J Virol* **75**, 3731-9.
- Calattini, S., Betsem, E. B., Froment, A., Mauclore, P., Tortevoeye, P., Schmitt, C., Njouom, R., Saib, A. & Gessain, A. (2007). Simian foamy virus transmission from apes to humans, rural Cameroon. *Emerg Infect Dis* **13**, 1314-20.
- Campbell, M., Eng, C. & Luciw, P. A. (1996). The simian foamy virus type 1 transcriptional transactivator (Tas) binds and activates an enhancer element in the gag gene. *J Virol* **70**, 6847-55.

- Certo, J. L., Shook, B. F., Yin, P. D., Snider, J. T. & Hu, W. S. (1998). Nonreciprocal pseudotyping: murine leukemia virus proteins cannot efficiently package spleen necrosis virus-based vector RNA. *J Virol* **72**, 5408-13.
- Chang, L. J. & Zhang, C. (1995). Infection and replication of Tat- human immunodeficiency viruses: genetic analyses of LTR and tat mutations in primary and long-term human lymphoid cells. *Virology* **211**, 157-69.
- Chen, H., Lilley, C. E., Yu, Q., Lee, D. V., Chou, J., Narvaiza, I., Landau, N. R. & Weitzman, M. D. (2006). APOBEC3A is a potent inhibitor of adeno-associated virus and retrotransposons. *Curr Biol* **16**, 480-5.
- Chiu, Y. L. & Greene, W. C. (2006). Multifaceted antiviral actions of APOBEC3 cytidine deaminases. *Trends Immunol* **27**, 291-7.
- Coffin, J. M., Hughes, S. H. & Varmus, H. E. (1997). Retroviruses. New York.
- Cullen, B. R. (2003). Nuclear mRNA export: insights from virology. *Trends Biochem Sci* **28**, 419-24.
- Darlix, J. L., Lapadat-Tapolsky, M., de Rocquigny, H. & Roques, B. P. (1995). First glimpses at structure-function relationships of the nucleocapsid protein of retroviruses. *J Mol Biol* **254**, 523-37.
- Dayton, A. I., Sodroski, J. G., Rosen, C. A., Goh, W. C. & Haseltine, W. A. (1986). The trans-activator gene of the human T cell lymphotropic virus type III is required for replication. *Cell* **44**, 941-7.
- De Celis, J., Tobaly-Tapiero, J., Hampe, A. & Emanoil-Ravier, R. (1994). Structure and function of the long terminal repeat of the chimpanzee foamy virus isolates (SFV-6). *Arch Virol* **138**, 345-55.
- Delebecque, F., Suspene, R., Calattini, S., Casartelli, N., Saib, A., Froment, A., Wain-Hobson, S., Gessain, A., Vartanian, J. P. & Schwartz, O. (2006). Restriction of foamy viruses by APOBEC cytidine deaminases. *J Virol* **80**, 605-14.
- Delelis, O., Saib, A. & Sonigo, P. (2003). Biphasic DNA synthesis in spumaviruses. *J Virol* **77**, 8141-6.
- Doms, R. W. & Peiper, S. C. (1997). Unwelcomed guests with master keys: how HIV uses chemokine receptors for cellular entry. *Virology* **235**, 179-90.
- Durandy, A. (2003). Activation-induced cytidine deaminase: a dual role in class-switch recombination and somatic hypermutation. *Eur J Immunol* **33**, 2069-73.

- Enssle, J., Moebes, A., Heinkelein, M., Panhuysen, M., Mauer, B., Schweizer, M., Neumann-Haefelin, D. & Rethwilm, A. (1999). An active foamy virus integrase is required for virus replication. *J Gen Virol* **80**, 1445-52.
- Erlwein, O., Cain, D., Fischer, N., Rethwilm, A. & McClure, M. O. (1997). Identification of sites that act together to direct dimerization of human foamy virus RNA in vitro. *Virology* **229**, 251-8.
- Esnault, C., Millet, J., Schwartz, O. & Heidmann, T. (2006). Dual inhibitory effects of APOBEC family proteins on retrotransposition of mammalian endogenous retroviruses. *Nucleic Acids Res* **34**, 1522-31.
- Falcone, V., Leupold, J., Clotten, J., Urbanyi, E., Herchenröder, O., Spatz, W., Volk, B., Bohm, N., Toniolo, A., Neumann-Haefelin, D. & Schweizer, M. (1999). Sites of simian foamy virus persistence in naturally infected African green monkeys: latent provirus is ubiquitous, whereas viral replication is restricted to the oral mucosa. *Virology* **257**, 7-14.
- Fiorentini, S., Marini, E., Caracciolo, S. & Caruso, A. (2006). Functions of the HIV-1 matrix protein p17. *New Microbiol* **29**, 1-10.
- Fisher, A. G., Feinberg, M. B., Josephs, S. F., Harper, M. E., Marselle, L. M., Reyes, G., Gonda, M. A., Aldovini, A., Debouk, C., Gallo, R. C. & et al. (1986). The trans-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication. *Nature* **320**, 367-71.
- Franca, R., Spadari, S. & Maga, G. (2006). APOBEC deaminases as cellular antiviral factors: a novel natural host defense mechanism. *Med Sci Monit* **12**, RA92-8.
- Freed, E. O. (2001). HIV-1 replication. *Somat Cell Mol Genet* **26**, 13-33.
- Freed, E. O. & Martin, M. A. (1995). The role of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins in virus infection. *J Biol Chem* **270**, 23883-6.
- Gabriel, A., Willems, M., Mules, E. H. & Boeke, J. D. (1996). Replication infidelity during a single cycle of Ty1 retrotransposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7767-71.
- Ganser-Pornillos, B. K., Yeager, M. & Sundquist, W. I. (2008). The structural biology of HIV assembly. *Curr Opin Struct Biol* **18**, 203-17.
- Gao, L., Balakrishnan, M., Roques, B. P. & Bambara, R. A. (2007). Insights into the multiple roles of pausing in HIV-1 reverse transcriptase-promoted strand transfers. *J Biol Chem* **282**, 6222-31.
- Georgiadis, M. M., Jessen, S. M., Ogata, C. M., Telesnitsky, A., Goff, S. P. & Hendrickson, W. A. (1995). Mechanistic implications from the structure of a catalytic fragment of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *Structure* **3**, 879-92.

- Giron, M. L., Colas, S., Wybier, J., Rozain, F. & Emanoil-Ravier, R. (1997). Expression and maturation of human foamy virus Gag precursor polypeptides. *J Virol* **71**, 1635-9.
- Gnatt, A. L., Cramer, P., Fu, J., Bushnell, D. A. & Kornberg, R. D. (2001). Structural basis of transcription: an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution. *Science* **292**, 1876-82.
- Goepfert, P. A., Shaw, K., Wang, G., Bansal, A., Edwards, B. H. & Mulligan, M. J. (1999). An endoplasmic reticulum retrieval signal partitions human foamy virus maturation to intracytoplasmic membranes. *J Virol* **73**, 7210-7.
- Goujon, C., Jarrosson-Wuilleme, L., Bernaud, J., Rigal, D., Darlix, J. L. & Cimorelli, A. (2003). Heterologous human immunodeficiency virus type 1 lentiviral vectors packaging a simian immunodeficiency virus-derived genome display a specific postentry transduction defect in dendritic cells. *J Virol* **77**, 9295-304.
- Greatorex, J. & Lever, A. (1998). Retroviral RNA dimer linkage. *J Gen Virol* **79** (Pt 12), 2877-82.
- Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C. S., Pawliuk, R., Morillon, E., Sorensen, R., Forster, A., Fraser, P., Cohen, J. I., de Saint Basile, G., Alexander, I., Wintergerst, U., Frebourg, T., Aurias, A., Stoppa-Lyonnet, D., Romana, S., Radford-Weiss, I., Gross, F., Valensi, F., Delabesse, E., Macintyre, E., Sigaux, F., Soulier, J., Leiva, L. E., Wissler, M., Prinz, C., Rabbitts, T. H., Le Deist, F., Fischer, A. & Cavazzana-Calvo, M. (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* **302**, 415-9.
- Hahn, B. H., Shaw, G. M., De Cock, K. M. & Sharp, P. M. (2000). AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* **287**, 607-14.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-80.
- Harris, R. S., Bishop, K. N., Sheehy, A. M., Craig, H. M., Petersen-Mahrt, S. K., Watt, I. N., Neuberger, M. S. & Malim, M. H. (2003). DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell* **113**, 803-9.
- Harris, R. S. & Liddament, M. T. (2004). Retroviral restriction by APOBEC proteins. *Nat Rev Immunol* **4**, 868-77.
- He, F., Blair, W. S., Fukushima, J. & Cullen, B. R. (1996). The human foamy virus Bel-1 transcription factor is a sequence-specific DNA binding protein. *J Virol* **70**, 3902-8.

- Heinkelein, M., Dressler, M., Jarmy, G., Rammling, M., Imrich, H., Thurow, J., Lindemann, D. & Rethwilm, A. (2002a). Improved primate foamy virus vectors and packaging constructs. *J Virol* **76**, 3774-83.
- Heinkelein, M., Leurs, C., Rammling, M., Peters, K., Hanenberg, H. & Rethwilm, A. (2002b). Pre-genomic RNA is required for efficient incorporation of pol polyprotein into foamy virus capsids. *J Virol* **76**, 10069-73.
- Heinkelein, M., Rammling, M., Juretzek, T., Lindemann, D. & Rethwilm, A. (2003). Retrotransposition and cell-to-cell transfer of foamy viruses. *J Virol* **77**, 11855-8.
- Herchenröder, O., Renne, R., Loncar, D., Cobb, E. K., Murthy, K. K., Schneider, J., Mergia, A. & Luciw, P. A. (1994). Isolation, cloning, and sequencing of simian foamy viruses from chimpanzees (SFVcpz): high homology to human foamy virus (HFV). *Virology* **201**, 187-99.
- Hill, M., Tachedjian, G. & Mak, J. (2005). The packaging and maturation of the HIV-1 Pol proteins. *Curr HIV Res* **3**, 73-85.
- Holmes, R. K., Malim, M. H. & Bishop, K. N. (2007). APOBEC-mediated viral restriction: not simply editing? *Trends Biochem Sci* **32**, 118-28.
- Hu, W. S. & Temin, H. M. (1990). Genetic consequences of packaging two RNA genomes in one retroviral particle: pseudodiploidy and high rate of genetic recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 1556-60.
- Huang, H., Chopra, R., Verdine, G. L. & Harrison, S. C. (1998). Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance. *Science* **282**, 1669-75.
- Hull, R., Covey, S. N. & Maule, A. J. (1987). Structure and replication of caulimovirus genomes. *J Cell Sci Suppl* **7**, 213-29.
- Hung, M., Patel, P., Davis, S. & Green, S. R. (1998). Importance of ribosomal frameshifting for human immunodeficiency virus type 1 particle assembly and replication. *J Virol* **72**, 4819-24.
- Imrich, H., Heinkelein, M., Herchenröder, O. & Rethwilm, A. (2000). Primate foamy virus Pol proteins are imported into the nucleus. *J Gen Virol* **81**, 2941-7.
- Jones, J. S., Allan, R. W. & Temin, H. M. (1994). One retroviral RNA is sufficient for synthesis of viral DNA. *J Virol* **68**, 207-16.
- Juretzek, T., Holm, T., Gärtner, K., Kanzler, S., Lindemann, D., Herchenröder, O., Picard-Maureau, M., Rammling, M., Heinkelein, M. & Rethwilm, A. (2004). Foamy virus integration. *J Virol* **78**, 2472-7.

- Kang, Y., Blair, W. S. & Cullen, B. R. (1998). Identification and functional characterization of a high-affinity Bel-1 DNA binding site located in the human foamy virus internal promoter. *J Virol* **72**, 504-11.
- Katz, R. A. & Skalka, A. M. (1994). The retroviral enzymes. *Annu Rev Biochem* **63**, 133-73.
- Kiem, H. P., Allen, J., Trobridge, G., Olson, E., Keyser, K., Peterson, L. & Russell, D. W. (2007). Foamy-virus-mediated gene transfer to canine repopulating cells. *Blood* **109**, 65-70.
- Kim, T., Mudry, R. A., Jr., Rexrode, C. A., 2nd & Pathak, V. K. (1996). Retroviral mutation rates and A-to-G hypermutations during different stages of retroviral replication. *J Virol* **70**, 7594-602.
- Kobayashi, M., Takaori-Kondo, A., Miyauchi, Y., Iwai, K. & Uchiyama, T. (2005). Ubiquitination of APOBEC3G by an HIV-1 Vif-Cullin5-Elongin B-Elongin C complex is essential for Vif function. *J Biol Chem* **280**, 18573-8.
- Kretzschmar, B., Nowrouzi, A., Hartl, M. J., Gärtner, K., Wiktorowicz, T., Herchenröder, O., Kanzler, S., Rudolph, W., Mergia, A., Wöhrl, B. & Rethwilm, A. (2008). AZT-resistant foamy virus. *Virology* **370**, 151-7.
- Kupiec, J. J., Tobaly-Tapiero, J., Canivet, M., Santillana-Hayat, M., Flugel, R. M., Peries, J. & Emanoil-Ravier, R. (1988). Evidence for a gapped linear duplex DNA intermediate in the replicative cycle of human and simian spumaviruses. *Nucleic Acids Res* **16**, 9557-65.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Lecellier, C. H. & Saib, A. (2000). Foamy viruses: between retroviruses and pararetroviruses. *Virology* **271**, 1-8.
- Lewinski, M. K. & Bushman, F. D. (2005). Retroviral DNA integration--mechanism and consequences. *Adv Genet* **55**, 147-81.
- Liddament, M. T., Brown, W. L., Schumacher, A. J. & Harris, R. S. (2004). APOBEC3F properties and hypermutation preferences indicate activity against HIV-1 in vivo. *Curr Biol* **14**, 1385-91.
- Lindemann, D. & Rethwilm, A. (1998). Characterization of a human foamy virus 170-kilodalton Env-Bet fusion protein generated by alternative splicing. *J Virol* **72**, 4088-94.
- Linial, M. (2000). Why aren't foamy viruses pathogenic? *Trends Microbiol* **8**, 284-9.
- Linial, M. L. (1999). Foamy viruses are unconventional retroviruses. *J Virol* **73**, 1747-55.

- Löchelt, M. & Flügel, R. M. (1996). The human foamy virus pol gene is expressed as a Pro-Pol polyprotein and not as a Gag-Pol fusion protein. *J Virol* **70**, 1033-40.
- Löchelt, M., Flügel, R. M. & Aboud, M. (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**, 638-45.
- Löchelt, M., Romen, F., Bastone, P., Muckenfuss, H., Kirchner, N., Kim, Y. B., Truyen, U., Rosler, U., Battenberg, M., Saib, A., Flory, E., Cichutek, K. & Münk, C. (2005). The antiretroviral activity of APOBEC3 is inhibited by the foamy virus accessory Bet protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 7982-7.
- Luban, J. (2007). Cyclophilin A, TRIM5, and resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* **81**, 1054-61.
- Mandel, R. J., Burger, C. & Snyder, R. O. (2008). Viral vectors for in vivo gene transfer in Parkinson's disease: properties and clinical grade production. *Exp Neurol* **209**, 58-71.
- Mansky, L. M. (1998). Retrovirus mutation rates and their role in genetic variation. *J Gen Virol* **79 (Pt 6)**, 1337-45.
- Mansky, L. M. & Temin, H. M. (1995). Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J Virol* **69**, 5087-94.
- Margottin, F., Bour, S. P., Durand, H., Selig, L., Benichou, S., Richard, V., Thomas, D., Strebel, K. & Benarous, R. (1998). A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Mol Cell* **1**, 565-74.
- McManus, C. M. & Doms, R. W. (2000). Fusion mediated by the HIV-1 envelope protein. *Subcell Biochem* **34**, 457-81.
- Meiering, C. D. & Linial, M. L. (2001). Historical perspective of foamy virus epidemiology and infection. *Clin Microbiol Rev* **14**, 165-76.
- Mergia, A., Leung, N. J. & Blackwell, J. (1996). Cell tropism of the simian foamy virus type 1 (SFV-1). *J Med Primatol* **25**, 2-7.
- Moebes, A., Enssle, J., Bieniasz, P. D., Heinkelein, M., Lindemann, D., Bock, M., McClure, M. O. & Rethwilm, A. (1997). Human foamy virus reverse transcription that occurs late in the viral replication cycle. *J Virol* **71**, 7305-11.
- Motomura, K., Chen, J. & Hu, W. S. (2008). Genetic recombination between human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and HIV-2, two distinct human lentiviruses. *J Virol* **82**, 1923-33.

- Mullis, K. B., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R. K. & Horn, G. T. a. E., H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **51**, 263.
- Mullis, K. B. a. F., F.A. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335.
- Murray, S. M., Picker, L. J., Axthelm, M. K., Hudkins, K., Alpers, C. E. & Linial, M. (2008). Replication in a Superficial Epithelial Cell Niche Explains the Lack of Pathogenicity of Primate Foamy Virus Infections. *J Virol* **82**, 5981-85.
- Newman, E. N., Holmes, R. K., Craig, H. M., Klein, K. C., Lingappa, J. R., Malim, M. H. & Sheehy, A. M. (2005). Antiviral function of APOBEC3G can be dissociated from cytidine deaminase activity. *Curr Biol* **15**, 166-70.
- Nowrouzi, A., Dittrich, M., Klanke, C., Heinkelein, M., Rammling, M., Dandekar, T., von Kalle, C. & Rethwilm, A. (2006). Genome-wide mapping of foamy virus vector integrations into a human cell line. *J Gen Virol* **87**, 1339-47.
- Onafuwa, A., An, W., Robson, N. D. & Telesnitsky, A. (2003). Human immunodeficiency virus type 1 genetic recombination is more frequent than that of Moloney murine leukemia virus despite similar template switching rates. *J Virol* **77**, 4577-87.
- Ottmann, M., Gabus, C. & Darlix, J. L. (1995). The central globular domain of the nucleocapsid protein of human immunodeficiency virus type 1 is critical for virion structure and infectivity. *J Virol* **69**, 1778-84.
- Pahl, A. & Flügel, R. M. (1995). Characterization of the human spuma retrovirus integrase by site-directed mutagenesis, by complementation analysis, and by swapping the zinc finger domain of HIV-1. *J Biol Chem* **270**, 2957-66.
- Parveen, Z., Mukhtar, M., Goodrich, A., Acheampong, E., Dornburg, R. & Pomerantz, R. J. (2004). Cross-packaging of human immunodeficiency virus type 1 vector RNA by spleen necrosis virus proteins: construction of a new generation of spleen necrosis virus-derived retroviral vectors. *J Virol* **78**, 6480-8.
- Pathak, V. K. & Temin, H. M. (1990). Broad spectrum of in vivo forward mutations, hypermutations, and mutational hotspots in a retroviral shuttle vector after a single replication cycle: substitutions, frameshifts, and hypermutations. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 6019-23.
- Peeters, M., Piot, P. & van der Groen, G. (1991). Variability among HIV and SIV strains of African origin. *Aids* **5 Suppl 1**, S29-36.

- Pettit, S. C., Lindquist, J. N., Kaplan, A. H. & Swanstrom, R. (2005). Processing sites in the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Gag-Pro-Pol precursor are cleaved by the viral protease at different rates. *Retrovirology* **2**, 66.
- Pfrepper, K. I., Löchelt, M., Rackwitz, H. R., Schnolzer, M., Heid, H. & Flügel, R. M. (1999). Molecular characterization of proteolytic processing of the Gag proteins of human spumavirus. *J Virol* **73**, 7907-11.
- Pietschmann, T., Heinkelein, M., Heldmann, M., Zentgraf, H., Rethwilm, A. & Lindemann, D. (1999). Foamy virus capsids require the cognate envelope protein for particle export. *J Virol* **73**, 2613-21.
- Pietschmann, T., Zentgraf, H., Rethwilm, A. & Lindemann, D. (2000). An evolutionarily conserved positively charged amino acid in the putative membrane-spanning domain of the foamy virus envelope protein controls fusion activity. *J Virol* **74**, 4474-82.
- Renshaw, R. W., Gonda, M. A. & Casey, J. W. (1991). Structure and transcriptional status of bovine syncytial virus in cytopathic infections. *Gene* **105**, 179-84.
- Rethwilm, A. (2007a). Foamy virus vectors: an awaited alternative to gammaretro- and lentiviral vectors. *Curr Gene Ther* **7**, 261-71.
- Rethwilm, A. (2007b). Foamy Viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **277**.
- Rethwilm, A., Baunach, G., Netzer, K. O., Maurer, B., Borisch, B. & ter Meulen, V. (1990). Infectious DNA of the human spumaretrovirus. *Nucleic Acids Res* **18**, 733-8.
- Rethwilm, A., Erlwein, O., Baunach, G., Maurer, B. & ter Meulen, V. (1991). The transcriptional transactivator of human foamy virus maps to the bel 1 genomic region. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 941-5.
- Rhodes, T., Wargo, H. & Hu, W. S. (2003). High rates of human immunodeficiency virus type 1 recombination: near-random segregation of markers one kilobase apart in one round of viral replication. *J Virol* **77**, 11193-200.
- Riggs, J. L., Oshirls, Taylor, D. O. & Lennette, E. H. (1969). Syncytium-forming agent isolated from domestic cats. *Nature* **222**, 1190-1.
- Roberts, J. D., Bebenek, K. & Kunkel, T. A. (1988). The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* **242**, 1171-3.
- Rose, P. P. & Korber, B. T. (2000). Detecting hypermutations in viral sequences with an emphasis on G --> A hypermutation. *Bioinformatics* **16**, 400-1.
- Roy, J., Rudolph, W., Juretzek, T., Gärtner, K., Bock, M., Herchenröder, O., Lindemann, D., Heinkelein, M. & Rethwilm, A. (2003). Feline foamy virus genome and replication strategy. *J Virol* **77**, 11324-31.

- Russell, D. W. & Miller, A. D. (1996). Foamy virus vectors. *J Virol* **70**, 217-22.
- Russell, R. A., Wiegand, H. L., Moore, M. D., Schafer, A., McClure, M. O. & Cullen, B. R. (2005). Foamy virus Bet proteins function as novel inhibitors of the APOBEC3 family of innate antiretroviral defense factors. *J Virol* **79**, 8724-31.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T. & Erlich, H. A. a. A., N. (1985). Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-7.
- Sarkar, I., Hauber, I., Hauber, J. & Buchholz, F. (2007). HIV-1 proviral DNA excision using an evolved recombinase. *Science* **316**, 1912-5.
- Schatz, O., Mous, J. & Le Grice, S. F. (1990). HIV-1 RT-associated ribonuclease H displays both endonuclease and 3'----5' exonuclease activity. *Embo J* **9**, 1171-6.
- Schliephake, A. W. & Rethwilm, A. (1994). Nuclear localization of foamy virus Gag precursor protein. *J Virol* **68**, 4946-54.
- Schmidt, M. & Rethwilm, A. (1995). Replicating foamy virus-based vectors directing high level expression of foreign genes. *Virology* **210**, 167-78.
- Schweizer, M., Turek, R., Hahn, H., Schliephake, A., Netzer, K. O., Eder, G., Reinhardt, M., Rethwilm, A. & Neumann-Haefelin, D. (1995). Markers of foamy virus infections in monkeys, apes, and accidentally infected humans: appropriate testing fails to confirm suspected foamy virus prevalence in humans. *AIDS Res Hum Retroviruses* **11**, 161-70.
- Sharma, P. L., Nurpeisov, V. & Schinazi, R. F. (2005). Retrovirus reverse transcriptases containing a modified YXDD motif. *Antivir Chem Chemother* **16**, 169-82.
- Shaw, K. L., Lindemann, D., Mulligan, M. J. & Goepfert, P. A. (2003). Foamy virus envelope glycoprotein is sufficient for particle budding and release. *J Virol* **77**, 2338-48.
- Sheehy, A. M., Gaddis, N. C., Choi, J. D. & Malim, M. H. (2002). Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* **418**, 646-50.
- Sheehy, A. M., Gaddis, N. C. & Malim, M. H. (2003). The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat Med* **9**, 1404-7.
- Shehu-Xhilaga, M., Crowe, S. M. & Mak, J. (2001). Maintenance of the Gag/Gag-Pol ratio is important for human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization and viral infectivity. *J Virol* **75**, 1834-41.

- Soneoka, Y., Cannon, P. M., Ramsdale, E. E., Griffiths, J. C., Romano, G., Kingsman, S. M. & Kingsman, A. J. (1995). A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res* **23**, 628-33.
- Stange, A., Mannigel, I., Peters, K., Heinkelein, M., Stanke, N., Cartellieri, M., Gottlinger, H., Rethwilm, A., Zentgraf, H. & Lindemann, D. (2005). Characterization of prototype foamy virus gag late assembly domain motifs and their role in particle egress and infectivity. *J Virol* **79**, 5466-76.
- Strappe, P. M., Hampton, D. W., Brown, D., Cachon-Gonzalez, B., Caldwell, M., Fawcett, J. W. & Lever, A. M. (2005). Identification of unique reciprocal and non reciprocal cross packaging relationships between HIV-1, HIV-2 and SIV reveals an efficient SIV/HIV-2 lentiviral vector system with highly favourable features for in vivo testing and clinical usage. *Retrovirology* **2**, 55.
- Strebel, K., Klimkait, T. & Martin, M. A. (1988). A novel gene of HIV-1, vpu, and its 16-kilodalton product. *Science* **241**, 1221-3.
- Svarovskaia, E. S., Cheslock, S. R., Zhang, W. H., Hu, W. S. & Pathak, V. K. (2003). Retroviral mutation rates and reverse transcriptase fidelity. *Front Biosci* **8**, d117-34.
- Switzer, W. M., Garcia, A. D., Yang, C., Wright, A., Kalish, M. L., Folks, T. M. & Heneine, W. (2008). Coinfection with HIV-1 and Simian Foamy Virus in West Central Africans. *J Infect Dis* **197**, 1389-93.
- Switzer, W. M., Salemi, M., Shanmugam, V., Gao, F., Cong, M. E., Kuiken, C., Bhullar, V., Beer, B. E., Vallet, D., Gautier-Hion, A., Tooze, Z., Villinger, F., Holmes, E. C. & Heneine, W. (2005). Ancient co-speciation of simian foamy viruses and primates. *Nature* **434**, 376-80.
- Switzer, W. M., Shanmugam, V., Bhullar, V. B., Folks, T. M., Boneva, R. S., Chapman, L. E. & Heneine, W. (2002). Virus Recovery from the Oral Mucosa and Evidence of Viral Quasispecies and Tissue Compartmentalization in an SFVcpz.infected Person. In *Fourth International Conference on Foamy Viruses*. Atlanta, GA, USA.
- Temin, H. M. (1993). Retrovirus variation and reverse transcription: abnormal strand transfers result in retrovirus genetic variation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 6900-3.
- Temin, H. M. & Mizutani, S. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* **226**, 1211-3.
- Thomas, M. J., Platas, A. A. & Hawley, D. K. (1998). Transcriptional fidelity and proofreading by RNA polymerase II. *Cell* **93**, 627-37.

- Thümer, L., Rethwilm, A., Holmes, E. C. & Bodem, J. (2007). The complete nucleotide sequence of a New World simian foamy virus. *Virology* **369**, 191-7.
- Tobaly-Tapiero, J., Bittoun, P., Neves, M., Guillemin, M. C., Lecellier, C. H., Puvion-Dutilleul, F., Gicquel, B., Zientara, S., Giron, M. L., de The, H. & Saib, A. (2000). Isolation and characterization of an equine foamy virus. *J Virol* **74**, 4064-73.
- Tobaly-Tapiero, J., Kupiec, J. J., Santillana-Hayat, M., Canivet, M., Peries, J. & Emanoil-Ravier, R. (1991). Further characterization of the gapped DNA intermediates of human spumavirus: evidence for a dual initiation of plus-strand DNA synthesis. *J Gen Virol* **72 (Pt 3)**, 605-8.
- Trobridge, G. D., Miller, D. G., Jacobs, M. A., Allen, J. M., Kiem, H. P., Kaul, R. & Russell, D. W. (2006). Foamy virus vector integration sites in normal human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1498-503.
- Van Heuverswyn, F., Li, Y., Neel, C., Bailes, E., Keele, B. F., Liu, W., Loul, S., Butel, C., Liegeois, F., Bienvenue, Y., Ngolle, E. M., Sharp, P. M., Shaw, G. M., Delaporte, E., Hahn, B. H. & Peeters, M. (2006). Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. *Nature* **444**, 164.
- Van Maele, B., De Rijck, J., De Clercq, E. & Debyser, Z. (2003). Impact of the central polypurine tract on the kinetics of human immunodeficiency virus type 1 vector transduction. *J Virol* **77**, 4685-94.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**, RESEARCH0034.
- Vartanian, J. P., Meyerhans, A., Sala, M. & Wain-Hobson, S. (1994). G-->A hypermutation of the human immunodeficiency virus type 1 genome: evidence for dCTP pool imbalance during reverse transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 3092-6.
- Verschoor, E. J., Langenhuijzen, S., Bontjer, I., Fagrouch, Z., Niphuis, H., Warren, K. S., Eulenberger, K. & Heeney, J. L. (2004). The phylogeography of orangutan foamy viruses supports the theory of ancient repopulation of Sumatra. *J Virol* **78**, 12712-6.
- Vink, C., Oude Groeneger, A. M. & Plasterk, R. H. (1993). Identification of the catalytic and DNA-binding region of the human immunodeficiency virus type I integrase protein. *Nucleic Acids Res* **21**, 1419-25.
- Wain-Hobson, S., Sonigo, P., Danos, O., Cole, S. & Alizon, M. (1985). Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. *Cell* **40**, 9-17.

- Wei, M., Xing, H., Hong, K., Huang, H., Tang, H., Qin, G. & Shao, Y. (2004). Biased G-to-A hypermutation in HIV-1 proviral DNA from a long-term non-progressor. *Aids* **18**, 1863-5.
- Wiegand, H. L., Doehle, B. P., Bogerd, H. P. & Cullen, B. R. (2004). A second human antiretroviral factor, APOBEC3F, is suppressed by the HIV-1 and HIV-2 Vif proteins. *Embo J* **23**, 2451-8.
- Wilson, W., Braddock, M., Adams, S. E., Rathjen, P. D., Kingsman, S. M. & Kingsman, A. J. (1988). HIV expression strategies: ribosomal frameshifting is directed by a short sequence in both mammalian and yeast systems. *Cell* **55**, 1159-69.
- Yang, S. & Temin, H. M. (1994). A double hairpin structure is necessary for the efficient encapsidation of spleen necrosis virus retroviral RNA. *Embo J* **13**, 713-26.
- Yin, P. D. & Hu, W. S. (1997). RNAs from genetically distinct retroviruses can copackage and exchange genetic information in vivo. *J Virol* **71**, 6237-42.
- Yu, Q., Konig, R., Pillai, S., Chiles, K., Kearney, M., Palmer, S., Richman, D., Coffin, J. M. & Landau, N. R. (2004). Single-strand specificity of APOBEC3G accounts for minus-strand deamination of the HIV genome. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 435-42.
- Yu, S. F., Baldwin, D. N., Gwynn, S. R., Yendapalli, S. & Linial, M. L. (1996a). Human foamy virus replication: a pathway distinct from that of retroviruses and hepadnaviruses. *Science* **271**, 1579-82.
- Yu, S. F., Edelmann, K., Strong, R. K., Moebes, A., Rethwilm, A. & Linial, M. L. (1996b). The carboxyl terminus of the human foamy virus Gag protein contains separable nucleic acid binding and nuclear transport domains. *J Virol* **70**, 8255-62.
- Yu, S. F., Sullivan, M. D. & Linial, M. L. (1999). Evidence that the human foamy virus genome is DNA. *J Virol* **73**, 1565-72.
- Zhang, J. & Temin, H. M. (1994). Retrovirus recombination depends on the length of sequence identity and is not error prone. *J Virol* **68**, 2409-14.
- Zhang, X. B., Beard, B. C., Trobridge, G. D., Wood, B. L., Sale, G. E., Sud, R., Humphries, R. K. & Kiem, H. P. (2008). High incidence of leukemia in large animals after stem cell gene therapy with a HOXB4-expressing retroviral vector. *J Clin Invest* **118**, 1502-1510.
- Zhuang, J., Mukherjee, S., Ron, Y. & Dougherty, J. P. (2006). High rate of genetic recombination in murine leukemia virus: implications for influencing proviral ploidy. *J Virol* **80**, 6706-11.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Adenin
A. dest	destilliertes Wasser
AID	Activation-induced Cytidine Deaminase
APOBEC	apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like complex 3
AZT	Azidothymidin
BLV	Bovines Leukämievirus
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CA	Kapsid
CAS	cis-aktive Sequenz
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
CIAP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase
CMV	Cytomegalievirus
cPPT	zentraler Polypurintrakt
CRM1	chromosome maintenance region 1
ddNTP	Didesoxynukleotid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid
dsDNA	Doppelsträngige DNA
EB	Ethidiumbromid
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	enhanced green fluorescing proteine
env	Envelope Protein
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FCS	Fötale Kälberserum
FSC	Forward Scatter
FV	Foamyvirus
g	Fallbeschleunigung
G	Guanin
gag	Gruppenspezifisches Antigen
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GR-Box	Glycin-Arginin-reiche Box

hA3F	humanes APOBEC3G
hA3G	humanes APOBEC3F
HFV	Humanes Foamyvirus
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HTLV	Humanes T-Zell ymphotropes Virus
Hygro	Hygromycin
IN	Integrase
IP	interner Promoter
iPPT	interner Polypurintrakt
IRES	interne Ribosomenbindungsstelle
IRT	intrazelluläre Retrotransposition
kb	Kilobasen
LP	Leaderpeptid
M	molar
MA	Matrix
min	Minuten
MLV	Murines Leukämievirus
mM	Millimolar
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MOI	multiplicity of infection
MPMV	Mason-Pfizer Monkey Virus
mRNA	messenger RNA
MSD	membranspannende Domäne
NC	Nukleokapsid
Neo	Neomycin
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
nm	Nanometer
<i>orf</i>	open reading frame (offener Leserahmen)
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells; periphere mononukleäre Blutzellen
pbs	Primerbindungsstelle
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PEI	Polyethylenimin
PFV	Prototypisches Foamyvirus
pmol	Pikomol
pol	Polymerase
PPP	Proteinprobenpuffer
PR	Protease
qRT-PCR	quantitative RealTime PCR

RNA	Ribonukleinsäure
RNaseH	RibonukleaseH
RRE	Rev-responsible Element
RT	Reverse Transkriptase
RV	Retrovirus
SDHA	Succinat-Dehydrogenase, Untereinheit A
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunden
SFFV	Spleen Focus Forming Virus
SFV	Simian Foamyvirus
SIV	Simian Immundefizienzvirus
SNV	Spleen Nekrose Virus
SSC	Side Scatter
SU	Surface-Untereinheit
T	Thymin
TAE	Tris-Azetat-Puffer
TAR	transactivator responsive element
Tas	Transaktivator von Spumaviren
Tat	Transaktivator von HIV-1
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TM	Transmembranuntereinheit
U	Uracil
UV	ultraviolett
Vif	virion infectivity factor
VLP	virus like particle (subvirales Partikel)
v_{\max}	maximale Geschwindigkeit
z. B.	zum Beispiel

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. 1: (A) Genomorganisation, (B) RNAs, (C) Strukturproteine und Enzyme von PFV	5
Abb. 1. 2: (A) Genomorganisation, (B) Strukturproteine und Enzyme von HIV-1	6
Abb. 1. 3: Vergleich eines foamyviralen mit einem HIV-1-Partikel	7
Abb. 1. 4: Der foamyvirale Replikationszyklus	14
Abb. 1. 5: Replikationszyklus der Orthoretroviren am Beispiel von HIV-	15
Abb. 1. 6: Reverse Transkription bei Retroviren	17
Abb. 1. 7: Ereignis des Template Switchings während der Reversen Transkription	19
Abb. 1. 8: Wirkung von APOBEC3G und Vif auf die Synthese des retroviralen Genoms	23
Abb. 2. 1: Für diese Arbeit konstruierte und verwendete Vektoren	32
Abb. 3. 1: Kassette des Vektors pKG83 zur Bestimmung der in-vivo Mutationrate bei PFV	61
Abb. 3. 2: PCR aus genomischer DNA von pKG83-Einzelzellklonen	62
Abb. 3. 3: Annealing des lacZ α -Fragments des Einzelzellklons 83/060 mit der Ausgangssequenz von pKG83	64
Abb. 3. 4: Westernblot von Zelllysaten aus 293T-Zellen zum Testen auf hA3G-Expression	64
Abb. 3. 5: RealTime PCR zur Bestimmung der Expression von hA3G	66
Abb. 3. 6: RealTime PCR; zur Bestimmung der Expression von hA3F	67
Abb. 3. 7: Standardkurven von hA3G und hA3F	69
Abb. 3. 8: Normalisierung der hA3G- und hA3F-Proteine	70
Abb. 3. 9: Anzahl der Mutationen in den Versuchen mit und ohne Bet	72
Abb. 3. 11: Kassette der PFV- und MLV-Expressionsplasmide zur Bestimmung der TS-Rate	74
Abb. 3. 12: Formel zur Berechnung der Template-Switching-Rate	79
Abb. 3. 13: Verdauemuster der PCR-Produkte der Inserts der Einzelzellklone	80
Abb. 3. 14: Verdauung einiger Einzelzellklone der doppelresistenten PFV-Klone (A) bzw. MLV-Klone (B)	81
Abb. 3. 15: Expressionskassetten der Plasmide pKG84 und pEGFPD zur Bestimmung des Crosspackaging	83
Abb. 3. 16: Titerbestimmung des Crosspackaging der verschiedenen Foamyviren	85
Abb. 3. 17: Westernblots der Zelllysate und Partikelpräparationen	87
Abb. 4. 1: Analyse der flankierenden Sequenzen der Deletion in Klon 83B/231	92

6.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 2. 1: E.coli-Stämme	29
Tab. 2. 2: Zelllinien	29
Tab. 2. 3: Vektoren	29
Tab. 2. 4: Expressionsplasmide für die Herstellung stabiler Zelllinien	30
Tab. 2. 5: Primer	33
Tab. 2. 6: Temperaturregime zur Amplifikation von cDNA	36
Tab. 2. 7: PCR-Temperaturregime zur DNA-Amplifizierung	37
Tab. 2. 8: Temperaturregime für eine Sequenzier-PCR	39
Tab. 2. 9: Temperaturregime einer RealTime PCR mit Schmelzpunktbestimmung	40
Tab. 2. 10: Übersicht von Agarosekonzentrationen zur Auftrennung von DNA-Proben	42
Tab. 2. 11: Übersicht der eingesäten Zellzahlen für Transfektionen und Infektionen	49
Tab. 2. 12: eingesetzte Transfektionsmengen	50
Tab. 2. 13: Antibiotikakonzentrationen zur Selektion von 293-Zellen	53
Tab. 3. 1: Selektion mit den verschiedenen Antibiotika und Wachstum der selektierten Zellen	75
Tab. 3. 2: Titerbestimmung der Ausgangsplasmide zur Expressionsbestimmung	76
Tab. 3. 3: Titerbestimmung der mit heterologen Plasmiden und Template Switching Rate	78
Tab. 3. 4: Kombination der verschiedenen Vektoren für Crosspackaging-Experimente	84
Tab. 4. 1: APOBEC-Konzentrationen in den verwendeten Zelllinien	91
Tab. 4. 2: Daten der Template Switching Raten	96
Tab. 4. 3: Transduktionseffizienzen bei der Verpackung der unterschiedlichen Foamyvirus-Genome	99

6.4 Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Kathleen Gärtner
Geburtsdatum: 13.04.80
Geburtsort: Freital (Sachsen)

Ausbildung:

1986-1991 Grundschule Dippoldiswalde
 1991-1998 „Glückauf“-Gymnasium Dippoldiswalde
 Abschluss: Abitur
 10/1998-09/2000 Grundstudium Biologie an der TU Dresden
 Abschluss: Vordiplom
 10/2000-09/2003 Hauptstudium Biologie an der TU Dresden
 Abschluss: Diplom
 Thema der Diplomarbeit: Molekularbiologische Untersuchungen zur
 nukleären Lokalisation der Pol-Proteine des prototypischen Foamyvirus
 10/2003-06/2008 Dissertation an der Julius Maximilians Universität Würzburg
 Thema der Dissertation: Abschätzung der Genauigkeit der
 foamyviralen Genomreplikation

Praktika und Nebenbeschäftigungen:

04/2000 – 11/2002: Wissenschaftliche Mitarbeiterin der TU Dresden, Dresden
 - am Institut für Mikrobiologie
 - am Institut für Virologie
 05/2002: 4-wöchiges Praktikum bei der Firma CARDION, Erkrath

6.5 Veröffentlichungen:

Publikationsliste:

Gärtner, K., Wiktorowicz, T., Park, J., Mergia, A., Rethwilm, A., Scheller, C. (2008). Accuracy estimation of foamy virus genome copying. *J Virol*; (eingereicht am 03.07.2008)

Kretzschmar, B., Nowrouzi, A., Hartl, M. J., **Gärtner, K.**, Wiktorowicz, T., Herchenröder, O., Kanzler, S., Rudolph, W., Mergia, A., Wöhr, B. & Rethwilm, A. (2008). AZT-resistant foamy virus. *Virology* **370**, 151-7.

Peters, K., Barg, N., **Gärtner, K.** & Rethwilm, A. (2007). Complex effects of foamy virus central purine-rich regions on viral replication. *Virology*.

Juretzek, T., Holm, T., **Gärtner, K.**, Kanzler, S., Lindemann, D., Herchenröder, O., Picard-Maureau, M., Rammling, M., Heinkelein, M. & Rethwilm, A. (2004). Foamy virus integration. *J Virol* **78**, 2472-7.

Roy, J., Rudolph, W., Juretzek, T., **Gärtner, K.**, Bock, M., Herchenröder, O., Lindemann, D., Heinkelein, M. & Rethwilm, A. (2003). Feline foamy virus genome and replication strategy. *J Virol* **77**, 11324-31.

Kongressbeiträge:

08/2006 6th International Foamyvirus Conference, Seattle, USA

07/2004 5th International Foamyvirus Conference, Würzburg, Deutschland

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation „Molekularbiologische Analysen der foamyviralen Reversen Transkriptase und Crosspackaging unterschiedlicher Foamyviren“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

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

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

Kathleen Gärtner

Würzburg, 07.07.2008

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Axel Rethwilm für die Betreuung und Bereitstellung des Themas bedanken. Durch sein ständiges Interesse, seine Unterstützung und seine Geduld hat er dazu beigetragen, dass mir die Bearbeitung der gestellten Aufgaben viel Freude bereitet hat.

Herrn Prof. Roy Gross danke ich sehr herzlich, dass er sich als Zweitgutachter dieser Arbeit zur Verfügung gestellt hat.

Weiterhin geht ein herzlicher Dank an Dr. Carsten Scheller, der mit neuen Ideen, vielen Anregungen und Diskussionen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Bei Benedikt Weißbrich und seinem „Sequenzierteam“ möchte ich mich für die Durchführungen ungezählter Sequenzierreaktionen bedanken.

Ich danke Tatiana, Anita, Katrin und Diana, die durch das Korrekturlesen der Dissertation, den logischen Aufbau der Arbeit gewährleistet und den Fehlerteufel in seine Grenzen gewiesen haben.

Für ihre Unterstützung und seelischen Aufbauarbeiten bedanke ich mich bei allen aktiven und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Rethwilm und Scheller. Besonders erwähnen möchte ich Tatiana, die mit mir während ungezählter „Schnickers-Längen“ für die Aufrechterhaltung des psychischen Gleichgewichts gesorgt hat.

Ich danke ganz besonders meinen Eltern und meinen Schwestern, die mich in meinen Unterscheidungen immer unterstützt und ihr Interesse gezeigt haben, auch wenn sie teilweise Schwierigkeiten hatten, den Erklärungen zu meiner Arbeit zu folgen.